

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

QUERCETİNİN, ROSMARİNİK ASİTİN VE
QUERCETİN&ROSMARİNİK ASİT KOMBİNASYONUNUN
METOTREKSATA BAĞLI TESTİS HASARINA ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Abdülkadir KUTLU

TRABZON – 2022

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

QUERCETİNİN, ROSMARİNİK ASİTİN VE
QUERCETİN&ROSMARİNİK ASİT KOMBİNASYONUNUN
METOTREKSATA BAĞLI TESTİS HASARINA ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Abdülkadir KUTLU

Tez Danışmanı Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

TRABZON – 2022

ÖNSÖZ

Tez çalışmamı tamamlamamda bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok kıymetli hocalarım Prof. Dr. Engin YENİLMEZ, Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Prof. Dr. Esin YULUĞ, Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN'a; Prof. Dr. Ahmet ALVER hocam vasıtasıyla tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'na; tez çalışmamın her aşamasında yardımlarıyla yanımda olan eşim Birgül GÜR KUTLU'ya, emek ve özverileriyle bugünlere gelmeme vesile olan saygıdeğer aileme ve birlikte çalıştığım değerli mesai arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım...



ÖZET

Quercetin, Rosmarinik Asit ve Quercetin & Rosmarinik Asit Kombinasyonunun Metotreksata Bağlı Testis Hasarına Etkileri

Araştırmamızda 40 adet Sprague Dawley cinsi erişkin erkek sıçan rastgele 5 eşit gruba ayrıldı. 7 günlük deney sürecinde Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmazken MTX, MTX+QT, MTX+RA ve MTX+QT+RA gruplarına deneyin 5. günü intraperitoneal yolla tek doz 30 mg/kg metotreksat uygulandı. Deney süresi boyunca her gün gavaj yoluyla; MTX+QT grubuna 30 mg/kg quercetin, MTX+RA grubuna 30 mg/kg rosmarinik asit, MTX+QT+RA grubuna ise 15 mg/kg quercetin ve 15 mg/kg rosmarinik asit verildi. Denekler 1, 4 ve 7. günlerde tartıldı. 7. günün sonunda anestezi altında kurban edilen deneklerden alınan; kan örnekleri biyokimya tüplerine, sol epididimis dokuları tris tamponu içeren petri kaplarına, sağ epididimis dokuları %10'luk formaldehit solüsyonuna, sol testis dokularının bir yarısı Bouin solüsyonuna, diğer yarısı ise biyokimyasal incelemeler için eppendorf tüplerine koyuldu. Sol testis dokuları ikiye bölünmeden önce tartıldı. Yapılan tartımlar ve alınan örneklerle; vücut ve testis kütle analizleri, sperm analizleri, kan testosteron ve doku MDA, doku SOD, doku GPx, doku CAT ölçümleri, hematoxilen&eozen, Masson trikrom, periyodik asit Schiff ve TUNEL boyamaları yapıldı.

Değerlendirilen veriler ışığında elde ettiğimiz sonuçlar; metotreksatın testiste fizyolojik, histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak hasara neden olduğunu; verilen antioksidan tedavilerinin, bozulan parametrelerin neredeyse hepsinde, çoğu zaman kısmi bazen ise tama yakın düzeltmeler yaptığını gösterdi. Tedavi gruplarının bazı parametrelerde başarı konusunda birbirlerine üstünlük kurdukları gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, quercetin, rosmarinik asit, testis, toksikoloji

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TTU-2021-9136

SUMMARY

The Effects of Quercetin, Rosmarinic Acid and Quercetin & Rosmarinic Acid Combination on Methotrexate Induced Testicular Injury

In this study, 40 Sprague Dawley adult male rats were randomly divided into 5 equal groups. No application was made to the control group during the 7-day experiment. A single dose of 30 mg/kg methotrexate was administered intraperitoneally to the MTX, MTX+QT, MTX+RA and MTX+QT+RA groups on the 5th day of the experiment. During the experimental period; MTX+QT group received 30 mg/kg quercetin, MTX+RA group received 30 mg/kg rosmarinic acid, MTX+QT+RA group received 15 mg/kg quercetin and 15 mg/kg rosmarinic acid daily by gavage. Rats were weighed on days 1, 4 and 7. At the end of the 7th day, the rats were sacrificed under anesthesia. Blood samples were placed in biochemistry tubes. Left epididymis were placed in petri dishes containing tris buffer. Right epididymis were placed in 10% formaldehyde solution. One half of the left testicular tissues were placed in Bouin solution, and the other half in eppendorf tubes for biochemical examinations. Left testis tissues were weighed before dividing into two. By using weighing results and tissue samples; body and testis mass analysis, sperm analysis, blood testosterone and tissue MDA, tissue SOD, tissue GPx, tissue CAT measurements, hematoxylin&eosin, Masson trichrome, periodic acid Schiff and TUNEL stainings were performed.

The results showed that methotrexate caused physiological, histopathological, immunohistochemical and biochemical damage to the testis, and that 3 different antioxidant treatments made mostly partial and sometimes complete corrections in almost all of the deteriorated parameters. It was observed that the treatment groups were superior to each other in terms of success in some parameters.

Key Words: Methotrexate, quercetin, rosmarinic acid, testis, toxicology

This study was supported by Karadeniz Technical University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project number: TTU-2021-9136

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖZET	ii
SUMMARY	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Embriyolojisi	3
2.2. Testis Anatomisi	4
2.3. Testis Histolojisi	5
2.3.1. Seminifer Tübül	6
2.3.2. Sertoli Hücreleri ve Kan Testis Bariyeri	6
2.3.3. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücreleri	7
2.3.4. Spermatogenez ve Spermatogenik Hücreler	8
2.4. Epididimis Histolojisi	9
2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	10
2.6. Metotreksat	11
2.7. Quercetin	13

2.8. Rosmarinik Asit	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği	17
3.2. Deney Süreci ve Numunelerin Eldesi	17
3.3. Sperm Analizi	19
3.4. Deney Sürecinde Kullanılan Solüsyonlar	20
3.4.1. Tris Tamponu	20
3.4.2. Bouin Fiksatif	20
3.4.3. %10'luk Formaldehit Fiksatif	21
3.5. Histopatolojik Değerlendirmeye Hazırlık	21
3.5.1. Testis Dokularının Hazırlanması	21
3.5.2. Epididimis Dokularının Hazırlanması	26
3.6. Histopatolojik İncelemeler	27
3.6.1. Hematoksilen & Eozin Boyalı Preparatlar	27
3.6.2. Masson Trikrom Boyalı Preparatlar	28
3.6.3. Periyodik Asit Schiff Boyalı Preparatlar	29
3.7. İmmünohistokimyasal İncelemeler	29
3.8. Biyokimyasal Değerlendirmeye Hazırlık	29
3.9. Biyokimyasal İncelemeler	30
3.9.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	30
3.9.2. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi	32
3.9.3. Protein Miktar Tayini	33

3.9.4. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü	34
3.9.5. GPx Enzim Aktivitesinin Ölçümü	36
3.9.6. Serum Testosteron Seviyesinin Ölçümü	37
3.10. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. Tartım Sonuçları	39
4.2. Sperm Analiz Sonuçları	41
4.3. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	45
4.3.1. Hematoksilen & Eozin Boyalı Preparatlar	45
4.3.2. Masson Trikrom Boyalı Preparatlar	60
4.3.3. Periyodik Asit Schiff Boyalı Preparatlar	65
4.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları	68
4.5. Biyokimyasal Değerlendirme Sonuçları	72
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	84
7. KAYNAKLAR	88

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABP	: Androjen bağlayıcı protein
AI	: Apoptotik indeks
AMH	: Antimüllerian hormon
BSA	: Bovin serum albumin
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FSH	: Follikül stimüle edici hormon
GPx	: Glutasyon peroksidaz
HCG	: İnsan koryonik gonadotropini
H&E	: Hematoksilen eozin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
i.p.	: İntraperitoneal
KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
MTX	: Metotreksat
MDA	: Malondialdehid
OH[•]	: Hidroksil radikali
O[•]	: Tekli oksijen
O₂^{•-}	: Süperoksit anyonu
PAS	: Periyodik asit Schiff
RA	: Rosmarinik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SF	: Serum fizyolojik
TBA	: Tiyoarbiturik asit
TBF	: Testis belirleyici faktör
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay
QT	: Quercetin

Simgeler

°C	: Santigrad derece
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
gr	: Gram
nm	: Nanometre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
µm	: Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1:	Metotreksatın molekül yapısı	12
Şekil 2:	Quercetin molekül yapısı	14
Şekil 3:	Rosmarinik asit molekül yapısı	15
Şekil 4:	SOD aktivitesi hesabında kullanılan standart grafiği	31
Şekil 5:	Protein tayininde kullanılan standart grafiği	34
Şekil 6:	Protein fazlarda MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği	35
Şekil 7:	MDA seviyesini belirlemek için yapılan protein tayininde kullanılan standart grafiği	36
Şekil 8:	GPx kontrol grafiği	37
Şekil 9:	GPx aktivitesini belirlemek için yapılan protein tayininde kullanılan standart grafiği	37
Şekil 10:	Serum testosteron ölçümünde kullanılan standart grafiği	38
Şekil 11:	Grupların deney sürecinde vücut kütle değişimleri	39
Şekil 12:	Grupların deney sonu testis kütleleri	40
Şekil 13:	Grupların testis kütle indeksleri	41
Şekil 14:	Grupların toplam sperm sayıları	42
Şekil 15:	Grupların sperm canlılık oranları	43
Şekil 16:	Grupların normal morfolojili sperm oranları	44
Şekil 17:	Grupların sperm motilite oranları	45
Şekil 18:	Grupların seminifer tübül çapları	49
Şekil 19:	Grupların germinal epitel kalınlıkları	50
Şekil 20:	Grupların germinal epitel kalınlığı / seminifer tübül çapı oranları	51
Şekil 21:	Grupların lümenine germinal hücre dökülmüş tübül sayısı oranları	53
Şekil 22:	Grupların modifiye Johnson skorları	54
Şekil 23:	Grupların vakuollü tübül sayıları	56
Şekil 24:	Grupların toplam vakuol sayıları	56

Şekil 25:	Grupların germinal epitelinde ayrılma içeren tübül sayıları (%)	57
Şekil 26:	Grupların içerdikleri toplam ayrılma sayıları	58
Şekil 27:	Grupların germinal epitelde içerdikleri toplam mikrovakuolizasyon sayıları	59
Şekil 28:	Grupların interstisyel bağ dokusu hasar skorları	61
Şekil 29:	Grupların bazal membran hasar skorları	65
Şekil 30:	Grupların apoptotik indeksleri (%)	69
Şekil 31:	Grupların doku MDA seviyeleri	72
Şekil 32:	Grupların doku SOD aktiviteleri	73
Şekil 33:	Grupların doku GPx aktiviteleri	74
Şekil 34:	Grupların doku CAT aktiviteleri	75
Şekil 35:	Grupların kan testosteron seviyeleri	76

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1:	Standart doku takip prosedürü	22
Tablo 2:	Hematoksilen & eozin boyama prosedürü	23
Tablo 3:	Deparafinizasyon programı	24
Tablo 4:	Masson trikrom boyama protokolü	24
Tablo 5:	Periyodik asit Schiff boyama protokolü	25
Tablo 6:	TUNEL boyama protokolü	26
Tablo 7:	Modifiye Johnson skorumla kriterleri	28
Tablo 8:	SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları	31
Tablo 9:	Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı	32
Tablo 10:	MDA seviyesi için yapılan reaksiyon karışımı	35
Tablo 11:	Grupların 1, 4 ve 7. günlerdeki vücut kütleleri (gr)	39
Tablo 12:	Grupların deney sürecindeki vücut kütle değişim yüzdeleri	40
Tablo 13:	Grupların deney sonu testis kütleleri (gr)	40
Tablo 14:	Grupların testis kütle indeksleri (%)	41
Tablo 15:	Grupların toplam sperm sayıları (10^6 /ml)	42
Tablo 16:	Grupların sperm canlılık oranları (%)	42
Tablo 17:	Grupların normal morfolojili sperm oranları (%)	43
Tablo 18:	Grupların sperm motilite oranları (%)	45
Tablo 19:	Grupların seminifer tübül çapları (μ m)	49
Tablo 20:	Grupların germinal epitel kalınlıkları (μ m)	50
Tablo 21:	Grupların germinal epitel kalınlığı / seminifer tübül çapı oranları (%)	50
Tablo 22:	Grupların lümenine germinal hücre dökülmüş tübül sayısı oranları (%)	52
Tablo 23:	Grupların modifiye Johnson skorları	54
Tablo 24:	Grupların vakuol içeren tübül (%) ve toplam vakuol sayıları	55
Tablo 25:	Grupların germinal epitelde ayrılma içeren tübül oranları (%) ve içerdikleri toplam ayrılma sayıları	57

Tablo 26:	Grupların germinal epitelde içerdikleri toplam mikrovakuolizasyon sayıları	59
Tablo 27:	Grupların interstisyel bağ dokusu hasar skorları (1-5)	61
Tablo 28:	Grupların bazal membran hasar skorları (1-5)	65
Tablo 29:	Grupların apoptotik hücre oranları (%)	68
Tablo 30:	Grupların doku MDA seviyeleri (nmol/mg protein)	72
Tablo 31:	Grupların doku SOD aktiviteleri (U/mg protein)	73
Tablo 32:	Grupların doku GPx aktiviteleri (nmol/dakika/mg protein)	74
Tablo 33:	Grupların doku CAT aktiviteleri (k/g protein)	74
Tablo 34:	Grupların kan testosteron seviyeleri (pg/ml).....	75

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim 1:	Metotreksatın etki mekanizması	12
Resim 2:	Deneklere ait testis ve epididimis dokularının çıkarılması	19
Resim 3:	Sperm analizinde karşılaşılan morfolojik anomaliler	44
Resim 4:	Kontrol grubu testis genel görünüm (H&E, 100x).....	46
Resim 5:	Kontrol grubu testis genel görünüm (H&E, 200x)	46
Resim 6:	MTX grubu testis genel görünüm (H&E)	47
Resim 7:	MTX+QT grubu testis genel görünüm (H&E)	47
Resim 8:	MTX+RA grubu testis genel görünüm (H&E)	48
Resim 9:	MTX+QT+RA grubu testis genel görünüm (H&E)	48
Resim 10:	İncelmiş germinal epitel (H&E)	51
Resim 11:	Germinal epitelde kalınlık artışı (H&E)	52
Resim 12:	Lümenine germinal hücre dökülmüş tübüller (H&E)	53
Resim 13:	Germinal epitelde vakuol (H&E)	55
Resim 14:	Germinal epitelde ayrılma ve mikrovakuolizasyonlar (H&E)	58
Resim 15:	Epididimis histopatolojileri (H&E)	60
Resim 16:	Kontrol grubu (Masson trikrom)	62
Resim 17:	İnterstisyel alanda dağılmalar ve tunika albugineada düzensizlik (MTX, Masson trikrom)	62
Resim 18:	İnterstisyel alanda ödem (MTX, Masson trikrom)	63
Resim 19:	MTX+QT grubu (Masson trikrom)	63
Resim 20:	MTX+RA grubu (Masson trikrom)	64
Resim 21:	MTX+QT+RA grubu (Masson trikrom)	64
Resim 22:	Kontrol grubu (PAS)	66
Resim 23:	Bazal membranda bozulmalar (MTX, PAS)	66
Resim 24:	MTX+QT grubu (PAS)	67
Resim 25:	MTX+RA grubu (PAS)	67
Resim 26:	MTX+QT+RA grubu (PAS)	68
Resim 27:	Kontrol grubu (TUNEL)	69
Resim 28:	MTX grubu (TUNEL)	70

Resim 29:	MTX+QT grubu (TUNEL)	70
Resim 30:	MTX+RA grubu (TUNEL)	71
Resim 31:	MTX+QT+RA grubu (TUNEL)	71



1. GİRİŞ

Testisler, skrotum adlı kesede yerleşmiş oval şekilli bir çift organdır. Aksesuar cinsiyet bezleri, genital boşaltım kanalları ve penisle birlikte erkek üreme sistemini oluşturan testisler, spermatogenez ve steroidogenez fonksiyonlarıyla erkek fertilitesinde çok kritik bir yere sahiptir (1). Günümüzde, gelişen in vitro fertilizasyon yöntemleriyle bahsi geçen diğer organlara ait yetersizlikler büyük ölçüde telafi edilebilirken, testislerdeki problemler derecesine göre bireyi infertiliteye kadar götürebilmektedir. Spermatogonyumlardan olgun spermilerin oluşturulduğu spermatogenez sürecinde sayısız mitoz ve mayoz bölünmenin gerçekleşiyor olması, erkek üreme sisteminde çok önemli bir yere sahip olan testisleri, dış etkilere, özellikle de ilaç yan etkilerine karşı hassaslaştırmakta ve daha fazla araştırmanın konusu haline getirmektedir (2).

Testiste toksik etkiler yapan ilaçların önde gelenlerinden biri metotreksattır (MTX). Baş ve boyun kanserleri, meme kanseri, lösemi, lenfoma gibi pek çok malignitenin yanı sıra romatoid artrit, psöriasis, sistemik lupus eritematozis, dermatomiyozit ve Crohn hastalığı gibi yaygın görülen inflamatuvar hastalıkların da tedavilerinde sıklıkla kullanılan metotreksat (3-5); gastrointestinal sistem, hematolojik sistem, santral sinir sistemi ve özellikle de erkek üreme sisteminde oluşturduğu yan etkiler nedeniyle kendi kullanımını kısıtlamakta, tedavideki etkinliğine gölge düşürmektedir (6). Sağlıklı testislerde metotreksat tedavisi; germ hücrelerinde artmış apoptoza, seminifer tübül hasarına, spermatogenezde bozulmaya ve oligospermiye neden olabilmekte, hatta bazen azospermi ve kalıcı infertiliteyle dahi sonuçlanabilmektedir (3, 4, 6, 7). Testis üzerindeki bu olumsuz etkilerinde, oluşturduğu oksidatif stresin önemli bir rolü olduğunun gösterilmesi ise araştırmacıları antioksidan maddelere yönlendirmiştir (4).

Soğan, yeşil çay, elma, çilek vb birçok bitkide bulunan quercetin (QT) (3,5,7,3',4'- pentahidroxyflavon), oksijen radikallerini temizleyerek oksidatif hasarı ve hücre ölümünü önleyen güçlü bir antioksidandır (8, 9). Antiinflamatuvar ve antikarsinojenik etkilere sahiptir. Ayrıca sperm kalitesi ve üreme organları üzerinde uyarıcı etkileri gösterilen quercetin (10), erkek fertilitésinin tedavisinde alternatif bir ilaç olarak kullanıldığı da bildirilmektedir (11).

Güçlü etkileriyle günümüzde pek çok çalışmaya konu olan bir diğer antioksidan ise rosmarinik asit (RA) [((R)-O-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid, 3,4- Dihydroxycinnamic acid (R)-1-carboxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethyl ester]'tir. Biberiye, kekik, adaçayı, nane gibi günlük hayatta yemeklerde kullandığımız bitkilerde yaygın olarak bulunan ve doğal polifenol bir bileşik olan rosmarinik asit; antiinflamatuvar, antimutajen, antibakteriyel, antiviral vb birçok dikkat çekici özelliğinin yanı sıra sperm kalitesini ve doğurganlığı arttırmak için kullanılmasıyla da ön plana çıkmaktadır (12, 13).

Bu çalışmada metotreksat kullanımına bağlı oluşabilecek testis hasarına karşı quercetin ve rosmarinik asitin olası düzeltici etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, ayrıca bu iki antioksidan maddenin birlikte kullanımlarının olumlu yönde sinerjik bir etki gösterip göstermeyeceğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Embriyolojisi

İntrauterin gelişimin 5. haftasında posteriyör abdominal duvardaki gonadal kabartıya yolk kesesi duvarından köken alan primordiyal germ hücrelerinin göç etmesiyle retroperitoneal olarak gelişimine başlayan testisler, bu dönemde her iki cinsten de benzer görünüme sahip farklanmamış gonad olarak nitelendirilirler. Gonadal kabartıyı oluşturan ara mezoderm, gelişimini tamamlamış testisteki Leydig hücreleri ve miyoid hücrelere kaynaklık ederken, kabartıyı döşeyen mezodermal epitel ise Sertoli hücrelerinin kaynağıdır. Primordiyal germ hücrelerinin yukarıda bahsedilen göçü, ara mezodermin ve mezodermal epitelin primer seks kordonlarını oluşturmak üzere proliferasyonunu uyarır.

İntrauterin 7. haftada testis belirleyici faktörün (TBF) uyarımıyla testosteron üretmeye başlayan gonad, gelişimini erkek yönünde sürdürür. Yoğunlaşan seminifer kordlar, bir kanallar ağı olan rete testisi oluşturmak üzere dallanıp anastomozlar yapacağı farklanmamış gonadın medullasına uzanır. Testis gelişiminin karakteristik özelliği olan tunika albuginea adlı kalın fibröz kapsülün gelişimiyle, seminifer kordların yüzey epiteliyle bağlantısı kesilir. Büyümeye devam eden testis, dejenere olan mezonefroza ayrılır ve kendi mezenterisi olan mezorşiyum tarafından asılır.

Daha sonra gelişimini sürdüren seminifer kordlar; her biri bir halka şeklindeki kıvrıntılı seminifer tübüllere (tubulus seminiferus kontortus), bu halkaların uç kısımları olan ve düz bir seyir izleyen tubulus rektuslara ve tubulus rektusların testis mediastinumunda anastomozlaşmasıyla meydana gelen rete testis adlı kanallar sistemine farklanır. Seminifer tübüller, Leydig hücrelerini de meydana getiren mezenşimal bağ dokusu ile birbirlerinden ayrılırlar.

Leydig hücrelerinin testosteron ve androstenedion adlı androjen hormonları salgılaması, mezonefrik kanalların ve dış genital organların erkek yönünde gelişimini uyarır. Üretimi, insan koryonik gonadotropini (hCG) tarafından stimüle edilen testosteron, tepe seviyelerine 8-12. haftalar arasında ulaşır. Bir yandan da seminifer kordlar içinde gelişen Sertoli (sustentaküler) hücreleri, müllerian-inhibiting substance (MIS) olarak da bilinen glikoprotein yapılı antimüllerian hormonu (AMH)

salgılar. Uterus ve tuba uterinaların geliştiği paramezonefrik kanalları suprese eden ve puberteye kadar salınmaya devam eden AMH'nın düzeyi puberteden sonra düşüşe geçer.

Sertoli hücreleri fetal testis seminifer epitelinde çoğunluğu teşkil eder. İlerleyen dönemlerde testis yüzel epiteli, mezoteliumu oluşturmak üzere yassılaştır. Rete testis daha sonra duktuli efferentesi oluşturacak olan 15-20 mezonefrik tübül ile devamlılık gösterir. Duktuli efferentes ise epididimisi meydana getiren mezonefrik duktusa bağlanır.

İntrauterin 26. hafta civarında testisler abdomenden kan ve lenf damarlarını, sinirlerini, anterolateral yüzünü örten tunika vaginalis adlı periton uzantısını da beraberinde sürükleyerek, inguinal kanal yoluyla skrotuma iner. Puberte öncesinde seminifer tübüllerin lümenleri kapalıdır ve tübül duvarını spermiyogenezis sürecinin destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ile olgun spermatozoonlara kaynaklık eden spermatogonyumlar olmak üzere iki tip hücre meydana getirmektedir (1, 2, 14, 15).

2.2. Testis Anatomisi

Testisler, sperm ve testosteron üretiminden sorumlu olup abdominal kavitenin dışındaki skrotum adlı kesenin içinde spermatik kord adı verilen yapıyla asılı halde bulunan oval şekilli bir çift organdır. Erişkin testisleri yaklaşık 15-25 ml hacme, 12-20 gr ağırlığa, 4-5 cm uzunluğa, 2-3 cm genişliğe ve 3-4 cm derinliğe sahiptir. Sol testis seviye olarak genellikle sağ testise göre biraz daha aşağıda yerleşiktir.

Testisleri dıştan güçlü bir kapsül çevrelemektedir. 3 tabakalı testis kapsülünün orta tabakası olan ve içteki tunika vaskülozayı sararken dıştan tunika vaginalis tarafından sarılan tunika albuginea, testisin posterior yüzünden içeri doğru kalın fibröz bir yapı uzatır. Mediastinum testis adı verilen bu yapı; damar, sinir ve testiküler kanalların kapsülü çaprazladığı yerdir. Kapsülün dış katmanı olan tunika vaginalis, aslında testisin abdominal kaviteden inguinal kanal yoluyla skrotuma inerken beraberinde sürüklediği periton parçasıdır. Onun da dışında, internal ve eksternal spermatik fasyalar ile aralarındaki kremaster kası bulunur. Bu fasyalar inguinal kanaldan geçen tüm yapıları dıştan çevrelemektedir.

Testisin arteriyel kanlanması 2/3'lük kısmı doğrudan abdominal aortadan köken alan testiküler arterden (internal spermatic arter) sağlanırken, kalan 1/3'lük kısmı ise süperior vezikal arterin dalı olan vasal arter (duktal arter) ve inferior epigastrik arterin dalı olan kremasterik arter (eksternal spermatic arter) tarafından sağlanmaktadır. Testisin venöz dönüşünden sorumlu olan plexus pampiniformis ise testiküler ven olarak devam edip solda sol renal vene drene olurken sağda doğrudan vena cava inferiora açılır. Taşıdığı nispeten düşük sıcaklıktaki kan sayesinde, yakın temas halinde olduğu testiküler arterin kanını, henüz testise ulaşmadan bir miktar soğutur. Testislerin skrotum içindeki konumları, skrotumun ince derisi ve pampiniform plexusun bu zıt akım ısı değişim mekanizması, testislerin normal vücut sıcaklığından 3-4 °C daha düşük bir sıcaklığa sahip olmalarını sağlar (1, 2, 14, 15).

2.3. Testis Histolojisi

Erkek gametleri olan olgun spermiyumların üretildiği spermatogenez sürecini gerçekleştiren testisleri, dıştan tunika albuginea adlı kalın bir bağ doku kılıf sarar. Bu kılıfın testis arka yüzünde kalınlaşarak oluşturduğu mediastinum testis, organın içlerine doğru yolladığı ince bağ doku yapısındaki septumlarla testisi yaklaşık 250 adet lobüle ayırır. Her bir lobülde 1-4 adet olmak üzere bulunan seminifer tübüller spermatogenezin gerçekleştiği yerdir. Seminifer tübüllerin lümenlerini çevreleyen ve çok katlı bir yapıya sahip olan germinal epitelleri, spermatogenik seriye ait hücreler ile spermatogenez sürecini destekleyen Sertoli hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Seminifer tübüllerin arası; Leydig hücrelerini, fibroblastları, miyoid hücreleri, sinirleri, kan ve lenf damarlarını içeren interstisyel bağ dokusu tarafından doldurulmaktadır. Kendi üzerinde katlanarak yüksek düzeyde kıvrımlar oluşturan halka şeklindeki seminifer tübüller, mediastinuma yakın uc kısımlarında kısa ve düz bir seyir izleyen tubulus rektuslar olarak devam ederler. Dallanıp birbirleriyle anastomozlaşan tubulus rektuslar, mediastinum testiste bir kanallar ağı olan rete testis meydana getirir. Rete testis ile epididimisin baş kısmı arasındaki bağlantıyı ise duktuli efferentes adı verilen yaklaşık 12 adet kısa tübül kurmaktadır (1, 2, 14, 15).

2.3.1. Seminifer Tübül

Seminifer tübüller, testis lobüllerinde yoğun bir şekilde kıvrılıp kendi üzerine katlanmış, her biri yaklaşık 30-50 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapında yapılardır. Dıştan bazal membranla çevrili bu tübüler yapılar, temelde iki farklı hücre tipi içeren kalın ve karmaşık çok katlı bir seminifer epitel ve merkezde yerleşik lümenden meydana gelmektedir. Germinal epitel olarak da adlandırılan bu epitel spermatogenezin gerçekleştiği yerdir. Epitelin, bazal membrana oturan periferdeki ilk hücre sırasını koyu tip A, açık tip A ile tip B spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri oluşturmaktadır. Lümeneye doğru ilerledikçe primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatidler olmak üzere spermatogenezin birbirini takip eden 3 aşamasına ait hücreler görülür. Olgunlaşma fazı olan spermiyogenez sürecini tamamlayan spermatidler ise olgun spermatozoonlar olarak seminifer tübül lümenine bırakılırlar. Tübüllerin çevresini ise ritmik kasılmalarıyla tübüler içeriğin ilerlemesini sağlayan 3-5 kat miyoid hücre (peritübüler kontraktıl hücre) ile kollajen liflerden oluşan peritübüler tunika propria sarmaktadır (1, 2, 14, 15).

2.3.2. Sertoli Hücreleri ve Kan Testis Bariyeri

Spermatogenez sürecinin destekleyici hücreleri olan Sertoli hücreleri, seminifer tübül bazal membranına oturup lümeneye kadar komşu spermatogonik hücreleri çevreleyerek uzanan düzensiz sınırlı prizmatik hücrelerdir. Bu özellikleriyle seminifer tübüllere yapısal düzenini kazandırmaktadırlar. Sustentaküler hücreler diye de bilinen bu hücreler puberteden sonra bölünmezler. Çevreledikleri spermatogonik seriye ait hücreleri fiziksel ve metabolik olarak korur ve desteklerler. Bazolateral membranları arasında kurdukları sıkı bağlantılar sayesinde kan-testis bariyerini oluşturan Sertoli hücreleri seminifer epiteli bazal ve adluminal olmak üzere iki kompartmana ayırırlar. Bazal kompartmanda spermatogonyumlar ve preleptoten primer spermatositler yer alırken adluminal kompartmanda pakiten primer spermatositler, sekonder spermatositler, erken ve geç spermatidler bulunur. Oluşan primer spermatositler adluminal kompartmana Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılarının bir fermuar gibi bölgesel olarak ayrılması ile göç ederler ve bu göç sırasında bariyer fonksiyonunda herhangi bir aksama olmaz. Bu bariyer sayesinde, gelişimin ileri aşamasındaki özelleşmiş antijenik yapılara sahip spermatogonik

hücreler, otoimmün saldırılardan ve kandaki toksik maddelerden korunmuş olur. Ancak Sertoli hücreleri, oluşturdukları bu bariyer sebebiyle adluminal kompartman hücrelerini aynı zamanda plazma ürünlerinden de izole ederler. Bu nedenle bu hücrelerin beslenmeleri ve atık maddelerinin uzaklaştırılması Sertoli hücrelerinin görevleri arasındadır. Sertoli hücreleri ürettikleri fruktozdan zengin testiküler sıvıyla, spermleri seminifer tübüller ve boşaltım kanalları boyunca taşır ve beslerler. Ayrıca seminifer tübül lümeninde spermatogenez süreci için gerekli testosteron yoğunluğunu arttıran ABP (androjen bağlayıcı protein), hipofizden FSH (folikül stimüle edici hormon) salınımını baskılayan inhibin, Müller kanallarını ve dişi yönde gelişimi baskılayan AMH (anti-Müllerian hormon) gibi maddelerin üretimini de sağlayan Sertoli hücreleri, gelişen spermatidlerin sitoplazma artıklarını fagosite ederek spermiyogenez adlı olgunlaşma sürecine de katkıda bulunurlar (1, 2, 14, 15).

2.3.3. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücreleri

Testiste seminifer tübüllerin arası kan ve lenf damarlarını, sinirleri, fibroblastları, miyoid hücreleri ve Leydig hücrelerini içerisinde barındıran interstisyel bağ doku ile doludur. Organın stromasını oluşturan bu fibromusküler gevşek bağ dokudaki Leydig hücreleri, steroidogenez fonksiyonlarıyla spermatogenez sürecinde kritik bir rol oynarlar.

İnterstisyel hücreler olarak da adlandırılan Leydig hücreleri, lipit damlacıkları içeren, iri ve poligonal hücrelerdir. Sitoplazmalarında lipofuskin pigmentine ve henüz fonksiyonları tam olarak bilinmeyen Reinke kristaloidlerine sık rastlanır. Steroid yapıda bir hormon olan testosteron salgıladıklarından granülsüz (düz) endoplazmik retikulumları gelişmiştir ve bu nedenle eozinofilik boyanırlar.

Embriyonik dönemde salgıladıkları testosteron ve androstenedion ile genital gelişimi erkek yönünde uyarırlar. İntrauterin 8-12. haftalar arasında testosteronu tepe noktalara ulaştıran Leydig hücreleri, intrauterin yaklaşık 5. aydan itibaren gonadotropik stimülasyona uğrayacakları puberteye kadar inaktifleşirler. Bu inaktif dönemlerinde fibroblastlardan ayırt edilmeleri zordur. Puberteden sonra ömür boyu aktif kalan Leydig hücreleri salgıladıkları testosteronla sekonder cinsiyet

karakterlerinin, ejakülattaki aksesuar bezlere ait salgıların ve spermatogenez sürecinin başlamasında ve devamlılığında kilit rol oynamaktadırlar (1, 2, 14, 15).

2.3.4. Spermatogenez ve Spermatogenik Hücreler

Germinal epitel bazalinde yer alan spermatogonyumlardan lümendeki olgun spermatozoonların oluşması süreci spermatogenez olarak tanımlanmaktadır. Sürecin başlangıç hücresi olan kök hücre niteliğindeki koyu tip A spermatogonyumlar, geçirdikleri mitozlarla diğer koyu tip A spermatogonyumlara ve soluk tip A spermatogonyumlara kaynaklık ederler. Oluşan soluk tip A spermatogonyumlarda alışılmışın dışında bir durum olarak sitokinez aşaması tam tamamlanmaz ve hücreler arasında ince sitoplazmik köprüler kalır. Soluk tip A spermatogonyumların mitoz bölünmeleri ise tip B spermatogonyumları meydana getirir. Tip B spermatogonyumlar bu serinin son üyeleridir ve geçirdikleri mitozla primer spermatositleri meydana getirerek spermatositer seriyi başlatırlar.

Primer spermatositler, mayoz bölünmeyi başlatan ve başlangıçta $2n, 2c$ formatında iken eşleyerek iki katına çıkardıkları genetik materyallerini ($2n, 4c$), mayoz 1 bölünmesi sırasında homolog kromozomları zıt kutuplara yollamak suretiyle tekrar yarıya indiren hücrelerdir. Bu sayede $n, 2c$ formatındaki sekonder spermatositleri oluştururlar. Primer spermatositlerin geçirdiği 1. mayoz bölünme, bir indirgenme bölünmesidir ve her bir primer spermatosit kendisinin yaklaşık yarısı büyüklüğünde 2 sekonder spermatosite dönüşür. Daha sonra oluşan sekonder spermatositler, DNA eşlemesi yapmaksızın geçirdikleri 2. mayoz bölünme ile n, c formatında 4 adet spermatidi meydana getirirler.

Başlangıçtaki 46 kromozomun ($2n, 2c; 44+XX / 44+XY$) 23 kromozoma ($n, c; 22+X / 22+Y$) inmesi, oositle fertilizasyon sonrası yeni oluşan bireyin kromozom sayı ve formatının korunmasını sağlar. Açık tip A spermatogonyumdan spermatid aşamasına kadar oluşan tüm hücrelerde aradaki sitoplazmik köprüler korunur ve bu durum oluşan spermatidlerin senkronize gelişimini sağlar. 2. mayoz bölünmenin tamamlanmasıyla oluşan spermatidler daha fazla bölünmeye uğramazlar fakat alışılmış yuvarlak hücre görünümünden tipik sperm görünümüne bürünecekleri çok ciddi bir morfolojik değişim sürecine girerler. Spermiyogenez adı verilen bu süreçte

erken spermatidler bir yandan akrozom ve flagellum yapılarını kazanırken diğer yandan sitoplazmik fazlalıklarından kurtularak ince ve uzamış bir yapıya sahip geç spermatidlere dönüşürler. Spermatidleri birbirine bağlayan sitoplazmik köprüler, rezidüel cisimcik olarak adlandırılan bu sitoplazmik fazlalıkların üzerinde kalır. Rezidüel cisimcikler daha sonra spermiyogenez sürecindeki destekleyici rolleriyle büyük önem taşıyan Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirler. Olgunlaşma sürecini tamamlayan spermatidler Sertoli-spermatid bağlantı komplekslerinin ortadan kaldırılmasıyla olgun spermatozoonlar olarak seminifer tübül lümenine bırakılırlar.

Lümenine bırakılan ve başlangıçta hareketsiz olan spermatozoonlar, seminifer tübül boyunca Sertoli hücrelerince salınan bir sıvı içerisinde, peritübüler miyoid hücrelerin peristaltik kasılmalarının da etkisiyle ilerler ve hareket yeteneklerini kazanacakları epididimise ulaşırlar. Epididimiste, spermaların DNA'larının yoğunlaşması sonucu baş boyutları bir miktar daha azalır; sitoplazmalarının küçültülmeye devam edilmesi sonucu şekilleri daha da incelir; membranlarında yapılan bir takım değişiklikler sonucu dişi genital kanallarına ulaşana kadar dölleme yetenekleri inhibe edilir (dekapasitasyon).

Tüm olgunlaşma süreçlerinden geçerek meydana gelen eşsiz hücreler olan matür sperm; yaklaşık 4-5 μm uzunluğunda ve 3 μm genişliğinde sivri bir baş, çok kısa (0,7 μm) bir boyun ve yaklaşık 50-55 μm uzunluğunda bir kuyruk olmak üzere 3 parçadan oluşmaktadırlar. Sperm başının 2/3'lük ön kısmını, içinde akrozin, hiyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz gibi proteolitik enzimleri barındıran akrozomal kep sarmaktadır. Kısa olan boyun, sentriyolleri; kuyruğu oluşturan 3 bölümün ilki olan orta parça ise sperme hareketi için gerekli enerjiyi sağlayan, sarmal şekilde dizilmiş mitokondriyonları içerir. Kuyruğun esas parçası yaklaşık 40 μm uzunluğu ile en uzun parça olma özelliği taşırken, 5 μm 'lik son parça ise yalnızca aksonemal kompleksi içermesi ile dikkat çekmektedir (1, 2, 14, 15).

2.4. Epididimis Histolojisi

Epididimis, duktuli efferentes ile duktus epididimisten oluşan ve testisin üst yüzünden başlayıp posterior yüzü boyunca aşağı doğru uzanan yay şeklinde bir organdır. Baş, gövde ve kuyruk olmak üzere 3 bölümden meydana gelen epididimis,

yeni üretilen spermilerin olgunlaştığı, fertilizasyon ve hareket yeteneklerini kazandığı ve ejakülasyona kadar depolandığı yerdir. Epididimis başının bir kısmını oluşturan yaklaşık 12 adet efferent duktus, rete testisten aldığı spermeleri 4-6 m uzunluğa ve yüksek düzeyde kıvrıntılı bir yapıya sahip olan duktus epididimise iletir. Spermeler epididimisteki matürasyon süreçlerinde epididimal sıvıda bulunan glikolipit yapıları dekapasitasyon faktörleri ile dekapasite edilirler. Bu sayede spermelerin dışı genital kanallarına ulaşmaya kadar akrozom reaksiyonları engellenmiş, fertilizasyon kabiliyetleri korunmuş olur.

Epididimis lümenini bazal membrana oturmuş yalancı çok katlı prizmatik stereosilyalı epitel döşemektedir. Epitel, lümene ulaşan ve apikal yüzeyinde stereosilyumlar içeren esas hücreler ile lümene ulaşamayan ve kök hücre niteliği taşıyan bazal hücrelerden meydana gelmektedir. Esas hücreler bir yandan testiküler sıvıyı geri emerken bir yandan da glikolipit ve glikoprotein içerikli epididimal sıvıyı salgırlar. Sertoli hücrelerinin fagosit edemediği rezidüel cisimcikleri ve dejenere olan spermeleri fagosit etmek de esas hücrelerin görev arasındadır. Epiteli çevreleyen gevşek bağ dokusu, içerisinde birkaç sıra hücreden oluşan ince sirküler bir düz kas tabakasını barındırır. Kuyruk kısmına gidildikçe kalınlaşan bu kas tabakası, kuyrukta; sirküler, iç longitudinal ve dış longitudinal olmak üzere olmak üzere 3 tabakalı hale gelir (1, 2, 14, 15).

2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Oksidasyon-redüksiyon (redox) tepkimeleri canlılığın gereği olan vazgeçilmez olaylardır. Vücudumuz; gıdalardan enerji üretmek, toksik maddeleri detoksifiye etmek, enfeksiyon ajanlarıyla savaşmak gibi pek çok amaçla redoks tepkimelerini kullanır. Fakat bu reaksiyonların doğal bir sonucu olarak hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH^-), tekli oksijen (O^-) gibi oksijenin eksik indirgendiği birtakım kimyasallar ortaya çıkmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan bu maddelerin; nükleik asitler, proteinler, lipitler gibi makromoleküller üzerinde lipit peroksidasyonu, tiyol grubunun hücresel proteinler ve membran proteinlerinden uzaklaştırılması, DNA'da kırıklar ve baz değişiklikleri gibi hasarlayıcı etkileri bulunmaktadır. Ayrıca lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) de bir yandan aminoasitlerin N-terminalleriyle kovalent

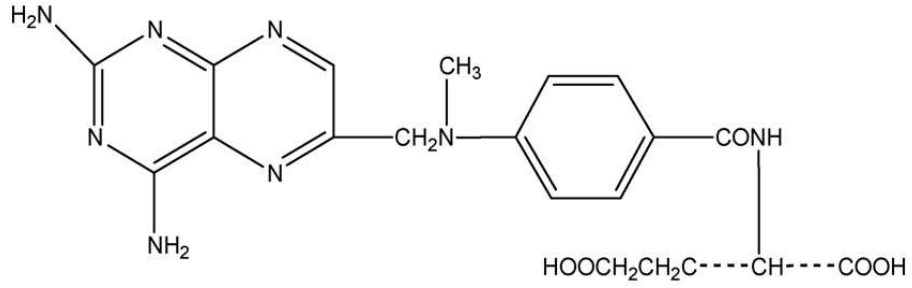
bağlar kurarak protein hasarına sebep olurken diğer yandan DNA zincirleri arasında çapraz bağlar kurarak DNA hasarına yol açmaktadır. Dolayısıyla ROS'un bu ve benzeri zararlı etkileri, üretimleriyle uyumlu bir şekilde ortadan kaldırılmalarını zorunlu kılmaktadır (16-20).

ROS'un üretim ve tüketimi arasındaki dengenin herhangi bir sebeple üretimi lehine bozulmasına oksidatif stres adı verilmektedir. Bu durum ROS üretiminin artması sonucu meydana gelebildiği gibi fizyolojik antioksidan mekanizmaların aktivitesinin azalması ile de ortaya çıkabilmektedir. Çeşitli mekanizmalarla hücreleri erken yaşlanmaya ve apoptozise kadar sürükleyen, kanser gelişimi, nörodejenerasyon, diyabet, ateroskleroz, yaşlanma ve benzeri şekillerde kliniğe yansıyan oksidatif stres, yol açtığı sorunların ciddiyeti nedeniyle günümüzde birçok çalışmaya konu olmaktadır. Oksidatif stresin önüne geçme çabaları ise araştırmacıları antioksidan maddelere yönlendirmektedir (16-18).

Antioksidan terimi; düşük konsantrasyonlarda dahi varlığı enzimatik veya non-enzimatik mekanizmalarla bir substratın oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen, oluşan serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getiren, hücrelerde oksidan-antioksidan dengesini kuran, redoks homeostazını stabilize ederek hücreyi oksidatif stresten koruyan endojen veya ekzojen kaynaklı maddeler olarak tanımlanabilir (21). Endojen kaynaklı antioksidanlardan; süperoksit anyonunu (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ile moleküler oksijene (O_2) çeviren süperoksit dismutaz (SOD), hidrojen peroksiti (H_2O_2) moleküler oksijen (O_2) ile suya (H_2O) çeviren katalaz (CAT) ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) suya (H_2O) çeviren glutatyon peroksidaz (GPx) öne çıkarken, ekzojen kaynaklı antioksidanlar ise halen araştırılmaktadır (21, 22).

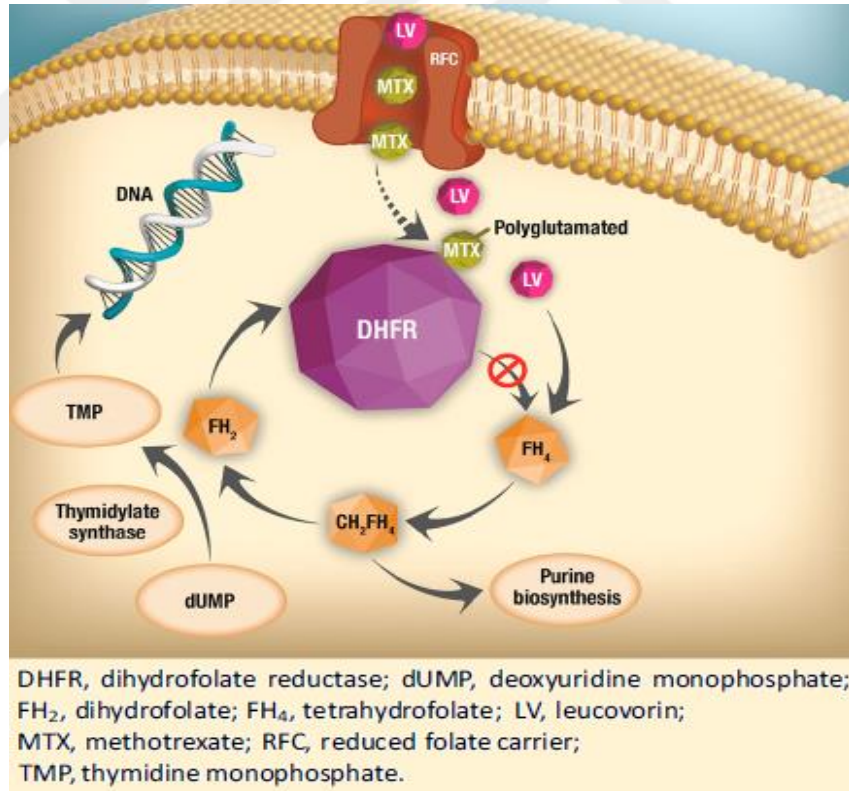
2.6. Metotreksat

Metotreksat (MTX) 1950'lerden beri klinik pratikte yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ajandır (23). Sıklıkla bir anti-kanser ilaç olarak kullanılan MTX, esas olarak bir folik asit antagonistidir. DNA öncüllerinin sentezini inhibe ederek hücre döngüsünün S-fazındaki hücrelere etki eder.



Şekil 1. Metotreksatın molekül yapısı (24).

Bu nedenle akut lenfoblastik lösemi, Burkitt lenfoma, non-Hodgkin lenfoma, koryokarsinom, osteosarkom, meme kanseri, baş ve boyun kanserleri, ovaryum kanseri, mesane kanseri vb. pek çok malign neoplazinin tedavisinde kullanılmakla birlikte romatoid artrit, psöriasis, sistemik lupus eritematozis, dermatomiyozit, graft-versus-host hastalığı ve Crohn hastalığı gibi birçok non-neoplastik hastalığın tedavisinde de tercih edilmektedir (3-5, 25).



Resim 1: Metotreksatın etki mekanizması (26).

Öte yandan metotreksatın DNA sentezi, onarımı ve hücresel replikasyon üzerindeki inhibe edici etkileri ne yazık ki sağlıklı doku ve hücreleri de

etkilemektedir (27). Buna bağlı olarak birçok hücre tipi ile birlikte özellikle spermatogenik seri gibi hızlı bölünen hücrelerde akut toksik etkiler ve fonksiyonel bozukluklar ortaya çıkmaktadır (27, 28). MTX'in testiste sebep olduğu seminifer tübül hasarı, kan-testis bariyer hasarı, sperm DNA hasarı, oligospermi, Sertoli ve Leydig hücrelerinde proliferasyon baskılanması, spermatogenik seri hücrelerinde apoptoz gibi toksik etkileri, bireyin üreme kapasitesini etkilemekte ve infertiliteye kadar varabilen olumsuz sonuçlara sebep olmaktadır (23, 24).

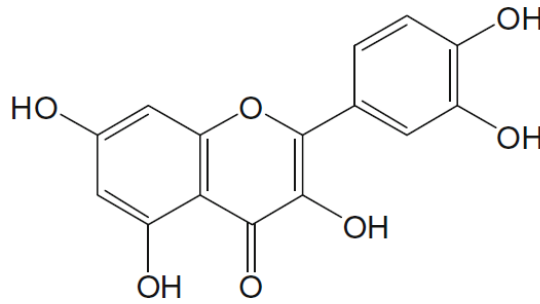
MTX ile indüklenen testis hasarının patogenezinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (24). MTX, hücrede reaktif oksijen radikallerinin üretimini indüklemekte ve artan oksidatif stres, testislerin ve germ hücrelerinin yapısına zarar vermektedir (27). Yapılan araştırmalar MTX'in aynı zamanda antioksidan enzim sistemlerinin etkinliğini azalttığını ve dolayısıyla hücreleri reaktif oksijen partiküllerine karşı duyarlı hale getirdiğini de ortaya koymuştur (29). Bu nedenle MTX'e bağlı testis hasarını önlemede sıklıkla testis dokusunu oksidatif strese karşı koruma yoluna gidilmekte ve bu konuda antioksidan maddelere başvurulmaktadır (27).

2.7. Quercetin

Polifenolik bileşikler; güçlü antioksidan, antialerjik, antimikrobiyal, antikanserojen ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olmalarının yanısıra tümör hücre si proliferasyonu, karsinojenez, bronşiyal astım, peptik ülser, ateroskleroz, spazmojenik bozukluklar, apoptoz, iskemik kalp hastalığı, hiperglisemi, hepatotoksisite, depresyon, katarakt, zayıf sperm hareketliliği ve metastaz gibi pek çok hastalığa ve sağlık riskine karşı hayati roller oynadığı tespit edilmiş moleküllerdir (30). Bu bileşiklerin en önde gelen üyelerinden biri, insan diyetinde en fazla bulunan polifenoller olarak bilinen flavonoidler grubuna ait quercetindir (QT) (31).

Quercetin; soğan, domates, Brassica sebzeleri (brokoli, roka, Çin lahanası, brüksel lahanası, lahana, karnıbahar, turp, şalgam, su teresi vb) elma, ilek, üzüm ve çay gibi günlük hayatta sıklıkla tükettiğimiz birçok bitkide bulunan bir diyet flavonoididir (8, 10, 32, 33). Bunlara ilaveten Ginkgo biloba, sarı kantaron

(*Hypericum perforatum*) gibi tıbbi bitkilerde ve daha pek çok bitkinin tohumunda, çiçeğinde ya da yaprağında mevcuttur (33). Molekölün “IUPAC” (The International Union of Pure and Applied Chemistry) isimlendirmesi 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavanone (3,3',4',5,7-pentahydroxy-2-phenylchromen-4-one)'dur (33). Güçlü etkileriyle diyabetin, kanserin, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde ve bunlara karşı korunmada rol oynadığı bilinmektedir (33, 34).



Şekil 2: Quercetin'in molekül yapısı (32).

Quercetin; antiinflamatuar, antikanser, antialerjik, antiviral, antibakteriyel, antidiyabetik, antihipertansif, antinosiseptif ve özellikle de antioksidan olmak üzere çok sayıda aktiviteye sahiptir (10, 33, 35). Çeşitli bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, depresyon, astım, ateroskleroz, hipertansiyon, hiperglisemi, hiperürisemi, diyabetik katarkt ve nöropati, gastrik ülser, reflü özofajit, prostatit, interstisyel sistit, osteoartrit ve benzeri pek çok sağlık problemine karşı olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (33, 36).

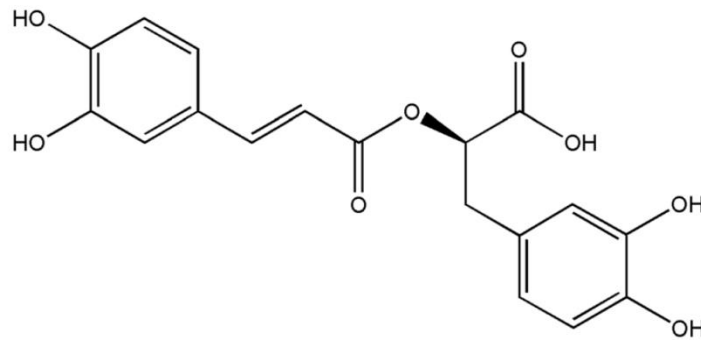
Quercetini öne çıkaran özelliklerinin başında güçlü bir antioksidan oluşu gelmektedir. Nitrik oksit gibi reaktif nitrojen türleri de dahil olmak üzere reaktif oksijen türlerinin en güçlü temizleyicilerindendir. Ayrıca, ksantin oksidazı inhibe etme, lipid peroksidasyonunu önleme ve metal iyonlarını şelatlama gibi çeşitli mekanizmalarla oksidatif hasarı ve hücre ölümünü önlemektedir (36, 37). İndüklenebilir nitrik oksit sentaz aktivitesine engel olarak deneysel iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarını ve nitrik oksit ile süperoksit anyonlarından, hasarlayıcı bir molekül olan peroksinitrit oluşumunu azaltmaktadır (37). Beyin, kalp, testis ve diğer

dokuları I/R hasarından ve oksidatif strese neden olan diğer faktörlerden koruduğu bilinmektedir (33, 37).

Quercetin, üreme sistemi üzerinde de pek çok olumlu etkiye sahiptir. Çalışmalar, quercetinin, oksidatif stresi azaltarak birçok toksik maddenin üreme sistemi üzerindeki toksisitesini önemli ölçüde tersine çevirdiğini göstermiştir (8, 9, 10, 38). Ayrıca yetişkin erkek sıçanlarda sperm kalitesi ve üreme organları üzerinde uyarıcı etkilerinin olduğu da tespit edilmiştir (10).

2.8. Rosmarinik Asit

Polifenolik bileşiklerin önde gelen üyelerinden bir diğeri ise rosmarinik asittir (30). Kafeik asit ile 3,4-hidroksifenillaktik asidin bir esteri olan ve polifenollerin en önemlilerinden biri kabul edilen rosmarinik asit, Boraginaceae familyasının türlerinde, Lamiaceae familyasının Nepetoideae alt familyasında ve eğrelti otu, boynuz otu gibi birtakım bitkilerde doğal olarak oluşan bir fenilpropanoiddir. İlk defa İtalyan kimyagerler Scarpati ve Oriente tarafından 1958 yılında *Rosmarinus officinalis* (biberiye)'ten izole edilmiş ve 1970'te Ellis ve Towers tarafından yapı taşlarının L-tirozin ve L-fenilalaninin olduğu gösterilmiştir (19). Moleküler formülü $C_{18}H_{16}O_8$, IUPAC adı (2R)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-[(E)-3-(3,4-dihidroksifenil) prop-2-enoil] oksipropanoik asittir. Günlük hayatta gerek mutfaklarda gerekse kozmetik ürünlerde sıklıkla kullanılan adaçayı (*Salvia officinalis*), kekik (*Thymus vulgaris*), nane (*Mentha piperita*), limon otu (*Melissa officinalis*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), fesleğen (*Ocimum basilicum*), lavanta (*Lavandula angustifolia*) gibi bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır (30, 39).



Şekil 3: Rosmarinik asitin molekül yapısı (39).

RA ve kimyasal deriveleri hem insan sağlığını geliştirmek hem de bazı alerjik, nörolojik veya kardiyovasküler hastalıkları tedavi etmek amacıyla sıklıkla diyetle dahil edilmektedir. Melanom ve lösemi hücrelerini etkili bir şekilde inhibe edebilmekte; karaciğer, kolon, meme, mide gibi birçok organda tümör oluşumunu ve gelişimini baskılayabilmektedir. Ayrıca nörolojik şikayetlerde, alt batın rahatsızlıklarında, herpes simpleks lezyonlarının tedavisinde de etkilidir. Antitümöral, antimitojen, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan vb pek çok önemli farmakolojik özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir (30, 39, 40). Rosmarinik asitin ne çıkan bu etkilerinin başında antioksidan aktivitesi gelmektedir. Bir yandan ROS üretimini önemli ölçüde ortadan kaldıran rosmarinik asit, bir yandan da mevcut serbest radikalleri temizlemekte ve bu sayede oksidatif strese bağlı hasara engel olmaktadır (41, 42).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği

“Quercetin, Rosmarinik Asit ve Quercetin & Rosmarinik Asit Kombinasyonunun Metotreksata Bağlı Testis Hasarına Etkileri” başlık ve 2020/18 protokol numaralı araştırmamıza, Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 31.12.2020 tarih ve 53488718-66 sayı numaralı onayı ve KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’nin desteği alınarak başlandı (Proje No: TTU-2021-9136).

3.2. Deney Süreci ve Numunelerin Eldesi

Çalışmamız, KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi’nden temin edilen ve kütleleri 200-250 gr arasında değişen 2-3 aylık toplam 40 adet erkek Sprague Dawley sıçanla gerçekleştirildi. Denekler, her grupta 8’er hayvan olacak şekilde rastgele 5 gruba dağıtıldıktan sonra tek tek tartıldı ve kütleleri kaydedildi. Ardından standart tip III kafeslere yerleştirilen sıçanlar, 7 günlük deney süresi boyunca, yine aynı merkezdeki 22 ± 2 °C sıcaklığa, 50 ± 5 % nem oranına ve 12 saatlik karanlık/aydınlık döngüsüne sahip bakım odalarında standart sıçan yemi ve içme suyuyla ad libitum beslenerek barındırıldı.

Kontrol (K) grubuna deney süresince herhangi bir uygulama yapılmadı. Hasar grubu olan Metotreksat (MTX) grubu ile tedavi grupları olan Quercetin (MTX+QT), Rosmarinik Asit (MTX+RA) ve Quercetin&Rosmarinik Asit (MTX+QT+RA) gruplarına deneyin 5. gününde 30 mg/kg dozunda metotreksat intraperitoneal (i.p.) yolla uygulandı. MTX grubuna deney süresince başka herhangi bir uygulama yapılmazken, MTX+QT grubuna deney süresince (7 gün) her gün 30 mg/kg dozunda quercetin, MTX+RA grubuna deney süresince her gün 30 mg/kg dozunda rosmarinik asit ve MTX+QT+RA grubuna deney süresince her gün 15 mg/kg dozunda quercetin ile 15 mg/kg dozunda rosmarinik asit oral gavaj yoluyla uygulandı.

Intraperitoneal metotreksat uygulamalarında her bir deneğe, gereken doz “Methotrexate 500 mg/20 ml Flakon, Koçak Farma” adlı üründen steril serum fizyolojik (SF) ile hazırlanan 2 ml’lik çözeltiler içinde verildi. Benzer şekilde oral

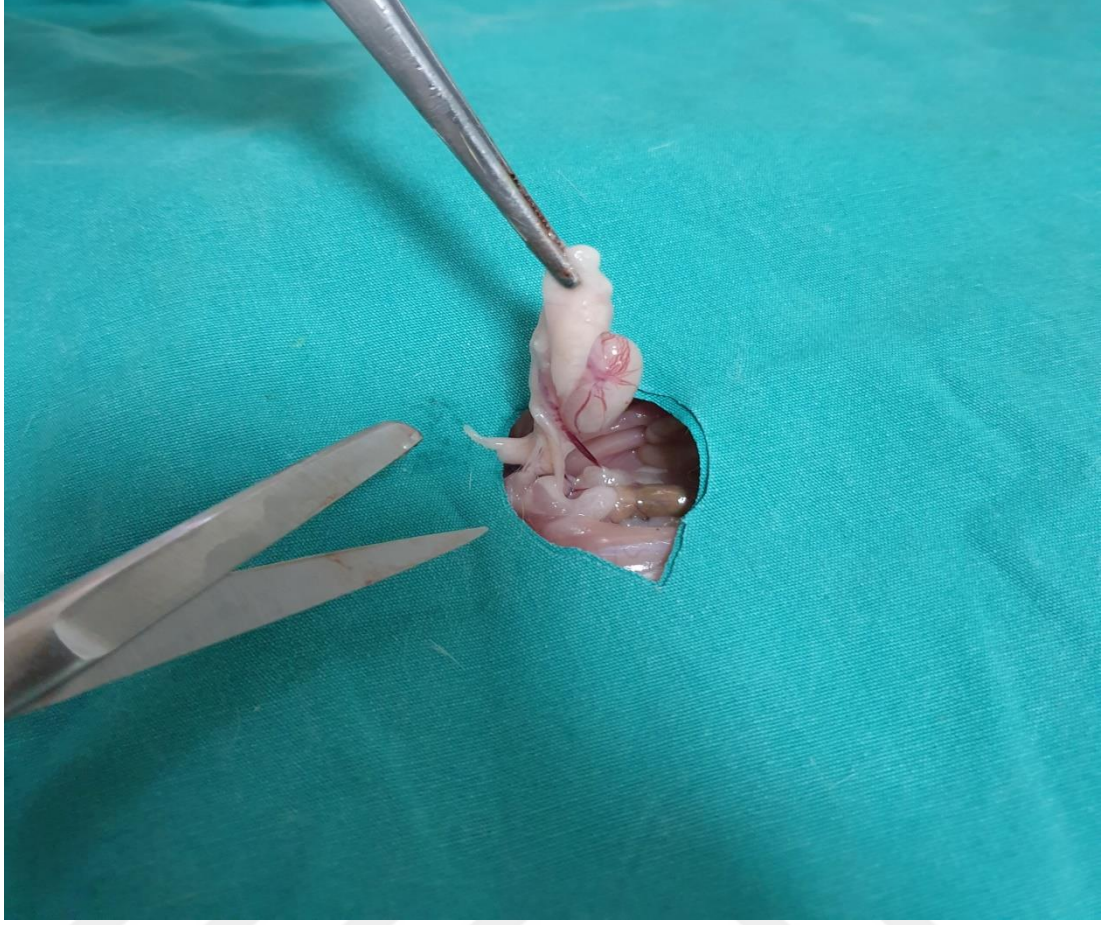
gavaj uygulamalarında da her bir hayvana, hesaplanan antioksidan miktarları “Quercetin %95 Sigma-Aldrich Q4951- 100G” ve “Rosmarinic acid 96% Sigma-Aldrich 536954-5G” ürünlerinden steril SF ile hazırlanan 2 ml’lik çözeltiler halinde verildi.

Deneyin ortası olan 4. günde tüm sıçanlar tekrar tek tek tartılarak kütleleri not edildi. Bahsi geçen uygulamalar her gün aynı saatler arasında (10:00-12:00) yapıldı. 1. gün uygulamalarının yapılmasıyla başladığı kabul edilen deney 7. gün uygulamalarından 24 saat sonra sonlandırıldı.

Öncelikle deneklerin deney sonu tartımları yapıldı ve kütleleri kaydedildi. Ardından tüm denekler 90 mg/kg dozunda i.p. ketamin uygulaması ile anestezi altına alınıp kansızlaştırma yoluyla sakrifiye edildi.

Sakrifikasyon sırasında her bir hayvandan alınan kan, biyokimyasal analiz amacıyla o hayvan için daha önceden hazırlanmış olan biyokimya tüpüne yerleştirildi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bölümü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı bünyesindeki Biyokimya Laboratuvarı’nda, 2000 rpm’de 10 dk santrifüj edilen tüplerdeki örneklerle ait plazma kısımları, ependorf tüplerine alınıp biyokimyasal incelemelerin yapılacağı zamana kadar -80 °C’de saklandı.

Kan numunelerinin elde edilmesinden hemen sonra temiz yeşil örtülerle örtülen deneklere, alt abdominal bölgeden orta hat insizyonları açıldı ve testislere ulaşıldı. İlk olarak sol testis ile epididimis dokuları çıkarıldı ve sol epididimisler önceden hazırlanıp 37 °C’ye kadar ısıtılmış 2 ml tris tamponu içeren petri kaplarına yerleştirildi. Petri kapları sperm analizinin yapılacağı KTÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki Görüntüleme Laboratuvarı’na avuç içi inkübasyonu altında hızlıca ulaştırıldı.



Resim 2: Deneklere ait testis ve epididimis dokularının çıkarılması.

Çıkarılan sol testis dokuları ise hassas terazi ile yapılan tartımın ardından serum fizyolojik ile yıkanıp enine ikiye bölündü ve bir yarıları 72 saat fikse edilmek üzere daha önceden hazırlanan Bouin solüsyonu içeren cam kavanozlara, diğer yarıları ise biyokimyasal inceleme için eppendorf tüplerine yerleştirildi. Eppendorf tüpleri biyokimyasal değerlendirmelerin yapılacağı zamana kadar Biyokimya Laboratuvarı'nda -80 °C'de muhafaza edildi.

3.3. Sperm Analizi

37 °C'ye kadar ısıtılmış ve 2 ml tris tamponu (tris-hydroxymethyl-aminomethane) (33) içeren petri kapları içinde, Görüntüleme Laboratuvarı'na ulaşan sol epididimis dokuları, bu kaplarda iki adet lam yardımıyla hızlıca parçalandı. 37 °C'lik etüvde 30 dk'lık inkübasyonla spermlerin mevcut sıvı içinde yüzmesi sağlandı.

Motilite oranları ve total sperm sayılarının tespiti için bu sıvılardan alınan 5 µl'lik numuneler Makler sayım kamerasının kuyucuğuna koyuldu ve kamaranın kapağı kapatıldı. Işık mikroskopunda (Olympus BX-51) 200X büyütme altında 10 karedeki motil ve immotil sperm sayıları belirlendi ve motilite oranları hesaplandı. Motil ve immotil spermlerin toplamaları ise $10^6/\text{ml}$ şeklinde total sperm sayısı olarak kaydedildi.

Vitalite ve normalite tayini için her bir petri kabındaki tris tamponuyla karışmış sperm sıvısından 10 µl alınıp her birinin üzerine 20 µl eozin y eklendi. 15 sn boyunca karışmaları sağlandıktan sonra bu sıvılardan alınan 10 µl'lik örnekler lamlar üzerine yayıldı. Işık mikroskopunda 400X büyütme altında her bir lamdan canlı ve cansız ayrımı yapılarak toplamda 50 hücre sayıldı ve vitalite oranları hesaplandı. Eş zamanlı olarak bu hücrelerin morfolojik normalite değerlendirmeleri de yapıldı. Normal ve anormal sperm sayıları belirlenip normalite oranları kaydedildi.

3.4. Deney Sürecinde Kullanılan Solüsyonlar

3.4.1. Tris Tamponu

Sperm analizi için kullanılan tris tamponu 0,4 molar (M) derişime sahip 250 ml'lik çözelti olarak hazırlandı. Öncelikle “molarite = mol sayısı / çözeltinin hacmi (litre)” formülü ile kullanılması gereken tris'in mol sayısı hesaplandı ($0,4 = \text{mol sayısı} / 0,25 \rightarrow \text{mol sayısı} = 0,1$). Mol kütlesi 121,14 gr olan tris'ten 0,1 mol yani 12,114 gr alındı ve 200 ml suda çözüldü. Üzerine pH: 7,4'e ayarlanana kadar 1 M derişimli HCl çözeltisi eklendi. Ardından çözeltinin hacmi suyla 250 ml'ye tamamlandı.

3.4.2. Bouin Fiksativ

Elde edilen testis dokularının fiksasyonunda kullanılan Bouin solüsyonu, aşağıda hacimsel oranları verilen 3 bileşenin bir cam kaba, yazıldığı sırayla eklenmesiyle hazırlandı:

- 75 ml $\rightarrow$ Pikrik asitin sudaki doymuş çözeltisi
- 75 ml $\rightarrow$ Formaldehit solüsyonu (%37-40)

- 5 ml → Glasiyel asetik asit

3.4.3. %10'luk Formaldehit Fiksatif

Elde edilen testis ve epididimis dokularının fiksasyonunda kullanılan %10'luk formaldehit fiksatif %37-40'lık formaldehit solüsyonunun aşağıdaki oranda suyla karıştırılmasıyla hazırlandı:

- %10 → Formaldehit solüsyonu (%37-40)
- %90 → Distile su

Hazırlanan çözelti her ne kadar %10'luk formaldehit fiksatif olarak anılsa da çözeltideki formaldehit oranı yaklaşık %4 idi.

3.5. Histopatolojik Değerlendirmeye Hazırlık

3.5.1. Testis Dokularının Hazırlanması

Sakrifikasyonun ardından deneklerden alınan sol testis dokularının bir yarıları, her denek için ayrı ayrı hazırlanmış cam kavanozlardaki Bouin solüsyonları içerisinde KTÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki Mikropreparasyon Laboratuvarı'na götürüldü. Bouin solüsyonunda 72 saat boyunca fikse edilen dokular 3. günün sonunda fiksatiften arınmaları için %70'lik etil alkol solüsyonuna geçirildi. Etil alkol solüsyonları her saat başı değiştirilmek suretiyle 8 saat boyunca yıkanan dokular bu işlemin ardından doku takip kasetleri ile kasetlendi ve kasetlerin üzerine tanımlayıcı bilgiler not edildi. Kasetler doku takip cihazına (Thermo Scientific Excelsior AS, İngiltere) yerleştirildi ve ayrıntıları Tablo 1'de belirtilen standart doku takip prosedürü uygulandı.

Tablo 1: Standart doku takip prosedürü

Uygulama	Süre
Formaldehit	1 saat
Alkol (30°C)	50 dakika
Alkol (30°C)	1 saat
Alkol (30°C)	1 saat
Alkol (30°C)	1 saat
Alkol (30°C)	1 saat
Alkol (30°C)	1 saat
Alkol (30°C)	1,5 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Parafin (58°C)	1 saat
Parafin (58°C)	1 saat
Parafin (58°C)	1,5 saat

Takibin ardından bloklama cihazında (Leica HistoCare Arcadia H, Çin) parafin bloklara gömülen dokular aynı cihazın soğutma ünitesinde soğumaya bırakıldı. Yeterli soğuma sağlandıktan sonra basemoldlardan çıkarılan bloklar kesilene kadar beklemek üzere +4 °C'ye ayarlı buzdolabına yerleştirildi. Benmariye (Apex Instruments, USA) koyulan suyun sıcaklığı 37 °C'ye ayarlandı ve tam otomatik mikrotom cihazıyla (Leica RM 2255, Almanya) bloklardan 5 µm'lik kesitler alındı. Kesitler kırışıklıklarının giderilmesi amacıyla benmarideki suyun yüzeyine serildi ve ardından lamlara aktarıldı. Hematoksilen&eosin (H&E), Masson trikrom, periyodik asit Schiff (PAS) ve TUNEL boyamalar için her bir hayvana ait doku kesitleriyle biri pozitif şarjlı olmak üzere 4 ayrı lam takımı hazırlandı.

Lamlar bir süre kurumaya bırakıldıktan sonra normal lamlara alınmış bir takım, zembillere dizildi ve otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) Tablo 2'deki prosedürle H&E boyandı. Boyaması tamamlanan lamlar üzerilerine kapama medyumunu damlatıldıktan sonra lamelle kapatıldı ve kurumaya bırakıldı.

Tablo 2: Hematoksilen & eozin boyama prosedürü

Uygulama	Süre
Fırın (60 °C)	45 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
%100 Alkol	5 dakika
%96 Alkol	5 dakika
%70 Alkol	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Hematoksilen	2 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Asit Alkol	1 saniye
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Amonyaklı Su	10 saniye
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Eozin	1,5 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
%96 Alkol	5 saniye
%100 Alkol	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika

Ardından Masson trikrom boyamaya geçildi. Bir diğer normal lam takımı zembillere dizildi ve otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) Tablo 3'te ayrıntıları verilen deparafinizasyon programı uygulanarak deparafinize edildi. Daha sonra kit (Masson Trikrom Boyama Kiti, GBL, Türkiye) kullanılarak firmanın önerdiği Tablo 4'teki protokolle Masson trikrom boyama yapıldı. Kapama medyumunu damlatılan lamalar lamelle kapatılıp kurumaya bırakıldı.

Tablo 3: Deparafinizasyon programı

Uygulama	Süre
Fırın (60 °C)	45 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
%100 Alkol	5 dakika
%96 Alkol	5 dakika
%70 Alkol	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	30 saniye

Tablo 4: Masson trikrom boyama protokolü

Uygulama	Süre
Weigert'in Demirli Hematoksileni (A+B)	10 dakika
Kurutma	45 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Pikrik Asit Alkolik Çözeltisi (C)	4 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Gelincik Kızılı Fuksin Çözeltisi (D)	4 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Fosfomolibdik Asit Çözeltisi (E)	10 dakika
Kurutma	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Masson Anilin Mavisi Çözeltisi (F)	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	30 saniye
%70 Etanol	30 saniye
%96 Alkol	30 saniye
%100 Alkol	30 saniye
Ksilen	1 dakika

Üçüncü normal lam takımı PAS boyama için kullanıldı. Lamalar zembillere dizilip otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) deparafinize edildikten sonra kit (PAS McManus Boyama Kiti, GBL, Türkiye) ile firmanın önerdiği Tablo 5'teki protokole uygun şekilde boyanıp lamelle kapatıldı ve kurumaya bırakıldı.

Tablo 5: Periyodik asit Schiff boyama protokolü

Uygulama	Süre
Periyodik Asit Çözeltisi (A)	10 dakika
Distile Su (Yıkama)	2 dakika
Schiff Ayıracı McManus (B)	20 dakika
Distile Su (Yıkama)	2 dakika
Sodyum Metabisülfid Çözeltisi (C)	2 dakika
Tespit Çözeltisi (D)	2 dakika
Distile Su (Yıkama)	2 dakika
Mayer Hemalum Çözeltisi (E)	3 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 dakika
%70 Etanol	30 saniye
%96 Alkol	30 saniye
%100 Alkol	30 saniye
Ksilen	1 dakika

Son olarak TUNEL boyamaya geçildi. Pozitif şarjlı lam takımı zembillere dizildi ve otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) deparafinize edildikten sonra Tablo 6'daki protokole göre boyanıp lamelle kapatıldı.

Tablo 6: TUNEL boyama protokolü

Uygulama	Özellikli Ortam	Süre
Phosphate Buffered Saline (PBS)	-	2x5 dakika
Hydrogen Peroxide Block (Thermo Scientific/TA-125-HP)	-	15 dakika
Distile Su (Yıkama)	-	5 dakika
PBS	-	2x5 dakika
Ultra V Block (Thermo Scientific/TA-125-UB)	-	10 dakika
Enzyme Solution (TdT) + Label Solution (fluorescein-dUTP) (Roche/11684817910)	37 °C, nemli	1,5 saat
PBS	-	2x5 dakika
Converter Peroxidase (anti- fluorescein antibody-peroxidase) (Roche/11684817910)	37 °C, nemli	30 dakika
PBS	-	3x5 dakika
DAB Kromojen Kit (Thermo Scientific/TA-125-HD)	Karanlık	2 dakika
Distile Su (Yıkama)	-	5 dakika
Hematoksilen	-	2 dakika
Distile Su (Yıkama)	-	5 dakika
%70 Etanol	-	5 dakika
%96 Etanol	-	5 dakika
%100 Etanol	-	5 dakika
Ksilen	-	5 dakika

3.5.2. Epididimis Dokularının Hazırlanması

Deneklerin sakrifikasyonunun ardından eksize edilen sağ epididimis dokuları önceden hazırlanmış %10'luk formaldehit çözeltisi içeren kavanozlara yerleştirildi.

%10'luk formaldehitte 72 saat fikse edilen dokular tek tek kasetlenip doku takip cihazında (Thermo Scientific Excelsior AS, İngiltere) standart doku takip programı ile takip edildi. Ardından bloklama cihazında (Leica HistoCare Arcadia H, Çin) parafin bloklar haline getirilen dokulardan tam otomatik mikrotom cihazıyla (Leica RM 2255, Almanya) 5 µm'lik kesitler alındı. Kesitler benmaride (Apex Instruments, USA) kırışıklıkları giderilip lam üzerine alındı. Elde edilen lamalar otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) H&E boyandı ve lamelle kapatılıp kurumaya bırakıldı.

3.6. Histopatolojik İncelemeler

İncelemelere deneklerin vücut kütle değişimleri ve testis kütleleri değerlendirilerek başlandı. Deneyin 1, 4 ve 7. günlerinde yapılan vücut kütle tartım sonuçlarına göre deneklerin vücut kütlelerinin deney boyunca değişimi saptandı ve gruplar arasında fark olup olmadığı sorgulandı. Benzer şekilde testis kütlesi tartım sonuçları incelendi ve gruplar arası farklılıklar sorgulandı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Mikroskopik incelemelerin tamamı KTÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki Görüntüleme Laboratuvarı'nda dijital fotoğraf makinesi (Olympus, DP 71, Japonya) ataçmanlı ışık mikroskopunda (Olympus BX 51, Japonya) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Almanya) programı ile gerçekleştirildi.

3.6.1. Hematoksilen & Eozin Boyalı Preparatlar

Mikroskopik incelemeye hazırlanan testis dokularından ilk olarak H&E ile boyanmış olanlar değerlendirmeye alındı. Bu preparatlarda genel histolojik görünüm değerlendirildi ve modifiye Johnson skorlaması (Tablo 7) yapıldı (25). Histomorfometrik olarak ise seminifer tübül çapları, germinal epitel kalınlıkları, germinal epitel kalınlıklarının seminifer tübül çaplarına oranları ve lümenine germinal hücre dökülmüş tübül sayıları tespit edildi. Ayrıca genel histolojik görünüm incelemesi yapılırken karşılaşılan anormal morfolojik yapıların da sayımı gerçekleştirildi. Bahsi geçen tüm incelemeler her bir hayvana ait preparattan rastgele

seçilen 25 seminifer tübülün değerlendirilmesiyle yapıldı. Elde edilen veriler gruplar arasında karşılaştırıldı.

Tablo 7: Modifiye Johnson skorlama kriterleri

Skor	Kriter
10	Tam spermatogenez, birçok spermatozoa
9	Hafif bozulmuŗ spermatogenez, birçok geç spermatid, düzensiz epitel
8	Tübül baŗına beŗten daha az spermatozoa, birkaç geç spermatid
7	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birçok erken spermatid
6	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid
5	Spermatozoa ve spermatid yok, pek çok spermatosit
4	Spermatozoa ve spermatid yok, birkaç spermatosit
3	Sadece spermatogonyum
2	Germinal hücre yok, sadece Sertoli hücreleri
1	Seminifer epitel yok

Mikroskopik incelemeye hazırlanan epididimis preparatlarında ise genel histolojik görünüm incelendi. Epitelyal deęiŗiklikler, lümendeki spermatozoon yığınları, peritübüler doku değerlendirildi.

3.6.2. Masson Trikrom Boyalı Preparatlar

Masson trikrom boyalı preparatlarda interstisyel bağ dokusu aŗaęıda verilen şekilde 1-5 puan üzerinden skorlandı:

- 1- Normal veya normale yakın
- 2- Hafif hasar/düzensizlik
- 3- Orta düzeyde hasar/düzensizlik
- 4- Ağır hasar/düzensizlik
- 5- Çok ağır hasar/düzensizlik

Skorlamada her bir denekten rastgele seçilen 25 seminifer tübülün etrafındaki interstisyel bağ dokusu değerlendirildi.

3.6.3. Periyodik Asit Schiff Boyalı Preparatlar

PAS boyalı preparatlarda ise seminifer tübül bazal membranları aşağıda verilen şekilde 1-5 puan üzerinden skorlandı:

- 1- Normal veya normale yakın
- 2- Hafif hasar/düzensizlik
- 3- Orta düzeyde hasar/düzensizlik
- 4- Ağır hasar/düzensizlik
- 5- Çok ağır hasar/düzensizlik

Skorlamada her bir denekten rastgele seçilen 25 seminifer tübüle ait bazal membranlar değerlendirildi.

3.7. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Apoptoz değerlendirmesi için TUNEL tekniği ile boyanmış her bir deneğe ait preparattan rastgele seçilmiş 5 tübüldeki tüm hücreler TUNEL(+/-) ayrımı yapılarak sayıldı. TUNEL (+) hücre sayılarının toplam hücre sayılarına oranları hesaplanarak apoptotik indeksler (AI) tespit edildi. Belirlenen AI değerlerinin gruplar arası karşılaştırmaları yapıldı.

3.8. Biyokimyasal Değerlendirmeye Hazırlık

Yaklaşık 100 mg testis dokusu 2 ml soğuk homojenizasyon tamponu ile deney tüpünde dokular tamamen parçalanıncaya kadar yaklaşık 20 sn buz içerisinde homojenize edildikten sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. 1,5 ml'lik eppendorfa 750 µl süpernatant koyuldu. Üzerine 600 µl etanol-kloroform (2:3) olan karışımdan ilave edildi. +4 0C'de 10000g'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında eppendorfun üst kısmındaki protein fazlarda protein tayini, SOD ve CAT aktivitesi ölçüldü.

Testis dokularının homojenizasyonunda kullanılan homojenizasyon tamponunun hazırlanışı aşağıda verilmiştir:

İzolasyon tamponu (50 mM Tris/HCl Tamponu): 1,514 g Tris yaklaşık 220 ml saf suda çözüldükten sonra karışımın pH'sı 2 M HCl ile 7.4'e ayarlandı. Homojenizasyona başlamadan hemen önce 125 µl Triton X100 ilave edilerek son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

3.9. Biyokimyasal İncelemeler

3.9.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley'in (43) geliştirdiği yöntem modifiye edilerek belirlendi. Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan O_2^- 'lerinin nitroblue tetrazoliumu indirgemesi sonucu oluşan mor renkli formazan molekülünün 560 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir.

SOD enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir:

SOD Reaktif Karışımı: 3.65 mg ksantin, 8.93 mg etilendiamintetraasetik asit, 1.01 g Na_2CO_3 , 12 mg BSA tartıldı ve hacmi 156 ml'ye tamamlandı.

2 M $(NH_4)_2SO_4$ Çözeltisi: 2.64 g $(NH_4)_2SO_4$ 10 ml saf suda çözüldü. Ksantin oksidaz enziminin hazırlanmasında kullanıldı.

0.8 mM $CuCl_2$ Çözeltisi: 6.82 mg $CuCl_2$ alındı ve 50 ml deiyonize suda çözüldü. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 4.59 U/ ml'lik orijinal şişeden 72,6 µl alınıp 2 ml'ye $(NH_4)_2SO_4$ çözeltisi ile tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlandı.

150 µM Nitroblue Tetrazolium Çözeltisi: 4.9 mg nitroblue tetrazolium 40 ml deiyonize suda çözülerek elde edildi. Nitroblue tetrazolium çözeltisi ışıktan korundu.

SOD standart çözeltileri: 100 U/ml'lik stok SOD standardından 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 U/ml'lik SOD standartları PBS tamponu kullanılarak hazırlandı. Testis dokusunda 4 kat seyreltme yapıldı. SOD aktivitesi ölçümü Tablo 8'e göre gerçekleştirildi.

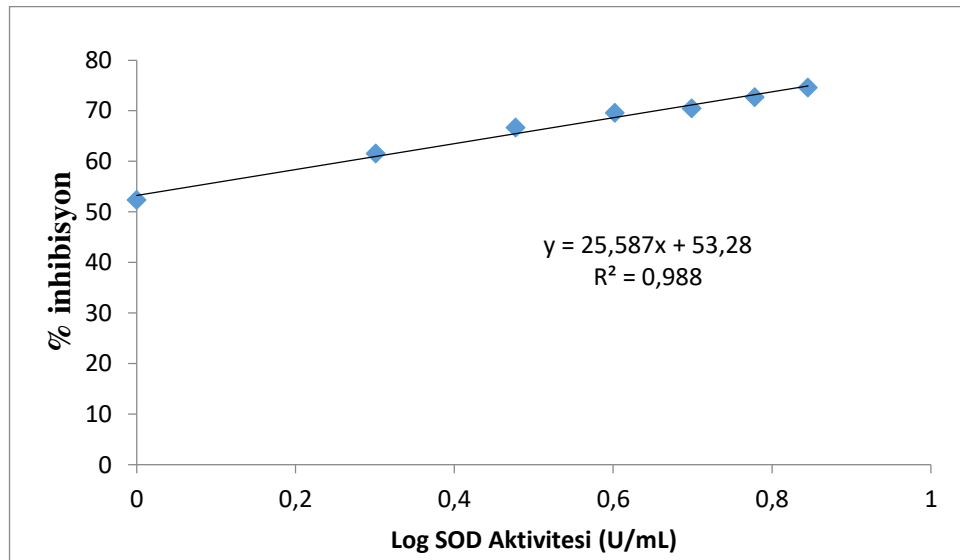
Tablo 8: SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim (µl)
Numune, Standart, Kör	200
SOD Reaktif Karışımı	796
Nitroblue Tetrazolium	204
Ksantin Oksidaz	20
25 °C’de 20 dk inkübasyon	
CuCl ₂	400
560 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	

SOD aktivitesi hesabında kullanılan % inhibisyonu belirlemek için aşağıdaki Eşitlik 1’de verilen formül kullanıldı:

Eşitlik 1: $\% \text{ inhibisyon} = (Abs \text{ Kör} - Abs \text{ Numune}) \div (Abs \text{ Kör}) \times 100$ (43)

Standart grafiği, % inhibisyona karşılık gelen konsantrasyonların logaritması belirlenerek Şekil 4’te gösterildiği gibi çizildi. Standart grafiğinde belirlenen denklem kullanılarak numunelerin % inhibisyonlarına karşılık gelen SOD konsantrasyonlarının logaritmik değeri hesaplandıktan sonra bunların anti logaritmaları alınarak numunelerin SOD konsantrasyonu hesaplandı. Seyreltme faktörü ile çarpıldı. Belirlenen SOD konsantrasyonu, toplam protein miktarına bölünerek SOD aktivitesi belirlendi. Sonuçlar U/mg protein olarak hesaplandı.



Şekil 4: SOD aktivitesi hesabında kullanılan standart grafiği

3.9.2. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi

Testis dokusunda CAT enzim aktivitesini belirlemede Aebi yöntemi kullanıldı (44). Bu yöntemin temeli H_2O_2 'nin enzimatik bozulması sonucu 240 nm'de absorbanstaki düşüşün takip edilmesine dayanır.

Kullanılan çözeltiler:

Fosfat Tamponu (pH:7.0; 50 mM): 3,41 g KH_2PO_4 deiyonize suda çözüldü son hacmi 500 ml'ye tamamlandı. 4,45 g $NaHPO_4 \cdot 2H_2O$ deiyonize suda çözüldü son hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve pH: 7.0'a ayarlandı.

H_2O_2 : 360 μ l %30'luk H_2O_2 'den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 ml'ye tamamlandı (günlük hazırlandı).

Doku homojenatları fosfat tamponu ile 50 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu. Kuartz küvetlere Tablo 9'a göre pipetlemeler kör ve numune karışımları için ayrı ayrı yapıldı.

Tablo 9: Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kör (μ l)	Numune (μ l)
Numune	1000	1000
Fosfat Tamponu	500	-
H_2O_2	-	500
240 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.		

H_2O_2 eklenir eklenmez kuartz küvetler altüst edildi ve 240 nm'de 30 sn süreyle her 10 sn'de bir absorbanslar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi. Absorbanslardaki düşüşün dakikada 0.015 ile 0.100 arasında olmasına dikkat edildi. Eğer bu aralıkta düşüş olmazsa numune dilüsyonları yeniden ayarlanmalıdır.

CAT aktivite tayininde birinci mertebede reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. Absorbanslardaki 10 s'lik düşüş için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

$$k = (2.3/10) \times \log(A_1/A_2) \text{ s}^{-1} \text{ (43)}$$

Burada;

A1= Başlangıç absorbansı

A2= 10 sn sonraki absorbanstır.

Eşitlik 1'e göre bulunan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı. Ardından testis dokularında g protein başına CAT aktivitesi hesaplandı. Sonuçlar k/g protein olarak verildi.

3.9.3. Protein Miktar Tayini

Testis dokusunda protein tayini, modifiye Bradford metodu (Coomassie Brilliant Blue yöntemi) uygulanarak yapıldı. Bu yöntem fosforik asitli ortamda Coomassie Brilliant Blue G250'nin proteinlere bağlanması ve oluşan mavi renkli kompleksin 600 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır.

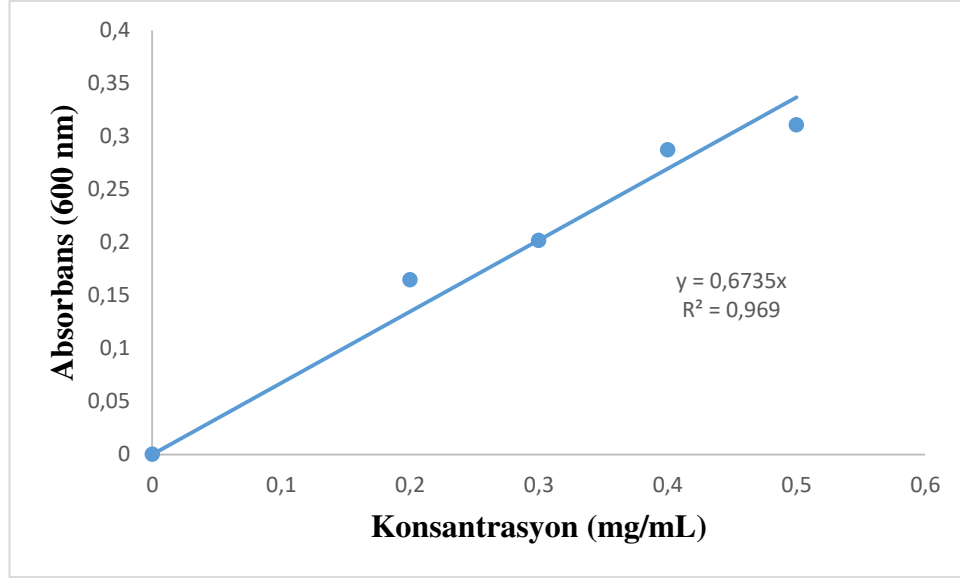
Kullanılan Çözeltiler:

Bradford Reaktifi: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 ml % 95'lik etanolde çözüldü, üzerine 10 ml % 85'lik H₃PO₄ eklendi. Son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Standart Çözeltileri: Standartlar BSA'dan 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 mg/ml'lik konsantrasyonlarda hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Süpernatantlardaki protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 100 µl Bradford Reaktifi ve 10 µl numune alındı. Bu miktarlar pleyte yüklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında karanlık ortamda 10 dk bekletildi. Mikropleyt okuyucu ile 600 nm'de absorbanslar okundu. Şekil 5'teki standart grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar hesaplandı. Sonuçlar mg/ml cinsinden ifade edildi.



Şekil 5: Protein tayininde kullanılan standart grafiği

3.9.4. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü

Testis dokularının homojenizasyonu için yaklaşık 100 mg testis dokusu 2 mL soğuk homojenizasyon tamponu ile deney tüpünde dokular tamamen parçalanıncaya kadar yaklaşık 30 sn buz içerisinde homojenize edildikten sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve MDA seviyesi belirlendi. Bu yöntem MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit ile oluşturduğu kompleksin renginin 532 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanan metod modifiye edilerek yapıldı (45). MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

Kullanılan çözeltiler:

Homojenizasyon tamponu: % 1,15'lik KCl çözeltisine %0,05'lik TritonX100 koyularak hazırlandı.

% 1'lik H₃PO₄ Çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 ml % 85'lik H₃PO₄ eklendi ve son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

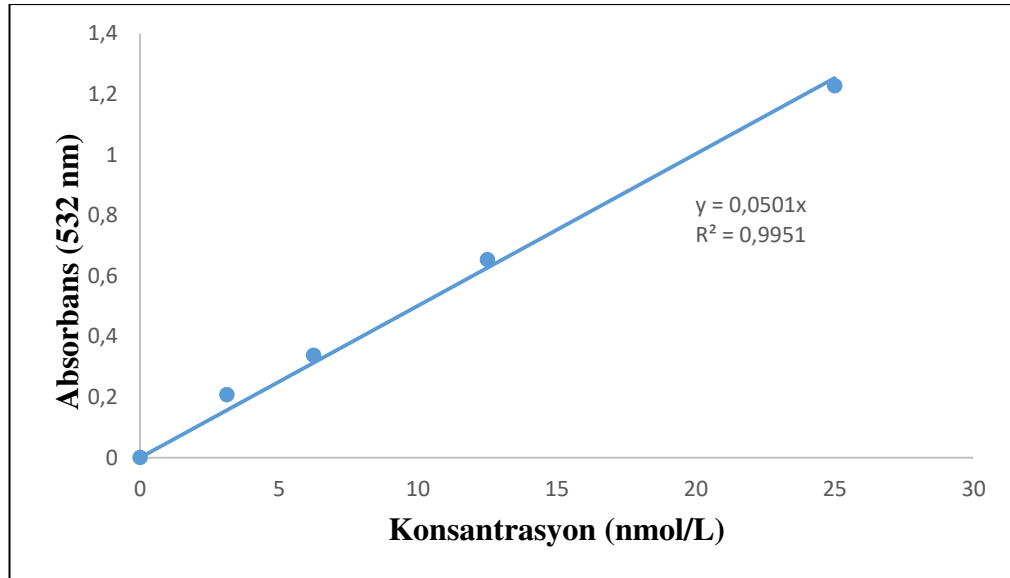
Tiyobarbitürik asit (TBA) Çözeltisi: 0.67 g TBA 50 ml saf suda manyetik bar yardımıyla 30 °C'de yaklaşık 20 dakika karıştırıldı. TBA çözeltisi tamamen soğuduktan sonra üzerine 50 ml asetik asit ilave edildi ve iyice karıştırılarak çalışmada kullanılan nihai çözelti elde edildi.

Standart çözeltiler: 82.5 µl tetrametoksipropan 50 ml 0.01 M HCl çözeltisine eklendi ve 50 °C’de 1 saat inkübe edildi. Reaksiyon sonucu oluşan 10000 nmol/ml’lik stok MDA standardından 100 nmol/ml’lik ara stok çözelti hazırlandı. Ara stok çözeltiden 10 nmol/ml’lik çözelti elde edildi ve bu çözeltiden seri seyreltmeler yapılarak 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.91, 1.95 nmol/ml’lik standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 10’da, standart grafikleri Şekil 6 ve 7’de verilmiştir.

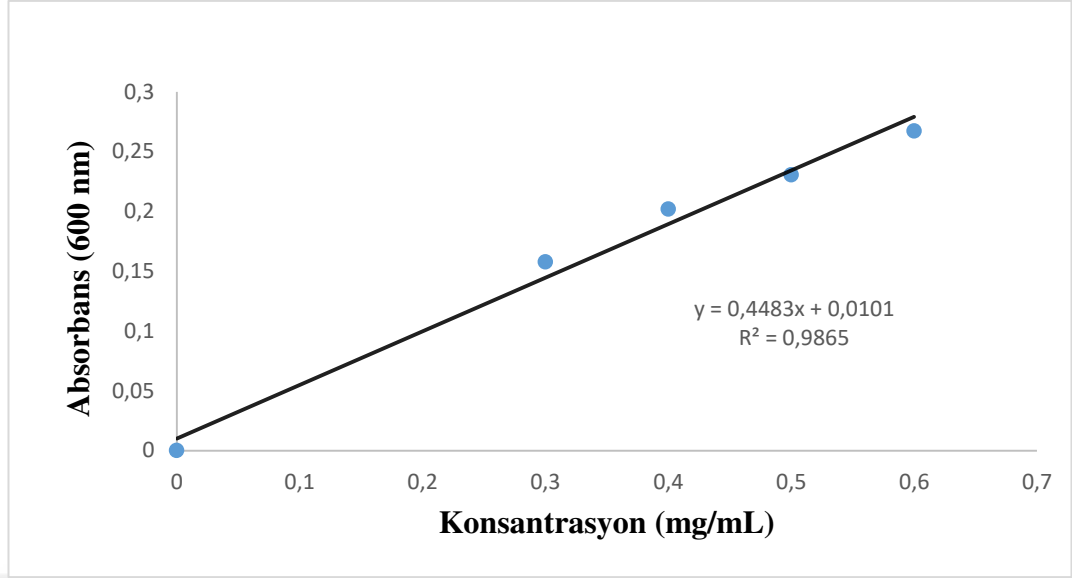
Tablo 10: MDA seviyesi için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Hacim (ml)
Numune, Standart, Kör	0,5
%1’lik H ₃ PO ₄ Çözeltisi	3
Tiyobarbitürik asit (TBA) Çözeltisi	1
100 °C’de 45 dakika inkübasyon	
532 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	

Şekil 6’daki standart grafik kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar ise nmol/mg protein olarak hesaplandı.



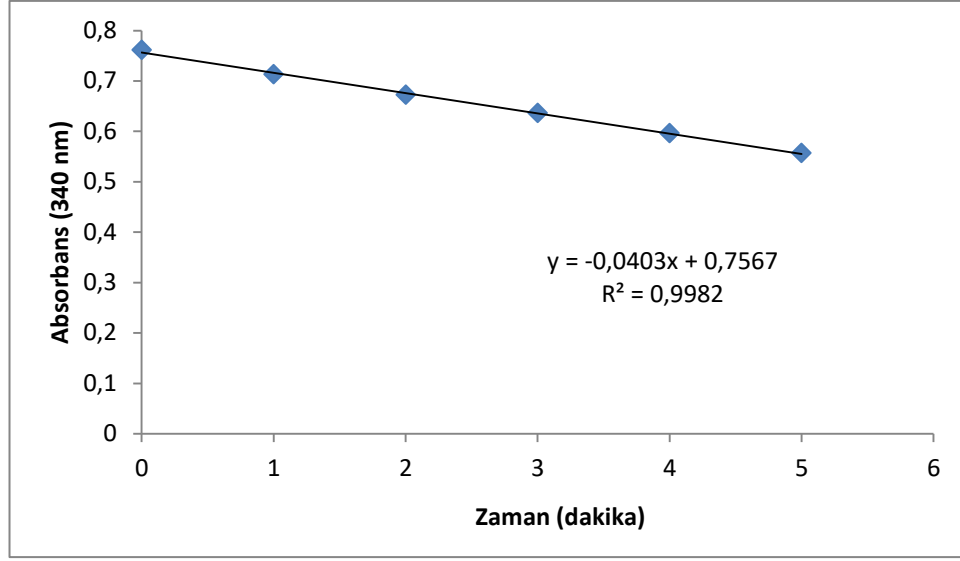
Şekil 6: Protein fazlarda MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği



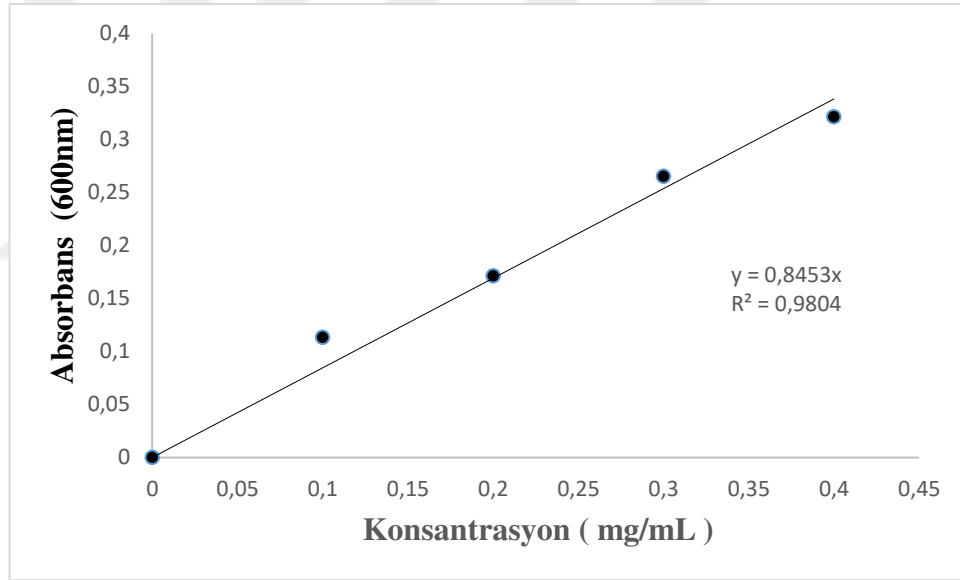
Şekil 7: MDA seviyesini belirlemek için yapılan protein tayininde kullanılan standart grafiği

3.9.5. GPx Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Testis dokusunda GPx aktiviteleri Cayman Chemical (ABD) firmasının ürettiği 703102 numaralı kitin prosedürüne uygun olarak belirlendi. Bu metotta GPx ve glutatyon redüktaz enzimleri kullanılır. Numunede bulunan hidroperoksitlerin varlığında indirgenmiş glutatyon, GPx enzimiyle yükseltgenir. Bu yükseltgenmiş glutatyon, NADPH varlığında glutatyon redüktaz enzimi ile indirgenmiş glutatyonla dönüştürülürken ayrıca NADP^+ elde edilir. NADPH'nin NADP^+ 'ya yükseltgenmesi sonucu 340 nm'deki absorbans düşüşü, GPx enzim aktivitesi ile orantılıdır. Numuneler seyreltilmedi ve ikili çalışıldı. GPx aktiviteleri nmol/dakika/mg protein cinsinden hesaplandı. Elde edilen GPx kontrol grafiği Şekil 8'de gösterilmiştir.



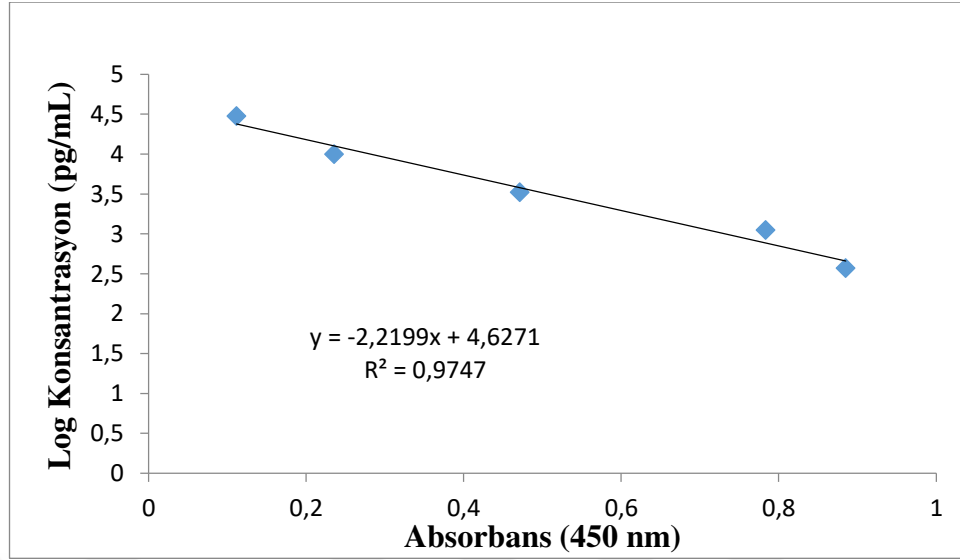
Şekil 8: GPx kontrol grafiği



Şekil 9: GPx aktivitesini belirlemek için yapılan protein tayininde kullanılan standart grafiği

3.9.5. Serum Testosteron Seviyesinin Ölçümü

Serum Testosteron ölçümünde USCN (Wuhan) firmasının ürettiği CEA458Ge 96 Tests ürün kodlu yarışmalı ELISA kiti kullanıldı. Serumda testosteron ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Numuneler seyreltilmedi ve ikili çalışıldı. Numune konsantrasyonları Şekil 10'daki standart grafiğine göre pg/ml cinsinden hesaplandı.



Şekil 10: Serum testosteron ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.10. İstatistiksel Analiz

Tüm veriler SPSS 23.0 istatistik programına aktarılarak analiz edildi. Niteliksel verilerin özetlenmesinde sayı ve yüzde, ölçümsel verilerin özetlenmesinde ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler kullanıldı.

Ölçümsel verilerin normal dağılıma uygunluğunun test edilmesinde Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı.

Normal dağılıma uyan veriler karşılaştırılırken ANOVA testi kullanıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. p değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunan durumlarda post hoc analiz yapıldı. Posthoc karşılaştırmalar yapılırken varyanslar homojen ise Tukey, varyansların homojen olmadığı durumda ise TamhaneT2 testi kullanıldı.

Normal dağılıma uymayan verilerin analizinde Kruskall Wallis testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

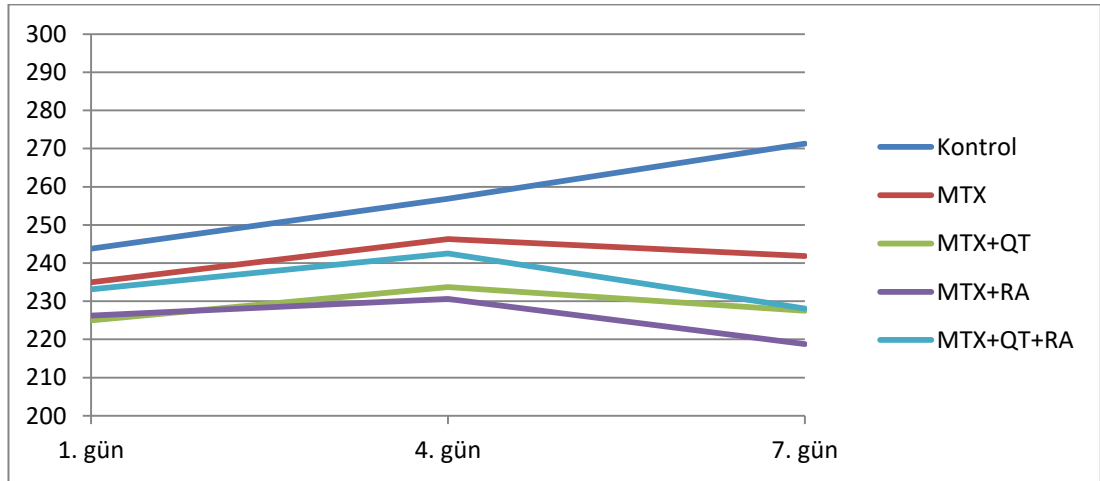
4.1. Tartım Sonuçları

Hayvanların, deneyin 1, 4 ve 7. günlerinde yapılan tartımları sonucunda Kontrol grubunda düzenli bir kütle artışı görülürken metotreksat enjeksiyonu yapılan diğer 4 grupta enjeksiyonun ardından kütle artışının yavaşlayıp durduğu, sonraki günlerde ise kütle azalması yaşandığı tespit edildi.

Tablo 11: Grupların 1, 4 ve 7. günlerdeki vücut kütleleri (gr)

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
1. gün	243,75 ±22,64	235,00 ±21,88	225,00 ±32,73	226,25 ±35,43	233,13 ±36,83
4. gün	256,88 ±22,98	246,25 ±22,48	233,75 ±30,21	230,65 ±34,38	242,50 ±33,49
7. gün	271,25 ^a ±26,15	241,88 ±22,03	227,50 ±34,43	218,75 ^a ±33,57	228,13 ±36,83

^a : Kontrol & MTX+RA → p<0,05



Şekil 11: Grupların deney sürecinde vücut kütle değişimleri

Tedavi gruplarında, verilen antioksidanların bu konuda belirgin bir düzeltici etkisi görülmedi. MTX+QT grubunda sonuçlar MTX grubuna benzer iken MTX+RA ve MTX+QT+RA gruplarında kütle düşüşü biraz daha belirgin idi.

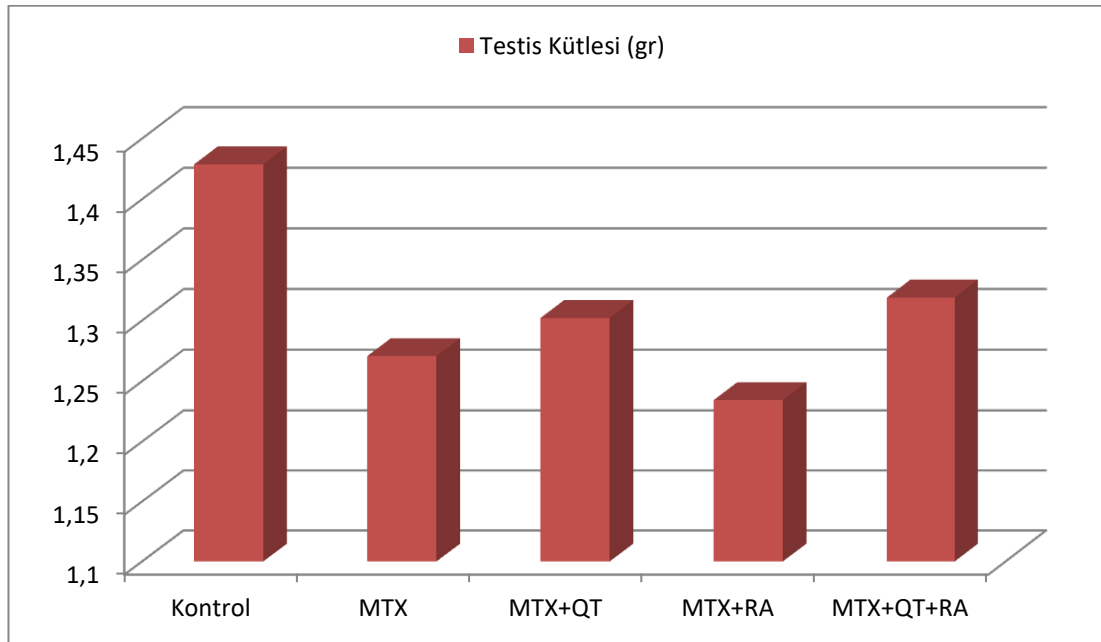
Tablo 12: Grupların deney sürecindeki vücut kütle değişim yüzdeleri

	Kontrol	MTX	MTX+QT	MTX+RA	MTX+QT+RA
Vücut Kütle Değişimi (%)	+11,28	+2,93	+1,11	-3,31	-2,14

Deneyin sonlandırılmasının ardından eksize edilen testis dokularının tartımları sonucunda Kontrol grubuna kıyasla metotreksat grubunda testis kütleleri daha düşük bulundu. MTX+QT ve MTX+QT+RA gruplarında bu düşüş kısmen önlenirken MTX+RA grubunda biraz daha derinleşti.

Tablo 13: Grupların deney sonu testis kütleleri (gr)

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
Testis Kütle (gr)	1,429 ±0,18	1,271 ±0,08	1,302 ±0,16	1,234 ±0,13	1,319 ±0,20

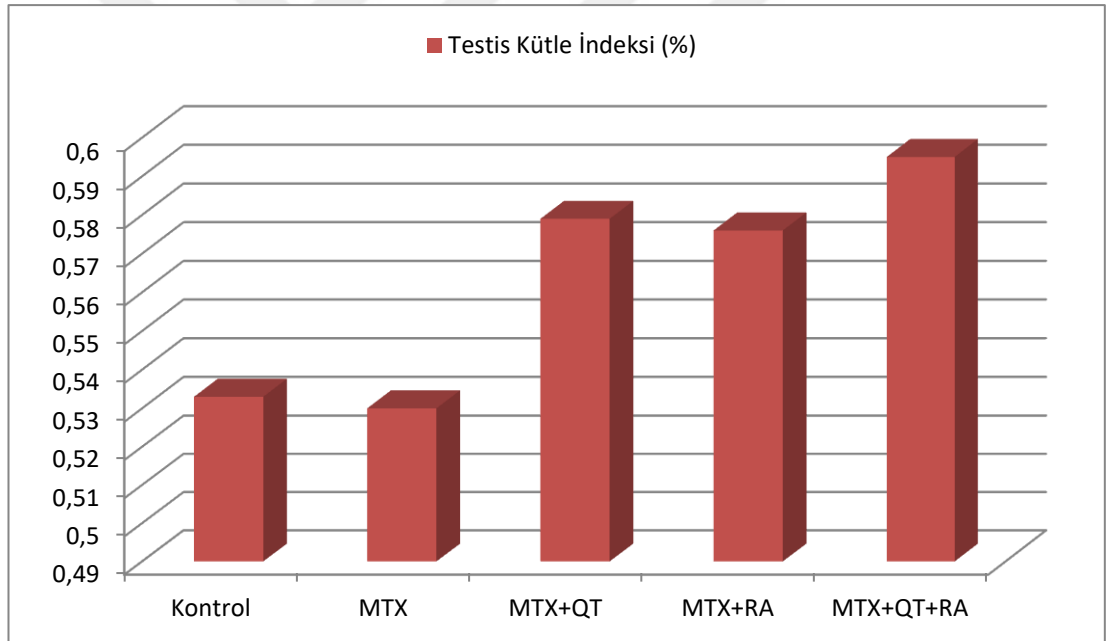


Şekil 12: Grupların deney sonu testis kütleleri

Ayrıca deneklerin “Testis Kütle İndeksi = (Testis Kütlesi / Vücut Kütlesi) x 100” formülüyle deney sonundaki “Testis Kütle İndeksleri (TKİ)” hesaplandı ve elde edilen değerler gruplar arasında karşılaştırıldı. (34). Sonuçlar MTX grubunda testis kütle indekslerinin düşük olduğunu, tedavi gruplarında ise kontrol grubundan bile yüksek olduğunu gösterdi.

Tablo 14: Grupların testis kütle indeksleri (%)

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
TKİ (%)	0,533 ±0,10	0,530 ±0,07	0,579 ±0,08	0,576 ±0,11	0,595 ±0,15



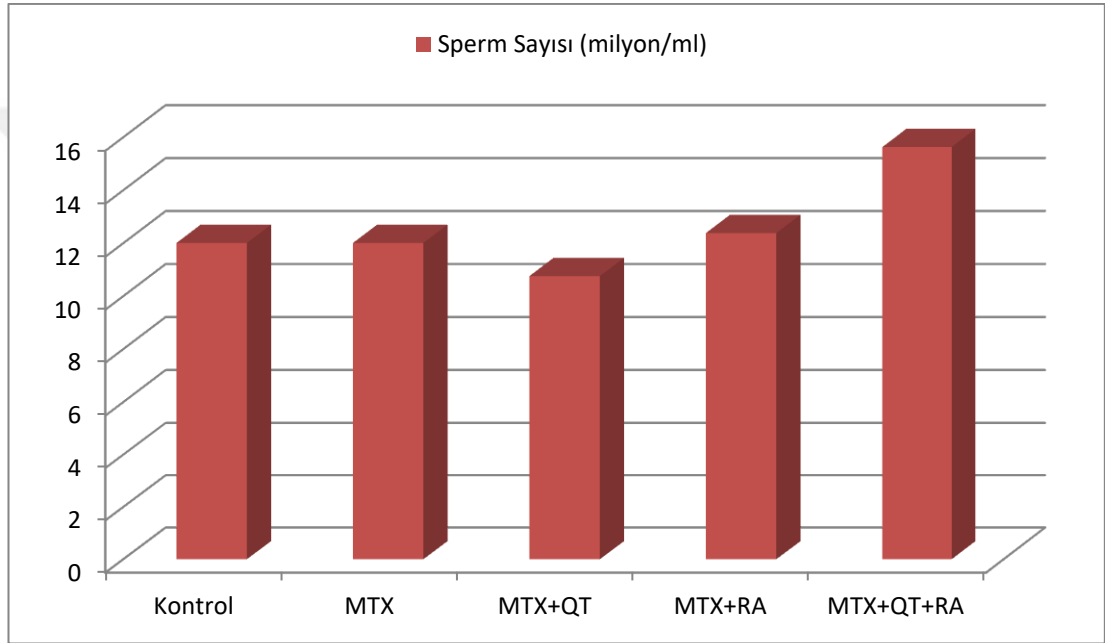
Şekil 13: Grupların testis kütle indeksleri

4.2. Sperm Analiz Sonuçları

Yapılan sperm analizi sonucunda elde edilen verilere göre metotreksatin sperm sayısını etkilemediği, quercetin'in bir miktar azalttığı, rosmarinik asitin hafif arttırdığı, quercetin ve rosmarinik asit kombinasyonunun ise bariz bir şekilde arttırdığı görüldü.

Tablo 15: Grupların toplam sperm sayıları ($10^6/\text{ml}$)

	Kontrol Ort$\pm$SD	MTX Ort$\pm$SD	MTX+QT Ort$\pm$SD	MTX+RA Ort$\pm$SD	MTX+QT+R A Ort$\pm$SD
Sperm Sayısı ($10^6/\text{ml}$)	12,000 $\pm 3,63$	12,000 $\pm 4,47$	10,750 $\pm 4,40$	12,375 $\pm 5,18$	15,625 $\pm 7,17$

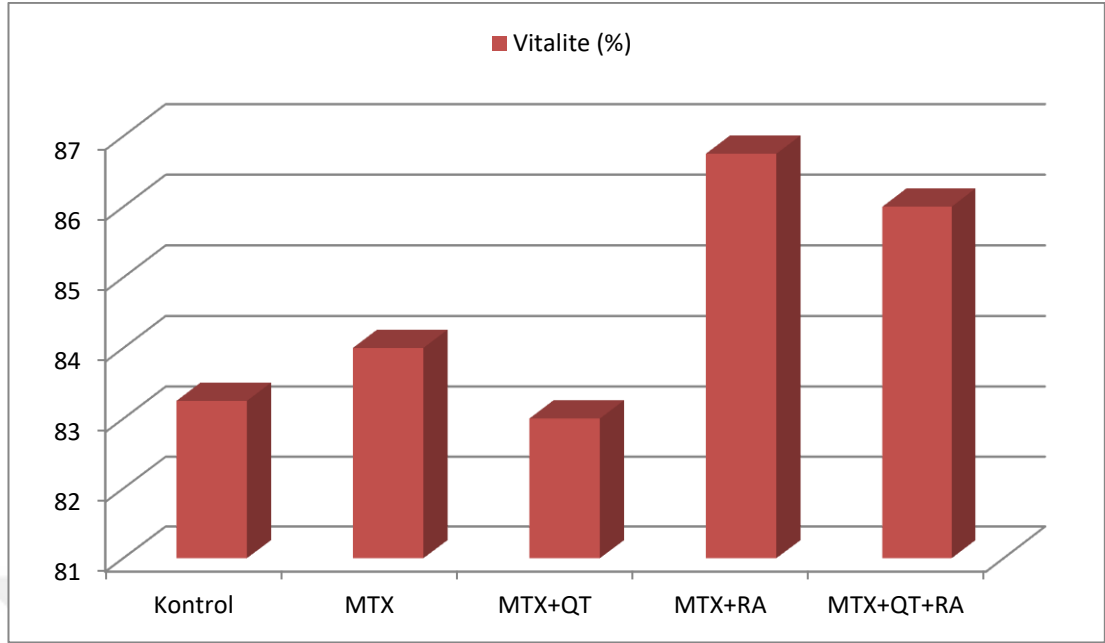


Şekil 14: Grupların toplam sperm sayıları

Vitalite değerlendirmesinde Kontrol grubuna kıyasla MTX ve MTX+QT gruplarında kayda değer bir değişim gözlenmezken MTX+RA ve MTX+QT+RA gruplarında artış tespit edildi.

Tablo 16: Grupların sperm canlılık oranları (%)

	Kontrol Ort$\pm$SD	MTX Ort$\pm$SD	MTX+QT Ort$\pm$SD	MTX+RA Ort$\pm$SD	MTX+QT+RA Ort$\pm$SD
Vitalite (%)	83,25 $\pm 5,85$	84,00 $\pm 4,28$	83,00 $\pm 7,48$	86,75 $\pm 9,25$	86,00 $\pm 7,33$

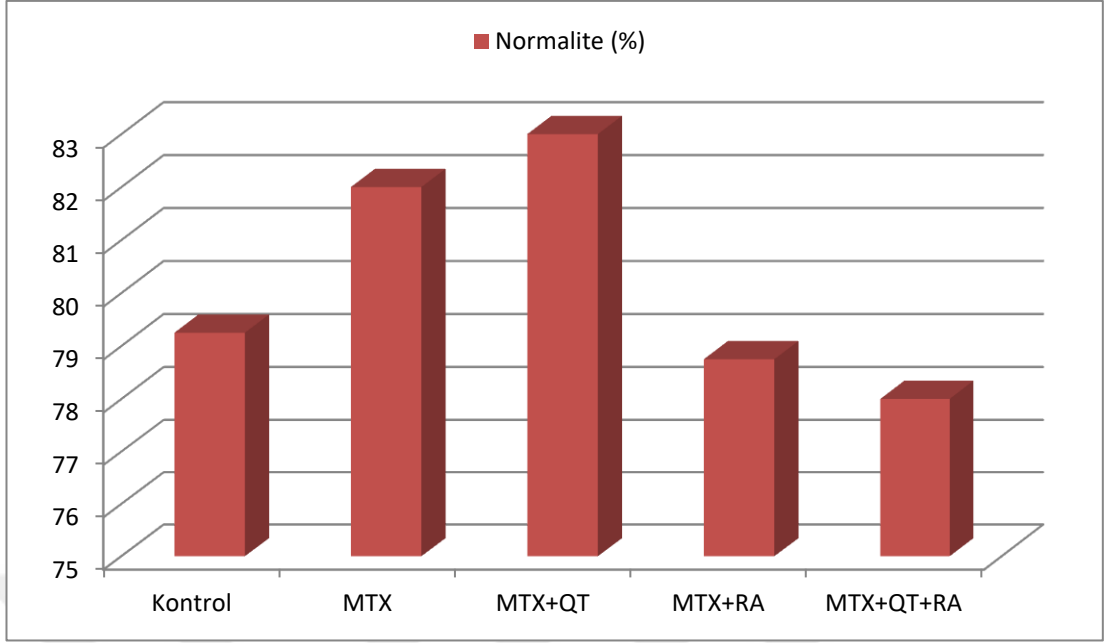


Şekil 15: Grupların sperm canlılık oranları

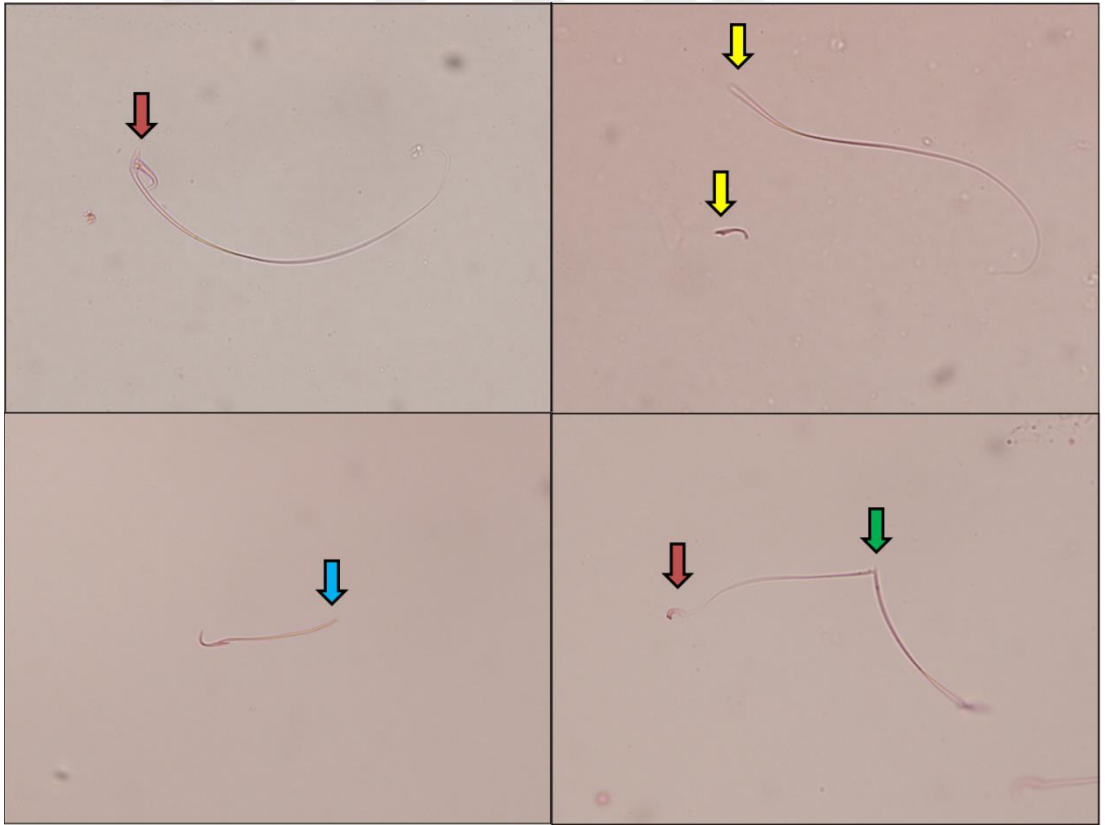
Sperm morfolojisi açısından yapılan normalite değerlendirmesinde MTX grubunda normal sperm morfolojisi Kontrol grubuna kıyasla hafif yüksek bulundu. MTX+QT grubunda da hafif bir yükselme görülürken MTX+RA ve MTX+QT+RA gruplarında ise hafif bir düşüşle karşılaşıldı.

Tablo 17: Grupların normal morfolojili sperm oranları (%)

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
Normalite (%)	79,25 ±6,32	82,00 ±9,562	83,00 ±8,21	78,75 ±11,36	78,00 ±9,07



Şekil 16: Grupların normal morfolojili sperm oranları

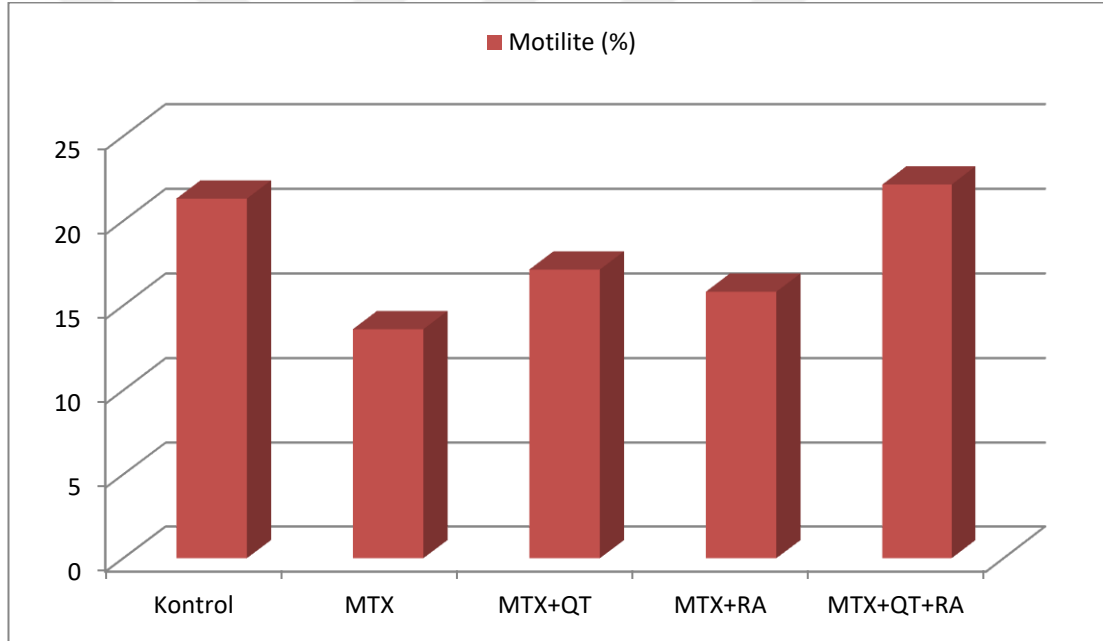


Resim 3: Sperm analizinde karşılaşılan morfolojik anomaliler. Kırmızı oklar → kırık boyun anomalisi; sarı oklar → kopuk baş anomalisi; mavi ok → kopuk kuyruk anomalisi; yeşil ok → kırık kuyruk anomalisi (Eozin y, 400x)

Motilite değerlendirmesinin sonuçlarına bakıldığında ise metotreksatın motiliteyi ciddi şekilde azalttığı tespit edildi. Quercetin ve rosmarinik asitin ayrı ayrı verildikleri MTX+QT ve MTX+RA gruplarında bu azalmayı kısmen önledikleri, birlikte verildikleri MTX+QT+RA grubunda ise tamamen önledikleri hatta hafif arttırdıkları görüldü.

Tablo 18: Grupların sperm motilite oranları (%)

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
Motilite (%)	21,31 ±7,10	13,60 ±8,01	17,12 ±12,63	15,81 ±4,68	22,14 ±13,08

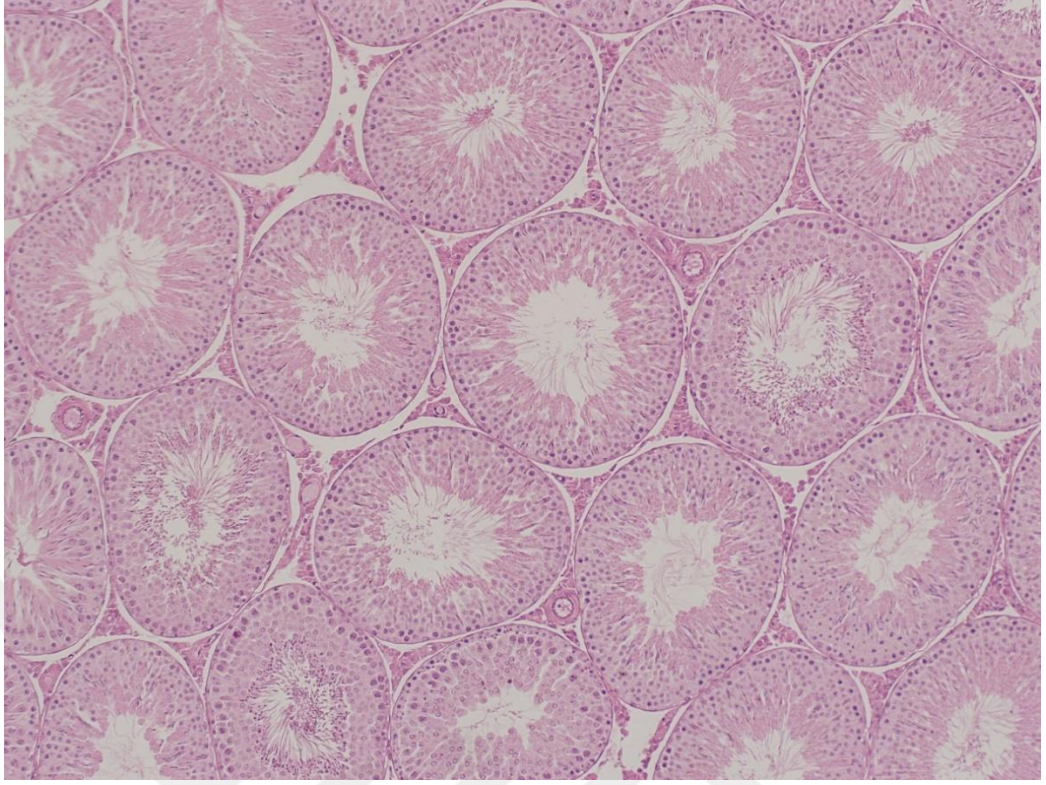


Şekil 17: Grupların sperm motilite oranları

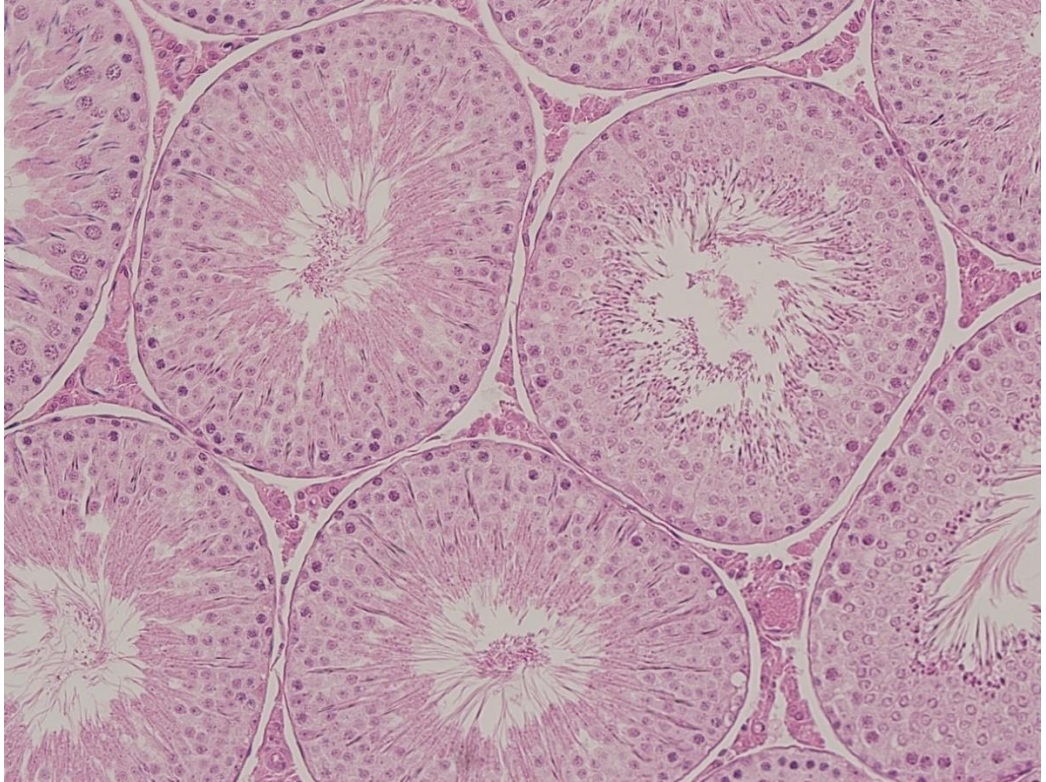
4.3. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

4.3.1. Hematoksilen & Eosin Boyalı Preparatlar

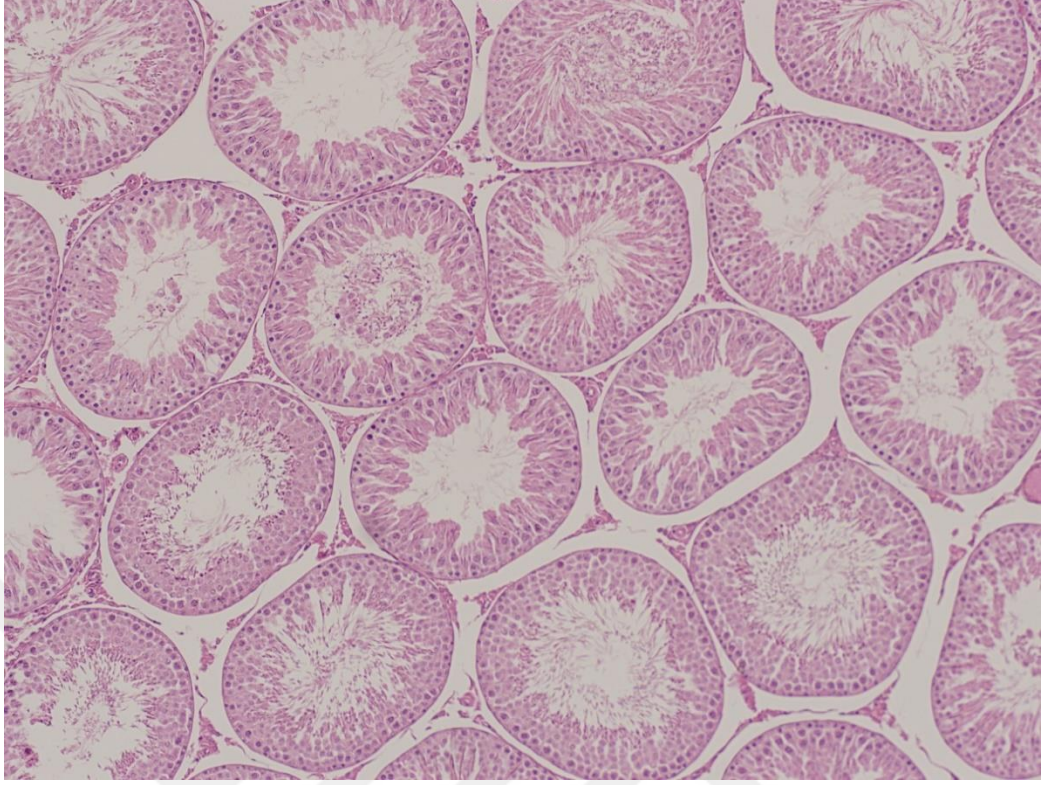
Bouin fiksatifiiyle tespit edilip H&E ile boyanmış preparatlar incelendiğinde metotreksatın MTX grubunda genel görünümü bozduğu ve tedavi gruplarının bu bozulmayı önemli ölçüde önlediği görüldü (Resim 4-9).



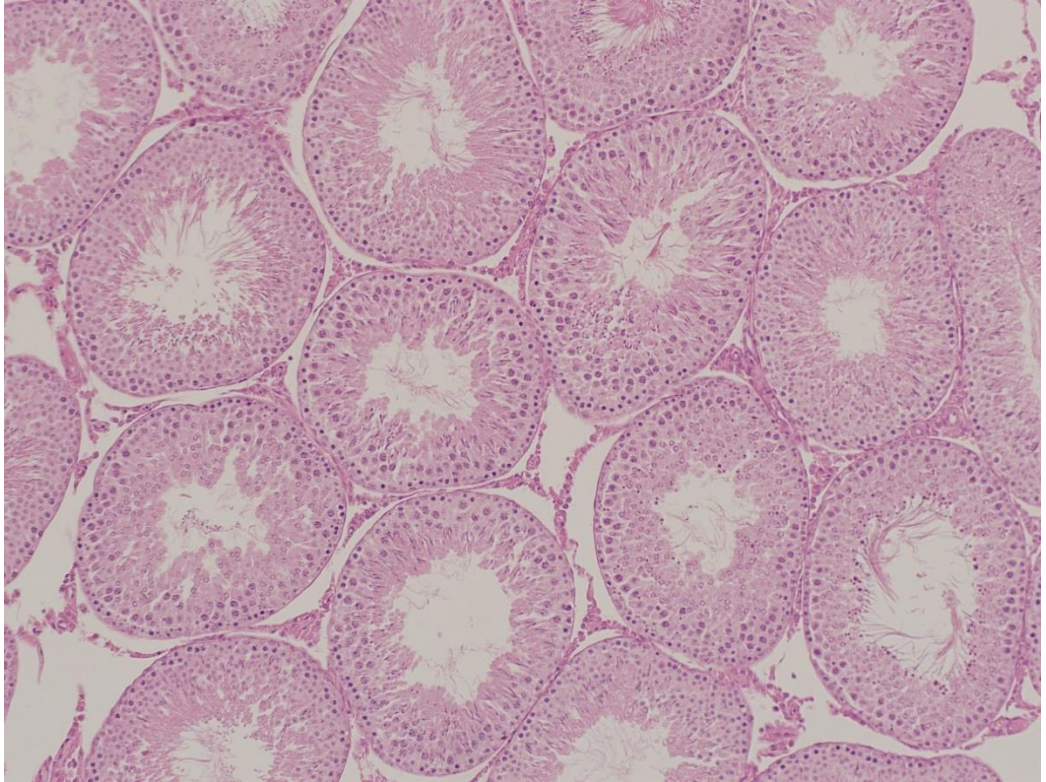
Resim 4: Kontrol grubu testis genel görünüm (H&E, 100x)



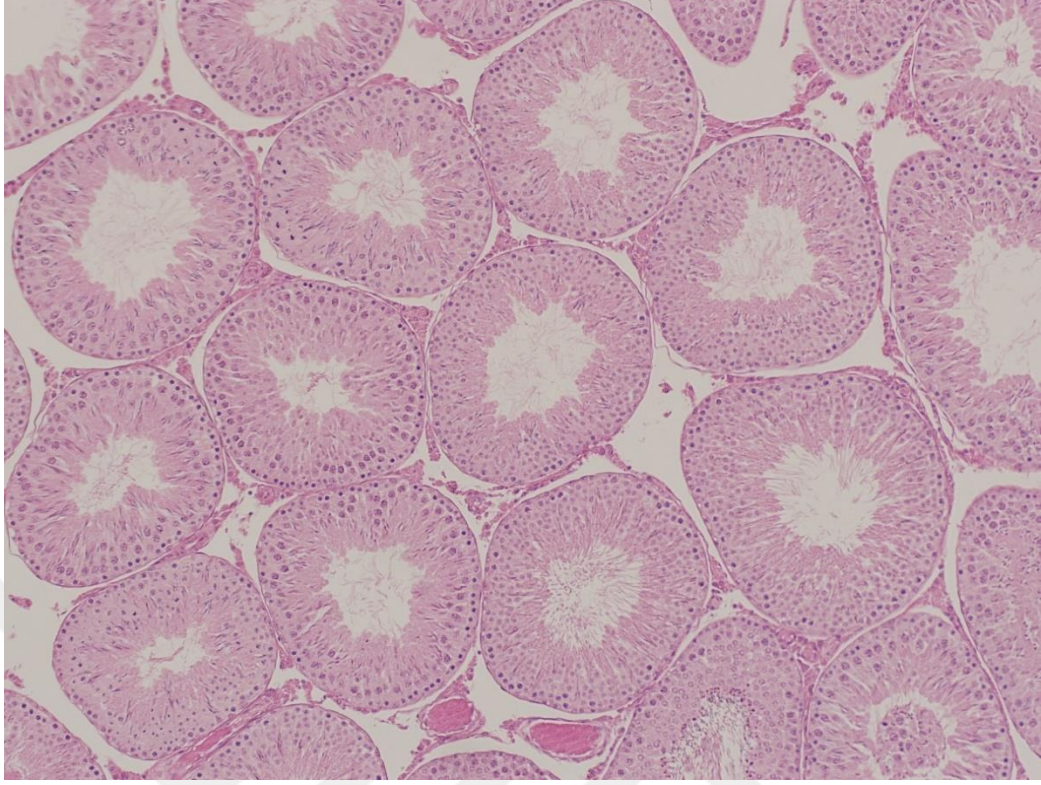
Resim 5: Kontrol grubu testis genel görünüm (H&E, 200x)



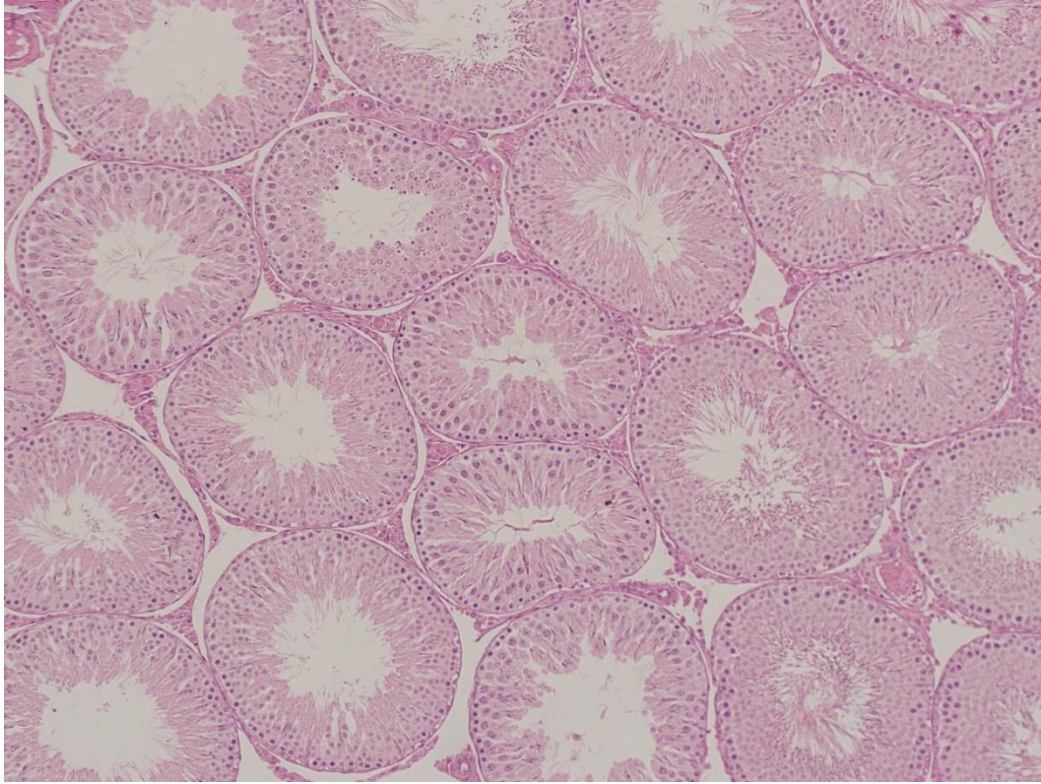
Resim 6: MTX grubu testis genel görünüm (H&E, 100x)



Resim 7: MTX+QT grubu testis genel görünüm (H&E, 100x)



Resim 8: MTX+RA grubu testis genel görünüm (H&E, 100x)

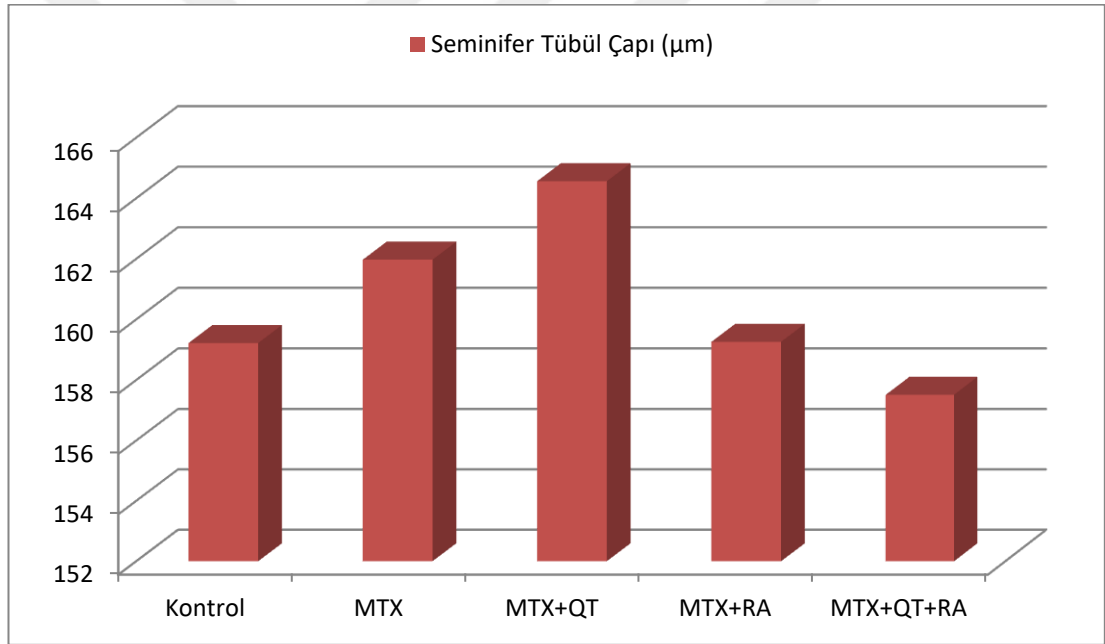


Resim 9: MTX+QT+RA grubu testis genel görünüm (H&E, 100x)

Elde edilen seminifer tübül çapı (STÇ) ölçüm sonuçları; metotreksatın seminifer tübül çapını hafif arttırdığını gösterdi. Tedavi gruplarında ise yalnızca quercetin MTX+QT grubunda seminifer tübül çapını artırıcı etki gösterdiği görüldü. MTX+RA grubunda sonuçlar kontrol grubuna benzer iken MTX+QT+RA grubunda seminifer tübül çapları kontrol grubunun altında izlendi.

Tablo 19: Grupların seminifer tübül çapları (µm)

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
STÇ (µm)	159,22 ±5,06	161,97 ±7,70	164,56 ±13,32	159,26 ±9,21	157,51 ±8,75



Şekil 18: Grupların seminifer tübül çapları

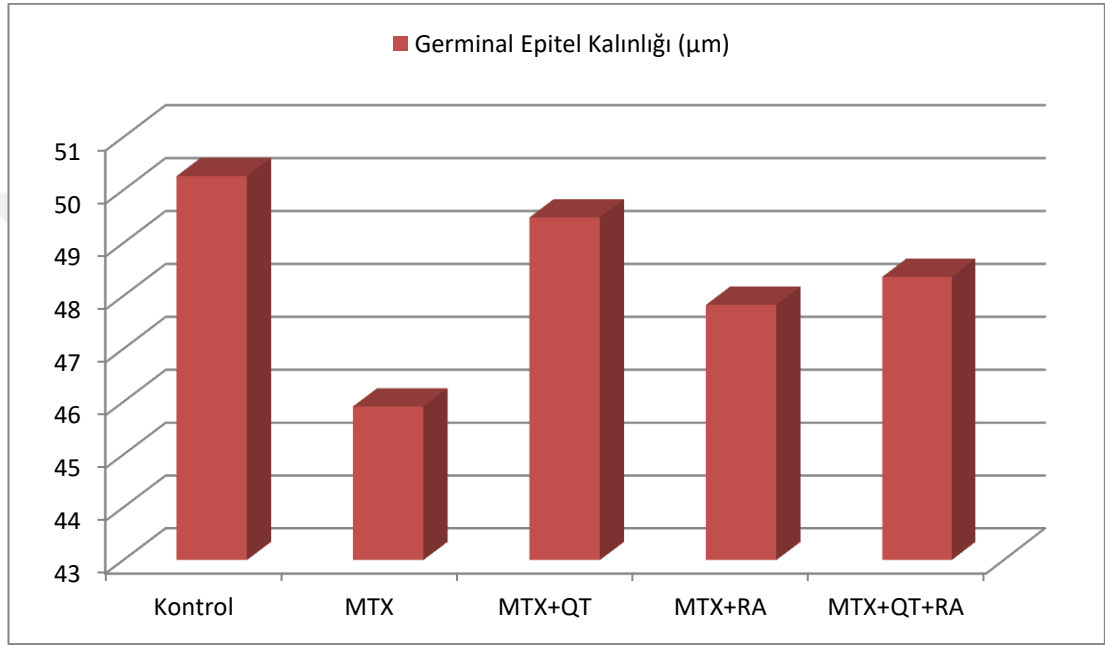
Ancak germinal epitel kalınlıklarında (GEK) durum farklı idi. Sonuçlar incelendiğinde metotreksatın seminifer tübül çapını arttırdığı halde germinal epitel kalınlığını düşürdüğü görüldü. Tedavi gruplarının ise tamamında germinal epitel kalınlığının Kontrol'e yaklaştığı tespit edildi.

Tablo 20: Grupların germinal epitel kalınlıkları (µm)

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
GEK (µm)	50,26 ^a ±1,40	45,91 ^{a,b} ±2,34	49,48 ^b ±2,59	47,83 ±1,96	48,36 ±1,54

^a : Kontrol & MTX → p<0,01

^b : MTX & MTX+QT → p=0,01



Şekil 19: Grupların germinal epitel kalınlıkları

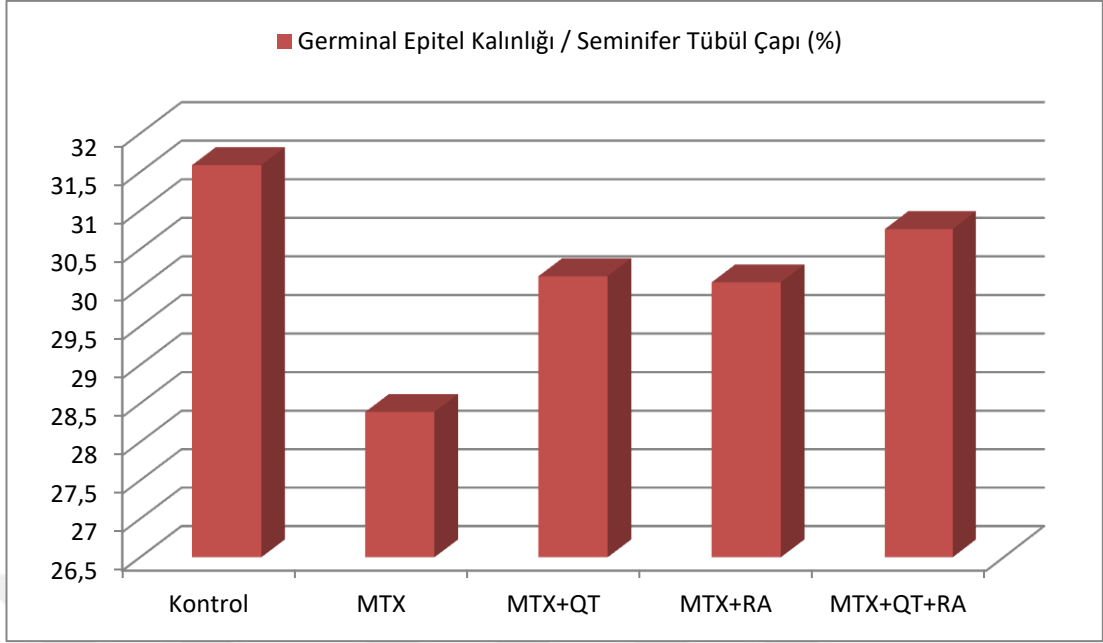
Bu verilerin ışığında hesaplanan “germinal epitel kalınlığı / seminifer tübül çapı” oranlarından metotreksatın oranı ciddi şekilde düşürücü etki yaptığı (Resim 4), tedavi gruplarının ise bu düşüşü büyük ölçüde önlediği anlaşıldı.

Tablo 21: Grupların germinal epitel kalınlığı / seminifer tübül çapı oranları (%)

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
GEK / STÇ (%)	31,59 ^a ±1,02	28,39 ^{a,b} ±1,68	30,15 ±1,56	30,07 ±1,15	30,76 ^b ±1,42

^a : Kontrol & MTX → p<0,01

^b : MTX & MTX+QT+RA → p<0,05



Şekil 20: Grupların germinal epitel kalınlığı / seminifer tübül çapı oranları



Resim 10: İncelmiş germinal epitel (turuncu çift başlı oklar) (MTX, H&E, 200x)

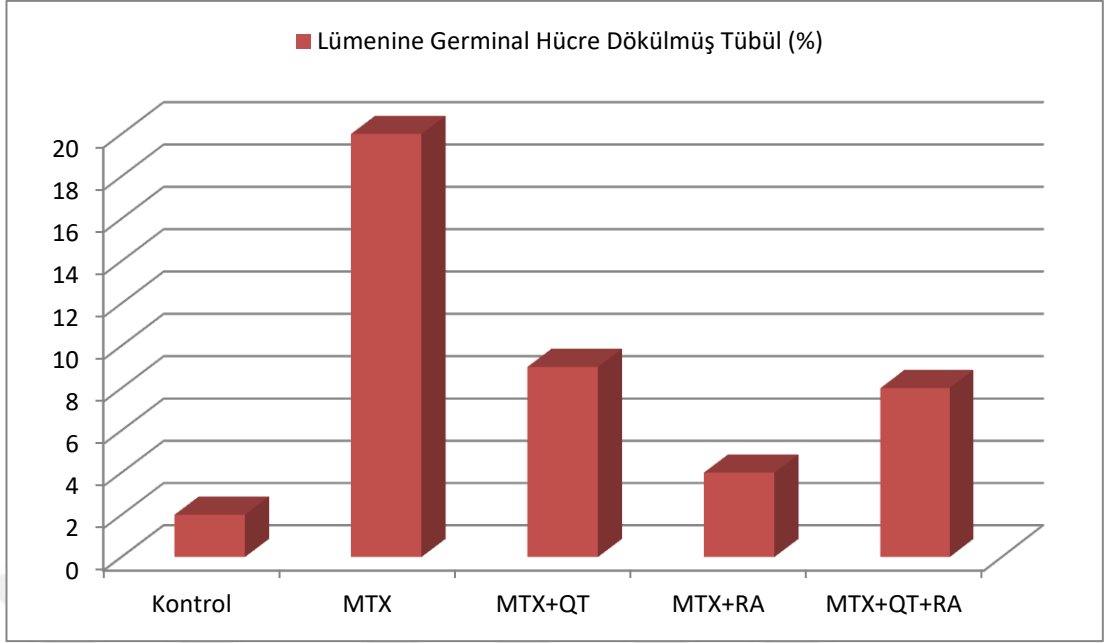


Resim 11: Germinal epitelde kalınlık artışı (turuncu çift başlı oklar) (MTX+QT+RA, H&E, 200x)

Yapılan incelemeler metotreksatin MTX grubunda lümenine germinal hücre dökülmüş tübül sayısını (LGHDTS) ciddi şekilde arttırdığı (Resim 5), verilen antioksidan tedavilerinin ise bu artışı kayda değer düzeylerde önlediği görüldü. Bu konuda Kontrol grubuna en yakın sonuçlara rosmarinik asit ile tedavi edilen MTX+RA grubunda ulaşıldı.

Tablo 22: Grupların lümenine germinal hücre dökülmüş tübül sayısı oranları (%)

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
LGHDTS (%)	2,20 ±3,27	19,91 ±24,50	8,62 ±8,62	3,57 ±3,43	7,72 ±7,08



Şekil 21: Grupların lümenine germinal hücre dökülmüş tübül sayısı oranları



Resim 12: Lümenine germinal hücre dökülmüş tübüller (sarı oklar) (MTX, H&E, 200x)

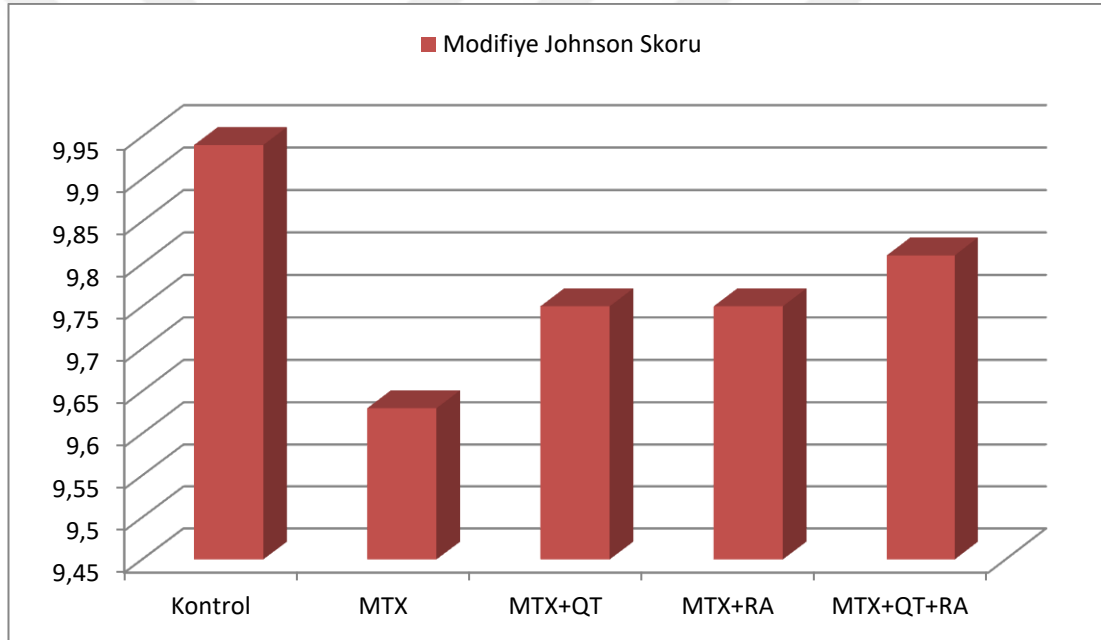
Gruplara uygulanan modifiye Johnson skorlaması (MJS) sonucunda metotreksatin MTX grubunda skoru düşürdüğü ve yine tüm tedavi gruplarında bu düşüşün önemli ölçüde önüne geçildiği görüldü.

Tablo 23: Grupların modifiye Johnson skorları

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
MJS	9,94 ^{a,b} ±0,08	9,63 ^a ±0,21	9,75 ^b ±0,10	9,75 ±0,03	9,81 ±0,13

^a : Kontrol & MTX → p<0,01

^b : Kontrol & MTX+QT → p<0,05



Şekil 22: Grupların modifiye Johnson skorları

İncelemeler sırasında seminifer tübüllerin duvarlarında vakuoller (V) olduğu görüldü (Resim 6) ve bu vakuolleri içeren tübüller (VT) ile içerilen toplam vakuol sayıları belirlendi. Her bir denekten rastgele seçilmiş 25 tübülün incelenmesiyle yapılan sayım sonucunda Kontrol grubunda tübüllerin %3,94'ünde bu vakuollere rastlanırken MTX grubunda metotreksatin bu oranı arttırdığı gözlemlendi. Tedavi gruplarında bu artışa çeşitli düzeylerde engel olunduğu tespit edildi. Bu konuda en başarılı sonuç rosmarinik asit ile MTX+RA grubunda alındı.



Resim 13: Germinal epitelde vakuol (sarı ok) (MTX, H&E, 400x)

Her bir denekten rastgele seçilip incelenen 25 tübüldeki toplam vakuol sayısı ise Kontrol grubunda 5,15 bulunurken, metotreksatın MTX grubunda bu sayıyı ciddi şekilde arttırdığı, tedavi gruplarının ise artışı büyük oranda önlediği izlendi.

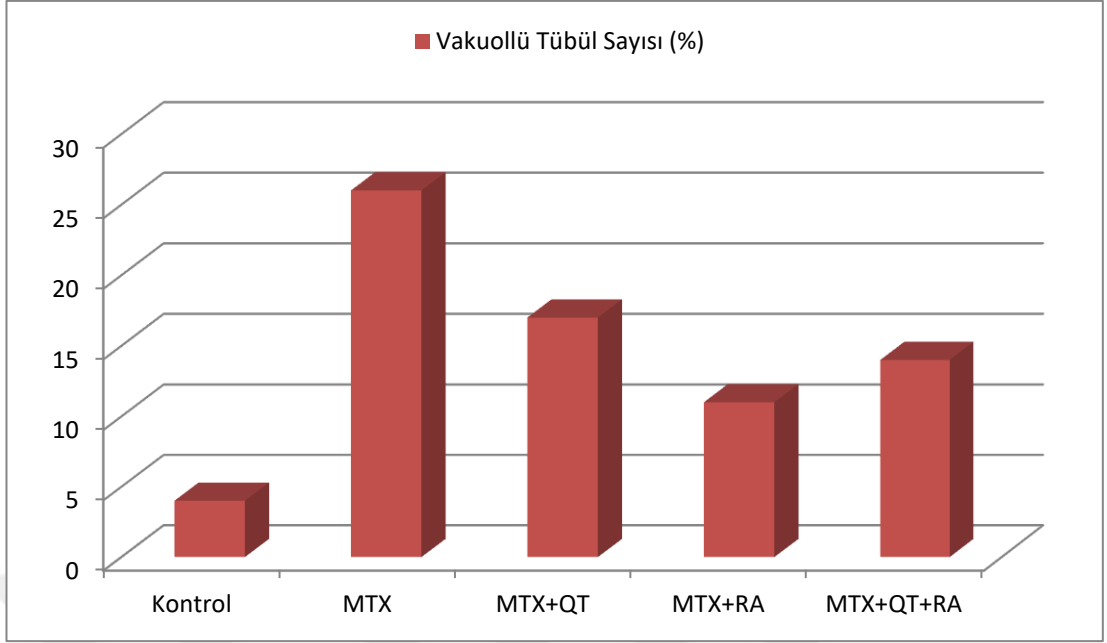
Tablo 24: Grupların vakuol içeren tübül (%) ve toplam vakuol sayıları

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
VT	3,94 ±2,95	26,49 ^a ±14,46	16,94 ±9,97	10,82 ±6,80	13,68 ±12,88
V	5,15 ±5,23	44,24 ^b ±26,34	24,48 ^c ±12,08	16,98 ±14,08	18,98 ±1867

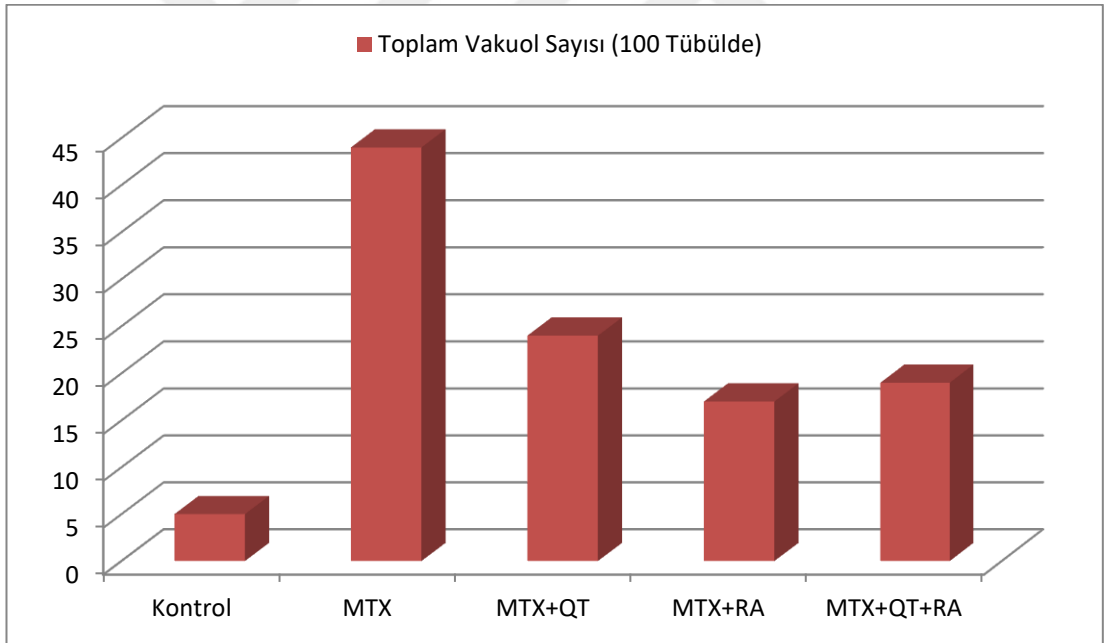
^a : Kontrol & MTX → p<0,05

^b : Kontrol & MTX → p<0,05

^c : Kontrol & MTX+QT → p<0,05



Şekil 23: Grupların vakuollü tübül sayıları



Şekil 24: Grupların toplam vakuol sayıları

Yine incelemeler sırasında germinal epitellerde yer yer ayrılmalarla (Resim 7) karşılaşıldı ve hem ayrılma izlenen tübüllerin hem de toplam ayrılma sayılarının tespiti yapıp sonuçlar gruplar arasında karşılaştırıldı. Her denekten rastgele seçilen 25 seminifer tübülün germinal epiteli ayrılmalar açısından değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar metotreksatın bu ayrılmaları içeren tübül sayılarını ve toplam ayrılma

sayılarını arttığını; diğer gruplarda verilen antioksidan tedavilerinin ise artışı değişik oranlarda önlediğini gösterdi. Kontrole en yakın sonuç alınan tedavi grubu MTX+RA idi.

Tablo 25: Grupların germinal epitelde ayrılma içeren tübül oranları (%) ve içerdikleri toplam ayrılma sayıları

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
Ayrılma İçeren Tübül (%)	27,06 ^{a,b} ±15,99	60,09 ^{a,c} ±13,72	50,37 ^{b,d} ±18,55	29,14 ^{c,d} ±09,65	44,89 ±8,36
Toplam Ayrılma Sayısı	11,57 ^{e,f} ±7,58	47,71 ^{e,g,h,i} ±15,84	29,17 ^{f,g} ±10,81	14,72 ^h ±5,35	23,68 ⁱ ±9,29

^a : Kontrol & MTX → p<0,01

^b : Kontrol & MTX+QT → p<0,05

^c : MTX & MTX+RA → p<0,01

^d : MTX+QT & MTX+RA → p<0,05

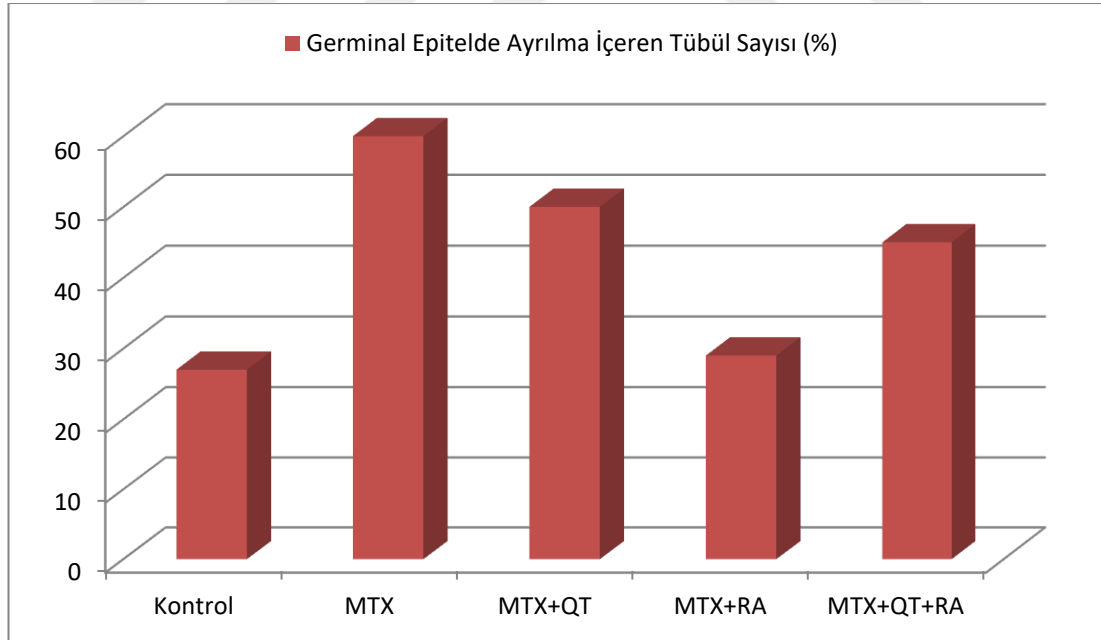
^e : Kontrol & MTX → p<0,01

^f : Kontrol & MTX+QT → p<0,05

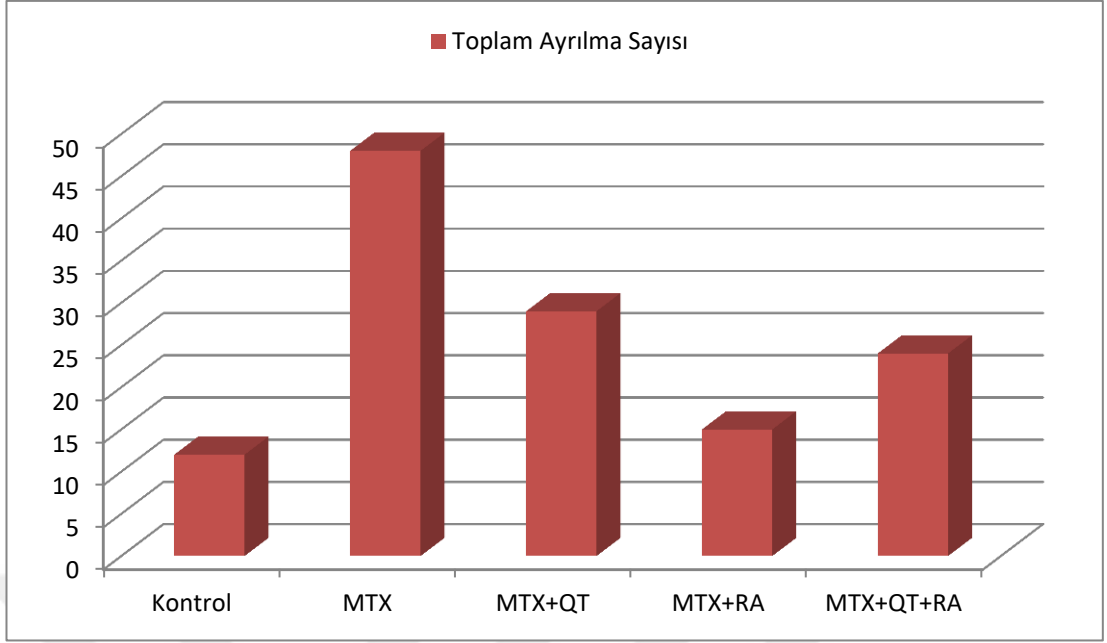
^g : MTX & MTX+QT → p<0,01

^h : MTX & MTX+RA → p<0,01

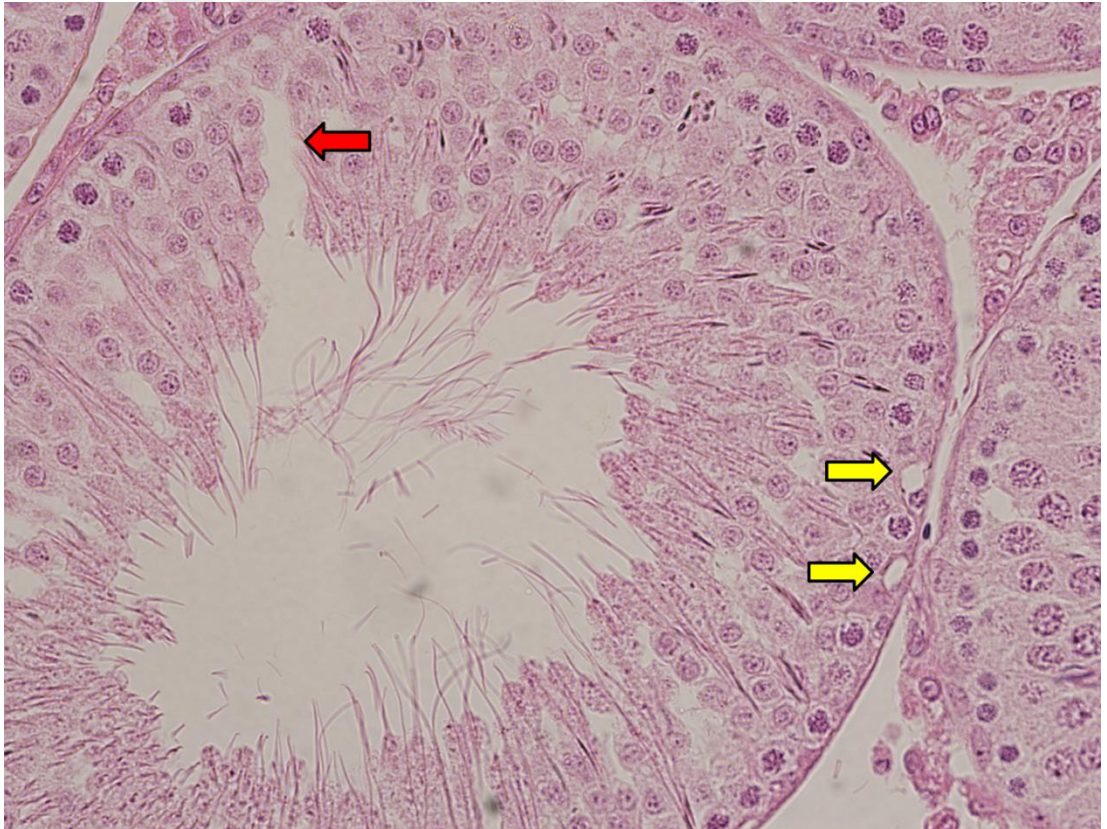
ⁱ : MTX & MTX+QT+RA → p<0,01



Şekil 25: Grupların germinal epitelinde ayrılma içeren tübül sayıları (%)



Şekil 26: Grupların içerdikleri toplam ayrılma sayıları

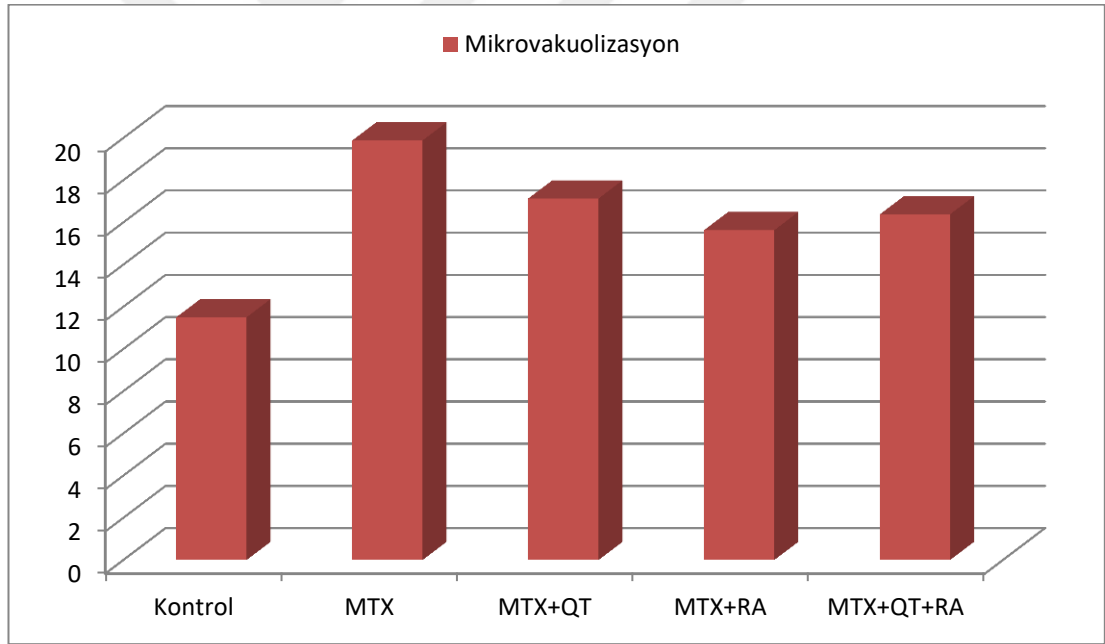


Resim 14: Germinal epitelde ayrılma (kırmızı ok) ve mikrovakuolizasyonlar (sarı oklar) (MTX, H&E, 400x)

İncelemeler sırasında karşılaşılan bir diğer patolojik durum ise seminifer tübüllerde kendini mikrovakuolizasyonlar (mV) olarak gösteren apoptozlar ya da tek hücre nekrozları idi (Resim 7). Bu patolojik görünümlü hücreler de sayılarak gruplar arası karşılaştırmaları yapıldı. Her hayvana ait rastgele seçilen 25 tübülün değerlendirilmesiyle elde edilen sonuçlar; metotreksatın bu hücrelerin sayısını arttırdığını, verilen tedavilerin ise artışı kısmen de olsa engellediğini gösterdi.

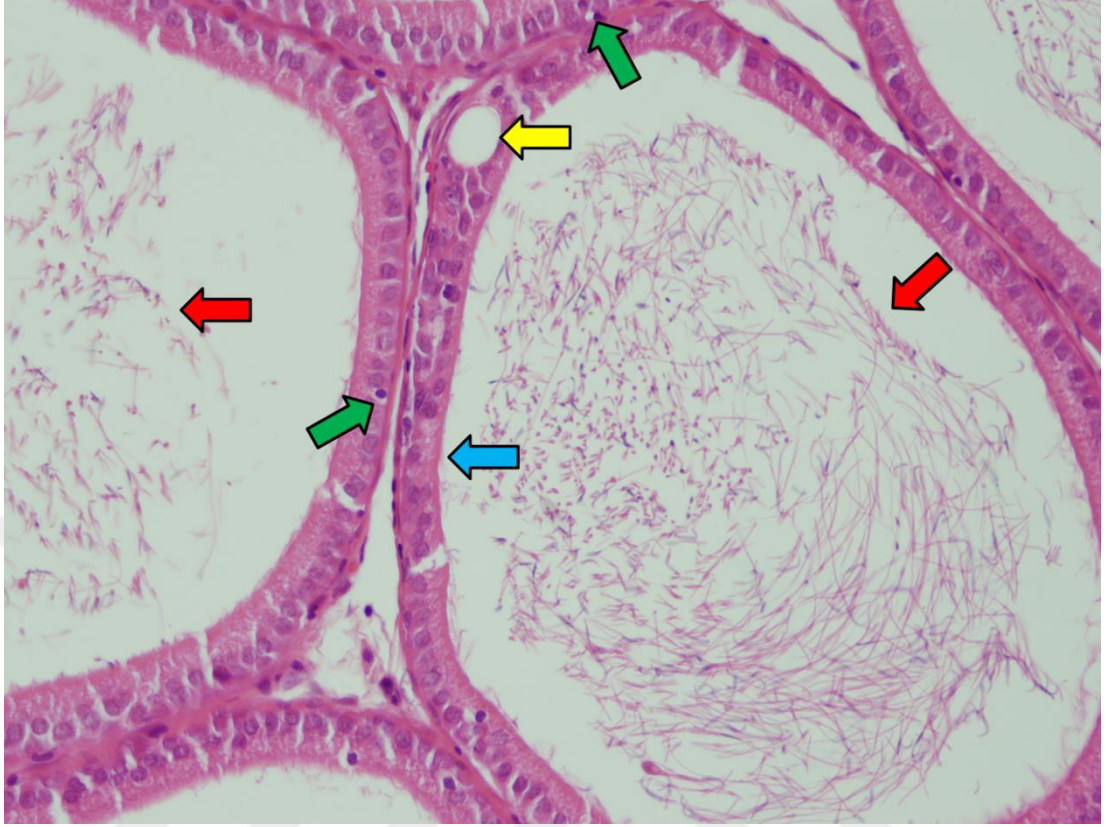
Tablo 26: Grupların germinal epitelde içerdikleri toplam mikrovakuolizasyon sayıları

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
mV	11,50 ±5,071	19,88 ±6,937	17,13 ±6,490	15,63 ±4,502	16,38 ±3,292



Şekil 27: Grupların germinal epitelde içerdikleri toplam mikrovakuolizasyon sayıları

Epididimis kesitlerinin kalitatif olarak gerçekleştirilen histopatolojik incelemesinde, MTX grubunda lümenlerdeki sperm yığınlarının seyreltiği görüldü. Ayrıca epitelde yer yer makro ve mikro düzeyde vakuollere rastlandı. Epitel hücrelerinin apikallerinde bulunan stereosilyaların yoğunluğunun azaldığı görüldü. Tedavi gruplarında ise bu bulguların azaldığı izlendi.



Resim 15: Epididimis histopatolojileri; lümenindeki sperm yığınlarında seyrelme (kırmızı oklar), yer yer makrovakuolizasyon (sarı ok) ve mikrovakuolizasyonlar (yeşil oklar), stereosilyumlarda azalma (mavi ok) (MTX, H&E, 400x)

4.3.2. Masson Trikrom Boyalı Preparatlar

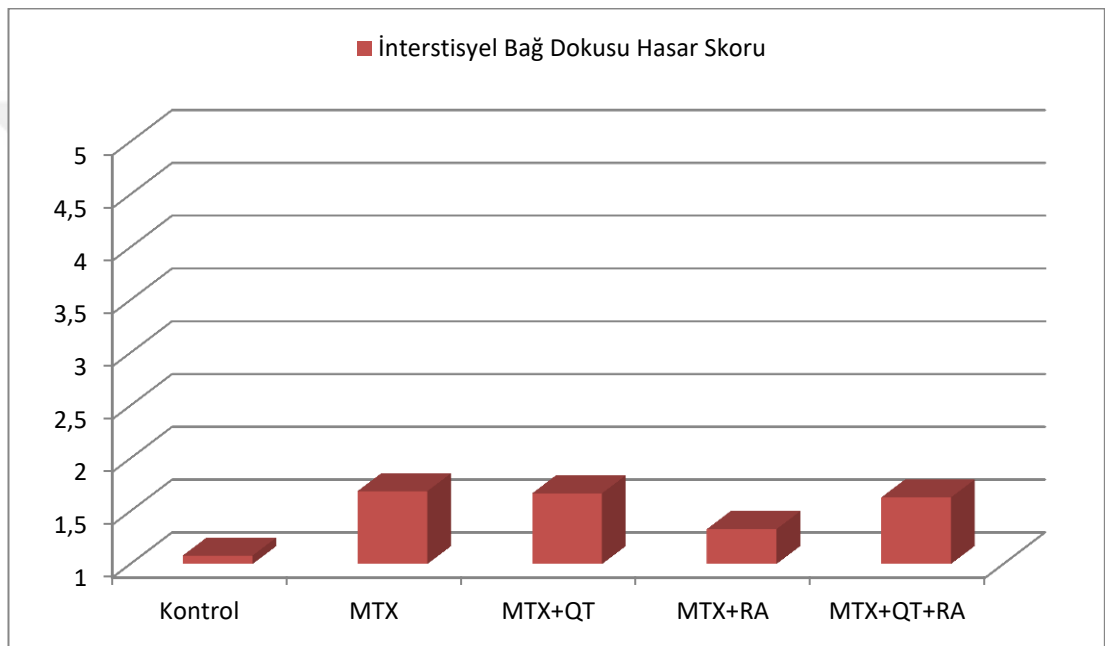
Masson trikrom boyalı preparatlarda interstisyel bağ dokusunu değerlendirmek amacıyla yapılan hasar skorlamasının sonuçları; metotreksatin MTX grubunda ileri düzeyde olmasa da interstisyel bağ doku hasarına neden olduğunu, quercetin ve quercetin&rosmarinik asit kombinasyonunun MTX+QT ve MTX+QT+RA gruplarında bu hasara karşı kayda değer bir önleyici etki gösteremediklerini, rosmarinik asitin ise MTX+RA grubunda hasarı azalttığını gösterdi.

Tablo 27: Grupların interstisyel bağ dokusu hasar skorları (1-5)

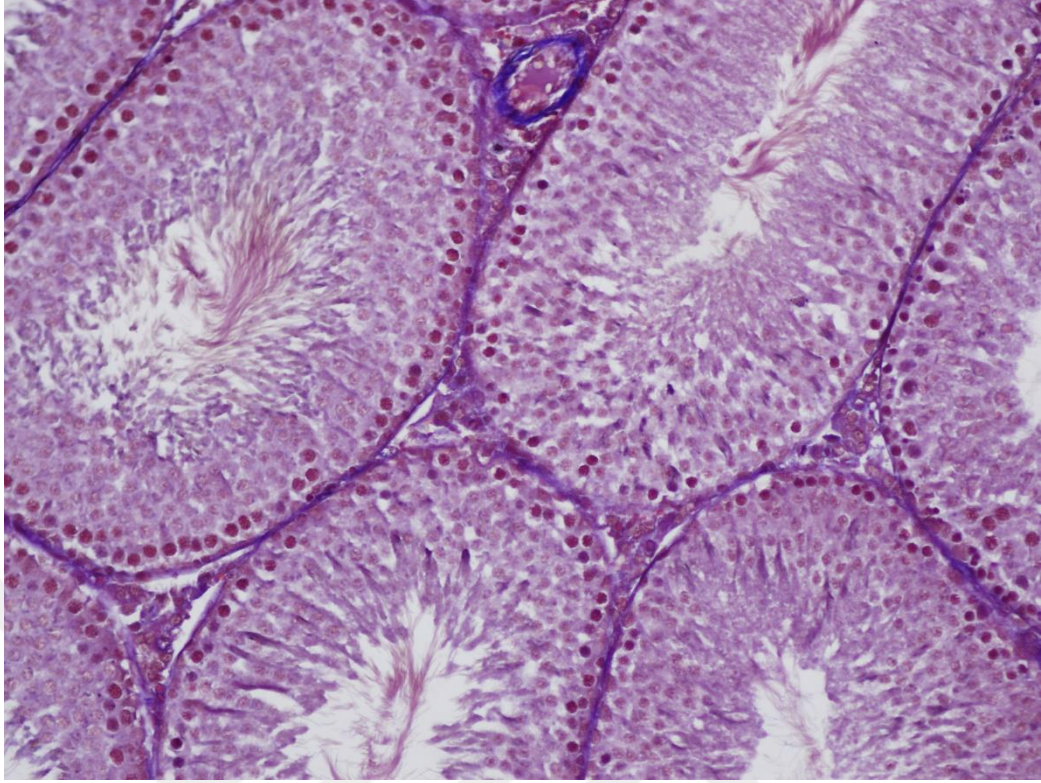
	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
İnt. Bağ Dokusu Hasar Skoru	1,08 ±0,02	1,69 ±0,03	1,67 ±0,05	1,33 ±0,10	1,63 ±0,18

Kontrol grubunun diğer gruplarla tüm ikili karşılaştırmalarında → p<0,01

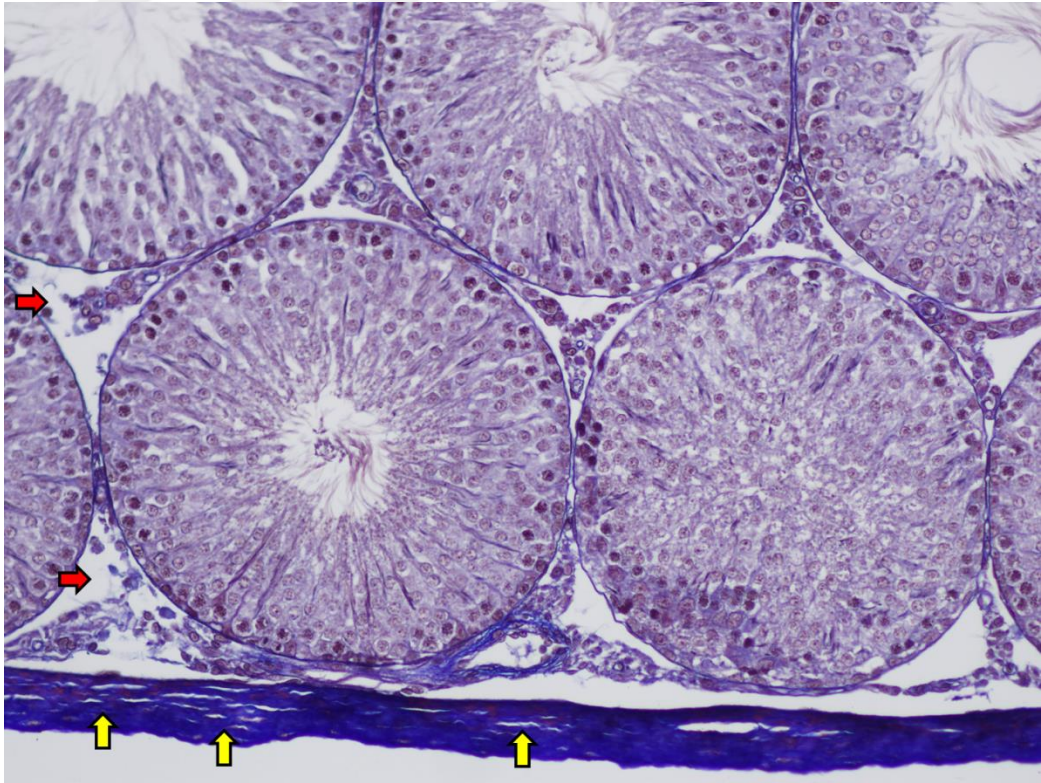
MTX+RA grubunun diğer gruplarla tüm ikili karşılaştırmalarında → p<0,01



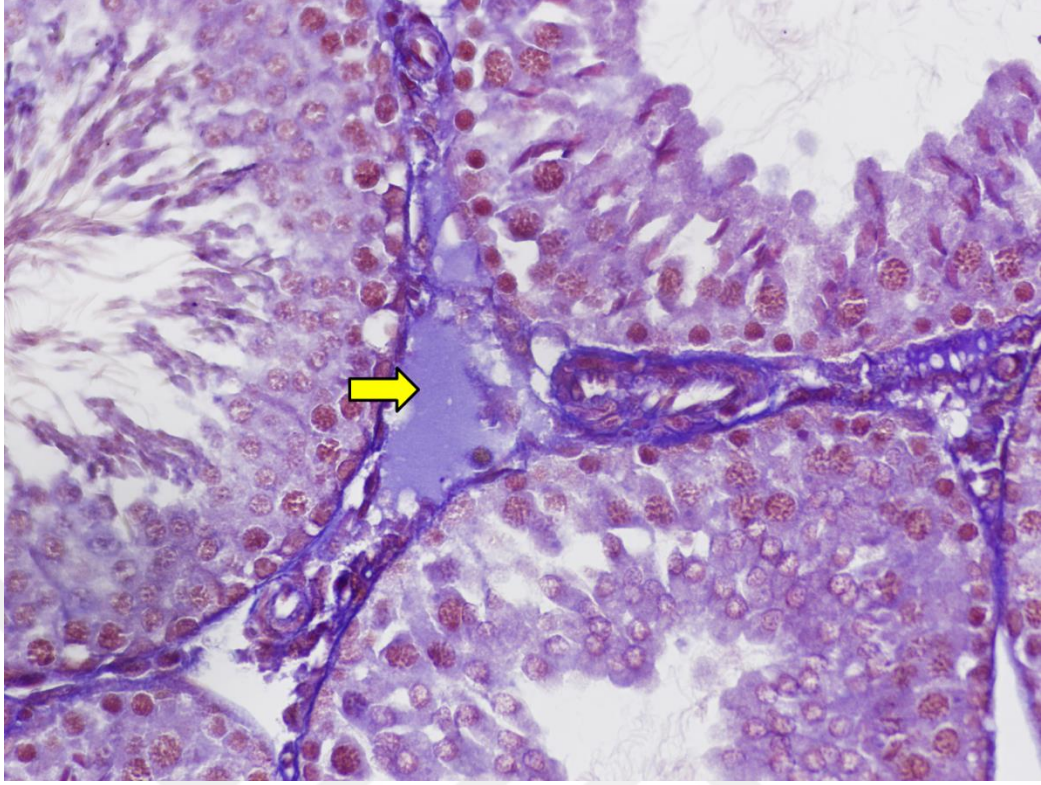
Şekil 28: Grupların interstisyel bağ dokusu hasar skorları



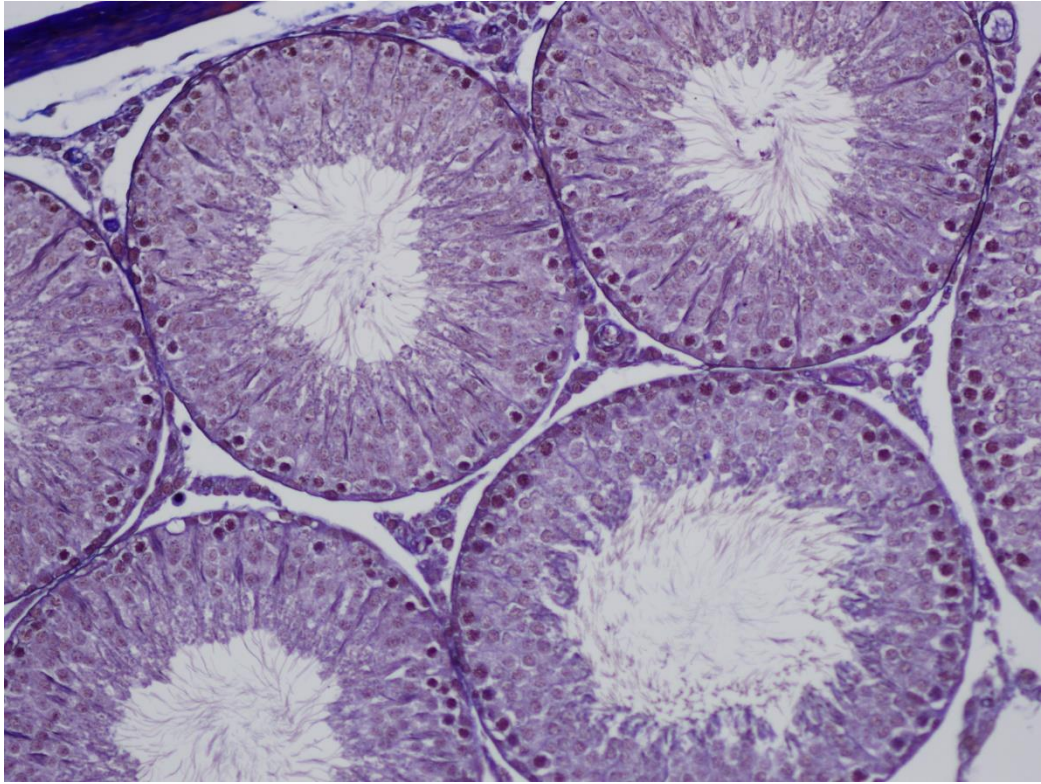
Resim 16: Kontrol grubu (Masson trikrom, 200x)



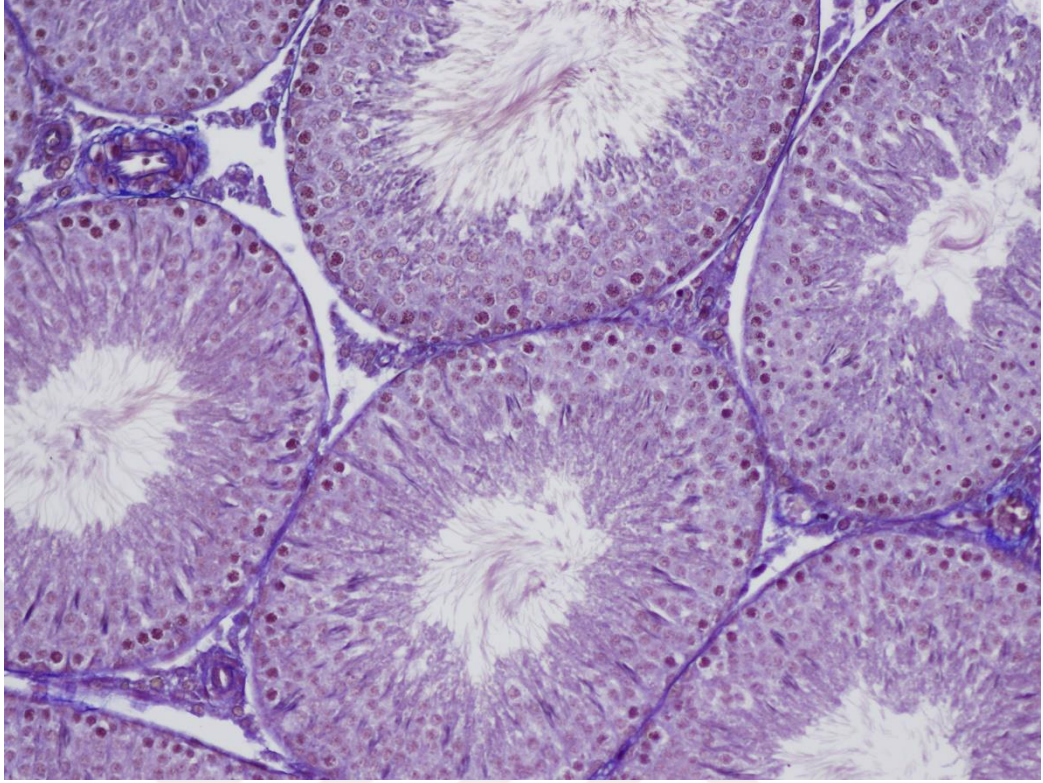
Resim 17: İnterstisyel alanda dağılmalar (kırmızı oklar), tunika albugineada düzensizlik (sarı oklar), (MTX, Masson Trikrom, 200x)



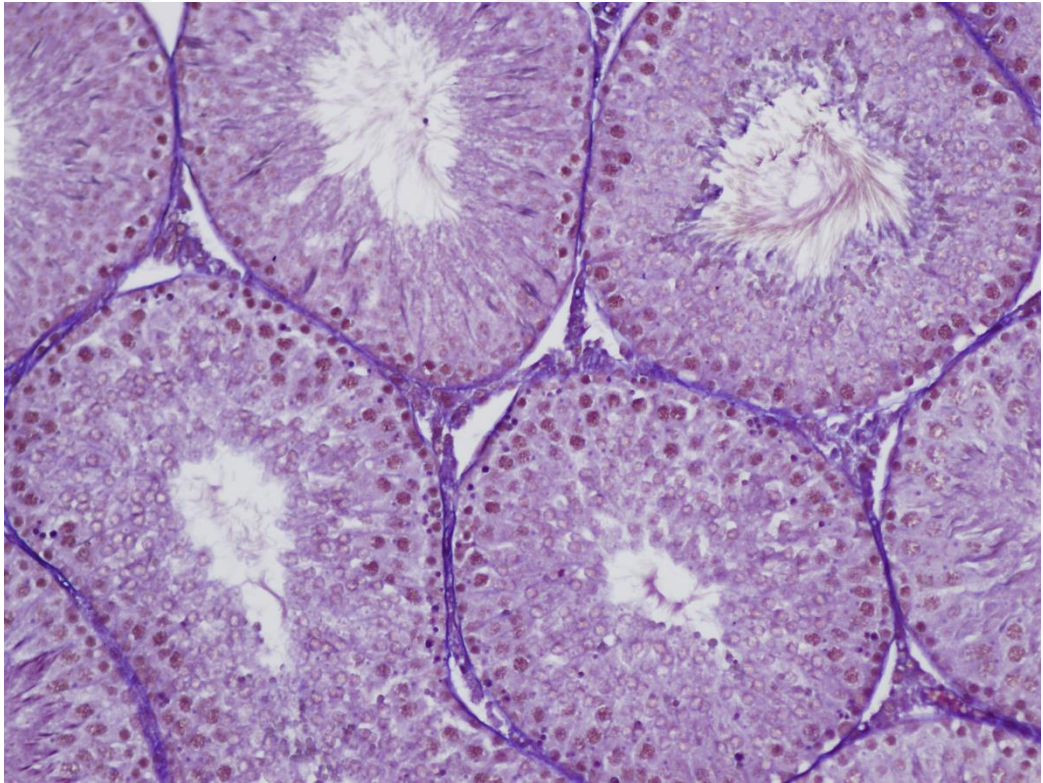
Resim 18: İnterstisyel alanda ödem (MTX, Masson trikrom, 400x)



Resim 19: MTX+QT grubu (Masson trikrom, 200x)



Resim 20: MTX+RA grubu (Masson trikrom, 200x)



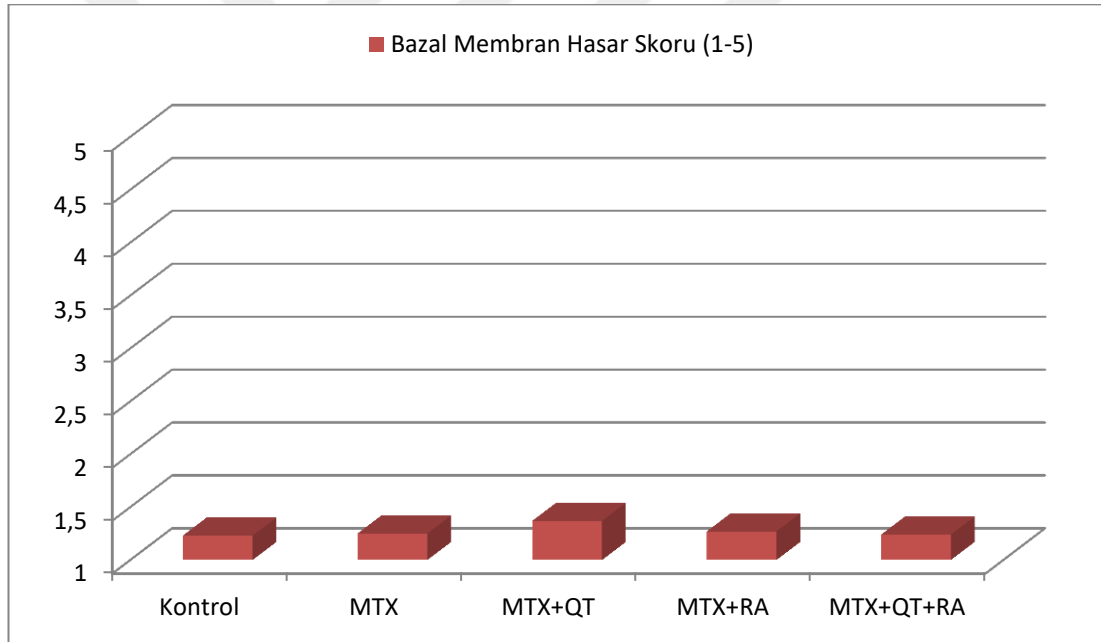
Resim 21: MTX+QT+RA grubu (Masson trikrom, 200x)

4.3.3. Periyodik Asit Schiff Boyalı Preparatlar

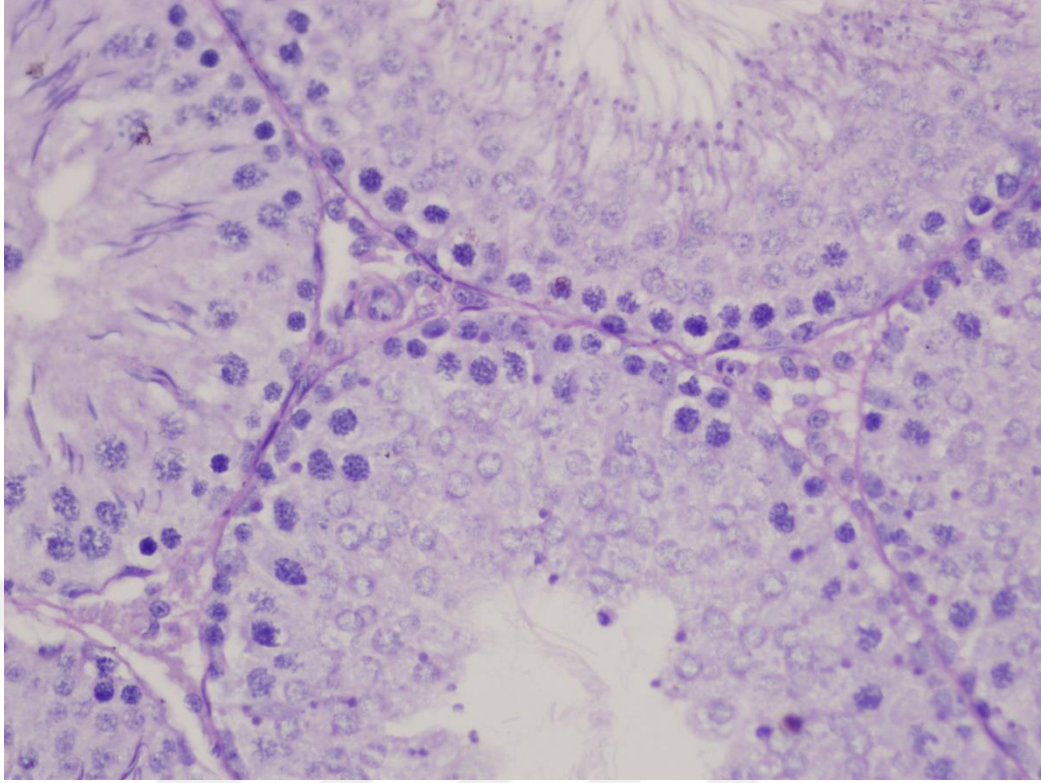
PAS boyalı preparatlarda yapılan bazal membran hasar değerlendirme skorlamasının (1-5) sonuçları; metotreksatın bazal membran düzensizliğine önemli bir etkisinin olmadığını gösterdi. Quercetin MTX+QT grubunda skoru çok hafif arttırırken diğer tedavi grupları Kontrol'e benzer sonuçlar verdi.

Tablo 28: Grupların bazal membran hasar skorları (1-5)

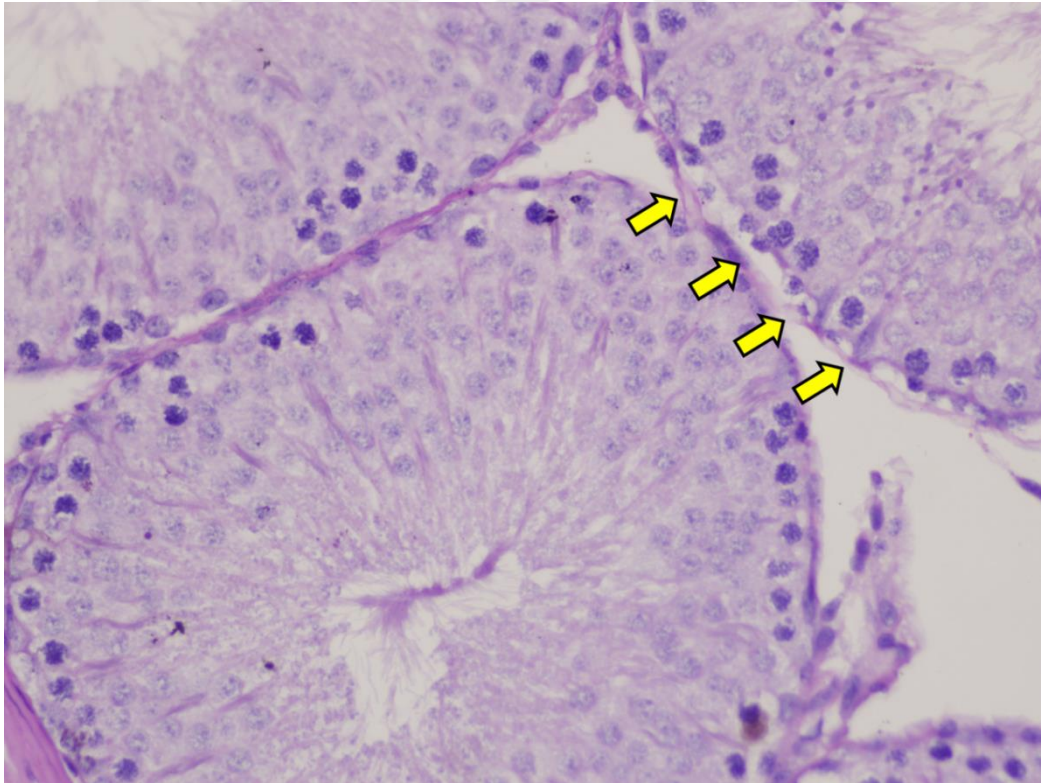
	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
BM Hasar Skoru	1,23 ±0,12	1,25 ±0,17	1,37 ±0,25	1,27 ±0,14	1,24 ±0,11



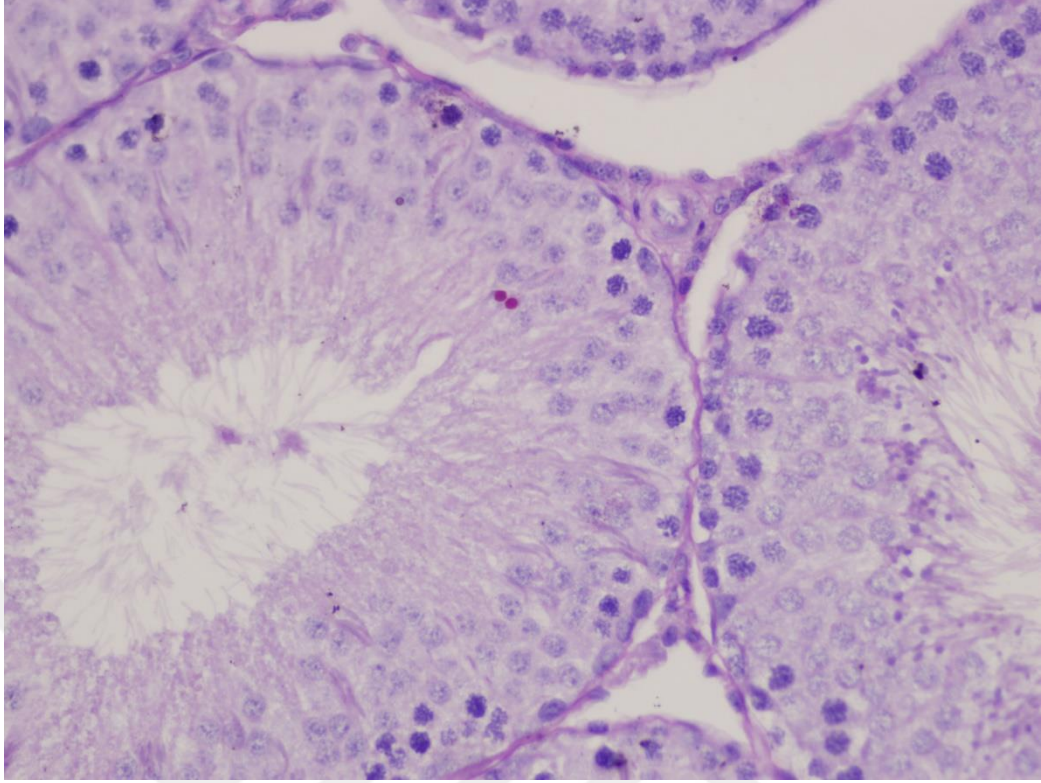
Şekil 29: Grupların bazal membran hasar skorları



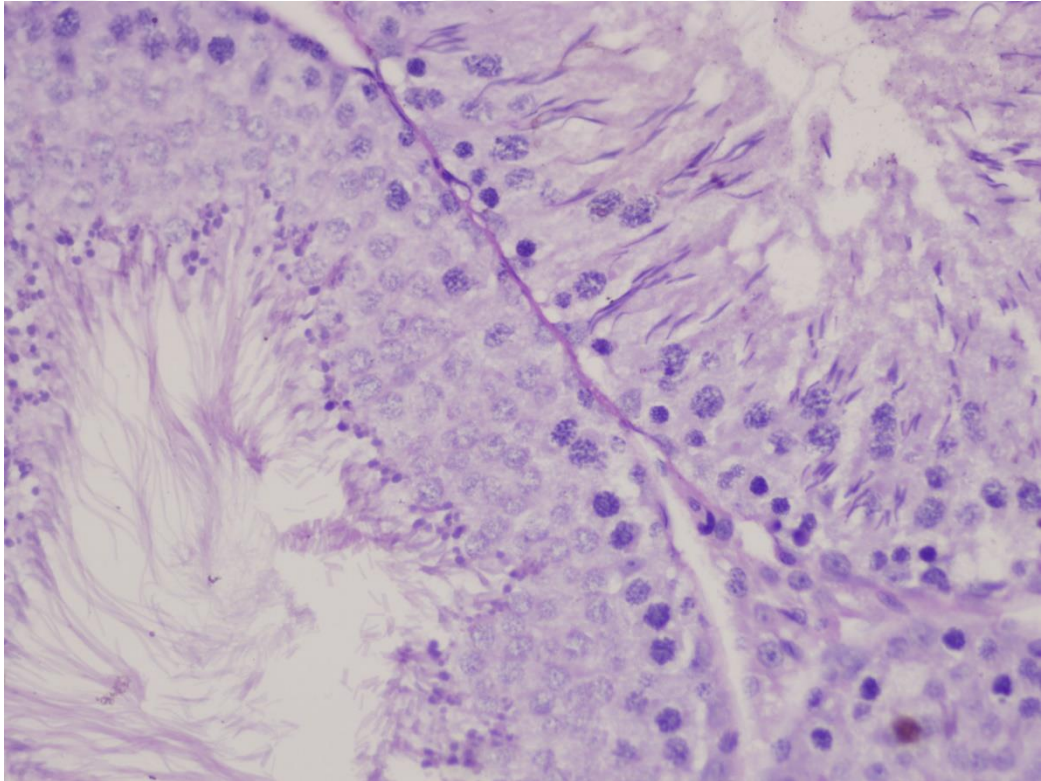
Resim 22: Kontrol grubu (PAS, 400x)



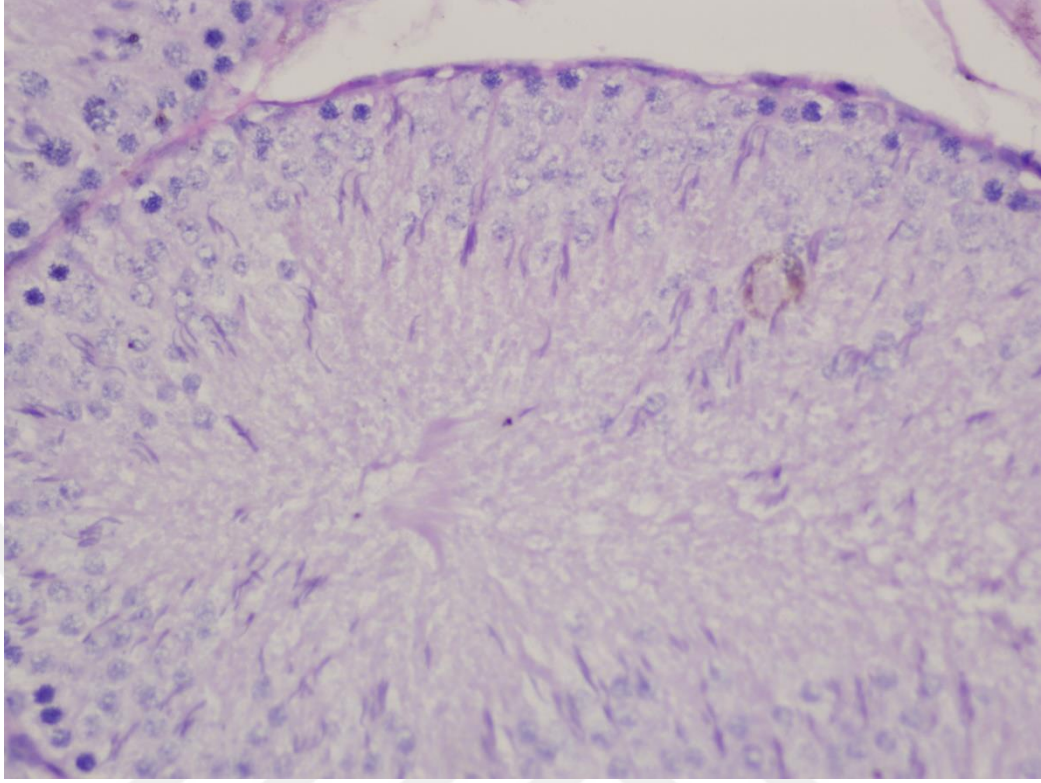
Resim 23: Bazal membranda bozulmalar (sarı oklar) (MTX, PAS, 400x)



Resim 24: MTX+QT grubu (PAS, 400x)



Resim 25: MTX+RA grubu (PAS, 400x)



Resim 26: MTX+QT+RA grubu (PAS, 400x)

4.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları

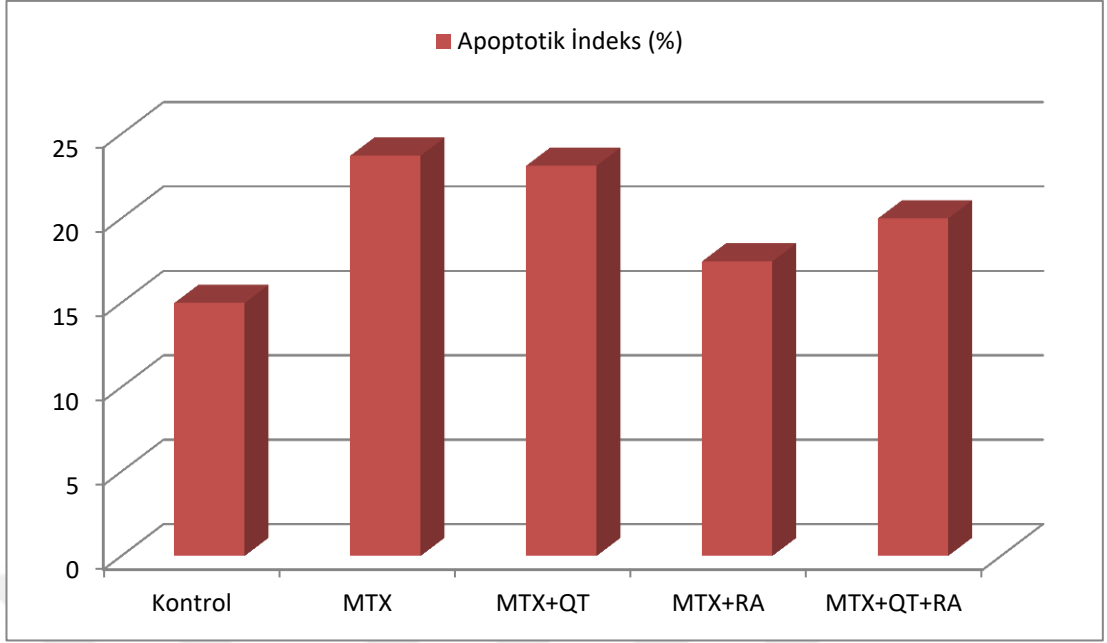
TUNEL boyalı preparatlarda yapılan apoptoz değerlendirme sonuçları; metotreksatin apoptotik indeksi arttırdığını gösterdi. Quercetin MTX+QT grubunda bu artışı önleyemezken rosmarinik asit MTX+RA grubunda artışın önemli ölçüde önüne geçti. MTX+QT+RA grubunda da benzer şekilde artışı önleyici etki görüldü.

Tablo 29: Grupların apoptotik hücre oranları (%)

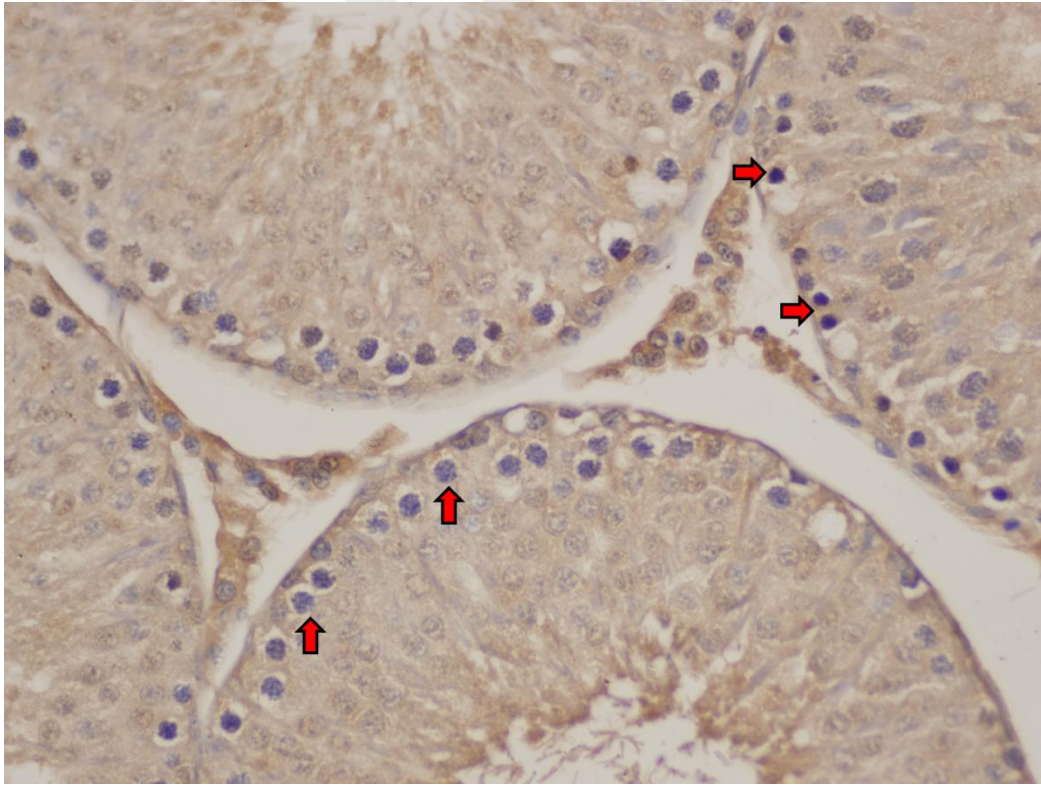
	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
Apoptotik İndeks (%)	14,98 ^a ±0,36	23,71 ^{a,b} ±0,42	23,12 ^{a,b} ±0,28	17,45 ^a ±0,40	19,99 ^a ±0,41

^a : Grupların tüm ikili karşılaştırmalarında → p<0,01

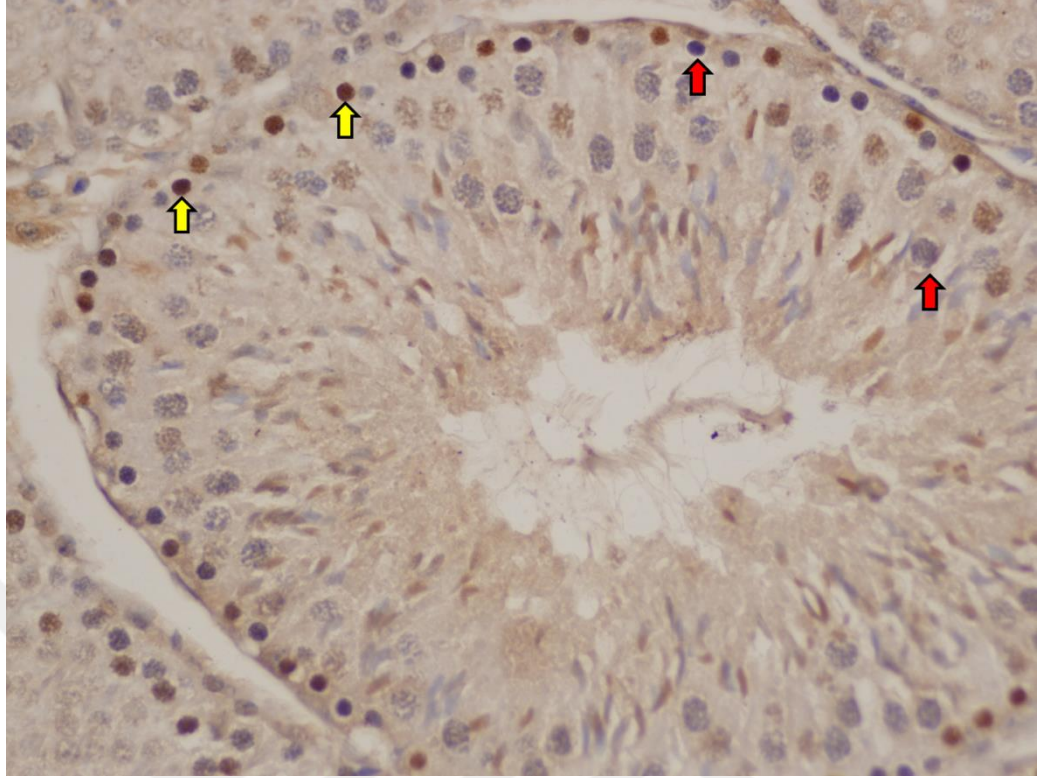
^b : MTX & MTX+QT → p<0,05



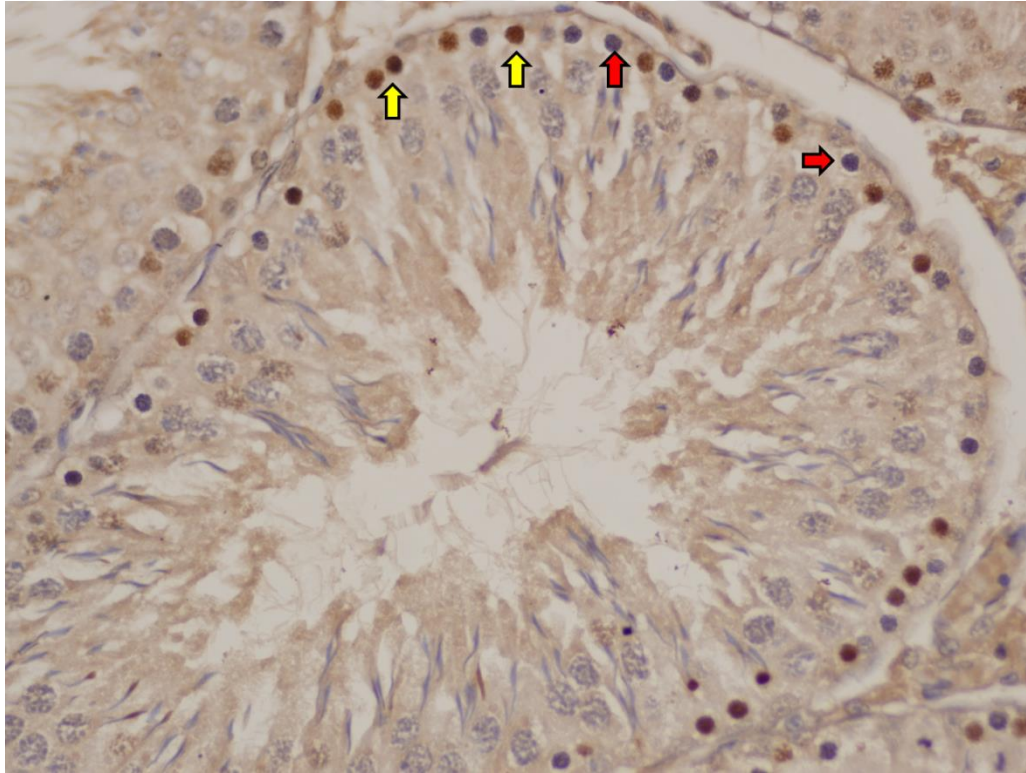
Şekil 30: Grupların apoptotik indeksleri (%)



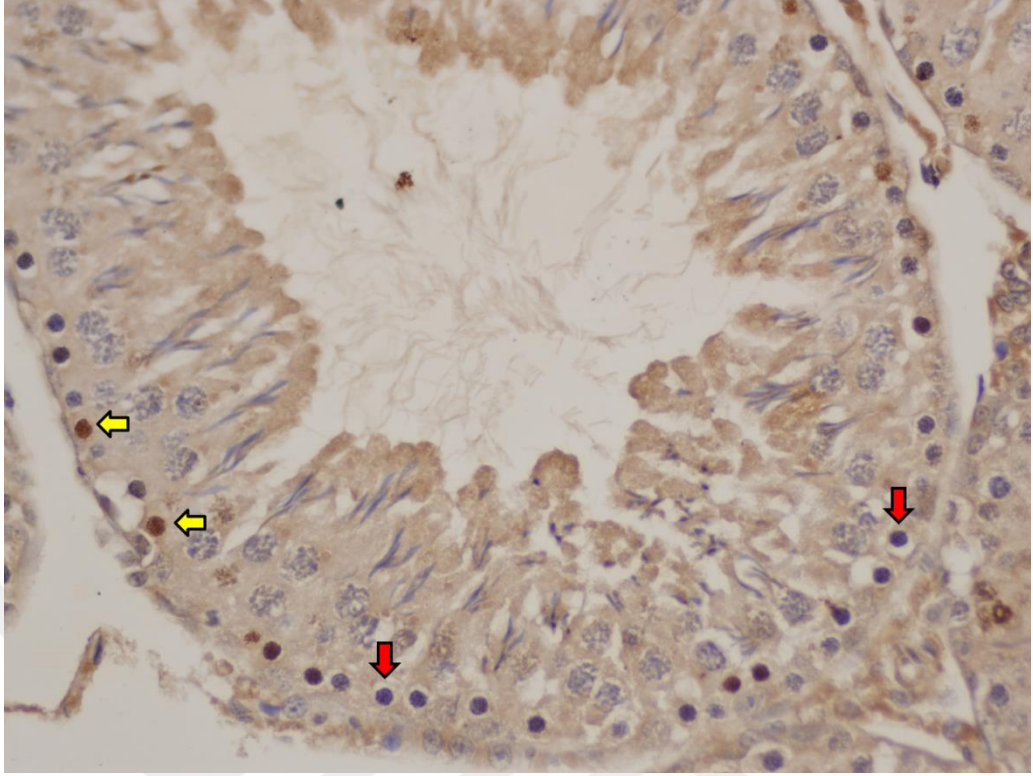
Resim 27: TUNEL (-) hücreler (kırmızı oklar) (K, TUNEL, 400x)



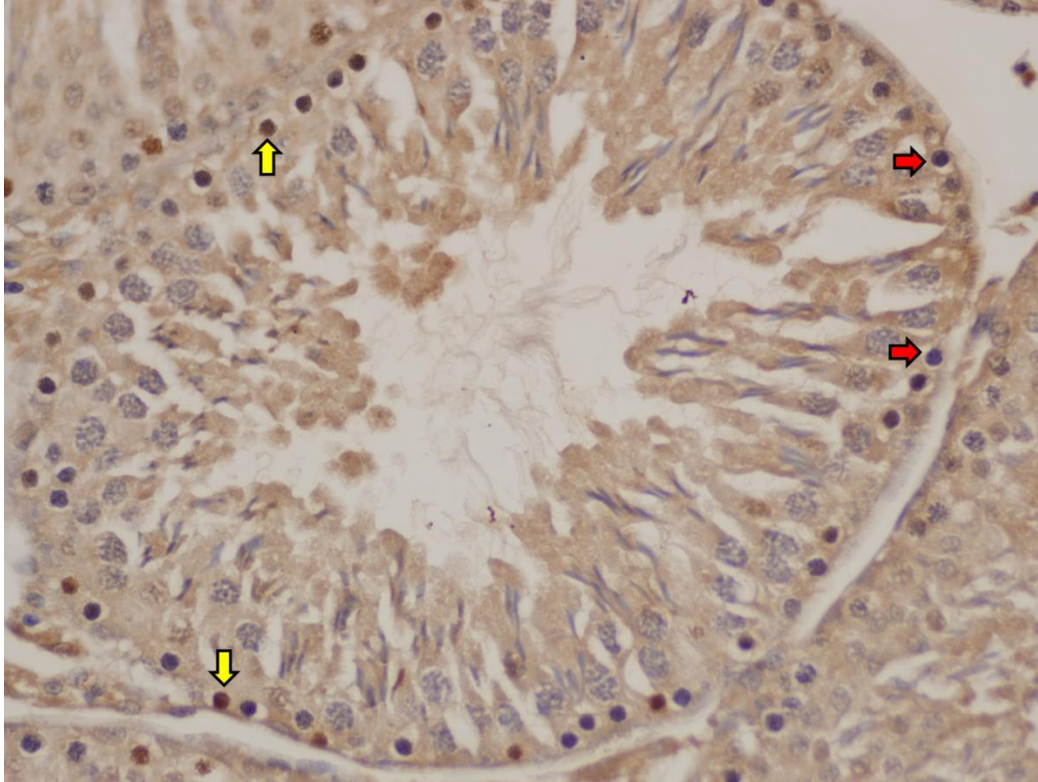
Resim 28: TUNEL (+) hücreler (sarı oklar), TUNEL (-) hücreler (kırmızı oklar) (MTX, TUNEL, 400x)



Resim 29: TUNEL (+) hücreler (sarı oklar), TUNEL (-) hücreler (kırmızı oklar) (MTX+QT, TUNEL, 400x)



Resim 30: TUNEL (+) hücreler (sarı oklar), TUNEL (-) hücreler (kırmızı oklar) (MTX+RA, TUNEL, 400x)



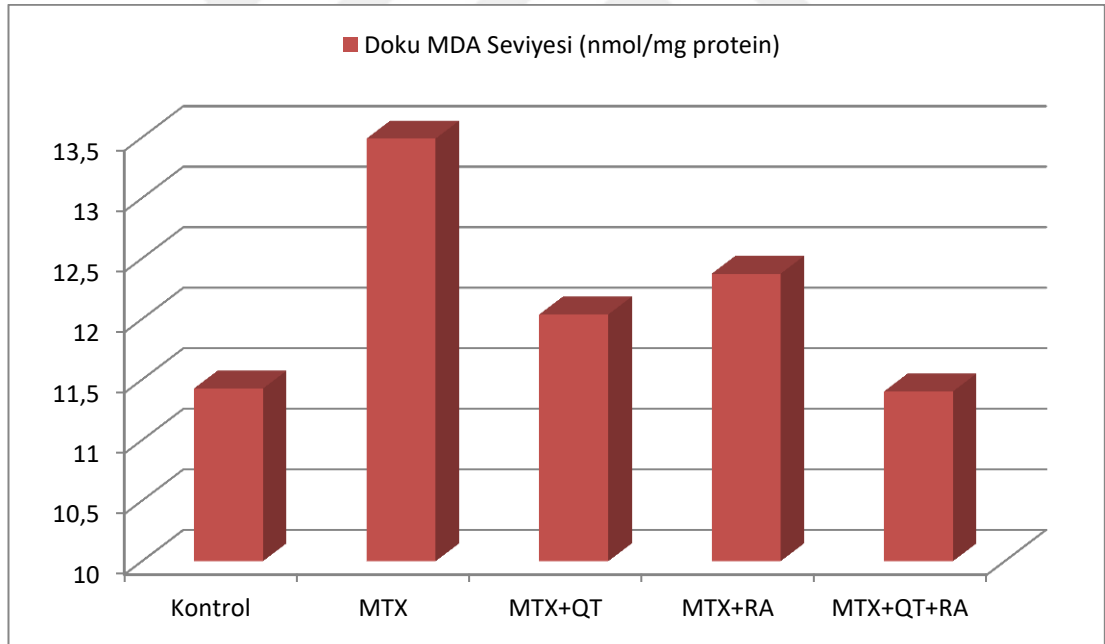
Resim 31: TUNEL (+) hücreler (sarı oklar), TUNEL (-) hücreler (kırmızı oklar) (MTX+QT+RA, TUNEL, 400x)

4.5. Biyokimyasal Değerlendirme Sonuçları

Yapılan biyokimyasal incelemeler sonucunda deneklere ait doku MDA değerleri hesaplandı ve metotreksatın MDA'yı arttırdığı, quercetin ve rosmarinik asitin ayrı ayrı verildikleri MTX+QT ve MTX+RA gruplarında bu artışın önemli ölçüde önüne geçtiği, birlikte verildikleri MTX+QT+RA grubunda ise tamamen önlediği tespit edildi.

Tablo 30: Grupların doku MDA seviyeleri (nmol/mg protein)

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
Doku MDA Seviyesi	11,43 ±4,90	13,49 ±2,47	12,04 ±3,43	12,37 ±3,84	11,40 ±2,35



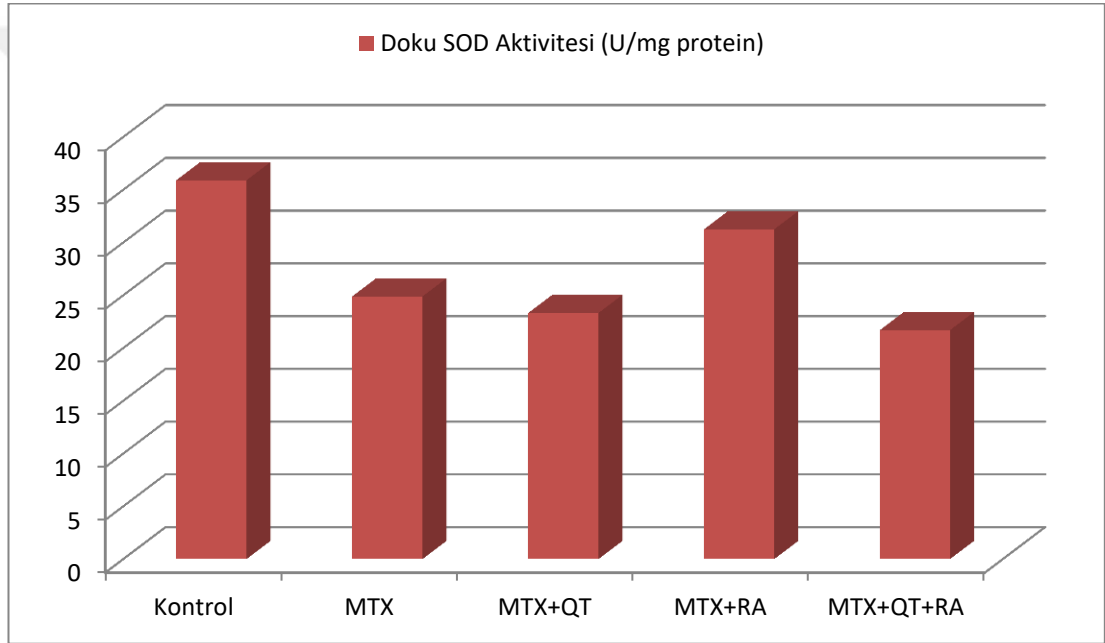
Şekil 31: Grupların doku MDA seviyeleri

Doku SOD aktivitesine bakıldığında ise metotreksatın azaltıcı etki yaptığı, quercetin MTX+QT grubunda bu azalmayı önleyemediği, rosmarinik asitin ise MTX+RA grubunda metotreksata bağlı bu azalmanın neredeyse tamamen önüne geçtiği görüldü. MTX+QT+RA grubunda ise sonuç MTX+QT grubundakine

benzerdi. Birlikte verilen QT ve RA'nın metotreksata bağılı ortaya çıkan SOD aktivite azalmasını engelleyemediği, hatta aktiviteyi çok hafif de olsa azalttığı tespit edildi.

Tablo 31: Grupların doku SOD aktiviteleri (U/mg protein)

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
Doku SOD Aktivitesi	35,89 ±10,95	24,89 ±7,8	23,31 ±4,072	31,25 ±10,85	21,69 ±4,39

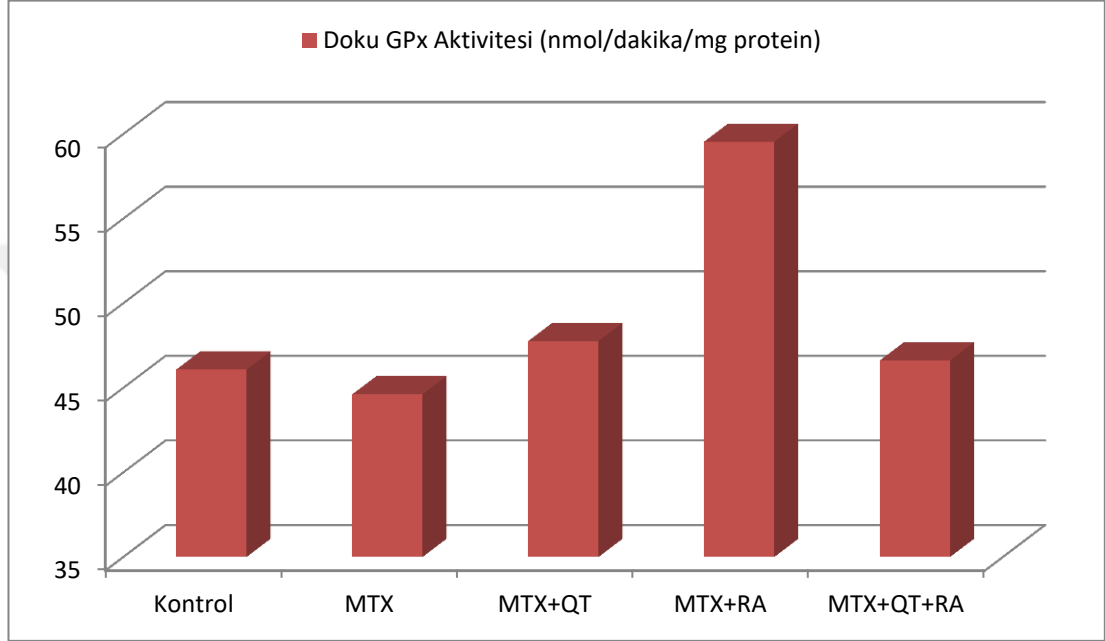


Şekil 32: Grupların doku SOD aktiviteleri

Doku GPx aktivitesinde de metotreksatın aktiviteyi düşürücü etkisi olduğu görüldü. Quercetin MTX+QT grubunda metotreksata bağılı bu düşüşü tamamen önlediği, rosmarinik asitin ise MTX+RA grubunda düşüşü önlemekle kalmayıp aktiviteyi Kontrol grubunda tespit edilen değerin de üzerine çıkardığı saptandı. MTX+QT+RA grubunda ise sonuçlar MTX+QT grubuna benzer idi. Birlikte verilen QT ve RA'nın da GPx aktivitesini Kontrol grubunda tespit edilen değer dolaylarında tuttuğu görüldü.

Tablo 32: Grupların doku GPx aktiviteleri (nmol/dakika/mg protein)

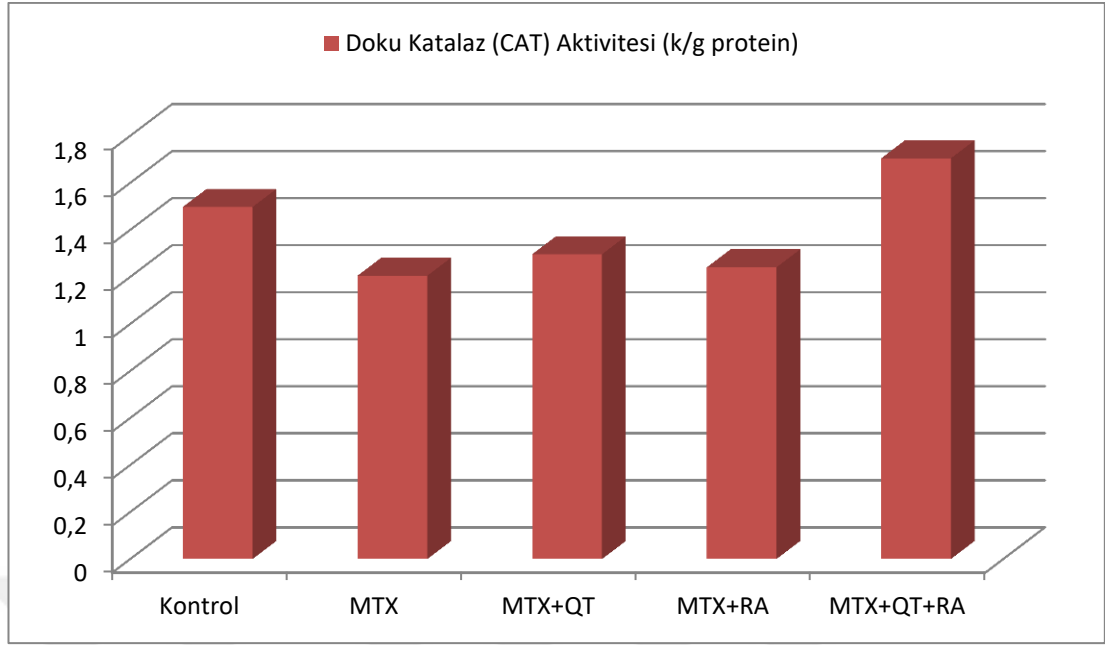
	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
Doku GPx Aktivitesi	46,08 ±3,52	44,61 ±6,62	47,76 ±1,78	59,54 ±13,48	46,61 ±1,88

**Şekil 33:** Grupların doku GPx aktiviteleri

Doku CAT aktivitesine bakıldığında metotreksatın yine aktiviteyi Kontrol grubuna kıyasla düşürdüğü, quercetin ve rosmarinik asitin MTX+QT ve MTX+RA gruplarında bu düşüşü bir miktar engellediği belirlendi. Ancak quercetin ve rosmarinik asit birlikte verildikleri MTX+QT+RA grubunda düşüşü tamamen engelledikleri gibi Kontrol grubunun da üzerine çıkardılar.

Tablo 33: Grupların doku CAT aktiviteleri (k/g protein)

	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
Doku CAT Aktivitesi	1,50 ±0,48	1,20 ±0,31	1,30 ±0,12	1,24 ±0,26	1,70 ±0,66



Şekil 34: Grupların doku CAT aktiviteleri

Deneklere ait testis dokularından elde edilen bu parametrelerin yanında alınan kan örneklerinden testosteron değerleri de ölçüldü. Ölçüm sonuçlarında metotreksatın kan testosteron miktarını azalttığı, quercetin MTX+QT grubunda bu azalmayı kısmen önlediği, rosmarinik asitin ise MTX+RA grubunda azalmayı daha da derinleştirdiği görüldü. MTX+QT+RA grubunda da düşüş belirgindi.

Tablo 34: Grupların kan testosteron seviyeleri (pg/ml)

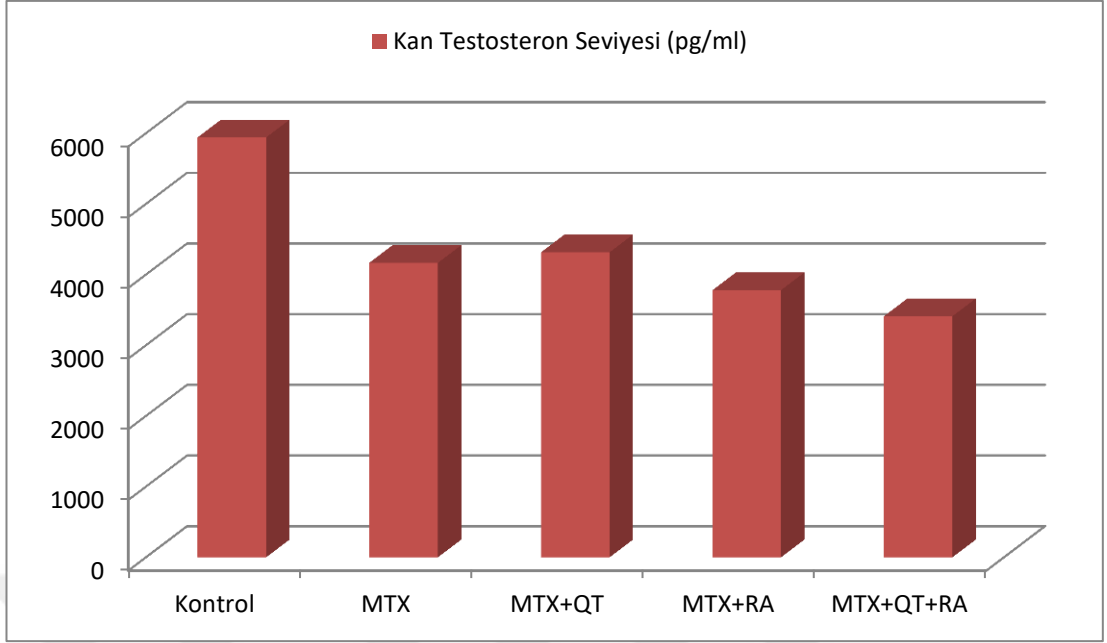
	Kontrol Ort±SD	MTX Ort±SD	MTX+QT Ort±SD	MTX+RA Ort±SD	MTX+QT+RA Ort±SD
Kan Testosteron Seviyesi	5940,13^{a,b,c,d} ±846,79	4166,04^a ±1063,93	4315,35^b ±782,03	3779,56^c ±490,06	3410,05^d ±916,98

^a : Kontrol & MTX → p<0,01

^b : Kontrol & MTX+QT → p<0,01

^c : Kontrol & MTX+RA → p<0,01

^d : Kontrol & MTX+QT+RA → p<0,01



Şekil 35: Grupların kan testosteron seviyeleri

5. TARTIŞMA

Kanser basitçe hücrelerin anormal büyümesidir. Herhangi bir organ veya vücut yapısından kaynaklanan kanserler, büyümeyi durdurma yeteneğini kaybetmiş küçük hücrelerden oluşmaktadır. 20. yüzyılın en korkulan hastalıklarından biri olan kanser, 21. yüzyılda süreklilik ve artan insidansla daha da yayılmaktadır. Durum o kadar endişe vericidir ki, her dört kişiden biri yaşam boyu kanser riski taşımakta, her yıl dünya çapında 14 milyonun üzerinde yeni kanser vakası kaydedilmektedir (46).

Sık görülen diğer bir hastalık grubu ise sistemik inflamatuvar hastalıklardır. Bu hastalık grubunun en önemli üyelerinden biri olan romatoid artrit, en sık 40-70 yaşlar arasında görülmekle birlikte her yaşta ortaya çıkabilen, insidansı yaşla birlikte artan ve toplamda popülasyonun yaklaşık %1'ini etkileyen çok ciddi bir sağlık problemidir. Esas olarak diartrodial eklemi etkileyen ve sistemik inflamasyonla seyreden bu hastalık, inflamatuvar artrit en yaygın şeklidir ve maliyet, sakatlık, üretkenlik kaybı gibi açılardan önemli toplumsal etkilere sahiptir (47).

Sebepler olduğu komorbid durumlar nedeniyle ciddi toplumsal etkilere sahip bir diğer sistemik inflamatuvar hastalık ise psöriasis. Papüloskuamöz bir deri hastalığı olan psöriasis, yakaladığı bireyi, yaşam kalitesinde bozulma ve buna bağlı depresif hastalık, kardiyovasküler hastalık ve psoriatik artrit gibi ciddi sağlık problemleri ile karşı karşıya getirmekte, bireyin ve dolayısıyla toplumun sağlığını son derece olumsuz etkilemektedir (48).

Yine sistemik inflamatuvar hastalıklar grubuna ait olup ciddi kliniği ve yüksek insidansı ile karşımıza çıkan bir başka hastalık sistemik lupus eritematozistis (SLE). SLE, nükleer ve sitoplazmik antijenlere karşı otoantikor üretimi, çok sayıda farklı klinik ve immünolojik anormallikler ve ataklarla seyreden bir klinik ile karakterize kronik otoimmün bir hastalıktır. Çoklu organ tutulumu yapabilen SLE son derece ağır klinik tablolarla karşımıza gelebilmektedir (49).

Metotreksat (MTX), günümüzde, bahsi geçen tüm bu hastalıkların yanı sıra daha pek çoğunun tedavisinde ortak olarak kullanılan ve bu nedenle çok büyük klinik öneme sahip bir ajandır. Akut lenfoblastik lösemi, Burkitt lenfoma, non-Hodgkin lenfoma, koryokarsinom, osteosarkom, meme kanseri, baş ve boyun kanserleri,

ovaryum kanseri, mesane kanseri vb. pek çok malign neoplazinin yanında romatoid artrit, psöriasis, sistemik lupus eritematozus, dermatomiyozit, graft-versus-host hastalığı, Crohn hastalığı gibi birçok non-neoplastik hastalığın tedavisinde de tercih edilmektedir (3-5, 25).

Esas olarak bir folik asit antagonisti olan MTX, DNA öncüllerinin sentezini inhibe ederek hücre döngüsünün S-fazındaki hücrelere etki eder (25) ve bu özelliği sayesinde antiproliferatif, antiinflamatuvar ve immünomodulator etkiler gösterir. Ancak ne yazık ki MTX'in DNA sentezi, onarımı ve hücresel replikasyon üzerindeki inhibe edici etkileri sağlıklı doku ve hücreleri de etkilemekte ve bu durum MTX'in klinik önemine gölge düşürmektedir (27). MTX'in sağlıklı hücreler üzerindeki olumsuz etkilerine bağlı olarak birçok hücre tipi etkilenebilmektedir. Fakat hızlı çoğalan hücreler olmaları nedeniyle özellikle spermatogenik seri hücrelerinde etki daha belirgin olarak karşımıza çıkmaktadır (27, 28). MTX'in testiste sebep olduğu seminifer tübül hasarı, kan-testis bariyer hasarı, sperm DNA hasarı, oligospermi, Sertoli ve Leydig hücrelerinde proliferasyon baskılanması, spermatogenik seri hücrelerinde apoptoz gibi toksik etkileri bireyin üreme kapasitesini etkilemekte ve infertiliteye kadar varabilen olumsuz sonuçlara sebep olabilmektedir (23, 24). MTX'in bu olumsuz etkilerini gidermek amacıyla yapılan çalışmalar MTX ile indüklenen testis hasarının patogenezinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını gösterince de dikkatler antioksidan maddelere yönelmiştir (24, 27).

Antioksidan maddelerin çalışmalara en çok konu olan gruplarından biri polifenollerdir. Çünkü polifenoller güçlü antioksidan, antialerjik, antimikrobiyal, antikanserojen ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olmalarının yanı sıra tümör hücresi proliferasyonu, karsinogenez, bronşiyal astım, peptik ülser, ateroskleroz, spazmojenik bozukluklar, apoptoz, iskemik kalp hastalığı, hiperglisemi, hepatotoksisite, depresyon, katarakt, zayıf sperm hareketliliği ve metastaz gibi pek çok hastalığa ve sağlık riskine karşı hayati roller oynadığı tespit edilmiş moleküllerdir (30). Polifenolik bileşikler içinde en önde gelenler ise quercetin ve rosmarinik asittir (31, 30).

Tüm bu sebeplerden ötürü biz de çalışmamızda metotreksatın indüklediği testis hasarını quercetin, rosmarinik asit ve ikisinin kombinasyonu ile gidermeyi amaçladık.

Sonuçlara baktığımızda metotreksatın beklendiği üzere neredeyse tüm parametrelerde olumsuz etki yaptığını gördük. Olumlu etki yaptığı 3 parametrede de istatistiksel olarak anlamlılık bulamadık. Bu parametrelerden biri seminifer tübül çapı idi. MTX istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da seminifer tübül çapını hafif arttırdı ancak diğer taraftan germinal epitel kalınlığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürdü. Dolayısıyla seminifer tübül çapının hafif de olsa artması germinal epitel kalınlığı / seminifer tübül çapı oranındaki düşüşü daha da derinleştirdi. Bu da kesitlere oransal olarak son derece incelmış germinal epiteller olarak yansıdı. Literatürde MTX kullanımına bağlı olarak seminifer tübül çaplarında bu şekilde istatistiksel anlamsız artışlara rastlamak mümkündür. Nouri ve ark. Wistar cinsi sıçanlara 14 gün boyunca her gün düşük doz (1 mg/kg) MTX verdiklerinde seminifer tübül çaplarında istatistiksel anlamsız hafif bir artış gördüler ancak aynı deneyde MTX uygulama süresini 28 güne çıkardıklarında seminifer tübül çaplarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğünü tespit ettiler (25). Biz de buradan yola çıkarak tek dozluk uygulamalarda nadir de olsa böyle sonuçlarla karşılaşılabilceğini ancak uzun dönem maruziyette MTX'in seminifer tübül çapını düşürücü etkisinin belirgin bir şekilde ortaya çıkacağını düşündük. Aynı çalışmada germinal epitel kalınlıklarına bakıldığında ise 14 ve 28 gün düşük doz MTX uygulamalarının her ikisinin sonucunda da istatistiksel anlamlı düşüş görüldü.

Metotreksatın beklenenin tersine olumlu etki gösterdiği diğer parametreler sperm analizi ile ilgiliydi. Çalışmamızda yalnızca MTX grubunun değil diğer grupların da sperm analiz sonuçlarında yer yer literatüre uymayan durumlarla karşılaşıldı. Kan testosteron düzeylerini düşüren rosmarinik asit ve quercetin&rosmarinik asit kombinasyonunun sperm analiz parametrelerinde birbirleri ile benzer sonuçlar vermeleri, kan testosteron düzeylerini MTX grubuna kıyasla yükselten quercetin'in ise onlarla genellikle ters sonuçlar vermesi bize sonuçların testosteron düzeyleri ile ilişkili olup rastlantısal olmayabileceğini

düşündürdü. Ancak genel olarak sperm analiz parametrelerinin istatistiksel analizinde herhangi bir anlamlılık bulunamadı.

Deney sonu vücut kütlesi, testis kütlesi, testis kütle indeksi, sperm motilitesi, germinal epitel kalınlığı, germinal epitel kalınlığı / seminifer tübül çapı oranı, lümenine germinal hücre dökülmüş tübül sayısı, modifiye Johnson skoru, germinal epitelde vakuol içeren tübül sayısı, toplam vakuol sayısı, germinal epitelde ayrılma içeren tübül sayısı, toplam ayrılma sayısı, germinal epitelde karşılaşılan mikrovakuolizasyon sayısı, apoptotik indeks, interstisyel bağ doku hasar skoru, bazal membran hasar skoru, doku MDA, SOD, GPX, CAT değerleri ve kan testosteron düzeyi şeklinde sıralanan diğer tüm parametrelerde metotreksatın beklendiği gibi olumsuz etki yaptığı görüldü. Ayrıca gruptaki hayvan sayılarımız az olmasına rağmen sonuçların birçoğu istatistiksel olarak anlamlı idi. Hatta bunların içinde çok sayıda ileri derecede anlamlı sonuç da mevcuttu.

Metotreksatın testiste sebep olduğu hasar açısından literatüre bakıldığında sonuçların çalışmamızla benzer olduğu görüldü. Güvenç ve ark. sıçanlara verdiği tek doz 20 mg/kg MTX'in deneklerde vücut ve testis kütlelerini azalttığını, spermelerde motiliteyi azalttığını, biyokimyasal olarak ise doku MDA düzeylerini arttırırken doku GPX düzeylerini azalttığını bildirdi (50). Bir başka çalışmada Morsy ve ark. metotreksatın sıçanlarda testis kütlesini düşürdüğünü, germinal epitel kalınlığını azalttığını, testiste histopatolojik hasara sebep olduğunu ve spermatogenezi bozduğunu, doku MDA seviyelerini arttırdığını, doku SOD ve serum testosteron seviyelerini düşürdüğünü bildirdi (23). Yuluğ ve ark. ise 30 mg/kg tek doz MTX uygulamasının testiste Johnson biyopsi skorunu düşürdüğünü, apoptotik indeksi arttırdığını, doku ve plazma MDA seviyelerini arttırırken doku SOD ve CAT değerlerini azalttığını rapor etti (3). Biz de çalışmamızda uygulanan modifiye Johnson skorunda MTX grubunda istatistiksel anlamlı bir düşüş, apoptotik indekste ise ileri derecede anlamlı bir artış tespit ettik. Başka bir çalışmada Koehler ve ark. 14 hafta boyunca haftada bir intravenöz 6 mg/kg MTX uyguladıkları Yeni Zellanda tavşanlarının spermatositlerinde sitoplazmik şişmelerin ve vakuolizasyonların arttığını bildirdi (51). Bir diğer çalışmada Badri ve ark. MTX'in sıçanlarda serum testosteron seviyelerini düşürdüğünü bildirdi (52). Bizim çalışmamızda da MTX

grubunda serum testosteron düzeylerindeki düşüş istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı idi.

Tedavi gruplarına bakıldığında ise genel olarak gayet iyi bir profil çizdikleri görüldü. Tüm tedavi gruplarında MTX grubuna kıyasla istisnalar hariç neredeyse tüm parametrelere olumlu etkiler tespit edildi. Verilen antioksidan tedavilerinin az da olsa bazı parametrelerde olumsuz etki yaptığı da görüldü ancak bunların hiçbirinde istatistiksel anlamlılık bulunamadı.

Tedavi gruplarında deney sonunda vücut kütlelerinin olumsuz etkilendiği görüldü ancak bu durum testis kütlelerine aynı şekilde yansımada. Tedavi gruplarında denekler yeterli kilo alamamış ya da kilo kaybetmiş olsalar bile verilen antioksidan tedavileri testislerin bu durumdan etkilenmelerinin önüne geçti. MTX grubunda, testis kütleleri vücut kütlelerine kıyasla oransal olarak daha fazla zarar gördüğünden testis kütle indeksleri düşük bulundu. Fakat verilen antioksidanlar sayesinde tedavi gruplarında indeksler kontrol grubundan bile daha yüksek olarak hesaplandı.

Tedavi gruplarında antioksidanların olumsuz etki gösterdikleri parametrelerden biri de kan testosteron düzeyleri idi. Metotreksatın MTX grubunda kan testosteron düzeylerini istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı şekilde düşürdüğü görüldü. Verilen antioksidanlardan bu düşüşü kısmen de olsa engelleyen MTX+QT grubunda quercetin oldu. MTX+RA ve MTX+QT+RA gruplarında düşüş engellenemedi hatta daha da derinleşti. Ancak çalışmamızda, tüm tedavi gruplarında verilen antioksidanların pek çok parametreye düzeltici etki yaptığı, testisin genel histolojik görüntüsünü gözle görülür şekilde düzelttiği tespit edilmişken testosteron düzeylerinde aynı başarıyı gösterememeleri düşündürücü idi. Bu konuda yaptığımız literatür taraması sırasında rosmarinik asitin kan testosteron düzeylerine etkilerine dair çok fazla yayına rastlayamadık. Keza literatürde quercetin ve rosmarinik asitin kombinasyon şeklinde kullanıldığı herhangi bir çalışma da bulunmamaktaydı. Fakat rosmarinik asitin kan testosteron düzeylerine etkisi hakkında ulaştığımız sınırlı sayıdaki yayından edindiğimiz kanaat bu durumun deney süremizin 1 hafta olmasından kaynaklı olabileceği oldu. Zira Hajhosseini ve ark. sıçanlarda yaptığı çalışmada 6 hafta boyunca 5 mg/kg dozunda verdikleri rosmarinik asitin kan testosteron seviyelerini istatistiksel anlamlı şekilde yükselttiğini bildirdi (53). Başka

bir çalışmada Georgy ve ark. sıçanlarda rosmarinik asitin doksorubisin tarafından düşürülen kan testosteron düzeylerini yükselttiğini tespit etti ancak çalışmalarında kullandıkları rosmarinik asit dozu 75 mg/kg ve tedavi süresi 2 hafta idi (54).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada Üyetürk ve ark. bizim çalışmamıza kıyasla yine daha yüksek doz (50 mg/kg) ve daha uzun süre (10 gün) rosmarinik asit tedavisinin doksorubisine bağlı düşen kan testosteron düzeylerini yükselttiğini raporladı (55). Üyetürk ve ark.'nın çalışmasında rosmarinik asit uygulama süresi bizim çalışmamıza kıyasla çok da uzun değildi ama zaten çalışmada rosmarinik asitin kan testosteron düzeyini yükselttiği verisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Öte yandan literatürde bu konuda farklı görüşlere de rastladık. Li ve ark. yayınladıkları makalenin tartışma bölümünde “Bu deneyde RA, testosteron ile ilgili olarak antagonistik etkiler sergilemiştir.” ifadesini kullandı. Ancak yayındaki bu ifadenin yazılma sebebine işaret eden tabloya baktığımızda Li ve ark.'nın primer kıl folikül fibroblast hücrelerine hücre kültür ortamında testosteronu ve testosteron+rosmarinik asiti ayrı ayrı uyguladıklarını, testosteronun bu hücrelerde canlılık oranını düşürdüğünü, rosmarinik asitin bu düşüşü önlediğini, bu durumun ise yayında testosterona antagonist etki olarak yorumlandığını gördük (56). Bir diğer çalışmada Nusier ve ark. rosmarinik asitten zengin biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ekstraktını sıçanlar üzerinde 9 hafta boyunca 500 mg/kg dozunda uyguladı ve sonuçta deneklerde kan testosteron düzeylerinin düştüğünü ve deneklerin fertilitelerinin zarar gördüğünü bildirdi (57). Bu çalışma bizi bu konuda bir fikir sahibi etse de çalışmada rosmarinik asit yerine biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ekstraktı kullanılması, tedavi süresinin (9 hafta) ve verilen dozun (500 mg/kg) çok yüksek olması, sonuçların bizim çalışmamızla karşılaştırılmasını imkansız kılıyordu.

Çalışmamızda verdiğimiz antioksidan tedavileri çok sayıda parametrede olumlu etki gösterdi. Ama bunlar içinde en başarılı sonuçlar alınan parametre apoptotik indeks idi. Metotreksat MTX grubunda apoptotik indeksi istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı şekilde yükseltirken antioksidan tedavileri bu artışı yine ileri derecede anlamlı şekilde önlediler.

Tedavi gruplarında elde ettiğimiz olumlu etkiler açısından literatüre baktığımızda sonuçlarımızın literatürle uyumlu olduğunu gördük. Üyetürk ve ark. daha önce bahsettiğimiz doksorubisine bağlı gelişen testis hasarına karşı rosmarinik asitin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında rosmarinik asitin Johnson skorunu yükselttiğini, apoptotik indeksi düşürdüğünü, doku MDA değerlerini düşürürken doku GPx değerlerini yükselttiğini tespit ettiler (55). Bostancı ve ark. cisplatine bağlı gelişen testis hasarına karşı quercetin'in etkilerini araştırdıkları çalışmada quercetin'in seminifer tübül çapını ve germinal epitel kalınlığını arttırdığını, tübüler atrofi ve vakuolizasyonları azalttığını, apoptotik indeksi düşürdüğünü, doku MDA seviyelerini azaltırken doku CAT seviyelerini arttırdığını rapor etti (58). Bir başka çalışmada Abarikwu ve ark. bütıl fitalat ile hasarladıkları testiste quercetin'in testis kitle indeksini arttırdığını, seminifer tübül çapını ve germinal epitel kalınlığını arttırdığını, doku MDA seviyelerini düşürdüğünü bildirdi (59). Gür ve ark. testiste cisplatin hasarına karşı rosmarinik asitin germinal epitel kalınlığını arttırdığını, Johnson skorunu arttırdığını, lümenine germinal hücre dökülmüş tübül sayısını azalttığını, apoptotik indeksi düşürdüğünü, sperm motilite ve vitalitesini arttırdığını raporladı (60). Wang ve ark. çalışmalarında quercetin'in testis kütlelerini ve kan testosteron seviyelerini arttırdığını tespit etti (61). Ahmed ve ark. doksorubisile indüklenen testis hasarına karşı quercetin'in ve quercetin&sitagliptin kombinasyonunun etkilerini araştırdıkları çalışmada her iki tedavinin de histopatolojik hasarı azalttığını, apoptotik indeksi düşürdüğünü, kan testosteron ve GPX değerlerini yükselttiğini bildirdi (62). Georgy ve ark. doksorubisine bağlı gelişen testis hasarına karşı rosmarinik asitin testis kitle indeksini yükselttiğini, toplam sperm sayısını ve sperm motilitesini arttırdığını, doku MDA düzeylerini düşürdüğünü saptadı. Aynı çalışmada rosmarinik asit&ellajik asit kombinasyonunun testis kütlelerini ve testis kitle indekslerini yükselttiğini, toplam sperm sayısı ile sperm motilitesini arttırdığını, doku MDA düzeylerini düşürdüğünü tespit etti (54). Bahsi geçen bu literatür verilerinin tamamı bizim çalışmamızla örtüşmekte idi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Quercetin, rosmarinik asit ve quercetin&rosmarinik asit kombinasyonunun metotreksata bağı testis hasarına etkilerini araştırdığımız 7 günlük bu çalışmamızda;

1- MTX grubunda 5. gün uygulanan 30 mg/kg tek doz metotreksatın Kontrol grubuna kıyasla;

- a. Deneklerde vücut kütlesini düşürdüğünü,
- b. Testis kütlesini düşürdüğünü,
- c. Testis kütle indeksini düşürdüğünü,
- d. Sperm motilitesini düşürdüğünü,
- e. Germinal epitel kalınlığını azalttığını,
- f. Germinal epitel kalınlığı / seminifer tübül çapı oranını düşürdüğünü,
- g. Lümenine germinal hücre dökülmüş tübül sayısını arttırdığını,
- h. Modifiye Johnson skorunu düşürdüğünü,
- i. Vakuol içeren tübül sayısını ve toplam vakuol sayısını arttırdığını,
- j. Germinal epitelde ayrılma içeren tübül sayısını ve toplam ayrılma sayısını arttırdığını,
- k. Mikrovakuolizasyon sayısını arttırdığını,
- l. Apoptotik indeksi yükselttiğini,
- m. İnterstisyel bağ dokusu hasar skorunu yükselttiğini,
- n. Bazal membran hasar skorunu yükselttiğini,
- o. Doku MDA seviyelerini yükselttiğini,
- p. Doku SOD seviyelerini düşürdüğünü,
- q. Doku GPX seviyelerini düşürdüğünü,
- r. Doku CAT seviyelerini düşürdüğünü,
- s. Kan testosteron seviyelerini düşürdüğünü tespit ettik.

2- MTX+QT grubunda 5. gün uygulanan 30 mg/kg tek doz metotreksata ilaveten 7 gün boyunca her gün uygulanan 30 mg/kg quercetinin MTX grubuna kıyasla;

- a. Testis kütlesini yükselttiğini,
- b. Testis kütle indeksini yükselttiğini,
- c. Sperm motilitesini yükselttiğini,
- d. Anormal sperm oranını düşürdüğünü,
- e. Seminifer tübül çapını arttırdığını,
- f. Germinal epitel kalınlığını arttırdığını,
- g. Germinal epitel kalınlığı / seminifer tübül çapı oranını arttırdığını,
- h. Lümenine germinal hücre dökülmüş tübül sayısını azalttığını,
- i. Modifiye Johnson skorunu yükselttiğini,
- j. Vakuol içeren tübül sayısını ve toplam vakuol sayısını azalttığını,
- k. Germinal epitelde ayrılma içeren tübül sayısını ve toplam ayrılma sayısını azalttığını,
- l. Mikrovakuolizasyon sayısını azalttığını,
- m. Apoptotik indeksi düşürdüğünü,
- n. İnterstisyel bağ dokusu hasar skorunu düşürdüğünü,
- o. Doku MDA seviyelerini düşürdüğünü,
- p. Doku GPX seviyelerini yükselttiğini,
- q. Doku CAT seviyelerini yükselttiğini,
- r. Kan testosteron seviyelerini yükselttiğini tespit ettik.

3- MTX+RA grubunda 5. gün uygulanan 30 mg/kg tek doz metotreksata ilaveten 7 gün boyunca her gün uygulanan 30 mg/kg rosmarinik asitin MTX grubuna kıyasla;

- a. Testis kütle indeksini yükselttiğini,
- b. Toplam sperm sayısını yükselttiğini,
- c. Sperm vitalitesini yükselttiğini,

- d. Sperm motilitesini yükselttiğini,
- e. Germinal epitel kalınlığını arttırdığını,
- f. Germinal epitel kalınlığı / seminifer tübül çapı oranını arttırdığını,
- g. Lümenine germinal hücre dökülmüş tübül sayısını azalttığını,
- h. Modifiye Johnson skorunu yükselttiğini,
- i. Vakuol içeren tübül sayısını ve toplam vakuol sayısını azalttığını,
- j. Germinal epitelde ayrılma içeren tübül sayısını ve toplam ayrılma sayısını azalttığını,
- k. Mikrovakuolizasyon sayısını azalttığını,
- l. Apoptotik indeksi düşürdüğünü,
- m. İnterstisyel bağ dokusu hasar skorunu düşürdüğünü,
- n. Doku MDA seviyelerini düşürdüğünü,
- o. Doku SOD seviyelerini yükselttiğini,
- p. Doku GPX seviyelerini yükselttiğini,
- q. Doku CAT seviyelerini yükselttiğini tespit ettik.

4- MTX+QT+RA grubunda 5. gün uygulanan 30 mg/kg tek doz metotreksata ilaveten 7 gün boyunca her gün uygulanan 15 mg/kg quercetin + 15 mg/kg rosmarinik asitin MTX grubuna kıyasla;

- a. Testis kütleini yükselttiğini,
- b. Testis kütle indeksini yükselttiğini,
- c. Toplam sperm sayısını yükselttiğini,
- d. Sperm vitalitesini yükselttiğini,
- e. Sperm motilitesini yükselttiğini,
- f. Germinal epitel kalınlığını arttırdığını,
- g. Germinal epitel kalınlığı / seminifer tübül çapı oranını arttırdığını,
- h. Lümenine germinal hücre dökülmüş tübül sayısını azalttığını,
- i. Modifiye Johnson skorunu yükselttiğini,

- j. Vakuol içeren tübül sayısını ve toplam vakuol sayısını azalttığını,
- k. Germinal epitelde ayrılma içeren tübül sayısını ve toplam ayrılma sayısını azalttığını,
- l. Mikrovakuolizasyon sayısını azalttığını,
- m. Apoptotik indeksi düşürdüğünü,
- n. İnterstisyel bağ dokusu hasar skorunu düşürdüğünü,
- o. Bazal membran hasar skorunu düşürdüğünü,
- p. Doku MDA seviyelerini düşürdüğünü,
- q. Doku GPX seviyelerini yükselttiğini,
- r. Doku CAT seviyelerini yükselttiğini tespit ettik.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların ileride yapılacak olan deneysel ve klinik araştırmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz. Çalışmamız metotreksata bağlı gelişen testis toksisitesine karşı quercetin'in etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmamız aynı zamanda testiste rosmarinik asit'in etkilerinin incelendiği nadir çalışmalardan biridir. Dahası çalışmamız quercetin & rosmarinik asit kombinasyonunun denendiği ilk çalışmadır. Bu yönleriyle araştırmamız literatürdeki pek çok boşluğu dolduracak, yapılacak olan ileri araştırmalara ön ayak olacaktır. Bu konuda ileri araştırmalar yapacak araştırmacılara;

- İstatistiksel olarak daha kesin sonuçlar elde edebilmek için gruptaki hayvan sayılarını arttırmalarını,
- Daha iyi kıyas yapabilmek amacıyla çalışmaya saf antioksidan grupları eklemelerini,
- Kullanılan maddelerin etkilerini daha iyi saptamak amacıyla deney süresini uzatmalarını,
- Kullanılan maddelerin farklı dozlarını denemelerini,
- Metotreksatın klinikte kullanıldığı bir hastalığın modellemesini yapıp benzer bir çalışma tatbik ederek verilen antioksidanların metotreksatın hastalığı tedavi edici etkisine herhangi bir zarar verip vermediğini araştırmalarını,
- Daha zengin veriler elde edebilmek için flow sitometri, konfokal mikroskopi, elektron mikroskopi, hücre kültürü vb daha ileri tekniklerle parametreleri genişletmelerini önerebiliriz.

7. KAYNAKLAR

1. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. In: Demir R, çeviri editör. 6. baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2017. 784-829.
2. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. In: Dalçık H, çeviri editör. 10. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2016. 260-278.
3. Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C. Effects of resveratrol on methotrexate-induced testicular damage in rats. The scientific world journal. 2013;2013.
4. Pınar N, Çakırca G, Özgür T, Kaplan M. The protective effects of alpha lipoic acid on methotrexate induced testis injury in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018 Jan 1;97:1486-92.
5. Bath RK, Brar NK, Forouhar FA, Wu GY. A review of methotrexate-associated hepatotoxicity. Journal of digestive diseases. 2014 Oct;15(10):517-24.
6. Gökçe A, Oktar S, Koc A, Yonden Z. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. Human & experimental toxicology. 2011 Aug;30(8):897-903.
7. Wang Y, Zhao TT, Zhao HY, Wang H. Melatonin protects methotrexate-induced testicular injury in rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018 Nov 1;22(21):7517-25.
8. Samova S, Patel CN, Doctor H, Pandya HA, Verma RJ. The effect of bisphenol A on testicular steroidogenesis and its amelioration by quercetin: an in vivo and in silico approach. Toxicology research. 2018 Jan 1;7(1):22-31.
9. Bu TL, Jia YD, Lin JX, Mi YL, Zhang CQ. Alleviative effect of quercetin on germ cells intoxicated by 3-methyl-4-nitrophenol from diesel exhaust

- particles. Journal of Zhejiang University SCIENCE B. 2012 Apr;13(4):318-26.
10. Ciftci OS, Aydin M, Ozdemir I, Vardi Nİ. Quercetin prevents 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced testicular damage in rats. *Andrologia*. 2012 Jun;44(3):164-73.
 11. Ranawat P, Kaushik G, Saikia UN, Pathak CM, Khanduja KL. Quercetin impairs the reproductive potential of male mice. *Andrologia*. 2013 Feb;45(1):56-65.
 12. Malo C, Gil L, Gonzalez N, Martínez F, Cano R, De Blas I, Espinosa E. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*. 2010 Aug 1;61(1):142-7.
 13. Gamaro GD, Suyenaga E, Borsoi M, Lermen J, Pereira P, Ardenghi P. Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *International Scholarly Research Notices*. 2011;2011.
 14. Mescher AL. Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas. In: Solakoğlu S, Erdoğan A, Mutlu HS, çeviri editör. 14. baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2019. 439-459.
 15. Eroschenko VP. diFiore'nin Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle. In: Demir R, çeviri editör. 12. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2016. 477-504.
 16. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*. 2005 Aug 1;15(4):316-28.
 17. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013 Oct;2013.
 18. Chio II, Tuveson DA. ROS in cancer: the burning question. *Trends in molecular medicine*. 2017 May 1;23(5):411-29.

19. Shukla SK, Gupta ML. Approach towards development of a radioprotector using herbal source against lethal irradiation. *Int Res J Plant Sci*. 2010;1(5):118-25.
20. Gürbüz G, Heinonen M. LC–MS investigations on interactions between isolated β -lactoglobulin peptides and lipid oxidation product malondialdehyde. *Food Chemistry*. 2015 May 15;175:300-5.
21. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G. Antioxidant measurements. *Physiological measurement*. 2007 Mar 7;28(4):R41.
22. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities.
23. Morsy MA, Abdel-Aziz AM, Abdel-Hafez S, Venugopala KN, Nair AB, Abdel-Gaber SA. The possible contribution of P-glycoprotein in the protective effect of paeonol against methotrexate-induced testicular injury in rats. *Pharmaceuticals*. 2020 Sep;13(9):223.
24. Daggulli M, Dede O, Utangac MM, Bodakci MN, Hatipoglu NK, Penbegul N, Sancaktutar AA, Bozkurt Y, Türkçü G, Yüksel H. Protective effects of carvacrol against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2014;7(12):5511.
25. Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M. Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia*. 2009 Apr;41(2):105-10.
26. Howard SC, McCormick J, Pui CH, Buddington RK, Harvey RD. Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate. *The oncologist*. 2016 Dec;21(12):1471.
27. Sarihan KK, Yilmaz MY, Eraldemir FC, Yazir Y, Acar E. Protective effects of apocynin on damaged testes of rats exposed to methotrexate. *Turkish journal of medical sciences*. 2020 Aug 26;50(5):1409-20.

28. Kim JC, Kim KH, Chung MK. Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reproductive Toxicology*. 1999 Sep 1;13(5):391-7.
29. 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 Jun 19;45(3):517-25.
30. Alagawany M, Abd El-Hack ME, Farag MR, Gopi M, Karthik K, Malik YS, Dhama K. Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. *Animal Health Research Reviews*. 2017 Dec;18(2):167-76.
31. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2010 Aug;69(3):273-8.
32. Staedler D, Idrizi E, Kenzaoui BH, Juillerat-Jeanneret L. Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2011 Nov;68(5):1161-72.
33. Kelly GS. Quercetin. *Alternative medicine review*. 2011 Jun 1;16(2):172-95.
34. M Eid H, S Haddad P. The antidiabetic potential of quercetin: underlying mechanisms. *Current medicinal chemistry*. 2017 Feb 1;24(4):355-64.
35. Kanter M, Aktas C, Erboga M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food and chemical toxicology*. 2012 Mar 1;50(3-4):719-25.
36. Dodda D, Chhajed R, Mishra J, Padhy M. Targeting oxidative stress attenuates trinitrobenzene sulphonic acid induced inflammatory bowel disease like symptoms in rats: role of quercetin. *Indian journal of pharmacology*. 2014 May;46(3):286.
37. Aldemir M, Özgün G, Önen E, Okulu EM, Kayıgil Ö. Quercetin has a protective role on histopathological findings on testicular ischaemia–reperfusion injury in rats. *Andrologia*. 2012 May;44:479-83.

38. Nna VU, Ujah GA, Mohamed M, Etim KB, Igba BO, Augustine ER, Osim EE. Cadmium chloride–induced testicular toxicity in male wistar rats; prophylactic effect of quercetin, and assessment of testicular recovery following cadmium chloride withdrawal. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017 Oct 1;94:109-23.
39. Swamy MK, Sinniah UR, Ghasemzadeh A. Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics. *Applied microbiology and biotechnology*. 2018 Sep;102(18):7775-93.
40. Petersen M, Simmonds MS. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 2003 Jan 1;62(2):121-5.
41. Fadel O, El Kirat K, Morandat S. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2011 Dec 1;1808(12):2973-80.
42. Vostálová J, Zdařilová A, Svobodová A. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Archives of dermatological research*. 2010 Apr 1;302(3):171-81.
43. Sun YI, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*. 1988 Mar 1;34(3):497-500.
44. Hugo A, Lester P. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 1984;105:121-6.
45. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*. 1978 May 1;86(1):271-8.
46. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: a critical analysis. *Indian journal of cancer*. 2016 Jul 1;53(3):441.

47. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis Lancet 358.
48. Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. The Lancet. 2007 Jul 21;370(9583):263-71.
49. Fortuna G, Brennan MT. Systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. Dental Clinics. 2013 Oct 1;57(4):631-55.
50. Güvenç M, Aksakal M. Ameliorating effect of kisspeptin-10 on methotrexate-induced sperm damages and testicular oxidative stress in rats. Andrologia. 2018 Oct;50(8):e13057.
51. Koehler M, Waldherr R, Ludwig R, Heinrich U, Brandeis WE. Effects of Methotrexate on Rabbit Testes Part 1: Morphological Changes. Pediatric hematology and oncology. 1986 Jan 1;3(4):325-34.
52. Badri SN, Vanithakumari G, Malini T. Studies on methotrexate effects on testicular steroidogenesis in rats. Endocrine research. 2000 Jan 1;26(2):247-62.
53. Hajhosseini L, Khaki A, Merat E, Ainehchi N. Effect of rosmarinic acid on sertoli cells apoptosis and serum antioxidant levels in rats after exposure to electromagnetic fields. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2013 Oct 14;10(6):477-80.
54. Georgy GS, Maher OW. Ellagic acid and rosmarinic acid attenuate doxorubicin-induced testicular injury in rats. Journal of biochemical and molecular toxicology. 2017 Sep;31(9):e21937.
55. Uyeturk U, Uyeturk U, Firat T, Cetinkaya A, Tekce BK, Cakir S. Protective effects of rosmarinic acid on doxorubicin-induced testicular damage. Chemotherapy. 2014;60(1):7-12.
56. Li JJ, Li Z, Gu LJ, Choi KJ, Kim DS, Kim HK, Sung CK. The promotion of hair regrowth by topical application of a Perilla frutescens extract through

increased cell viability and antagonism of testosterone and dihydrotestosterone. *Journal of natural medicines*. 2018 Jan;72(1):96-105.

57. Nusier MK, Bataineh HN, Daradkah HM. Adverse effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on reproductive function in adult male rats. *Experimental biology and medicine*. 2007 Jun;232(6):809-13.
58. Bostancıeri N, Taşlıdere A, Elbe H, Taşlıdere E. Protective effects of quercetin against testis damage caused by cisplatin. *Biotechnic & Histochemistry*. 2021 May 26:1-5.
59. Abarikwu SO, Simple G, Onuoha CS. Morphometric Evaluation of the Seminiferous Tubules and the Antioxidant Protective Effects of Gallic Acid and Quercetin in the Testis and Liver of Butyl Phthalate Treated Rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2020 Jan;35(1):20-31.
60. Gür B. Cisplatin ile indüklenen testis hasarına karşı rosmarinik asitin koruyucu etkileri [tez]. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi; 2019.
61. Wang D, Li Y, Zhai QQ, Zhu YF, Liu BY, Xu Y. Quercetin ameliorates testosterone secretion disorder by inhibiting endoplasmic reticulum stress through the miR-1306-5p/HSD17B7 axis in diabetic rats. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 2021 Sep 28.
62. Ahmed ZA, Abtar AN, Othman HH, Aziz TA. Effects of quercetin, sitagliptin alone or in combination in testicular toxicity induced by doxorubicin in rats. *Drug design, development and therapy*. 2019;13:3321.