



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METHOTREXATE KAYNAKLI
TESTİS HASARI ÜZERİNE SHİLAJİTİN
HİSTOPATOLOJİK ETKİSİ**

Eray GÜVEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

TRABZON – 2013



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METHOTREXATE KAYNAKLI
TESTİS HASARI ÜZERİNE SHİLAJİTİN
HİSTOPATOLOJİK ETKİSİ**

Eray GÜVEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

TRABZON – 2013

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

07.03.2013

Eray GÜVEN

TEŞEKKÜR

“Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarı Üzerine Shilajitin Histopatolojik Etkisi” isimli bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinden çalışmaların yürütülmesi ve sonuçlandırılmasına kadar her aşamasında bilgi, deneyim, destek ve görüşlerinden yararlandığım danışman hocam Doç. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU’na minnet ve şükran borçluyum.

Çalışmam boyunca beni yönlendiren ve tezin çeşitli aşamalarında gösterdiği yardımlarından dolayı Prof. Dr. Engin YENİLMEZ’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN ve Doç. Dr. İsmail DEMİR hocalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Tezin bütün aşamalarında büyük bir içtenlikle bilgi, deneyim ve tecrübelerini benden esirgemeyen çok değerli arkadaşım doktora öğrencisi Hatice HANCI’ ya ve yine tez aşamalarında benden yardımlarını esirgemeyen doktora öğrencileri Sibel TÜREDİ ve Zehra TOPAL’a ayrı ayrı teşekkür ederim.

Çalışmanın başından beri her türlü desteklerini benden esirgemedikleri için sevgili aileme ve kız arkadaşıma teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Eray GÜVEN

Trabzon, 2013

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Eray GÜVEN'in hazırladığı "Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarı Üzerine Shilajitin Histopatolojik Etkisi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN

Doç. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

Tarih: .../.../2013

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

Prof. Dr. Ahmet KALKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

KABUL ve ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER DİZİNİ..... i

TABLolar DİZİNİ..... iii

ŞEKİLLER DİZİNİ iv

RESİMLER DİZİNİ v

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ..... vi

1. ÖZET vii

2. SUMMARY viii

3. GİRİŞ ve AMAÇ 1

4. GENEL BİLGİLER 3

4.1. Testis Embriyolojisi 3

4.2. Testisin Anatomisi 4

4.3. Testis Histolojisi 5

4.3.1. Seminifer Tübüller 6

4.3.2. Seminifer Tübül Epiteli..... 6

4.3.2.1. Sertoli Hücresi 6

4.3.2.2. Spermatogenik Hücreler 7

4.3.3. Spermatogenez 7

4.3.4. Spermatozoa..... 8

4.3.5. Seminifer Epitel Döngüsü..... 9

4.3.6. İntersitisyel Alan ve Leydig Hücreleri..... 9

4.4. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem 10

4.4.1. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller 10

4.4.2. Antioksidan Sistem 11

4.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) 11

4.4.2.2. Katalaz (CAT)..... 11

4.4.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon Redüktaz (GR)..... 11

4.4.3. Serbest Radikaller ve Testis Hasarı 12

4.5.	Methotrexate	12
4.5.1.	Etki Mekanizması	12
4.5.2.	Endikasyonları	13
4.5.3.	Yan Etkileri	14
4.5.4.	MTX ve Testis Hasarı	14
4.6.	Shilajit (PS)	15
4.6.1.	Kimyasal Bileşenleri	16
4.6.2.	Etkisi	16
5.	GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
5.1.	Deneysel Çalışma Aşaması	18
5.1.1.	Deney Hayvanları	18
5.1.2.	Laboratuvar Koşulları	18
5.1.3.	Deneysel Çalışma Planı	19
5.1.4.	Doku Örneklerinin Toplanması	22
5.1.5.	Bouin Tespitinin Hazırlanışı	24
5.1.6.	Işık Mikroskobu için Dokuların Hazırlanması	24
5.1.7.	Kesitlerin Alınması	24
5.1.8.	Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi	25
5.2.	İstatistiksel Analizler	26
6.	BULGULAR.....	27
6.1.	Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Bulgular	27
6.2.	Morfometrik Bulgular	27
6.3.	Morfolojik Bulgular	28
7.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	34
8.	KAYNAKLAR	36
9.	ETİK KURUL ONAYI.....	42
10.	ÖZGEÇMİŞ ve KİŞİSEL BİLGİLER	43

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Çalışma Grupları ve Özellikler	20
Tablo 2. Deney Gruplarının Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar	27
Tablo 3. Deney Gruplarına Ait Morfometrik Ölçümlerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	28

ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa**

Şekil 1.	MTX'in Kimyasal Yapısı	13
-----------------	------------------------------	----

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Resim 1. Tip III Kafesler	19
Resim 2. Sıçanlara İntraperitoneal MTX Verilmesi	21
Resim 3. Sıçanlara Gavaj Yoluyla PS Verilmesi	22
Resim 4. Hayvanların Karın Bölgelerinin Açılması	23
Resim 5. Testislerin Çıkarılması	23
Resim 6. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki testis kesit görüntüsünde, seminifer tübüller (★), spermatogenik seriye ait hücreler (✦) ve interstisyel alandaki Leydig hücreleri (➡) izlenmektedir (A; H&E, X400).....	29
Resim 7. MTX grubuna ait testis kesit görüntüsünde, lümende olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri (▲), seminifer tübül germinal epitelinde düzensizlikler (✦) ve interstisyel alanda ödem (★) izlenmektedir (B ₁ ; H&E, X200)	30
Resim 8. MTX grubuna ait testis kesit görüntüsünde, lümende olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri (▲), lümende spermatozoa azlığı (➡) ve interstisyel alanda ödem (★) izlenmektedir (B ₂ ; H&E, X400).....	31
Resim 9. MTX+PS grubuna ait testis kesiti görüntüsü, lümende spermatozoa yoğunluğu (▲) ve az sayıda lümende olgunlaşmamış germinal hücrelerin görüldüğü seminifer tübüller (★) izlenmektedir (C ₁ , C ₂ ; H&E, X200, X400)	32
Resim 10. PS Grubuna ait testis kesit görüntüsünde seminifer tübüllerin histolojik yapısının kontrol grubuna benzer olduğu izlenmektedir (D; H&E, X400).....	33

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ**Kısaltmalar**

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
ALL	: Akut Lenfositik Lösemi
CAT	: Katalaz
FSH	: Follikül Stimülan Hormon
GH	: Büyüme Hormonu (Growth Hormone)
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
HCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu
LH	: Lüteinizan Hormon
MDA	: Malondialdehit
MIS	: Antimüllariyan İnhibe Edici Madde
MTX	: Methotrexate
NHL	: Non-hodgkin Lenfoma
PS	: Shilajit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SYR geni	: Sex-Determining Region Y
TBF	: Testis Belirleyici Faktör
THF	: Tetrahidrofolat

1. ÖZET

Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarı Üzerine Shilajitin Histopatolojik Etkisi

Bu çalışmada sıçanlarda methotrexate (MTX) kaynaklı testis hasarı üzerine shilajitin (PS) histopatolojik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 24 adet Sprague Dawley tipi erkek sıçan 4 gruba ayrıldı. 1. Grup'a (kontrol grubu) herhangi bir uygulama yapılmadı. 2. Grup'a tek doz i.p. 20 mg/kg MTX verildi. 3. Grup'a deney süresinin (7 gün) ilk gününde (0. Gün) tek doz i.p. 20 mg/kg MTX verilmeden 15 dk önce 2 ml/kg distile suda 100 mg/kg PS çözülerek gavaj yoluyla verildi. 0. günü takip eden gün aşırı günlerde sıçanlara toplamda üç kez olacak şekilde 2 kez daha 2 ml/kg distile suda 100 mg/kg PS çözülerek gavaj yoluyla verildi. 4. Grup'a 0. Gün ve akabindeki gün aşırı günlerde toplamda üç kez olacak şekilde sıçanlara 2 ml/kg distile suda 100 mg/kg PS çözülerek gavaj yoluyla verildi. Deney süresinin bitiminde hayvanların tümü sakrifiye edilerek sol testisleri alındı. Testis doku örnekleri ışık mikroskobunda histopatolojik olarak değerlendirildi.

Histopatolojik olarak; MTX grubunda seminifer tübül çapında ve seminifer tübül epitel kalınlığında anlamlı derecede azalma gözlenirken, MTX+PS grubunda MTX grubuna göre seminifer tübül çapında ve seminifer tübül epitel kalınlığında artış olduğu gözlemlendi. Morfolojik bulgular değerlendirildiğinde; MTX grubuna ait testis kesitlerinde, lümende olgunlaşmamış seminifer tübül epitel hücreleri ve lümende spermatozoa azlığı, seminifer tübül epitelinde düzensizlikler, seminifer tübül bazal membranında düzensizlikler ve interstisyel alanda ödem izlendi. MTX+PS grubuna ait testis kesitlerinde ise, seminifer tübül epitelinde düzensizlik ve lümenine olgunlaşmamış seminifer tübül epitel hücrelerinin dökülmüş olduğu birkaç tübül dışında herhangi bir patolojiye rastlanmadı.

Bulgularımız methotrexate'in testis hasarı meydana getirdiğini ve PS uygulamasının bu hasarı önleyebileceğini göstermektedir. Sonuç olarak PS'nin, MTX tedavisi sonrasında oluşan testis hasarının önlenmesinde yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Methotrexate, Shilajit, Oksidatif stres, Sıçan, Testis.

2. SUMMARY

Histopathological Effect of Shilajit on the Testes Damage Caused by Methotrexate in Rats

With this study, it is aimed to investigate histopathological effect of shilajit (PS) on testes damage caused by methotrexate (MTX) on rats.

In this study, twenty four Spraque Dawley type male rats were separated into four groups. No application was done on the 1st Group (Control Group). Single doze 20 mg/kg MTX was given to the 2nd Group (MTX Group) as intraperitoneal. 100 mg/kg PS dissolved in 2ml/kg distilled water was given to the 3rd Group (MTX + PS Group) in the first day (0th day) of the experiment period (7 days) 15 minutes before single doze i.p. 20 mg/kg MTX is given by gavage. Every other day following the 0th day rats were given 100 mg/kg PS dissolved in 2 ml/kg distilled water by gavage two more times, totally three times. 0th day and the following every other day 100 mg/kg PS dissolved in 2 ml/kg distillate water were given to the 4th Group (PS Group) by gavaj three times totally. At the end of the experiment period left testes of all the animals were taken by sacrificing. Testes tissue samples were evaluated histopathologically in the light microscope.

Histopathologically, while remarkable decrease was observed in the seminiferous tubules diameter and seminiferous epithelium thickness in MTX group, increase in the seminiferous tubules diameter and seminiferous epithelium thickness in MTX+PS group in comparison with MTX group. When morphological findings were evaluated, in testes sections belong to the MTX group, immature seminiferous epithelium cells and lack of spermatozoas in lumen, irregularity in seminiferous tubule epithelium, irregularity in the basal membrane of seminiferous tubule and oedema in interstitial area were observed. In testes sections belong to the MTX+PS groups, no irregularity in the seminiferous tubules epithelium and no pathology except for a few seminiferous tubules in immature seminiferous tubule epithelium cells in lumen was found.

Our findings shows that MTX causes testes damage and PS application can prevent this damage. Consequently, we think that PS can be useful in the prevention of the testes damage that happens after MTX treatment.

Key Words: Methotrexate, Shilajit, Oxidative stress, Rat, Testes.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

İlk olarak 1950’lerde klinik kullanıma sunulan, çoğunlukla akut lenfoblastik lösemi, non-hodgkin lenfoma (NHL), meme kanseri, mesane kanseri, baş-boyun kanser hastalıklarının yanı sıra testis kanserlerinin tedavisinde de kullanılan ve günümüzde antimetabolit grubunun halen kullanılmakta olan tek formu Methotrexate (4-amino-4-deoxy-10-N-methylpteroylglutamic acid; MTX) olarak adlandırılmaktadır (1, 2, 3). MTX, hücre bölünmesini inhibe ettiği için uzun yıllardır antikanser ilacı olarak kullanılır. Bir folik asit antagonisti olan MTX, oksidatif stres sonucu organ toksisitesine neden olabilir (4, 5).

Kanser tedavisinde kullanılan en etkili tedavi yöntemi kemoterapidir. Ancak kemoterapi tedavisinde kullanılan ilaçların ortak özelliği çoklu organ sistemlerinde akut toksik yan etkiler oluşturmalarıdır. Gastrointestinal sistem, hematolojik ve merkezi sinir sistemi gibi kısımlar kemoterapiden etkilenen bölgelerden bazılarıdır. Kemoterapi tedavisinde sık olarak görülen gonadal hasar, antikanser ajanlarının potansiyel yan etkileri arasında yer almaktadır (1, 6).

Erkek bireylere MTX uygulaması, bireyin testislerinde ki oksidatif stresin artmasına neden olur. Artan oksidatif stres neticesinde testis ve üreme hücrelerinin yapısında hasar oluşmaktadır ve bu hasar infertiliteye yol açmaktadır (7, 8, 9). MTX tedavisi almış bir erkek bireyde testiküler hasar oluşarak başta oligospermi oluşmakta spermatogenez ve fertilite zarar görmektedir (10, 11, 12, 13).

Son yıllarda doğal ürünlere olan ilginin artması ve tıbbi özelliklerinin incelenmeye başlanmasıyla beraber birçok doğal ürün gibi Shilajit de (PS) araştırma konusu olmuştur. PS aynı zamanda salajit, shilajatu, mumie ya da mummiyo olarak da adlandırılmaktadır. Özellikle Hindistan yarımadasındaki Himalaya dağ dizilerinde ve dünyadaki birçok dağ dizisinin 0.6 km ile 5 km arasında ki yüksekliklerinde bulunan kaya katmanlarından sızan ve değişken kıvam gösteren soluk siyahımsı kahverengi bir sıvıdır. PS, doğal habitatın kaya rizosferlerindeki mikrobiyal metabolitler ile bitki ve organik humuslu maddelerin kompleks bir karışımından oluşur ve birçok ülkede binlerce yıldır geleneksel tıp sistemlerinin (ayurveda) parçası olarak kullanılmaktadır. Modern bilimsel değerlendirmeler tarafından doğrulanan birçok iyileştirme özelliği de

bulunmaktadır. PS, eski zamanlardan beri ayurveda tıbbında kullanılan en büyük keşiflerden biridir ve erkek üreme bozukluklarının tedavisinde uygulanır. Modern tıpta PS ile ilgili yapılan bir çalışmada, PS'nin toplam sperm sayısını, sperm hareketini, serum testosteron, follikül stimulan hormon (FSH) ve spermatogenezin başlaması ve devamı için gerekli olan lüteinizan hormon (LH) seviyesini önemli derecede artırdığı gösterilmiştir (14).

PS serbest radikal seviyesinin baskılanması üzerine de önemli derecede katkı yapmaktadır. İşlenmiş PS'nin serbest radikaller üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, PS'nin polimerizasyona neden olan hidroksil radikaline karşı metil meta krilat korumasını neredeyse sağladığı ve etkili bir biçimde nitrik oksit serbest radikallerinin etkisini azalttığı ifade edilmiştir (14, 15, 16, 17)

Çalışmamızda antioksidan özelliği olan PS'nin, kemoterapi tedavisi almış olan erkek bireylerin üreme fonksiyonlarında oluşabilecek yan etkilerin önlenmesi üzerine sağlayacağı katkıların görülmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Testis Embriyolojisi

Testisler, seks kromozom kompleksinde normal bir Y kromozomu taşıyan embriyolarda gelişir. Koordineli bir gen dizisi, testis gelişimini uyarır ve Y kromozomunun kısa kolundaki testis belirleyici faktör (TBF) için sex-determining region Y (SYR geni), farklanmamış gonadın gelişimini bir testise yönlendiren anahtar olarak rol oynar. Genital kabarıklıkta yer alan bipotansiyel gonadal dokular testis belirleyici gen olan SRY geninin etkisiyle testis yönünde farklılaşır (18). Testiküler tayin için transkripsiyon faktörü SOX9 geninin ekspresyonu da gereklidir. TBF rete testisi oluşturmak üzere dallanıp anastomoz yapacağı farklanmamış gonadın medullasına doğru yoğunlaşması ve uzaması için gonadal kordonları uyarır. Çıkıntı oluşturan gonadal kordonların seminifer kordonun yüzey epiteli ile bağlantısı tunika albuginea geliştiği zaman kaybolur. Kalın, sıkı fibröz bir kapsül olan tunika albuginea, fetüste testiküler gelişimin karakteristik bir özelliğidir. Testis aşamalı olarak, dejenere olan mezonefroza ayrılır ve kendi mezenteriyi (mezorkiyum) asılı kalır. Seminifer kordonlar seminifer tübüllere, düz tübüllere (tubuli rekti) ve rete testise dönüşür (19).

Seminifer tübüller, intersitisyel hücreleri oluşturan mezenşim ile ayrılmışlardır. Sekizinci haftada bu hücreler, mezonefrik kanalların ve dış genital organların erkeklik yönünde farklılaşmasını uyan androjenik hormonlar olan testosteron ve androstenedion salgırlar. Testosteron üretimi, embriyonik ve fetal gelişimin 8. ile 12. haftalarındaki dönemde en yüksek miktara ulaşan insan koryonik gonadotropin hormonu (HCG) tarafından uyarılır. Fetal testis ayrıca, antimüllariyan inhibe edici madde (MIS) olarak bilinen bir glikoprotein üretir. Puberteye kadar mevcut olan ve bu evrede düzeyleri azalan MIS, sustentaküler hücreler olan Sertoli hücreleri tarafından üretilir. MIS, uterus ve tuba uterinaları oluşturan paramesonefrik (Müller) kanalların gelişimini engeller. Seminifer tübüller lümenin gelişmeye başlayacağı puberteye kadar solid yani lümensiz olarak kalır. Seminifer tübüllerin duvarları iki tür hücreden oluşur.

- Sertoli hücreleri, testisin yüzey epitelinin türeyen destekleyici hücreler

- Spermatogonyumlar, primordiyal germ hücrelerinden türeyen primordiyal sperm hücreleri

Sertoli hücreleri, fötal testiste seminifer epitelin büyük bir kısmını oluşturur. Rete testisin efferent kanallarını döşeyen 15-20 kadar mesonefrik tübül ile devam etmektedir (19).

4.2. Testisin Anatomisi

Erkek üreme hücrelerinin üretildiği testisler erkekte temel üreme organıdır. Ovoid şekilli olan testisler erişkin bir erkekte 4x3, 5x3 cm boyutlarındadır ve yaklaşık olarak 10-14 gr ağırlığındadır. Testisler, testis torbası (skrotum) içinde oblik pozisyonda dururlar. Üst ucu serbest, öne ve dışa doğru iken; alt ucu ise epididim, bağ dokusu ve damarlarla örtülü olup, arkaya ve içe doğru bakmaktadır. Testisler fötal hayatta karın boşluğu içinde, fascia transversalis ile periton arasında gelişir; ancak doğumdan önce, canalis inguinalisten geçerek skrotum içine iner. Testislerin normal fonksiyonlarını yapabilmeleri için, karın boşluğundan skrotuma inmeleri zorunludur (20, 21).

Testis, tunica albuginea denen kalın fibröz bir tabaka ile çevrelenmiştir. Elastikiyeti ve genişleme özelliği bulunmayan bu tabaka fibroblastlar ve kollajenden yoğun bir yapıdadır. Tunika albuginea'nın iç kısmını örten nispeten daha gevşek bağ dokusu yapısında, tunika vaskulosa adı verilen damarsal bir tabaka yer alır. Tunika albuginea testisin arka kısmından testis içine girerek mediastinum testis olarak adlandırılan vertikal bir bölme oluşturur. Mediastinum testisin ön ve yan kısımlarından çıkan uzantılara septula testis adı verilir ve bu uzantılar tunika albugineanın iç yüzünden fibröz septalar çıkararak testisi piramit şekilli ve yaklaşık 250 adet olan lobüllere ayırır. Bu her bir lobülün içinde seminifer tübül olarak adlandırılan 1-4 adet kıvrımlı yapı bulunur. Seminifer tübüller rete testise açılırlar. Tunika albuginea'nın üzerinde tunika vaginalis yer almaktadır. Tunika vaginalis; tunika albuginea ve tunika vaskulosa ile sarılmıştır. Bu üç tabakaya testis kapsülü denir ve testis kapsülü sempatik ile parasempatik uyarılara yanıt vererek spontan kasılmalar yapar (22, 23).

Testisin ana damarı, sağ ve sol arteria testicularis denen aortanın ön yüzünden ve böbrek arterinin yaklaşık iki-üç cm altından çıkan testiküler arterdir. Her bir testisin arka tarafından küçük venler çıkarak birleşirler ve plexus pampiniformis'i meydana

getirirler. Plexus pampiniformis'i oluşturan venler çoğunlukla iç kasık halkası seviyesinde birleşerek vena testicularis'i oluştururlar. Sağ testiküler ven vena cava inferior'a; sol testiküler ven ise v. renalis sinistra'ya açılır (20, 23).

Damarları takip ederek testise ulaşan ve tunika albuginea' nın dışında dallara ayrılan sempatik postganglionik ve visseral afferent sinirler testis innervasyonunu sağlamaktadır. Testis lenfatikleri ise seminifer tübüller etrafında ki lenfatik kapillerlerle interlobüler septadan başlayarak spermatik kordu takip eder ve paraaortik, interaortokaval ve perikaval lenf düğümlerine açılırlar (20, 23).

4.3. Testis Histolojisi

Testisler yaklaşık 1 mm kalınlığında beyaz fibromuskuler yapıdaki tunika albuginea ile sarılı, skrotum içinde ayrı bölümlere yerleşmiş 2 adet oval şekilli organdır. Tunika albuginea sıkı düzenli bağ dokusundan meydana gelmiş fibröz bir membrandır. Tunika albugineanın derin kısmında tunika vaskulosa olarak isimlendirilen kan damarlarından zengin ve daha gevşek bir yapı mevcuttur. Tunika albuginea arka kenarında, parankim içine giren üçgen şekilli bir kalınlaşma meydana getirir ve bu yapı mediastrum olarak adlandırılır. Tunika albuginea dokusu mediastrum testis bölümünde kalınlaşır ve testisi 250 kadar lobüle böler. Her lobülde 1 ila 4 adet, kıvrımlı yapıda ve ana işlevi sperm üretimi olan seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller birkaç hücre tabakasından oluşan epitelle döşelidir. Bu epitelin bazal hücreleri Sertoli hücreleri ve spermatogonium hücrelerinden oluşmaktadır (24).

Sertoli hücreleri spermatozoonların desteklenmesinde ve olgunlaşmasında çok önemli rol oynar. Ayrıca spermatogenetik artık ürünlerini fagosite eder ve kurduğu sıkı bağlantılarla kan-testis bariyerini oluşturur.

Germ hücreleri, spermatogenezden sorumlu olan proliferatif hücrelerdir. İnsanda spermatogonium safhası ile spermatozoa oluşumu arasındaki süreç yaklaşık 64 gündür. Testis kesiti mikroskop altında incelendiği takdirde değişik evrelerdeki germ hücreleri görülebilir (25).

Seminifer tübülleri saran bağ dokusu bol miktarda kan, lenf damarı, sinirler ve Leydig hücreleri olarak adlandırılan intersitisyal hücreleri içerir. Seminifer tübüller

erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, Leydig hücreleri de eozinofilik boyanma özelliği gösteren hücreler olup androjenleri salgılar (26).

4.3.1. Seminifer Tübüller

Spermatozoonların üretim yeri olan seminifer tübüller her iki testiste yaklaşık 250-1000 adet olarak bulunur. Seminifer tübüller intersitisyel hücreleri oluşturan mezenşim ile ayrılmışlardır (19). Seminifer tübül epiteli olağanın dışında, iki tip hücre grubu barındıran çok katlı epitel özelliği sergiler. Bunlar; spermatogenik (germ ya da üreme) hücreler ve çoğalma özelliğine sahip olmayan Sertoli hücreleridir. Seminifer tübüller ayrıca tunika propria olarak adlandırılan fibröz bir bağ dokusu kılıfına sahip olup belirgin bir bazal lamina içerir ve en içte bazal laminaya yapışık olarak düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler bulundurulur. Her bir seminifer tübül yaklaşık 150-250 mikrometre çapında olup 30-70 cm boyundadır ve normal bir testisteki toplam tübül uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Tübüller kıvrımlı yapıda olup uçlarına doğru kıvrımları azaltıp lümeni daraltarak tubuli rekti adını verdiğimiz kısa segmentler haline dönüşür ve bu şekilde rete testise bağlanır. Rete testis mediastinum testiste yerleşik, labirent benzeri boşluklardan oluşmaktadır. Spermiler buradan epididimisin ilk parçası olan ve duktus epididimise açılan 15-20 adet ductuli efferentese geçer. Buradan da epididimin baş kısmına bağlanır (19, 25, 26, 27, 28).

4.3.2. Seminifer Tübül Epiteli

Seminifer tübül epiteli, destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ve spermatogenetik hücreler olmak üzere iki tip hücreden meydana gelmektedir (29).

4.3.2.1. Sertoli Hücresi

Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerin hücresel yapısının %10-15'ini oluşturan ve testislerin işlevi açısından oldukça önemli hücrelerdir. Bu hücreler bölünme yeteneği olmayan, seminifer tübülün bazal kısmından lümene doğru uzanarak spermatogenez serisindeki hücreleri saran uzun piramidal destek hücreleridir. Sertoli hücresinin

sınırları ışık mikroskobu altında, spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda uzantı olması nedeniyle iyi belirlenemez. Ancak elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda çok sayıda düz endoplazmik retikulum, az granüllü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi kompleksine ve çok sayıda mitokondri ile lizozoma sahip oldukları gösterilmiştir. Sertoli hücreleri, belirgin ancak düzensiz nükleolusları ile germ hücre elemanlarından ayrılır. Yan yana bulunan Sertoli hücreleri puberte çağındayken, hücrenin alt yan yüzlerinde engelleyici sıkı bağlantılarla birbirlerine tutunarak kan-testis bariyerini oluştururlar. Bu bariyer, kandan gelen makromoleküllerin lümen içerisine geçişini önler. Bu hücreler ayrıca; spermatogenezin düzenlenmesinde rol alan androjen bağlayıcı protein (ABP), transferrin, büyüme hormonu (growth hormone, GH), seruloplazmin ve inhibin gibi pek çok maddenin sentezini de yaparlar (27, 30).

4.3.2.2. Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik hücreler seminifer tübüllerde, 4-8 tabaka halinde düzenlenmiş bazal lamina ile lümen arasına yerleşmiş hücre serileridir. Bu hücreler bazal laminadan lümeneye doğru; spermatogoniumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar şeklinde sıralanmıştır. Bu germ hücreleri ontojenik olarak farklı hücre tipleri değildirler, ancak germ hücreleri birbirini izleyen evrelerde devamlı bir değişim içerisinde (31).

4.3.3. Spermatogenez

Spermatogenez, pubertedeki ilkel germ hücreleri olan spermatogoniumların büyüyüp bir takım mitoz ve mayoz bölünmeler geçirerek spermatozoonları oluşturduğu süreç olarak tanımlanır (26). Spermatogoniumlar bazal laminanın hemen üstünde yer alan yaklaşık 12 mm büyüklüğündeki hücrelerdir. Cinsel olgunluk çağına giriş ile birlikte spermatogonium hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlayarak yeni hücreler oluşturur (27). Oluşan bu yeni hücreler 2 şekilde gelişimlerini devam ettirebilirler. Birinci tip bölünmeyi sürdürebilecek kök hücreler olarak görev yapan A tipi spermatogoniumlar, ikinci tip ise farklılaşmaya devam ederek spermatozoa oluşumunu sağlayan B tipi spermatogoniumlardır. B tipi spermatogoniumlar

farklılaşarak primer spermatositleri oluştururlar. Bu işlem adolesan çağında oluşmaya başlayan primer spermatositler 46 kromozom (44+ XY) ve 4N DNA içerir. Bir sonraki aşamada birincil spermatositler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler ve içerdikleri kromozom ve DNA sayısını azaltırlar. Spermatositlerin bu formuna sekonder spermatosit adı verilir. Bu hücreler 23 kromozom (22+X veya 22+Y) ve 2N DNA içerirler. Bir sonraki bölünmede ise sekonder spermatositler 23 kromozomlu spermatidleri oluşturur. Spermatidlerin olgunlaşmasıyla spermatozoonlar (sperm) oluşur. Spermatozoonlar farklılaşma sırasında mitoz ve mayoz bölünme geçirip olgunlaşırken, tübüllerin lümenine doğru göç eder. Sertoli hücreleri tarafından koordine edilen bu işlem 64-74 günde gerçekleşir ve yaşam boyu devam eder (32).

4.3.4. Spermatozoa

Olgun sperm baş ve kuyruk olmak üzere temelde iki elemandan oluşur. Baş kuyruğa bir bağlantı parçasıyla bağlıdır. Baş akrozom tarafından sarılmış çekirdekten meydana gelir. Yassılaştırmış yoğun bir yapıda olan çekirdeğin ön yarısını akrozom örter. Akrozom yapısında, bol miktarda proteaz, asit fosfataz, hiyaluronidaz ve nöraminidaz gibi hidrolitik enzimleri içerir. Akrozom genellikle özel tip lizozom olarak ifade edilir. Akrozomal enzimler, döllenme esnasında spermin oositi saran korona radiata ve zona pellusidayı aşarak oosite girişini kolaylaştırmak için salınır.

Kuyruk orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 3 parçaya ayrılmıştır. Bağlantı parçası dar bir parça olup bir çift sentriyol barındırır. Sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksoneme kaynaklık yapan sentriyol distal sentriyoldur.

Kuyruğun orta parçası sarmal olarak dizilen mitokondriyonların meydana getirdiği tabakadır. 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler olarak adlandırılan sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan 9 uzunlamasına seyreden kolonlardan oluşur. Esas parça 7 dış yoğun lifçe sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşmuş kuyruğun en uzun parçasıdır. Eş uzaklıktaki uzunlamasına kolonlardan çıkan dairesel iskelet tarafından oluşturulmuş fibröz kılıf ve dış yoğun lifler spermin öne hareketi esnasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan keratin içerir. Son parça ise kuyruğun en kısa parçası olup dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı yalnızca aksonem bulundurur (25, 27, 33).

4.3.5. Seminifer Epitel Döngüsü

Sağlıklı erişkin bir erkekte spermatogenez sürecinin tamamlanması yaklaşık olarak 64 gün sürmektedir. Buna rağmen sürekliliğinin olması spermatogenezin seminifer tübüllerde ve her seminifer tübülün kendi içerisinde aynı zamanda uyumlu olarak gerçekleşmemesinden kaynaklanır. Bu nedenle; bir tübül kesitinin farklı alanlarında ya da farklı tübül kesitlerinde, spermatogenezin farklı aşamaları görülebilmektedir. Bu durum seminifer epitel döngüsü olarak adlandırılmaktadır (27).

4.3.6. İntersitisyel Alan ve Leydig Hücreleri

Testis dokusunun %25-30'unu oluşturan intersitisyel alan, androjen üretimi açısından çok önemlidir. Testislerde seminifer tübüller arasındaki boşluklar Leydig hücreleri, kan damarları, lenfatikler, sinirler, makrofajlar ve mast hücrelerini ihtiva eder. Ergenlikte, çekirdeği merkezde, yuvarlak ya da çokgen şekilli ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik sitoplazması bulunan başka bir tip hücre daha işlevsel hale gelir. Bu hücreler Leydig hücreleri olarak adlandırılır. Bunlar, görevi testosteron üretimi olan hücrelerdir. Testosteron, LH tarafından salgılanan sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonudur (30).

Spermatogenez döngüsü hipofizden salgılanan FSH ile LH'nin testis üzerindeki etkileriyle bağlantılıdır. LH, Leydig hücrelerini etkiler ve testosteron yapımını uyarak normal spermatogenik hücrelerin gelişimini sağlar. FSH ise Sertoli hücrelerini etkiler ve adenilat siklazı uyarak siklik adenozin monofosfat artışını gerçekleştirir. Bunların sonucunda da androjen bağlayıcı protein sentezi ve salgısı artar. Androjen bağlayıcı protein ise testosteronu bağlayarak seminifer tübül lümenine taşınmasını sağlar (27, 30, 34).

Leydig hücreleri karakteristik olarak tübüler kristal mitokondrionlar ile gelişmiş bir granülsüz endoplazmik retikulum içerir ve genellikle kapiller damarlara yakındırlar. Bu hücrelerin sitoplazmasında sadece insanlarda ve sıçanlarda görülen Reinke kristaloidleri de görülmektedir. Puberte ile birlikte görülmeye başlayan, yaşlılıkta ve infertilite vakalarında sayıları artan bu oluşumların fonksiyonları bilinmemektedir (29).

4.4. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

4.4.1. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektronun olduğu atom veya atom grupları serbest radikaller olarak adlandırılır (35). Serbest radikal molekülünün kararsız konumda bulunma nedeni eşleşmemiş elektrondur ve kararlı yapı kazanabilmesi için elektronunu başka bir elektronla eşleştirmesi gerekir. Serbest radikalın kimyasal aktivite potansiyelinin yüksek olması bu nedenledir. Oluşan oksidan ürünlerin arttığı durumlarda hedef moleküller olan membran yapısındaki fosfolipidler, glikolipidler, membran proteinleri ve doymamış yağ asitleri oksidatif strese maruz kalırlar ve bunun sonucunda metabolik bozukluklar, hücre hasarı ve hatta ölüme neden olurlar (36, 37).

Reaktif oksijen ve nitrojen türleri ile antioksidan sistem arasındaki dengenin oksidan yönde bozulması oksidatif strese neden olur. Oksidatif hasar aslında doğal bir süreç olan oksidatif stresi kontrol altında tutan özelleşmiş mekanizmaların yetersizliği durumlarında oluşur (38).

Serbest radikaller bağışıklık sistemine saldıran moleküllerdir. Antioksidanlar ise bu serbest radikallerin etkilerini nötralize eden, kanser, kalp hastalıkları ve erken yaşlanmaya neden olabilecek reaksiyonları engelleyen moleküllerdir. Organizmalar tarafından hücre içinde mitokondriyal solunum zincirinde ya da hücre dışında özellikle fagositler tarafından oluşturulan serbest radikaller; temel olarak oksijen kaynaklı metabolitler (süperoksit anyonları, hidrojen peroksit, hidroksil radikali), hipoklorik asit, kloraminler, azot dioksit, ozon ve lipid peroksitlerdir (36).

Biyolojik yapılar içinde reaktif oksijen ürünlerinin toksik etkilerine en duyarlı yapılar lipidlerdir. Hücre membranında bulunan ve membran akışkanlığını sağlayan çoklu doymamış yağ asitleri ile serbest oksijen ürünleri, yüksek oranda tepkimeye girerek peroksidasyon meydana getirirler. Doymamış yağ asitlerinde oluşan hasar membran akışkanlığında azalma olmasına neden olur. Lipid peroksidasyonu sırasında biyolojik yapılardan kolayca tespit edilebilen ve peroksidatif hasarın belirteci olan malondialdehit (MDA) oluşur (39).

4.4.2. Antioksidan Sistem

Antioksidanlar, canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelerdir. Antioksidanlarda serbest radikal tarafından oluşturulan hasar durumlarında devreye giren savunma sistemleri bulunmaktadır (36). Organizmada sentezlenen (endojen) veya dışarıdan alınan (eksojen), oksidan molekülerin hücreye zarar vermesini önleyen antioksidan moleküller enzimatik veya nonenzimatik yapıdadırlar (40).

Enzimatik antioksidanlara, Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon-S-transferazlar örnek verilebilir.

4.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, oksidatif strese karşı savunmayı ilk olarak başlatan tepkime olan O_2^- anyonunun H_2O_2 'ye dismutasyonunu gerçekleştiren enzimdir (41). Bu tepkime sonucunda oluşan ürünlerin H_2O 'ye detoksifikasyonu, lizozomlardaki CAT tarafından veya mitokondrideki GSH-Px tarafından gerçekleştirilir (42).

4.4.2.2. Katalaz (CAT)

CAT, H_2O_2 'nin yüksek yoğunlukta olduğu durumlarda yüksek aktivite gösteren ve H_2O_2 'yi suya dönüştüren glikoprotein yapıdaki bir hemoproteindir (42, 43).

4.4.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon Redüktaz (GR)

GSH-Px, yapısında selenyum metali bulunan ve H_2O_2 'yi suya çeviren bir metalloenzimdir. Bunun yanı sıra redükte glutasyonu okside glutatyona dönüştürür. GR ise oluşan okside glutasyonun NADPH kullanılarak yeniden redükte glutatyona dönüştürülmesini sağlar (44). GSH-Px aktivitesi ortamda bulunan H_2O_2 oranına göre değişir.

Nonenzimatik antioksidanlara ise vitamin E, vitamin C, koenzim Q10, beta karoten, serüloplazmin, transferrin, melatonin ve glutatyon örnek olarak verilebilir (42, 45, 46, 47).

4.4.3. Serbest Radikaller ve Testis Hasarı

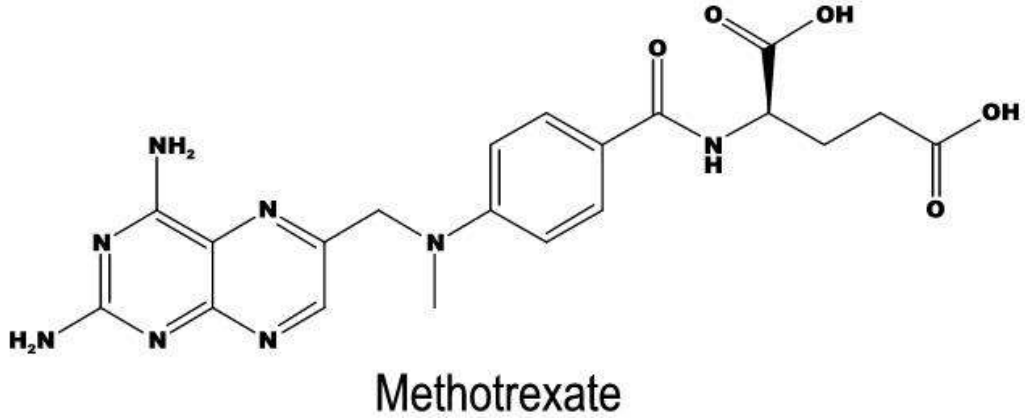
Reaktif oksijen türleri (ROS) serbest radikal sınıfına ait yüksek düzeyde oksitlenen reaktif bileşiklerdir. Karaciğer ve testis gibi çeşitli organlarda ROS üretimi normal fizyolojik bir olaydır. Testis gibi kan damarları açısından zengin bir organda kanla taşınan toksik maddelerin oksidan-antioksidan sistem arasındaki dengeyi dokuların aleyhine değiştirmesi olasıdır. Bu durumda artan serbest radikaller, testiste doku hasarına yol açar. Ayrıca oksidatif stresin spermatozoa fonksiyonlarını bozduğu ve anormal spermatozoa üretimine yol açtığı bilinmektedir. Bununla birlikte ROS sentezindeki artış hücrelerde oksidasyona ve DNA hasarına yol açmaktadır (48).

ROS'un düşük miktarlarının, sperm kapasitasyonu, spermin oositi dölleyebilme yeteneği kazanabilmesi ve akrozom reaksiyonu için gerekli olduğunu belirten çalışmalarda literatürde yer almaktadır. Fakat aşırı miktardaki ROS spermatozoa ve seminal plazmanın antioksidan kapasitesinin bozulmasına yol açmaktadır. Yine spermatozoada oksidatif stres sperm motalitesinde düşüklüğe ve sperm canlılığında azalmaya neden olduğundan dolayı erkek infertilitesi ile yakından ilişkilidir (49, 50).

4.5. Methotrexate

4.5.1. Etki Mekanizması

Kimyasal yapısı aşağıdaki gibi olan MTX antimetabolit grubunun halen kullanılmakta olan tek formudur. Folik asidin 4-amino-N¹⁰ – metil analogudur (3).



Şekil 1. MTX'in Kimyasal Yapısı, (3).

Dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eden MTX, DNA, RNA ve ATP sentezinde gerekli olan tetrahidrofolat (THF) sentezini durdurarak timidilat, pürin nükleotidleri ve aminoasitlerin sentezinde azalmaya neden olur. Böylece nükleik asid ile protein metabolizmasını önler (51).

MTX, hücre bölünmesini inhibe ettiği için uzun süredir kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik bir ilaçtır. MTX düşük dozlarda oral olarak alındığında büyük oranda böbrekler tarafından emilime uğrar ve hücrelere aktif taşıma yoluyla girer (5, 52).

4.5.2. Endikasyonları

MTX, romatizmal hastalıklardan kanser metastazına kadar oldukça geniş etki mekanizmasına sahip olan bir kemoterapiktir. MTX bunun yanı sıra çocuklarda ve erişkinlerde lösemi tedavisinde, meningeal karsinomatozis tedavisinde, karyokarsinomada kullanılan ve tedavilerinde oldukça etkili olan bir ilaçtır. Ayrıca astımla ilgili yapılan klinik bir çalışmada, MTX kullanımının semptomların şiddetinde hafifleme meydana getirdiği gösterilmiştir (53, 54, 55). MTX göğüs, baş-boyun, ovaryum ve mesane kanserinde kullanılan tedavi rejimlerinde de yerini almıştır. Lökoverin kurtarma tedavisi ile birlikte uygulanan yüksek doz MTX, osteosarkomun adjuvan tedavisinde kullanılan standart protokolün bir parçasıdır (56).

Ancak MTX'in en önemli kullanım yeri ise Akut Lenfositik Lösemidir (ALL) (3). Uzun süreli kanser tedavilerinde erişkin yaşa kadar ulaşan çocuklarda gonad fonksiyonuna bu tedavi sürecinin çok önemli etkileri bulunmaktadır (57).

4.5.3. Yan Etkileri

MTX'in yan etkileri nedeniyle ilk 5 yılda ilacın kesilme olasılığı %20'dir. MTX'in yaygın yan etkileri kemik iliği supresyonu, cilt ile gastrointestinal mukozada meydana gelen hasar ve germ hücreleri üzerine yapmış olduğu etkilerdir (5, 51). Ayrıca MTX tedavisi karaciğer fonksiyonları üzerine de etkide bulunabilir. Lösemi, psöriazis ve romatoid artrit tedavisi sırasında hepatotoksisite gelişebilir. Nükleer polimorfizm, hepatosit nekrozu, kronik portal inflamasyon, fibrozis ve siroz gibi patolojik lezyon ve durumlar gözlenir. Bu karaciğer hasarı mekanizması tam olarak anlaşılamamakla birlikte intrasellüler MTX poliglutamat birikimi ve folat azalmasının sorumlu olabileceği düşünülmektedir (58).

4.5.4. MTX ve Testis Hasarı

Kanserli erkek hastalarda tedavi sonucu hasar gören fertilité önemlilikle üzerinde durulması gereken bir durumdur. Kemoterapi sonucu artan serbest radikaller testis dokusunda hasara neden olmakta ve spermatogenezi olumsuz yönde etkilemektedir. Buna yönelik olarak Işık ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada MTX'in seminifer tübül membranında kalınlaşmalara neden olduğu, germ hücrelerinde maturasyon ve sıralanma bozukluğu olduğu ve lümende spermatozoa azlığı ya da yokluğu ifade edilmiştir (5). Koehler ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ise tavşanlarda kullanılan MTX'in tübüler bazal membranda kalınlaşmalara neden olduğu, spermatogonium sayısında azalma olduğu ve var olan spermatogoniumlarda şişme meydana geldiği ifade edilmiştir (57). Modi ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ise MTX'in insan gonadlarında apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (59). Bayram ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada ise ratlarda kullanılan MTX'in oogenez ve spermatogenezde bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir (13).

4.6. Shilajit (PS)

Son birkaç yıldır, doğal ürünlerin tıbbi özellikleri üzerinde ki araştırmalar önemli ölçüde artmıştır. PS’de bu alanda araştırma konusu olan doğal ürünlerden biridir. PS aynı zamanda salajit, shilajatu, mumie ya da mummiyo olarak bilinen özellikle Hindistan yarım adasındaki Himalaya ve Hindikus dağ dizilerinde ayrıca dünyadaki birçok dağ dizisinin 0.6 km ile 5 km arasında ki yüksekliklerinde olmak üzere kaya katmanlarından sızan değişken kıvam gösteren organik bileşikler, mikrobiyal metabolitler, kaya humuslarını ve minerallerini içeren soluk kahverengi-siyahımsı bir sıvıdır. Bitki ve organik humuslu maddelerin kompleks bir karışımından oluşmaktadır. Binlerce yıldır özellikle Rusya, Altay Dağları’nda, Moğolistan, İran Kazakistan ve Kırgızistan’da ayurvedik tıp sistemlerinin bir parçası olarak yenileyici ve adaptojen şeklinde kullanılmaktadır. Ayrıca modern bilimsel değerlendirmeler bakımından da doğrulanan birçok iyileştirme özelliği bulunmaktadır (14, 15, 17, 60).

PS eski zamanlardan beri, hastalıkların giderilmesi, yaşlanmanın yavaşlatılması ve farmakolojik aktivitenin sağlanması için kullanılan geleneksel bir ilaçtır. 3000 yıllık antik yazıtlar, PS’nin Vaidyas ve Hakims tarafından uzun süre kullanıldığı ve eşsiz bir yere sahip olduğu gösterilmektedir.

Geçmişten günümüze en geniş kapsamlı tıp eserlerinden olan Caraka Samhita’da, PS’nin bütün hastalıkların tedavisinde kullanılabilir olduğu ve 4 farklı çeşidinin bulunduğu belirtilmiştir. Bunlar; savrana, rayat, tamra ve lauhadır. Savrana kırmızı renkteki altın PS, tamra mavi renkteki bakır PS, lauha PS kahverengi- siyah renkte olup yapısında demir içerdiğinden beyaz renkte görülür ve tamra PS ise gümüş PS olarak adlandırılır. Bu PS tiplerinden tamra, sarvana ve rajat çok nadir bulunup, bugün kullanılan PS türü lauha PS’dir (14, 15).

Binlerce yıldır yerel tıp ilacı olarak kullanılan bu maddenin tadı acıdır ve kokusu bir ineğin bayat idrarının kokusunu andıran bu madde genital hastalıklar, diyabet, sindirim sistemi hastalıkları, sinir sistemi hastalıkları, tüberküloz, kronik bronşit, astım, anemi, egzema ve kemik hastalıklarının tedavisinde kullanılır (15, 60).

4.6.1. Kimyasal Bileşenleri

Dünyanın farklı yerlerinden alınan PS örnekleri benzer fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmalarına rağmen tek tek bileşen oranları farklıdır. PS, %60-80 oranında humuslu organik maddeden oluşurken, %20-40 oranında da mineral maddeler içerir. PS'nin önemli bir oranını oluşturan organik bileşikler; biyoaktif oksijenlenmiş dibenol-alfa-pironlar, fenolik lipidler ve küçük tannoidlerdir. Kimyasal analizler bu maddenin zambak, albuminler, yağ asitleri, büyük oranda benzoik ve huppiric asit ayrıca bunların tuzlarını içerdiğini göstermiştir. Tıbbi açıdan en baştaki aktif madde ise benzoik asit ve benzoatlardır (60, 15).

4.6.2. Etkisi

PS kullanılarak gastrik ülser tedavisi yapılmış ve gastrik ülser endeksinde azalma ayrıca mukus bariyerinde artış görülmüştür. Aynı zamanda PS'nin akut, subakut ve kronik olan 3 tip inflamasyonda güçlü bir antiinflamatuvar etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur (61).

İşlenmiş PS ile işlenmemiş PS'nin antioksidan ve C vitamini özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada işlenmemiş PS'nin sürekli olarak antioksidan aktivite sergilemediği, buna rağmen işlenmiş PS'nin yüksek konsantrasyonlarının yüksek serbest radikal koruması sağladığı görülmüştür (62, 63). Sıçan karaciğeri ile yapılan bir diğer çalışmada ise, PS'nin karaciğer homojenatlarında lipid peroksidasyon ve glutatyon içeriği araştırıldı. Yapılan bu çalışmada PS'in lipid peroksidasyon seviyesinde azalma meydana getirdiği gösterilmiştir (64).

PS'nin antidiyabetik aktivitesinin araştırılmış olduğu streptozotosin uygulamasına bağlı olarak oluşturulan deneysel diyabet çalışmasında erkek ratlar pankreas ada hücrelerinde süperoksit dismutaz aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. Streptozotosin uygulamasına bağlı olarak oluşan hiperglisemide artan süperoksit dismutaz seviyesi PS uygulamasıyla beraber istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalmıştır. PS'nin serbest radikal aktivitesini önleyebileceğinin öngörüldüğü bu çalışmaya göre diyabet gelişiminde PS koruyucu olabileceği düşünülmektedir (65).

PS ve aktif elemanları ile mast hücrelerinin antijen özelliği üzerine yapılan bir çalışmada PS'nin önemli derecede koruma etkisi sağladığı ve alerjik hastalıkların tedavisinde PS'nin teropatik kullanımı ile uyumlu olabileceği gösterilmiştir (66).

PS'nin immunomodüler aktivitesinin araştırılması için yapılan bir çalışmada PS uygulanan farelerde beyaz kan hücrelerinin aktivitesinde artış meydana geldiği ve gözlenen aktivitenin shilajit ekstraktının dozuyla orantılı olarak arttığı belirlenmiştir (67). Ratlarda beyin monoamin seviyeleri üzerine PS'nin etkisinin araştırıldığı bir başka immunomodüler aktivite çalışmasında PS'nin dopamin, noradrenalin ve onların metabolit seviyelerinde artışa neden olduğu belirtilmiştir. Nörotransmitter madde seviyesinde ki bu değişimin artan immun aktiviteye işaret olabileceği ve bundan dolayı da PS'nin ayurvedik rasayana olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (68).

Park ve arkadaşları tarafından yapılan kronik PS uygulamasının spermatogenik ve ovogenik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada testis ve epididimisteki sperm sayısının uygulama yapılan grup ile kontrol grubu kıyaslandığında hatırı sayılır derecede arttığı ifade edilmiştir. Kalp, karaciğer, böbrek, beyin, testis ve epididimis gibi çeşitli organların ağırlıkları alınmış ve kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Ayrıca dişi sıçanlarda ovulasyon aşamaları izlenmiş ve PS uygulamasına bağlı olarak oositlerde çoğalma ve farklılaşmanın arttığı ve buna ek olarak PS'nin ovulasyon frekansını artırdığı belirtilmiştir. Histopatolojik olarak ise PS'nin testiste herhangi bir patolojiye neden olmadığı, normal yapıda Sertoli ve Leydig hücreleri gözlemlendiği, ayrıca normal seminifer tübül yapısının korunduğu belirtilmiştir (16).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Deneysel Çalışma Aşaması

5.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra başlandı (Tarih: 15.01.2013, Sayı: 5). Çalışmada, erişkin 6 haftalık ve 150-200 gram ağırlığında Sprague Dawley cinsi 24 adet erkek sıçan kullanıldı. Çalışma grubunu oluşturan sıçanların tamamı KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlandı. Çalışma süresince sıçanların bakımı, beslenme ve barınması için KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde bulunan sıçan takip odaları kullanıldı. Deney için kullanılan sıçanların tamamı Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edildiği için çevre stresi ve uyum problemi yaşanmadı.

5.1.2. Laboratuvar Koşulları

Deney süresince laboratuvarın sıcaklığı 22 ± 2 °C, nisbi nem ortalama $\%50 \pm 5$ olarak ayarlandı. 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatılma sağlandı. Sıçanlara içme suyu olarak çeşme suyu verildi ve standart sıçan yemi ile beslendi. Çalışma süresince sıçanların barındırılmasında standart Tip III kafesleri kullanıldı (Resim 1).



Resim 1. Tip III Kafesler

5.1.3. Deneyisel Çalışma Planı

Çalışmada Spraque Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. 24 adet sıçan ağırlıklarına göre rastgele, her bir grupta 6 sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Grupların özellikleri ve çalışma sırasında gruptaki sıçanlara uygulanan işlemler şu şekildedir (Tablo 1).

1.Kontrol grubu (n:6) : Herhangi bir uygulama yapılmadı.

2.MTX grubu (n:6) : deney süresinin ilk gününde (0. Gün)Tek doz i.p. 20mg/kg MTX verildi (Resim 2).

3.MTX + PS grubu (n:6) : Deney süresinin (7 gün) ilk gününde (0. Gün) tek doz i.p. 20mg/kg MTX verilmeden 15 dk önce 2ml/kg distile suda 100mg/kg PS çözülerek gavaj yoluyla verildi (Resim 3). 0. günü takip eden gün aşırı günlerde sıçanlara toplamda üç kez olacak şekilde 2 kez daha 2ml/kg distile suda 100mg/kg PS çözülerek gavaj yoluyla verildi.

4. PS grubu (n:6) : 0. Gün ve akabindeki gün aşırı günlerde toplamda üç kez olacak şekilde sıçanlara 2ml/kg distile suda 100mg/kg PS çözülerek gavaj yoluyla verildi.

Tablo 1. Çalışma Grupları ve Özellikler

Gruplar	Uygulama	Denek Sayısı
1. Kontrol Grubu	Herhangi bir uygulama yapılmadı.	6
2. MTX Grubu	Tek doz i.p. 20mg/kg MTX	6
3. MTX + PS Grubu	Tek doz i.p. 20mg/kg MTX + 100mg/kg PS (gavaj yoluyla)	6
4. PS Grubu	100mg/kg PS (gavaj yoluyla)	6

Çalışmanın deney aşaması ve dokuların elde edilmesi işlemlerinin tümü KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde özel olarak hazırlanmış hayvan takip ve cerrahi müdahale odalarında gerçekleştirildi. Uygulamalar aynı saatler arasında(Saat: 09.00-10.00) yapıldı. Deney süresinin bitiminde sıçanlar abdominal aorta makasla kesilerek kansızlaştırma yoluyla sakrifiye edildi.



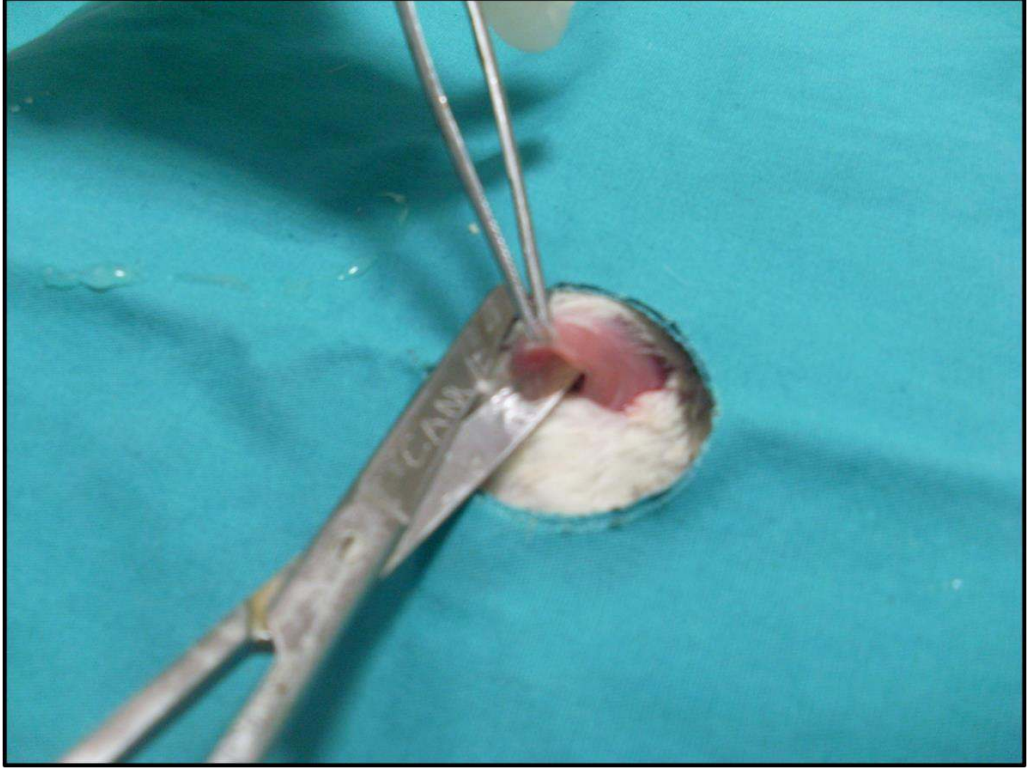
Resim 2. Sıçanlara İntraperitoneal MTX Verilmesi



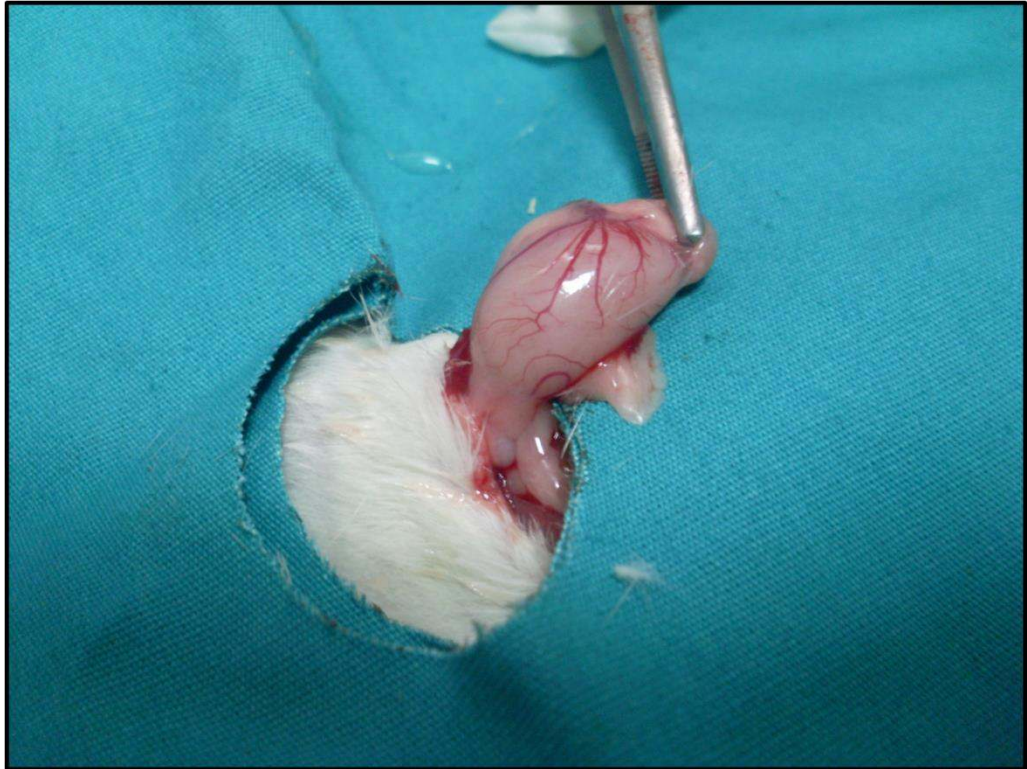
Resim 3. Sıçanlara Gavaj Yoluyla PS Verilmesi

5.1.4. Doku Örneklerinin Toplanması

Tüm hayvanlar deney süresinin bitiminde derin anestezi (Ketalar 50 mg/kg) altındayken hayvanların karın bölgesi açılarak testisleri çıkarıldı (Resim 4, 5). Çevre dokularından iyice temizlenen sol testisler hassas terazide tartıldı, kayıt altına alındıktan sonra vertikal olarak 2'ye bölündü. Testislerin yarısı histolojik incelemeler için Bouin tespitine alındı.



Resim 4. Hayvanların Karın Bölgelerinin Açılması



Resim 5. Testislerin Çıkarılması

5.1.5. Bouin Tespitinin Hazırlanışı

Dokuların tespitinde kullanılacak bouin solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı;

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

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

5.1.6. Işık Mikroskobu için Dokuların Hazırlanması

Dokuların takip, kesit alma ve boyanma işlemlerinin tümü KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Bouin solüsyonuna alınan testisler 3 gün ışık almayan kuru ortamda oda sıcaklığında saklandıktan sonra aşağıdaki aşamalardan sırasıyla geçirilerek parafin blok haline getirildi.

1. % 70'lik alkol..... 1 gün
2. % 90'lık alkol 1 gün
3. % 96'lık alkol 1 gün
4. % 100'lük alkol 1 gün
5. % 100'lük alkol 1 saat (1 kez)
6. Ksilen 5 dakika (3 kez)
7. Dokular eritilmiş parafin içerisinde 58 °C'de etüvde 3 kez 15 dakika bekletildi ve sonrasında tekrar etüv içerisinde 2 saat bekletildi.
8. Dokular bloklandı.

5.1.7. Kesitlerin Alınması

Kesitler KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarındaki tam otomatik mikrotom (LEICA RM 2255) yardımıyla dokunun başlangıcına kadar 20 µm'lik kesitlerle trimlendi, dokuya ulaşıncaya 4 µm'lik kesitler

alındı. Alınan kesitler 45°C’de benmari içindeki sıcak su üzerinde kırışıkların açılması bekletildi ve lam üzerine alındı.

5.1.8. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

Kesit alma işlemi tamamlandıktan sonra lam üzerine alınan dokular Hematoksilen&Eozin boyaması için zembile yerleştirildi. Parafinin erimesi için 1 saat 58°C’lik etüvde bekletildi ve sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi:

1. Ksilen 5 dakika
2. Ksilen 5 dakika
3. %100’lük alkol 5 dakika
4. %96’lık alkol 5 dakika
5. %70’lik alkol 5 dakika
6. Distile su 2-3 dakika
7. Hematoksilen 35 saniye*
8. Musluk suyu 5 dakika
9. Asit alkol 1kez batırılıp çıkartılır
10. Distile su 1 dakika
11. Amonyaklı su 10 saniye
12. Distile su 1 dakika
13. Eozin 30 saniye
14. Distile su 1 dakika
15. % 70’lik alkol 5 dakika
16. % 96’lık alkol 5 dakika
17. %100’lük alkol 5 dakika
18. Ksilen 5 dakika
19. Ksilen 5 dakika
20. Entellan ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlarda seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Stereoloji Laboratuvarında bulunan Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Japan) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak

hesaplandı. Seminifer tübüldeki spermatogenetik hücreler ve interstisyel alan, yine aynı mikroskopta incelendi ve fotoğrafları çekilerek dijital ortama aktarıldı.

5.2. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 13.1, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Her bir gruba ait sayısal veriler ortalama±standart sapma (SS) olarak verildi ve Kruskal Wallis varyans analizi (post hoc olarak Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi) ile karşılaştırıldı. Tüm karşılaştırmalarda $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Bulgular

Kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların vücut ağırlıkları ile testis ağırlıklarının karşılaştırılması tablo 2’de verilmiştir. Elde edilen istatistiksel verilere göre kontrol grubuna ait sıçanların vücut ve testis ağırlıkları diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Tablo 2. Deney Gruplarının Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar

GRUPLAR	Vücut Ağırlığı (gr)	Testis Ağırlığı (gr)
Kontrol Grubu	228.17 ± 41.53	1.15 ± 0.23
MTX Grubu	187.17 ± 36.57	1.13 ± 0.20
MTX + PS Grubu	202.33 ± 21.77	1.20 ± 0.32
PS Grubu	216.50 ± 35.17	1.15 ± 0.16

6.2. Morfometrik Bulgular

Deney gruplarına ait seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı ölçüm sonuçları tablo 3’de verilmiştir.

MTX grubunda kontrol grubuna göre seminifer tübül çapında ve seminifer epitel kalınlığında istatistiksel açıdan anlamlı derecede azalma gözlemlendi. MTX+PS grubunun MTX grubuna göre seminifer tübül çapında ve germinal epitel kalınlığında istatistiksel açıdan artış olduğu gözlemlendi. Bu bulgulara ek olarak kontrol grubu ile PS grubu kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 3. Deney Gruplarına Ait Morfometrik Ölçümlerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

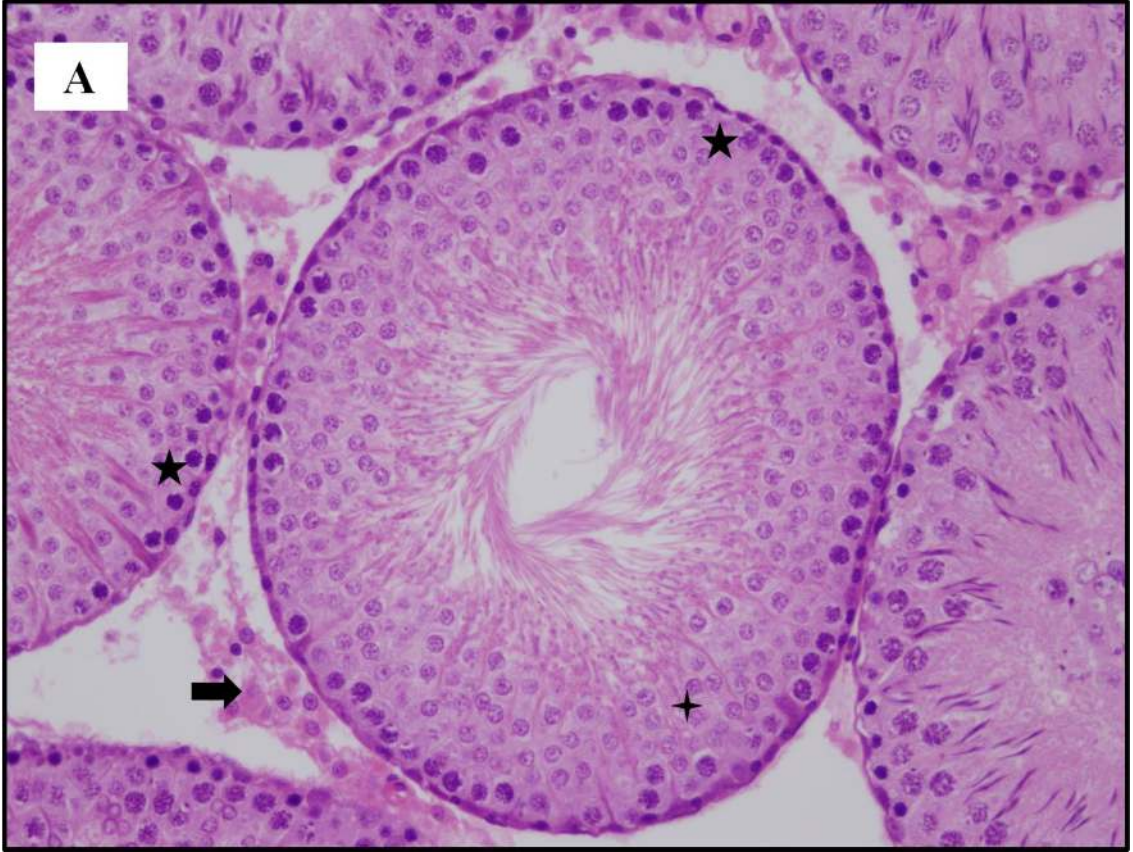
GRUPLAR	Seminifer Tübül Çapı	Germinal Epitel Kalınlığı
Kontrol Grubu	273.72 ± 11.70	107.13 ± 2.79
MTX Grubu	200.77 ^a ± 7.55	71.97 ^a ± 3.65
MTX + PS Grubu	237.94 ^b ± 6.26	96.86 ^b ± 1.72
PS Grubu	263.51 ± 4.79	109.44 ± 4.73

^a: MTX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p<0,04).

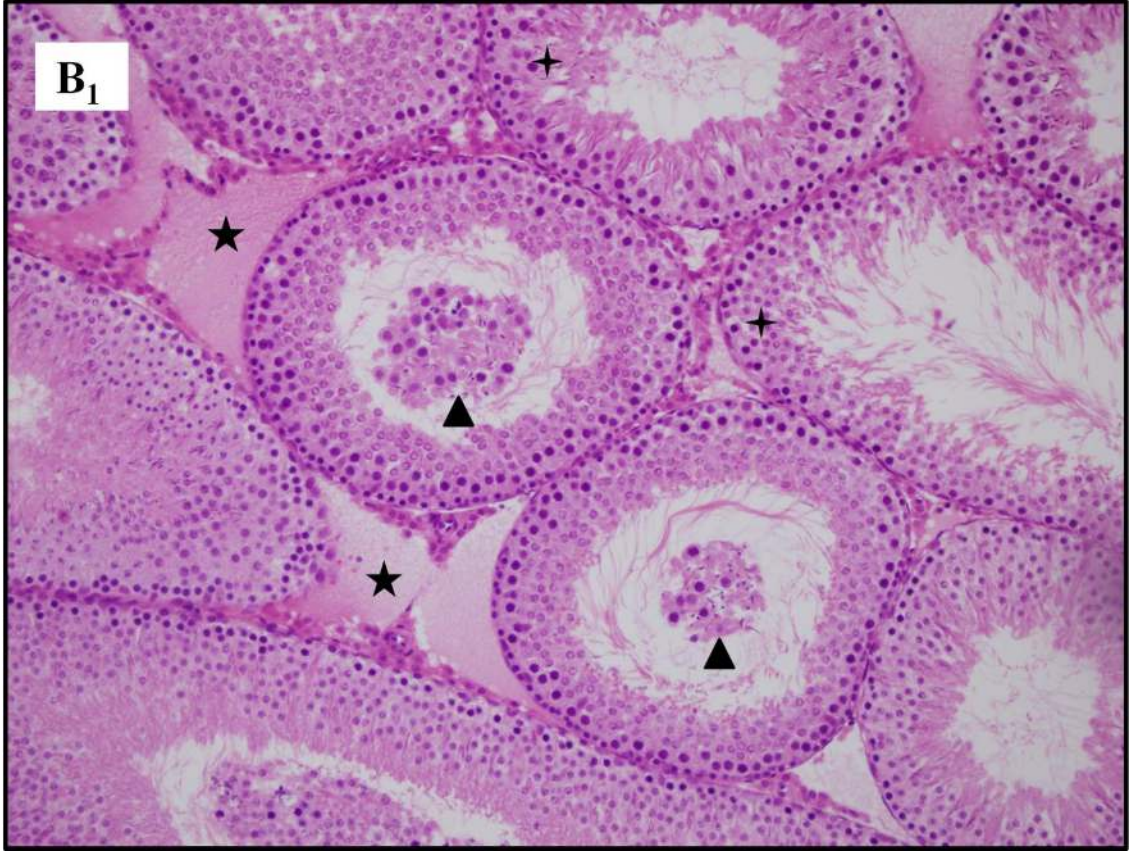
^b: MTX+PS grubundaki değerler MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p<0,04).

6.3. Morfolojik Bulgular

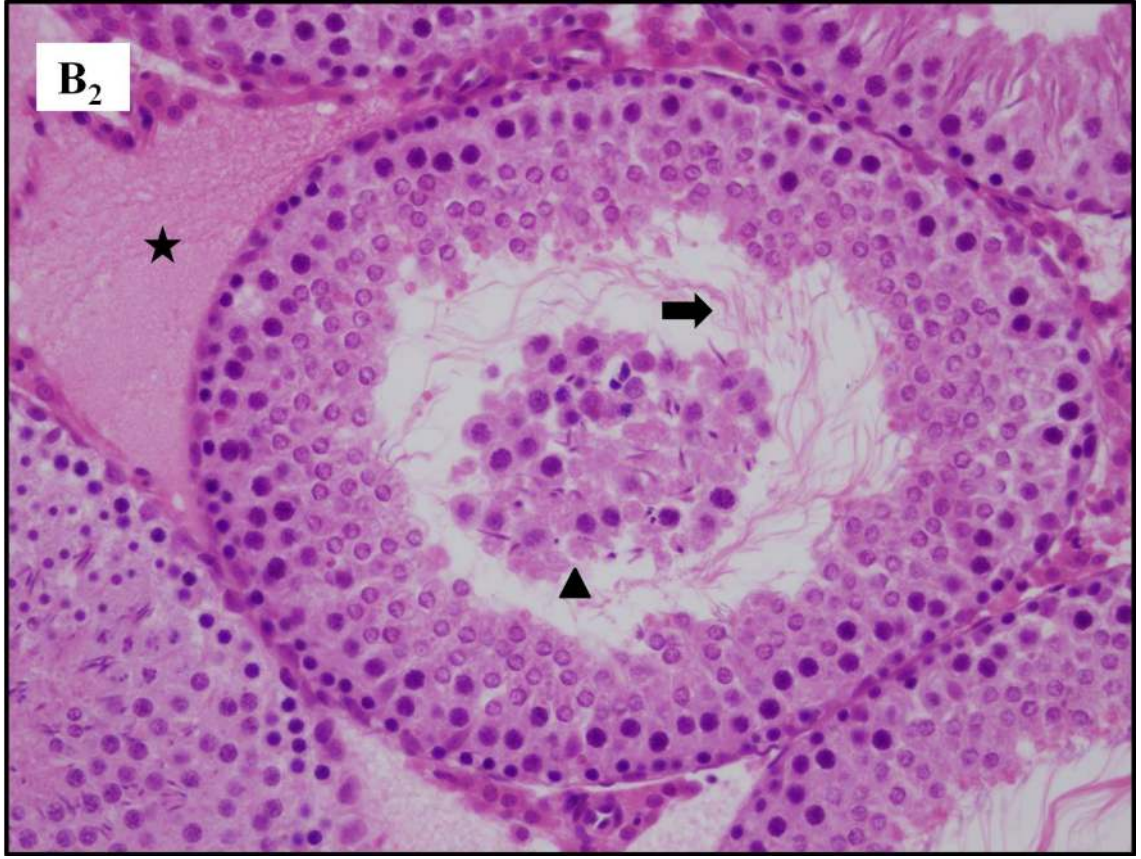
Testis dokusu histolojik olarak incelendiğinde; Kontrol grubuna ait kesitlerde normal yapıda seminifer tübüller, spermatogenik seriye ait hücreler, interstisyel dokuda Leydig hücreleri izlendi ve değerlendirme sonucunda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı (Resim 6). MTX grubuna ait testis kesitlerinde, lümende olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri ve lümende spermatozoa azlığı, seminifer tübül germinal epitelinde düzensizlikler, seminifer tübül bazal membranında düzensizlikler ve interstisyel alanda ödem izlendi (Resim 7, 8). MTX+PS grubuna ait testis kesitlerinde seminifer tübül germinal epitelinde düzensizlik ve lümende germinal epitel hücrelerinin dökülmüş olduğu birkaç tübül dışında herhangi bir patolojiye rastlanmadı (Resim 9). PS grubuna ait testis kesitlerinde ise kontrol grubuna benzer şekilde bir yapı gözlemlendi ve patolojiye rastlanmadı (Resim10).



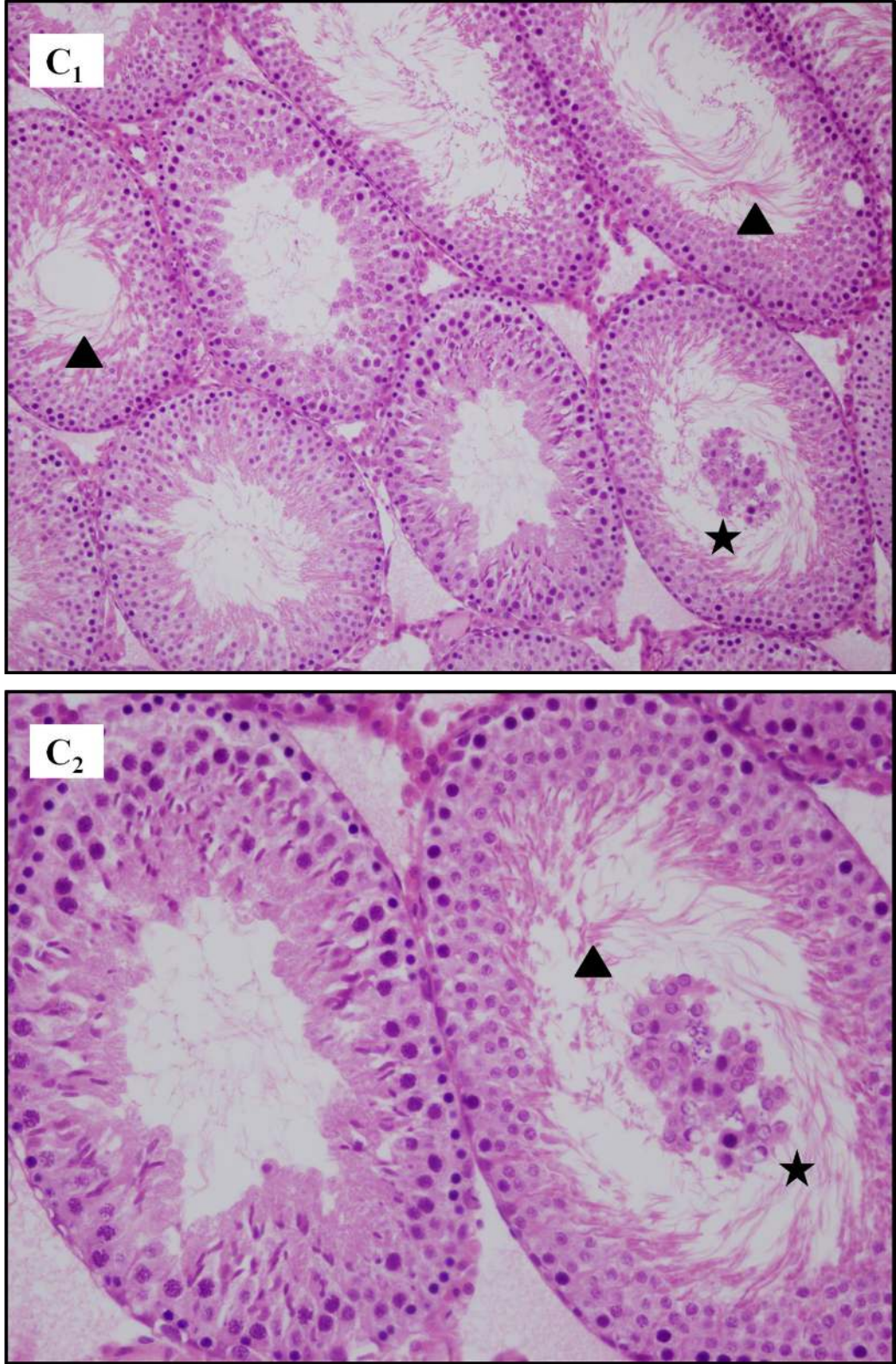
Resim 6. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki testis kesit görüntüsünde, seminifer tübüller (★), spermatogenik seriye ait hücreler (+) ve interstisyel alandaki Leydig hücreleri (➡) izlenmektedir (A; H&E, X400)



Resim 7. MTX grubuna ait testis kesit görüntüsünde, lümende olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri (▲), seminifer tübül germinal epitelinde düzensizlikler (+) ve interstisyel alanda ödem (★) izlenmektedir (B₁; H&E, X200)



Resim 8. MTX grubuna ait testis kesit görüntüsünde, lümende olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri (▲), lümende spermatozoa azlığı (➡) ve interstisyel alanda ödem (★) izlenmektedir (B₂; H&E, X400)



Resim 9. MTX+PS grubuna ait testis kesiti görüntüsü, lümende spermatozoa yoğunluğu (▲) ve az sayıda lümende olgunlaşmamış germinal hücrelerin görüldüğü seminifer tübüller (★) izlenmektedir (C₁, C₂; H&E, X200, X400)



Resim 10. PS Grubuna ait testis kesit görüntüsünde seminifer tübüllerin histolojik yapısının kontrol grubuna benzer olduğu izlenmektedir (D; H&E, X400)

7. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Bir folat antimetaboliti olan MTX; ALL, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri gibi pek çok kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılan sitotoksik bir ilaçtır. Kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik ilaçlar, hücre siklusunu etkileyip, DNA prekürsörlerinin sentezini inhibe etmektedir (4). Testiküler doku gibi yüksek mitotik aktiviteye sahip organlar da bu ilaçların hedefi haline gelmektedir (8). Erkek fertilitesi spermatogonyumların devamlı kendini yenilemesine ve spermatojenik hücrelere farklılaşmasına bağlı olduğundan, antikanser ilaçları testiküler dokuyu yapısal ve fonksiyonel olarak etkilemektedir. MTX'e bağlı toksisite gelişiminin serbest oksijen radikalleri ve hidrojen peroksit ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Son dönemde yapılan çalışmalarda MTX ile oluşan organ hasarını önlemek için melatonin, nikotinamid, metiyonin, E vitamini ve n-asetilsistein gibi antioksidan ajanlar kullanılmıştır (69, 70, 71).

PS doğal habitatın kaya rizosferlerindeki mikrobiyal metabolitler ile bitki ve organik humik maddelerin kompleks bir karışımından oluşmuştur. PS, antik zamanlardan beri ayurveda tıbbında en büyük keşiflerden biridir ve erkek üreme bozukluklarının tedavisinde yararlanır. Modern tıpta PS ile ilgili yapılan bir çalışmada PS'nin toplam sperm sayısını, sperm hareketini, serum testosteron seviyesini, FSH ve spermatogenezin başlaması ve devamı için gerekli olan LH seviyesini önemli derecede artırdığı belirtilmiştir (14).

Biz de bu çalışmada MTX'e dayalı testis hasarında bir antioksidan olarak bilinen PS'nin koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırdık.

Yapılan çalışmalarda MTX'in vücut ve testis ağırlığında anlamlı bir azalmaya neden olmadığı belirtilmiştir (7, 72, 73). Bizim çalışmamızda da MTX'in testis ve vücut ağırlığında anlamlı bir azalmaya neden olmadığı görülmüştür. Bulgularımız bu yönüyle Padmanabhan ve arkadaşlarının yanı sıra Armağan arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmaları destekler niteliktedir.

Testislerden spermatozoa oluşum ve salınımına önderlik eden germ hücrelerinin olgunlaşması ve farklılaşması sürecine spermatogenez denir. Bu karmaşık süreç seminifer tübül epitelinde bulunan germ hücreleri ve Sertoli hücreleri arasındaki

etkileşime bağlıdır. Germinal epitelde meydana gelecek bir hasar hasar spermatogenez sürecini etkiler (74, 75).

MTX ile yapılan diğer çalışmalarda da MTX'in seminifer tübül çapında ve germinal epitel kalınlığında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (57, 76, 77). Bizim çalışmamızda MTX uygulaması sonucu testis seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmüştür. Bu morfolometrik değerlerdeki azalmanın spermatogenez sürecini olumsuz etkileyebileceği kanaatindeyiz. Bununla birlikte MTX uygulaması ile birlikte PS verilen grubun morfolometrik değerlerinde, MTX grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı bir artış görülmüştür.

Bizim çalışmamızda MTX uygulanan grubun seminifer tübülünün bazal membranında açılmalar, interstisyel alanda ödem ve lümende olgunlaşmamış germ hücreleri izlendi. Bununla beraber MTX tedavisi ile birlikte PS verilen grubun testis seminifer tübül lümeni birkaç olgunlaşmamış germ hücresi içersede kontrol grubuna yakın bir mikroskopi göstermektedir. Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda MTX'in testis histolojisini bozduğu belirtilmiştir. Çalışmamız bu yönleri ile Russel ve ark.' ları ile Vardi ve ark.' larının yapmış oldukları çalışmaları destekler niteliktedir (12, 78).

Sonuç olarak, MTX tedavisi testiste histopatolojik hasar oluşturmakta ve bu hasar antioksidan karakterli PS ile önlenabilmektedir. Ancak çalışmamızın sonuçlarının desteklenebilmesi açısından farklı doz ve sürelerde yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB (2009). Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: intervention of folic and folinic acid. *Mutat Res* 673(1): 43-52.
2. Cole PD, Alcaraz MJ, Smith AK, Tan J, Kamen BA (2006). Pharmacodynamic properties of methotrexate and aminotrexate during weekly therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 57: 826-834.
3. Kayaalp O (2005). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1. Cilt. 11. Baskı Hacettepe-Taş Yayıncılık, Ankara; 317-343.
4. Şener G, Demiralp EE, Çetiner M, Ercan F, Yeğen BÇ (2006). B-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol* 542: 170-8.
5. Işık A, Işılay L, Erdemli EA, Akbay C, Anafarta K (1997). Sıçan testisinde metotreksat'ın ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 50, Sayı 3*.
6. Kim JC, Kim KH, Chung MK (1999). Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reprod Toxicol* 13: 391-7.
7. Armagan A, Uzar E, Uz E, Yılmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoglu HR, Soyupek S, Cam H, Serel TA (2008). Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Human and Experimental Toxicology* 27: 547-552.
8. Ateşşahin A, Şahna E, Türk G, Çeribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A, Bulmuş O (2006). Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res* 41: 21-7.
9. Ateşşahin A, Karahan İ, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Çeribaşı AO (2006). Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* 21: 42-7.
10. Sussman A, Leonard JM (1980). Psoriasis, methotrexate, and oligospermia. *Arch Dermatol* 116: 215-217.
11. Morris LF, Harrod MJ, Menter MA, and Silverman AK (1993). Methotrexate and reproduction in men: case report and recommendations. *J Am Acad Dermatol* 29: 913-916.

12. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Otlı A (2009). Antiapoptotic and antioxidant effects of betacarotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril* 92: 2028-2033.
13. Bayram M, Ozogul C, Dursun A, Ercan ZS, Isik I, Dilekoz E (2005). Light and electron microscope examination of the effects of methotrexate on the endosalpinx. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 120: 96-103.
14. Biswas TK, Pandit S, Mondal S, Biswas SK, Jana U, Ghosh T, Tripathi PC, Debnath PK, Auddy RG, Auddy B (2010). Clinical evaluation of spermatogenic activity of processed Shilajit in oligospermia. *Andrologia* Feb 42(1): 48-56.
15. Agarwal SP, Khanna R, Karmarkar R, Anwer MK, Khar RK (2007). Shilajit: A Review. *Phytother Res* 21: 401-405.
16. Park JS, Kim GY, Han K (2006). The spermatogenic and ovogenic effects of chronically administered Shilajit to rats. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 349-353.
17. Aiello A, Fattorusso E, Menna M, Vitalone R, Schröder HC, Müller WE (2011). Mumijo Traditional Medicine: Fossil Deposits from Antarctica (Chemical Composition and Beneficial Bioactivity). *Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 738131.
18. Sadler TW (2005). *Medikal Embriyoloji (Langman's Medical Embryology* 9. Baskıdan çeviri) Palme Yayıncılık, Ankara; 330-338.
19. Moore KL, Persaud TVN (2009). *Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri* 7. Baskı, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara; 173-187.
20. Snell RS (1986). *Clinical anatomy*. 3rd ed. Brown and Company, Boston; 68-75.
21. Sancak B, Cumhuriyet M (2004). *Fonksiyonel anatomi* 3. Baskı, Odtü Yayıncılık, Ankara; 286-291.
22. Toprak M, Akkın NS (1996). *Anatomi Ders Kitabı*, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul; 844-861.
23. Kuran O (1983). *Sistematik anatomi*, Filiz Kitabevi, İstanbul; 512-4.
24. Kerr JB (2000). *Atlas of Functional Histology*. 2nd ed. Mosby, London; 135-160.
25. Moore KL, Persaud TVN (2008). *Klinik Yönler ile İnsan Embriyolojisi*, Nobel Matbaacılık, İstanbul; 260-280.
26. Ovalle WK, Nahirney PC (2009). *Netter Temel Histoloji*, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara; 378-398.

27. Junqueira LC, Carneiro J (2009). Temel Histoloji Text&Atlas, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 418-434.
28. Gartner LP, Hiatt JL (2009). Renkli Histoloji Atlası 4. Baskı, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara; 376-386.
29. Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA (1988). Text/ atlas of histology, W.B. Saunders International Edition, Philadelphia; 635-668.
30. Kayalı H (1989). Özel histoloji, İstanbul Üniversitesi Film Merkezi, İstanbul; 218-28.
31. Bloom W, Fawcett DW (1975). Textbook of histology, W.B.Saunders International Edition, Philadelphia; 796-834.
32. Ganong WF (1996). Tıbbi Fizyoloji 1.Cilt, Barış Kitabevi 17.Baskı, İstanbul; 523-524.
33. Abraham L, Kierszenbaum MD (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Çeviren: Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara; 531-564.
34. Sternberg SS (1992). Histology for pathologist, Raven Press Lt, New York; 731-9.
35. Maher P, Schubert D (2000). Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. Cell Mol Life Sci 57: 1287-1305.
36. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford; 1-276.
37. Boyunaga H, Çelik C (1996). Serbest radikaller ve hücresel denge. Bilim Teknik Dergisi 347: 98-100.
38. Sies H (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med 91: 31-38.
39. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radic Biol Med (1-2): 202-26.
40. Eu JP, Liu L, Zeng M, Stamler JS (2000). An apoptotic model for nitrosative stress. Biochemistry 39(5): 1040-7.
41. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol Cell Biochem 266(1-2): 37-56.

42. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 4(1): 5.
43. Halliwell B (1974). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto* 73: 1075-1086.
44. Urso ML, Clarkson PM (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189: 41-54.
45. Drisko JA, Chapman J, Hunter VJ (2003). The use of antioxidants with first-line chemotherapy in two cases of ovarian cancer. *J Am Coll Nutr.* 22(2): 118-23.
46. Halliwell B (1989). Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* 82: 747-752.
47. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST, Qi W (2000). Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 29(11): 1177-85.
48. Söylemez H, Uğraş YM, Beytur A, Oğuz F, Kuruş M, Karabulut AB (2011). Sigara dumanına maruz kalan sıçanlarda resveratrolün testis dokusundaki antioksidan etkisinin değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Urology* 37(3): 235-241.
49. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79: 829-43.
50. Nakamura BN, Lawson G, Chan JY, Banuelos J, Cortes MM, Hoang YD, Ortiz L, Rau BA, Luderer U (2010). Knockout of the transcription factor Nrf2 disrupts spermatogenesis in an age- dependent manner. *Free Radic Biol Med* 49(9): 1368-1379.
51. Bertram G (2004). Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, 9. Edition. The McGraw-Hill Companies, Singapore; 898-931.
52. Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB (1998). Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 27: 277-292.
53. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (2009). Tedavinin Farmakolojik Temeli. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 1315-1405.
54. Chen YX, Lv WG, Chen HZ, Ye F, Xie X (2009). Methotrexate induces apoptosis of human choriocarcinoma cell line JAR via a mitochondrial pathway. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 143(2): 107-11.

55. Hedman J, Seideman P, Albertioni F, Stenius-Aarniala B (1996). Controlled trial of methotrexate in patients with severe chronic asthma. *Eur J Clin Pharmacol* 49(5): 347-9.
56. Jolivet JJ, Cowan KH, Clendennin NJ, Chabner BA (1983). The pharmacokinetics and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 309: 1094-104.
57. Koehler M, VValdherr R, Ludvvig RL (1986). Effects of MTX on rabbit testes. Part 1: Morphological Changes. *Pediatric Hematology Oncology* 3(4): 335-41.
58. Kevat S, Ahern M, Hall P (1988). Hepatotoxicity of methotrexate in rheumatic diseases. *Med Toxicol Adverse Drug Exp* 3(3): 197-208.
59. Modi DN, Sane S, Bhartiya D (2003). Accelerated germ cell apoptosis in sex chromosome aneuploid fetal human gonads. *Mol Hum Reprod* 9: 219-223.
60. Schepetkin IA, Xie G, Jutila MA, Quinn MT (2009). Complement-fixing activity of fulvic acid from Shilajit and other natural sources. *Phytother Res* 23(3): 373-84.
61. Goel RK, Bannerjee RS, Acharya SB (1990). Anti-ulcerogenic and anti-inflammatory studies with Shilajit. *J Ethnopharmacol* 29: 95-103.
62. Ghosal S, Lata S, Kumar Y, Gaur B, Misra N (1995). Interaction of Shilajit with biogenic free radicals. *Indian J Chem* 34B: 596-602.
63. Bhattacharya SK (1995). Shilajit attenuates streptozocin induced diabetes mellitus and decrease in pancreatic islet superoxide dismutase activity in rats. *Phytother Res* 9: 41-44.
64. Ghosal S, Mukhopadhyay B, Bhattacharya SK (2000). Shilajit, a rasayan of Indian traditional medicine. In *Molecular Aspects of Asian Medicines*, PJD Publication Ltd Westbury, NY; 425-444.
65. Bhattacharya SK (1995). Shilajit attenuates streptozocin induced diabetes mellitus and decrease in pancreatic islet superoxide dismutase activity in rats. *Phytother Res* 9: 41-44.
66. Ghosal S (1989). The facets and facts of Shilajit. *Research and development of indigenous drugs*. Institute of History of Medicine and Medical Research, New Delhi; 72-80.
67. Bhaumik S, Chattapadhyay S, Ghosal S (1993). Effects of Shilajit on mouse peritoneal macrophages. *Phytother Res* 7: 425-427.
68. Ghosal S (1990). Chemistry of Shilajit, an immunomodulatory Ayurvedic rasayan. *Pure Appl Chem (IUPAC)* 62: 1285-1288.

69. Muralikrishnan G, Amalan Stanley V, Sadasivan Pillai K (2001). Dual role of vitamin C on lipid profile and combined application of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil treatment in fibrosarcoma-bearing rats. *Cancer Lett* 169 (2): 115-20.
70. Oktem F, Yilmaz HR, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, Uzare E, Uz E (2006). Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health* 22(6): 241-7.
71. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yeğen BC, Sener G (2003). Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 34(4): 282-7.
72. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB (2009). Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: intervention of folic and folinic acid. *Mutat Res* 673(1): 43-52.
73. Chen S, Wang H-T, Yang B, Fu Y-R, Ou Q-J (2004). Protective effects of recombinant human growth hormone on cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 10: 2894-2897.
74. Mirhoseini M, Mohamadpour M, Khorsandi L (2012). Toxic effects of *Carthamus tinctorius* L. (Safflower) extract on mouse spermatogenesis. *J Assist Reprod Genet* 29 (5): 457-61.
75. Reuter K, Schlatt S, Ehmcke J, Wistuba J (2012). Fact or fiction: In vitro spermatogenesis. *Spermatogenesis* 2(4): 245-252.
76. Shrestha S, Dhungel S, Saxena AK, Bhattacharya S, Maskey D (2007). Effect of methotrexate (MTX) administration on spermatogenesis: an experimental on animal model. *Nepal Med Coll J* 9(4): 230-3.
77. Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M (2009). Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia* 41(2): 105-10.
78. Russell LD, Russell JA (1991). Short-term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. *Am J Anat* 192(2): 142-68.

9. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ**

Çalışmasının Adı : “Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarı Üzerine Shilajitin Histopatolojik Etkisi”
Çalışmacılar :Doç.Dr.Yavuz TEKELİOĞLU, Yük.Lis.Öğr.Eray GÜVEN,
Doç.Dr.İsmail DEMİR
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji ABD.

Etik Kurul Dosya No 2012/49	Etik Kurul Toplantı Tarihi 15.01.2013	Etik Kurul Toplantı No 2013/01	Etik Kurul Karar No 5
---	---	--	-------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu’nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN’ın başkanlığında; “Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarı Üzerine Shilajitin Histopatolojik Etkisi” başlığını taşıyan tez çalışmasının, Karadeniz Teknik Üniversitesi’nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (15.01.2013)

Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

10. ÖZGEÇMİŞ ve KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport No : 71443002708
Soyadı, Adı : GÜVEN, Eray
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 03.06.1988
Medeni hali : Bekar
Telefon : 05059629570
Faks : -
E-Posta : erayguven@windowslive.com
Yazışma adresi : KTÜ Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	: Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	: KTÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2013
Lisans	: Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010
Lise	: Trabzon Lisesi	2005

AKADEMİK/ MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
--------	-------	-----------------

YABANCI DİL İngilizce

UZMANLIK ALANI

YAYINLAR/BİLDİRİLER

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

HOBİLER