



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA METHOTREXATE KAYNAKLI
TESTİS HASARINA KARŞI MELATONİNİN
ANTIAPOPTOTİK VE ANTİOKSİDAN
ETKİLERİ

Zehra TOPAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

TRABZON - 2012

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi tüm eğitim hayatım boyunca beni destekleyen ve maddi, manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme ve çok sevgili dedem Adil TOPAL' a ithaf ediyorum.

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 Zehra TOPAL'ın hazırladığı “Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Melatoninin Antiapoptotik ve Antioksidan Etkileri” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Engin YENİLMEZ _____

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ _____

Doç. Dr. Esin YULUĞ _____

Doç. Dr. Ahmet ALVER _____

Tarih:20/06/2012

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

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İç Kapak Sayfası

KABUL ve ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

TABLolar DİZİNİvi

ŞEKİLLER DİZİNİvii

SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİvii

1. ÖZET 1

2. SUMMARY 2

3. GİRİŞ ve AMAÇ 3

4. GENEL BİLGİLER 4

4.1. İnsan Testisinin Anatomisi 4

4.2. İnsan Testisinin Embriyolojisi 4

4.3. Testis Histolojisi 5

4.3.1. Testisin Genel Yapısı 5

4.3.2. Seminifer Tübüller 6

4.3.2.1. Lamina Propriya (Sınırlayıcı Doku = Peritübüler Bağ Dokusu)..... 6

4.3.2.2. Seminifer Tübül Epiteli 6

4.3.2.3. Sertoli Hücresi 6

4.3.2.4. Spermatozoonlar	7
4.3.3. Spermatogenez.....	8
4.3.4. Spermiyogenez	10
4.3.5. Leydig Hücreleri.....	12
4.4. Testis Fizyolojisi	13
4.4.1. Kan-Testis Bariyeri	13
4.5. Metotreksat	13
4.6. Melatonin	15
4.6.1. Melatonin Salgılanmasının Düzenlenmesi	15
4.6.2. Melatoninin Biyokimyası.....	15
4.6.3. Melatoninin Farmakokinetiği	16
4.6.3.1. Endojen Melatonin	16
4.6.4. Antiproliferatif Özelliği	16
4.6.5. Antioksidan Özelliği.....	16
4.6.6. Diğer Özellikleri	17
4.6.7. Antikanser Etkileri	17
4.7. Serbest Radikaller	17
4.7.1. Serbest Radikal Kaynakları	17
4.7.1.1. Hidrojen Peroksit	17
4.7.1.2. Süperoksit Anyon Radikali	17
4.7.2. Serbest Radikal Hasarına Bağlı Hastalıklar.....	18
4.8. Lipid Peroksidasyon (LPO)	18

4.9. Lipid Peroksidasyon Ürünleri.....	19
4.9.1. Malondialdehit	19
4.10. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	19
4.10.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri	20
4.10.1.1. Süperoksit Dismutaz	20
4.10.1.2. Glutasyon Peroksidaz	20
4.10.1.3. Katalaz	20
4.11. Protein Oksidasyonu	20
4.11.1. Protein Fragmentasyonu ve Karbonil Türevlerinin Oluşumu	21
5. GEREÇ ve YÖNTEM	22
5.1. Deneysel Çalışma Aşaması	22
5.1.1 Deney Hayvanlarının Bakımı, Barınması ve Temini	22
5.1.2 Çalışmada Kullanılan Gruplar ve Deneyin Uygulanması.....	23
5.2. Histolojik İşlemler	25
5.2.1 Kan ve Doku Numunelerinin Elde Edilmesi.....	25
5.2.2. Doku Takibi	26
5.2.3 Kesitlerin Alınması	26
5.2.4 Kesitlerin Hematoksilen-Eozin Boyanması	27
5.3. İmmünohistokimyasal İşlemler ve Analizler	28
5.3.1. TUNEL(Terminal deoxynucleotidy transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay) Boyama	28
5.4. Biyokimyasal İşlemler ve Analizler	28
5.4.1. Bradford Metodu	28

5.4.2. MDA Tayini	29
5.4.2.1. Dokuda MDA Tayini (Manuel)	29
5.4.2.2. Plazmada MDA Tayini (Manuel)	30
5.4.3. SOD Tayini.....	31
5.4.3.1. Dokuda SOD Tayini	31
5.4.3.2. Plazmada SOD Tayini	33
5.4.4. CAT Tayini	35
5.4.4.1. Dokuda CAT Tayini.....	35
5.4.4.2. Plazmada CAT Tayini	36
5.4.5. GP-x Tayini	36
5.4.5.1. Dokuda GP-x Tayini	36
5.4.5.2. Plazmada GP-x Tayini	36
5.4.6. Protein Karbonil Tayini.....	37
5.4.6.1. Dokuda Protein Karbonil Tayini	37
5.5. Verilerin İstatiksel Analizi.....	37
6. BULGULAR	38
6.1. Histolojik Bulgular	38
6.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	42
6.3. Biyokimyasal Bulgular.....	45
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
8. SONUÇLAR	50
9. KAYNAKLAR.....	51

10. ETİK KURUL ONAYI61

11. ÖZGEÇMİŞ62

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 eseri 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.

25.05.12

Zehra TOPAL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen saygıdeğer Danışman Hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Engin YENİLMEZ'e ve bölümümüzün Değerli Hocaları Prof. Dr. Ersan ODACI ve Doç. Dr. Esin YULUĞ'a, dostluklarıyla yaşamımın her dakikasında yanımda olacak olan ve tezimin her aşamasında yardım eden dostlarım yüksek lisans öğrencileri Sibel TÜREDİ ve Hatice HANCI ve Akın BODUR'a, tezimin biyokimyasal ve istatistiksel analizlerinin ortaya çıkmasında yardım eden Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, Arş. Gör. Cemil KAHRAMAN'a, Arş. Gör. Diler US'a, değerli bilgilerini paylaşan Doç. Dr. Sinan CANPOLAT'a, KTÜ Tıp Fak. Cerrahi Araştırma Merkezi çalışanlarına, tezimi 2010.114.001.10 kod numarasıyla destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve en önemlisi beni bugüne kadar sonsuz sevgisiyle büyüten annem, babam ve dedeme teşekkürü bir borç bilirim.

Yük. Lis. Öğr. Zehra TOPAL

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Çalışmada kullanılan gruplar ve gruplara uygulanan tedaviler tablosu	24
Tablo 2. Histolojik değerlendirmeler tablosu	44
Tablo 3. Testis dokusundaki biyokimyasal değerlendirmeler tablosu	45
Tablo 4. Kan plazmasındaki biyokimyasal değerlendirmeler tablosu	46

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Sıçanların bakımı ve barınması ait resim	23
Resim 2. Testislerin çıkarılışına ait resim	26
Resim 3. Kontrol Grubu. Mikrotografi x400 H.E resmi.....	38
Resim 4. MTX Grubu. Mikrotografi x400 H.E resmi	39
Resim 5. MTX+Mel Grubu. Mikrotografi x400 H.E resmi	40
Resim 6. Etanol Grubu. Mikrotografi x400 H.E resmi.....	41
Resim 7. Mel Grubu. Mikrotografi x400 H.E resmi	42
Resim 8. MTX Mikrotografi x400, DAB Boyama H.E resmi.....	43
Resim 9. MTX+Mel Mikrotografi x400, DAB boyama H.E resmi.....	44

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AI	Apoptotik İndeks
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BSA	Bovin Serum Albumin
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Glutasyonun disülfidleri
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LPO	Lipid peroksidasyon
MDA	Malondialdehid
Mel	Melatonin
MTX	Methotrexate
NBT	Nitroblue tetrazolium
NADPH	Nikotinamid dinüklotid fosfat
Px	Peroksidaz
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
ROS	Reaktif oksijen süpürücüler
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TdT	Terminal deoxynucleotidy transferase

TUNEL	Terminal deoxynucleotidy transferase deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay
HCl	Hidroklorik asit
HO₂·	Hidroperoksil
H₂O₂	Hidrojen peroksit
H₃PO₄	Fosforik asit
H₂SO₄	Sülfirik asit
O₂	Oksijen
O₂·	Süperoksit
OH·	Hidroksil radikali
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
NADPH	Nikotinamid dinüklotid fosfat
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
Na₂HPO₄·2H₂O	Disodyum hidrojenfosfat dihidrat
L	Litre
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre

ÖZET

Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Melatoninin Antiapoptotik ve Antioksidan Etkileri

Bu çalışma, methotrexate (MTX)'in oluşturduğu testis hasarına karşı melatoninin koruyucu etkisini araştırmak amacıyla yapıldı. Araştırma için 30 adet, 16 haftalık erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her biri 6 sıçandan oluşan 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubu sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmadı. Kontrol grubundaki gruplara, maddeler intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi. MTX grubuna birinci gün tek doz MTX (20mg/kg), sonraki 4 gün boyunca da serum fizyolojik verildi. MTX+Melatonin, Melatonin (Mel) ve Etanol gruplarına 5 gün boyunca her gün aynı saatte madde verildi. MTX+Mel grubuna birinci gün tek doz MTX (20mg/kg) ve ilk günden itibaren melatonin (10mg/kg) uygulandı. Mel grubuna melatonin (10mg/kg) verildi. Etanol grubuna melatoninin çözülmesinde kullanılan %5 etanol içeren serum fizyolojik (v/v) verildi. 5. gün sonunda tüm sıçanlar anestezi altında öldürüldü; alınan testisler ışık mikroskopik ve biyokimyasal olarak değerlendirildi.

Kontrol grubu sıçanların testis yapısı normal olarak izlendi ve MDA seviyesi düşük bulundu. MTX grubuna ait seminifer tübüllerin lümenlerinde immatür germinal hücreler, bazal kompartımanında Sertoli hücreleri ile spermatogoniumlar arasında açılma ve germinal epitelde yer yer vakuolizasyon izendi. MTX grubuna ait testis ve kan biyokimyasal analizinde, malondialdehid (MDA)'in oldukça arttığı belirlendi. Etanol grubunda testis histolojisi MTX grubuna benzer bulgular taşıyordu ve MDA seviyesi yüksekti. MTX+Mel grubundaki apoptoz indeksi ise MTX ve Etanol gruplarına göre anlamlı olarak azalmıştı. MTX+Mel grubunda testis histolojisi ve biyokimyasında MTX'in oluşturduğu bozuklukların önemli ölçüde düzeldiği belirlendi. Mel grubundaki tübüller normal yapıda izlendi ve MDA seviyesi düşük bulundu.

Bulgularımız MTX'in testiste oksidatif etki ile testiste yapısal bozukluklar oluşturduğunu; melatoninin antioksidan etkiyle, MTX'in testiste oluşturduğu bu oksidatif hasarı düzelttiğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Testis, Methotrexate, Melatonin, Malondialdehid, Mikroskopi

SUMMARY

Antiapoptotic and Antioxidant Effects of Melatonin Against Methotrexate-induced Testicular Damage In Rats

The aim of this study was to investigate protective effects of melatonin against methotrexate (MTX)- induced testicular damage.

Sixteen week old 30 rats were divided into five groups. Each group was included 6 rats. Control group rats were not done any application. Another groups were injected solutions by intraperitoneally. Methotrexate group was administered single dose of MTX (20 mg/kg body weight). Methotrexate+Melatonin group was administered a single dose MTX on the first day and melatonin (10 mg/kg body weight) for five days. Melatonin group was administered melatonin for five days. Rat testes of Control group were observed in normal structure. There were a lot of immature germ cells in the lumen, widening between Sertoli cell and spermatogonia at basal compartment and a few vacuolization at adluminal compartment in seminiferous tubules of MTX Group. Malondialdehyde (MDA) in MTX Group was increased considerably. Testis histology in Ethanol group was similar to MTX group and MDA level was high. MTX and ethanol, the apoptosis index was significantly decreased in MTX + Mel group groups. In MTX+Melatonin group, testis histology was observed normal appearance and MDA level was significantly decreased, compared with MTX Group. Testis structure of Melatonin group was normal and MDA level was low.

The results indicate that MTX have done oxidative damage and melatonin has protective effect against MTX in rat testis.

Keywords: Testis, Methotrexate, Melatonin, Malondialdehyde, Microscopy

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser kemoterapisi için kullanılan çoğu ilacın, çoklu organ sistemlerinde toksik yan etkiler ürettiği bilinmektedir (1). MTX'in indüklediği testis toksisitesi de bazı çalışmalarda tanımlanmıştır. MTX uygulanması, MDA'nın artmasıyla lipid peroksidasyonunun artmasına neden olmuştur (2,3). Lipid peroksidasyon, serbest radikal oksijenler tarafından hücre membranı hasarına, yıkımına önemli bir neden oluşturur ve MTX doku hasarını bir faktördür. MTX'in tek doz uygulanması karaciğer ve böbreklerde toksik etkiye ve oksidatif hasara neden olmuştur(3). MTX uygulanan sıçanlarda CAT aktivitesinde azalma meydana gelmiştir (2).

Melatonin;hidroksil (4,5) ve peroksil radikalleri (6), tekli oksijen (7) ve nitrik oksit (8) içeren reaktif oksijen türlerine karşı (ROS) güçlü bir süpürücüdür. Mel vitamin A ve E'den iki kat daha etkili bir lipofilik antioksidan olduğu belirtilmiştir (6). Mel sirkadiyen ritim, kan basıncı, dönmşsel üreme ve bağışıklık olmak üzere çeşitli vücut fonksiyonları düzenlemede önemli bir role sahiptir (2).

İskemi-reperfüzyon hasarında endojen kaynaklı Mel uygulanmasında oksidatif hasara karşı etkili bir koruma sağlamıştır (7). Mel MTX'in indüklediği oksidatif stresi, nötrofil infiltrasyonunu ve böbrek hasarını düzeltmiştir. MTX'in indüklediği MDA artışını Mel azaltmıştır(2). Mel MTX'in oluşturduğu oksidatif toksik etkileri tersine dönüştürebilme yeteneğine sahiptir (3).

Bu çalışma, metotreksat (MTX)'ın oluşturduğu testis hasarına karşı melatoninin koruyucu etkisini araştırmak amacıyla gerçekleştirildi.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnsan Testisinin Anatomisi

Testisler erkekte üreme organı olup, testis torbası (skrotum) içinde yer alırlar. Oval şekilde, yanlardan basık, küçük bir kuş yumurtası büyüklüğünde (herbiri yaklaşık 2,5x3x5 cm boyutlarında, 10-15 gr ağırlığında) çift organ olan testisler erkek üreme hücreleri olan spermatozoonlar ile erkek seks hormonları olan androjenleri üretirler. Erken fetal dönemde, karın boşluğunda böbreklere yakın olarak yer alan testisler, fetus geliştikçe aşağıya doğru hareket ederek doğumdan hemen önce inguinal kanal aracılığıyla skrotuma inerler. Testislerin normal fonksiyonlarını yapabilmeleri için, karın boşluğundan skrotuma inmeleri zorunludur.

Skrotum içinde yer alan her bir testis, tunika albuginea olarak adlandırılan kalın bir kapsül ile sarılıdır. Bu kapsül, arka kenarından testisin içine girerek mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testis, testise girip çıkan damarlar ile rete testise ait kanalcıkları içerdiği gibi gönderdiği bölmelerle de testisi 250-300 lobcuğa böler. Her bir lopçukta 3-4 tane olmak üzere tüm testiste 1000 kadar seminifer kanalcık (seminifer tübül) bulunur. Testisin temel parankim yapısını oluşturan seminifer kanalcıklar spermatozoonların üretildiği yerlerdir.

Seminifer tübüller, mediastinum testise uzanarak burada birbirleriyle ağzlaşmalar oluştururlar. Mediastinum testiste bu kanalcık ağı rete testis olarak adlandırılır. Rete testise ulaşan spermatozoonlar, buradan çıkan 10-20 adet duktuli efferentes ile epididimin kanal sistemine ulaştırılır.

Testisler abdominal aortadan çıkan a. testicularis ile kanlandırılır. Testislerin venöz kanı sağda v. cava inferior'a, solda v. renalis'e dökülür. Testisler otonom sinirlerle innerve edilir (9).

4.2. İnsan Testisinin Embriyolojisi

Testis gelişiminin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar. Mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitel ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık gonadal (genital) kabartı olarak adlandırılırlar. Parmak şeklindeki epitelial kordonlar -primer seks kordonları- altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Bu aşamada gonadal kabartılar henüz farklanmamıştır. Farklanmamış gonad dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşmaktadır

(10). Seks kromozomu kompleksinde bir Y kromozomu taşıyan embriyoda, testisler genellikle gelişmektedir. Testislerin gelişimi koordineli bir seri genin indüksiyonu ile oluşur (11). Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktörler için SRY geni, farklanmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar fonksiyonu görmektedir (12). Testis belirleyici faktör (TDF), primer seks kordonlarını uyararak, onların farklanmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomozlar yaparlar ve böylece rete testis oluşur. Seks kordonlarının -seminifer (testiküler) kordonların- kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile bağlantıları kaybolur. Tunika albuginea' nın gelişimi, fötusta testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdaki ayrılır ve kendi mezenterisi olan mezorşium ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar seminifer tübüllere, tubuli recti ve rete testis' e farklanırlar (10).

4.3. Testis Histolojisi

4.3.1. Testisin Genel Yapısı

Erkek üreme sistemi, iki adet testis, kanal sistemi (duktuli eferentes, duktus epididimis, duktus deferens ve duktus ejakulatorius) ve onlara bağlı yardımcı bezleri (seminal vezikül, prostat ve bulbouretral bezleri -Cowper bezleri) içerir (13). Testis, tunika albuginea adı verilen kalın fibröz kapsülle çevrili tubuler bir bezdir. Testislerin spermatozoa ve hormonları üretmek üzere iki esas görevi vardır. Testislerin bu iki görevi birbirleriyle ilişkilidir. Seminifer tübüllerde spermatogenez ve Leydig hücrelerinde androjen biyosentezi gerçekleşir (14). Tunika albuginea'nın iç yüzü, kan damarı içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır, buna tunika vaskulosa testis denir. Gevşek bağ dokuya benzer karakterdeki bu doku, seminifer tübüller arasındaki tüm açıklıkları doldurarak bu tabakayı içeriye doğru genişletir. Burası fibroblast, makrofaj, mast hücresi ve perivasküler mezenşimal hücreler içerir. Ayrıca kümeler halinde epitelooid interstisyel hücreler yada Leydig hücreleri adı verilen hücreleri taşır.

Her testis, spermatik kord adı verilen uzun bir vasküler pedikülün sonunda asılı durur; duktus deferens testisin boşaltım kanalını oluşturur; kan damarları ve sinirler testise bu taraftan ulaşır. Epididimis, testisi arka taraftan sıkıca destekleyen, ekskretuar kanal sisteminin kıvrımlı ağ biçimindeki kısmını oluşturan bir organdır.

4.3.2. Seminifer Tübüller

4.3.2.1 Lamina Propria (Sınırlayıcı Doku = Peritübüler Bağ Dokusu)

Seminifer tübüller, interstisyumun birincil bağ dokusu elementlerinden türeyen adventisyal hücrelerin oluşturduğu bir yada çok tabakayla sarılıdır. Bu sınır dokunun organizasyonu türden türe farklılık gösterir. Kemirgenlerle yapılan yaygın laboratuvar deneylerinde, tek tabakalı yassılaştırmış poligonal hücreler, bir kenardan diğer kenara epitel tabakasıyla tübülü çevreler. Peritübüler dokunun hücresel yapılarını, kasılabilen düz kas özelliğindeki hücreler oluşturur. Bu hücrelere doğrudan düz kas hücresi denilmez; çünkü düzensiz şekillidirler ve epitele benzer organizasyonu vardır; bu yüzden bu hücrelere myoid hücreler veya peritübüler kasılabilir hücreler denir. Bu hücrelerin seminifer tübüllerin kasılmalarından sorumlu olduğu bildirilmektedir. Bu kasılmalar doğal olarak oluşur; çünkü bu tabakanın kenarında sinir görülmez.

4.3.2.2. Seminifer Tübül Epiteli

Yetişkinlerde, kompleks tabakalı epitle çevrili seminifer tübüller, iki büyük kategorideki hücreden oluşur; destekleyici hücreler ve spermatogenik hücreler. Destekleyici hücreler tek tipdedirler ve bunlar Sertoli hücreleridir. Spermatogenik hücreler ise bazı morfolojik değişiklikler içerir: spermatogoniumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar. Bu germ hücreleri birbirini izleyen evrelerde sürekli bir değişim sürecindedirler (13).

4.3.2.3. Sertoli Hücresi

Seminifer tübüllerin omurgası Sertoli hücreleri tarafından şekillenir ve bu hücreler seminifer tübülün bazal membranı üzerine oturur (14). Komşu Sertoli hücreleri, bazal kısmın yakınında, komşu Sertoli hücreleriyle özelleşmiş bağlayıcı kompleksler aracılığı ile birbirlerine bağlanırlar (15). Sertoli hücresinin üç boyutlu şekli alışılmamış karmaşıklıktadır. Yapısı temel olarak sütun şeklinde düşünülebilir. Bazal lamina üzerine oturur ve kalın epitelin arasından geçerek serbest yüzeye ulaşır. Erken evredeki germ hücreleri (spermatogonyumlar) bazal laminanın üstüne otururken, daha gelişmiş evredeki hücreler birbirini izleyen daha yukarı epitel kısmında bulunur. Hücreler arasındaki dinamik ilişki seminifer tübüllerin epitelini, diğer epitel arasında özel ve tek yapar. İnsanda Sertoli hücrelerine özgü Charcot-

Böttcher kristalleribulunur. Bunlar incecik, 10-25 μm uzunluğunda fuziform yapılardır ve bazen ışık mikroskobunda da görülebirlirler.

Sertoli hücreleri germ hücrelerinin gelişimi için mekanik desteklik ve koruma sağlar, beslenmelerini gerçekleştirir. Bunlar olgun spermatozoonların salıverilmesinde aktif rol oynarlar. Sertoli hücreleri sıcaklığa, iyonlaştırıcı radyasyon ve çeşitli toksik ajanlara direnç gösterirler; hassas spermatogenik hücreleri imha ederler.

4.3.2.4. Spermatozoonlar

Aktif olarak hareket eder. Olgun spermatozoon serbest yüzebilen bir baş ihtiva eder. Bir babanın çocuklarına tüm genetik özelliklerini transfer eden bir çekirdek içerir. Hareketini sağlayankuyruk (flagellum) fertilizasyon sırasında spermin transferini ve ovumun dış örtüsüne penetrasyonunu sağlar.

İnsan sperm başı önden görünüşünde ana hatlarıyla ovaldır ve kenardan görüldüğünde pyriformdur; alt kısma ve tepeye doğru gittikçe inceler. Baş 4 - 5 μm uzunluğunda ve 2.5- 3.5 μm genişliğindedir. Başın büyük kısmını çekirdek oluşturur ve yumurtaya transferde genomunu zarar görmekten korur. Çekirdek önden akrozomal keple kaplıdır; bu organel fertilizasyon sırasında spermin penetrasyonunda önemli rol oynayan enzimler içerir. Memeli sperm başı boyutunda çok farklılıklar vardır ve şekli türden türe değişir.

Sperm kuyruğu yaklaşık 55 μm uzunluğundadır ve uç kısmın çapı 1 μm - 0.1 μm arasında değişir. Işık mikroskopunda 4 segmenti tanınabilir. Proksimalden distale doğru, boyun, orta parça, esas parça ve son parça kısımlarından oluşur. Bu segmentlerin iç yapısında önemli değişiklikler vardır. Rutin preparatlarda açıkça görülmeyebilir, fakat özel sitolojik tekniklerle veya elektron mikroskop ile gösterilebilir.

4.3.3. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyumdan spermatozoon dönüşmede ardarda gelen olayların tümüdür. Üç temel faza ayrılır. İlki spermatositogenezdir, birçok spermatogonyum (Tip A), mitotik bölünmeyle hızla çoğalır ve bazı spermatogonyumları oluşturur ve her biri bir öncekinden farklıdır. Son bölünen spermatogonyum (Tip B) preleptoten spermatosite

dönüşür. İkinci faz mayoz fazıdır. Bu bölünmede spermatositler, iki olgunlaşma bölünmesi geçirir, kromozom sayısı bu fazda yarıya iner ve spermatid kümeleri üretilir. Üçüncü faza ise spermiyogenez denir. Spermatidler bir takım sitolojik değişiklikler geçirerek spermatozoonlara dönüşür.

Tip A spermatogonyumunküresel veya elipsoid çekirdeğinde kromatin granülleri iyi seçilir; bir veya iki düzensiz şekilli nükleolus nükleer zarfın iç yüzeyine bağlıdır. Sitoplazma homojendir ve soluk boyanır. Bu tip bazı spermatogonyumların, nükleoplazması koyudur ve büyüktür; nükleer vakuolleri soluk boyanır. Bu hücreler insan ve maymundaki koyu Tip A spermatogonyum olarak belirlenir, diğerlerinden daha soluk nükleoplazma ve çekirdek vakuolü olmayışıyla ayırt edilir. Tip B spermatogonyumlar çeşitli boyutta kromatin granülleri içeren küresel çekirdeğe sahiptir ve granüllerin çoğu nükleer zar boyunca dağılmıştır. Tek çekirdekçik merkezde yerleşiktir ve granüllü kromatinle birleşir. Sitoplazma Tip A spermatogonyumun sitoplazmasından farklı değildir. Tip B spermatogonyumlar bölünerek primer spermtositlere dönüşür.

Vücut hücrelerinde kromozomlar çiftler halindedir. Bu hücreler kromozom sayılarına göre diploid olarak adlandırılır. Gametler sadece bir kromozom içerdiği zaman bunların her birine haploiddendir. Fertilizasyonda haploid kromozomlu spermatozoon ve yumurta hücreleri birleşerek diploid kromozomlu zigotun oluşturulması sağlanır. Nükleer materyalin bölünerek haploid gametlerin oluşumuna mayoz adı verilir. Mayoz spermatogeneze spermatositler oluşur.

Primer spermatositler boyut ve sitolojik olarak ilk başta benzerdirler. Fakat germinal epitelin bazal laminasından uzaklaşıp, çok sitoplazma biriktirirler ve belirgin bir şekilde büyürler. Bunların kromatini mayozun leptoten evresinde iplik benzeri ince kromozomlarla karakteristiktir. Homolog kromozomlar interfaz boyunca kendilerini ikiye katlarlar. Sinaptonemal komplekslerin oluşumu zigotenevresinde oluşur. Bu evredeki eşleşmiş kromozomlar, daha kalın olmaları ve derin boyanmaları nedeniyle, leptoten evresine göre daha belirgin olarak görülürler. Kromozomlar eşleştiğinde şekilleri bivalent veya tetrad yapısıdadır; daha sonra spiralleşir ve daha kısalırlar. Pakiten evresinde kromozom iplikleri oldukça belirginleşirler. Bu evrede duplike kromozomlar sentromerlerinden yapışmıştır. Bunlar diyadlar veya kardeş kromatidler olarak adlandırılırlar. Her pakiten elementi dört kromatin içerir. Bu evrede çaprazlaşma (crossing over) oluşur, kromatidlerin

uygun bölgelerinde kromozom değişimleri gerçekleşir. Diploten evresinde sinaptonemal kompleksler kaybolur.

Mayotik profazın bu evresi oldukça uzar, yaklaşık 22 güne yayılır. Bunun sonucunda, profazın farklı evrelerindeki birçok spermatosit seminifer tübülden geçen kesitlerde görülebilir.

Profazın sonunda, çekirdek zarı kaybolur. Tetradlar veya bivalentler, metafaz evresinde ekvatoryal düzlemde dizilirler. Anafaz I de homolog çiftlerden herbiri sentromerlerinden zıt kutuplara çekilir ve diyardlar kromatidlere ayrılır. Mitozun aksine duplike kromozomlar ekvatoryal düzlemde sıralanır ve sentromerler bölünür. Her bir kromozom zıt kutuplara kopyasını gönderir. Mayozda ayrılan kromozomlar hem annenin hem de babanın kromozomlarından farklıdır. Çünkü çaprazlaşma sırasında değişim meydana gelir. Anafaz I ve Telofaz I çabucak tamamlanır; spermatositlerin orijinal kromozomlarının sayısal yarısı taşınmaktadır. Sekonder spermatositlerin kromozomları hızlı bir şekilde duplike oldukarı için bunlar seminifer tubullerdeki kesitlerde nadir olarak görülürler. Sekonder spermatositler 2. mayoz bölünme fazını çabuk tamamlarlar; kısa bir profaz II'yi metafaz II takip eder ve kromozomlar ekvatoryal düzlemde bir hizaya girerler. Anafaz II, anafaz I'den farklıdır. Sentromerler mitozdaki gibi bölünürler ve kardeş kromatidlerin zıt kutuplara gitmesini sağlarlar. Telofaz II nin tamamlanmasıyla, haploid yapıda kromozomlara sahip olan spermatidler oluşur.

İnsan spermatogonyumunda 46 kromozom bulunur. 22 çift otozomal ve bir çift cinsiyet kromozomu (XX veya XY) vardır. Farklı otozom çiftleri boyutunda değişiklikler gözlenir. Bunlar kinetokorlarda yerleşir ve otozomların iki üyesi morfolojik olarak tanınır. Cinsiyet kromozomları kadınlarda (XX) identiktir; fakat erkeklerde (XY) farklı boyutlardadır. Kromozomlar spermatogenezin ilk maturasyon bölünmesinde her bivalent XY çifti içerir, bunlar iki bileşenine ayrılır. Sekonder spermatositler birinci olgunlaşma bölünmesi ile oluşur (22 tek otozom ve bir tane X veya bir tane Y kromozomu). Kadınların ürettiği yumurtaların hepsi aynıdır (22 otozom ve bir tane X kromozomu). X kromozomu içeren spermatositle dişi yumurta hücresinin (ovum) birleşim sonucu kadın oluşumu gerçekleşir. Çünkü fertilizasyon sonucunda oluşan zigot 44 + XX içerir (kadın) Y kromozomu taşıyan spermatositle ovumun birleşmesi sonucu erkek oluşumu sağlanır, çünkü zigot 44 + XY içerir.

Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar, erkek eşey hücrelerinin bölünmesinin diğerk somatik hücrelerin bölünmesinden farklı olduğunu göstermiştir. Çekirdek bölünmesini (karyokinez) takiben hücre gövdesi bölünmesi (sitokinez) tamamlanır; kardeş hücreler birbirlerine protoplazmik köprülerle bağlıdır. Burada iğ ipliklerinin artıkları görülür. İğ iplikleri köprüleri somatik hücrelerin mitozunda geçici olarak oluşur. Fakat seminifer epitelde kalıcıdır ve kardeş hücreler arasında iletişimi sağlarlar. Bunlar spermatidlerden spermatozoonlara dönüşümde geç evrelere kadar kalırlar. Olağan görünüşde her spermatogonyum bölünür, her kardeş hücre primer spermatosite gelişir. Bu da bölünerek iki sekonder spermatositi oluşturur ve sekonder spermatositlerde bölünerek dört tane spermatidi oluştururlar. Erken spermatogonyal bölünme sitokinezle tamamlanır. Spermatogonyumlar kümeler halinde primer spermatositleri oluştururlar; bu üretim sonucu çift sayıda sekonder spermatosit oluşur. Sekonder spermatositlerin bölünmesiyle çok sayıda spermatid oluşur. Böylece tek bir spermatogonyumdan oluşan yavru germ hücreleri kümelerinin protoplazmik bağlılığı farklanma boyunca kalır. Bu, seminifer tübülün herhangi bir alanında, çok sayıdaki eşey hücresinin gelişiminin senkronizasyonunu sağlar. Spermatozoonlar epitelden lümene serbest olarak salınırlar.

4.3.4. Spermiyogenez

Spermiyogenezterimi spermatidlerin ardışık bir şekilde spermatozoonlara dönüşmesi olarak tanımlanır. Küçük küresel veya poligonal spermatidlerin her biri sekonder spermatositlerin bölünmesi sonucu oluşurlar. Bunların 5 - 6 m çapında soluk boyanan granüllü kromatin içeren çekirdeği vardır. Sitoplazmada küçük bir Golgi aygıtı görülür. Spermatozoonların spesifik bileşeninin değişiminin ilk işareti bir veya daha fazla granüllü Golgi aygıtının varlığıdır.

Olgunlaşma sürecinde Golgi bölgesinden ayrılan bazı granüller büyük, tek bir vakuolde bütünleşir. Bu akrozomal granül membranla çevrili akrozomal vezikül veya vakuol içerir. Bu nükleer zarfın i yüzeyine yapışıkır. Akrozomal vezikülün yüzeyiyle Golgi aparatı sıkıca birleşik olarak devam eder ve küçük veziküller ile akrozomal veziklle birleşerek onun genişlemesine yardımcı olurlar.

Spermiyogenez dört fazda incelenir. Proakrozomal granüller nükleer zarfa yapışık olduğu faz Golgi fazıdır. İkinci fazda (kep fazında) membranla sınırlandırılmış akrozomal

vezikül nükleer zarla yapışma alanını artırır. Kalın bir katlantı oluşturur, çekirdeğin karşı kutbuna uzanır ve en sonunda baş kepini yarı küresel membranla kaplar.

Üçüncü ya da spermiyogenezin akrozomal fazında, akrozomal maddelerin yeniden dağıtımı yapılır, çekirdek zarı yoğunlaşır ve spermatid uzar. Akrozomun genişliği çekirdeğin ön kutbuna kadar uzanır. Fakat spermiyogenez fazı sırasında katlanmış membran içeren baş kepi aşamalı olarak kalın bir tabaka halinde uzanır. Akrozom ve baş kepi akrozomal kep olarak birliktedir. Oluşum formu kep benzeri yapısıyla tanımlanır ve membranla sınırlandırılmıştır; karbonhidratlar ve hidrolitik enzimlerce zengindir. Farklı türlerde boyut ve şekil bakımından farklılık gösterir; fakat günümüzde spermiler tüm memelilerde aynı içeriklidir. Spermatid çekirdeği bu periyotta uzayarak düzleşir.

Dördüncü fazda veya spermiyogenezin olgunlaşma fazında primat spermi akrozomunda basit küçük değişiklikler gözlenir; fakat bazı türlerde daha fazla değişim izlenir ve aşamalı olarak türe özgü şekil görülür.

Spermiasyon: Kuyruğun farklılaşmasının tamamlanmasıyla spermatozoonların fazla sitoplazması ayrılır ve çekirdeksiz zarla sınırlandırılmış artık cisimcikler epitelde kalır; küçük granüller ve yağ damlacıkları içeren dejenere artık organeller spermatozoonların oluşumunda kullanılmazlar.

4.3.5. Leydig Hücreleri

Testislerde endokrin yapıdaki Leydig hücreleri, kıvrıntılı seminifer tübüller arasındaki köşeli alanlar arasında yerleşmişlerdir. Tübüller arasındaki kan damarları peritubuler pleksus yapısındadır. Dokulararası alanın bileşimi türden türe çok değişiklik gösterir. İnsandaki ekstrasvasküler interstisyel doku, ekstraselüler sıvıdan oldukça zengin gevşek bağ dokusu yapısındadır. Burada küçük kümeler halindeki Leydig hücrelerine ek olarak, az sayıda fibroblast, makrofaj, mast hücreleri ve nispeten az farklılaşmış mezenşimal kökenli hücreler bulunur. Bunlar gonadotropik uyarıya cevap verirler.

Bazı türlerde, özellikle at, domuz ve keseli sıçanlarda Leydig hücreleri oldukça fazladır. Bunlar çoğu zaman tubüller arası boşluğu doldururlar. Leydig hücreleri bazen değişik boyutlarda kümeler oluştururlar. Bazende kan damarlarıyla sıkıca birleşiktirler. Genellikle düzensiz ve çok yüzlüdürler; 14 - 20 µm çapında, sıkıca paketlenmişlerdir. Fakat periferde

kümeler halinde uzunveya iğ şeklinde olabilirler. Büyük küresel, çekirdekler çevrede dizili küçük miktarlarda heterokromatin, bir veya iki belirgin çekirdekçik içerir. İki çekirdekli olanları yaygındır (13).

Leydig hücreleri geniş, çok yüzlü epitel benzeri hücrelerdir. Sitoplazma bolca düz endoplazmik retikulumla doludur. Golgi kompleksi iyi gelişmiştir. Sitoplazma lipid vakuolleri, Reinke kristalleri, mikrotübüller ve primer lizozomlar içerir (16). İnsanda üç nesil Leydig hücresi vardır (17). İlki fötal nesildir; bunlar erkek üreme alanındaki farklanma sırasında gonadotropinlerden bağımsız androjen üretirler. İkinci popülasyon perinatal periyotta sadece kısa süreli gonadotropin bağımlıdır. Doğumdan sonra, interstisyel doku gerekli olan Leydig hücrelerinden fakirleşir. Üçüncü nesilin kuruluşu olan puberteye kadar görülmez. Üçüncü nesil Leydig hücreleri interstisyumda kümeler oluştururlar (14).

Ayrıca, bunlar myoid hücrelerle çevrili seminifer tübüllerin sınırlayıcı dokusunda da bulunabilir. Böylece olası Leydig hücresi/Sertoli hücresi etkileşimi gerçekleşir (18).

4.4. Testis Fizyolojisi

4.4.1. Kan-Testis Bariyeri

Seminifer tübüllerin duvarları, öncü germ hücreleri ve tübülün bazal laminasından lümeneye kadar uzanan büyük, karmaşık, glikojen içeren Sertoli hücreleriyle örtülüdür. Komşu Sertoli hücreleri arasında, bazal lamina yakınındaki sıkı bağlantılar, kan-testis engelini oluşturur. Bu engel, birçok büyük molekülün interstisyel dokudan ve tübülün bazal lamina yakınındaki kısmından (bazal kompartman), tübülün lümen; yakınındaki bölümüne (lümenaltı kompartman) ve lümeneye geçişi engeller. Ancak steroidler bu engeli kolayca aşar. Bazı proteinlerin, Sertoli hücrelerinden Leydig hücrelerine veya tersi yönde parakrin tarzda geçtiğine dair bulgular vardır. Ayrıca, olgunlaşmakta olan germ hücrelerinin de lümeneye doğru hareket ederken bu engeli geçmeleri gerekir. Bu germ hücresi geçişi sırasında, bu hücrenin yukarısındaki sıkı bağlantılar, engel açılmadan sırayla açılır. Germ hücresi geçtikten sonra altındaki yeni sıkı bağlantılar yeniden oluşur.

Seminifer tübül lümenindeki sıvı, plazmadan tamamen farklıdır. Çok az miktarda protein ve glikojen içerir. Fakat androjenler, östrojenler, K^+ , inositol, glutamik asit ve aspartik asit bakımından zengindir. Sıvının bu içeriğinin korunması, olasılıkla kan-testis engeline bağlıdır. Engel aynı zamanda, germ hücrelerini kandan gelen zararlı maddelerden korur.

Germ hücre bölünmesi ve olgunlaşması ile ilgili antijenik ürünlerinin dolaşıma geçip otoimmün bir yanıt oluşturmalarını engeller; sıvının tübül lümenine doğru hareketini kolaylaştıran osmotik bir farklanma oluşmasına yardım edebilir (19).

4.5. Methotrexate

Kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçların çoklu organ sistemlerinde akut toksik yan etkiler ürettiği iyi bilinmektedir. Çoğunlukla etkilenen organlar kemik iliği, mide ve bağırsağa ait alanlar, mukozal membranlar ve kıl folikülü gibi kendiliğinden yenilenen hücre popülasyonları içeren organlardır (20).

Methotrexate (4-amino-4-deoxy-10-N-methylpteroylglutamic acid; MTX) çoğunlukla akut lenfoblastik lösemi, osteosarkoma, koryokarsinoma, lenfoma, göğüs kanseri, mesane kanseri, baş ve boyun kanseri gibi neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (21). Ayrıca MTX, romatoid artrid, psoriasis, graft versus host hastalığı gibi tümör içermeyen hastalıklarda da düşük dozda kullanılmaktadır (22). MTX'in toksisitesi nefrotik, hematolojik ve merkezi sinir sistemi gibi çeşitli organlarda da bildirilmiştir (23, 24). Buna rağmen gonad hasarı daha yaygın gözlemlenmiştir. Antikanser ajanların potansiyel yan etkileri zıt etkilerinden daha az araştırılmıştır; çünkü hayati tehlikesi olmayan semptomlar gonadların hasarından daha önceliklidir(25).

Bazı hipotezler, MTX etkilerinin oksidatif stresle ilişkili olduğunu önermektedirler. (26,27,28). Birçok çalışma MTX uygulanan insan ve hayvanlarda ROS'un uyardığı doku hasarının doğurganlığın patofizyolojisinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir; muhtemelen ROS üretimi DNA'yla ilişkili bazı enzimlerin engellenmesini artırır (29, 3,30). MTX glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerini azaltmaktadır (27, 29,). Bu durum MTX'in oksidatif hasar oluşturduğunu göstermektedir.

Testis membranında bulunan doymamış omega 3 yağ asitleri ROS'un hedefi haline gelmekte, bu da organı oksidatif strese daha duyarlı hale getirmektedir (31). Tek doz MTX'in uygulanması, testislerde oksidatif stresin artmasına neden olmuştur (21). MTX oksidatif stresle veya doğrudan toksik etkiyle testiküler toksisiteyi indüklemiştir (32). Oksidatif stres de testis ve üreme hücrelerinin yapısında hasara öncülük etmektedir (33, 34).

Testiste çeşitli antioksidan mekanizmalar vardır. Bunlar zararlı etkiye sahip ROS'ları nötralize ederler. Buna rağmen MTX, antioksidan mekanizmaların etkisini kaybettirir ve proenflamatuvar sitokin sistemindeki değişim serbest radikal formasyonunun oluşumunun artmasına neden olur; bu da fagositik hücrelerin aktivasyonuna yol açar (27, 30). MTX enflamatuvar cevap sistemini aktive ederek prositokin üretiminin artmasına neden olur (30, 35). Proenflamatuvar sitokinler ve ROS uyaran sitokinler, lipid peroksidasyonunu artırabilirler (36).

MTX'in oluşturduğu testis toksisitesi, infertiliteye neden olan önemli bir yan etkidir (21). Antikanser ilaçlarına hücresel ve moleküler bakımdan maruz kalan spermatogenez evresindeki hayvanlarda, gonadların hasar gördüğü çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (2, 25, 37). MTX'e maruz kalan erkeklerde, hücresel-kromozomal değişim ve oligozoospermi oluşmuştur (38). Ayrıca MTX oogenezi ve spermatogenez bozarak fertiliteye neden olmuştur (20, 39). MTX kaynaklı toksisite birçok faktörün etkisiyle oluşur; bunlar dozaj programı, uzun süreli tedavi, genetik ve moleküler apoptotik faktörlerin varlığıdır (40).

4.6. Melatonin

Amfibi epifizinde, bir indol olan N-asetil-5-metoksitriptamin bulunur. Melanoforları etkileyerek iribaş derisinin rengini açtığından bu indole, Melatonin (Mel) adı verilmiştir. Memeli epifiz dokusunda da melatonin ve bunun serotoninden N-asetilleme ve O-metilleme ile sentezinden sorumlu enzimler bulunur. Memelilerde diğer bazı dokularda da bir kısım Mel'in sentezi söz konusudur. Mel epifizin parenkim hücreleri tarafından sentez edilir ve kan ile beyin-omurilik sıvısına salınır (41).

4.6.1. Melatonin Salgılanmasının Düzenlenmesi

İnsan ve bugüne kadar incelenen diğer türlerde, Mel sentez ve salınımı, günün karanlık evresinde artar, aydınlık saatlerinde düşük bir düzeyde sürdürülür. Salgılanmadaki bu dikkat çekici diüurnal değişkenlik, epifizi innerve eden postganliyonik sempatik sinirlerden (nervi conarii) salınan noradrenalinle sağlanır. Noradrenalin, β -adrenerjik almaçlar aracılığı ile, epifiz hücrelerindeki siklik adenosin monofosfat (cAMP) miktarını artırır. cAMP artışı ise N-asetiltransferaz etkinliğini ve sonuçta Mel sentez ve salınımını artırır.

Dolaşımdaki Mel, karaciğerde hızla 6-hidroksilasyon ve bunu izleyen konjugasyonla metabolize edilir ve Mel'in %90'dan fazlası, idrarda, 6-hidroksi konjugatlar ve 6-sülfatoksimelatonin şeklinde bulunur (41).

4.6.2. Melatoninin Biyokimyası

Endojen Mel sirkadiyen ritimde açıkça görülür. Mel triptofan aminoasidinden üretilen birincil noktürnaldır ve gece-gündüz döngüsüne maruz kalarak kontrol edilir, uykudan bağımsızdır (42). Ayrıca epifizdeki üretimin yanı sıra, bir miktar Mel de retina (43), kemik iliği (44), sindirim sisteminde üretilir ve safraya verilir (45). Barsaklarda orantılı olarak epifiz bezinden daha fazla Mel üretimi meydana gelir (46).

Mel salınımı kişiden kişiye farklılık gösterir. Yüksek salınım görülen hastalarda gece vakti salınımının pik değere ulaştığı seviye 54-75 pg/ml civarındadır; düşük salınım yapanların gece vakti pik yaptığı Mel seviyesi ise 18-40 pg/ml civarındadır (47).

4.6.3. Melatoninin Farmakokinetiği

4.6.3.1. Endojen Melatonin

Epifiz tarafından sentezlenen endojen Mel kan dolaşımı içinde kolayca yayılır ve diğer vücut sıvıları, beyin-omurilik sıvısı (BOS) (48), tükürük () da Mel içerir. Safra ve beyin omurilik sıvısı (BOS)'ndaki Mel seviyeleri bazı zamanlarda serumdan daha yüksek görülür (48,50). Kan dolaşımında bulunan Mel'in % 50-75'i plazmada bulunan proteinler, albümin, alfa₁-asid glikoproteinlere bağlı olarak geri dönüşebilir (51).

4.6.4. Antiproliferatif Özelliği

Mel, insan göğüs kanseri hücre serisi MCF-7'de (52) yapılan çalışmalarda kanseri engellemede doğrudan etki göstermiştir.

Mel'in mitotik hücre bölünmesini metafaz evresinde engellediği (53), kanserli hücrelerin farkanmasına yardım ettiği, hücre yüzeyindeki adhezyon moleküllerini ve hücrelerarası haberleşmeyi azaltarak bazı kanser türlerinde metastatik aktiviteyi azalttığı bildirilmiştir. Mel bazı kanser türlerinde apoptozu doğrudan indüklemektedir (54).

4.6.5. Antioksidan Özelliği

Melatonin;hidroksil (4,5) ve peroksil radikalleri (6), tekli oksijen (7) ve nitrik oksit (8) içeren reaktif oksijen türlerine karşı (ROS) güçlü bir süpürücüdür. ROS'lara karşı süpürücü özelliğine ek olarak Mel, SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzimlerini uyarır (55, 56, 57).Melin vivo LPO'yu azaltmada Vitamin C ve E'den daha etkilidir (58, 59).

4.6.6. Diğer Özellikleri

Çalışmalar Mel'in anti-enflamatuar ve özelliklerinin, proenflamatuar sitokinlerle düşük düzeyde düzenlendiğini (60); nitrik oksit ve metilendioksiyafetamin üretimini engellediğini göstermiştir (61).

4.6.7. Antikanser Etkileri

Göğüs kanserleri (62), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (63), metastatik böbrek hücresi karsinomu (64), hepatosit karsinomu (65), beyindeki metastatik solid tümörleri içeren çeşitli kanser tiplerinin günlük 10-50 mg/kg dozunda Mel'e karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir.

4.7. Serbest Radikaller

4.7.1. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller, oksijenden kaynaklanan radikallerdir (66).

4.7.1.1. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit(H_2O_2) radikali süperoksit dismutaz veya oksijenin doğrudan redüksiyonu sonucu oluşur. Oluşumundan sonra ya doğrudan oksidatif hasara neden olur ya da süperoksit radikalinde olduğu gibi, aşırı reaktif serbest radikallerin oluşum reaksiyonlarına katılır. En önemli özelliği Haber-Weiss reaksiyonuna katılarak güçlü hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olmasıdır (67, 68).

Hidrojen peroksitin etkisi, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleri ile azaltılır (69). Bununla birlikte yavaş reaksiyon verir ve bundan dolayı da biyolojik moleküllere verdiği

hasar artar. Doğrudan DNA yapısını bozabilir ya da proteinlerin tiyol gruplarını okside edebilir (67, 68).

4.7.1.2. Süperoksit Anyon Radikali

Süperoksit anyonucanlı organizmada ekzojen ya da endojen kaynaklı olarak meydana gelir. Özellikle mitokondrilerde ve endoplazmik retikulumlardaki elektron transport zincirinden elektron sızması ve ardından oksijenle reaksiyona girmesi ile meydana gelir (70).

Süperoksitler ömrü milisaniyelerle sınırlı olan zayıf oksidan, güçlü redüktanlardır (71). Doğal oksijen, süperoksit grubuna bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan SOD aracılığı ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan CAT, peroksidaz (Px) ve GSH-Px gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır. Dietilditiyokarbamat gibi SOD'un etkinliğini engelleyen maddeler, süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırırken, lipid peroksidasyonunu hızlandırırlar. Ayrıca CAT'ın etkinliğini engelleyen maddeler (aminotriazol gibi herbisitler) de etkin oksijen gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırırırlar (72).

4.7.2. Serbest Radikal Hasarına Bağlı Hastalıklar

Normalde serbest radikal molekülleri, belirli düzeyde kaldıkları sürece organizmanın yabancı maddelere ve infeksiyöz ajanlara karşı savunmasında önemli moleküllerdir. Ancak serbest radikaller belirli bir düzeyin üzerine çıktıkları zaman ve antioksidanlar yetersiz kalınca hücrenin yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve yararlı enzimlerini bozarak zararlı etkilere neden olurlar. Bu serbest radikaller birçok hastalığın etmenidirler (73, 74, 75).

4.8. Lipid Peroksidasyonu (LPO)

Lipid peroksidasyonu (LPO) serbest radikaller tarafından indüklenen en önemli oksidasyon reaksiyonudur. LPO, membran lipidlerinin oksidatif hasarla bozulması olayıdır. LPO, serbest radikaller tarafından başlatılır ve membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonuna neden olur (76). Hücre fonksiyonları açısından, hücre membranlarının bütünlüğü ve akışkanlığı çok önemlidir. Ökaryotlarda bu akışkanlık membran

lipidleri içine sokulan PUFA sayesinde olmaktadır. LPO'nun başlaması için, PUFA'ların yan zincirindeki bir metilen karbonundan bir hidrojen atomu çekmeye yetecek reaktivitesi olan herhangi bir kimyasal yeterlidir (77). Bütün PUFA'lar temel bir yapıya sahiptir. Komşu çift bağlar, karbon-alilik hidrojenbağlarını zayıflatır. İki çift bağ arasındaki karbon atomlarına bağlı alilik hidrojenler, serbest radikaller tarafından çıkarılmaya karşı kısmen aktif halde bulunurlar. Bu şekilde oluşan lipid radikalleri, reaksiyon zincirinin başında moleküler oksijen ile reaksiyona girerler ve böylece PUFA'ların yapısı bozulmuş olur. Oluşan bu reaksiyon dizisi, LPO'dur (76).

4.9. Lipid Peroksidasyon Ürünleri

4.9.1. Malondialdehit

LPO'nun en önemli ürünü MDA'dır. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği sebebiyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (78, 79, 80).

4.10. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Bunlar Vitamin C, E, A, beta-karoten, metallothionein, poliaminler, melatonin, nikotinamid dinükleotid fosfat (NADPH), adenosin, koenzim Q-10, ürat, ubiquinol, polifenoller, flavonoidler, fitoöstrojenler, sistein, homosistein, taurin, metionin, s-adenozil-L-metionin, resveratrol, nitroksidler, glutatyon (GSH), GSH-Px, CAT, SOD, tioredoksin redüktaz, nitrik oksid sentaz, hem oksijenaz-L ve eozinofil'dir (72). Antioksidanlar, serbest radikallerin hidrojen atomunu PUFA'ların yerine antioksidanlardan almasına izin verir. Böylece serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırarak reaktif olmayan antioksidan radikalinin oluşmasını sağlarlar (76).

4.10.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri

4.10.1.1. Süperoksit Dismutaz

SOD, tüm aerobik dokularda bulunan serbest radikal reaksiyonlarına karşı hücreyi koruyan önemli bir intraselüler proteindir (66). SOD, biri Cu-Zn merkezli ve sitozolik, diğeri Mn merkezli ve mitokondrial olmak üzere iki enzimden oluşur. Bakırlı bir enzim olan SOD, son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubunu H_2O_2 ve oksijene çevirir (72).

4.10.1.2. Glutatyon Peroksidaz

Memeli hücreleri, toksik kimyasallar ve selüler metabolizmanın yarattığı oksidatif ürünlerden, en önemli endojen sistem olan GSH redoks döngüsü ile korunur (81). GSH in vivo olarak karaciğerde glutamilsistein ve glisinlerden, GSH sentetaz enzimi ile üretilir. Total glutatyondaki GSH tüketimi %20–30 seviyesine inerse hücrenin savunma mekanizması darbe alır ve hücre hasara uğrar (82).

GSH-Px ekzojen ve endojen oksitleyici ajanlardan hücreleri koruyarak H_2O_2 ' ye karşı bir savunma sistemi oluşturur (76). Endojen oksidatif stres ökaryotlarda ve özellikle mitokondride aerobik metabolizma sonucu oluşur. Solunum zincirinde oksijenin indirgenmesi sırasında toksik oksijen ara ürünleri oluşur. Mitokondriyal oksijen tüketiminin yaklaşık %2-5'i H_2O_2 üretimi ile sonuçlanır. Üretilen bu H_2O_2 ise GSH-redoks döngüsü ile GSH tarafından indirgenir (83). H_2O_2 indirgenmezse çok reaktif hidroksil radikallerinin ve dolayısı ile proteinler, DNA, RNA ve membran yapısına zarar verir; yapıyı bozup lipid hidroperoksitlerin oluşmasına neden olur (84).

4.10.1.3. Katalaz (CAT)

CAT, aerobik hücrelerin çoğundaperoksizomlar, mitokondrilerde ve sitozolde gibi diğer subselüler organellerde bulunan bir enzimdir. Bu enzim GSH-Px gibi hücre içi H_2O_2 konsantrasyonunu azaltır (85).

4.11. Protein Oksidasyonu

Reaktif oksijen türevleri tarafından proteinlerin oksidatif modifikasyonu, birçok bozukluk ve hastalıkların ciddi bir şekilde ilerlemesine yol açar(86).

4.11.1. Protein Fragmentasyonu ve Karbonil Türevlerinin Oluşumu

Protein oksidasyonu temel olarak hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$) ile başlar. Oksidasyon sürecinde O_2 ile birlikte, süperoksit anyon radikali ve süperoksit radikalinin protonlanmış formu olan hidroperoksil ($\text{HO}_2^\cdot$)' in varlığı da gereklidir. Bu reaktif oksijen türevleri aminoasitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile protein fragmentasyonuna neden olur (87, 88).

Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin, lizin, sistein ve glisin gibi çok sayıda aminoasit bakiyesinde ve proteinlerin peptid omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak protein karbonil ürünleri meydana gelir (89, 90).

5. GEREÇ ve YÖNTEMLER

5.1. Deneysel Çalışma Aşaması

5.1.1 Deney Hayvanlarının Bakımı, Barınması ve Temini

Çalışmamız Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2011/21 sayısıyla onay almıştır. Tez çalışması süresince kullanılan deney hayvanları, kimyasal malzemeler, araç ve gereçler KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2010.114.001.10 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

Çalışmada kullanılan 16 haftalık 30 adet Spraque Dawley cinsi erkek sıçanların bakımı, beslenmesi ve barınması KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde sıçan takip odalarında yapılmıştır. KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde bulunan veteriner ve teknikerlerden deney hayvanlarının bakımı ve fiziki koşulların optimum düzeyde olması için destek alınmıştır. Sıçanların bulunduğu oda 22 ± 2 °C olacak şekilde termometre ile ayarlanmıştır. Sirkadiyen ritminin devamı için odada bulunan ışıklar 12 saat açık 12 saat kapalı tutulmuştur. Sıçanların beslenmesinde standart sıçan yemi ve musluk suyu kullanılmıştır.

Çalışma süresince sıçanların barındırılmasında standart Tip III sıçan kafesleri kullanıldı. Her kafeste hayvanların kullanabileceği yeterlilikte yem ve su kafes üzerinde hayvanların kolaylıkla ulaşabileceği bölmelere yerleştirildi (Resim 1).



Resim 1. Sıçanların bakımı ve barınmasına ait resim

5.1.2 Çalışmada Kullanılan Gruplar ve Deneyin Uygulanması

Deneyde kullanılan 30 sıçan her grupta 6 hayvan olacak şekilde 5 ayrı gruba ayrıldı. Hayvanlar yaş ve ağırlıklarına göre gruplara homojen şekilde dağıtıldı (Tablo1).

Gruplar	Grupların Özellikleri ve Uygulanan Tedaviler
I	Herhangi bir tedavi uygulanmayan kontrol grubu sıçanlar
II	İlk gün tek doz verilen MTX grubu sıçanlar
III	5 gün boyunca melatonin verilen Mel grubu sıçanlar
IV	İlk gün tek doz MTX uygulanan ve ilk günden itibaren 5 gün boyunca melatonin uygulanan MTX+ Mel grubu sıçanlar
V	5 gün boyunca %5 etanol içeren serum fizyolojik uygulanan Etanol grubu sıçanlar

Tablo 1. Çalışmada kullanılan gruplar ve gruplara uygulanan tedaviler tablosu

Çalışmamızda 5 günlük deney aşamasını takiben 5.günün sonunda deney hayvanlarının sakrifiye edilmesiyle deney kısmı tamamlandı. Birinci günde bütün hayvanlar yaş ve ağırlıklarına göre 5 ayrı gruba ayrıldı. Sıçanların kafesleri her gün temizlendi, besin ve su ihtiyaçları karşılandı.

Birinci gün sıçanlar ağırlıklarına göre 5 ayrı gruba homojen şekilde ayrıldı. Kontrol grubuna 5 gün boyunca herhangi bir işlem uygulanmadı. MTX (KOÇAK FARMA, Üsküdar, İstanbul) grubuna tek doz MTX (20mg/kg) periton içi (i.p.) uygulandı,sonraki 4 gün boyunca da serum fizyolojik verildi. Mel grubuna 5 gün boyunca melatonin (10mg/kg) periton içine (i.p.) uygulandı. MTX + Mel grubuna ilk gün tek doz MTX ve 5 gün boyunca melatonin i.p. olarak uygulandı. Bütün enjeksiyonlar her gün aynı saatte (10: 00-11:00 arası) uygulandı. Toz haldeki melatonin (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA) 10 mg’lık parçalar halinde tartıldı, karanlık ortamda ve -20 °C’de saklandı. 10 mg melatonin 100µl etanolde vortekslenerek çözüldü, çözelti üzeri 2ml’ye serum fizyolojikle tamamlanarak içerisindeki etanol %5 seviyesine indirildi.

5.2. Histolojik İşlemler

5.2.1 Kan ve Doku Numunelerinin Elde Edilmesi

5. günlük deney sonunda bütün sıçanlar ketamin (50 mg/kg) ve ksilazinin (xylazine, 5mg/kg) i.p. olarak uygulanmasından sonra yaklaşık 10 dk.uyutuldu. Karın boşluğundan girilerek sağ testis çıkarıldı ve abdominal aortadan girilerek kan alındı (Resim2). Daha sonra abdominal aorta makasla kesilerek kansızlaştırma yöntemi uygulandı ve sıçanlar sakrifiye edildi. Elde edilen testisler boyuna ikiye bölündü. Her sıçanda aynı testis bölgesi olmak üzere testisin bir yarısı histolojik değerlendirmeler için Bouin fiksatifine konuldu. Testisin diğer yarısı biyokimyasal analizler için ependorf tüplerine konuldu ve -20°C'deki soğutucuda muhafaza edildi. Alınan kanlar kan tüpüne konuldu ve santrifüj edilerek plazma kısmı -20°C'de saklandı. Biyokimyasal analizler için alınan tüm doku ve kan numuneleri KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki soğutucularda muhafaza edildi.

Çalışmanın deney aşaması, kan ve dokuların elde edilmesi işlemlerinin tümü KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde özel olarak hazırlanmış hayvan takip ve cerrahi müdahale odalarında gerçekleştirildi.



Resim 2. Testislerin çıkarılışına ait resim. a) Karın boşluğunun açılması, b) Testisin karın boşluğundan çıkarılışı, c) Çıkarılan testisin görüntüsü, d) Yağ ve epididimiden ayrılmış testis.

5.2.2. Doku Takibi

Dokuların takip, kesit alma ve boyanma işlemlerinin tümü KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Bouin fiksatifine alınan testisler 18 saat ışık almayan kuru ortamda, oda sıcaklığında saklandıktan sonra sırasıyla sudan uzaklaştırma, şeffaflaştırma ve parafinden geçirilme işlemlerinden sonra blok haline getirildi.

Bouin solüsyonu:

75ml Pikrik asit

25ml Formaldehid

5ml Glasiyel asetik asit eklenerek hazırlandı.

Doku takibi aşamasında aşağıdaki işlemler uygulandı:

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 oda sıcaklığında bloklandı.

5.2.3 Kesitlerin Alınması

Kesitler KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarındaki Leica marka RM 2255 mikrotom ile alındı. Dokuya kadar 20µm'lik kesitler alınarak, dokunun parafini atıldı. Dokuya ulaşıldığında 5 µm'lik kesitler alındı. Kesitler Benmari içindeki sıcak su üzerine alınarak kırışıklıkların açılması sağlandı ve lam üzerine yerleştirildi.

5.2.4 Kesitlerin Hematoksilen-Eozinle (H.E.) Boyanması

Tüm dokulardan kesitlerin alınması tamamlandıktan sonra boyama işlemine başlandı. Boyama sırasında H.E. boyaları kullanıldı. Tüm kesitlerin parafini 58°C'lik etüvde iyice eritildi ve sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı :

- 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 1 kez batırılıp çıkartıldı
- 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 kapatma.

5.3. İmmünohistokimyasal İşlemler ve Analizler

5.3.1. TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay) Boyama

Kesitler Roche marka In Situ Cell Death Detection Kit, POD kitinin protokolüne uygun olarak boyandı. TUNEL metoduyla DAB ve hematoksilinle boyanan dokularda apoptoza uğrayan hücrelerin kahverengi ile boyananları TUNEL (+) ve apoptotik, mor renkte boyananlar ise nonapoptotik ve TUNEL (-) hücreler olarak değerlendirildi. X40'lık büyütmede TUNEL (+) ve TUNEL (-) hücreler sayıldı ve TUNEL (+) / Toplam hücre sayısı = Apoptotik İndeks (AI) olarak değerlendirildi ve her sıçan testisinden enine kesilmiş en az 10 tübülde germinal hücreler sayıldı. Seminifer tübüldeki germinal epitel kalınlığı, tübülün çapı ve lümene dökülmüş immatür germinal hücre içeren tübül sayısını hesaplamak için K.T.Ü Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD Stereoloji Laboratuvarındaki Analysis Research programından yararlanıldı. Ayrıca her sıçanın seminifer tübülündeki germinal epitel kalınlığı, tübül çapı ve lümene dökülmüş immatür germinal hücre içeren tübüllerin sayısını belirlemek içinde her kesitten en az 10 tübül sayıldı.

5.4. Biyokimyasal İşlemler ve Analizler

5.4.1. Bradford Metodu

Bradford metodu uygulanmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları aşağıda verilmiştir:

%20'lik HCl çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 27.03 ml %37'lik HCl'den alındı ve son hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı. Kullanılan cam malzemelerdeki olabilecek protein kalıntılarını uzaklaştırmak için yıkama çözeltisi olarak kullanıldı.

Bradford Reaktifi: 25 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 12,5 ml %95'lik etanolde çözüldükten sonra üzerine 25 ml %85'lik H₃PO₄ eklendi. Son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

Standart çözeltiler: Standart çözeltiler Bovin Serum Albumin (BSA)'dan hazırlandı. 25 mg BSA bir miktar suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Oluşan 2,5 mg/ml'lik çözeltiden 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1mg/ml'lik çözeltiler hazırlandı.

Bradford Reaktifi 100 µl

Homojenat (10 kat seyreltildi) 10 µl

Plate karıştırıcıda 10 sn karıştırıldı.

600 nm’de spektrofotometrik okuma yapıldı.

5.4.2. MDA Tayini

5.4.2.1. Dokuda MDA Tayini (Manuel)

Bu işlem için gerekli çözeltiler şu şekilde hazırlandı:

Doku homojenizasyon tamponu: % 1,15 lik KCl çözeltisine % 0,05 lik (bir litre için 500 µl olacak şekilde) Triton X.100 konarak hazırlandı.

1. %1’lik H_3PO_4

2. TBA: 0,67 g TBA tartılıp, 50 ml suda manyetik bar yardımıyla karıştırılarak üzerine 50 ml asetik asit ilave edildi.

3. MDA standartları: MDA Standartları tetrametoksipropan dan 0,01 M HCl asitle 50°C de 1 saat inkübe edilerek hidrolize elde edildi.

4. Stok MDA 10 nmol/ml’den 10nm/ml, 5 nm/ml, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 çözeltileri hazırlandı ve standartlar çift çalışıldı. Standartlara TBA’lı ve %1’lik H_3PO_4 lü ve sonrasındaki uygulamalar yapıldı.

Dokuda manuel MDA tayini için aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. 50mg (0,05g) doku tartıldı.

2. Tüplerin üzerine 2 ml tampon koyuldu(Doku homojenizasyon tamponu önceden soğuk olarak hazırlandı).

3. 0,05 g olarak tartılan dokular homojenizasyon için uygun tüplere koyuldu.

4. Homojenizasyon da buz üzerinde yapıldı.

5. 3000rpm de 10 dk santrifüj edildi.

6. Santrifüj işlemi sonunda üstte kalan süpernatantlardan 500 µl alınıp, başka tüplere koyuldu.

7. Bu tüplerin üzerine 3 ml %1’lik H_3PO_4 ve 1 ml TBA koyuldu.

8. 100⁰C de 45 dk etüvde inkübasyona bırakıldı.

9. Tüpler 4000rpm’de 10dk santrifüjlendi.

10. Elisa pleytlerine 300 µl pipetlenir ve 532 nm’de absorbans okundu.

5.4.2.2. Plazmada MDA Tayini (Manuel)

Plazmada MDA tayini için gerekli çözeltiler aşağıdadır:

0,084N H₂SO₄:570 µl H₂SO₄(%98’lik)saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

%10’luk fosfotungustik asit: 0,5 g tartıp 4,5 ml deiyonize suda çözüldü.

TBA: 0,67g TBA tartılıp, 50 ml suda manyetik bar yardımıyla karıştırılarak üzerine 50 ml asetik asit ilave edildi.

Plazma MDA seviyesi ölçümü Yagi yöntemiyle aşağıdaki gibi ölçüldü (108).

1. 150 µl plazma üzerine 1,2 ml H₂SO₄ ve 150 µl fosfotungustik asit ilave edilip, hafif vortekslendi.

2. 4000rpm’de 10 dk santrifüj edildi.Üst faz atıldı.

3. Çöken kısımlara 2 ml deiyonize su ilave edilip tekrar vortekslenip, çözüldü.

0,5 ml TBA ilave edildi.

4. 1saat 100⁰C de inkübasyona bırakıldı.

5. İnkübasyon sonucunda tüpler tekrar 4000rpm’de 10 dk santrifüj edildi.

6. 532 nm de absorbans okundu.

5.4.3. SOD Tayini

5.4.3.1. Dokuda SOD Tayini

Homojenizasyon Aşaması

Homojenizasyon tamponu: Tris –HCl 50 mM pH: 7,4 (Litrede 500 µL olacak şekilde Triton X-100 olmalı) tampon soğuk olmalı. Bu tampon homojenizasyonda, numunelerin

dilüsyonu gerekli ise dilüsyonda ve ayrıca SOD standartlarını hazırlamada kullanıldı. Homojenizasyondan sonra aynı gün içinde SOD çalışıldı.

Ksantin çözeltisi: 40 ml

EDTA çözeltisi: 20 ml

NBT çözeltisi: 20 ml (ışıktan korunmalı ve karışıma en son pipetleme yapmadan hemen önce eklendi.)

Na₂CO₃:12 ml

%0,1 Bovin Serum Albümin: 6 ml

Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı.

1. 50 mg doku alındı ve alınan dokular kaydedildi.
2. 2 ml soğuk tampona koyuldu.
3. Soğukta homojenize edildi.
4. 3000 rpm 10 dk santrifüj edildi.
5. Süpernatanın bir kısmı ile SOD tayini yapıldı.

Homojenize dokuda SOD ölçümü

1. 1 ml Süpernatın alındı ve 500 µl Etanol-Kloroform karışımı (3:2 oranında) ilave edildi.
2. Vortekslendi.
3. Soğukta 10 000 g de 30 dk santrifüj edildi.
4. Süpernatın alınır homojenizasyon tamponu ile dilüe edildi. (Dilüsyon oranı, birkaç numunenin rengi (absorbansı) kör ile standart 10 arasında kalacak şekilde tespit edildi.)
5. Dilüe süpernatın kullanıldı.

Sod Ölçümünde Kullanılacak Çözeltiler

1. 0,3 mM Ksantin

2. 0,6 mM EDTA
 3. 150 μ M NBT (çok taze olmalı)
 4. 400 mM Na_2CO_3
 5. %0,1 Bovin Serum Albümin
 6. 2,3 M amonyum sülfat (stok ksantin oksidaz enzimini dilüe etmek için kullanıldı).
 7. 0,8 mM bakır klorür (çalışma sonunda spektrofotometrik ölçümden hemen önce reaksiyonu durdurmak için kullanıldı).
 8. 167 u/L ksantin oksidaz (dilüsyon gerekli ise soğuk amonyum sülfat ile dilüe edildi).
 9. 0,125- 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8- 9 - 10 ünite /ml lik SOD standartları.
- Yukardaki çözeltilerin ilk 5 tanesi ile aşağıda verilen oranlarda bir karışım (SOD reaksiyon karışımı) elde edildi ve bu karışım kullanıldı.

Cam Tüpte Çalışma adımları:

Süpernatant alındı, homojenizasyon tamponu ile dilüe edildi. (Dilüsyon oranı, birkaç numunenin rengi (absorbansı) kör ile standart 10 arasında kalacak şekilde tespit edildi.)

1. Dilüe süpernatant kullanıldı.
2. 0,25 ml kör, standart, dilüe süpernatant (cam tüpe) alındı.
3. 994,9 ml SOD karışımı + 255,1 ml NBT ilave edildi.
4. 0,025 ml (25 μ L) 167 u/L karanlıkta ksantin oksidaz ilave edildi.
5. 15-20 dk 25 °C de karanlıkta inkübe edildi (su banyosunda) ve inkübasyon esnasında renk değişimini kontrol edildi. Ayrıca inhibisyonu durdurmadan önce (bakır klorür ekleyerek) standartın birkaç tanesi ile okuma yaparak inhibisyonun %30-65 aralığında olup olmadığı kontrol edilmesi önerilir.
6. 0,5 ml bakır klorür(0,8 mM) ilave edildi.
7. Bu pipetlemeler küvette okumak için yaklaşık 2 ml'lik bir numunemiz olmaktadır.

8. Kuvette ya da eliza pleytine numuneler aktarılarak okundu.

9. 560 nm de okundu.

5.4.3.2. Plazmada SOD Tayini

SOD aktivitesinin tayini, Sun ve Oberley'i metoduna göre yapıldı (109).

Sod Ölçümünde Kullanılacak Çözeltiler

1) 0,1 M pH: 7,5 potasyum fosfat tamponu

2) 0,3 mM ksantin

3) 0,6 mM EDTA

4) 150 µM NBT

5) 400 mM Na₂CO₃

6) %0,1 Bovin Serum Albümin

7) 2,3 M soğuk amonyum sülfat

8) 0,8 mM bakır klorür

9) 167 u/L ksantin oksidaz

10) 0,125- 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8- 9 - 10 ünite /ml lik SOD standartları.

Yukardaki çözeltilerin ilk 5 tanesi ile aşağıda verilen oranlarda bir karışım (SOD reaksiyon karışımı) elde edildi ve bu karışım kullanılır.

Yaklaşık 100 ml saf suya aşağıdaki 4 kimyasal ilave edilir. Ve son hacim 156 ml ye tamamlandı.

Ksantin çözeltisi: 40 ml

EDTA çözeltisi: 20 ml

NBT çözeltisi: 20 ml

Na₂CO₃:12 ml

%0,1 Bovin Serum Albümin: 6 ml

Cam Tüpte Çalışma Adımları:

0,5 ml serum standart alındı.

0,4 ml etanol kloroform karışımı (5: 3 oranında) ilave edildi.

1) 1 dk. Vortekslendi.

2) 18 000 g de 60 dk santrifüj edildi (+4 derecede).

3) 0,25 ml kör, standart, dilüe süpernatant alındı (cam tüpe).

4) 994,9 ml SOD karışımı + 255,1 ml NBT ilave edildi, (1,25 ml SOD kimyasal karışımı ilave edildi (tüm karışım NBT dahil)).

5) 0,025 ml (25 mikrolitre) 167 u/L karanlıkta ksantin oksidaz ilave edildi.

6) 15-20 dk 25°C de karanlıkta inkübe et (su banyosunda) inkübasyon esnasında renk değişimini kontrol edildi. Ayrıca inhibisyonu durdurmadan önce (bakır klorür eklemek) standartın birkaç tanesi ile okuma yaparak inhibisyonun %30-65 aralığında olup olmadığı kontrol edilmesi önerilir.

7) 0,5 ml bakır klorür(0,8 mM) ilave edildi.

Bu pipetlemlerle küvette okumak için yaklaşık 2 ml lik bir numunemiz olmaktadır.

1) Küvette yada eliza pleytine numuneler aktarılarak okundu.

2) Eliza pleyti 560 nm de okundu.

Sonuçların hesaplanması:

% inhibisyon aşağıdaki formüle göre yapıldı.

%inhibisyon = ((kör abs-numune abs)/kör abs)X100

5.4.4. CAT Tayini

5.4.4.1. Dokuda CAT Tayini

SOD tayininde kullanılan homojenat kullanıldı. CAT aktivitesinin tayininde Aebi'nin metodu kullanıldı (110).

Kullanılan Çözeltiler:

1. Fosfat tamponu (pH=7,0; 50 mM): 6,81 g KH_2PO_4 deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. 8,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve gerektiğinde asit veya baz ilavesi yapılarak pH=7,0 'ye ayarlandı.

2. Hidrojen Peroksit: 240 μl %30'luk H_2O_2 'den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 ml 'ye tamamlandı (günlük hazırlandı).

Deneyin yapılışı:

Doku homojenatları fosfat tamponu ile 3 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu.

Fosfat Tamponu	750 μl (Kör, ml)-----	(Numune, ml)
Numune	1500 μl (Kör, ml)	1500 μl (Numune, ml)
H_2O_2	----- (Kör, ml)	750 μl (Numune, ml)

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 0,015 ile 0,100 arasında olmasına dikkat edildi. Eğer bu aralıkta düşüş olmazsa H_2O_2 'nin konsantrasyonu yeniden ayarlanmalıdır.

Katalaz aktivite tayininde birinci mertebede reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. 10 sn'lik aralık için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

$$k = (2,3/10) \times \log(A1/A2) \text{ s}^{-1}$$

A1= Başlangıç Absorbansı

A2= 10 s sonraki absorbans

Yukarıdaki formüle göre bulunan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı. Ardından testis dokularında mg protein başına katalaz aktivitesi hesaplandı (k/mg protein).

5.4.4.2. Plazmada CAT Tayini

Dokuda uygulanan işlemler ve çözeltiler kullanıldı ve numuneler 20 kat seyreltildi.

5.4.5. GP-x Tayini

5.4.5.1. Dokuda GP-x Tayini

SOD tayininde kullanılan homojenat kullanıldı. Cayman marka katalog no= 703102 numaralı kitin protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

5.4.5.2. Plazmada GP-x Tayini

Cayman marka katalog no= 703102 numaralı kitin protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

5.4.6. Protein Karbonil Tayini

5.4.6.1. Dokuda Protein Karbonil Tayini

pH'sı 6.7 olan 1mM EDTA içeren sodyum tamponunda doku homojenatı hazırlandı. Cayman marka katalog no= 10005020 numaralı kitin protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

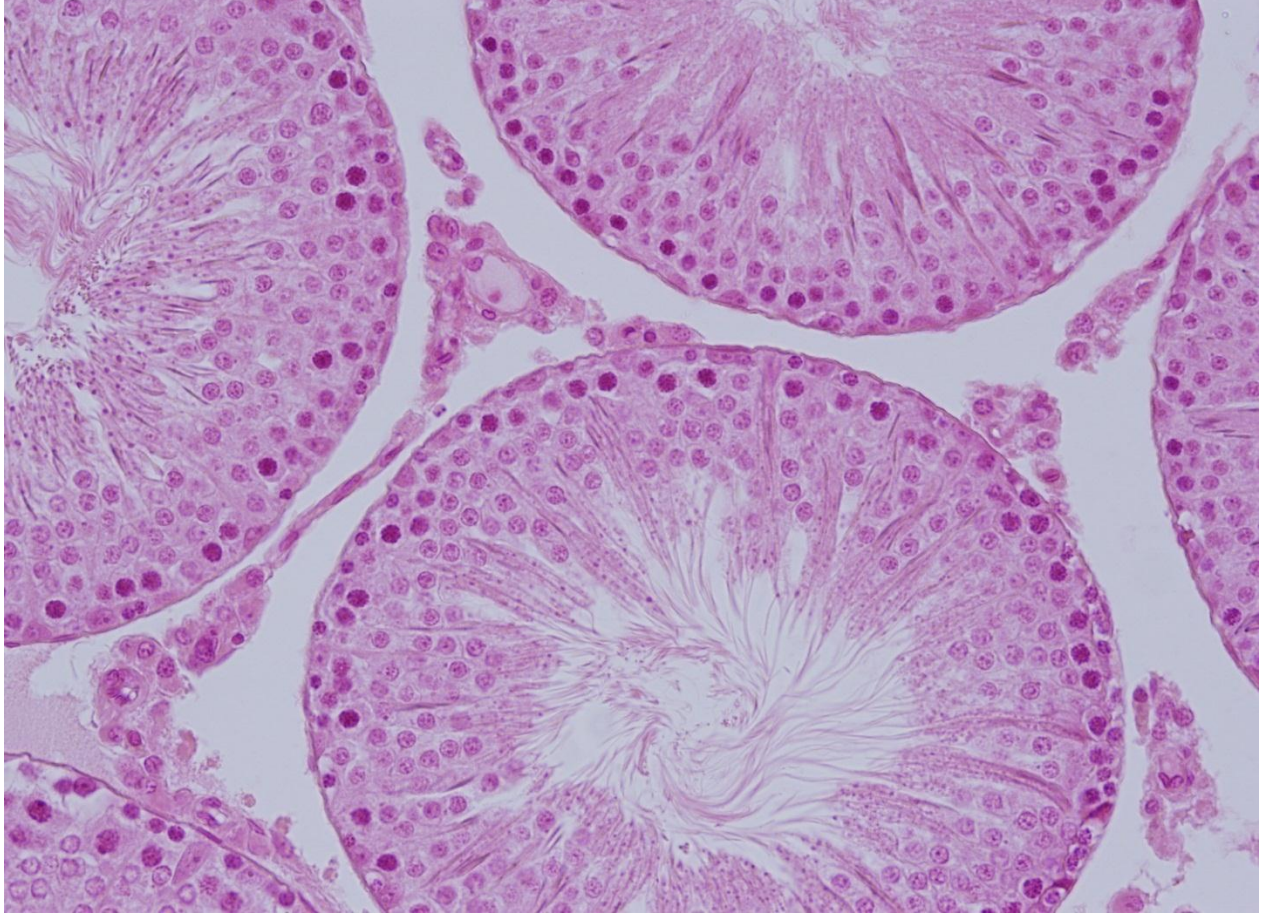
5.5. Verilerin İstatiksel Analizi

İstatistiksel analiz yapılırken gruplar arası karşılaştırma sonuçları için Mann-Whitney U testi, grup içi dağılım sonuçları Kruskal Wallis testiyle elde edildi. Hata kat sayısı 0,05'den küçük olan değerler ($p < 0,05$) anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Histolojik Bulgular

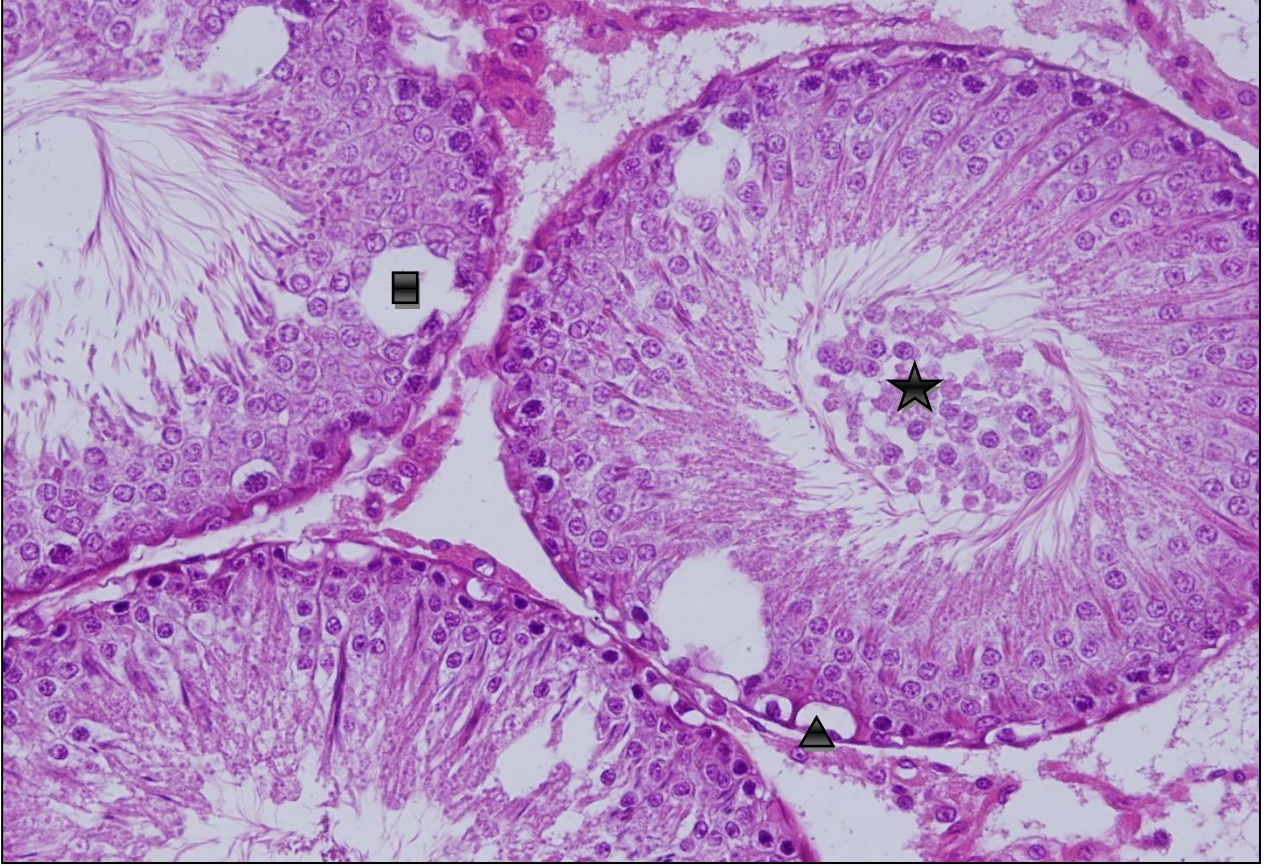
Kontrol grubu sıçanlarda, seminifer tübüller içindeki germinal hücrelerin normal döngüde seyrettiği, interstisyel alan dokusunun bütünlüğünü koruduğu gözlemlendi (Resim3).



Resim 3.Kontrol Grubu. Mikrofotografi X400. H.E resmi

MTX grubuna ait seminifer tübüllerin lümenine daha fazla sayıda immatür germinal hücrelerin döküldüğü, Sertoli hücreleri ile spermatogoniumlar arasında açılmalar ve germinal epitelde yer yer vakuolizasyon olduğu görüldü (Resim 4). MTX+Mel grubundaki seminifer tübüllerde Sertoli hücresi ve spermatogonyum arasındaki açılmaların ve vakuolizasyonun belirgin derecede azaldığı, spermatogenik hücrelerin yapısının korunduğu izlendi (Resim 5). Etanol grubunda, MTX grubuna göre daha az miktarda Sertoli hücresiyle spermatogonyum arasında açılma, seminifer tübüllerin lümenine dökülen immatür germinal hücreler ve germinal epitelde vakuolizasyon görüldü (Resim 6). Melatonin grubundaki seminifer tübüller

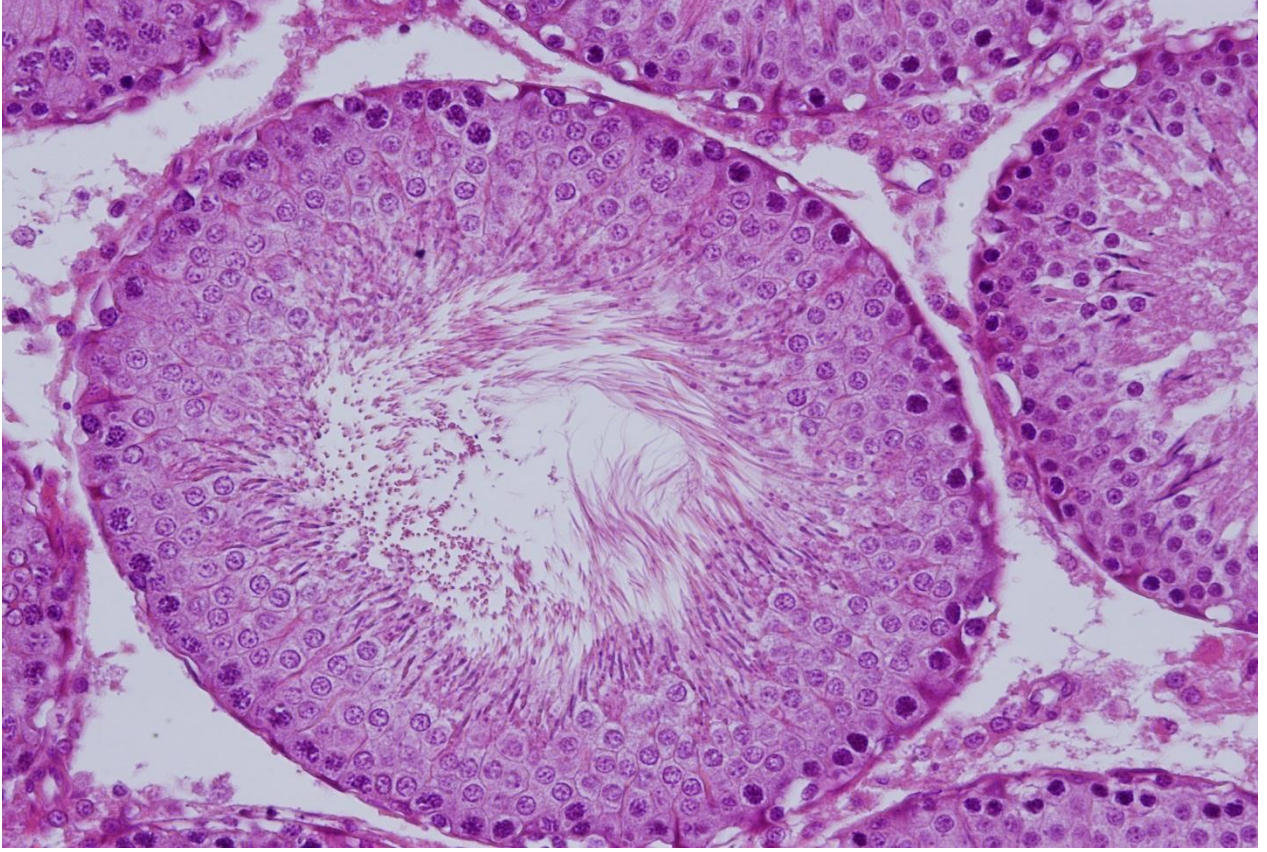
kontrol grubuna benzer şekilde spermatogenik hücre döngüsünün normal biçimde seyrettiği ve tübül yapısı bütünlüğünün korunduğu izlendi (Resim 7).



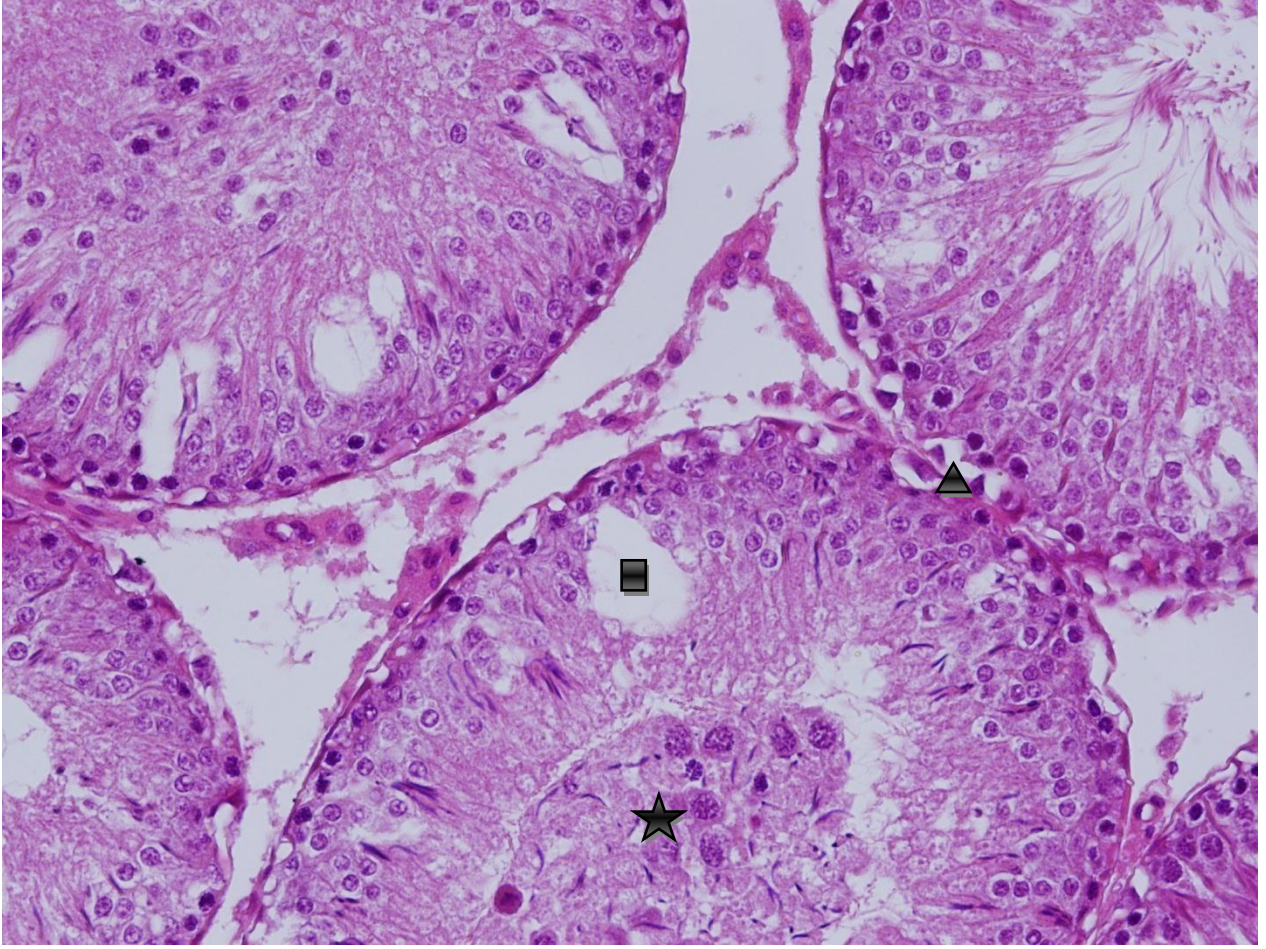
Resim4.MTX Grubu. Mikrofotografi X400. H.E resmi

■ = Vakuolizasyon ★ = Lümeneye dökülmüş olan olgunlaşmamış germinal hücreler

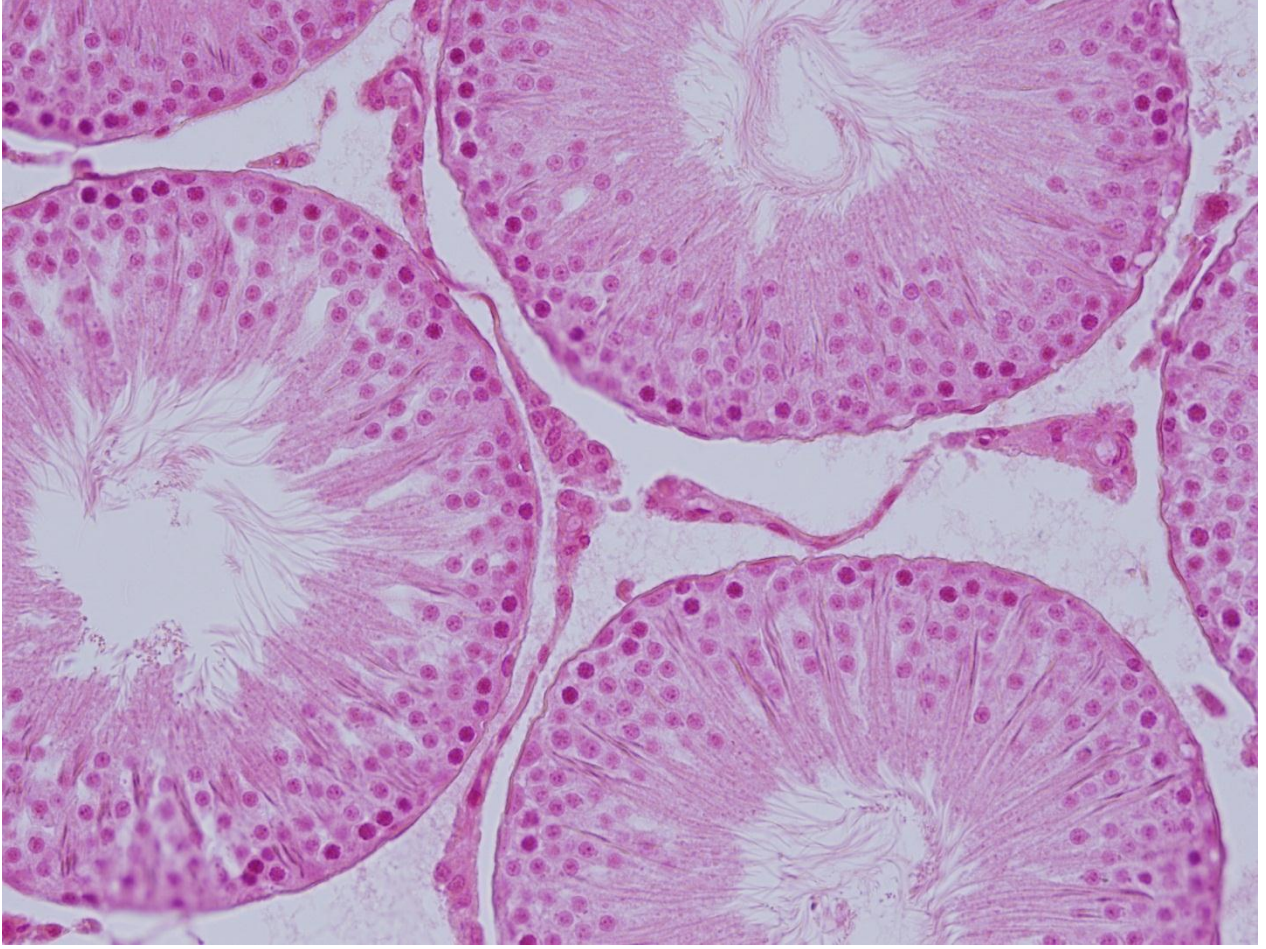
▲ = Sertoli hücresiyle spermatogonium arasında açılma



Resim 5.MTX+Mel Grubu. Mikrotografi X400. H.E resmi



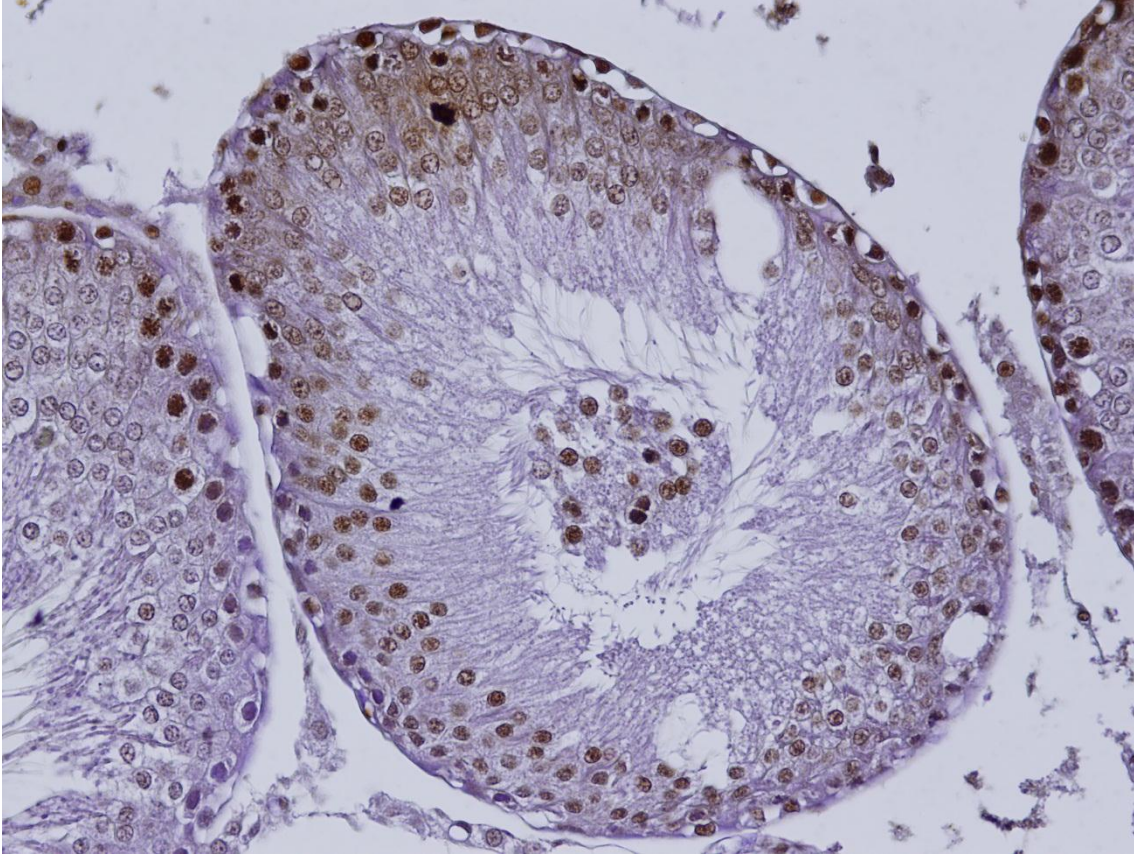
Resim 6.Etanol Grubu. Mikrofotografi X400. H.E resmi



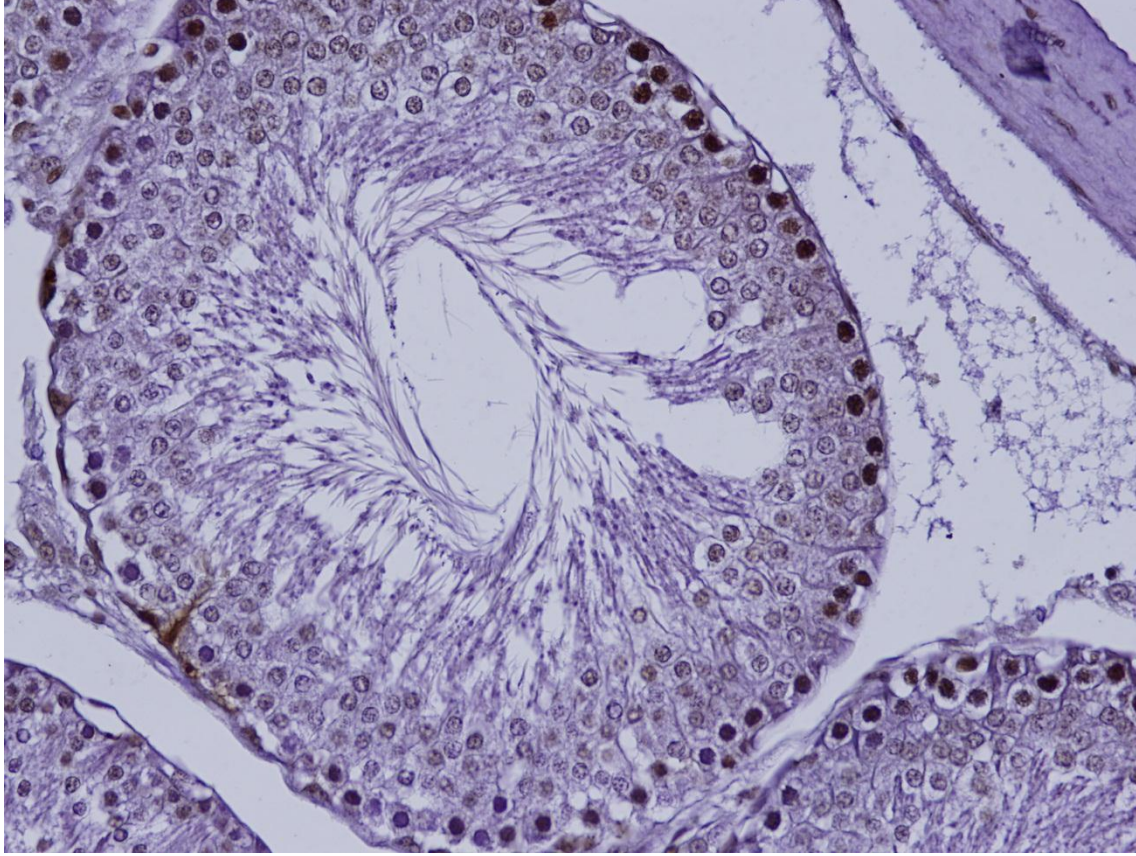
Resim 7. Mel Grubu. Mikrotografi X400. H.E resmi

6.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

TUNEL metoduyla DAB ve hematoksilene boyanan dokularda apoptoza uğrayan hücrelerin kahverengiye, canlı hücrelerin ise mor renge boyandığı gözlemlendi. X40'lık büyütmede sayılan AI, germinal epitel kalınlığı, tübül çapı ve lümenine dökülmüş immatür germinal hücre içeren tübüller sayıldı ve istatistiksel analizler yapıldı. İstatistiksel analizler sonucu seminifer tübül çapları, AI, germinal epitel kalınlığı ve lümenine immatür germinal hücre dökülen seminifer tübül sayısının grup içi dağılımları istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulundu. MTX grubundakontrol grubuna göre seminifer tübül çapları ve germinal epitel kalınlığı anlamlı olarak azalmış, apoptoz indeksi ve lümenine immatür germinal hücre dökülen seminifer tübül sayısı anlamlı olarak artmıştı. MTX+Mel grubunda AI ve lümenine immatür germinal hücre dökülen seminifer tübül sayısı MTX ve Etanol gruplarına göre anlamlı şekilde azalmış, germinal epitel kalınlığı ise anlamlı şekilde artmıştı.



Resim 8. MTX Mikrotografi X400, DAB boyama resmi



Resim 9. MTX+Mel Grubu Mikrotografi X400, DAB boyama resmi

Tablo 2. Histolojik değerlendirmeler tablosu

Gruplar	Lümenine Germinal Hücre Tübül Sayısı (%)	İmmatür Dökülen	AI (%)	Tübül Çapı (µm)	Germinal Kalınlığı (µm)	Epitel
Kontrol	5,13 ± 0,31		2,1567 ± 0,65	273,54 ± 7,97	93,2740 ± 5,32	
MTX	59,8333 ^b ± 3,25		52,2667 ^b ± 7,18	248,94 ^a ± 18,47	51,1383 ^a ± 3,80	
Mel	6,4517 ± 0,27		2,8000 ± 0,14	262,05 ± 13,87	89,2367 ± 3,78	
MTX+Mel	30,3183 ^{c,e} ± 1,95		36,6500 ^{c,e} ± 1,18	269,48 ± 16,87	87,2067 ^{d,f} ± 6,89	
Etanol	43,1500 ± 3,76		43,5167 ± 2,89	268,90 ± 15,58	67,5400 ± 5,47	

a = MTX grubu değerleri Kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. (p< 0,05)

b = MTX grubundaki değerler Kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. (p< 0,05)

c = MTX+Mel grubundaki değerler MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. (p< 0,05)

d = MTX+Mel grubundaki değerler MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. (p< 0,05)

e = MTX+Mel grubundaki değerler Etanol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. (p< 0,05)

f = MTX+Mel grubundaki değerler Etanol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. (p< 0,05)

6.3. Biyokimyasal Bulgular

Testis dokusu üzerinde yapılan biyokimyasal analizlerin Mann-Whitney U testine göre değerlerendirilmesi sonucu; MTX grubunun MDA ve GP-x değerleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı, SOD ve CAT değerlerinin ise anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. MTX ve MTX+Mel arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda protein karbonilin MTX grubunda anlamlı bir şekilde arttığı diğer parametrelerin ise anlamsız olduğu görüldü. Kruskal Wallis testine göre dokuda incelenen parametreler açısından her grup içindeki dağılımı anlamlı olduğu görüldü.

Kan plazmasında bakılan biyokimyasal parametrelerde ise MTX grubundaki GSH-Px değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış bulundu. MTX+Mel grubundaki GSH-Px değerleri MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde arttı. Etanol grubunda ise GSH-Px değerleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştı. Kruskal Wallis testine göre plazma GSH-Px değerlerinin grup içindeki dağılımları anlamlı idi.

Tablo 3. Testis dokusundaki biyokimyasal değerlendirmeler tablosu

Gruplar	MDA (nmol/g doku)	SOD (ünite/gr protein)	CAT (k/g protein)	GSH-Px (EU/g protein)	Protein Karbonil (nmol/mg protein)
Kontrol	1924,97 ±197,7	0,041 ±0,03	30,77 ±13,2	299,88 ±195,34	572,78 ±131,23
MTX	2810,31 ^a ±566,5	2,078 ^b ±0,06	8,80 ^b ±1,75	1709,70 ^a ±699,38	671,57 ±306,04
MTX+Mel	2214,81 ±696,8	1,400 ±1,80	13,60 ±8,70	1204,75 ±789,26	327,06 ^c ±148,55
Mel	2086,63 ±413,5	0,413 ±0,27	20,91 ±6,81	344,70 ±105,96	484,74 ±150,18
Etanol	2476,68 ±464,2	2,593 ±0,61	15,43 ±5,43	1371,76 ±607,36	293,29 ±79,32

a= MTX grubundaki değerler Kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. (p< 0,05)

b= MTX grubundaki değerler Kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. (p< 0,05)

c= MTX+Mel grubundaki değerler MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. (p< 0,05)

Tablo 4. Kan plazmasındaki biyokimyasal değerlendirmeler tablosu

Gruplar	MDA (nmol/ml)	SOD (ünite/g protein)	CAT (k)	GSH-Px (EU/ml)
Kontrol	2,084±0,086	1,268±0,198	0,0157±0,0088	48,614±7,096
MTX	2,274±0,582	1,070±0,564	0,0117±,0056	10,722 ^a ±5,002
MTX + Mel	2,148±0,190	0,756±0,569	0,0215±0,0178	32,497 ^b ±13,118
Mel	2,022±0,048	1,020±0,779	0,0115±0,00750	20,259±6,04
Etanol	2,220±0,265	1,128±0,490	0,0156±0,01019	5,119 ^d ±2,298

a = MTX

grubundaki değerler Kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. (p< 0,05)

b = MTX+Mel grubundaki değerler MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. (p< 0,05)

c = MTX+Mel grubundaki değerler MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır.(p<0,05)

d = Etanol grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır.(p< 0,05)

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser kemoterapisi için kullanılan çoğu ilacın, çoklu organ sistemlerinde toksik yan etkiler ürettiği bilinmektedir (1). Sisplatin ve adriamisin gibi antitümör ilaçların erkek sıçanlara uygulanması, eşey hücrelerinin dökülmesi ve dejenerasyonuna, seminifer tübül çapında ve eşey hücre kalınlığında azalmaya neden olmaktadır (25). Bu yüzden erkek eşey hücrelerinin üremesi, kendiliğinden yenilenebilen kök hücrelerin devamlılığına ve bu kök hücrelerin spermatogenetik hücrelere farklanmasına bağlıdır (25).

Testisin germinal epitelinin sitotoksik ilaçların hasarına karşı duyarlı olduğu bildirilmektedir (25,33). MTX bir folik asit antagonistidir ve uzun yıllardır antikanser ilacı olarak kullanılmaktadır (35).

Russel ve Russel kemoterapi ilaçlarının testis hücresel içeriğini önemli derecede değiştirdiğini. Primer ve sekonder spermatositlerde normal DNA sentezi için gerekli olan enzimi (dihidrofolat redüktaz), dolayısıyla germinal hücrelerin DNA'larının replike edilmesini engellediklerini bildirmişlerdir (91). DNA çaprazlaşmasının engellenmesi, protein sentezi ve S fazındaki hücre döngüsünün önlenmesine, hücreden hücreye etkileşimin ve hücre farklılaşmasının engellenmesine neden olmaktadır (92).

Bu çalışmada MTX verilen grupta kontrol grubuna göre seminifer tübül çapının ve germinal epitel kalınlığının anlamlı şekilde azaldığı belirlendi. MTX grubundaki germinal epitelde, daha fazla miktarda spermatogonyumlar ile Sertoli hücreleri arasında açılmalar, germinal epitelde vakuolizasyon ve lümenine immatür germinal hücrelerin döküldüğü seminifer tübül izlendi. Seminifer tübül lümenine immatür germinal hücrelerin döküldüğü tübül sayısının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, germinal epitel kalınlığının azaldığı belirlendi. Bu grupta germinal epiteldeki hücre kayıplarının arttığı tespit edildi. Bu bulgular germinal epitelde önemli derecede hasar oluştuğunu göstermektedir.

Prahalathan ve ark. (1) ile Amin ve ark. (93) antikanser ilaçların eşey hücrelerinde apoptoza neden olduğunu bildirmişlerdir. Apoptoz, antikanser ilaçların spermatogenetik hücrelerde oluşturduğu hasarın önemli bir belirticidir (93).

Çalışmamızda MTX'in germ hücreleri DNA'sına verdiği zararı ve sitotoksitesini belirlemek amacıyla TUNEL metoduyla apoptoz belirlendi. Elde ettiğimiz veriler, MTX

grubundaki AI'nın diğer gruplara göre anlamlı olarak arttığını göstermiştir. MTX germinal hücrelerin DNA'sına zarar vererek sitotoksositeye neden olmaktadır (1, 93).

Bunun aksine, MTX+Mel grubundaki AI ise MTX ve Etanol gruplarına göre anlamlı olarak azalmıştı. Bu da bize Mel'in, MTX'in oluşturduğu apoptotik etkiyi hafiflettiğini göstermektedir. MTX'in testiste oluşturduğu toksik etkiler daha önceki çalışmalarda da tanımlanmıştır (2, 3).

Birçok araştırmacı oksidatif stresin oluşturduğu testis hasarını belirlemek amacıyla oksidatif stresin bir indikatörü olan MDA seviyesini ölçmüşlerdir (94). MDA seviyeleri, LPO'nun artmasından dolayı serbest radikal üretilmesinde önemli bir belirteçdir (95). MTX'in uygulandığı bireylerde kan, karaciğer, testis ve böbrek MDA seviyelerini arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (21, 30).

Armağan ve ark. yaptıkları çalışmada tek doz MTX uygulaması sonucu, testislerde oksidatif stresin arttığını belirlemişlerdir (21). Oksidatif streserek üreme hücrelerinin yapısında hasara yol açmaktadır (33, 34).

Bu çalışmada LPO'nun indikatörü olan MDA'yı ölçerek oksidatif stresi belirledik. MTX grubunda MDA değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı; dolayısıyla MTX'in LPO'yu artırarak oksidatif stres oluşturduğunu saptadık.

Bazı spesifik enzimler oksidatif strese üreme kabiliyetinin sürdürülebilmesinde önemli role sahiptirler ve oksidatif strese karşı koruyucu özellik taşırlar (116). Bu enzimler SOD, GSH-Px, glutatyon redüktaz ve CAT içerirler. Serbest radikalleri veya reaktif oksijenleri radikal olmayan ara maddelere dönüştürürler (21). SOD ve GSH-Px erkek üreme organlarında zararlı ROS'ları süpürmede önemli enzimlerdir (96). Büyük farklılık gösteren çeşitli ksenobiyotikler, testislerde oksidatif stresi indükleyerek antioksidan mekanizmaları durdururlar (97).

Melatonin, beyin epifizi tarafından salınan baş indolamin kaynağıdır, etkili bir antioksidan olarak gösterilir ve serbest radikal tutucusudur (98, 99, 100).

Bu hormon yüksek lipofilitesi ve küçük boyutu nedeniyle biyolojik membranlardan kolayca geçer, böylece hücrenin tüm kompartmanlarına ulaşır. Melatoninin DNA, yağlar ve proteinlere karşı olan koruyucu etkisi, yapısal bütünlüğün korunmasını sağlar (101, 102, 103).

Melatonin; hidroksil (4, 5) ve peroksil radikalleri (6), tekli oksijen (7.) ve nitrik oksit (8) içeren ROS'lara karşı güçlü bir süpürücüdür. Diğer antioksidanlara benzer şekilde, melatonin de SOD, CAT ve GSH-Px antoksidan enzimlerini uyarmaktadır (55, 56, 57).

Melatoninin diğer çoğu antioksidanlar dışında iki önemli düzenleyici özelliği vardır. Bunlardan birincisi, tek elektron oksidasyonu yapan çoğu serbest radikal süpürücülerinden farklı olarak iki elektron oksidasyonu oluşturmaktadır. İkincisi ise hem lipid hemde sulu ortamda kolayca çözünebilmesi ve kan-testis bariyerinden kolayca geçerek germinal epiteli korumasıdır (97).

Çalışmamızda MTX grubunun GSH-Px değerleri hem testis doku örneklerinde hem de kan plazmasında artmıştır. Bu sonuç enzimatik antioksidan savunma sisteminin devreye girerek MTX' e karşı bir savunma hattı oluşturduğunu göstermektedir.

MTX + Mel grubunda MTX' e göre GSH-Px değerlerinin testiste anlamlı olarak değişmemesine rağmen, protein karbonil seviyesinin hem testiste hem de kan plazmasında anlamlı bir şekilde azalmış olması, melatoninin MTX' in meydana getirdiği LPO etkisini azalttığını ortaya koymaktadır. Bu LPO değerlerinin azalması da melatoninin antioksidan etkiyle germinal epitelde düzelmeyi sağladığını göstermektedir.

Melatoninin çözülmesinde kullandığımız etanolün hem histolojik hem de biyokimyasal bulguları MTX grubuyla benzer olarak bulundu. Etanolün MDA seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırması testiste oksidatif hasara neden olduğunu göstermektedir.

8. SONUÇLAR

Bu çalışmanın sonuçları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

A) Sadece MTX verilen grupta:

1. Kontrol grubuna göre germinal epitelde spermatogonyumlar ile Sertoli hücreleri arasında açılma,
2. Vakuolizasyon,
3. Seminifer tübül lümenine immatür germ hücreleri dökülmesinde AI'de artış,
4. Doku MDA, LPO ve GSH-Px seviyelerinde artış,
5. Epitel kalınlığında, kontrol grubuna göre doku CAT ve SOD seviyelerinde azalma belirlendi.

B) MTX+Mel verilen grupta:

1. MTX grubuna göre seminifer tübül lümenine immatür germ hücreleri dökülmesinde, AI' de azalma
2. Doku MDA ve LPO' da azalma görüldü.

C. Etanol grubunda

1. Kontrol grubuna göre kan GSH-Px seviyelerinde azalma,
2. MTX+Mel grubuna göre AI artış
3. MTX+Mel grubuna göre germinal epitelde azalma izlendi.

Bulgularımız MTX'in testiste oksidatif hasar oluşturarak yapısal bozukluklara neden olduğunu; melatoninin antioksidan etkiyle, MTX'in testiste oluşturduğu bu oksidatif hasarı düzelttiğini göstermektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P (2005). Protective effect of lipoic acid on adriamycin-induced testicular toxicity. *Clin Chim Acta* 360: 160–166.
2. Abraham P, Kolli VK, Rabi S (2010). Melatonin attenuates methotrexate-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Cell Biochem Funct* 28: 426–433.
3. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yeğen BC, Sener G (2003). Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J. Pineal Res.* 34: 282-287.
4. Reiter RJ, Tan DX, Qi WB (1998). Suppression of oxygen toxicity by melatonin. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 19: 575-581.
5. Bromme HJ, Morke W, Peschke D, et al (2000). Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. *J Pineal Res* 29: 201-208.
6. Pieri C, Marra M, Moroni F, et al (1994). Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 55: 271-276.
7. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, et al (1996). Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatogastroenterology* 43: 898-905.
8. Noda Y, Mori A, Liburdy R, Packer L (1999). Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. *J Pineal Res* 27: 159-163.
9. Yıldırım M (2003). İnsan Anatomisi. Altıncı Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul; 226-227.
10. Persaud M, Moore KL (2002). Human Embriology. 6th ed. Çevirenler: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul, 323-325.
11. Thompson MW, McInnes RR, Willar HE (1991) Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders.
12. Berta P, Hakins JR, Sinclair AH et al. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348: 448. DiGeorge AM (1996). Hermaphroditism. Nelson Textbook of Pediatrics (Ed: Behrman RE, Kliegman RM, Arvin AM). 15th ed. Philadelphia: WB Saunders.

13. Bloom W, Fawcett DW (1975). Textbook of histology. Philadelphia, 796-834.
14. Aksel S, Beksac S (1993). Reproduction Endocrinology and Infertility. Serial No:1. Ankara: Medical Network Publication, 42-54.
15. Fawcett DW. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. in: Greep RO, Astwood EB, eds. Handbook of Physiology, Sect 7: Endocrinology, Male Reproductive System. Washington DC: American Physiological Society, 1975 5: 21-55.
16. Burgos MH, Vitale-Calpe R, Aoki A (1970). Fine structure of the testis and its functional significance. in: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL, eds. The testis. New York: Academic Press 551-649.
17. Maddocks S, Setchell BP. The physiology of the endocrine testis. Oxf Rev Reprod Biology, 1988. 10: 53-123. Griswold MD, Morales C, Sylvester SR. Molecular biology of the Sertoli cell. Oxf Rev Reprod Biology, 1988 10: 124-61.
18. Neaves WB. Leydig cells. in: Greep RO, Koblinsky MA. Frontiers in Reproduction and Fertility Control. Massachusetts: MIT Press, 1977: 321-37.
19. Ganong WF, (2001). Review of Medical Physiology. Tıbbi Fizyoloji 20th ed. Çeviren: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, 398-401.
20. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, and Otlu A (2009). Antiapoptotic and antioxidant effects of betacarotene against methotrexate-induced testicular injury. Fertil Steril 92: 2028–2033.
21. Armagan A, Uzar E, Uz E, et al (2008). Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. Hum Exp Toxicol 27: 547–552.
22. Cole, PD, Alcaraz, MJ, Smith, AK, Tan, J, et al (2006). Pharmacodynamic properties of methotrexate and aminotrexate during weekly therapy. Cancer Chemother Pharmacol 57: 826–834.
23. Ng C, Xiao YD, Lum BL, and Han YH (2005). Quantitative structure-activity relationships of methotrexate and methotrexate analogues transported by the rat multispecific resistance-associated protein 2 (rMrp2). Eur J Pharm Sci 26: 405–413.

24. Widemann BC, Adamson PC (2006). Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* 11: 694–703.
25. Kim JC, Kim KH, Chung MK (1999). Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reprod Toxicol* 13: 391–397.
26. Uzar E, Koyuncuoglu HR, Uz E, Yilmaz HR, et al (2006). The activities of antioxidant enzymes and the level of malondialdehyde in cerebellum of rats subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem* 63: 292–298.
27. Uzar E, Sahin O, Koyuncuoglu HR, Uz E, et al (2006). The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology* 218: 125–133.
28. Miletova P, Kaemingk K, Hockenberry M, et al (2005). Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res* 6: 187–195.
29. Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB (1989). Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct* 16: 283–293.
30. Jahovic N, Sener G, Cevik H, Ersoy Y, et al (2004). Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct* 22: 169–178, 32. Miyazono Y, Gao F, Horie T (2004). Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol* 39: 1119–1127.
31. Naziroglu M. Enhanced testicular antioxidant capacity in streptozotocin-induced diabetic rats: protective role of vitamins C and E and selenium (2003). *Biol Trace Elem Res* 94: 61–72.
32. Oktar S, Gokce A, Aydin M, Davarci M, Meydan S, Ozturk OH, Koc A, et al. (2010). Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. *Toxicology and Industrial Health* 26(7): 433–438.
33. Ateşşahin A, Şahna E, Türk G, Çeribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A, et al (2006). Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res* 41: 21–7.

34. Ateş Şahin A, Karahan İ, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Çeribaşı AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats (2006). *Reprod Toxicol* 21: 42–47.
35. Sener G, Eksioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, et al (2006). Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol* 542: 170–178.
36. Kokcam I, Naziroğlu M (2002). Effects of vitamin E supplementation on blood antioxidants levels in patients with Behçet's disease. *Clin Biochem* 35: 633–639.
37. Jahuson FE, Doubek WG, Tolman KC, Janney CG (1993). Testicular cytotoxicity of intravenous procarbazine in rats. *Surg Oncol* 2: 77–81. 42. Jordan, RL, Wilson, JG, Schumacher, HJ (1977). Embryo toxicity of the folate antagonist methotrexate in rat and rabbits. *Teratology* 15: 73–97.
38. Sussman A, Leonard JM (1980). Psoriasis, methotrexate and oligospermia. *Arch Dermatol* 116: 215–217. 44 Morris LF, Harrod MJ, Menter MA, et al (1993). Methotrexate and reproduction in men: case report and recommendations. *J Am Acad Dermatol* 29: 913–916.
39. Bayram M, Ozogul C, Dursun A, Ercan ZS, Isik I, and 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.
40. Neuman MG, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Malkewcz IM, Shear NH (1999). Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatotoxicity. *Clin Biochem* 32: 519–536.
41. Ganong WF, (2001). Review of Medical Physiology. Tıbbi Fizyoloji 20th ed. Çeviren: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul., 448-449.
42. Melatonin. *Alternative Medicine Review*. 2005;10: 326-336.
43. Iuvone PM, Brown AD, Haque R, et al (2002). Retinal melatonin production: role of proteasomal proteolysis in circadian and photic control of arylalkylamine N-acetyltransferase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 564-572.

44. Conti A, Conconi S, Hertens E, et al (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 28: 193-202.
45. Aust S, Thalhammer T, Humpeler S, et al (2004). The melatonin receptor subtype MT1 is expressed in human gallbladder epithelia. *J Pineal Res* 36: 43-48.
46. Lee PP, Pang SF (1993). Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol Signals* 2: 181-193.
47. Bergiannaki JD, Soldatos CR, Paparrigopoulos TJ, et al (1995). Low and high melatonin secretors among healthy individuals. *J Pineal Res* 18: 159-164.
48. Rousseau A, Petren S, Plannthin J, et al (1999). Serum and cerebrospinal fluid concentrations of melatonin: a pilot study in healthy male volunteers. *J Neural Transm* 106:883-888.
49. Vakkuri O (1985). Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. *Acta Physiol Scand* 124:409-412.) ve safra (59. Tan D, Manchester LC, Reiter RJ, et al (1999). High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci* 65: 2523-2529.
50. Tan D, Manchester LC, Reiter RJ, et al (1999). High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci* 65: 2523-2529. 59. Tan D, Manchester LC, Reiter RJ, et al (1999). High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci* 65: 2523-2529.
51. Morin D, Simon N, Depres-Brummer P, et al (1997). Melatonin high-affinity binding to alpha-1-acid glycoprotein in human serum. *Pharmacology* 54: 271-275.
52. Cos S, Sanchez-Barcelo EJ (1994). Differences between pulsatile or continuous exposure to melatonin on MCF-7 human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett* 85: 105-109.
53. Banerjee S, Margulis L (1973). Mitotic arrest by melatonin. *Exp Cell Res* 78: 314-318.
54. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT (2002). Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2: 113-132.

55. Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, et al (1996). Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 10: 882-890.
56. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, et al (1995). Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 26: 497-502.
57. Montilla P, Tunc I, Munoz MC, et al (1997). Antioxidative effect of melatonin in rat brain oxidative stress induced by Adriamycin. *Rev Esp Fisiol* 53: 301-305.
58. Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, et al (2001). Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. *J Pharm Pharmacol* 53: 1393-1401.
59. Montilla P, Cruz A, Padillo FJ, et al (2001). Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats. *J Pineal Res* 31: 138-144.
60. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, et al (2000). Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 917:376-386.
61. Bilici D, Akpinar E, Kiziltunc A (2002). Protective effect of melatonin in carrageenan-induced acute local inflammation. *Pharmacol Res* 46: 133-139.
62. Lissoni P, Barni S, Meregalli S, et al (1995). Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: a phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic breast cancer patients progressing under tamoxifen alone. *Br J Cancer* 71: 854-856.
63. Lissoni P, Barni S, Ardizzoia A, et al (1992). Randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in advanced nonsmall cell lung cancer resistant to a first-line chemotherapy containing cisplatin. *Oncology* 49: 336-339.
64. Neri B, Fiorelli C, Moroni F, et al (1994). Modulation of human lymphoblastoid interferon activity by melatonin in metastatic renal cell carcinoma. A phase II study. *Cancer* 73: 3015-3019.
65. Aldeghi R, Lissoni P, Barni S, et al (1994). Low-dose interleukin-2 subcutaneous immunotherapy in association with the pineal hormone melatonin as a first-line therapy in locally advanced or metastatic hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 30A: 167-170.

66. Cochran CG (1991). Cellular injury by oxidants. *Am. J. Med.* 92: 235-305.
67. Brent JA, Rumack BH (1993b). Role of free radicals in toxic hepatic injury II: Are free radicals the cause of toxin induced liver injury? *Clin. Toxicol.* 31(1): 173-196.
68. Brent JA, Rumack BH (1993a). Role of free radicals in toxic hepatic injury I: Free radical Biochemistry. *Clin. Toxicol.* 31(1): 139-171.
69. Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.
70. Basaga HS (1990). Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell Biol.* 68: 989-998.
71. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia.* 37: 1233-1358.
72. Matés JM (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 153: 83-104.
73. Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidant: a personal view. *Nutr. Rev.* 52: 253-265.
74. Hogg N (1998). Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrin.* 16(4): 241-248.
75. Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49(3): 481-493.
76. Horton AA, Fairhurst S. (1987). Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC Crit. Rev. Tox.* 18: 27-69.
77. Halliwell B, Gutteridge JMC (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Mol. Aspects. Med.* 8: 89-193.
78. Niki E (1987). Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 44: 227-253.
79. Placer CA, Cushman LL, Johnson BC (1990). Estimation of product of lipid peroxidation (Malondyaldehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 16: 259-264.
80. Porter NA (1984). Chemistry of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 105: 273-283.

81. Reed DJ (1986). Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem. Pharmacol.* 35: 7-13.
82. Reed DJ, Fariss MW (1984). Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol. Rev.* 36: 25-33.
83. Sies H, Moss KM (1978). A role of mitochondrial glutathione peroxidases in modulating mitochondrial oxidations in liver. *Eur. J. Biochem.* 84: 377-83.
84. Reed DJ (1990). Glutathione: Toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 603-631.
85. Levine M (1986). New concepts in biology and biochemistry ascorbic acid. *N. Engl. J. Med.* 314: 892-895.
86. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003). Protein Carbonylation in human diseases. *Trend. Mol. Med.* 9: 169-176.
87. Stadtman ER, Levine RL (2003). Free radical- mediated oxidation of free amino acids and residues in proteins. *Amino Acids.* 25: 207-218.
88. Berlett BS, Stadtman ER (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272: 20313- 20316.
89. Levine RL (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 790-796.
90. Requena BS, Levine RL, Stadtman ER (2003). Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids.* 25: 221-226.
91. Russell LD, Russell JA (1991). Short-term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. *Am J Anat* 192: 142–168.
92. Wheeler GP (1962). Studies related to the mechanism of action cytotoxic alkylating agents: a review. *Cancer Res* 22: 651–688.
93. Amin A, Hamza AA, Kambal A, Daoud S (2008). Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian J Androl* 10: 291–297.

94. Gokce A, Oktar S, Koc A, Yonden Z (2010). Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. *Human and Experimental Toxicology* 000(00): 1-7.
95. Draper HH, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186: 421–431.
96. Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T (2003). Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J Androl* 5: 231–242.
97. Aitken RJ, Roman SD (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 1: 15–24.
98. Reiter RJ, Maestroni GJM (1999). Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. *J Mol Med* 77: 36–39.
99. Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Micali A, De Sarro A, Caputi AP (2000). Beneficial effects of melatonin in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *J Pineal Res* 28: 52–63.
100. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S (2001). Free radical-mediated molecular damage. *Ann NY Acad Sci* 939: 200–215.
101. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ (1993). Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1: 57–60.
102. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 7: 444–458.
103. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W (2001). Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. A review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 34: 237–256.

10. 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 Hasarına Karşı Melatoninin Antiapoptotik ve Antioksidan Etkileri"
Çalışmacılar : Yük.Lis.Öğr.Zehra TOPAL, Prof.Dr.Engin YENİLMEZ, Doç.Dr.Ahmet ALVER
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji ABD.

Etik Kurul Dosya No 2011/21	Etik Kurul Toplantı Tarihi 24.05.2011	Etik Kurul Toplantı No 2011/13	Etik Kurul Karar No 1
---	---	--	-------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN'ın başkanlığında "Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Melatoninin antiapoptotik ve Antioksidan Etkileri" 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. (24.05.2011)

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

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı:TOPAL Zehra

Uyruğu:T. C.

Telefon:04623257737

E-posta: zehratopall@gmail.com

Yazışma adresi: K.T. Ü. Tıp Fak. Temel Bilimler Binası C blok Histoloji ve Embriyoloji
AD. TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Ondokuzmayıs Üniversitesi	2009
Lise	Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi	2004

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR/BİLDİRİLER

1.Topal Z, Yenilmez E, Alver A (2012). Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Melatoninin Koruyucu Etkileri. Uluslararası Katılımlı XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Poster Bildiri (74).

ÖDÜLLER/TEŞVİKLER/BURSLAR

1. Topal Z, Yenilmez E, Alver A (2012). Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Melatoninin Koruyucu Etkileri. Uluslararası Katılımlı XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Poster Bildiri (74), Türkçe Bilim Dili Ödülü.

HOBİLER

Tiyatro, sinema, doğa yürüyüşleri, yüzme.