



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

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI
TESTİS HASARINA KARŞI BETA
GLUKAN'IN ETKİSİ**

Fidan KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

TRABZON – 2015

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 Fidan KOÇ 'un hazırladığı “Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Beta Glukan’ ın Etkisi” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca, kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU _____

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU _____

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ _____

Doç. Dr. Şafak ERSÖZ _____

Tarih: 25 /02 /2015

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

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür
Vekili

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi (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, kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

25 /02 /2015
Fidan KOÇ

İTHAF

*Bu yüksek lisans tezimi hayatıma ışık tutan, yol göstericim, hayatını çocuklarına
adamış rahmetli annem Hatuncuk KOÇ'a ithaf ediyorum.*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen ve hiçbir desteğini esirgemeyen KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi saygıdeğer hocam Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU' na, lisansüstü eğitimim boyunca bilgilerini ve deneyimlerini bizimle paylaşan KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Prof. Dr. Engin YENİLMEZ' e, eğitimimize katkıları ve bizimle paylaştıkları bilgiler için KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ersan ODACI, Prof. Dr. Esin YULUĞ ve Yrd. Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU' na, bu yüksek lisans vasıtasıyla tanıştığım ve hayatımın tüm aşamalarında yer almasından mutluluk duyacağım Araş. Gör. Dr. Ahmet Uğur AKMAN ve tezimde büyük emeği olan, yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Gökşen Derya REİS KÖSE' ye, yüksek lisans tezim vasıtasıyla tanıştığım yardımlaşmanın en güzel örneğini bana gösteren ve tezimin istatistik çalışmasında büyük emekleri geçen KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Nazım Ercüment BEYHUN' a ve Araş. Gör. Volkan KARABACAK' a, beraber başladığımız bu zorlu süreçte, her aşamada desteğini hissettiğim ve hayatımda olmalarından gurur duyduğum değerli arkadaşlarım Şeyma KURT ve Beyza AYAN' a, yüksek lisans eğitimlerini tamamlamış olmasına rağmen uzaktan bile yardımını esirgemeyen arkadaşlarım Gülsen YILMAZ, Melih KILIÇ ve Cansu ÖZYILMAZ' a, yine katkılarından dolayı doktora öğrencileri Sibel TÜREDİ ve Hatice HANCI' ya, bu zorlu süreçte varlığıyla bana destekçi olan ve hayatımın tüm anlarında yanımda olacağını bildiğim manevi kardeşim Didem PEKÇETİN' e, tez çalışmamı 11940 kod nolu proje olarak destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne ve son olarak yaşamımın her anında olduğu gibi bu süreçte de desteklerini, içten sevgilerini ve güvenlerini esirgemeyen aileme, karşılık beklemeden verdikleri sevgi ve gösterdikleri özveri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Testis Anatomisi	5
4.2. Testis Embriyolojisi	6
4.3. Testis Histolojisi	9
4.3.1. Seminifer Tübüller	9
4.3.1.1. Seminifer Tübül Epiteli	10
4.3.2. Sertoli Hücresi	10
4.3.3. Spermatogenik Hücreler (Germinal Hücreler = Germ Hücreleri)	12
4.3.3.1. Spermatogonyum (Gonosit)	13
4.3.3.2. Primer Spermatosit	14
4.3.3.3. Sekonder Spermatosit	14
4.3.3.4. Spermatid	15
4.3.3.5. Spermatozoon (Spermium)	15
4.3.4. Seminifer Epitelyum Siklusu	17
4.3.5. İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri	17
4.4. Apoptozis	19
4.5. Metotreksat	20
4.5.1. Metotreksatın Endikasyonları	23

4.5.2. Metotreksatın Yan Etkileri	23
4.6. Beta Glukan	24
4.6.1. Beta Glukanın Biyolojik Aktiviteleri	26
5. GEREÇ ve YÖNTEM	27
5.1 Deney Aşaması	27
5.1.1. Etik Kurul Onayı, Deney Hayvanlarının Temini, Bakımı ve Barınması	27
5.1.2. Çalışmada Kullanılan Gruplar ve Deneyin Uygulanması	28
5.2. Histolojik İşlemler	29
5.2.1. Doku Numunelerinin Elde Edilmesi	29
5.2.2. Bouin Fiksatifinin Hazırlanışı	30
5.2.3. Kesitlerin Alınması	31
5.2.4. Kesitlerin Hematoksilen ve Eozin (H.E.) ile Boyanması	31
5.3. İmmünohistokimyasal İşlemler ve Analizler	32
5.3.1. TUNEL Boyama	33
5.4. İstatistiksel Analiz	34
6. BULGULAR	35
6.1. Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Bulgular	35
6.1.1. Deney Gruplarının Vücut Ağırlıklarına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar	35
6.1.2. Deney Gruplarının Testis Ağırlıklarına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar	35
6.2. Morfometrik Bulgular	36
6.2.1. Seminifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığına Ait Bulgular	36
6.2.2. Johnsen Skorumu Sonuçları	37
6.3. Histopatolojik Değerlendirmeler	37
6.4. Tunel Bulguları	40
7. TARTIŞMA ve SONUÇLAR	43
8. KAYNAKLAR	47
9. ETİK KURUL ONAYI	54
10. ÖZGEÇMİŞ VE KİŞİSEL BİLGİLER	55

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Gruplar ve Gruplara Yapılan Uygulamalar	29
Tablo 2. Deney Gruplarının Deney Öncesi ve Deney Sonrası Vücut Ağırlıklarına Ait Ortalama ve Standart sapmalar	35
Tablo 3. Deney Gruplarının Testis Ağırlığına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar	36
Tablo 4. Deney Gruplarına Ait Morfometrik Ölçümlerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	36
Tablo 5. Deney Gruplarına Ait Johnsen Skorlama Sistemi Değerlendirme Sonuçları	37
Tablo 6. Deney Gruplarına Ait AI Değerlendirme Sonuçları	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Yolk kesesi Duvarında Oluşan Primordial Germ Hücrelerinin Konumunu Gösteren Üçüncü Haftanın Sonunda Bir Embriyo	7
Şekil 2. Sıçan Testislerinde Apoptotik Hücrelerin Hilal Şeklindeki Çekirdekleri	20
Şekil 3. Metotreksatın Kimyasal Yapısı	21
Şekil 4. Folik Asit Mekanizması	21
Şekil 5. Beta Glukanın Yapısı	24
Şekil 6. Ekmek Mayası (<i>Saccharomyces Cerevisia</i>)'nın Hücre Duvarının Yapısı	25

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Seminifer Tübülün Genel Histolojik Yapısı.	13
Resim 2. Sıçanların Bakımı ve Barınmasında Kullanılan Tip III Kafesler (A, B).	27
Resim 3. Sıçanlara Gavaj Yoluyla Beta Glukanın Verilmesi (A, B).	29
Resim 4. Testis Çıkarılışı (A). Testisin Makroskopik Görüntüsü (B).	30
Resim 5. Kontrol Grubuna (A) ve BG Grubuna (B) Ait Testis Dokusu.	38
Resim 6. MTX Grubuna Ait Testis Dokusu.	39
Resim 7. MTX+ BG Grubuna Ait Testis Dokusu.	39
Resim 8. Kontrol Grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (←) görülmektedir (TUNEL, X400).	40
Resim 9. BG Grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (←) görülmektedir (TUNEL, X400).	41
Resim 10. MTX Grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (←) görülmektedir (TUNEL, X400).	41
Resim 11. MTX + BG Grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (←) görülmektedir (TUNEL, X400).	42

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AI	Apoptotik İndeks
BG	Beta Glukan
DHF	Dihidrofolat
DHFR	Dihidrofolat redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
H.E.	Hematoksilen ve Eozin
IM	Işık Mikroskobu
i.p	İntraperitoneal
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LH	Luteinleştirici Hormon
MTX	Metotreksat
PAS	Periyodik Asit Schiff
PBS	Phosphate Buffer Solution
pH	Power of Hydrogen
RA	Romatoid Artrid
RNA	Ribonükleik Asit
SER	Düz Endoplazmik Retikulum
SF	Serum Fizyolojik
SRY	Sex-Determining Region of the Y Chromosom
TDF	Testis Belirleyici Faktör
THF	Tetrahidrofolat
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Deoxyuridine Triphosphate Nick End Labeling Assay

Simgeler

cm	Santimetre
°C	Santigrat derece

gr	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
%	Yüzde

Formüller

H₂O₂	Hidrojen peroksit
-----------------------------------	-------------------

1. ÖZET

Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Beta Glukan'ın Etkisi

Bu çalışmada, kemoterapötik bir ajan olan Metotreksat ile güçlü bir antioksidan ve immunmodülatör olduğu bilinen beta glukanın sıçan testisinde oluşturduğu histolojik değişikliklerin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada 24 adet *Sprague Dawley* erkek sıçan Kontrol, Metotreksat (MTX), Beta Glukan (BG) ve Metotreksat + Beta Glukan (MTX+BG) grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Bu araştırmada deneyin birinci günü tek doz Metotreksat (intraperitoneal, 30mg/kg) MTX grubuna ve MTX+ BG grubuna uygulandı. Deney süresince (5 gün) gavaj yoluyla beta glukan (50mg/kg) BG ve MTX+BG grubuna her gün aynı saatte olmak üzere uygulandı. Kontrol grubuna deney süresince gavaj yoluyla serum fizyolojik verildi. Deney süresinin sonunda (5 gün) denekler anestezi altındayken, karın boşluğuna girilerek testis dokusu çıkarıldı ve kansızlaştırma yöntemiyle ötanazi yapıldı. Testis doku örnekleri ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirildi. Testisteki apoptozisi değerlendirmek için TUNEL tekniği kullanıldı.

Histopatolojik değerlendirme sonucunda kontrol ve BG grubundaki sıçanların testis yapısının normal görünümlü olduğu izlendi. MTX grubunda intertübüler alanda ödem, seminifer tübül lümeninde germinal epitel hücreleri, seminifer tübül epitelinde yer yer açılma ve vakuoller izlendi. MTX+BG grubunda ise bu hasarın belirgin derecede azaldığı izlendi. MTX grubunun morfometrik ölçümlerinde, seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. MTX+BG grubundaki, germinal epitel kalınlığının MTX grubuna göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Apoptotik indeks gruplar arasında en fazla MTX grubunda bulundu. MTX+BG grubundaki apoptotik indeksin ise MTX grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi.

Bulgularımız bize MTX' in testiste hasar oluşturduğunu ve bu hasarı Beta glukan' ın önleyebileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Testis, Beta glukan, Metotreksat, Apoptoz, Sıçan

2. SUMMARY

The Effect of Beta Glucan Against Methotrexate – Induced Testicular Damage in Rats

The aim of this study was to investigate histologic testicular changes of rats induced Methotrexate which is an chemotherapeutic agent and beta glucan which is known as a strong antioxidant a immunomodulator.

In this study, 24 *Sprague Dawley* male rats were divided into 4 groups as Control, Methotrexate, Beta glucan (BG), Methotrexate + Beta glucan (MTX+BG). In the first day of experiment, a single dose of Methotrexate (30 mg/kg) was intraperitoneally administered to groups MTX and MTX+BG. Beta glucan (50mg/kg) was administered by gavage to groups BG and MTX+BG every days at the same times for 5 days. At the end of the experiment (after 5 days), the testes of the animals were removed and animals were euthanized. Testicular tissue samples were evaluated histopathologically under light microscope. The TUNEL technique was used to determine apoptosis.

Histopathologically, testicular tissue in the control and BG groups were observed normal. In MTX group testicular tissue exhibited edema in the intertubular space, germinal epithelial cells in the lumen and dehiscence in some parts and vacuoles of the basal membrane of seminiferous tubules. The number of immature germ cells in the lumen and vacuolization in MTX+BG group were lower when compare to MTX group. The diameter of seminiferous tubules and thickness of germinal epithelium were found decreased in the MTX group. MTX+BG group's thickness of germinal epithelium were increased than in the MTX group. Apoptotic index was found significantly higher in the MTX group. The apoptotik index of MTX+BG group were significantly decreased.

These findings show that MTX causes testes damage and BG can prevent this damage.

Key Words: Testis, Beta glucan, Methotrexate, Apoptosis, Rat

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser dünyada en önemli insan sağlığı problemlerinden birisidir. Dünya Sağlık Örgütü' nün (DSÖ) 2001 kayıtlarına göre dünyada her yıl 10 milyon kişiye kanser tanısı konulmakta ve 6 milyon kişi de kanserden ölmektedir (1). Kanser veya tümör normal bir hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak, giderek büyüyen anormal hücreler topluluğuna dönüşmesidir (2).

Kanserli hücreleri öldürmek ya da yok etmek için çeşitli kombinasyonlar halinde kimyasallar kullanılarak gerçekleştirilen tedaviye kemoterapi denir (3). Kanserinin ilaçla tedavi edilme fikri ilk kez 1941' de Huggins tarafından ortaya atılmış ve östrojenlerin prostat kanserini hafifletmesinin ve nitrojen mustad (azotlu hardal)' ın insan lenfoma ve lösemilerinde antitümör aktiviteye sahip olduğunun gösterilmesi, kanser kemoterapisinin başlamasına yol açmıştır (4). Kanser tedavisi için kullanılan ilaçlar hücre proliferasyon mekanizmasını inhibe ettiklerinden hem tümör hücrelerine hem de proliferasyon gösteren normal hücrelere toksik etki gösterebilmektedir (1). Kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçların çoklu organ sistemlerinde akut toksik yan etkiler oluşturduğu iyi bilinmektedir (5). İlk kez 1948' de çocukların lösemilerini tedavi etmek amacıyla tedaviye sokulan Metotreksat (MTX) uzun yıllardır antikanser ilacı olarak lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri, mesane kanseri, testis tümörü ve diğer bazı kanser tiplerinde kemoterapötik ajan olarak kullanıldığı gibi psöriasis, dermatomiyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit (RA) gibi bazı inflamatuvar hastalıklarda da yaygın şekilde kullanılmaktadır (6, 7, 8, 9). Kemoterapötik kullanımı sırasında gastrointestinal, hematolojik ve sinir sistemi üzerine toksisitesi belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, MTX oogenez, spermatogenez ve doğurganlık üzerine de zararlı etkilere sahiptir (10). Yapılan çalışmalarda MTX' e bağlı organ hasarının oksidatif stres sonucu olabileceği bilinmektedir (11). Bu oksidatif stres ise testis ve germ hücreleri yapısında hasara yol açmaktadır (12, 13). MTX uygulamasından sonra testislerde sperm sayısında azalma, sperm DNA hasarı ve seminifer tübüllerde hasar meydana geldiği bildirilmiş ve erkeklerde kalıcı azoospermi ve infertilite kemoterapötiklerin yan etkileri olarak belirlenmiştir (14).

Beta glukan (BG); maya, bakteri, mantar ve ayrıca yulaf, arpa gibi tahılların hücre duvarlarının başlıca yapısal bileşeni olan glikoz zincirlerinden oluşan karbonhidrattır

(15). Bağımsızlık sistemine yararlı etkilerinin bulunması, toksik etkisinin olmaması ve olumsuz etkisinin bulunmaması sebebiyle beta glukan molekülü üzerinde yapılan araştırmalar son zamanlarda yoğunlaşmıştır (16). Son on yılda beta glukanın; tümör gelişimini inhibe ettiği aynı zamanda konakçının viral, bakteriyel, fungal ve parazitik enfeksiyonlara karşı direncini artırdığı bildirilmiştir. Bunun yanı sıra sitokin üretimini tetiklemesi, makrofaj aktivasyonu, lipid düşürücü özelliği, radyasyona karşı koruyucu etkisi, yara iyileşmesini hızlandırıcı ve hematopoetik etkileri de bu çalışmalarda belirtilmiştir (11). Yapılan çalışmalar, glukanların serbest radikal süpürücü aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir (11, 17). Bunlara ek olarak, beta glukan; kemoterapi ve radyoterapi alan kanser hastalarında, kemoterapötiklerin ve radyasyonun meydana getirdiği yan etkileri engellemek için verilmektedir (18).

Tüm bu bilgiler ışığında, bu çalışmada, kemoterapide kullanılan Metotreksatın sıçan testislerinde meydana getirdiği hücresel hasarı ve bir antioksidanın bu hasarı ne yönde ve ne derece etkilediğini araştırmak ve bu alanda yapılan çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla; birçok kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılan Metotreksat ile antioksidan özelliği bilinen beta glukanın sıçan testislerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler araştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi, üreme hücrelerini (spermatozoon) yaratan bir çift temel üreme organı testisler, boşaltım yolları, bu yollara açılan bezler, penis ve skrotumdan oluşur (19).

Erkek genital organları dış ve iç olmak üzere iki kısma ayrılır. Dış genital organları; skrotum ve penis, iç genital organları; testis, epididimis, ductus deferens, vesicula seminalis, ductus ejaculatorius, gl. bulbouretralis ve prostata'dır (20).

4.1. Testis Anatomisi

Erkek üreme organı olan testisler, sağda ve solda olmak üzere bir çift halinde skrotum denen deri bir torba içinde bulunurlar. Her bir testis oval biçimde olup, yanlardan basıktır ve insanda yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2.5 cm eninde ve 20-30 gr ağırlığındadırlar. Büyüklükleri yaklaşık olarak aynı olsa da sola göre sağ testis % 10 kadar daha ağırdır. Genellikle sol testis sağa göre 1 cm daha aşağıdadır. Sıcaklıkları vücut sıcaklığından 3-4 °C daha düşüktür. Testislerin iç ve dış iki yüzü (facies medialis, facies lateralis), ön ve arka iki kenarı (margo anterior, margo posterior), üst ve alt olmak üzere iki ucu (extremitas superior, extremitas inferior) vardır (21, 22).

Testisler fetal hayatta karın boşluğu içinde, fascia transversalis ile periton arasında gelişir, ancak doğumdan önce canalis inguinalis'ten geçerek skrotum içine iner. Karın ön duvarından skrotuma doğru giderken karın ön duvarı tabakalarını da birlikte sürüklediği için testislerin dış tarafında, karın ön duvarı tabakalarına da uzantıları olan tabakalar yer alır (21). Doğumdan sonra bu kese periton boşluğuyla ilişkisini keserek tunika vaginalis adını alır. Tunika vaginalisin skrotumun iç yüzünü döşeyen periorşium (parietal yaprağı) ile testisin üzerini örten epiorşium (visseral yaprağı) arasında çok az miktarda seröz sıvı bulunur (23, 24). Visseral yaprağı, sadece testisin ön kenarını ve iki yüzünü örterken, arka kenarın medial ve lateral taraflarında ise kendi üstüne kıvrılarak parietal yaprağı ile devam eder. Rete testisi yapan kanalcıklar mediastinum testisin üst ucunda duktuli efferentes denilen kanallarla devam ederler. Duktuli efferentes ise tunika albugineayı delerek testislerden epididimise geçer (24). Testise gelen ve testisten çıkan damar ve sinirler de testisin skrotuma inişi sırasında onu takip ederler. Bu oluşumlar bir araya gelerek funikulus spermaticus denen

bir kordon oluşturur. Funikulus spermatikus testisin skrotumda asılı durmasını sağlayan yapıdır (23, 25).

Testis tunika albuginea denilen fibröz bir tabaka ile sarılmıştır. Bu tabaka elastikiyeti ve genişleme özelliği bulunmayıp fibroblastlar ve kollajenen yoğun bir yapıdadır. Bu tabakanın iç kısmını örten nispeten gevşek bağ dokusu yapısında Tunika vaskulosa adı verilen bir tabaka yer alır. Tunika albuginea, arka kenarda testisin içine doğru kalın ve vertikal yarım bir bölme şeklinde uzantı gönderir. Bu bölmeye mediastinum testis denilmektedir (22, 24). Mediastinum testisin ön ve yan kısımlarından çıkan uzantılarına ise septula testis adı verilir. Tunika albugineanın iç yüzeyine tutunan bu uzantılar testisi lobüllere ayırmakta ve her lobül içinde de tubuli seminiferi kontorti denen kanalcıklar bulunmaktadır. Spermiumlar bu kanalcıkların duvarlarında gelişmelerini tamamlar. Seminifer tübüllerin başlangıç kısmı kıvrıntılı, son kısmı ise düzdür. Seminifer tübüller rete testise açılırlar. 'Tunika albugenia' nın üzerinde Tunika vaginalis yer alır (24).

Testisler aortanın dalı olan arteria testikularisten beslenirler. Herbir testisin arka tarafından küçük venler çıkar ve bu venler birleşerek plexus pampiniformis denilen venöz ağı oluştururlar. Bu venöz ağdan önce iki sonra bir vena testikularis oluşur. Sağ vena testikularis vena cava inferiora, sol vena testikularis ise vena renalis sinistraya açılır (23).

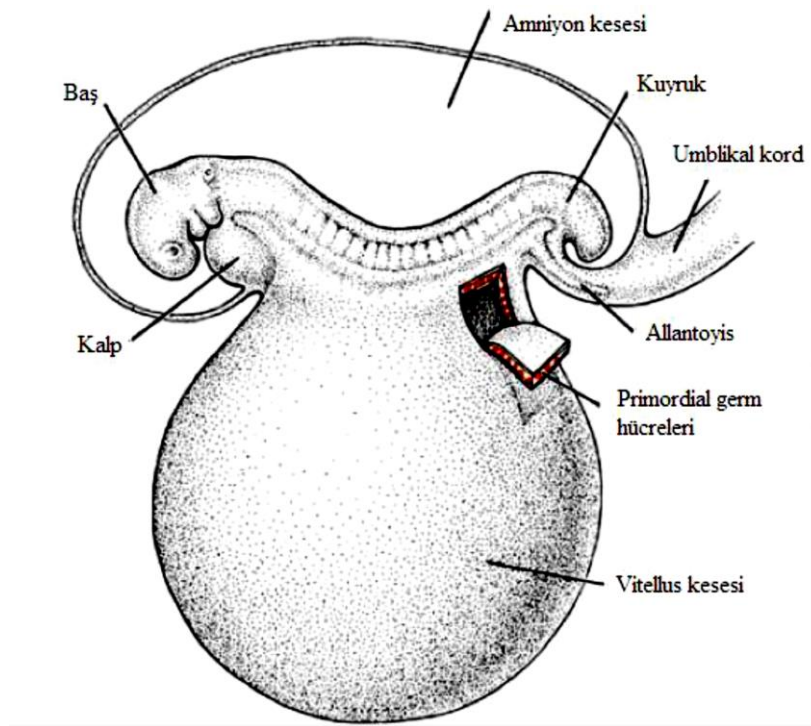
4.2. Testis Embriyolojisi

Kromozomal ve genetik cinsiyet fertilizasyon ile sağlanmaktadır. X kromozomuna sahip ovumun X veya Y kromozomu taşıyan sperm ile döllenmesine bağlıdır. Gelişmekte olan gonadlar XX veya XY kromozom kompleksine sahip olurlar. Yedinci haftadan önce gonadların görünümü her iki cinsten de birbirine benzer, dolayısıyla farketilmemiş gonadlar olarak adlandırılırlar. Erkek fenotipinin gelişimi için Y kromozomu gereklidir fakat bu kromozomun yalnızca kısa kolu seks tayini için önemlidir. Testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan SRY (Sex-Determining Region of the Y Chromosome) geninin, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleştiği saptanmıştır. Y kromozomu, farketilmemiş gonadın medullası üzerinde testis belirleyici etkiye sahiptir. Y kromozomu tarafından düzenlenen, TDF, testiküler farklılaşmayı sağlar; bu faktörün etkisi altında, primer seks kordonları seminifer

tübüllere farklılaşırlar. Y kromozomunun yokluğu over gelişimiyle sonuçlanır. Sonuç olarak seks kromozomunun tipi farklılaşmamış gonadın hangi yönde gelişeceğini belirlemektedir.

Gonadlar üç embriyonel kaynaktan köken alır:

- Mezotelyum (posterior abdominal duvarı döşeyen mezodermal epitel)
- Mezenşim (mezotelyum altındaki embriyonik bağ dokusu)
- Primordiyal germ hücreleri (Şekil 1) (26, 27).



Şekil 1. Yolk kesesi duvarında oluşan primordiyal germ hücrelerinin konumunu gösteren üçüncü haftanın sonunda bir embriyo (28).

Dördüncü haftanın başlarında, allantois kökü kenarındaki yolk kesesinin endodermal hücreleri arasında büyük ve küresel olarak pirimitif seks hücreleri görünür hale gelir. Beşinci haftada mezonefrozun venteromedial kesimindeki mezoderm kalınlaşmaya başlar. Altında kalan mezenşimin değişime uğramasıyla genital kabartı oluşur. Bu esnada yolk kesesinin arka duvarındaki primordiyal germ hücreleri dorsal mezenter boyunca genital kabartının içine göç ederler. Embriyo, katlanırken yolk kesesinin dorsal kısmı da embriyonun içine katılır. Altıncı haftada genital kabartıdan

uzanan parmaklı epitelyal kordlar alttaki mezenşim içine doğru büyüyerek primordiyal germ hücreleri ile birleşirler. Bu safhaya kadar gonadlar morfolojik olarak farklılaşmamıştır (indiferansiye) ve dışta korteks, içte medulla kısmı vardır (26, 27).

Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktörler için SRY geni, farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar fonksiyonu üstlenmektedir. Testis belirleyici faktör (TDF), primer seks kordonlarını uyararak, onların farklılaşmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece rete testis oluşur. Seks kordonlarının kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Yoğun tunika albuginea gelişimi fetüste testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefroza ayrılır ve kendi mezenterisi olan mesorşiyum ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklılaşır (26).

Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. Sekizinci haftadan itibaren Leydig hücreleri, testosteron ve andosteron salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik duktusların ve dış genitalerin maskulin olarak farklılaşmasını indüklerler.

Tunika albugineanın 12. haftada gelişmesi, karakteristik olup testisin geliştiğinin önemli bir göstergesidir. Testis kordonları 16. haftada at nalı biçimini alırlar ve uç noktaları birleşerek tubuli rektleri yaparlar. Testis kordonları bu evrede, primitif cinsiyet hücreleri ve sölom epitelinden köken alan Sertoli hücrelerini içerirler (27).

Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar, puberteden itibaren lümen gelişir ve seminifer tübül adını alırlar. Seminifer tübüller bir kere kanallı olduktan sonra, rete testis tübülleri katılır ve daha sonra duktuli efferenteslere girerler. Efferent duktuslar mezonefrik sistemin geri kalan boşaltım tübülleridir. Bu kanallar, rete testis ile mezonefrik veya Wolff kanallarından oluşan duktus deferens arasında bir bağlantı işlevi görürler (28).

Fötal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluktadır. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktusları oluşturan 15-20 adet mezonefrik

tübüller ile devam eder. Bu duktuslar, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktus ile bağlanırlar (26).

4.3. Testis Histolojisi

Testisler erkekliğe farklanmada gonadlardan meydana gelen bir çift organdır (19). Testisler skrotum denilen deri ve fibromüsküler kesemsi yapı içinde asılı durumdadır ve skrotum testisin ısısının ayarlanmasında önemli rol oynar. Yapısal özellikleri, yani deri altından yağ dokusu olmayışı, damardan ve ter bezinden zengin oluşu ile bu işlevine uygundur (29). Testisler, skrotum içinde spermatik kord ile asılı dururlar ve birbirlerinden septum skroti ile ayrılırlar. Her biri tunika vaginalis denilen ve peritondan köken almış seroz bir kese taşır. Tunika vaginalis, dış parietal ve testisin anterior ve lateral yüzlerinde tunika albugineayı örten, iç visseral yapraklardan oluşmuştur (27).

Testisler birleşik tübüler, ekzokrin ve endokrin karışık bezlerdir (19). Testisleri saran tunika albugineanın, testisin arka yüzünde kalınlaşarak oluşturduğu mediastinum testis, testis içine doğru fibröz uzantılar (septum) yaparak testiküler lobüller denilen yaklaşık 250 piramidal bölme oluştururlar. Bu uzantılar tam değildir ve bölmeler çoğunlukla birbirleriyle ilişkilidir. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül yer alır. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken testisin ekzokrin salgısını, interstisyel hücreler de testiküler androjenleri salgılayarak testisin endokrin salgısını yaparlar (30).

4.3.1. Seminifer Tübüller

Spermatozoonlar seminifer tübüllerde üretilir. Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Her bir seminifer tübül yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-50 cm uzunlukta olup, karmaşık yapıda çok katlı bir epitelyum ile döşelidir. Kıvrımlı tübüller bir şebeke oluştururlar. Bu şebekedeki her tübül başlangıçta kör uçludur ve dallara ayrılır. Her bir tübül sonlanırken lümeni daralır ve düz tübüller ya da tubuli rekti adıyla bilinen kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını

sağlar. Mediastinumun bağ dokusunda bulunan rete testis, 10-20 duktuli efferents ile epididimisin baş kısmını bağlamıştır (30, 31).

Seminifer tübüller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olarak bulunan en içteki katman düz kas özellikleri gösteren yassılaştırmış myoid hücrelerden oluşur. Seminifer tübüllerin arasındaki boşluğun büyük bir bölümünü interstisyel (Leydig) hücreler doldurur. Bu alanda Leydig hücreleri dışında, küçük kan damarları, makrofajlar ve lenfatikler de bulunmaktadır (19, 30).

4.3.1.1. Seminifer Tübül Epiteli

Seminifer tübülün çok sıralı epiteli başlıca iki tip hücreden meydana gelmektedir. Bunlar Sertoli hücresi adı verilen besleyici ve destek hücreleri ile germinal veya spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerdir (19).

4.3.2. Sertoli Hücresi

Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücrelere nazaran sayıca az ve seyrekler. Spermatogenik hücreler arasında dağılmışlardır. Uzun hücrelerdir. Bazal tarafları ile bazal laminaya otururlar, apikal uçları ile lümene kadar uzanırlar. Hücre çevreleri düzensiz ve belirsizdir (19). Pubertaya kadar dominant hücre tipi olup puberteden sonra seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10' unu oluşturur. İleri yaştaki erkeklerde germinal epitel hücrelerinin sayısı azaldığı zaman Sertoli hücreleri tekrar seminifer epitelin ana bileşeni olmaya başlar (32). Işık mikroskopunda, spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda yan uzantı nedeniyle, Sertoli hücresi sınırları iyi belirlenemez. Sitoplazma saydam, nukleus uzun, hücrenin uzun eksenine paralel konumlu, kromatince fakirdir (29). Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin çok sayıda düz endoplazmik retikulumu (SER), az granüllü endoplazmik retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozomlar, mikrofibriller ve mikrotübüller ve lipid inklüzyonları içerdiği gösterilmiştir (29, 30). Organelleri arasında lizozomların çok oluşu fagositik aktivitesine işarettir (29). Ayrıca bu hücrelerin bazal kısımlarında kristal yapı niteliğinde inklüzyonların varlığı dikkat çeker. Bunlar Charcot-Böttcher kristalleri olup, filamentöz yapıda gözlenir.

Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış nükleusunda çok sayıda girintiler, belirgin nükleolus ve az miktarda heterokromatin bulunur (29, 30). Olgun testiste bölünme göstermeyen Sertoli hücreleri ısı, radyasyon, toksik madde, enfeksiyon gibi etkenlere karşı oldukça dayanıklıdır (29). Spermatogenik hücreler harap olsa bile, Sertoli hücreleri canlılıklarını kolay kolay kaybetmezler (19, 29).

Sertoli hücreleri germ hücrelerini besler ve onlara desteklik eder. Seminifer tübül duvarında bazal laminadan lümene kadar uzanan sitoplazmaları boyunca, yakın ilişkide bulunduğu germinal hücrelere hem destek olur hem de bazal laminayla ilişkisi olmayan ve damarlardan uzak olan bu germinal hücrelere peritübüler kapillerlerinden alınan besleyici maddeleri ulaştırır (19).

Farklılaşmasını bitiren spermatozoonların lümene verilmesinde SER membranları, mikrotübüller ve mikrofilamentler rol oynar. Filamentlerde aktin bulunuşu bu hücrelerin kasılma yeteneği olduğunu gösterir (33).

Sertoli hücreleri, Spermiogenesis sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde atılır. Bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücrelerindeki lizozomlar tarafından fagosite edilir ve sindirilir (30). Bu kalıntı cisimciklerin (residual body) fagositozu ile lipid inklüzyonlarının oluştuğuna dair görüşler vardır (33).

Seminifer tübüllere sürekli boşalan salgı sperm ilerleyişini kolaylaştırır. Androjen bağlayıcı protein üretimi Sertoli hücreleri tarafından folikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir ve seminifer tübül içinde spermatogenesis için gerekli olan testosteronun yoğunlaştırılmasını sağlar. Bu hücreler aynı zamanda, ön hipofiz bezinden FSH sentezini ve salınmasını önleyen inhibin denilen bir peptid salgılar. Steroid olmayan faktör- inhibin- peptid yapısındadır ve spermatogenesis girecek spermatogonyumların sayısını ayarlayan bir faktördür. Cinsiyet hücrelerinin seminifer tübüllerden salınmadığı durumlarda, inhibin, Sertoli hücrelerinde devamlı salgılanır ve hipofiz bezini etkileyerek FSH üretimini baskılar. Steroid olmayan anti – Müllerian hormon glikoprotein yapısındadır. Embriyonal dönemde erkek fötüslerde Müller kanalının gerilemesini mezonefroz kanalının gelişmesini etkiler (29, 33).

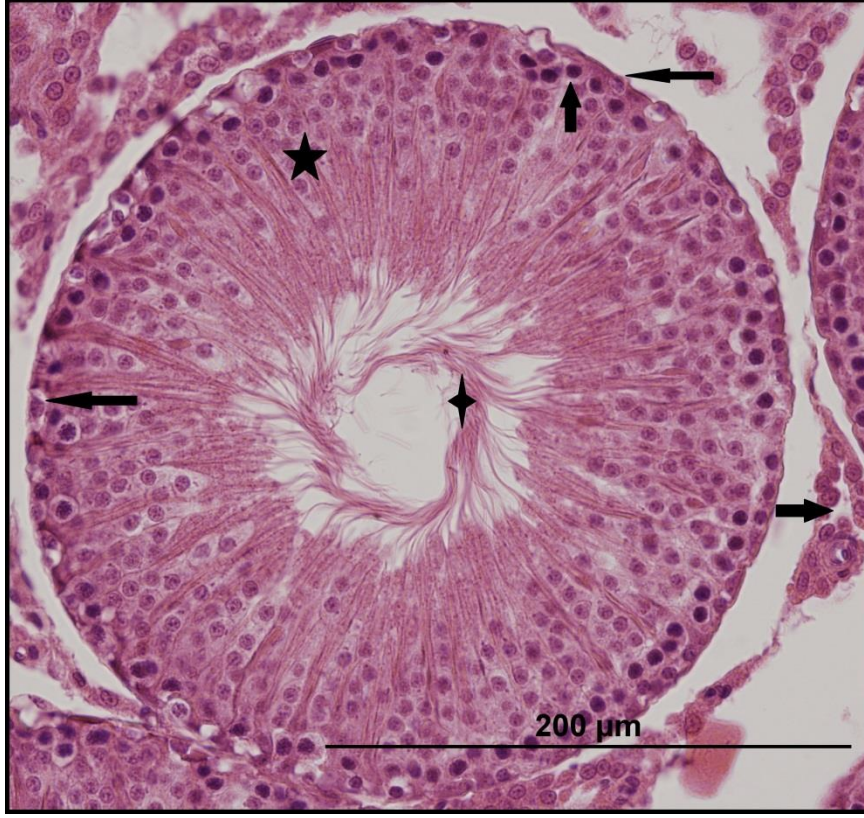
Ayrıca Sertoli hücrelerinin bütün germinal epitel hücreleri sıralarını kapsayacak şekilde, hem bazal kompartımanda hem de luminal kompartımanda yer almış olması ve

yanyana bulunan Sertoli hücreleri arasında da lateral yüzleri ile tutunma komplekslerinin bulunması ile seminifer tübül içinde senkronize spermatogenesis sağlanmış olur. Böylece Sertoli hücrelerinin tübül duvarında bütünlük sağlaması, aynı zamanda kan-testis bariyerinde Sertoli hücrelerinin önemini gösterir (33).

Kan Testis Bariyeri: fizyolojik ve morfolojik çalışmalarda Sertoli - Sertoli bağlantı komplekslerinin kan testis bariyer yöreleri olduğu saptanmıştır. Seminifer tübül ve genital boşaltma yollarından toplanan testis sıvısının, iyon, amino asit, karbonhidrat ve protein içeriği bakımından kan plazması ve testis lenfinden belirgin farklılıklar gösterdiği, pek çok serum proteinleri ve immunglobulinlerden yoksun olduğu dikkat çekmiştir. Sertoli - Sertoli arasındaki bağlantı komplekslerinin kan-testis bariyeri olarak işlev gördüğü belirlenmiştir. Kan testis bariyerinin immünolojik anlamda çok önemli bir işlevi vardır. Şöyleki, spermiumlar ve spermatogenik hücrelerin sahip oldukları moleküller, bu hücelere özgündürler ve immun sistem tarafından yabancı olarak tanınırlar. Çünkü spermatogenesis immunkompetansın gelişmesinden çok sonra pubertede olaylanır. Bu nedenle farklılaşan spermatogenik hücreler yabancı olarak tanınırlar ve immun cevabı harekete geçirerek cins hücrelerinin mahvolmasına neden olan immunglobulinleri oluştururlar. Ancak kan-testis bariyeri, immun sistem ile cins hücreleri arasındaki her tür etkileşimi ortadan kaldırarak, immunglobulinlerin seminifer tübüller içine geçmesini ve yüksek düzeylerde, sperm antikorlarına sahip hastalarda fertilite bozukluğunu önler. Böylece kan-testis bariyeri, seminifer epiteli otoimmün reaksiyonlara karşı korur (27, 30).

4.3.3. Spermatogenik Hücreler (Germinal Hücreler= Germ Hücreleri)

Germ hücreleri, Seminifer tübüllerin bazal laminası ile lümeni arasında 4-8 katlı olan, sürekli üreme ve olgunlaşma gösteren sıralar halindedir. Genç hücreler bazalde otururlar. Olgunlaşan ve farklılaşan hücreleri ise lümene doğru itilirler (19). Bu hücreler bazaldan lümene doğru; Spermatogonyum, Primer spermatosit, Sekonder spermatosit, Spermatid (olgunlaşmamış ve olgun) ve Spermatozoon (spermium) olarak sıralanırlar (Resim 1). Tübül lümeni içinde bu hücre tiplerinin yer aldığı olaylar; spermatogenesis ve spermiogenesis diye birbirini izleyen iki seride toplanır.



Resim 1. Seminifer Tübülün Genel Histolojik Yapısı (★). Seminifer tübüller arası İnterstisyel alan (→), sertoli hücresi (➔), spermatogonyum (↑), spermatozoonlar (✚) (H&E, X400).

Spermatogenesis, ana germ hücresi spermatogonyumdan üreme ve büyüme periyodlarını izleyen mayoz bölünmeleri sonunda dört haploid kromozomlu spermatid oluşumuna kadar gerçekleşen olayları kapsamaktadır. Oluşan spermatidin hareketli bir spermatozoona (spermium) farklılaşması ise spermiogenesis olarak isimlendirilmektedir (30, 33).

4.3.3.1. Spermatogonyum (Gonosit)

Primer cinsel hücreler, erkekliğe farklanmada spermatogonyumları oluştururlar. Bunlar seminifer tübüllerin periferinde bulunurlar. Yani bazal laminaya yakın ilk sırada otururlar. Bunlar mitoz ile çoğalarak birbirlerine benzer hücreleri meydana getirirler. Spermatogonyumlar yuvarlak hücrelerdir. Çekirdekleri var olup gevşek kromatine sahiptirler. Bazen nukleolus belirgindir (19). Spermatogonyumlar bazal kompartmanda bazal membran ile direkt ilişkide olan yaklaşık 12 μm çapında diploid spermatogenik

hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki tıkayıcı bağlantıların altında yer alır ve bu nedenle kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar (30).

Puberte başlayana kadar, spermatogenik hücrelerden sadece spermatogonyumlar bulunur. Pubertede hormonal etki ile spermatogonyumlar mitozla çoğalarak diğer tip hücreleri oluşturur. Spermatogonyum kendisinden gelişen hücre tiplerine göre daha küçüktür. Çekirdeğin büyüklüğü, biçimi, kromatin dağılımı ve histokimyasal özelliklerine göre iki tipe ayrılır ve her çekirdek 46 kromozomludur (29).

Tip A spermatogonyumlar, çekirdeği oval olup mitozla çoğalınca yarısı Tip A olarak kalır, yarısı büyüyerek Tip B' ye dönüşür. Yani Tip A'lar spermatogonyumların kaynağı durumundadır. A tipi doğurucu ana hücrelerdir (stem cell) devamlı mitoz ile çoğalarak yeni spermatogonyumları yaparlar (19).

Tip B spermatogonyumlar, ana spermatogonyumlardan daha büyük hücrelerdir. Çekirdeği çok daha yuvarlaktır ve koyu boyanırlar. Tip B'ler büyüyerek primer spermatositlere dönüşürler ve lümene doğru itilirler. Primer spermatosit bazal laminadan uzaklaşır, hacmi artar. Primer spermatositler bir veya iki sıra halinde dizilirler (19, 29).

4.3.3.2. Primer spermatosit

Seminifer epitelin orta kısmında bulunan, küre ya da oval biçimli, hacmi en büyük hücrelerdir. Primer spermatositler bir veya iki sıra halinde dizilirler. Oluşur oluşmaz birinci mayotik bölünmenin profaz evresine girerler. Profaz evresi çok uzun sürdüğü için en çok sayıda görülen hücrelerdir ve 46 kromozom taşırlar (19, 29).

4.3.3.3. Sekonder spermatosit

Primer spermatositin mayotik bölünmesi sonucu oluşan iki yavru hücre sekonder spermatosit adını alır. $22+X$ veya $22+Y$ kromozomlu küçük hücrelerdir. Kromozomlar uzunlamasına ortalarından yarıklanmış haldedir. Yani kromatidlerine ayrılırlar. Henüz tam redüksiyon meydana gelmemiştir. İki yavru hücre hiçbir zaman tam olarak birbirlerinden ayrılamazlar, tam bir sitokinez gerçekleşmez. Sekonder spermatositler birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlıdır. Bunlar hemen ikinci bir mayoz bölünmesine başlarlar. Kısa bir sürede ikinci mayoz bölünmeyi geçirdiklerinden

kesitlerde görülmeleri zordur. Bölünmesiyle tam manasıyla haploid sayıda kromozomlu spermatidler oluşur (19, 29).

4.3.3.4. Spermatid

Spermatidler meydana gelirken tam bir redüksiyon bölünmesi olmuş diploid olan kromozom sayısı haploid hale gelmiştir. Bir spermatogonyumdan böylece 4 adet spermatid meydana gelmiştir. Spermatidler, sekonder spermatositlere oranla daha küçük ve yuvarlak veya poligonaldırlar. Lümene doğru gruplar halinde uzanırlar. Hücre organellerinin tümüne sahip olup çekirdekleri ufaktır. Kromatin ağı sıktır ve boyalı preparatlarda koyu gözüktürler. Spermatidler artık bölünmezler ve 23 adet kromozom taşıyan hücrelerdir. Şekil değiştirerek spermatozoon (spermiumları) meydana getirirler. Bu olaya spermiogenesis denir (19).

4.3.3.5. Spermatozoon (Spermium)

Spermiogenesis, bir farkanma olayı olup spermatidler bu safhanın sonunda olgun erkek hücrelerine spermium ya da spermatozoonlara dönüşürler. Bu dönüşme olayında spermatidte meydana gelen başlıca değişiklikler şunlardır: Akrozom oluşması, kuyruk gelişmesi, çekirdek şekil ve büyüklüğünün değişmesiyle birlikte kromatin yoğunlaşması ve artık spermatid sitoplazmasının atılması.

Genç spermatidler, yuvarlak çekirdekli ve çok köşeli (poligonal) ya da yuvarlak hücrelerdir. Sitoplazmalarında çekirdek bitişğinde iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondriler, bir çift sentriol ve düzensiz şekilli bazofilik kromatid cismi bulunur. Spermiogenesis sırasında bu organellerin her birinde göze çarpar değişiklikler meydana gelir.

Akrozom oluşması: Spermiogenesisde ilk değişiklik spermatidin Golgi kompleksinde görülür. PAS pozitif proakrozom granülleri, Golgi kompleksi yöresinde dikkati çeker. Sonra bu granüller büyük bir vezikül içinde toplanarak akrozom vezikülünü oluştururlar. Akrozom vezikülü spermatid çekirdeğinin ön kutbuna hareket eder ve çekirdek zarına yapışır. Akrozomun bu yapışma yöresi ilerki spermium çekirdeğinin uç kısmını oluşturur. Akrozom vezikülü zarı, çekirdek dış zarına yapıştığı bölgede, çekirdeğin yarısını ya da $2/3$ ' ni saracak biçimde yayılır ve çekirdeğin ön kısmını tamamen kaplayan bir katlantı, başlık oluşturur. Çekirdeğin ön kutbunda

yerleşik olan akrozom granülü de başlık içinde yayılır ve ikisi birlikte akrozomu meydana getirirler.

Akrozom, şekil ve büyüklük yönünden tüm memeliler arasında farklılıklar gösterir. Hyaluronidaz, akrozin, asit fosfataz, proteaz, nöraminidaz, β - N – asetilglukozaminidaz ve aril sülfataz gibi hidrolitik enzimlerden zengindir. Bu enzimler, döllemede spermiumun sekonder oositin çevresindeki engelleri aşmasında önemlidir.

Kuyruk gelişmesi: Spermatid seminifer tübül tabanına doğru yönelir ve aksonem lümenine doğru uzanır. Çekirdek de uzayıp yoğunlaşır. Aynı zamanda sentriyollerden biri gelişerek kamçıyı meydana getirir. Mitokondriler de kamçının proksimal kısmı etrafında toplanarak orta parça denilen kalınlaşmış bölgeyi meydana getirir. Bu bölge spermatozoon hareketinin enerji kaynağını oluşturur (27).

Artık spermatid sitoplazmasının atılması: Sitoplazmanın bir kısmı kuyruk ucuna doğru kayarak flagellumu kuşatır, geri kalanı da rezidüel cisim şeklinde dışarı atılır. Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Farklılanma ilerledikçe sitoplazma fazlası atılmakta, sadece çekirdeği, orta parçayı ve flagellumu saran ince tabaka halinde sitoplazma geride kalmaktadır. Sertoli hücrelerinin lizozomlardan zengin olması atılan sitoplazmanın sindirilmesini sağlamaktadır (27, 29).

Nukleus değişimi ile birlikte kromatin yoğunlaşması: Nukleus kromatini yoğunlaşmaya ve yassılaşmaya başlayarak badem şeklini alır. Hücre membranına doğru yer değiştirir. Nukleus akrozom ve çevresindeki az miktardaki sitoplazmayla birlikte spermiumun baş kısmını yapar. Akrozomal kepin arka kenarında nukleus çevresindeki mikrotubuller silindirik bir band oluşturur. Bu band nukleusun uzun biçim alması ve yassılaşmasında rol oynar. Olgun spermatidlerde kuyruklar tübül lümenine doğru uzanır. Sertoli hücreleri tarafından lümenine serbest bırakılan olgun hücrelere spermatozoon (spermium) denir. Bu sırada morfolojik olarak matür ama fonksiyon olarak immatürdürler. Hareketsizdir ve ovumu dölleme yeteneği sınırlıdır. Olgunlaşmanın son adımı olan kapasitasyon ejakülasyondan sonra kadın organizması içinde fertilizasyondan az zaman önce spermdeki enzimatik değişikliktir. Farklı türlere ait spermatozoonlar farklılık gösterse de esasta aynı ana yapılar yer alır. Spermatozoon silindirik biçimli, total uzunluğu 55-65 μ m olan hareketli hücrelerdir (29). Hareketlerini ancak epididimiste kazanırlar. Hareket hızları dakikada ortalama olarak boylarının 70-

80 katıdır (19). Ergin spermium baş ve kuyruk olarak iki ana kısımdan oluşur. Baş kuyruğa bir bağlantı parçası olan boyun ile bağlanmıştır. Kuyruk kısmında, esas parça, orta parça ve son parça halinde dört segment gözlenir. Baş babadan oğula geçen tüm özellikleri taşır. Kuyruk, spermiuma hareketlilik sağlar (27).

İnsanda, baş uzun eksen boyunca 7 µm olan yassılaştırmış bir armut şeklini andırır. Nükleus hemen hemen baş bölgesini doldurur. Başın ön yarısı akrozomdan farklı olan bir başlık ile örtülüdür. Bunun en uç kısmı delici ucu teşkil eder. Bunun hyaluronidaz enzimini taşıdığı tespit edilmiştir. Sekonder oositi çeviren *Corona radiata* hücrelerini erittiği ve fertilizasyonu kolaylaştırmaktadır (19).

Kuyruk 55 µm uzunluktadır. Spermiumun aksonemini oluşturan bir çift santral 9 çift perifer mikrotübülüs düzeni (9+2) kuyruğun öz kısmını meydana getirir ve önemli bir değişme göstermeksizin, boyundan başlayıp kuyruğun son uç kısmına kadar uzanır. Spermium kuyruğunun en önemli özelliği aksonemin 9 adet kalın koyu dış fibrillerle çevrili olmasıdır (9+9+2). Aksonem kuyruğa hareketlilik, kalın koyu dış fibriller ise diklik sağlayan yapıdır (27).

4.3.4. Seminifer Epitelyum Siklusu

Seminifer epitelyum siklusu (döngüsü), epitelyumda belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan maturasyon değişiklikleri dizisidir (34). İnsanda bir spermatogonyumdan olgun bir spermiumun meydana gelmesine kadar geçen zaman 64 gündür ve birbirini izleyen 16 günlük dört siklusa gerçekleşir. Spermatogenesis tüm seminifer tübüllerde aynı anda olaylanmaz. Yerine dalgalanma şeklinde olaylanır. Bazı tübüllerde serbest spermiumlara rastlandığı halde diğerlerinde sadece spermatidler gözlemek mümkündür. Spermatogenesis puberteden başlayıp ileri yaşlara kadar kesintisiz devam eder. İleriki yaşlarda spermatogenesiste tamamen kesilme olmamakla birlikte yalnızca azalma gözlenmektedir (27).

4.3.5. İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri

Testiste seminifer tübüllerin arasını dolduran interstisyum bağ dokusundaki kapillerleri pencere tiptedirler. Fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve indeferensiye mezenşimal hücreler bulunmaktadır. Ayrıca sinirler, kan ve lenf damarları da bulunur. Puberteden sonra Leydig hücresi görülmeye başlar (29). Leydig hücreleri

seminifer tübüllerin arasını dolduran interstistiyel bağ dokusu içinde kan kapillerleri etrafında tek tek ya da gruplar halinde bulunur. Őekilleri yuvarlak ya da köşeli olup merkezde yerleşik bir ya da iki çekirdekleri bulunur. Lipid damarlarından zengin, asidofilik bir sitoplazmaya sahiptirler. İyi gelişmiş bir Golgi kompleksi, fazla sayıda mitokondriler, yaşı n ilerlemesi ile artan lipofuksin pigmenti ve yalnızca insan Leydig hücrelerine özgü olan Reinke kristalleri içerirler. Elektron mikroskobunda görülebilen en belirgin özelliği ise diğer steroid hormon salgılayan hücrelerde görüldüğü gibi sitoplazmalarında çok iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulumun bulunmasıdır. Ayrıca bağlantı kompleksleri, pek çok mikrovillusları ve dağınık granüllü endoplazma retikulum sisternaları, peroksizom ve lizozomları içerirler (27).

Leydig hücreleri erkeklik hormonu testosteronu sentezler ve salgılar. Testisin endokrin fonksiyonu, Leydig hücre topluluğuna bağlıdır. Testosteronun hemen hemen tümü testislerde, böbrek üstü bezinden ise %5' den azı üretilir. İnsanda tüm Leydig hücreleri günde 7 mg testosteron salgırlar. Gebelik döneminde plasenta gonadotropik hormonu ya da luteinleştirici hormon anne karnından f tuse geçerek çok sayıda Leydig hücrelerini uyarır ve testosteronun salgılanmasını sağlar. Gebelik döneminde, testosteronun varlığı embriyoda erkek genital sisteminin farklanması için gereklidir. Gebeliğin 4-5 ayna kadar Leydig hücreleri tam gelişmiştir. Daha sonra dejenerasyona uğırlar, dolayısıyla testosteron düzeyi de giderek düşer. Doğumda bu uyarı kalkar ve sonrasında Leydig hücrelerinde atrofi artar. Ancak pubertede hipofiz hormonlarının (Luteinleştirici hormon, LH) uyarmasıyla Leydig hücreleri görülmeye başlamaktadır. Leydig hücreleri insanda testis dokusu hacminin %12'sini oluştururlar (29, 30).

Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron kan ve lenf kapillerleri ya da peritubuler doku sıvısı yolu ile seminifer tübüllere geçer. Testis içinde testosteronun lokal düzeyi, dolanımdaki düzeyden 200 kat fazla olması gereklidir. Çünkü spermatogenesisin seminifer tübüllerde olaylanabilmesi için testosteron seminifer tübüllerde yüksek düzeyde konsantre olmalıdır. Testosteron, spermatogenesisin sürdürülmesi ve erkekte sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişimi için gereklidir (29, 30, 33).

4.4. Apoptozis

Organizma sürekli bir denge halinde bulunmaktadır. Bu dengenin korunması için yeni hücreler sentezlenirken, var olan eski hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmaktadır. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur (35, 36). Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen hücre ölümü meydana gelir (37). Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptozis, organizmanın ihtiyaç duymadığı, hasarlı hücrelerin zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümü olarak tanımlanabilir. Apoptozis hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar;

- Apoptozun başlatılması,
- Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu,
- Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal

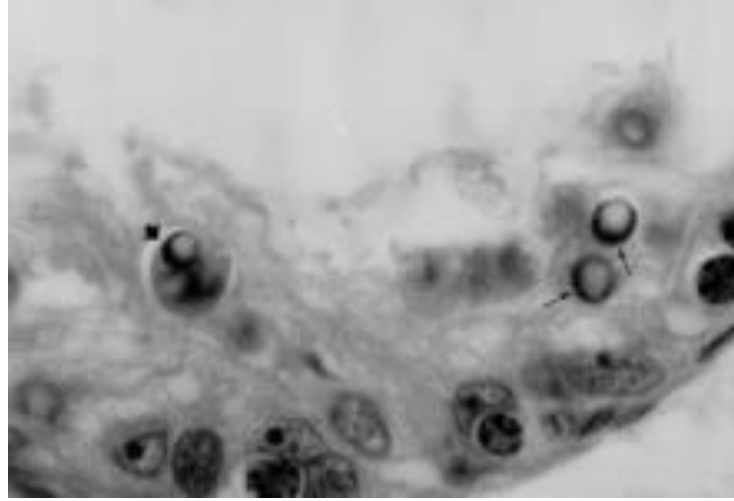
değişikliklerin oluşması,

- Fagositoz, olarak özetlenebilir.

Hücre içinden veya dışından gelen sinyaller proteazları aktive eder. Aktive olan proteazlar hedef proteinleri yıkarak hücre içi değişikliklere neden olur ve hücre parçalanarak apoptotik cisimlere ayrılır. Apoptotik cisimler fagositoz yoluyla yok edilirler. Hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınlar gibi hücrelerin maruz kaldığı etkenler dış apoptozise neden olabilirler. Bu etkenler DNA hasarı oluşturarak apoptozis meydana getirirler.

Apoptozisde en önemli değişiklikler çekirdekte izlenir. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak, değişik şekil ve büyüklüklerde çöker. Elektron mikroskop ile bakıldığında kromatinin yoğun granüler yarım ay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği izlenir. Çekirdek de hücre gibi büzülür. Bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nükleer porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar.

Apoptozis hematoksilen eozinle boyanmış kesitlerde ışık mikroskopik seviyede de izlenebilir. Hücreler koyu eozinofilik sitoplazmalı, bir veya birkaç parçalı piknotik çekirdekli olarak görülür (Şekil 1). Çekirdek, kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle hilal veya yarımay şeklinde izlenebilir (38).

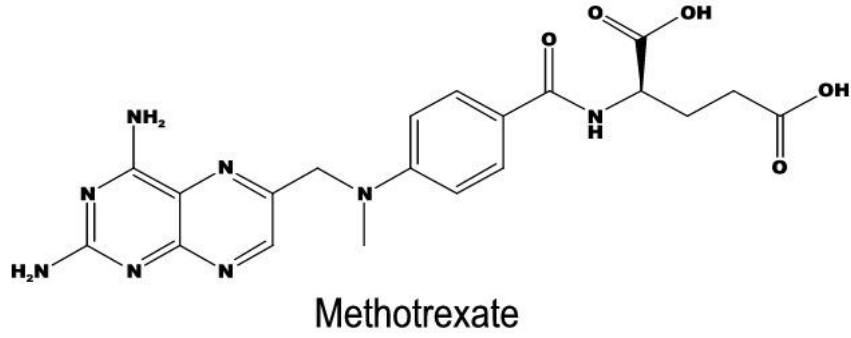


Şekil 2. Sıçan testislerinde apoptotik hücrelerin hilal şeklindeki çekirdekleri (ince ok), koyu eozinofilik sitoplazmalı apoptotik hücreler (kalın ok) (38).

Apoptozisin saptanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Apoptotik hücre morfolojisini belirlemek için ışık, faz kontrast, elektron, floresan, lazerli konfokal mikroskopları kullanılırken; DNA kırıklarının belirlenmesinde Anneksin-V, TUNEL, jel elektroforezi, M-30, Kaspaz-3, Akım sitometri, ELISA ve DNA mikroarray gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (39).

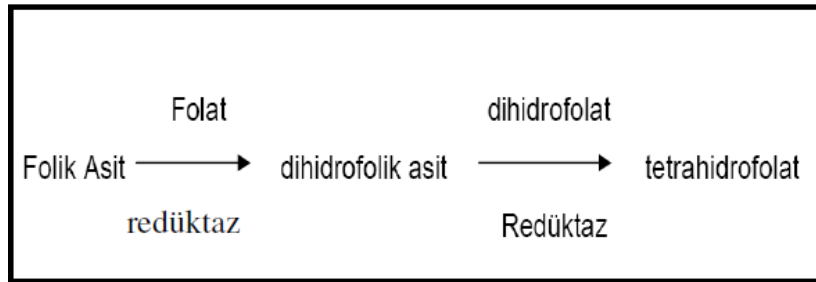
4.5. Metotreksat

Metotreksat (MTX) ya da ametopterin folik asit antimetabolit (antifolik) gurubunun başlıca antikanser ilacıdır. İlk kez 1948’ de çocukların lösemilerini tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır (2).



Şekil 3. Metotreksat' ın Kimyasal Yapısı (2, 4).

Metotreksat kimyasal olarak folik asidin 4-amino N¹⁰-metil analogudur. Folik asit ise deoksiribonükleik asit (DNA) sentezinde önemli olan tetrahidrofolat (THF) öncülüdür (40). Hücrede dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine oldukça fazla afinite gösterir. DHFR enzimi hücre metabolizmasında folik asidin tetrahidrofolat şekline dönüşmesinin ikinci basamağında rol almaktadır (2, 4).



Şekil 4. Folik Asit Mekanizması (2, 4).

MTX, dihidrofolatı (DHF) tetrahidrofolata (THF) çeviren dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini baskılar (2, 4). Tetrahidrofolat pürin ve pirimidin sentezinin önemli bir parçası olan timidilatın üretiminde etkindir (41). Pürin ve pirimidin nükleotidleri deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) sentezinde rol oynarlar. Bu inhibisyon, timidilat ve purin nükleotidlerinin (adenin ve guanin) biosentezinin durmasına yol açar (42). Bu nedenle MTX, THF eksikliğine yol açarak pürin, pirimidin metabolizması ve DNA sentezini içeren pek çok metabolik yolu etkiler. Bu metabolik yollar üzerinde yaptığı değişiklikler ile MTX' in tedavi edici etkileri yanında toksik etkileri de ortaya çıkmaktadır (2, 4).

Metotreksat faz bağımlı bir sitostatiktir. S fazındaki hücrelere daha fazla etkir. Hücrenin S fazına girmesini engellerler. Böylece sitotoksik etkilerini azaltırlar. RNA ve

protein sentezini yukarıdaki mekanizmayla inhibe ettiğinden dolayı hücrelerin özellikle G fazından S fazına geçişini engellerken kendi etkisini de kısıtlamaktadır (2, 4).

Yayınlanan birçok çalışmada gastrointestinal, renal, hepatik ve kemik iliği toksisitesi oluşturması bu ilacın kullanımını sınırlamaktadır. MTX kaynaklı toksisite dozaj programı ve tedavinin süresi, hastalığın tipi, hastanın risk faktörleri, genetik ve moleküler apoptotik faktörlerin varlığı gibi birçok faktörün etkileşimi sonucu görülmektedir (11, 43).

Kemoterapötik kullanımı çoklu organ sistemlerinde akut toksik etkilere yol açtığı bilinmektedir (14). MTX' in mide-bağırsak, karaciğer, böbrek ve kemik iliği toksisiteleri en sık görülen yan etkilerindendir (11).

Erkeklerde kalıcı azospermi ve infertilite kemoterapötik ilaçların yan etkileri olarak ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalarda MTX verilmesinden sonra testiste seminifer tübüllerde hasar, sperm sayılarında azalma ve sperm DNA hasarı bildirilmiştir (11).

Metotreksat oral yolla ($30 \text{ mg} / \text{m}^2$) alındığında iyi oranda absorbe olduğu halde, artan dozlarda bu oran azalmaktadır. Çocukların akut lenfositik lösemilerinin nükslerinde absorpsiyonunun bozulduğu bildirilmiştir. Metotreksat 3 yarı ömürlüdür (5 dakika, 2-3 saat, 8-10 saat) ve son ikisi böbrek yetmezliği durumunda ya da retansiyonu (tutulması) durumunda uzar. Eliminasyonun bu son döneminde, böbrek hasarı yüzünden meydana gelecek uzama, ilacın kemik iliği, gastrointestinal epitel ve cilt üzerindeki toksik etkilerinin artmasına neden olur. MTX' in plevral ya da peritoneal kavite gibi vücut boşluklarına dağılımı yavaştır. Ancak, asit ya da plevral efüzyon gibi nedenlerle meydana gelecek genişlemelerde, bu bölgeler ilaç deposu gibi davranıp ilacın yavaş salınımına neden olurlar. Bu nedenle plazma konsantrasyonundaki artış devam eder ve daha ciddi toksisite bulguları gelişebilir. Plazma-BOS konsantrasyon oranına göre MTX' in Santral Sinir Sistemine (SSS) geçişi düşüktür. Kanseri hücreleri membranından geçişi kolaylaştırmak düşüncesiyle metotreksatın yüksek dozlarda uygulanması önerilmektedir. Hücre içinde ilacın konsantrasyonunun artması, DHFR artışından ya da metotreksata DHFR' in afinitesinin azalmasından kaynaklanan direnci de yeneceği belirtilmektedir. Metotreksatın bu yüksek dozları hücrede poliglutamatların oluşumunu ve dolayısıyla ilacın etki süresini artırmaktadır. Ancak bu yüksek dozların etkinliği

konvansiyonel (normal) dozlarla karşılaştırıldığında önemli bir farklılık ortaya çıkmamaktadır. Yüksek doz tedavisine 5- formil-tetra folik asit (lökovorin) eklenmesi yararlı olmaktadır. Ayrıca metotreksatın yüksek dozlarının uygulanmasında timidin ve 1-asparaginazla hücre siklusu bloku yapılması da denenmiştir (44).

4.5.1. Metotreksatın Endikasyonları

Onkolojide yüksek dozda ($3-10\text{g/m}^2/\text{gün}$) kullanılan metotreksat; koryokarsinomlar, lösemiler, lenfomalar, osteosarkomlar, meme kanseri, baş ve boyun kanseri, ovaryum ve mesane kanserlerinde; diğer antineoplastiklerle kombine edilerek de kullanılmaktadır. Onkolojide uygulanan dozların 100-1000 kez daha azaldığı düşük dozda uygulanan metotreksat ise; antiinflamatuvar ve hücre bölünmelerini inhibe edici etkileri nedeniyle psöriyazis, romatoid poliartritler, testis kanseri, sindirim kanalının, karaciğerin bazı inflamatuvar hastalıkları ve bazı şiddetli astımlarda kullanılabilmektedir (2, 4, 44).

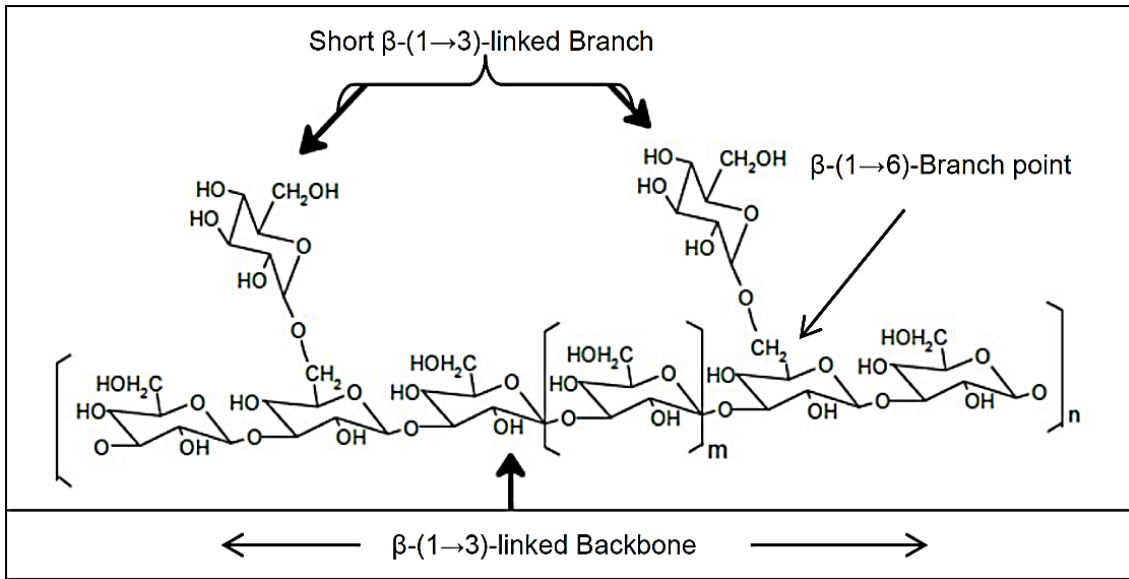
4.5.2. Metotreksatın Yan Etkileri

MTX' in yan etkileri fazla ve şiddetlidir. MTX kullanımı sırasında gelişebilecek yan etkiler şunlardır:

- Kemik iliği depresyonu sonucu lökopeni, trombositopeni, agranülositoz görülebilmektedir.
- Sindirim mukozalarında inflamasyon oluşturmasıyla bulantı, kusma, anoreksi, karın ağrısı oluşabilir.
- Enfeksiyonlara karşı duyarlılık artabilmektedir.
- Teratojen etki: metotreksat kullanımında gebelik başlıca kontreksiyondur.
- Spermazoonlarda değişme ve oligospermi
- Uzun süreli oral tedaviler siroz ve vena porta fibrozuna neden olabilir.
- Radyoterapi ile birlikte, intraketal yolla uygulandığında, baş ağrısı, ateş ve ensede sertlik gibi belirtilerle karakteristik kimyasal bir araknoidit tablosu ortaya çıkar.
- Uygulamadan 2-3 hafta sonra motor paralizi, kraniyal sinirlerin paralizi, konvülsiyonlar ve koma görülebilir (SSS ile ilgili yan etkiler, radyoterapi ile şiddetlenebilir) (2, 4).

4.6. Beta Glukan

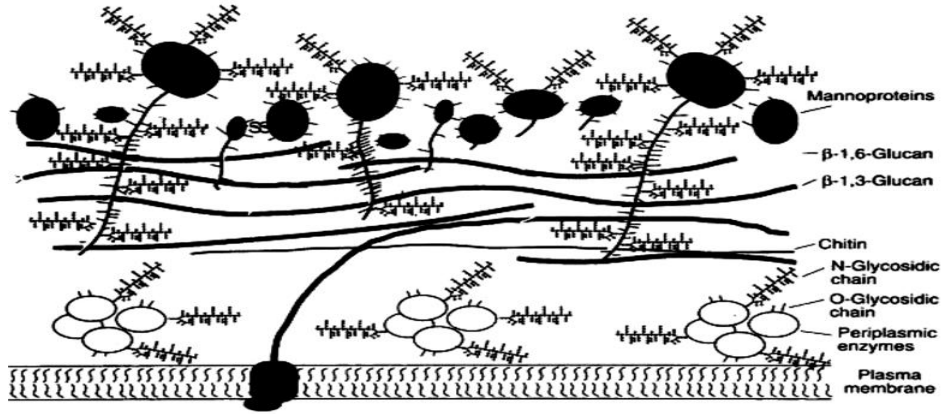
Beta glukanlar, doğada mantarlarda, bitkilerde ve bazı mikroorganizmalarda bulunan polisakkarit polimerleridir. Farklı etki seviyelerine sahip, değişik tipte beta glukanlar bulunmaktadır. Mantarların hücre duvarı glukanları, yapısal olarak 1, 3 glukopiranozil bağlarından oluşanlar ve 1, 6 bağlarla dallanma yapanlar olmak üzere iki farklı içeriktedirler (45) (Şekil 4). Beta glukanlar, molekül ağırlıklarından ve 1, 6 bağlarının derecesinden etkilenen güçlü immün stimulatördürler (46). Beta glukanların bağlantı tipindeki ve dallanmasındaki değişikliklerin yanı sıra moleküler ağırlığı, üç boyutlu yapısı, dallanma derecesi, polimer yükü ve çözünme yapısındaki farklılıklar da önemlidir. Bu özelliklerin hepsi beta glukanların immün destekleyici özelliklerini etkilemektedir. Fungusdan elde edilen beta glukanların moleküler ağırlığı fazla olanların doğrudan lökositleri aktive ettiği, düşük molekül ağırlıklı olanların ise sitokinele uyarıldığında bağışıklıktan sorumlu hücreleri desteklediği görülmüştür (47).



Şekil 5. Beta Glukanın Yapısı (48).

Polimerik karbohidratların, in vitro ve in vivo uygulamalarda inflamatuvar yanıtları azalttığı rapor edilmiştir. Önceki raporlar beta glukanlar gibi bazı karbohidratlar polimerlerinin serbest radikal süpürücü etkinliğine sahip olduğunu göstermektedir (17). Beta glukanların immün sistem üzerine yararlı etkileri bilinmektedir ve herhangi bir yan etkileri veya toksisitesi bulunmadığı gözlenmiştir (11, 16). Uzun süredir immün sistemi uyarmak ve kanserle mücadele için polisakkaritler kullanılmaktadır ancak son zamanlarda

bu yöndeki çalışmalar hızlanmıştır. Bu polisakkaritlerin içinde ekmek mayasından (*Saccharomyces cerevisia*) elde edilen beta glukan polimerleri en çok çalışılanlarıdır (11, 16).



Şekil 6. Ekmek Mayası (*Saccharomyces cerevisia*) Hücre Duvarının Yapısı (48).

Beta glukanların bakteri, viral, fungal ve parazitlere karşı savunma yaptığı tümör gelişimini engellediği, radyasyona karşı korucu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu polisakkarit bileşiklerinin monositlerde, lökositlerde ve makrofajlarda bulunan özel glukan reseptörlerine bağlanmasıyla sitokinlerin serbest bırakılması, nitrik oksit oluşumu, arakidonik asit metabolitlerinin serbest bırakılması ve hematopoezin uyarılması gibi birçok immün cevabı uyarır (11, 16). Son yıllarda glukanların faydalı etkileri immün fonksiyonlarına, antioksidan etkilerine ve diğer nonspesifik etkilerine bağlanmaktadır (49).

Beta glukanların temel immüno-farmakolojik aktiviteleri; konakçının viral, bakteriyel fungal ve parazitik enfeksiyonlara karşı direncini artırması, antitümör etkisi ve karsinogeneze korunma, zararlı ışınların etkilerinden korunma ve immün sistemi güçlendirme, retikuloendotelial sistemin fagositik ve proliferatif aktivitesinin artırılmasını kapsamaktadır. Bütün glukanlar immün sistemi destekleme anlamında aynı değildir. Bu nedenle yulaftan, arpadan, çeşitli mantarlardan ve alglerden elde edilen glukanlar ekmek mayasından izole edilen beta glukan kadar kuvvetli değildir (50).

Beta glukan immüno-stimülant olduğu kadar, immün sistemin potent bir düzenleyicisi olarak da aktivite gösterir. Beta glukanın immüno-stimülant aktiviteleri, kanser hücre büyümesi ve metastazın bozulmasıyla, bakteriyel enfeksiyonun

indirgenmesi ve önlenmesiyle sonuçlanabilir. Beta glukanın immün sistem aktiviteleri, onun helikal konformasyonuna bağlıdır ve moleküler büyüklüğü de biyolojik aktivitelerini artırmak için gereklidir. Beta glukanın biyolojik aktiviteleri doku tamirine ve dokunun yeniden oluşmasına yardım etmek ve inflamasyonu modüle etmektir (51).

4.6.1. Beta Glukanın Biyolojik Aktiviteleri

Beta glukanın en önemli biyolojik aktivitesi, immün sistemi düzenleme yeteneğidir. Çünkü diğer etkileri de bu aktivitesine bağlıdır. Beta glukanın immüno-regülatör aktivitesi immün sistem kontrolünde veya makrofaj fagositozunu ayarlama rol oynayan sitokinlerin makrofajlardan salınımını uyarma ya da engelleme yeteneğiyle ilişkilidir. Beta glukanın diğer önemli biyolojik aktivitelerinden biri de onun kanser hücre büyümesi ve tümör gelişimi üzerindeki etkisidir ki bu aktivitesini immün sistemi uyarabilme yeteneği sayesinde yapar (51). Beta glukanın diğer bir önemli biyolojik aktivitesi ise bakteriyel enfeksiyonu önlemeye yardım etme yeteneğidir. Beta glukanın antitümör aktivitesini yükseltmesi kadar çeşitli viral, bakteriyel, protozoon ve fungal hastalıklara karşı direnci arttırdığı da gösterilmiştir Beta glukanın ayrıca vücut sağlığını destekleyen birkaç ek biyolojik aktiviteye sahiptir (52).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Deney Aşaması

5.1.1. Etik Kurul Onayı, Deney Hayvanlarının Temini, Bakımı ve Barınması

Çalışmamız Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2013/60 protokol numarasıyla onay almıştır. Tez çalışması için gerekli olan deney hayvanlarının temini ve saf malzeme alımı KTÜ BAP (Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birim) tarafından BAP02-Hızlı Destek Programı kapsamında 11940 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

Çalışmada 12 haftalık 250-300 gr ağırlığında 24 adet *Sprague Dawley* erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların bakımı, beslenmesi ve barınması KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi sıçan takip odalarında yapıldı. Deney süresince (5 gün) laboratuvarın sıcaklığı ortalama $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, nisbi nem ortalama $\%50 \pm 5$ olarak ayarlandı. Sirkadiyen ritminin devamı için odada bulunan ışıklar 12 saat açık 12 saat kapalı tutuldu. Sıçanların beslenmesinde standart sıçan yemi ve musluk suyu kullanıldı.

Çalışma süresince sıçanların barındırılmasında standart Tip III sıçan kafesleri kullanıldı. Her kafeste yeterli miktarda yem ve su kafes üzerinde hayvanların kolaylıkla ulaşabileceği bölmelere yerleştirildi (Resim 2A, B).



Resim 2. Sıçanların Bakımı ve Barınmasında Kullanılan Tip III Kafesler (A, B).

5.1.2. Çalışmada Kullanılan Gruplar ve Deneyin Uygulanması

Deneyde kullanılan 24 adet sıçan dört grupta altışar hayvan olacak şekilde ayrıldı. Denekler ağırlıklarına göre gruplara homojen şekilde dağıtıldı (Tablo 1).

1. Grup: Kontrol Grubu

Deney süresince yani 5 gün boyunca 6 adet sıçan standart yem ile beslendi. Beta glukun uygulanan sıçanlarla eş zamanlı olarak 5 gün boyunca kontrol grubuna serum fizyolojik gavaj yoluyla verildi. Başka bir uygulama yapılmadı.

2. Grup: MTX Grubu

Deneyin ilk günü (0.gün) tek doz olarak 6 adet sıçana 30 mg/kg Metotreksat intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı (14). Deney bitimine kadar yani 5 gün boyunca sıçanlara başka bir uygulama yapılmadı.

3. Grup: Beta Glukun Grubu (BG Grubu)

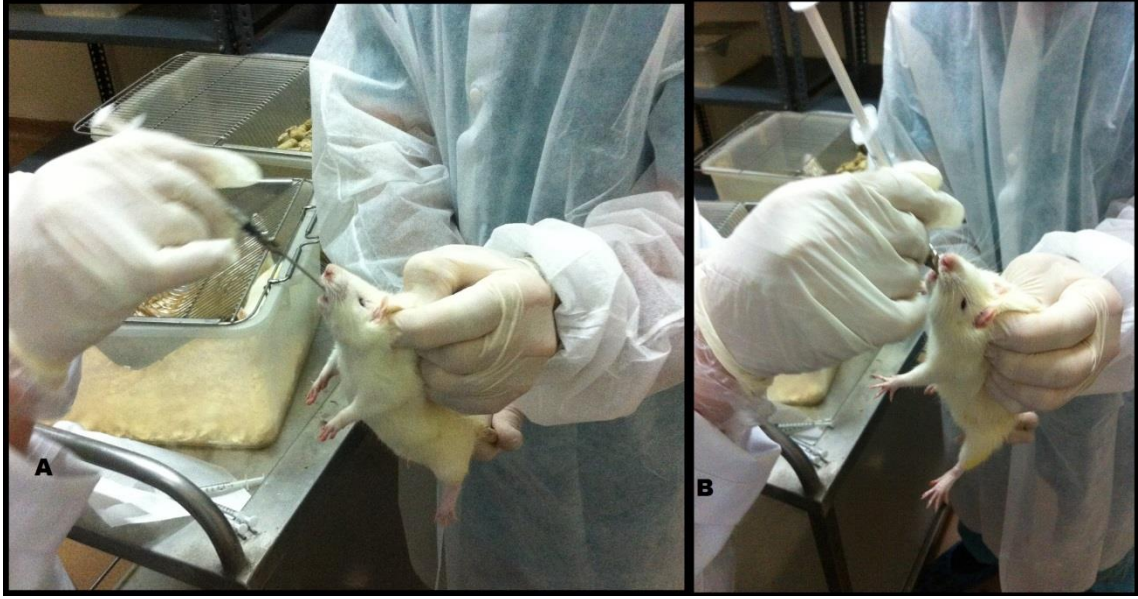
Deney süresince (5 gün) 6 adet sıçana Beta Glukun (50 mg/kg) 2 ml % 0.9' luk NaCl çözeltisinde (SF) süspansiyon haline getirilip gavaj yoluyla uygulandı (Resim 3 A, B) (11, 15, 16).

4. Grup: MTX+Beta Glukun Grubu (MTX+BG Grubu)

Deneyin ilk günü (0. gün) tek doz MTX (30mg/kg) intraperitoneal olarak ve ilk günden (0. günden) itibaren 5 gün boyunca BG (50mg/kg) 2 ml % 0.9' luk NaCl çözeltisinde (SF) süspansiyon haline getirilerek ve gavaj yolu ile 6 adet sıçana uygulanmıştır (Resim 3 A, B).

Deneklere uygulanan Beta glukun Mustafa Nevzat Drug Company'den temin edilmiş olup Metotreksat ise Koçak Farma' dan alınmıştır.

Bütün uygulamalar her gün aynı saatte (10:00-11:00 arası) yapıldı. Beşinci günün sonunda denekler kurifiye edilerek doku numuneleri alındı.



Resim 3. Sıçanlara Gavaj Yoluyla Beta Glukanın Verilmesi (A, B).

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Gruplar ve Gruplara Yapılan Uygulamalar

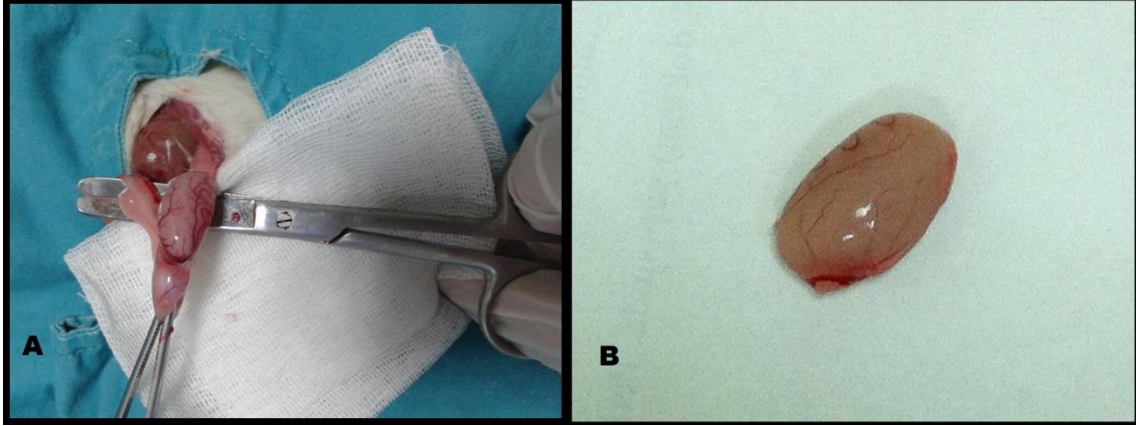
Gruplar	Uygulama
Kontrol Grubu (n:6)	Deney süresince (5 gün) gavaj yoluyla serum fizyolojik
BG Grubu (n:6)	Deney süresince (5 gün) gavaj yoluyla beta glukan (50mg/kg)
MTX Grubu (n:6)	Tek doz i.p 30 mg/kg metotreksat
MTX + BG Grubu (n:6)	Tek doz i.p. MTX (30mg/kg)+ Deney süresince (5 gün) gavaj yoluyla BG (50mg/kg)

5.2. Histolojik İşlemler

5.2.1. Doku Numunelerinin Elde Edilmesi

Beşinci günün sonunda bütün sıçanlar ketamin (50 mg/kg) ve ksilazinin (xylazine, 5mg/kg) i.p olarak uygulanmasından sonra yaklaşık on dakika uyutuldu. Karın boşluğundan girilerek sağ testis çıkarıldı (Resim 4 A, B). Daha sonra abdominal aorta makasla kesilerek kansızlaştırma yöntemiyle deneklere ötanazi yapıldı. Sağ testis çıkarılarak hassas terazide tartıldı. Elde edilen testis her biri boyuna ikiye bölündü. Her sıçanda aynı testis bölgesi olmak üzere sağ testisin bir yarısı histolojik değerlendirmeler için Bouin fiksatifine alındı.

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



Resim 4. Testis Çıkarılışı (A). Testisin Makroskopik Görüntüsü (B).

5.2.2. Bouin Fiksatifinin Hazırlanışı

Bouin fiksatifini hazırlamak için önce doymuş pikrik asit çözeltisi (75 mL) formaldehit (%37, 75 mL) ile iyice karıştırıldı, sonra üzerine yavaşça glasiyal asetik asit (5 mL) eklenerek tekrar karıştırıldı (53).

Bouin fiksatifine alınan testisler 18 saat ışık almayan kuru ortam ve oda sıcaklığında saklanıp sırasıyla sudan uzaklaştırma, şeffaflaştırma ve parafinden geçirilme işlemlerinden sonra blok haline getirildi.

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
6. Ksilen 5 dakika (3 kez)
7. Dokular eritilmiş parafin içerisinde önce 58 °C' lik etüvde üç kez 15 dakika, sonrasında ise 2 saat bekletildi.
8. Dokular oda sıcaklığında bloklandı.

5.2.3. Kesitlerin Alınması

Kesitler KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarındaki mevcut mikrotom ile alındı. Dokuya kadar 20 µm' lik kesitler alınarak dokunun parafini atıldı. Dokuya ulaşıldığında 5 µm' lik kesitler alındı. Kesitler benmari içindeki 45 °C' lik sıcak su üzerine koyularak kırışıklıkların açılması sağlandı ve lam üzerine yerleştirildi.

5.2.4. Kesitlerin Hematoksilen ve Eozin (H.E.) ile Boyanması

Tüm dokulardan kesitlerin alınması tamamlandıktan sonra boyama işlemine başlandı. Boyama sırasında H.E. boyaları kullanıldı. Tüm kesitlerin parafini 60 °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.

Hazırlanan preparatlarda seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve lümende olgunlaşmamış germinal hücrelerin görüldüğü tübül sayısı Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskopunda (IM) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak hesaplandı. Seminifer tübüldeki spermatogenetik hücreler ve interstisyel alan yine aynı mikroskopla incelendi ve resimler dijital ortama aktarıldı.

Testis seminifer tübülünde hasar değerlendirmesi için Johnsen skorum sistemi kullanıldı (54, 55).

Johnsen skorum sistemi (54)

- 10 : Germinal epitel çok sıralı, çok sayıda spermatozoa var
- 9 : Germinal epitelyum disorganize ve lümene doğru yığılma, spermatozoa var
- 8 : Germinal epitel çok sıralı ancak lümende 10'dan az spermatozoa var
- 7 : Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid var
- 6 : Spermatozoa yok, spermatid 10'dan az
- 5 : Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit var
- 4 : Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit 5'den az
- 3 : Germ hücre olarak sadece spermatogonia var
- 2 : Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi var
- 1 : Seminifer tübül içinde hiç hücre yok

5.3. İmmünohistokimyasal İşlemler ve Analizler

Testisteki apoptozu değerlendirmek için TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay) tekniği kullanılarak seminifer tübül germinal hücrelerinde DNA fragmentasyonları tanımlandı. Nekroz alanları bulunmayan, homojen boyanmış kahverengi nükleuslu TUNEL pozitif (+) hücreler apoptotik hücre olarak değerlendirildi. Her testiste en az 10 seminifer tübülde TUNEL (+) hücre sayısı ve toplam hücre sayısı bakılıp apoptotik yüzde (AI= TUNEL (+) hücre sayısı / toplam hücre sayısı x 100) hesaplandı (56).

5.3.1. TUNEL Boyama

TUNEL tekniği için In situ cell death detection kit, POD kiti kullanıldı. Lam üzerine alınan 5 µ' luk kesitler 1 saat 60 °C' lik etüvde bekletildikten sonra aşğıdaki işlemlerden geçirildi.

1. Oda ısısında 3x5 dk ksilende inkübe edildi.
2. %100 etanol 2x5 dk
3. %95 etanol 2x5 dk
4. %70 etanol 2x5dk
5. Distile su ile yıkandı.
6. Oda ısısında 20 µg/ml Proteinase K 15 dk
7. PBS (Phosphate Buffer Solution)' de yıkandı.
8. %3 H₂O₂' de 15 dk
9. Distile su ile yıkandı.
10. PBS'de 2x5 dk
11. Oda ısısında Large Volume UV (Ultraviyole ışın) block 10 dk
12. 75 µg Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve 50 µl TdT/dUTP karışımı ile dokular kaplandı, 37 °C' lik etüvde 1,5 saat nemli ortamda tutuldu.
13. PBS' de yıkandı.
14. 100 µ converter peroksidaz dokuyu kapatacak şekilde kaplandı ve 37 °C' lik etüvde inkübe edildi.
15. PBS'de 3x5 yıkandı.
16. 100 µl DAP ile 5 dk karanlıkta oda ısısında beklendi.
17. Distile suda 1x2 kez yıkandı.
18. Hematoksilen ile 15 sn boyanır ve çeşme suyu ile yıkandı.
19. %70 etanol 2x5dk
20. %95 etanol 2x5 dk
21. %100 etanol 2x5 dk
22. Ksilen 2x5 dk
23. Kurutulup entellan ile kapatıldı.

5.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences 13.1, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Her bir gruba ait sayısal veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak verildi ve Kruskal Wallis varyans analizi (post hoc olarak Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi) ile karşılaştırıldı ve karşılaştırmalarda $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Bulgular

6.1.1. Deney Gruplarının Vücut Ağırlıklarına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar

Deney gruplarına ait sıçanların vücut ağırlıklarının karşılaştırılması Tablo 2’ de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu deney öncesi vücut ağırlıkları ile deney sonrası vücut ağırlıkları gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında MTX Grubu ve MTX+BG gruplarının vücut ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşmüştür (Paired T Testi, iki eş arasındaki farkın önemlilik testi, $p<0.05$). Kontrol grubu ve BG gruplarının deney öncesi ile deney sonrası vücut ağırlıkları kendi içlerinde karşılaştırıldığında, Kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmuştur ($p<0.001$). BG grubundaki artış ise istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p=0.852$).

Tablo 2. Deney Gruplarının Deney Öncesi ve Deney Sonrası Vücut Ağırlıklarına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar

Gruplar	Deney Öncesi Vücut Ağırlığı (gr)	Deney Sonrası Vücut Ağırlığı (gr)
Kontrol Grubu	282.50*±16.65	301.33*±12.35
BG Grubu	297.50±21.38	298.16±18.17
MTX Grubu	289.16**±36.38	270.33**±39.50
MTX +BG Grubu	285.00***±33.91	245.16***±35.44
*: Kontrol grubunun deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.001$).		
**: MTX grubunun deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında anlamlı şekilde düşmüştür.		
***: MTX+BG grubunun deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında anlamlı şekilde düşmüştür.		

6.1.2. Deney Gruplarının Testis Ağırlıklarına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar

Deney gruplarına ait sıçanların testis ağırlıklarının karşılaştırılması Tablo 3’ de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda Kontrol, BG, MTX ve MTX + BG gruplarının testis ağırlıkları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (One Way ANOVA, $p= 0.996$).

Tablo 3. Deney Gruplarının Testis Ağırlığına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar

Gruplar	Testis Ağırlığı (gr)
Kontrol Grubu	1.40±0.15
BG Grubu	1.40±0.14
MTX Grubu	1.40±0.15
MTX + BG Grubu	1.41±0.11

6.2. Morfometrik Bulgular

6.2.1. Seminifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığına Ait Bulgular

Deney gruplarına ait seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığına ait ölçüm sonuçları Tablo 4’ de verilmiştir. Hesaplanan istatistiksel sonuçlarda MTX grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında seminifer tübül çapında bir azalma meydana geldiği gözlemlendi. MTX grubunda kontrol grubuna göre bir azalma görülmüştür ama bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tukey HSD, $p<0.05$). Bu azalma sadece MTX ve BG grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlıdır. MTX+BG grubunda MTX grubuna göre seminifer tübül çapında bir artış görüldü ama bu artış istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p=0,052$). Kontrol grubu ile BG grubu kıyaslandığında seminifer tübül çapında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Germinal epitel kalınlığı açısından MTX grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalma meydana geldiği görüldü. MTX+BG grubundaki germinal epitel kalınlığı MTX grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artma görüldü (Tukey HSD, $p<0.05$).

Tablo 4. Deney Gruplarına Ait Morfometrik Ölçümlerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Gruplar	Seminifer Tübül Çapı (μm)	Germinal Epitel Kalınlığı (μm)
Kontrol Grubu	255.81 ±6.71	80.26 ±1.95
BG Grubu	262.43 ±12.40	72.12 ±3.40
MTX Grubu	242.04*±10.03	54.89**±4.52
MTX +BG Grubu	258.06 ±9.92	64.88***±4.82

* : MTX grubundaki değerler, BG grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede azalmıştır.
 **: MTX grubundaki germinal epitel kalınlığı, diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir derecede azalmıştır.
 ***: MTX+BG grubundaki germinal epitel kalınlığı, MTX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır.

6.2.2. Johnsen Skorumlama Sonuçları

Deney gruplarındaki testis hasar değerlendirmesi Johnsen skorumlama sistemi ile belirlendi. Sonuçlar Tablo 5’ de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre MTX grubunun diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu gözlendi (Tukey HSD, $p<0.05$). MTX grubundaki testis hasarı diğer gruplara göre anlamlı derecede artmıştır. MTX grubu ile MTX+BG grubu hasar yönünden kıyaslandığında, MTX+BG grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş görüldü (Tukey HSD, $p<0.05$). Bu sonuçlar MTX grubundaki testis hasarının diğer gruplara göre arttığını; MTX ile birlikte BG uygulanan sıçanlarda ise testis hasarının MTX grubuna göre azaldığını göstermektedir.

Tablo 5. Deney Gruplarına Ait Johnsen Skorumlama Sistemi Değerlendirme Sonuçları

Gruplar	Johnsen Skorumlama Sonuçları
Kontrol Grubu	8.91 $\pm$ 0.23
BG Grubu	8.70 $\pm$ 0.52
MTX Grubu	6.05* $\pm$ 0.57
MTX + BG Grubu	8.38** $\pm$ 0.38
*: MTX grubundaki testis hasarı diğer gruplara göre anlamlı derecede artmıştır.	
**: MTX+BG grubundaki testis hasarı MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır.	

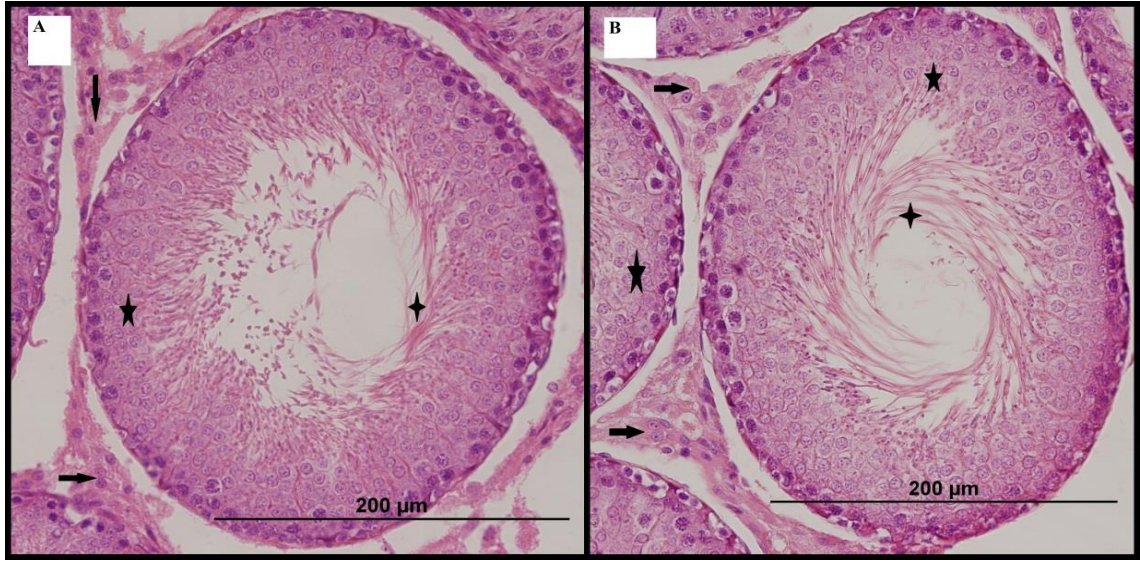
6.3. Histopatolojik Değerlendirmeler

Testis dokusu histopatolojik olarak incelendiğinde kontrol grubuna ait kesitlerde, normal morfolojik yapı gözlenmiştir. Seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücreler olan spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit ve spermatidler düzenli dizilmiştir. Birçok seminifer tübülün lümeninde çok sayıda spermatozoa görülmüştür. Sertoli hücreleri normal görünümdeydi ve interstisyel alan dokusunun bütünlüğünü koruduğu gözlendi. Değerlendirme sonucunda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı (Resim 5A).

BG grubundaki seminifer tübüller kontrol grubuna benzer şekilde olduğu spermatogenik hücre döngüsünün normal biçimde seyrettiği ve tübül yapısı bütünlüğünün korunduğu görüldü. Değerlendirme sonucu herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı (Resim 5B).

MTX grubuna ait testis kesitlerinde, seminifer tübüllerin lümenine olgunlaşmamış germinal epitel hücrelerin döküldüğü, Seminifer tübül ve germinal epitel hücrelerinde düzensizlikler görüldü. Seminifer tübül epitelinde ve bazal membranında yer yer açılmalar ve vakuoller gözlemlendi. İnterstisyel alanda ödem izlendi. (Resim 6).

MTX+BG grubundaki seminifer tübüllerde Sertoli hücresi ve spermatogonyum arasındaki açılmaların, vakuolizasyonun ve interstisyel alanda ödemin belirgin derecede azaldığı, seminifer tübüllerin lümeninde birkaç germinal epitel hücrelerin dışında spermatogenik hücrelerin yapısının korunduğu izlendi ve herhangi bir patolojiye rastlanmadı (Resim 7).



Resim 5. Kontrol Grubuna (A) ve BG Grubuna (B) Ait Testis Dokusu. Kontrol Grubuna ve BG Grubuna ait normal yapıdaki testis dokusunda seminifer tübüller (★), spermatazoonlar (✦) ve aralarındaki interstisyel doku (↓), leydig hücreleri (—→) görülmektedir (H&E, X400).



Resim 6. MTX Grubuna Ait Testis Dokusu. MTX Grubunda seminifer tübülde vakuoller (↓) ve bazal membranda vakuoller (←), lümene dökülen olgunlaşmamış germ hücreleri (→) dikkat çekmektedir (H&E, X400).



Resim 7. MTX+ BG Grubuna Ait Testis Dokusu. MTX+ BG Grubu lümeninde spermatazoon yoğunluğu (★), lümeninde az sayıda olgunlaşmamış germ hücreleri (→) ve interstisyel doku (↓) görülmektedir (H&E, X400).

6.4. Tunel Bulguları

Deney gruplarına ait testis dokularının TUNEL tekniği ile değerlendirilen apoptotik indeks (AI) Tablo 6 ve Resim 8- 11' de verilmiştir. AI değerlendirmesine göre; AI'in MTX grubunda kontrol grubuna ve BG grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı görüldü. MTX +BG grubuna ait AI'in MTX grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede azaldığı izlendi.

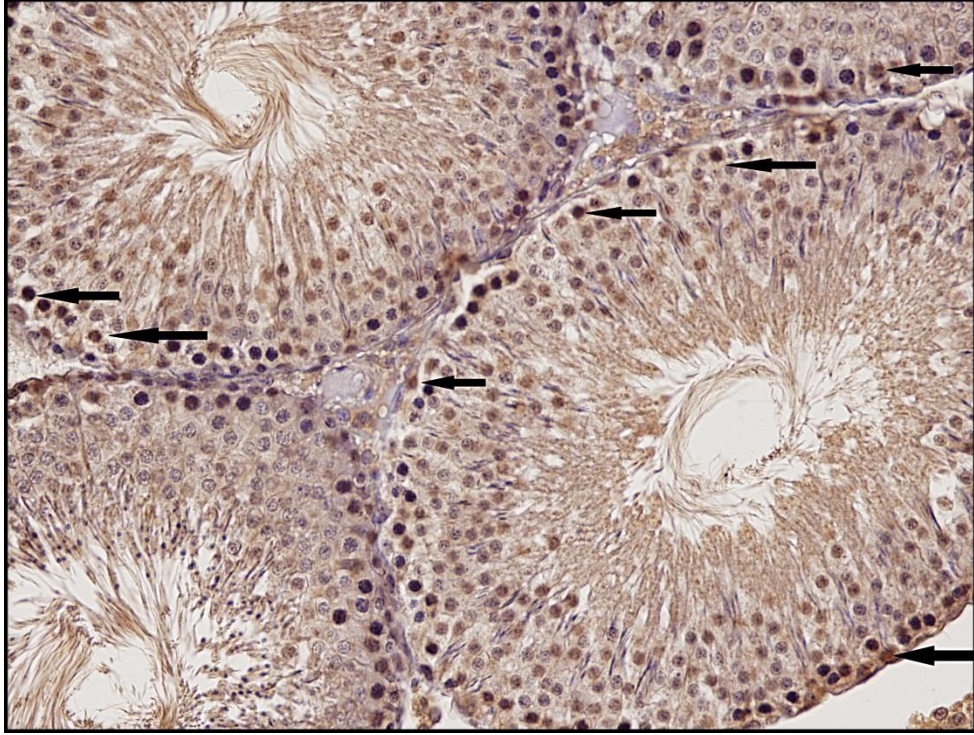
Tablo.6. Deney Gruplarına Ait AI Değerlendirme Sonuçları

Gruplar	Apoptotik İndeks (%)
Kontrol Grubu	3.67 ±0.64
BG Grubu	4.65 ±0.50
MTX Grubu	16.76*±1.87
MTX + BG Grubu	10.91**±0.59

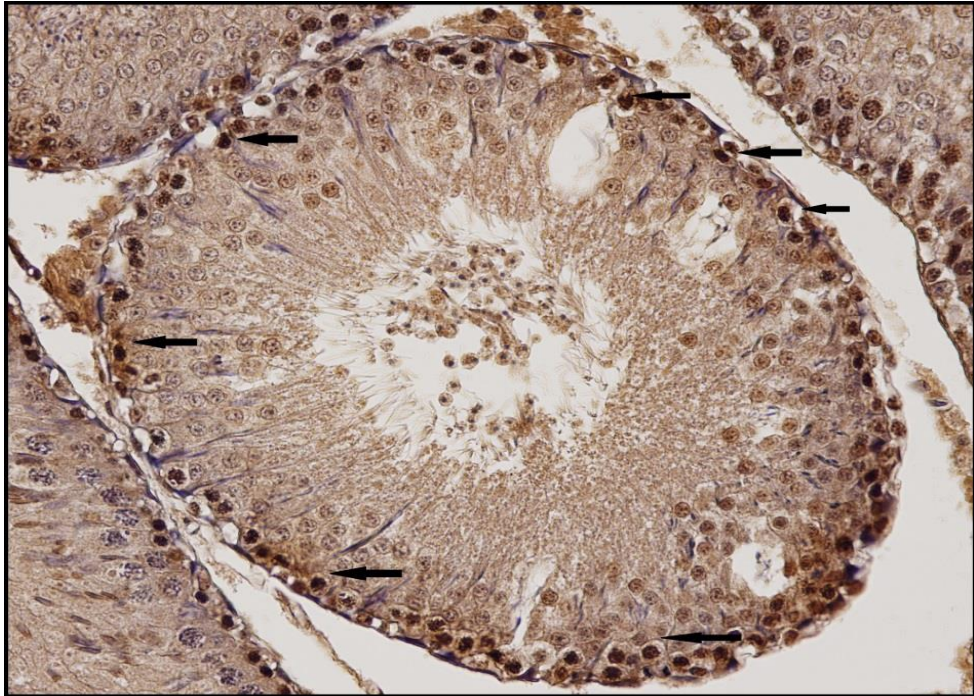
*: MTX grubundaki AI'in kontrol grubuna ve BG grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır (p<0.05).
**:MTX +BG grubuna ait AI'in MTX grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede azalmıştır (p<0.05).



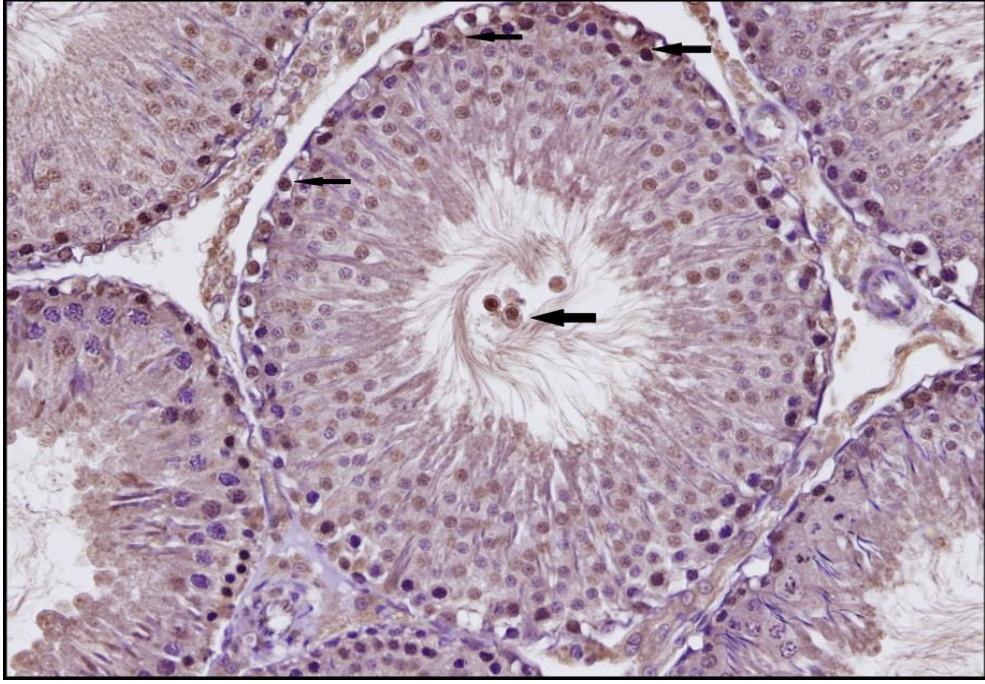
Resim 8. Kontrol Grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (←) görülmektedir (TUNEL, X400).



Resim 9. BG Grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (←) görülmektedir (TUNEL, X400).



Resim 10. MTX Grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (←) görülmektedir (TUNEL, X400).



Resim 11. MTX + BG Grubuna ait testis dokusunda gözlenen TUNEL (+) hücreler (←) görülmektedir (TUNEL, X400).

7. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

MTX bazı kanser türlerinde bir kemoterapik ajan olarak, lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri, mesane kanseri, testis tümörü ve diğer bazı kanser tiplerinde kullanıldığı gibi psöriasis, dermatomiyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit (RA) gibi bazı inflamatuvar hastalıklarda da yaygın şekilde kullanılan bir folik asit antagonistidir (8, 9). Metotreksat dihidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin aktif noktasına sıkı bir şekilde bağlanarak enzimi inhibe eder (57, 58). Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu timidilat ve pürin nukleotidlerinin (adenin ve guanin) biyosentezinin durmasına yol açar. Bu da hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA sentezini inhibe eder. Bu metabolik yollar üzerinde yaptığı değişiklikler nedeniyle MTX' in tedavi edici etkileri yanında toksik etkileride ortaya çıkmaktadır (40). MTX' in kısa ve uzun dönem kullanımlarına bağlı olarak pek çok yan etkilerinin olduğu yapılmış deneysel hayvan çalışmalarında saptanmıştır.

Son birkaç yıl içinde araştırmacıların ilgileri, organizmanın savunma mekanizmalarını uyaran ve doğal olarak oluşan maddelere karşı artmıştır. Bu maddeler arasında, biyolojik tepki modifiye ediciler olarak bilinen glukanlar vardır. Yapılan çalışmalar, beta glukanların temel immunofarmakolojik aktivitelerinin, konakçının viral, bakteriyel, fungal ve parazitik enfeksiyonlarına karşı direncinin artırılması, antitümör etki, karsinogenezden korunma, immun sistemi güçlendirme, retiküloendotelyal sistemin fagositik ve proliferatif aktivitesinin artırılması şeklinde olduğunu göstermektedir. Bazı mantar glukanları, örneğin *Lentinan* ve *Schizophyllan*, Japonya' da kanser tedavisi için klinik olarak kullanılmaktadır (59). Şener ve arkadaşları (2006) ile Tsiapali ve arkadaşları (2001)' nin yapmış oldukları çalışmada, glukanların serbest radikal süpürücü aktiviteye sahip olduklarını göstermişlerdir. Bunlara ek olarak, beta glukan; kemoterapi ve radyoterapi alan kanser hastalarında, kemoterapötiklerin ve radyasyonun meydana getirdiği yan etkileri engellemek için verilmektedir (18). Ayrıca beta glukanın daha önceden yapılan çalışmalarda tümör hücre çoğalmasını önleme (60, 61), makrofaj aktivasyonunu artırma (46), sitokin sentezini artırma (62, 63), nitrik oksit ve arşidonik asit sentezini artırma (64, 65) ve antioksidan (66, 67) özellikleri saptanmıştır. Oral olarak verildiğinde sepsis, ciltte oluşan basınç ülseri, iskemi veya

asetaminofen ve metotreksat gibi ilaçlarla gelişen oksidatif strese koruyuculuğu çalışmalarda gözlenmiştir (68, 69).

Biz çalışmamızda, güçlü bir antioksidan olduğu bilinen Beta glukanın MTX' in kullanımına bağlı olarak oluşan hasarları azaltmada bir faydasının olup olmadığını araştırmayı ve yapılan çalışmalara katkıda bulunmayı amaçladık.

Bu çalışmada; sıçanlara birçok kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antineoplastik ajan olan MTX ile birlikte antioksidan etkisi bilinen beta glukanın verilmiştir. Biz sıçanlara MTX' i Yuluğ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer şekilde, doku toksisitesi oluşturacak dozda intraperitoneal yolla tek seferde 30 mg/kg dozdan uyguladık (14). Çalışmamızda sıçanlara antioksidan madde olarak beta glukanın 50 mg/kg'lık dozu kullanılmıştır(11, 15, 16).

Padmanabhan ve arkadaşları (2008)' nin yaptığı çalışmada, MTX ile tedavi edilen sıçanlarda, kontrol grubuna göre ortalama vücut ağırlığının düşük olduğu bulunmuştur (70). Çalışmamızda yapılan çalışmaya benzer şekilde, sıçanların deney öncesi vücut ağırlıkları ile deney sonrası vücut ağırlıkları (gruplar kendi içinde) karşılaştırıldığında MTX ve MTX+BG grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu bulunmuştur. MTX uygulanan sıçanlarda vücut ağırlıklarının diyare gelişimi sonucunda azaldığı düşünülmektedir.

Armağan ve arkadaşları (2008)' nin yaptıkları bir çalışmada ise testis ağırlığında görülen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi (71). Bizim yaptığımız çalışmada bu çalışmaya benzer şekilde deney gruplarının testis ağırlıkları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı.

Şener ve arkadaşları (2006)' nin yaptığı bir çalışmada, MTX tedavisi uygulanan sıçanların ileal, karaciğer ve böbrek dokularında hasar görülmüş ancak beta glukanın ileal tedavi edilen MTX grubunda ise bu hasarın azaldığı bulunmuştur (11). Vardı ve arkadaşları (2009)' nin bulgularına göre sıçan testislerinde MTX' in seminifer tübüllerde atrofiye, germinal hücrelerin dökülmesine ve apoptoza yol açtığı gözlenmiştir (72). Yapılan bir diğer çalışmada MTX' in; seminifer tübül epitel boyunda kısalma, interstisyel alanda ödem, spermatogonyum sayısında azalma görüldüğü belirtilmiştir(73). Yuluğ ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada MTX

grubunda, seminifer tübüllerin lümeninde spermatozoon kaybı ve olgunlaşmamış germinal hücreleri gözlenmiştir (14). Shrestha ve arkadaşları (2007)'nın bir çalışmasında ise i.p. olarak uygulanan MTX' in sıçanlardaki seminifer tübül çaplarında azalmaya ve Leydig hücre morfolojisinde bozulmalara neden olduğu söylenmiştir (74). Saxena ve arkadaşlarının (2004) sıçan testisi üzerinde yaptıkları bir çalışmada; uygulanan MTX' in; anlamlı derecede seminifer tübül çapında azalma ve interstisyel alan çapında artış olduğu görülmüş. Büyüklükleri değişmiş primer ve sekonder spermatositler ile spermatidler, şekilleri ovalden yuvarlağa değişen ve vakuolizasyon görülen spermatositler, Sertoli ve Leydig hücresi boyutlarında önemli derecede azalma ve bazal membranda yer yer incelme ve düzensizlik g r ld ğu belirtilmiştir (75). Bizim  alışmamızda ışık mikroskobunda yapılan morfolojik değerlendirmelerde bu çalışmalara paralel olarak, MTX grubuna ait seminifer tübüllerin lümeninde olgunlaşmamış germinal epitel hücrelerin d k ld ğu, Seminifer tübül ve germinal epitel hücrelerinde düzensizlikler görüldü. Seminifer tübül epitelinde ve bazal membranında yer yer açılmalar ve vakuoller gözlendi. İnterstisyel alanda  dem g r lm ştir. MTX+BG grubundaki seminifer tübüllerde Sertoli hücresi ve spermatogonyum arasındaki açılmaların, vakuolizasyonun ve interstisyel alanda ödemin belirgin derecede azaldığı, seminifer tübüllerin lümeninde birkaç germinal epitel hücrelerin dışında spermatogenik hücrelerin yapısının korunduğu izlendi ve herhangi bir patolojiye rastlanmadı. Kontrol ve BG grubu testis yapısında herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır ve bu kesitlerde normal morfolojik yapı gözlenmiştir.

Morfolojik incelemelerin yanı sıra morfometrik ölçümlerle sıçan testislerindeki hasarı belirlemek için seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı değerlendirilmiştir. Hesaplanan seminifer tübül çaplarında, MTX grubunda seminifer tübül çapının diğer gruplara göre bir azalma olduğu g r lm ştir. Kontrol grubu ile MTX grubundaki azalma kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu azalma MTX grubunda BG grubuna göre istatistiksel açıdan önemli derecededir. Bu azalmanın spermatogenezisi olumsuz etkileyeceği düşünülmektedir. MTX+BG grubunda ise MTX grubuna göre seminifer tübül çapında bir artış görüldü ama bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p=0,052$). Fakat p değerinin sınıra yakın olması sebebiyle denek sayısının arttırılarak çalışmaların tekrarlanması bu farkın anlamlı çıkabileceği düşündürmektedir. Kontrol ile BG grubu kıyaslandığında seminifer tübül

apında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Germinal epitel kalınlığı açısından MTX grubu diğery gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı derecede bir azalma meydana geldiğı görüldü. MTX+ BG grubunda ise MTX grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak germinal epitel kalınlığında anlamlı derecede bir artış görüldü.

Biz alışmamızda deney gruplarına ait testis dokularındaki apoptozu TUNEL tekniğı ile değerlendirdik. Bu değerlendirme sonucunda, MTX grubunda Apoptotik İndeks (AI)' in kontrol grubu ve BG grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı görüldü. MTX +BG grubuna ait AI' in ise MTX grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede azaldığı izlendi. Vardı ve arkadaşları (2010)' nın apoptozu değerlendirdikleri çalışmada, MTX grubunda seminifer tüböl epitelinde kaspaz-3 ile boyanmış germ hücrelerinin sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuştur ve bizim çalışmamız da bu çalışmayı destekler niteliktedir (72).

Tüm bu veriler ve çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre; MTX' in testislerde histopatolojik bir hasar oluşturduğu ve bir antioksidan olan beta glukanın bu hasarı azalttığını söyleyebiliriz. Bu çalışmanın sonuçlarının desteklenebilmesi için bu maddelerin farklı kombinasyonları uygulanarak, farklı sürelerde yeni çalışmaların yapılması gerekmekte ve daha kesin sonuçlara ulaşabilmek için farklı dozlarda, daha fazla sayıda denekle çalışılması önerilmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Olah E (2005). Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination. The Journal of The International Federation of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine. Vol 16 No 2.
2. Dökmeci İ (2000). Farmakoloji Temel Kavramlar. Nobel Tıp Kitapevleri, 975-991.
3. Baloglu E (2001). Synthesis and Biological Evaluation of Paclitaxel Analogs, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia.
4. Dökmeci İ (1992). Farmakoloji İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar. Nobel Tıp Kitapevleri, 819-831.
5. Kim JC, Kim KH, Chung MK (1999). Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent in rats. Reprod Toxicol 13: 391-97.
6. Perez A, Woods A, Grattan CE (2009). Methotrexate: a useful steroid-sparing agent in recalcitrant chronic urticaria. Br J Dermatol. 2010 Jan; 162(1): 191-4.
7. Bleyer WA, Poplack DG (1985). Prophylaxis and treatment of leukemia in the central nervous system and other sanctuaries [Review]. Semin Oncol 12:131-148.
8. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena G (2008). Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. Mutation Research 655: 59-67.
9. Armağan A, Uzar E, Uz E, Yılmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoğlu HR, et al. (2008). Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. Human and Experimental Toxicology 7: 547-52.
10. Oktar S, Gökçe A, Aydın M, Davarcı M, Meydan S, Öztürk OH, Koç A (2010). Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. Toxicology and Industrial Health 26 (7) : 433- 438.
11. Şener G, Demiralp Ekşioğlu E, Çetiner M, Ercan F, Yeğen BÇ (2006). B-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. Eur J Pharmacol 542: 170-78.

12. Ateşşahin A, Sahna E, Türk G, Ceribaşı 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.
13. Ateşşahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Çeribaşı AO (2006). Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* 21: 42-7.
14. Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C (2013). Effects of Resveratrol on Methotrexate-Induced Testicular Damage in Rats. *Scientific World Journal*.
15. Çağlayan K, Erdoğan E, Avcı B, Güngör B, Çınar H, Arslan N (2013). Effect of Beta-Glucan on Intestinal Anastomoses in a Rat Model. *Adv Clin Exp Med* 22, 2: 157-163.
16. Şener G, Toklu H, Ercan F, Erkanlı G (2005). Protective effect of beta-glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *International Immunopharmacology* 5 : 1387-1396.
17. Tsiapali E, Whaley S, Kalbfleisch J, et al. (2000). Glucans Exhibit Weak Antioxidant Activity, But Stimulate Macrophage Free Radical Activity. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 30, No. 4, 393-402
18. Keller T (2000). Compounding with beta-1,3-Glucan. *International Journal of Pharmaceutical Compounding* 4 (5): 342-345.
19. Kerse İ (1974). İnsan Embriyolojisine Giriş. Hacettepe Üniversitesi Yayınları 52-75.
20. Yıldırım M (2000). İnsan Anatomisi. Beşinci baskı. Nobel Yayıncılık, İstanbul, 24-229.
21. Dere F (1999). Anatomi atlası ve ders kitabı. Nobel tıp kitapevleri, Adana.
22. Arıncı K, Elhan A (2006). Anatomi, 1. Cilt, Güneş Kitabevi, Ankara; 29-4.
23. Cumhuri M, Yener N, Tuncel M (2001). Temel Anatomi. METU Press, Ankara; 287-292.

24. Çimen A (1987). Anatomi. Birinci baskı. Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa; 396-397.
25. Sancak B, Cumhur M (1999). Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar. Beşinci baskı. ODTÜ Yayıncılık, Ankara.
26. Moore KL, Persaud TVN. İnsan embriyolojisi (Türkçe çeviri, Arcalı S.). Altıncı baskı. İzmir, Güven Kitapevi, 2002; 252-84.
27. Şeftalioğlu A (1998). Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. Üçüncü baskı. Tıp ve Teknik Yayıncılık, Ankara; 346-350.
28. Sandler TW (1996). Langman's Medical Embryology. Medikal Embriyoloji. Seventh ed. Çeviren: Başaklar AC, Palme Yayıncılık, Ankara, 272-275.
29. Paker Ş (1990). Histoloji. Birinci Baskı. Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa; 260-288.
30. Junqueira LC, Carneiro J (2006). Basic Histology. Temel Histoloji Text & Atlası. Tenth ed. Çeviren: Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 431-447.
31. Clara M, Maskar Ü (1970). Histoloji. II. Sermet Matbaası, İstanbul.
32. Lowe JS, Alan SA (1997). Human Histology. Second ed Mosby, Spain, Barcelona; 310-319.
33. Erben T (1990). Histoloji. İkinci baskı. Güneş Kitabevi Yayınları, Ankara; 153-190.
34. Clermont Y (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev 52: 198-236.
35. Ameisen JS (1996). The origin of programmed cell death. Science 272: 1278-1279.
36. Thompson CB (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267:1456-1462.
37. Kiess W, Gallaher B (1998). Hormonal control of programmed cell death apoptosis. Eur J Endocrin 18: 482-491.

38. Öztürk F (2002). Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 9(2): 143-148.
39. Taşpınar T (2008). GSM 900 ve 1800 MHz Telefonların Oluşturduğu Manyetik Alanın Hematolojik Parametreler ve Kemik İliği Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Isparta.
40. Kayaalp O (2005). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1. Cilt. 11. Baskı. Hacettepe-Taş Yayıncılık. Ankara; 317-343.
41. Flores F, Kerdel FA (2000). Other novel immunosuppressants. Dermatol Clin. Jul;18(3):475-483.
42. Rosenfeld GC, Loose DS (1999). Antimetabolitler, In: Selçukbiricik S. (ed) Farmakoloji, (Second Edition), Nobel Tıp kitabevleri, İstanbul.
43. 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.
44. Dökmeci İ, (2007). Farmakoloji ilaçlar ve etkileri, Birinci Baskı, Alfa Yayınları, İstanbul; 1254 s.
45. Brown GD, Gordon S (2003). Fungal beta-glucans and mammalian immunity. Immunity 19(3): 311-315.
46. Cleary JA, Kelly GE, Husband A (1999). The effect of molecular weight and beta-1,6 linkages on priming of macrophages function in mice by (1,3)-beta-glucan. Imm Cell Biol 77(5): 395-403.
47. Volman JJ, Ramakers D, Plat J (2008). Dietary Modulation of Immune Function by Beta-Glucans. Physiology&Behavior 94:276-284.
48. Tam TM, Duy NQ, Minh NP, Dao DTA (2013). Optimization Of Beta-Glucan Extraction From Waste Brewer's Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* Using Autolysis, Enzyme, Ultrasonic And Combined Enzyme - Ultrasonic Treatment. American Journal of Research Communication 1(11): 149-158.
49. Kayalı H, Özdağ MF, Kahraman S, Aydın A, Gönül E, Sayal A, Odabaşı Z, Timurkaynak E (2005). The Antioxidant Effect of Beta-Glucan on Oxidative Stress

- Status in Experimental Spinal Cord Injury in Rats. Pub-Med Medline 28(4):298-302.
50. Carrow DJ (1996). Beta 1,3-Glucan as a primary immune activator. Townsend Letter for Doctors and Patients 84-91.
 51. Gardiner T (2000). A Review: Beta-glucan Biological Activities. GlycoScience 1 (32): 1-6.
 52. Davis JM, Murphy EA, Brown AS, Carmichael MD, Ghaffar A, Mayer EP (2004). Medicine & Science in Sports & Exercise. 36(8): 1321-1327.
 53. Demir R, Yilmazer S, Öztürk M, Üstünel İ, Demir N, Korgun ET, Akkoyunlu G (2001). Histolojik Boyama Teknikleri. Birinci Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara; 9-10.
 54. Johnsen SG (1970). Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones 1: 2-25.
 55. Oliveira Filho AB, Souza RS, Azeredo-Oliveira MT, Peruquetti RL, Cedenho AP (2010). Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis. Genet Mol Res 9(3):1405-13.
 56. Potten CS (1996). What is an apoptotic index measuring? A commentary. Br J Cancer 74 (11):1743-8.
 57. Jollivet J, Cowan K, Curt G, Clendeninn N, Chabner B (1983). The pharmacology and clinical use of methotrexate. N. Eng. J. Med. 309:1094-1104
 58. Iqbal MP, Sultana F, Mehboobali N, Pervez S (2001). Folinic acid protects against suppression of growth by methotrexate in mice. Biopharm Drug Dispos 22:169-178.
 59. Tohamy AA, El-Ghor AA, El-Nahas SM, Noshay MM (2003). Beta-Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. Mutation Research 541: 45-53.
 60. Ross GD, Vetvicka V, Yan J, Xia Y, Vetvickova J (1999). Therapeutic intervention with complement and b-glucan in cancer. Immunopharmacology 42: 61-74.

61. Vetvicka V, Yvin JC (2004). Effect of marine b-1,3 glucan on immune reactions. *Int. Immunopharmacol* 4: 721-730.
62. Engstad CS, Engstad RE, Olsen JO, Osteud B (2002). The effect of soluble b-1,3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. *Int. Immunopharmacol* 2: 1585-1597.
63. Solyths J, Quinn MT (1999). Modulation of endotoxin and enterotoxin-induced cytokine release by in vivo treatment with b-(1,6)-branched b-(1,3)-glucan. *Infect Immun* 67: 244-250.
64. Hashimoto T, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T (1997). Enhanced production of inducible nitric oxide synthase by b-glucans in mice. *Immunol. Med. Microbiol* 19: 145-50.
65. Ljungman AG, Leanderson P, Tagesson C (1998). B(1-3)-D-glucan stimulates nitric oxide generation and cytokine mRNA Expression in macrophages. *Environ. Toxicol. Pharmacol* 5: 273-281.
66. Babincova M, Bacova Z, Machova E, Kogan G (2002). Antioxidant properties of carboxymethyl glucan: comparative analysis. *J. Med. Food*. 5: 79-83.
67. Krinzkova L, Durackova Z, Sandula J, Slamenova D, Sasinkova V, Sivonova M, Krajcovic J (2003). Fungal beta-(1-3)-D-glucan derivatives exhibit high antioxidative and antimutagenic activity in vitro. *Anticancer. Res.* 23: 2751.
68. Bayrak O, Turgut F, Karataş OF, Çimentepe E, Bayrak R, Çatal F, Atış O, Akçay A, Ünal D (2008). Oral betaglucan protects kidney against ischemia/reperfusion injury in rats. *Am. J. Nephrol*; 28: 190-196.
69. Pillemer L, Ecker EE (1941). Anticomplementary factor in fresh yeast. *J. Biol. Chem* 137: 139.
70. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB (2009). Methotrexate induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: Intervention of folic and folinic acid. *Mutation Research* 673/s 43-52.

71. Armağan A, Uzar E, Uz E, Yılmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoğlu HR, Soyupek S, Cam H, Serel TA (2008). Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of. *Human & Experimental Toxicology* 27: 547.
72. Vardi N, Parlakpınar H, Ateş B, Çetin A, Otlı A (2009). Antiapoptotic and antioxidant effects of betacarotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril* 92: 2028-33.
73. Gökçe A, Oktar S, Koç A, Yonden Z (2011). Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. *Human and Experimental Toxicology* 30(8) 897-903.
74. Shrestha S, Dhungel S, Saxena AK, Bhattacharya S, D Maskey (2007). Effect of methotrexate (MTX) administration on spermatogenesis: an experimental on animal model. *Nepal Med Coll J Dec*; 9(4):230-3.
75. Saxena AK, Dhungel S, Bhattacharya S, JHA CB, Srivastava AK (2004). Effect Of Chronic Low Dose Of Methotrexate On Cellular Proliferation During Spermatogenesis In Rats. *Archives of Andrology* 50: 33-35.

9. ETİK KURUL ONAYI

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



**KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE**

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

Çalışmasının Adı : “Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Beta Glukan’ın Etkisi”
Çalışmacılar : Prof.Dr.Yavuz TEKELİOĞLU, Yük.Lis.Öğr.Fidan KOÇ,
Doktora Öğr.Sibel TÜREDİ
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji ABD.

Etik Kurul Dosya No 2013/ 60	Etik Kurul Toplantı Tarihi 19.11.2013	Etik Kurul Toplantı No 2013/17	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 Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Beta Glukan’ın Etkisi” başlığını taşıyan tez çalışmasının, Karadeniz Teknik Üniversitesi’nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (19.11.2013)

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

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport No :
Soyadı, Adı : KOÇ, Fidan
Uyruğu : TC
Doğum tarihi ve yeri : 27/09/1987 – Trabzon
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 462 3777730
Faks : -
E-Posta : fidan.koc@hotmail.com
Yazışma adresi : KTÜ Histoloji - Embriyoloji Anabilim
Dalı

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	KTÜ Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalı	2015
Lisans	KTÜ Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği	2011
	KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2014
Lise	Akçaabat Lisesi	2004

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

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

YABANCI DİL : İngilizce

UZMANLIK ALANI

YAYINLAR/BİLDİRİLER

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

HOBİLER