



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LİNOLEİK ASİT'İN SIÇANLARDA
METOTREKSAT KAYNAKLI TESTİS
HASARINA KARŞI ANTİOKSİDAN VE
ANTİAPOPTOTİK ETKİLERİ**

Beyza AYAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

TRABZON-2016

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora 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 Beyza AYAN'ın hazırladığı "Linoleik Asit'in Sıçanlarda Methotrexate
Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Antioksidan ve Antiapoptotik Etkisi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü
Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite
yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Engin YENİLMEZ



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

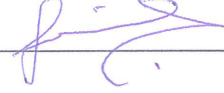
Prof. Dr. Engin YENİLMEZ



Prof. Dr. Esin YULUĞ



Prof. Dr. Feriha ERCAN



.....



.....



Tarih: 08/11/2016

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

sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

08.11.2016

Beyza AYAN

İTHAF

En değerli varlığım olan aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca her daim yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Engin YENİLMEZ'e; bu süreçte bilgi ve becerileriyle bizlere ışık tutan KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri olan değerli hocalarımız Prof. Dr. Esin YULUĞ, Prof. Dr. Ersan ODACI, Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU'na; tanımaktan kıvanç duyduğum kıymetli uzmanlık öğrencisi arkadaşlarımız Arş. Gör. Dr. Ahmet Uğur AKMAN, Uzm. Dr. Derya ÖZTÜRK OKATAN, Arş. Gör. Dr. Gökşen Derya REİS KÖSE ve Arş. Gör. Dr. Senem KURTCAN ARI'ya; biyokimya çalışmalarında yetkinlikleriyle bana çok destek veren sayın hocam Prof. Dr. Ahmet ALVER, Yrd. Doç. Dr. Ayşe ŞENTÜRK, Akın BODUR ve İmran İNCE'ye; istatistik çalışmalarında emeği olan kıymetli hocam Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye; deneyim ve bilgilerimizi beraber filizlendirdiğimiz sevgi ve arkadaşlığın bir kez daha anlam kazandığı dönem arkadaşlarım Şeyma KURT ve Fidan KOÇ'a; yine samimiyet ve deneyimlerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Aşye İKİNCİ KELEŞ ve Cansu ÖZYILMAZ ALTUN'a; yine bu süreçte yardımları olan Sibel TÜREDİ, Hatice HANCI, Özkan YILDIRIM ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma; tanıdığım günden beri iyi ki varsınız dediğim ve bu zorlu süreçte de manevi destekleriyle her daim yanımda olan kıymetli dostlarım Nuran ASLAN, Gülşen ASLAN ve Tuğba OLGUN BIYIKLI'ya; tez çalışmamı proje kapsamında destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına ve varlıklarıyla hayat bulduğum, yaşamımın her aşamasında beni özveri ve anlayışla destekleyen, sevgi ve güvenlerini hep yanı başımda hissettiren, bu zorlu süreçte de sabırla yanımda olan çok değerli ailem'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL ve ONAY

BEYAN

İTHAF

TEŞEKKÜR

TABLolar DİZİNİ

ŞEKİLLER DİZİNİ

RESİMLER DİZİNİ

SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Testis Embriyolojisi	5
4.2. Testis Anatomisi	7
4.3. Testis Histolojisi	8
4.3.1. İnterstisyel Doku	9
4.3.2. Seminifer Tubüller	9
4.3.3. Seminifer Epitel	10
4.3.3.1. Sertoli Hücreleri	11
4.3.3.2. Spermatogenez	12
4.3.4. Spermatozoon Yapısı	16
4.4. Epididimis	17
4.5. Methotrexate	18
4.6. Yağ Asitleri	20
4.7. Esansiyel Yağ Asitleri	22
4.8. Linoleik Asit	23
4.9. Apoptoz	25
4.10. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	26
4.10.1 Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)	27
4.10.2. Serbest Radikallerin Etkileri	28

4.11. Antioksidan Savunma Sistemleri	28
4.11.1. Endojen Antioksidanlar	29
5. GEREÇ ve YÖNTEM	30
5.1. Deneysel Çalışma Aşaması	30
5.1.1. Deney Hayvanlarının Temini, Bakımı ve Barınması	30
5.1.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulaması	30
5.2. Histolojik İşlemler	32
5.2.1. Kan ve Doku Numunelerinin Elde Edilmesi	33
5.2.2. Semen Analizi	34
5.2.3. Doku Takibi	36
5.2.4. Kesitlerin Alınması	37
5.2.5. Kesitlerin Hematoksilen - Eozin ile Boyanması	37
5.2.6. Histolojik Ölçümler	38
5.2.7. Johnsen Skorum	39
5.3. İmmünohistokimyasal İşlemler	39
5.3.1. TUNEL Boyama	39
5.4. Biyokimyasal İncelemeler	41
5.4.1. Serum MDA Seviyesi	41
5.4.2. Doku MDA Ölçümü	43
5.4.3. CAT Aktivitesi	44
5.4.4. SOD Aktivitesi	45
5.4.5. Protein Tayini	48
5.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	50
6. BULGULAR	51
6.1. Vücut ve Testis Ağırlıklarına Ait Bulgular	51
6.2. Morfometrik Bulgular	52
6.2.1. Seminifer Tubül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığına Ait Bulgular	52
6.2.2. Johnsen Skorum Sonuçları	53
6.3. Histopatolojik Bulgular	54
6.4. Semen Analizine Ait Bulgular	57
6.5. TUNEL Sonuçları	61
6.6. Biyokimyasal Değerlendirmeler	65

7. TARTIŞMA ve SONUÇ	68
8. KAYNAKLAR	76
9. ETİK KURUL ONAYI	89
10. ÖZGEÇMİŞ	90



TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Günlük alınması gereken yağ asidi miktarları	23
Tablo 2. Deney grupları ve uygulamaları	31
Tablo 3. Serum MDA seviyesi ölçümü	42
Tablo 4. MDA ölçümü için reaksiyon karışımı ve yapılan uygulamalar	43
Tablo 5. CAT aktivitesi ölçümü ve yapılan işlemler	45
Tablo 6. SOD aktivitesi ölçümü	47
Tablo 7. Protein tayini	49
Tablo 8. Deney gruplarının deney öncesi vücut ağırlıkları, deney sonrası vücut ağırlıkları ve testis ağırlıklarına ait ortalama ve standart sapmalar	51
Tablo 9. Seminifer tubül çapı, epitel kalınlığı ve lümenine immatür hücre dökülen seminifer tubül sayısına ait bulgular	53
Tablo 10. Testis dokusunda seminifer tubüllerde Johnsen skoru ve apoptotik indeks değerleri	53
Tablo 11. Semen analizine ait ortalama ve standart sapma değerleri	58
Tablo 12. Testis dokusunda biyokimyasal değerlerin aritmetik ortalama ve standart sapma sonuçları	66
Tablo 13. Kan serumunda biyokimyasal değerlerin aritmetik ortalama ve standart sapma sonuçları	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa
Şekil 1. Seminifer tubül epiteli	13
Şekil 2. Spermatogenik seri hücreleri	16
Şekil 3. MTX'in kimyasal yapısı	19
Şekil 4. Yağ asitlerinin konfigürasyonu	20
Şekil 5. Yağ asiti dönüşümü	24
Şekil 6. Linoleik asidin kimyasal yapısı	24
Şekil 7. Serumda Standart MDA grafiği	42
Şekil 8. Dokuda Standart MDA grafiği	44
Şekil 9.A Numunelerin SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan logaritmik lineer olarak değiştirilmiş standart grafiği (A, B)	48
Şekil 10. Standart BSA protein tayini grafiği	49

RESİMLER DİZİNİ

Resimler	Sayfa
Resim1. Seminifer tubüllerin H&E boyama ile gösterimi (X400)	10
Resim 2. Sıçanların bakımı ve barınması	31
Resim 3. Sıçanlara gavaj yoluyla Linoleik Asidin verilmesi	32
Resim 4. Testis ve epididimisin çıkarılması	33
Resim 5. Etüv içerisinde epididimis içeren petrilere (A) ve semen analizi için petri içine konulmuş epididimis parçaları (B)	34
Resim 6. Makler Sperm Sayım Kamarası ile analiz (A) ve Makler Sperm Sayım Kamarası (B)	35
Resim 7. Spermatozoon görüntüleri (Eozin-Y, X1000)	36
Resim 8. Kontrol grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)	54
Resim 9. MTX grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)	55
Resim 10. MTX+LA grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)	56
Resim 11. LA grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)	57
Resim 12. Kontrol grubunun seminal sıvısı (Eozin-Y, X200)	58
Resim 13. MTX grubunda spermatozoon görüntüleri (Eozin-Y, X200)	59
Resim 14. MTX+LA grubunda spermatozoon görüntüleri (Eozin-Y, X200)	60
Resim 15. LA grubunda spermatozoon görüntüleri (Eozin-Y, X200)	61
Resim 16. Kontrol grubu testis dokusunda apoptotik hücreler (DAB, X400).	62
Resim 17. MTX grubu testis dokusunda apoptotik hücreler(DAB, X400).	63
Resim 18. MTX+LA grubu testis dokusunda apoptotik hücreler (DAB, X400).	64
Resim 19. LA grubu testis dokusunda apoptotik hücreler (DAB, X400). Tek yönlü ok apoptotik hücreyi göstermektedir.	65

KISALTMALAR, SİMGELER VE FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

α-LN	α -linolenik asit
aa	Amino asit
AA	Araşidonik asit
ABP	Androjen bağlayıcı protein
Ad	A koyu
AD	Anabilim dalı
aER	Granülsüz endoplazmik retikulum
AI	Apoptotik indeks
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
AMH	Antimüllerian hormon
Ap	A açık
BAP	Bilimsel araştırma projeleri
BCA	Bisinkoninik asit
BSA	Bouin serum albumin
CAT	Katalaz
ÇDYA	Çoklu doymamış yağ asitleri
DHA	Dokosaheksaenoik asit
DHF	Dihidrofolat
DHFR	Dihidrofolat redüktaz
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dUTP	Deoxyuridine triphosphate
EPA	Eikosapentaenoik asit
G₁	Mitoz aralığı 1
gER	Granüllü endoplazmik retikulum
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
H&E	Hematoksilen-Eozin
hCG	İnsan koryonik gonadotropini
ip	İntraperitoneal

KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LA	Linoleik asit
LDL	Low density lipoprotein
LH	Luteinleştirici hormon
LPO	Lipit peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
MTX	Methotrexate
NBT	Nitro blue tetrazolium
PAS	Periyodik asit-Schiff
PBS	Phosphate buffer solution
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
S	DNA sentezi
SD	Standart sapma
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri
SRX	Y geni üzerindeki cinsiyet belirleyici bölge
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TDF	Testis belirleyici faktör
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TDYA	Tekli doymamış yağ asitleri
TMP	Tetrametoksipropan
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling
X	Ortalama

Simgeler

%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
ω	Omega
°C	Santigrat derece
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
2n	Diploid kromozom
4d	Çift DNA
cc	Mililitreye eşdeğer hacim birimi
cm	Santimetre
d	Haploid DNA
g	Gram
mg/kg	Miligram/kilogram
mL	Mililitre
mM	Mikromolar
N	Haploid kromozom
nm	Nanometre
Nmol	Nanomol
pH	Hidrojenin gücü
R	Radikal
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
X	Dişi eşey kromozomu
Y	Erkek eşey kromozomu

1. ÖZET

Linoleik Asit'in Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Antioksidan ve Antiapoptotik Etkisi

Bu çalışma Metotreksat (MTX)'in indüklediği sıçan testisinde Linoleik asit (LA)'in etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı.

Araştırmada ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 12 haftalık 24 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Yirmi dört adet erkek sıçan kontrol, MTX, MTX + LA ve LA olarak dört gruba ayrıldı. Deneyin ilk günü MTX ve MTX+LA gruplarına tek doz MTX (30 mg/kg, ip) verildi. 7 gün boyunca MTX+LA ve LA gruplarına gavaj yoluyla LA (100 mg/kg) verildi. 7. gün sonunda deneklerin karın boşluğu anestezi altında açıldı; her iki testis ve epididimisleri çıkarıldı, kan alındı ve kansızlaştırma yöntemiyle ötanazi yapıldı. Alınan sağ testisler histolojik incelemeler için kullanıldı, sol testisler ve alınan kan örnekleri biyokimyasal incelemeler için kullanıldı. Çıkarılan epididimisteki spermilerin motilite ve vitalite değerlendirmeleri yapıldı; semene dökülen epitel hücre sayıları belirlendi.

MTX grubunda kontrol grubuna göre seminifer tubül çapı, epitel kalınlığı, Johnsen skoru, sperm motilitesi ve sperm vitalitesinin düştüğü, fakat germ hücrelerinde apoptotik indeks (AI)'in arttığı belirlendi. MTX+LA grubunda MTX grubuna göre tubül çapı, epitel kalınlığı, Johnsen skorunda artış ve AI'te düşüş belirlendi. LA grubunda kontrol grubuna göre epitel kalınlığı ve Johnsen skorunun düştüğü tespit edildi. LA grubunda diğer gruplara göre seminifer tubül lümenine dökülen immatür germ hücre sayısının düştüğü görüldü.

Bu çalışma, MTX'in testis üzerinde hasara yol açtığını, LA'nın bu dejeneratif etkileri belli ölçüde düzelttiğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: İmmünohistokimya, linoleik asit, mikroskopi, seminifer tubül, vitalite

2. SUMMARY

Antioxidant and Antiapoptotic Effect of Lineoic Acid Against Methotrexate-Induced Testicular Damage in Rats

The aim of this study is to investigate effects of linoleic acid on methotrexate-induced rat testis.

250-300 g bw. 12 weeks old 24 male Sprague Dawley rats were used in the study. Rats were divided into four groups as control, methotrexate (MTX), methotrexate + linoleic acid (MTX+LA), linoleic acid (LA). The first day of experiment, single dose methotrexate (30 mg/kg) injected intraperitoneally to rats of MTX and MTX+LA group. LA (100 mg/kg) was given to MTX+LA and LA groups rats by gavage during seven days. At the end of the experiment the abdominal cavity of each rat was opened under anesthesia, their both testes and epididymis were taken out, blood collected and its were euthanized. Each right testis was used for histological examination; left testis and blood samples were used for biochemical examination. Motility and vitality of spermatozoa were evaluated in epididymal seminal fluid.

Seminiferous tubule diameter, its epithelium height, Johnsen score, sperm motility and vitality decreased but apoptotic index (AI) of germ cells increased in MTX group according to the control. The tubule diameter, epithelium height, Johnsen score increased and AI decreased in MTX+LA group according to MTX group. Also, epithelium height, Jhonsen score decreased LA group according to the control. Seminiferous tubule number that immature germ cells fell into its lumen decreased in LA grup according to the other groups.

As a results of the study MTX destroyed testis and LA partially improved that degenerative changes.

Key words: Immunohistochemistry, linoleic acid, microscopy, seminiferous tubule, vitality

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, normal hücre gelişmesinin denetimini kaybederek hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması olarak tanımlanır. Bu anormal hücre çoğalmasıyla birlikte tümörler (neoplazmalar) oluşur. Kanser hücresel düzeyde bir genetik düzensizlik olarak ifade edilmektedir. Kanser, oluşan dokudaki hücre tipine bağlı olarak lösemiler, lenfomalar, sarkomalar ve karsinomalar olmak üzere dört gruba ayrılır. Karsinomalar, kanser tiplerinin %85'ini oluştururlar ve bezler, meme, deri ve ürogenital dokulardan köken alırlar (1). Günümüzün en önemli hastalıklarından biri olan kanserin tedavisinde kemoterapötik ilaçlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Kemoterapi, özellikle çoğalan hücrelere yönelik seçici öldürücü etkileri bulunan, doğal veya sentetik kimyasal, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavi yöntemidir. Kemoterapötik ajanlar, en fazla hücrelerin proliferatif safhasında etki gösterirler. Bu durum, daha çok kan hücreleri, gastrointestinal sistemdeki hücreler, kıl folikülleri ve spermiler gibi hızlı bölünebilen hücreler üzerinde yan etkiler oluşmasına sebep olmaktadır (2, 3). Kemoterapötikler çoklu organ sistemlerinde akut toksik yan etkiler oluşturmaktadır (4).

Bir folik asit antagonisti olan Metotreksat (MTX) uzun yıllardır kemoterapötik ilaç olarak kullanılmaktadır (5). MTX'in tedavi edici özellikleri olmasına rağmen, infertilite gibi yan etkileri de bulunmaktadır. Tek doz MTX, testislerde oksidatif stres oluşturur ve infertiliteye neden olabilir (6). MTX oogeneze, spermatogeneze ve doğurganlık üzerine zararlı etkiler göstermektedir (7). MTX uygulamasının ardından testislerde seminifer tubüllerde hasar, sperm sayısında azalma, sperm DNA hasarı ile kalıcı azoospermi ve infertilite yan etki olarak görülmektedir (8).

Linoleik asit (LA), esansiyel yağ asidi çeşidi olup vücuda hazır olarak alınmaktadır (9). Mevcut çalışmalarda esansiyel yağ asitlerinden yoksun beslenildiğinde üreme bozuklukları görülmüş, ancak diyetle esansiyel yağ asitlerinin ilavesiyle birlikte bu sorunun ortadan kalktığı belirlenmiştir (10). Esansiyel yağ asitleri sağlıklı hücre membranının şekillenmesi, beyin ve sinir sistemi fonksiyonlarını uygun şekilde yürütebilmesi ve eikosanoid denilen hormon benzeri maddelerin üretimi için gereklidirler (11). Linoleik asidin de içinde bulunduğu $\omega 6$ grubu yağ asitlerinin, cilt sağlığını, esnek ve pürüzsüz cilt oluşumunu sağlayarak deriyi yaralanma ve enfeksiyonlara karşı koruduğu bilinmektedir (12).

İnfertilite (kısırlık), üreme yeteneğinin istek dışı azalması ya da kaybolması olayıdır. Bu olay fiziksel, psikososyal, sosyoekonomik ve çevresel faktörler nedeniyle meydana gelmektedir (13). İnfertilite evli çiftlerin %15'ini etkilemekle birlikte bu oranın yarısı erkeğe bağlı infertiliteden kaynaklanmaktadır. Kemoterapi gören evli çiftlerde kemoterapinin tamamlanmasının ardından infertilite oranı %15-30'lara ulaşmaktadır. Kemoterapötikler kanserli olmayan normal dokularda ve hücrelerde farklı seviyelerde yan etki göstererek erkek infertilitesi hatta sterilitesine neden olurlar. Kemoterapötik ajanlar üreme sistemindeki yan etkileri nedeniyle erkeklerin fertilitesi cinsel yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Buna yönelik kanserli erkekler ile deney hayvanları üzerinde yapılan pek çok çalışmaya göre, özellikle genç erkeklerin fertilitate problemi gelecekte ciddi bir sorun oluşturacaktır. Bu sorunu aşmaya yönelik çeşitli hormonal ve antioksidan uygulamalar ile sperma, germ hücreleri ve testis dokusunun dondurularak saklanması yoluyla deney hayvanlarında olumlu sonuçlar elde edilmiştir (3).

Literatürde MTX'in testis toksisitesine karşı LA'nın etkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, MTX kaynaklı testis hasarına karşı LA'nın morfolojik ve fonksiyonel etkilerinin olup olmadığının araştırılması amacıyla yapıldı.

4. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi; testisler, genital boşaltım kanalları, aksesuar cinsiyet bezleri (vezikula seminalisler, prostat, bulboüretral bezler) ve penisten oluşur. Testislerin spermatogenez (spermin üretimi) ve steroidogenez (androjenlerin üretimi) olmak üzere iki temel görevi vardır. Testisler, scrotum içerisine yerleşerek sperm üretimi için gerekli olan düşük vücut ısısına sahip olurlar. Burada üretilen spermatozoonlar, epididimise iletilir ve burada depolanır. Spermatozoonlar, epididimisten duktus deferense geçer ve buradan penil üretraya iletilerek dışarı atılır (14, 15).

4.1. Testis Embriyolojisi

Embriyonun genetik açıdan cinsiyeti X kromozomuna sahip ovum ile X veya Y kromozomuna sahip spermin birleşmesiyle (fertilizasyonla) belirlenir. Morfolojik olarak yedinci haftaya kadar ortaya çıkmayan dişi veya erkek özellikleri değişim dönemine girerek bazıları otozomal ve birden çok eşeyssel genlerin etkisiyle farklılaşma sürecine girerler. Genital gelişimin pasif olarak geçirildiği erkek ve dişi özelliklerin benzer olarak sızlandığı gelişimin bu başlangıç periyodu “seksüel gelişimin farklılaşmamış safhası” olarak tanımlanmaktadır (16-18).

Testisler embriyonik dönemin erken gelişim döneminde, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal bölgede gelişirler (14, 19, 20).

Gelişimleri 5. haftada başlayan gonadlar (testisler ve ovaryumlar), abdomenin posterior duvarındaki mezotel (mezodermal epitel), altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve primordial germ hücrelerinden oluşur. Mezonefrozun medialinde epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla gonadal kabartı belirir. Primer seks kordonları olarak adlandırılan parmak şeklindeki epiteliyal kordonlar, mezenşim içerisine doğru göç eder. Farklılaşmamış gonad, dışta korteks ve içte medulla halini alır. Eğer embriyo dişi kromozom yapısına (XX) sahipse korteks overe farklılaşır, medullası geriler. Embriyo erkek kromozom yapısına (XY) sahip ise medulla testise dönüşür, korteks bir takım kalıntıları dışında gerileyerek dejenere olur (17, 18).

Epiblasttan köken alan primordial germ hücreleri oldukça büyük ve yuvarlak yapıdadır. Primitif çizgiden göç eden primordial germ hücreleri, üçüncü haftada yolk kesesinin (vitellüs kesesi) allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşir. Dördüncü haftada primordial germ hücreleri, ameboid hareketlerle sonbağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerler. Embriyonun katlanmaları sırasında, vitellus kesesinin dorsal parçası içerisinde konumlanır. 5. haftanın başında primordial germ hücreleri gonadal kabartılara doğru ilerler. 6. haftada genital sırtta mezenşim içerisine yerleşerek primer seks kordonlarıyla birleşir (16, 17).

Cinsiyetin belirlenmesi fertilizasyonla başlamakta olup erkek fenotipinin gelişimi Y kromozomunun kısa kolu üzerinde cinsiyet belirleyici bölgeye yerleşmiş 223 aminoasit (aa) düzenine sahip olan SRY geninin testis belirleyici faktörü (TDF) aktifleştirmesiyle başlamaktadır. TDF, primer seks kordonlarından testiküler farklılaşmayı sağlamaktadır. TDF'nin aktifleşmesiyle ilkel cinsiyet kordonları çoğalarak medullanın içerisine doğru ilerler ve testisin medullar kordonlarını oluşturur. Bu kordonlar, bezin hilusuna doğru ilerleyip birbirleriyle anostomoz yaparak rete testisi oluşturur. Gelişimin 12. haftasında testiküler kordonlar, kalın fibröz bir bağ dokusuna sahip olan tunika albuginea ile yüzey epitelinden ayrılır. 16. haftada testis kordonları at nalı şeklini alarak uç noktaları birleşir ve tubülü rektleri oluşturur. Bu aşamada testis kordonları, bezin yüzey epitelinden gelişen Sertoli hücreleri ile primitif germ hücrelerinden oluşmaktadır (16-18, 21).

Testis kordonlarının farklılaşmaya başlamasıyla birlikte bunların arasında bulunan interstisiyel Leydig hücreleri gelişmeye başlar. 8. haftada Leydig hücreleri, testosteron ve androstenedion gibi androjenik hormonları salgılayarak dış genitaler ve mezonefrik kanalların erkeksi karaktere farklanmasını sağlar. Testosteron üretimi insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu tarafından uyarılır. hCG hormonu 8-12 haftalık süreçte en yüksek seviyesine ulaşır (16-18).

Fötal testislerin Sertoli hücrelerinden 8. haftadan itibaren glikoprotein yapıda olan antimüllerian hormon (AMH) salınmaya başlar. AMH, Müller kanallarının gelişimini önlerken, erkek üreme sisteminin normal şekilde seyretmesini sağlar. AMH serum seviyesi erkeklerde iki yaşına kadar yüksek olup puberteye kadar yavaşlar ve sonrasında hızla düşer (17, 22).

Fötal testisin testis kordonlarında Sertoli hücreleri çoğunluğu oluşturmaktadır. Gelişimin ilerlemesiyle testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin yüzeyini kaplayan mezoteli meydana getirir. Testis kordonları puberteye kadar solid yapıda olup bu evreden sonra lümenleri açılarak seminifer tubüllere dönüşür. Kanalize olan seminifer tubüller rete testislerle birleşerek duktuli efferenteslere girer. Duktuli efferentesler, rete testislerle birlikte ileride duktus deferensle birleşir (16, 17).

Testisler gelişimin yaklaşık 26. haftasında skrotuma doğru göç ederler. Spermatik kordonlara asılı halde olan testisler, skrotuma inişleri sırasında peritondan köken alan seröz bir kese ile birlikte sürüklenir. Tunica vajinalis olarak adlandırılan bu kese testisin ön ve yan bölümlerinden tunica albugineayı kuşatır; dışta pariyetal yaprak ve içte viseral yapraktan oluşmaktadır (15, 19, 20).

4.2. Testis Anatomisi

Testisler erkekte temel üreme organıdır. Bu yapılar, funiculus spermaticusa asılı şekilde skrotum içerisinde bulunur. Funiculus spermaticus, Vasa epigastricae inferiores'in dış yanında Anulus inguinalis superficialisten çıkar ve testisin arka kenarında scrotum içerisinde son bulur. Tüp şeklindeki Funiculus spermaticus; kan ve lenf damarları, sinirler ve ductus deferens bulundurmaktadır. Skrotum ise deriden oluşan bir kesedir ve iki tabakası vardır: Yoğun pigmentli deri ve düz kas liflerinin bulunduğu Tunica dartos. Tunica dartos yağ tabakası bulundurmamakla birlikte ısı kaybının düzenlenmesini sağlar (23-25).

Testisler; bir çifttir, ovoid ve beyazımsı yapıdadır. Testislerin her biri 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde 3 cm kalınlığında ve 10–15 g ağırlığındadır. Scrotum içerisinde kan stazından dolayı sol testis sağ testise göre yaklaşık 1 cm daha distalde yer alır (23, 26).

Her bir testis parenkimi 3 tabakalı örtü ile kuşatılmıştır. En dışta testisin posterior kısmı hariç diğer kısımları örten epiorchium bulunur. Bunun altında testisin tüm yüzeyini saran kalın fibröz tabakaya sahip beyaz renkte Tunica albuginea yer alır. İç kısımda ise testis parenkimine bitişik bağ dokusu ve kan damarlarından oluşan Tunica vasculosa bulunmaktadır. Tunica albuginea testisin arka kenarı boyunca kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur ve testis parenkimi içine doğru uzanır. Testis parenkimine ulaşan kan damarları, lenf damarları ve genital boşaltım kanalları

mediastinum testis içerisinde geçmektedir. Dallanan mediastinum testis, parenkimi yaklaşık 250 lobüle bölmektedir. Birbiriyle ilişkili olan bu lobüller içerisinde 1–4 adet seminifer tubül bulunmaktadır (14, 23).

4.3. Testis Histolojisi

Testisi dıştan Tunica albuginea adı verilen sıkı bağ dokusu sarar. Tunica albuginea tabakası, testisin arka kısmında kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Bu yapı testisin içine doğru fibröz uzantılar vererek testisi çoğunlukla birbiriyle ilişkili olan yaklaşık 250 adet testiküler lobüle ayırır. Her lobül, 1-4 adet seminifer tubül ve bu tubüllerin arasında bulunan tunica vasküloza tabakasından oluşan interstisyel bağ dokusundan oluşmaktadır (Resim 1). Burada interstisyel alan hücreleri testiküler androjenleri, seminifer tubüller spermatozoonlar olarak adlandırılan erkek üreme hücrelerini üretir (15, 19, 20).

Seminifer tubüller, çok uzun yapıda olup lobül içerisinde kendi üzerine katlanarak kıvrımlar oluşturur. Bu yapılar, karmaşık halde çok katlı bir epitel ile çevrelenerek sarılmaktadır ve baş kısımları kör uçludur. Bunlar mediastinuma ilerlerken lümenleri daralır ve düz tubülleri oluştururlar (tübüli rekti). Tübüli rektiler; dar kanallı, kısa segmentler olup epiteli izoprizmatik veya alçak prizmatik epiteldir ve spermatogenik hücreler içermez. Bu tubüller mediastinum içerisinde anastomozlaşmış olan rete testise bağlanırlar. Rete testis, geniş lümenli olup epiteli tek katlı yassı, alçak izoprizmatik veya alçak prizmatik epitel taşır. Rete testis uç kısmına doğru genişleyerek yaklaşık 10-20 adet duktuli efferentes ile birleşir. Duktuli efferentes, düz tubüller bulundurulur ve epididimisin baş kısmına doğru oldukça kıvrımlı bir yapıya dönüşür. Bunlar uzun yüksek prizmatik hücre grupları ile alçak izoprizmatik hücre grupları şeklinde epitele sahiptir. Taşıdığı bu hücre grupları nedeniyle lümenleri oldukça düzensizdir. Duktuli efferentes, testis ile epididimis arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır (15, 19).

Testislerin seminifer tubüllerinde üretilen spermatozoonlar, genital kanalların ve yardımcı bezlerin salgılarına eklenerek düz kasların kasılmasıyla ilerler. Oluşan bu semen penis aracılığıyla dişi üreme sistemine iletilir (27).

4.3.1. İnterstisyel Doku

Testislerde seminifer tubüllerin arasını oluşturan interstisyel alan; bağ dokusu, sinirler, kan ve lenf damarları ve pencere kapillerler bulundurmaktadır. Buradaki bağ dokusu fibroblastlar, mast hücreleri, makrofajlar, puberteye kadar pasif halde bulunan kümeleşmiş şekildeki Leydig (interstisyel) hücrelerini içerir (Resim 1). İnterstisyel alan yapılanması, türler arasında çeşitlilik göstermektedir. İnsandaki ekstraselüler maddede bol miktarda gevşek bağ dokusu bulunmaktadır. Domuz, at ve keseli sıçan gibi diğer türlerde de interstisyel alanda bol miktarda Leydig hücreleri yer alır (19, 20).

Leydig hücrelerinin temel fonksiyonu, androjenleri üreterek ikincil seks karakterlerini ortaya çıkarmaktır. Üretilen hormonlar sayesinde embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu yürütülür. Leydig hücrelerinin sayıları ve işlevsellikleri hormonlarla yönetilir. Gebelikte plasentada üretilen gonadotropik hormonun anne kanından fetüse geçişiyle fetal testiküler interstisyel hücreler uyarılır ve androjenlerin üretimi başlar. Embriyonik dönemde androjenlerin etkisiyle erkek genital organlarının farklılaşması yaklaşık olarak 4. ayda tamamlanır ve testosteron üretimi giderek düşer. Hipofizden salgılanan luteinleştirici hormon (LH) sayesinde Leydig hücreleri, puberteye kadar inaktif periyoda girer. Leydig hücreleri pubertede gonadotropik stimülasyonun etkisiyle tekrar aktifleşir ve aktiflikleri yaşam boyu devam eder (14, 15).

Leydig hücreleri; yuvarlak ya da poligonal şekilli merkezi bir nükleus, granülsüz endoplazmik retikulum (aER) ve bol miktarda küçük lipid damlacıkları bulunduran eozinofilik hücredir. Yapılarında lipofuskin pigmenti, çubuk şekilli Reinke kristalleri ve tubüloveziküler kristaller bulunur. İnterstisyel doku içinde, Leydig hücreleri çeşitli miktarlarda kümeleşirler ve bu hücreler arasına kan damarlarıyla ilişkilidir; hücreler 14–20 µm boyutundadır. Leydig hücreleri sitoplazmalarındaki Reinke kristalleri ise 3X20 µm boyutundadır. Testosteron üretimi hücrenin düz endoplazmik retikulumunda ve mitokondrilerinde enzimler tarafından gerçekleşmektedir (14, 15, 20).

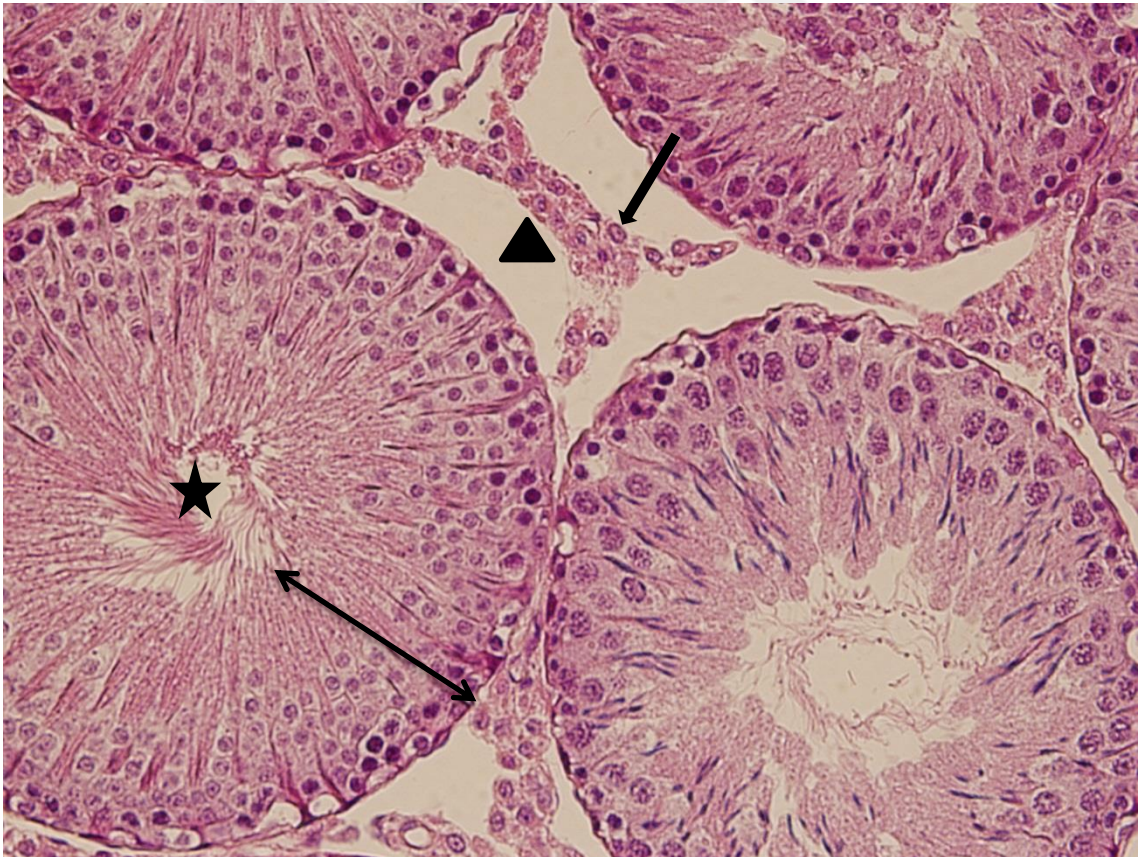
4.3.2. Seminifer Tubüller

Testisin interstisyel bağ dokusu arasına yerleşmiş olan seminifer tubüllerin her biri yaklaşık 50 cm uzunluğunda ve 150 – 250 µm çapındadır. Seminifer tubüller; tunika propria olarak adlandırılan fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina

ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden meydana gelmektedir. Peritübüler doku olarak da bilinen tunika propria, seminifer tubülleri en dıştan çevreleyen birkaç fibroblast katmanından oluşmaktadır. En içte bazal laminaya bitişik bulunan tabaka düz kas özelliği gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler ve kollajen fibrillerden oluşmaktadır. İnsanda bu tabaka 3-5 sıra şeklinde miyoid hücre içermektedir. Bu miyoid hücrelerin ritmik kasılmaları ile spermatozoanın ve testiküler sıvının seminifer tubüllerden boşaltım kanalı sistemine geçişi sağlanır (15, 19).

4.3.3. Seminifer Epitel

Seminifer epitel çok katlı, karmaşık bir yapıda olup iki temel hücre çeşidini içermektedir. Biri destek hücreleri olan Sertoli hücreleridir. Diğer hücre çeşidi ise spermatogenik seri hücreleridir ve bu hücreler spermatogenez ile spermatozoonları üretmekle görevlidir (Resim 1, şekil 1) (19).



Resim 1. Seminifer tubüllerin H&E boyama ile gösterimi (X400). Yıldız seminifer tubülün lümenini, çift uçlu ok seminifer epiteli, üçgen interstisyel alanı, tek yönlü ok ise Leydig hücrelerini göstermektedir.

4.3.3.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, tabanı seminifer epitelin bazal laminası üzerine oturan apikal uçları sıklıkla seminifer tubülün lümenine ulaşan çok sayıda yan uzantılara sahip uzun, prizmatik, replike olmayan, hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin sınırları çok sayıda yan uzantıya sahip olduğundan ışık mikroskobu incelemelerinde net olarak belirlenemez. Sertoli hücreleri destek hücreleri olarak anılır. Spermatogenik seri hücreleri, mayozdan sonra Sertoli hücrelerinin yüzeyine tutunur. Sertoli hücreleri yapısında iyi gelişmiş bir gER, yaygın bir aER, anüler lamel dizileri, bol miktarda küre biçiminde uzun mitokondri, iyi gelişmiş Golgi aygıtı ve değişken miktarda mikrotübüller, lizozomlar, lipid damlacıkları, veziküller, glikojen granülleri ve filamentler bulundurur. Nükleusu 7–9 nm’lik bir filament kılıfı ile sarılarak diğer organellerden ayrılmaktadır. Nükleusun şekli ve yerleşimi çok değişken olmakla birlikte genellikle oval ya da üçgen şekillidir, nükleusta bir veya daha fazla derin içe katlantılar bulunabilir. Nükleus ökromatik yapıya sahiptir. Sertoli hücre nükleusu, bazı türlerde karyozom denilen ve kendine has üç parçalı yapıda, RNA ve DNA içeren cisimcik çifti tarafından yan taraftan kuşatılan bir nükleolus içerir. İnsandaki bazal sitoplazmada, 10–25 nm uzunluğunda ve 1 nm genişliğinde inklüzyon cisimcikleri (Charcot–Böttcher kristalloidleri) bulunmaktadır. Bunlar, ince füziform kristalloiddir ve rutin histolojik preperatlarda görülebilir (14, 19).

Seminifer epitel üzerinde bulunan Sertoli hücreleri yan yana gelecek şekilde konumlanabilir. Bu durumda Sertoli hücresi – Sertoli hücresi (Sertoli–Sertoli) bağlantı kompleksini oluşturur. Bu kompleks, özelleşmiş sitoplazma ve yapısal olarak eşsiz membran içermektedir. Komplekslerin bir bölümünde 50’den fazla kaynaşma çizgisi bulunan sıkı bağlantı olan zonula okludens belirgindir. Sertoli–Sertoli bağlantı kompleksi seminifer epiteli bazal ve luminal bölümlere ayırmaktadır. Spermatogenik seri hücreleri bu bölümler arasına yerleşmiş durumdadır. Spermatogoniumlar ve erken primer spermatositler, seminifer epitelin bazalinde bulunur. B tipi spermatogoniumların mitozuyla üretilen erken spermatositler, bazal bölümden luminal bölüme hareket halinde bulunur. Daha olgun spermatositler ve spermatidler luminal kısma yerleşmiştir. Bu şekilde spermatogenik hücrelerin farklılaşması sırasında mayoz evresi ve spermiyogenez luminal bölümde gerçekleşmektedir (14).

Sertoli–Sertoli bağlantı kompleksi seminifer epitelde kan–testis bariyerini de oluşturmaktadır. Sertoli hücrelerinin testosteron ve androjen bağlayıcı protein (ABP)

olan ekzokrin salgıları, seminifer tubüllerin lümenlerinde bol miktarda bulunmaktadır. Bu farklılaşmakta olan spermatogenik hücelere bir mikro çevre oluşturmaktadır. Testiküler kapilerler pencereci tiptedir ve büyük moleküllerin geçişine izin verir. Seminifer epitelin bazaline yerleşmiş olan spermatogonium hüceleri, kandaki maddelere kolay bir şekilde ulaşabilmektedir. Bunun yanında Sertoli hüceleri arasındaki sıkı bağlantı noktaları sayesinde, büyük moleküllerin Sertoli hüceleri arasına geçişi engellenir. Bu sayede spermatogenezin ileri safhalarındaki germ hücelerinin bu maddelerle ilişkisi engellenmiş olur. Böylece testiküler lenf ve kan plazmasının içeriği ile seminifer tubüller ve boşaltım kanallarındaki sıvının içeriği birbirinden belirgin şekilde farklı tutulur. Kan–testis bariyeri sayesinde plazma proteinleri, dolaşımdaki antikorlar ve spesifik sperm antikorları, lümende bulunan genetik olarak farklılık gösteren haploid yapıdaki germ hüceleri (sekonder spermatositler, spermatidler ve spermler) ile spesifik sperm antijenlerini birbirinden ayırır. Böylelikle spermatogenik hüceler immün sistemden korunmaktadır (14, 19).

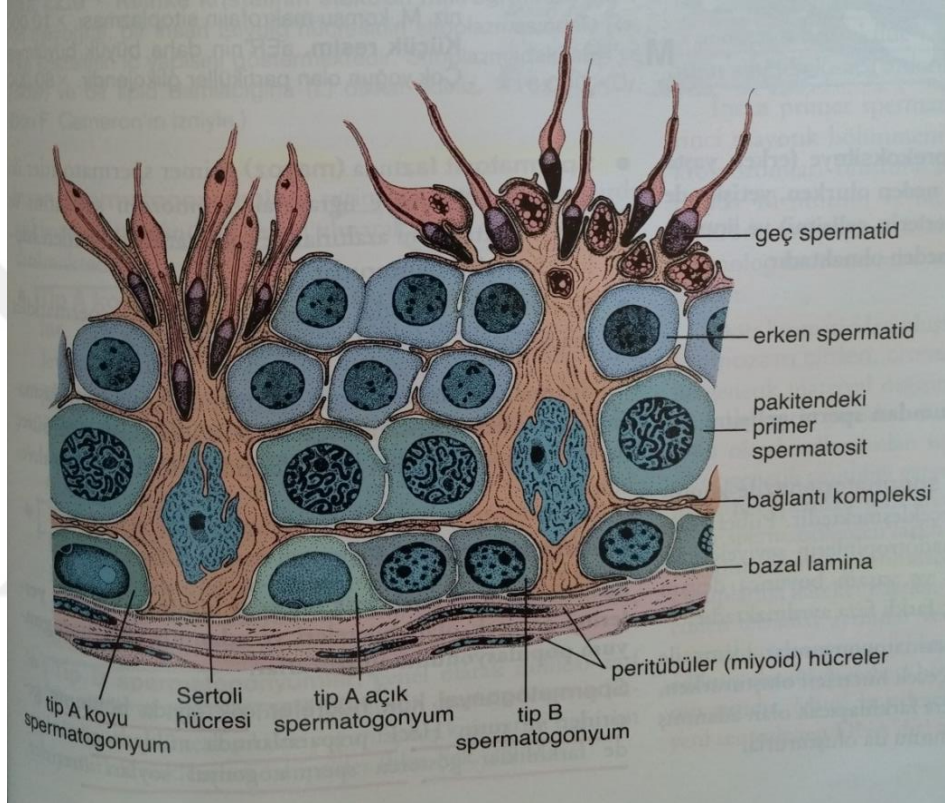
Sertoli hücelerinin bu özelliklerinin yanında birçok görevi bulunmaktadır. Bunlar:

1. Gelişmekte olan spermatogenik seri hücelere desteklik yapmak, korumak ve beslenmelerini sağlamak.
2. Gelişmekte olan spermatidlerin fazlalık sitoplazmasını artık cisimcik şeklinde fagosit etmek.
3. Spermiyasyon olayı ile olgun spermın seminifer tubüllerin lümenine atılmasını sağlamak.
4. Spermın beslenme ve naklinde gerekli olan testiküler sıvıyı salgılamak.
5. Androjen bağlayıcı protein (ABP), inhibin hormonu ve anti-Müllerian hormonunu üretmek (15, 19).

4.3.3.2. Spermatogenez

Puberteye kadar inaktif olarak bulunan testisler, puberteye girmeden önce salınan gonadotropik hormonların etkisiyle aktif hale gelirler ve bu aktiflikleri hayat boyu devam eder. Spermatogenez, puberteye girilmesiyle spermatogonyumlardan spermaların oluşum sürecini tanımlamaktadır (Şekil 1 ve 2). Spermatogenez olayı üç fazda incelenmektedir: Spermatogonyal faz, spermatosit fazı ve spermatid fazı.

Spermatogonyal fazda, kök hücreler mitoz bölünmeler geçirerek kendi yerlerini alacak olan hücreler ile primer spermatositlere dönüşecek olan spermatogonyum popülasyonunu meydana getirirler. İnsan spermatogonyumları, rutin histolojik preparatlarda nükleusların görünüşü bakımından üç tip olarak gruplandırılmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Seminifer tubül epiteli (Ross ve ark.) (14)

1. Tip A koyu (Ad) spermatogonyumlar: Kromatini ince granüllü, yoğun bazofilik ve oval nükleusludurlar. Bunların seminifer epitelin kök hücreleri olabileceği üzerinde durulmaktadır. Bu gruptakiler düzensiz periyotlarda bölünerek kök hücre olarak kalan bir çift Ad spermatogonyumu oluşturabildiği gibi bir çift Ap spermatogonyumu da oluşturabilir.
2. Tip A açık (Ap) spermatogonyumlar: Kromatini ince granüllü açık renkte boyanan oval nükleuslu, spermi üretmek için farklılaşma sürecine giren hücrelerdir ve bu hücreler peş peşe birden fazla mitotik bölünme geçirerek sayılarını artırır. Bu süreçte mitotik olarak oluşan hücreler birbirlerine

sitoplazmik köprüler ile bağlanmaktadır ve mayotik bölünmede de aynı şekilde devam eder. Spermatid maturasyonunun son evresine kadar devam eden bu yapı sayesinde aynı hücreden köken alan hücre serisi, inci dizisi gibi gözlenmektedir.

3. Tip B spermatogonyumlar ise genel olarak nüklear zarf boyunca ve merkezi bir nükleolusun etrafında geniş kümeler oluşturan yoğunlaşmış kromatine sahip yuvarlak nukleusludur. Tip B spermatogonyumlar, spermatogonyal fazın son aşamasını oluşturmaktadır.

Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmesiyle primer spermatositler oluşur. Bu aşamada primer spermatositler mayoz bölünme geçirerek kromozom sayısı ve DNA miktarı yarıya iner. Ancak primer spermatositler, meydana geldikten kısa bir süre sonra, mayoz bölünmeye başlamadan önce DNA replikasyonu gerçekleştirerek DNA'larını iki katına çıkarır. Bu sayede mayoz öncesi primer spermatositler normal miktarda kromozom ($2n$) sayısına ve çift DNA ($4d$) yapısına sahip olur. DNA'da her kromozom, iki kardeş kromatid içerdiğinden dolayı DNA $4d$ şeklinde olmaktadır. Mayoz I geçiren primer spermatositlerden sekonder spermatositler oluşmaktadır. Burada mayozun profaz evresi insan primer spermatositlerinde uzun sürmektedir. Yaklaşık 22 gün kadar süren profaz evresinde, kromatin yoğunlaşarak kromozomlar görünür hale gelir. Tür içi çeşitliliği sağlayan crossing-over olayı da mayoz I'de görülmektedir. Kromozom sayısı (n) olan ve diploid DNA'ya sahip olan sekonder spermatosit mayoz II geçirerek n kromozomlu haploid DNA (d)'ya sahip olan spermatidleri oluşturur.

Spermatidler, farklılaşmaya başlayarak spermiyogenez (spermatid fazı) evresine girer. Spermatid fazında yoğun farklılaşma sürecine giren spermatidlerden olgun spermiler oluşmaktadır. Bu aşamadan itibaren döllenme olayı gerçekleşene kadar herhangi bir bölünme olmamaktadır. Spermatid fazı; Golgi fazı, kep fazı, akrozom fazı ve olgunlaşma (maturasyon) fazı olmak üzere dört aşamada incelenmektedir:

Golgi fazı, spermatidin Golgi kompleksinde periyodik asit-Schiff (PAS) pozitif granüllerinin kümeleşmesi çok belirgin şekilde görülür. Bu proakrozomal granüller, içeriğinde bol miktarda glikoprotein bulundurulur. Kümeleşen granüller bir araya gelerek bir membranla kuşatılır ve akrozomal vezikülü oluştururlar. Akrozomal folikül, nüklear zarfa yakın konumlanmıştır. Giderek içeriği artıp genişleyen vezikülün konumu spermin ön kutbunu oluşturur. Sentriyoller ise jukstanüklear kısımdan spermatidin arka kutbuna göç

ederler. Olgun sentriyoller, burada plazma mebranına dik açı olacak şekilde yerleşirler. Sentriyol, sperm kuyruğunun aksonemini oluşturacak olan dokuz periferik mikrotübül çiftinin ve iki merkezi mikrotübülün parçalarının toplanmasını başlatır.

Kep fazında, akrozomal vezikül nükleusun ön yarısını kuşatır. Oluşan bu yapı akrozomal kep olarak anılmaktadır. Bu aşamada altta kalan nüklear zarf parçası, porlarını kaybeder ve kalınlaşır. Nüklear içerik ise giderek yoğunlaşır.

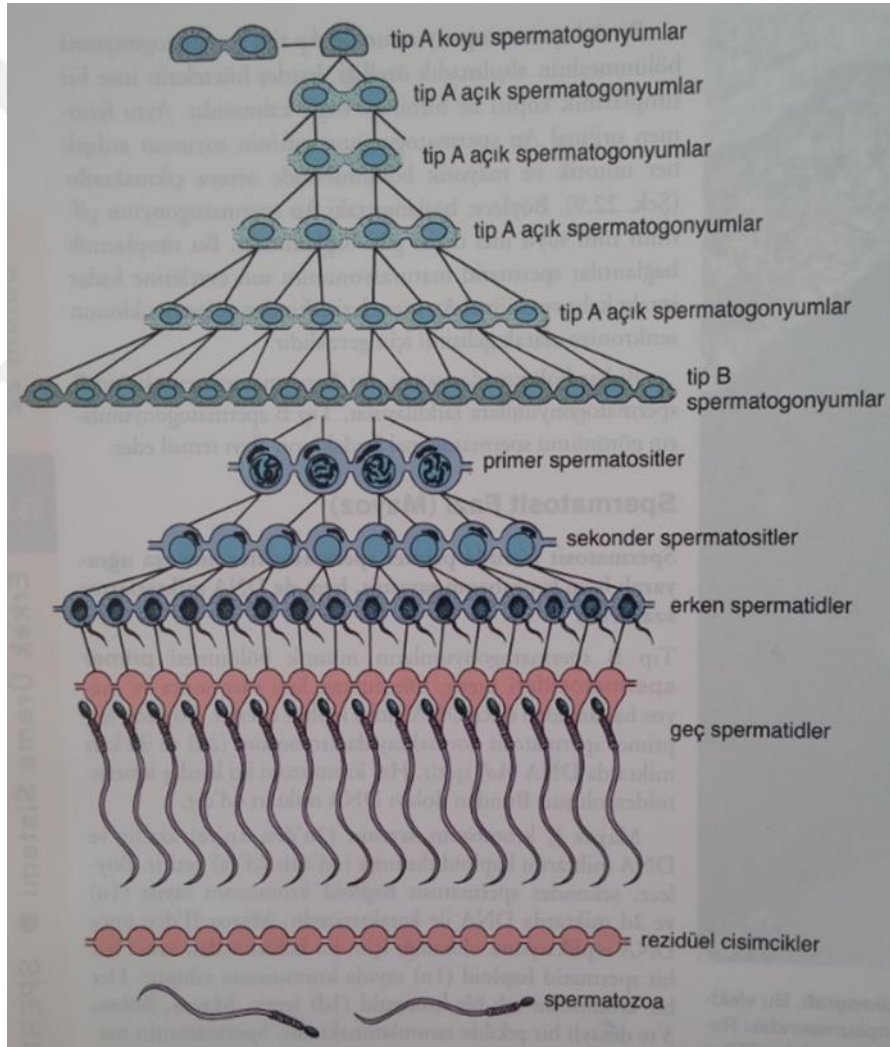
Akrozom fazında, spermatid yeniden konumlanmaktadır. Bu süreçte spermatidin baş kısmı Sertoli hücrelerinin içerisine iyice gömülerek bazal laminaya doğru ilerlerken gelişmekte olan flagellum ise seminfer tubülün lümenine doğru ilerlemektedir. Spermatidin yoğunlaşan nükleusu yassılaşıp uzar. Nükleus ve onu çevreleyen akrozom plazma membranının ön kısmına yakın bir şekilde yerleşirken sitoplazma posterior kısma doğru akmaktadır. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kenarında spermatidin arka kutbuna doğru silindirik kılıf şeklinde manşeti oluşturur. Bu aşamada sentriyoller, nükleusun arka yüzeyine ilerler ve burada immatür sentriyoller nükleustaki sıkı bir oluğa tutunur. Sentriyoller, modifikasyona uğrayarak spermin boyun bölgesi olarak adlandırılan bağlantı parçasını oluştururlar. Nükleusa tutunan dokuz kalın fibril, dış yoğun lif olarak kuyruk boyunca uzar ve nükleusla flagellum arasındaki bağlantıyı sağlar. Spermin orta parçasında ise büyüyen flagellumu kuşatacak olan plazma membranı posterior kısma ilerler. Bu şekilde manşet kaybolur ve mitokondriyonlar sitoplazmanın kalan kısmından göç ederek boyun bölgesindeki kaba fibrillerin etrafında ve boyun bölgesinin hemen posterior uzantısında sıkı, helikse benzer bir kılıf oluştururlar. Orta parçanın distal kısmında uzunlamasına iki sütundan ve çok sayıda bağlantı kuşağından oluşan fibröz kılıf, esas parçanın dokuz longitudinal lifini çevreleyerek flagellumun hemen hemen sonuna kadar ulaşır. Kuyruğun, fibröz kılıfın, distalinde kalan kısa segment son parça olarak tanımlanmaktadır.

Olgunlaşma fazında flagelyum etrafında bulunan fazla sitoplazma azaltılır ve olgun (matür) spermatozoon oluşur. Rezidüel cisimcik şeklinde de ifade edilen bu fazla sitoplazma artığı Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir. Gelişmekte olan gametler arasında bulunan interselüler köprüler fazla sitoplazmada kalmaktadır. İnterselüler köprülerden ayrılmış olan spermatidler ise Sertoli hücrelerinden salınırlar.

Bu aşamalardan sonra spermiyogenezin sonunda, özelleşmiş Sertoli - spermatid bağlantı kompleksi dağılarak uzamış olan spermatidler Sertoli hücrelerinden seminifer tubülün lümenine doğru ilerler. Bu evre spermiyasyon olarak adlandırılmaktadır (14).

4.3.4. Spermatozoon Yapısı

Olgun insan spermi yaklaşık 60 µm uzunluğundadır. Olgun sperm, baş ve kuyruk olmak üzere iki birimden oluşmaktadır. Bunlar birbirine bir bağlantı parçasıyla tutunmaktadır. Spermin baş ve kuyruk bölümlerini bir plazma membranı kuşatmaktadır.



Şekil 2. Spermatogenik seri hücreleri (Ross ve ark.) (14)

Spermin baş kısmı yassı ve sivri olup 4.5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındadır. Baş kısmı yassılaştırmış çekirdek ve bunun anterior yarısını saran akrozomdan oluşmaktadır. Akrozom kısmı hyalüronidaz, nöraminidaz, asit fotfataz ve proteaz gibi hidrolitik enzimler içerir. Spermin yumurtaya değmesiyle birlikte bu akrozomal enzimler salınır ve akrozom reaksiyonu başlamış olur. Bu sayede spermin penetrasyonu sonrasında gerçekleşecek olan fertilizasyon kolaylaştırılır ve ovuma başka spermlerin girmesi önlenir.

Boyun olarak da adlandırılan bağlantı parçası, dar bir parça olup bir çift sentriol bulundurmaktadır. Distal sentriol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksoneme kaynaklık yapmaktadır. Bağlantı parçası ayrıca kaba liflerin başlangıcını içerir.

Spermin kuyruk kısmı; orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç kısımdan oluşur:

Orta parça, yaklaşık 7 µm uzunluğundadır ve mitokondriyonlar içermektedir. Bu mitokondriler kuyruğun hareketi için gerekli olan enerjiyi sağlayarak spermin hareketini sağlar. Mitokondriler, 9+2 diziliimli mikrotübüler aksonem ile dış yoğun lifleri sarmal şekilde kuşatmaktadır.

Esas parça, yaklaşık 40 µm uzunluğunda olup kuyruğun en uzun parçasıdır. Bu yapı yedi dış yoğun life sarılı merkezi bir aksonem ile bir fibröz kılıftan oluşmaktadır. Bu fibröz kılıf, eşit uzaklıktaki uzamına kolonlardan çıkan dairesel iskeletten oluşur. Esas parçada bulunan bu fibröz kılıf ve dış yoğun lifler keratin içermektedir. Keratin, spermin öne hareketi esnasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir protein iskeleti oluşturmaktadır.

Son parça, olgun sperimde yaklaşık 5 µm olup kuyruğun çok kısa parçasıdır. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıf erken sonlandığından bu parça sadece aksonemden oluşmaktadır (14, 28).

4.4. Epididimis

Epididimis, testisin postero-medialinde bulunan borucuklardan oluşmuş spermlere depo görevi gören virgül şeklindeki organdır. Ductus epididymis kıvrımlı borulardan oluşmaktadır. Bu organ, baş (caput epididymidis), orta (corpus

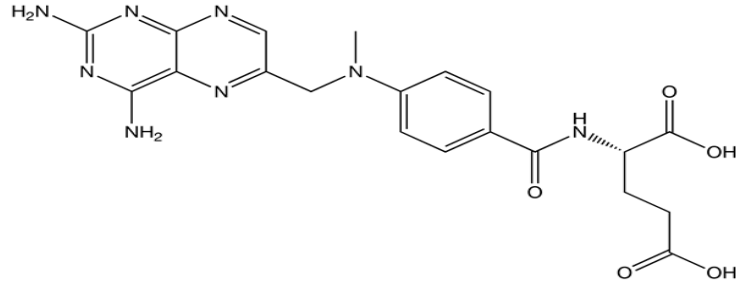
epididymidis) ve kuyruk (cauda epididymidis) olmak üzere üç kısımdan oluşur: Baş kısmına duktuli efferentes bağlanır ve bu kısım sperm topluluğu içermez (29).

Duktus epididimis, yaklaşık 4-6 m uzunluğunda olup tek ve oldukça kıvrımlı bir kanaldır. Bağ dokusu ve kan damarlarıyla kuşatılmıştır. Epididimisten alınan enine kesitte kıvrımlı tubüller görülür. Bu tubüllerin iç ve dış yüzeylerinin sınırları düz olup tubüller, bağ dokusu ve düz kas hücreleriyle örtülmüştür. Yalancı çok katlı olan tubül epiteli; uzun, hareketsiz, stereosilyalı yüksek prizmatik esas hücreler ile küçük bazal hücreler bulundurulur. Stereosilyumlar dallanma gösteren uzun mikrovilluslardır. Bazı tubüllerin lümeninde olgun spermatozoonlar görülmektedir (15, 19)

Spermiler, efferent kanallardaki hareketli silyumlar sayesinde seminifer tubüllerden epididimise taşınır. Silyumsuz izoprizmatik hücreler, seminifer tubüllerde Sertoli hücrelerinden üretilen testiküler sıvının bir kısmını geri emer. Epididimiste ise stereosilyumlu esas hücreler, spermilerin geçişi sırasında testiküler sıvıyı emer. Ayrıca esas hücreler, seminifer tubüllerde uzaklaştırılamayan artık cisimleri ve bozulan sperm hücrelerini fagosit eder. Ek olarak spermilerin dışı üreme yollarında depolanmasına kadar kapasitasyonunu baskılayan bir glikoprotein salgılar. Bazal hücrelerin görevi ise bilinmemektedir. Epididimis kanalları spermin biriktirilmesi, depolanması ve olgunlaştırılmasında görev alır. Spermiler burada hareketlilik ve yumurtayı dölleme yeteneği kazanır (15).

4.5. Metotreksat

Metotreksat ($C_{20}H_{22}N_8O_5$), özellikle neoplazmlarda kullanılmakta olan bir folik asit antimetabolitidir (Şekil 3). Antimetabolitler; proteinler, DNA, RNA ve diğer temel hücre bileşenlerinin sentez zincirinin farklı aşamalarında substrat veya koenzim olarak görev alan çeşitli doğal metabolitlerin analoglarıdır. Folik asit antimetabolitleri, ilk defa 1948 yılında Farber ve ark. tarafından kanser terapisinde kullanılmıştır. MTX ilk kez Sidney Farber tarafından, akut lenfoblastik lösemili (ALL) çocuklarda geçici remisyon için uygulanmıştır. Bugüne kadar klinikte birçok folat analogu kullanılmasına karşın MTX bu analogların en yaygın kullanılanıdır (30-32).



Şekil 3. MTX'in kimyasal yapısı

Folik asit, dihidrofolat redüktaz enzimiyle dihidrofolat (DHF) ve tetrahidrofolata indirgenmektedir. İndirgenen bu folatlar, homosisteinin metionine dönüşümü sırasında, histidin metabolizmasında, DNA sentezinde gerekli olan timidilat ve pürin sentezinde görev almaktadırlar. MTX, dihidrofolat redüktaza (DHFR) antimetabolit olarak bağlanır ve onu inaktive eder. Bu şekilde homosisteinin metionine, glisinin serine dönüşüm mekanizması ile timidilat ve inosilik asit sentezi bozulur ve sonuç olarak protein sentezinde hasar oluşur. MTX'in yaptığı bu etkiden dolayı tümör hücrelerinin ve romatolojik hastalıklarda etkinliği olan inflamatuvar hücrelerin etkinliği bozulur.

MTX'in biyoyararlanımı yaklaşık %60 civarındadır. Plazma yarılanma ömrü yaklaşık 6 saattir. Diğer antifolat ilaçlarla birlikte alındığında folat yetmezliğine neden olmaktadır (33).

MTX; lösemi, lenfoma, meme kanseri, baş ve boyun kanseri gibi pek çok kanser türü ve romatizmal hastalıklarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca intratekal olarak tümörün leptomeningeal yayılımını önlemek için de kullanılmaktadır (34, 35).

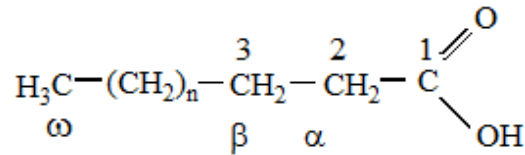
Tedavide MTX kullanımı dokularda apoptoz artışına neden olmaktadır. MTX uygulamasının 6 saat sonrasında sıçan ince barsağında apoptoz en yüksek seviyeye ulaşmıştır (36).

MTX kullanımında; bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme, somatit, kemik iliği depresyonu, ağız ve bağırsak mukozasında ülserasyon, akciğerlerde infiltrasyon gibi yan etkiler görülmektedir (37, 38). MTX'in teratojenik olduğu, bu nedenle doğurganlık çağındaki kadınların MTX alırken hamile kalmaması ve gebelik öncesi en az bir ovariyal siklus döneminde MTX kullanımının kesilmesi gerektiği bildirilmiştir (39). Ayrıca MTX, testis toksisitesi oluşturarak infertiliteye neden olmaktadır (6). MTX

kullanan erkeklerde, oligozoospermi ve hücrel-kromozomal değişim gözlenmiştir (40).

4.6. Yağ Asitleri

Yağ asitleri, hidrokarbon zincirli monokarboksilik asitler olup R-COOH kapalı formülüyle ifade edilirler. Yağ asitlerinin karbon atomları, karboksil ucundan başlanarak numaralandırılmakta olup 2 nolu karbon atomu α , 3 no'lu karbon atomu β ve zincirin sonundaki metil karbonu ise ω sembolleri ile ifade edilmektedir. Yağ asitleri, radikal (R) grubunun tek veya çift bağ içermesine göre farklı şekilde kategorize edilmektedir. Eğer yağ asitlerinin R grubu tek bağ içeriyorsa doymuş yağ asidi, bir veya daha fazla sayıda karbon-karbon çift bağ bulunduruyor ise doymamış yağ asidi denilmektedir. Doymamış yağ asitleri, içerdikleri çift bağın bağlı olduğu karbon atomuna göre isimlendirilmektedir (Şekil 4). Yapılan çalışmalarda çeşitli hücre ve dokularda 100'den fazla sayıda farklı yağ asidi izole edilmiştir. Bu yağ asitleri zincir uzunluğu, doymamış bağların sayısı ve yeri gibi özelliklerinden dolayı çeşitlilik göstermektedir (9). Yağ asitlerinin fiziksel, kimyasal ve beslenmedeki görevleri; moleküldeki karbon atomu sayısı, doymuşluk derecesi, karbon atomları arasındaki çift bağ sayısı ve karbon atomuna bağlı hidrojenlerin konumu ile analiz edilmektedir (12, 41).



Şekil 4. Yağ asitlerinin konfigürasyonu

Yağ asitlerinin fiziksel özellikleri incelendiğinde oda sıcaklığında doymuş yağ asitleri katı iken doymamış yağ asitleri sıvı özelliktedir. Karbon atomu 10'a kadar olan bütün doymamış yağ asitleri oda sıcaklığında sıvı ve uçucu yapıda olup suda erimezler. Daha uzun karbon zinciri bulunduran yağ asitleri ise oda sıcaklığında katıdır. Yapısı 12:0 ve daha uzun zincirli yağ asitleri vücut sıcaklığında katıdır. Ancak yapısı 18:2 olan üç adet doymamış yağ asidi 0°C'de sıvı halde bulunur. Yağ asitlerinin bu özellikleri zar lipidlerine de yansımaktadır. Zarlar belirli bir sıcaklığın üstünde sıvı kristal yapıdadır.

Zarın yapısındaki lipitler, doymuş yağ asitleri içeriyorsa zarın sıvı kristale dönüşüm sıcaklığı yüksektir. Ancak zarda bulunan lipitler, doymamış yağ asitleri içeriyorsa zarın sıvı kristale dönüşüm sıcaklığı daha düşük olmaktadır. Bu duruma bağlı olarak adaptasyondan ötürü sıcak bölgelerde yaşayan canlıların zar lipitlerinde daha fazla doymuş yağ asitleri bulunurken soğuk bölgelerde yaşayan canlıların zar lipitlerinde daha fazla miktarda doymamış yağ asitleri bulunmaktadır (42-45).

Doymuş yağ asitleri, hidrokarbon zincirlerinde çift bağı bulunmayan ve dallanmamış yapıdaki yağ asitleridir. Bu yağ asitlerinin omurgasında her bir tekli bağ tam dönme serbestisine sahip olduğundan hidrokarbon zinciri sonsuz sayıda konformasyona sahip olabilmektedir (9). Doymuş yağ asitleri; kısa, orta ve uzun zincirli gruplar halinde tanımlanmaktadır. Şöyle ki: 2-6 karbona sahip olanlar kısa, 8-12 karbonlular orta ve bundan daha fazla karbon atomuna sahip olanlar ise uzun zincirli olarak belirtilmektedir. Doymuş yağ asitlerinin en basitini asetik asit oluşturmaktadır ve yapısında iki karbon atomu bulundurur (46). Yağ asitlerinin vücuda alınımında aynı miktarda kalori sağlanmasına rağmen doymuş yağ asitleri tüketildiğinde vücutta yağ birikimi ve kilo alımı olmaktadır (42). Doymuş yağ asitlerinin tüketilmesinin kanın yağ oranını ve LDL kolesterol düzeyini yükselttiği, kalp damar hastalıklarına risk oluşturduğu, diyabete eğilimi artırdığı belirtilmektedir (47).

Doymamış yağ asitleri hidrokarbon zincirleri üzerinde bir veya daha fazla miktarda çift bağ içermektedirler. Bu yağ asitleri yapısında iki veya daha fazla miktarda çift bağ bulunduruyorsa bu çift bağlar mutlaka üç karbon arayla konumlanmışlardır (48). Doymamış yağ asitlerinin cis ve trans formları mevcuttur. Bu yağ asitlerinde dönme serbestisi olmayan çift bağda; cis formunda ise 30°'lik bükülme, trans formunda ise doymuş yağ asitlerindeki benzer yapı gözlenmektedir. Cis formları, trans formlarına göre daha az kararlı yapıda olup biri diğerine bazı katalizörlerle dönüşebilmektedir. Doymamış yağ asitlerinde bulunan bu konfigürasyonlar, özellikle membranlarda biyolojik öneme sahiptir (9). Doymamış yağ asitleri çift bağ sayısına göre de gruplandırılmaktadır. Eğer bunlar bir adet çift bağa sahip ise tekli doymamış yağ asitleri (TDYA), birden fazla çift bağ içeriyor ise çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) olarak adlandırılır (49). Çoklu doymamış yağ asitlerinin başlıca olanları: Linoleik asit (LA), α -linolenik asit (α -LN), Araşidonik asit (AA), Eikosapentaenoik asit (EPA), Dokosaheksaenoik asit (DHA) şekilde verilir (50, 51).

4.7. Esansiyel Yağ Asitleri

Esansiyel yağ asitleri, memeli organizması tarafından sentezlenemeyip dışarıdan vücuda hazır olarak alınan yağ asitleridir. Memeli enzim sistemlerinde yağ asidi zincirlerinin 9 nolu karbon atomlarında çift bağ oluşturacak enzimler bulunmamaktadır. Bu yüzden bu canlılar, doymuş yağ asitleri ile TDYA'yı sentezleyebilirken esansiyel yağ asitlerini sentezleyememektedir. Esansiyel yağ asitleri; linoleik asit (18:2 cis- Δ^9 , Δ^{12}) ve α -linoleik asit (18:3 cis- Δ^9 , Δ^{12} , Δ^{15})'tir (9). Bunlar, F vitamini olarak da anılmaktadır. Doymamış yağ asitleri çoğunlukla $\omega 3$ ve $\omega 6$ formunda bulunurlar (52). Memelilerdeki doymamış yağ asitleri; palmitoleat, oleat, linoleat veya linolenattan türetilmektedir (9).

1928'de Evans ve Burr'un yaptığı bir çalışmaya göre A ve D vitaminlerinin dışardan eklendiği, artırılmış lipitsiz diyetle beslenen sıçanlarda gelişmenin gerilediği ve üreme bozuklukları olduğu gözlenmiştir. Sonrasında yapılan çalışmada ise diyetle linoleik, α -linolenik, ve araşidonik asit ilave edilmesiyle bu sorunun giderildiği saptanmıştır. Bu eksikliğin tanısal nitelikleri arasında deride kepeklenme, kuyrukta nekroz ve idrar yolu lezyonları görülmüştür; ancak öldürücü nitelikte olmadığı belirlenmiştir (10).

Bilim adamları, Eskimoların sağlığı üzerine Gröndland'da ilk defa bir çalışma yapmışlar ve bu çalışmada $\omega 3$ 'ün farkına varmışlardır. Eskimoların, geleneksel gıdaları yüksek oranlarda yağ içermesine rağmen kalp hastalığı, romatizmal kireçlenme, astım ve endüstriyel ülkelerde yaygın olan pek çok hastalığa dirençli oldukları anlaşılmıştır (53, 54). Bunun nedeni olarak da Eskimoların, doymuş yağ asitlerini içeren bitkisel yağlar ile karasal memelilerin yağlarını tüketmek yerine doymamış yağ asitlerini içeren balık etleri ve deniz memelilerinin yağlarını yaygın olarak tüketmelerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (55).

Vücutta $\omega 3$ ve $\omega 6$ yağ asitleri değerlerinin belirli oranda bulunması gerekir. İdeal beslenmede alınması gereken n-6/n-3 oranı 5:1 ile 10:1 arasında olmalıdır (56). Diyet uzmanlarına göre günlük alınması gereken kalori miktarı doymuş yağlarda %1'den az olması, yağlarda %30'dan fazla olmaması gerektiği önerilmiştir. İngiliz beslenme vakfına göre diyetlerdeki kaloringin %6'sı $\omega 6$ yağ asitleri, %1,5'u ise $\omega 3$ yağ

asitleri tarafından karşılanması gerekmektedir. Bu açıklamaya göre günlük alınması önerilen değerler tablo 1’de verilmiştir (53, 54, 57).

Linoleik asit ve α -linolenik asit, vücutta diğer bazı yağ asitlerine dönüşebilirler. Linoleik asit; gamma-linoleik asit, dihonogamma-linoleik asit ve araşidonik asit gibi birçok $\omega 6$ yağ asitlerini oluşturabilir. α -linolenik asit ise eikosapentaeonik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) gibi $\omega 3$ yağ asitlerini sentezleyebilir (58-60).

Tablo 1. Günlük alınması gereken yağ asidi miktarları (Eritsland ve ark.) (57)

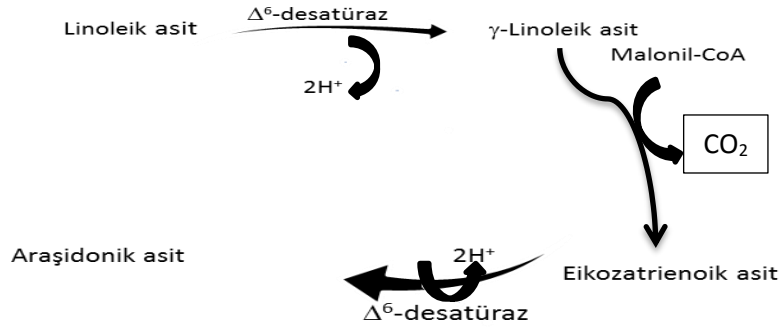
Yağ Asidi	Miktar (g)	
	Erkek	Kadın
Linoleik Asit	17.0	13.0
α -Linolenik Asit	3.0	2.0
EPA ve DHA	1.4	1.1

Esansiyel yağ asitlerinin migren türü baş ağrıları, bazı kanser türleri, eklem romatizması, yetişkinlerde şeker hastalığı, yüksek kolesterol, yüksek tansiyon, kalp damar hastalıkları ve bazı alerjiler gibi hastalıklara karşı koruyucu etkileri bulunmaktadır (61, 62). Ayrıca bu yağ asitleri özellikle çocuklarda bedensel ve ruhsal gelişim açısından önemli bir yere sahiptir (63). EPA’dan yoksun diyetle beslenilmesinde; kepek, ekzema, çatlak tırnaklar, mat ve kırılğan saçlar gibi deri problemleri de oluşabilmektedir (64).

4.8. Linoleik Asit

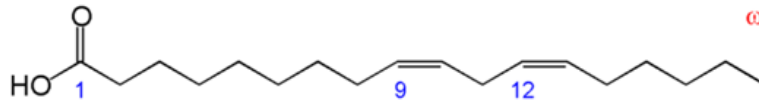
Linoleik asit (18:2), esansiyel yağ asidi olup ilk çift bağı metil grubuna en yakın altıncı karbonunda yer aldığından $\omega 6$ grubunda yer almaktadır (50). Kimyasal formülü $C_{18}H_{32}O_2$ şeklindedir (Şekil 6) (65). Erime noktası $-5^{\circ}C$ ’dir (9). Vücuda alınan linoleik asit γ -linoleik asit (18:3, $\Delta^{6,9,12}$) ve araşidonik asite (18:4, $\Delta^{5,8,11,14}$) şekil 5’de olduğu gibi dönüştürülebilmektedir (66).

ω -6 yağ asitlerinin cilt sağlığını koruduğu, esnek ve pürüzsüz cilt oluşumuna katkı yaptığı, bu sayede deriyi yaralanmalara ve enfeksiyonlara karşı koruduğu, vücut sıcaklığını ve su kaybını düzenlediği belirtilmektedir (12).



Şekil 5. Yağ asiti dönüşümü

Vücuda hazır olarak alınan LA'nın birçok bitkisel üründe bol miktarda bulunduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda, cevizdeki esansiyel yağ asidi içeriğinin önemli miktarda olduğu dikkat çekmektedir. Ceviz yağının yaklaşık %50-70'ini çoklu doymamış yağ asitlerinin oluşturduğu, sert kabuklu meyveler içerisinde %60 oranla en yüksek değerde LA içerdiği belirtilmektedir (67, 68). Yemeklik yağlar ve yağlı tohumlar üzerine yapılan bir çalışmaya göre, Gümüşhane ve Şebinkarahisar yörelerinden toplanan ceviz türlerinin LA bakımından çok zengin olduğu belirlenmiştir. Yine bu çalışmada; ticari ayçiçeğinin %70 oranında, doğal ayçiçeğinin %90 oranında LA içerdiği, susam tohumundaki %70 yağ içeriğinin yaklaşık %60'ının LA olduğu; kabak çekirdeği, haşhaş tohumu yağının ve mısır yağının LA bakımından zengin olduğu; balık yağının ise hemen her çeşit yağ asidine sahip olduğu ve en zengin ω3 yağ asidi serisi içerdiği, araşidonik, dokosanoik ve diğer uzun zincirli doymuş ve doymamış yağ asitlerinin bol miktarda bulunduğu belirtilmektedir (69).



Şekil 6. Linoleik asidin kimyasal yapısı

4.9. Apoptoz

Apoptoz, Vogt tarafından 1842 yılında hücrelerin normal gelişim süreçleri sırasında gerçekleşen ölüm şekli olarak tanımlanmıştır. Apoptoz terimi ilk kez Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmıştır. Apoptoz terimi kelime anlamı olarak yaprak dökümüne benzetilerek Yunancada apo (ayrı) ve ptozis (düşen) fizyolojik veya fizyolojik olmayan nedenlerden dolayı, komşu hücrelerden ayrılarak bir takım değişikliklerden sonra yok olması olarak tanımlanmaktadır (70, 71). Bu olay genetik yapı gibi hücrenin kendine özgü özellikleriyle, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi çevresel faktörlerin etkisi altındadır (72). Hücreler kendi istekleri doğrultusunda ölüme karar verdikleri düşünüldüğünden apoptoz programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (73).

Apoptoz ilk kez gelişen embriyoda keşfedilmiştir. Bu olay embriyonun morfogenezini için temel oluşturmaktadır. İleriki yıllarda araştırmacılar normal erişkin dokularında apoptozin yaygın olarak gerçekleştiğini belirlemişlerdir (19). Organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde apoptoz sürekli şekilde ve yaşam boyu devam etmektedir. Bu şekilde dokularda apoptoz ve mitoz aktifliklerini sürdürerek doku homeostazisini gerçekleştirmektedirler (74).

Apoptoz sitoplazmik organellerde fazla değişiklik olmadan, plazma membranlarında tomurcuklanma, hücre hacminde azalma, kromatin yoğunlaşması, nukleusun parçalanması şeklinde devam eden ölüm şeklidir (73).

Apoptotik hücrelerin morfolojilerindeki değişiklikleri belirlemede ışık mikroskobu, elektron mikroskobu ve flow sitometriden yararlanılmaktadır (70). Apoptotik hücrelerin belirlenmesinde en sık kullanılan teknikler TUNEL yöntemi gibi DNA hasarının belirlenmesi şeklinde olmaktadır (73).

Apoptoz genlerin kontrolünde gerçekleşmektedir. Memeli hücrelerinin apoptoza girmesinde hücre siklusunda G₁ fazından S fazına geçerken p53 geninin kritik bir rolü vardır. p53 genindeki bir mutasyon sonucunda hasara uğrayan hücrelerin elimine olması gerekirken ölümsüzleşirler ve bu şekilde kanserleşme meydana gelir. Germ hücrelerindeki p53 geni mutasyonu Li-Fraumeni sendromuna neden olmaktadır. Li-Fraumeni sendromu kalıtsal kanser sendromu olarak önem arz etmektedir ve bu

sendromda yumuşak doku sarkomları, meme kanserleri, beyin tümörleri, lösemiler ve diğer kanser türleri görülmektedir (1).

Apoptozun mekanizması şu şekilde meydana gelmektedir: Hücre yoğunluğu artarak hücre zarının düzgün yapısı bozulur. Endoplazmik retikulum genişleyerek hücre zarıyla birleşir. Sitozolde organeller normal yapılarını koruyarak bir araya toplanırlar. Mikrovilluslar kaybolur, hücreler arası desmozom bağlantıları kopar ve bu şekilde hücreler birbirinden ayrılır. Nükleus küçülerek nüklear kromatin yoğunlaşır. Bu sayede nükleus membranında kep şeklinde görüntü oluşur ve nükleus zarı dalgalı bir görünüm alır. Bu süreçte nükleus zarı porları da kaybolarak nükleus zarı parçalanır. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu artar ve bu artışla birlikte hücre içi endonükleaz aktivitesi artar. Endonükleazın aktivitesi nedeniyle DNA 180-200 baz çifti veya katları şeklinde nükleozomal bölgelerden kırılarak, DNA kırıkları oluşur. Bu aşama jel elektroforezinde merdiven şeklinde bant görüntüsü oluşturur. Sonrasında hücre zarında hücre içeriği hücrenin dışına sızmaksızın tomurcuklanma meydana gelir. Hücre, içerisinde organeller ve kromatin parçacıkları bulunan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler, yüzey belirleyicileri yardımıyla, komşu epitel hücreleri ve makrofajların tomurcuklanmasıyla fagosit edilir ve lizozomlar tarafından sindirilir (72). Nekrozdaki hücre parçalanmasının aksine apoptozda apoptotik cisimciklerin oluşmasından dolayı bu çevreyi kirletmeyen ‘temiz hücre ölümü’ olarak da tanımlanmaktadır (73).

4.10. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron çifti bulunduran atom veya moleküllerdir (75). Bunlar kararsız, kısa ömürlü, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir (76). Diğer moleküller ile çok kolay elektron alışverişi yapan bu moleküller, oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri (ROS) şeklinde de adlandırılmaktadır (77). Serbest radikaller endojen veya ekzojen kaynaklı olabilirler. Ekzojen kaynaklar olarak bazı kimyasallar, çeşitli ilaç toksisiteleri, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği oluşturan fitokimyasallar, sigara dumanı, solventler, antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular belirtilmekte olup toksikolojik açıdan önem arz etmektedirler (76). Serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücreleri olan nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için

gereklidirler. Ancak bu serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümüne neden olmaktadır.

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde olmaktadır ve bu olay oksidatif denge olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif denge korunduğu müddetçe organizmada serbest radikallerden dolayı bir sorun oluşmamaktadır. Ancak radikallerin oluşum hızında artma veya ortadan kaldırılma hızında bir yavaşlama olduğunda oksidatif denge bozulmaktadır. Oksidatif stres olarak tanımlanan bu durum doku hasarına neden olmaktadır (78).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijen kaynaklı radikallerdir (76). Bunlar serbest oksijen radikalleri (SOR) veya daha genel ismiyle reaktif oksijen türleri (ROS) şeklinde adlandırılırlar (79).

4.10.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

Canlı sistemlerinde oksijenin indirgenmesiyle serbest radikaller ortaya çıkmaktadır. Oksijen canlılarda dört elektron alarak suya indirgendiği gibi basamak basamak tek değerli indirgenme de gerçekleştirebilmektedir. Bu şekilde, biyolojik sistemlerde meydana gelen en önemli serbest oksijen grupları süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH\cdot$) ve singlet oksijendir (1O_2) (79).

Süperoksit radikali (O_2^-), aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelir. Bunlar elektronca zengin ortam olan iç mitokondri zarında ve ksantin oksidaz gibi flavoenzimlerce endojen olarak oluşturulur. Fagositik kan hücreleri (monosit, nötrofil, makrofaj ve eozinofil gibi) tarafından sürekli sentezlenmektedirler. Buna rağmen dokularda fazla miktarda oksidatif hasara neden olmazlar. Nedeni ise bunların dokularda bulunan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşmeleridir. Bu radikallerin asıl zarar mekanizmaları, hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarından kaynaklanmaktadır (80-82).

Hidrojen Peroksit (H_2O_2), moleküler oksijenin iki elektron almasıyla oluşur. Canlı sistemlerde hücrelerde bulunan ürat oksidaz, glikoz oksidaz ve D-aminoasit oksidaz gibi pekçok enzim iki elektronunu oksijene vererek H_2O_2 oluşabildiği gibi süperoksit radikalının dismutasyonu ile birlikte H_2O_2 meydana gelebilmektedir. Bu serbest radikal değildir, ancak serbest radikal oluşumuna kaynak oluşturmaktadır.

Ortaklanmamış bir elektron bulundurmadiğından oksidan özelliğı çok zayıftır. Buna rağmen Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve en toksik serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturur (80, 83).

Hidroksil radikalleri ($\text{OH}\cdot$), geçiş metalleri varlığında Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten meydana gelmektedir. Son derece reaktif olup yarılanma ömrü oldukça kısadır ve en güçlü SOR'dır. Oluştugu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikaller oluşturur ve bu şekilde hücrede hasar oluşturur (80).

Singlet oksijen, serbest radikal reaksiyonlarını başlatır ve serbest radikal reaksiyonları sonucu oluşmaktadır. Eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal özellikte değildir (84). Bunlar hücre zarlarının fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki doymamış asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan yağ gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini meydana getirirler (76).

4.10.2. Serbest Radikallerin Etkileri

SOR'un organizmadaki artışı sonucunda hücre membranlarında hasar, hücre içi proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulma, DNA baz dizilimlerinde değişimler, kopmalar, kardeş kromatit değişmelerinde artışla yapısal hasar oluşturarak hücre zedelenmesine neden olmaktadır (80, 85). Radikaller hücre membranlarında lipid peroksidasyonu (LPO) etki gösterirler (75). LPO, çoklu doymamış yağ asitlerinin radikallerle oksidasyonu ile başlayıp otokatalitik zincir reaksiyonlarıyla devam eden süreçtir. Bu reaksiyonlar sonucunda toksik olan aldehitler oluşarak organizmada hasar oluşmaktadır. Oluşan aldehitlerden en iyi bilineni malondialdehit (MDA)'dır (86). LPO ile oluşan MDA'nın, nadiren de olsa DNA mutasyonu oluşturduğu, kanser ve bazı genetik hastalıklara sebebiyet verdiği düşünülmektedir (87).

4.11. Antioksidan Savunma Sistemleri

SOR'ların oluşumunu ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek için vücut tarafından oluşturulan bazı savunma mekanizmaları 'antioksidan savunma sistemleri' olarak tanımlanmaktadır. Antioksidan moleküller; endojen veya eksojen kaynaklı olabilirler. Bu sistem sayesinde oksidan moleküllerin oluşturduğu hasar hücre içi ve

hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilir. Esas antioksidan savunmayı, hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler oluşturmaktadır (78).

4.11.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen kaynaklı antioksidanların en önemlileri enzimatik yapıda olup bunlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px)'dır. Bu enzimler yapılarında bakır, çinko, manganez ve selenyum gibi iz elementleri bulundurduklarından metaloenzim olarak tanımlanırlar (77, 78).

SOD, süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir (88). Oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur (89). İnsan hücrelerinde SOD'un iki izoenzimi bulunur: sitozolde bakır ve çinko iyonu içeren SOD ve manganez iyonu içeren mitokondrial SOD (77).

CAT, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalar. Bu enzim dört tane hem grubu bulunduran hemoproteindir. Oksijenli solunum yapan sitokrom sistemi içeren tüm hücrelerde bulunur. Peroksizomlar, endoplazmik retikulum ve sitozolde bulunmaktadır (84).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Deneysel Çalışma Aşaması

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 17.12.2013 tarihinde 4 nolu karar ile onay alındı. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun onayının ardından KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (BAP) başvuruda bulunulmuş ve BAP Koordinasyon Birimi'nin ID: 122 proje kodlu izni ile çalışmaya başlanmıştır.

5.1.1. Deney Hayvanlarının Temini, Bakımı ve Barınması

Çalışmada 24 adet, 12 haftalık, 250-300 g arasında Spraque Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanların temini, bakımı ve barınması KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Bu sayede hayvanların çevreye uyum problemi ve çevre stresi gibi olumsuz durumlardan etkilenmesi engellendi. Sıçanlar 7 gün boyunca KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezinde sıçan takip odalarında takip edildi. Deney süresince ortamın sıcaklığı $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, nem oranı ortalama $\%50 \pm 5$, ışık ayarı sirkadiyen ritime uygun olan 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Çalışma boyunca hayvanlar, standart Tip III sıçan kafeslerinde barındırıldı. Sıçanların tüketeceği yem ve su, kolaylıkla ulaşabilecekleri şekilde kafesin üst kısmına yerleştirildi. Sıçanların beslenmesinde standart yem ve su olarak çeşme suyu verildi (Resim 2).

5.1.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulama

Çalışmada kullanılan 24 adet yetişkin Spraque Dawley sıçan, her grupta 6 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. 1. grup kontrol grubu olup bu gruba herhangi bir işlem uygulanmadı. 2. grup (MTX grubu) sadece 1. gün 30 mg/kg şeklinde tek doz MTX (Koçak Farma, Türkiye, parti no: 1903502) intraperitoneal (ip) olarak uygulandı. 3. grup (MTX + LA grubu) 1. gün tek doz 30 mg/kg MTX i.p olarak verilerek 1. günden itibaren 7 gün boyunca 100 mg/kg LA (Alfa Aesar, Germany, LOT: 10190989) gavaj yoluyla uygulandı. 4. grup (LA grubu) 1. günden itibaren 7 gün süresince 100 mg/kg LA gavaj yoluyla uygulandı (Tablo 2).



Resim 2. Sıçanların bakımı ve barınması

Tablo 2. Deney Grupları ve Uygulamaları (n=6)

Gruplar	Uygulama	Uygulama Yöntemi	
		MTX	LA
1.	Kontrol	-	-
2.	(MTX)	İlk gün 30 mg/kg (ip)	-
3.	(MTX + LA)	İlk gün 30 mg/kg (ip)	7 gün 100 mg/kg (gavaj)
4.	(LA)	-	7 gün 100 mg/kg (gavaj)

Deney süresi boyunca deneklerin vücut ağırlıkları belirli aralıklarla ölçüldü. Deney boyunca uygulamalar düzenli olarak her gün 9.30 – 10.30 saatleri arasında yapıldı (Resim 3). 7. günün sonunda deneklere anestezi altında gerekli işlemler yapıldıktan sonra eksanguinasyon (kansızlaştırma) yoluyla ötanazi yapıldı.



Resim 3. Sıçanlara gavaj yoluyla linoleik asidin verilmesi

5.2. Histolojik İşlemler

Çalışmanın deney aşaması, kan ve doku örneklerinin alınması KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezinde bulunan hayvan takip ve cerrahi müdahale odalarında gerçekleştirildi. Deney sürecinin sonunda deneklere i.p olarak 50 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin verilerek anestezi yapıldı. Anestezi işleminin ardından deri ve parmak kısırtma yöntemiyle anestezi derinliği belirlendi. Gerekli sürenin ardından deneklerden örneklerin alınması işlemine geçildi (Resim 4).

5.2.1. Kan ve Doku Numunelerinin Elde Edilmesi

Anestezi altındaki deneklerin karın boşluğu açıldıktan sonra, önce sağ testis ve epididimisleri çıkarıldı (Resim 4). Çıkarılan testis bilateral olarak trimlendikten sonra her bir testisin aynı yarısı kasetlenerek histolojik işlemler için Bouin solüsyonuna, diğer yarısı biyokimyasal incelemeler için ependorf tüplerine konuldu. İçinde testis dokusu bulunan ependorf tüpleri biyokimyasal çalışma sürecine kadar -20°C 'de muhafaza edildi. Çıkarılan epididimis örneği sperm sayımı için önceden hazırlanmış olan petri içine alındı ve 37°C 'lik etüve yerleştirildi (Resim 5). Ardından biyokimyasal analiz için abdominal aortadan girilerek 2 cc kan örneği alındı ve kanlar biyokimya tüplerine konuldu. Cerrahi işlemin ardından alınan kanlar santrifüjlenerek biyokimsayal olarak çalışılmak üzere -20°C 'de muhafaza edildi. Biyokimyasal analiz için alınan kan ve doku örnekleri KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'de bulunan soğutuculara yerleştirildi. Örneklerin alınmasından sonra kansızlaştırma yoluyla deneklere ötanazi yapıldı.



Resim 4. Testis ve epididimisin çıkarılması

5.2.2. Semen Analizi

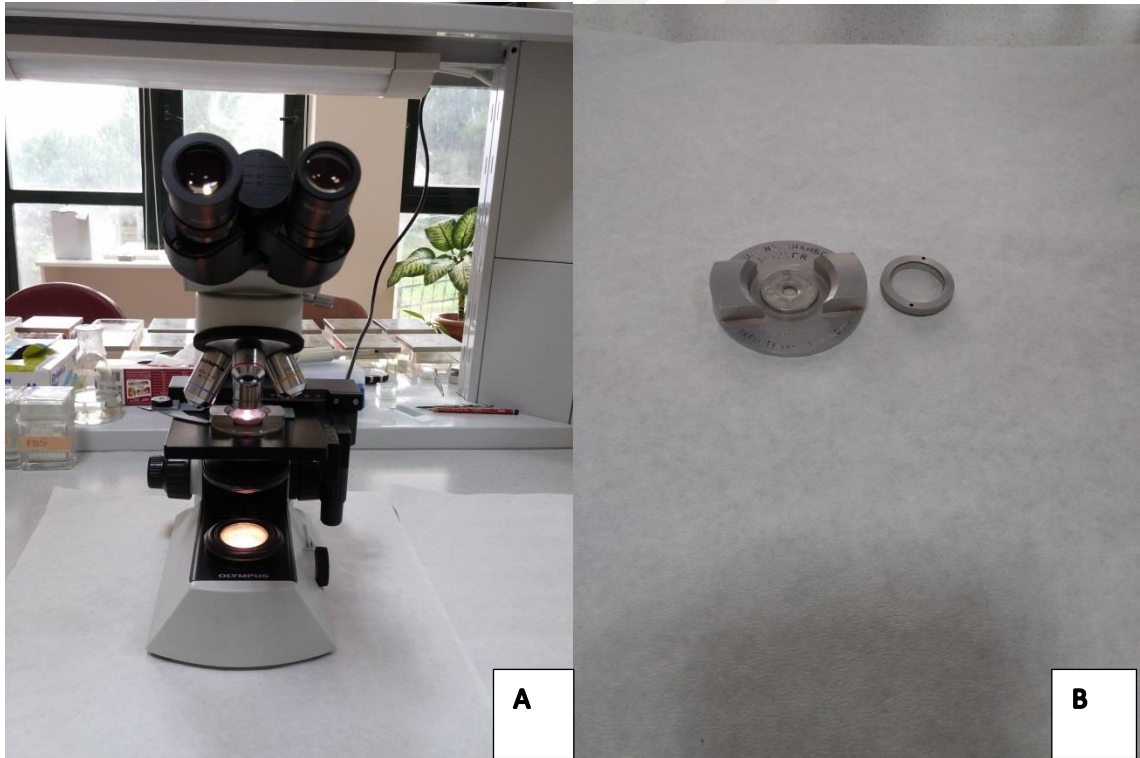
Semen örneğinde sperm sayımı ve motilite değerlendirmesi için Makler Sperm Sayım Kamarası (Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel) kullanıldı (Resim 6-A, B). Değerlendirmeler için deneklerden alınan epididimis, hızlı bir şekilde Tris tampon solüsyonu (pH: 7,5) bulunan petri içerisinde parçalara ayrılarak 37°C'lik etüvde 30 dk bekletildi ve bu sayede spermlerin sıvı içerisinde yüzmesi sağlandı (Resim 5-A, B).



Resim 5. Etüv içerisinde epididimis içeren petriler (A) ve semen analizi için petri içine konulmuş epididimis parçaları (B)

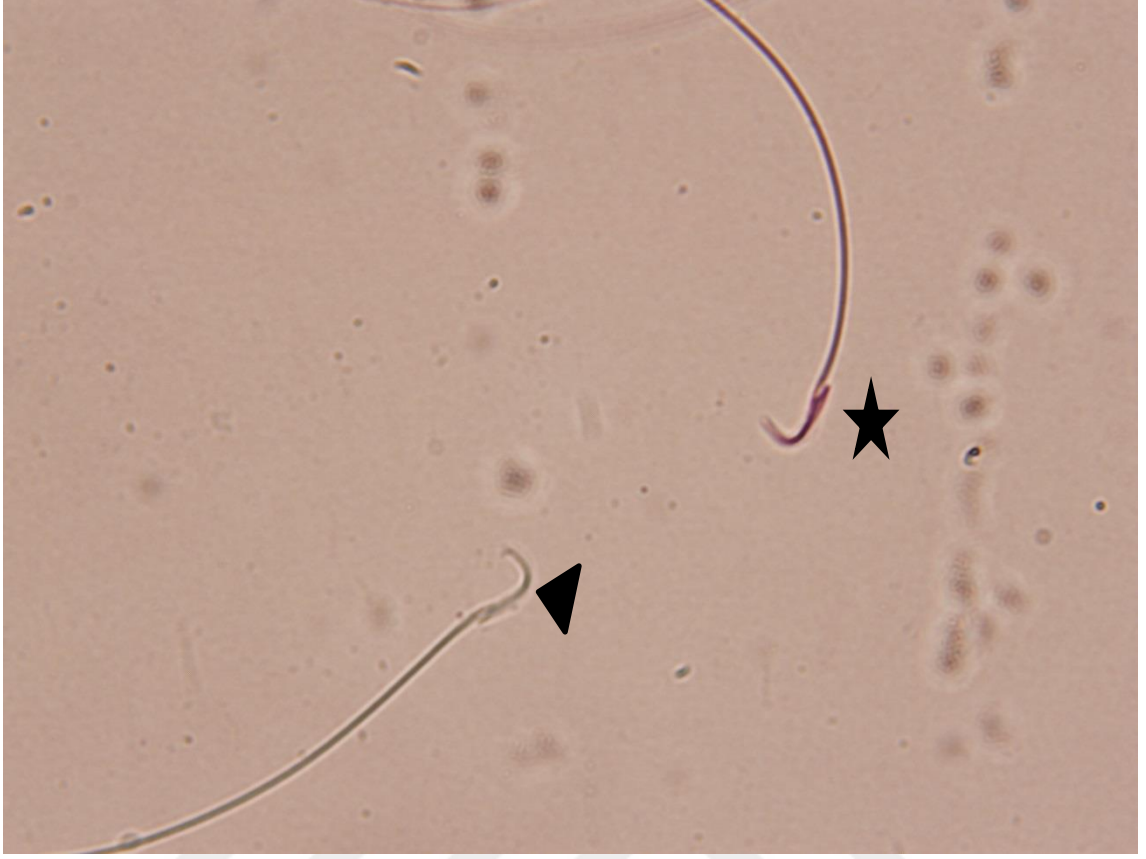
Motilite değerlendirmesi için bir damla semen (5 μL) kameranın merkezine damlatılarak üzerine kapak camı kapatıldı. Dört adet kuvarz bacak sayesinde spermilerin, 10 μm derinlikte yüzmeleri sağlandı. Bir hat üzerinde 10X büyütme altında, 10 karede motil ve non-motil spermier sayıldı ve 10^6 ile çarpılarak mililitredeki ($\times 10^6/\text{mL}$) sperm sayısı belirlendi. Motil sperm sayısının toplam sperm sayısına oranı hesaplanarak motilite yüzdesi (%) belirlendi. Normal sperm konsantrasyonu ($>20 \times 10^6/\text{ml}$) dikkate alınarak değerlendirildi (90).

Vitalite değerlendirmesi için hazırlanan semen örneğinden lam üzerine bir damla damlatıldı, üzerine insülin enjektörü yardımıyla bir damla %1'lik Eozin-Y eklenerek karıştırıldı ve lamel ile kapatılarak değerlendirme yapıldı. Her bir örnekten 100 sperm canlılık açısından değerlendirildi (Resim 7).



Resim 6. Makler Sperm Sayım Kamarası ile analiz (A) ve Makler Sperm Sayım Kamerası (B)

Epididimal sıvıda 5 farklı alanda 20'lik objektifle döküntü epitel hücre sayımı yapılarak total epitel sayısı belirlendi.



Resim 7. Canlı ve ölü spermatozoon görüntüleri (Eozin-Y, X1000) (Ok başı: Canlı spermatozoon, Yıldız: Ölü spermatozoon)

5.2.3. Doku Takibi

Histolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar için alınan örneklerin doku takibi, kesit alımı, boyanması ve bu işlemler için gerekli olan solüsyonların hazırlanması KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Testis dokuları önceden hazırlanmış olan üç günlük Bouin solüsyonu içinde; kuru, ışık almayan ortamda, oda sıcaklığında bekletildi.

Bouin solüsyonunun hazırlanışı:

-75 mL pikrik asit

-75 mL formaldehit

-5 mL glasiyel asetik asit

Bouin solüsyonunda fikse edilen dokular, üçüncü günün ardından doku takip işlemine alındı. Doku takip işleminin ardından dokular, parafine gömülerek doku blokları hazırlandı.

Doku takibi aşağıdaki şekilde yapıldı:

1) %70'lik alkol	1 gün
2) %90'lik alkol	1 gün
3) %96'lik alkol	1 gün
4) %100'lük alkol	1 gün
5) %100'lik alkol	1 saat
6) Az ksilen, parafin	5 dakika
7) Ksilen	5 dakika
8) Ksilen	5 dakika
9) 58°C'lik etüvde parafin	15 dakika
10) 58°C'lik etüvde parafin	15 dakika
11) 58°C'lik etüvde parafin	15 dakika
12) 58°C'lik etüvde parafin	2 saat

5.2.4. Kesitlerin Alınması

Kesitlerin alınması KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında bulunan LEICA RM 2255 model mikrotom aracılığıyla sağlandı. İlk olarak doku bloğundan 20 µm'lik kesitler alınarak trimlendi ve dokuya ulaşılması sağlandı. Dokuya tam olarak ulaşılmasının ardından 5 µm'lik kesitler alındı ve kesitler Benmarideki 45°C'lik su içerisine konuldu. Benmaride bekletilerek kırışıklığı açılan dokular, dikkatlice lam üzerine alındı.

5.2.5. Kesitlerin Hematoksilen – Eozin (H&E) İle Boyanması

Dokulardan kesitlerin alınmasının ardından, kesitler H&E boyası ile boyandı. Kesitlerin 58°C'lik etüvde parafini iyice eritildikten sonra aşağıda belirtildiği gibi boyama işlemine geçildi.

- 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 batırıp çıkarma
- 10) Distile su 1 dakika
- 11) Amonyaklı su 10 saniye
- 12) Distile su 1 dakika
- 13) Eozin 30 saniye
- 14) Distile su 1 dakika
- 15) %70'lik alkol 5 dakika
- 16) %96'lık alkol 5 dakika
- 17) %100'lük alkol 5 dakika
- 18) Ksilen 5 dakika
- 19) Ksilen 5 dakika
- 20) Entellan ile kapatma

5.2.6. Histolojik Ölçümler

Hazırlanan preparatlar KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Stereoloji laboratuvarında bulunan Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskobunda (Olympus, BX51, Japan) incelendi. Seminifer tubüllerdeki spermatogenik hücreler ve interstisyel alanlar görüntülenerek fotoğraflar çekildi ve dijital ortama kaydedildi. Seminifer tubül çapı ve germinal epitel kalınlığı Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak ölçüldü ve gerekli hesaplamalar yapıldı. Seminifer tubül çapı, germinal epitel kalınlığı ve lümenine immatür germinal hücre dökülen seminifer tubül sayısının hesaplanmasında, enine kesilmiş en az 100 tubül değerlendirildi. Lümenine immatür germinal hücre dökülen seminifer tubül sayısı hesaplanırken, seminifer tubül lümeninde en az bir germinal hücrenin bulunduğu seminifer tubül (+) olarak belirlendi.

5.2.7. Johnsen Skorlama

Fotoğrafları çekilen seminifer tubüllerde hasar değerlendirmesi yapıldı. Bunun için Johnsen skorlama yöntemi (91, 92) uygulandı. Johnsen skorlama yöntemi şu şekildedir:

- 10: Germinal epitel çok sıralı, çok sayıda spermatozoa var
- 9: Germinal epitel 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 hücreleri olarak sadece spermatogonia var
- 2: Germ hücreleri yok, sadece Sertoli hücreleri var
- 1: Seminifer tubül içinde hiç hücre yok

5.3. İmmünohistokimyasal İşlemler

Apoptozu belirlemek için testis dokusunda TUNEL metodu uygulandı. Uygulamada çekirdekleri kahverengi ile boyanan hücreler apoptoza uğrayan hücrelerdir ve TUNEL (+) olarak adlandırılırlar; mor renkte boyananlar ise nonapoptotik hücrelerdir ve TUNEL (-) olarak adlandırılırlar. Her sıçan testis dokusunda X40'lık büyütmede 10 tubül incelenerek TUNEL (+) ve TUNEL (-) hücreler sayıldı ve apoptotik indeks (AI) belirlendi. Apoptotik indeks (AI) = TUNEL (+) hücre sayısı / toplam hücre sayısı X 100 şeklinde hesaplandı (93). İmmünohistokimyasal işlemlerin ölçümü KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Stereoloji laboratuvarındaki Olympus DP 71 (Olympus, Tokyo, Japan) kameralı ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Tokyo, Japan) incelenerek Analysis 5 Research programı (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany) ile yapıldı.

5.3.1. TUNEL Boyama

TUNEL [Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling] tekniği için In situ cell death detection kit, POD (Roche,

Mannheim, Germany) kiti kullanıldı. Boyama için testis dokusuna aşağıdaki işlemler sırayla uygulandı.

- 1) Oda ısısında ksilende inkübasyon, 3X5 dakika
- 2) %100 etanol, 2X5 dakika
- 3) %95 etanol, 2X5 dakika
- 4) %70 etanol, 2X5 dakika
- 5) Distile su ile yıkama
- 6) Oda ısısında 20 µg/mL proteinase K, 15 dakika
- 7) PBS (phosphate buffer solution)'de yıkama
- 8) %3 H₂O₂, 15 dakika
- 9) Distile su ile yıkama
- 10) PBS'de yıkama, 2X5 dakika
- 11) Oda ısısında Large Volume Ultra V block, 10 dakika
- 12) Insitu cell death detection kit enzim (TdT) ve label (dUTP) solüsyonlarının karışımından 50 µl ile her bir doku kaplandı. 37°C'lik etüvde nemli ortamda tutuldu, 1.5 saat
- 13) PBS'de yıkama
- 14) 100 µl converter peroksidaz dokuyu kapatacak şekilde damlatıldı ve 37°'lik etüvde inkübe edildi
- 15) PBS'de yıkama, 3x5 dakika
- 16) 100 µl DAP ile karanlıkta oda ısısında bekleme, 5 dakika
- 17) Distile suda yıkama, 1x2 kez
- 18) Hematoksilen ile boyama, 15 saniye
- 19) Çeşme suyuyla yıkama
- 20) %70 etanol, 2x5 dakika
- 21) %95 etanol, 2x5 dakika
- 22) %100 etanol, 2x5 dakika
- 23) Ksilen, 2x5 dakika
- 24) Kurutulup kapatıldı.

5.4. Biyokimyasal İncelemeler

5.4.1. Serum MDA Seviyesi

Serum MDA ölçümü Yagi (94) yöntemiyle yapıldı. Lipid peroksidasyon ürünü MDA ile tiyobarbitürik asit arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. TBA ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için serum lipidleri proteinle birlikte fosfotungustik asit/sülfürik asit sistemiyle çöktürüldü.

Kullanılan Çözeltiler

0.042 M Sülfürik Asit: 570 μL % 98'lik H_2SO_4 bir miktar su içeren balon jojeye pipetlenip hacim 250 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk Fosfotungustik Asit: 0.5 g $\text{H}_3(\text{W}_3\text{O}_{10})_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4.5 mL deiyonize suda çözüldü.

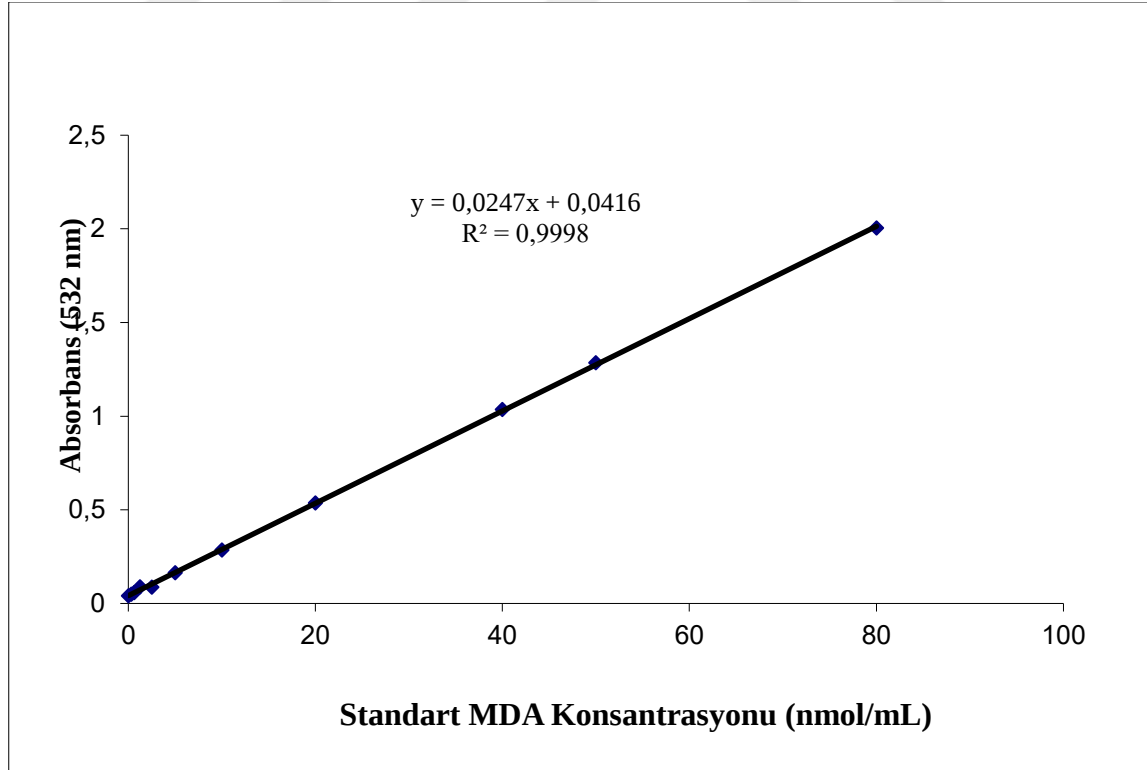
% 0.67'lik Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisi: 0.67 g TBA % 50'lik 100 mL asetik asit çözeltisinde ısıtılarak çözüldü (günlük hazırlandı).

Standart Çözeltiler: 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 50, 80 nmol [(1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP)) /mL: 164.7 μL TMP 0.01 M HCl ile 100 mL'ye tamamlandı ve 50 $^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat inkübe edildi. Bu 10 mM'luk stok çözeltiden 10 μL alınıp 10 mL'ye deiyonize suyla tamamlanarak hazırlanan 10 μM 'lık standarttan seri dilüsyonlar yaparak standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 3. Serum MDA seviyesi ölçümü

Reaktifler	Numune (mL)
Serum	0.3
H ₂ SO ₄	2.4
Fosfotungustik asit	0.3
Hafifçe vortekslenerek 5 dakika beklendi. 4000 rpm 'de 10 dakika santrifüjlendi.	
Üst faz atıldı.	
Deiyonize su	4.0
Çökelek vortekslenerek çözüldü.	
TBA çözeltisi	1.0
1 saat kaynar su banyosunda tutuldu ve soğutuldu.	
n-bütanol	3.0

Tablo 3’de ifade edildiği gibi pipetlemeler ve işlemler yapıldı. Sonuçlar MDA için hazırlanan Şekil 7’deki standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 7. Serumda standart MDA Grafiği

5.4.2. Doku MDA Ölçümü

MDA ölçümü Mihara ve Uchiyama yöntemi (95) modifiye edilerek yapıldı. Bu metodun esası, MDA' nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu molekülün renginin 532 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler

Doku Homojenizasyon Çözeltisi: 1.15 g KCl hassas terazide tartıldı 1 L saf suda çözüldü. Oluşan çözelti % 0.05 Triton X-100 içerebilmesi için 500 µL Triton X-100 eklendi.

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

Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisi: 0.67 g TBA tartıldı, 50 mL saf su ve 50 mL asetik asit ilave edilerek magnetik bar yardımıyla karıştırılıp çözüldü.

Standart Çözeltiler: 200, 100, 80, 50, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 ve 0 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Yaklaşık 20-30 mg doku 1 mL soğuk homojenizasyon çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar 3 000 rpm'de 10 dk santrifüjlendikten sonra süpernatant alındı.

Tablo 4. MDA ölçümü için reaksiyon karışımı ve yapılan uygulamalar

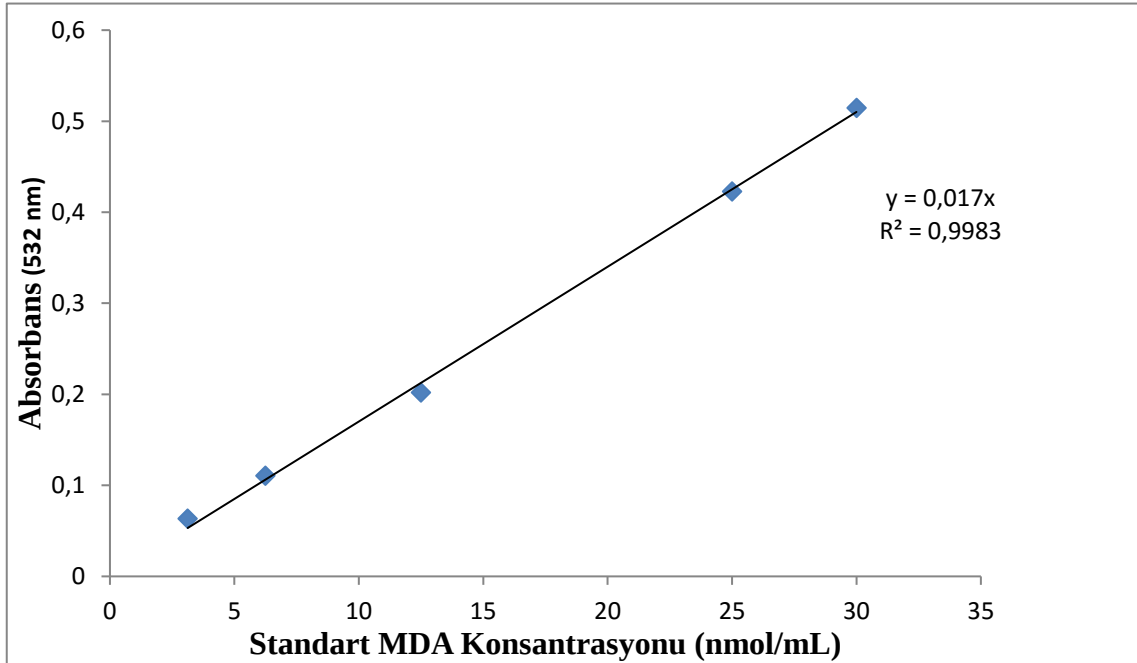
Çözelti	Hacim (mL)
Numune (Kör, Standart, Süpernatant)	0.5
%1 H ₃ PO ₄ Çözeltisi	3.0
TBA Çözeltisi	1
Vortekslendi.	

100 °C'de 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Soğutuldu.

4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

532 nm'de absorbansı ölçüldü.

MDA ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 4'e göre pipetlendi. Numune sonuçları standart grafiği kullanılarak hesap edildi ve MDA sonuçları nmol/mg protein olarak verildi. MDA standart grafiği Şekil 8'da gösterilmiştir.



Şekil 8. Dokuda standart MDA Grafiği

5.4.3. CAT Aktivitesi

Serum ve doku örneklerindeki CAT aktivitesi ölçümü, temel prensibi amonyum molibdatın hidrojen peroksitle oluşturduğu sarı renkli kompleksin 405 nm'de absorbansının ölçülmesi esasına dayanan Goth metoduna göre yapıldı (96).

Kullanılan Çözeltiler

Homojenizasyon Tamponu:

60 mM Sodyum Potasyum Fosfat Tamponu (pH 7.0): 5.37 g KH_2PO_4 ve 3.65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yaklaşık 750 mL saf suda çözülde, pH 7.0'a ayarlandı ve hacmi 1 L'ye tamamlandı.

32.4 mM Amonyum Molibdat Çözeltisi: 1.89 g amonyum molibdat 50 mL saf suda çözülde.

65 mM H₂O₂ Çözeltisi: 280 µL % 35'lik H₂O₂ 50 mL fosfat tamponunda çözüldü. H₂O₂ çözeltisi taze hazırlandı.

Yaklaşık 50-60 mg doku buz aküsü üzerinde kesilip tartıldı. Buz banyosunda bekleyen 2 mL soğuk homojenizasyon tamponuna (500 µL/L triton x 100, 50 mM Tris –HCl içeren pH: 7.4) konuldu. Dokular soğuk ortamda 10 saniye (sn) süre ile homojenizatörle homojenize edildi. Homojenat 4 °C'de, 3 000 rpm'de, 10 dakika (dk) santrifüj edildi. Süpernatant elde edilen süpernatant SOD ve CAT ölçümünde kullanıldı.

Tablo 5. CAT aktivitesi ölçümü ve yapılan işlemler

Çözeltiler	Numune	Kör 1	Kör 2
Numune (serum, süpernatant)	20 µL		
Tampon		20 µL	120 µL
H ₂ O ₂ 'li tampon	100 µL	100 µL	
37 °C'de 1 dakika bekletildi.			
Amonyum Molibdat Çözeltisi	100 µL	100 µL	100 µL
405 nm'de absorbansları okundu.			

Tablo 5'de ifade edilen işlemler yapıldı. Ölçülen absorbans değerleri aşağıdaki denklemde yerine konularak katalaz aktivitesi hesaplandı.

$$Katalaz\ aktivitesi \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{(A\ kör1 - A\ numune)}{(A\ kör1 - A\ kör\ 2)} \times 271$$

5.4.4. SOD Aktivitesi

Serum ve doku örneklerindeki SOD aktivitesi ölçümü, Sun ve Oberley (97) metoduna göre yapıldı. Bu metod, ksantin-ksantin oksidaz sisteminin oluşturduğu süperoksit radikallerinin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgeyerek oluşturduğu mavi-mor rengin 560 nm'de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır SOD'un ortamdaki süperoksit radikallerini uzaklaştırması sonucu optik dansitede meydana gelen azalmadan yararlanılarak SOD tarafından katalizlenen

reaksiyonun % inhibisyonu hesaplandı. % 50 inhibisyona karşı gelen SOD miktarı bir enzim ünitesi olarak alındı.

Kullanılan Çözeltiler

Etanol: Kloroform Karışımı (5:3): 50 mL etanol 30 mL kloroformla karıştırıldı.

0.3 mmol/L Ksantin Çözeltisi: 3.65 mg ksantin 80 mL deiyonize suda çözöldü.

0.6 mmol/L EDTA Çözeltisi: 8.93 mg EDTA 40 mL deiyonize suda çözöldü.

150 µL NBT Çözeltisi: 4.9 mg NBT 40 mL deiyonize suda çözöldü. NBT günlük taze hazırlandı.

400 mM Na₂CO₃ Çözeltisi: 1.01 g Na₂CO₃ 24 mL deiyonize suda çözöldü.

1 g/L BSA: 12 mL deiyonize suda 12 mg BSA çözöldü.

167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 3.3 U/mL'lik orijinal şişeden 101 µL alınıp 2 mL'ye amonyum sülfatla tamamlandı. Ksantin oksidaz günlük hazırlandı.

0.8 mmol/L CuCl₂ Çözeltisi: 5.37 g CuCl₂ 50 mL deiyonize suda çözöldü. Günlük taze hazırlandı.

2 mol/L Amonyum Sülfat: 2.64 g amonyum sülfat 10 mL deiyonize suda çözöldü.

SOD Standartları: 10, 8, 4, 3, 2, 1, 0.5 U/mL'lik SOD standartları ve kör hazırlandı.

Reaksiyon karışımı: 80 tüp için; 80 mL 0,3 mM ksantin çözeltisi, 40 mL 0,6 mM EDTA çözeltisi, 40 mL 150 µM NBT çözeltisi, 24 mL 400 mM Na₂CO₃ çözeltisi, 12 mL 1g/L BSA karıştırıldı. Reaksiyon karışımı hazırlanırken hacimler hesaplanıp bütün maddeler aynı kapta karıştırıldı. Yukarıda ifade edilen konsantrasyon ifadeleri son konsantrasyonlardır. Ksantinin kolay çözünmesi için bunların aynı ortamda olması gerekir.

250 µL seruma 250 µL etanol:kloroform (5:3) karışımı eklenip vortekslendi. 18000 x g'de 4 °C'de bir saat santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant SOD aktivitesi ölçümünde kullanıldı.

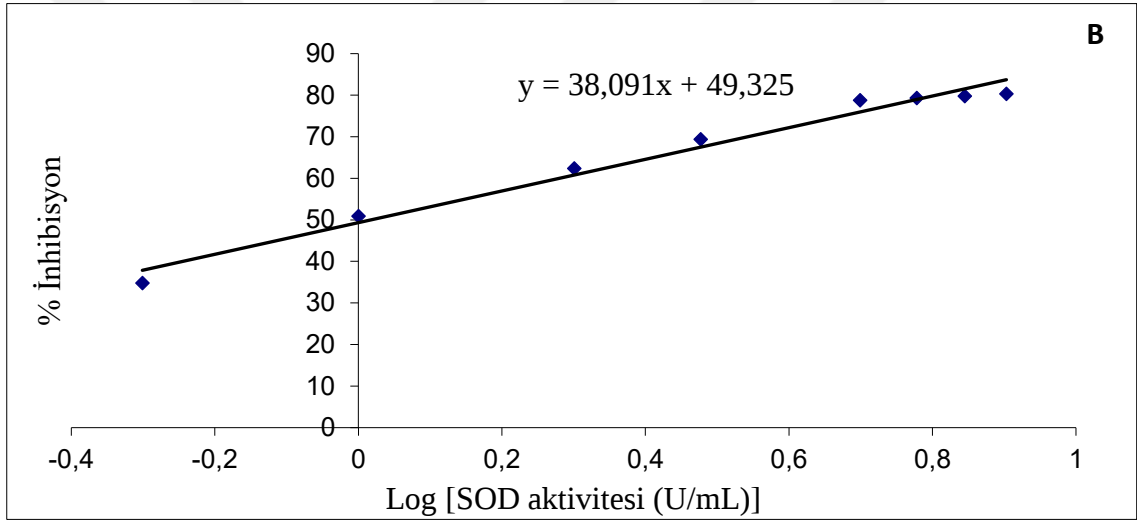
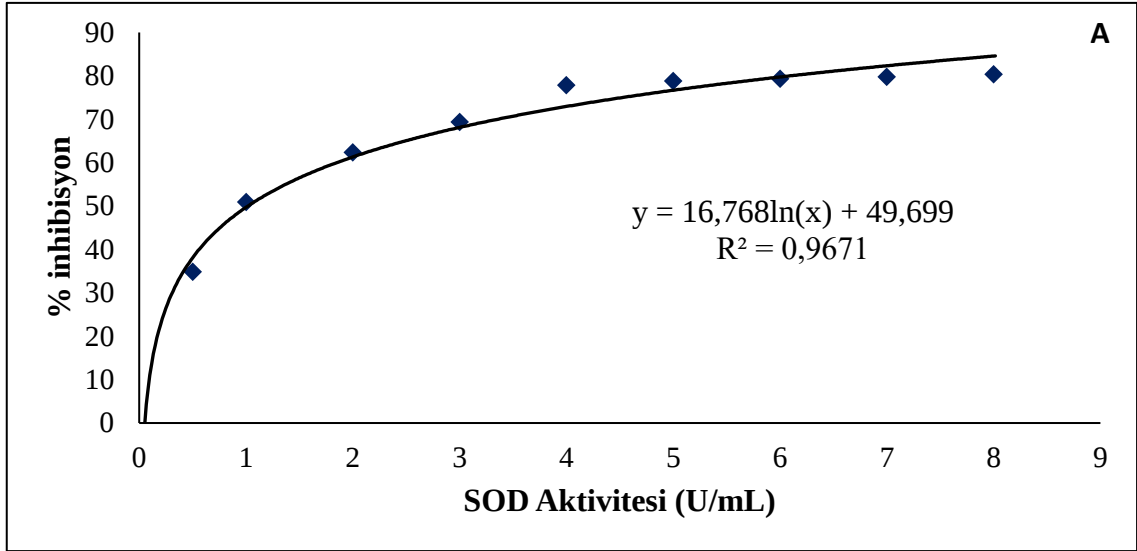
Doku örnekleri ise CAT ölçümünde ifade edildiği gibi yaklaşık 50-60 mg doku olacak şekilde buz aküsü üzerinde kesilip tartıldı. Buz banyosunda bekleyen 2 mL soğuk homojenizasyon tamponuna konulup homojenize edildi. Homojenat 4 °C’de, 3.000 rpm’de, 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanın 800 µL’sine 400 µL etanol:kloroform (5:3) karışımı eklenip vortekslendi. 18 000 x g’de 4 °C’de bir saat santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant SOD aktivitesi ölçümünde kullanıldı.

Tablo 6. SOD aktivitesi ölçümü

Çözeltiler	Hacim (mL)
Reaksiyon karışımı	1.225
Numune (Serum, Süpernatant, Kör, Standart)	0.25
Ksantin oksidaz	0.025
25 °C’da 20 dakika inkübasyona bırakıldı (karanlıkta).	
Bakır klorür	0.5
560 nm’de absorbanst ölçüldü.	

Tablo 6’de ifade edildiği gibi pipetlemeler ve işlemler yapıldı ve 560 nm de absorbanstlar ölçüldü. Hesaplamalar % inhibisyon olarak hesaplandı. Şekil 9A’daki standart grafiği SOD aktivitesinin logaritması alınarak Şekil 9B’deki lineer standart grafiğine dönüştürüldü. Bu grafikten yararlanılarak % inhibisyonlar SOD aktivitesine dönüştürüldü.

$$\% inhibisyon = \frac{(A \text{ kör} - A \text{ numune})}{A \text{ kör}} \times 100$$



Şekil 9. Numunelerin SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan logaritmik ve lineer olarak değiştirilmiş standart grafikler (A, B)

5.4.5. Protein Tayini

Protein tayinleri Novagen firmasına ait BCA Protein Assay Kiti ile yapıldı. BCA Protein Tayini biüret reaksiyonu dayanmaktadır. Alkali ortamda proteinlerle Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmektedir ve oluşan Cu^{+1} BCA (bisinkoninik asit) ile şelat oluşturmaktadır. Oluşan mor renkli kompleks 562 nm'de maksimum absorbens vermektedir.

Kullanılan çözeltiler

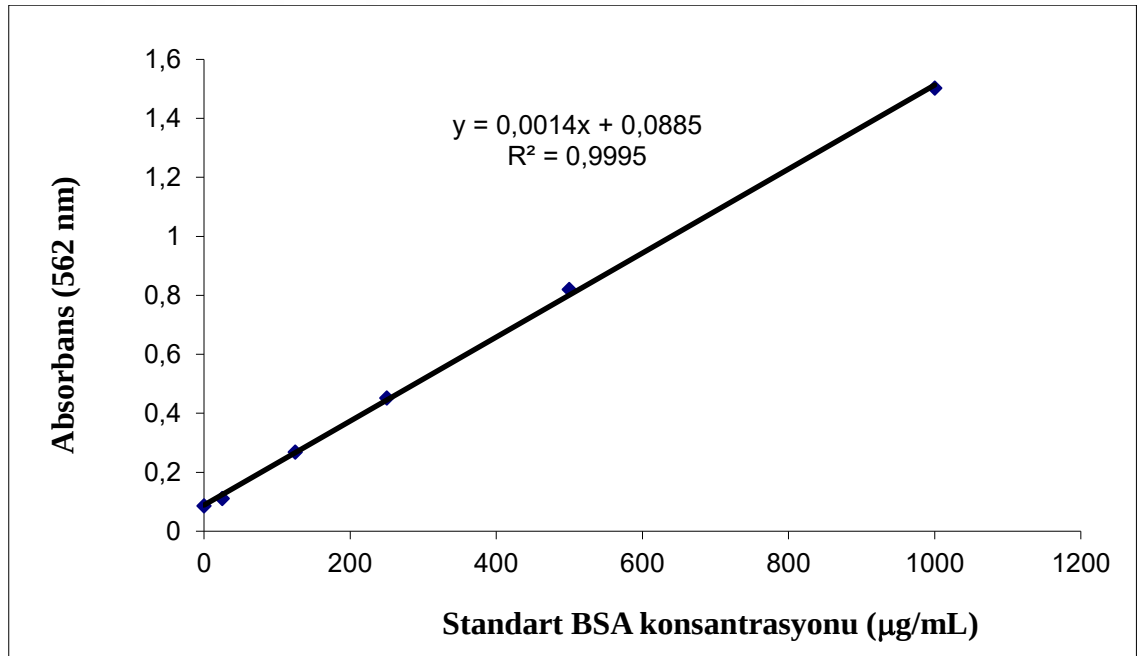
Standart BSA çözeltisi: 1000, 500, 250, 125, 25 ve 0 µg/mL’lik BSA çözeltileri saf su ile hazırlandı.

Reaksiyon karışımı: BCA çözeltisi ve % 4’lük Bakır sülfat çözeltisi 1:50 oranında karıştırılarak hazırlandı.

Tablo 7. Protein tayini

Çözelti	Hacim (µL)
Numune (serum, süpernatant, standart)	25
Reaksiyon karışımı	200
37 °C’de 30 dakika inkübe edildi ve 562 nm’de absorbansı ölçüldü.	

Tablo 7’deki pipetlemeler ve işlemler yapıldı. Şekil 10’daki standart grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar hesaplandı.



Şekil 10. Standart BSA protein tayin grafiği

5.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Her bir gruba ait değerler aritmetik ortalama ve standart sapma ($\bar{X} \pm SD$) olarak ifade edildi. Denek sayısı her bir grupta ($n=6$) az olduğu için non-parametrik testler uygulandı. Bağımsız grupların değerlendirilmesinde Kruskal Wallis testi kullanıldı. Grup içindeki posthoc değerlendirmeler için Mann-Whitney U testi uygulandı. $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



6. BULGULAR

6.1. Vücut ve Testis Ağırlıklarına Ait Bulgular

Deney gruplarına ait sıçanların ilk ağırlıkları, son ağırlıkları ve testis ağırlıkları ölçülerek istatistik değerlendirmesi yapılmış, ortalama ve standart sapma değerleri tablo 8’de verilmiştir.

Buna göre deney öncesi vücut ağırlıklarına, deney sonrası vücut ağırlıklarına ve testis ağırlıklarına Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Deney öncesi vücut ağırlıklarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Deney sonrası vücut ağırlıklarında ve testis ağırlıklarında anlamlı ölçüde farklılıklar bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 8. Deney Gruplarının Deney Öncesi Vücut Ağırlıkları, Deney Sonrası Vücut Ağırlıkları ve Testis Ağırlıklarına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar

Gruplar	Deney Öncesi Vücut Ağırlığı (g)	Deney Sonrası Vücut Ağırlığı (g)	Testis Ağırlığı (g)
Kontrol	273±12.29	280±12.01	1.86±0.10
MTX	272.67±11.70	233.17±10.81 ^a	1.26±0.08 ^a
MTX+LA	272.50±12.35	236.50±13.42 ^a	1.31±0.13 ^a
LA	273.33±8.14	277.83±8.15 ^{b,c}	1.56±0.15 ^{a,b,c}

^a Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

^b MTX grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

^c MTX+LA grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

Deney sonrası vücut ağırlıklarında kontrol grubuna göre MTX, MTX+LA ve LA gruplarında azalma gözlenmiştir. Bu azalma MTX ve MTX+LA gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, LA grubunda anlamlılık görülmemiştir (sırasıyla; $p<0.05$, $p<0.05$, $p>0.05$). MTX grubuna göre deney sonrası vücut ağırlığı, MTX+LA ve LA gruplarında artmıştır. Bu artış MTX+LA grubunda istatistiksel olarak anlamlı değilken LA grubunda anlamlı görülmüştür (sırasıyla $p>0.05$, $p<0.05$). MTX+LA grubuna göre deney sonrası vücut ağırlığı LA grubunda anlamlı olarak artma görülmüştür ($p<0.05$).

Testis ağırlıkları kontrol grubuna göre MTX, MTX+LA ve LA gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.05$). MTX grubuna göre MTX+LA ve

LA gruplarında testis ağırlığı artmıştır. Bu artış MTX+LA grubunda anlamlı değilken LA grubunda anlamlı bulunmuştur (sırasıyla: $p>0.05$, $p<0.05$). MTX+LA grubuna göre LA grubunda anlamlı olarak artış görülmüştür ($p<0.05$).

6.2. Morfometrik Bulgular

6.2.1. Seminifer Tubül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığına Ait Bulgular

Deney gruplarına ait testis dokusunda seminifer tubül çapı, epitel kalınlığı ve lümenine immatür hücre dökülen seminifer tubül sayısı ölçüm sonuçları tablo 9'da verilmiştir. Verilerin istatistik değerlendirmelerine göre, sonuçlar aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

Seminifer tubül çapında kontrol grubuna göre MTX ve MTX+LA gruplarında azalma görüldü. Bu azalma kontrol grubuna göre MTX grubunda anlamlı bulunurken MTX+LA grubunda anlamlı bulunmadı (sırasıyla; $p<0.05$, $p>0.05$). Seminifer tubül çapında kontrol grubuna göre LA grubunda anlamlı olmayan bir artma görüldü ($p>0.05$). MTX grubuna göre seminifer tubül çapı MTX+LA ve LA gruplarında anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.05$). MTX+LA grubuna göre seminifer tubül çapı LA grubunda anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$).

Epitel kalınlığında kontrol grubuna göre MTX, MTX+LA ve LA gruplarında anlamlı bir şekilde azalma görüldü ($p<0.05$). MTX grubuna göre epitel kalınlığı MTX+LA ve LA gruplarında anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$). MTX+LA grubuna göre epitel kalınlığı LA grubunda anlamlı bir artma belirlendi ($p<0.05$).

Lümenine immatür hücre dökülen seminifer tubül sayısı kontrol grubuna göre MTX grubunda artma, LA grubunda azalma, MTX+LA grubunda hemen hemen eşit bulundu. Kontrol grubuna göre MTX ve MTX+LA gruplarındaki bu değişimler anlamlı bulunmazken LA grubundaki azalma anlamlı olarak belirlendi (sırasıyla $p>0.05$, $p>0.05$, $p<0.05$). MTX grubuna göre lümenine immatür hücre dökülen seminifer tubül sayısı MTX+LA ve LA gruplarında azalma görüldü. MTX grubuna göre olan bu azalma MTX+LA grubunda anlamlı değilken LA grubunda anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p>0.05$, $p<0.05$). MTX+LA grubuna göre LA grubunda lümenine immatür hücre dökülen seminifer tubül sayısı anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$).

Tablo 9. Seminifer tubül çapı, epitel kalınlığı ve lümenine immatür hücre dökülen seminifer tubül sayısına ait bulgular (X±SD)

Gruplar	Seminifer Tubül Çapı (µm)	Epitel Kalınlığı (µm)	Lümenine İmmatür Hücre Dökülen Seminifer Tubül Sayısı (%)
Kontrol	248.17±19.85	82.68±7.71	30.5±6.09
MTX	222.93±7.82 ^a	50.42±3.16 ^a	35.66±7.42
MTX+LA	238.57±10.86 ^b	68.20±3.58 ^{a,b}	30.33±4.88
LA	259.01±4.91 ^{b,c}	75.60±5.04 ^{a,b,c}	17.33±4.36 ^{a,b,c}

^a Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır (p<0.05).

^b MTX grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır (p<0.05).

^c MTX+LA grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır (p<0.05).

6.2.2. Johnsen Skorlama Sonuçları

Deney gruplarına ait testis dokusunda hasar değerlendirmesi için Johnsen skorlaması yapılarak istatistik değerlendirmesi yapılmıştır. İstatistik değerlendirmelerine ait ortalama ve standart sapma değerleri tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. Testis dokusunda seminifer tubüllerde Johnsen skoru ve apoptotik indeks değerleri

Gruplar	Johnsen Skoru	Apoptotik İndeks (AI)
Kontrol	9.60±0.08	2.76±1.31
MTX	4.15±0.53 ^a	19.41±2.48 ^a
MTX+LA	7.86±0.57 ^{a,b}	3.86±1.18 ^b
LA	9.15±0.32 ^{a,b,c}	2.92±0.89 ^b

^a Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır (p<0.05).

^b MTX grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır (p<0.05).

^c MTX+LA grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır (p<0.05).

Johnsen skoru kontrol grubuna göre MTX, MTX+LA ve LA gruplarında anlamlı olarak azalmıştır (p<0.05). MTX grubuna göre Johnsen skoru MTX+LA ve LA gruplarında anlamlı olarak artmıştır (p<0.05). MTX+LA grubuna göre LA grubunda Johnsen skoru anlamlı olarak artmıştır (p<0.05).

6.3. Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubunda seminifer tubüllerde tubül çapı, epitel kalınlığı, Sertoli hücreleri ve miyoid hücreler normal yapıda izlendi. Spermatogoniumlar, spermatositler ve spermatidler düzgün sıralı gözlendi. İnterstisyel alanda Leydig hücrelerinin normal görünümü olarak yapısını koruduğu görüldü (Resim 8).



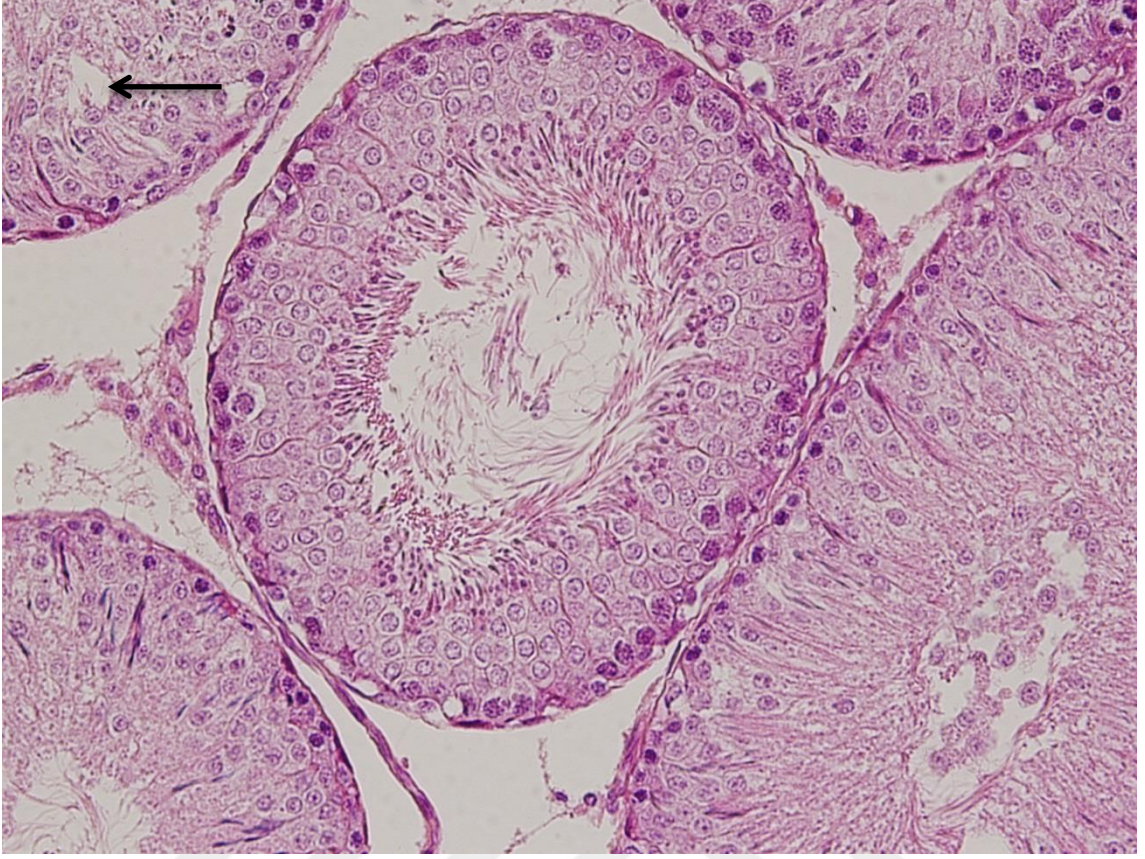
Resim 8. Kontrol grubuna ait testis dokusu (H&E X400)

MTX grubunda seminifer tubül epitelinde açılmalar görüldü. Spermatogoniyumlarda atrofi gözlenirken spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar düzgün yapıda gözlendi. Seminifer tubül lümenine dökülen immatür hücre sayısında bir miktar artış tespit edildi. İnterstisiyal alanda hemoraji ve Leydig hücrelerinde atrofi belirlendi (Resim 9).



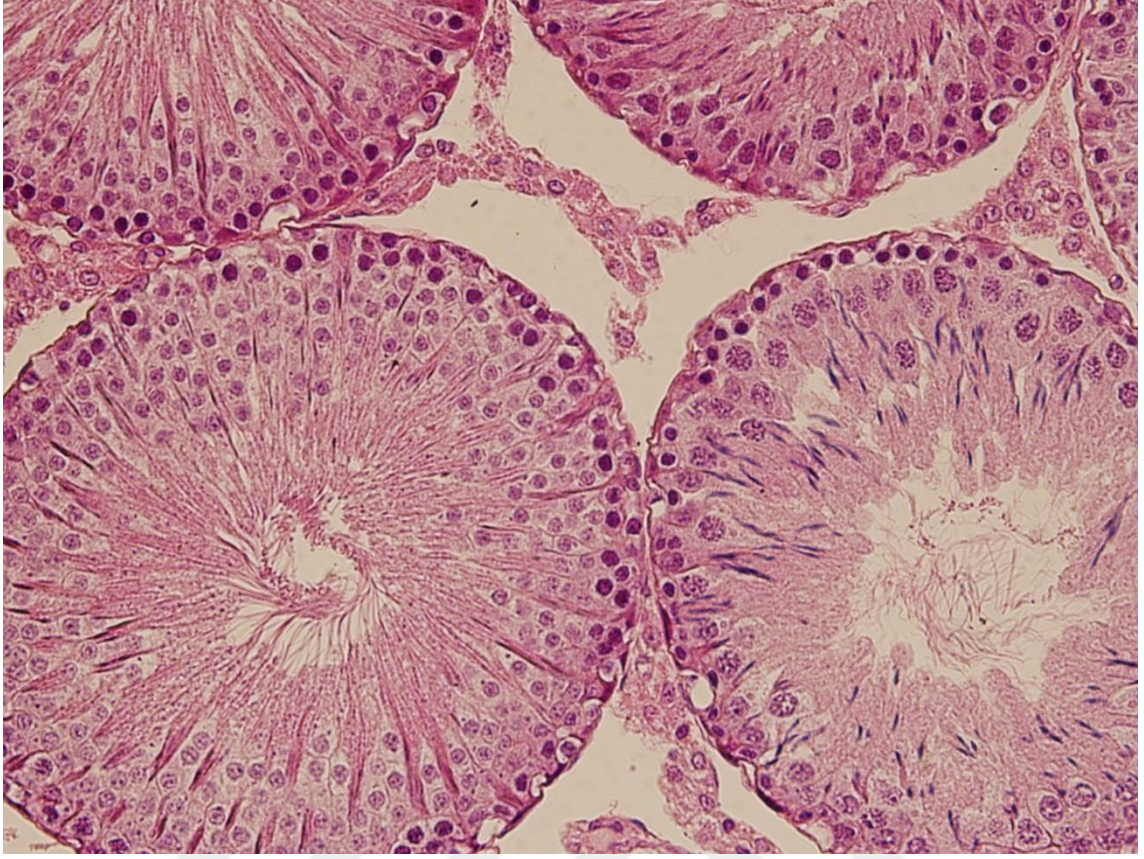
Resim 9. MTX grubuna ait testis dokusu (H&E X400). Yıldız işareti seminifer epitelde açılmayı, kalın ok işareti seminifer tubül lümenine dökülen immatür hücre sayısını, ince ok işareti atrofik hücreyi göstermektedir.

MTX+LA grubunda spermatogoniyumlar normal yapıda gözlendi. Epiteliyal hücreler arasında yer yer az sayıda açılmalar görüldü. Seminifer tubül lümenine dökülen immatür hücrelerde, MTX grubuna göre, azalma belirlendi. İnterstisyel alanda hemoraji bulgularına rastlanmadı (Resim 10).



Resim 10. MTX+LA grubunda testis dokusu (H&E X400). Tek yönlü ok seminifer tubül epitelinde açılmayı göstermektedir.

LA grubunda seminifer tubül ve interstisyel alan düzgün yapıda gözlendi. Seminifer epitelde açılma ve Leydig hücreleri ile spermatogonyumlarda atrofi, MTX grubuna göre, azalmıştır (Resim 11).



Resim 11. LA grubuna ait testis dokusu (H&E X400). Testis normal yapıda izlendi.

6.4. Semen Analizine Ait Bulgular

Deney gruplarına ait epididimal semen analizinde sperm sayısı, sperm motilitesi, sperm vitalitesi, epididimiste seminal sıvıya dökülen immatür hücre sayısı ve istatistiksel değerlendirme sonuçları tablo 11’de verilmiştir.

Sperm sayısı kontrol grubuna göre MTX, MTX+LA ve LA gruplarında azalmıştır. Kontrol grubuna göre bu azalma MTX+LA grubunda anlamlı bulunurken MTX ve LA gruplarında anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla $p<0.05$, $p>0.05$, $p>0.05$). MTX grubuna göre MTX+LA grubunda sperm sayısında anlamlı azalma görüldürken, LA grubunda ise sperm sayısının aynı olduğu belirlendi (sırasıyla $p<0.05$, $p>0.05$). MTX+LA grubuna göre LA grubu sperm sayısında anlamlı olarak artma görüldü ($p<0.05$).

Tablo 11. Semen analizine ait ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	Sperm Sayısı ($\times 10^6$)	Sperm Motilitesi (%)	Sperm Vitalitesi (%)	Epididimal Sıvıya Dökülen Epitel Hücre Sayısı
Kontrol	35.2 $\pm$ 6.72	56.80 $\pm$ 5.08	57.66 $\pm$ 2.33	99.16 $\pm$ 16.55
MTX	34.33 $\pm$ 5.85	45.46 $\pm$ 6.27 ^a	46 $\pm$ 6.69 ^a	98 $\pm$ 42.88
MTX+LA	20 $\pm$ 5.33 ^{a,b}	48.02 $\pm$ 2.15 ^a	43 $\pm$ 10.17 ^a	70.66 $\pm$ 19.01 ^a
LA	34.33 $\pm$ 8.89 ^c	60.46 $\pm$ 5.67 ^{b,c}	54.66 $\pm$ 2.73 ^{b,c}	118.16 $\pm$ 19.21 ^c

^a Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p < 0.05$).

^b MTX grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p < 0.05$).

^c MTX+LA grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p < 0.05$).

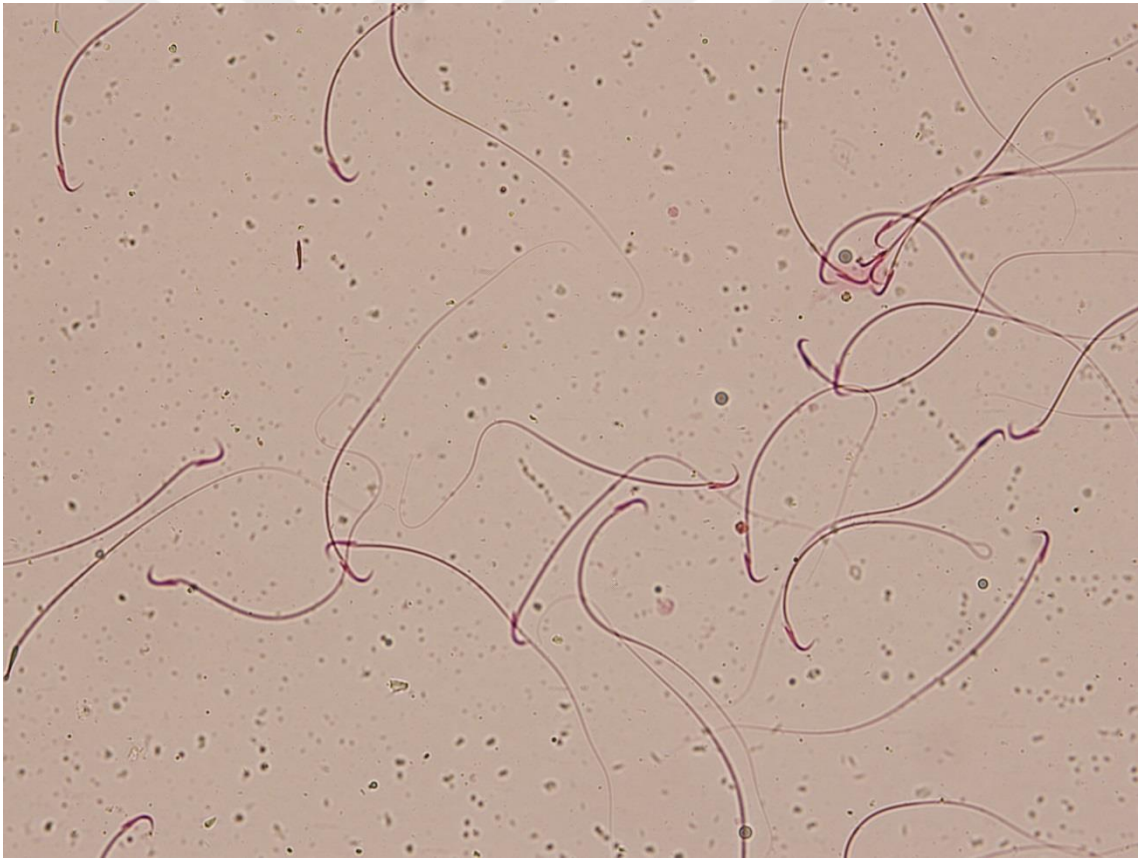


Resim 12. Kontrol grubunun seminal sıvısı (Eosin-Y, X200)

Sperm motilitesinde kontrol grubuna göre MTX ve MTX+LA gruplarında anlamlı azalma, LA grubunda ise anlamlı olmayan bir artma görüldü (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p > 0.05$). MTX+LA ve LA gruplarında, MTX grubuna göre, sperm motilitesinde

artma görüldü. MTX grubuna göre olan bu artış MTX+LA grubunda anlamlı değilken LA grubunda anlamlı olarak belirlendi (sırasıyla $p>0.05$, $p<0.05$). MTX+LA grubuna göre LA grubunda sperm motilitesi anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$).

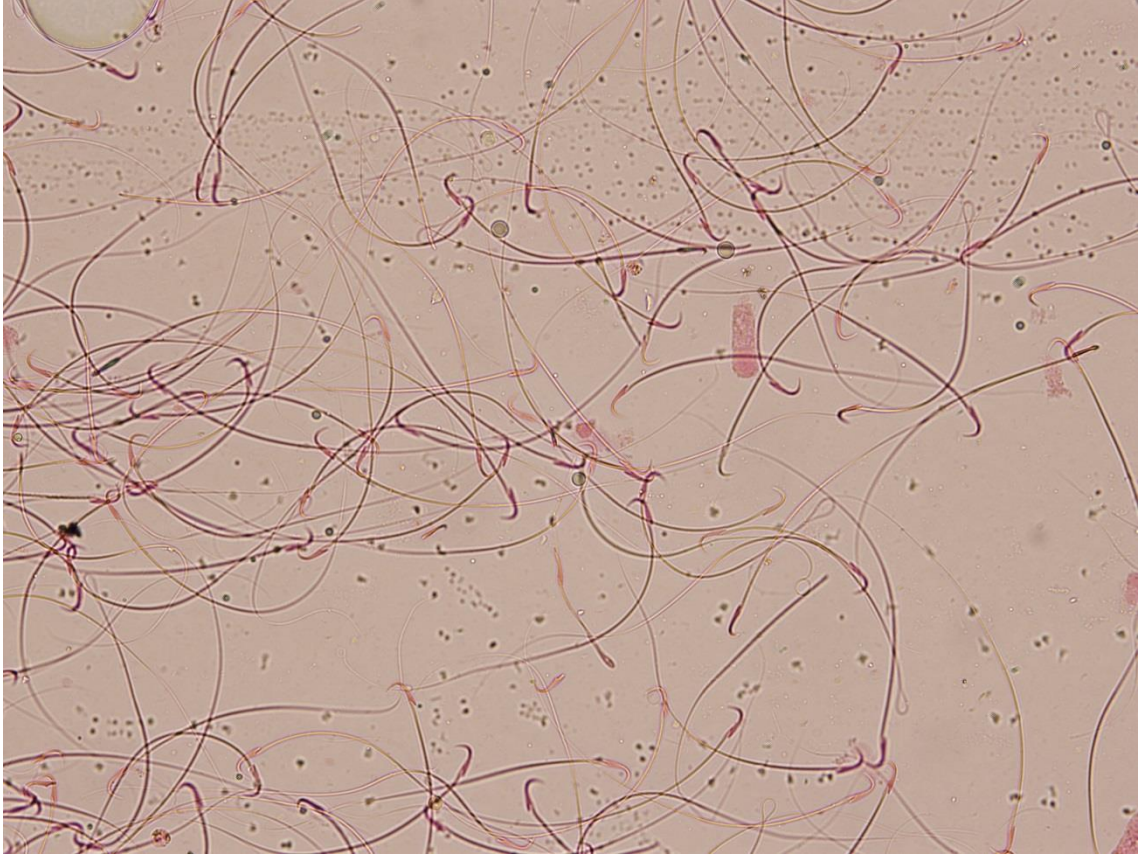
Sperm vitalitesi kontrol grubuna göre MTX, MTX+LA ve LA gruplarında azalmıştır. Kontrol grubuna göre olan bu azalma MTX ve MTX+LA gruplarında anlamlı bulunurken, LA grubunda anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$, $p>0.05$). Sperm vitalitesinde MTX grubuna göre MTX+LA grubunda anlamlı olmayan bir azalma, LA grubunda ise anlamlı olan bir artma belirlendi (sırasıyla $p>0.05$, $p<0.05$). MTX+LA grubuna göre LA grubunda sperm vitalitesi anlamlı olarak artış gösterdi ($p<0.05$) (Resim 12-15).



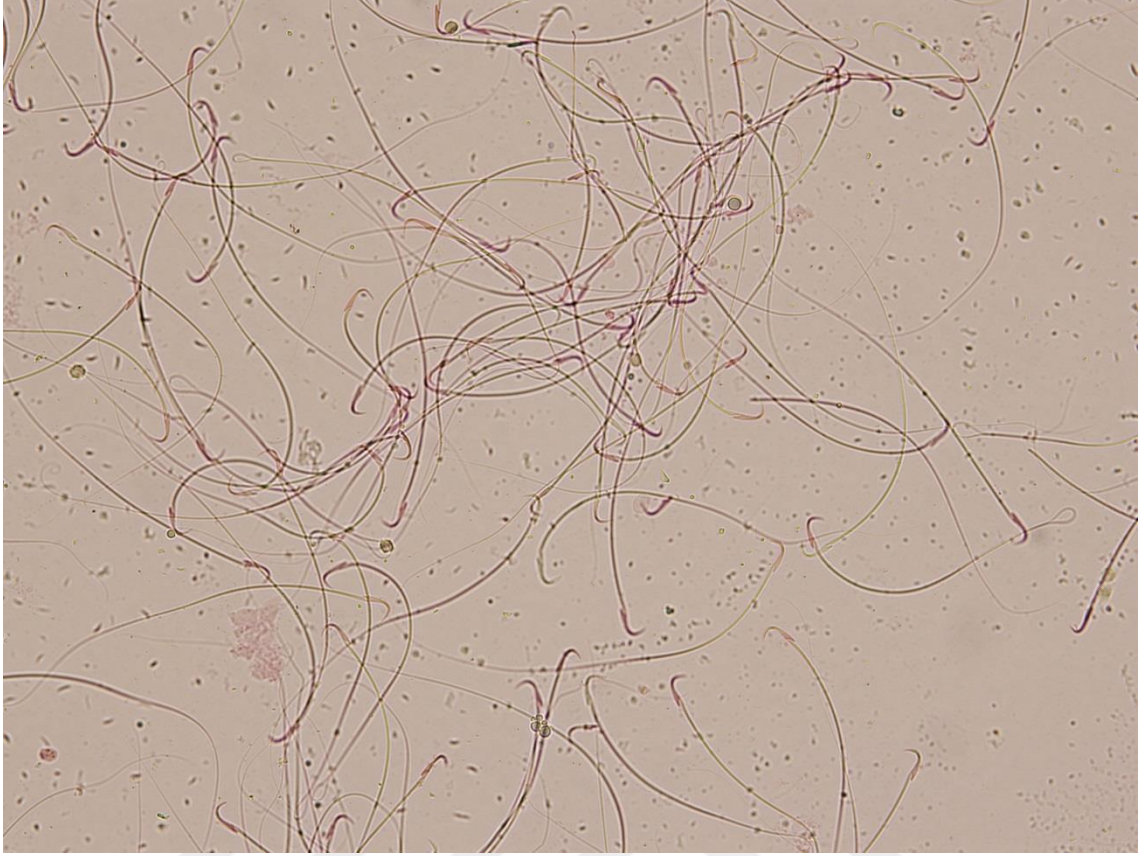
Resim 13. MTX grubunda spermatozoon görüntüleri (Eozin-Y, X200)

Epididimiste seminal sıvıya dökülen epitel hücre sayısında kontrol grubuna göre MTX ve MTX+LA gruplarında azalma belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre olan bu

azalma MTX grubuna göre anlamlı değilken, MTX+LA grubunda anlamlı bulundu (sırasıyla $p>0.05$, $p<0.05$). Kontrol grubuna göre LA grubunda, epididimis seminal sıvısına dökülen epitel hücre sayısı artış göstermiş, ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Epididimis seminal sıvısına dökülen epitel hücre sayısında MTX grubuna göre MTX+LA grubunda azalma, LA grubunda artma belirlendi. MTX grubuna göre olan bu değişimler anlamlı değildi ($p>0.05$). Epididimis seminal sıvısına dökülen epitel hücre sayısı MTX+LA grubuna göre LA grubunda anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0.05$) (Resim 12-15).



Resim 14. MTX+LA grubunda spermatozoon görüntüleri (Eozin-Y, X200)

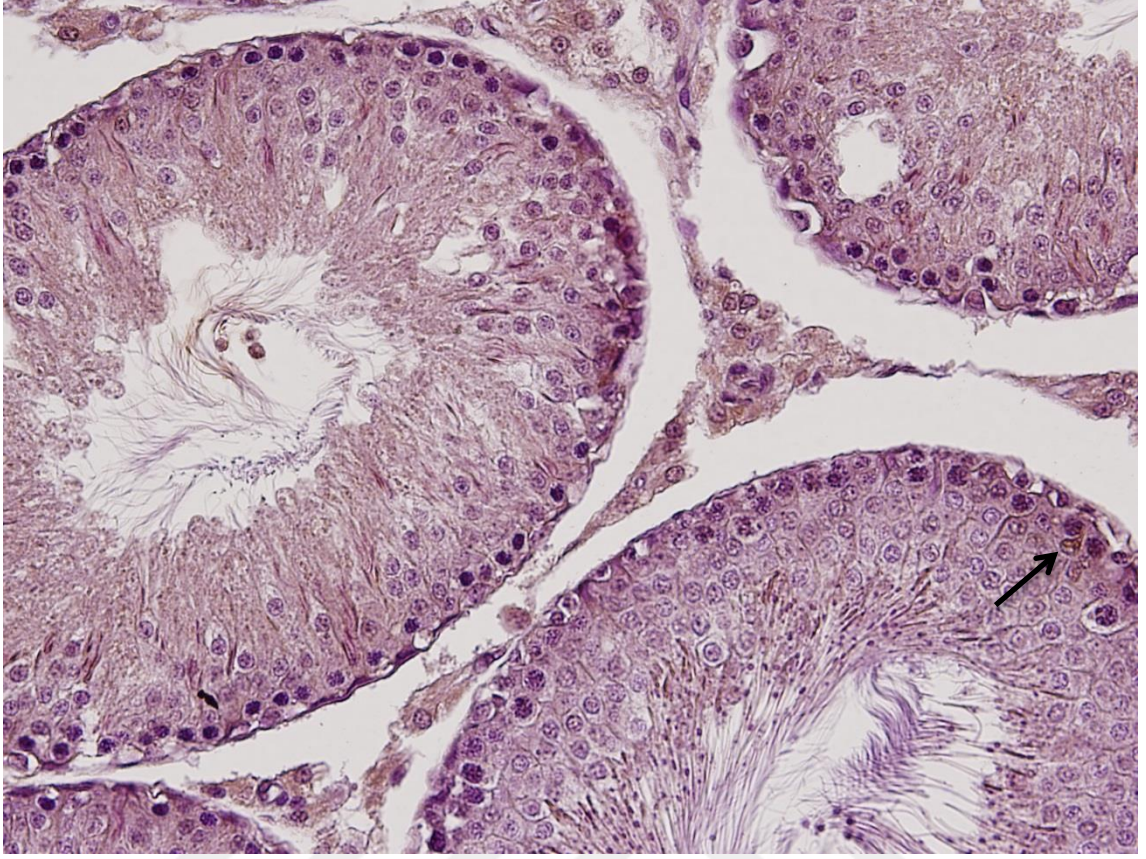


Resim 15. LA grubunda spermatozoon görüntüleri (Eozin-Y, X200)

6.5. TUNEL Sonuçları

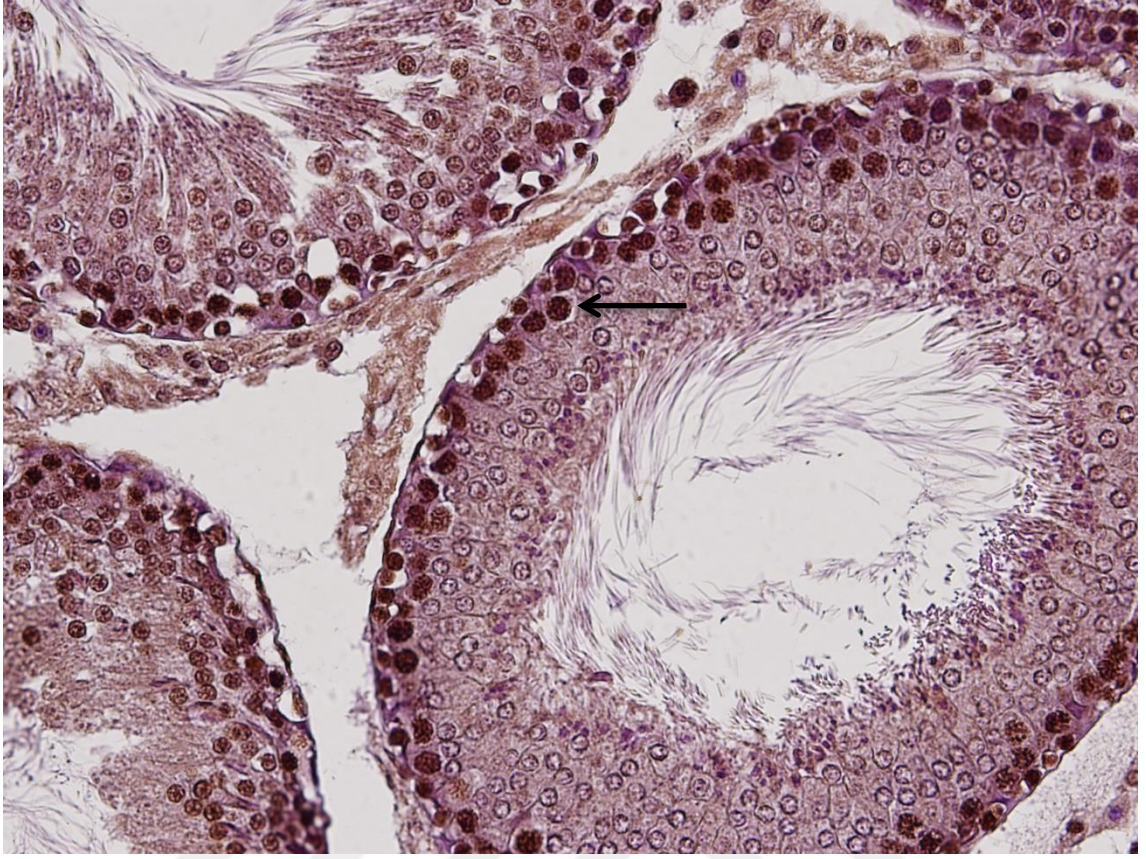
Deney gruplarına ait testis dokusunda TUNEL tekniğiyle değerlendirilen AI sonuçları tablo 10’da verilmiştir.

AI’in kontrol grubuna göre, MTX, MTX+LA ve LA gruplarında arttığı görüldü; bu artış MTX grubunda anlamlı bulunurken, MTX+LA ve LA gruplarında anlamlı bulunmadı (sırasıyla $p<0.05$, $p>0.05$, $p>0.05$) (Resim 16-19).



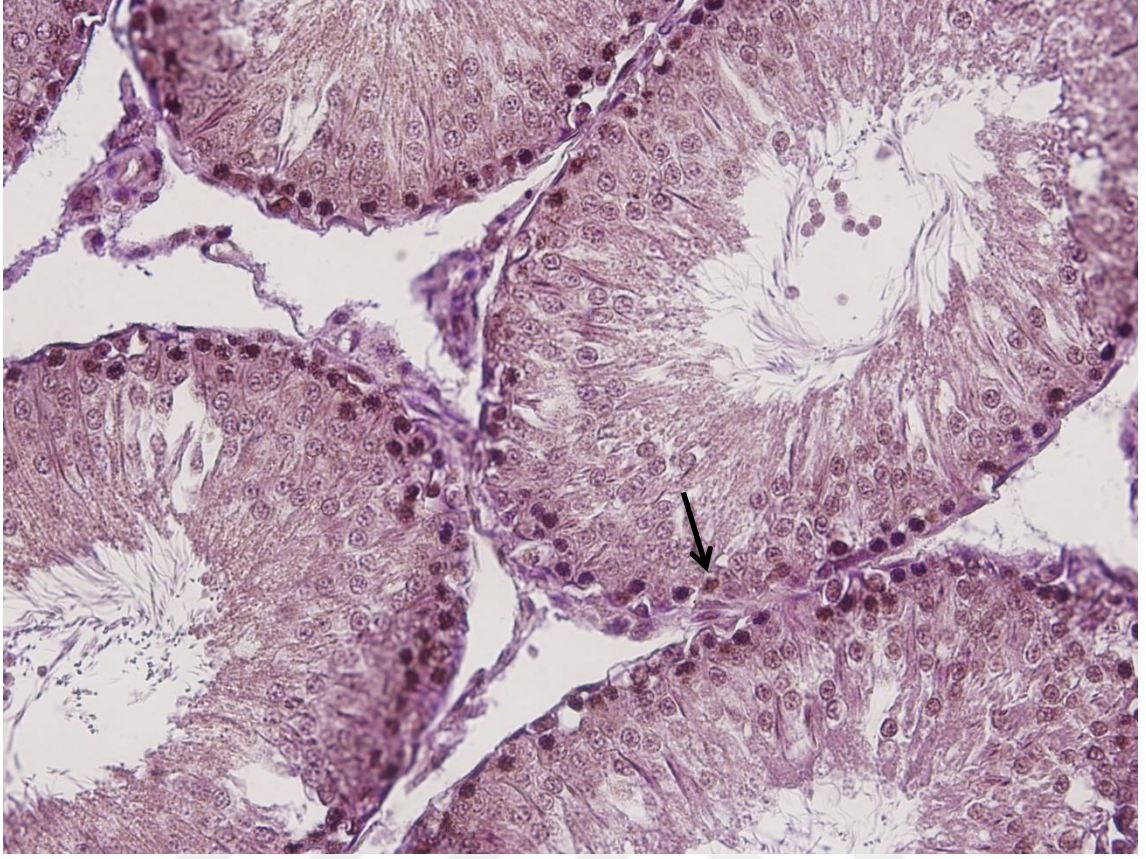
Resim 16. Kontrol grubu testis dokusunda apoptotik hücreler (DAB, X400). Tek yönlü ok apoptotik hücreyi göstermektedir.

MTX grubuna göre AI, MTX+LA ve LA gruplarında anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$).

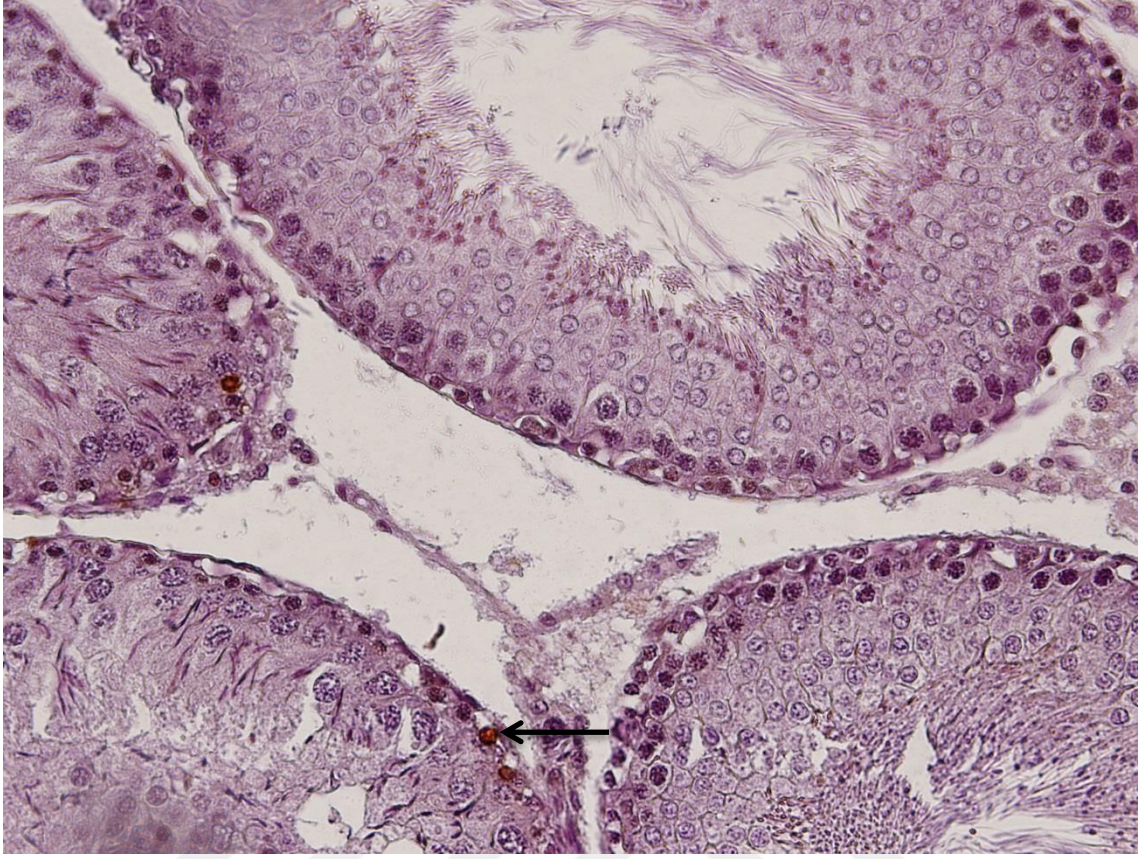


Resim 17. MTX grubu testis dokusunda apoptotik hücreler (DAB, X400). Tek yönlü ok apoptotik hücreyi göstermektedir.

MTX+LA grubuna göre LA grubunda AI'i azalmış, ancak bu azamla anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).



Resim 18. MTX+LA grubu testis dokusunda apoptotik hücreler (DAB, X400). Tek yönlü ok apoptotik hücreyi göstermektedir.



Resim 19. LA grubu testis dokusunda apoptotik hücreler (DAB, X400). Tek yönlü ok apoptotik hücreyi göstermektedir.

6.6. Biyokimyasal Değerlendirmeler

Deney gruplarına ait testis dokusu ve kan serumunda MDA, CAT ve SOD değerleri ölçülmüş ve sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir (Tablo 12, tablo 13).

Testis dokusunda MDA seviyesinde, kontrol grubuna göre, MTX ve LA gruplarında anlamlı bulunmayan bir artma görülürken, MTX+LA grubunda değişme olmadığı görüldü ($p>0.05$). MTX grubuna göre testis dokusundaki MDA seviyesinde MTX+LA grubunda azalma, LA grubunda artma görüldü. MTX grubuna göre MDA seviyesi değişimleri anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Testis dokusu MDA seviyesinde MTX+LA grubuna göre, LA grubunda anlamlı olmayan artış görüldü ($p>0.05$).

Testis dokusu CAT aktivitesinde, kontrol grubuna göre MTX ve MTX+LA gruplarında azalma görüldü. Kontrol grubuna göre olan bu azalma MTX grubunda anlamlı değilken, MTX+LA grubunda anlamlı bulundu (sırasıyla $p>0.05$, $p<0.05$).

Kontrol grubuna göre LA grubunda testis dokusu CAT aktivitesinde artma görülmüş, bu artma anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Testis dokusu CAT aktivitesinde MTX grubuna göre MTX+LA grubunda anlamlı olmayan azalma, LA grubunda ise anlamlı bir artma görüldü (sırasıyla $p>0.05$, $p<0.05$). MTX+LA grubunda, LA grubuna göre, testis dokusu CAT aktivitesinde anlamlı bir artma görüldü ($p<0.05$).

Testis dokusu SOD aktivitesi kontrol grubuna göre MTX ve LA gruplarında azalmış, MTX+LA grubunda artmıştır. Ancak gruplar arasındaki bu değişimlerde anlamlı bir fark oluşmamıştır ($p>0.05$). MTX grubuna göre testis dokusundaki SOD aktivitesi MTX+LA ve LA gruplarında artmıştır; bu artış anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). MTX+LA grubuna göre LA grubu testis dokusundaki SOD aktivitesinde azalma görüldü, ancak bu azalma anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 12. Testis dokusunda biyokimyasal değerlerin aritmetik ortalama ve standart sapma sonuçları

Gruplar	MDA (nmol/mg)	CAT (U/mg)	SOD (U/mg)
Kontrol	0.32±0.10	31.06±7.73	9.21±1.21
MTX	0.34±0.09	24.65±5.26	7.62±2.48
MTX+LA	0.32±0.06	17.69±8.10 ^a	10.24±2.42
LA	0.36±0.05	33.58±4.93 ^{b,c}	8.82±2.10

^a Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

^b MTX grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

^c MTX+LA grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

Kan serumundaki MDA, CAT ve SOD ölçüm sonuçları tablo 13’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; kan serumunda MDA seviyesi, kontrol grubuna göre, MTX, MTX+LA ve LA gruplarında artmıştır. Bu artış istatistiksel olarak MTX ve LA gruplarında anlamlı değilken, MTX+LA grubunda anlamlı bulundu (sırasıyla $p>0.05$, $p>0.05$, $p<0.05$). MTX grubuna göre, serum MDA seviyesinde MTX+LA ve LA gruplarında anlamlı olmayan bir azalma belirlendi ($p>0.05$). MTX+LA grubuna göre, LA grubu serum MDA seviyesinde anlamlı olmayan bir azalma görüldü ($p>0.05$).

Kan serumu CAT aktivitesinde, kontrol grubuna göre, MTX, MTX+LA ve LA gruplarında anlamlı olmayan şekilde artış görüldü ($p>0.05$). Kan serumu CAT aktivitesinin, MTX grubuna göre, MTX+LA grubunda istatistiksel olarak anlamlı

olmayan şekilde arttığı, LA grubunda azaldığı görüldü ($p>0.05$). Kan serumunda CAT aktivitesi MTX+LA grubuna göre LA grubunda azalma gösterdi; bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Kan serumu SOD aktivitesinin, kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde MTX ve MTX+LA gruplarında azaldığı, LA gruplarında arttığı görüldü ($p>0.05$). Kan serumu SOD aktivitesinin, MTX grubuna göre, MTX+LA ve LA gruplarında arttığı görüldü; bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$). Kan serumu SOD aktivitesinin, MTX+LA grubuna göre, LA grubunda anlamlı olmayan şekilde arttığı görüldü ($p>0.05$).

Tablo 13. Kan serumunda biyokimyasal değerlerin aritmetik ortalama ve standart sapma sonuçları

Gruplar	MDA (nmol/mL)	CAT (U/mL)	SOD (U/mL)
Kontrol	8.64±2.71	67.18±25.31	11.24±2.44
MTX	14.46±5.50	87.67±24.54	9.09±3.63
MTX+LA	14.37±3.92 ^a	107.80±35.22	10.67±6.53
LA	9.62±3.90	71.69±21.82	11.60±4.20

^a Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır. ($p<0.05$)

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde giderek artan kanser hastalığının tedavisinde pek çok antineoplastik ilaçlar kullanılmaktadır. Bunların içinde yaygın olarak kullanılanlardan biri de MTX'tir (3, 98). Kanser tedavisinde kullanılan MTX, romatoid artrit hastalığının son aşamasında da sıklıkla kullanılmaktadır. Antineoplastik ve antiromatizmal olarak kullanılan bu ilacın tedavi edici özelliğinin yanında yaygın yan etkileri de bulunmaktadır ve bu yan etkiler nedeniyle ilacın kullanımı kısıtlanmaktadır (37, 98, 99, 100). MTX'in yan etki ve toksisite oluşturmamasının folat metabolizmasında bulunan enzimlerde oluşabilecek polimorfizmlerden kaynaklanabileceği belirtilmektedir (101). Yan etkilerin azaltılmasına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. MTX kaynaklı infertilite miktarı giderek artmaktadır (3, 98). Biz de bu çalışmamızı, MTX'in oluşturduğu testis hasarının erkek üreme hücreleri üzerine olan etkisinden hareketle belirleyerek, buna karşı LA'nın iyileştirici etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla gerçekleştirdik.

Vücudumuzun temel gereksinimlerinden biri olan, esansiyel yağ asitlerinin öneminin ortaya çıkışı 1900'lü yıllara dayanmaktadır. Evans ve Burr, 1928'de yaptıkları bir çalışmada lipitten yoksun diyetle beslenen sıçanlarda üreme bozuklukları ve gelişim geriliği olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonraları diyetle linoleik, α -linolenik ve araşidonik asit ekleyerek bu sorunların ortadan kalktığını görmüşlerdir (10). Esansiyel yağ asitlerinin; migren türü baş ağrıları, bazı kanser türleri, eklem romatizması, yetişkinlerde şeker hastalığı, yüksek kolesterol, yüksek tansiyon, kalp damar hastalıkları ve bazı alerjiler gibi hastalıklara karşı koruyucu etkilerinin olduğu bilinmektedir (61, 62). Esansiyel yağ asitlerinin özellikle çocuklarda bedensel ve ruhsal gelişim üzerinde büyük önem arz ettiği bilinmektedir (63). Bazı çoklu doymamış yağ asitleri, tümör öldürücü etkiye sahiptir; ilaca dirençli hücrelerde ilaç emilimini artırıp, atılımını azaltarak spesifik anti-kanser ilaçların sitotoksik aktivitelerini artırma yeteneğindedirler. Böylece çoklu doymamış yağ asitleri, gerek tek başına gerekse kemoterapik ilaçlar ile birlikte kullanılarak anti-kanser moleküller gibi bir potansiyele sahiptir (102). Sperm plazma membranındaki lipitler sperm motilitesinde de önemli rol oynamaktadır. Sperm motilitesindeki değişiklikler, sperm plazma membranındaki ω 3 yağ asitleri içeriği ve seminal plazmadaki ekstraselüler antioksidanlar ile ilişkilidir ki bunlar sperm plazma membranlarını oksidatif stres periyodu boyunca lipid peroksidasyonundan korurlar

(103). 6 yağı asitlerinin cilt sağlığını, deriyi yaralanmalara ve enfeksiyonlara karşı koruduğu, esnek ve pürüzsüz cilt oluşumunda etkili olduğu, vücut sıcaklığını ve su kaybını düzenlediği bildirilmiştir (12). Shafeeqe ve Zafarul 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, *Nigella sativa* (çörek otu)'nın metanolik ekstraktını ve uçucu yağ ekstraktını hazırlamışlar ve metanolik ekstraktta yüksek oranda linoleik asit bulunduğunu ve *Nigella sativa*'nın linoleik asit içeriğiyle hipolipidemik özelliğe sahip olduğunu belirlemişlerdir (104). Shafeeqe ve Zafarul 2015 yılında yaptıkları diğer çalışmada atherogenik süspansiyonla beslenen sıçanlar üzerinde *Nigella sativa*'nın iyileştirici etkisini belirlemişler ve bu çalışmaya göre *Nigella sativa* metanol ekstraktının serbest radikal zincir hastalıklarında tedavi edici olarak yemeklere takviye edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (105).

Literatürde sıçanların testis dokusu üzerine MTX toksisitesiyle ilgili pek çok çalışma mevcuttur.

Sönmez ve arkadaşları (106), Yüncü ve arkadaşları (107), Yuluğ ve arkadaşları (8), Gökçe ve arkadaşları (108), Nouri ve arkadaşları (109), Vardı ve arkadaşları (110), Shrestha ve arkadaşları (111), Saxena ve arkadaşları (112), Işık ve arkadaşları (113) MTX'in sıçan testis histolojisi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar yapmışlardır. Bu araştırmacılar, MTX'in farklı süre ve dozlarda, seminifer tubüller, spermatogenik seri hücreleri ve interstisyel alanlardaki etkilerini inceleyerek oluşan hasarları belirlemişlerdir. Buna göre Sönmez ve arkadaşları; MTX uyguladıkları grupta seminifer tubüllerde ve interstisyel alanda önemli ölçüde hasar belirlemişlerdir. Seminifer epitelde vakuolizasyon, germinal hücrelerde düzensizlik, seminifer tubül lümenine olgunlaşmamış germinal hücre dökülmesi ve bazı seminifer tubüllerde atrofi tespit etmişlerdir (106). Yüncü ve arkadaşları ışık ve elektron mikroskopi çalışmaları sonucunda; MTX grubunda interstisyel alanda ödem ve konjesyon, seminifer tubüllerde vakuolleşme, bazal membranda ayrılma, spermatogenik seri hücrelerinde azalma ve epitelde çok nükleuslu dev hücrelerin oluştuğunu bulmuşlardır (107). Yuluğ ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; MTX grubunda seminifer tubüllerin lümeninde spermatozoon kaybı ve olgunlaşmamış germinal hücreler görmüşlerdir (8). Shrestha ve arkadaşları iki farklı dozda MTX uygulaması sonucunda seminifer epitelin bazal membranında ve Leydig hücrelerinde düzensizlik, seminifer tubül çapında daralma, primer spermatosit ve spermatidlerin çapında azalma, interstisyel alanda artış olduğunu

belirlemişlerdir (111). Saxena ve arkadaşları; MTX uygulaması sonucu, interstisyel alanda istatistiksel olarak anlamlı derecede artma ve seminifer tubül çapında azalma, primer spermatositlerin büyüklüklerinde farklılık, sekonder spermatositler ve spermatidler arasında vakuolizasyon, Sertoli ve Leydig hücresi boyutlarında önemli ölçüde küçülme, bazal membranda yer yer incelme ve düzensizlik tespit etmişlerdir (112).

Bu çalışmada Yuluğ ve arkadaşlarının (8) yaptıkları testis toksisitesi çalışmasına eşdeğer olarak sıçanlara ip olarak tek doz 30 mg/kg MTX uygulandı. LA'nın MTX'e karşı koruyucu etkisini araştırmak amacıyla sıçanlara gavajla yedi gün boyunca 100 mg/kg dozunda LA verildi. Biz bu çalışmada daha önce yapılan çalışmalara (8, 116-113) paralel olarak MTX grubunda, kontrol grubuna göre, seminifer tubül çapında ve epitel kalınlığında anlamlı şekilde azalma, lümenine immatür hücre dökülen seminifer tubül sayısında artış tespit ettik. MTX+LA grubunda ise MTX grubuna göre, seminifer tubül çapı ve epitel kalınlığının anlamlı olarak arttığını, lümenine immatür hücre dökülen seminifer tubül sayısının azaldığını belirledik. LA grubunda, seminifer tubül çapının MTX ve MTX+LA gruplarına göre arttığını; epitel kalınlığının kontrole göre azaldığını; MTX ve MTX+LA gruplarına göre ise arttığını bulduk. Ayrıca MTX grubunda, kontrol grubuna göre, seminifer tubül epitelinde açılmalar, spermatogonyumlarda atrofi, lümenine immatür hücre dökülen tubül sayısında artış, interstisyel alanda hemoraji ve Leydig hücrelerinde atrofi gördük. MTX+LA grubunda, MTX grubuna göre seminifer epitel hücreleri arasında açılmaların azaldığını, spermatogonyumların normal yapıda olduğunu, lümenine immatür hücre dökülen seminifer tubül sayısının azaldığını ve interstisyel alanda hemorajinin olmadığını belirledik. LA grubunda seminifer tubül ve interstisyel alan kontrole benzer yapıda gözlemlendi. Seminifer epitelde açılma, Leydig hücreleri ve spermatogonyumlardaki atrofide azalma belirlendi. Bulgularımız LA'nın MTX oluşturduğu dejeneratif etkileri belli ölçüde düzelttiğini göstermektedir.

Doku hasarını belirleyebilmek için kullanılan önemli yöntemlerden biri TUNEL tekniğiyle AI değerlendirmesidir. Bu doğrultuda Sönmez ve arkadaşları MTX uyguladıkları çalışmalarında testis dokusu üzerinde AI ve Johnsen skorlaması yapmışlar; apoptotik hücre sayılarının kontrol grubuna göre arttığını, Johnsen skor değerlerinin ise anlamlı şekilde azaldığını belirlemişlerdir (106). Vardı ve arkadaşları;

tek doz 20 mg/kg olarak MTX uyguladıkları grupta seminifer tubüllerde atrofi, germinal hücrelerde dökülme ve apoptoz belirlemiştir (110). Işık ve arkadaşları, farklı sürelerde uygulanan dozlarda MTX'in etkisini araştırmışlar; özellikle spermatosit ve spermatidlerde öldürücü hasar oluştuğunu, ancak germinal epitelin kök hücreleri olan spermatogonyumların bu hasardan en az etkilendiğini belirlemiştir. Bunun sonucunda testis dokusunda oluşan MTX hasarının geri dönüşümlü olabileceğini belirtmişlerdir. İki haftadan altı haftaya kadar, haftada bir 0.7 mg/kg uygulanan MTX testis dokusunda seminifer tubül duvarı bazal membranlarında kalınlaşma, germ hücre maturasyon ve dağılımında bozulma, seminifer tubül lümeninde spermatozoonda azalma veya yok olma, lümendeki dejenere spermatidlerde artma görülmüştür. Spermatogonyum, spermatosit ve spermatidlerde kromatin yoğunlaşması, parçalanması, hücrede vakuolizasyon ve apoptozu belirlemiştir (113). Bu araştırmada, AI'de MTX grubunda, kontrol grubuna göre, anlamlı bir artma, MTX+LA grubunda ise MTX grubuna göre, anlamlı bir azalma tespit ettik.

Johnsen skoruna göre, MTX, MTX+LA ve LA gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma, MTX+LA grubunda MTX grubuna göre anlamlı bir artma; LA grubunda, MTX ve MTX+LA gruplarına göre anlamlı olarak artma görüldü.

Çalışmamızda deney öncesi sıçan vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Bu durum grupların homojen olarak dağıtıldığını göstermektedir. Deney sonrası MTX grubu sıçan vücut ağırlıklarının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi. MTX+LA grubu deneklerinin deney sonrası vücut ağırlıklarının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı, MTX grubuna göre ise anlamlı bulunmayan bir artış olduğu görüldü. Deney sonrası vücut ağırlıklarının LA grubunda, kontrol grubuna göre az miktarda azaldığı, bu azalmanın anlamlı olmadığı; MTX ve MTX+LA gruplarına göre ise anlamlı olarak arttığı görüldü. MTX grubu testis ağırlıklarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalma, tedavi grubunda ise MTX grubuna göre anlamlı olmayan bir artma belirlendi. LA grubu testis ağırlığında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalma, MTX+LA ve LA gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı olmayan artma tespit edildi.

Testis dokusunda MTX hasarının belirlenmesinin yanında MTX'in olgun spermatozoonlara olan etkisinin de bilinmesi üreme kapasitesi açısından önem arz

etmektedir. Nouri ve arkadaşları haftada bir doz MTX uyguladıkları 28 günlük sıçan çalışmasında; 14. günde testisin bazı bölgelerinde, seminifer tubüller arasındaki alanda artış ve seminifer tubüllerde nekrotik alanlar oluşması, 28. günde seminifer tubüllerde belirgin şekilde atrofi ve seminifer tubül çapında, testis ve vücut ağırlığında, kontrol grubuna göre azalma belirlemişlerdir. 14. ve 28. günlerde seminifer epitel kalınlığında ve epididimal sperm sayısında azalma olduğunu ortaya koymuşlardır (109). Padmanabhan ve arkadaşları fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, MTX'in epididimal sperm sayısında düşüşe ve anormal başlı spermilerin oranında artışa sebep olduğunu belirlemişlerdir (114). Biz bu çalışmada sperm sayısının, sperm motilitesinin ve sperm vitalitesinin MTX grubunda, kontrol grubuna göre azaldığını, bu azalmaların sperm motilitesi ve vitalitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirledik. Bunun yanında tedavi grubunda MTX grubuna göre sperm sayısında anlamlı bir azalma, sperm motilitesinde anlamlı olmayan artma, sperm vitalitesinde de anlamlı olmayan bir azalma izledik. Ayrıca epididimal seminal sıvıya dökülen epitel hücre sayısının, MTX grubunda kontrol grubuna göre ve tedavi grubunda MTX grubuna göre azaldığı; bunun LA grubunda diğer tüm gruplara göre arttığı; LA grubundaki bu artışın tedavi grubuna göre anlamlı olduğu belirlendi.

Oksidatif stresin önemli belirteçlerinden biri MDA'dır (86). Antioksidan savunma sistemleri için CAT ve SOD önemli belirteçlerdir (77, 78). Yüncü ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MTX grubunda, MDA seviyesinin anlamlı ölçüde arttığını, SOD aktivitesinin anlamlı şekilde azaldığını belirlemişlerdir (107). Sönmez ve arkadaşları MTX grubunda, doku MDA seviyesinin anlamlı olmayan şekilde arttığını belirtmişlerdir (106). Dagguli ve arkadaşları sıçanlarda MTX ile testis hasarı oluşturarak MDA, total oksidan kapasite ve oksidatif stres indeksinin yükseldiğini belirlemişlerdir (115). Başkaya'nın $\omega 3$ açısından zengin balık yağı ve ona göre $\omega 6$ açısından zengin olan zeytinyağıyla yaptığı çalışmada zeytinyağı grupta lipit peroksidasyonun anlamlı olarak arttığını belirlemiştir. Ayrıca CAT aktivitesinin de anlamlı olarak arttığını tespit etmişlerdir (116). Acar, linoleik asitçe zengin olan ayçiçeği yağıyla yaptığı çalışmada, ayçiçeği yağı grubunda plazma MDA seviyesinin, fındık yağı gruplarına göre anlamlı şekilde arttığını belirlemiştir (117). Çalışmamızda doku MDA seviyesi MTX grubunda, kontrol grubuna göre, anlamlı olmayan bir artış gösterdi. MTX+LA grubundaki MDA seviyesinde ise MTX grubuna göre anlamlı olmayan bir azalış belirlendi. LA

grubundaki MDA seviyesinde, kontrole göre artış belirlendi; ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. LA grubundaki MDA artışının, LA'nın ölçüm sırasındaki oksitlenmesiyle ilgili olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca çoklu doymamış yağ asitlerinin otooksidasyona duyarlı oldukları ve LA'nın prooksidan özelliği olduğu bilinmektedir (118-120). LA grubundaki bu MDA artışının, LA'nın otooksidan ve/veya prooksidan olarak fonksiyon görmesiyle de ilgili olabileceği söylenebilir.

Çoklu doymamış yağ asitlerince zengin diyetle beslenildiğinde organizmada lipit peroksidasyonuna duyarlılık artarak antioksidan sistem etkilenmekte, prooksidan-antioksidan dengesi prooksidasyon yönünde değişmektedir (118, 120-123). Sıçanlarda fındık ve ceviz ile beslenmenin ateroskleroz ve prooksidan-antioksidan dengenin araştırıldığı çalışmada; aterosklerozlu diyetle beslenen gruba göre linoleik asitçe zengin olan ceviz ilaveli aterosklerozlu diyet grubunda plazma MDA seviyesi ve antioksidan aktivitesinin anlamlı şekilde arttığı görülmüştür; bunun nedeninin içerdiği yağ asidinden kaynaklandığı düşünülmektedir (124). Ayrıca dışarıdan alınan fazla miktarlardaki antioksidan besinlerin oksidatif stresi artırarak prooksidan olarak rol oynayabildikleri bildirilmiştir (125, 126). Çalışmamızda LA'nın normal vücuda dışarıdan verilmesiyle, LA'nın prooksidan etki yaparak oksidatif stres ürünü olan MDA'yı artırmış olabileceğini düşünüyoruz.

Dokuda antioksidan enzimlerinden SOD aktivitesinde tüm gruplar arasında anlamlı bir değişim bulunmadı. MTX grubunda, kontrol grubuna göre, SOD ve CAT aktivitelerinde anlamlı olmayan bir azalış, MTX+LA grubunda ise SOD aktivitesinde anlamlı olmayan bir artış, CAT aktivitesinde ise anlamlı bir azalış bulundu. MTX grubuna göre, MTX+LA grubunda anlamlı olmayan şekilde SOD aktivitesinde artış, CAT aktivitesinde ise azalış vardı. Burada CAT aktivitesinin düşük çıkmasının nedeninin, önemli bir diğer antioksidan enzim olan glutatyon peroksidazın (GSH-Px) aktivitesindeki artış ile ilgili olabileceği düşüncesini akla getirmektedir. SOD'ın oluşturduğu H_2O_2 'i parçalayan CAT ve GSH-Px aynı görevi üstlenmelerine rağmen bunların afiniteleri farklılık göstermektedir. GSH-Px'in H_2O_2 'e olan afinitesi ve hızı CAT'a göre çok daha fazladır. MTX+LA grubunda CAT aktivitesindeki bu azalmanın sebebi GSH-Px enziminin devreye girmiş olmasından kaynaklanabilir.

Bazı esansiyel yağ asitleri, antikanser ilaçlarla birlikte kullanıldıklarında ilaca dirençli hücrelerde ilaç emilimini artırarak ve ilaç atılımını azaltarak bu antikanser ilaçların sitotoksik etkilerini artırır (102). Bu şekilde LA, MTX+LA grubunda sitotoksik etki ile doku CAT aktivitesinde düşüşe neden olmuş olabilir. MTX+LA grubuna göre LA grubu SOD aktivitesinde anlamlı olmayan bir azalış, CAT aktivitesinde ise anlamlı derecede artış görüldü.

Kan serumunda MDA seviyesi kontrol grubuna göre diğer gruplarda artmıştır. Bu artış MTX+LA grubunda anlamlıdır. MTX grubundaki artış oksidatif stres desteklemektedir. MTX+LA grubunda bu artışın devam etmesi verilen LA'nın prooksidan rol üstlendiğini ve ayrıca bir stres oluşturduğunu doğrular niteliktedir.

Kan serumunda SOD aktivitesi kontrol grubuna göre MTX grubunda azalmış, MTX+LA grubunda artmıştır. MTX grubuna göre ise MTX+LA grubunda sadece SOD aktivitesinde artış görülmüştür. CAT aktivitesi kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda artmıştır. CAT aktivitesi MTX grubuna göre MTX+LA grubunda da artış göstermiştir. Kan serumundaki enzim aktivitelerinde anlamlı bir farklılık bulunmadı. Bu farklılıkların olmayışı, kan serumunda bulunan diğer antioksidan enzimlerin daha aktif olmalarından kaynaklanabilir. Ayrıca her ne kadar tüm gruplar için standart deney ortamı sağlanmış olsa da canlılar arasında gün içinde yine de farklı aktivasyonlar görülebilir ve bu durum oksidan-antioksidan sistemi etkileyebilir. Bunların sonucu kan serum değerlerine yansiyabilir.

Sonuç olarak; MTX oksidatif stres oluşturarak dokuda hasar oluşturmaktadır. MTX yüksek doz uygulandığında ($>30\text{mg/m}^2$) 8-15 saatte vücutta yarılanır (127); yarı ömür uzunluğuna dayanarak 24. saatte yaklaşık % 88-92'sinin vücuttan atıldığı düşünülürse bundan sonraki saatlerde daha az oranda harabiyet vermesi beklenebilir. Ayrıca MTX'in kanda maksimum konsantrasyona ulaşmaya kadar geçen süre (T_{max}) 0.5-1 saat olarak bildirilmiştir (128). Deneyin ilk günü oluşan oksidatif ürünler dokuda histolojik hasar oluşturur. Oksidatif hasar oluştuktan sonra vücudun doğal antioksidan enzim aktivitesi artar ve oksidatif ürünleri ortadan kaldırmaya çalışır. Dışarıdan verilen antioksidan maddeler bu savaşta vücudun doğal antioksidan enzimlerine desteklik eder. Bu arada dokuda yavaş yavaş rejenerasyonlar sürer. Dışarıdan verilen LA ilk etapta antioksidatif enzim gibi rol oynayabilir. Ancak deneyin son gününde, vücudun

doğal antioksidan enzimlerinin oksidasyon ürünlerini ortadan kaldırmış olabileceğini, bu durumda LA'nın prooksidan gibi davranarak doku MDA'sını bir miktar yükseltmiş olabileceğini düşünüyoruz. Bununla birlikte, histopatolojik bulgularımız MTX'in doku hasarını artırdığını, LA'nın ise bu hasarı belirli ölçüde düzelttiğini göstermektedir.

Ancak MTX'in toksik etkisine karşı tedavi yollarının araştırılmasında tek doz MTX uygulaması yapıldıktan 24 saat sonra oksidatif stresin değerlendirilmesinin daha etkin veri elde edilmesini sağlayacağını düşünmekteyiz. LA'nın MTX hasarına karşı antioksidatif etkisinin olup olmadığının araştırılması için, LA uygulamasının, MTX'e bağlı oksidatif hasar ürünlerinin en fazla ortaya çıktığı 8-15. saatler arasında, tek doz MTX uygulamasından 1 gün sonra yapıldığı, MTX'in akut etkilerinin çalışıldığı bir araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın histopatolojik verileri, LA'nın MTX'e bağlı oluşan doku hasarını düzelttiğini göstermektedir. Ancak oksidan-antioksidan dengedeki değişimlerin çalışma sonuçlarını etkilemesi nedeniyle, MTX uygulanan dokulara LA'yı farklı dozlarda uygulayarak, daha farklı parametrelerin kullanıldığı araştırmalarla, daha detaylı sonuçlar elde edilebileceğini düşünüyoruz.

8. KAYNAKLAR

1. Bozcuk AN (2005). Genetik. İkinci baskı. Palme Yayıncılık, Ankara, 299-304.
2. Pizzo PA, Poplack DG (2001). Principles and Practice of Pediatric Oncology. Lippincott: Williams & Wilkins, Philadelphia, 197-202.
3. Türk G (2013). Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. Marmara Pharmaceutical Journal, 17: 73-92.
4. Kim JC, Kim KH, Chung MK (1999). Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. Reprod Toxicol 13: 391-97.
5. Şener G, Demiralp Ekşioğlu E, Çetiner M, Ercan F, Yeğen BÇ (2006). B-glucan ameliorates metotreksat-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. Eur J Pharmacol 542: 170-78.
6. Armagan A, Uzar E, Uz E, et al (2008). Caffeic acid phenethyl ester modulates metotreksat-induced oxidative stress in testes of rat. Hum Exp Toxicol 27: 547–552.
7. Oktar S, Gökçe A, Aydın M, Davarcı M, Meydan S, Öztürk OH, Koç A (2010). Beneficial effect of erdosteine on metotreksat-induced testicular toxicity in mice. Toxicology and Industrial Health 26(7): 433-438.
8. Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C (2013). Effects of Resveratrol on Metotreksat-Induced Testicular Damage in Rats. Scientific World Journal 2013:489659.
9. Keha EE, Küfrevioğlu Öİ (2007). Biyokimya. 5. Baskı, Aktif yayınevi, İstanbul; 172-175
10. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwel WW (1996). Harper's Biochemistry. Harper'ın Biyokimyası. 24th ed. Çeviren: Dikmen N, Özgümen T, Barış Kitabevi, İstanbul, 248
11. Simopoulos AP and Salem N (1996). Fatty acids and lipids from cell biology to

- human disease. *Lipids*, 31 (suppl), SI.
12. Karabulut HA, Yandı İ (2006). Su ürünlerindeki omega-3 yağ asitlerinin önemi ve sağlık üzerine etkisi. *Ege Üniv. Su Ürünleri Derg.* 23(1/3): 339-342.
 13. Kırca N, Pasinlioğlu T (2013). İnfertilite tedavisinde karşılaşılan psikososyal sorunlar. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar* 5(2): 162-178.
 14. Ross MH, Pawlina W (2016). *Histology: A Text and Atlas: with correlated cell and molecular biology*. 7th. ed. Wolters Kluwer Health. 790-812.
 15. Eroschenko VP (2001). *Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. Di Fore Histoloji Atlası – Fonksiyonel Yönleriyle. 9th. ed. Çeviren: Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara, 283-288.
 16. Sadler TW (2010). *Langman's Medical Embryology*. Langman Medikal Embriyoloji. 11th ed. Çeviren: Başaklar AC, Palme Yayıncılık, Ankara, 246-248.
 17. Moore KM, Persaud TVN (2002). *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*. 6th ed. Çeviren: Yıldırım M. Okar İ, Dalçık H, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 323-325.
 18. Moore KM, Persaud TVN (1993). *Before We Are Born Essentials of Embryology and Birth Defects*. Forth ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 213-216.
 19. Junqueira LC, Carneiro J (2006). *Basic Histology*. Temel Histoloji. Tenth ed. Çeviren: Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 431-442.
 20. Bloom W, Fawcett DW (1986). *A Textbook of Histology*. 8th ed. W. B. Saunders Company, US, 796-828
 21. Şeftalioğlu A (1998). *Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi*. Üçüncü Baskı. Tıp ve Teknik Yayıncılık, Ankara, 346-350.
 22. Antimüllerian Hormon (2015) Erişim: www.duzen.com.tr/artFiles/AMH. Erişim tarihi: 05.02.2015
 23. Yıldırım M (2006). *İnsan Anatomisi 2*. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul; 181-182.

24. Moore KL, Dally AF (2007). Clinically Oriented Anatomy. Kliniğe Yönelik Anatomi. Dördüncü baskı. Çeviren: Şahinoğlu K. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 198-202.
25. Drake RL, Vogl AW, Mitchell AWM (2011). Gray's Anatomy. Gray's Anatomi. 2th ed. Çeviren: Yıldırım M, Güneş Kitapevi, Ankara, 448-450.
26. Graaff KMVD (2002). Human Anatomy. Sixth ed. McGraw-Hill Higher Education, US, 702-705.
27. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (1998). Basic Histology. Temel Histology. Eighth ed. Çeviren: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B; Barış Kitabevi, İstanbul, 407.
28. Abraham L. Kierszenbaum (2006). Histology and Cell Biology. Hücre ve Hücre Biyolojisi. Çeviren: Demir R, Palme yayıncılık, Ankara, 531-558.
29. Feneis H (2001). Pocket atlas of human anatomy: based on the international nomenclature. Uluslararası terimlerle resimli anatomi sözlüğü. Çeviri editörü: Yıldırım M, Marur T, Nobel tıp kitapevi, İstanbul.
30. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA (1983). The pharmacology and clinical use of metotreksat. N Engl J Med 309: 1094-1104.
31. Salmon SE, Sartorelli AC (1998). Cancer chemotherapy. In: Katzung BG, Ed. Basic & Clinical Pharmacology. 7th Ed., Stamford, Connecticut: A Simon & Schuster Company, 881-915.
32. Delap RJ (1996). Antimetabolic agents. In: Kirkwood JM, Lotze MT, Yasko JM, Eds. Current Cancer Therapeutics. 2th Ed. Philadelphia: Edwards Brothers, Inc, 50-53.
33. Ersoy Y (2002). Metotreksat ve diğer toksik ilaçlar. Goksoy T. Romatizmal hastalıkların tanı ve tedavisi, I. Baskı, 907-26.
34. Quinn CT, Kamen BA (1996). A biochemical perspective of metotreksat

neurotoxicity with insight on nonfolate rescue modalities. J Invest Med 44: 522-30.

35. Goodman and Gillman (2009). The Pharmacological Basis of Therapeutics Laurence L. Bruton (editör), John. S. Lazo, Keith L. Parker (editör Yardımcıları), McGraw-Hill. Tedavinin Farmakolojik Temeli. Çeviri editörü: Süzer Ö, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 1315-1405.
36. Gibson RJ, Keefe DMK, Thompson FM, Golland GJ, Cummins AG (2002). Effect of interleukin-11 on ameliorating intestinal damage after metotreksat treatment of breast cancer in rats. Dig Dis Sci, 47: 2751-2757.
37. Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB (1998). Metotreksat in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. Semin. Arthritis Rheum; 27(5):277-292.
38. Kayaalp O (1998). Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Taş Ankara, 388-393.
39. Del Pozo J, Martinez W, Garcia-Silva J, Almagro M, Pena-Penabad C, Fonseca E (2001). Cutaneous ulceration as a sign of metotreksat toxicity. Eur J Dermatol, 11 (5): 450-452.
40. Sussman A, Leonard JM (1980). Psoriasis, metotreksat and oligospermia. Arch Dermatol 116: 215–217. 44 Morris LF, Harrod MJ, Menter MA, et al (1993). Metotreksat and reproduction in men: case report and recommendations. J Am Acad Dermatol 29: 913–916.
41. Karaca, E. ve Aytaç, S., 2007. Yağ bitkilerinde yağ asitleri kompozisyonu üzerine etki eden faktörler. Ondokuz Mayıs Üniv. Ziraat Fak. Derg., 22(1): 123-131
42. Altunkaynak B, Özbek E (2006). Obezite nedenleri ve tedavi seçenekleri. Van Tıp Derg, 13(4): 138-142.
43. Bayşu N (1979). Fundamental Biochemistry (in Turkish). Fırat Üniv. Veteriner Fak. Yayınları: 18, Ders Kitabı: 8. Elazığ.

44. Hoşsu B, Korkut AY, Fırat A, (2001). Fish Nutrition and Food Technology I (in Turkish). Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No: 50, İzmir.
45. Tüzün C (1993). Medikal Biyokimya. Palme yayınevi, Ankara, 193.
46. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/sunularim.html>. 20 Ekim2006.
47. Samur G (2006). Kalp Damar Hastalıklarında Beslenme. ISBN: 975-590-181-7, Sinem Matbaacılık, Ankara.
48. <http://www.odevsel.com>. 12 Temmuz 2007.
49. Semma M (2002). Trans fatty acids: Properties, benefits and risks. J. Health Sci., 48 (1): 7-13.
50. Gogus U, Smith C (2010). n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. Int. J. Food Sci. Technol., 45: 417-436.
51. Holub BJ (2002). Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. Can Med. Assoc. J. (JMAC) 166 (5): 608 - 615.
52. Watkins BA (1991). Importance of essential fatty acids and their derivatives in poultry. J. Nutr.,121: 1475-1485.
53. Lau CS, Morley KD, Belch JJ (1993). Effects of fish oil supplementation on non-steroidal anti-inflammatory drug requirement in patients with mild rheumatoid arthritis-a double-blind placebo controlled study, Br. J. Rheumatol. Vol. 32, pp. 982-989.
54. Simon HB (1994). Patient-directed, non-prescription approaches to cardiovascular disease, Arch. Intern. Med. 154: 2283-2296.
55. Kromhout D, Bosschieter EB, de Lezenne Coulander C (1985). The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. N Engl J Med 312: 1205-1209.
56. Dyerberg J (1986). Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention

- of atherosclerosis. *Nutr. Rev.*, 44: 125-134.
57. Eritsland I, Arnesen H, Seljefolt I (1995). Longterm Metabolic Effects of n-3 Polyunsaturated fatty acids in Patients with Coronary Artery Disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 831-836.
 58. Burr GO, Burr MM (1929). A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet, *J.Biol.Chem.* 82:345-367.
 59. Halver JE (1972). *Fish Nutrition*. Academic Press. Inc.111 Fifth Avenue, New York, 713.
 60. Bilgüven M (2002). *Food Information, Food Technology and Fish Nutrition* (in Turkish). Yayın No:1, Akademisyen Yayın Evi, Rize.
 61. Gorga C (1998). *Quality assurance of seafood*. An Avi Book Published by Van Nostrand Reinhold New York.
 62. Nettleton JA (2000). Seafood nutrition in the 1990s., issues for the consumer. p. 32-39. In E. Graham Bligh (ed.), *Seafood science and technology*, Chap. 4 Can. Inst. of Fish. Tech., Tech. Uni. of Nova Scotia Halifax, Canada.
 63. Gadoth N (2008). On Fish Oil and Omega-3 Supplementation in Children: The Role of Such Supplementation on Attention and Cognitive Dysfunction. *Brain & Development*, 30: 309–312.
 64. Leaf A, Weber PC (1988). Cardiovascular effects of ω -3 fatty acids. *The New Engl. J. Med.*, 318: 549-557.
 65. Karlson P (1992). *Tıp ve Fen Bilimciler İçin Biyokimya*. 2th ed. Çeviren: Telefoncu A, Arkadaş Tıp Kitapları; 267.
 66. Onat T, Emerk K, Sözmén EY (2006). *İnsan Biyokimyası*. İkinci baskı. Palme Yayıncılık, Ankara; 333.
 67. Ruggeri S, Cappelloni M, Gambelli L, Nicoli S, Carnovale E, (1998). Chemical composition and nutritive value of nuts grown in Italy. *Ital J Food Sci* 10 (3): 243-

252.

68. Zwarts L, Savage GP, McNeil DL (1999). Fatty acid content of New Zealand-grown walnuts (*Juglans regia* L). *Int J Food Sci Nutr* 50: 189-194.
69. Kolayli S, Tarhan O, Kara M, Aliyazicioglu R, Kucuk M (2011). An investigation of frequently consumed edible oils in terms of omega fatty acids. *Chem Nat Compd* 47: 347.
70. <http://www.istanbul.edu.tr/fennotlar1260110414.pdf> (15.04.2013)
71. <http://www.istanbul.edu.tr/fennotlar1260110344pdf.pdf> (23.03.2013)
72. Başaran A (2004). *Tıbbi Biyoloji*. Yedinci baskı. Güneş & Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul; 264-265.
73. Eşrefoğlu M (2016). *Genel Histoloji*. İstanbul Tıp Kitabevi
74. Elmore S (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicology Pathology*, 35 (4): 495-516.
75. Yener MB, Aydoğan S (2000). Oksidatif stres ve antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*; 9(1): 49-53.
76. Mercan U (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 15 (1-2): 91-96.
77. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology*. 3-4: 92-95.
78. Altan N, Dinçel AS, Koca C (2006). Diabetes mellitus and oxidative stress. *Turk J Biochem* 31 (2); 51-56.
79. Sies H (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Wiener klinische Wochenschrift*. 69: 965-968.
80. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z (2015). Oxidative stress and its impacts

on intracellular lipids, proteins and DNA. J Clin Exp Invest 6 (3): 331-336.

81. Halliwell B, Gutteridge JM (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J. 219: 1-14.
82. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 95: 351-358.
83. Gutteridge JM (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin. Chem. 41: 1819-1828.
84. Akkuş İ (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Birinci Baskı. Mimoza Yayınları, 1-60.
85. Smith MAC, Bortolado MKH, Melargno MI, Neto ST (1990). Investigation of the effect of hydrogen peroxide on the chromosomes of young and elderly individuals. Mech Age. Dev. 56: 107-115.
86. Sivas F, Alemdaroglu E, Yıldırım O, Tezel N, Ucan H, Bodur H (2009). Evaluation of Fall and Fall Prediction Index in Patients with Stroke. Türk Geriatri Dergisi- TURK J GERIATR, 12: 55-61.
87. Marnett LJ (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology, 181: 219-222.
88. Harris ED (1992). Regulation of antioxidant enzymes. The FASEB Journal 6: 2675-2683.
89. Fridovich I (1973). Superoxide radical and superoxide dismutase. Biochem. Soc. Trans, 1:48.
90. Duru NK (1998). Subfertil ve İnfertil Sperm Parametreleri. GATA Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Notları, Ankara.
91. 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.

92. Oliveria 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): 1405-1413.
93. Potten CS (1996). What is an apoptotic index measuring? A commentary. *Br J Cancer* 74 (11): 1743-1748.
94. Yagi K (1994). Lipid peroxides a related radicals in clinical medicine free radicals in diagnostic medicine. Plenum Press New York.1-15. 121.
95. Mihara M, Uchiyama M, (1978). Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271-278.
96. Goth L (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*.196: 143-151.
97. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 34: 497-500.
98. Kemoterapötikler (2005). <http://www.e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/mised/eylul05/7.pdf> (20.06.2016)
99. Yılmaz L, Aslan G, Bodur H (2003). Romatoid artritli hastalarda ikinci basamak ilaç kullanımı, *Romatizma*; 18 (3): 141-150.
100. Kane D, Gogarty M, O'leary J, Silvia I, Bermingham N, Bresnihan B, Fitzgerald O (2004). Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with metotreksat. *Arthritidis Rheum.* 50 (10): 3286-95.
101. Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N (2003). Polymorphism in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose metotreksat therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med*, 11 (5): 593-600.
102. Das UN, Madhavi N (2011). Effect of polyunsaturated fatty acids on drug-

- sensitive and resistant tumor cells in vitro. *Lipids Health Dis.*14;10:159.
103. Am-in N, Kirkwood RN, Techakumphu M, Tantasuparuk W (2011). Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology* 15;75(5): 897-903.
 104. Ahmad S, Beg ZH (2013). Elucidation of mechanisms of actions of thymoquinone-enriched methanolic and volatile oil extracts from *Nigella sativa* against cardiovascular risk parameters in experimental hyperlipidemia. *Lipids in Health and Disease. Lipids Health Dis.* 13;12: 86.
 105. Ahmad S, Beg ZH (2016). Evaluation of therapeutic effect of omega-6 linoleic acid and thymoquinone enriched extracts from *Nigella sativa* oil in the mitigation of lipidemic oxidative stress in rats. *Nutrition* 32: 649-655.
 106. Sönmez MF, Çilenk KT, Karabulut D, Ünalımsı S, Deligönül E, Öztürk İ, Kaymak E (2016). Protective effects of propolis on metotreksat-induced testis injury in rat. *Elsevier, Biomedicine & Pharmacotherapy* 79: 44-51.
 107. Yüncü M, Bükücü N, Bayat N, Sencar L, Tarakçıoğlu M (2015). The effect of vitamin E and L-carnitine against metotreksat- induced injury in rat testis *Türk J Med Sci*, 45: 517-525.
 108. Gökçe A, Okar S, Koç A, Yonden Z (2011). Protective effects of thymoquinone against metotreksat-induced testicular injury. *Hum Exp Toxicol*, 30(8): 897-903.
 109. Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M (2008). Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by metotreksat in rats. *Andrologia*, 41: 105-110.
 110. Vardı N, Parlakpınar H, Ateş B, Otlı A (2010). The Preventive Effects of Chlorogenic Acid Against to Testicular Damage Caused by Metotreksat. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*; 30(2): 507-13.
 111. Shrestha S, Dhungel S, Saxena AK, Bhattacharya S, Maskey D (2007). Effects of metotreksat (MTX) administration on spermatogenesis: an experimental on animal model, Department of Anatomy, B. P. Koirala Institute of Health Science,

Dharan, Nepal.

112. Saxena AK, Dhungel S, Bhattacharya S, JHA CB, Srivastava AK (2004). Effect of chronic low dose of metotreksat on cellular proliferation during spermatogenesis in rats. Arch. Androl., 50: 33-35.
113. Işık A, Işılay L, Atabenli Erdemli E, Akbay C, Anafarta K (1997). Sıçan testisinde metotreksatın ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, cilt 50, sayı 3, 125-129.
114. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB (2009). Metotreksat-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: intervention of folic and folinic acid. Mutat Res, 673: 43-52.
115. Daggulli M, Dede O, Utangac MM, Bodakci MN, Hatipoglu NK, Penbegul N (2014). Protective effects of carvacrol against metotreksat-induced testicular toxicity in rats. Int J Clin Exp Med. 7(12): 5511-5516.
116. Başkaya A (2007). Erkek Farelerde Menhaden Fish Oil (Omega-3 Yağ Asiti) ve Zeytinyağı Katkılarının Lipit Peroksidasyonu ve Bazı Biyokimyasal Değerlere Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Vet) Anabilim Dalı, Konya.
117. Acar N (2004). Doymamış Yağ Asidi İçeren Sıvı Yağlarla Beslenen Ratlarda Vitamin E İlavesinin Lipid Peroksidasyonuna Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Vet) Anabilim Dalı, Konya.
118. Song JH, Fujimoto K, Miyazawa T (2000). Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. J Nutr 130: 3028-3033.
119. Yam D, Eliraz A, Berry EM (1996). Diet and disease- The Israeli Paradox: Possible dangers of a high omega-6 polyunsaturated fatty acid diet. Isr J Med Sci 32: 1134-1143.

120. Yamaguchi Y, Kitagawa S, Imaizumi N, Kunitomo M, Fujiwara M (1993). Enhancement of aortic cholesterol deposition by dietary linoleic acid in cholesterol-fed mice: An animal model for primary screening of antiatherosclerotic agents. *J Pharmacol Toxicol Meth* 30: 169-175.
121. Ando K, Nagata K, Yoshida R, Kikugawa K, Suzuki M (2000). Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on lipid peroxidation of rat organs. *Lipids* 35: 401-407.
122. Nardini M, D' Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Di Felice M, Scaccini C (1995). Dietary fish oil enhances plasma and LDL oxidative modification in rats. *J Nutr Biochem* 6: 474-480.
123. Nardini M, Scaccini C, D'Aquino M, Benedetti CP, Felice DM, Tomassi G (1993). Lipid peroxidation in liver microsomes of rats fed soybean, olive and coconut oil. *J Nutr Biochem* 4: 39-44.
124. Dönmez T (2006). Fındık ve cevizin sıçanlarda serum lipitler, aterosklerotik lezyonlar ve prooksidant-oksidan denge üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi. İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya AD, İstanbul.
125. Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J (1998). Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, vol. 392, no. 6676, p. 559.
126. Palozza P (1998). Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutrition Reviews*, vol. 56, no. 9, pp. 257–265.
127. http://www.uptodate.com/contents/metotreksat-drug-information?source=search_result&search=metotreksat&selectedTitle=1~150#F194533 (05.09.2016)
128. www.micromedexsolutions.com/micromedex2/librarian/CS/06C2EE/ND_PR/evidencexpert/ND_P/evidencexpert/DUPLICATIONSHIELDSYNC/D9D990/ND_PG/evidencexpert/ND_B/evidencexpert/ND_AppProduct/evidencexpert/ND_T/evidencexpert/PFActionId/evidencexpert.GoToDashboard?docId=924079&contentSetId=100&title=Metotreksat&servicesTitle=Metotreksat&brandName=MTX

(05.09.2016)



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 : "Linoleik Asit'in Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Antioksidan ve Antiapoptotik Etkisi"
Çalışmacılar : Prof.Dr.Engin YENİLMEZ, Yük.Lis.Öğr.Beyza AYAN,
Doç.Dr.Ahmet ALVER, Arş.Gör.Ayşe ŞENTÜRK
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji ABD.

Etik Kurul Dosya No 2013/ 65	Etik Kurul Toplantı Tarihi 17.12.2013	Etik Kurul Toplantı No 2013/19	Etik Kurul Karar No 4
---	--	---	--------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN'ın başkanlığında; "Linoleik Asit'in Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Antioksidan ve Antiapoptotik 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. (17.12.2013)

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

10. ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : AYAN, Beyza
Uyruğu : TC
Yeri : Trabzon
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 0462 377 7737
Faks : -
E-Posta : beyzaayan@gmail.com
Yazışma adresi : KTÜ Histoloji ve Embriyoloji AbD

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	KTÜ Histoloji ve Embriyoloji AD	2016
Lisans	Atatürk Üni. Fen Fak. Biyoloji Böl	2010
Lise	Trabzon Lisesi	2001

AKADEMİK / MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Sağlık Eğitmeni	Zen Halkla İlişkiler Eğitim Danş.	2013-2015
2. Sağlık Eğitmeni	Zen Halkla İlişkiler Eğitim Danş.	2010-2011

YABANCI DİL

İngilizce