



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA METHOTREXATE
KAYNAKLI TESTİS HASARINA KARŞI
***Laurocerasus officinalis* Roem. (Karayemiş)' in**
ANTIAPOPTOTİK VE ANTİOKSİDAN
ETKİLERİ

Gülşen YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

TRABZON – 2014



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA METHOTREXATE
KAYNAKLI TESTİS HASARINA KARŞI
***Laurocerasus officinalis* Roem. (Karayemiş)' in**
ANTIAPOPTOTİK VE ANTİOKSİDAN
ETKİLERİ

Gülşen YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

TRABZON – 2014

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Gülsen YILMAZ'ın hazırladığı “Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı *Laurocerasus officinalis* Roem. (Karayemiş)’ in Antiapoptotik ve Antioksidan Etkileri” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca, kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Yrd. Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU

Tarih: 05 /02 /2014

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

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

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 eseri olduğunu, tezde yer alan, 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.

20. 01. 2014
Glсен YILMAZ

İTHAF

Bu yüksek lisans tezimi hayatını çocuklarına adanmış, sevgili babam Mustafa YILMAZ' a ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen anabilim dalı başkanımız saygıdeğer hocam Prof. Dr. Engin YENİLMEZ' e; yüksek lisans tezim vasıtasıyla tanıştığım, bu zorlu süreçte her an desteğini hissettiğim ve hayatımın tüm aşamalarında yer almasından mutluluk duyacağım Recep Tayyip ERDOĞAN Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Nimet BALTAŞ' a; KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü Prof. Dr. Ahmet KALKAN, enstitü sekreteri Ömer DOĞAN ve yazı işlerinde görev yapan Hülya YÜCESAN'a; bilgilerini ve deneyimlerini bizimle paylaşan KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI, Arş. Gör. Hüseyin ŞAHİN ve Recep Tayyip ERDOĞAN Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde görev yapan Arş. Gör. Arife Pınar EKİNCİ' ye; KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ersan ODACI, Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Doç. Dr. Esin YULUĞ ve Yrd. Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU' na; dostluğun sabır olduğunu öğrendiğim sevgili arkadaşlarım Zümra ŞAHİN, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Feyza DEMİR ve KTÜ Eğitim Bilimleri Enstitüsü Kimya Eğitimi Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Neşva AKSU' ya, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Bilişimi Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Uğur TOPRAK' a, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tüm uzmanlık, doktora ve yüksek lisans öğrencilerine; KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi çalışanlarına ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, hep yanımda olmalarını istediğim sevgili aileme teşekkür ederim.

Yük. Lis. Öğr. Gülşen YILMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İç Kapak Sayfası	
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	ix
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Testis Anatomisi	4
4.2. Testis Embriyolojisi	5
4.3. Testis Histolojisi	7
4.3.1. Seminifer Tübüller	7
4.3.1.1. Seminifer Tübül Epiteli	8
4.3.2. Sertoli Hücresi	8
4.3.3. Spermatogenik Hücreler (Germinal Hücreler= Germ Hücreleri)	10
4.3.3.1. Spermatogonyum (Gonosit)	10
4.3.3.2. Primer spermatosit	11
4.3.3.3. Sekonder spermatosit	11
4.3.3.4. Spermatid	11
4.3.3.5. Spermatozoon (Spermium)	13
4.3.4. Seminifer Epitelyum Siklusu	14
4.3.5. İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri	14
4.4. Epididimis	15
4.5. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	16

4.5.1. Serbest Oksijen Radikalleri	17
4.5.2. Serbest Radikallerin Etkileri	18
4.5.2.1. Proteinlere Etkisi	18
4.5.2.2. Lipid Peroksidasyonu	18
4.6. Antioksidanlar ve Antioksidan Savunma Sistemleri	19
4.6.1. Endojen Antioksidanlar	19
4.6.2. Eksojen Antioksidanlar	20
4.7. Methotrexate	20
4.8. <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem. (Karayemiş)	21
5. GEREÇ ve YÖNTEM	22
5.1. Kullanılan Cihazlar	22
5.2. Deney Hazırlığı	23
5.2.1. <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem. (Karayemiş) Meyve Ekstraktının Hazırlanması	23
5.2.2. Toplam Fenolik Madde Tayini	23
5.2.3. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC)	24
5.2.4. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi	25
5.3. Deney Aşaması	26
5.3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı, Barınması ve Temini	26
5.3.2. Çalışmada Kullanılan Gruplar ve Deneyin Uygulanması	27
5.4. Histolojik İşlemler	28
5.4.1. Kan ve Doku Numunelerinin Elde Edilmesi	28
5.4.2. Bouin Fiksatifinin Hazırlanışı	30
5.4.3. Kesitlerin Alınması	30
5.4.4. Kesitlerin Hematoksilen ve Eozin (H.E) ile Boyanması	31
5.4.5. Epididimiste Sperm Sayımı, Motilite ve Vitalite Değerlendirmeleri	33
5.5. İmmünohistokimyasal İşlemler ve Analizler	34
5.5.1. TUNEL Boyama	34
5.6. Plazmada Yapılan Biyokimyasal Testler	35
5.6.1. Plazma ve Testis Doku Örneklerinde Protein Tayini	35
5.6.2. Plazmada Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini	36
5.6.3. Plazmada Malondialdehid (MDA) Seviyesinin Belirlenmesi	37

5.6.4. Plazmada Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi	38
5.6.5. Protein Karbonil Ölçümü	40
5.7. Testis Dokusunda Yapılan Biyokimyasal Testler	41
5.7.1. Testis Dokusunda CAT Aktivitesinin Tayini	41
5.7.2. Testis Dokusunda MDA Tayini	42
5.7.3. Testis Dokusunda SOD Tayini	43
5.8. İstatistiksel Analiz	45
6. BULGULAR	46
6.1. Antioksidan Kapasitesine Ait Bulgular	46
6.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı	46
6.1.2. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC)	47
6.1.3. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi	47
6.2. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular	49
6.3. Semen Analizine Ait Bulgular	58
6.4. Biyokimyasal Bulgular	59
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	62
8. KAYNAKLAR	66
9. ETİK KURUL ONAYI	76
10. ÖZGEÇMİŞ	77

TABLÖLAR DİZİNİ

vi

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Toplam fenolik madde tayininde yapılan işlemler	24
Tablo 2. CUPRAC tayininde kullanılan miktarlar	25
Tablo 3. DPPH yöntemi için deney şartları	26
Tablo 4. Çalışmada kullanılan gruplar ve gruplara yapılan uygulamalar	27
Tablo 5. Plazma CAT aktivitesinde kullanılan miktarlar	36
Tablo 6. Plazma SOD analizi için kullanılan miktarlar	40
Tablo 7. Doku CAT aktivitesinde kullanılan miktarlar	41
Tablo 8. Doku SOD analizi için kullanılan miktarlar	45
Tablo 9. Karayemiş numunesinde toplam fenolik madde miktarı	46
Tablo 10. Karayemiş numunesinin bakır (II) indirgeme kuvveti	47
Tablo 11. Histolojik incelemelerin ortalama ve standart sapma değerleri	54
Tablo 12. Testis dokusunda Johnsen Skoru ve Apoptotik İndeks değerlendirilmesi	58
Tablo 13. Semen analizine ait bulgular	59
Tablo 14. Kan plazması biyokimyasal değerlendirmeleri	60
Tablo 15. Testis dokusu biyokimyasal değerlendirmeleri	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

vii

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar	22
Şekil 2. Gallik asit standart çalışma grafiği	46
Şekil 3. Troloks standart çalışma grafiği	47
Şekil 4. Troloks standart çalışma grafiği	48
Şekil 5. Karayemiş ekstraktına ait DPPH çalışma grafiği	48
Şekil 6. Plazma için hazırlanan MDA standart çalışma grafiği	59
Şekil 7. Plazma için hazırlanan SOD standart çalışma grafiği	60
Şekil 8. Testis dokusu için hazırlanan MDA standart çalışma grafiği	61

RESİMLER DİZİNİ

viii

Resim	Sayfa
Resim 1. Sıçanların bakımı ve barınması	27
Resim 2. Testis çıkarılışı	29
Resim 3. Makler Sayım Kamerası	33
Resim 4. Kontrol grubu. Mikrofotografi X400 H.E	49
Resim 5a. MTX grubu. Mikrofotografi X400 H.E	50
Resim 5b. MTX grubu. Mikrofotografi X400 H.E	51
Resim 6. MTX+LO grubu. Mikrofotografi X400 H.E	52
Resim 7. LO grubu. Mikrofotografi X400 H.E	53
Resim 8. MTX grubu. Mikrofotografi X400 DAB boyama	55
Resim 9. MTX+LO grubu. Mikrofotografi X400 DAB boyama	56
Resim 10. LO grubu. Mikrofotografi X400 DAB boyama	57

Kısaltmalar

ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
AI	Apoptotik İndeks
AOPP	İleri Oksidasyon Protein Ürünleri
ATP	Adenozin Trifosfat
ATPaz	Adenozin Trifosfataz
BSA	Bovin Serum Albumin
CAT	Katalaz
CUPRAC	Bakır II iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini
dk	Dakika
DPPH·	2,2 Difenil-1-pikril Hidrazil
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
H.E	Hematoksilen ve Eozin
IM	Işık Mikroskopi
i.p	İntraperitoneal
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LH	Luteinleştirici Hormon
LPO	Lipid Peroksidasyonu
LO	<i>Laurocerasus officinalis</i> Roem.
MDA	Malondialdehid
MTX	Methotrexate
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NADPH	Nikotinamid Dinükleotid Fosfat
PAS	Periyodik Asit Schiff
PC	Protein Karbonil
PBS	Phosphate Buffer Solution

pH	Power of Hydrogen
RDA	Recommended Dietary Allowance
ROS	Reaktif Oksijen Süpürücüler
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SER	Düz Endoplazmik Retikulum
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikali
SRX	Sex-Determining Region of the Y Chromosome
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBF	Testis Belirleyici Faktör
TdT	Terminal Deoxynucleotidy Transferase
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi
TMP	1,1,3,3-Tetrametoksipropan
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidy Transferase Deoxyuridine Triphosphate Nick End Labeling Assay
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

Simgeler

cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
gr	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
m	Metre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
N	Normalite
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar

μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre

Formüller

CH_2	Metilen
CuCl_2	Bakır II Klorür
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Bakır (II) sülfat pentahidrat
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H_2SO_4	Sülfirik asit
H_3PO_4	Fosforik asit
KCl	Potasyum klorür
KH_2PO_4	Potasyum hidrojen fosfat
O_2	Oksijen
$\text{O}_2^\cdot$	Süperoksit
$\text{OH}^\cdot$	Hidroksil radikali
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Amonyum sülfat
NaOH	Sodyum hidroksit
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Disodyum hidrojenfosfat dihidrat
$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$	Amonyum Asetat
$\text{ROO}^\cdot$	Peroksit Radikali
$-\text{SH}$	Tiyol

1. ÖZET

Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı *Laurocerasus officinalis* Roem. (Karayemiş)' in Antiapoptotik ve Antioksidan Etkileri

Bu çalışma, Methotrexate (MTX) uygulandıktan sonra antioksidan olarak verilen *L. officinalis* Roem. (Karayemiş=LO)'in testisler üzerindeki antioksidatif ve antiapoptotik etkilerinin olup olmadığını araştırma amacıyla yapıldı.

Araştırmada 12 haftalık 250-300 gr aralığında 24 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her biri altı denekten oluşan dört gruba ayrıldı. Kontrol grubu sıçanlarına deney süresince (5 gün) herhangi bir uygulama yapılmadı. MTX ve MTX+LO grubuna deneyin birinci günü tek doz MTX (30 mg/kg) intraperitoneal (i.p) olarak enjekte edildi. MTX+LO ve LO gruplarına 5 gün boyunca her gün aynı saatte LO meyvesi ile hazırlanan ekstrakt (10 gr/kg) gavaj yöntemi kullanılarak verildi. 5. gün sonunda denekler anestezi altındayken, karın boşluğuna girilerek her iki testis ve epididimis çıkarıldı ve kansızlaştırma yöntemiyle ötanazi yapıldı. Alınan testislerin biri histolojik; kan ve diğer testis ise biyokimyasal incelemeler için kullanıldı. Çıkarılan epididimisten alınan spermlerin motilite ve vitalite değerlendirmeleri yapıldı.

Kontrol grubu sıçanların testis yapısı, testis ve plazmadaki biyokimyasal parametreler normal olarak izlendi. MTX grubuna ait seminifer tübüllerin lümenlerinde immatür germinal hücreler, bazal kompartımanında Sertoli hücreleri ile spermatogoniumlar arasında açılma ve germinal epitelde yer yer vakuolizasyon izlendi. MTX grubuna ait testis ve kan biyokimyasal analizinde MDA, SOD, CAT, PC değerlerinin oldukça arttığı, sperm canlılık ve hareketliliğinin anlamlı derecede azaldığı belirlendi. MTX+LO grubunda apoptoz indeksi, MDA, SOD, CAT, PC seviyesi MTX grubuna göre anlamlı olarak azaldığı; sperm canlılık ve hareketliliğinin ise anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. MTX+LO grubunda testis histolojisi ve biyokimyasında MTX' in oluşturduğu bozuklukların önemli ölçüde düzeldiği belirlendi. LO grubundaki tüm parametrelerin kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği izlendi.

Bulgularımız MTX' in oksidatif etki ile testiste yapısal bozukluklar oluşturduğu ve sperm kalitesini azalttığını; LO meyvesinin antioksidan etkiyle, bu hasarı düzelttiğini, sperm motilite ve vitalitesini arttırdığını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, mikroskopi, oksidatif stres, *Prunus laurocerasus*, sperm

2. SUMMARY

Antiapoptotic and Antioxidant Effects of *Laurocerasus officinalis* Roem. (Cherry Laurel) Against Methotrexate-induced Testicular Damage in Rats

The aim of this study was to investigate the possible protective role (antioxidant and anti-apoptotic effects) of *L. officinalis* Roem. (Cherry laurel=LO) on testicular toxicity of Methotrexate (MTX) in rats.

Twelve weeks old, twentyfour male Sprague Dawley (250-300 gr) rats were divided into four groups as follows: control group, MTX group, MTX+LO group, LO group. Control group had never been administered anything during the experiment. In the first day of experiment, a single dose of Methotrexate (30 mg/kg) was intraperitoneally administered to groups MTX and MTX+LO. Extract of *L. officinalis* Roem. (10 gr/kg) was administered by gavage to groups MTX+LO and LO for 5 days. After 5 days, the testes and epididymis of the animals were removed and abdominal aorta of the animals were drawn blood to sacrifice. One of two testes was used for histological examinations, the other testis and the blood were used for biochemical analysis. Motility and vitality of sperms were evaluated in removed epididymis.

Testicular structure of control group was seen normally and malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and protein carbonyl (PC) level was found low. In MTX group, immature germinal cells were found in lumens of seminiferous tubules and, vacuolization was seen in germinal epithelium. Separation was seen between Sertoli cells and spermatogonium. Testicular and blood biochemical analysis of MTX group was resulted as MDA, SOD, CAT and PC level high, but motility and vitality of sperm was low. In MTX+LO group, index of apoptosis, MDA, SOD, CAT and PC level were significantly decreased, motility and vitality of sperm was significantly increased in relation to MTX group. Histology and biochemistry of testis was magnificantly treated for disorders of MTX. Parameters of LO group were similar to control group.

As a result, this study shows that antioxidant and anti-apoptotic effects of LO could repair MTX-induced testicular damage and oxidative stress and amplify motility and vitality of sperms.

Key Words: Apoptosis, microscopy, oxidative stress, *Prunus laurocerasus*, sperm

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Üreme yeteneğinin istek dışında azalması ya da kaybolmasına infertilite (kısırlık) denilmektedir. İnfertil çiftlerin yaklaşık %40' ında problem kadında, %40' ında erkekte, %20' sinde ise çiftin her ikisinde bulunmaktadır. İnfertilite fiziksel, psikososyal, sosyoekonomik ve çevresel faktörlerin etkisiyle oluşur. Erkek infertilitesi erkek genital organ hastalıkları ve anomalileri, sperm anomalileri ve fonksiyon bozuklukları, sigara, alkol, uyuşturucu madde kullanımı, kimyasal maddelere ve radyasyona maruz kalma, kemoterapi ve ilaç gibi etkenlerle ortaya çıkar (1).

Kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçların çoklu organ sistemlerinde akut toksik yan etkiler oluşturduğu iyi bilinmektedir (2). Bir folik asit antagonisti olan Methotrexate (MTX) uzun yıllardır antikanser ilacı olarak kullanılmaktadır (3). Tek doz MTX' in uygulanması, testislerde oksidatif stresin artmasına neden olur. MTX' in testis toksisitesi önemli bir yan etkidir ve infertiliteye yol açabilir (4). Oksidatif stres testis ve üreme hücrelerinin yapısında hasara öncülük eder (5, 6). MTX' a maruz kalmış bir erkekte, başta oligozoospermi olmak üzere hücrel kromozom değişiklikleri de oluşmaktadır (7, 8). Ayrıca, MTX oogeneze, spermatogeneze ve fertilitate zarar verir (9, 10).

Rosaceae (Gülgiller) familyasına mensup *Laurocerasus officinalis* Roem. (sinonim: *Prunus laurocerasus* L.) Türkiye' nin kuzey kıyı bölgesinde yetişen, yerel ismiyle "Karayemiş" ya da "Taflan" olarak bilinen, 6 m yüksekliğinde, yaprak dökmeyen bir ağaç türüdür. Halk arasında taze yaprakları ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanılır (11). LO taze meyvesi kimyasal ve antioksidan özellikleri bakımından test edilmiş; yüksek miktarda su, protein, pektin ve şeker yanında çeşitli fenolik bileşenler ve mineraller içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca yapısında bulunan askorbik asit meyvenin antioksidan özellik kazanmasını sağlar (12).

Antioksidan özelliğindeki bileşenler MTX tarafından indüklenen oksidatif stresin toksik etkilerine karşı testis dokusunu koruyabilir (10).

LO meyvesinin antiapoptotik ve antioksidan etkileri MTX kaynaklı testis hasarına karşı daha önce kullanılmamıştır. Bu çalışma Doğu Karadeniz bölgesinde bolca ve doğal olarak da yetişen bu bitkinin, antioksidan özelliği sayesinde testis hasarı ve semen anomalilerini düzeltebileceği düşünülerek gerçekleştirilmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi, üreme hücrelerini (spermatozoa) yaratan bir çift temel üreme organı (gonada, testis) ile bu hücreleri vücut dışına taşıyan iletili yollar (viae genitales), bu yollara açılan eklenti bezleri ve penisten oluşur.

Üreme organları yerleşim yerine göre iç üreme organları ve dış üreme organları olarak iki gruba ayrılır. Testisler, iletili yollar (epididimis, ductus deferens, ductus ejakulatorius) ve eklenti genital bezler (vezikula seminalis, prostat ve bulboötretral bez) iç üreme organlarını; penis ve skrotum ise dış üreme organlarını oluşturur (13).

4.1. Testis Anatomisi

Erkek üreme organı olan testisler, sağlı sollu olmak üzere bir çift halinde skrotum denen deri bir torba içinde bulunurlar. Her bir testis oval biçimde olup, yanlardan basıktır. Testislerin her biri yaklaşık 10-14 gr ağırlıkta, 4-5 cm boyunda, 2.5 cm genişliğinde ve 3 cm kalınlığındadır. Sol testis 1 cm kadar daha aşağıdadır. Testislerin dış ve iç iki yüzü (facies medialis, facies lateralis), ön ve arka iki kenarı (margo anterior, margo posterior), üst ve alt olmak üzere iki ucu (extremitas superior, extremitas inferior) vardır (14, 15).

İntrauterin hayatta karın boşluğunda yer alan testisler, doğumdan hemen önce kanalis inguinalisten geçerek skrotuma iner. Bu geçiş sırasında karın boşluğunda kendisini saran periton kesesini de beraberinde taşır. Doğumdan sonra bu kese periton boşluğuyla ilişkisini keserek tunika vajinalis adını alır. Tunika vajinalisin skrotumun iç yüzünü döşeyen parietal yaprağı (periorşium) ile testisin üzerini örten visseral yaprağı (epiorşium) arasında çok az miktarda seröz sıvı bulunur (16, 17). Testise gelen ve testisten çıkan damar ve sinirler de testisin skrotuma inişi sırasında onu takip ederler. Bu oluşumlar bir araya gelerek funikulus spermatikus denen bir kordon oluşturur. Funikulus spermatikus testisin skrotumda asılı durmasını sağlayan yapıdır (17, 18).

Testis tunika vajinalis, tunika albuginea ve tunika vaskulosa ile sarılmıştır. Bu üç tabaka testis kapsülü olarak isimlendirilir. Bu kapsül spontan kasılmalar yapar.

Tunika albuginea kalın fibröz bir örtüdür. Çok miktarda kollajen lif içeren bu örtünün elastikiyet ve genişleme özelliği azdır. Tunika albuginea arka kenarı hariç dıştan epiorşium ile örtülüdür. Peritonun bulunmadığı arka kenara ise epididimis tutunur ve

buradan testisin damarları girip çıkar. Tunika albuginea, arka kenarda testisin içine doğru kalın ve vertikal yarım bir bölme şeklinde uzantı gönderir. Bu bölmeye mediastinum testis denilir (15, 16). Mediastinum testisin ön ve yan kısımlarından çıkan uzantılara septula testis adı verilir. Tunika albugineanın iç yüzeyine tutunan bu uzantılar testisi lobüllere ayırır. Her lobül içinde de tubuli seminiferi kontorti denen kanalcıklar bulunur. Spermiumlar bu kanalcıkların duvarlarında gelişmelerini tamamlar. Seminifer tübüllerin başlangıç kısmı kıvrıntılı, son kısmı ise düzdür. Tubuli rekti denilen bu düz kısımlar mediastinum testisin fibröz dokusuna sokulur. Burada kanalların anastomozu sonucu rete testis denilen ağ oluşur. Rete testisi yapan kanalcıklar mediastinum testisin üst ucunda duktuli efferentes denilen kanallarla devam ederler. Duktuli efferentes ise tunika albugineayı delerek testislerden epididimise geçer (17).

Tunika vaskulosa, tunika albugineanın iç yüzeyinde bulunan damar ağ tabakasıdır. Tunika albugineanın iç yüzünü ve testis içindeki tüm lobüllerin yüzlerini örter (15).

Testisler aortanın dalı olan arteria testikularisten beslenirler. Herbir testisin arka tarafından çıkan küçük venler birleşerek plexus pampiniformis denilen venöz ağ yaparlar. Bu venöz ağdan önce iki, sonra bir vena testikularis oluşur. Sağ vena testikularis cava inferiora, sol vena testikularis ise vena renalis sinistraya açılır (16).

Testisleri innerve eden simpatik lifler 9-12. göğüs spinal segmentlerinden çıkar. Bu lifler plexus aortikus ve plexus renalisten ayrılarak arteria testikularis çevresinde plexus testikularisi oluştururlar (17).

4.2. Testis Embriyolojisi

Embriyonun kromozal ve genetik cinsiyeti, sekonder oositi dölleyen sperm türüne bağlı olarak fertilizasyonla belirlenir. Gonadların erkek ve dişiğe farklılaşmaları, yani gonadal cinsiyet yedinci haftada olur ve XX, XY kompleksine bağlıdır.

Gonadlar üç yerden köken alarak gelişirler:

- 1- Posterior karın duvarını döşeyen sölom epiteli (mezotelyum)
- 2- Sölom epiteli altındaki mezenşim
- 3- Vitellüs kesesi arka duvarında oluşan ilkel cinsiyet hücreleri (Primordial germ hücreleri) (19).

Gonadlar ilk olarak bir çift gonadal ya da genital kabartı denilen, sölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla gelişimin 5. haftasında belirirler (20).

Gelişmenin dördüncü haftasında, vitellüs kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında görülen primordiyal germ hücreleri, ameboid hareketlerle son barsak mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek, altıncı haftada gonadal kabartılara göç ederler. Bu göçten biraz önce ya da göç esnasında sölom epiteli tekrar proliferer olur ve mezenşime yayılarak primitif cinsiyet kordonları oluştururlar. Bu kordonlar hem dişi hem erkek gonadlarında çok benzerdirler ve farklanmamış gonad olarak isimlendirilirler.

Eğer embriyo erkekse, primordiyal germ hücreleri XY cinsiyet kromozom kompleksini taşırlar. Y kromozomu kısa kolu üzerindeki SRY (Sex-determining region of the Y Chromosome) bölgesinde yer alan Testis Belirleyici Faktör (TBF) geni, farklanmamış gonad üzerinde etkiye sahiptir. Bu faktör etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları çoğalmaya devam ederler ve gonad medullası içine doğru uzanırlar. Oluşan bu kordonlara testis ya da medulla kordonları adı verilir. Testis kordonları, gonadın hilusunda ince hücre kordonlarına bağlanarak, rete testis tübüllerini oluşturacak bir ağ şekline dönüşürler. Gelişimin ilerleyen evrelerinde, kalın fibröz bir kapsül olan tunika albuginea oluştuğunda testis kordonları yüzey epiteliyle bağlantılarını kaybederler (19, 20).

12. haftada tunika albugineanın gelişmesi, karakteristik olup testisin geliştiğinin önemli bir göstergesidir. 16. haftada testis kordonları at nalı biçimini alırlar ve uç noktaları birleşerek tubuli rektleri yaparlar. Testis kordonları bu evrede, primitif cinsiyet hücreleri ve sölom epitelinden köken alan Sertoli hücrelerini içerirler (19).

Gonadal kabartının orijinal mezenşiminden köken alan Leydig hücreleri testis kordonları arasında bulunur. Gestasyonun sekizinci haftasında Leydig hücreleri, testosteron üretimine başlarlar.

Puberteye kadar içi dolu olarak kalan testis kordonları, pubertede lümen kazanırlar ve seminifer tübül adını alırlar. Seminifer tübüller bir kere kanalize olduktan sonra, rete testis tübüllerine açılır ve bunlar da duktuli efferentse bağlanırlar. Efferent duktuslar mezonefrik sistemin geri kalan boşaltım tübülleridir. Bu kanallar, rete testis ile

mezonefrik veya Wolff kanallarından oluşan epididimis arasında bir bağlantı işlevi görürler (20).

Giderek büyüyen testis, gerileyen mezonefroza ayrılır ve mezorkium denilen kendi mezenteriyiyle asılı durur. Testis gelişmesinin son aşamasında, yüzey epiteli yassılaşıp ergin testisin dış yüzünü döşeyen tek katlı mezotelyum yapısını oluşturur (19).

4.3. Testis Histolojisi

Testislerin içinde asılı pozisyonda durduğu deri ve fibromusküler bir yapıya sahip olan skrotumun yağ dokusuna sahip olmayışı, damardan ve ter bezinden zengin oluşu nedeniyle testis ısısı karın içinden daha düşüktür (21, 22).

Testisler ekzokrin ve endokrin salgı yapan birleşik tubuler bir bezdir (21). Testisleri saran tunika albugineanın, testisin arka yüzünde kalınlaşarak oluşturduğu mediastinum testis, testis içine doğru fibröz uzantılar (septum) yaparak testiküler lobüller denilen yaklaşık 250 piramidal bölme oluştururlar. Bu uzantılar tam değildir ve bölmeler çoğunlukla birbirleriyle ilişkilidir. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül yer alır. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken testisin ekzokrin işlevini, interstisyel hücreler de testiküler androjenleri salgılayarak testisin endokrin işlevini yaparlar (22).

4.3.1. Seminifer Tübüller

Spermatozoonlar seminifer tübüllerde üretilir. Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Her tübül 0,2 mm çapta, 30-70 cm uzunluktadır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Tübüller kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçludur. Sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller ya da tubuli rekti olarak anılan kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanallarını oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır (21, 22).

Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık germinal ya da seminifer epitel ile döşeli kanallardır (22, 23).

4.3.1.1. Seminifer Tübül Epiteli

Seminifer tübül epiteli modifiye çok katlı kübik epitelidir. Epitelin üzerine oturduğu bazal lamina elastik fibrillerden zengin olup yaşlandıkça kalınlığı artar. Bazal laminanın dışında peritübüler doku (tunica propria) bulunur. Peritübüler doku tabakalar halinde yerleşmiş bağ dokusu fibrilleri ve fibroblastlardan oluşur. En iç kısımda (bazal laminaya yakın) 3-4 tabakalı yassı epitele benzer myoid hücreler bulunur.

Myoid hücreler kendi içinde doğan impulslarla kontraksiyonlar yapabilir fakat gerçek düz kas hücresi değildirler. Bu yassı hücrelerin sitoplazmalarında aktin filamentleri bulunur (21, 24). Aşağı sınıf hayvanlarda kontraksiyonların seminifer tübüllerde spermiumların ilerlemesini kolaylaştıracağı düşünülmüştür. Fakat insanlarda bu fonksiyonu gösterilmemiştir. Myoid hücreler birbirlerine membranlarıyla tutunur, ancak makromoleküllerin seminifer tübüllere geçişini tamamen engellemezler.

Peritübüler dokunun dışında geniş lenfatik kapillerler bulunur. Böylece peritübüler doku ve lenf kapillerlerinin seminifer tübüllerle kan arasında madde değişimine bir engel oluşturduğu öne sürülmüştür (21).

Seminifer epitelde (germinal epitel) değişik spermatogenez evrelerindeki spermatogenik hücreler (germinal hücreler) ile spermium olgunlaşmasında destek ve beslenme görevini üstlenmiş olan Sertoli hücreleri olmak üzere iki ayrı hücre popülasyonu görülür (24).

4.3.2. Sertoli Hücresi

Sertoli hücreleri testislerin işleyişi açısından çok önemlidir. Bu hücreler spermatogenik serideki hücreleri saran uzamış piramidal hücrelerdir. Spermatogenik hücrelere kıyasla daha az sayıda bulunurlar. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Işık mikroskopunda, spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda yan uzantı nedeniyle, Sertoli hücresi sınırları iyi belirlenemez. Bu yan uzantılar sayesinde seminifer epiteldeki değişik tip hücreler bir arada tutulur. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin çok sayıda düz endoplazmik retikulumu (SER), az granüllü endoplazmik retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri, lizozom, mikrofibril, mikrotübül ve lipid inklüzyonları içerdiği gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin bazal kısımlarında kristal

yapı niteliğinde inklüzyonların varlığı dikkat çeker. Bunlar Charcot-Böttcher kristalleri olup, filamentöz yapıda gözlenir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış nükleusunda çok sayıda girintiler, belirgin nükleolus ve az miktarda heterokromatin bulunur (21, 22, 24). Olgun testiste bölünme göstermeyen Sertoli hücreleri ısı, radyasyon, toksik madde, enfeksiyon gibi etkenlere karşı oldukça dayanıklıdır (21).

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları arasında germinal hücrelerin beslenmesi ve destek görevi başta gelir. Seminifer tübül duvarında bazal laminadan lümene kadar uzanan sitoplazmaları boyunca, yakın ilişkide bulunduğu germinal hücrelere hem destek olur hem de bazal laminayla ilişkisi olmayan ve damarlardan uzak olan bu germinal hücrelere peritübüler kapillerlerden alınan besleyici maddeleri ulaştırır.

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

Sertoli hücreleri, germinal epitelde Spermatogenez ile Spermiyogenez sürecinde, dejenerasyona uğrayan hücresel yapıları fagosit ederler. Bu kalıntı cisimciklerin (residual body) fagositozu ile lipid inklüzyonlarına dönüştüğüne dair görüşler vardır (24).

Sertoli hücreleri olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve spermlerin taşınması için kullanılan bir sıvı salgılar. Androjen-bağlayıcı protein üretimi Sertoli hücreleri tarafından folikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir ve seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaştırılmasını sağlar. Bu hücreler aynı zamanda, ön hipofiz bezinden FSH sentezini ve salınmasını önleyen inhibin denilen bir peptid salgılar. Müller kanalını baskılayıcı hormon olarak da bilinen Anti-Müllerian hormon gelişme sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir ve immatür Sertoli hücreleri tarafından salgılanır (22, 24).

Ayrıca Sertoli hücrelerinin bütün germinal epitel hücreleri sıralarını kapsayacak şekilde, hem bazal kompartımanda hem de adluminal kompartımanda yer almış olması ve yanyana bulunan Sertoli hücreleri arasında da lateral yüzleri ile tutunma komplekslerinin bulunması ile seminifer tübül içinde senkronize Spermatogenezis sağlanmış olur. Böylece

Sertoli hücrelerinin tübül duvarında bütünlük sağlaması, aynı zamanda Kan-Testis Bariyeri oluşumunda Sertoli hücrelerinin önemini gösterir (24).

Seminifer tübüllerin iç kısmıyla kan arasında bir bariyerin bulunması, testiküler sıvıda kandan gelen çok az miktarda madde bulunmasına yol açar. Testiküler kapillerler pencere tiptedir ve büyük moleküllerin geçişine izin verirler. Spermatogonyumlar kanda bulunan maddelere kolayca ulaşabilir. Ancak, Sertoli hücreleri arasında bulunan engelleyici bağlantılar, bir bariyer oluşturarak büyük moleküllerin adluminal kompartmanda Sertoli hücreleri arasındaki boşluğa taşınmasını engeller. Böylece, Spermatogenezin daha ileri aşamalarındaki germinal hücreler, kandaki zararlı maddelere karşı korunmuş olur (22).

4.3.3. Spermatogenik Hücreler (Germinal Hücreler= Germ Hücreleri)

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

Spermatogenez, ana germ hücresi Spermatogonyumdan üreme ve büyüme periyodlarını izleyen mayoz bölünmeleri sonunda dört haploid kromozomlu Spermatid oluşumuna kadar gerçekleşen olayları kapsar. Oluşan Spermatidin hareketli bir Spermatozoona (Spermium) farklılaşması ise Spermioenez olarak isimlendirilir (22, 24).

4.3.3.1. Spermatogonyum (Gonosit)

Puberte başlayana kadar, Seminifer tübüllerde spermatogenik hücrelerden sadece spermatogonyumlar bulunur. Spermatogonyumlar Pubertede hormonal etki ile mitozla çoğalarak diğer tip hücreleri oluştururlar.

Spermatogonyum kendisinden gelişen hücre tiplerine göre daha küçüktür. Çekirdeğin büyüklüğü, biçimi, kromatin dağılımı ve histokimyasal özelliklerine göre koyu boyanan Tip A, açık boyanan Tip A ve Tip B olarak üçe ayrılır ve hepsi diploid kromozomludur (21, 24).

Koyu boyanan Tip A spermatogonyumlar, germinal epitelin kök hücresi olarak kabul edilen, küçük ve kubbe şeklinde hücreler olup, oval ve heterokromatik çekirdeğe sahiptir. Bu hücreler, hücre döngüsüne girmezler ve mitoz bölünme geçirerek yeni koyu ve açık A tipi spermatogonyumlara farklılırlar.

Açık boyanan tip A spermatogonyumlar, yuvarlak veya oval şekilli, ökromatik çekirdek ile açık sitoplâzmaya sahiptir. Bu hücreler A1, A2, A3 ve A4 olmak üzere dört jenerasyon halinde gözlenir. Birbirini takip eden bu serilerde, mitoz bölünme sonucunda meydana gelen A4 tipi spermatogonyum bölünür ve A ile B arasında bir geçit tipi olan ara spermatogonyumu oluşturur. Bu ara spermatogonyumlar ise B tipi spermatogonyumlara dönüşür.

B tipi spermatogonyumlar, küre şeklinde ve merkezi yerleşimli çekirdekçiğe sahip hücrelerdir. Bazı yazarlara göre bu hücrelerin de B1, B2, B3 ve B4 olmak üzere dört jenerasyonu vardır ve B tipi bu spermatogonyumlar, primer spermatositleri oluştururlar (25).

4.3.3.2. Primer Spermatosit

Seminifer epitelin orta kısmında bulunan, küre ya da oval biçimli, hacmi en büyük olan hücrelerdir. Oluşur oluşmaz birinci mayotik bölünmenin profaz evresine girerler. Profaz evresi çok uzun sürdüğünden dolayı en çok sayıda görülen hücrelerdir. Diploid kromozoma sahiptirler.

4.3.3.3. Sekonder Spermatosit

Primer spermatositin mayotik bölünmesi sonucu oluşan haploid kromozomlu küçük hücrelerdir. Haploid kromozomlu Sekonder spermatositler dişi ya da erkek gonozomların sadece birini içerir. Bu hücreler birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlıdır. Kısa bir sürede ikinci mayoz bölünmeyi geçirdiklerinden kesitlerde görülmeleri zordur. Bölünmesiyle Spermatid denilen hücreler oluşur.

4.3.3.4. Spermatid

Spermatidler, küçük boyutları (7-8 μm), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleusları ile ayırt edilebilirler. Seminifer tübüllerde lümen yakınına yerleşmişlerdir. Bu

hücreler haploid kromozomludur. Birbirleriyle sitoplazmik bağlantılar yapan sinsityal hücre kümesi oluştururlar.

Primer, Sekonder spermatosit ve Spermatidlerin arasındaki sitoplazmik köprüler Spermatogenezin düzenlenmesinde rol oynar ve hücreden hücreye bilgi alışverişine olanak sağlar. Spermatogenez tamamlanınca bu köprüler kaybolur ve hücreler serbestleşir.

Spermatogonyumlardan Spermatidlerin oluşmasıyla Spermatogenez tamamlanmış olur. Oluşan Spermatidler, Spermiyogenez aşamasına girerek Spermatozoonlara (Spermium) dönüşürler (21).

Spermiyogenez, Spermatozoon üretiminin son aşamasıdır ve Spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan Spermatozoona dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez.

Spermiyogenez, akrozom oluşumunu, nükleus yoğunlaşmasını ve uzamasını, flagellum gelişmesini ve sitoplazmanın çoğunun kaybolmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Sonuçta, daha sonra Seminifer tübül lümenine salınan olgun Spermatozoon oluşur. Spermiyogenez üç kısımda incelenebilir.

Golgi fazı denilen ilk aşamada, Spermatid sitoplazması, nükleusun yakınında yer alan belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum içerir. Proakrozomal granüller olarak adlandırılan küçük PAS (Periyodik asit Schiff) pozitif granüller Golgi kompleksinde birikir ve daha sonra birleşerek membranla sınırlı bir akrozomal vezikülün içinde yer alan tek bir akrozomal granülü oluştururlar. Sentriyoller göç ederek oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden nükleusa doğru göç ederken hareket ettikçe aksonemal bileşenleri çevresine sarar.

Akrozomal faz denilen ikinci aşamada ise akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom hiyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Bu enzimlerin, oositleri çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir.

Spermiyogenezin bu fazı sırasında, spermatid seminifer tübülün tabanına doğru yönelir ve aksonem lümene doğru uzanır. Ayrıca, nükleus uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriler de flagellumun proksimal kısmı etrafında toplanarak orta parça denilen kalınlaşmış kısmı oluştururlar. Bu bölge Spermatozoon hareketlerinin enerji kaynağını oluşturur. Flagellum hareketi, miktor b ller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur.

Maturasyon fazı denilen son aşamada geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir ve Spermatozoonlar tübülün lümenine salınırlar (22).

4.3.3.5. Spermatozoon (Spermium)

Farklı türlere ait Spermatozoonlar farklılık gösterse de esasta aynı ana yapılar yer alır. Spermatozoon çok uzun bir hücre olması ile (65  m) dikkat çeker. Baş, boyun ve kuyruk olarak üç ana kısımdan oluşur. Kuyruk kısmında esas parça, orta parça ve son parça halinde üç segment gözlenir.

 nsanda, baş uzun eksen boyunca 7  m olan yassılaşmış bir armut şeklini andırır. Nükleus hemen hemen baş bölgesini doldurur. Yoğun kromatin yapısı içinde kromatinden fakir aydınlık bölgeler nükleus vakuolleri olarak tanımlanır. Nükleusun 2/3  n kısmını örten akrozom başlığı, glikoprotein ile eritici enzimlerden zengindir.

Boyun bölgesi, baş ile kuyruk segmentlerini birleştiren kısa bir bölgedir. Burada yer alan bir ift Sentriollerin biri flagellumun aksonemasını oluşturur. Aksonema 9+2 formülüne uyan çift mikrotübüller içerir. Aksonema, boyunda fibröz bir halka oluşturmuş olup, etrafında sitoplazma örtüsü belirgindir.

Kuyruk bölgesinde segmentlerinden orta parçanın büyüklüğü, baş uzunluğuna yakındır. Bu segmentte flagellum aksoneması dışında longitudinal 9 kalın fibril demeti yer alır. Bunun dışında da spiral sıralanmış mitokondri topluluğu yer alır. Mitokondrilerin esas parçaya geçişini engelleyen ve fibröz bir kalınlaşma halindeki anulus burada yer alır.

Kuyruğun en uzun segmentini oluşturan esas parça, orta parçanın devamı olan merkezde aksonema ile longitudinal fibröz fibril demeti dışında, sirküler sıralanmış fibröz yapılarla dikkat çeker. Longitudinal fibriller ile fibröz yapıların iki bölgede birleşerek orta

parça yapısında bir asimetri oluşturması, hareket fonksiyonu ile ilgilidir. Son parça, aksonemadan oluşan kısa bir sonlanma halinde gözlenir (24).

4.3.4. Seminifer Epiteyum Siklusu

Seminifer epiteyum siklusu (döngüsü), epiteyumda belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan maturasyon değişiklikleri dizisidir (26). İnsan ve sıçanlarda spermatogenez süreci çok benzer olmasına karşın bazı farklılıklar içermektedir. Erkek sıçanlarda testislerin skrotuma inmesiyle beraber ilk sperm üretimi yaklaşık 45. günde başlar ancak optimum üretim 75 günde gerçekleşir (27). İnsanlarda her spermatogenik döngü arasında yaklaşık 16 gün bulunurken sıçanlarda bu süre 12 gündür. Sıçanlarda bir spermatogenik siklusun tamamlanması için 52-54 gün gerekirken insanlarda bu süre 65 gündür. Sıçanlarda spermatogoniyal farklılaşma 12. gün sonlarında, insanlarda da 16. günde başlar ve spermatositlerin gelişimi için sıçanlarda 14 gün, insanlarda ise 25 gün gereklidir. Sıçanlarda haploid germ hücrelerinden olgun sperme dönüşüm süreci olan spermiyogenezis 7-14 gün iken insanlarda ise bu süreç 8-14 gündür (28, 29).

4.3.5. İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri

Testisin interstisyel dokusu, androjen üretimi açısından önemlidir. Testis lobülleri içinde Seminifer tübüllerin aralarını dolduran interstisyum, bağ dokusu lifleri ve hücreleri (fibrosit, lenfosit, mast hücreleri ve makrofajlar), yanında özel bir hücre grubu olan Leydig hücreleri ile kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirlerden zengin bir ara doku yapısında gözlenir. Testiküler kapillerler pencerelidir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin geçişine izin verir. İnterstisyel alanda lenf damarlarının oluşturduğu yoğun ağ, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır.

Erken fõtal hayatta gelişen testiste çok sayıda bulunan Leydig hücreleri, fõtal testise kan yoluyla ulaşan plasental kaynaklı gonadotropinler tarafından uyarılması sonucu hormon üretimine başlar. Sentezledikleri testosteron erkek genital organların embriyolojik farklılaşmasında etkindir. Gebelięin 4-5 ayına kadar Leydig hücreleri tam gelişmiştir. Daha sonra dejenerasyona uğrarlar, dolayısıyla testosteron düzeyi de giderek düşer. Doğumda bu uyarı kalkar ve sonrasında Leydig hücrelerinde atrofi artar. Ancak

pubertede hipofiz hormonlarının (LH) uyarmasıyla Leydig hücreleri görülmeye başlamaktadır. Leydig hücreleri insanda testis dokusu hacminin %12' sini oluştururlar.

Leydig hücreleri tübüllerin arasında özellikle lenfatiklere yakın konumda gruplaşmalar yaparlar. Büyük, oval ve eksentrik konumlu nükleusları ile kolayca tanınırlar. Sitoplazmaları eosinofil olup, ışık mikroskopunda veziküllü görünüştedirler. Elektron mikroskop görüntülerinde SER çok iyi gelişmiş olduğu ve lipid inklüzyonları ile yakın topografik ilişki içinde oldukları gözlenir. Bu yapı steroid salgılayan hücre tipine uygundur. Mitokondri ve iyi gelişmiş Golgi kompleksi ile nadiren sentriol bulunur. Leydig hücrelerinde lipid ile birlikte, lipopigment granulalara rastlanır. Bu granular yaş ilerledikçe artar. Bu hücrelerde, organeller ve steroid sentezinde gerekli inklüzyonlar dışında, Reinke kristalleri denilen uzun kristal yapılara da rastlanır. Bu kristaller genelde hegzagonal olup bazen birleşebilirler. Reinke kristalleri haricinde Piring cisimleri (Rice body) de görülebilir.

Leydig hücrelerinin salgıladığı testosteron, Spermatogenezin sürdürülmesi ve erkekte sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişimi için gereklidir (21, 22, 24).

4.4. Epididimis

Testis içi genital kanallar tubuli rekti, rete testis ve duktuli efferentestir. Bu kanallar, seminifer tübüllerden gelen sıvıyı ve spermatozoonları duktus epididimise taşıır.

Testiste üretilen spermatozoonları penise doğru taşıyan kanallar duktus epididimis, duktus deferens (vas deferens) ve uretradır (24).

Epididimis, çok sayıdaki duktuli efferentes kanallarının tek kanal halinde toplanıp kıvrıntılı bir kanal halindeki devamıdır. Duktus epididimis, düzleştirilmiş halde 4-6 m uzunlukta olmakla beraber, kıvrıntılı toplu halde 5 cm' lik bir uzunluk içine yerleşmiştir (22, 24).

Epididimis; kaput epididimis, korpus epididimis ve kauda epididimis olmak üzere üç bölgeye ayrılır. Kıvrımların etrafı bağ dokusu, kas ve interstisyum ile birlikte bir organ oluşturur. Epididimis duvarını döşeyen epitel iki sıralı olup, altta izoprizmatik ve üstte prizmatiktir. Prizmatik hücrelerin lümene bakan yüzünde sitoplazmik uzantılar halinde stereosilya yapıları bulunur. Stereosilyalar pasif kasılma hareketleri yapabilme yeteneğindedirler.

Epitel, bazal lamina üzerine oturmuştur; dışta ince bir lamina propria yer alır. Sirküler sarılmış düz kas tabakası incedir. Duktus deferense yakın bölgelerde buna longitudinal kaslar da eklenip kalınlaşır.

Epididimiste kanalları saran kas dışında, fibröz stroma, kan damarları, lenfatik ve sinirlerden zengin bir ara doku bulunur.

Epididimiste spermatozoonların olgunlaşması sürer. Testisten epididimise gelen spermatozoon zayıf hareketli ve ovumu dölleme yeteneğinden yoksunken, epididimiste androjene bağlı fonksiyonel olgunlaşma geçirir.

Epididimis epitelinin salgısı ve bölgelere göre farklı morfoloji göstermesi, bölgelerin değişik fonksiyonlarına bağlıdır. Baş kısmında seminifer tübüllerden gelen sıvının resorpsiyonu, kuyruk bölgesinde ise spermiumların depolanması gerçekleşir (24).

4.5. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller iyonlaşma ve eksitasyon sonucunda dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküllerdir (30, 31). Genellikle elektriksel açıdan yüksüz olan bu atom veya moleküller oldukça reaktif ve toksiktirler (30, 32, 33). Serbest radikal molekülü sahip olduğu eşleşmemiş elektron nedeniyle kararsız konumdadır. Kararlı yapı kazanabilmesi için eşleşmemiş elektronların bir başka radikalın aynı durumundaki elektronu ile eşleştirilmesi gerekmektedir. Kararlı hale gelen serbest radikaller elektron alıcı (oksitleyici) veya elektron verici (redükleyici) özelliğe sahiptir (34, 35). Serbest radikaller endojen kaynaklı normal metabolik olayların ürünü olabileceği gibi; egzoz gazları, ozon, ağır metaller, kirli su ve X ışınlarının sebep olduğu eksojen kaynaklı da olabilir (30, 36).

Artan serbest radikallerin elektronları, hücredeki diğer moleküllerle etkileşime girerek oksidatif strese sebep olurlar (31, 37). Oksidatif stres ise organizmadaki oksidan ve antioksidan dengesinin, fazla miktarda pro-oksidan bileşenlerinin üretilip oksidan sistemin baskın gelmesiyle bozulmasıdır (31).

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin en önemlisi oksijen içerenler olup bunlara serbest oksijen radikalleri (SOR), oksidan molekülleri veya reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species = ROS) denilmektedir (33).

4.5.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri, moleküler oksijen ve oksijenin en stabil formu olan suya indirgenmesi sırasında ve farklı oksidatif stres mekanizmalarıyla oluşmaktadır. Oksijenin kendisi (singlet oksijen) ve oksijenin eksik indirgenmesi sonucu oluşan süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalleri en iyi bilinen serbest oksijen radikalleridir (33, 38). Aerobik canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan oksijen, bazı durumlarda potansiyel olarak toksik bir moleküldür (39, 40).

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$); moleküler oksijenin tek bir elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelir (33, 41). Bu radikal hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olması yönünden önemlidir (33). Süperoksit radikalleri meydana geldiği hücreden daha uzak yerlere kolayca geçerek, farklı radikallerin oluşmasına ve doku hasarına sebep olur (42, 43).

Hidrojen peroksit (H_2O_2); moleküler oksijenin iki elektron almasıyla oluşabildiği gibi süperoksitin tek elektron almasıyla meydana gelen peroksitin, iki hidrojen atomuyla reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (39). Hidrojen peroksit, yapısında eşleşmemiş elektron içermediğinden serbest radikal özelliği taşımaz ve reaktif bir tür değildir (44). Ancak süperoksitle reaksiyona girerek yıkılır ve en reaktif olan hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikalini oluşturur (45).

Hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikali; hidrojen peroksitin geçiş elementleri varlığında indirgenmesiyle ya da süperoksit radikali ile reaksiyona girmesiyle hidrojen peroksitteki O-O bağının hemolitik parçalanması sonucu iki hidroksil radikali meydana gelir (42, 46, 47). Oksijen radikallerinin en reaktif ve toksik olan formu hidroksil radikalidir (38, 42).

Singlet oksijen, serbest radikal reaksiyonlarını başlatan ve serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana gelen singlet oksijen eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal değildir (33). Doymuş yağ asitleriyle doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini ($ROO^{\cdot}$) ve lipid peroksidasyonunu (LPO) başlatabilir (46).

4.5.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm bileşiklerinin yapılarında bozukluklara neden olur (48, 49).

4.5.2.1. Proteinlere Etkisi

Proteinler, serbest radikal saldırılarına karşı doymamış yağ asitlerinden daha az duyarlıdır (33). Çok yoğun saldırı olmazsa bu hasar fazla görülmez (44). Proteinler, serbest oksijen radikalleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyon sonucunda oksidasyona uğrarlar (50, 51). Serbest radikallerin aminoasit moleküllerindeki sülfidril ya da amino gruplarıyla etkileşip oluşturduğu hasar sonucunda; proteinlerde aminoasitlerin modifikasyonu, protein fragmentasyonu, protein agregasyonu ve çapraz bağlanmalar gibi yapısal değişiklikler meydana gelir (33, 52). Oksidasyona uğrayan proteinlerde disülfid bağlarının kırılması, sistein kalıntılarının oksidasyonu ve yanlış yeni disülfid bağlarının oluşumuyla proteinlerin üç boyutlu yapısı bozulur. Özellikle tersiyer yapının bozulması proteinin proteolize ve oksidatif hasara yatkınlığını artırır. Böylece ligand ve allosterik bağlanma bölgelerinin geometrisi değişir ve proteinler işlevlerini kaybederler. Serbest oksijen radikallerinin proteinlerle etkileşimi, protein karbonil (PC) türevlerinin ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) oluşumuna yol açmaktadır. PC ve AOPP ise proteinlerdeki kalıcı oksidatif hasarın göstergeleri olarak kullanılırlar (53).

4.5.2.2. Lipid Peroksidasyonu

Biyolojik sistemlerde serbest oksijen radikallerin doymamış yağ asitleri ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Serbest radikaller en fazla hücre membranı fosfolipidlerinde bulunan doymamış yağ asitlerini etkiler. Bunun sonucunda ciddi ölçüde membran hasarı gözlenir ve bu hasar geri dönüşümsüzdür. Organizmada oluşan bir serbest oksijen radikali, membran yapısındaki doymamış yağ asit zincirinin metilen (CH_2) grubundan bir hidrojen atomu uzaklaştırır ve böylece lipid peroksidasyonu başlar (33, 44, 54).

Lipid peroksidasyonunun sebep olduğu hücre membranı hasarıyla membran akışkanlığı kaybolur ve kalsiyum gibi iyonların hücre içine girmesiyle hücre

fonksiyonları bozulur. Lipid peroksidasyonu ürünü olarak lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile aldehitler ve malondialdehid (MDA) meydana gelir.

Tiyobarbitürik asitle ölçülebilen MDA, süperoksit radikallerinin üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitleri ile peroksidasyonu ya da eikozanoid sentezinde serbestleşen endoperoksitler sonucu oluşur (55). Membran bileşenlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona neden olan MDA, membrandan kolaylıkla difüze olarak DNA' nın yapısındaki nitrojen bazlarla tepkimeye girer ve mutajen, karsinojen, genotoksik etkiler gösterir. Doku hasarı incelemelerinde lipid peroksidasyon ölçümü kullanılmaktadır. (56).

4.6. Antioksidanlar ve Antioksidan Savunma Sistemleri

Organizmada artan serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonu yavaşlatan, durduran veya engelleyen moleküllere antioksidan, bu sisteme ise antioksidan savunma sistemi denilmektedir. Hücre hasarına sebep olan serbest radikallerle reaksiyona giren antioksidanlar, kanser dahil birçok hastalığı ve erken yaşlanmayı önleyen, yok eden veya etkilerini azaltan moleküllerdir. Antioksidanlar kaynaklarına göre endojen ve eksojen olmak üzere iki ana gruba ayrılabilirler (57-59).

4.6.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, organizma tarafından sentezlenip enzimatik ve nonenzimatik olarak iki alt gruba ayrılır. Enzimatik antioksidanlara süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR); nonenzimatik antioksidanlara ise bilirubin, ferritin, albümin, ürik asit ve seruloplazmin örnek olarak verilebilir (57, 60, 61).

Serbest radikallere karşı ilk ve en önemli savunmayı yapan SOD, organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzimdir. SOD, süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyerek hücre içindeki süperoksit seviyesini azaltır. Biri sitozolde bulunan Cu-Zn merkezli, diğeri mitokondride bulunan Mn merkezli iki izoenzimi vardır (62-66).

CAT, tariflenen ilk antioksidan enzimdir ve hücre içinde % 80 oranında peroksizomlarda bulunur. Hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalayan reaksiyonda görev yapar (57, 67).

4.6.2. Eksojen Antioksidanlar

Organizmada sentezlenmeyip dışarıdan alınan antioksidanlardır. Eksojen antioksidanlar daha çok bitkiler tarafından sentezlenen çeşitli vitamin ve fenolik maddelerdir (68). Fenolik bileşikler veya polifenoller, bitkiler tarafından en fazla sentezlenen sekonder metabolitlerdir. Bitkiler aleminde 5000’ den daha fazla fenolik yapının olduğu belirtilmektedir (69). Yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin büyük çoğunluğunun potansiyel olarak antioksidan, antikarsinojenik, antimitojenik, antibakteriyel, antiviral ve antiinflamatuvar özelliğe sahip olduğu ortaya koyulmuştur (70-73).

4.7. Methotrexate

Methotrexate (4-amino-4-deoxy-10-N-methylpteroylglutamic acid; MTX) 40 yılı aşkın süredir lösemiler, solid tümörler, psöriasis, sarkoidoz, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, vaskulit, romatoid artrit ve diğer bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılan folat antagonisti antimetabolittir. S fazındaki hücreleri etkileyen MTX dihidrofolat analogudur ve hücre replikasyonunda anahtar enzim olan dihidrofolat redüktaza bağlanıp, pürin ve pirimidin yapımında gerekli tetrahidrofolat sentezini inhibe eder. Apoptozisle sonuçlanan DNA defektleri, pürin ve pirimidin sentez inhibisyonuyla oluşur (74, 75).

MTX’ in etkinliği genelde sebep olduğu yan etkiler ve toksik durumlar yüzünden sınırlanmıştır (76). MTX kaynaklı toksisite dozaj programı, tedavinin uzunluğu, hastalığın tipi, hastanın risk faktörleri, genetik ve moleküler apoptotik faktörlerin varlığı gibi etkenlerle ortaya çıkmaktadır (77). MTX ile yapılan son toksisite çalışmalarında oksidatif stres dikkat çekicidir (78). MTX tedavisi nedeniyle hidroksil radikalleri, süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroklorik radikaller gibi serbest oksijen radikallerine karşı hücre koruyucu antioksidan savunma sistemi zayıflar (79). Bunun sonucunda antioksidan savunma sisteminde görev yapan SOD ve CAT etkinliği azalır (80, 81). Testis membranında bulunan omega-3 yağ asitleri serbest oksijen radikallerinin hedefi haline gelir ve MTX kaynaklı oksidatif stres ile testis hasarı gözlenir (4). MTX oksidatif stresle testiküler toksisiteyi indüklediği gibi doğrudan toksik etkisiyle de organa hasar verebilir (82).

4.8. *Laurocerasus officinalis* Roem. (Karayemiş)

Rosaceae (Gülgiller) familyasının Prunoideae (sinonim: Amygdaloideae) alt familyasına mensup *Laurocerasus officinalis* Roem. (sinonim: *Prunus laurocerasus* L.) Türkiye' nin kuzey kıyı bölgesinde yetişen, yerel ismiyle karayemiş ya da taflan olarak bilinen, 6 m yüksekliğinde, yaprak dökmeyen bir ağağ türüdür. *L. officinalis* Roem. (LO) meyveleri, Doğu Karadeniz bölgesinde daha çok taze meyve ve meyve suyu, pekmez, reel, kuru meyve ve turşu olarak tüketilir. Ayrıca halk arasında taze yaprakları ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanılır. Olgun meyvesi yüksek oranda fruktoz, glukoz, vanilik asit ve linoleik asit içerir (11).

Karayemiş (LO), Türkiye' nin Doğu Karadeniz bölgesi haricinde Balkanların bazı kısımları, Kuzey İrlanda, batı Avrupa, güney ve batı Kafkasya, İran, Doğu Marmara ve bazı Akdeniz lkelerinde de yetişmektedir. *Laurocerasus officinalis* Roem. (LO) taze meyvesi kimyasal ve antioksidan özellikleri bakımından test edilmiş; yüksek miktarda su, protein, pektin ve şeker yanında çeşitli fenolik bileşenler ve mineraller içerdiği belirlenmiştir. Önerilen günlük alım miktarına göre (Recommended Dietary Allowance: RDA, 83) bu minerallerin oranları meyvenin iyi bir besin kaynağı olduğunu göstermektedir. Halk arasında idrar söktürücü, antidiyabetik olarak, ayrıca mide ülseri, sindirim sistemi problemleri, bronşit, egzama ve hemoroid tedavisinde de kullanılmaktadır. Ayrıca yapısında bulunan askorbik asit meyvenin antioksidan özellik kazanması sağlamaktadır (12).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalarımızda kullanılan cihazlar ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Şekil 1’ de verilmiştir.

Adı/ Modeli	Kullanım amacı
Spektrofotometre/ UV-VIS Double PC-8 auto cell, Labomed Inc, Culver City, USA	Biyokimyasal analizler
Dondurucu/ Joun sa Deep Freezer VXE490, Czech Republic	Ekstrakt hazırlama, biyokimyasal analizler
Homojenizatör/ Ika-Werke, Ultra Turrax [®] T25 Basic, Germany	Ekstrakt hazırlama, biyokimyasal analizler
pH Metre/ Hanna pH 213, Romania	Biyokimyasal analizler
Santrifüj/ Hettich, 1406 Type, Universal 320R, Germany	Ekstrakt hazırlama, biyokimyasal analizler
Vorteks/ Heidolph, Reaxtop	Biyokimyasal analizler, sperm sayımı
Su banyosu/ Nüve, ST 402	Biyokimyasal analizler
Magnetik karıştırıcı/ Heidolph MR 3001, Germany	Biyokimyasal analizler
ETÜV/ Heraeus B12 Tip Sınıf: 3.1 Kendrol, Germany	Doku takip işlemleri
Sıçan terazisi/ Kern-Sohn-GmbH, PCB-800-1, Germany	Tartım işlemleri
Mikro plate okuyucu/ Tunable, Versa Max, Microplate reader, USA	Biyokimyasal analizler
Rotary mikrotom/ Leica RM 2155	Doku kesme
Işık mikroskopu/ Olympus BX-51; Olympus Optical Co, Ltd, Tokyo, Japan	Preparat fotoğrafı çekme
Lipshaw Paraffin Dispenser	Doku takip işlemleri
Lipshaw Benmari	Doku kesme
Işık mikroskopu/ Olympus, DP 71, Japan	Preparat fotoğrafı çekme
Makler Counting Chamber/ Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel	Sperm sayımı

Şekil 1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

5.2. Deney Hazırlığı

5.2.1. *Laurocerasus officinalis* Roem. (Karayemiş) Meyve Ekstraktının Hazırlanması

LO (Karayemiş) meyvesi ile yapılan farklı çalışmalar mevcuttur. Kolaylı vd. (12) yaptıkları çalışmada meyveden farklı çözücülerle (etanol, aseton ve su) elde ettikleri ekstraktlarda antioksidan aktivite yönünden en zengin aktiviteyi sulu ekstraktın gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu sebeple yapılan çalışmada meyveden elde edilen sulu ekstrakt kullanıldı.

Olgun LO meyvesi Ağustos ayında Trabzon il merkezinden toplandı. Meyve çalışma zamanına kadar -20 °C de saklandı ve çalışma zamanı derin dondurucudan çıkartıldı. Buzu çözündükten sonra meyvenin etli kısmı ile çekirdeği birbirinden ayrıldı. Etli kısımdan hassas terazide 1500 gr tartıldı. Tartılan meyve buz banyosunda yeterli miktarda saf su eklenip iyice homojenize edildi. Ön süzme işlemi üç katlı beyaz temiz tülbent ile 2 kez süzülerek yapıldı ve 15000 rpm’ de santrifüj edildi. Meyve ekstraktı 45 µm’ lik filtrelerden geçirildi ve 800 mL ekstrakt elde edildi. Ekstrakt erlen içerisinde derin dondurucuda dondurulduktan sonra suyunu uzaklaştırmak için liyofilizatör cihazına konuldu. Üç gün sonunda erlende kalan liyofilizat son hacmi 100 mL olacak şekilde saf su ile çözüldü. Elde edilen karayemiş ekstraktının konsantrasyonu 1500 gr/100 mL= 15000 mg/mL olarak kaydedildi ve bütün hesaplamalar bu konsantrasyon üzerinden yapıldı. Ekstraktın bir kısmı eppendorf tüplere konulup toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite çalışmaları için saklandı. Geriye kalan kısmı deney hayvanlarında kullanılmak üzere +4 °C’ de saklandı ve deney süresince hayvanlara belirlenen miktarda verildi.

5.2.2. Toplam Fenolik Madde Tayini

Yöntem, suda ve organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifleri ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor–menekşe renkli kompleks 765 nm’ de maksimum absorbands oluşturur (84).

Çalışmada, standart grafiğin hazırlanmasında, fenolik bir madde olan gallik asit (Sigma) standardı kullanıldı. Gallik asitin farklı konsantrasyonları (0.5; 0.25; 0.125; 0.0625; 0.03125 ve 0.015625 mg/mL) hazırlanıp, absorbandsları okundu. Standart ve 100

kat seyreltilen numune konsantrasyonları üç paralel olarak çalışıldı. Konsantrasyona karşılık bulunan absorbans değerleri ile grafik çizildi. Çizilen grafiğe göre karayemiş numunesinin toplam fenolik madde miktarı bulundu. Metodun yapılışı Tablo 1’ de verilmiştir.

Tablo 1. Toplam fenolik madde tayininde yapılan işlemler

	Kör	Standart	Numune
Distile su	700 µL	680 µL	680 µL
Standart	-	20 µL	-
Numune	-	-	20 µL
0.5 N Folin Reaktifi	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL
Tüpler karıştırılır ve 3 dakika sonra			
% 10’ luk Na ₂ CO ₃	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL
2 saat inkübe edildikten sonra 760 nm’ de absorbans okundu.			

5.2.3. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC)

Yöntem, tiyol (-SH) tipi antioksidanlarla çabuk ve net sonuçlara ulaşır. CUPRAC, fizyolojik pH’ lara yakın olan pH=7 ortamında yürütülür; dolayısıyla fizyolojik koşulları yansıtmaya şansı daha fazladır. Uygun çözücü seçimiyle hem hidrofilik, hem de lipofilik antioksidanlar tayin edilebilir. Metod, bakır (II)-neokuproin kompleksinin ortama antioksidan çözeltisi ilave edilmesi sonucunda bakır (I)-neokuproine indirgenmesi esasına dayanır ve sonuçlar içinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm’ de absorbans değerlerinin ölçülmesiyle elde edilir (85, 86).

Analizde standart olarak Troloks® (1000-62.5 M) kullanılmıştır. Standart ve 100 kat seyreltilen numune konsantrasyonları üç paralel olarak çalışıldı. Elde edilen test sonuçları Troloks® eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) cinsinden verildi.

Tablo 2. CUPRAC tayininde kullanılan miktarlar

	Numune	Standart	Kör
10 mM CuCl ₂	1 mL	1 mL	1 mL
7.5 mM Neokuproin	1 mL	1 mL	1 mL
NH ₄ CH ₃ COO tamp.(1 M, pH 7.0)	1 mL	1 mL	1 mL
Numune	0.2 mL	-	-
Standart	-	0.2 mL	-
Saf su	0.9 mL	0.9 mL	1.1 mL
1 saatlik inkübasyondan sonra 450 nm’ de absorbans okundu.			

5.2.4. DPPH[•] Radikal Temizleme Aktivitesi

DPPH[•] radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, Aldrich) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup çalışmada 4 mg/100 mL olacak şekilde DPPH[•] radikalinin metanolik çözeltisi kullanıldı. Elde edilen karayemiş ekstraktı değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. Eşit hacimde (750 µL) DPPH[•] çözeltisi ve numune çözeltileri karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda DPPH[•]’ ın maksimum absorbans verdiği 517 nm’ de absorbanslar okundu. Kör olarak DPPH[•] çözeltisi ve numunenin çözüldüğü çözücü kullanıldı. Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek SC₅₀ değerleri mg/mL cinsinden hesaplandı (87).

SC₅₀ Değerlerinin Bulunması

SC₅₀ radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. SC₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmada 5 farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Analizde standart olarak Troloks® (Aldrich) (0.02-0.00125 mg/mL) aralığında 5 farklı konsantrasyonu kullanıldı. Karayemiş numunesinin (150-9.375 mg/mL) konsantrasyon aralığında 5 farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorbans ölçümleri yapıldı ve absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen konsantrasyon miktarı SC₅₀ değerini vermektedir. SC₅₀ değeri ortamda var olan DPPH[•] radikalinin yarısını süpüren, temizleyen numune yada standart konsantrasyonudur. SC₅₀ değeri mg/mL veya mM gibi birimlerle ifade edilmektedir.

Tablo 3. DPPH yöntemi için deney şartları

	Reaktif Kör	Numune
Standart ve Numune (Değişen Konsantrasyonlarda)	-	750 µL
DPPH	750 µL	750 µL
Çözücü	750 µL	-
50 dakika sonra 517 nm’ de absorbands okundu.		

5.3. Deney Aşaması

5.3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı, Barınması ve Temini

Çalışmamız Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2013/2 protokol numarasıyla onay almıştır. Tez çalışması süresince kullanılan deney hayvanları ve sarf malzeme alımı TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) tarafından 1002-Hızlı Destek Projesi kapsamında 113S409 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

Çalışmada kullanılan 12 haftalık 24 adet Spraque Dawley cinsi erkek sıçanların bakımı, beslenmesi ve barınması KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi sıçan takip odalarında yapıldı. Deney süresince (5 gün) laboratuvar sıcaklığı ortalama 22 ± 2 °C, nisbi nem ortalama % 50 ± 5 olarak ayarlandı. Sirkadiyen ritminin devamı için odada bulunan ışıklar 12 saat açık 12 saat kapalı tutuldu. Sıçanların beslenmesinde standart sıçan yemi ve musluk suyu kullanıldı.

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



Resim 1. Sıçanların bakımı ve barınması

5.3.2. Çalışmada Kullanılan Gruplar ve Deneyin Uygulanması

Deneyde kullanılan 24 adet sıçan, her grupta altı hayvan olacak şekilde dört gruba ayrıldı. Denekler gruplara ağırlıklarına göre homojen şekilde dağıtıldı (Tablo 4).

Tablo 4. Çalışmada kullanılan gruplar ve gruplara yapılan uygulamalar

Gruplar	Gruplara Yapılan Uygulamalar
Grup 1	Kontrol Grubu; herhangi bir uygulama yapılmadı.
Grup 2	MTX Grubu; deneyin ilk günü tek doz 30 mg/kg Methotrexate i.p olarak uygulandı.
Grup 3	LO Grubu; deney süresince (5 gün) Karayemiş ekstraktı (10 gr/kg ekstrakt = 0.3 mL/ 300 gr) gavaj yoluyla uygulandı.
Grup 4	MTX+LO Grubu; deneyin ilk günü tek doz MTX (30 mg/kg) i.p olarak ve deney süresince LO ekstraktı (0.3 mL/ 300 gr) gavaj yolu ile uygulandı.

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

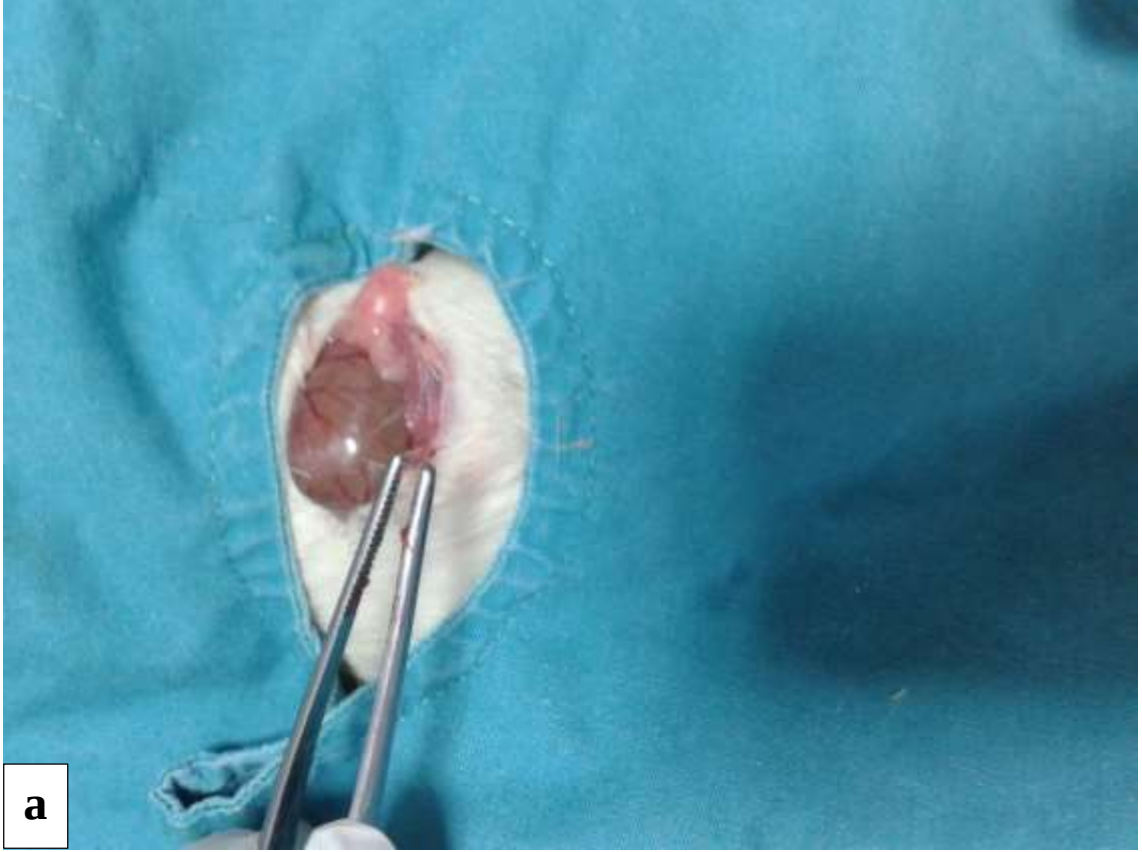
5.4. Histolojik İşlemler

5.4.1. Kan ve Doku Numunelerinin Elde Edilmesi

Beşinci günün sonunda bütün sıçanlar, ketamin (50 mg/kg) ve ksilazinin (xylazine, 5 mg/kg) i.p olarak uygulanmasından sonra yaklaşık on dakika uyutuldu. Karın boşluğundan girilerek her iki testis ve sağ epididimis çıkarıldı; abdominal aortadan girilerek kan alındı (Resim 2). Daha sonra abdominal aorta makasla kesilerek kansızlaştırma yöntemiyle denekler sakrifiye edildi. Sağ testise ait epididimis, tris tampon solüsyonu içeren vücut ısısındaki petri kabına alındı. Elde edilen testislerin her biri boyuna ikiye bölündü. Her sıçanda aynı testis bölgesi olmak üzere sağ testisin bir yarısı histolojik değerlendirmeler için Bouin fiksatifine alındı. Testisin diğer yarısı ise biyokimyasal analizler için eppendorf tüplerine konuldu ve -80 °C’ deki soğutucuda muhafaza edildi. Çıkarılan sol testis enine ikiye ayrıldı ve bu dokular B planı için freezing metoduyla saklandı. Alınan kanlar antikoagülanlı (% 3.2’ lik Sodyum sitrat) tüplere konularak 3-5 dakika (dk) alt üst edildi; 2500 rpm’ de 15 dk santrifüjün ardından plazma kısmı alındı ve analiz zamanına kadar -80 °C’ de saklandı.

Testis dokusu süpernatantlarında ve plazmalarda MDA, CAT, SOD ve PC analizleri spektrofotometrik olarak yapıldı.

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



Resim 2. a,b: Testis çıkarılışı

5.4.2. Bouin Fiksatifinin Hazırlanışı

Bouin fiksatifini hazırlamak için önce doymuş pikrik asit çözeltisi (75 mL) formaldehit (% 37, 75 mL) ile iyice karıştırıldı, sonra üzerine yavaşça glasiyal asetik asit (5 mL) eklenerek tekrar karıştırıldı (88).

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

Doku takibi aşamasında aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. % 70' lik alkol 1 gün
2. % 90' lık alkol 1 gün
3. % 96' lık alkol 1 gün
4. % 100' lük alkol 1 gün
5. % 100' lük alkol 1 saat
6. Ksilen 5 dk (3 kez)
7. Dokular eritilmiş parafin içerisinde önce 58 °C' lik etüvde üç kez 15 dk, sonrasında ise 2 saat bekletildi.
8. Dokular oda sıcaklığında bloklandı.

5.4.3. Kesitlerin Alınması

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

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

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

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

Hazırlanan preparatlarda seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve lümende olgunlaşmamış germinal hücrelerin görüldüğü tübül sayısı Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskopunda (IM) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak hesaplandı. Seminifer tübüldeki spermatogenetik hücreler ve interstisyel alan Olympus BX51 (Japan) fotomikroskoplu IM’de incelendi ve resimler dijital ortama aktarıldı.

Seminifer tübülde hasar değerlendirmesi için Johnsen skorum sistemi kullanıldı (89, 90).

Johnsen skorum sistemi (89)

10: Germinal epitel çok sıralı, çok sayıda spermatozoa var

9: Germinal epitelyum disorganize ve lümene doğru yığılma, spermatozoa var

8: Germinal epitel çok sıralı ancak lümende 10'dan az spermatozoa var

7: Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid var

6: Spermatozoa yok, spermatid 10'dan az

5: Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit var

4: Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit 5'den az

3: Germ hücre olarak sadece spermatogonia var

2: Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi var

1: Seminifer tübül içinde hiç hücre yok

5.4.5. Epididimiste Sperm Sayımı, Motilite ve Vitalite Değerlendirmeleri

1978 yılında Prof. Dr. Amnon Makler tarafından özel olarak tasarlanan Makler Sperm Sayım Kamerası ile sperm sayımı ve motilite değerlendirmeleri yapıldı. Semen örneğinin incelendiği kameranın 10 µm derinliğinde olması spermatozoanın tek bir düzlemde serbest hareketine olanak sağlamaktadır. Makler kamerası ile spermilerin hareketlilik yüzdeleri daha kesin olarak saptanabilmektedir (91, 92).

Değerlendirmeler için deneklerden alınan epididimis, Tris tampon solüsyonu (pH: 7.5) içeren petride parçalara ayrılıp 37 °C' lik etüvde 10-30 dk bekletildi ve spermilerin sıvı içerisinde yüzmesi sağlandı. Motilite değerlendirmesi için bir damla semen (5 µL) kameranın merkezine damlatılıp üzerine kapak camı kapatıldı. Dört adet kuvarz bacak sayesinde spermilerin, 10 µm derinlikte yüzmeleri sağlandı. Bu derinliğe ancak bir adet sperm başı sığabilir. Bu yüzden bir hat üzerinde 20X büyütme altında, 10 karede motil ve non-motil sperm sayıldı ve 10^6 ile çarpılarak mililitredeki ($\times 10^6$ /mL) sperm sayısı belirlendi. Motil sperm sayısının toplam sperm sayısına oranı bulunarak motilite yüzdesi (%) olarak hesaplandı. Normal sperm konsantrasyonu ($>20 \times 10^6$ /ml) dikkate alınarak değerlendirildi (91). Vitalite değerlendirmesi için lam üzerine semen örneğinden bir damla damlatıldı ve üzerine insülin enjektörü ile 1 damla % 1' lik Eozin-Y eklenerek karıştırıldı ve lamel ile kapatıldı. Her bir örnekte 100 sperm canlılık açısından değerlendirildi.



Resim 3. Makler Sayım Kamerası (92)

5.5. İmmünohistokimyasal İşlemler ve Analizler

Testisteki apoptozu değerlendirmek için TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay) tekniği kullanılarak seminifer tübül germinal hücrelerinde DNA fragmentasyonları tanımlandı. Nekroz alanları bulunmayan, homojen boyanmış kahverengi nukleuslu TUNEL (+) hücreler apoptotik hücre olarak değerlendirildi. Her testiste en az 10 seminifer tübülde TUNEL (+) hücre sayısı ve toplam hücre sayısı belirlendi; Apoptotik İndeks (AI= TUNEL (+) hücre sayısı / toplam hücre sayısı x 100) hesaplandı (93).

5.5.1. TUNEL Boyama

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

1. Oda ısısında 3x5 dk ksilende inkübe edildi.
2. % 100 etanol 2x5 dk
3. % 95 etanol 2x5 dk
4. % 70 etanol 2x5dk
5. Distile su ile yıkandı.
6. Oda ısısında 20 µg/mL Proteinase K 15 dk
7. PBS (Phosphate Buffer Solution)' de yıkandı.
8. % 3 H₂O₂' de 15 dk
9. Distile su ile yıkandı.
10. PBS' de 2x5 dk
11. Oda ısısında Large Volume UV block 10 dk
12. 75 µg Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve 50 µL TdT/dUTP karışımı ile dokular kaplandı, 37 °C' lik etüvde 1.5 saat nemli ortamda tutuldu.
13. PBS' de yıkandı.

14. 100 μ converter peroksidaz dokuyu kapatacak şekilde kaplandı ve 37 °C' lik etüvde inkübe edildi.
15. PBS' de 3x5 dk yıkandı.
16. 100 μ L DAP ile 5 dk karanlıkta oda ısısında beklendi.
17. Distile suda 1x2 kez yıkandı.
18. Hematoksilen ile 15 saniye boyanır ve çeşme suyu ile yıkandı.
19. % 70 etanol 2x5dk
20. % 95 etanol 2x5 dk
21. % 100 etanol 2x5 dk
22. Ksilen 2x5 dk
23. Kurutulup entellan ile kapatıldı.

5.6. Plazmada Yapılan Biyokimyasal Testler

5.6.1. Plazma ve Testis Doku Örneklerinde Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı (94) ve protein standardı olarak Sığır Serum Albümini (BSA) kullanıldı.

Kalibrasyon grafiği çizebilmek amacıyla hazırlanan BSA çözeltisinden (1,0 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 μ L konuldu. Bu şekilde tüplerdeki BSA nihai konsantrasyonunun 20, 40, 60, 80 ve 100 μ L olması sağlandı.

Standart içeren tüplerin dışında ham enzim kaynağından, amonyum sülfatla çöktürülen ve amikon filtreden geçirilen protein karışımından ve saf proteinden ayrı bir deney tüpüne 5 μ L ilave edildi. Standartların ve örneğin son hacimlerini 500 μ L tamamlayacak şekilde 0.1 N NaOH içindeki % 0.1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi.

Her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi (% 2 sodyum-potasyum tartarat, % 1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.1 N NaOH içerisinde % 2 Na_2CO_3) ilave edilip vortekslelendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin reaktifinden 100 μL ilave edildi ve karanlık ortamda 30 dk inkübe edildi. 650 nm’ de absorbanslar okundu.

Kalibrasyon grafiği çizilerek örneklerdeki protein konsantrasyonu hesaplandı. Plazma örnekleri 20 kat seyreltilip protein tayini yapıldı. Okunan absorbans değerleri 50 kat seyreltme ve 20 kat numune seyreltme faktörleri ile çarpıldı ve sonuçlar $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı.

5.6.2. Plazma Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde Aebi metodu (95) kullanıldı. Yöntem katalazın hidrojen peroksiti (H_2O_2) parçalayıp uzaklaştırması esasına dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler:

1. Fosfat tamponu (pH=7.0; 50 mM): 6,81 gr KH_2PO_4 deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L’ ye tamamlandı. 8.9 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L’ ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1.5 oranında karıştırıldı ve gerektiğinde asit veya baz ilavesi yapılarak pH=7.0’ ye ayarlandı.
2. Hidrojen Peroksit: 240 μL % 30’ luk H_2O_2 ’ den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 mL’ ye tamamlandı (günlük hazırlandı).

Plazma örnekleri 20 kat seyreltildi. Gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra Tablo 5’ deki gibi pipetleme yapıldı.

Tablo 5. Plazma CAT aktivitesinde kullanılan miktarlar

Reaktifler	Kör	Numune
Fosfat Tamponu	750 μL	-
Numune	1500 μL	1500 μL
H_2O_2	-	750 μL

H₂O₂ eklenir eklenmez kuartz küvetler altüst edildi ve 240 nm’ de 30 sn süreyle her 10 sn’ de bir absorbanslar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi. Katalaz aktivite tayininde birinci mertebeden reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. 10 sn’ lik aralık için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

$$k = (2,3/10) \times \log(A_1/A_2) \text{ s}^{-1}$$

A₁= Başlangıç Absorbansı

A₂= 10 s sonraki absorbans

Yukarıdaki formüle göre bulunan k değeri seyreltme faktörü 20 ile çarpıldı.

5.6.3. Plazmada Malondialdehid (MDA) Seviyesinin Belirlenmesi

Lipit peroksidasyon ürünü olan MDA, oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Metot, tiyobarbitürik asit (TBA, Merck) ile MDA’ nın oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (96). MDA standardı olarak 1,1,3,3-Tetrametoksiopropan kullanıldı. Stok çözeltiden (100 nmol/mL) seri seyreltme ile 20; 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.3125 ve 0.15625 konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı.

Yagi (1994)’ e göre plazmalarda MDA seviyesi tespit edildi. Lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ile TBA 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.

Plazmada MDA tayini için gerekli çözeltiler aşağıdadır:

- 1- 0.084 N H₂SO₄: 580 µL H₂SO₄ (% 96’ lık) saf su ile 250 mL’ ye tamamlandı.
- 2- % 10’ luk fosfotungustik asit: 0.5 gr tartılıp 4.5 mL deiyonize suda çözüldü.
- 3- % 0.67’ lik TBA: 0.67 gr TBA tartılıp, 50 mL suda manyetik bar yardımıyla karıştırılarak üzerine 50 mL asetik asit ilave edildi.

0.15 mL plazma üzerine 1.2 mL H₂SO₄ (0.084 N) ve 150 µL fosfotungustik asit (% 10' luk) eklendi ve karıştırıldı. 5 dakika beklendikten sonra 4600 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üst faz atıldı. Çöken kısım 2 mL saf su ile vortekslendi. Her numunenin üzerine 0.5 mL TBA eklendi ve 100 °C' de 1 saat beklendi. Daha sonra 4500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi ve 532 nm' de absorbansları okundu.

Standartların hazırlanmasında ise; 2 mL standart üzerine 0.5 mL TBA eklendi ve 100 °C' de 1 saat beklendi. Kör tüpüne MDA yerine 2 mL saf su ve 0.5 mL TBA konuldu. Daha sonra 532 nm' de absorbansları okundu. Sonuçlar nmol MDA/mL plazma olarak ifade edildi.

5.6.4. Plazmada Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi

SOD ölçümü, Ksantin oksidaz aracılığı ile üretilen O₂⁻ radikalinin reaksiyon ortamından nitroblue tetrazolium (NBT, Applichem) indirgenmesinin numunede bulunan SOD enzimi tarafından engellenmesi prensibine dayanır (97). NBT' nin indirgenmesi ile 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren mor renkli formazan oluşur. SOD aktivitesinin büyüklüğü oluşan formazanın absorbansı ile ters orantılıdır.

SOD Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler:

- 1) 0.1 M pH: 7.5 potasyum fosfat tamponu
- 2) 0.3 mM ksantin: 0.00913 gr ksantin bir miktar distile suda çözülüp, 200 mL' ye distile suyla tamamlandı.
- 3) 0.6 mM EDTA: 0.023 gr EDTA (Merck) bir miktar distile suda çözülüp, 100 mL' ye distile suyla tamamlandı.
- 4) 150 µM NBT: 0.0123 gr NBT bir miktar distile suda çözülüp, 100 mL' ye distile suyla tamamlandı.
- 5) 400 mM Na₂CO₃: 2.12 gr Na₂CO₃ bir miktar distile suda çözülüp, 50 mL' ye distile suyla tamamlandı.
- 6) % 0.1 Bovin Serum Albümin: 20 mg BSA, bir miktar distile suda çözülüp hacmi 20 mL' ye tamamlandı.

7) 2.3 M soğuk amonyum sülfat: 2.65 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bir miktar distile suda çözülüp, 10 mL' ye distile suyla tamamlandı.

8) 0.8 mM bakır (II) klorür: 0.00866 gr CuCl_2 tartılır, 80 mL distile suda çözülür. Tartım litre bazında hazırlanıp, seyreltilir.

9) 0.125- 0.25 – 0.5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8- 9 - 10 ünite /mL' lik SOD standartları kullanıldı.

Analizde kullanılacak olan reaksiyon karışımı taze hazırlandı. Reaksiyon karışımında 0.6 mM EDTA, 400 mM Na_2CO_3 , 0.3 mM Ksantin (Sigma), 1 gr/L BSA ve 150 μM NBT bulunmaktadır. Çalışmamızda kullanılan karışım için 80 mL EDTA, 48 mL Na_2CO_3 , 160 mL Ksantin ve 24 mL BSA çözeltilerinden eklendi ve karıştırıldı. Uygulamanın hemen öncesinde 80 mL NBT eklendi ve karıştırıldı. Reaksiyon karışımımız hazır hale geldi.

Ksantin oksidaz (Applchem) enziminin 167 ünite/L' lik bir konsantrasyonda, buzlu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içerisinde taze olarak hazırlanması gereklidir.

10) 167 U/L ksantin oksidaz (dilüsyon gerekli ise) soğuk amonyum sülfat ile dilüe edildi.

$$9 \text{ mg protein/mL} \times 0.8 \text{ U/mg protein} = 7.2 \text{ U/mL} = 7200 \text{ U/L}$$

$$7200 \text{ U/L} \times V_1 = 167 \text{ U/L} \times 4 \text{ mL} \quad \Longrightarrow \quad V_1 = 0.0928 \text{ mL}$$

92.8 μL stok Ksantin oksidaz' dan alındı, 4 mL' ye buzlu 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile tamamlandı.

SOD standartları: Saf SOD (Sigma) enziminin (stok 3786 U/mg katı) 1.3 mg tartıldı. 10 mL 0.1 M pH 7.5 potasyum fosfat tamponu ile çözülür ve 492 U/mL' lik stok SOD çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden; 0.1 M pH: 7.5 potasyum fosfat tamponu ile seyreltmeler yaparak, 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0 (kör) U/mL' lik standartlar hazırlandı.

Plazmada SOD tayini için 0.5 mL plazma numunesi üzerine 400 µL etanol:kloroform (5:3) karışımından eklendi. Karışım 1 dakika vortekslendikten sonra 18000 g' de, +4 °C' de 1 saat santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alındı. Numune olarak süpernatantlar kullanıldı. Pipetlemeler Tablo 6' da verildiği gibi yapıldı.

Tablo 6. Plazma SOD analizi için kullanılan miktarlar

	Numune	Standart	Kör
Numune	250 µL	-	-
Standart	-	250 µL	-
Reaksiyon karışımı	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL
Ksantin oksidaz	25 µL	25 µL	25 µL
25°C'de 25 dakika karanlıkta inkübe edildi.			
CuCl ₂	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL

CuCl₂ ilavesinden sonra tüpler vortekslendi ve 560 nm' de absorbanları okundu.

SOD konsantrasyonuna karşı, % inhibisyon değerleri grafiğe geçirilerek standart SOD grafiği elde edildi.

Sonuçların hesaplanması:

% inhibisyon aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(\text{kör abs-numune abs}) / \text{kör abs}] \times 100$$

5.6.5. Protein Karbonil (PC) Ölçümü

Plazma ve testis dokusunda protein karbonil ölçümü Protein Carbonyl Colorimetric Assay Cayman marka kit (Cayman marka katalog no = 10005020) prosedürü kullanılarak yapıldı. pH' sı 6.7 olan 1 mM EDTA içeren sodyum tamponunda doku homojenatı hazırlandı.

Protein Karbonil için doku homojenizasyon tamponu: 50 mM pH'sı 6.7 olan 1 mM EDTA içeren 200 mL sodyum fosfat tamponu: 3.581 gr Na_2HPO_4 yaklaşık 150 mL saf suda çözüldü. pH' sı HCl ile 6.7' ye ayarlandı. İçerisine 0.0744 gr EDTA ilave edildi ve hacmi saf su ile 200 mL ye tamamlandı.

5.7. Testis Dokusunda Yapılan Biyokimyasal Testler

5.7.1. Testis Dokusunda CAT Aktivitesinin Tayini

SOD tayininde kullanılan homojenat kullanıldı ve CAT aktivitesinin tayininde Aebi' nin metodu (95) kullanıldı.

Kullanılan Çözeltiler:

1. Fosfat tamponu (pH=7.0; 50 mM): 6.81 gr KH_2PO_4 deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L' ye tamamlandı. 8.9 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L' ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1.5 oranında karıştırıldı ve gerektiğinde asit veya baz ilavesi yapılarak pH=7.0' ye ayarlandı.
2. Hidrojen Peroksit: 240 μL % 30' luk H_2O_2 ' den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 mL' ye tamamlandı (günlük hazırlandı).

Deneyin yapılışı:

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

Tablo 7. Doku CAT aktivitesinde kullanılan miktarlar

Reaktifler	Kör	Numune
Fosfat Tamponu	750 μL	-
Numune	1500 μL	1500 μL
H_2O_2	-	750 μL

H₂O₂ eklenir eklenmez kuartz küvetler altüst edildi ve 240 nm’ de 30 sn süreyle her 10 sn’ de bir absorbanslar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi. Katalaz aktivite tayininde birinci mertebeden reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. 10 sn’ lik aralık için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

$$k = (2,3/10) \times \log(A_1/A_2) \text{ s}^{-1}$$

A₁= Başlangıç Absorbansı

A₂= 10 sn sonraki absorbans

Yukarıdaki formüle göre bulunan k değeri seyreltme faktörü 3 ile çarpıldı. Ardından testis dokularında mg protein başına katalaz aktivitesi hesaplandı (k/mg protein).

5.7.2. Testis Dokusunda MDA Tayini

Bu işlem için gerekli çözeltiler şu şekilde hazırlandı:

Doku homojenizasyon tamponu: % 1.15’ lik KCl çözeltisine % 0.05’ lik (bir litre için 500 µL olacak şekilde) Triton X-100 konarak hazırlandı. 200 mL çözeltiyi hazırlamak için 1.30 gr KCl tartıldı, yaklaşık 200 mL suda çözüldü, içerisine 100 µL Triton X-100 ilave edildi ve hacmi 200 mL ye tamamlandı.

1. % 1’ lik H₃PO₄

2. % 0.67’ lik TBA: 0.67 gr TBA tartılıp, 50 mL suda manyetik bar yardımıyla karıştırılarak üzerine 50 mL asetik asit ilave edildi.

3. MDA standartları: MDA Standartları tetrametoksipropandan 0.01 M HCl ile 50 °C’ de 1 saat inkübe edilerek hidrolizle elde edildi.

4. Stok MDA 200 nmol/mL’ den 150, 100, 75, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 nmol/mL çözeltileri hazırlandı ve standartlar çift çalışıldı. Standartlara TBA’ lı ve % 1’ lik H₃PO₄’ lü ve sonrasındaki uygulamalar yapıldı. Kör tüpüne MDA yerine su konuldu.

Standart çalışmasında 500 µL standart, ağzı kapaklı tüplere pipetlendi. Üzerine 3 mL % 1’ lik H₃PO₄ ve 1 mL TBA eklendi. 100 °C’ de 45 dk etüvde inkübasyona bırakıldı.

Soğuyan tüplerin 532 nm’ de absorbansları okundu. MDA standart grafiği çizildi.

Dokuda manuel MDA tayini için aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. 50 mg (0.05 gr) doku tartıldı.
2. Tüplerin üzerine 2 mL tampon koyuldu (Doku homojenizasyon tamponu önceden soğuk olarak hazırlandı).
3. 0.05 gr olarak tartılan dokular homojenizasyon için uygun tüplere konuldu.
4. Homojenizasyon işlemi buz üzerinde yapıldı.
5. 3000 rpm’ de 10 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj işlemi sonunda üstte kalan süpernatantlardan 500 µL alınıp, başka kapaklı tüplere koyuldu. Numunelerde seyreltme yapmadan MDA tayini yapıldı. Numuneleri çalışırken kör tüpüne numune yerine homojenizasyon tamponundan koyuldu.
7. Bu tüplerin üzerine 3 mL % 1’ lik H_3PO_4 ve 1 mL TBA koyuldu.
8. 100 °C’ de 45 dk etüvde inkübasyona bırakıldı.
9. Tüpler 4000 rpm’ de 10 dk santrifüjlendi.
10. Elisa pleytlerine 300 µL pipetlendi ve 532 nm’ de absorbans okundu.

Çizilen MDA standart grafiğinden ve homojenatta yapılan protein tayini sonuçlarına bakarak, sonuçlar nmol MDA/gr protein olarak verildi.

5.7.3. Testis Dokusunda SOD Tayini

Homojenizasyon Aşaması

Homojenizasyon tamponu: Tris–HCl 50 mM pH: 7.4 (Litrede 500 µL olacak şekilde Triton X-100 olmalı) tampon soğuk olmalıdır. 200 mL çözelti hazırlamak için 1.21 g Tris–base tartıldı yaklaşık 200 mL saf suda çözüldü ve 100 µL Triton X-100 ilave edildi. pH 7.4’ e HCl çözeltisi ile ayarlandı ve hacmi 200 mL’ ye saf su ile tamamlandı.

Bu tampon homojenizasyonda, numunelerin dilüsyonu gerekli ise dilüsyonda ve ayrıca SOD standartlarını hazırlamada kullanıldı.

Homojenizasyondan sonra aynı gün içinde SOD çalışıldı.

Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı.

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

Homojenize dokuda SOD ölçümü:

1. 1 mL Süpernatın alındı ve 500 µL Etanol-Kloroform karışımı (3:2 oranında) ilave edildi. Kör tüpüne ise 1 mL homojenizasyon tamponu ve 500 µL Etanol-Kloroform karışımı ilave edilip numunelerle aynı işlemlere tabi tutuldu.
2. Vortekslendi.
3. Soğukta 10 000 g' de 30 dk santrifüj edildi.
4. Süpernatın alınıp homojenizasyon tamponu ile dilüe edildi (Dilüsyon oranı, birkaç numunenin rengi (absorbansı) kör ile standart arasında kalacak şekilde tespit edildi).
5. Testis doku süpernatını alındı, homojenizasyon tamponu ile 5 kat dilüe edildi. Ölçümde dilüe süpernatın kullanıldı.

Analizde kullanılacak olan reaksiyon karışımı taze hazırlandı. Reaksiyon karışımında 0.6 mM EDTA, 400 mM Na₂CO₃, 0.3 mM Ksantin, 1 gr/L BSA ve 150 µM NBT bulunmaktadır. Çalışmamızda kullanılan karışım için 80 mL EDTA, 48 mL Na₂CO₃, 160 mL Ksantin ve 24 mL BSA çözeltilerinden eklendi ve karıştırıldı. Uygulamanın hemen öncesinde 80 mL NBT eklendi ve karıştırıldı. Reaksiyon karışımımız hazır hale getirildi

Cam Tüpte Çalışma Adımları:

Tablo 8. Doku SOD analizi için kullanılan miktarlar

	Numune	Standart	Kör
Numune	250 µL	-	-
Standart	-	250 µL	-
Reaksiyon karışımı	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL
Ksantin oksidaz	25 µL	25 µL	25 µL
25°C’de 25 dakika karanlıkta inkübe edildi.			
CuCl ₂	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL

CuCl₂ ilavesinden sonra tüpler vortekslendi ve 560 nm’ de absorbanları okundu.

Sonuçların hesaplanması:

% inhibisyon aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(\text{kör abs-numune abs})/\text{kör abs}] \times 100$$

5.8. İstatistiksel Analiz

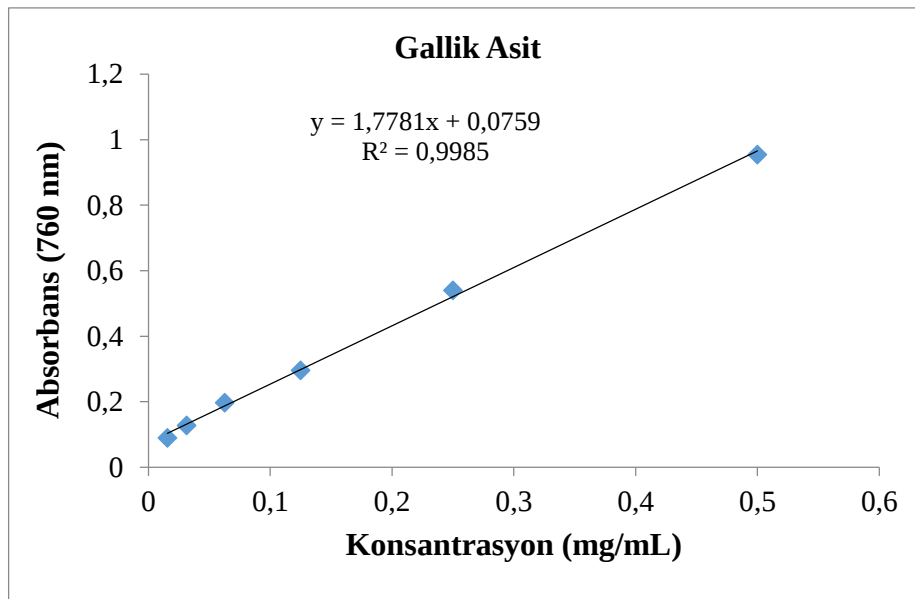
İstatistiksel olarak grupların biyokimyasal ve histolojik verilerinin analizlerinde sayısal değerler Kruskal Wallis varyans analizi (post hoc olarak Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi) ile karşılaştırıldı, ortalama ve Standart sapmalar hesaplanarak $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Antioksidan Kapasitesine Ait Bulgular

6.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Karayemiş ekstraktında gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi ve gallik asit standardı kullanılarak tayin edildi. 760 nm’deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri ise x-ekseninde gösterilerek standart çalışma grafiği hazırlandı (Şekil 2).



Şekil 2. Gallik asit standart çalışma grafiği

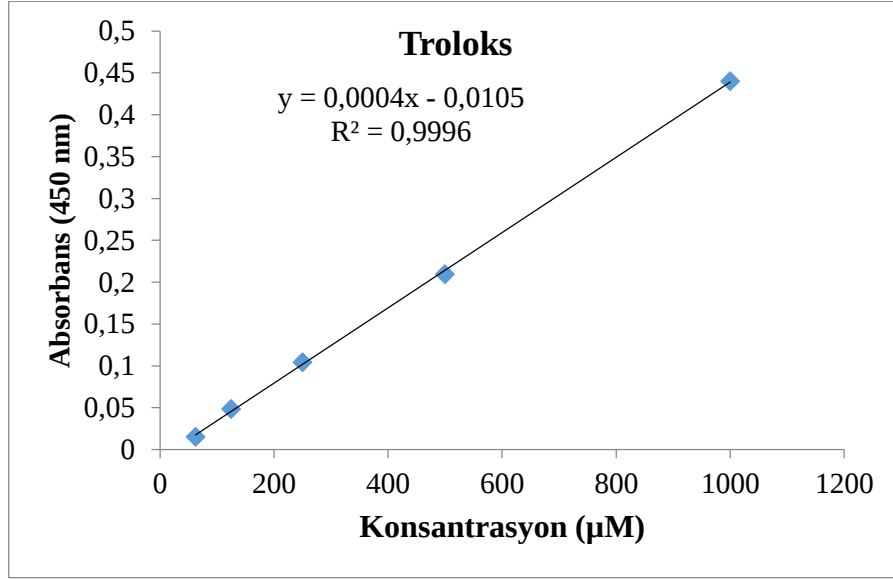
Toplam fenolik madde miktarı gallik asit kalibrasyon denkleminde yararlanarak hesaplandı. 3 paralel tekrar yapıldı, ortalamalar alındı ve standart sapma değeri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 9’da verilmiştir. Karayemiş ekstraktının fenolik madde içeriği gram karayemiş numunesi başına mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak verildi.

Tablo 9. Karayemiş numunesinde toplam fenolik madde miktarı

Numune	Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/gr karayemiş)
Karayemiş Ekstraktı	3.213±0.162

6.1.2. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC)

Kalibrasyon eğrisi Troloks®'un değişik konsantrasyonlarındaki absorbans değerlerinden faydalanarak çizildi. Troloks® konsantrasyonundan yola çıkarak numunelerin antioksidan kapasitesi ve μM Troloks® eşdeğeri/gr numune olarak antioksidan kapasite (TEAC) ifade edildi (Tablo 10).



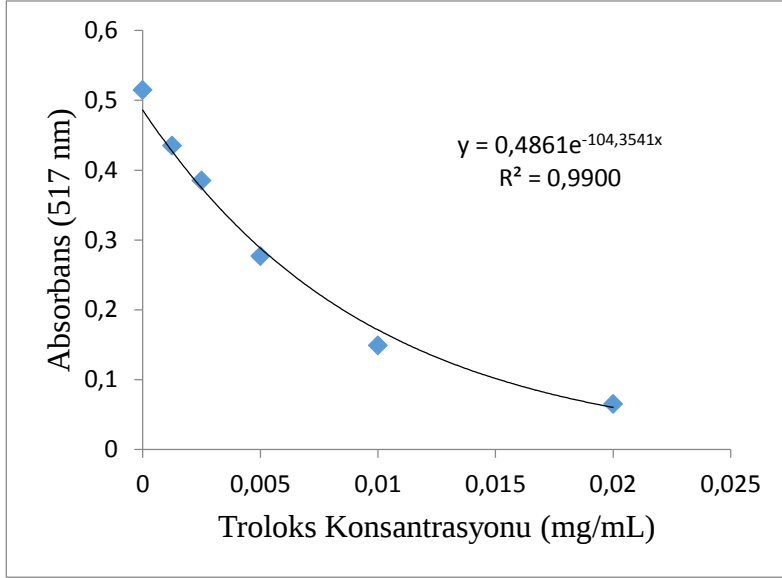
Şekil 3. Troloks standart çalışma grafiği

Tablo 10. Karayemiş numunesinin bakır (II) indirgeme kuvveti

Numune	Bakır(II) İndirgeme Kuvveti (CUPRAC) (mmol TEAC/gr numune)
Karayemiş Ekstraktı	3.442±0.042

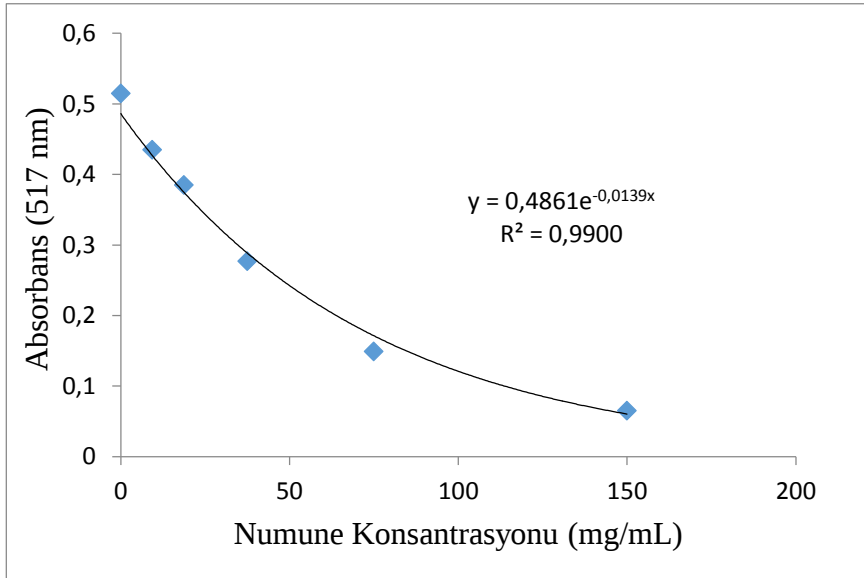
6.1.3. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi

Artan numune konsantrasyonuna karşı 517 nm' deki absorbanslar grafiğe geçirilerek elde edilen grafiklerden antioksidan kapasiteler kantitatif olarak ifade edilmiştir. Antioksidan aktivite, numunenin SC₅₀ değeri belirlenerek standartla (Şekil 4) karşılaştırılmıştır.



Şekil 4. Troloks standart çalışma grafiği

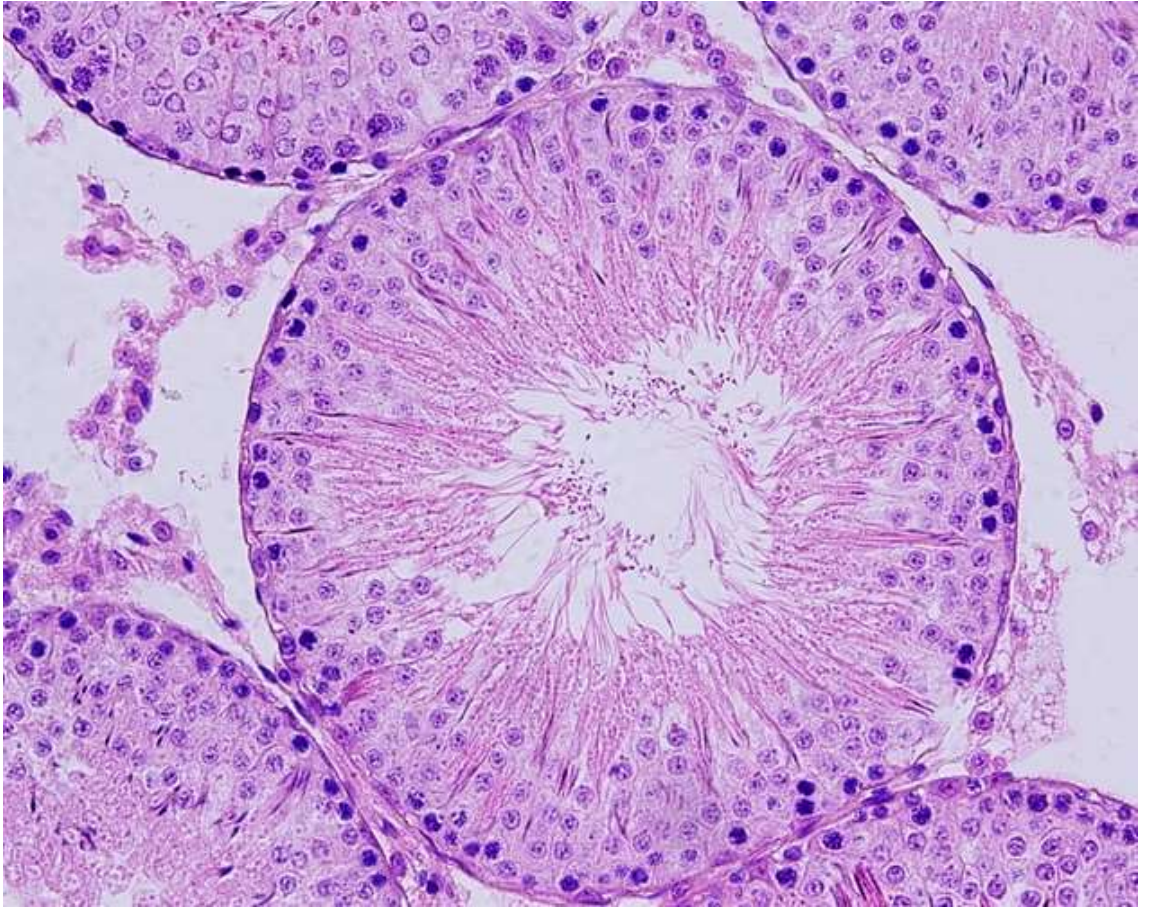
SC₅₀, başlangıç DPPH• radikal konsantrasyonunu (kontrolün absorbansını) yarıya düşüren numune konsantrasyonudur. Sonuçlar mg/mL cinsinden verildi. Standart olarak Troloks® kullanılmıştır. Troloks standardının SC₅₀ değeri 0.006±0, karayemiş ekstraktının SC₅₀ değeri ise 48.663±0.721 mg/mL olarak bulundu (Şekil 5).



Şekil 5. Karayemiş ekstraktına ait DPPH çalışma grafiği

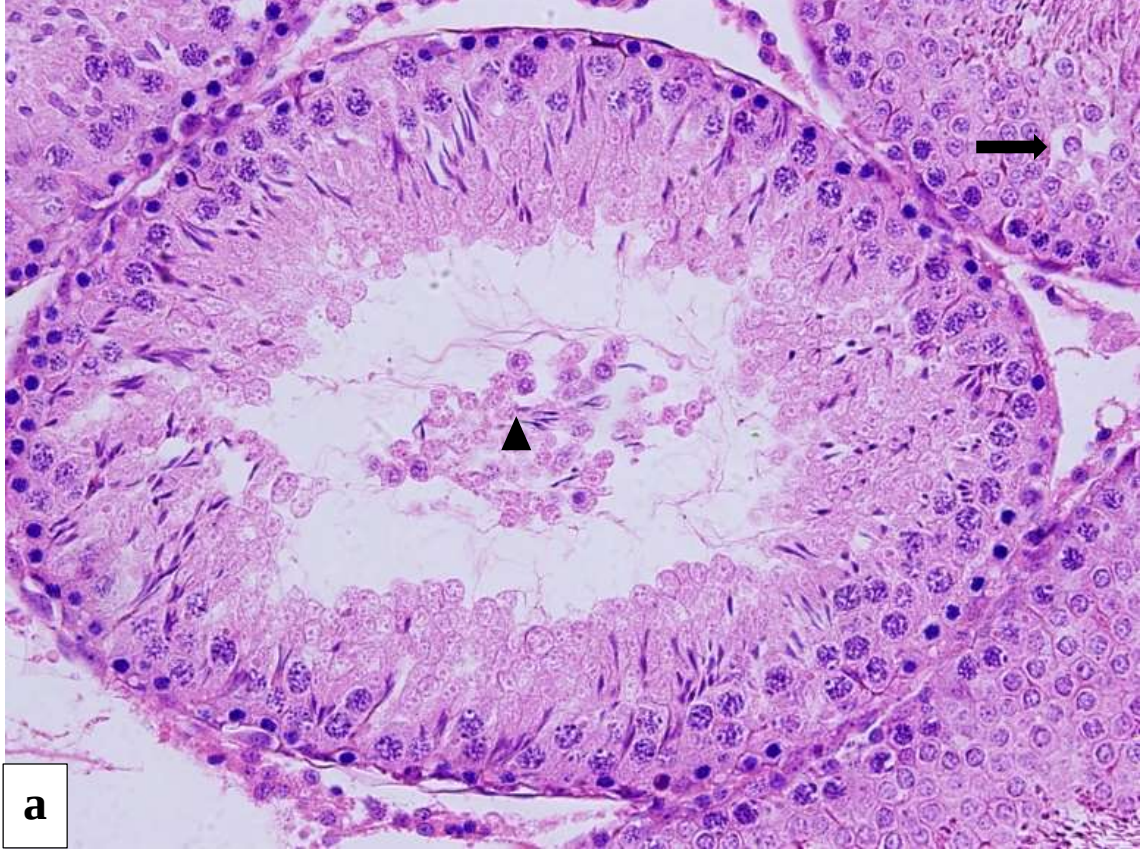
6.2. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular

Kontrol grubu sıçanlarda, seminifer tübüller içindeki germinal hücrelerin normal döngüde seyrettiği, interstisyel alan dokusunun bütünlüğünü koruduğu gözlemlendi (Resim4).



Resim 4. Kontrol grubu. Mikrofotografi X400 H.E

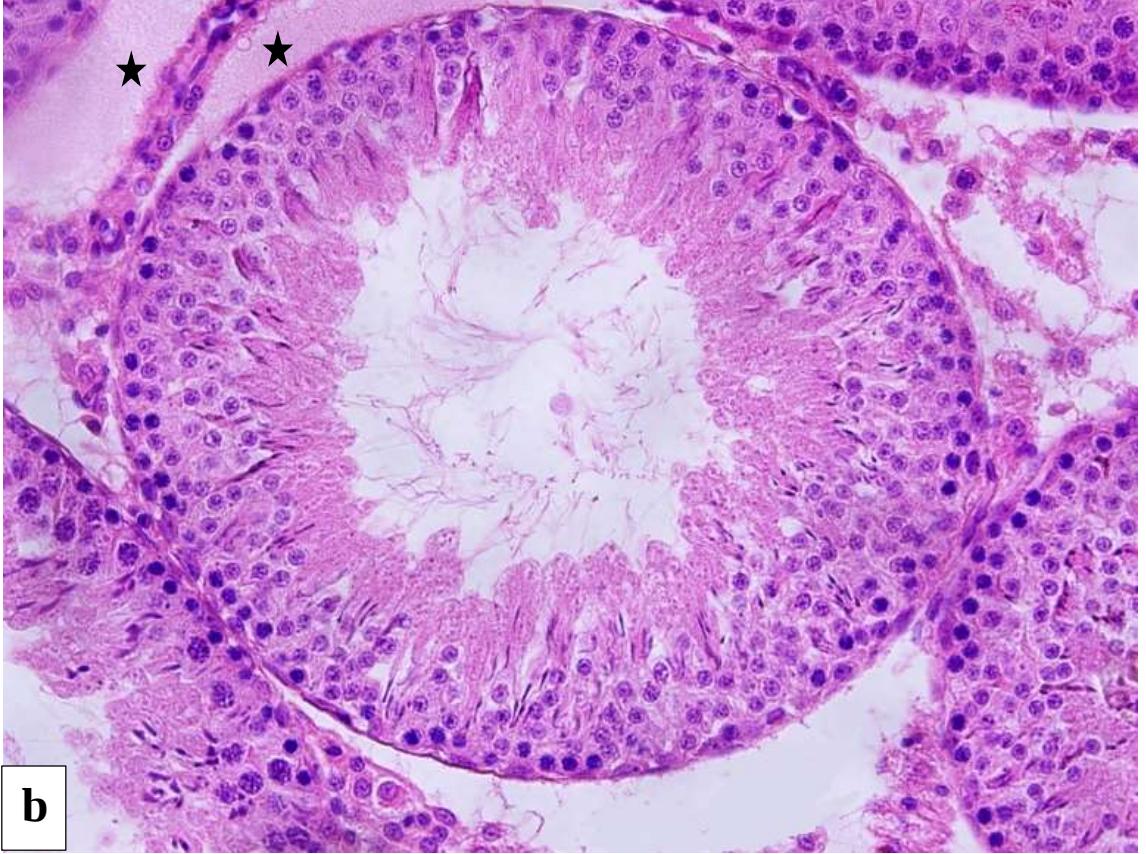
MTX grubuna ait seminifer tübüllerin lümenine daha fazla sayıda immatür germinal hücrelerin d k ld   , Sertoli hücreleri ile spermatogoniumlar arasında açılmalar, germinal epitelde yer yer vakuolizasyon olduğu görüldü (Resim 5a ve 5b).



Resim 5a. MTX grubu. Mikrofotografi X400. H.E

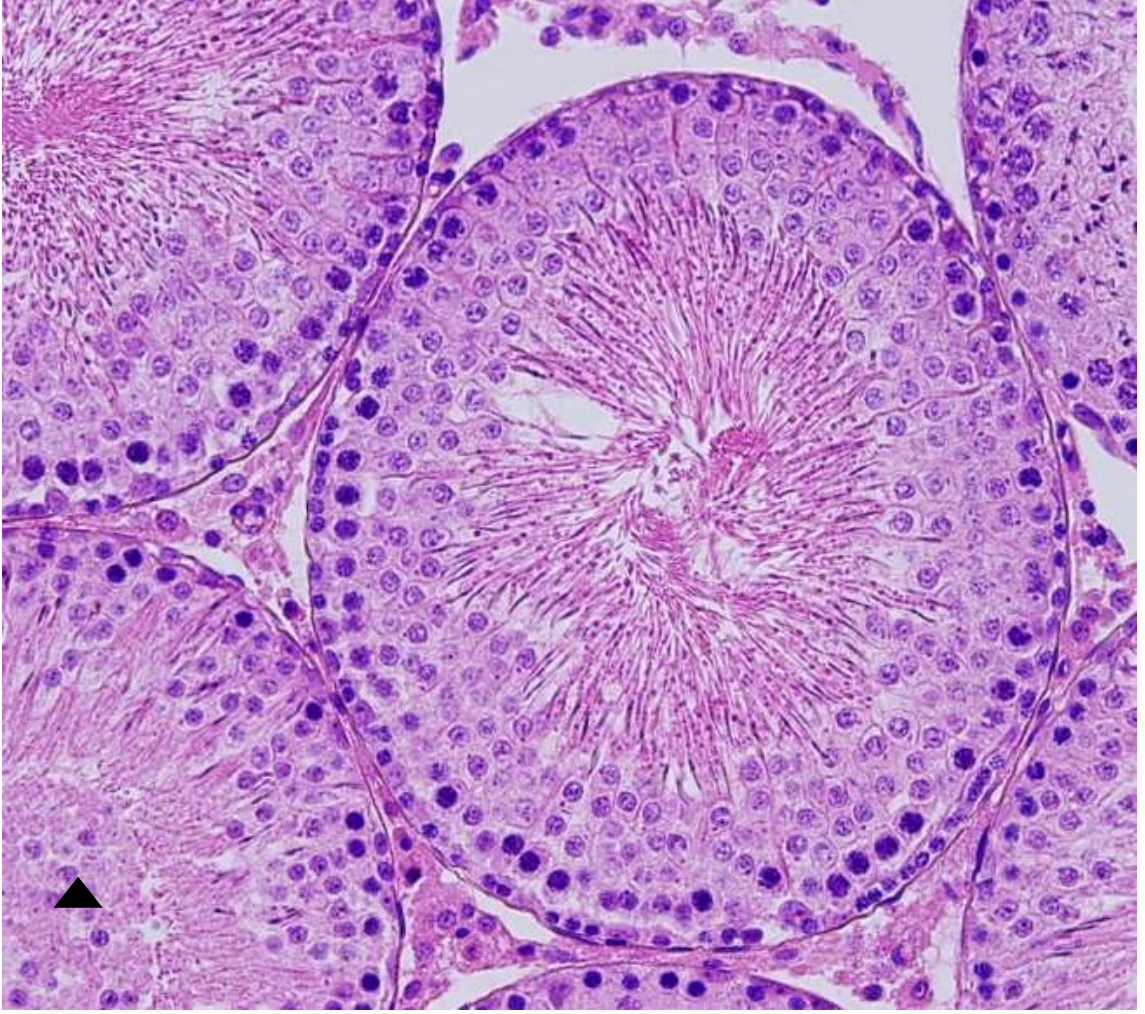
▲ = Lümene dökülen immatür germ hücreleri

➡ = Vakuolizasyon



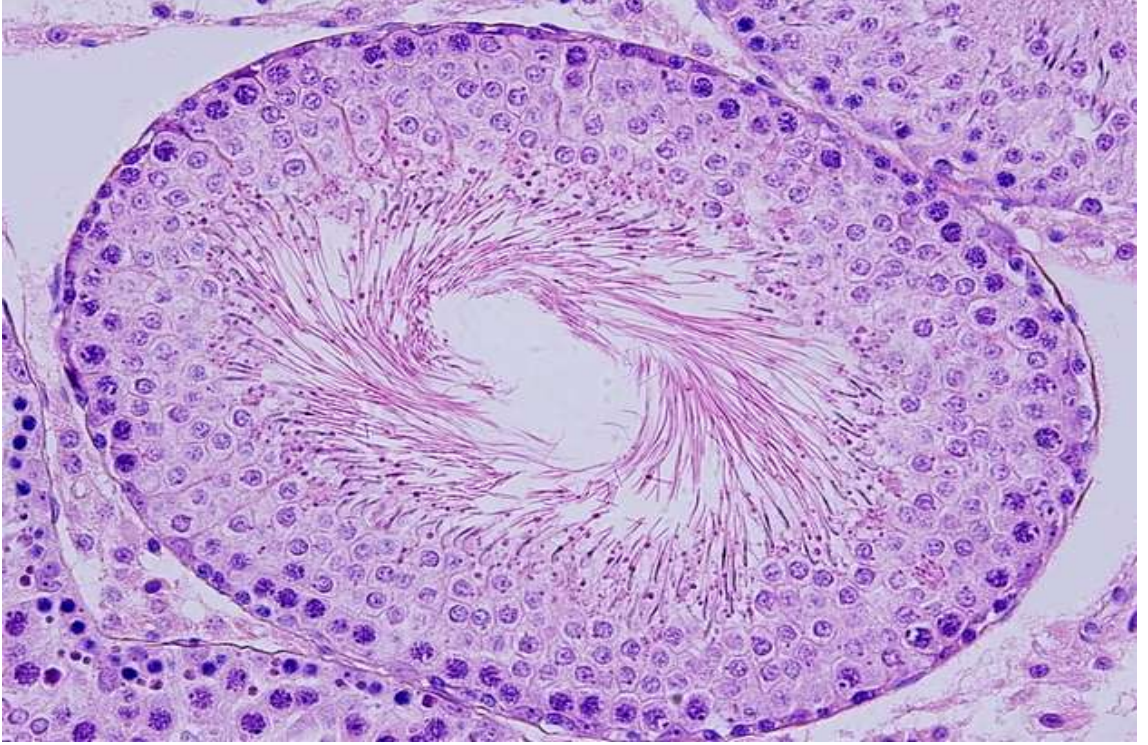
Resim 5b. MTX grubu. Mikrofotografi X400. H.E
★ = İnterstisyumda ödem

MTX+LO grubundaki seminifer tübüllerde Sertoli hücresi ve spermatogonyum arasındaki açılmaların ve vakuolizasyonun belirgin derecede azaldığı, spermatogenik hücrelerin yapısının korunduğu izlendi (Resim 6).



Resim 6. MTX+LO grubu. Mikrofotografi X400. H.E
▲ = Lümeneye dökülen immatür germ hücreler

LO grubundaki seminifer tübüller kontrol grubuna benzer şekilde spermatogenik hücre döngüsünün normal biçimde seyrettiği ve tübül yapısı bütünlüğünde herhangi bir bozulma olmadığı gözlemlendi (Resim 7).



Resim 7. LO grubu. Mikrofotografi X400. H.E

Deney gruplarına ait seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve germinal hücrelerin lümenine döküldüğü tübül sayısına ait istatistiksel verilerin sonuçları Tablo 11’ de verilmiştir.

Tablo 11. Histolojik incelemelerin ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	Tübül Çapı (µm)	Germinal Epitel Kalınlığı(µm)	Lümenine Germinal Hücre Dökülen Tübül Sayısı (%)
Kontrol	287.98±2.749	94.8032±6.632	6.431±1.023
MTX	246.24 ^a ±8.86	55.6590 ^a ±1.306	62.5712 ^c ±4.343
MTX+LO	277.89 ^b ±2.598	87.2592 ^b ±6.652	31.1223 ^d ±3.056
LO	285.91±4.324	94.5608±6.84	6.3024±4.082

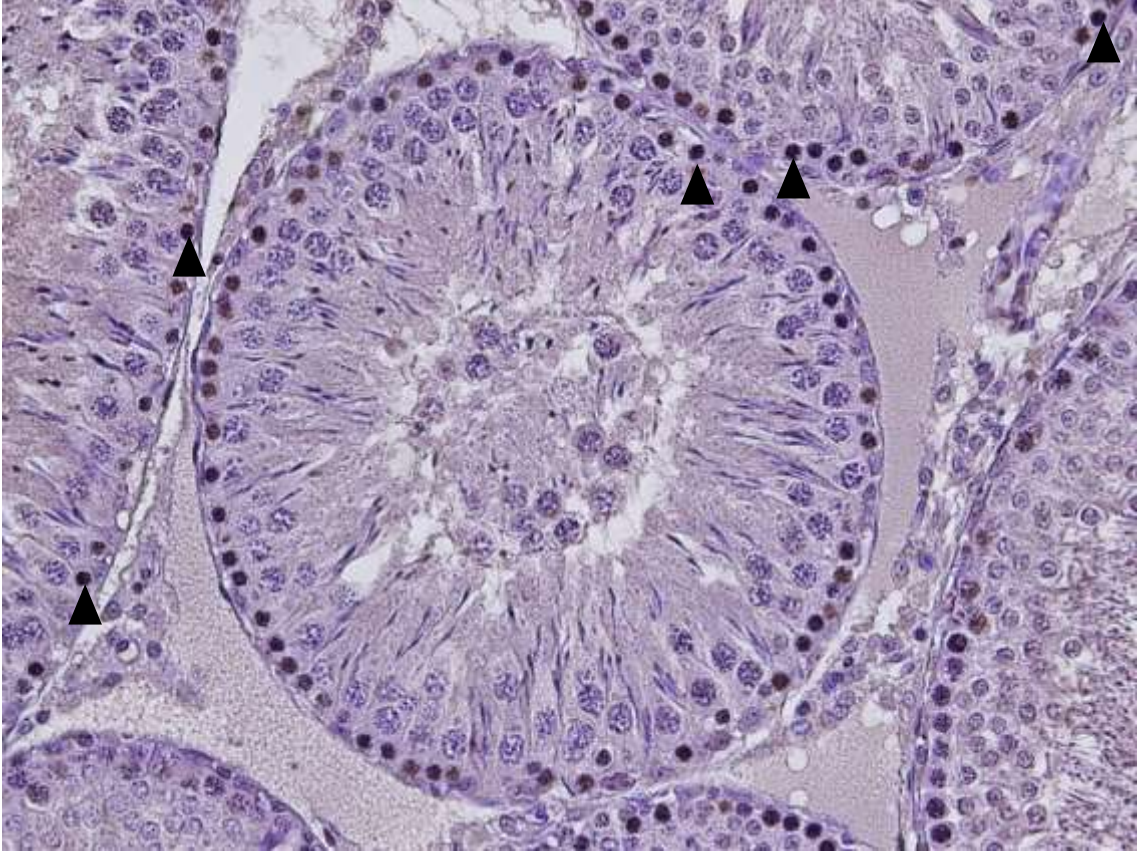
a= MTX grubu değerleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p<0.05).

b= MTX+LO grubu değerleri MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p<0.05).

c= MTX grubu değerleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p<0.05).

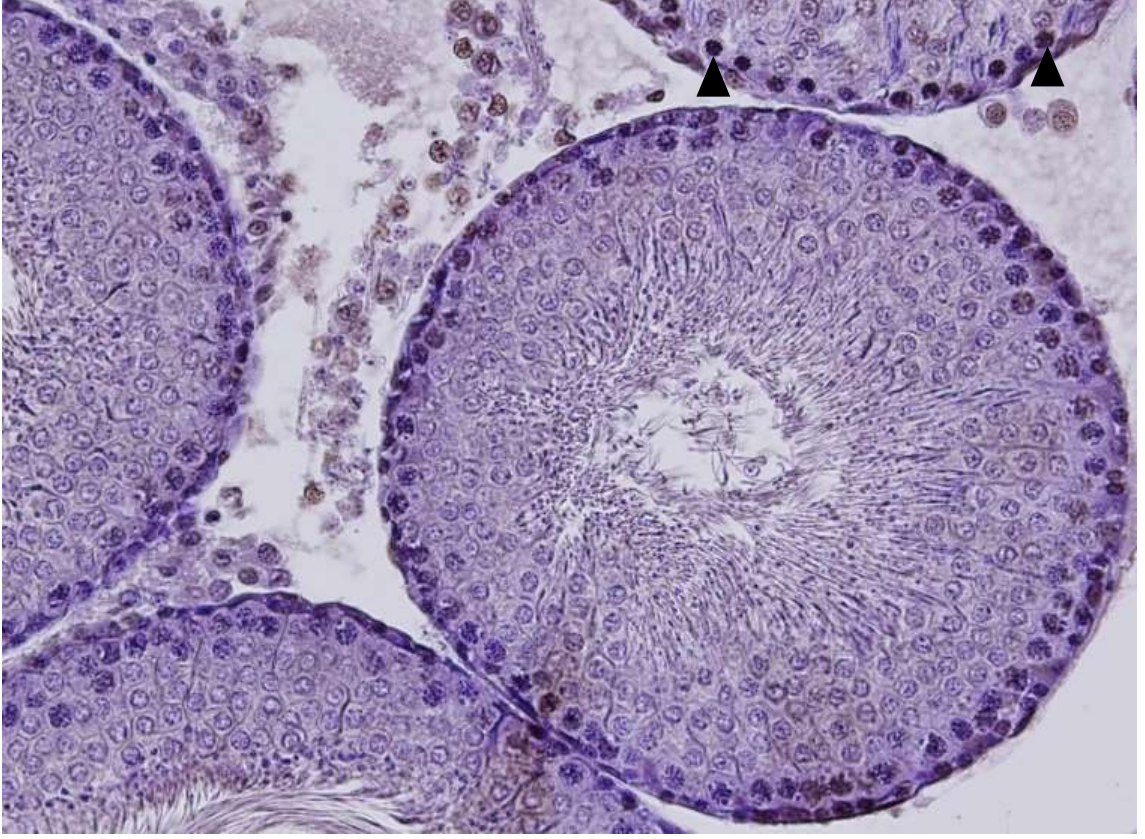
d= MTX+LO grubu değerleri MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p<0.05).

TUNEL metodu ile boyanan dokularda MTX grubunda apoptotik hücre sayısının kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi (Resim 8).



Resim 8. MTX grubu. Mikrofotografi X400. DAB boyama
▲ = Apoptotik hücre

MTX+LO grubundaki apoptotik hücre sayısının MTX grubuna göre anlamlı derecede azaldığı Resim 9’ da görülmektedir.



Resim 9. MTX+LO grubu. Mikrofotografi X400. DAB boyama
▲ = Apoptotik hücre

LO grubunda kontrol grubuna benzer olarak çok seyrek apoptotik hücre izlendi (Resim 10).



Resim 10. LO grubu. Mikrofotografi X400. DAB boyama
▲ = Apoptotik hücre

Deney gruplarına ait testis dokularının seminifer tübül yapısının Johnsen testis hasar skorlaması ile değerlendirme sonuçları, TUNEL tekniği ile değerlendirilen Apoptotik İndeks (AI) Tablo 12’ de verilmiştir. Johnsen Skoru değerlendirmesine göre; MTX grubu skorunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı; MTX+LO grubunda MTX grubuna göre anlamlı derecede arttığı izlendi. AI değerlendirmesine göre; AI’ in MTX grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı; MTX+LO grubuna ait AI’ in MTX grubuna göre anlamlı derecede azaldığı izlendi.

Tablo 12. Testis dokusunda Johnsen Skoru ve Apoptotik İndeks değerlendirilmesi

Gruplar	Johnsen Skoru	Apoptotik İndeks (%)
Kontrol	9.5833±0.497	2.1189±1.341
MTX	4.4500 ^a ±0.79	53.2484 ^c ±3.384
MTX+LO	7.6667 ^b ±0.572	37.0945 ^d ±2.262
LO	9.4000±0.558	2.1226±3.094

a= MTX grubu değerleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p<0.05).

b= MTX+LO grubu değerleri MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p<0.05).

c= MTX grubu değerleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p<0.05).

d= MTX+LO grubu değerleri MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p<0.05).

6.3. Semen Analizine Ait Bulgular

Deney gruplarına ait semen analizinde total sayı, canlılık ve progresyon değerlendirme sonuçları Tablo 13’ te verilmiştir.

Bu bulgulara göre MTX uygulamasından sonra sperm sayısında, canlılıkta ve progresif hareketli sperm yüzdesinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma gözlemlendi. MTX+LO grubunun MTX grubuna göre semen analizi bulgularında sperm sayısında, canlılıkta, progresif hareketli sperm yüzdesinde anlamlı derecede artış olduğu görüldü.

Tablo 13. Semen analizine ait bulgular

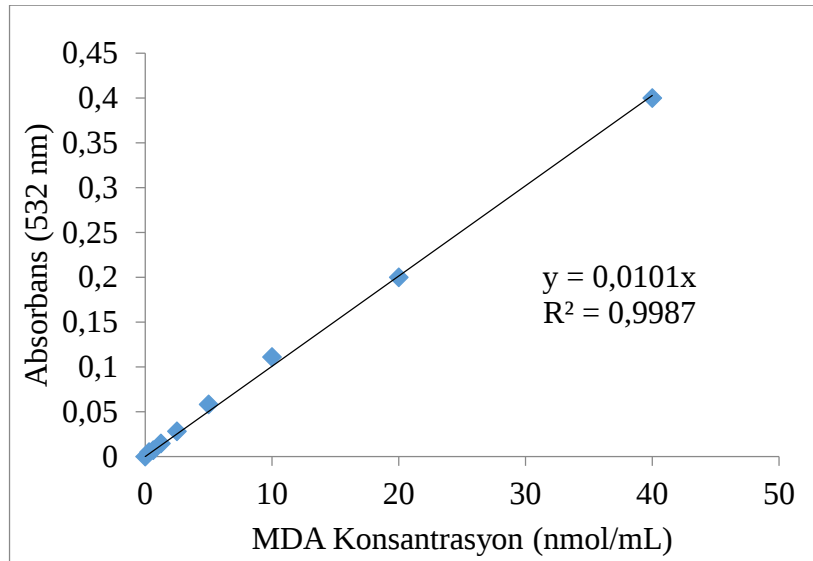
Gruplar	Total Sayı (x10 ⁶)	Progresif (%)	Canlılık (%)
Kontrol	22.1667±2.13	68.2751±4.04	65.6667±8.04
MTX	15.50 ^a ±1.87	33.0889 ^a ±6.35	39 ^a ±5.76
MTX+LO	17.6667 ^b ±1.03	56.5662 ^b ±9.86	54.6667 ^b ±5.31
LO	23.1667±2.22	72.9219±5.92	60±3.34

a= MTX grubu değerleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p<0.05).

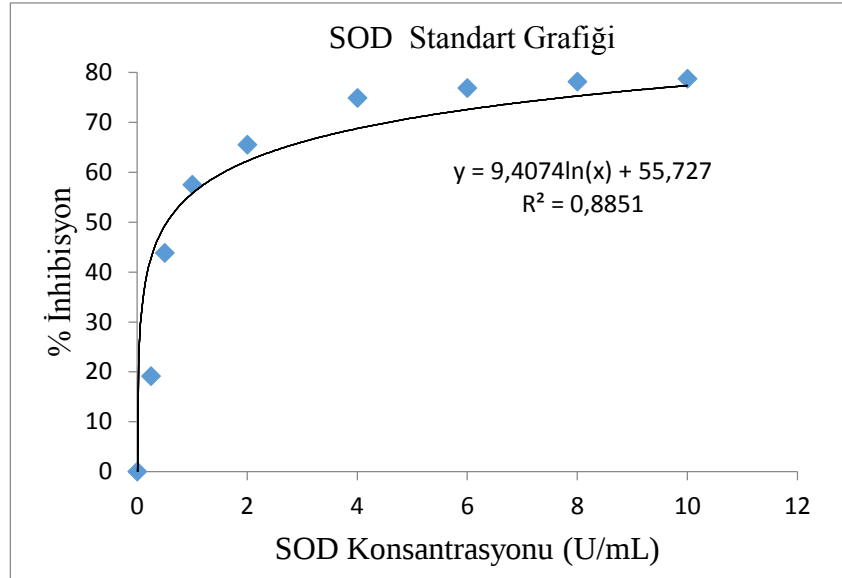
b= MTX+LO grubu değerleri MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p<0.05).

6.4. Biyokimyasal Bulgular

Plazmada yapılan MDA ve SOD tayinine ait standart eğri grafikleri Şekil 6 ve Şekil 7' de verilmiştir.



Şekil 6. Plazma için hazırlanan MDA standart çalışma grafiği



Şekil 7. Plazma için hazırlanan SOD standart çalışma grafiği

Kan plazmasında yapılan biyokimyasal analizlerin Mann-Whitney U testine göre değerlendirilmesi sonucu; MTX grubu MDA, SOD, CAT ve PC değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı, MTX ve MTX+LO grupları arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda ise bu parametrelerin anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü (Tablo 14). Kruskal Wallis testine göre incelenen parametrelerin her grup içindeki dağılımının anlamlı olduğu izlendi.

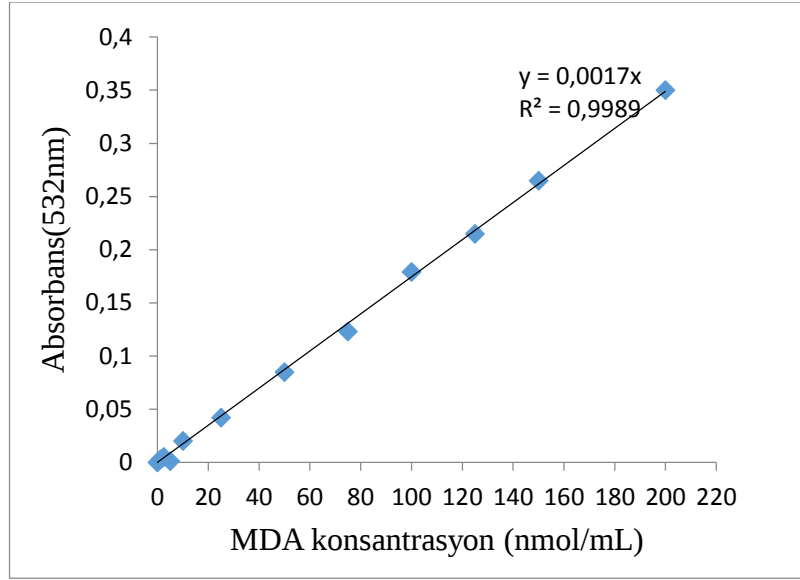
Tablo 14. Kan plazması biyokimyasal değerlendirmeleri

Gruplar	MDA (nmol/0.15 mL plazma)	SOD (U/mL plazma)	CAT (k değeri 10 sn)	PC (nmol/mg protein)
Kontrol	2.7611±0.751	1.9962±0.49	0.1314±0.022	0.6328±0.026
MTX	9.7672 ^a ±1.303	4.2231 ^a ±1.98	0,1533 ^a ±0.02	1.3343 ^a ±0.247
MTX+LO	4.5498 ^b ±1.31	2.021 ^b ±0.67	0.1478 ^b ±0.014	0.7427 ^b ±0.07
LO	2.8634±0.487	1.9392±0.31	0.1302±0.039	0.6654±0.077

a= MTX grubu değerleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.05$).

b= MTX+LO grubu değerleri MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0.05$).

Testis dokusunda yapılan MDA tayinine ait standart eğri grafiği Şekil 8' de verilmiştir.



Şekil 8. Testis dokusu için hazırlanan MDA standart çalışma grafiği

Testis dokusu üzerinde yapılan biyokimyasal analizlerin Mann-Whitney U testine göre değerlendirilmesi sonucu; MTX grubu MDA, SOD, CAT ve PC değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı, MTX ve MTX+LO grupları arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda ise bu parametrelerin anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü (Tablo 15). Kruskal Wallis testine göre incelenen parametrelerin her grup içindeki dağılımının anlamlı olduğu izlendi.

Tablo 15. Testis dokusu biyokimyasal değerlendirmeleri

Gruplar	MDA (nmol/mg protein)	SOD (U/mg protein)	CAT (k/mg protein)	PC (nmol/mg protein)
Kontrol	4.6215±0.06	1.209±0.057	0.051±0.001	0.331±0.104
MTX	5.5798 ^a ±0.27	1.8095 ^a ±0.18	0.077 ^a ±0.002	1.1516 ^a ±0.03
MTX+LO	4.6088 ^b ±0,03	1.4058 ^b ±0.06	0.0575 ^b ±0.002	0.6301 ^b ±0.06
LO	4.6985±0.08	1.2481±0.01	0.04948±0.004	0.4652±0.093

a= MTX grubu değerleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır (p<0.05).

b= MTX+LO grubu değerleri MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p<0.05).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Romatolojik ve dermatolojik hastalıkların çeşitli formları ile solid organ ve lösemiler gibi malign hastalıkların tedavisinde uzun yıllardır kullanılan, bir antimetabolit ve folik asit antagonisti olan MTX, önemli klinik sorunlara ve önceden tahmin edilemeyen ciddi yan etkilere yol açabilmektedir (74, 75). MTX toksisitesi prositokinlerin artan üretimi ile birlikte görülen inflamatuvar cevabın oluşmasıyla karakterizedir (80, 98). Gao ve arkadaşları MTX'in ksenobiyotiklerin ve endotoksinlerin, makrofaj ve nötrofil infiltrasyonunu başlattıklarını, sonunda serbest oksijen radikalleri artışına yol açtıklarını (99); Oktar ve arkadaşları ise MTX'in testis içine infiltre olan makrofaj ve nötrofiller aracılığı ile oksidatif stresin arttığını göstermişlerdir (82). Literatürde kafeik asit, C vitamini, E vitamini, melatonin, n-asetilsistein gibi çok sayıda antioksidan maddeler kullanılarak MTX' in oksidatif hasar ile oluşturduğu yan etkilerini azaltmak amacıyla yapılan çalışmalar mevcuttur (76, 79, 100-102). Ayrıca üzüm çekirdeği, sarımsak ve ursodeoksikolik asidin antioksidan özellikleri kullanılarak MTX toksisitesine karşı olumlu yönde etki gösterdikleri bulunmuştur (75, 103, 104). Bu çalışmada Karadeniz Bölgesinde bolca tüketilen, halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ve antioksidan yönünden zengin olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmış *Laurocerasus officinalis* Roem. (Karayemiş) meyvesinin, tek doz (30 mg/kg) MTX uygulamasının sıçan testisi ve biyokimyasal parametreler üzerindeki olumsuz etkilerine karşı koruyucu etkisinin olup olmadığı incelendi. Ayrıca yapılan bu çalışma MTX toksisitesine karşı LO meyvesinin etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır.

Bu çalışmada MTX verilen grupta kontrol grubuna göre; seminifer tübül çapının ve germinal epitel kalınlığının anlamlı şekilde azaldığı, germinal epitelde germinal hücreler ile Sertoli hücreleri arasında açılmaların olduğu, vakuolizasyon ve lümenine immatür germinal hücrelerin döküldüğü seminifer tübül sayısında artış gözlemlendi. Bu grupta germinal epiteldeki hücre kayıplarının arttığı tespit edildi. Bu bulgular germinal epitelde önemli derecede hasar oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca MTX grubu semen analizinde total sperm sayısı, canlılık ve hareketlilik yüzdelерinin kontrol grubuna oranla anlamlı derecede azaldığı belirlendi. MTX+LO grubunda seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığının MTX grubuna göre anlamlı ölçüde arttığı, immatür germinal hücrelerin lümenine döküldüğü tübül sayısının ise azaldığı tespit edildi. MTX+LO grubu

semen analizinde total sperm sayısı, canlılık ve hareketlilik yüzdelerinin MTX grubuna göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi.

Histolojik değerlendirmelerde kullanılan bir diğer parametre apoptotik indekstir. Apoptoz, antikanser ilaçların eşey hücrelerine verdiği hasarın önemli bir göstergesidir (105).

Çalışmamızda DNA fragmentasyonlarını belirlemek amacıyla TUNEL metodu kullanılarak apoptotik hücreler belirlendi ve apoptotik indeks çıkarıldı. MTX verilen grupta apoptoza uğramış hücrelerin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı, MTX+LO grubunda ise MTX grubuna oranla anlamlı derecede azaldığı görüldü. Ayrıca testis hasarını daha iyi değerlendirmek ve seminifer tübüllerde gerçekleşen spermatogenezin yeterliliğini ve olgun spermatozoa sayısını belirlemek amacıyla Johnsen Skorum Sistemi kullanıldı. Bu skorum ile parametrelerin değerlendirilmesi sonucu kontrol grubuna göre MTX grubu skorumun anlamlı derecede azaldığı, MTX+LO grubunun MTX grubuna göre anlamlı derecede arttığı belirlendi.

Organ yetersizliklerinin patogeneğinde ve bazı ksenobiyotiklerin böbrek ve karaciğerde toksisite oluşturmalarında reaktif oksijen radikallerinin rolü kanıtlanmıştır (106). MDA seviyesindeki artış, hücre membran harabiyeti ve aminoasit yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonunun önemli bir nedeni olduğuna inanılan, serbest oksijen radikalleri aracılı lipid peroksidasyonunun iyi bir göstergesidir (107, 108). MTX' in testis, ince bağırsak, karaciğer ve böbrek dokusu üzerine olan etkilerinin araştırıldığı deneysel çalışmalarda, MTX' in doku MDA seviyelerini belirgin şekilde arttırdığı, bu artışın antioksidan özellikleri olan melatonin (76, 98) ve taurin (106) ile baskılandığı gösterilmiştir. Bundan dolayı, MTX' in neden olduğu testis, barsak, karaciğer ve böbrek toksisitesinde serbest radikallerin rol oynadığı iddia edilebilir.

Eser, MTX' in yol açtığı hasarı düzeltmede propolisin etkisini incelediği uzmanlık tezi çalışmasında, MTX grubunda karaciğer dokusu ve plazma MDA seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuştur. Bu sonuç, MTX tedavisinin karaciğer dokusu ile plazmada oksidatif hasara ve lipid peroksidasyonuna neden olduğunu göstermektedir. MDA seviyesi MTX grubuna göre propolis-MTX grubunda anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Bulgulara dayanarak, propolisin MTX' in neden olduğu sistemik oksidatif hasarda lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin olduğu

belirtmiştir. Bu etkinin propolisin polifenolik bileşiklerinin antioksidan özellikleri ile alakalı olabileceğini belirtmişlerdir (109).

Birçok araştırmacı oksidatif stresin oluşturduğu testis hasarını belirlemek amacıyla oksidatif stresin bir indikatörü olan MDA seviyesini ölçmüşlerdir (110). MDA seviyeleri, LPO' nun artmasından dolayı serbest radikal üretilmesinde önemli bir belirteçtir (111). MTX' in uygulandığı bireylerde kan, karaciğer, testis ve böbrek MDA seviyelerinin arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (4, 98). Armağan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tek doz MTX uygulaması sonucu, testislerde oksidatif stresin arttığını belirtmişlerdir (4).

Bu çalışmada hem plazma hem de doku MDA düzeyleri MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bununla beraber doku ve plazma MDA seviyeleri MTX+LO grubunda MTX grubuna göre anlamlı derecede azaldı. LO grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Bulgular, karayemiş meyve ekstraktının, MTX' in neden olduğu sistemik oksidatif hasarda lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki yaptığını, bu etkinin içerdiği polifenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri ile alakalı olabileceğini düşündürmektedir. Karahalil ve Şahin, karayemiş meyvesinde bulunan fenolik bileşik ve flavonoid içeriğini yaptıkları çalışma ile aydınlatmışlardır. Çalışma sonucunda karayemiş meyvesinin bol miktarda klorojenik asit, vanilik asit, p-kumarik asit, p-hidroksi benzoik asit ve kateşin içerdiğini tespit etmişlerdir (112).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir (113). Oksidatif stres sperm hasarı ve infertilite açısından kritik rol oynamaktadır. Spermatozoonlar ROS' a karşı çeşitli enzimatik antioksidanlar, vitaminler ve glutatyon gibi biyomoleküller ile mücadele etmektedir (114). Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit anyonu, bakırlı bir enzim olan SOD aracılığıyla H_2O_2 ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır (113).

Bu çalışmada MTX ile oluşan serbest radikalleri savurucu antioksidan enzimlerden SOD ve CAT incelendi. MTX grubunda, hem plazma hem de doku örneklerinde SOD ve CAT seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. MTX+LO grubunda ise SOD ve CAT miktarı MTX grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Bu bulgular testis dokusundaki SOD ve CAT seviyelerinin artışının MTX' e dayalı oksidatif stres altında serbest radikallerin aşırı üretimini süpürmek için bu antioksidan enzimlerin fazla salındığını düşündürmektedir (115).

Serbest radikallerin hedefi olan biyomoleküllerden birisi de proteinlerdir. Proteinlerin oksidasyon ürünü olan PC miktarı kit yardımıyla spektrofotometrik olarak ölçüldü. MTX grubunda, hem plazma hem de doku örneklerinde PC seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. MTX+LO grubunda ise MTX grubuna göre anlamlı derecede azalma belirlendi.

Bu çalışmanın verileri, MTX sitotoksitesinin mekanizmalarından birinin oksidatif stres olduğunu, karayemiş ekstraktının histopatolojik olarak testis dokusunda ve biyokimyasal olarak doku ve plazmada gösterilen koruyucu etkisinin reaktif oksijen radikallerini temizlemesi sonucu lipid peroksidasyonunu engellemesi mekanizmasıyla olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, MTX' in testis fonksiyonunu bozduğunu ve semen kalitesini azalttığını; karayemiş meyve ekstraktı uygulamasının bu hasarı önlemede olumlu etki yaptığını ve semen kalitesini arttırdığını göstermektedir. Bununla birlikte konu ile ilgili etkin doz ve uygulama süresinin belirlenmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Kırca N, Pasinlioğlu T (2013). İnfertilite Tedavisinde Karşılaşılan Psikososyal Sorunlar. *Psikiyatri Güncel Yaklaşımlar* 5 (2): 162-78.
2. Kim JC, Kim KH, Chung MK (1999). Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reprod Toxicol* 13 (5): 391-7.
3. Sener G, Ekşioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Yeğen BC (2006). Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol* 542 (1-3): 170-8.
4. Armagan A, Uzar E, Uz E, Yılmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoğlu HR, et al. (2008). Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum Exp Toxicol* 27 (7): 547-52.
5. Ateşşahin A, Sahna E, Türk G, Ceribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A, et al. (2006). Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res* 41 (1): 21-7.
6. Ateşşahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Ceribaşı AO (2006). Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* 21 (1): 42-7.
7. Sussman A, Leonard JM (1980). Psoriasis, methotrexate, and oligospermia. *Arch Dermatol* 116 (2): 215-7.
8. Morris LF, Harrod MJ, Menter MA, Silverman AK (1993). Methotrexate and reproduction in men: case report and recommendations. *J Am Acad Dermatol* 29 (5 Pt 2): 913-6.
9. Bayram M, Ozogul C, Dursun A, Ercan ZS, Isik I, Dilekoz E (2005). Light and electron microscope examination of the effects of methotrexate on the endosalpinx. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 120 (1): 96-103.
10. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Otlu A (2009). Antiapoptotic and antioxidant effects of beta-carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril* 92 (6): 2028–33.

11. Akkol EK, Kırmızıbekmez H, Küçükboyacı N, Gören CA, Yesilada E (2012). Isolation of active constituents from cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) leaves through bioassay-guided procedures. J Ethnopharmacol 139 (2): 527-32.
12. Kolaylı S, Küçük M, Duran C, Candan F, Dinçer B (2003). Chemical and Antioxidant Properties of *Laurocerasus officinalis* Roem. (Cherry Laurel) Fruit Grown in the Black Sea Region. J Agric Food Chem 51 (25): 7489-94.
13. Yıldırım M (2000). İnsan Anatomisi. Beşinci baskı. Nobel Yayıncılık, İstanbul; 224-9.
14. Çimen A (1987). Anatomi. Birinci baskı. Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa; 396-7.
15. Arıcı K (1997). Anatomi. İkinci baskı. Güneş Kitabevi, Ankara; 417-26.
16. Çimen A (1996). Anatomi. Altıncı baskı. Bursa Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa; 361-7.
17. Cumhuriyet M, Yener N, Tuncel M (2001). Temel Anatomi. METU Press, Ankara; 287-92.
18. Sancak B, Cumhuriyet M (1999). Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar. Beşinci baskı. ODTÜ Yayıncılık, Ankara.
19. Şeftalioğlu A (1998). Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. Üçüncü baskı. Tıp ve Teknik Yayıncılık, Ankara; 346-50.
20. Sadler TW (1996). Langman's Medical Embryology. Medikal Embriyoloji. Seventh ed. Çeviren: Başaklar AC, Palme Yayıncılık, Ankara, 272-5.
21. Parker Ş (1990). Histoloji. Birinci Baskı. Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa; 260-88.
22. Junqueira LC, Carneiro J (2006). Basic Histology. Temel Histoloji Text & Atlas. Tenth ed. Çeviren: Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 431-47.
23. Eşrefoğlu M (2004). Genel ve Özel Histoloji. Birinci baskı. Pelikan Yayıncılık, Ankara; 305-15.

24. Erbenli T. (1990). Histoloji. İkinci baskı. Güneş Kitabevi Yayınları, Ankara; 153-90.
25. Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA (1988). Text/Atlas of Histology, W.B. Saunders International Edition, Philadelphia; 635-68.
26. Clermont Y (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52 (1): 198-236.
27. Soylu SM (2010). Rat Fizyolojisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine* 22-25.
28. Adler ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutat Res* 352 (1-2): 169-72.
29. Foster WG, Maharaj-Briceño S, Cyr DG (2011). Dioxin-induced changes in epididymal sperm count and spermatogenesis. *Cien Saude Colet* 16 (6): 2893-905.
30. Kurutaş EB, Güler Fİ, Kılınç M (2004). Serbest radikaller. *Arşiv*, 13: 120-132.
31. Kopani M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biro C (2006). Oxidative stress and electron spin resonance. *Clin Chim Acta* 364 (1-2): 61-66.
32. Halliwell B (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91 (3C): 14-22.
33. Akkuş İ (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Birinci baskı. Mimoza Yayınları, 1-60.
34. Burçak G, Gülnur A (2004). Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35: 159-169.
35. Gutteridge JMC, Halliwell B (1991). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Ed, Oxford: Clarendon Press 1-276.
36. Sies H (1991). Oxidative stress from basic research to clinical application. *Am J Med* 9 (3C): 31-37.
37. Sies H (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215 (2): 213-9.
38. Cadenas E (1998). Mechanisms of Antioxidant Action. In: Tomris Özben, editör. *Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants*. Plenum Press, New York; 237-51.

39. Halliwell B, Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.
40. Knight JA (1995). Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann Clin Lab Sci* 25 (2): 111-21.
41. McCord JM, Day ED Jr (1978). Superoxide-Dependent Production of Hydroxyl Radical Catalyzed by Iron EDTA complex. *FEBS Lett* 86 (1): 139-42.
42. Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs* 21: 24-8.
43. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB (1991). Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 161 (4): 488-503.
44. Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction of free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49 (3): 481-93.
45. Memişogulları R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I (2003). Antioxidant status and peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochem Func* 21 (3): 291-6.
46. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A (1997). Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 60 (25): 2255-71.
47. Das DK, Maulik N (1994). Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol* 233: 601-10.
48. Slater TF (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222 (1): 1-15.
49. Valenzuela A (1991). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci* 48 (4): 301-9.
50. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT (1999). Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med* 27 (11-12): 1151-63.
51. Shacter E (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 32 (3-4): 307-26.

52. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M (1996). Pathological aspects of active oxygens free radicals. *Jpn J Physical* 46 (1): 15-32.
53. Özgün Sayılan G, Eskiocak S, Süt N (2010). Streptozotosin ile Diyabet Geliştirilmiş Sıçanlarda L—Karnitin Protein Oksidasyonu Üzerine Etkisi. *Türk Biyokimya Dergisi* 35 (3): 183–189.
54. Basaga HS (1990). Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 68 (7-8): 989-98.
55. Yılmaz S, Bahçelioğlu İH (2000). Karbontetraklorür ile siroz oluşturulmuş ratlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzim ve piruvat kinaz aktiviteleri. *Türk J Vet Anim Sci* 24: 25-28.
56. Halliwell B (1996). Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res* 25 (1): 57-74.
57. Young IS, Woodside JV (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54 (3): 176-86.
58. Halliwell B (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun* 9 (1): 1-32.
59. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE (1992). Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119 (6): 598–620.
60. Fang YZ, Yang S, Wu G (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18 (10): 872-9.
61. Mantle D, Preedy VR (1999). Free radicals as mediators of alcohol toxicity. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 18 (4): 235-52.
62. Matés JM (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153 (1-3): 83-104.
63. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ (1991). Oxidant and antioxidants. *Am J Med* 91 (3): 2-13.
64. Battistoni A, Folcarelli S, Cervoni L, Polizio F, Desideri A, Guartosio A, Rotilio G (1998). Role of The Dimeric Structure in Cu, Zn Superoxide Dismutase. pH-

- dependent, reversible denaturation of the monomeric enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 273 (10): 5655-61.
65. Fridovich I (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23: 239-57.
 66. Wheeler RC, Salkzman AJ (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 184: 193-9.
 67. Halliwell B (1994). Free Radicals, Antioxidant And Human Disease: Curiosity, Cause or Consequence? *Lancet* 344 (8924): 721-4.
 68. Kolaylı S, Keha E (1999). A comparative study of antioxidant enzyme activities in freshwater and seawater adapted rainbow trout. *J Biochem Mol Toxicol* 13 (6): 334-7.
 69. Bravo L (1998). Polyphenol chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev* 56 (11): 317-33.
 70. Almaraz N, Campos MG, Avila JA, Naranjo N, Herrera J, Gonzalez LS (2007). Antioxidant Activity of Polyphenolic Extract of Monofloral Honeybee Collected Pollen From Mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *J Food Compos Anal* 20 (2): 119-24.
 71. Evers DL, Chao CF, Wang X, Zhang ZG, Huong SM, Huang ES (2005). Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Res* 68 (3): 124-34.
 72. Haris GK, Qian Y, Leonard SS, Sbarra DC, Shi XL (2006). Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-e2 formation in raw 264.7 cells. *J Nutr* 136 (6): 1517-21.
 73. Middleton E JR (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med and Biol* 439: 175–82.
 74. Chabner B, Wilson W, Supko J (2007). Pharmacology and toxicity of antineoplastic drugs. Editorial: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kipps TJ,

- Kaushansky K. In Williams Hematology. 7th Edition. Mc Graw Hill Company, United States; 249-51.
75. Uraz S, Tahan V, Aygun C, et al. (2008). Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci* 53 (4): 1071-7.
76. Jahovic N, Çevik H, Şehirli AO, Yeğen BC, Şener G (2003). Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 34 (2): 282-7.
77. Neuman MG, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Malkewcz IM, Shear NH (1999). Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatotoxicity. *Clin Biochem* 32: 519-36.
78. Hersh EM, Wong VG, Henderson ES, Freireich EJ (1966). Hepatotoxic effects of methotrexate. *Cancer* 19: 600–6.
79. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, et al (2006). N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit* 12: 274-8.
80. Uzar E, Sahin O, Koyuncuoglu HR, Uz E, et al (2006). The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology* 218: 125-33.
81. Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB (1989). Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct* 16: 283-93.
82. Oktar S, Gokce A, Aydin M, Davarci M, Meydan S, Ozturk OH, Koc A, et al. (2010). Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. *Toxicology and Industrial Health* 26 (7): 433-8.
83. HCF Nutrition Foundation. <http://www.hcf-nutrition.org/lifestyle/rdatable.html>.
84. Slinkard K, Singleton VL (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manuel Methods. *Am J Enol Viticult* 28: 49-55.
85. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 7970-81.

86. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE, Erçağ E (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Science and Nutrition* 57 (5): 292-304.
87. Cuendet M, Hostettmann P, Potterat O (1997). Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta* 80: 1144-52.
88. Demir R, Yilmazer S, Öztürk M, Üstünel İ, Demir N, Korgun ET, Akkoyunlu G (2001). *Histolojik Boyama Teknikleri*. Birinci Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara; 9-10.
89. 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.
90. Oliveira Filho AB, Souza RS, Azeredo-Oliveira MT, Peruquetti RL, Cedenho AP (2010). Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis. *Genet Mol Res* 9 (3): 1405-13.
91. Duru NK (1998). *Subfertil ve İnfertil Sperm Parametreleri*. GATA Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Notları, Ankara.
92. The Makler Counting Chamber for Rapid Semen Evaluation. Erişim: <http://www.zdlinc.com/maklercc.htm>. Erişim tarihi: 15. 12. 2013
93. Potten CS (1996). What is an apoptotic index measuring? A commentary. *Br J Cancer* 74 (11): 1743-8.
94. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.
95. Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Enzymol* 105: 121-6.
96. Yagi K (1994). Lipid Peroxides and Related Radicals in Clinical Medicine, in *Free Radicals in Diagnostic Medicine*, 1st edition, Plenum Press, New York.
97. Sun Y, Oberley L, Li Y (1988). A Simple Method For Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin Chem* 34: 497-500.

98. Jahovic N, Sener G, Çevik H, Ersoy Y, Arbak S, Yegen BC (2004). Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct* 22 (3): 169-178.
99. Gao F, Ueda S, Horie T (2001). Effect of a synthetic analog of prostaglandin E1 on the intestinal mucosa of methotrexate-treated rats. *Anticancer Res* 21 (3B): 1913-7.
100. Yüncü M, Kanter M (2006). Farelerde metotreksatın ince barsak mukozasında yaptığı hasara karşı E vitamininin koruyucu etkisi: Elektron Mikroskopik Çalışma. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 4 (2): 1-6.
101. İraz M, Özerol E, Güleç M, Tasdemir S, İdiz N, Fadılhoğlu E, Nazıroğlu M, Akyol O (2006). Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. *Cell Biochem Funct* 24 (4): 357-61.
102. Muralikrishnan G, Amalan Stanley V, Sadasivan Pillai K (2001). Dual role of vitamin C on lipid profile and combined application of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil treatment in fibrosarcoma-bearing rats. *Cancer Lett* 169 (2): 115-20.
103. Yüncü M, Eralp A, Celik A (2006). Effect of aged garlic extract against methotrexate-induced damage to the small intestine in rats. *Phytother Res* 20: 504-10.
104. Cetin A, Kaynar L, Kocyiğit I, et al (2008). Role of Grape Seed Extract on Methotrexate Induced Oxidative Stress in Rat Liver. *The American Journal of Chinese Medicine* 36: 1–12.
105. Amin A, Hamza AA, Kambal A, Daoud S (2008). Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian J Androl* 10: 291–297.
106. Cetiner M, Sener G, Sehirli Ö, et al (2005). Taurine protects against methotrexate induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicology and Applied Pharmacology* 209: 39-50.
107. Köse K, Doğan P (1992). Lipid peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi*; Prof. Dr. Ahmet Bilge Ek Sayısı: 340-50.
108. Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52: 253-65.

- 109.Eser B (2009). Ratlarda metotreksatın yol açtığı intestinal mukoza hasarı ve oksidatif stres üzerine propolisin etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri.
- 110.Gokce A, Oktar S, Koc A, Yonden Z (2011). Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. Human and Experimental Toxicology 897-903.
- 111.Draper HH, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol 186: 421-31.
- 112.Yaylaci Karahalil F, Şahin H (2011). Phenolic composition and antioxidant capacity of Cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) sampled from Trabzon region, Turkey. African Journal of Biotechnology Vol 10 (72): 16293-99.
- 113.Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997). Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association 3-4: 92-5.
- 114.Prahalathan C, Selvakumar E, and Varalakshmi P (2004). Remedial effect of DL- α -lipoic acid against adriamycin induced testicular lipid peroxidation. Molecular and Cellular Biochemistry 267: 209-14.
- 115.Aydınlık E (2011). Ratlarda Methotrexate Tarafından Oluşturulan Oksidatif Karaciğer Hasarı Üzerine Alfa Lipoik Asidin Etkileri. Tıpta Uzmanlık Tezi, Kahramanmaraş Üniv. Tıp Fak. İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.

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

Çalışmanın Adı : “Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem. (Karayemiş)’in Antiapoptotik ve Antioksidan Etkileri”			
Çalışmacılar : Prof.Dr.Engin YENİLMEZ, Yük.Lis.Öğr.Gülşen YILMAZ, Okutman Dr.Nimet BALTAŞ			
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji ABD.			
Etik Kurul Dosya No 2013/ 2	Etik Kurul Toplantı Tarihi 12.02.2013	Etik Kurul Toplantı No 2013/03	Etik Kurul Karar No 3
Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu’nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN’ın başkanlığında; “Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem. (Karayemiş)’in Antiapoptotik ve Antioksidan Etkileri” başlığını taşıyan tez çalışmasının, Karadeniz Teknik Üniversitesi’nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (12.02.2013) Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı			

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : YILMAZ, Gülsen
Uyruğu : TC
Doğum tarihi ve yeri : Trabzon 08. 09. 1988
Medeni hali : Bekar
E-Posta : gulsenyilmaz61@gmail.com
Yazışma adresi : Boztepe Mah. İran Cad. No: 128
Merkez TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Trabzon Lisesi	2005

YABANCI DİL: İngilizce