



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

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METHOTREXATE
KAYNAKLI TESTİS HASARINA KARŞI
Camellia sinensis (Yeşil Çay)
KATEŞİNLERİNİN ANTİOKSİDAN VE
ANTİAPOPTOTİK ETKİLERİ**

Melih KILIÇ

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
Camellia sinensis (Yeşil Çay)
KATEŞİNLERİNİN ANTİOKSİDAN VE
ANTİAPOPTOTİK ETKİLERİ**

Melih KILIÇ

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 Melih KILIÇ'ın hazırladığı “Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı *Camellia sinensis* (Yeşil Çay) Kateşinlerinin 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. Münevver SÖKMEN

Prof. Dr. Esin YULUĞ

Tarih: 03 /04 /2014

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18/03/2014 tarih ve 9 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 ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi, kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

2014

Melih KILIÇ

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi annem Meliha KILIÇ ve babam Metin KILIÇ' a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer Danışman Hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Engin YENİLMEZ' e, tezime yaptığı katkılardan dolayı KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Münevver SÖKMEN' e, yüksek lisans eğitimim sırasında desteğini her zaman hissettiğim Prof. Dr. Esin YULUĞ' a, KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Prof. Dr. Ersan ODACI ve Yrd. Doç Dr. Gökçen KERİMOĞLU' na, tezimin biyokimyasal analizlerinde bana yardımcı olan KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ahmet ALVER ve doktora öğrencisi Akın BODUR' a, tezimi hazırlarken benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Gülşen YILMAZ' a, KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümünden Melek KOÇ ve doktora öğrencisi Ezgi DEMİR' e, bütün bu stresli süreç boyunca manevi desteklerini her zaman hissettiğim başta Sinan ADANUR, Esra SERDAR ve Zeynep ŞENTÜRK olmak üzere bütün dostlarıma ve KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki bütün yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	viii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Testis Embriyolojisi	4
4.2. Testis Anatomisi	5
4.3. Testis Histolojisi	6
4.3.1. Seminifer Tübüller	6
4.3.2. Sertoli Hücreleri	7
4.3.3. Spermatogenik Hücreler (Germinal Hücreler= Germ Hücreleri)	8
4.3.3.1. Spermatogonyum	8
4.3.3.2. Primer spermatosit	9
4.3.3.3. Sekonder spermatosit	9
4.3.3.4. Spermatid	10
4.3.3.5. Spermatozoon (Spermium)	11
4.3.4. İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri	12
4.3.5. Kan-Testis Bariyeri	13
4.4. Epididimis	13
4.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem	14
4.5.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	14
4.5.2. Antioksidan Sistem	16
4.5.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	16

4.5.2.2. Katalaz (KAT)	17
4.6. Apoptoz	17
4.7. Methotrexate	18
4.8. Kateşinler	18
5. GEREÇ ve YÖNTEM	21
5.1. Deneysel Çalışma Aşaması	21
5.1.1. Deney Hayvanlarının Bakımı, Barınması ve Temini	21
5.1.2. Deneysel Çalışma Planı	23
5.1.3. Kateşinlerin <i>Camellia sinensis</i> (Yeşil Çay)' den İzole Edilmesi	23
5.2. Histolojik İşlemler	24
5.4.1. Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması	24
5.4.2. Bouin Tespitinin Hazırlanışı	25
5.2.3. Doku Takibi	26
5.2.4. Kesitlerin Alınması	26
5.2.5. Kesitlerin Hematoksilen-Eozinle Boyanması	26
5.3. İmmünohistokimyasal İşlemler ve Analizler	28
5.3.1. TUNEL Boyama	28
5.4. Biyokimyasal İşlemler ve Analizler	29
5.4.1. Biyokimyasal Analizler için Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	29
5.4.2. MDA Tayini	30
5.4.2.1. Dokuda MDA Tayini	30
5.4.2.2. Plazmada MDA Tayini	31
5.4.3. Plazma ve Doku KAT Aktivitesi Tayin Yöntemi	31
5.4.4. Plazma ve Doku SOD Aktivitesi Tayin Yöntemi	32
5.4.5. Protein Tayini	32
5.5. İstatistiksel Analiz	33
6. BULGULAR	34
6.1. Histolojik Bulgular	34
6.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	37
6.3. Biyokimyasal Bulgular	41
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	43
8. SONUÇLAR	46

9. KAYNAKLAR	47
10. ETİK KURUL ONAYI	57
11. ÖZGEÇMİŞ	58

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Çalışmada kullanılan gruplar ve gruplara uygulanan tedaviler tablosu	23
Tablo 2. Kateşinlerin yüzde ve ppm cinsinden miktarları	24
Tablo 3. Biyokimyasal analizler için kullanılan cihazlar	29
Tablo 4. Biyokimyasal analizler için kullanılan kimyasal maddeler	30
Tablo 5. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı	31
Tablo 6. Plazma MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı	31
Tablo 7. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı	32
Tablo 8. Bradford metodu için yapılan reaksiyon karışımı	33
Tablo 9. Histolojik verilere ait tablo	40
Tablo 10. Testis dokusundaki biyokimyasal değerlendirmeler tablosu	41
Tablo 11. Kan plazmasındaki biyokimyasal değerler tablosu	42

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Deneklerin Barındırıldığı tip III kafesler	22
Resim 2. a) Testisin çıkarılması, b) Testisin yağ ve epididimisten ayrılmış hali	25
Resim 3. Kontrol grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)	34
Resim 4. MTX grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)	35
Resim 5. CAT grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)	36
Resim 6. MTX+CAT grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)	37
Resim 7. CAT grubuna ait TUNEL boyaması (X400)	38
Resim 8. MTX grubuna ait TUNEL boyaması (X400)	39
Resim 9. MTX+CAT grubuna ait TUNEL boyaması (X400)	40

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AI	Apoptotik İndeks
ATP	Adenozin Trifosfat
ATPaz	Adenozin Trifosfataz
BSA	Bovin Serum Albumin
CAT	Kateşin
CG	Kateşingallat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EC	Epikateşin
ECG	Epikateşin gallat
EGC	Epigallo kateşin
EGCG	Epigallokateşin gallat
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GC	Gallokateşin
GCG	Gallokateşin gallat
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSSG-R	Glutasyon Redüktaz
GST	Glutasyon-S-Transferaz
H.E.	Hematoksilen ve Eozin
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
i.p	İntraperitoneal
KAT	Katalaz
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LH	Luteinleştirici Hormon
MDA	Malondialdehid
MTX	Methotrexate
NBT	Nitroblue Tetrazolium
PAS	Periyodik Asit Schiff
PBS	Phosphate Buffer Solution

pH	Power of Hydrogen
ppm	Milyonda Bir Birim
RA	Romatoid Artrit
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Ürünleri
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SER	Düz Endoplazmik Retikulum
SOD	Süperoksit Dismutaz
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SRY	Sex-Determining Region of the Y Kromozom
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TDF	Testis Determining Factor
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TMP	1,1,3,3-Tetrametoksipropan
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Deoxyuridine Triphosphate Nick End Labeling Assay

Simgeler

cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
gr	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre

Formüller

CuCl₂	Bakır Klorür
CH₃COOH	Asetik Asit
H₂O₂	Hidrojen peroksit

H₃PO₄	Fosforik asit
HO[•]	Hidroksil Radikali
HO₂[•]	Hidroperoksil Radikali
HOCl	Hipoklorid
KCl	Potasyum Klorür
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
Na₂HPO₄·2H₂O	Disodyum hidrojenfosfat dihidrat
MgSO₄	Magnezyum Sülfat
O₂	Oksijen
O₂[•]	Süperoksit radikali
OH[•]	Hidroksil Radikali
RCOO	Organik Peroksit Radikali
RO	Alkoksil Radikali
ROO	Peroksil Radikali

1. ÖZET

Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı *Camellia sinensis* (Yeşil Çay) Kateşinlerinin Antioksidan ve Antiapoptotik Etkileri

Bu çalışma methotrexate (MTX) ile oluşturulmuş testis hasarına karşı *Camellia sinensis* (yeşil çay) kateşinlerinin (CAT) antioksidan ve antiapoptotik etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı.

Bu çalışmada ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 24 adet erkek Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Her grupta 6 adet sıçan olacak şekilde 4 grup oluşturuldu. Deney süresi 5 gün olarak belirlendi. Kontrol grubu sıçanlara bu süre içerisinde herhangi bir uygulama yapılmadı. MTX grubu sıçanlara sadece çalışmanın ilk günü 25 mg/kg MTX intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. CAT grubundaki sıçanlara 5 gün boyunca 500 mg/kg kateşin ekstraktı gavaj yoluyla verildi. Tedavi (MTX+CAT) grubundaki sıçanlara çalışmanın ilk günü 25 mg/kg MTX uygulandı ve daha sonra ilk günden başlayarak 5 gün boyunca 500 mg/kg kateşin gavaj yoluyla verildi. 5 günlük deney süresi sonunda anestezi altında deneklerin testisleri çıkarıldı ve kansızlaştırma yöntemiyle ötanazi yapıldı. Çıkarılan testislerden biri ikiye bölündü. Testislerin bir yarısı histolojik işlemler için, diğer yarısı ve kan serumu ise biyokimyasal analizler için kullanıldı.

Kontrol ve CAT gruplarına ait testis yapısında herhangi bir anomali izlenmedi. MTX grubunda seminifer tübül lümeninde immatür germinal hücreler, bazal kompartmanda Sertoli hücreleri ile spermatogoniumlar arasında açılma ve germinal epitelde vakuolizasyon görüldü. MTX+CAT grubunda ise MTX grubuna kıyasla lümendeki immatür germinal hücre sayısının ve seminifer epitelde vakuolizasyon miktarının azaldığı belirlendi. Biyokimyasal analizler sonucunda, malondialdehid (MDA) seviyesinin, MTX grubunda arttığı, MTX+CAT grubunda ise MTX grubuna kıyasla azaldığı gözlemlendi.

Tüm bu işlemler sonucunda MTX' in testiste oksidatif stres oluşturarak testise zarar verdiği, kateşinlerin ise antoksidan etkileri sayesinde bu hasarı azalttığı belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Testis, oksidatif stres, yeşil çay, antioksidan, malondialdehid

2. SUMMARY

Antiapoptotic and Antioxidant Effects of *Camellia sinensis* (Green Tea) Catechins Against Methotrexate-Induced Testicular Damage In Rats

This study has been done to investigate the antioxidant and antiapoptotic effects of *Camellia Sinensis* catechins on the testicle damage caused by methotrexate (MTX).

In this study, twenty four Sprague Dawley male rats, weighing between 250 gr and 300 gr were used. They were divided into four groups which each one have six rats. Experimental period has been determined as five days and during the period, rats of the control group did not received any treatment.

Just for the first day of the experiment, 25 mg/kg of MTX has been injected intraperitoneally to the rats of MTX group. For five days, the rats of catechine group (CAT) have been dosed by oral gavage with 500mg/kg of catechine extract. The treatment group (MTX+CAT) have been injected with 25 mg/kg of MTX on the first day of the study and for five days (including the first day) they have been dosed by oral gavage with 500 mg/kg of catechine. At the end of the five-day experiment, testicles of the rats have been taken out and euthanasia has been applied by exsanguination. One of the each pair of the testicles has been divided into two pieces and one of them has been used for histological processes. The other half and blood serum have been used for biochemical analyses.

Any abnormalities were not seen in the structure of the testicles of the rats of control and CAT group. In MTX group immature germ cells were observed in the seminifer tubul lumen, widening occurred between Sertoli cell and spermatogonia at basal compartment and vacuolization was observed at seminifer epithelium. The number of immature germ cells in the lumen and vacuolization in MTX+CAT group were lower when compared to MTX group. After biochemical analyses, a decrease was observed the level of malondialdehyde (MDA) in MTX+CAT group compared to MTX group.

As a result of all the processes, it has been found that oxidative stress occurred by, MTX damages testicle structure and catechins decrease this damage with its antioxidant effect.

Key words: Testis, oxidative stress, green tea, antioxidant, malondialdehyde

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kemoterapi kanser tedavisi için en etkili yöntemlerden birisidir, fakat sıklıkla uzun veya kısa dönemde toksisitelere neden olur (1). MTX kaynaklı organ toksisitesinin oksidatif stresin sonucu olabileceği düşünülmektedir (2, 3). MTX glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (KAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerini düşürerek oksidatif strese neden olur (4). Bu nedenle, antioksidan içeriğe sahip bileşiklerin, MTX kaynaklı oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı, testis dokusunun korunmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir (2).

Kateşinler, theaflavinler ve thearubiginler çayda bulunan, kronik hastalıkların önlenmesi ve azaltılmasında dikkate değer yetenekleri olan polifenolik bileşiklerdir (5). Yeşil çay; epigallokateşin gallat (EGCG), epigallokateşin (EGC), epikateşin gallat (ECG) ve epikateşin (EC) gibi birçok polifenolik bileşik içerir (6). Pek çok çalışma çay polifenollerinin antikarsinogenik ve kemopreventif içeriğini ortaya koyan kanıtlar sunmuştur (5). Kateşinler yapılarındaki hidroksil grubundan hidrojen vererek muhteşem bir antioksidan aktiviteye sahip olurlar (6). Yeşil çay polifenollerinin; özellikle EGCG'nin kalp hastalıkları, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi kronik rahatsızlıklara karşı koruyucu oldukları, yaygın olarak yapılan laboratuvar çalışmaları ve epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmiştir (7).

Yapılan bu çalışmanın amacı, MTX'in meydana getirdiği testis hasarına karşı yeşil çay kateşinlerinin koruyucu etkisinin olup olmadığının araştırılmasıdır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Testis Embriyolojisi

Her ne kadar embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, ovumu dölleyen spermin çeşidi ile fertilizasyon sırasında belirleniyorsa da, erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri, embriyonik yedinci haftaya kadar gelişime başlamazlar. Genital sistem erken dönemde her iki cinsten de birbirine benzer, bu nedenle genital sistemin gelişiminin başlangıç periyodu “seksüel gelişimin farklanmamış safhası” olarak adlandırılır (8, 9).

Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar: Mezodermal epitel, embriyonik bağ dokusu ve primordial germ hücreleri.

Gonadal gelişimin ilk safhaları beşinci haftada ortaya çıkar, mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık –gonadal (genital) kabarıklık- oluşur. Parmak şeklindeki epitelial kordonlar –primer seks kordonları- altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklanmamış gonad şimdi, dışta yer alan korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi overe differansiye olur, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermektedirse, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler, dejenere olur (8).

Primordial germ hücreleri, insan embriyosunda gelişimin erken evrelerinde, yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler. Ameboid hareketlerle, son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve altıncı haftada da genital kabarıklıkları işgal ederler. Kabarıklıklara ulaşamadıkları takdirde, gonadlar gelişmez. Gonadların over veya testise farklanmasında, primordial germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır (9).

Kromozomal ve genetik cinsiyet, fertilizasyonda belirlenir ve sekonder oositi dölleyen spermatozoonun X ya da Y cinsiyet kromozomu tarafından belirlenir. Y kromozomu farklanmamış gonadın medullası üzerine, testis-belirleyici etkiye sahiptir. Testis-belirleyen faktör (Testis Determining Factor=TDF) geni, Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki cinsiyet-belirleyen bölgede (Sex-Determining Region of the Y chromosome = SRY) yerleşiktir. Bu faktör, farklanmamış gonadın ilkel cinsiyet

kordonlarındaki hücrelerde sentezlendiğinde taslak gonadlar, testislere farkanırlar. Y kromozomu yokluğunda, ovaryumlar meydana gelir. Böylece fertilizasyonda saptanan cinsiyet kromozom kompleksi (XX ya da XY) gonadın tipini belirleyerek, farkanmamış gonadın testis ya da ovaryumlara farkanmasını sağlar. Mevcut gonadların tipi ise, genital boşaltma yolları ve dış genital organların cinsiyete göre farkanmasını belirler (10).

Testislerin gelişimi, koordineli bir seri genin indüksiyonu ile sağlanır. Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktörler için SRY geni, farkanmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar fonksiyonu göstermektedir. TDF, primer seks kordonlarını uyararak, onların farkanmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece rete testis oluşur. Kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra seks kordonlarının yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Sıkı tunika albugineanın gelişimi, fõtusta testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdaki ayrılar ve kendi mezenterisi olan mesorchium ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farkanırlar (8).

4.2. Testis Anatomisi

Bir çift testisin her biri yaklaşık 10-15 gr ağırlıkta, 4.5-5 cm boyunda ve 2.5 cm çapındadır. Testisler skrotum içerisinde korunmaya alınmıştır. Spermi üreten testisler için gerekli sıcaklık, vücut sıcaklığından 2-3 °C daha düşüktür (11). Testis'in facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü; margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı; extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere de iki ucu vardır (12).

Testis dıştan içe doğru tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vaskulosa olmak üzere üç kılıf ile çevrilidir.

Tunika vaginalis visseral ve parietal olmak üzere 2 tabakadan oluşur. Visseral tabaka testisin ön yüzünde ve her iki yanında bulunur. Parietal tabaka ise testisin alt kısmından üst kısmına doğru uzanır. Bu iki tabaka arasında potansiyel bir boşluk vardır. Bu boşlukta az miktarda seröz sıvı bulunur (13).

Tunica albuginea kalın, fibröz bir tabakadır. Bu tabaka testisin arka kenarından bez içine sokulur ve tam olmayan vertikal bir bölme (mediastinum testis) oluşturur. Mediastinum testis'in ön ve yan kısımlarından çıkan uzantılara septula testis adı verilir. Bu uzantılar testis yüzeyine doğru ışınal tarzda olup tunika albuginea'nın iç yüzüne tutunur. Bu uzantılar testisi lobüllere ayırır. Her lobül içinde de tubuli seminiferi contorti denilen kanalcıklar yer alır. Spermiumlar bu kanalcıkların duvarlarında gelişmelerini tamamlar (12).

Tunica vaskulosa, tunika albuginea'nın iç yüzünde yerleşmiş bir damar ağı tabakası olup, tüm bölmelerin yüzlerini örter. Böylece, testisin içindeki tüm lobuli testisi de sarmış olur (14).

4.3. Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmuştur. Testisler erkekte temel üreme organı olup, testis torbası (skrotum) içinde yer alırlar. Testisin başlıca iki görevi hormon ve spermatozoonları üretmektir. Tunika albuginea'dan bezin içine giren fibröz septumlar bu yapıyı testiküler lobüller denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölgeye ayırırlar. Bu septumlar tam değildir, lobüller arasında çoğunlukla iletişim vardır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül yer alır. Bu bağ dokusunda bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel (Leydig) hücreler bulunur. Seminifer tübüller erkek üremem hücreleri olan spermatozoonları üretirler. İnterstisyel hücreler testiküler androjenleri salgırlar (15).

4.3.1. Seminifer Tübüller

Her bir seminifer tübül yaklaşık olarak 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluktadır, çok katlı bir epitel ile döşelidir. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu 250 m civarındadır (16). Bu tübüler yapılar testisin % 92'sini oluşturur. Seminifer tübüllerin duvarı dışta lamina propria denilen bağ dokusu tabakası, içte kalın bir seminifer epitel katmanı ve bunların arasında bulunan bazal laminadan oluşur.

Lamina proprianın ortalama kalınlığı 8 -10 µm kadardır. Bağ dokusu katmanı fibroblastlardan zengin birçok kat halinde düzenlenmiş silindir biçimli tip I kollajen lif bantlarından oluşur. Bazal laminaya yapışık bulunan en içteki katman 3 -5 sıralı düzenlenmiş düz kas özelliği gösteren myoid hücrelerden yapıldır.

Tübüller arası gevşek bağ dokusunda, intertisyel hücreler olarak da bilinen Leydig hücre kümeleri, ince kollajen ve retiküler lifler, fibroblastlar, kan damarları ve sinirler bulunur.

Seminifer epitel başlıca iki hücre tipi içermektedir. Bunlar Sertoli hücreleri ile çeşitli olgunlaşma aşamasındaki spermatogenik hücrelerdir. Spermatogenik seri hücreleri bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak şekilde 4 ile 8 kat şeklinde düzenlenmişlerdir (15, 17).

4.3.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış piramidal hücrelerdir. Bu hücrelerin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır (16). Hücre yan yüz zarları karmaşık içe katlanmalar oluşturur. Bu nedenle hücre yan sınırları ışık mikroskobu ile ayırt edilemez. Lümene bakan apikal hücre membranları da oldukça katlantılı olup seminifer lümen içine çıkıntılar yapar. Sertoli hücreleri bazalde yerleşik, açık renk ve bir iki çentikli oval heterokromatik çekirdek ile merkezi yerleşimli büyük bir çekirdekçiğe sahiptirler (18,19).

Sertoli hücreleri puberteye değin seminifer epitelin baskın hücre tipi iken, puberteden sonra seminifer tübül epitelindeki hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. İleri yaştaki erkeklerde spermatogenik hücre topluluğu azaldığında, Sertoli hücreleri yeniden epitelin baskın hücresi olur (20).

Sitoplazmada mikrotübüller ve ara filamentlerden oluşan gelişmiş bir hücre iskeletinin yanında, çok sayıda granülsüz endoplazmik retikulum, az sayıda granüllü endoplazmik retikulum, bol miktarda mitokondri, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, lipid damlacıkları, lipofuskin içeren lizozomlar ve glikojen granülleri bulunur (21, 22).

Sertoli hücrelerinin dört önemli fonksiyonu vardır:

- **Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesi:** Spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar kan testis bariyeri ile kan desteğinden izole edildiği için, bu spermatogenik hücreler besin maddelerinin ve metabolitlerin alıp verilmesinde Sertoli hücrelerinin aracılığına muhtaçtırlar.

- **Fagositoz:** Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde dökülür. Bu sitoplazmik parçacıklar fagosite edilir ve Sertoli hücre lizozomları tarafından yıkılırlar (16).
- **Sekresyon:** Sertoli hücreleri, sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm taşınımı için kullanılan bir sıvı salgılamaktadırlar. Androjen bağlayıcı protein sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından folikül stimüle edici hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlamaktadır. Sertoli hücreleri, testosteronu östradiyol haline çevirebilmektedirler. Bu hücreler aynı zamanda, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen ‘inhibin’ adı verilen bir peptid salgılamaktadırlar (15).
- **Anti-Müllerian Hormon Üretimi:** Müllerian-inhibe edici hormon olarak da isimlendirilen bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise Wolf kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlar (23).

4.3.3. Spermatogonik Hücreler (Germinal Hücreler= Germ Hücreleri)

Spermatogonik ya da üreme hücreleri, Sertoli hücreleri ile birlikte seminifer tübül epitelini oluşturan, düzenli olarak çoğalarak olgun spermatazoonlara farklanan hücrelerdir (17, 20, 24). Bu hücreler seminifer tübüllerde, lümen ile bazal lamina arasında yerleşmiş 4-8 hücre katı oluşturan ve gelişmekte olan hücre serilerini içerir. Bunlar çoğalıp farklılaşan ve sonuçta olgun germ hücreleri olan spermatozoonların oluşmasını sağlayan farklı dönemlerdeki hücreleri temsil ederler (25). Çeşitli olgunlaşma aşamalarında olan bu hücreler, bazaldan lümene doğru spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoon olarak sıralanır (20, 21).

4.3.3.1. Spermatogonyum

Spermatogonyumlar bazal kompartmanda bazal lamina ile direkt ilişkide olan diploid hücrelerdir (20). Yuvarlağımsı şekle sahip, yaklaşık 12 µm çapındadırlar. Çekirdekleri irili, ufaklı kromatin tanecikleri ve bir çekirdekçik içerir (26). Sertoli hücreleri arasındaki tıkalı bağlantıların altında yer alırlar ve bu nedenle kan-testis

bariyerinin dışında yer alırlar. Spermatogonyumlar spermatogoniyal kök hücreden köken alırlar ve pubertede başlayan mitotik bölünmeler geçirirler (20).

İnsanda morfolojik olarak ayrılabilen 3 tip spermatogonyum vardır: koyu renkli boyanan koyu tip A spermatogonyum, soluk renkli boyanan açık tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyum.

Koyu Tip A Spermatogonyumlar: 12 μm çapında, küçük ve kubbe şeklindedirler. Çekirdek oval ve heterokromatiktir. Seminifer epitelin kök hücreleridir. Hücre döngüsüne girmezler, depo hücrelerdir. Mitozla bölünerek yeni koyu ve açık A tipi spermatogonyumları yaparlar (17).

Açık Tip A Spermatogonyumlar: Oval şekillidirler. Çekirdekleri açık boyanır ve ökromatiktir. Nükleolus çok belirgindir. Testosteron hormonu etkisiyle mitozla bölünürler ve B tipi spermatogonyumları oluştururlar. Bu hücreler B tipine dönüşmeden önce sırasıyla A1, A2, A3, A4 ve daha sonra ara spermatogonyumları yaparlar (17, 21).

Tip B Spermatogonyumlar: Merkezi yerleşimli çekirdekçik ve büyük yoğunlaşmış kümeler oluşturan kromatin içeren çekirdeğe sahip hücrelerdir. B tipi spermatogonyumlar, primer spermatositleri oluştururlar (21).

4.3.3.2. Primer Spermatosit

18 μm büyüklüğündedirler ve veziküler görünümlü belirgin bir çekirdek içerirler (15). Spermatogenik serinin en büyük hücreleridir. Primer spermatositler başlangıçta 46 kromozom ve $2n$ DNA'ya sahiptirler. Kısa sürede I. mayoz bölünmenin profaz evresine girerler ve DNA'larını $4n$ 'e çıkarırlar (15, 21).

4.3.3.3. Sekonder Spermatosit

Sekonder spermatositler I. Mayoz bölünme tamamlandıktan hemen sonra oluşurlar (27). Oluşan sekonder spermatositler küçük hücrelerdir ve yeniden DNA eşleşmesi olmadan doğrudan II. mayoz bölünmeye girdiklerinden, seminifer epitelde sık izlenemezler. Yaşam süreleri ortalama 8 saattir. Sekonder spermatositteki kromatitler, bölünme sonunda ayrılarak her biri bir spermatide gider. Sonuçta n kromozomlu 4 adet spermatid oluşur (15, 20).

4.3.3.4. Spermatid

Spermatidler yaklaşık 8 µm çapında, küçük, yuvarlak hücrelerdir. Sitoplazmalarında mitokondriler, çekirdeğin yakınında yer alan iyi gelişmiş Golgi kompleksi, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar, granülsüz ve granüllü endoplazmik retikulum tübülleri içerirler (15, 17). Seminifer tübüllerde, lümen yakınında ve adluminal bölmede yerleşmişlerdir (15, 21, 27). Spermatozoonlara dönüşme süreci boyunca spermatidler, bol hidrolitik enzim depolar ve organellerini azaltırlar, sitoplazmalarının bir kısmı atılır, filagellum ve ilgili yapılar şekillenir (17). Spermatidler Sertoli hücrelerinin girintileri arasına gömülmüş durumdadır. Spermatidler lümene doğru yol alırken, uzarlar ve spermiyogenezis adı verilen, bölünmenin gerçekleşmediği karmaşık bir olgunlaşma işleminden geçerler.

Spermiyogeneziste yuvarlak şekilli, hareketsiz spermatidlerin uzayarak, hareketli spermatozoonlara dönüştüğü sıralı değişimler gerçekleşir (26). Memelilerde spermatidden spermatozoon oluşması dört aşamada gerçekleşir:

1. Golgi Evresi: Nükleus yakınındaki Golgi kompleksi lamelleri ile vezikülleri bir kutuplaşma gösterir ve spermatidde anterior kutup oluşur. Spermatid farklılaşmasında ilk belirtiler, Golgi bölgesinde proakrozom granüllerinin birikmeye başlayıp, akrozom granülünü oluşturmalarıdır. Bu da, Golgi membranlarından gelişen akrozomal kese, içindeki glikoproteinden zengin içeriği nedeniyle PAS (Periyodik Asit Schiff) pozitif olarak belirir. Golgi kompleksi ile nükleus arasında topografik bir yakınlık söz konusudur. Akrozomal kesenin membranı da dış nükleus membranı ile birleşir. Spermatidde nükleusun bir kutbunda akrozom oluşumu ilerlerken, karşıt kutupta da sentriol, nükleus membranına yaklaşır ve bu bölgeden bir flagellum büyümesi başlar. Bu esnada, mitokondriler perifere göç edip plazma membranına yakın sıralanma gösterirler.
2. Başlık (Kep) Evresi: Golgi kompleksinin yer değiştirmesi ile akrozomal kesedeki sıvı rezorbsiyona uğrar ve kese yassılaşır; nükleus üzerine yapışıp, başlık gibi oturur. Bu dönemde nükleusta bazı belirgin değişiklikler olmaktadır. Kromatin yoğunlaşır, yassılaşmaya ve uzamaya başlar; hücre

membranına yaklaşır ve spermiumun baş oluşumu ilerler. Sitoplazma, hücrede kuyruk oluşumunun ilerlediği bölgeye doğru birikir (28).

3. Akrozomal Evre: Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozomal faz sırasında spermin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına doğru yönelir. Buna ek olarak nükleus uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriler flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluştururlar. Bu bölge spermatozoonların hareketlerinin kaynağını aldığı yerdir.

Mitokondrilerin bu şekilde yerleşmesi, organellerin hücre hareketi ve yüksek enerji tüketimi ile ilgili olan bölgelerde toplanmasına başka bir örnek teşkil eder. Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkinleşmesi sonucunda oluşur (15).

4. Olgunlaşma (Matürasyon) Evresi: Spermatozoon farklılaşması tamamlandığında, Sertoli hücresi sitoplazmasında yerleşmiş olduğu girintiden ayrılır. Bu ayrılmada, Sertoli hücreleri sitoplazması içindeki düz endoplazmik retikulum (SER) membranları topluluğunda şişmeler olmakta ve yüzey girintideki düzleşme ile farklılaşmış olgun spermatozoon, Sertoli hücresi ile ilişkisini kesip lümene geçmektedir (28).

4.3.3.5. Spermatozoon

Spermatozoon, çok uzun bir hücre olması ile (65 μm) dikkati çeker (28). Çekirdek ve akrozomu içeren baş ile uzun bir kuyruk olarak iki ana bölümden oluşur. Kuyruk; boyun, orta parça, esas parça ve son parçayı içerir (21).

- a) Baş: İnsanda, baş uzun eksenli boyunca 7 μm olan yassılaşmış bir armut şeklini andırır. Nükleus, hemen hemen tüm baş bölgesini doldurur. Yoğun kromatin yapısı içinde kromatinden fakir aydınlık bölgeler “nükleus vakuelleri” diye tanımlanır (28). Baş, akrozom ve onunla sarılmış çekirdekten oluşur. Akrozom lizozomlarda bulunan hidrolitik enzimler

(proteazlar, asit fosfatazlar, hyaluronidaz, akrosin, nöraminidazlar) içerir (17, 20). Bu özellik, fertilizasyon esnasında spermium başının, korona radiatayı kolayca aşır, zona pellusidayı eriterek ovuma ulaşmasında önemlidir (28).

- b) Kuyruk: Boyun, orta parça, esas parça ve son parça olarak dört kısımdan oluşur (17,21). Boyun bölgesi, baş ile kuyruk segmentlerini birleştiren kısa bir bölgedir. Sentioller bu bölgede yer almıştır. Sentiollerden biri, flagellumun aksonemasını yapar. Aksonema, 9+2 formülüne uyan çift mikrotubuluslar taşır. Aksonema, boyunda fibröz bir halka oluşturmuş olup, etrafında sitoplazma örtüsü belirgindir. Orta parça, hemen hemen başın uzunluğuna yakın ölçüdedir. Bu segmentte, flagellum aksoneması dışında longitudinal 9 kalın fibril demeti yer alır. Bunun dışında da spiral sıralanmış mitokondri topluluğu bulunur (28). Esas parça yaklaşık 45 µm uzunluğunda, kuyruğun en uzun parçasıdır. Annulus adı verilen mitokondri sarmalının son bölümünün altında yoğun bir halka olan son halkadan başlar, mitokondri sarmalı içermez. Esas parça; yedi dış kalın lifle sarılı, aksonem ve bunları çevreleyen fibröz bir kılıftan oluşur (17, 20). Son parça, aksonemadan oluşan kısa bir sonlanma halinde gözlenir (28).

4.3.4. İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri

Testisin seminifer tübülleri arasındaki boşluklar bağ dokusu elemanları, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. İnterstisyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun şebeke, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir; bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Puberte sırasında ek bir hücre tipi belirgin hale gelir, bu yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir nükleusu ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan bir hücredir. Steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir (15).

Leydig hücreleri steroid salgı yapan hücrelerin genel yapısal özelliklerini gösterirler (15, 24). Bunların eozinofilik sitoplazmalarında tübüler kristal mitokondriler, bol granülsüz endoplazmik retikulum tubulusları, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, lizozomlar ve çok sayıda lipid damlacıkları bulunur (15, 17).

Leydig hücrelerindeki organellerin ve inklüzyonların çoğu testosteron sentezini ve salgısını düzenler, ancak en fazla granülsüz endoplazmik retikulum bulunur. Testosteron, öncülü olan kolesterolden türer. Kolesterol ya doğrudan granülsüz endoplazmik retikulum zarlarında sentezlenmekte ya da dolaşımdaki düşük yoğunluklu lipoprotein moleküllerinden türemektedir. Zarla sarılı olmayan lipid damlacıklarında gerektiğinde kullanılmak üzere kolesterol depolanır. Taşıyıcı proteinler kolesterolü mitokondrinin iç zarına aktardıktan sonra mitokondriler luteinizan hormonun etkisiyle kolesterolü pregnanolona çevirir. Sentezlenen pregnanolon mitokondri zarından granülsüz endoplazmik retikuluma aktarılır. Granülsüz endoplazmik retikulum üzerindeki enzimler pregnanolon üzerinde çeşitli değişiklikler gerçekleştirerek bunu testosterona çevirirler. Bu hücreler tarafından aralıksız sentezlenen testosteron mikrovilluslarla yüzey alanı artırılan hücre zarından difüzyonla geçer. Hücre dışına saliverilen testosteron, dolaşıma geçerek, hızla dolaşımdaki steroid bağlayıcı proteinlere bağlanır (26).

4.3.5. Kan-Testis Bariyeri

Kan ile seminifer tübüllerin iç bölgesi arasında bir bariyerin bulunması testiküler sıvı içine kandan çok az maddenin geçmesini açıklar. Erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önemli olan bu bariyer, Sertoli hücrelerinin arasındaki tıkaçıcı bağlantılar ile oluşturulur (15).

Kan-testis bariyerinde iki hücre grubu bulunur. Bunlar peritübüler miyoid hücreler ve Sertoli hücreleridir. Bariyerin oluşturulmasında yapısal olarak esas öneme sahip olan hücre Sertoli hücreleri ve bunların aralarında yaptıkları özelleşmiş bağlantı birimleridir. Sıkı bağlantı birimleri epitel hücreleri arasında vücudun en sıkı bölgelerini oluştururlar ve kan-testis bariyerinde çok önemli rol üstlenirler.

4.4. Epididimis

Epididimis, çok sayıdaki ductuli efferentes kanallarının tek kanal halinde toplanıp kıvrıntılı bir kanal halindeki devamıdır. Ductus epididimis, düzleştirilmiş halde, 5-7 metre uzunlukta olmakla beraber, kıvrıntılı toplu halde, 5 cm'lik bir uzunluk içine yerleşmiştir (28). Embriyoda mezonefrozdaki türeyen epididimis, bir baş (caput epididymis), bir gövde (corpus epididymis) ve kuyruk (cauda epididymis) bölgesi olmak üzere üç bölümden oluşur (26, 28). Baş parçası duktuli efferenteslerin sıkıca

bağlandığı bölümlerden oluşur. Erkeklerin %25'inde, baş bölümünde sap şeklinde bir uzantıya sahip kistik bir yapı olan apendiks epididimis yer alır (26). Epididimisin kanal çevresini saran bağ dokusu ve kan damarları epididimis'in her üç kısmında da bulunur (24).

Epididimis kanalının duvarında, bazal (kök) hücreler ve apikal bölümde lümene kadar uzanan uzun, hareketsiz stereosilyaya sahip yüksek prizmatik (esas) hücreleri barındıran çok yüksek yalancı çok katlı epitel bulunmaktadır (26).

Epitel kalınlığı, epididimisin baş bölgesinde daha uzun, kuyruk bölgesinde daha kısadır. Baştan kuyruğa doğru kalınlığı artan bir iç dairesel düz kas tabakası ve gövdeden itibaren görünen bir dış uzunlamasına tabaka, epiteli ve bazal laminayı kuşatır. Kas tabakası epididimis kanalı boyunca spermin taşınmasını kolaylaştırmak için peristaltik hareketler yapar (20).

Epididimisin üç ana işlevi bulunmaktadır:

1. Spermatozoon olgunlaşması: Epididimisin baş bölgesinde toplanan spermatozoonlar döleyebilme yeteneğine sahiptir. Döllenme yeteneği epididimisin gövdesinden kuyruğuna doğru kazanılır. Spermatozoon olgunlaşması şu şekildedir; yoğunlaşmış kromatinin sabitlenmesi, plazma membranının yüzey yükündeki değişiklikler, spermatozoon tarafından yeni yüzey proteinlerinin kazanılması.
2. Ejakülasyona kadar spermatozoon depolanması.
3. Depolanma bölgesi olan epididim kuyruğuna doğru peristaltik hareketlerle spermatozoon taşınması.

4.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

4.5.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Bir veya birden fazla tek elektron içeren yüksek reaktiviteli molekül veya gruplara serbest radikal denir. Ortaklanmamış tek elektron, moleküllere karakteristik özellikler kazandırır (29). Genellikle elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunurlar ve bu halleri ile stabildirler. Eğer moleküle veya atoma bir elektron eklenir veya çıkarsa reaktif hale gelmektedir (30, 31). Radikallerle reaksiyona giren moleküllerin bir elektronu azaldığı için onlar da reaktif hale gelmektedirler. Bir

radikalin diğer moleküllerle etkileşmesi araya bir antioksidan sistem girene kadar, zincirleme reaksiyon şeklinde devam etmektedir (32, 33).

Oksidan maddeler, reaktif oksijen ürünleridir (ROS). Serbest Oksijen Radikalleri; Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$), Hidrojen Peroksit (H_2O_2), Hidroksil Radikali ($HO\cdot$), Singlet Oksijen ($O_2 \uparrow\downarrow$), Hipoklorid ($HOCl$), Peroksil radikali ($ROO\cdot$), Organik peroksit radikali ($RCOO\cdot$), Perhidroksil radikali ($HO_2\cdot$), Alkoksil radikali (RO) gibi reaktif oksijen türevleri sayılabilir.

Normal metabolizma sırasında ya da patolojik intra ve ekstrasellüler olaylarla ortaya çıkan serbest radikallerin etkileri oksidatif stres olarak adlandırılır. Aerobik canlılarda hayati öneme sahip oksijen, yer aldığı biyokimyasal tepkimelerde gerçekleşen enzim inhibisyonları ve oluşan oksijen radikalleriyle toksik etki yapabilmektedir (34, 35).

Serbest oksijen radikalleri normal hücre metabolizması süresince devamlı olarak üretilmekte ve antioksidan savunma sistemi tarafından nötralize edilmektedir. Ancak ROS aşırı miktarda üretildiğinde veya antioksidan enzimlerde belirgin bir azalma olduğunda antioksidan savunma sistemi baskılanır ve oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stres karsinogenezin başlamasında kritik rol oynayan DNA hasarına, kromozomal sapmalara, tümör süpresör genlerde mutasyonlara, kontrol edilmeyen hücre bölünmelerine, genomik kararsızlıklara neden olarak tümör gelişimine yol açmaktadır (36).

Serbest oksijen radikallerinin en hasarlandırıcı etkisi, poliansatüre yağ asitleri ve fosfolipidden oluşan hücre membranları üzerine olur. Lipit peroksidasyonu membranda bulunan poliansatüre yağ asitlerinin, ROS tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması ile sonuçlanır (37). ROS, lipid peroksidasyonunu indükleyerek fonksiyonel ve yapısal hücre hasarına neden olur (38).

Aldehitler uzun ömürlü olduklarından hücre hasarının yayılmasına neden olabilmektedirler. Aldehidler arasında en iyi bilineni üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan MDA'dır. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna sebep olmaktadır. Bunun sonucunda da hücrelerde deformasyon, iyon transportu, enzim

aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özellikleri değişmektedir (35, 39).

4.5.2. Antioksidan Sistem

Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek için vücut antioksidanlar olarak bilinen birçok savunma sistemi geliştirmiştir (40). Normal fizyolojik koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan defans sistemine sahiptir. Bütün hücreler güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile oksidatif strese karşı savaşmaktadırlar (41).

Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Scavenging (Temizleme) Etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.
2. Quencher (Baskılama) Etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. Onarma Etkisi = Onarıcı Etki (Repair Etki): Onarıcı etki üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Oksidatif hasar görmüş DNA molekülünü tamir eden enzimler bu gruba örnek olarak verilebilir (42).
4. Zincir Koparma Etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır (43, 44).

Vücutta antioksidanlar enzimatik ve non enzimatik olarak 2 grup altında bulunur. Enzimatik antioksidanların başlıcaları; Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (KAT), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon Redüktaz (GSSG-R), Glutasyon-S-Transferaz'lar (GST) ve Mitokondrial Sitokrom Oksidaz'lardır (37, 39). Enzimatik olmayan antioksidanların başlıcaları; Askorbik Asit (C Vitamini), β -Karoten (Vitamin A Ön Maddesi), Vitamin E (α -Tokoferol), Melatonin, Polifenoller, Transferrin, Laktoferrin, Seruloplazmin, Albümin, Ürik Asit ve Bilirubin'dir (45).

4.5.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalının ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir (46,

47). Yüksek oksijen kullanımı olan dokularda aktivitesi daha fazladır ve süperoksidin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Süperoksit dismutazın %85'i ekstrasellüler sıvı ve sitoplazmada, %15'i ise mitokondride bulunmaktadır (32, 48, 49).

4.5.2.2. Katalaz

Katalaz (KAT) yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. KAT esas olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur (45, 46). Hidrojen peroksit ve metil/etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşı etkilidir ancak büyük moleküllü lipid hidroperoksitleri üzerinde etkisi yoktur (32). Granulomatöz hücrelerde, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma işlevini de görür (45, 46).

4.6. Apoptozis

Apoptozis 'apo' =ayrı, 'ptosis' =düşmek kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur (50). Apoptozis kelimesi ilk kez Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür (50, 51). Apoptosis terimi Kerr ve arkadaşları tarafından programlı hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır (52, 53).

Apoptozis, sağlıklı doku oluşumu ve gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynayan önemli bir mekanizmadır. Genetik olarak kontrol altındaki hücrelerin kendi kendini yok ettiği, RNA (Ribonükleik asit)' ya, protein 46 sentezine ve enerjiye ihtiyaç duyan programlı hücre ölüm şeklidir (54).

Deri, barsak epiteli, kan hücreleri gibi hücre yenilenmesinin hızlı olduğu dokularda yaşlanan hücreler apoptozisle ortadan kaldırılırlar. Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde; fetusun implantasyonundan organogeneze kadar tüm gelişim sürecinde apoptozis rol alır. Embriyolojik süreçte; parmak aralarındaki zarın, sinir sisteminde istenmeyen nöronların ortadan kaldırılmasında apoptozis rol oynar. Erişkinde hormona bağlı involüsyonda; örneğin, menstrüel siklusta endometrial hücre yıkımı, menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin küçülmesinde apoptozis görülür. Bağışıklık sistemi hücrelerinin seçiminde de apoptozis önemli rol oynamaktadır (55).

4.7. Methotrexate

MTX çeşitli kronik inflamatuvar hastalıklarda ve neoplastik durumlarda kullanılan, folik aside benzeyen folik asit antimetaboliti bir antineoplastik ilaçtır (56, 57). Uzun yıllardan beri lösemi, lenfoma, osteosarkom, akciğer kanseri, meme kanseri, baş ve boyun tümörleri gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca immünsüpressif ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle MTX, kanser tedavisinin dışında; romatoid artrit (RA), psoriasis, sarkoidoz, vaskulit ve diğer otoimmün rahatsızlıklarda da kullanılan etkili bir ilaçtır (56, 58).

MTX, dihidrofolat redüktaz enziminin aktif noktasına sıkı bir şekilde bağlanıp onu inhibe ederek tetrahidrofolat sentezini durdurur. Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu DNA ve RNA için gerekli purin bazlarının (adenin ve guanin) sentezinin durmasına yol açar. Ayrıca protein sentezinin bozulmasına neden olur.

MTX, S dönemindeki hücreler üzerinde sitotoksik etki yapar. MTX tümör, karaciğer ve böbrek hücrelerinde uzun süre bağlı kalır. Tümör hücrelerindeki bu durumun tedavi yönünden değeri vardır. Şöyle ki, antimetabolitler istirahat halindeki hücrelerde sitotoksik etki yapmazlar. Fakat bu durumdaki hücrede uzun süre kalan MTX'in, latent sitotoksik etkisi vardır; hücre bölünmeye başladığı zaman bu etki belirgin hale geçer ve hücreyi öldürür (59).

MTX tedavisinde en sık rastlanan yan etkiler bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme ve stomatit gibi yan etkiler, hafif ve geri dönüşümlü olup sıklıkla doz ilişkilidir (60). MTX'in akut yan etkileri doza bağlıdır. Yüksek doz MTX tedavisi sonucunda; kemik iliği baskılanması, mukozit, kusma, diyare, gastrointestinal ülserler, deri ülserleri gibi yan etkilerinin olmasının yanında en önemli etkisi karaciğer toksisitesidir (58, 61).

4.8. Kateşinler

Theaceae familyasının *Camellia sinensis* türünden olan çay, dünya üzerinde sudan sonra en fazla tüketilen ikinci içecektir. İlk olarak Çin'de keşfedilen çay, 30'dan fazla ülkede yetiştirilmektedir (62). Kateşinler, theaflavinler ve thearubiginler çayda bulunan, kronik hastalıkların önlenmesi ve azaltılmasında dikkate değer bir yetenekleri olan polifenolik bileşiklerdir (5).

Kateşinler polifenoller grubundan, şarap, çay, meyve ve çikolatada bulunan flavanoidlerdir. Bu grup flavanoidler majör olarak kateşin, epikateşin, epigallokateşin alt gruplarını içermektedir. Kateşinler, doğal antioksidan aktiviteleriyle bilinirler ve bitkilerdeki bu polifenoller vasküler, viral, gastrointestinal ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılırlar (63, 64).

Kateşinler yeşil çay yapraklarındaki ana biyoaktif bileşenleri oluşturur (kuru ağırlığın % 25-35'lik kısmı). Bir bardak yeşil çay 100-200 mg kateşin içerir (65, 66). Flavanoidlerin içerdikleri 2,3 çift bağ nedeniyle 8 stereoizomeri bulunmaktadır (67, 68).

1. (+) kateşin (C),
2. (-) epikateşin (EC),
3. (+) gallokteşin (GC),
4. (-) epigallo kateşin (EGC),
5. (+) kateşin gallat (CG),
6. (-) epikateşin gallat (ECG),
7. (+) gallokteşin gallat (GCG),
8. (-) epigallokteşin gallat (EGCG)

Kateşinler biyomoleküllere zarar veren serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırdıklarından antioksidan aktiviteye sahiptirler; bu sayede DNA'yı ve diğer biyomolekülleri serbest radikallerin zararlı etkilerinden korurlar (69). Hücreleri tümör oluşumuna karşı korurlar, serum kolesterol seviyesini azaltırlar, hipertansiyonu düşürürler, ayrıca antimutajenik etkiye sahiptirler (70, 71). Kateşinlerin antiviral, plak oluşumunu inhibe etme, bazı tip kanserlerin önlenmesi, yüksek olan tansiyonu ve kan glukoz seviyesini düşürme gibi bir takım olumlu fizyolojik etkileri vardır. Lipid metabolizması üzerine de etkileri bulunmaktadır; total kolesterol ve trigliserit miktarını azaltırlar, karaciğerdeki yağ birikimini inhibe ederler, karaciğerdeki lipid katabolizmasını stimüle ederler ve enerji tüketimini arttırırlar (72).

Özellikle çayda bulunan kateşinler kimyasal olarak suda çözünebilen, renksiz moleküllerdir (68, 73). Moleküllerin kimyasal farklılıkları heterosiklik oksijen halkasının moleküldeki konformasyonuna dayanmaktadır. Kateşinlerin antioksidan

potansiyelleri EGCG>ECG>EGC>EC olarak sıralanmaktadır. Bilgilerin analizi sonrasında ortho konfigürasyona sahip olmanın ve içerdikleri hidroksil grubunun sayısının antioksidanların aktivitesini önemli ölçüde etkilediği hipotezi öne sürülmüştür (68).

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Deneysel Çalışma Aşaması

5.1.1. Deney Hayvanlarının Bakımı, Barınması ve Temini

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 25.06.2013 tarihli ve 1 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Tez çalışması süresince kullanılan deney hayvanları, kimyasal malzemeler, araç ve gereçler KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 10921 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

Çalışmada, 12 haftalık 250-300 gr ağırlığında Spraque Dawley cinsi 24 adet erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanların bakımı, beslenmesi ve barınması KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'ndeki sıçan takip odalarında yapıldı. Deney süresince laboratuvarın sıcaklığı ortalama $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, nisbi nem ortalama $\%50 \pm 5$ olarak ayarlandı. 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sağlandı. Sıçanlara içme suyu olarak çeşme suyu verildi. Tüm denekler standart yem ile sınırsız beslendi. Çalışma süresince sıçanların barındırılmasında standart Tip III kafesleri kullanıldı (Resim 1). Deney için kullanılan sıçanların tamamı Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edildiği için çevre stresi ve uyum problemi yaşanmadı.



Resim 1. Deneklerin barındırıldığı tip III kafesler

5.1.2. Deneyisel Çalışma Planı

Deneyde kullanılan 24 adet sıçan her grupta 6 hayvan olacak şekilde 4 ayrı gruba ayrıldı. Hayvanlar yaş ve ağırlıklarına göre gruplara homojen şekilde dağıtıldı (Tablo1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan gruplar ve gruplara uygulanan tedaviler tablosu.

Gruplar	Grupların Özellikleri ve Uygulanan Tedaviler
Kontrol Grubu	Herhangi bir tedavi uygulanmayan sıçanlar
MTX Grubu	İlk gün tek doz (25mg/kg) MTX uygulanan sıçanlar
CAT Grubu	5 gün boyunca kateşin (500 mg/kg) verilen sıçanlar
MTX + CAT Grubu	İlk gün tek doz (25 mg/kg) MTX uygulanan ve ilk günden itibaren 5 gün boyunca kateşin (500 mg/kg) uygulanan sıçanlar

Çalışmamızda birinci günde bütün hayvanlar yaş ve ağırlıklarına göre dört ayrı gruba ayrıldı. Sıçanların kafesleri her gün temizlenerek besin ve su ihtiyaçları karşılandı. 5 günlük deney aşamasının ardından altıncı günün sabahında deney hayvanları sakrifiye edilerek deney kısmı tamamlandı.

Sıçanlar birinci gün ağırlıklarına göre 5 gruba homojen olarak dağıtıldı. Kontrol grubuna 5 gün boyunca herhangi bir işlem uygulanmadı. MTX grubuna çalışmanın ilk günü tek doz MTX (25 mg/kg) periton içi (i.p.) uygulandı, sonraki 4 gün boyunca herhangi bir işlem uygulanmadı. CAT grubuna 5 günlük çalışma boyunca, her gün aynı saatte, 500 mg/kg kateşin distile suda çözülerek gavaj yöntemiyle verildi. MTX + CAT grubuna çalışmanın ilk günü tek doz MTX (25 mg/kg) periton içi (i.p.) olarak uygulandı, buna ek olarak 5 gün boyunca, her gün aynı saatte, 500 mg/kg kateşin gavaj yöntemiyle verildi.

5.1.3. Kateşinlerin *Camellia sinensis* (Yeşil Çay)' den İzole Edilmesi

Kateşin ekstraktı Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılan çalışmalarla elde edildi. Yapılan çalışmada

öncelikli olarak, Doğu Karadeniz Bölgesinde (Sürmene, Trabzon), farklı dönemlerde yetiştirilen (1. sürüm Mayıs ayı, 2. sürüm Temmuz ayı ve 3. sürüm Ağustos ayı) yeşil çay yapraklarından kateşin ve kafeinin ekstraksiyonu yapıldı.

Ekstraksiyon Yöntemi:

10 g yeşil çay yaprağının 200 mL saf su ile 80 derecede 40 dakika 300 rpm'de karıştırılmasıyla ekstraksiyon sağlandı. Sonra süzgeç kağıdından süzülerek, süzölmüş kısımlar su/kloroform (1:1 v/v) ile fazlarına ayrıldı. Kafein ve diğer safsızlıklar kloroform fazına taşındı. Su fazları birleştirilip etil asetat (1:1 v/v) ile yeniden fazlarına ayrıldı. Bu ekstarksiyon sonrasında kateşin bileşikleri etil asetat fazına alındı. $MgSO_4$ kullanılarak etil asetat fazı kurutulduktan sonra organik çözücü tamamen evapore edildi. Kantitatif analiz için HPLC'ye verilen örneklerde yeşil çay içeriğinde en önemli kateşin çeşidi olan EGCG' nin en yüksek değere sahip olduğu tespit edildi. Elde edilen kateşinlerin yüzde ve ppm cinsinden miktarları Tablo 2' de sunulmuştur.

Tablo 2. Kateşinlerin yüzde ve ppm cinsinden miktarları.

KATEŞİN	% MİKTAR	ppm CİNSİNDEN MİKTAR (mg/L)
EGC	8.304	21.259
C	0.399	1.020
EC	1.725	4.417
EGCG	20.552	52.613
GCG	0.820	2.101
ECG	3.826	9.795
Kafein	0.253	0.648

5.2. Histolojik İşlemler

5.2.1. Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması

5 günlük deney süresi sonunda bütün hayvanlara ketamin (50 mg/kg) ve xylazine (5 mg/kg) i.p olarak uygulanarak 10 dakika uyutuldu. Karın boşluğundan girilerek sağ testis çıkarıldı ve abdominal aortadan girilerek kan alındı (Resim 2). Yapılan bu işlemlerden sonra abdominal aorta makasla kesilerek kansızlaştırma yöntemi

ile hayvanlar sakrifiye edildi. Sıçanlardan alınan testisler boyuna ikiye bölündü. Her testisin bir yarısı histolojik değerlendirmeler için Bouin fiksatifine konuldu. Testisin diğer yarısı ise biyokimyasal analizler için ependorf tüplerine konuldu ve ependorflar -80°C'deki soğutucuda muhafaza edildi. Alınan kanlar antikoagülanlı (%3,2' lik sodyum sitratlı) tüplere konularak alt üst edildi; sonra bunlar santrifüj edilerek plazma kısmı -20°C'de saklandı. Biyokimyasal analizler için alınan tüm doku ve kan numuneleri KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki soğutucularda muhafaza edildi.



Resim 2. Testis Diseksiyonu a)Testisin çıkarılması, b)Testisin yağ ve epididimisten ayrılmış hali

5.2.2. Bouin Tespitinin Hazırlanışı

Dokuların tespitinde kullanılacak Bouin solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı;

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

Bouin tespitini hazırlamak için önce doymuş pikrik asit çözeltisi formaldehit ile iyice karıştırıldı, sonra üzerine yavaşça glasiyal asetik asit eklenerek tekrar karıştırıldı (74).

5.2.3. Doku Takibi

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

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

5.2.4. Kesitlerin Alınması

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

5.2.5. Kesitlerin Hematoksilen-Eozinle Boyanması

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

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

Hazırlanan preparatlarda seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Stereoloji Laboratuvarında bulunan Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Japan) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak hesaplandı. Seminifer tübüldeki spermatogenetik hücreler ve interstisyel alan, yine aynı mikroskopta incelendi ve fotoğrafları çekilerek dijital ortama aktarıldı.

5.3. İmmünohistokimyasal İşlemler ve Analizler

5.3.1. TUNEL Boyama

Testisteki apoptozisi değerlendirmek için TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay) boyama tekniği kullanılarak seminifer tübül germinal hücrelerinde DNA fragmentasyonları tanımlandı. TUNEL metoduyla DAB ve hematoksilenle boyanan dokularda apoptoza uğrayan hücrelerin kahverengi ile boyananları TUNEL (+) ve apoptotik, mor renkte boyananları ise nonapoptotik ve TUNEL (-) hücreler olarak değerlendirildi. Her testiste 20 seminifer tübülde TUNEL (+) hücre sayısı ve toplam hücre sayısı bakılıp Apoptotik yüzde (AI= TUNEL (+) hücre sayısı / toplam hücre sayısı x 100) hesaplandı (75).

TUNEL tekniği için In situ cell death detection kit, POD kiti kullanıldı. Lam üzerine alınan 5 µ'luk kesitler 1 saat 60 °C'lik etüvde bekletildikten sonra 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 (Ultraviyole ışın) block 10 dk
12. 75 µg Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve 50 µl TdT/dUTP karışımı ile dokular kaplandı, 37 °C'lik etüvde 1,5 saat nemli ortamda tutuldu.
13. PBS'de yıkandı.

14. 100 µl converter peroksidaz dokuyu kapatacak şekilde kaplandı ve 37 °C'lik etüvde inkübe edildi.
15. PBS'de 3x5 yıkandı.
16. 100 µl DAP ile 5 dk karanlıkta oda ısısında beklendi.
17. Distile suda 1x2 kez yıkandı.
18. H&E ile 15 sn boyandı ve çeşme suyu ile yıkandı.
19. %70 etanol 2x5dk
20. %95 etanol 2x5 dk
21. %100 etanol 2x5 dk
22. Ksilen 2x5 dk
23. Dokular kapatıldı ve değerlendirildi.

5.4. Biyokimyasal İşlemler ve Analizler

5.4.1. Biyokimyasal Analizler İçin Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Çalışmamız için gerçekleştirilen biyokimyasal çalışmalarda aşağıda belirtilen cihazlar (Tablo 3) ve kimyasal maddeler (Tablo 4) kullanılmıştır.

Tablo 3. Biyokimyasal analizler için kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	Üretici Firma
ELISA okuyucusu	VERSA max
pH metre	Hanna Instruments
Saf su cihazı	Aquatron 4 AD
Hassas analitik terazi	Metler Toledo AB 204-S
Deney tüpleri	SH&GLASS
Homojenizatör	Ultra-Turrax T25
Spektrofotometre	Beckman-Coulter
Soğutmalı santrifüj	Beckman-Coulter

Tablo 4. Biyokimyasal analizler için kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici firma, ürün kodu ve saflığı
Ksantin	Sigma, X-0626
EDTA	Carlo Erbo Reagent, Code No 303227
Nitroblue tetrazolium (NBT)	Sigma, #SLB8190V
Sodyum karbonat (Na₂CO₃)	Merck, Art 6398
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma, Lot#058K0726
Bakır klorür (CuCl₂)	Lancaster, 13167
Ksantin oksidaz	Sigma, Lot#SLBB1574V
Etanol	Sigma, Lot#34870, %99,8
Kloroform	Merck, UN 1888, %99
Triton X-100	Merck, Art 11869
Fosforik Asit (H₃PO₄)	Merck, Art 563, %85
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma, Lot#S42774-018
1,1,3,3-tetrametoksipropen	Sigma, Lot 76H3424, %99
Asetik asit (CH₃COOH)	Merck, Art 56, %99,5
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, 35050
Hidrojen peroksit (H₂O₂)	Sigma, A6011
Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄)	Merck, Art 4871
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na₂HPO₄)	Merck, Art 6576

5.4.2. MDA Tayini

5.4.2.1. Dokuda MDA Tayini

Dokular buz içinde 0.5 mL/L Triton X-100 içeren %1.15'lik KCl (Potasyum klorür) çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek elde edilen süpernatantlarda ilgili ölçümler yapıldı. MDA ölçümü Mihara ve Uchiyama yöntemine göre yapıldı (76). Standart çözeltiler 1,1,3,3-tetrametoksipropandan hazırlandı. 8.3 µL tetrametoksipropen 0.01 M HCl çözeltisine eklendi ve 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu oluşan 10 µmol/mL'lik ara stok çözeltiden dilüsyonlar yapılarak 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 5. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı.

Reaktifler	Eklenen Miktar (mL)
Doku homojenatı	0.5
H ₃ PO ₄	3
Tiyobarbitürik asit	1

Karışım 100 °C’de etüvde inkübasyona bırakıldı. Süpernatantlar ELISA pleytine pipetlendikten sonra 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. MDA düzeyi nmol MDA/g doku olarak hesaplandı.

5.4.2.2. Plazmada MDA Tayini

Plazma Lipid peroksit seviyesi ölçümü Yagi yöntemiyle yapıldı (77). MDA ile tiyobarbitürik asit arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. 10, 5, 2.5, 1.25, 0.675 nmol/mL’lik standart çözeltiler hazırlandı. Sonuçlar µM cinsinden hesaplandı.

Tablo 6. Plazma MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı.

Reaktifler	Eklenen Miktar (ml)
Plazma	0.15
H ₂ SO ₄	1.2
Fosfotungustik asit	0.15
Tiyobarbitürik asit	0.5
Saf su	2
TBA	0.5

5.4.3. Plazma ve Doku KAT Aktivitesi Tayin Yöntemi

Doku ve plazma katalaz aktivitesi Goth metoduna göre yapıldı (78). Bu metod amonyum molibdatın H₂O₂ ile oluşturduğu sarı kompleksin 405 nm’deki spektrofotometrik analizine dayanır.

Dokular buz üzerinde 0.1 M pH’sı 7 olan fosfat tamponu ile homojenize edildi. Katalaz aktivitesi ölçümünde, 0.2 mL doku homojenatı 65 µL H₂O₂ eklenen 6 mM’lık pH’sı 7.4 olan fosfat tamponunun 1 mL’si içinde 60 sn inkübe edildi (numune 1). Çalışmada gerekli seyreltmeler yapıldı ve numune 1’in yanında iki adet kontrol kullanıldı. 0.2 mL fosfat tamponu üzerine 1 mL H₂O₂ eklendi (kontrol 2). Kontrol 3’te

ise sadece 1.2 mL fosfat tamponu kullanıldı. Numune ve kontrollerde oluşan reaksiyonları durdurmak için 1 mL 32.4 mM'lık amonyum molibdat çözeltisi eklendi. Reaksiyonlar sonucu oluşan sarımsı renk 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Katalaz aktivitesi U/mg cinsinden belirlendi.

5.4.4. Plazma ve Doku SOD Aktivitesi Tayin Yöntemi

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley'in geliştirdiği yöntemin modifiye edilmesi sonucu yapıldı (79). Bu metod, ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile oluşturulan $O_2^{\cdot-}$ 'nin SOD tarafından kullanılarak nitroblue tetrazolium (NBT)'dan mor renkli formazan boyası oluşumunun engellenmesi esasına dayanır. Reaksiyon sonucu oluşan renkli bileşiğin absorbansı 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Dokular buz içinde 0.5 mL/L Triton X-100 içeren pH'sı 7.4 olan 50 mM'lık Tris-HCl tampon çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C' de 10 000 g'de 30 dk santrifüjlenerek elde edilen süpernatantlarda SOD aktivite ölçümü yapıldı. 3, 2, 1, 0.5, 0.25 U/mL' lik SOD standartları kullanıldı. Sonuç U/mg cinsinden hesaplandı.

Tablo 7. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Reaktifler	Miktar (mL)
Standart/Dilue Numune	0.25
SOD reaksiyon karışımı	1.25
Ksantin oksidaz	0.25
Bakır klorür	0.5

5.4.5. Protein Tayini

Protein miktarının tayini Bradford yöntemine göre (80) yapıldı. Bu metotta negatif yüklü olan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası proteinlerin üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın proteindeki pozitif yüke bağlanmasıyla kırmızıdan maviye olan renk dönüşmesinin 600 nm'deki spektrofotometrik ölçümüne dayanan bir metottur. Standart çözeltiler 2 mg/mL'lik stok BSA'dan hazırlandı. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı.

Tablo 8. Bradford metodu için yapılan reaksiyon karışımı.

Reaktifler	Miktar (µL)
Bradford Reaktifi	100
Homojenat (10 kat seyreltildi)	10

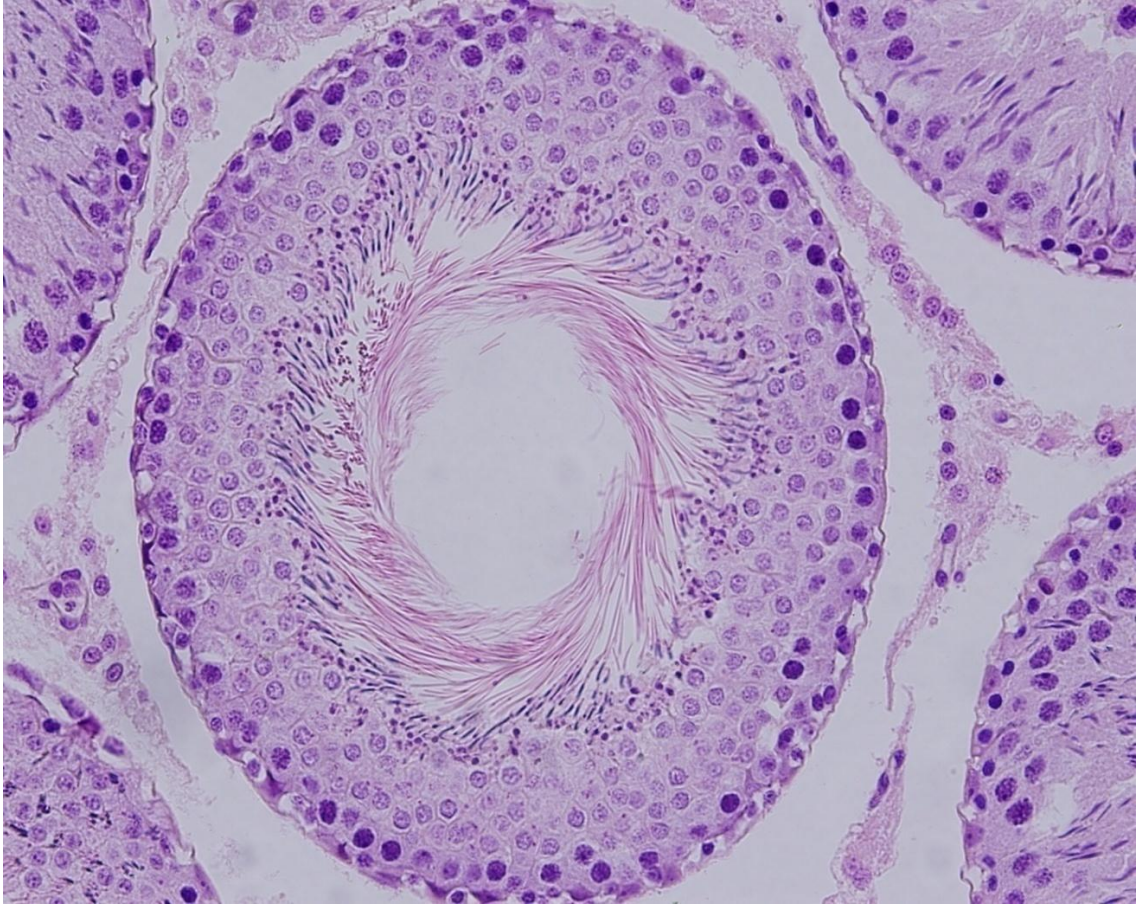
5.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 for Windows® istatistik paket programı ve Microsoft® Excel (for windows XP) kullanıldı. İstatistiksel analiz yapılırken gruplar arası karşılaştırma sonuçları için Mann-Whitney U testi, grup içi dağılım sonuçları için Kruskal Wallis testi kullanıldı. Hata kat sayısı 0,05’den küçük olan değerler ($p<0,05$) anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

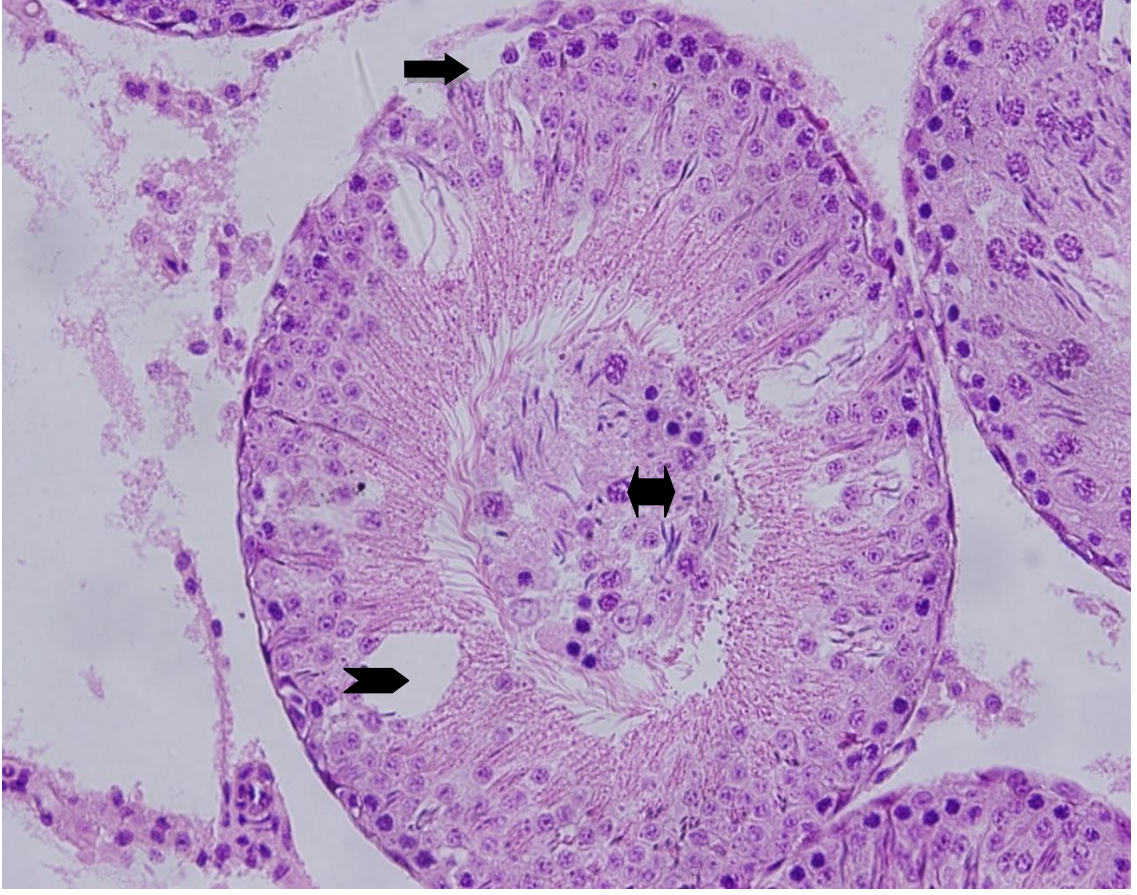
6.1. Histolojik Bulgular

Testis dokusunda yapılan histolojik incelemede; kontrol grubundaki sıçanlara ait testis kesitleri incelendiğinde herhangi bir patolojiye rastlanmadı. Seminifer tübüller, spermatogenik seriye ait hücreler ve interstisyel alandaki Leydig hücreleri normal yapıda idi (Resim 3).



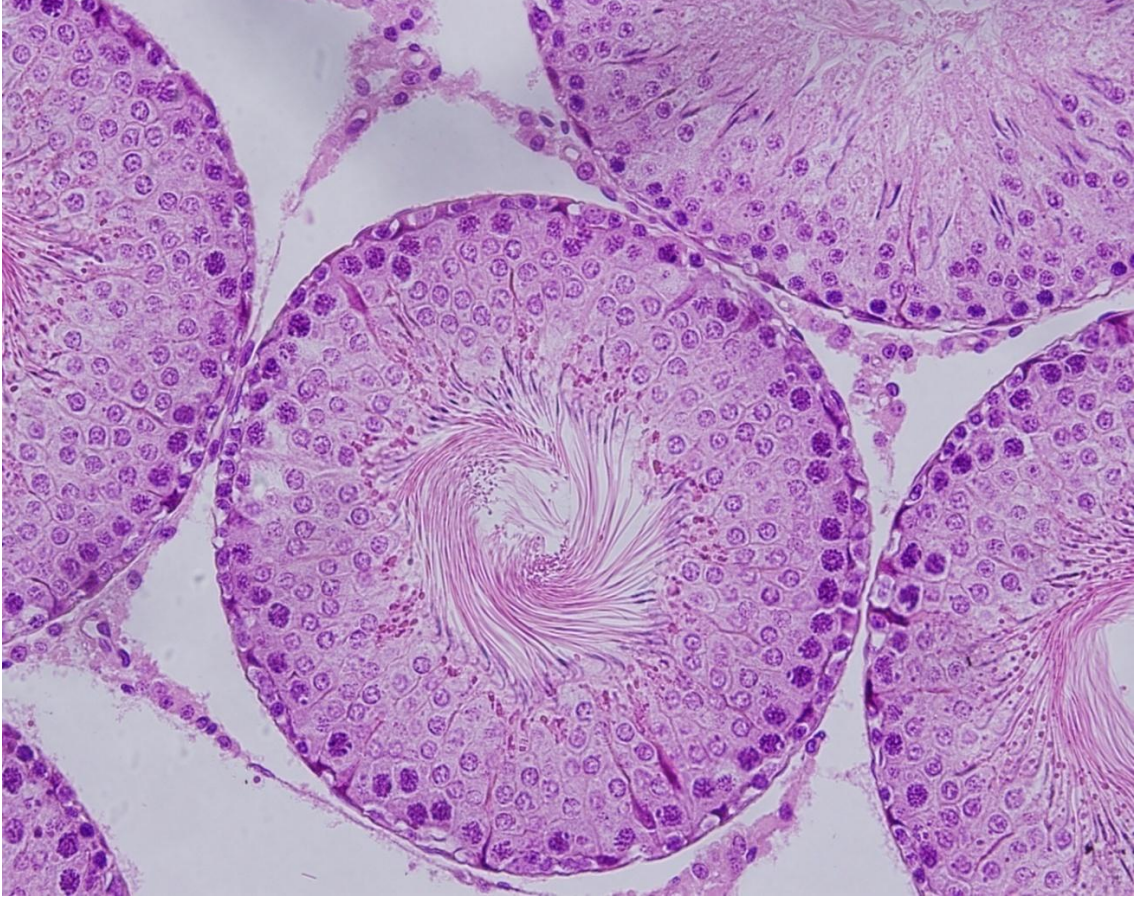
Resim 3. Kontrol grubuna ait testis dokusu (H&E, X400).

MTX grubunda bulunan sıçanlara ait testis dokusu incelendiğinde seminifer tübül lümenlerine çok sayıda olgunlaşmamış germinal hücrelerin döküldüğü, germinal epitelde vakuolizasyon ve Sertoli hücreleri ile spermatogoniumlar arasında açılmalar olduğu belirlendi (Resim 4).



Resim 4. MTX grubuna ait testis dokusu (H&E, X400).  = Lümene dökülmüş immatür germinal hücreler,  = Vakuolizasyon,  = Sertoli hücresi ile spermatogonyum arasında açılma

Kateşin (CAT) grubundaki testis kesitleri incelendiği zaman kontrol grubunda olduğu gibi seminifer túbül yapısında ve spermatogenik hücre döngüsünde herhangi bir patolojiye rastlanmadı (Resim 5).



Resim 5. CAT grubuna ait testis dokusu (H&E, X400).

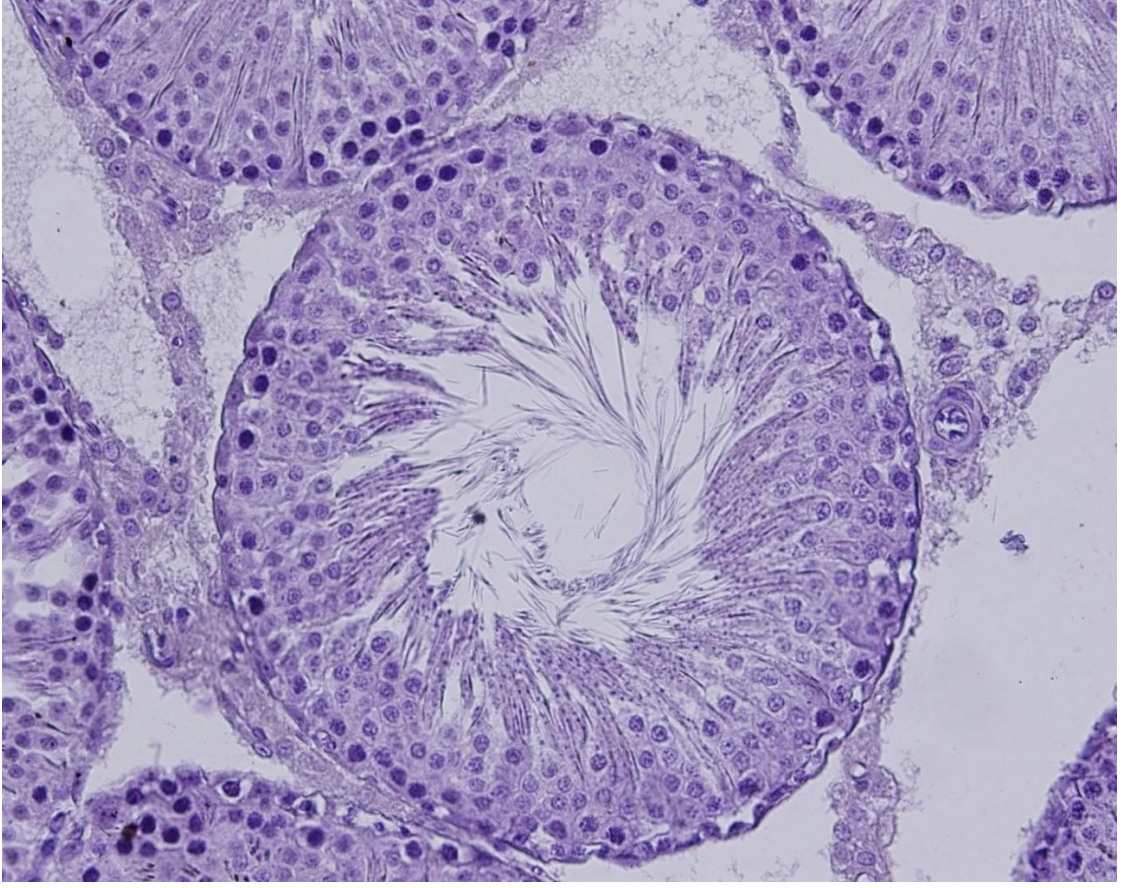
MTX+CAT grubundaki sıçanlara ait kesitler incelendiğinde Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar arasındaki açılmaların, germinal epiteldeki vakuolizasyonların ve seminifer tübül lümenine dökülen olgunlaşmamış germinal hücre sayısının MTX grubuna kıyasla belirgin derecede azaldığı gözlemlendi (Resim 6).



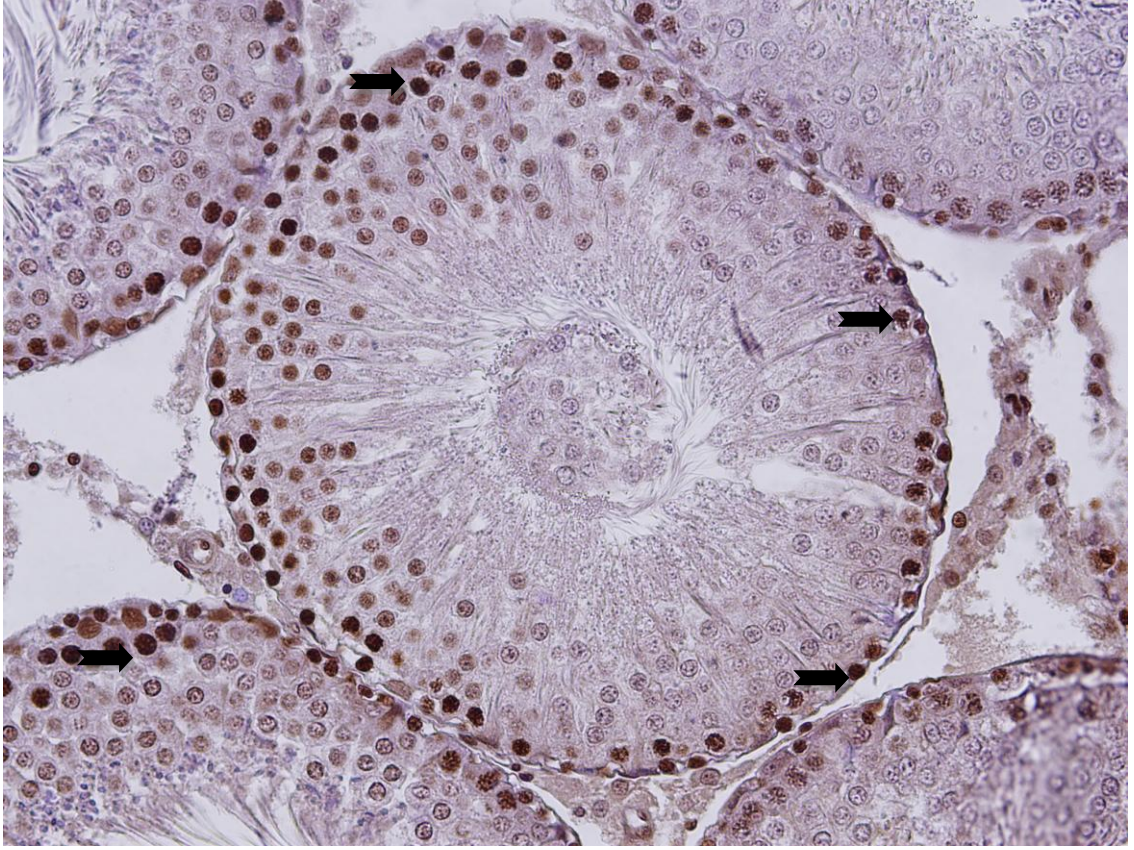
Resim 6. MTX+CAT grubuna ait testis dokusu (H&E, X400).  = Sertoli hücresi ile spermatogonyum arasında açılma.

6.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

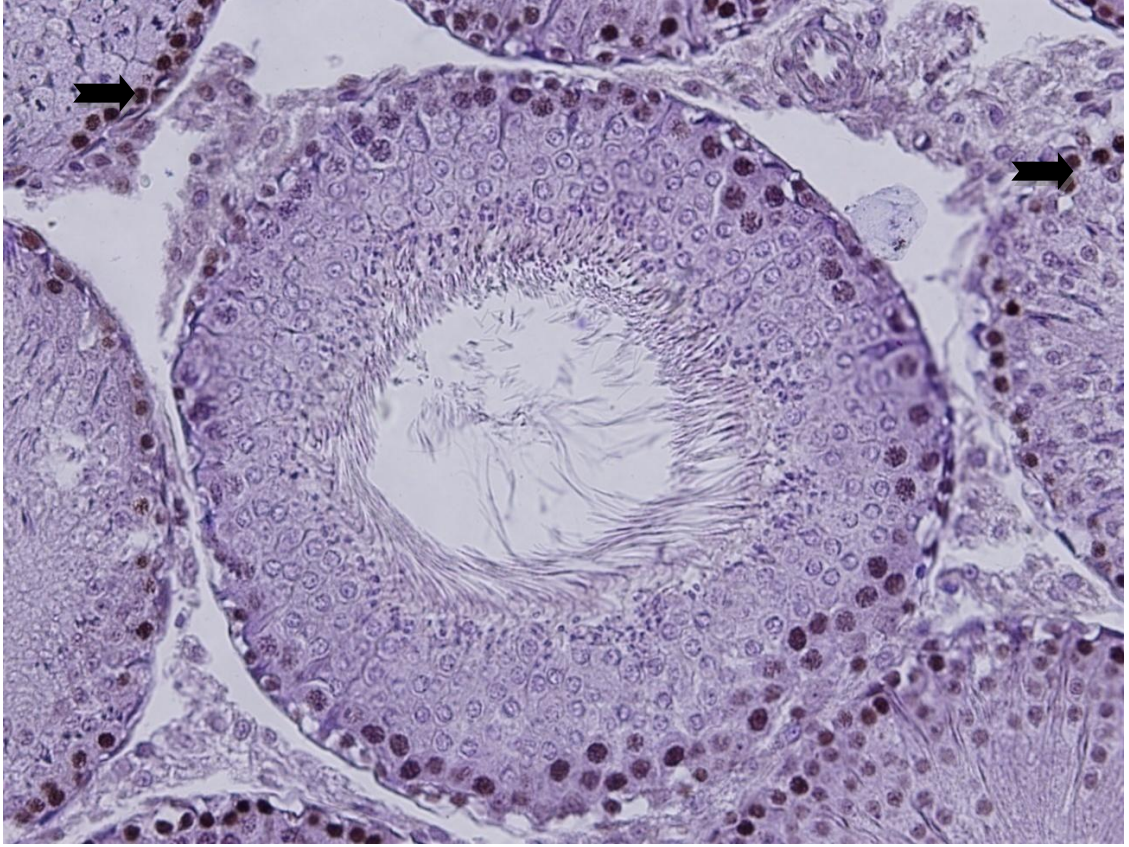
Dokuların TUNEL metoduyla boyanması sonucunda, apoptoza uğrayan hücrelerin kahverengi, canlı olan hücrelerin ise mor renge boyandığı görüldü. Işık mikroskopunda 40X büyütme altında yapılan sayım sonucu AI belirlendi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda MTX grubunda kontrol grubuna göre AI' nın istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı, CAT grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğin olmadığı görüldü. MTX+CAT grubunda ise MTX grubuna kıyasla AI' nın istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü belirlendi (Tablo 9).



Resim 7. CAT grubuna ait TUNEL boyaması (X400).



Resim 8. MTX grubuna ait TUNEL boyaması (X400). ➡= Apoptotik hücre.



Resim 9. MTX+CAT grubuna ait TUNEL boyaması (400X) ➡ = Apoptotik hücre.

Tablo 9. Histolojik verilere ait tablo.

Gruplar	Lümenine İmmatür Germinal Hücre dökülen Tübül Sayısı (%)	AI (%)	Tübül Çapı (µm)	Germinal Epitel Kalınlığı (µm)
Kontrol	6,28 ± 3,42	2,3438 ± 0,72	285,69 ± 9,3836	95,17 ± 3,723
MTX	68,46 ± 4,87 ^a	58,3532 ± 4,28 ^a	248,57 ± 10,362 ^b	59,72 ± 8,463 ^b
CAT	5,85 ± 2,31	2,2725 ± 1,02	283,26 ± 8,1544	94,15 ± 4,395
MTX+CAT	26,43 ± 4,28 ^c	28,5361 ± 1,78 ^c	277,21 ± 7,1685 ^d	83,62 ± 5,013 ^d

a= MTX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (p<0.05).

b= MTX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0.05).

c= MTX+CAT grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0.05).

d= MTX+CAT grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (p<0.05).

6.3. Biyokimyasal Bulgular

Testis dokusu üzerinde yapılan biyokimyasal analizlerin Mann-Whitney U testine göre değerlendirilmesi sonucunda; kontrol grubuna kıyasla MTX grubunda MDA değerinin anlamlı olarak arttığı, SOD ve KAT değerlerinin ise anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. MTX ve MTX+CAT grupları kıyaslandığında ise MTX+CAT grubunda MTX grubuna göre MDA değerinin anlamlı şekilde azaldığı, SOD ve KAT değerlerinin ise anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Tablo 10).

Tablo 10. Testis dokusundaki biyokimyasal değerlendirmeler tablosu.

Gruplar	MDA (nmol/g doku)	SOD (U / mg)	KAT (U / mg)
Kontrol	113,759 ± 8,7507	3,59311 ± 0,5540	31,3402 ± 4,4833
MTX	136,939 ^a ± 8,9126	1,80989 ^b ± 0,4315	12,0211 ^b ± 4,3738
CAT	113,898 ± 7,1685	3,13968 ± 0,9813	30,8737 ± 1,5426
MTX+CAT	118,868 ^c ± 3,2039	2,49062 ^d ± 0,8913	17,7962 ^d ± 4,5545

a= MTX grubundaki değer kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (p<0.05).

b= MTX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0.05).

c= MTX+CAT grubundaki değer MTX grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0.05).

d= MTX+CAT grubundaki değerler MTX grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (p<0.05).

Kan plazmasında yapılan biyokimyasal analizlerin Mann-Whitney U testine göre değerlendirilmesi sonucu; kontrol grubuna kıyasla MTX grubunda MDA değerinin anlamlı olarak arttığı, SOD ve KAT değerlerinin ise anlamlı olarak azaldığı belirlendi. MTX ve MTX+CAT grupları kıyaslandığında ise MTX+CAT grubunda MTX grubuna göre MDA değerinin anlamlı şekilde azaldığı, SOD ve KAT değerlerinin ise anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Tablo 11).

Tablo 11. Kan plazmasındaki biyokimyasal değerler tablosu.

Gruplar	MDA (μM)	SOD (U / mg)	KAT (U / mg)
Kontrol	3,8394 $\pm$ 0,6409	6,8643 $\pm$ 1,9648	22,9588 $\pm$ 2,8938
MTX	6,4245 ^a $\pm$ 1,7373	3,5898 ^b $\pm$ 0,9839	15,3211 ^b $\pm$ 1,3984
CAT	4,7928 $\pm$ 0,9174	6,6387 $\pm$ 1,2135	22,3234 $\pm$ 2,8305
MTX+CAT	4,2918 ^c $\pm$ 0,4514	5,0292 ^d $\pm$ 0,9499	19,7265 ^d $\pm$ 2,9045

a= MTX grubundaki değer kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (p<0.05).

b= MTX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0.05).

c= MTX+CAT grubundaki değerler MTX grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0.05).

d= MTX+CAT grubundaki değerler MTX grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (p<0.05).

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bir folik asit antimetaboliti olan MTX, kan ve solid organ malignansilerinde, dermatolojik ve romatolojik hastalıklarda, ektopik gebelik sonlandırılmasında ve çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak kullanılan bir ajandır (81, 82). Kalantzis ve arkadaşları uzun dönem düşük dozda MTX tedavisi alan hastalarda %30 ile %80 arasında yan etki insidansı bulunduğunu, %5-35 oranında da bu yan etkiler nedeni ile tedavinin bırakıldığını belirtmişlerdir (83). MTX' in pnömoni, nefrotoksisite, hepatotoksisite gibi yan etkilerinin yanında çeşitli organ sistemleri üzerinde karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkileri vardır (84, 85). MTX' in toksik etkisinin oksidatif stres kaynaklı olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Vardı ve arkadaşları intestinal sistemde oluşan oksidatif hasara karşı beta karoten ve kayısının antioksidan özelliklerini inceledikleri çalışmalarında MDA ve MPO aktivitesinin artıp, SOD, KAT ve GSH içeriğinin azaldığını rapor etmişlerdir (86). Literatürde MTX tarafından oluşturulan oksidatif hasarı önlemek için çeşitli antioksidanlarla yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Zerdeçal, kayısı, ökse otu, kuersetin, kabak çekirdeği ve diğer pek çok madde antioksidan özelliklerinden dolayı MTX' den dolayı oluşan toksik hasara karşı kullanılmışlardır (87-90). Biz de yaptığımız bu çalışma ile, dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecek olan *Camellia sinensis* (yeşil çay)'in içerdiği polifenolik bileşiklerden olan kateşinlerin MTX kaynaklı testis hasarına karşı antioksidan ve antiapoptotik etkilerini inceledik.

Bu çalışmada yapılan histolojik incelemeler sonucunda MTX grubunda kontrol grubuna kıyasla germinal epitel kalınlığı ve seminifer tübül çapının anlamlı derecede azaldığı belirlendi. MTX grubunda kontrol grubuna göre, seminifer tübül lümeninde daha fazla sayıda immatür germinal hücreye rastlandı. Bu grupta spermatogonyumlar ile Sertoli hücreleri arasında açılmalar ve germinal epitelde vakuolizasyonlar görüldü. Yapılan bütün bu incelemeler tek doz MTX uygulanmasının germinal epitelde önemli ölçüde hasar oluşturduğunu göstermektedir. MTX grubuna kıyasla MTX+CAT grubunda ise seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığında artış, seminifer tübül lümenine dökülen hücre sayısında ve vakuolizasyon miktarında azalma görüldü.

Bu çalışmada MTX' in germ hücreleri DNA' sına verdiği zararı anlayabilmek için TUNEL metoduyla apoptoz belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla MTX grubunda AI'

nın anlamlı olarak arttığı belirlendi. MTX+CAT grubunda ise MTX grubuna kıyasla apoptoza uğramış hücre sayısının anlamlı olarak azaldığı görüldü. Buradan yola çıkarak yeşil çay kateşinlerinin, antiapoptotik etkileriyle, MTX' in oluşturduğu hasarı azalttıklarını göstermektedir.

Fizyolojik şartlarda insan vücudunda oluşan ROS ile antioksidan defans bir denge halindedir. Yoğun ROS üretimi ya da antioksidan defansın azalması, oksidatif strese neden olarak biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara yol açar (91). ROS'un fazlalığı hücrel lipidler, proteinler ve DNA'da hasara, hücrenin normal fonksiyonlarında inhibisyona neden olur (92, 93).

MDA lipid peroksit düzeylerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılmaktadır ve lipid peroksidasyonunun derecesi ile çok iyi korelasyon göstermektedir (94). Literatürde MTX kullanılarak MDA aktivitesinin arttığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Hemeidan ve arkadaşlarının sıçanlarda MTX' e bağlı hepatik oksidatif hasarın curcumin verilmesiyle azaltıldığının gösterildiği çalışmalarında (95), Devrim ve arkadaşlarının sıçan böbreğinde yaptıkları çalışmada (96), Cıralık ve arkadaşlarının sıçan barsak dokusunda yaptıkları çalışmada (97), MTX' in MDA seviyesini artırdığını göstermişlerdir. Biz de yaptığımız bu çalışma ile kontrol grubuna kıyasla MTX grubunda testis dokusu ve kan plazmasında MDA değerinin anlamlı ölçüde arttığını belirledik. Buna karşılık MTX grubu ile kıyasladığımızda, MTX+CAT grubunda MDA seviyesinin anlamlı olarak azaldığını gördük. Elde ettiğimiz bu bulgular ile yeşil çay kateşinlerinin, MTX' in neden olduğu sistemik oksidatif hasarda lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki yaptığı sonucuna vardık.

Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler SOD, glutatyon- S-transferaz, (GPx), glutatyon redüktaz, KAT ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (98). SOD, vücutta ROS'un oluşturduğu hasara karşı hayati rol oynayan endojen antioksidan bir enzimdir. SOD enzimi süperoksit radikalini daha az reaktif bir ürün olan hidrojen peroksit'e dönüştürür (99). KAT ise SOD' un oluşturduğu H_2O_2 ' i peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar. Çetinkaya ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, sıçanlarda MTX kullanımı ile karaciğer dokusunda MDA düzeyinin arttığı, SOD ve KAT aktivitelerinin azaldığı,

tedavi olarak N-asetil sistein eklenmesi ile bunların normal düzeylere çekildiği belirlenmiştir (100). Yapılan bir diğer çalışmada Garipardıç ve arkadaşları, sıçanlarda MTX' in indüklediği özofageal hasar modelinde, MTX grubu ratlarda SOD ve KAT enzim aktivitelerinin anlamlı derecede düşük olduğunu saptamışlardır (101).

Yaptığımız bu çalışmada SOD ve KAT değerleri, MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış, MTX+CAT grubunda ise MTX grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır. Bulgularımız MTX'in lipid peroksidasyonu ve doku hasarına neden olarak MDA değerini artırdığını, buna paralel olarak SOD ve KAT değerlerini düşürdüğünü; yeşil çay kateşinlerinin ise muhtemelen lipid peroksidasyonunu ve MDA değerlerini azaltarak, SOD ve KAT gibi antioksidatif enzimleri artırarak koruyucu etki yaptığını göstermektedir.

Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalar flavanoidlerin kardiyovasküler, serebrovasküler ve kanser hastalıklarında azalma meydana getirdiğini göstermektedir (102-104). Flavanoidlerden olan kateşinin yeşil çay, siyah çay ve diğer besinlerde bulunduğu ve birçok fizyolojik fonksiyona sahip olduğu rapor edilmiştir (105). Flavanoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, demir ve bakır şelasyonu, α -tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatör, immünstimülan, antiallerjik, antiviral etkileri de söz konusudur (106). Lotito ve Fraga kateşinin kan plazmasında antioksidan olarak etkili olduğu, endojen lipid çözünürlüğünü geciktirdiği ve lipid oksidasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (107). Biz de yaptığımız bu çalışma ile histolojik ve biyokimyasal verilerden yola çıkarak kateşinlerin MTX kaynaklı testis hasarına karşı antioksidan ve antiapoptotik özellikleri olduğunu belirledik.

Bu araştırma sonucunda elde ettiğimiz bulgular, MTX' in testis fonksiyonunu bozduğunu ve yeşil çay kateşinlerinin bu hasarı önlemede olumlu etki yaptığını göstermektedir. Bu konuda daha kesin sonuçların elde edilebilmesi için farklı doz ve zaman ayarlamaları ile daha ileri çalışmalar yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

8. SONUÇLAR

MTX' in sıçan testisi üzerine yeşil çay kateşinlerinin antioksidan ve antiapoptotik etkilerini incelediğimiz bu çalışmanın sonuçları şu şekildedir:

1. Kontrol grubuna kıyasla MTX grubunda spermatogonyumlar ile Sertoli hücreleri arasında açılma, seminifer epitelde vakuolizasyon, seminifer tübül lümenine dökülen immatür germ hücresi sayısında artış, seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığında azalma görüldü.
2. MTX+CAT grubunda MTX grubuna kıyasla spermatogonyumlar ile Sertoli hücreleri arasındaki açılmanın, vakuolizasyonların görülme sıklığının ve lümene dökülen immatür germ hücresi sayısının azaldığı; seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığının ise arttığı belirlendi.
3. Testis dokusu ve kan plazmasında kontrol grubuna kıyasla MDA değerinin arttığı, SOD ve KAT değerlerinin ise azaldığı belirlendi.
4. Testis dokusu ve kan plazmasında MTX+CAT grubunda MTX grubuna kıyasla MDA değerinin azaldığı, SOD ve KAT değerlerinin ise arttığı görüldü

Sonuç olarak, elde edilen veriler MTX' in testis dokusu üzerinde oksidatif hasar oluşturduğunu, yeşil çay kateşinlerinin ise bu hasarın önlenmesinde etkili olduğunu göstermektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB (2008). Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. *Mutation Research* 655: 59-67.
2. Vardi N, Parlakpınar H, Ateş B, Cetin A, Otlı A (2009). Antiapoptotic and antioxidant effects of β -carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril* 92(6):2028-33.
3. Sener G, Demiralp EE, Cetiner M, Ercan F, Yegen BC (2006). B-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol* 542: 170-8.
4. Armagan A, Uzar E, Uz E, Yılmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoglu HR, Soyupek S, Cam H, Serel TA (2008). Caffeic acid phenyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Human & Experimental Toxicology* 27: 547-553.
5. Darvesh AS, Bishayee A (2013). Chemopreventive and therapeutic potential of tea polyphenols in hepatocellular cancer. *Nutrition and Cancer* 65 (3): 329-344.
6. Hong YH, Jung EY, Park Y, Shin KS, Kim TY, Yu KW, Chang UJ, Suh HJ (2013). Enzymatic improvement in the polyphenol extractability and antioxidant activity of green tea extracts. *Biosci Biotechnol Biochem* 77(1):22-9.
7. Lambert JD, Elias RJ (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys* 1;501(1):65-72.
8. Moore KL, Persaud TVN (2002). Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Altıncı Baskı. Çevirenler: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul; 323-330.
9. Sadler TW (1995). Langman's Medikal Embriyoloji. Onbirinci Baskı. Çeviren: Başaklar AC, Palme Yayıncılık, Ankara; 246-250.
10. Şeftalioğlu A. Genel & Özel İnsan Embriyolojisi. Üçüncü Baskı. Tıp ve Teknik Yayıncılık, Ankara; 346-380.

11. Aktümsek A (2001). Anatomi ve Fizyoloji (İnsan Biyolojisi). Birinci Baskı. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara; 433-444.
12. Cumhur M, Yener N, Tuncel M (2001). Fonksiyonel Anatomi. Birinci Baskı, Metu Press Yayınları, Ankara; 287-292.
13. Brooks JD (2002). Campbell's Urology. Sekizinci Baskı, WB saunders, Philadephia; 41-80.
14. Arıncı K, Elhan A (2006). Anatomi, 1. Cilt. Dördüncü Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara; 417-426.
15. Junquera CL, Carneiro J, Kelley RO (1998). Basic Histology: Temel Histoloji (Çev: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışalı B.) Barış kitabevi, Adapazarı; 407-419, 431-433.
16. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (2003). Robbins Temel Patoloji (Çev: Çevikbaş U.) Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul; 172-195.
17. Gartner LP, Hiatt JL (2001). Color Textbook of Histology. İkinci Baskı. WB Saunders Company, Philadelphia; 487- 508.
18. Erkoçak A (1990). Özel Histoloji Genital Sistem. İkinci baskı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara; 166-194.
19. Tekelioğlu M (2002). Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme. Birinci Baskı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara; 231-244.
20. Kierszenbaum AL (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş. (Çev: Demir R.) Palme Yayıncılık, Ankara; 532-564.
21. Ross MH, Pawlina W (2006). Histology- A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. Beşinci Baskı. Lippincott Williams & Wilkins, Philedelpdhia.
22. Henrikson RC, Kaye GI, Mazurkiewicz JE (1997). NMS Histology. Birinci Baskı. Lippincott Williams & Wilkins, Phiadelphia.
23. Guyton, AC, Hall JE (1996). The textbook of Medical Physiology Guyton & Hall. Dokuzuncu Baskı (Çev: Çağlayan B.). Nobel Kitapevleri, İstanbul; 432-567.
24. Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, Ilgaz C (2008). Genel Histoloji. Üçüncü Baskı. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara.

25. Özdamar S, Sorkun H (2002). Genel Embriyoloji. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Kayseri; 4-6.
26. Netter FH, Ovalle WK, Nahirney PC (2009). Temel Histoloji. (Çev: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P). Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara; 377-398.
27. Lowe JS, Alan SA (1997). Human Histology. İkinci Baskı. Mosby, Barcelona; 310-319.
28. Erbeni T. (1990). Histoloji. İkinci baskı. Güneş Kitabevi Yayınları, Ankara; 153-190.
29. Southorn PA, Powis G (1996). Free Radicals In Cell Biology Principles Of Medical Biology. Cell Chemistry and Physiology 4(II). Birinci Baskı. Elsevier Ltd: 349-377.
30. Simone F, Adrienne MG, Osamu H, Afshin S (2010). Cellular stress responses: Cell survival and cell death. International Journal of Cell Biology. Volume 2010: 23.
31. Samali A (2007). Apoptosis: a mapped path to cell death. Journal of Cellular and Molecular Medicine 11 (6): 1212-1213.
32. Akkus İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Türk Biyokimya Dergisi, İkinci baskı, Mimoza Yayınları, 1-60, Konya.
33. Aydılek N, Aksakal M (2003). Testosteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi, 14 :22-25.
34. Vincent HK, Taylor AG (2006). Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. Int J Obes 30: 400-18.
35. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease curiosity, cause, or consequence (1994). Lancet: 344: 721-5.
36. Schuyer M, Berns EM (1999). Is TP53 dysfunction required for BRCA1-associated carcinogenesis? Mol Cell Endocrinol 155: 143-152.
37. Uysal M (1998).. Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeli etkileyen koşullar. Klinik Gelişim; 11: 336–341.

38. Slater TF (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*; 222: 1-15.
39. Erdeve Ş, Dallar Y, Yılmaz F, et al (2007). Increased oxidative stress in obese children. *Journal of Ankara University Faculty of Medicine*; 60: 26-30.
40. Somuncu S, Cakmak M, Dikmen G, et al(2008). Ischemia-reperfusion injury of rabbit ovary and protective effect of trapidil. An experimental study. *Pediatr Surg Int* 24:315-318.
41. Qanungo S, Sen A, Mukherjea M (1999). Antioxidant status and lipid peroxidation in human feto-placental unit. *Clin Chim Acta* 285: 1-12.
42. Freeman BA, Crapo JD (1982). Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab. Invest* 4: 412-426.
43. Cros CE, Halliwell B, Borish E (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.* 107:526-45.
44. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*: 6(3-4):92-95.
45. Yanbeyi S (1999). Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, s 88.
46. Kohen R, Nyska A (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*: 30(6):620-50.
47. Gutteridge JM (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*: 41(12 Pt 2):1819-28.
48. Marzatico F, Cafe C (1993). Oxygen radicals and other toxic metabolites as key mediators of the central nerveous system tissue injury. *Functional Neurology* 8:51-66.
49. Erden M (1992). Serbest radikaller. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 12:201-7.

50. Cummings, MC, Winterford, CM, Walker NI (1997). Apoptosis, Am J Surg Pathol 21: 88-101.
51. Kiechle FL, Zhang X (2002). Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications, Clin Chim Acta 326: 27-45.
52. Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B (2003). Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system, Exp Biol Med (Maywood) 228: 995-1003.
53. Carmody RJ, Cotter TG (2001). Signalling apoptosis: a radical approach, Redox Rep 6: 77-90.
54. Brooks SA, Hannah LB, Kinch C, Nash G, Kıeda C (2009). Altered cell surface glycosylation function in mechanisms of cancer cell metastasis. Anadolu University Journal of Science and Technology 10 (1): 91-101.
55. Tomatır AG (2003). Apoptoz: Programlı hücre ölümü. T Klin Tıp Bilimleri 23: 499-508.
56. Şendur N, Karaman G, Şavk H, Şahinkarakaş E (2002). Akut metotreksat toksisitesinin erken belirtisi ; Deri Ülserleri. T Klin Tıp Bilimleri 22, 593-596.
57. Peter CA, Frank MB, Stacey B, Susan MB (2006), General Principles of Chemotherapy, Principles and Practice of Pediatric Oncology. Beşinci Baskı. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 318-322.
58. Totan M, Ak AR, Albayrak D (1999). Yüksek Doz Metotreksat Tedavisine Bağlı Karaciğer ve Böbrek Toksisitesi. T Klin J Pediatr 8: 185-188.
59. Kayaalp O (1998). Tıbbi Farmakoloji. Onuncu Baskı Hacettepe Taş Yayınları, Ankara; 388-393.
60. Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB (1998). Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. Semin Arthritis Rheum 27(5):277-292.
61. Goto E, Tomojiri S, Okamoto I (2001). Methotrexate poisoning with acute hepatorenal dysfunction. Clinical Toxicology 39, 101-104.

62. Higdon JV, Frei B (2003). Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43:89-143.
63. Shimizu M, Weinstein IB (2005). Modulation of signal transduction by tea catechins and related phytochemicals. *Mutat Res* 225: 147-160.
64. Gerhauser C (2005). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer* 41: 1941-1954.
65. Zaveri NT (2006). Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci* 78: 2073-2080.
66. Xuczaj W, Skrzydlewska E (2005). Antioxidative properties of black tea. *Prev Med* 40: 910-918.
67. Sutherland BA, Rahman RMA, Appleton I (2006). Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem* 17: 291-306.
68. Gramza A, Korczak J (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Sci Technol* 16: 351-358.
69. Chu KA, Wang CC, Chu CY, Rogers MS, Choy KW, Pang CP (2004). Determination of catechins and catechin gallates in tissues by liquid chromatography with coulometric array detection and selective solid phase extraction. *Journal of Chromatography B* 810: 187-195.
70. Satoh K, Sakamoto Y, Ogata A, Nagai F, Mikuriya H, Numazawa M, Yamada K, Aoki N (2002). Inhibition of aromatase activity by green tea extract catechins and their endocrinological effects of oral administration in rats. *Food and Chemical Toxicology* 40: 925-933.
71. Lin SD, Liu EH, Mau JL (2008). Effect of different brewing methods on antioxidant properties of steaming green tea. *LWT-Food and Technology* 41: 1616-1623.
72. Chengelis CP, Kirkpatrick JB, Regan KS, Radovsky AE, Beck MJ, Morita O, Tamaki Y, Suzuki H (2008). 28-day oral (gavage) toxicity studies of green tea

- catechins prepared for beverages in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 978-989.
73. Nwuha V, Nakajima M, Tong J, Ichikawa S (1999). Solubility study of green tea extracts in pure solvents and edible oils. *J Food Eng* 40: 161-165.
 74. Demir R, Yilmazer S, Öztürk M, Üstünel İ, Demir N, Korgun ET, Akkoyunlu G (2001). *Histolojik Boyama Teknikleri*. Palme Yayıncılık, Ankara, 9-10.
 75. Potten CS, 1996. What is an apoptotic index measuring? A commentary. *Br J Cancer* 74(11):1743-8.
 76. Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271.
 77. Yagi, K (1994). *Lipid peroxides a related radicals in clinical medicine free radicals in diagnostic medicine*, Plenum Press, New York, pp.1-15.
 78. Goth L (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. Feb 15;196(2-3):143-51.
 79. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34: 497.
 80. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
 81. Ohbayashi M, Suzuki M, Yashiro Y, Fukuwaka S, Yasuda M, Kohyama N, Kobayashi Y, Yamamoto T (2010). Induction of pulmonary fibrosis by methotrexate treatment in mice lung in vivo and in vitro. *J Toxicol Sci*. 35(5):653-61.
 82. Smith SW, Nelson LS (2008). Case files of the New York City poison control center: antidotal strategies for the management of methotrexate toxicity. *J Med Toxicol* 4(2):132-40.
 83. Kalantzis A, Marshman Z, Falconer DT, Morgan PR, Odell EW (2005). Oral effects of low-dose methotrexate treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100(1):52-62.

84. Bangert CA, Costner MI. Methotrexate in dermatology (2007). *Dermatol Ther* 20(4):216-28.
85. Tabassum H, Parvez S, Pahsa ST, Banerjee BD, Raisuddin S (2010). Protective effect of lipoic acid against methotrexate-induced oxidative stress in liver mitochondria. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 1973-1979.
86. Vardi N, Parlakpınar H, Ozturk F, Ates B, Gul M (2008). Potent protective effect of apricot and β -carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 46(9): 3015-3022.
87. Moghadam AR, Mohajeri D, Namvaran-Abbas-Abad A, Manafi H, Shahi D, Mazani M (2013). Protective effect of turmeric extract on methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress. *Chin J Nat Med*. 11(5):477-83.
88. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Otlu A (2013). The protective effects of *Prunus armeniaca* L (apricot) against methotrexate-induced oxidative damage and apoptosis in rat kidney. *J Physiol Biochem* 69(3):371-81.
89. Sekeroğlu ZA, Sekeroğlu V (2012). Effects of *Viscum album* L. extract and quercetin on methotrexate-induced cyto-genotoxicity in mouse bone-marrow cells. *Mutat Res* 4;746(1):56-9.
90. El-Boghdady NA (2011). Protective effect of ellagic acid and pumpkin seed oil against methotrexate-induced small intestine damage in rats. *Indian J Biochem Biophys* 48(6):380-7.
91. Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I (2004). Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 207(Pt 18):3221-31.
92. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84.
93. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 18(9):567-79.

94. Halliwell B (1989). Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions, *Acta Neurology Scandinavia* 126: 23-33.
95. Hemeida RAM, Mohafez OM (2008). Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst* 20(2): 141-148.
96. Devrim E, Cetin R, Kiliçoğlu B, Ergüder BI, Avcı A, Durak I (2005). Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Ren Fail* 27(6):771-3.
97. Ciralık H, Bulbuloglu E, Cetinkaya A, Kurutas EB, Celik M, Polat A (2006). Effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced small intestinal damage in rats. *Mt Sinai J Med* 73(8):1086-92.
98. Altan N, Dinçel AS, Koca C (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi (Turk J Biochem)* 31 (2); 51–56.
99. Johnson F, Giulivi C (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med* 26(4-5):340-52.
100. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B (2006). N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit.* 12(8):274-8.
101. Drapper HH, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421-31.
102. Hertog MGL, Holman PCH, Katan MB, Krombot D (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer* 20, 21-29.
103. Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 560–568.
104. Arts IC, Holman PC, Feskens EJ, Bueno MHB, Kromhout D (2001). Catechin Intake Might Explain The Inverse Relation Between Tea Consumption and Ischemic Heart Disease: The Zutphen Elderly Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 74(2), 227-232.

105. Kalender Y, Kaya S, Durak D, Uzun FG, Demir F (2012). Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. *Environ. Toxicol. Phar.* 33, 141-148.
106. Çimen MBY (1999). Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *T. Klin. Tıp Bilimleri*, 19: 296-304.
107. Lotito SB, Fraga CG (2000). Ascorbate protects (+)-catechin from oxidation both in a pure chemical system and human plasma. *Biol Res.* 33(2):151-7.

10. ETİK KURUL ONAYI

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



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

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

Çalışmanın Adı : "Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı *Camellia sinensis* (Yeşil Çay) Kateşinlerinin Antioksidan ve Antiapoptotik Etkisi"
Çalışmacılar : Prof.Dr.Engin YENİLMEZ, Yük.Lis.Öğr.Melih KILIÇ,
Prof.Dr.Münevver SÖKMEN, Doç.Dr.Ahmet ALVER, Doktora Öğr.Ahmet BODUR
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji ABD.

Etik Kurul
Dosya No
2013/ 35

Etik Kurul
Toplantı Tarihi
25.06.2013

Etik Kurul
Toplantı No
2013/11

Etik Kurul
Karar No
1

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN'ın başkanlığında; "Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı *Camellia sinensis* (Yeşil Çay) Kateşinlerinin Antioksidan ve Antiapoptotik Etkisi" başlığını taşıyan tez çalışmasının, Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (25.06.2013)

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

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : KILIÇ, Melih
Uyruğu : TC
Doğum tarihi ve yeri : İstanbul 11.03.1987
Medeni hali : Bekar
E-Posta : melihkili2@gmail.com
Yazışma adresi : 1 No' lu Beşirli Mah. Arka Sok.
Çimenyolu Sit. 48/6 C Blok D:7
Trabzon

EĞİTİM BİLGİLERİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Kartal Lisesi (YDA)	2005

YABANCI DİL: İngilizce