



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

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

***PRİMULA VULGARİS* L.'NİN SIÇANLARDA
METOTREKSAT KAYNAKLI TESTİS
HASARINA KARŞI ANTİOKSİDAN VE
ANTİAPOPTOTİK ETKİSİ**

Murat BERBER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2017

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Murat BERBER'in hazırladığı “*Primula Vulgaris* L.'nin Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Antioksidan Ve Antiapoptotik Etkisi” başlıklı tez Karadeniz Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ

Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU

Tarih: 31 /03/ 2017

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

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

.../.../2017

Murat BERBER

TEŐEKKÖR

Çalışmamın planlanması ve yürütölmesinde desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOğLU'na;

Örneğimin toplanması için her türlü desteği sağlayan Prof. Dr. Kamil COŐKUNÇELEBİ'ye;

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren çalışmalarımda bana desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Engin YENİLMEZ'e, Araç. Gör. Beyza AYAN'a, Araç. Gör. Nuriye KORKMAZ'a;

TYL-2015-5341 kodu ile desteklenmiş Bilimsel Araştırma Projesi ile maddi desteklerini esirgemeyen Karadeniz Teknik Ünivesitesine;

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

Murat BERBER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	x
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 (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	9
4.3.3.5. Spermatozoon	11
4.3.4. İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri	11
4.3.5. Kan-Testis Bariyeri	12
4.4. Epididimis	13
4.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem	13
4.5.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	13
4.5.2. Antioksidan Sistem	14
4.5.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	15
4.5.2.2. Katalaz (KAT)	15

4.6. Apoptoz	16
4.7. Metotreksat	16
4.7.1. Metotreksat'ın Endikasyonları	17
4.7.2. Metotreksat'ın Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri	17
4.8. <i>P. vulgaris</i> Hakkında Genel Bilgiler	18
4.9. Bitkilerin Tedavi Amaçlı Kullanılması	20
5. GEREÇ ve YÖNTEMLER	22
5.1. Deneysel Çalışma Aşaması	22
5.1.1. Deney Hayvanlarının Temini, Bakımı ve Barınması	22
5.1.2. Deneysel Çalışma Planı	23
5.1.3. <i>Primula vulgaris</i> 'in Sulu Ekstraktının Hazırlanması	23
5.2. Histolojik İşlemler	24
5.2.1. Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması	24
5.2.2. Sperm Sayısı, Motilite ve Vitalite	25
5.2.3. Doku Takibi	25
5.2.4. Kesitlerin Alınması	26
5.2.5. Kesitlerin Hematoksilen – Eozinle Boyanması	26
5.3. İmmünohistokimyasal İşlemler ve Analizler	27
5.3.1. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay) Boyama	27
5.4. Biyokimyasal İşlemler ve Analizler	28
5.4.1. Biyokimyasal Analizler İçin Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	28
5.4.2. MDA Tayini	29
5.4.2.1. Dokularda MDA Tayini	29
5.4.2.2. Plazmada MDA Tayini	30
5.4.3. Plazma ve Doku Katalaz Aktivitesi Tayin Yöntemi	30
5.4.4. Plazma ve Doku SOD Aktivitesi Tayin Yöntemi	31
5.4.5. Protein Tayini	31
5.5. İstatiksel Analiz	32
6. BULGULAR	33
6.1. Histolojik Bulgular	33
6.2. Biyokimyasal Bulgular	47

7. TARTIŞMA	49
8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	56
8.1. Sonuçlar	56
8.2. Öneriler	56
9. KAYNAKLAR	57
10. ETİK KURUL ONAYI	66
11. ÖZGEÇMİŞ	67



TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Çalışmada kullanılan gruplar ve gruplara uygulanan tedaviler	23
Tablo 2. Biyokimyasal analizler için kullanılan cihazlar	28
Tablo 3. Biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasallar	29
Tablo 4. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı	30
Tablo 5. Plazma MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı	30
Tablo 6. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı	31
Tablo 7. Protein tayini için kullanılan reaksiyon karışımı	31
Tablo 8. Grupların testis dokusunda; seminifer tübül çapı, epitel kalınlığı, lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı	33
Tablo 9. Gruplardaki deneklerin sperm sayısı, motilite ve vitalite değerleri	40
Tablo 10. Gruplardaki deneklerin Johnsen Skorlaması ve apoptotik indeksi (AI)	42
Tablo 11. Testis dokusundaki biyokimyasal sonuçlar	48
Tablo 12. Serumda biyokimyasal sonuçlar	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Süperoksit Dismutazın (SOD) reaksiyonu	15
Şekil 2. Katalazın (KAT) reaksiyonu	16
Şekil 3. Metotraksatın (MTX) kimyasal yapısı	16
Şekil 4. Seminifer tübül çapı bar grafiği	33
Şekil 5. Epitel kalınlığı bar grafiği	34
Şekil 6. Lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı bar grafiği	34
Şekil 7. Sperm sayısı bar grafiği.....	40
Şekil 8. Motilite bar grafiği	41
Şekil 9. Vitalite bar grafiği	41
Şekil 10. Johnsen Skorlama bar grafiği	43
Şekil 11. Apoptotik indeks (AI) bar grafiği.....	43

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. <i>Primula vulgaris</i> 'in genel görünüşü	19
Resim 2. Deneklerin barındırıldığı tip III kafesler	22
Resim 3. Testis Diseksiyonu a) Testisin çıkarılması, b) Testisin yağ ve epididimisten ayrılmış hali.....	24
Resim 4. Kontrol grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)	36
Resim 5. MTX grubuna ait testis dokusu (H&E, X400).....	37
Resim 6. MTX+ <i>P.vulgaris</i> grubuna ait testis dokusu (H&E, X400).....	38
Resim 7. <i>P.vulgaris</i> grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)	39
Resim 8. Kontrol grubu testis dokusunda apoptotik görüntüler (DAB, X400)	44
Resim 9. MTX grubu testis dokusunda apoptotik görüntüler (DAB, X400).....	45
Resim 10. MTX+ <i>P. vulgaris</i> grubu testis dokusunda apoptotik görüntüler (DAB, X400)	46
Resim 11. <i>P. vulgaris</i> grubu testis dokusunda apoptotik görüntüler (DAB, X400)	47

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ**Kısaltmalar**

ABD	: Ana Bilim Dalı
AI	: Apoptotik İndeks
AICAR	: 5-amino-imidazol-4-karboksamid ribonukleotid transformilaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
ATPaz	: Adenozin Trifosfataz
BSA	: Bovine Serum Albumin
DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dUPT	: Deoxyuridine Triphosphate
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GSH	: Glutatyon
H&E	: Hematoksilen- Eozin
HPLC	: High-perfonmance Liquid Chromatography (Ters faz- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi- Ultra viyole)
i.p.	: İntraperitoneal (Periton İçi)
KAT	: Katalaz
KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
mM	: Milimolar
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µmol	: Mikromol
MTX	: Metotreksat
NBT	: Nitroblue tetrazolium
nm	: Nanometre

nmol	: Nanomol
PAS	: Periyodid Asit Schiff
PBS	: Phosphate Buffer Solution
pH	: Hidojen Gücü
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SF	: Serum Fizyolojik
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
STRY	: Y Geni Üzerindeki Cinsiyet Belirleyici Bölge
STAC	: Statistical Tests for Algorithms Comparison
TBA	: Tiyoarbitürük asit
t-BHP	: Tert-Butil Hiperoksit
TDF	: Testis Belirleyen Faktör
TdT	: Terminal deoxynucleotidyl transferase
Tris- HCl	: Tris Hidroklorid
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Deoxyuridine Triphosphate (dUTP) Nick End Labeling

U : Ünite

Simgeler

α	: Alfa
β	: Beta
%	: Yüzde

Formüller

CH₃COOH	: Asetik asit
CuCl₂	: Bakır klorür
FH₂Glu_n	: Dihidrofolatpoliglutamat
FH₄	: Tetrahidrofolik Asit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H₃PO₄	: Fosforik asit

HCl	: Hidroklorik asit
OH[·]	: Hidroksil Radikali
HO₂[·]	: Perhidroksil Radikali
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat dihidrat
O₂⁻	: Süperoksit Radikali



1. ÖZET

***Primula vulgaris* L.'nin Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Antioksidan ve Antiapoptotik Etkisi**

Bu çalışma, metotreksat (MTX) ile oluşturulmuş testis hasarına karşı *Primula vulgaris* L. (çuha çiçeği) ekstraktının antioksidan ve antiapoptotik etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı. Çalışmada 250-300 g, 32 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Her grupta 8 adet sıçan olacak şekilde 4 grup (kontrol, MTX, MTX + *P. vulgaris* ve *P. vulgaris*) oluşturuldu. Kontrol grubu sıçanlara bu süre içerisinde sadece 0.8 mg/kg serum fizyolojik gavaj yoluyla verildi. MTX grubu sıçanlara sadece çalışmanın ilk günü tek doz 30 mg/kg MTX intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. MTX + *P. vulgaris* grubu sıçanlara çalışmanın ilk günü tek doz 30 mg/kg MTX uygulandı ve daha sonra ilk günden başlayarak 7 gün boyunca 100 mg/kg sulu ekstrakt gavaj yoluyla verildi. *P. vulgaris* grubu sıçanlara 7 gün boyunca 100 mg/kg sulu ekstrakt gavaj yoluyla verildi. 8. gün anestezi altında sıçanların testisleri ve epididimisleri çıkarıldı, kanları alındı ve kansızlaştırma yöntemi ile ötanazi yapıldı. Çıkarılan testisler ikiye bölünerek, testisin bir yarısı ve epididimis örnekleri histolojik işlemler için, testisin diğer yarısı ve alınan kan örneği ise biyokimyasal analizler için kullanıldı. MTX grubunda kontrol grubuna göre seminifer tübül çapı, epitel kalınlığı, sperm sayısı, motilite, vitalite ve Johnsen skorum değerlerinin azaldığı; lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı ve apoptotik indeksin arttığı (AI) belirlendi. MTX + *P.vulgaris* grubunda MTX grubuna göre seminifer tübül çapı, epitel kalınlığı, sperm sayısı, motilite, vitalite ve Johnsen skorum değerlerinin arttığı; lümenine immatür hücre dökülen seminifer tübül sayısı ve AI'nın azaldığı belirlendi. Biyokimyasal analizler sonucunda kan plazmasında ve testis dokusunda kontrol grubuna kıyasla MTX grubunda malondialdehit (MDA) değerinin arttığı, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) değerlerinin ise azaldığı bulundu. MTX grubuna kıyasla MTX + *P.vulgaris* grubunda ise MDA değerinin azaldığı, SOD ve KAT değerlerinin arttığı bulundu. Tüm bu işlemler sonucunda MTX'in testiste oksidatif stres oluşturarak testise zarar verdiği, *Primula vulgaris*'in antioksidan etkileri ise bu hasarı azalttığı belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Apoptotik indeks, epididimis, katalaz, oksidatif stres, süperoksit dismutaz

2. SUMMARY

Antiapoptotic and Antioxidant Effects of *Primula vulgaris* L. Against Methotrexate-Induced Testicular Damage In Rats

In this study, antioxidant and antiapoptotic effects of *P. vulgaris* against MTX-induced testicular injury were investigated. 32 Sprague-Dawley male rats 250-300 g bw. were used 4 groups (control, MTX, MTX + *P. vulgaris* and *P.vulgaris*) each including 8 rats were constructed. The control group rats were given only 0.8mg/kg physiological saline by gavage for 7 days. The MTX group rats were applied a single dose 30mg/kg MTX on the first day. The MTX + *P.vulgaris* group rats applied a single dose (30mg/kg) MTX on the first day and this group were given 100mg/kg liquid extract by gavage for 7 days starting from the first day. *P.vulgaris* group rats were given 100 mg/kg by gavage for 7 days. On Day 8, testicles and epididymides of rats were removed under anesthesia, blood samples were taken and rats were euthanized by exsanguination. The removed testicles were divided in two part where one part from each testicle was used for histological procedures and the other part of half testicle for biochemical analyses with blood samples. The removed epididymides were used for evaluating sperm count, motility and vitality. It was determined that with respect to control group; the seminiferous tubule diameter, epithelial thickness, sperm count, motility, vitality and Johnsen score were lower and apoptotic index as well as seminiferous tubule number that immature germ cells fell into its lumen were higher in MTX group. It was also determined that with respect to MTX group; seminiferous tubule diameter, epithelial thickness, sperm count, motility, vitality and Johnsen score were higher and as well as seminiferous tubule number that immature germ cells fell into its lumen were lower in MTX + *P. vulgaris* group. After biochemical analyses; MDA was found to be higher, SOD and CAT were found to be lower in both blood plasmas and testicular tissues in MTX group with respect to control group. After given practices; it was concluded that MTX injured testicles by creating oxidative stress and *Primula vulgaris* reduced the injury by its antioxidant effects.

Key words: Apoptotic index, epididymis, catalase, oxidative stress, superoxide dismutase

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, tüm dünyada ölüm nedenleri arasında önde gelen hastalıklardan birisidir. Kanser insidansı Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde daha belirgin olmak üzere tüm dünyada giderek artmaktadır (1). Kanserle mücadele konusunda özellikle önleme ve tarama çalışmalarının doğru bir şekilde yürütülmesi gerekmektedir (2).

Kemoterapi, kanser tedavisi için etkili bir yöntem olmasına karşın kullanılan ilaçlar yüksek proliferasyona sahip dokularda akut toksik yan etkilere sebebiyet verebilmektedir (3). Özellikle testisin germinatif epiteli, bağırsak ve ağız mukoza epiteli, kıl folikülü hücreleri bu toksisiteden etkilenmektedir. Kemoterapide kullanılan ilaçlardan MTX'in testis epiteline antioksidan ve antiapoptotik etkilerinin *in vivo* olarak araştırılması amaçlanmaktadır.

Antineoplastik bir ilaç olan MTX'in tek doz olarak kullanılmasıyla bile testislerde oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Testislerin germinal epitel hücrelerinin, sitotoksik kemoterapötiklere karşı duyarlılığının fazla olması nedeniyle deneyimizde testis hasarının oluşturulmasında MTX'in kullanılması tercih edilmiştir.

P. vulgaris ekstraktının zengin antioksidan yapıya sahip olduğunu gösteren çalışmaya dayanılarak kanser tedavisinde kullanılan MTX'in testis dokusunda oluşturduğu hasarlar üzerine *P. vulgaris* ekstraktının koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır (4).

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Testis Embriyolojisi

Döllenme sırasında embriyonun cinsiyeti belli olsa da morfolojik özellikler ancak 7. haftada oluşmaya başlar. Erken dönemde genital sistem her iki cinsde de benzerlik gösterir. Genital sistemin bu aşaması bundan dolayı “seksüel gelişimin farklılaşmamış safhası”, gonadlara da “farklılaşmamış gonadlar” adı verilir (5, 6).

Gonadlar mezodermal epitel, embriyonik bağ dokusu ve primordial germ hücrelerinden meydana gelirler.

Gonadal gelişimin ilk safhaları ancak beşinci haftada ortaya çıkmaya başlar. Mezonefrozun medialinde, mezotelin altındaki mezenşimin çoğalmasıyla bir kabarıklık oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar (primer seks kordonları) kısa sürede mezenşim içerisine doğru büyürler. Farklılaşmamış gonad bir korteks ve bir medulladan oluşmaktadır. Embriyo, XX seks kromozom kompleksine sahipse, farklılaşmamış gonadın korteksi ovaryuma farklılaşır ve medullası geriler. Eğer XY seks kromozom kompleksine sahipse, medulla testise farklılaşır ve korteks geriler, dejenere olur (5).

İnsan embriyosunda gelişimin ilk dönemlerinde, yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endodermal hücreler arasında primordial germ hücreleri belirir. Beşinci haftanın başında son bağırsağın mezenterinin dorsali istikametince ilerleyerek gonadal kabartılara ulaşır. Altıncı haftada gonadal kordonlara dahil olurlar. Primordial hücrelerin indükleyici etkisi gonadların ovaryum veya testise farklılaşmasında önemli rol oynar (6).

Cinsiyet, sekonder oositi dölleyen spermatazoonun X ve Y cinsiyet kromozomu tarafından belirlenir. Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki cinsiyet belirleyen bölgede testis belirleyen faktör (Testis Determining Factor = TDF) geni bulunur. Bu TDF geni, ilkel cinsiyet kordonundaki hücrelerde sentezlendiğinde taslak gonadlar, testislere dönüşür. Genital boşaltma yolları ve dış genital organların cinsiyete göre farklılaşmasını mevcut gonad tipi belirler (7).

Testisler, seks kromozom kompleksinde bir Y kromozomu taşıyan embriyolarda gelişmektedirler. Testislerin gelişimi, koordineli olarak bir seri genin indüksiyonu ile sağlanmaktadır. TDF için SRY geni (Sex Determining Region of the Y chromosome)

farklılaşmamış gonadın testise dönüşümünde önemli rol oynamaktadır. TDF, primer seks kordonlarını [seminifer (testiküler) kordonlar] uyararak, kordonların farklılaşmamış gonadın medulla derinliklerine doğru uzamasını sağlar. Kordonlar burada dallanıp ağırsı bir yapı oluşturarak rete testis oluşumunu sağlarlar. Seks kordonlarının tunika albuginea geliştikten sonra yüzey epiteli ile bağlantıları kaybolur. Genişleyen testis, gittikçe dejenere olan mezonefroz'dan ayrılır. Kendi mezenteri olan mesorchium ile asılı hale geçerken seminifer kordonlar; seminifer tübüllere, tübülü rekti ve rete testise farklılaşır (5).

4.2. Testis Anatomisi

Her bir testis yaklaşık olarak 10-15 g ağırlığında, 4.5-5 cm boyunda ve 2.5 cm çapındadır. Testisler skrotum adı verilen torba içerisinde bulunmaktadır. Spermi üreten testisler gerekli sıcaklık vücut ısısından 2-3 °C düşük olup optimum sıcaklık 34 °C' dir. (8). Skrotum sıcakta sarkarak ve soğukta büzülerek testislerin optimum sıcaklıkta kalmasını sağlar. Bu hareketleri skrotumda bulunan kremaster kası gerçekleştirir. Testis ısısının korunmasında ayrıca ter bezlerinin de önemi vardır.

Testislerden her biri 800-1000 kadar seminifer tübülünden oluşmaktadır. Her bir tübül yaklaşık olarak 80 cm civarındadır ve testis içerisinde kıvrılmış yapıda bulunmaktadır. Bu tübüller spermin üretildiği yerdir. Tübüllerin genellikle 1-3 tanesi, sayısı yaklaşık 200-300 arasında değişen lobül (lobcuk) içerisinde bulunur. Testis dıştan içe doğru olmak üzere tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vaskulosa kılıfları ile çevrilidir. Tunika albuginea'nın iç yüzüne yerleşmiş olan tunika vaskulosa bir damar ağı tabakası olup testisin içerisindeki tüm lobuli testisi sarar.

Seminifer tübüllerin duvarları, spermatojenik hücreler ve destek (sertoli) hücreleri içeren germinal doku ile kaplıdır. Spermatojenik hücreler; spermatogonia, spermatosit ve spermatitlerdir. Destek hücreleri ise germinal spermin olgunlaşmasını sağlayan besleyici hücrelerden meydana gelmiştir. Bu sertoli hücreleri ayrıca androjen bağlayıcı protein ve inhibin hormonu salgılar. İnhibin, hipofizden fazla FSH'ın salgılanmasını önler ve kontrol altında tutar.

Seminifer tübüllerin arasında leydig hücreleri denen androjenleri salgılayan endokrin faaliyet gösteren hücreler bulunur. Testosteron androjenlerin en önemlisidir.

Testislerin skrotuma inişleri doğumdan 3-4 hafta önce gerçekleşir. Bazı nedenlerle genellikle sağ testisler inguinal kanalda kalarak testisin skrotuma inişi gerçekleşmez. Bu duruma kriptorşidizm adı verilir. Abdominal boşlukta kalan testisler sperm üretme kabiliyetini kaybeder. Bunun önemli nedenlerinden birisi spermilerin üretimi için gerekenin üzerindeki ısıdır. 2 yaşına kadar uygulanan operasyonlar kısırlığı engeller. Operasyon 5. yaştan sonraya kalırsa spermatogenez zarar görür.

4.3. Testis Histolojisi

Testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penis erkek üreme sistemini oluşturur. Testisin başlıca görevleri hormon ve spermatozoon üretmektir. Testiste üretilen başlıca hormon testosterondur. Bununla birlikte erkek fizyolojisi için hem testosteron hem de metaboliti dihidrotestosteron gereklidir. Embriyo ve fetüsün gelişimi sırasında cinsel farklılaşma ve gonadotropin salgısının kontrolü için testosteron spermatogenez önemlidir. Ergenlik ve erişkinlik çağlarında dihidrotestosteron pek çok doku ve organ üzerinde etkilidir.

Testislerin çevrili bulunduğu tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Burada septumlar bezi yaklaşık 250 adet testiküler lobüle ayırırlar. Her lobülde 1-4 seminifer tübül bulunur. Seminifer tübülü saran bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve interstiyel hücreler (leyding hücreleri) içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretir. İntertisyel hücreler ise testiküler androjenleri salgılar (9).

4.3.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübül 150-250 µm çapında ve açılmış hali 30-70 cm uzunluğundadır. Bir testiste bulunan tübüllerin toplam uzunluğu 250 m civarındadır (10). Seminifer tübülü saran fibröz tunika propria fibroblast katmanlardan oluşmuştur. En içte bulunan katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılanmış miyoid hücreler içerir.

Seminifer epiteli oluşturan iki tip hücre vardır. Bunlar destek (sertoli) hücreleri ile spermatogenezdeki seriyi oluşturan hücrelerdir. Spermatogenik hücreler 4 – 8 tabaka halinde düzenlenmiştir (11).

4.3.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri saran uzamış piramidal hücrelerdir. Bu hücrelerin tabanları bazal laminaya tutunurlar. Sertoli hücrelerin apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır (10). Hücre yan yüz zarları karmaşık şekilde içe doğru katlanmalar oluşturur. Lümeneye bakan apikal hücre membranları da oldukça katlanmalı yapıda olup seminifer lümen içine çıkıntılar yapar. Sertoli hücreleri bazalde yerleşik, açık renk ve bir iki çentikli oval heterokromatik çekirdek ile merkezi yerleşimli büyük bir çekirdeğe sahiptirler (12, 13).

Sertoli hücreleri puberteye değin seminifer epitelin baskın hücre tipindeyken, puberteden sonra seminifer tübül epitelindeki hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Spermatogenik hücre topluluğu azaldığında, Sertoli hücreleri yeniden epitelin baskın hücresi olur (14).

Mikrotübüller ve ara filamentlerden oluşan gelişmiş bir hücre iskeleti bulunan sitoplazmada, az sayıda granüllü endoplazmik retikulum, çok sayıda granülsüz endoplazmik retikulum, bol miktarda mitokondri, iyi gelişmiş golgi kompleksi, lipid damlacıkları, lipofuskin içeren lizozomlar ve glikojen granülleri bulunur (15, 16).

Sertoli hücrelerinin dört önemli fonksiyonu vardır:

- **Spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesi:** Spermatogenik hücreler besin maddelerinin ve metabolitlerin alıp verilmesinde Sertoli hücrelerinin aracılığına muhtaçtırlar.
- **Fagozitoz:** Spermiyogenez esnasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde dökülür. Bu sitoplazmik parçacıklar fagosite edilirken Sertoli hücre lizozomları tarafından yıkılırlar (10).
- **Sekresyon:** Seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm taşınımı için kullanılan sıvıyı Sertoli hücreleri salgılamaktadırlar. Androjen bağlayıcı protein sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından folikül protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testesteronun yoğunlaşmasını sağlamaktır. Sertoli hücreleri, testesteronu östradiyol haline çevirebilmektedirler. Bu hücreler aynı zamanda, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen 'inhibin' adı verilen bir peptid salgılamaktadırlar (9).

- **Anti-Müllerian Hormon Üretimi:** Bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Müllerian-inhibe edici hormon olarak da isimlendirilir. Testosteron ise Wolf kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlar (17).

4.3.3. Spermatogenik Hücreler (Germ Hücreleri)

Bu hücreler Sertoli hücreleri ile birlikte seminifer tübül epitelini oluşturan, düzenli olarak çoğalarak olgun spermatazoonlara farklılaşan hücrelerdir (11, 18, 19). Hücreler seminifer tübüllerde, lümen ile bazal lamina arasında yerleşmiş 4-8 hücre katı oluşturan ve gelişmekte olan hücre serilerini içerir. Bunlar çoğalıp farklılaşan ve olgun germ hücreleri olan spermatazoonların oluşmasını sağlayan farklı dönemlerdeki hücreleri temsil ederler (20). Bu hücreler, bazaldan lümene doğru spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermazoon olarak sıralanır (14, 15).

4.3.3.1. Spermatogonyum

Bazal kompartmanda bazal lamina ile direkt ilişkide olan diploid hücrelerdir (14). Yaklaşık 12 µm çapında olup yuvarlağımsı şekle sahiptirler. Çekirdekleri irili, ufaklı kromatin tanecikleri ve bir çekirdekçik içerir (21). Spermatogonyumlar spermatogonyal kök hücreden köken alırlar ve pubertede başlayan mitotik bölünmeler geçirirler. Sertoli hücreleri arasındaki tıkalı bağlantıların altında yer aldıklarından kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar (14).

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

Tip A koyu Spermatogonyumlar: Küçük ve kubbe şeklinde olup 12 µm çapındadır. Çekirdekleri oval ve heterokromatiktir. Seminifer epitelin kök hücreleridir. Depo hücreleri olup hücre döngüsüne girmezler. Mitozla bölünerek yeni koyu ve A tipi açık spermatogonyumları yaparlar (11).

Tip A açık Spermatogonyumlar: Oval şekilli olup, çekirdekleri ökromatiktir ve açık boyanır. Nükleus çok belirgindir. Testesteron 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 (11, 15).

Tip B Spermatogonyumlar: Çekirdekçik merkezi yerleşimli ve büyük yoğunlaşmış kümeler oluşturan kromatin oluşturan çekirdeğe sahip hücrelerdir. B tipi spermatogonyumlar, primer spermatositleri oluştururlar (15).

4.3.3.2. Primer Spermatosit

Veziküler görünümlü 18 µm büyüklüğünde belirgin bir çekirdek içerirler (9). Spermatogenik serinin en büyük hücreleridir. Başlangıçta 46 kromozom ve 2n DNA'ya sahip olan primer spermatositler kısa sürede I. mayoz bölünmenin profaz evresine girerler ve DNA'larını 4n'e çıkarırlar (9, 15).

4.3.3.3. Sekonder Spermatosit

I. mayoz bölünme tamamlandıktan hemen sonra oluşan sekonder spermatositler küçük hücrelerdir ve yeniden DNA eşleşmesi olmadan doğrudan II. mayoz bölünmeye girdiklerinden, seminifer epitelde sık izlenemezler. Yaşam süreleri ortalama 8 saattir. Kromatitleri, bölünme sonunda ayrılarak her biri bir spermatide gider ve n kromozomlu 4 adet spermatid oluşur (9, 14, 22).

4.3.3.4. Spermatid

Yaklaşık 8 µm çapında, küçük ve yuvarlak hücreleri olan spermatidlerin sitoplazmalarında mitokondriler, çekirdeğin yakınında yer alan iyi gelişmiş Golgi kompleksi, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar, granülsüz ve granüllü endoplazmik retikulum tübülleri içerirler (9, 11). Seminifer tübüllerde, lümen yakınında ve adluminal bölmede yerleşmişlerdir (9, 15, 22). Spermatozoonlara dönüşme süreci boyunca spermatidler, bol hidrolitik enzim depolar, sitoplazmalarının bir kısmı atılır ve organellerini azaltırlar. Flagellum ve ilgili yapılar şekillenir (11). Sertoli hücrelerinin girintileri arasına gömülen spermatidler lümene doğru yol alırken, uzarlar ve spermiyogenezis adı verilen bölünmenin gerçekleşmediği karmaşık bir olgunlaşma işleminden geçerler.

Spermiyogeneziste hareketsiz spermatidlerin uzayarak, hareketli spermatozoonlara dönüştüğü sıralı değişimler dört aşamada gerçekleşir (21):

1. Golgi Evresi: Golgi kompleksi lamelleri ile vezikülleri bir kutuplaşma gösterir ve spermatidde anterior kutup oluşur. Golgi bölgesinde proakrozom granüllerinin birikmeye başlayıp, akrozom granülünü oluşturması

farklılaşmanın ilk belirtileridir. Golgi membranlarında gelişen akrozomal kese, içindeki glikoproteinden zengin içeriği nedeniyle PAS (Periyodid Asit Schiff) pozitif olarak belirir. Akrozomal kesenin membranı dış nükleus membranı ile birleşir. 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: Akrozomal kesedeki sıvı Golgi kompleksinin yer değiştirmesi ile resorbsiyona uğrar ve kese yassılaşır; nükleus üzerine yapışıp, başlık gibi oturur. Bu dönemde kromatin yoğunlaşır, yassılaşmaya ve uzamaya başlar; hücre membranına yaklaşır ve spermiumun baş oluşumu ilerler. Hücrede kuyruk oluşumunun ilerlediği bölgeye doğru sitoplazma birikir (23).
3. Akrozomal Evre: Nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde akrozomal vezikül ve granül yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom hidrolitik enzimler (hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi) içerir. Akrozomal faz sırasında spermin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına doğru yönelir. Ayrıca nükleus uzayıp daha yoğun bir hale gelir. Sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellum oluşturur. Mitokondriler flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış spermatozoonların hareketlerinin kaynağını aldığı bölgeyi oluştururlar. Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkinleşmesi sonucunda oluşur (9).
4. Olgunlaşma (Matürasyon) Evresi: Sertoli hücresi spermatozoon farklılaşması tamamlandığında, sitoplazmasında yerleşmiş olduğu girintiden ayrılır. 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 (23).

4.3.3.5. Spermatozoon

Spermatozoon 65 μm uzunluğunda oldukça uzun bir hücredir (23). Uzun bir kuyruk ve çekirdek ve akrozomu içeren baş olmak üzere iki bölümden oluşur. Boyun, orta parça, esas parça ve son parça kuyruğu içerir (15).

- a) Baş: İnsanda, baş uzun eksenini boyunca 7 μm olan yassılaştırmış armut şeklini andırır. Baş bölgesi neredeyse tamamen nükleustan oluşur. Yoğun kromatin yapısı içindeki kromatinden fakir aydınlık bölgeler “nükleus vakuolleri” diye bilinir (23). Akrozom ve onunla sarılmış çekirdek başı oluşturur. Akrozom, proteaz, asit fosfataz, hyaluronidaz, akrosin, nöraminidaz gibi lizozomlarda bulunan hidrolitik enzimleri içerir (11, 14). Bu özellik, fertilizasyon esnasında spermiun başının, korona raditayı kolayca aşır, zona pellusidayı eriterek ovuma ulaşmasında önemlidir (13).
- b) Kuyruk: Orta parça, esas parça, boyun ve son parça olmak üzere dört bölümden oluşur (11, 15). Baş ile kuyruk segmentlerini birleştiren boyun bölgesi kısa bir bölge olup sentriolleri içermektedir. Sentriollerden biri, flagellumun aksonemasını yapar. Aksonema, 9+2 formülüne uyan çift mikrotübülüsler taşır. Aksonema, boyunda fibröz bir halka oluşturup, etrafında sitoplazma örtüsü bulunur. Başın uzunluğuna yakın ölçüde olan orta parçada flagellum aksoneması dışında longitudinal 9 kalın fibril demeti yer alır. Bunun dışında da spiral sıralanmış mitokondri topluluğu bulunur (23). Esas parça kuyruğun en uzun parçası olup 45 μm 'dir. Annulus adı verilen mitokondri sarmalının son bölümünün altında yoğun bir halka olan son halkadan başlar, mitokondri sarmalı içermez. Yedi dış kalın lifle sarılı, aksonem ve bunları çevreleyen fibröz bir kılıf esas parçayı oluşturur (11, 14). Son parça, aksonemadan oluşan kısa bir sonlanma halinde gözlenir (23).

4.3.4. İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri

Sinirler, bağ dokusu elemanları, kan ve lenfatik damarlar testisin seminifer tübülleri arasındaki boşlukları doldurmuştur. İnterstisyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun şebeke, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır. Fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar gibi çeşitli tipteki hücreler bağ dokusunu

oluşturur. Puberte sırasında ek bir hücre tipi belirgin hale gelir. Bu hücre yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir nükleusu ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan bir hücredir. Bu hücreler testisin interstisyel ya da Leydig hücreleri olup steroid salgılayan hücre özelliği gösterir (9).

Leydig hücreleri steroid salgı yapan hücrelerin genel yapısal özelliklerini gösterirler ve eozinofilik sitoplazmalarında tübüler kristal mitokondriler, bol granülsüz endoplazmik retikulum tübülüsleri, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, lizozomlar ve çok sayıda lipid damlacıkları bulunur (9, 11, 18).

Leydig hücrelerinde en fazla granülsüz endoplazmik retikulum bulunur. Bu hücrelerdeki organellerin ve inklüzyonların çoğu testosteron sentesini ve salgısını düzenler. Testosteron kolesterolden türer. Kolesterol ya dolaşımdaki düşük yoğunluklu lipoprotein moleküllerinden türemekte ya da doğrudan granülsüz endoplazmik retikulum zarlarında sentezlenmektedir. Kolesterol zarla sarılı olmayan lipid damlacıklarında gerektiğinde kullanılmak üzere depolanır. Taşıyıcı proteinler kolesterolü mitokondrinin iç zarına aktardıktan sonra mitokondriler luteinizan hormonun etkisiyle kolesterolü pregnanolona çevirir. Granülsüz endoplazmik retikuluma sentezlenen pregnalonon mitokondri zarından aktarılır. Pregnanolon üzerinde granülsüz endoplazmik retikulum üzerindeki enzimler çeşitli değişiklikler gerçekleştirerek bunu testesterona çevirirler. Sentezlenen testesteron hücre zarından difüzyonla geçer. Testesteron hücre dışına salındıktan sonra dolaşıma geçerek hızla dolaşımdaki steroid bağlayıcı proteinlere bağlanır (21).

4.3.5. Kan-Testis Bariyeri

Testiküler sıvı içine kandan çok az maddenin geçmesinin nedeni kan ile seminifer tübüllerin iç bölgesi arasında bir bariyer bulunmasıdır. Bu bariyer erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önemlidir. Ayrıca bu bariyer Sertoli hücrelerinin arasındaki tıkaçıcı bağlantılar ile oluşturulur (9).

Kan-testis bariyerinde peritübüler miyoid hücreler ve Sertoli hücreler olmak üzere iki hücre grubu bulunur. Sertoli hücreleri ve bunların aralarında yaptıkları özelleşmiş bağlantı birimleri bariyerin oluşturulmasında yapısal olarak esas öneme sahiptir. Sıkı bağlantı birimleri epitelyum hücreleri arasında vücudun en sıkı bölgelerini oluştururlar.

4.4. Epididimis

Çok sayıda ductuli efferentes kanallarının tek kanal halinde toplanıp kıvrıntılı bir kanal halindeki devamı epididimisi oluşturur. Ductus epididimis, 5-7 metre uzunluğunda düzleştirilmiş ve kıvrıntılı toplu halde 5 cm'lik bir uzunluk içine yerleşmiştir (23). Epididimis bir baş, bir gövde ve kuyruk bölgesi olmak üzere üç bölümden oluşup; embriyoda mezonefroza türer (21, 23). Ductuli efferenteslerin sıkıca bağlandığı bölüm baş parçasını oluşturur. Baş bölümünde sap şeklinde bir uzantıya sahip kistik bir yapı olan apendiks epididimis yer alır ve erkeklerin %25'inde bulunur (21). Epididimisin her üç kısmında kanal çevresini saran bağ dokusu ve kan damarları bulunur (18).

Kök hücreler epididimisin kanalının duvarında; apikal bölümde lümene kadar uzanan uzun, hareketsiz stereosilyaya sahip yüksek prizmatik hücreleri barındıran çok yüksek yalancı çok katlı epitelyum bulunur (21).

Epididimisin baş bölgesinde epitelyum kalınlığı daha uzun, kuyruk bölgesinde ise 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. Epididimis kanalı boyunca spermin taşınmasını kolaylaştırmak için kas tabakası peristaltik hareketler yapar (14).

Epididimisin üç ana görevi vardır:

1. Spermatozoonların ejakülasyona kadar depolanması,
2. Spermatozoonların depolanma bölgesi olan epididim kuyruğuna doğru peristaltik hareketlerle taşınması,
3. Spermatozoonların olgunlaşması: baş bölgedeki spermatozoonlar dölleyebilme yeteneğine sahiptir. Olgunlaşma şu şekildedir: yoğunlaşmış kromatinin sabitlenmesi, plazma membranının yüzey yükündeki değişiklikler, spermatozoon tarafından yeni yüzey proteinlerin kazanılması.

4.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

4.5.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikal; bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren yüksek reaktiviteli molekül veya gruplara denir (24). Stabil halde olan atom ya da moleküle bir

elektron eklenir ya da çıkarılırsa reaktif hale gelmektedir (19, 25). Radikallerle reaksiyona giren moleküller de reaktif hale gelmektedir. Bir antioksidan sistem müdahale edinceye kadar bir radikalın diğer moleküllerle etkileşmesi zincirleme reaksiyon şeklinde devam etmektedir (26, 27).

Serbest oksijen radikalleri; Hidrojen Peroksit (H_2O_2), Süperoksit Radikali (O_2^-), Hidroksil Radikali ($HO^\cdot$), Perhidroksil Radikali ($HO_2^\cdot$) gibi oksijen türevleri sayılabilir. Serbest radikallerin metabolizmanın normal işleyisi sırasında ya da patolojik olaylarla ortaya çıkmasıyla organizmada oksidatif stres oluşur. Oksijenin toksik etkisi yer aldığı biyokimyasal tepkimelerde gerçekleşen enzim inhibisyonları ve oluşan oksijen radikalleriyle ortaya çıkmaktadır (28, 29).

Oksidatif stres şu şekilde ortaya çıkmaktadır: serbest oksijen radikalleri metabolizmada düzenli olarak üretilmekte olup antioksidan savunma sistemi tarafından nötralize edilmektedir. Reaktif oksijen ürünleri (ROS) aşırı miktarda üretildiğinde ya da antioksidan sistemi baskılandığında oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres organizmada çeşitli sorunlara yol açmaktadır. Bunlar arasında kontrol edilmeyen hücre bölünmeleri, genomik kararsızlıklara neden olan tümör gelişimi, karsinogenezin başlamasında kritik rol oynayan DNA hasarı sayılabilir (30). Radikallerin en zarar verici etkisi poliansatüre yağ asitleri ve fosfolipidden oluşan hücre membranı üzerine olur. Poliansatüre yağ asitlerinin ROS tarafından yıkılması sonucu; peroksitler, alkoller, etan, pentan gibi ürünler oluşur (31). Lipid peroksidasyonunun ROS tarafından indüklenmesiyle fonksiyonel ve yapısal hücre hasarı oluşur (32).

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan Malondialdehit (MDA) membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna sebep olmaktadır. Bu da hücrelerde iyon transportu, hücrelerde deformasyon ve enzim aktivitesi gibi intrinsik membran özellikleri değişmektedir (29, 33).

4.5.2. Antioksidan Sistem

Antioksidanlar serbest oksijen radikallerinin yapımını ve bunlar sonucunda meydana gelen hasarı önlemek için vücut tarafından geliştirilen bir savunma sistemidir (34). Organizmanın kompleks bir antioksidan defans sistemi vardır (35). Antioksidanların oksidanları etkisizleştirmesi dört aşamada olmaktadır:

1. Temizleme (Scavenging) Etkisi: Enzimler tarafından oksidanlar zayıf moleküllere çevrilir.
2. Baskılama (Quencher) Etkisi: Vitaminler ve flavonoidler oksidanlara bir hidrojen aktararak onları etkisiz hale getirir.
3. Onarma (Repair) Etkisi: Hasar gören DNA molekülünü tamir eden enzimler örnek verilebilir (36).
4. Zincir Koparma Etkisi: Hemoglobin, Seruloplazmin ve E vitamini tarafından oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engellerler (37, 38).

Antioksidanlar iki gruba ayrılır. Bunlar:

- a) Enzimatik antioksidanlar: Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz ve mitokondriyal sitokrom oksidaz'dır.
- b) Enzimatik olmayan antioksidanlar: Askorbik asit, β -karoten, vitamin E, melatonin, polifenol, transferin, albumin, ürik asit, bilirubin, laktoferrin ve seruloplazmin'dir (39).

4.5.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz antioksidan bir enzimdir. Süperoksit serbest radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (40, 41). Dokularda oksijen kullanımı arttıkça enzimin aktivitesi de artmaktadır. Enzimin %85'i ekstrasellüler sıvı ve sitoplazmada; %15'i mitokondride bulunmaktadır (26, 42, 43).



Şekil 1. Süperoksit Dismutazın (SOD) reaksiyonu

4.5.2.2. Katalaz (KAT)

Katalaz bir hemoproteindir. Yapısında dört hem grubu bulunur. Katalaz sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda da bulunmak üzere büyük oranda peroksizomlarda bulunur (39, 40). Etkisini hidrojen peroksit ve metil/etil hidroperoksitleri üzerinde gösterir (26). Granulomatöz hücrelerde, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma görevi vardır (39, 40).



Şekil 2. Katalazın (KAT) reaksiyonu

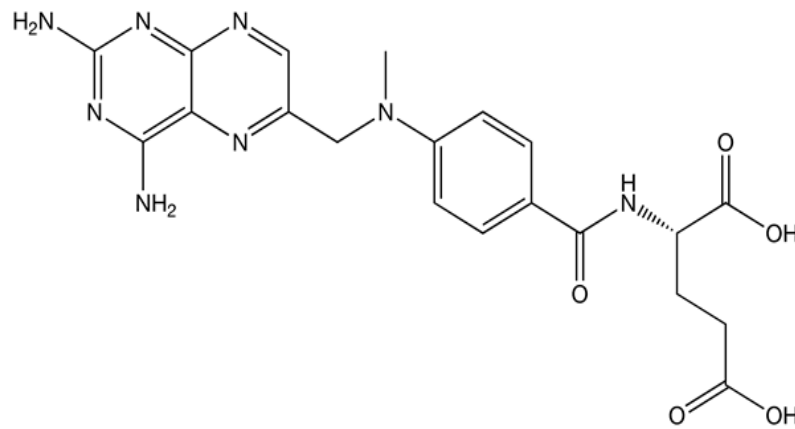
4.6. Apoptoz

Apoptoz programlı hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (44, 45). Hücrelerin kendi kendini yok ettiği, RNA (ribonükleik asit)'ya, protein sentezine ve enerjiye ihtiyaç duyan programlı hücre ölüm şeklidir (46).

Apoptozun görev aldığı durumlara kan hücreleri, deri gibi hücre yenilenmesinin hızlı olduğu dokularda yaşlanan hücrelerin yok edilmesi; embriyogenez ve metamorfoz sürecinde fetusun gelişim süreci; embriyolojik süreçte parmak aralarındaki zarın yok edilmesi, istenmeyen nöronların ortadan kaldırılması gibi durumlar örnek verilebilir. Ayrıca bağışıklık sistemi hücrelerinin seçiminde, menstrüel siklusta endometrial hücre yıkımında, menapozda folikül atrezinde de apoptoz rol oynar (47).

4.7. Metotreksat

MTX (4-amino-4-deoxy-10-N-methylpteroylglutamic acid) bir folik asit antonogonistidir ve kemoterapide yaygın olarak kullanılan antimetabolit ve antineoplastik bir ilaçtır (48). MTX'in romatizmal hastalıklar, lösemi, lenfoma, osteosakrom, akciğer ve meme kanseri, baş ve boyun tümörleri, romatoid artrit, psoriasis, vaskulit gibi çok geniş kullanım endikasyonları bulunmaktadır (48-50).



Şekil 3. Metotraksatın (MTX) kimyasal yapısı

MTX, dihidrofolik asidin 4-aminoN¹⁰-metil analogudur ve dihidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin aktif bölgesine sıkı bir şekilde bağlanıp onu inhibe ederek tetrahidrofolat sentezini durdurur. Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu DNA ve RNA için gerekli pürin bazlarının sentezinin durmasına yol açar. Bu inhibisyonla tetrahidrofolat üretimi duracağından pirimidin timidilat ve pürin nükleotidlerinin (adenin ve guanin) biyosentezi gerçekleşmez. Böylece DNA, RNA sentezi ve hücre için gerekli olan ATP yapımı durur. Ayrıca dihidrofolatpoliglutamatlar (FH₂Glu_n) FH₄'e dönüşmeden kaldıklarından MTX'in poliglutamat türevleri toksik inhibitör olarak birikir ve büyük yapıda olduklarından hücre dışına çıkamazlar. Bu durum hücre ölümü ile sonuçlanır.

MTX'in S dönemindeki hücelere sitotoksik etkisi vardır. Tümör, karaciğer ve böbrek hücrelerinde uzun süre bağlı kalan MTX'in, tümör hücrelerindeki bu durumu tedavi için önemlidir. Antimetabolitler, istirahat halindeki hücelere sitotoksik etki yapamadıkları bilinmektedir. Fakat MTX'in, latent sitotoksik etkisi, hücre bölünmeye başladığı zaman aktif hale geçerek hücrenin ölmesine sebep olur (51).

4.7.1 Metotreksat'ın Endikasyonları

MTX, diğer antineoplastiklerle kombine edilerek onkoloji ünitesinde günlük 3-10 g/m² dozda hazırlanarak koryokarsinom, gırtlak kanseri, meme kanseri, baş ve boyun kanseri, ovaryum ve mesane kanseri, lösemi, lenfoma, osteosarkom tedavilerinde kullanılmaktadır. Daha düşük dozlarda 100-1000 defa seyreltilerek antinflamatuar ve hücre bölünmelerini inhibe ettiklerinden psöriyazis, romatoid poliartritler, sindirim kanalları ve karaciğerin bazı inflamatuvar hastalıkları, testis kanseri ve bazı durumlarda şiddetli astımlarda da kullanılabilir.

4.7.2 Metotreksat'ın Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri

MTX'in yan etkilerinin şiddeti ve ciddiyeti, genellikle uygulama sıklığına ve dozajına bağlıdır. En sık rastlanan yan etkileri; ülseratif stomatitis, lökopeni, bulantı ve mide bağırsak sistemi problemleri, kendini iyi hissetmeme hali, açıklanamayan yorgunluk hali, üşümeye bağlı titremeler, ateş, baş dönmesi, hastalıklara karşı direnç azalmasıdır. Ayrıca organ sistemlerine göre çeşitli yan etkileri bulunmaktadır. Ağızdaki ağrı ve ülserasyonlar toksisitenin ilk belirtileridir. Gebeliğin bütün dönemlerinde teratojen etki gösterebilmektedir. Gonadlar üzerindeki toksik etkisi spermazoidlerde

değişme ve oligospermiye neden olabilmektedir. Düşük dozajlarda kullanımı saç telinde incelmeye yol açabilmektedir (52, 53).

MTX bazı asit yapılı ilaçlarla zararlı etkileşimler yapmaktadır. MTX, plazma proteinlerine yüksek oranda bağlandığından asit yapılı ilaçlar bu yapıyı bozabilmektedir.

MTX'in sitotoksik etkisi kanser hücreleri için seçici değildir. Yüksek proliferasyona sahip saç folikülleri, bağırsak mukozası ve kemik iliği gibi dokular ve gonad da MTX'in toksisitesinden etkilenmektedir.

4.8. *P. vulgaris* Hakkında Genel Bilgiler

Primula L. cinsi, *Primulaceae* familyasının en büyük cinsidir ve dünyada *Primula* cinsine ait türlerde süs bitkisi olarak kültürü yapılmaktadır (54). *Primula* cinsi, dünyada 425 tür ile temsil edilmekte olup (55) bunların %75'i Himalaya dağlarında ve Batı Çin'de bulunmaktadır (56). *Primula* cinsi ülkemizde 3 alt cinsten yer alan 8 tür ve bu türlere bağlı 11 takson ile temsil edilir. Özellikle *P. davisii* W.W. Sm ve *P. longipes* Freyn & Sint. taksonları, ülkemizin önemli gen kaynakları içinde yer alan endemik bitkilerdir (57). *Primula* cinsinin bazı türleri halk ilacı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (58). Özellikle *P. veris* L., *P. vulgaris* Huds. ve *P. elatior* (L.) Hill türlerinin yaprak ve rizomlarından elde edilen özütlerin diüretik, antispazmodik, ağrı kesici, ateş düşürücü, balgam sökücü, öksürük giderici, sakinleştirici, uykusuzluk hastalıklarını giderici olarak ve soğuk algınlığı, akut ve kronik bronşit hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Resim 1) (58, 59).



Resim 1. *Primula vulgaris* 'in genel görünüşü

- Alem : Plantae (Bitkiler)
Bölüm : Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf : Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım : Ericales
Familiya : Primulaceae (Çuha çiçeğigiller)
Cins : *Primula*
Tür : *Primula vulgaris*
Alttür 1.: *Primula vulgaris subsp. vulgaris*
Alttür 2.: *Primula vulgaris subsp. sibthorpii*

***Primula vulgaris subsp. vulgaris*:** Çiçekleri açık sarı veya beyaz renkli olup Türkiye’de 500-2100 m arasındaki yükseltilerde bulunurlar. Genellikle çiçeklenmeleri Mart ve Haziran ayları arasında gerçekleşir. Gölgeyi veya açık çayırılık alanlar, yaprağını döken veya her zaman yeşil ağaçların altı ve çayırılıklar gibi nemli alanlarda bulunurlar.

***Primula vulgaris subsp. sibthorpii*:** Çiçekleri mor-pembe ile leylak rengi bazen de beyaz renklidir. Türkiye’de 1-850 m arasındaki yükseltilerde yayılış gösterirler. Mart ve Mayıs ayları arasında çiçeklenirler. Maki, meşe ormanları, fındık bahçeleri, çayırlar, çalılıklar ve çimenlik alanlarda ve sıklıkla nemli bölgelerde yayılış gösterirler.

Türkiye'nin batı kesimlerinde *Primula vulgaris subsp. Sibthorpii* oldukça düşük yükseltilerde bulunur (60).

Akçaabat'tan toplanan *Primula vulgaris*, fenolik bileşiklerden zengin bir doğal ürün olup, yapısında bulunan protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, galik asit, vanilik asit ve rutince zengin antioksidan yapılarından dolayı biyolojik değeri yüksek bir üründür. Karadeniz bölgesi *Primula vulgaris* dikimi ve üretimi için çok elverişli bir bölge olması nedeniyle bu değerli ürünün gıda sanayiinde daha yaygın biçimde kullanılması koruyucu tıp açısından yararlı olacaktır (4).

4.9. Bitkilerin Tedavi Amaçlı Kullanılması

Bitkiler, insanlığın var oluşundan bu yana hayatın vazgeçilmez temel kaynaklarından birisi olmuştur. İlkçağlardan beri insanlar bitkileri çeşitli amaçlarla kullanmışlar, bitkileri tanımış ve tanıtmaya uğraşmışlardır. Bitkilerin besin maddesi olarak kullanılmalarının yanı sıra; koku verici ve tat verici olarak da kullanımı yaygındır. Bitkilerin tedavi amacıyla kullanılmaları ise eski uygarlıklara kadar dayanmaktadır. 1800'lü yıllarda bitkilerden etken maddenin elde edilmesi, ardından özellikle 20.yy'ın son çeyreğinde analiz yöntemlerinin gelişmesiyle içeriklerinin saptanması ve etkilerinin araştırılması büyük önem kazanmıştır (61).

İnsanlar eskiden beri hastalıklara karşı bitkiler ile çare aramaya çalışmışlar ve bu bitkiler ile tedavi etme yöntemlerinden başarılı sonuçlar almışlardır. Bundan dolayıdır ki, bitkisel ürünlerin tedavide kullanımı geçmişten günümüze kadar devam etmiştir. Birçoğu tesadüfen, birçoğu da denenerek etkileri anlaşılan doğal ilaçlar, kulaktan kulağa yayılarak tanınmaya başlamış ve yıllar geçtikçe de daha farklı bitkilerin başka hastalıklara da deva oldukları anlaşılmıştır (62).

'Bitkilerle tedavi ya da bitkilerin tedavi amacıyla ilaç olarak kullanılması' anlamına gelen 'fitoterapi' terimi ilk kez Fransız hekim Henry Leclerc (1870-1955) tarafından kullanılıp tıp literatürüne kazandırılmıştır. İlaçlar eczanelerde bitkisel kaynaklı ya da bitkisel kaynaklı bileşiklerin sentezlenmiş türevleri şeklinde satılmaktadır. Tıbbi bitkiler, eczacılıkta bazı preparatların (tentür, ekstre, şurup, gargara vb.) hazırlanmasında ve tedavide kullanılan saf etkili maddelerin (alkaloit, glikozit, heterozit, tanen, saponozit vb.) elde edilmesinde kullanılmaktadır. Sentetik olarak elde edilen ilaçların istenmeyen yan etkilerinin olması, sadece tek etkiye sahip olmaları,

insanları tekrar doğal kaynaklı ilaçları kullanmaya yönetmiştir. Bu amaçla yeni doğal ilaç ham maddeleri bulmak üzere bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar gün geçtikçe önem kazanmaya başlamıştır. Romanya, Macaristan, Çin, Kore, Japonya ve Bulgaristan örneklerindeki gibi birçok ülkede bitkilerle tedavi bir devlet politikası haline gelmiştir (63).

Üretilen sentetik kökenli maddelerin yan etkilerinin daha fazla olması, özellikle antimikrobiyal olarak kullanılan sentetik ilaçlara karşı organizmaların direnç oluşturmaları gibi sebeplerden dolayı doğal bitkisel kaynakların ve bu maddeleri taşıyan tıbbi bitkilerin önemi daha çok artmıştır (64).

Doğal ortamı tahrip etmeden devamlı, kaliteli ve standartlara uygun ürün üretmek için tıbbi ve aromatik bitkiler kültüre edilmeye başlanmıştır. Bu tıbbi bitkiler kültüre edildiğinde yabancı madde taşımayan ve etken madde verimi yüksek bitkiler elde edilmektedir. Ülke ekonomisinin yükselmesine ve endüstriyel sektörlerin gelişmesine katkı sağlanmaktadır (65).

5. GEREÇ ve YÖNTEMLER

5.1. Deneysel Çalışma Aşaması

5.1.1. Deney Hayvanlarının Temini, Bakımı ve Barınması

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 25.02.2014 Tarihli ve 8 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Tez çalışması süresince kullanılan deney hayvanları, kimyasal malzemeler, araç ve gereçler KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2015-5341 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

Çalışmada 12 haftalık 250-300 g ağırlığında Spraque Dawley cinsi 32 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların barınması, bakımı ve beslenmesi KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinde bulunan 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olarak ayarlanmış sıçan takip odalarında yapıldı. Bu odaların sıcaklığı ortalama 22 ± 2 °C, nisbi nem ortalama 50 ± 5 olarak ayarlandı. Sıçanlara içme suyu olarak çeşme suyu ve yem olarak da standart yem verildi. Çalışma süresince sıçanlar standart Tip III kafeslerinde barındırıldı (Resim 2). Çalışmada kullanılan sıçanların tamamı Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edildiği için çevre stresi ve uyum problemi yaşanmadı.



Resim 2. Deneklerin barındırıldığı tip III kafesler

5.1.2. Deneysel Çalışma Planı

Deneyde kullanılan 32 adet sıçan her grupta 8 hayvan olacak şekilde yaş ve ağırlıklarına göre gruplara homojen bir şekilde dağıtıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan gruplar ve gruplara uygulanan tedaviler (n=32)

Gruplar	Gruplara Uygulanan Tedaviler
Kontrol Grubu	Serum fizyolojik (SF) 0.8 mL/kg gavaj yolu ile 7 gün uygulandı.
MTX Grubu	Tek doz MTX (30 mg/kg) intraperitoneal olarak deneyin ilk günü uygulandı.
MTX + <i>P. vulgaris</i> Grubu	Deneyin ilk günü tek doz MTX (30 mg/kg) intraperitoneal olarak (+) <i>P. vulgaris</i> L. (100 mg/kg) 7 gün boyunca gavaj yolu ile uygulandı.
<i>P. vulgaris</i> Grubu	7 gün boyunca <i>P. vulgaris</i> L. (100 mg/kg) gavaj yolu ile uygulandı.

Çalışmamızın birinci gününde bütün sıçanlar yaş ve ağırlıklarına göre homojen dağılım olacak şekilde dört gruba ayrıldı. Sıçanların kafes temizliği her gün yapılarak besin ve su ihtiyaçları karşılandı. Yedi günlük deney aşamasının ardından sekizinci günün sabahında sıçanlar kurban edilmek suretiyle deney aşaması tamamlandı.

Kontrol grubuna 0.8 mL/kg SF gavaj yolu ile 7 gün boyunca uygulandı. MTX grubuna çalışmanın ilk günü tek doz MTX (30 mg/kg) periton içi (i.p.) uygulandı, sonraki 6 gün boyunca herhangi bir işlem uygulanmadı. MTX + *P.vulgaris* grubuna çalışmanın ilk günü tek doz MTX (30 mg/kg) periton içi (i.p.) olarak uygulandı, buna ek olarak 7 gün boyunca, her gün aynı saatte, 100 mg/kg *P. vulgaris* 'in sulu ekstraktı gavaj yöntemiyle verildi. *P. vulgaris* grubuna 7 günlük çalışma boyunca, her gün aynı saatte, 100 mg/kg *P. vulgaris* 'in sulu ekstraktı gavaj yolu ile uygulandı.

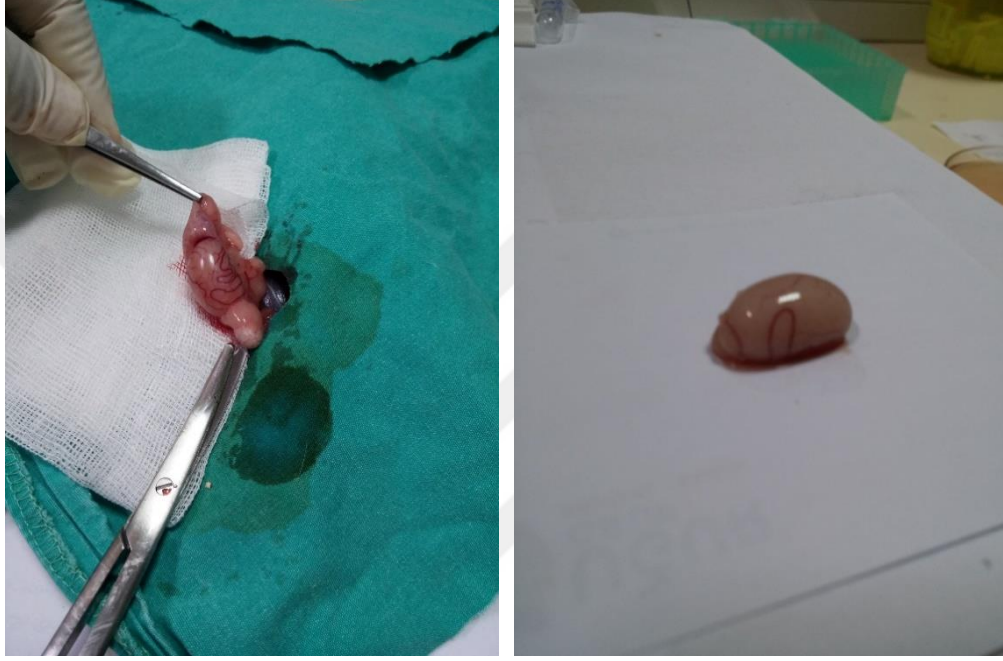
5.1.3. *P. vulgaris* 'in Sulu Ekstraktının Hazırlanması

Akçaabat'tan toplanmış mor renkli *Primula vulgaris subsp. sibthorpii* 'nin kurutulmuş, toz edilmiş çiçek kısmından 1 g tartıldı. Yaklaşık 20 mL saf su ile 1 gece çalkalayıcıda 25 °C'de bekletildi, süzgeç kağıdından süzüldü ve çözücü vakum altında kuruluğa kadar uçuruldu. Biyolojik aktivite çalışmaları için 10 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde yeniden su ile çözündürüldü.

5.2. Histolojik İşlemler

5.2.1. Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması

Yedi günlük deney süresi tamamlandığında sekizinci gün bütün sıçanlara 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 3. Testis Diseksiyonu a) Testisin çıkarılması, b) Testisin yağ ve epididimisten ayrılmış hali

Abdominal aorta makasla kesilerek kansızlaştırma yöntemiyle tüm sıçanlar sakrifiye edildi. Sıçanlardan alınan testisler boylamasına şekilde ikiye bölündü. Her testisin bir yarısı histolojik değerlendirmeler için Bouin solüsyonuna, diğer yarısı ise biyokimyasal analizler için ependorf tüplerine konularak -80°C 'deki derin dondurucuda muhafaza edildi. Alınan kanlar antikoagülanlı (%3,2'lik sodyum sitratlı) tüplere konularak alt üst edildi. Tüplerdeki kanlar 1800 g'de 10 dak. santrifüj edildi ve elde edilen plazma kısımları -20°C 'de saklandı. Biyokimyasal analizler için alınan doku örnekleri ve kan numuneleri KTÜ Eczacılık Fakültesi'ndeki soğutucularda muhafaza edildi.

Bouin Tespitinin Hazırlanışı

Dokuların tespitinde kullanılacak Bouin solüsyonu aşağıdaki oranlarda 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 karıştırıldı, sonra üzerine yavaş şekilde glasiyal asetik asit eklendi (66).

5.2.2. Sperm Sayısı, Motilite ve Vitalite

Epididimiden alınan semen örneğinde sperm sayımı, motilite ve vitalite değerlendirmesi yapıldı. Tris tampon solüsyonuna alınan numunelerde Makler Sperm Sayım Kamarası (Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel) yardımıyla sperm sayımı ve motilite değerlendirildi. Bir damla semen örneği 10X büyütme altında incelenerek motil ve non-motil sperm sayıldı; mililitredeki sperm sayısı ve motilite yüzdesi belirlendi. Vitalite değerlendirmesi bir damla semen örneğinde %1'lik Eozin-Y ilavesiyle yapıldı. Her örnekte 100 sperm canlılık açısından değerlendirildi.

5.2.3. Doku Takibi

Dokulardan kesit alma, boyama ve takip işlemleri KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi. Bouin solüsyonuna alınan testisler üç gün ışık almayan kuru ortamda oda sıcaklığında saklandı. Saklanan testislere aşağıdaki işlemler uygulanarak parafin blok haline getirildi.

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

5.2.4. Kesitlerin Alınması

Kesitlerin alınması KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarındaki Leica marka RM 2255 otomatik mikrotom ile gerçekleştirildi. Dokuya kadar 20 µm'lık kesitler alınarak dokunun parafinin atılması sağlandı. Dokuya ulaşıldığında 5 µm'lık kesitler alınarak Benmari içindeki sıcak suyla teması sağlandı. Böylece kesitlerdeki kırışıkların açılması sağlandı ve kesit lam üzerine yerleştirildi.

5.2.5. Kesitlerin Hematoksilen-Eozinle Boyanması

Lam üzerine alınan dokular hematoksilen-eozin boyaması için zembile yerleştirildi. Parafinin erimesi için 1 saat süreyle 58 °C'ye ayarlanmış etüvde bekletildi ve aşağıdaki işlemler sırasıyla gerçekleştirildi.

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 Laboratuvarı'nda bulunan Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Japan) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı yardımıyla hesaplandı. Seminifer tübüldeki spermatogenetik hücreler ve intertisyel alan aynı mikroskop kullanılarak incelendi. Görüntülerin fotoğrafları çekilerek dijital ortama aktarıldı.

5.3. İmmünohistokimyasal İşlemler ve Analizler

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

Testisteki apoptozi değerlendirmek için TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate (dUPT) nick end labeling assay) tekniği kullanıldı ve seminifer tübül germinal hücrelerinde DNA fragmentasyonları tanımlandı. TUNEL yöntemine göre DAB ve hematoksilenle boyanan dokularda apoptoza uğrayan hücrelerin kahverengi ile boyananları TUNEL (+) (apoptotik), mor renkte boyananları ise TUNEL (-) (nonapoptotik) hücreler olarak değerlendirildi. Her testiste 20 seminifer tübülde TUNEL (+) hücre sayısı ve toplam hücre sayısı bakılıp apoptotik indeks (AI= TUNEL (+) hücre sayısı / toplam hücre sayısı x 100) hesaplandı (67).

TUNEL tekniği için In situ cell death detection kit [POD kiti(Roche, Mannheim, Germany)] kullanıldı. Lam üzerine 5 µ'luk kesitler yayıldı. 1 saat 60 °C'lik etüvde bekletilerek sırasıyla aşağıdaki işlemlere tabi tutuldu.

1. Oda ısısında 3x5 dk ksilende inkübe edildi.
2. %100 etanol 2x5 dk
3. %95 etanol 2x5 dk
4. %70 etanol 2x5 dk
5. Distile su ile yıkandı.
6. Oda ısısında 20 µg/mL proteinase K 15 dk
7. PBS (phosphate buffer solution) tamponunda yıkandı.
8. %3 H₂O₂'de 15 dk
9. Distile su ile yıkandı.
10. PBS tamponunda 2x5 dk

11. Oda ısısında Large Volume Ultra V block 10 dk
12. 75 µg Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve 50 µL TdT/dUPT karışımı ile dokular muamele edildi. 37 °C'lik etüvde 1.5 saat bekletildi.
13. PBS tamponunda yıkandı.
14. 100 µL converter peroksidaz dokuyu kapatacak şekilde kaplanarak 37 °C'lik etüvde bekletildi.
15. PBS tamponunda 3x5 dk yıkandı.
16. 100 µL DAB ile 5 dk karanlıkta oda ısısında bekletildi.
17. Distile suda 1x2 kez yıkandı.
18. Hematoksilen ile 15 sn boyandı ve ardından çeşme suyu ile yıkandı.
19. %70 etanol 2x5 dk
20. %95 etanol 2x5 dk
21. %100 etanol 2x5 dk
22. Ksilen 2x5 dk
23. Kurutulup kapatıldı.

5.4. Biyokimyasal İşlemler ve Analizler

5.4.1. Biyokimyasal Analizler İçin Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan cihazlar Tablo 2'de, kimyasal maddeler ise Tablo 3'de verildi.

Tablo 2. 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 3. Biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasallar

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(Na_2CO_3)	Merck, Art 6398
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, Lot#058K0726
Bakır klorür (CuCl_2)	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 (H_3PO_4)	Merck, Art 563, %85
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma, Lot#S42774-018
1,1,3,3-tetrametoksipropen	Sigma, Lot#76H3424, %99
Asetik asit (CH_3COOH)	Merck, Art 56, %99,5
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, 35050
Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Sigma, A6011
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck, Art 4871
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na_2HPO_4)	Merck, Art 6576

5.4.2. MDA Tayini

5.4.2.1. Dokularda MDA Tayini

Dokular, buz içerisinde 0,5 mL/L Triton X-100 içeren %1.15'lik Potasyum klorür (KCl) çözeltisi içerisinde homojen hale getirildi. Oluşan homojenatlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlarda, Mihara ve Uchiyama yöntemlerine göre ölçümler yapıldı (68). 1,1,3,3-tetrametoksipropen standart çözeltiler hazırlandı. 8.3 µL tetrametoksipropen 0.01 M HCl çözeltisine eklendi. 50 °C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Oluşan 10 µmol/mL'lik ara stok çözeltiden 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 nmol/mL'lik standart çözeltiler oluşturuldu.

Tablo 4. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı

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

Karışım 100 °C'ye ayarlanmış etüvde inkübasyona bırakıldı. Süpernatantlar ELISA pleytine pipetlendi. Daha sonra 532 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. MDA düzeyi nmolMDA/g doku olarak hesaplandı.

5.4.2.2. Plazmada MDA Tayini

Yagi yöntemine göre plazma lipid peroksit seviyesi ölçümü yapıldı (69). MDA ile tiyobarbitürik asit reaksiyonu sonucu oluşan kırmızı renk 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. 0.675, 1.25, 2.5, 5 ve 10 nmol/mL standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 5. Plazma MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	İlave Edilen 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 Katalaz Aktivitesi Tayin Yöntemi

Goth metoduna göre doku ve plazma katalaz aktivitesi yapıldı(70). Goth metodu amonyum molibdat ve H₂O₂ kompleksinin 405 nm'deki spektrofotometrik ölçümüne dayanır.

Dokular; buz üzerinde 0.1 M, pH'sı 7 olan fosfat tamponu ile homojen hale getirildi. 0,2 mL homojenat, 65 µL H₂O₂ eklenen 6 mM'lık pH'sı 7.4 olan fosfat tamponunun 1mL'si içerisine ilave edilerek 1 dakika inkübe edildi (numune 1). Gerekli seyreltmeler yapılarak iki adet kontrol kullanıldı. 0.2 mL fosfat tamponuna 1 mL H₂O₂ eklenerek kontrol 1 elde edildi. Kontrol 2 için 1.2 mL fosfat tamponu kullanıldı. Numune ve kontrollerde oluşan reaksiyonları durdurmak için 1 mL 32.4 nM'lık

amonyum molibdat çözeltisi eklendi. Reaksiyon sonucu oluşan sarımsı renk 405 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek katalaz aktivitesi U/mg olarak belirlendi.

5.4.4. Plazma ve Doku SOD Aktivitesi Tayin Yöntemi

Sun ve Oberley’in geliştirdiği yöntem modifiye edilerek SOD enzim aktivitesi ölçüldü (71). Sun ve Oberley’in yöntemi, 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 bileşik, 560 nm’de spektrofotometrik olarak tayin edildi.

Dokular; buz içinde 0.5 mL/L Triton X-100 içeren pH’sı 7.4 olan 50 mM’lık Tris-HCl tampon çözeltisi içinde homojen hale getirildi. Oluşan homojenatlar, +4 $^{\circ}C$ ’de 10 000 rpm’de 30 dk. santrifüjlendi. Elde edilen süpernatantta SOD aktivitesi ölçüldü. 0.25, 0.5, 1, 2 ve 3 U/mL’lik SOD standartları kullanılarak sonuçlar U/mg cinsinden hesaplandı.

Tablo 6. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaktifler	İlave Edilen 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 tayini için Bradford yönteminden yararlanıldı (72). Negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası proteinlerin üzerindeki pozitif yüke bağlanmasıyla kırmızıdan maviye renk dönüşümünün 600 nm’deki spektrofotometre ile ölçümüne dayanan metottur. Stok BSA’dan 2 mg/mL’lik standart çözelti hazırlanarak sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı.

Tablo 7. Protein tayini için kullanılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	İlave Edilen Miktar (mL)
Bradford reaktifi	100
Homojenat (10 kat seyreltilmiş)	10

5.5. İstatiksel Analiz

Histolojik bulgularda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde STAC (Statistical Tests for Algorithms Comparison) paket programı kullanıldı (73). Çalışma gruplarına ait seminifer tübül çapı, epitel kalınlığı, lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı, johnsen skrolama, AI, sperm sayısı, motilite, vitalite parametrelerine Freidman varyans analizi yapıldı (74). Post-hoc değerlendirme için Holm testi uygulandı (75). Freidman testinde $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

Biyokimya bulgularının değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 13.0 for Windows® istatistik paket programı ve Microsoft® Excel (For Windows XP) kullanıldı. Çalışma gruplarına MDA, SOD ve KAT için Kruskall Wallis varyans analizi yapıldı, Post-hoc değerlendirme için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi uygulandı ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Histolojik Bulgular

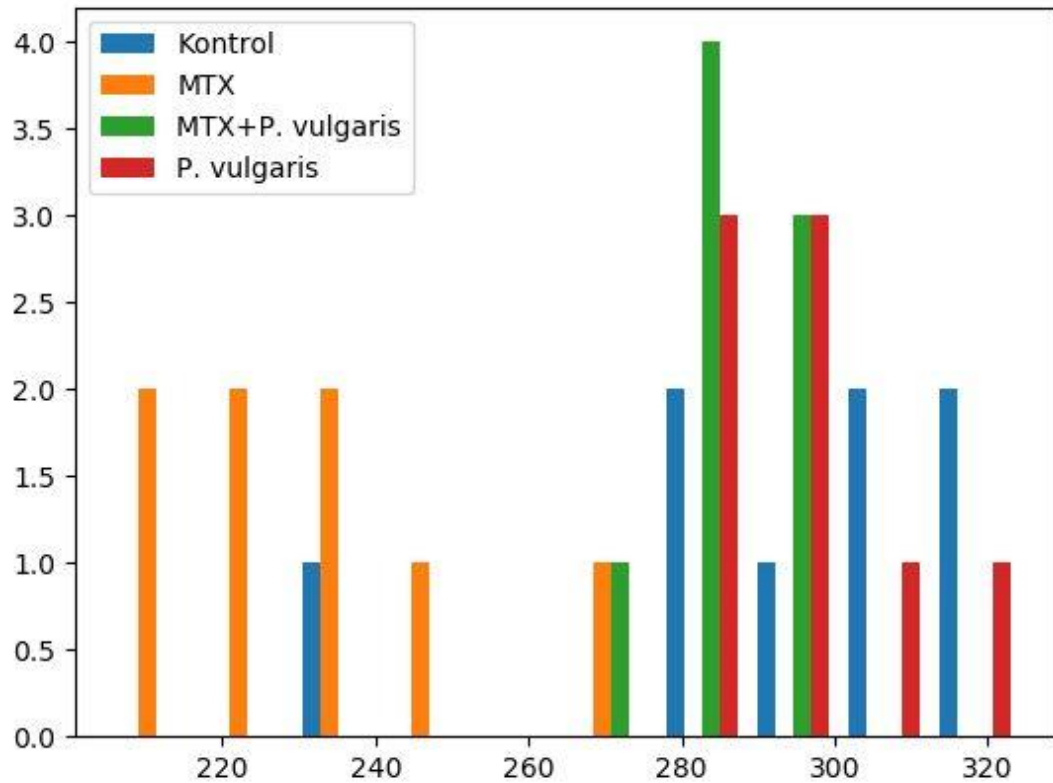
Çalışmaya ait grupların testis dokusunda; seminifer tübül çapı, epitel kalınlığı ve lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı hesaplandı. Sonuçların istatistik değerlendirilmesi yapılarak Tablo 8’de belirtildi. Ayrıca, sonuçların gruplar bazında dağılımı Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6’da gösterildi.

Tablo 8. Grupların testis dokusunda; seminifer tübül çapı, epitel kalınlığı, lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı (n=32)

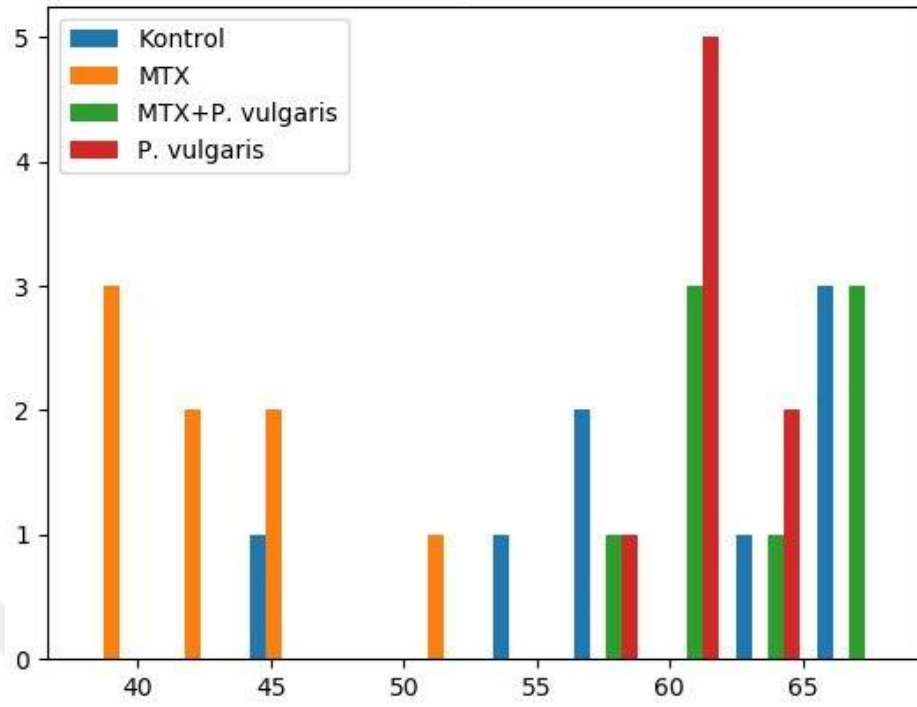
Gruplar	Seminifer Tübül Çapı (µm)	Epitel Kalınlığı (µm)	Lümenine İmmatür Hücre Dökülen Tübül Sayısı (%)
Kontrol	293.64 ± 27.12	59.62 ± 7.93	16.52 ± 11.44
MTX	229.95 ^a ± 18.69	42.84 ± 4.13	45.33 ^a ± 17.43
MTX + <i>P. vulgaris</i>	285.53 ^b ± 7.99	62.59 ^b ± 3.60	26.10 ± 10.91
<i>P. vulgaris</i>	294.50 ^b ± 12.54	61.34 ± 1.82	19.57 ^b ± 15.55

^aKontrol grubuna göre anlamlı farklılık vardır (p < 0.05).

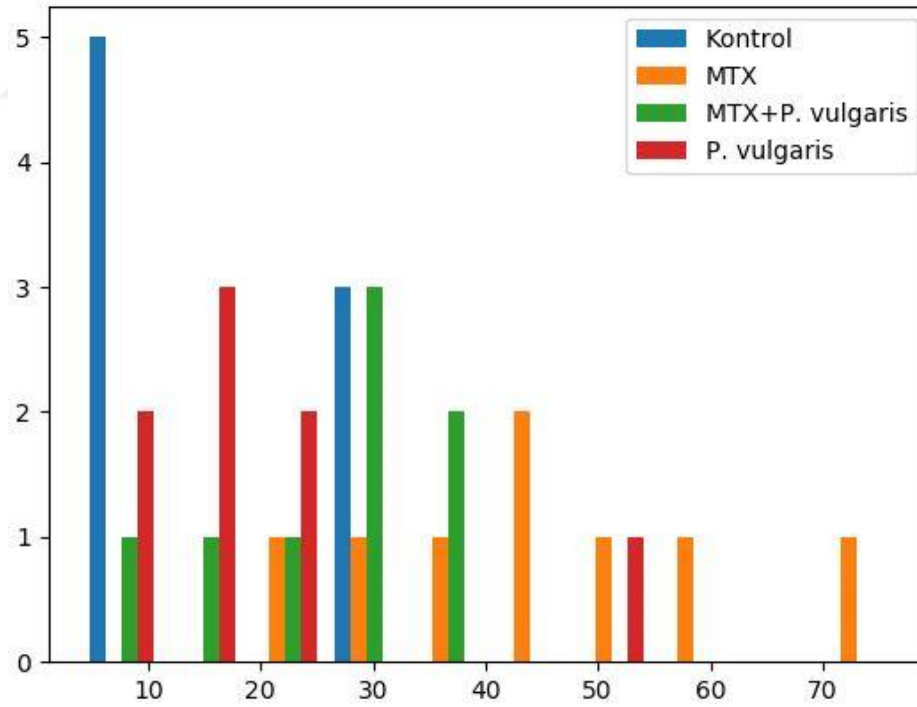
^bMTX grubuna göre anlamlı farklılık bulunmaktadır (p < 0.05).



Şekil 4. Seminifer tübül çapı bar grafiği [tübül çapı (µm) / denek sayısı]



Şekil 5. Epitel kalınlığı bar grafiği [epitel kalınlığı (µm) / denek sayısı]



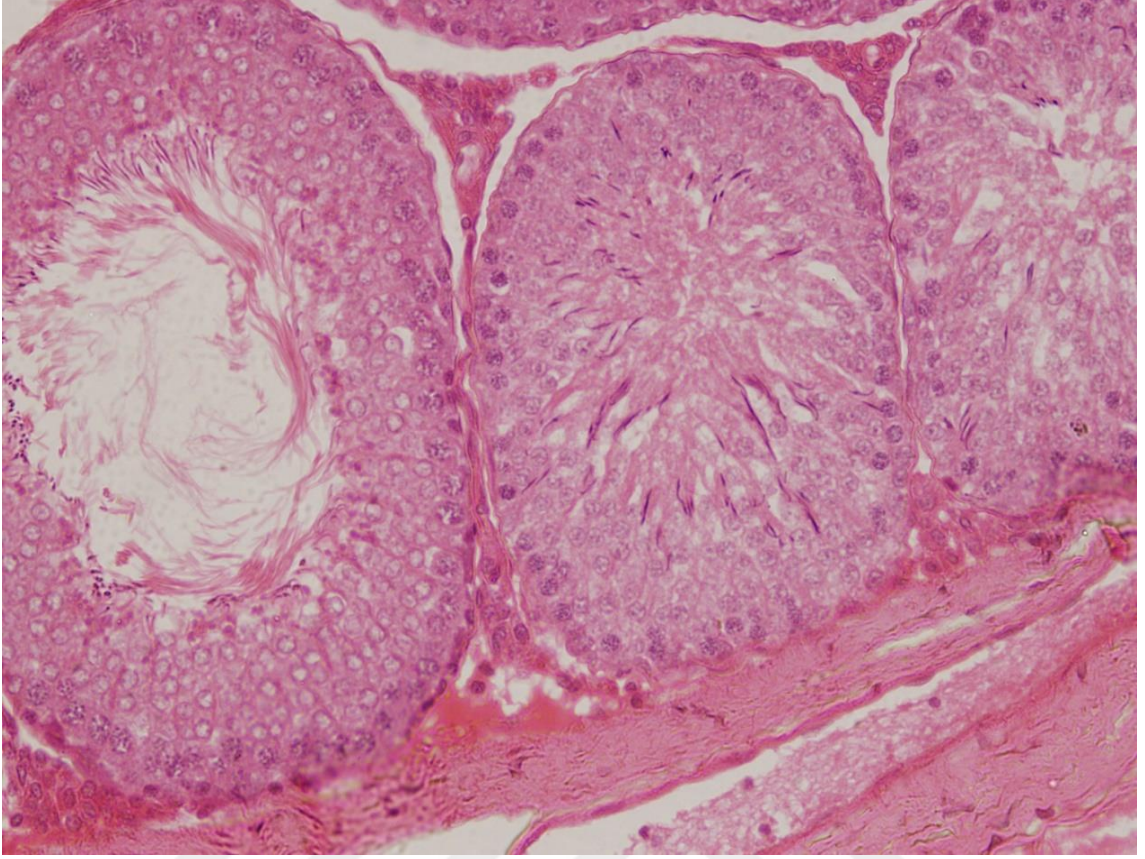
Şekil 6. Lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı bar grafiği [tübül sayısı(%) / denek sayısı]

Seminifer tübül çapının kontrol grubuna göre MTX ve MTX + *P.vulgaris* gruplarında azaldığı, *P. vulgaris* grubunda ise arttığı belirlendi. Bu değişim MTX grubunda kontrol grubunda azaldığı belirlendi. MTX + *P. vulgaris* ve *P. vulgaris* gruplarında ise MTX grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlendi.

Epitel kalınlığının kontrol grubuna göre anlamlı olmayan şekilde MTX grubunda azaldığı, MTX + *P. vulgaris* ve *P. vulgaris* grubunda ise arttığı belirlendi. MTX grubuna göre MTX + *P. vulgaris* grubunda anlamlı olarak, *P. vulgaris* grubunda ise anlamlı olmayarak arttığı gözlendi. MTX + *P. vulgaris* grubuna göre *P. vulgaris* grubunda düşük miktarda azalma belirlendi.

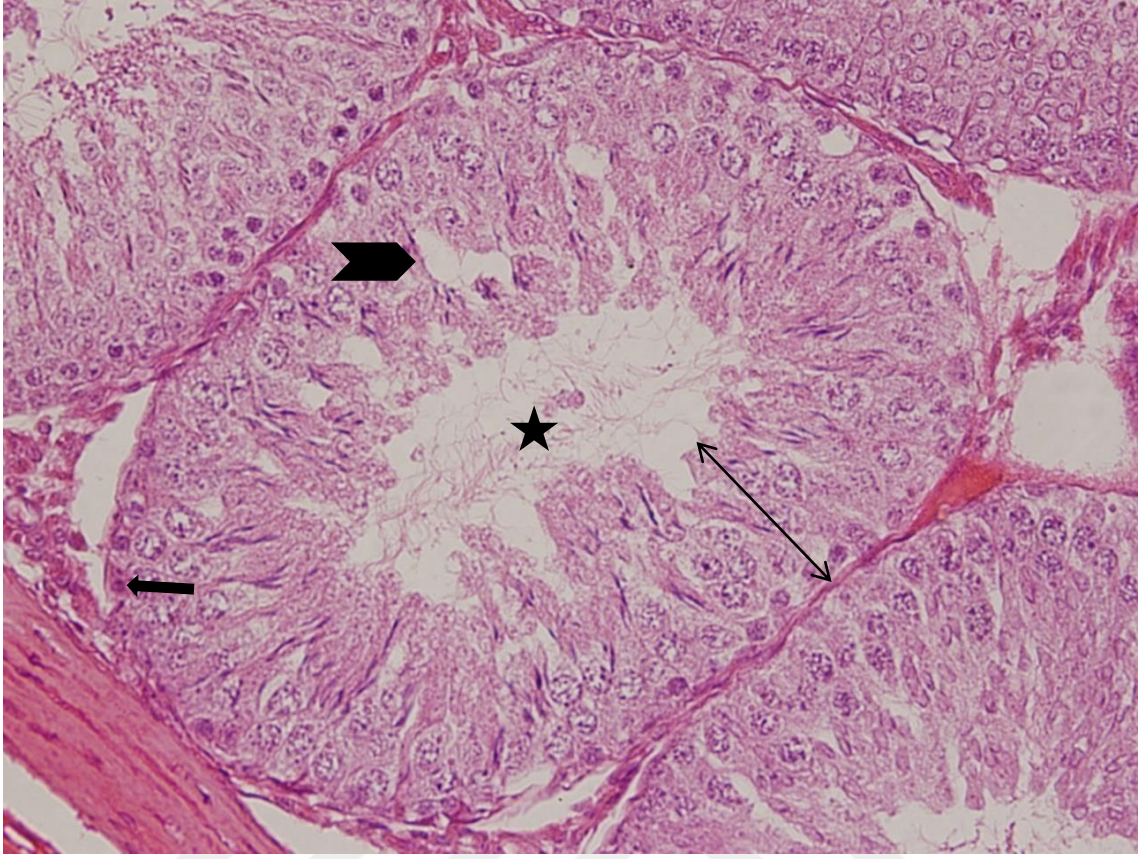
Lümenine immatür hücre dökülen seminifer tübül sayısı, kontrol grubuna göre MTX, MTX + *P. vulgaris* ve *P. vulgaris* gruplarında arttığı ve bu artışın MTX grubunda anlamlı olduğu belirlendi. MTX grubuna göre MTX + *P. vulgaris* grubunda anlamlı olmayan, *P. vulgaris* grubunda ise anlamlı bir azalma gözlendi. MTX + *P. vulgaris* grubuna göre *P. vulgaris* grubunda anlamlı olmayan bir azalma belirlendi.

Testis dokusundaki histopatolojik değerlendirmeye göre kontrol grubunda intersiyel alanın bütünlüğünü koruduğu, leydig hücrelerinin normal yapıda görüldüğü, seminifer tübüllerde spermatogonialar, spermatositler ve spermatidler düzgün sıralı olduğu belirlendi (Resim 4).



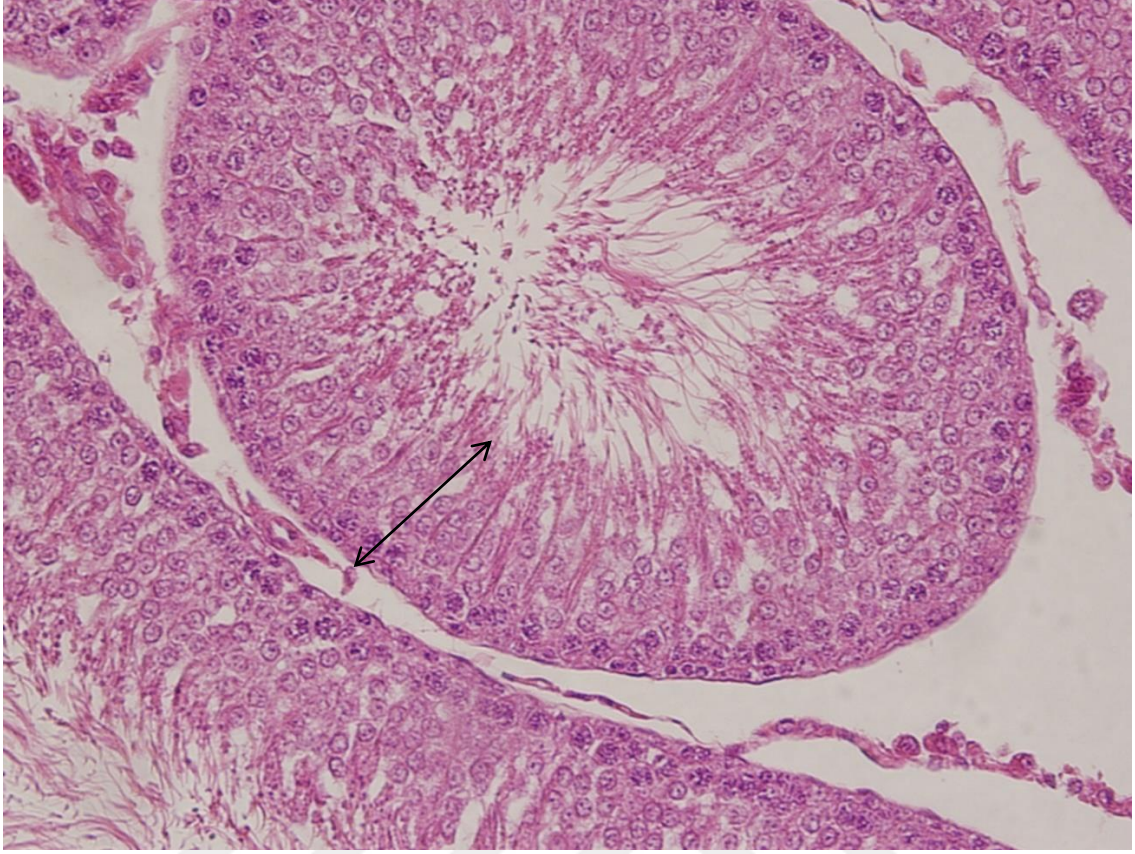
Resim 4. Kontrol grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)

MTX grubu incelendiğinde seminifer epitelde açılma ve seminifer epitel kalınlığında incelme, germinal hücrelerde ve leydig hücrelerinde atrofi görüldü (Resim 5).



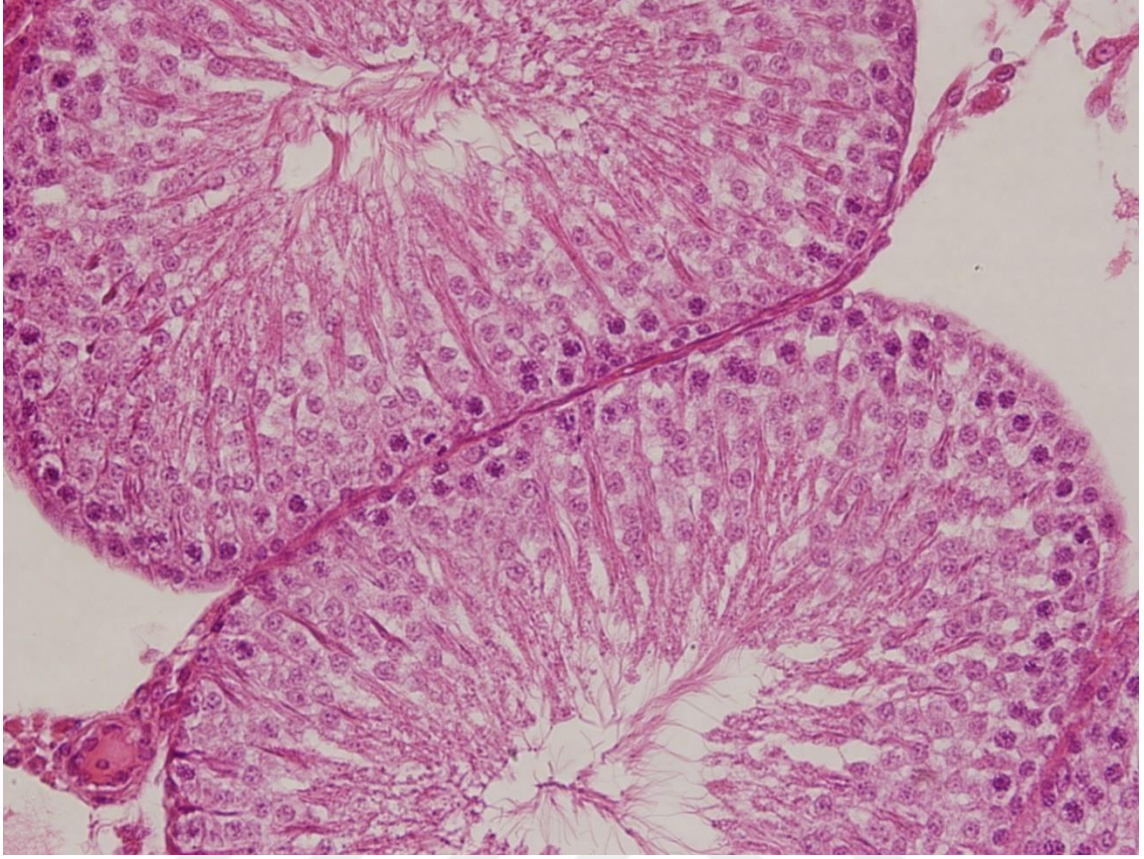
Resim 5. MTX grubuna ait testis dokusu (H&E, X400). **➡**: Seminifer epitelde açılmalar, **★**:Seminifer tübül lümenine dökülen immatür hücre, **➡**: Germinal hücrelerde atrofi, **↔**: Epitel kalınlığında daralma

MTX+ *P.vulgaris* grubunda seminifer epitel kalınlığında artış görüldü. Diğer bulgular kontrol grubuna benzerlik gösterdi (Resim 6).



Resim 6. MTX+ *P.vulgaris* grubuna ait testis dokusu (H&E, X400). $\longleftrightarrow$: Epitel kalınlığında artış

P. vulgaris grubundaki bulgular kontrol grubuna benzerlik gösterdi (Resim 7).



Resim 7. *P.vulgaris* grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)

Gruplardaki deneklerin sperm sayısı, motilite ve vitalite değerleri Tablo 9’da gösterilmiştir.

Sperm sayısının kontrol grubuna göre anlamlı olmayan şekilde MTX grubunda azaldığı, MTX + *P. vulgaris* ve *P. vulgaris* gruplarında arttığı belirlendi. MTX grubuna göre MTX + *P. vulgaris* grubunda anlamlı olmayan, *P. vulgaris* grubunda anlamlı bir artış belirlendi. MTX + *P. vulgaris* grubuna göre *P. vulgaris* grubunda anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi.

Motilitenin kontrol grubuna göre MTX ve MTX + *P. vulgaris* grubunda azaldığı, *P. vulgaris* grubunda ise arttığı belirlendi. MTX grubuna göre MTX + *P.vulgaris* ve *P. vulgaris* gruplarında artış bir belirlendi. MTX + *P. vulgaris* grubuna göre *P. vulgaris* grubunda bir artış belirlendi. Motilitedeki bu değişimlerin anlamlı olmadığı gözlemlendi.

Vitalite, kontrol grubuna göre MTX, MTX + *P. vulgaris* ve *P. vulgaris* gruplarında azaldığı, bu azalışın MTX grubunda anlamlı olduğu belirlendi. MTX

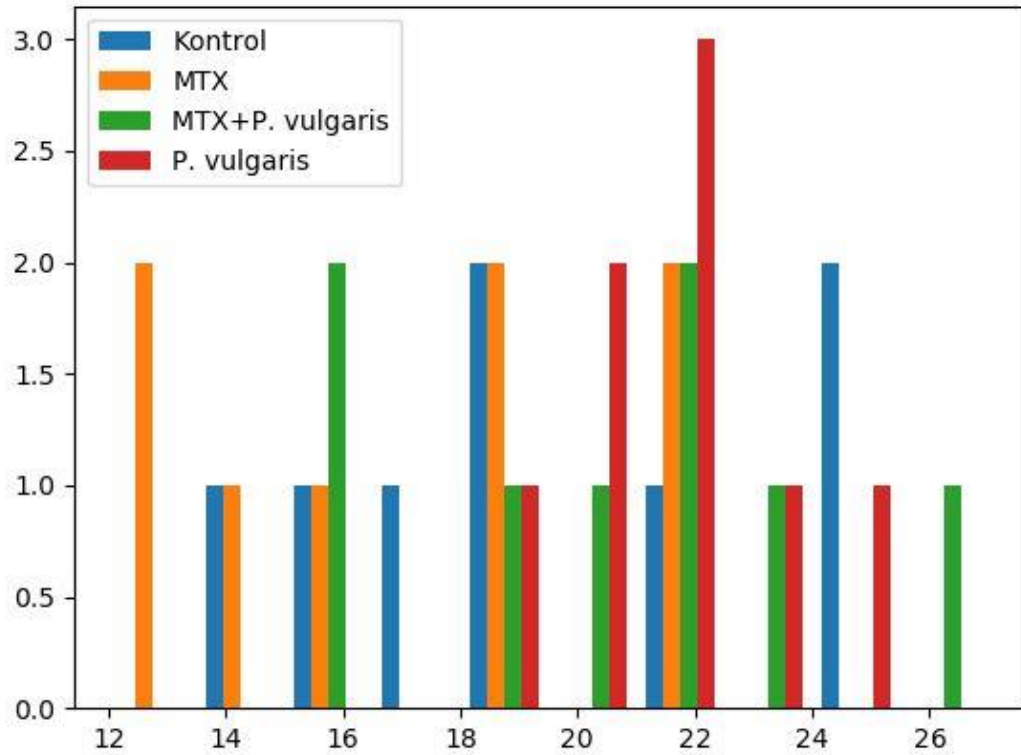
grubuna göre MTX + *P. vulgaris* ve *P. vulgaris* gruplarında arttığı ve bu artışın *P. vulgaris* grubunda anlamlı olduğu belirlendi. MTX + *P. vulgaris* grubuna göre *P. vulgaris* grubunda anlamlı olmayan bir artış belirlendi. Ayrıca, sonuçların dağılım grafiği Şekil 7, Şekil 8, Şekil 9’da gösterildi.

Tablo 9. Gruplardaki deneklerin sperm sayısı, motilite ve vitalite değerleri (n=32)

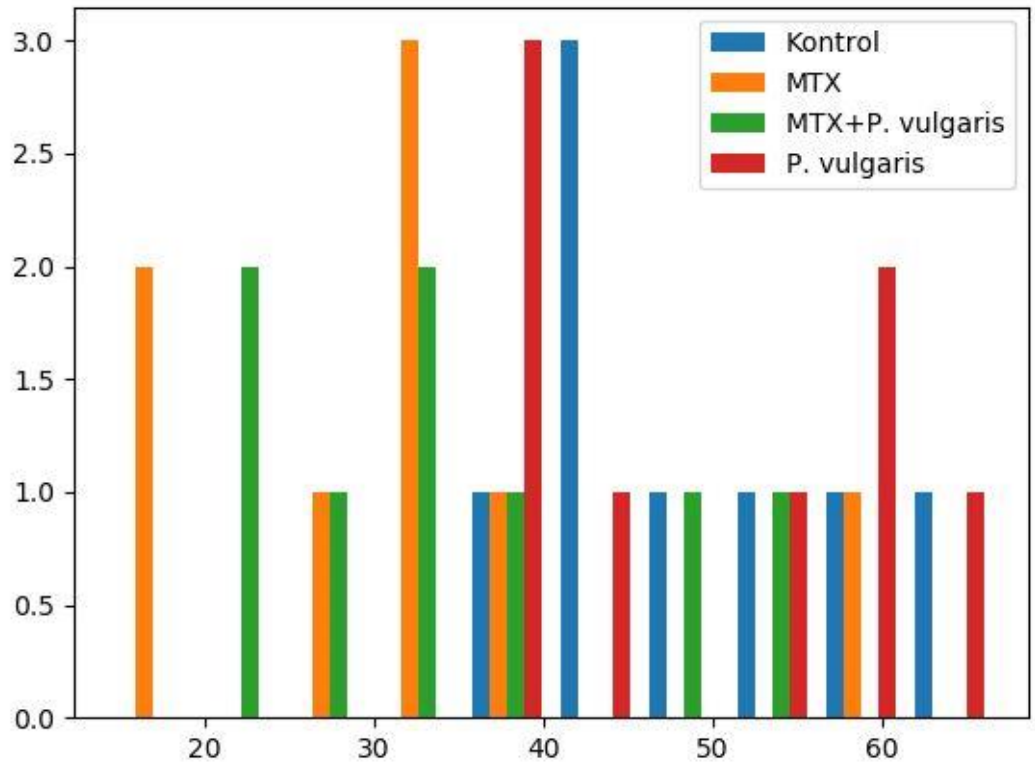
Gruplar	Sperm Sayısı ($\times 10^6$)	Motilite (%)	Vitalite (%)
Kontrol	19.12 $\pm$ 3.75	49.72 $\pm$ 9.60	61.50 $\pm$ 3.50
MTX	16.62 $\pm$ 3.92	30.95 $\pm$ 13.33	42.75 ^a $\pm$ 8.20
MTX + <i>P. vulgaris</i>	20.25 $\pm$ 3.91	34.41 $\pm$ 11.58	51.00 $\pm$ 7.55
<i>P. vulgaris</i>	21.25 ^b $\pm$ 1.90	49.87 $\pm$ 11.21	58.75 ^b $\pm$ 8.06

^aKontrol grubuna göre anlamlı farklılık vardır ($p < 0.05$).

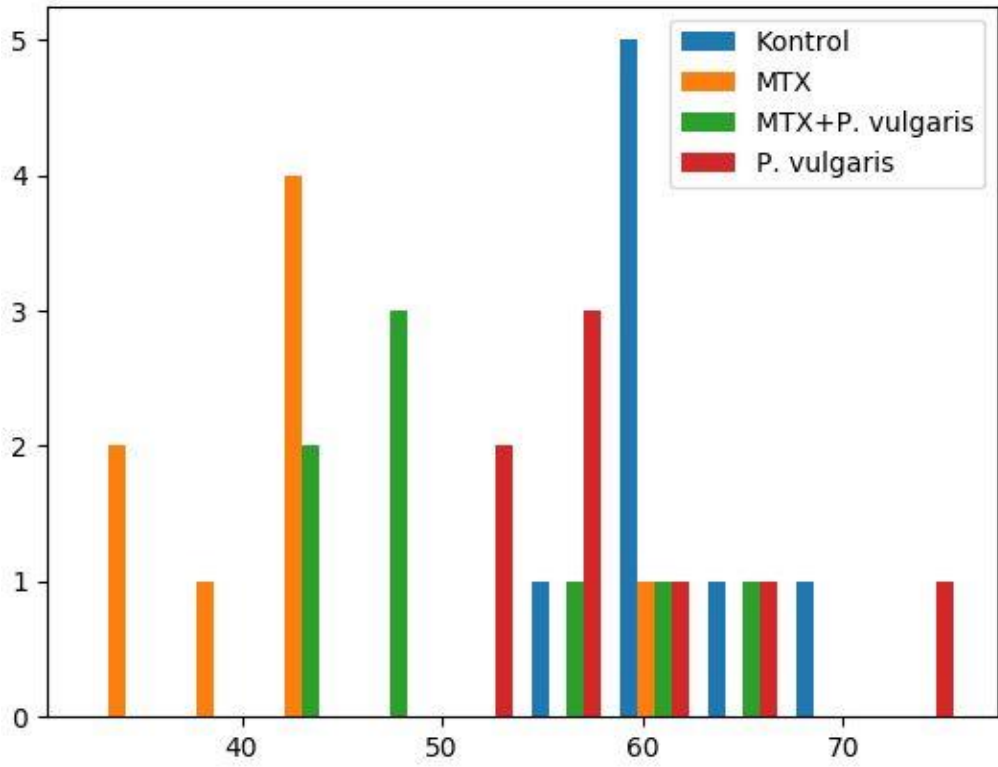
^bMTX grubuna göre anlamlı farklılık vardır ($p < 0.05$).



Şekil 7. Sperm sayısı bar grafiği [sperm sayısı (10^6) / denek sayısı]



Şekil 8. Motilite bar grafiği [motilite (%) / denek sayısı]



Şekil 9. Vitalite bar grafiği [Vitalite (%) / denek sayısı]

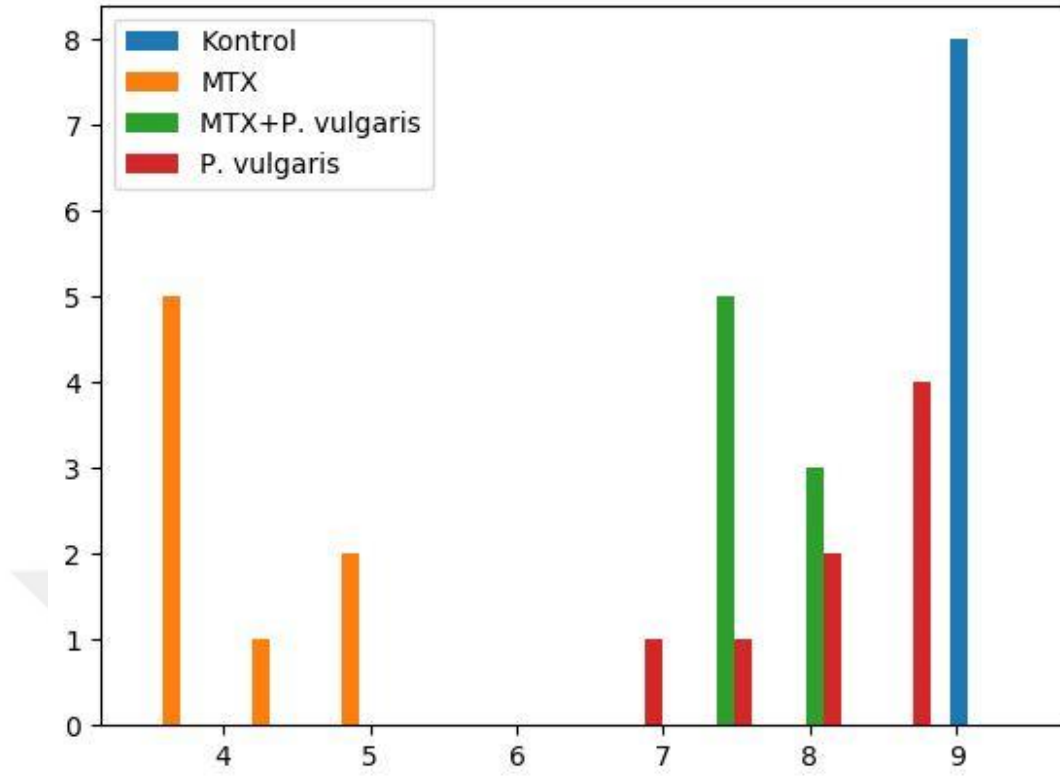
Çalışmaya ait grupların testis dokusunda; johnsen skrolama ve AI değeri belirlendi. Sonuçların istatistik değerdendirmesi Tablo 10'da belirtildi. Ayrıca, sonuçların gruplar bazında dağılımı Şekil 10 ve Şekil 11'de gösterildi. Johnsen skoru kontrol grubuna göre MTX, MTX + *P. vulgaris* ve *P. vulgaris* gruplarında azaldığı, bu azalışın yalnızca MTX grubunda anlamlı olduğu belirlendi. MTX grubuna göre MTX + *P. vulgaris* ve *P. vulgaris* gruplarında anlamlı olmayan bir artış belirlendi. MTX + *P.vulgaris* grubuna göre *P. vulgaris* grubunda anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi. AI değerdendirmesinde; kontrol grubuna göre MTX, MTX + *P. vulgaris* ve *P. vulgaris* gruplarında bir artış olduğu ve bu artışın MTX grubunda anlamlı olduğu belirlendi. MTX grubuna göre MTX + *P. vulgaris* ve *P. vulgaris* gruplarında anlamlı bir azalış belirlendi. MTX + *P.vulgaris* grubuna göre *P. vulgaris* grubunda anlamlı olmayan bir artış belirlendi. TUNEL tekniğiyle boyanmış olan testis dokuları Resim 8'de gösterildi.

Tablo 10. Gruplardaki deneklerin Johnsen Skrolaması ve apoptotik indeksi (AI) (n=32)

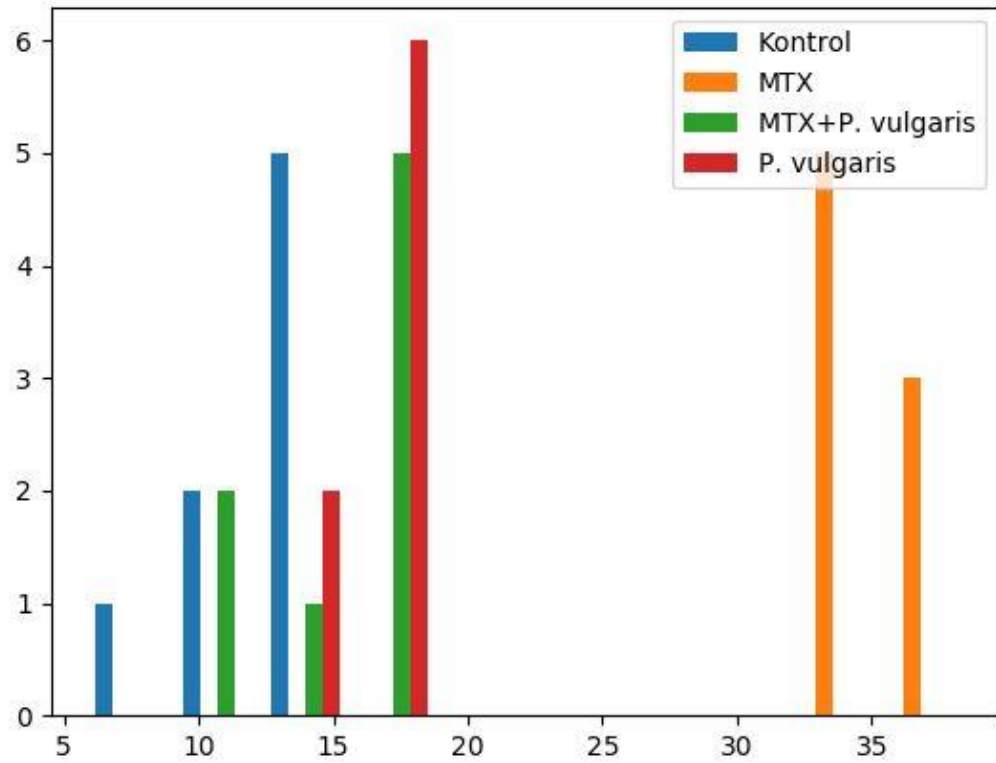
Gruplar	Johnsen Skrolama	AI (%)
Kontrol	9.38 ± 0.11	12.03 ± 3.11
MTX	4.12 ^a ± 0.62	34.7 ^a ± 2.10
MTX + <i>P. vulgaris</i>	7.7 ± 0.37	15.16 ^b ± 3.33
<i>P. vulgaris</i>	8.08 ± 0.73	15.81 ^b ± 1.73

^aKontrol grubuna göre anlamlı farklılık vardır (p < 0.05).

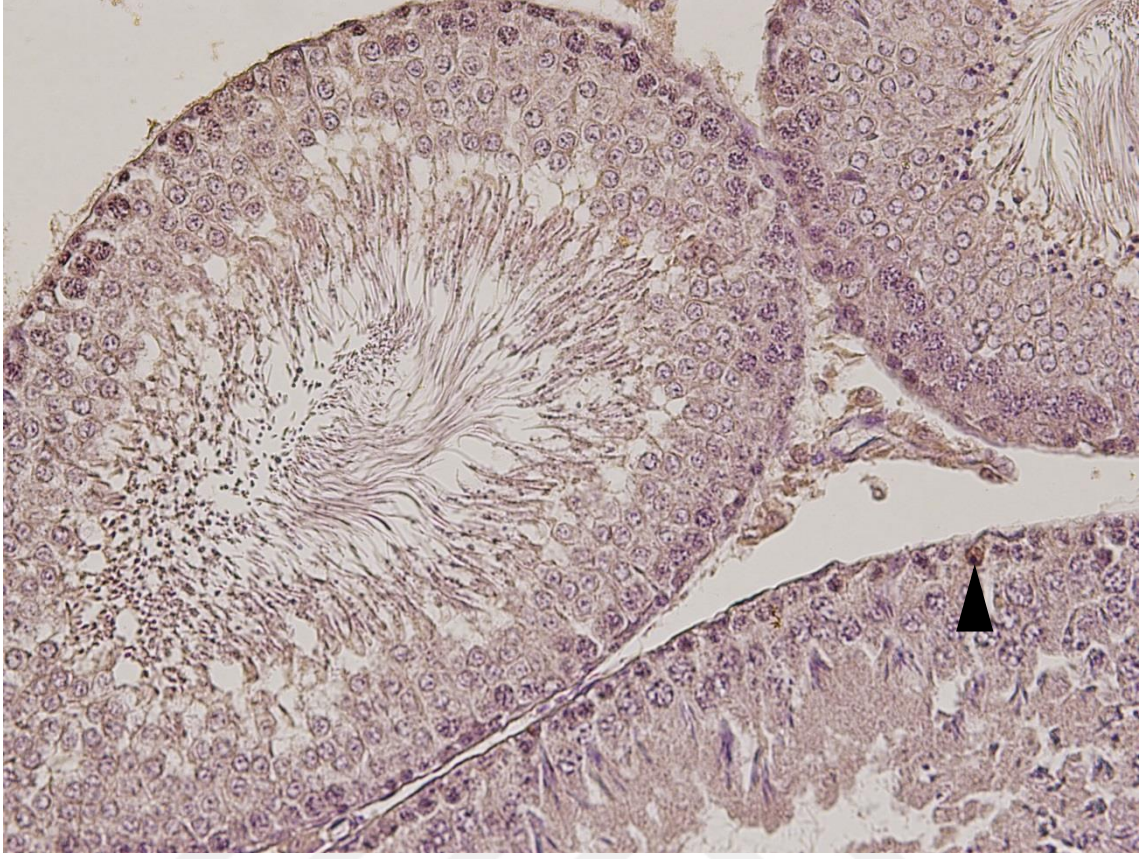
^bMTX grubuna göre anlamlı farklılık vardır (p < 0.05).



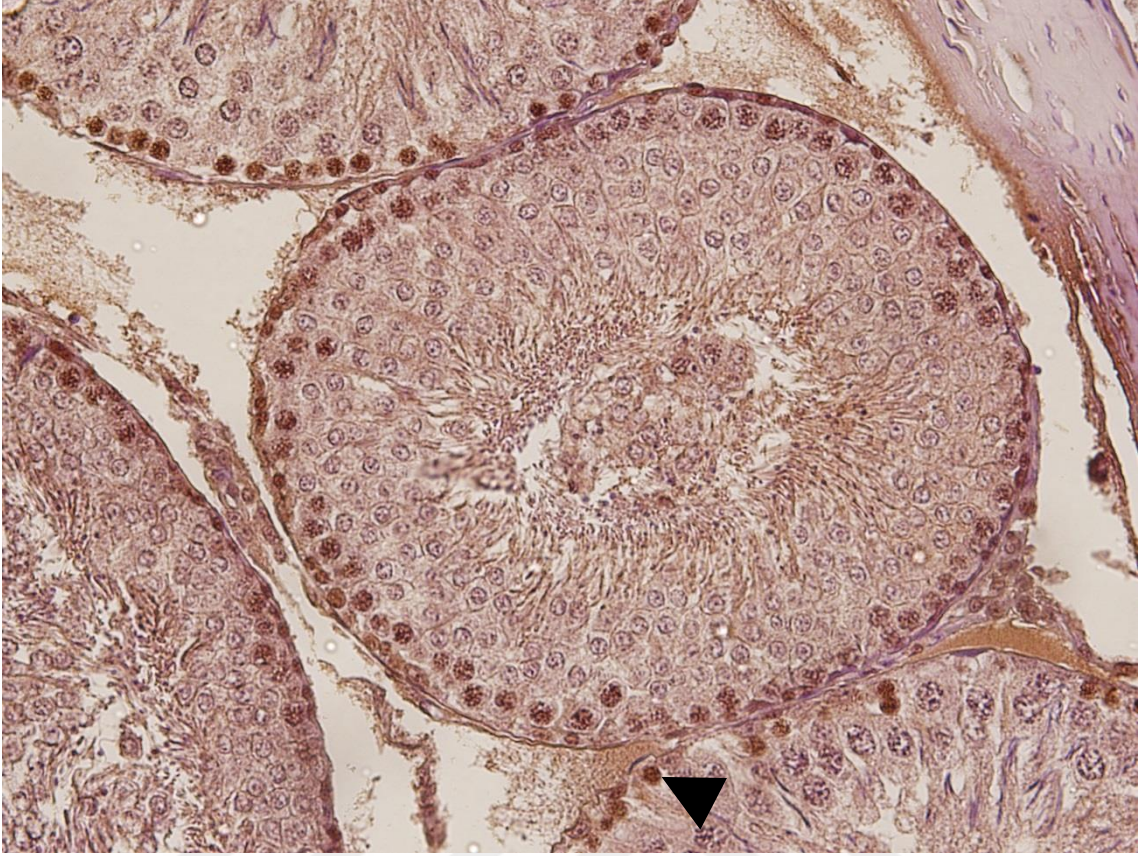
Şekil 10. Johansen Skorlama bar grafiği [Johansen Skorlama / Denek Sayısı]



Şekil 11. AI bar grafiği [AI (%) / Denek Sayısı]



Resim 8. Kontrol grubu testis dokusunda apoptotik görüntüler. ▲: Apoptotik hücre (DAB, X400)



Resim 9. MTX grubu testis dokusunda apoptotik görüntüler. ▲: Apoptotik hücreleri göstermektedir (DAB, X400)



Resim 10. MTX+ *P. vulgaris* grubu testis dokusunda apoptotik görüntüler. ▲: Apoptotik hücreyi göstermektedir (DAB, X400)



Resim 11. *P. vulgaris* grubu testis dokusunda apoptotik görüntüler. ▲: Apoptotik hücreyi göstermektedir (DAB, X400)

6.2. Biyokimyasal Bulgular

Testis dokusu üzerinde yapılan biyokimyasal analizlerin Mann-Whitney U testine göre incelenmesi sonucunda; MTX grubunda MDA değerinin kontrol grubuna göre arttığı, SOD ve KAT değerlerinin ise azaldığı bulundu. MTX + *P. vulgaris* grubunda MDA değerinin MTX grubuna göre azaldığı, SOD ve KAT değerlerinin ise arttığı gözlemlendi (Tablo 11).

Tablo 11. Testis dokusundaki biyokimyasal sonuçlar (n=32)

Gruplar	MDA (nmol/mg protein)	SOD (U/mg protein)	KAT (U/mg protein)
Kontrol	12.27 ± 1.89	1.86 ± 0.13	29.77 ± 4.60
MTX	15.38 ^a ± 1.97	1.24 ^b ± 0.12	19.10 ^b ± 5.08
MTX + <i>P. vulgaris</i>	14.08 ± 2.65	1.41 ^c ± 0.29	25.22 ± 9.72
<i>P. vulgaris</i>	12.60 ± 1.53	1.56 ^d ± 0.54	26.79 ± 8.40

^aMTX grubundaki değer kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (p < 0.05).

^bMTX grubundaki değer kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p < 0.05).

^cMTX + *Primula vulgaris* grubundaki değer kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p < 0.05).

^d*Primula vulgaris* grubundaki değer kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p < 0.05).

Kan plazmasında yapılan biyokimyasal analizlerin Mann-Whitney U testine göre değerlendirilmesi sonucu; kontrol grubuna kıyasla MTX grubunda MDA değerinin arttığı, SOD ve KAT değerlerinin ise azaldığı bulundu. MTX + *P. vulgaris* grubunda MDA değerinin MTX grubuna göre azaldığı, SOD ve KAT değerlerinin ise arttığı gözlemlendi (Tablo 12).

Tablo 12. Plazmadaki biyokimyasal sonuçlar (n=32)

Gruplar	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)	KAT (U/mL)
Kontrol	0.81 ± 0.41	4.47 ± 3.30	167.77 ± 1.00
MTX	1.03 ^a ± 0.01	2.38 ± 1.29	163.89 ± 2.92
MTX + <i>P. vulgaris</i>	0.88 ± 0.39	2.91 ± 2.62	166.24 ± 2.03
<i>P. vulgaris</i>	0.89 ± 0.15	2.46 ± 0.87	164.62 ± 4.59

^aMTX grubundaki değer kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (p < 0.05).

7. TARTIŞMA

Oksidatif hasar ve serbest radikal mekanizmalı reaksiyonlar yaşlanma, kanser, ateroskleroz ve diyabete neden olmaktadır. Doğal ürünlerde bulunan biyolojik aktif bileşiklerin bu hastalıkların oluşumuna yol açan oksidasyonu engelleyici ve serbest radikal mekanizmalı reaksiyonları önlediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bitkilerde bulunan çeşitli flavonoid, fenolik asit gibi bileşenlerden dolayı doğal antioksidan kaynağıdır. Bu nedenle son yıllarda oksidatif hasara karşı koruyucu rol oynadığından diyetle alınan antioksidanlara ve dolayısıyla doğal ürünlere karşı ilgi çok artmıştır (76).

“*P. vulgaris* ekstraktlarının biyolojik aktivitesinin incelenmesi ve fibroblast hücre serilerinde t-BHP ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksitesite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması” adlı projemizde *P. vulgaris* için farklı metodlar kullanılarak antioksidan kapasitesi ölçüldü. HPLC ile kompozisyon çalışması yapıldı. Farklı gram negatif ve gram pozitif bakteriler kullanılarak antibakteriyal özelliği araştırıldı. Fibroblast hücre serilerinde t-BHP ile uyarılmış DNA hasarı meydana getirilerek *P. vulgaris*’in etkinliği incelendi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre *P. vulgaris*’in içerdiği fenolik bileşikler ve flavonoidler sayesinde yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu bulundu (4). *P. vulgaris* bitkisinin içerdiği yüksek antioksidan, fenolik ve flavonoid içeriğinin testis hasarında koruyucu etkisinin olabileceği düşünüldü. Bu çalışmada deneysel olarak metotreksat ile testis hasarı oluşturulmuş sıçanlarda *P. vulgaris*’in antioksidan ve antiapoptotik etkileri incelendi.

Folik asit antimetaboliti olan MTX, çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılan bir antifolat bileşiktir. Kanser tedavisi yanı sıra romatoid artrit, şiddetli psoriasis ve psoriatik artrit tedavisinde de kullanılabilmektedir (77).

MTX, antiproliferatif ve antiinflamatuvar etkilere sahiptir. MTX antiproliferatif etkisini, folik asit redüktaza bağlanıp enzim aktivitesini inhibe ederek ve folik asitin tetrahidrofolata dönüşümünü engelleyerek gösterir. Dolayısıyla tetrahidrofolattan türetilen koenzimlerin görev aldığı tek karbon transfer reaksiyonları; nükleotid biyosentez reaksiyonları artık gerçekleşmez. Böylelikle DNA’nın sentezi ve hücresel replikasyon durmuş olur. MTX, sahip olduğu bu etki mekanizması ile anti-kanser ajan özelliği taşır. Antiinflamatuvar etkisini ise purin sentezinde rol oynayan 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid transformilaz (AICAR) enzimini inhibe ederek

ve antiinflamatuvar etkiye sahip adenosini arttırarak gösterir (78). Hücre içi ve dışında adenosin artışıyla proinflamatuvar sitokinlerin salınımı, apoptoz ve nötrofil göçü inhibe olur (79).

MTX tedavisinin en önemli yan etkileri doza bağlı olarak bulantı, kusma, ishal gibi gastrointestinal toksisite, hepatotoksisite ve hematolojik toksisitedir. 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 yarıda kesildiğini belirtmişlerdir (80).

MTX'in toksik etkisinin oksidatif stresle ilişkili olduğuna dair pek çok çalışma vardır. Moghadam ve arkadaşları, MTX kaynaklı karaciğer toksitesi ve oksidatif stresi turmerik ekstresinin azalttığını bulmuşlardır. MTX tedavisi sonucu karaciğerde meydana gelen sentrilobüler ve periportal dejenerasyon, portal ven hiperemisi, artmış inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve nekrozu turmerik ekstresinin (200 mg/kg) verilmesi bu bulguları azaltmıştır (81). Dadhania ve arkadaşlarının metotreksat kaynaklı intestinal hasara karşı α -lipoik asitin oksidatif stresi azalttığını bulmuşlardır (82).

Fizyolojik şartlarda insan vücudunda oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidan savunma bir denge halindedir. Aşırı ROS üretimi ya da antioksidan savunmanın azalması, oksidatif strese neden olarak biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara yol açabilir (83). Aşırı ROS üretimi, lipidlerde, proteinlerde ve DNA'da hasar oluşturur, böylece hücrenin normal fonksiyonlarının inhibisyonuna neden olur (84, 85).

MDA lipid peroksit düzeylerinin ölçülmesinde sık kullanılan ve lipid peroksidasyonunun derecesi ile çok iyi korelasyon gösteren bir parametredir (86). Literatürde MTX kullanılarak MDA aktivitesinin arttığını gösteren pek çok çalışma vardır. Hemeidan ve arkadaşlarının sıçanlarda MTX'e bağlı hepatik oksidatif hasarın curcumin verilmesiyle azalttığının gösterildiği çalışmalarında (87), Devrim ve arkadaşlarının sıçan böbreğinde yaptıkları çalışmada (88), Ciralik ve arkadaşlarının sıçan barsak dokusunda yaptıkları çalışmada (89) MTX'in MDA seviyesini artırdığını belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada kontrol grubuna kıyasla MTX grubunda testis dokusu ve kan plazmasında MDA değerinin arttığını belirledik. Buna karşılık MTX + *Primula vulgaris* grubunu MTX grubu ile karşılaştırdığımızda MTX + *P. vulgaris*

grubunda MDA düzeylerinin azaldığını gördük. Elde ettiğimiz verilere göre *P. vulgaris* 'in MTX'in neden olduğu sistemik oksidatif hasarda lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki yaptığı sonucunu çıkarabiliriz.

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidan maddeler, bu mekanizmaya da antioksidan savunma denir. Belirli bir düzeye kadar olan oksidan molekül artışı, vücutta bulunan doğal antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilmektedir (90). Antioksidan savunma katalaz, SOD, mitokondriyal sitokrom oksidaz, glutatyon S-transferaz, glutatyon peroksidaz enzimleri aracılığıyla olursa enzimatik antioksidan savunma; tokoferol, askorbik asit vb. maddelerle olursa nonenzimatik antioksidan savunma olarak tanımlanır (91). SOD; süperoksidin, hidrojen peroksid ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen endojen antioksidan bir enzimdir. KAT ise SOD'un meydana getirdiği H_2O_2 'i peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar. Asci ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, sıçanlarda MTX kullanımı ile böbrek ve karaciğer dokusunda MDA düzeyinin arttığı, SOD ve KAT aktivitelerinin azaldığı; tedavi olarak misoprostol eklendiğinde ise MDA düzeyinin azaldığı, SOD ve KAT aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir (92). Çetin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sıçanlara MTX verilmesinin karaciğer dokusunda MDA düzeylerini artırdığını, SOD, KAT ve glutatyon peroksidaz düzeylerini belirgin olarak azalttığını bulmuşlardır. Propolis eklenmesinin ise MTX alan sıçanların karaciğerinde MDA düzeyini azalttığını ve glutatyon peroksidaz seviyelerini anlamlı olarak artırdığını belirtmişlerdir (93). Vardı ve arkadaşları, metotreksat kaynaklı intestinal hasara karşı β -karoten ve kayısının antioksidan özelliklerini incelemişlerdir. MTX ile MTX + β -karoten ve MTX ile MTX + kayısı grubu karşılaştırıldığında β -karoten ve kayısı tedavisi alan gruplarda MTX grubuna göre MDA ve miyeloperoksidaz düzeyinin azaldığını; SOD, KAT ve GSH düzeyinin arttığını ifade etmişlerdir (94). Vardı ve arkadaşları, sıçanlarda MTX'in anlamlı derecede lipid preoksidasyonunu başlattığı, antioksidan aktiviteyi azalttığı ve böbrek dokusunda glomeruloskleroz ve apoptoz gibi anlamlı histolojik harabiyet meydana getirdiğini belirtmişlerdir. Ancak kayısının MTX'in toksik etkisini anlamlı derecede önlediğini, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon düzeylerini artırdığını ve malondialdehid düzeylerini azalttığını bulmuşlardır (95). Sekeroğlu ve arkadaşları, fare

kemik iliğinde quersetin ve *Viscum album* L. ekstresinin MTX kaynaklı sitogenotoksititeye karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır (96). El Boghdady, yaptığı çalışmada MTX kaynaklı ince bağırsak harabiyetine karşı kabak çekirdeği yağı ve ellagik asit verilen sıçanlarda ince bağırsak harabiyeti ve prostaglandin E2, malondialdehid, nitrik oksit düzeylerinin azaldığını, glutasyon düzeyinin ise arttığını bulmuştur (97). Yüncü ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, MTX verilen sıçanların jejunal dokularında harabiyet meydana geldiğini, plazmada malondialdehid ve laktat düzeylerinin arttığını; MTX ile jejunal dokularında harabiyet meydana gelen sıçanlara sarımsak ekstresi verildiğinde ise bu bulguların önemli ölçüde düzeldiğini bulmuşlardır (98). Tabassum ve arkadaşları, karaciğer mitokondrisinde metotreksat kaynaklı oksidatif strese karşı lipoik asitin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Metotreksat'ın mitokondrial lipid peroksidasyonunda (LPO), protein karbonil (PC) miktarında ve süperoksit radikali üretiminde artışına neden olduğunu bulmuşlardır. 35 mg/kg lipoik asit verilen farelerde LPO, PC ve süperoksit radikal üretiminin anlamlı derecede azaldığını bulmuşlardır (99). Çetinkaya ve arkadaşları sıçanlarda MTX kullanımı ile karaciğer dokusunda MDA düzeyinin arttığını, SOD ve katalaz aktivitelerinin azaldığını, tedavi olarak N-asetil sistein eklenmesi ile bunların normal düzeylere çekildiğini ifade etmişlerdir (100). Garipardıç ve arkadaşları sıçanlarda MTX'in indüklediği özofageal hasar modelinde, MTX grubu ratlarda SOD ve katalaz aktivitelerinin anlamlı derecede düşük olduğunu saptamışlardır (101). Yuluğ ve arkadaşları bir antioksidan olan resveratrol'ün MTX'e karşı testis yıkımı için koruyucu etkileri in vivo olarak araştırmışlar ve ratlar 4 gruba bölmüşlerdir (kontrol, resveratrol, MTX, MTX+resveratrol). MTX grubunda plazma ve dokuda MDA seviyesi yüksek, SOD ve katalaz aktivitelerini kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulmuşlardır. MTX+resveratrol grubunda ise plazma ve dokuda MDA seviyeleri düşerken SOD aktivitesini önemli derecede yüksek bulmuşlardır. Testis biyopsi skor değerlerini MTX grubundan daha yüksek bulmuşlardır. Bu sonuçlardan yola çıkarak resveratrol antioksidanının koruyucu etkinliği olabileceğini ifade etmişlerdir (102). Dagguli ve arkadaşları MTX kaynaklı testis hasarı oluşturulan sıçanlarda bulunan yükselmiş MDA, total oksidan kapasite, oksidatif stres indeksi değeri, carvatrol verilen sıçanlarda bu parametrelerin azaldığı ayrıca total antioksidan kapasite değerinin arttığını bulmuşlardır. Carvatrolun MTX ile birlikte kullanıldığında germ hücrelerini oksidatif stres ve

apoptozden koruyabildiğini belirtmişlerdir (103). Yüncü ve arkadaşları, sıçanların testis dokusunda MTX'in meydana getirdiği hasara karşı Vitamin E ve L-karnitin'in hasarın şiddetini anlamlı derecede azalttığını bulmuşlardır (104).

Yaptığımız bu çalışmada SOD ve KAT değerleri, MTX grubunda kontrol grubuna göre azalmış, MTX + *P. vulgaris* grubunda ise MTX grubuna kıyasla artmıştır. Bulgularımız MTX'in lipid peroksidasyonu ve doku hasarına neden olarak MDA değerini artırdığını, buna paralel olarak SOD ve KAT değerlerini düşürdüğünü; *P. vulgaris*'de bulunan polifenollerin muhtemelen lipid peroksidasyonunu ve MDA değerlerini azaltarak, SOD ve KAT gibi antioksidan enzimleri artırarak koruyucu etki yaptığını göstermektedir.

Sönmez ve arkadaşları; MTX grubunda seminifer epitelde vakuolizasyon, germinal hücrelerde düzensizlik, seminifer tübül lümenine olgunlaşmamış germinal hücre dökülmesi ve bazı seminifer tübüllerde atrofi gözlemlemişlerdir (105). Saxena ve arkadaşları; kronik olarak düşük doz uyguladıkları MTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede testis dokusunda interstisyel alanda artma ve seminifer tübül çapında azalma, büyüklükleri değişen şekilde primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatidler, spermatositler arasında vakuolizasyon, Sertoli ve Leydig hücresi boyutlarında önemli ölçüde azalma ve bazal membranda yer yer incelme ve düzensizlik belirlemişlerdir (106). Bükücü; testis dokusunda yaptığı hasar skoru değerlendirmesine göre MTX'in dokuda belirgin bir hasara yol açtığını gözlemlemişlerdir (107). Oktar ve arkadaşları, farelere ilk gün 10 mg/kg doz MTX uygulamasıyla oksidatif stresin arttığını belirleyerek seminifer tübüllerde atrofi, vakuolizasyon ve hücresel deskuamasyon gözlemlemişlerdir (108).

Biz de çalışmamızda, MTX grubunda kontrol grubuna göre seminifer tübül çapında anlamlı bir azalma bulduk. MTX + *P. vulgaris* grubunda MTX grubuna göre seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı anlamlı şekilde arttığı belirlendi. Lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı, MTX + *P.vulgaris* grubunda MTX grubuna göre anlamlı olmayan şekilde azaldığı belirlendi. *P. vulgaris* grubunda MTX grubuna göre seminifer tübül çapının anlamlı şekilde arttığı görüldü. *P. vulgaris* grubunda MTX grubuna göre, lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısının anlamlı şekilde azaldığı görüldü.

Padmanabhan ve arkadaşları, fareler üzerinde yaptıkları çalışmada MTX'in sperm sayısını azalttığını ve anormal başlı spermilerin oranında arttığını gözlemlemişlerdir (109). MTX grubunda kontrol grubuna göre sperm sayısı ve motilite değerlerinin anlamlı olmayan şekilde azaldığı; vitalitenin ise anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi. Çalışmamızda MTX + *P. vulgaris* grubunda MTX grubuna göre sperm sayısı, motilite ve vitalite değerlerinin arttığı görüldü. *P.vulgaris* grubunda MTX grubuna göre sperm sayısı ve vitalite oranı anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi.

Apoptoz, sağlıklı doku oluşumu ve gelişiminin sürdürülmesinde rol oynayan önemli bir mekanizmadır. Genetik olarak kontrol altındaki hücrelerin kendi kendini yok ettiği programlı hücre ölümü şeklidir (46). Deri, barsakvepiteli, kan hücreleri gibi hücre yenilenmesinin hızlı olduğu dokularda yaşanan hücreler apoptosis mekanizması ile ortadan kaldırılırlar. Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde; fetusun implantasyonundan organogeneze kadar tüm gelişim sürecinde apoptoz rol oynar. Embriyolojik süreçte; parmak aralarındaki zarın, sinir sisteminde istenmeyen nöronların ortadan kaldırılmasında apoptoz rol oynamaktadır. Kadınlarda menstrual siklusta endometriyal hücre yıkımı, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin küçülmesinde apoptosis görev yapar. Ayrıca bağışıklık sistemi hücrelerinin seçiminde de apoptozis önemli rol oynamaktadır (47).

Testis doku hasarının değerlendirilmesinde AI ve Johnsen skorlaması önemli parametrelerdir. Sönmez ve arkadaşları, testis dokusu üzerinde MTX grubunda kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayılarının arttığını, Johnsen skorlamasının ise anlamlı şekilde azaldığını belirlemişlerdir (105).

Johnsen skoru değerlendirmesinde MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı, MTX + *P. vulgaris* grubunda MTX grubuna göre anlamlı olmayan şekilde arttığı belirlendi.

AI değerinin MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, MTX + *P. vulgaris* grubu ile *P. vulgaris* gruplarında MTX grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi.

Bu araştırma sonucunda elde ettiğimiz bulgular, sıçanlarda MTX'in testis fonksiyonunu bozduğunu ve *P. vulgaris* L.'nin sulu ekstraktının bu hasarı önlemede olumlu etki yaptığını göstermektedir. Bu konuda daha kesin sonuçların elde

edilebilmesi için farklı ekstrak konsantrasyonları ve zaman denemeleri ile daha ileri çalışmalar yapılabileceği kanaatindeyiz.



8. SONUÇ ve ÖNERİLER

8.1. Sonuçlar

MTX'in sıçan testisi üzerine *P. vulgaris* L.'nin antioksidan ve antiapoptotik etkilerini incelediğimiz bu çalışmanın sonuçları şöyledir:

1. Testis dokusunda MTX grubunda kontrol grubuna göre seminifer tübül çapı, epitel kalınlığı sperm sayısı, motilite, vitalite ve johnsen skorlama değerlerinin azaldığı; lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı ve AI'nın arttığı belirlendi.
2. Testis dokusunda MTX + *P. vulgaris* grubunda MTX grubuna göre seminifer tübül çapı, epitel kalınlığı, sperm sayısı, motilite, vitalite ve johnsen skorlama değerlerinin arttığı; lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı ve AI'nın azaldığı belirlendi.
3. Testis dokusu ve kan plazmasında kontrol grubuna göre MTX grubunda MDA değerinin arttığı, SOD ve KAT değerlerinin azaldığı bulundu.
4. Testis dokusu ve kan plazmasında MTX + *P. vulgaris* grubunda MTX grubuna göre MDA değerinin azaldığı, SOD ve KAT değerlerinin ise arttığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, elde edilen veriler MTX'in testis dokusu üzerinde oksidatif hasar oluşturduğunu, *Primula vulgaris*'in ise bu hasarın önlenmesinde etkili olabileceğini göstermektedir.

8.2. Öneriler

1. MTX ilacı ile oluşturulacak testis hasarının yanı sıra karaciğer, böbrek gibi diğer organlarda oluşturulacak hasarın antioksidan, antiapoptotik ve sitotoksik etkileri incelenebilir.
2. MTX ya da hasar oluşturabilecek farklı bir ilacın doza bağımlı olarak metabolik etkileri incelenebilir.
3. Testis hasarı oluşturabilecek farklı bir ilaç denenerek deney tekrarlanabilir ve iki ilacın etkinlikleri ve metabolik etkileri karşılaştırılabilir.

9. KAYNAKLAR

1. Peter B, Bernard L. (2008). World Cancer Report 2008. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.
2. Gultekin M, Ozgul N, Olcayto E, Tuncer M (2011). Kanser ve Kanser Risk Faktörleri Hakkında Türk Halkı'nın Bilgi Düzeyinin Ölçülmesi Araştırması. Turk J Obstet Gynecol. Cilt: 8 Sayı: 1: 57- 61.
3. 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.
4. Ozkan MT, Aliyazicioglu R, Demir S, Mısır S, Turan I, Yildirmis S, Aliyazicioglu Y (2016). Phenolic characterisation and antioxidant activity of *Primuva vulgaris* and its antigenotoxic effect on fibroblast cells. Jundishapur J Nat Pharm Prod. doi: 10.17795/jjnpp.40073.
5. Moore KL, Persaud TVN (2002). Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Altıncı Baskı. Çevirenler: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul, 323-330.
6. Sadler TW (1995). Langman's Medikal Embriyoloji. Onbirinci Baskı. Çeviren: Başaklar AC, Palme Yayıncılık, Ankara, 246-250.
7. Şeftalioğlu A. (1998) Genel & Özel İnsan Embriyolojisi. Üçüncü Baskı. Tıp ve Teknik Yayıncılık, Ankara; 346-380.
8. Cumhur M, Yener N, Tuncel M (2001). Fonksiyonel Anatomi. Birinci Baskı, Metu Press Yayınları, Ankara; 287-292.
9. Junquera CL, Carneiro J, Kelley RO (1998). Basic Histology: Çeviren: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahıskalı B, Barış Kitabevi, Adapazarı, 407-419, 431-433.
10. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (2003). Robbins Temel Patoloji. Çeviren: Çevikbaş U. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 172-195.
11. Gartner LP, Hiatt JL (2001). Color Textbook of Histology. İkinci Baskı. WB Saunders Company, Philadelphia; 487-508.
12. Erkoçak A (1990). Özel Hisyoloji Genital Sistem. İkinci Baskı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara; 166-194
13. Tekelioğlu M (2002). Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme. Birinci Baskı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. Ankara; 231-244

14. Kierszenbaum AL (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş. Çeviren: Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara, 532-564
15. Ross MH, Pawlina W (2006). Histology- A Text ana Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. Beşinci Baskı. Lippincott Williams and Wilkins, Philedelpdhia.
16. Henrikson RC, Kaye GI, Mazurkiewicz JE (1997). NMS Histology. Birinci Baskı. Lippincott Williams and Wilkins, Philedelpdhia.
17. Guyton AC, Hall JE (1996). The textbook of Medical Physiology Guyton and Hall. Dokuzuncu Baskı Çeviren: Çağlayan B, Nobel Kitapevleri, İstanbul, 432-567.
18. Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, Ilgaz C (2008). Genel Histoloji. Üçüncü Baskı. Hatipoğlu Kitabevi Yayınevi, Ankara.
19. Simone F, Adrienne MG, Osamu H, Afshin S (2010). Cellular stres responses: Cell survival and cell death. Int J Biochem Cell Biol. Volume 2010: 23.
20. Özdamar S, Sorkun H (2002). Genel Embriyoloji. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Kayseri; 4-6.
21. Netter FH, Ovalle WK, Nahirney PC (2009). Temel Histoloji. Çeviren: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P, Güneş Kitabevleri, Ankara, 377-398.
22. Lowe JS, Alan SA (1997). Human Histology. İkinci Baskı. Mosby, Barcelona; 310-319.
23. Erbeni T (1990). Histoloji. İkinci Baskı. Güneş Kitabevi Yayınları, Ankara; 153-190.
24. 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.
25. Samali A (2007). Apoptosis: a mapped path to cell death. J Cell Mol Med 11 (6): 1212-1213.
26. Akkus İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Turk J Biochem 2: 1-60
27. Aydılek N, Aksakal M (2003). Testesteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. VAN VET J. 14: 22-25.

28. Vincent HK, Taylor AG (2006). Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes* 30: 400-418.
29. Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet*: 344: 721-725.
30. Schuyler M, Berns EM (1999). Is TP53 dysfunction required for BRCA1 associated carcinogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 155: 143-152.
31. Uysal M (1998). Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengesini etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 11: 336-341.
32. Slater TF (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222: 1-15.
33. 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.
34. Somuncu S, Çakmak 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.
35. Qanungo S, Sen A, Mukherjee M (1999). Antioxidant status and lipid peroxidation in human foeto-placental unit. *Clin Chim Acta* 285: 1-12.
36. Freeman BA, Crapo JD (1982). Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab. Invest* 4: 412-426.
37. Cross CE, Halliwell B, Borish E (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*. 107: 526-545.
38. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*: 6(3-4): 92-95.
39. Yanbeyi S (1999). Aspirin ve antioksidant butylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun.
40. Kohen R, Nyska A (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*: 30(6): 620-650.
41. Gutteridge JM (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41: 1819-1828.

42. 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.
43. Erden M (1992). Serbest redikaller. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 12: 201-207.
44. 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* 228: 995-1003.
45. Carmody RJ, Cotter TG (2001). Signalling apoptosis: a radical approach, *Redox Rep* 6: 77-90.
46. Brooks SA, Hannah LB, Kinch C, Nash G, Kieda C (2009). Altered cell surface glycosylation function in mechanisms of cancer cell metastasis. *AUJST-A* 10 1: 91-101.
47. Tomatır AG (2003). Apoptoz: Programlı hücre ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri* 23: 499-508.
48. Peter CA, Frank MB, Stacey B, Susan MB (2006), *General Principles of Chemotherapy, Principles and Practice of Pediatric Oncology*, Beşinci Baskı. Lippincott Williams Wilkins, Philedelphia 318-322.
49. Şendur N, Karaman G, Şavk H, Şahinkarakaş E (2002). Akut metotreksat toksisitesinin erken belirtisi; Deri ülserleri. *T Klin Tıp Bilimleri* 22: 593-596.
50. Totan M, Ak AR, Albayrak D (1999). Yüksek doz Metotreksat Tedavisine Bağlı Karaciğer ve Böbrek Toksisitesi. *T Klin J Pediatr* 8: 185-188.
51. Kayaalp O (1998). *Tıbbi Farmakoloji*. Onuncu Baskı Hacettepe Taş Yayınları, Ankara; 388-393.
52. Goto E, Tomojiri S, Okamoto I (2001). Methotrexate poisoning with acute hepatorenal dysfunction. *Clinical Toxicology* 39: 101-104.
53. 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.
54. Mizuhiro M, Ito K, Mii M (2001). Production and Characterization of Interspecific Somatic Hybrids between *Primula malacoides* and *P. obconica*, *Plant Science*, 161: 489-496.

55. Mast AR, Kelso S, Richards J, Lang DJ, Feller DMS, Conti E (2001). Phylogenetic Relationships in *Primula* L. and Related Genera (Primulaceae) Based on Noncoding Chloroplast DNA, *Int. Journal Plant Science* 162 (6): 1381-1400.
56. Kandemir A, Beyazoğlu O (2002). Köse Dağları'nın (Gümüşhane) Tıbbi ve Ekonomik Bitkileri. *SDÜ Fen Bil Enst Der* 6 (3): 148-157.
57. Lamond J (1978). In Edit. by Davis P. H., *Flora of Turkey and The East Aegean, Islands* 6: 112-120.
58. Baytop T (1999). *Therapy with Medicinal Plants in Turkey*, University of Istanbul, Istanbul; 273.
59. Prajapati DN, Knox JF, Emmons J, Saeian K, Csuka ME, Binion DG (2003). Leflunomide Treatment of Crohn's Disease Patients Intolerant to Standard Immunomodulator Therapy, *J Clin Gastroenterol* 37 (2): 125-133.
60. Davis PH (1978). *Flora of Turkey and the EastAegean Islands. Vol. 6*, Edinburg Univ. Press, Edinburg, 111-118.
61. Tanker M., Tanker, N (1990). *Farmakognozi. Cilt.2. Ankara Üniv. Eczacılık Fakültesi Yayınları No:65*, Ankara.
62. Yoğunoğlu, A (2011). Tunceli ekonomik değeri olan bitkiler raporu, "Sektörel Araştırmalar Serisi 5". Fırat Kalkınma Ajansı.
63. Avcı M (2005). Çeşitlilik ve endemizm açıdan Türkiye'nin bitki örtüsü. *Coğrafya Dergisi. İstanbul*; 13: 27-55.
64. Nakipoğlu M (1993). Bazı Adaçayı (*Salvia*) Türleri ve Bu Türlerin Ekonomik Önemi. *Buca Eğitim Fakültesi, Fen Bil. Eg. Bölümü, İzmir*; 6: 45-51.
65. Kan Y, Kartal M, Arslan S, Altun L, Endes Z (2005). Farklı Dozlarda Uygulanan Organik Gübrenin Oğulotu (*Melissa officinalis* L.) nun Verim ve Kalitesi Üzerine Etkisi. *Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, Antalya, 5-9 Eylül 2005*, 1: 501-504.
66. Demir R, Yilmazer S, Ozturk M, Ustunel İ, Demir N, Korgun ET, Akkoyunlu G (2001). *Histolojik Boyama Teknikleri. Palme Yayıncılık, Ankara*; 9-10.
67. Potten CS, 1996. What is an apoptotic index measuring? A commentary. *Br J Cancer* 74 (11): 1743-1748.
68. Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271.

69. Yagi K (1994). Lipid peroxides a related radicals in clinical medicine free radicals in diagnostic medicine, Plenum Press, New York; 1-15.
70. Goth L (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chem 34: 497.
71. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 34: 497.
72. 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.
73. Rodríguez-Fdez I, Canosa A, Mucientes M, Bugarín A, (2015). STAC: A web platform for the comparison of algorithms using statistical tests. Proceedings of the 2015 IEEE International Conference on Fuzzy Systems (FUZZ-IEEE).
74. Friedman M (1937). The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. Journal of the American Statistical Association 32: 674–701.
75. Holm OJS (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scandinavian Journal of Statistics 6: 65–70.
76. Alasalvar vd., 2003; Chung vd., 1998; Cassidy vd., 2000; Cai vd., 2006; Shahidi vd., 1995; Rice-Evans vd., 1997; Cao vd., 1997; Lien vd., 1999
77. Santos MA, Enyedy EA, Nuti E, Rossello A, Krupenkoc NI, Krupenkoc SA (2007). Methotrexate α -hydroxamate derivatives as potential dual target antitumor drugs, Bioorganic & Medicinal Chemistry 15: 1266–1274.
78. Kavala M, Türkoğlu Z, Özlü E (2014). Metotreksat ve dermatolojide klinik kullanımları. Göztepe Tıp Dergisi 29(2): 104-110.
79. Dutz JP, Ho VC (1998). Immunosuppressive agents in dermatology: an update. Dermatol Clin 16(2): 235-250.
80. 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.
81. 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): 477-483.

82. Dadhaniaa VP, Tripathi DN, Vikramb A, Ramarao P, Jena GB (2010). Intervention of -lipoic acid ameliorates methotrexate-induced oxidative stress and genotoxicity: A study in rat intestine. *Chemico-Biological Interactions* 183: 85–97.
83. Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I (2004). Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 207: 3221–3231.
84. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD, Mazura M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44–84.
85. 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: 567-579.
86. Halliwell B (1989). Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions, *Acta Neurology Scandinavia* 126: 23-33.
87. Hemeida RAM, Mohafez OM (2008). Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats. *Journal of the Egyptian Nat.* 20(2): 141-148.
88. Devrim E, Cetin R, Kiliçoglu B, Ergüder BI, Avci A, Durak I (2005). Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Ren Fail* 27(6): 771-773.
89. Ciralik 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): 1086-1092.
90. Mates JM, Perez-Gomez C, Nurez de Castro I (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 328: 595-603.
91. 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: 44-84.
92. Asci H, Ozer MK, Calapoglu M, Savran M, Oncu M, Yesilot S, Candan IA, Kulac E, Cicek E (2011). Effects of Misoprostol on Methotrexate-Induced Hepatic and Renal Damages. *J Bio Life Sci* 2(1): 32-37.
93. Çetin A, Kaynar L, Eser B, Karadağ C, Saraymen B, Öztürk A, Koçyiğit İ, Kabukçu Hacıoğlu S, Çiçek B, Silici S (2011). Beneficial Effects Of Propolis On Methotrexate-Induced Liver Injury In Rats. *Acta Oncol Tur* 44(1): 18-23.

94. Vardi N, Parlakpınar H, Ozturk F, Ates B, Gul M (2008). Potent protective effect of apricot and carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology* 46(9): 3015-3022.
95. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Otlı 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): 371-381.
96. Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu 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): 56-59.
97. El-Boghdady NA (2011). Protective effect ellagic acid and pumpkin seed oil against methotrexate-induced small intestine damage in rats. *Indian J Biochem Biophys* 48(6): 380-387.
98. Yüncü M, Eralp A, Çelik A (2006). Effect of aged garlic extract against methotrexate-induced damage to the small intestine in rats. *Phytother Res.* 20: 504-510.
99. Tabassum H, Parvez S, Pasha ST, Banerjee BD, Raisuddin S (2010). Protective effect of lipoic acid against methotrexate-induced oxidative stress in liver mitochondria. *Food Chem Toxicol* 48(7): 1973-1979.
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): 274-278.
101. Garipardic M, Bakan V, Davutoğlu M, Sayar H, Kurutaş EB (2010). Oxidative stress and protective effect of erythropoietin on methotrexate-induced esophageal damage. *J Pediatr Hematol Oncol* 32: 108-112.
102. Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Kahraman C (2013). Effects of Resveratrol on Methotrexate-Induced Testicular Damage in Rats. *ScientificWorldJournal* 2013: 489659.
103. Daggulli M, Dede O, Utangac MM, Bodakci MN, Hatipoglu NK, Penbegul N (2014). Protective effects of carvacrol against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. *Int J Clin Exp Med* 7 (12): 5511-5516.

- 104.** Yüncü M, Bükücü N, Bayat N, Sencar L, Tarakçıoğlu M (2015). The effect of vitamin E and L-carnitine against methotrexate-induced injury in rat testis. *Turk J Med Sci* 45: 517-525.
- 105.** Sonmez MF, Çilenk KT, Karabulut D, Unalmış S, Deligonul E, Ozturk İ, Kaymak E (2016). Protective effects of propolis on methotrexate-induced testis injury in rat. *Biomed & Pharmacother* 79: 44-51.
- 106.** Saxena AK, Dhungel S, Bhattacharya S, JHA CB, Srivastava AK (2004). Effect of chronic low dose of methotrexate on cellular proliferation during spermatogenesis in rats. *Arch Androl*, 50: 33-35.
- 107.** Bükücü N (2013). Sıçan testisinde metotreksatın yaptığı hasara karşı vitamin E ve L-Karninitin etkisi. Yüksek lisans tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- 108.** Oktar S, Gökçe A, Aydın M, Davarci M, Meydan S, Öztürk OH, Koç A (2010). Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. *Toxicol Ind Health* 26: 433.
- 109.** Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB (2009). Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: intervention of folic and folinic acid. *Mutat Res* 673: 43-52.

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 : “*Primula Vulgaris* L.’nin Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Antioksidan Sitotoksik ve Antiapoptotik Etkisi”
Çalışmacılar : Doç.Dr.Rezzan ALİYAZICIOĞLU, Yük.Lis.Öğr.Murat BERBER, Prof.Dr.Engin YENİLMEZ, Y.Doç.Dr.Sermet YILDIRMIŞ
Anabilim Dalı : Temel Eczacılık Bilimleri

Etik Kurul Dosya No 2014/ 8	Etik Kurul Toplantı Tarihi 25.02.2014	Etik Kurul Toplantı No 2014/04	Etik Kurul Karar No 3
---	---	--	-------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Eczacılık Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu’nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN’ın başkanlığında; “*Primula Vulgaris* L.’nin Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Antioksidan Sitotoksik 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. (25.02.2014)

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

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : BERBER, Murat
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 18.11.1989 – Trabzon
Medeni Hali : Bekar
E- posta : muratberber61@hotmail.com
Yazışma Adresi : İlbank A.Ş. Lojmanları 13/A Ortahisar/TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniv. Sağlık Bil. Enst. Eczacılıkta Biyokimya ABD	-
Lisans	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2011
Lise	Trabzon Yunus Emre Lisesi	2006

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Araştırmacı – Uzman	Onkozone Ar-Ge Müh. Hiz. Ltd. Şti.	2013-2014
Veri Hazırlama ve Kontrol İşletmeni	İkizdere Kaymakamlığı Yazı İşleri Müdürlüğü	2013-2016
Veri Hazırlama ve Kontrol İşletmeni	Trabzon Valiliği İl Yazı İşleri Müdürlüğü	2016 -

YABANCI DİL

İngilizce

HOBİLER

Basketbol, Futbol, Halk Oyunları, Yüzme