



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI
TESTİS HASARINA KARŞI ELLAJİK ASİTİN
ETKİLERİ**

Ferhat UZUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

TRABZON-2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI
TESTİS HASARINA KARŞI ELLAJİK ASİTİN
ETKİLERİ**

Ferhat UZUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

TRABZON-2018

ONAY



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 kaynak listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici davranışımın olmadığını beyan ederim.

27 / 12 / 2018

Ferhat UZUN

İthaf

Yüksek lisans tezimi tüm hayatım boyunca beni destekleyen, maddi ve manevi hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan kendime ithaf ediyorum



TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimin ve tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle yanımda olan danışmanım Prof. Dr. Yavuz TEKELİÖĞLU, değerli hocalarım Prof. Dr. Engin YENİLMEZ, Prof. Dr. Ersan ODACI, Prof. Dr. Esin YULUĞ, Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU'na, çalışmamın bütün aşamalarında benden desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Cansu KAYA, Uzm. Dr. Ahmet Uğur AKMAN ve tüm bölüm arkadaşlarıma, tez çalışmamı TYL-2018-7478 no'lu proje kodu ile destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Ferhat UZUN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Testis	5
4.1.1. Testis Anatomisi ve Histolojisi	5
4.1.2. Testis Gelişimi ve Spermatogenezis	6
4.1.3. Seminifer Tübül Histolojisi	6
4.1.4. Seminifer Tübüllerin İnce Yapısı ve Spermatogenezis	7
4.1.5. Germ Hücrelerinin İnce Yapısı ve Spermiyogenezis	7
4.1.6. Sertoli Hücrelerinin İnce Yapısı ve İşlevi	8
4.1.7. Leydig Hücrelerinin Histolojisi ve İnce Yapısı	9
4.2. Epididimis	9
4.2.1. Epididimisin Anatomisi ve Histolojisi	9
4.2.2. Epididimisin Histolojisi ve İşlevi	9
4.3. Metotreksat	10
4.3.1. Metotreksatın Tarihçesi	10
4.3.2. Metotreksatın Etki Mekanizması	11
4.4. Ellajik Asit	11
4.4.1. Ellajik Asitin Kimyasal Yapısı	14
4.4.2. Ellajik Asitin Antioksidan Doğası	14
4.5. Apoptoz	15

4.5.1. Apoptozun Tanımı	15
4.5.2. Apoptoz ve Akım Sitometri (Flow Cytometry)	16
5. GEREÇ ve YÖNTEM	18
5.1. Gereç	18
5.1.1. Deney Hayvanlarının Temini	18
5.1.2. Sıçanların Bakımı ve Laboratuvar Koşulları	18
5.1.3. Çalışma Grupları	19
5.1.4. Testis Dokularının Elde Edilmesi	21
5.2. Yöntem	22
5.2.1. Histopatolojik Yöntem	22
5.2.1.1. Doku Takibi ve Bloklama	22
5.2.1.2. Kesitlerin Alınması	22
5.2.1.3. Hematoksilen & Eozin ile Boyama ve Kapatma	22
5.2.1.4. Histolojik Ölçümler ve Johnsen Skorlama	23
5.2.2. Akım Sitometrik Yöntem	24
5.2.2.1. Akım Sitometrik Analiz	24
5.2.3. İstatistiksel Analiz	25
6. BULGULAR	26
6.1. Vücut ve Testis Ağırlıklarına Ait Bulgular	26
6.2. Morfometrik Bulgular	26
6.2.1. Seminifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığına Ait Bulgular	26
6.2.2. Johnsen Skorlama Sonuçları	27
6.3. Histopatolojik Bulgular	28
6.4. Akım Sitometrik Bulgular	32
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	33
8. KAYNAKLAR	37
9. EKLER	44
9.1. EK 1. ETİK KURUL ONAYI	44
ÖZGEÇMİŞ	45

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Bazı bitkilerdeki EA konsantrasyonu	13
Tablo 2. Deney grupları ve uygulamaları	20
Tablo 3. Deney gruplarının vücut ve testis ağırlıklarına ait ortalama ve standart sapmalar	26
Tablo 4. Seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve lümenine immatür hücre dökülen seminifer tübül sayısına ait ortalama ve standart sapmalar	27
Tablo 5. Deney gruplarının testis dokularındaki Johnsen skorlarına ait ortalama ve standart sapmalar	28
Tablo 6. Deney gruplarının apoptotik indeks (AI) ortalamaları ve standart sapmalar	32

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Skrotum, testis ve epididimis	6
Resim 2. EA'nın kimyasal yapısı	13
Resim 3. Sıçanların barındığı kafesler	19
Resim 4. Sıçanlara gavaj uygulaması	20
Resim 5. Sıçan testislerinin çıkarılması	21
Resim 6. Kontrol grubuna ait testis dokusu	28
Resim 7. EA grubuna ait testis dokusu	29
Resim 8. MTX grubuna ait testis dokusu	30
Resim 9. MTX + EA grubunda testis dokusu	31
Resim 10. Kontrol, EA, MTX ve MTX + EA gruplarına ait apoptotik indeks yüzdelere ait akım sitometrik histogram	32

SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

7-AAD	7-Amino-actinomycin D
AI	Apoptotik İndeks
ALA	Alfa lipoik asit
DHFR	Dihidrofolat redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
EA	Ellajik asit
ET	Ellajitanen
H&E	Hematoksilen-Eozin
HHDP	Hexahydroxydiphenic asit
i.p.	Intraperitoneal
KD	Kilodalton
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
MTX	Metotreksat
RNA	Ribonükleik asit
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPM	Dakikadaki devir sayısı
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
pH	Power of Hydrogen
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

1. ÖZET

Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Ellajik Asitin Etkileri

Bu çalışmada sıçanlarda metotreksat (MTX) kaynaklı testis hasarına karşı ellajik asitin (EA) etkilerinin araştırılması amaçlandı. MTX çeşitli kanser türlerinde tedavi amaçlı kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Lösemi, lenfoma, uterus, göğüs, akciğer kanserleri de dâhil birçok kanser türlerinde sıklıkla kullanılır. MTX ile tedavi sürecinde ciddi yan etkilerin ortaya çıktığı bilinmektedir. Artan serbest radikaller testis de dâhil olmak üzere birçok dokuda hasara neden olmakta ve testislerde sperm üretimini olumsuz yönde etkilemektedir. EA, başta ahududu, çilek, ceviz, üzüm ve siyah kuş üzümü gibi meyveler ile fındıkta bulunur. EA, hastalıkları önleyebilen, serbest radikalleri temizleyebilen iyi bir antioksidandır. Önceki çalışmalarda EA'nın, antioksidan, serbest radikal önleyici ve kanser önleyici gibi geniş etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca, EA'nın çeşitli ilaçların sebep olduğu oksidatif strese bağlı testis hasarını iyileştirdiği gösterilmiştir.

Çalışmada ağırlıkları 200-250 g arasında değişen toplam 24 adet *Sprague Dawley* türü erkek sıçan rastgele 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 5 gün boyunca salin (0.6 ml) gavaj yoluyla verildi. MTX grubuna sadece deneyin ilk günü tek doz MTX (20 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. EA grubuna 5 gün boyunca EA (25 mg/kg) gavaj yoluyla verildi. MTX + EA grubuna ise sadece deneyin ilk günü tek doz MTX (20 mg/kg) i.p. olarak uygulandı ve ilk gün dâhil toplamda 5 gün boyunca EA (25 mg/kg) gavaj yoluyla verildi. Deney sonunda sıçanlar kansızlaştırma yoluyla sakrifiye edilirken histopatolojik ve akım sitometrik (flow cytometry) analizler için testisleri alındı.

Histopatolojik analizler sonucunda EA grubuna ait testis dokuları kontrol grubuna benzer şekilde normal yapıda izlendi. MTX grubunda, seminifer tübül epitelinde doku hasarı görüldü. Spermatogonyumlarda atrofi gözlenirken, seminifer tübül lümeninde immatür hücre sayısında bir miktar artış tespit edildi. İnterstisyel alanda Leydig hücrelerinde atrofi belirlendi. MTX + EA grubunda ise bu hasar MTX grubuna göre azaldığı belirlendi. Histopatolojik ve akım sitometrik analizler sonucu, MTX'in doku hasarını artırdığı, EA'nın ise bu hasarı belirli ölçülerde iyileştirdiği görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Akım sitometri, ellajik asit, metotreksat, testis, toksisite

2. SUMMARY

Effects of Ellagic Acid Against Methotrexate-Induced Testicular Toxicity in Rats

The aim of this study was to investigate the effects of ellagic acid (EA) against methotrexate (MTX)-induced testicular damage in rats. MTX is a chemotherapeutic drug used for the treatment of various types of cancer. It is frequently used in many types of cancer, including leukemia, lymphoma, uterus, breast, lung cancers. It is known that serious side effects occur during the treatment with MTX. Increased free radicals cause damage to many tissues, including the testicles, and affect testicular sperm production negatively. EA is found primarily in raspberries, berries, walnuts, grapes and hazelnuts, such as black currant. EA is a good antioxidant that can prevent diseases and free radicals. Previous studies have shown that EA has a wide range of effects such as antioxidants, free radical scavengers and anti-cancer agents. In addition, EA has been shown to improve oxidative stress-related testicular damage caused by various drugs.

A total of 24 *Sprague Dawley* rats (weighing 200-250 g) were randomly divided into four groups. Control group was given saline (0.6 ml) by gavage for 5 days. MTX group was administered MTX (20 mg/kg) intraperitoneally (i.p.) on the first day of the experiment. The EA group was given EA (25 mg/kg) by gavage for 5 days. The MTX + EA group was administered a single dose of MTX (20 mg/kg) i.p. on the first day of the experiment and EA (25 mg/kg) was administered by gavage for 5 days including the first day. At the end of the experiment, the rats were sacrificed by exsanguination and their testicles were taken for histopathological and flow cytometric analysis.

As a result of histopathological analysis, testicular tissues belonging to EA group were observed as normal as control group. In MTX group, tissue damage was seen in the seminiferous tubule epithelium. Atrophy was observed in spermatogonium and there was a slight increase in the number of immature cells in the seminiferous tubule lumen. Atrophy was detected in Leydig cells in the interstitial area. In MTX + EA group, it was determined that the damage decreased compared to MTX group. Histopathological and flow cytometric analysis showed that MTX increased tissue damage and EA improved this damage to a certain extent.

Key Words: Ellagic acid, flow cytometry, methotrexate, testis, toxicity

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Metotreksat (MTX), ilk olarak 1950'lerde kullanıma sunulmuştur. Akut lenfoblastik, lenfositik ve meningeal lösemi, non-hodgkin lenfoma (NHL), osteosarkom, baş ve boyun bölgesinde oluşan ve ameliyatla alınamayan kanserler gibi geniş kullanım alanlarına sahiptir (1-3). Uterus, göğüs ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde de sıklıkla kullanılır (4). Etkinliği, pürin ve pirimidinlerin biyosentezinde anahtar enzimleri inhibe etme kabiliyetine atfedilir, böylece malign hücre proliferasyonunu ve döngüsünü zayıflatır. Güçlü bir dihidrofolat redüktaz inhibitörü olan tetrahidrofolat üretiminde rate-limitör enzim olarak pürinlerin ve pirimidinlerin *de novo* üretimini azaltır ve DNA sentezine müdahale eder. Bu nedenle, hedef dokulardaki T lenfositler gibi enflamatuvar hücrelerin hücre döngüsünün yüksek olduğu iltihaplı hastalıklarda uygulama alanına sahiptir. Bu bağlamda MTX'in etkinliği bilinmektedir ancak hücresel döngünün inhibisyonu, MTX'in yan etkilerinin çoğunun ardındaki nedendir (5). MTX tedavisinde çeşitli yan etkiler görülebilmektedir. MTX tedavisinde en sık rastlanan yan etkiler, mide rahatsızlığı, bulantı, yumuşak dışkı gibi gastrointestinal sistem problemleri; karaciğer fonksiyonlarında bozulma; stomatit veya ağızda yara; transaminazlarda yükselme; ekstremitelerde maküler punktat döküntü; baş ağrısı, halsizlik, konsantrasyon bozukluğu gibi santral sinir sistemi semptomları; alopesi; ateş; kemik iliği süpresyonu, makrositoz gibi hematolojik değişikliklerdir. MTX tedavisinde görülen ciddi yan etkiler ise, pulmoner değişiklikler (interstisyel pnömonit, alveolit), hepatotoksisite (fibrozis, hepatik steatoz, siroz), enfeksiyon, kemik iliği süpresyonu, nefrotoksisite ve lenfoproliferatif hastalıklardır. MTX, ayrıca düşük indükleyici ve teratojeniktir. Bu sebeple MTX kullanan kadın ve erkek bireylerde ilaç kesildikten yaklaşık üç ay sonrasına kadar kontrasepsiyon önerilmelidir (6). MTX, kandan interstisyel alana ve seminifer tübül içine geçerek bazı değişiklikleri önemli ölçüde indüklemeye yeteneğine sahiptir (7). Benzer etkiler, gelişmekte olan sıçan testislerine antikanser ilaç uygulaması sonrasında da görüldü (8). Seminifer tübülün hücresel içeriğinin büyüklüğü, primer ve sekonder spermatositlerin, DNA'nın normal sentezi için gerekli olan esansiyel bir enzimin (dihidrofolat redüktaz) inhibisyonuna bağlı olarak DNA'larını kopyalayamadığından (9), mitotik gecikmeye, anormal protein sentezine ve hücre genişlemesine yol açtığından dolayı önemli ölçüde değişmiştir. Antikanser ilaç uygulamasından sonra, testis dokusunda, 74.500 KD proteinin aşırı ekspresyonu gözlenmesine rağmen (10), sitotoksik ajanların etki

mekanizması, hücre ölümüne yol açmamıştır. DNA'nın çapraz bağlanması inhibisyonu, protein sentezi ve S-fazında hücre döngüsünün durdurulması gibi faktörler; hücre-hücre etkileşiminin, hücre proliferasyonunun ve hücre farklılaşmasının sürdürülmesinde rolü olan önemli faktörlerdendir (11). RNA proteinleri gibi makromoleküller, hücrelerde birikerek, spermatositlerde belirgin morfolojik değişiklik yapabilir. İki farklı antikanser ilacın etki mekanizması aynı değildir, ancak germinal hücrelerin sitotoksitesinin doğası aynıdır. Bu değişiklikler tersine çevrilemezse, erkeklerin üreme performanslarını etkileyebilir (12).

Günümüzde, insan sağlığında diyetin rolü ile bitki polifenollerine karşı duyulan özel ilgi arasında önemli bir ilişki vardır. Bitki polifenoller, insan beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır ve antioksidan, anti-enflamatuvar, antikanser ve antiaterosklerotik aktiviteler dâhil olmak üzere, birçok biyolojik özellikle ilişkilendirilmiştir. Bu fitokimyasallar arasında, gallik asitin dimerik bir türevi olan ellajik asit (EA), meyve ve kabuklarda ya EA-glikozitleri olarak serbest formda bulunur ya da ellajitanenler (ET'ler) olarak bağlanır (13). Tablo 1, çeşitli meyve ve bitkilerin toplam EA miktarlarını göstermektedir (14). EA, 1831'de Braconnot tarafından keşfedilmiştir (15). EA (Resim 2), 302 g/mol'lük bir moleküler ağırlığa sahip bir moleküldür. Çok termostabil olan (350 °C'lik erime noktası) bir moleküldür (16). EA, pH <7'de çözünmez, ancak fizyolojik pH'de çözünür (17).

EA'nın oksidatif strese bağlı toksisiteye karşı E vitamininden daha iyi bir koruma sağladığı önceki literatür çalışmalarında değinilmektedir. Bununla birlikte, MTX ile indüklenen testis hasarı literatürde bildirilmiştir ve antioksidanlarla, özellikle EA ile önerilen koruma çok iyi anlaşılamamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada, EA'nın, MTX'in indüklediği sıçan testi hasarını iyileştirip iyileştirmeyeceği irdelenmiştir. MTX, intraperitoneal (i.p.) uygulandığında sıçan testislerinde güçlü bir toksisite etkisinin olduğu belirlenmiştir. EA tarafından oluşturulan koruma, histopatolojik ve akım sitometrik çalışmalarla değerlendirilmiştir.

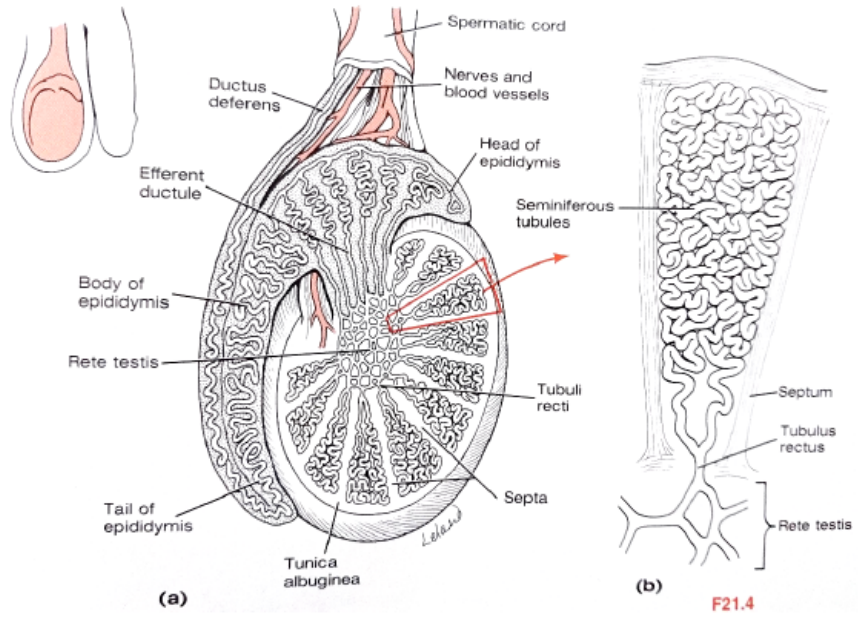
4. GENEL BİLGİLER

4.1. Testis

Erkek üreme sistemi, bir çift testis, boşaltım kanalları ve yardımcı üreme bezlerinden oluşur. Skrotum ve penis, dış genital organları oluştururlar. Testisler, vücut boşluğunun dışında, skrotumun içinde asılı durumda yer almaktadır. Testisler ve bunlara bağlı olan sperm kordonları, karın boşluğu içinden skrotuma inerken farklı doku tabakalarıyla sarılır. Testisler, spermatozoa olarak adlandırılan erkek üreme hücrelerinin üretildiği yer olan küçük kıvrımlı seminifer tübüller ve interstisyel bağ dokusundan oluşur. Leydig hücreleri testosteron üretir. Spermatozoonlar, seminifer tübüllerde üretildikten sonra testislerden rete testise, duktuli efferentese (efferent kanalcıklara), epididimise, duktus (vas) deferense, ejakülator kanala ve oradan da üretra ve penise doğru gider. Yardımcı bezler, salgılarını ejakülator kanallara ve üretraya boşaltan iki adet seminal vezikülü, prostat bezini ve bulboüretral bezleri kapsar. Bu sistemin üç işlevi vardır; spermatozoonların üretilmesi, bu hücrelerin dişi üreme sistemine aktarılması ve testosteron üretimi işlevleridir (18, 19).

4.1.1. Testis Anatomisi ve Histolojisi

Testisleri tunika albuginea adı verilen sıkı fibroelastik bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül sarar. Visseral katman olan tunika vaginalis, bu kapsülü dışarıdan sarar. Testisin arka kenarında, kapsül kalınlaşarak içeriye doğru uzanır, bu kısım mediastinum testisi oluşturur. İnce fibröz septumlar (bölmeler), mediastinumdan ışınal olarak uzanarak lobüller oluşturur. Lobüller içinde seminifer tübüller bulunur ve yapıları kıvrımlı olduğu için kesite farklı düzlemlerden girer. Seminifer tübüller, mediastinumdan tübüli rektiye (düz tübüllere) ve rete testise boşalır. Rete testis birleşerek duktuli efferentesi oluşturur. Bu kanallar spermatozoonları ve testis sıvısını epididimisin proksimaline aktarır. Rete testis tek katlı kübik epitelden oluşan toplayıcı kanallardır. Testisin %20-%30 kadarını interstisyel doku oluşturur. İnterstisyel bağ dokusu hormon üreten Leydig hücrelerinin bulunduğu yerdir (Resim 1) (18, 19).



Resim 1. Skrotum, testis ve epididimis (Ovalle'den, 18)

4.1.2. Testis Gelişimi ve Spermatogenezis

Testisler, embriyonik ara mezodermden kökenlenir. Gelişimin ilk evresinde, ara mezoderm, seminifer tübüllerin öncülleri olan primer epiteliyal cinsiyet kordonlarını oluşturur. Gelişimin dördüncü haftasından sonra, primordial germ hücreleri, vitellus kesesi endoderminden kordonlara doğru göç eder. Yenidoğan döneminde testis, germ hücre kordonlarından ve bunlara eşlik eden, gelecekte Sertoli hücrelerini oluşturacak olan epitel hücrelerinden oluşur. Kordonlar puberte dönemine kadar içleri dolu durumda bulunur. Daha sonra çapları genişleyerek içlerindeki lümeni oluştururlar. Leydig hücreleri seminifer tübüllerin arasındaki mezenkimden köken alır. Puberte döneminde ilkel germ hücreleri olan spermatogonyumlar mitoz bölünme geçirmeye başlar ve seminifer tübül epitelindeki diploid spermatogonyumlardan haploid spermatozoonların olduğu spermatogenezis gerçekleşir. Mitoz ve mayoz bölünmelerin ardından spermatozoonlar tübüllerin lümenine doğru göç eder. Bu işlem Sertoli hücreleri tarafından koordine edilir ve 64-74 günde gerçekleşir. Bireyin yaşamı boyunca devam eder (18-20).

4.1.3. Seminifer Tübül Histolojisi

Her seminifer tübül fibromusküler ara bağ dokusu, yassı miyoid hücrelerden oluşan bir tabaka ve bazal membran ile çevrilidir. Seminifer tübül epiteli iki hücre grubu

barındırır; spermatogenik (germ) hücreler ve çoğalma özelliğine sahip olmayan Sertoli hücreleri. Seminifer tübüldeki germ hücrelerinin bazal membrana en yakın olanları yuvarlak çekirdekli spermatogonyumlardır. Yuvarlak çekirdekli, ancak daha büyük hücreler, primer spermatositlerdir. Haploid, sekonder spermatositler ise az görülür ve oluşur oluşmaz bölünerek spermatidleri oluştururlar. Bu hücreler, lümene yakın olan germinal epitelyuma gömülüdürler. Destekleyici Sertoli hücreleri, sütuna benzer ve germinal epitel boyunca uzanır, serbest uçları lümene ulaşır. Spermatidler, bölünmeksizin lümene bırakılacak olan spermatozoonlara olgunlaşırlar (18, 19).

4.1.4. Seminifer Tübüllerin İnce Yapısı ve Spermatogenezis

Spermatogonyumlar, seminifer tübülün bazal membranına yerleşmiş olan, sürekli bölünebilen kök hücre topluluklarıdır. Yaklaşık 12 µm çapında olan, nispeten büyük, yuvarlak bir çekirdeğe sahip diploid hücrelerdir. Bölündüklerinde nispeten büyük çekirdeklere sahip primer spermatositleri oluştururlar. Bu hücreler de mayoz bölünme geçirerek daha küçük yapıya sahip sekonder spermatositleri meydana getirirler. Sekonder spermatositler, DNA replikasyonu gerçekleştirmeden sekonder mayoz bölünme geçirir. Bu bölünme sonunda oluşan yuvarlak spermatidler, haploid kromozom sayısına sahip hücrelerdir. Spermatidler, Sertoli hücrelerinin oluşturduğu girintiler arasına gömülmüş durumda bulunurlar. Spermatidler, lümene doğru yol alırken uzar ve karmaşık bir olgunlaşma işleminden geçer ki bu olaya spermiyogenezis adı verilir. Bu gelişim evrelerinin sonucunda oluşan spermatozoonlar, tek bir kamçıya ve küçük, yoğun bir çekirdeğe sahip olan yüksek düzeyde özelleşmiş hücrelerdir. Bir günde yaklaşık 300 milyon adet spermatozoon üretilir ve lümene bırakılır (18). Oluşan bu olgun sperm hücresi; akrozomal kep içeren baş, boyun, mitokondriyon kılıfı içeren kuyruk orta parçası, kuyruk esas parçası ve kuyruk son parçasından oluşur (20).

4.1.5. Germ Hücrelerinin İnce Yapısı ve Spermiyogenezis

Yuvarlak şekilli, hareketsiz spermatidler, spermiyogenezis olarak adlandırılan karmaşık yapısal bir olgunlaşma işleminden geçerek spermatozoonlara dönüşür. Seminifer tübül epitelinin üst katmanlarında gerçekleşen bu sıralı değişiklikler; çekirdek kromatininin yoğunlaşması, çekirdeğin uzaması, akrozomun oluşması, kamçı yapısının oluşması ve sitoplazmanın ortadan kalkması şeklinde sıralanan olaylar bütünüdür. İlk olarak golgi fazının başlangıcında, golgi kompleksinin çekirdeğe komşu kısmında birkaç

adet akrozom vezikülü oluşur. Bu veziküller, çekirdek zarına bağlı, büyük bir akrozom oluşturacak şekilde birleşirler. Vezikül içinde, çekirdeğin ön yüzeyini örtecek şekilde yayılır ve spermatozoonun ön tarafını oluşturan akrozom granülü oluşur. Değişikliğe uğramış bir lizozom olan akrozom içerisinde, döllenme sırasında, zona pellusidanın ve korona radyatanın aşılabilmesine olanak sağlayan, hyaluronidaz ve tripsin benzeri aktiviteye sahip, proteaz gibi birçok hidrolitik enzimi içerir (18, 19).

Spermiyogenezisin daha ileriki dönemlerinde, bir çift sentriyol spermatid çekirdeğinin karşı kutbuna göç eder ve burada birinden kamçı meydana gelir. Spermin kuyruk hareketinden sorumlu bu yapı, merkezinde bir çift santral mikrotübül, çevresinde dokuz adet mikrotübül çifti bulundurur. Mitokondriyonlar bu kamçıya doğru göç eder. Daha sonra, sitoplazma ve organel fazlası Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Yüksek düzeyde özelleşmiş hücreler olan bu olgun spermatozoonların boyu, yaklaşık 60 µm civarındadır (18).

4.1.6. Sertoli Hücrelerinin İnce Yapısı ve İşlevi

Spermatozoonların desteklenme ve olgunlaşma sürecinde, Sertoli hücreleri, çok büyük öneme sahiptir. Sertoli hücreleri, seminifer tübüller içerisinde spermatogenik hücreler arasında yerleşmiş şekilde bulunurlar ve prizmatik, sınırları güçlükle ayırt edilen hücrelerdir. Bazal membrandan seminifer tübül lümenine kadar uzanırlar. Tepe kısımlarında, kriptaya benzer girintiler bulunur ve yeni oluşan spermatidler lümene bırakılınca dek, buraya yerleşir. Sınırları düzgün olmayan, ökromatik çekirdeğe sahiptir ve çekirdekçikleri belirgindir. Sitoplazmalarında, çok belirgin olmayan, düz bir endoplazmik retikuluma ve çok sayıda lipid damlacıklarına sahiptir. Mitokondriyonları yassıdır, mikrotübüller ve ara filamanlardan oluşmuş hücre iskeletleri oldukça gelişmiştir ve lizozomlarında lipofuskin bulundurur. Taban ve yan yüzeylerindeki sıkı bağlantı kompleksleriyle komşu hücrelere tutunurlar. Bu tutunma kompleksleri her bir seminifer tübülü, bazal ve adluminal kompartmana ayıran, kan-testis bariyerini oluşturur. Kan-testis bariyeri, spermatogonyumlarla primer spermatositleri, daha üstteki sekonder spermatositlerden ve spermatidlerden ayırır ve plazma proteinleri ile kan kaynaklı antikorları, seminifer tübül lümeninin dışında tutarak, immün yanıt oluşumunun önüne geçer. Sertoli hücreleri, spermatid artıklarını fagosite eder, spermin yaşaması için gerekli olan pek çok maddeyi salgılar (18, 19).

4.1.7. Leydig Hücrelerinin Histolojisi ve İnce Yapısı

Leydig hücreleri, seminifer tübüllerin arasında bulunan, gevşek bağ dokusunda bulunur. Büyük, poligonal ve eozinofilik olan bu hücrelerin sitoplazması köpüksü bir görüntüye sahiptir. Bu görüntü, testosteron sentezi için yüksek düzeyde lipit içermesinden kaynaklanır. Bu hücreler, kesin yapıları ve fonksiyonları bilinmeyen, lipofuskin pigmenti ve çubuk şekilli sitoplazmik kristalleri olan Reinke kristalleri bulundurmaktadır. Çekirdekleri, bir ya da iki çekirdekçiğe sahiptir. Hücre yüzeyinde çok sayıda mikrovillus bulunur. Leydig hücreleri, çoğunlukla pencere kapillerler ve küçük lenf damarlarına yakın bölgelerde konumlanırlar. Steroid salgılayan diğer hücreler gibi Leydig hücreleri de sitoplazmalarında, yoğun, sıkı paketlenmiş düz endoplazmik retikulum bulundurur. Nispeten daha az sayıda ribozoma, granüllü endoplazmik retikuluma, steroid salgılayan hücrelerin diğer bir karakteristik özelliği olan çok sayıda tübuloz veziküler kristal mitokondriyona, çekirdeğin hemen yanında bulunan büyük bir golgi kompleksine ve çok sayıda lipid damlacıklarına sahiptir (18, 20).

4.2. Epididimis

4.2.1. Epididimisin Anatomisi ve Histolojisi

Epididimis, testislerin arka bölümünü örten kıvrımlı bir kanaldır. Embriyoda, mezonefroza türeyen epididimis, baş kısmını oluşturan başlangıç parçası, kanalın ana bölümünü oluşturan gövde kısmı ve kuyruk bölgesi olmak üzere üç bölüme ayrılır. Başlangıç parçası, duktali efferenteslerin sıkıca sarmallanmış bölümlerinden meydana gelir. Erkeklerin %25'inde, baş bölümünde sap şeklinde bir uzantıya sahip kistik bir yapı yer alır. Bu yapıya apendiks epididimis denir. Epididimisin baş parçası, duktali efferenteslere bağlanır. Duktali efferentesler, titretilmiş tüylü prizmatik epitelle döşelidir. Bu titretilmiş tüyler, spermatozoonların hareketine yardımcı olur (18).

4.2.2. Epididimisin Histolojisi ve İşlevi

Epididimis kanalının duvarını oluşturan yalancı çok katlı prizmatik epitel, uzun, hareketsiz stereosilyumlar bulunduran uzun, prizmatik esas hücrelerden ve küçük bazal hücrelerden oluşur. Stereosilyumlar, hücrenin yüzey alanını büyütürler, testisten spermatozoonlarla birlikte gelen fazla sıvının emiliminde işlev görürler. Epididimis, aynı zamanda, bir depo kanal işlevini de üstlenmektedir. Spermatozoonlar, kanal boyunca

olgunlaşır, hareket ve dölleme yetenekleri edinirler. Kanalın dış kısmında, gevşek bağ dokusu ve düz kaslar bulunur (18).

4.3. Metotreksat

4.3.1. Metotreksatın Tarihçesi

1947'de Sidney Farber tarafından yönetilen bir araştırmacı ekibi, geliştirilen kimyasal bir folik asit analogu olan aminopterin akut lenfoblastik lösemili çocuklarda iyileşmeyi uyarabileceğini gösterdi. Folik asit analoglarının geliştirilmesi, folik asit uygulamasının lösemiye kötüleştirdiği ve folik asitten yoksun bir diyetin, aksine, bir gelişme sağlayabileceğinin keşfiyle hız kazanmıştır. Bu etkilerin ardındaki eylem mekanizması, bu tarihte, hala bilinmemekteydi (21). Diğer folik asit analogları da geliştirilmekteydi ve 1950'de MTX (daha sonra amethopterin olarak bilinecek), lösemi için tedavi olarak önerildi (22). 1951 yılında, Gubner, folat antagonisti olan aminopterin ile tedavi edilen sedef hastalarında iyileşme bildirmiş, ancak oral ülserasyon, abdominal kramplar ve diyare, alopesi ve yara iyileşmelerinde inhibisyon etkilerinin bulunması klinik uygulamasını sınırlandırmıştır (23). 1955'te, Rees ve arkadaşları, daha düşük bir dozda aminopterin kullanarak, daha az yan etki ile birlikte sedef hastalığının iyi bir şekilde temizlendiğini bildirmiştir (24). 1958 yılında, Edmundson ve Guy, amethopterin veya MTX kullanıldığında sedef hastalığının iyi bir şekilde temizlendiğini bildirmiştir (25). Daha sonraki birkaç karşılaştırmalı çalışma, MTX'in aminopterinle biraz daha az etkili olmasına rağmen, MTX'in daha az toksik olduğu sonucuna varmıştır. 1951'de, Jane C. Wright, solid tümörlerde MTX kullanımının, meme kanserinde iyileşmeye sebep olduğunu gösterdi (26). Wright'ın ekibi, ilik kanseri olan lösemilerin aksine, solid tümörlerde ilacın kullanımını ispatlayan ilk gruptu. Min Chiu Li ve arkadaşları 1956'da, koriokarsinom ve korioadenomlu kadınlarda eksiksiz iyileşme (27) ve 1960 yılında, Wright ve arkadaşları mikozis fungoideste iyileşme olduğunu kanıtladı (28, 29).

Hayvanlarda toksisite çalışmaları, MTX toksisitesinin, toplam dozdan ziyade, dokularla temas süresi ile daha yakından ilişkili olduğunu ve 1963'te, Berlin'in dozaj çalışması, MTX'in terapötik indeksini geliştirebileceğini göstermiştir (30). 1971 yılında, Weinstein ve Frost, hücre döngüsü kinetiği çalışmalarında, dozu, 12 saat arayla verilen üç porsiyona bölerek, haftalık dozaj çizelgesinde bir modifikasyon ortaya atmıştır (31).

4.3.2. Metotreksatın Etki Mekanizması

Bir sitotoksik ajan olarak, MTX bir dizi benzersiz özelliğe sahiptir. Birçok ajanın aksine, nükleik asitlerle kimyasal olarak reaksiyona girmez. Esansiyel DNA bileşenlerinin sentezine dâhil edilmeyen, ortak kullanımda olan tek antimetabolittir. Dahası, MTX'in kansere neden olan hiçbir kanserojen etkisi yoktur, çünkü nükleik asitlerle kimyasal olarak reaksiyona girmez (32).

Kanserde, MTX, tetrahidrofolat sentezine katılan bir enzim olan dihidrofolat redüktazı (DHFR) inhibe eder (33, 34). DHFR için MTX'in afinitesi, folatın yaklaşık 1000 katıdır. DHFR, dihidrofolatın, aktif tetrahidrofolata dönüşümünü katalize eder. DNA sentezi için gerekli olan timidin nükleosidinin *de novo* sentezi için folik asit gereklidir. Ayrıca, folat, pürin ve pirimidin bazlarının biyosentezi için gerekli olduğundan, sentez inhibe olacaktır. MTX, bu nedenle, DNA, RNA, timidilat ve proteinlerin sentezini inhibe eder (33).

MTX, hem nükleik asitlerin hem de proteinlerin sentezini bozduğundan, hücre döngüsü durdurulur, böylece G1 hücreleri daha fazla ilerleyemez ve MTX'e maruz kalma sırasında S fazında olan hücreler öldürülür. MTX, S fazındaki hücreleri timidilat sentezini inhibe ederek öldürse de, bu etki sınırlıdır, çünkü RNA ve protein sentezinin inhibisyonu, hücrelerin S fazına giriş hızını yavaşlatır (32).

Romatoid artrit tedavisinde, DHFR'nin inhibisyonunun ana mekanizma olduğu düşünülmez. Aksine, adenosin birikmesine yol açan pürin metabolizmasında rol oynayan enzimlerin inhibisyonu; T hücresi aktivasyonunun inhibisyonu ve hücreler arası adhezyon molekül ekspresyonunun T hücreleri tarafından bastırılması; B hücrelerinin down regülasyonu; aktif T hücrelerinin CD95 duyarlılığını arttırmak ve bağışıklık sistemi fonksiyonuna ilişkin enzim aktivitesinin deaktivasyonuna yol açan, metiltransferaz aktivitesinin inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmaların romatoid tedavisinde etken olduğu görülür (35, 36). MTX'in bir başka mekanizması, interlökin 1-betanin hücre yüzeyi reseptörüne bağlanmasının inhibisyonudur (37).

4.4. Ellajik Asit

EA, başta ahududu, çilek, ceviz, üzüm ve siyah kuş üzümü gibi meyveler ile fındıkta bulunur. Önceki çalışmalar, EA'nın damıtılmış içkilerde bol miktarda bulunan yaygın polifenollerden biri olduğunu ortaya koymuştur. En yüksek seviyedeki EA,

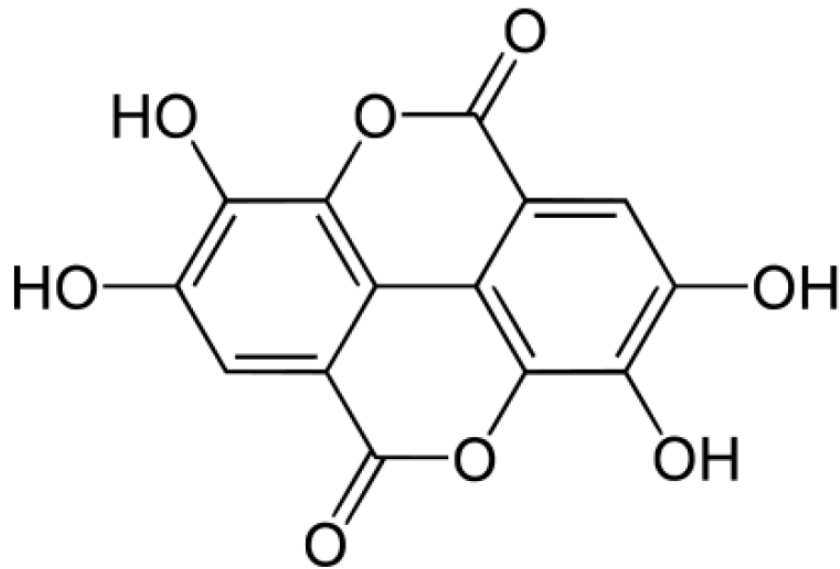
ahudududa bulunur. Alman ulusal gıda tüketimi araştırmasına göre, her Alman vatandaşının tükettiği meyve ve sebzelerin 5.2 mg/gün EA içerdiği ölçülmüştür (38). EA, ayrıca, misket üzümün şarabının her 100 gramında ortalama 5.6 mg bulunur ve her 100 gram misket üzümü şarabının 10.2 mg'ı, misket üzümü şarabının üretimi sırasında açığa çıkan çözünmeyen sedimentlerle ilişkilendirilmiştir (17). EA'nın koruyucu etkisi için çeşitli faktörler gerekmektedir. Bu faktörler, DNA bağlama kapasitelerini, Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) oluşumun engellenmesini, ROS'un temizlenmesini ve DNA'nın alkillenmesinin önlenmesini içermektedir. Hidroksil ve lakton gruplarının, EA yapısında önemli ölçüde olduğu görülmektedir. EA'nın, yukarıda bahsedilen tüm biyolojik korumalardan güçlü bir şekilde sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. EA'nın serbest radikal çalışmaları, E vitamini ile karşılaştırıldığında, oksidatif strese karşı daha iyi koruma sağladığını göstermektedir (38). EA, hayvan modellerinde kimyasal kanserojenlerden kaynaklanan tümör büyümelerini inhibe eder (39). Ghudhaib ve arkadaşları (2010), EA'nın hayvanlara karşı anti-tifo korumasına sahip olduğunu bildirmiştir (40). Ek olarak, bu çalışma, EA açısından zengin olan meyvelerin düzenli tüketiminin, *Salmonella typhimurium*'un hayvanlar üzerindeki etkisini önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur. Diğer çalışmalar, ayrıca, EA'nın, sıtmanın, özellikle *Plasmodium falciparum* türleri üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (41). EA'nın kimyasal yapısı ise Resim 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Bazı bitkilerdeki EA konsantrasyonu (Zhang'den, 41)

Meyveler ve bitkiler	Toplam EA
Muz	2*
Armut	4*
Mandalina	4*
Ananas	6*
Erik	7*
Çilek	31-78*
Pikan Cevizi	33*
Ceviz	59*
Ahududu	>150*
Cloudberry	>160*
Arctic Bramble	>160*
Çilek çeşitleri	6-34.1**
Pongamia pinnata	1.5* (kabuk) 0.1* (yaprak) 0.4* (tohum)
Geraniaceae	397*
Misket üzümü çeşitleri	587-1900* (posa)

*: mg/100 g kuru ağırlık

** : mg/100 g donmuş ağırlık



Resim 2. EA'nın kimyasal yapısı (Sepúlveda'den, 16)

4.4.1. Ellajik Asitin Kimyasal Yapısı

Tanenlerin yapısal çeşitliliği, spesifik yapısal ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Tanenler, sıcak suyla muamele edilerek, hidrolize edilebilir tanenler ve hidrolize edilemeyen tanenler olarak ayrılabilirler. Nitekim "hidrolize edilebilir tanenler" terimi, hem gallotanenleri, hem de ellajitanenleri (ET) içerir (42).

ET'ler, çeşitli tipik bitki ailelerinde bulunur. ET'ler hem çözelti içinde, hem de ortamda kararsızdırlar ve hidroliz ve polimerizasyon reaksiyonları geçirirler. Clifford ve Scalbert'in çalışması, ET'nin, asitler veya bazlarla reaksiyona girmesiyle, ester bağlarının hidrolize edildiğini ve HHDP grubunun, suda çok az çözünebilir EA'ya dönüştüğünü açıkça doğrulamıştır (43). Landete, polimerizasyon reaksiyonunun, ET'lerin hücre duvarı bileşenlerine kovalent bağlanmasına yol açtığını bildirmiştir (44). Bitkilerde bulunan farklı EA türevleri, hidroksil gruplarının metilasyon, glikolizasyon ve metoksilasyon yoluyla oluşturulmuştur. EA, esas olarak bitki vakuolunda, EA veya EA türevleri olarak serbest formlarında bulunur veya suda çözünebilir ET'ler olarak bağlanır. ET'ler ve EA çalışması, ET'lerin ve EA'nın antioksidan etkinliğinin doğrudan hidroksilasyon derecesiyle ilişkili olduğunu ve bir şeker varlığı ile azaldığını açıklamıştır (45).

4.4.2. Ellajik Asitin Antioksidan Doğası

ROS ve reaktif azot türleri (RNS), hücre içinde üretilir, çeşitli insan hastalıklarıyla ilişkilendirilmiş olan birçok önemli biyomolekülün zarar görmesine sebebiyet verir. ROS ve RNS endojen antioksidanlar tarafından daima dengede tutulurlar, ancak hastalık durumlarında bu denge değişir ve oksidatif stres oluşur. Dolayısıyla EA, hastalıkları önleyebilen, serbest radikalleri temizleyebilen iyi bir antioksidandır. Önceki çalışmalarda, EA'nın, antioksidan, serbest radikal önleme, antikanserojen, antiöstrojenik, antimutajenik ve anti-apoptotik gibi geniş etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Fenolik meyvelerin bolca tüketimi ile koroner kalp hastalıkları insidansı arasında güçlü bir korelasyon vardır. EA'nın antioksidan etkisiyle bu durum büyük oranda ilişkilendirilmiştir. EA, CCl₄ ile indüklenen karaciğer dokularına karşı hepatoprotektif özellikler göstermiştir. Dahası, EA'nın oksidatif strese karşı E vitaminden daha iyi bir koruyucu etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada, H₂O₂'ye karşı deneysel sitogenetik korumanın, EA tarafından reaktif serbest radikallerin temizlenmesiyle ilişkili olabileceği raporlanmıştır (38). Özkaya, EA'nın, serbest

radikalleri doğrudan temizleyerek veya hücredeki antioksidan enzim cevabı ile sonuçlanabilecek hücredeki yolları regüle ederek, hücrenin antioksidan cevabını arttırdığını bulmuştur (46). EA, lipid peroksidasyonunu önlediği gibi süperoksit anyonu olan O_2^- ve hidroksil radikallerini ($-OH$) de önler. EA'nın, cisplatin ile indüklenen hayvanlar üzerindeki etkisinin gözlemlendiği bir çalışmada, EA'nın serbest radikalleri (O_2^- ve $-OH$) temizlediği ve oksidatif DNA hasarını baskıladığı görülmüştür (47). EA'nın OH radikalleri, peroksil radikalleri, NO_2 radikalleri ve peroksinitrit gibi ROS ve RNS'yi yok etme kapasitesinin, E vitamini ve C vitamini gibi bilinen birçok antioksidanlara eşit olduğu bulunmuştur. EA suda düşük çözünürlüğe sahiptir, ancak EA'nın çözünürlüğü organik çözücülerde artar ve bu durum EA'nın iyi bir lipofilik antioksidan gibi davranabildiğini gösterir. Serbest radikalleri yok etme kabiliyeti ile birlikte bu özelliği, EA'yı zincir kırıcı antioksidanlara iyi bir aday yapar (38).

4.5. Apoptoz

4.5.1. Apoptozun Tanımı

Apoptozis terimi, 1972'de morfolojik olarak farklı bir hücre ölüm formunu tanımlamak için bir makalede kullanılmıştır (48). Memeli hücrelerinde apoptozis sürecine dâhil olan mekanizmaların anlaşılması, *Caenorhabditis elegans* nematod türünün gelişimi sırasında ortaya çıkan programlanmış hücre ölümlerinin araştırılmasından doğmuştur (49). Bu organizmada, 1090 somatik hücre, yetişkin bir solucanın oluşumu sırasında üretilir, bu hücrelerin 131'i apoptoza veya “programlanmış hücre ölümüne” maruz kalır. Bu 131 hücre, gelişim sürecinde belirli noktalarda ölür. Apoptozis, o zamandan beri, hücrelerin genetik olarak belirlenmiş eliminasyonunu içeren, ayırt edici ve önemli bir “programlanmış” hücre ölümü olarak kabul edildi. Bununla birlikte, programlanmış hücre ölümünün diğer formlarının tarif edilmiş olduğunu ve diğer programlanmış hücre ölümlerinin henüz keşfedilemediğini unutmamak önemlidir (50).

Apoptoz gelişim ve yaşlanma sırasında normal olarak, hücre popülasyonlarının dokularda muhafaza edilmesi için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Apoptoz, ayrıca, bağışıklık reaksiyonlarında olduğu gibi veya hücreler, hastalık veya zararlı maddeler tarafından zarar gördüğünde, bir savunma mekanizması olarak da ortaya çıkar (51). Her ne kadar apoptozu tetikleyebilen, hem fizyolojik hem de patolojik olarak çok çeşitli uyarıcı durumlar olsa da, tüm hücreler aynı uyarana cevap olarak ölmeyecektir.

Kanser kemoterapisinde kullanılan ışınlama veya ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarı ile sonuçlanır, bu da, p53'e bağlı bir yoldan apoptotik ölüme yol açabilir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, bazı hücrelerde (timositler) apoptotik ölüme yol açabilir, ancak diğer hücreler etkilenmez, hatta uyarılabilir.

Apoptozisi nekrozdan ayırma problemi de vardır. İki süreç de birbirinden bağımsız olarak meydana gelebildiği gibi aynı anda da meydana gelebilir (52). Bazı durumlarda, apoptoz veya nekroz ile hücrelerin ölüp ölmediğini belirleyen, uyarıların türü ve/veya uyarıların derecesidir. Isı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçlar gibi zararlı uyarılar, düşük dozlarda apoptozisi indükleyebilir ve aynı uyarıların yüksek dozları da nekroz ile sonuçlanabilir. Apoptoz, “kaspaz” adı verilen bir sistein proteazları grubunun aktivasyonunu ve başlatıcı uyarı hücrenin nihai ölümü ile birleştiren karmaşık bir olaylar dizisini içeren, koordine ve çoğunlukla enerjiye bağımlı bir süreçtir (48).

4.5.2. Apoptoz ve Akım Sitometri (Flow Cytometry)

Tarihsel olarak, geliştirilen ilk akım sitometri (flow cytometry), sadece hücrelerin büyüklüğünü tespit eden, tek parametrelili bir cihazdır. Günümüzde, son derece karmaşık cihazlar, eş zamanlı olarak 14 parametrenin algılanması ile evrimleşmiştir (53). Akım sitometri, sıvı solüsyon içerisindeki tek bir hücrenin veya mikroorganizmalar, çekirdekler ve kromozom preparatları gibi herhangi bir materyalin bir ışık kaynağından geçirildiğinde optik ve floresan özelliklerini ölçebilir. Akım sitometrinin temel prensibi, hareket eden parçacıklara çarpan uyarım kaynağından (genellikle bir lazer ışını) gelen ışık olarak ortaya çıkan ışık saçılımı ve floresan emisyonu ile ilgilidir. Elde edilen veriler parçacıkların biyokimyasal, biyofiziksel ve moleküler yönleri hakkında değerli bilgiler verebilir. Işık saçılımı, hücrenin yapısal ve morfolojik özellikleri ile doğrudan ilişkiliyken, bir floresans probundan türetilen floresan emisyonu, hücrelere veya hücresel bileşene bağlı floresan prob miktarıyla orantılıdır (54).

İki farklı tipte sitometri vardır; non-sorting ve sorting olarak adlandırılır. Non-sorting tipi, ışık saçılımı ve floresan emisyonunu işleyebilirken, sorting tipi, parçacıkları da işleme yeteneğine sahiptir (53).

Akım sitometreleri ve hücre ayırıcılarının ana bileşenleri temel olarak, fluidik sistem, optikler (uyarı optiği ve toplama optiği), elektronik ağ dedektörleri ve bir

bilgisayardır. Fluidik sistem, sıvı içerisindeki parçacıkları odaklanmış ışık kaynağına yönlendirmekten sorumludur. Uyarı optiği, ışık kaynağını hücreler/parçacıklar üzerine odaklarken; toplama optikleri, parçacıkların ışık saçılımını veya floresan ışığını bir elektronik ağı iletir. Elektronik ağı, sinyali algılar ve sinyalleri ışık şiddeti ile orantılı olan dijital verilere dönüştürür ve bilgisayar da verileri analiz etmek için gereklidir (53, 55).

Akım sitometri, membran, sitoplazmik ve nükleer antijenlerin saptanmasına dayanan çeşitli uygulamalarda kullanılır. Ek olarak, tüm hücreler ve organeller, çekirdekler, DNA, RNA, kromozomlar, sitokinler, hormonlar ve protein içeriği gibi hücresel bileşenler de akım sitometri ile araştırılabilir. Hücre bölünmesi ve hücre döngüsü analizi, kalsiyum flux ve membran potansiyeli ölçümleri akım sitometri için geliştirilen yöntemlerin yaygın olarak kullanılan örnekleridir (56, 57).

Apoptoz, akım sitometri ile floresan bir madde olan propidium iyodür veya PE Annexin V kullanılarak belirlenebilir. Hücrelerde, hücre zarının iç yüzeyinde fosfatidilserin bulunur. Membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin molekülleri, eğer hücre apoptoza giderse, hücre zarının dış yüzeyine doğru hareket eder. Apoptozun erken dönemlerinde, hücre membran bütünlüğünün henüz bozulmadığı dönemlerde, bu yer değiştirme olayı gerçekleşir. Annexin V, fosfatidilserin moleküllerine karşı yüksek affiniteye sahip bir proteindir. Hücrelerde membran bozuklukları, fosfatidilserinler ile Annexin arasındaki bu bağlanma ile akım sitometride gözlemlenebilir (58, 59).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

Bu proje Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-7478 no'lu proje kodu ile desteklenmiştir.

5.1.1. Deney Hayvanlarının Temini

Çalışmada kullanılan sıçanlar KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Bu çalışmada, 200-250 g ağırlığında *Sprague Dawley* türü, 24 adet erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların temini, bakımı, beslenmesi, barınması ve deney süresince takibi KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Bu sayede, çevresel değişikliklerden kaynaklanan stres ve uyum probleminin önüne geçildi.

5.1.2. Sıçanların Bakımı ve Laboratuvar Koşulları

Deney süresi boyunca laboratuvar sıcaklığı ortalama 22 ± 2 °C ve nem oranı ortalama $\%50 \pm 5$ olacak şekilde ayarlandı. Ayrıca ortam aydınlatma koşulları 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Sıçanların beslenmesinde içme suyu ve yem olarak merkezde normal şartlarda kullanılan çeşme suyu ve standart sıçan yemi verildi. Sıçanların barınmasında ise standart Tip III kafesler kullanıldı (Resim 3).



Resim 3. Sıçanların barındığı kafesler

5.1.3. Çalışma Grupları

Çalışma için, 24 adet erişkin erkek sıçan, adaptasyon için deneyden 5 gün önce, rastgele 4 gruba ayrıldı. Uygulanan MTX ve EA dozajları, literatüre uygun olarak belirlendi. Uygulama yapılan gruplara ilişkin veriler aşağıda sıralanmıştır, Tablo 2’de tablo halinde gösterilmiş ve Resim 4’de gavaj uygulaması yapılan bir sıçan resmedilmiştir.

1. Kontrol grubu (n: 6): Bu gruba 5 gün boyunca salin (0.6 ml) gavaj yoluyla verildi.
2. MTX grubu (n: 6): Bu gruba sadece deneyin ilk günü tek doz MTX (20 mg/kg, Koçak Farma, Tekirdağ, Türkiye) intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı.
3. EA grubu (n: 6): Bu gruba 5 gün boyunca EA (25 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, E2250) salinde çözülerek gavaj yoluyla verildi.

4. MTX + EA grubu (n: 6): Bu gruba sadece deneyin ilk günü tek doz MTX (20 mg/kg) i.p. olarak uygulandı ve ilk gün dâhil toplamda 5 gün boyunca EA (25 mg/kg) salinde çözülerek gavaj yoluyla verildi.

Tablo 2. Deney grupları ve uygulamaları

Gruplar	Sıçan Sayısı (n)	Uygulama
1. Grup: Kontrol	6	0.6 ml salin, 5 gün
2. Grup: MTX	6	20 mg/kg MTX, 1. gün
3. Grup: EA	6	25 mg/kg EA, 5 gün
4. Grup: MTX + EA	6	20 mg/kg MTX, 1. gün + 25 mg/kg EA, 5 gün

Deney süresi boyunca tüm uygulamalar, aynı saatler arasında, KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.



Resim 4. Sıçanlara gavaj uygulaması

5.1.4. Testis Dokularının Elde Edilmesi

Sıçanlar, 5. gün, KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde, anestezi altında, kansızlaştırma yöntemi ile sakrifiye edildi. Hemen ardından, steril koşullar altında, sıçanların testisleri çıkartıldı (Resim 5). Çıkarılan sağ testislerin bir yarısı histopatolojik doku takibi için hazır hale getirilmek üzere, aşağıda hazırlanışı verilen 24 saatlik Bouin solüsyonuna koyuldu. Diğer yarısı ise, akım sitometrik işlemler için PBS'ye koyuldu.



Resim 5. Sıçan testislerinin çıkarılması

24 saatlik Bouin solüsyonunun hazırlanışı için karışım şu şekildedir;

- 75 ml pikrik asit
- 75 ml formaldehit
- 5 ml glasiyel asetik asit

5.2. Yöntem

5.2.1. Histopatolojik Yöntem

5.2.1.1. Doku Takibi ve Bloklama

Doku takibi için, KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na getirilen, Bouin solüsyonunda 24 saat bekletilerek tespit edilen dokulara şu işlemler uygulandı;

1. %70'lik etil alkol içerisinde bir gün bekletildi.
2. %90'lik etil alkol içerisinde bir gün bekletildi.
3. %96'lik etil alkol içerisinde bir gün bekletildi.
4. %100'lik etil alkol içerisinde bir gün bekletildi.
5. %100'lik etil alkol içerisinde bir saat bekletildi.
6. Ksilen içerisinde 5 dk bekletildi ve bu işlem basamağı 2 kez daha tekrarlandı.
7. Etüvde, 58 °C'de erimiş parafin içerisinde 15 dk bekletildi ve bu işlem 2 kez daha tekrarlandıktan sonra yine erimiş parafin içerisinde 2 saat bekletildi.
8. Son olarak, dokular oda sıcaklığında bloklandı.

5.2.1.2. Kesitlerin Alınması

Bloklanan dokulardan, LEICA marka, RM2255 model mikrotom ile kesitler alındı. Kesit alma işlemi için, ilk önce 20 µm'lik trimlemeler yapılarak dokuya ulaşıldı. Dokuya ulaşıldıktan sonra, 5 µm'lik kesitler alınarak, bu kesitler, Benmaride 37 °C'ye getirilen su üzerine koyuldu. Su üzerinde kırışıklıkları giderilen kesitler hemen lam üzerine alındı.

Lam üzerine aktarılan dokuları, Hematoksilen & Eozin (H&E) ile boyama işlemi için hazır hale getirilmek üzere zembillere yerleştirilerek 58 °C'deki etüvde parafinleri eritildi.

5.2.1.3. Hematoksilen & Eozin ile Boyama ve Kapatma

Parafini eritilen kesitlere, H&E ile boyama için şu işlemler uygulandı;

1. Ksilen içerisinde 5 dk bekletildi ve bu işlem basamağı bir kez daha tekrarlandı.
2. %100'lük etil alkol içerisinde 5 dakika bekletildi.
3. %96'lık etil alkol içerisinde 5 dakika bekletildi.

4. %70'lik etil alkol içerisinde 5 dakika bekletildi.
5. Distile su içerisinde 2-3 dk bekletildi.
6. Hematoksilen içerisinde 35 sn. bekletildi.
7. Musluk suyu içerisinde 5 dakika bekletildi.
8. Asit Alkol içerisine 1 kez batırıp çıkarıldı.
9. Distile su içerisinde 1 dakika bekletildi.
10. Amonyaklı su içerisinde 10 saniye bekletildi.
11. Distile su içerisinde 1 dakika bekletildi.
12. Eozin içerisinde 30 saniye bekletildi.
13. Distile su içerisinde 1 dakika bekletildi.
14. %70'lik etil alkol içerisinde 5 dakika bekletildi.
15. %96'lık etil alkol içerisinde 5 dakika bekletildi.
16. %100'lük etil alkol içerisinde 5 dakika bekletildi.
17. Ksilen içerisinde 5 dakika bekletildi ve bu işlem basamağı bir kez daha tekrarlandı.
18. Son olarak, boyanan kesitler, lamel ile entellan kullanılarak kapatıldı.

5.2.1.4. Histolojik Ölçümler ve Johnsen Skorlama

Hazırlanan preparatlar, KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Stereoloji laboratuvarı bünyesinde mevcut olan, Olympus DP 71 (Japan) kameralı (Olympus, BX51, Japan) ışık mikroskopunda incelendi. Seminifer tübüller, spermatogenik hücreler ve interstisyel alanların fotoğrafları çekilerek dijital ortama aktarıldı. Seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak ölçüldü.

Johnsen skorlama için fotoğrafları çekilen seminifer tübüllerde hasar değerlendirmeleri gerçekleştirildi (60, 61). Değerlendirme için kullanılan skorlama şu şekildedir;

- 10: Germinal epitel çok sıralı, çok sayıda spermatozoon var.
- 9: Germinal epitel disorganize ve lümene doğru yığılma, spermatozoon var.
- 8: Germinal epitel çok sıralı ancak lümende 10'dan az spermatozoon var.
- 7: Spermatozoon yok, çok sayıda spermatid var.
- 6: Spermatozoon yok, spermatid 10'dan az.

- 5: Spermatozoon yok, spermatid yok, spermatosit var.
- 4: Spermatozoon yok, spermatid yok, spermatosit 5'den az.
- 3: Germ hücresi olarak sadece spermatogonia var.
- 2: Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi var.
- 1: Seminifer tübül içinde hiç hücre yok.

5.2.2. Akım Sitometrik Yöntem

Akım sitometrik işlemler için, KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na getirilen dokulara şu işlemler uygulandı;

1. 0.5-1 g taze doku örnekleri, her grup için ayrı bir petride, 3 ml serum fizyolojik ortamında ince kesitler şeklinde doğrandı.
2. Petrideki dokular, plastik serum tüplerinin tabanları yardımı ile ezilerek, çamur kıvamına gelinceye kadar, mekanik olarak parçalandı.
3. Petride süspansiyon haline getirilen dokular, ayrı ayrı tüplere aktarıldı.
4. Bu süspansiyonlar, DNA mesh (Spectramesh-nylon, 50 micron Backman-Coulter)'den geçirilip süzüldü.
5. Her grup için, her bir süspansiyondan 400 µL örnek alınarak BD Pharmingen PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (Cat: 559763 Lot: 5306537) ile boyandı.

Boyama işlemi için izlenen yol şu şekildedir;

Hücre süspansiyonları her grup için ayrı ayrı Eppendorf tüplere aktarıldı. Hücreler, 2 kez PBS ile yıkanarak 1200 RPM'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Üzerlerine 1X dilüe Binding Buffer eklenerek 15 dk bekletildi. 5 µL PE Annexin V ve 5 µL 7-Amino-actinomycin D (7-AAD) eklenerek hafifçe vortekslendi. 15 dk karanlık ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edildi.

6. Boyama işleminin ardından, maksimum 1 saat içerisinde, akım sitometri cihazında değerlendirildi.

5.2.2.1. Akım Sitometrik Analiz

Akım sitometrik analiz, BD Accuri C6 Cytometer cihazında (488-640 nm) yapıldı ve FCM bilgisayarına aktarıldı. FCM bilgisayarına aktarılan apoptoz piki yüzde oranları,

BD Accuri C6 Cytometer Software ve Multicycle DNA analiz programı kullanılarak değerlendirildi.

5.2.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Version 25, SSPS Inc. Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Gruplara ait veriler aritmetik ortalama ve standart sapma ($\bar{X} \pm SD$) olarak ifade edildi. Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak normal dağılıma (parametrik) uyduğu belirlendi. Bağımsız gruplar değerlendirilirken, One-Way ANOVA testi kullanıldı. Grup içerisindeki posthoc değerlendirmeler için ise, Bonferroni testi kullanıldı. $p < 0.05$ değerleri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Vücut ve Testis Ağırlıklarına Ait Bulgular

Deney gruplarına ait sıçanların ilk ağırlıkları, son ağırlıkları ve testis ağırlıkları ölçülerek istatistik değerlendirmesi yapılmış, ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 3’de verilmiştir. Elde edilen istatistiksel verilere göre kontrol grubuna ait sıçanların vücut ve testis ağırlıkları diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 3).

Tablo 3. Deney gruplarının vücut ve testis ağırlıklarına ait ortalama ve standart sapmalar

Gruplar	Vücut Ağırlıkları (g)	Testis Ağırlıkları (g)
1. Grup: Kontrol	221.15 ± 32.33	1.16 ± 0.22
2. Grup: EA	219.21 ± 33.23	1.15 ± 0.12
3. Grup: MTX	196.11 ± 31.51	1.11 ± 0.19
4. Grup: MTX + EA	200.96 ± 26.12	1.13 ± 0.30

6.2. Morfometrik Bulgular

6.2.1. Seminifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığına Ait Bulgular

Deney gruplarına ait testis dokularındaki seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı ölçüm sonuçları Tablo 4’de verilmiştir. Verilerin istatistik değerlendirmelerine göre, sonuçlar aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

Seminifer tübül çapında, kontrol grubuna kıyasla, MTX ve MTX + EA gruplarında azalma görüldü. Bu azalma, kontrol grubuna göre, MTX grubunda anlamlı bulunurken, MTX + EA grubunda anlamlı bulunmadı (sırasıyla; $p<0.05$, $p>0.05$). Seminifer tübül çapında, kontrol grubuna göre, EA grubunda anlamlı olmayan bir artma görüldü ($p>0.05$). EA grubuna göre seminifer tübül çapı, MTX ve MTX + EA gruplarında azalış göstermiştir. Bu azalış, MTX grubunda anlamlı iken, MTX + EA grubunda anlamlı değildir (sırasıyla $p<0.05$, $p>0.05$). MTX grubuna göre seminifer tübül çapı, MTX + EA grubunda anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$).

Germinal epitel kalınlığında, kontrol grubuna göre EA grubu, hemen hemen eşit bulunurken, MTX, MTX + EA gruplarında anlamlı bir şekilde azalma görüldü ($p<0.05$).

EA grubuna göre germinal epitel kalınlığı, MTX ve MTX + EA gruplarında anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$). MTX grubuna göre germinal epitel kalınlığında MTX + EA grubunda anlamlı bir artma belirlendi ($p<0.05$).

Lümenine immatür hücre dökülen seminifer tübül sayısı, kontrol grubuna göre MTX grubunda anlamlı artma, EA grubunda ise anlamlı azalma görüldü (sırasıyla $p>0.05$, $p<0.05$). MTX + EA grubu ise hemen hemen kontrol grubuna eşit bulundu. EA grubuna kıyasla lümenine immatür hücre dökülen seminifer tübül sayısı, MTX ve MTX + EA gruplarında anlamlı olacak şekilde artmıştır ($p<0.05$). MTX grubuna göre lümenine immatür hücre dökülen seminifer tübül sayısı, MTX + EA grubunda anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$) (Tablo 4).

Tablo 4. Seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve lümenine immatür hücre dökülen seminifer tübül sayısına ait ortalama ve standart sapmalar

Gruplar	Seminifer Tübül Çapı (μm)	Germinal Epitel Kalınlığı (μm)	Lümenine İmmatür Hücre Dökülen Seminifer Tübül Sayısı (%)
1. Grup: Kontrol	247.13 $\pm$ 18.73	88.1 $\pm$ 7.53	31.5 $\pm$ 6.19
2. Grup: EA	251.91 $\pm$ 4.93	87.26 $\pm$ 5.68	26.83 $\pm$ 5.36 ^a
3. Grup: MTX	222.19 $\pm$ 8.51 ^{a, b}	52.03 $\pm$ 3.34 ^{a, b}	39.66 $\pm$ 8.22 ^{a, b}
4. Grup: MTX + EA	239.87 $\pm$ 9.1 ^c	69.65 $\pm$ 3.66 ^{a, b, c}	31.43 $\pm$ 5.78 ^{b, c}

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

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

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

6.2.2. Johnsen Skorumla Sonuçları

Deney gruplarına ait testis dokusunda hasar değerlendirmesi için, Johnsen skorlaması yapılarak istatistik değerlendirmesi yapılmıştır. İstatistik değerlendirmelerine ait ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 5’de verilmiştir.

Johnsen skoru, kontrol grubuna kıyasla MTX grubu anlamlı olarak azalmış ($p<0.05$), EA grubunda ise hemen hemen eşit bulunmuştur. EA grubuna kıyasla MTX grubu skorunda anlamlı bir azalma görülmüştür. MTX grubuna göre MTX + EA grubunda skor anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$).

Tablo 5. Deney gruplarının testis dokularındaki Johnsen skorlarına ait ortalama ve standart sapmalar

Gruplar	Johnsen Skoru
1. Grup: Kontrol	9.62±0.19
2. Grup: EA	9.27±0.32
3. Grup: MTX	4.17±0.67 ^{a, b}
4. Grup: MTX + EA	8.36±0.63 ^c

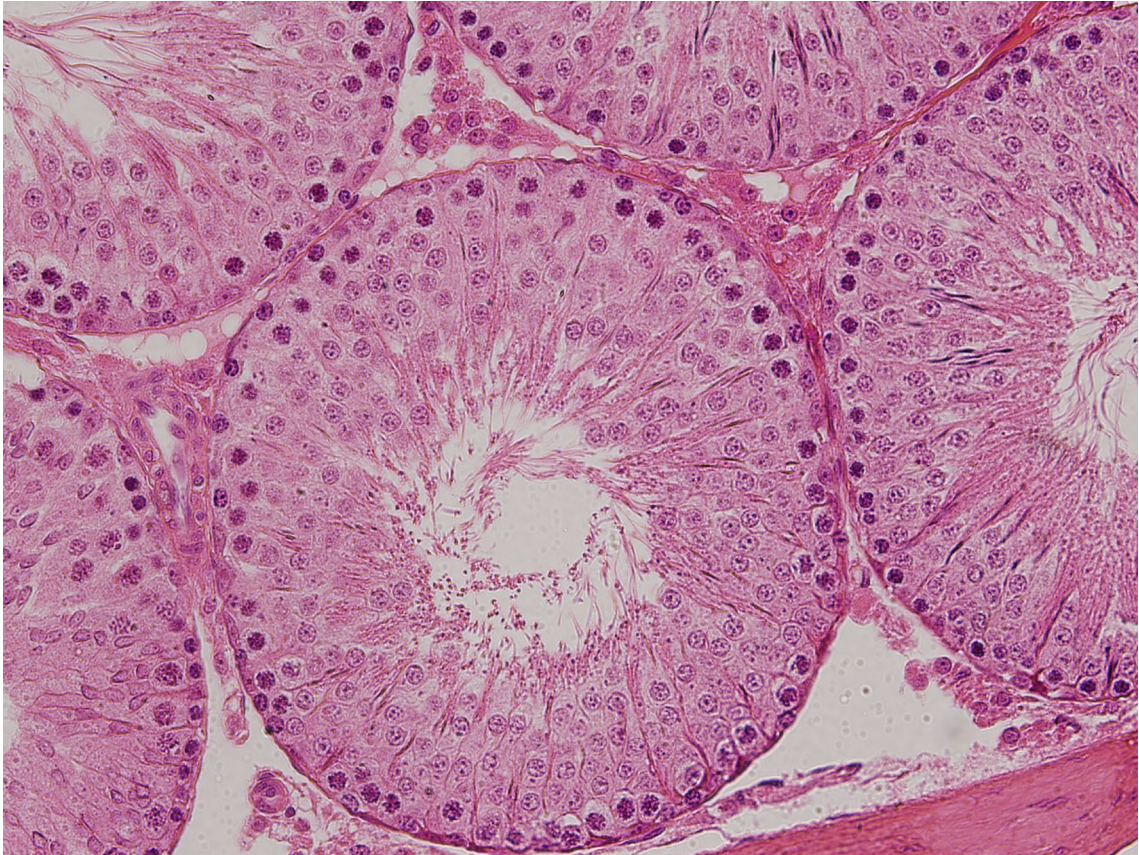
^a: Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır (p<0.05).

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

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

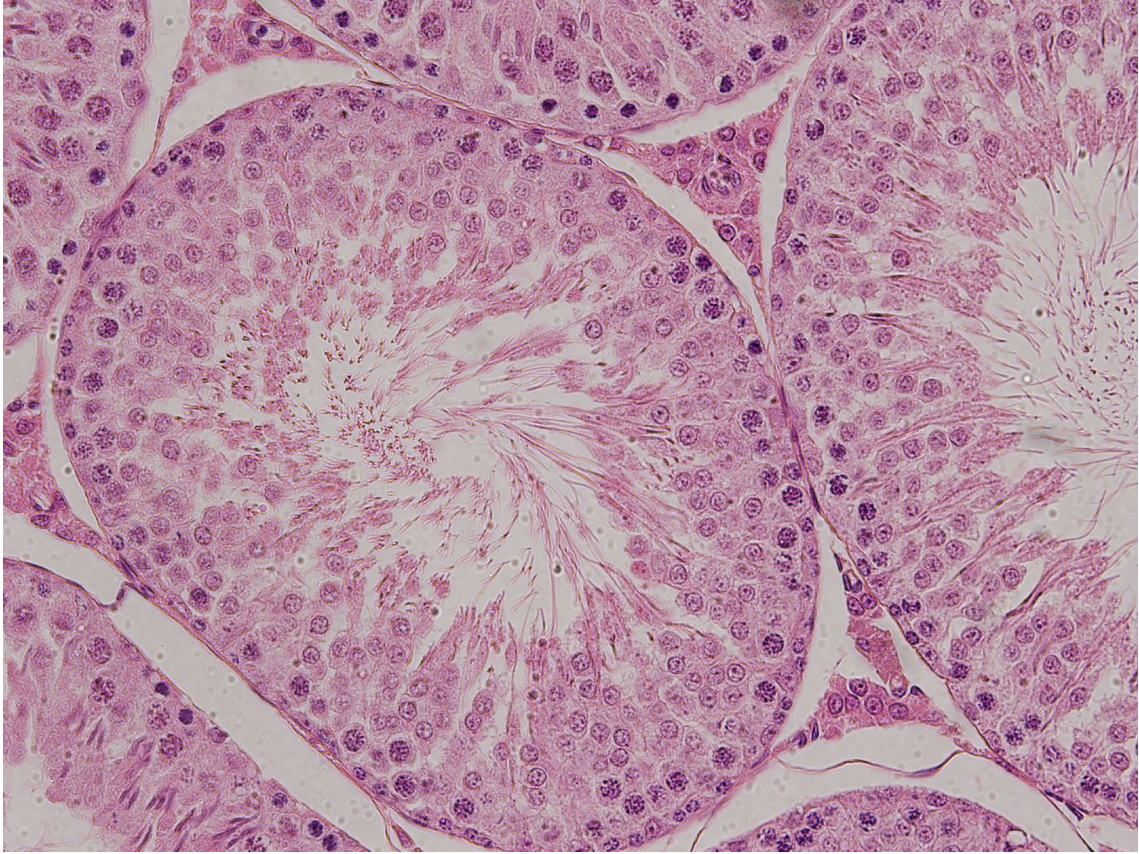
6.3. Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubunda, seminifer tübüllerde, tübül çapı, germinal epitel kalınlığı, Sertoli hücreleri ve miyoid hücreler normal yapıda izlendi. Spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler düzgün sıralı gözlemlendi. İnterstisyel alanda Leydig hücrelerinin normal görünümü olarak yapısını koruduğu görüldü (Resim 6).



Resim 6. Kontrol grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)

EA grubunda, seminifer tübül ve interstisyel alan düzgün yapıda gözlendi. seminifer tübüllerde, tübül çapı, germinal epitel kalınlığı, Sertoli hücreleri ve miyoid hücreler normal yapıda izlendi. Spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler düzgün sıralı gözlendi (Resim 7).



Resim 7. EA grubuna ait testis dokusu (H&E, X400)

MTX grubunda, seminifer tübül epitelinde açılmalar görüldü. Spermatogonyumlarda atrofi gözlenirken, spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar düzgün yapıda gözlendi. Seminifer tübül lümenine dökülen immatür hücre sayısında bir miktar artış tespit edildi. İnterstisyel alanda, Leydig hücrelerinde atrofi belirlendi (Resim 8).



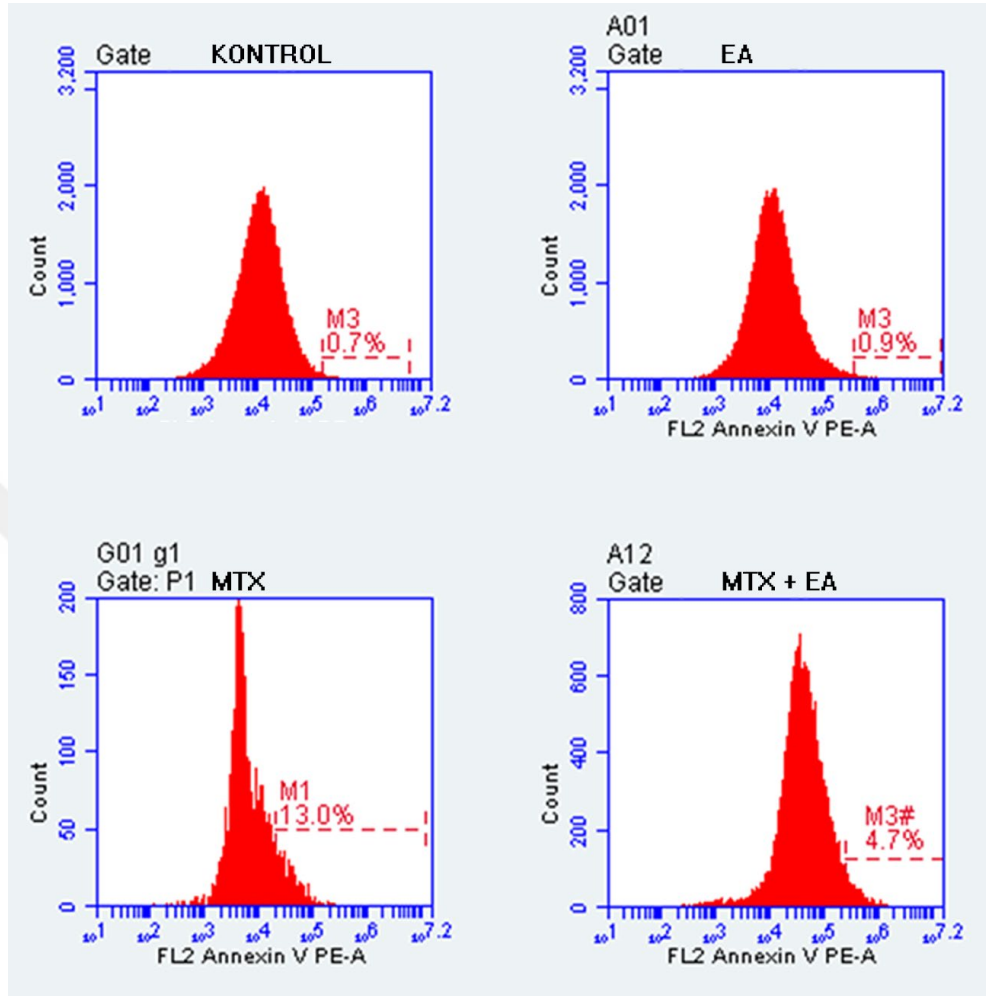
Resim 8. MTX grubuna ait testis dokusu. Ok (←) işareti seminifer epitelde açılmayı, yıldız (*) ise seminifer tübül lümenine dökülen immatür hücreleri göstermektedir (H&E, X400)

MTX + EA grubunda, spermatogonyumlar normal yapıda gözlendi. Epiteliyal hücreler arasında yer yer az sayıda açılmalar görüldü. Seminifer tübül lümenine dökülen immatür hücrelerde, MTX grubuna göre azalma belirlendi (Resim 9).



Resim 9. MTX + EA grubunda testis dokusu. Tek yönlü ok (←) seminifer tübül epitelinde açılmayı göstermektedir (H&E, X400)

6.4. Akım Sitometrik Bulgular



Resim 10. Kontrol, EA, MTX ve MTX + EA gruplarına ait apoptotik indeks yüzdelere ait akım sitometrik histogram

Tablo 6. Deney gruplarının apoptotik indeks (AI) ortalamaları ve standart sapmalar

Gruplar	Apoptotik İndeks
	% (AI)
1. Grup: Kontrol	0.63±0.17
2. Grup: EA	0.8±0.089
3. Grup: MTX	19.43 ± 6.5 ^{a, b, c}
4. Grup: MTX + EA	5.1±0.57

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

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

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

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser insidansının her geçen gün artmasına paralel olarak, anti-neoplastik ilaçların kullanımı da artmaktadır. MTX, en yaygın olarak bilinen antikanser ajanlarından biridir. Kanser kemoterapisinin yanı sıra, otoimmün, inflamatuvar ve romatolojik hastalıklarda da yaygın bir kullanıma sahip olan MTX, tedavi ile birlikte yan etkilere de sebep olmaktadır. İlacın kullanım alanlarını genişletmek maksadıyla, bu yan etkilerin azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (62, 63). MTX, tetrahidrofolat sentezine katılan bir enzim olan dihidrofolat redüktazı (DHFR) inhibe eder (33, 34). Yan etkilerinin bu folat metabolizmasında oluşabilecek polimorfizmlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (64). Bu yan etkiler testislerde, testis hasarı ve infertilite şeklinde kendini göstermektedir (65).

EA, serbest radikalleri temizleyebilen iyi bir antioksidandır. EA'nın oksidatif strese karşı, E vitamininden daha iyi koruma sağladığı tespit edilmiştir. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada, EA tarafından H₂O₂'ye karşı deneysel sitogenetik koruması, reaktif serbest radikalleri temizleyerek olabileceğini bildirilmiştir (38). EA'nın, hem süperoksit anyonu O₂⁻, hem de OH radikali ve aynı zamanda lipid peroksidasyonu üzerinde güçlü bir yok edici etki gösterdiği belirlenmiştir (47).

Gonadlar, üreme sisteminin önemli bileşenleridir. MTX'in seminifer epitel kalınlığını azalttığı bilinmektedir (66). Ayrıca testis üzerindeki yan etkileri nedeniyle infertiliteye neden olabilir. Önceki çalışmalar, MTX'in sperm DNA'sına ve testislerdeki seminifer tübüllere zarar verdiğini ve ayrıca, sperm sayısını azalttığını göstermiştir. Ek olarak, MTX'in, hücrelerin, antioksidan faktörlerini azaltarak serbest radikallerin zararlı etkilerini açığa çıkardığı ve böylece testiküler doku ve germ hücrelerine zarar verdiğini gösterilmiştir (67).

Literatürde sıçanların, MTX'in testis dokusu üzerine etkisi ilgili birçok çalışma mevcuttur (12, 66, 68-74).

Shrestha ve arkadaşları MTX'in sıçan testis histolojisi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar yapmışlardır. Bu araştırmacılar, MTX'in farklı doz ve sürelerde, seminifer tübüller, spermatogenik seri hücreleri ve interstisyel alanlardaki etkilerini incelemişlerdir. Buna göre, Pınar ve arkadaşları, alfa lipoik asitin (ALA) erkek farelerdeki testiküler hücre gelişimi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışma yapmışlardır. Bunun için, ALA, MTX,

MTX + ALA ve Kontrol grubu olmak üzere 4 grup oluşturmuşlar, tek doz MTX (20 mg/kg i.p.) uyguladıkları gruplara 10 gün boyunca ALA (100 mg/kg i.p.) ile tedavi etmişlerdir. MTX grubunda, seminifer tübüllerde vakuoler dejenerasyon, tübül lümeninde germ hücrelerinin görüldüğü tübül sayısında artma, epitel kalınlığında azalma ve ödem bulgularına rastlamışlardır (71).

Sönmez ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada; MTX uyguladıkları grupta, seminifer tübüllerde, seminifer epitelde vakuolizasyon, germinal hücrelerde düzensizlik, bazı seminifer tübüllerde atrofi tespit etmişlerdir ve interstisyel alanda ciddi hasar gördüklerini bildirmişlerdir (69).

Yüncü ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada; MTX grubunda seminifer tübüllerde vakuolizasyon, seminifer tübül epitelinde incelmeye, interstisyel alanda konjesyon bulgularına rastlamışlardır (72).

Yuluğ ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; MTX grubunda seminifer tübüllerin lümeninde dökülme ve spermatozoon kaybı ile olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri görmüşlerdir (68).

Saxena ve arkadaşlarının yapmış olduğu MTX uygulamasında, seminifer tübül çapında azalma, interstisyel alanda anlamlı artma ve seminifer tübül epitelinde vakuolizasyon tespit etmişlerdir (12).

Shrestha ve arkadaşları, farklı dozlarda MTX uygulamış, bunun sonucunda seminifer tübül çapında daralma, seminifer epitelin bazal membranında ve Leydig hücrelerinde düzensizlik olduğunu bildirmişlerdir (75).

Yapmış olduğumuz çalışmada, Gökçe ve arkadaşlarının yapmış oldukları testis toksisitesi çalışmasına paralel olarak, sıçanlara i.p. olarak tek doz 20 mg/kg MTX uygulandı. MTX'in indüklediği testis hasarına karşı EA'nın iyileştirici etkilerini araştırmak amacıyla, sıçanlara 5 gün boyunca 25 mg/kg EA verildi (74). Daha önce Yuluğ ve arkadaşları (68), Sönmez ve arkadaşları (69) ve Işık ve arkadaşlarının (70) yapmış olduğu çalışmalar ışığında, bu çalışmada; MTX grubunda, kontrol grubuna göre seminifer tübül çapında ve epitel kalınlığında anlamlı şekilde azalma, lümenine immatür hücre dökülen seminifer tübül sayısında anlamlı artış tespit ettik. MTX + EA grubunda ise MTX grubuna göre seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığının anlamlı olarak arttığını, lümenine immatür hücre dökülen seminifer tübül sayısının ise anlamlı azaldığını bulduk. EA

grubunda, seminifer tübül çapının MTX grubuna göre anlamlı, MTX + EA grubuna göre ise anlamsız arttığını; epitel kalınlığının kontrole göre hemen hemen eşit olduğunu belirledik. Ayrıca, MTX grubunda, kontrol grubuna göre lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısında anlamlı artış, seminifer tübül epitelinde açılmalar, Leydig hücrelerinde ve spermatogonyumlarda atrofi gördük. Bu bağlamda, bulgularımız, EA'nın, MTX'in oluşturduğu degeneratif etkilerini kısmen düzelttiğini göstermektedir.

Güven ve arkadaşlarının MTX kaynaklı testis hasarı üzerine shilajitin'in etkilerini araştırdıkları çalışmalarından elde edilen istatistiksel verilere göre, kontrol grubuna ait sıçanların vücut ve testis ağırlıkları, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir (76). Bizim  alı mamızda da, deney öncesi sıçan vücut ağırlıklarında ve testis ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Bu durum, grupların homojen olarak dağıtıldığını göstermektedir. Deney sonrası MTX grubu sıçan vücut ağırlıklarının, diğer gruplara göre anlamlı olmayacak şekilde azaldığı gözlendi. Yine aynı şekilde, MTX grubuna ait testis ağırlıkları da diğer gruplara kıyasla anlamsız olarak azalmıştır.

Akım sitometri, apoptoz tayini yapmak amacıyla sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir (77). Deney gruplarına ait testis dokusunda hasar değerlendirmesi için, Johnsen skorlaması ve akım sitometri analizlerinin istatistik değerlendirmesi yapılmıştır. Koç ve arkadaşlarının MTX uyguladığı çalışmalarında, testis dokusu üzerinde Apoptotik indeks (AI) ve Johnson skorlaması yapılmıştır. Sonuçlara göre, apoptotik hücre sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını, Johnsen skor değerlerinin ise anlamlı şekilde azaldığını belirlemişlerdir (78). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada, Johnsen skoru, kontrol grubuna kıyasla MTX grubunda anlamlı olarak azalmış, EA grubunda ise hemen hemen eşit bulunmuştur. EA grubuna kıyasla MTX grubu Johnsen skorunda anlamlı bir azalma görülmüştür. MTX grubuna göre ise MTX + EA grubunda bu skor anlamlı olarak artmıştır. Yine Koç ve arkadaşlarının AI sonuçlarına paralel olarak, çalışmamızın akım sitometrik analizlerine göre MTX grubuna ait apoptotik indeks yüzdesi, kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. İstatistik olarak anlamlı bulunan bu bulgu, MTX'e bağlı olarak apoptozun önemli derecede arttığını göstermektedir. MTX + EA grubuna ait apoptotik indeks, MTX grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Bu bağlamda, MTX'in doku hasarını arttırdığını, EA'nın ise bu hasarı belirli ölçülerde iyileştirdiğini göstermektedir.

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

Bu çalışma, EA'nın MTX'e bağlı oluşan testis dokusu hasarını düzelttiğini göstermektedir. Ancak oksidan-antioksidan dengesindeki değişimlere bağlı olarak, MTX ile oluşturulan testis hasarına karşı EA'nın farklı dozlarda uygulandığı ve farklı parametrelerin kullanıldığı araştırmalar ile daha detaylı sonuçlar elde edilebileceğini düşünüyoruz.

8. KAYNAKLAR

1. Adams MP, Urban C (2015). Pharmacology: Connection to Nursing. 3rd ed. Pearson Education, 1-1140.
2. Chan AJ, Rajakumar I (2014). High-dose methotrexate in adult oncology patients: a case-control study assessing the risk association between drug interactions and methotrexate toxicity. *Journal of Oncology Pharmacy Practice* 20(2): 93-99.
3. Fermiano M, Bergsbaken J, Kolesar JM (2014). Glucarpidase for the management of elevated methotrexate levels in patients with impaired renal function. *American Journal of Health-System Pharmacy* 71(10): 793-798.
4. Karch AM (2012). 2013 Lippincott's Nursing Drug Guide. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA; 1-1486.
5. Cronstein BN (2005). Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacological Reviews* 57(2): 163-172.
6. Sentürk N (2016). Metotreksat. *Turkderm* 50: 20.
7. Mayer-Kuckuk P, Banerjee D, Malhotra S, Doubrovin M, Iwamoto M, Akhurst T, Balatoni J, Bornmann W, Finn R, Larson S (2002). Cells exposed to antifolates show increased cellular levels of proteins fused to dihydrofolate reductase: a method to modulate gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(6): 3400-3405.
8. Saxena A, Singh C (1990). Effect of cyclophosphamide on the seminiferous tubules and leydig cells in rat. *Anatomical Society* 32: 101-107.
9. Russell LD, Russell JA (1991). Short-term Morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. *Developmental Dynamics* 192(2): 142-168.
10. Saxena A, Singh G (1999). Cyclophosphamide modulates gene expression in neonatal rat testis following antenatal exposure to fetuses during testicular differentiation. *Archives of Andrology* 42(3): 205-210.
11. Wheeler GP (1962). Studies related to the mechanisms of action of cytotoxic alkylating agents: a review. *Cancer Research* 22(6): 651-688.
12. Saxena A, Dhungel S, Bhattacharya S, Jha C, Srivastava A (2004). Effect of chronic low dose of methotrexate on cellular proliferation during spermatogenesis in rats. *Archives of Andrology* 50(1): 33-35.

13. Seeram NP, Lee R, Heber D (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinica Chimica Acta* 348(1-2): 63-68.
14. Zhang H, Guo ZJ, Xu WM, You XJ, Han L, Han YX, Dai LJ (2014). Antitumor effect and mechanism of an ellagic acid derivative on the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line. *Oncology Letters* 7(2): 525-530.
15. Malini P, Kanchana G, Rajadurai M (2011). Antibabetic efficacy of ellagic acid in streptozotocin-induced diabetes mellitus in albino wistar rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 4(3): 124-128.
16. Sepúlveda L, Ascacio A, Rodríguez-Herrera R, Aguilera-Carbó A, Aguilar CN (2011). Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. *African Journal of Biotechnology* 10(22): 4518-4523.
17. Losso JN, Bansode RR, Trappey II A, Bawadi HA, Truax R (2004). In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 15(11): 672-678.
18. Ovalle WK, Nahirney PC (2013). *Netter's Essential Histology*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences, 1-486.
19. Eroschenko VP, Di Fiore MS (2013). *DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. 12th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1-603.
20. Ross MH, Pawlina W (2014). *Histology*. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1-972.
21. Bertino JR (2000). *Methotrexate: historical aspects*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland; 1-7.
22. Meyer LM, Miller FR, Rowen MJ, Bock G, Rutzky J (1950). Treatment of acute leukemia with amethopterin (4-amino, 10-methyl pteroyl glutamic acid). *Acta Haematologica* 4(3): 157-167.
23. Gubner R (1951). Effect of aminopterin on epithelial tissues. *American Medical Association Archives of Dermatology and Syphilology* 64(6): 688-699.
24. Rees RB, Bennett JH, Bostick WL (1955). Aminopterin for psoriasis. *American Medical Association Archives of Dermatology* 72(2): 133-143.
25. Edmundson WF, Guy WB (1958). Treatment of psoriasis with folic acid antagonists. *American Medical Association Archives of Dermatology* 78(2): 200-203.

26. Wright JC, Prigot A, Wright BP, Weintraub S, Wright LT (1951). An evaluation of folic acid antagonists in adults with neoplastic diseases. *Journal of the National Medical Association* 43(4): 211.
27. Li MC, Hertz R, Spencer DB (1956). Effect of methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenoma. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 93(2): 361-366.
28. Wright JC, Gumport S, Golomb F (1960). Remissions produced with the use of Methotrexate in patients with mycosis fungoides. *Cancer Chemotherapy Reports* 9: 11-20.
29. Wright JC, Lyons MM, Walker DG, Golomb FM, Gumport SL, Medrek TJ (1964). Observations on the use of cancer chemotherapeutic agents in patients with mycosis fungoides. *Cancer* 17(8): 1045-1062.
30. Berlin NI, Rall D, Mead J, Freireich EJ, Van Scott E, Hertz R, Lipsett MB (1963). Folic Acid Antagonists: Effects on the Cell and the Patient Combined Clinical Staff Conference at the National Institutes of Health. *Annals of Internal Medicine* 59(6): 931-957.
31. Weinstein GD, Frost P (1971). Methotrexate for psoriasis: a new therapeutic schedule. *Archives of Dermatology* 103(1): 33-38.
32. Smith KC, Su WD, Muller SA (1989). Methotrexate in dermatology. *Derm Sinica* 7: 11-18.
33. Rajagopalan PR, Zhang Z, McCourt L, Dwyer M, Benkovic SJ, Hammes GG (2002). Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(21): 13481-13486.
34. Goodsell DS (1999). The molecular perspective: methotrexate. *The Oncologist* 4(4): 340-341.
35. Wessels J, Huizinga T, Guchelaar HJ (2007). Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 47(3): 249-255.
36. Böhm I (2004). Increased peripheral blood B-cells expressing the CD5 molecules in association to autoantibodies in patients with lupus erythematosus and evidence to selectively down-modulate them. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58(5): 338-343.

37. Brody M, Böhm I, Bauer R (1993). Mechanism of action of methotrexate: experimental evidence that methotrexate blocks the binding of interleukin 1 β to the interleukin 1 receptor on target cells. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 31(10): 667-674.
38. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H (2002). Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(7): 2200-2206.
39. Li TM, Chen GW, Su CC, Lin JG, Yeh CC, Cheng KC, Chung JG (2005). Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Research* 25(2A): 971-979.
40. Ghudhaib KK, Hanna ER, Jawad AH (2010). Effect of ellagic acid on some types of pathogenic bacteria. *Journal of Al-Nahrain University-Science* 13(2): 79-85.
41. Zhang HM, Zhao L, Li H, Xu H, Chen WW, Tao L (2014). Research progress on the anticarcinogenic actions and mechanisms of ellagic acid. *Cancer Biology & Medicine* 11(2): 92.
42. Khanbabaee K, van Ree T (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports* 18(6): 641-649.
43. Clifford MN, Scalbert A (2000). Ellagitannins—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7): 1118-1125.
44. Landete J (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International* 44(5): 1150-1160.
45. Niemetz R, Gross GG (2005). Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* 66(17): 2001-2011.
46. Özkaya A, Çelik S, Yüce A, Şahin Z, Yılmaz Ö (2010). The effects of ellagic acid on some biochemical parameters in the liver of rats against oxidative stress induced by aluminum. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 16(2): 263-268.
47. Yüce A, Ateşşahin A, Çeribaşı AO, Aksakal M (2007). Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 101(5): 345-349.

48. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26(4): 239.
49. Horvitz HR (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Research* 59(7): 1701-1706.
50. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini G, Capaccioli S, Zecchi Orlandini S (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of Cellular Physiology* 182(1): 41-49.
51. Norbury CJ, Hickson ID (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41(1): 367-401.
52. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15(13): 1573.
53. Wilkerson MJ (2012). Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 42(1): 53-71.
54. Macey MG (2007). Principles of flow cytometry. Humana Press, Totowa, New Jersey; 1-15.
55. Shapiro HM, Telford WG (2018). Lasers for flow cytometry: current and future trends. *Current Protocols in Cytometry* 83(1): 1.9.1-1.9.21.
56. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z (2011). Rapid quantification of cell viability and apoptosis in B-cell lymphoma cultures using cyanine SYTO probes. *Mammalian Cell Viability. Springer Science* 740: 81-89.
57. Wlodkowic D, Skommer J, Akagi J, Fujimura Y, Takeda K (2013). Multiparameter Analysis of Apoptosis Using Lab-on-a-Chip Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry* 66(1): 9.42.41-49.42.15.
58. Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis* 3(2): 115-121.

59. Güleş Ö, Ülker E (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 19(2): 73-78.
60. Johnsen SG (1970). Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormone Research in Paediatrics 1(1): 2-25.
61. Oliveira Filho AB, Souza RSd, Azeredo-Oliveira MTVd, Peruquetti RL, Cedenho AP (2010). Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis. Genetics and Molecular Research 9(3): 1405-1413.
62. 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. Seminars in Arthritis and Rheumatism 27(5): 277-292.
63. Kayaalp SO (2000). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1. Cilt. Hacettepe-Taş Kitapçılık, 1-1555.
64. Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N (2003). Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. International Journal of Molecular Medicine 11(5): 593-600.
65. Türk G (2013). Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. Marmara Pharmaceutical Journal 17(2): 73-92.
66. Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M (2009). Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. Andrologia 41(2): 105-110.
67. Sayılmaz A, Karabulut YY, Özgörgülü A (2016). The histopathological evaluation of healing effects of vitamin C administered before methotrexate therapy on testicular injury induced by methotrexate. Turkish Journal of Urology 42(4): 235.
68. Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C (2013). Effects of resveratrol on methotrexate-induced testicular damage in rats. The Scientific World Journal 2013(489659): 1-6.
69. Sönmez MF, Çilenk KT, Karabulut D, Ünalmış S, Deligönül E, Öztürk İ, Kaymak E (2016). Protective effects of propolis on methotrexate-induced testis injury in rat. Biomedicine & Pharmacotherapy 79: 44-51.

70. Işık A, Işılay L, Erdemli E, Akbay C, Anafarta K (1997). Sıçan testisinde metotreksat'ın ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 50: 125-129.
71. Pınar N, Kaplan M, Özgür T, Özcan O (2018). Ameliorating effects of tempol on methotrexate-induced liver injury in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy 102: 758-764.
72. 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. Turkish Journal of Medical Sciences 45(3): 517-525.
73. Vardı N, Parlakpınar H, ATEŞ B, Otlı A (2010). Metotreksatın neden olduğu testiküler hasara karşı klorogenik asidin koruyucu etkileri. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences 30(2): 507-513.
74. Gökçe A, Oktar S, Koc A, Yonden Z (2011). Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. Human & Experimental Toxicology 30(8): 897-903.
75. Shrestha S, Dhungel S, Saxena A, Bhattacharya S, Maskey D (2007). Effect of methotrexate (MTX) administration on spermatogenesis: an experimental on animal model. Nepal Medical College Journal 9(4): 230-233.
76. Güven E, Erişgin Z, Tekelioğlu Y (2017). Sıçanlarda metotreksat kaynaklı testis hasarı üzerine shilajitin'in histopatolojik etkisi. Kocatepe Tıp Dergisi 18(1): 1-6.
77. Kanev M, Muranlı FG (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. Sakarya University Journal of Science 20(1): 33-38.
78. Koc F, Erişgin Z, Tekelioğlu Y, Takır S (2018). The effect of beta glucan on MTX induced testicular damage in rats. Biotechnic & Histochemistry 93(1): 70-75.

9. EKLER

9.1. EK 1. ETİK KURUL ONAYI



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

Sayı : 53488718 - 52
Konu: Onay Belgesi

24/01/2018

Sayın, Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU
Histoloji ve Embriyoloji ABD. Öğretim Üyesi,

“Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Ellajik Asitin Etkileri” başlık ve 2018/3 protokol numaralı çalışma önerisi Kurulumuzca incelenmiş olup; yürürlükteki etik ilke ve kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Ahmet AYAR
Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

61080 – Trabzon / TÜRKİYE

Tel: +90 (462) 377 5403

Faks: +90(462)325 2270

Elektronik Ağ: www.ktu.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin İrtibat
Şerafettin YILMAZ
e posta:
serafettinyilmaz@ktu.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : UZUN, Ferhat
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 29.06.1992 - Essen / F. Almanya
Medeni hali : Bekâr
E-Posta : ferhat.u61@gmail.com
Yazışma adresi : Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri
Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2018
Lisans	KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2016
Lise	Trabzon Yunus Emre Lisesi	2010

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Yüksek Lisans Öğrencisi	KTÜ, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2016 – 2018

YABANCI DİL

İngilizce