

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**METOTREKSATIN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI
ÜZERİNE ELLAGİK ASİTİN KORUYUCU ETKİSİ**

**Hazırlayan
Ayşegül GÜRBAK**

**Danışman
Prof. Dr. Birkan YAKAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Kasım 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**METOTREKSATIN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI
ÜZERİNE ELLAGİK ASİTİN KORUYUCU ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Ayşegül GÜRBAK**

**Danışman
Prof. Dr. Birkan YAKAN**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL-2016-6674 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

**Kasım 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Ayşegül GÜRBAK

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Metotreksatın Oluşturduğu Testis Hasarı Üzerine Ellagik Asitin Koruyucu Etkisi” adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Erciyes Üniversitesi Yüksek Lisans Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Ayşegül GÜRBAK

Danışman

Prof. Dr. Birkan YAKAN

Ana Bilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Birkan YAKAN

Prof. Dr. Birkan YAKAN danışmanlığında **Ayşegül GÜRBAK** tarafından hazırlanan **“Metotreksatın Oluşturduğu Testis Hasarı Üzerine Ellagik Asitin Koruyucu Etkisi”** konulu bu çalışma, jürimiz tarafından **Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / / 2017

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof. Dr. Birkan YAKAN
(Erciyes Üni. Histoloji- Embriyoloji AD)

Üye : Doç. Dr. Arzu YAY
(Erciyes Üni. Histoloji- Embriyoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Hüseyin Eray BULUT
(Cumhuriyet Üni. Histoloji- Embriyoloji AD)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun.....tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / / ...

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesi, planlanması ve yürütülmesinde bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım ve bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Birkan YAKAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca hoşgörü ortamı içerisinde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen bölüm hocalarımız Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR, Doç. Dr. Arzu YAY ve Uzm. Dr. Esra BALCIOĞLU'na,

Bu çalışmayı yaparken deneysel bölümünde benden katkısını esirgemeyen sevgili bölüm arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi anlamda hep benimle olan aileme, desteğini hiç esirgemeyen eşim Ali Ersin GÜRBAK ve değerli arkadaşım Ayşe CEYHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayşegül GÜRBAK

Kasım 2017, KAYSERİ

METOTREKSATIN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI ÜZERİNE ELLAGİK ASİTİN KORUYUCU ETKİSİ

Ayşegül GÜRBAK

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
Yüksek Lisans Tezi, Kasım 2017
Danışman: Prof. Dr. Birkan YAKAN**

ÖZET

Antikanserojen bir ilaç olan Metotreksat (MTX), sıçan testislerinde spermatojenik seri hücrelerinde ve destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ile Leydig hücrelerinde hasara yol açmaktadır. Bu çalışmada, MTX ile testis dokusunda oluşturulan hasar üzerine Ellagik Asit (EA)'in etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

Deneyde 48 adet ergin erkek Wistar albino türü sıçanlar kullanıldı. Denekler ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Kontrol grubu: Grup 1 mısırözü yağı (12 gün) intraperitoneal (i.p.), EA 40 mg/kg (12 gün) (i.p.): Grup 2, EA 80 mg/kg (12 gün) (i.p.): Grup 3, MTX 20 mg/kg (tek doz) (i.p.): grup 4, MTX 20 mg/kg (tek doz) (i.p.)+EA 40 mg/kg (12 gün) (i.p.): grup 5, MTX 20 mg/kg (tek doz) (i.p.)+EA 80 mg/kg (12 gün): grup 6. Grup 5 ve 6' ya deneyin 3.gününde EA uygulamasından 4 saat sonra metotreksat 20 mg/kg tek doz i.p. olarak uygulandı. Hayvanlar 12. gün sakrifiye edildi. Alınan testis dokuları histopatolojik değerlendirmeler için Hematoxylin - eosin (H & E) ile boyanıp ışık mikroskopik incelendi. Tübüllerdeki hasarlanmanın derecesinin değerlendirilmesinde Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) kullanıldı. TUNEL tekniğiyle de apoptozis seviyesi belirlendi. Biyokimyasal analizlerde SOD, MDA, CAT parametlerine bakıldı.

Histopatolojik olarak; yalnızca MTX verilen grupta spermatojenik hücre serilerinde bozulmalar, vakualizasyon, ödem, lümende olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri gibi bulgular saptandı. MTX uygulanan grupta, Johnsen 'in testiküler biyopsi skoru seviyesi azalırken, apoptotik hücre sayısında artış gözlenirken, MDA, SOD, CAT parametreleri anlamsız olarak kabul edildi. MTX+EA 80 verilen grupta histopatolojik olarak daha iyi sonuçlar elde edilirken, JTBS seviyesinde yükselme, apoptotik hücre sayısında oldukça fazla yükseliş gözlemlendi.

Sonuç olarak tek doz MTX uygulanması daha önceki çalışmalarda olduğu gibi sıçan testis dokusunda hasar oluşturmuştur. Sıçan testis dokusunda oluşan bu hasarın EA ile düzeltilebileceği ancak yüksek doz kullanımının toksik etki yarattığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, Ellagik asit, sıçan, testis, infertilite

THE PROTECTIVE EFFECT OF ELLAGIC ACID ON TESTICULAR DAMAGED CAUSED BY METOTREXATE

Ayşegül GÜRBAK

**Erciyes University, Institute of Medical Sciences
Department of Histology and Embryology
MSc Thesis, November 2017
Advisor: Prof. Dr. Birkan YAKAN**

ABSTRACT

Metotreksat (MTX), an anticancer drug, causes damage to spermatogenic serial cells in rat testis and leydig cells and sertoli cells which have sustenacular cells. In this study, our aim was to invastigate the protective effect of Ellagic acid(EA) on MTX- induced testicular damage.

48 of adult male Wistar albino rats grown in Erciyes University Experimental and Clinical Research Center (DEKAM) were used. They were separated into four groups randomly. Group 1 (control group) (n = 8) was administered intraperitoneally (ip) of corn oil, EA 40 mg / kg / day to Group 2 rats over the course of the experiment for 12 days. Group 3 rats received EA 80 mg / kg / day i.p. for 12 days. Group 4 rats received a single dose of MTX 20 mg / kg 3.day i.p. Group 5 EA 40 mg / kg / day i.p. for 12 days and MTX was administered in a single dose of 20 mg / kg on the 3rd day after administration of EA 40 mg / kg / day for about 4 hours. Group 6 rats received EA 80 mg / kg / day for 12 days and MTX 20 mg / kg as single dose i.p. after 4 hours of EA 80 mg / kg / day on the 3rd day of the application. At the end of the experiment period, all subjects were sacrificed under general anesthesia using ketamine + xylasine (50mg / kg-15mg / kg) and decapitated and testes were taken. The testis tissues were satined with Hematoxylin - eosin (H & E) histopathological damage by light microscopy. The Johnsen Testicular Biopsy Score (JTBS) was used to assess the extent of damage to the tubules. The level of apoptosis was also determined by TUNEL technique. SOD, MDA, CAT parameters were examined in biochemical analyzes.

Histopathologically; disruptions in spermatogenic cell series, vacuolization, edema, luminal and immature germinal epithelial cells were detected in only MTX supplied group. In the MTX supplied group, the level of testicular biopsy score decreased while the number of apoptotic cells increased, whereas the MDA, SOD, and CAT parameters were accepted as meaningless. When histopathologically better results were obtained in

the group given MTX + EA 80, there was a significant increase in apoptotic cell count, elevation in JTBS level.

As a result, single dose MTX administration caused damage to the testicular tissue of the rat as it was in previous studies. It has been shown that this damage to the rat testicle can be corrected by EA.

Keywords: Metotreksat, Ellagic acid, Rat, Testes, Infertility

İÇİNDEKİLER

METOTREKSATIN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI ÜZERİNE ELLAGİK ASİTİN KORUYUCU ETKİSİ

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ.....	3
2.2. TESTİS ANATOMİSİ	6
2.3. TESTİS HİSTOLOJİSİ	9
2.3.1. Seminifer Tübüller.....	10
2.3.2. Spermatogenez.....	13
2.3.3. Spermiyogenez	16
2.3.3.1. Golgi Fazı (Dönemi).....	16
2.3.3.2. Kep Fazı (Şapka Dönemi).....	16
2.3.3.3. Akrozomal Faz.....	17
2.3.3.4. Olgunlaşma (Matürasyon) Fazı.....	17
2.3.4. Sertoli Hücreleri.....	20
2.3.5. İnterstisyel Alan.....	23
2.4. METOTREKSAT	24
2.4.1. Metotreksatın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	25

2.4.2. Metotreksatın Etki Mekanizması ve Farmakokinetik Özellikleri.....	26
2.4.3. Metotreksatın Yan Etkileri	28
2.5. ELLAGİK ASİT	30
2.5.1. Ellagik Asitin Kimyasal Özellikleri.....	31
2.5.2. Ellagik Asitin Biyolojik Aktivitesi	33
2.5.3. Ellagik Asitin Etki Mekanizması.....	33
2.5.4. Ellagik Asitin Kanser Tedavisindeki Yeri	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. DENEYSEL PROSEDÜR	36
3.2. JOHNSEN TESTİKÜLER BİYOPSİ SKORU.....	38
3.3. TUNEL METODU.....	38
3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZLER (ELİSA METODU).....	38
3.4.1. Malondialdehit (MDA) Düzey Tayini	39
3.4.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD) Aktivite Tayini.....	39
3.4.1.2. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	40
3.5. İSTATİKSEL ANALİZ	40
4. BULGULAR	41
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	41
4.2. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru Sonuçları	46
4.3. Apoptotik Bulgular.....	46
4.4. Biyokimyasal Bulgular.....	51
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
6. KAYNAKLAR	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1:	A. 3 haftalık embriyoda yolk kesesi duvarında, allantois bağlantısına yakın bir yerde primordiyal germ hücrelerini gösteren şematik çizim. B. Primordiyal germ hücrelerinin, son barsak ve dorsal mezenter boyunca genital kıvrıma doğru göç yolu4
Şekil 2.2:	Testis anatomisi6
Şekil 2.3:	Testis ve üreme yollarını gösteren şematik çizim.....10
Şekil 2.4:	Seminifer tübül epiteli ve spermiyogenez evreleri12
Şekil 2.5:	İnsan seminifer epitelinin şematik çizimi15
Şekil 2.6:	Bir insan spermatozoonunun diyagramı19
Şekil 2.7:	Olgun spermatozoon20
Şekil 2.8:	Bir seminifer tübülde Sertoli hücrelerinin yerleşimi, birbirleri ile bağlantıları ve gelişimin farklı evrelerindeki spermatojenik hücreleri gösteren çizim22
Şekil 2.9:	Metotreksatın kimyasal yapısı25
Şekil 2.10:	Dihidrofolatın molekül yapısı.....26
Şekil 2.11:	Ellagitantinlerin hidrolizasyonu.....32
Şekil 4.1:	Kontrol grubuna (Grup 1) ait sıçan testis dokusu. Seminifer tübüllerdeki germinal epitel (GE) normal olarak gözlenmektedir. Lümen (L), interstisyel alandaki Leydig hücreleri (İA) (H& E) X20.42
Şekil 4.2:	EA 40 (Grup 2) uygulanan sıçan testis dokusu. Seminifer tübüllerdeki germinal epitel (GE) normal olarak gözlenmektedir. Lümen (L), interstisyel alandaki Leydig hücreleri (İA) (H& E) X20.43
Şekil 4.3:	EA 80 (Grup 3) verilen sıçanlara ait testis dokusu. Germinal epitele ait hücre serilerinde düzensizlikler (▲) ve vakuol mevcut (▼) (H&E) X20.43
Şekil 4.4:	Sadece MTX (Grup 4) uygulanan sıçan testis dokusu. Germinal epitele ait hücre serilerinde düzensizlikler (▲), geniş vakuoller (▼) ve interstisyel alanda ödem (■) mevcut (H&E) X20.44

- Şekil 4.5:** Sadece MTX (Grup 4) uygulanan sıçan testis dokusu. Lümeninde olgunlaşmamış germinal epiteli hücreleri (✦) (H&E) X20.44
- Şekil 4.6:** MTX+EA 40 (Grup5) uygulanan sıçan testis dokusu. Germinal epitele ait hücre serilerinde düzensizlikler (▲) ve lümeninde spermatozoa yoğunluğu (↘) (H&E) X20.45
- Şekil 4.7:** MTX 20+EA 80 (Grup 6) uygulanan sıçan testis dokusu. Germinal epitele ait hücre serilerinde düzensizlikler (▲) ve lümeninde spermatozoa azlığı (➤) (H&E) X20.45
- Şekil 4.8:** Grup1' e ait testis dokusunda TUNEL boyamasında normal hücreler gözlendi (X20).47
- Şekil 4.9:** Grup 2' ye ait testis dokusunda TUNEL boyamasında normal hücreler gözlendi (X20).48
- Şekil 4.10:** Grup 3'e ait testis dokusunda TUNEL boyama yöntemi. Tunel pozitif hücreler (↘) seminifer tübül epiteli içerisinde gözlendi (X20).48
- Şekil 4.11:** Grup 4'e ait testis dokusunda TUNEL boyama yöntemi. Tunel pozitif hücreler (↘) seminifer tübül epiteli içerisinde gözlendi (X20).49
- Şekil 4.12:** Grup 5'e ait testis dokusunda TUNEL boyama yöntemi. Tunel pozitif hücreler (↘) seminifer tübül epiteli içerisinde gözlendi (X20).49
- Şekil 4.13:** Grup 6'ya ait testis dokusunda TUNEL boyama. Tunel pozitif hücreler (↘) seminifer tübül epiteli içerisinde gözlendi (X20).50

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Bazı bitki türlerinde bulunan EA miktarları.....	31
Tablo 2.2: Bazı meyve türlerinde EA ve Antosiyanin miktarına bağlı gözlenen ORAK (Oksijen Radikalleri Absorbans Kapasitesi) değerleri.....	33
Tablo 3.1: Çalışmada Hazırlanan Deney Grupları.....	35
Tablo 3.2: Işık Mikroskobu Doku Hazırlama Tekniği	37
Tablo 3.2: Hematoksilen- Eozin Boyama Tekniği	37
Tablo 3.3: Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması.....	38
Tablo 4.1: JTBS sonuçları. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.....	46
Tablo 4.2: Apoptoz sonuçları. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir	47
Tablo 4.4: Doku örneklerinde ortalama Katalaz (CAT), Süperoksit dismutaz (SOD), Malondialdehit (MDA) ölçümleri.....	51

KISALTMALAR

µm	: Mikrometre
ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
AMH	: Antimüllerian Hormon
ATP	: Adenozin Trifosfat
ATPaz	: Adenozin Trifosfataz
BOS	: Beyin Omirilik Sıvısı
CAT	: Katalaz
CLA-1	: Lipoprotein Reseptör
CCDP	: Sisplatin
CP	: Siklofosamid
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DEKAM	: Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EA	: Ellagik Asit
ER	: Östrojen Reseptör
ET	: Ellagitanin
FH2	: Dihidrofolat
FH4	: Tetrahidrofolat
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
H&E	: Hematoksilen Eozin
HCG	: İnsan Karyonik Gonadotropin
HHDP	: Hegza Hidroksi-Difenol
ip	: İntraperitoneal
JTBS	: Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması
kg	: Kilogram
LC	: Likopen
m²	: Metrekare

MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
MİS	: Müllerian İnhibitör Madde
ml	: Mililitre
MT	: Masson Trichrom
MTX	: Metotreksat
MTX-PG	: Metotreksat Polyglutamat
NDEA	: N-Nitrozodietilamin
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PAS	: Periyodik Asit- Schiff
PBS	: Fosfat Tamponu
PGH	: Primordial Germ Hücreleri
RA	: Romatoid Artrit
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süpreoksit Dismutaz
SPSS	: Statistical Package for The Social Sciences
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TBF	: Testis Belirleyici Faktör
W	: Watt

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, vücuttaki dokulardan birine ait bir veya birkaç hücrede DNA hasarı sonucu normal özellikleri dışında bir değişim göstermesi ve kontrolsüz çoğalmasıyla meydana gelen ve genellikle tümör (kitle veya ur) oluşumuna sebep olan, günümüzün en önemli hastalıklarından birisidir (1,2). Kanser türlerinin tedavisinde kemoterapötik (antikanser) ajanlar kullanılmakta olup bunlar çeşitli kategorilere ayrılır ve her birinin etki mekanizması birbirinden farklılık gösterir (3).

Metotreksat (MTX), bir folik asit antagonisti olup lenfoma, lösemi, meme kanseri, osteosarkom, akciğer kanseri gibi kanser türlerinde kullanılmasının dışında dermatomiyozit, psöriyazis, romatoid artrit gibi hastalıklarda kullanılır. Ayrıca antimetabolit, antiinflamatuvar, antiproliferatif, immünosupresif, antipsöriatik etkinlikleri de bulunmakta ve günümüzde klinikte halen bu endikasyonlar için kullanılmaktadır (3,4).

MTX, multiorgan sistemleri üzerinde akut ve kronik yan etkilerinin ortaya çıkması sebebiyle, kullanımında kısıtlılığa neden olur. Kemoterapötik ajanların yan etkilerinden hasar gören organlardan birisi de testistir. MTX ile hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda ilacın, testis dokusunda patolojik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (5). MTX, testis dokusundaki hasarlanmaya oksidatif stres oluşturarak yol açmaktadır. İlaç genellikle, apoptotik hücre sayısında artış, hücrelerde bazal membrandan ayrılıp lümene dökülme ve spermatojenik hücre serisinde yer yer kayıp gibi hasarlara yol açmaktadır (3,5,6). Bu yüzden birçok antioksidan etkili ürün, MTX'in oluşturduğu testis hasarında koruyucu etkisi test edilmek amacıyla deneysel olarak çalışılmıştır (7).

Ellagik asit (EA); ahududu, çilek ve nar gibi üzümsü, pembe ve mor renkli taze meyveler ile ceviz, kestane, fındık gibi kabuklu meyvelerin içeriğinde bulunan bitkisel kaynaklı kimyasal fenol bileşigidir (8). EA bu meyvelerin güçlü antioksidan,

antikanserojenik, antiinflamatuvar etkilerinden sorumlu bileşenlerinden birisidir. EA polifenolik yapıda bir bileşendir. En yüksek seviyede ahududu da bulunur. Bitkilerde şekere bağlanmış olarak ellagitanin formunda yer alır. Bitkiye karakteristik olarak ekşimsi buruk tadını veren bir bileşiktir (9,10). EA, kuvvetli bir antikanserojen/antimutagenik etkiye sahip fenolik bir asit olup, antibakteriyel ve antiviral etkisinin de varlığı tespit edilmiştir (11). Bitkilerde doğal bir şekilde bulunduğu düşünülmemektedir. Ellagitaninlerin bazı kimyasal işlem basamaklarını geçirmesi sonucu ellagik asit oluşmaktadır (12). EA, bir hücre tarafından tanınıp algılanması ve kullanılması için uygun bir kimyasal formda bulunmalıdır. Uygun formun oluşması şeker molekülleriyle birleşmesi neticesinde ortaya çıkar (13). Bu fonksiyonlarının yanı sıra EA, yaşlanmayı geciktirici etkiler de göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalar, özellikle kırmızı ahududularından elde edilen EA'nın bazı kanser türlerinde kanserli hücrelerin gelişmesini önlediğini göstermiştir (14-16). İnsan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan EA'nın meyvelerdeki miktarı; türe, işlenme tekniğine ve depolama özelliğine göre değişmektedir (17). Günümüzde EA güncel kullanım için birçok sağlıklı yiyecek mağazalarında besin takviyesi olarak sıvı ekstrakt, kurutulmuş kapsül veya tablet şeklinde satılmaktadır (18).

Bu çalışmanın amacı, MTX'in testislerde oluşturduğu hasar üzerine intraperitoneal yolla uygulanan EA'nın koruyucu etkisinin olup olmadığını ışık mikroskopik düzeyde ve biyokimyasal olarak incelemektir.

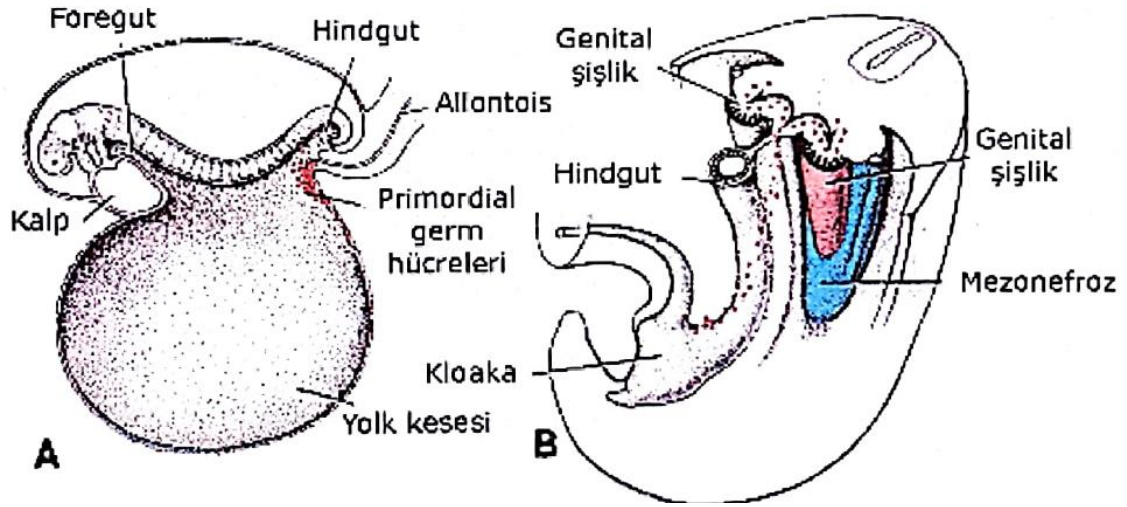
2. GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ

İnsanoğlunun gelişimi erkek gamet hücresi olan spermatozoon ile dişi gamet hücresi olan oositin birleşmesiyle oluşan zigottan itibaren başlar. Bu olaya döllenme veya fertilizasyon denir. Gametler döllenmeden sonraki ikinci hafta boyunca epiblast içerisinde oluşan ve sonrasında vitellus kesesine göç eden primordial germ hücrelerinden (PGH) köken alır. PGH'ler dördüncü haftanın başlarından itibaren, vitellus kesesinden, gelişmekte olan gonadlara doğru yer değiştirir. Beşinci haftada gonadlara ulaşırlar. Göç esnasındaki mitotik bölünmeler sonucunda çoğalarak sayılarını artıran bu hücreler gonadlara ulaştıklarında da bu aktiviteyi devam ettirirler.

Embriyonun genetik ve kromozal cinsiyeti, çok karmaşık bir süreç olup bazıları otozomal olan çok sayıdaki genler tarafından düzenlenmektedir. Seksüel dimorfizmin anahtarı, 11 no'lu kromozomun kısa kolu üzerindeki (Yp11) SRY genini taşıyan Y kromozomudur. Gelişmemiş (rudimenter) durumda olan cinsiyet organlarının ne olacağını belirleyip genlerini harekete geçiren transkripsiyon faktörü olan SRY proteinini bir testis belirleyici faktör (TBF) dır. Bu genin varlığı fetusu erkek, yokluğu dişi olmasıyla neticelendirir (19,20).

Embriyonun cinsiyeti genetik açıdan fertilizasyon aşamasında belirlenmiş olsa da erkek ve dişiye ait morfolojik özellikler embriyonik 7.haftaya kadar belirgin değildir (19,20). Genital sistem her iki cinsten de gelişimin erken safhasında birbirine çok fazla benzerlik gösterir ve bu sebeple ilk evreler seksüel gelişimin farklanmamış safhası (evresi) olarak isimlendirilir (20).



Şekil 2.1: A. 3 haftalık embriyoda yolk kesesi duvarında, allantois bağlantısına yakın bir yerde primordiyal germ hücrelerini gösteren şematik çizim. B. Primordiyal germ hücrelerinin, son barsak ve dorsal mezenter boyunca genital kıvrıma doğru göç yolu (19).

Gonadlar, genital veya gonadal sırt şeklinde ortaya çıkar (19). Üç kaynaktan köken alır. Bunlar;

1. **Mezotel:** Posterior abdominal duvarı döşeyen mezodermal epiteldir.
2. **Mezenkimal Doku:** Mezodermal epitelin altındaki embriyonik bağ dokusudur.
3. **Primordiyal Germ Hücreleri:** En erken dönemdeki farklılaşmamış cinsiyet hücreleridir (20).

Genital sırtlar içerisinde gelişimin 6.haftasına kadar germ hücreleri yoktur (19). Primordiyal germ hücreleri, fertilizasyondan sonraki 24.gün primitif çizgi boyunca göç ederek vitellus kesesinin allantois'e yakın bir yerinde endodermal hücrelerin arasına yerleşir. Gelişimin 4. haftasında ameboid hareketler ile son bağırsağın dorsal mezenteri boyunca hareket eder ve 5.haftanın başlarında primitif gonadlara ulaşır, 6.hafta sırasında mezenkim içerisine girerler ve genital sırta (gonadal kabartılara) dahil olurlar (19,20). PGH'leri genital sırta ulaşamadıkları takdirde gonadlar gelişmez. PGH'nin gonadların testis veya overe farklılaşması üzerinde uyarıcı etkisi vardır (19).

PGH'leri primitif gonadlara ulaştıkları anda genital sırta bulunan epitel hücreleri çoğalarak altında bulunan mezenşim içerisine gömülürler. Primitif cinsiyet kordonları olarak adlandırılan düzensiz kordonları oluştururlar. Bu kordonlar dişi ve erkekte yüzey

epiteline bağlıdır, dolayısıyla bu dönemde dişi ya da erkek gonad ayrımı yapılması mümkün değildir ki bu evredeki gonada da farklılaşmamış gonad denir (19,20). Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahipse farklılaşmamış gonad korteksi overde olgunlaşır medulla geriler. Ya da embriyo XY seks kromozom kompleksine sahipse, medulla testise farklılaşır ve korteks bazı kalıntıları haricinde geriler ve dejenere olur (20).

Genetik olarak erkek olan bir embriyoda XY kromozom kompleksi var olup TBF' nin kodlanmasını sağlayan Y kromozomu üzerindeki SRY geninin etkisiyle primitif cinsiyet kordonları testis ya da medullar kordonları oluşturmak üzere çoğalarak medulla içerisindeki derinliklere doğru ilerlerler. Kordonlar burada birbiri ile anastomoz yaparak bezin hilusuna doğru ilerler. Rete testis oluşumuna katkı sağlayacak olan küçük hücre sıraları şeklinde bir ağ yapacak halde dağılım gösterirler. Gelişimin daha sonraki evrelerinde kalın fibröz bir bağ dokusu olan tunika albuginea tabakası oluşumuyla testisin kordonlarının yüzey epiteliyle olan bağlantıları kopar. Büyüyen testis kademeli olarak dejenere olan mezonefrozdaki ayrılıp kendi mezenterisi olan mezorşiyumla asılı halini alır (19).

Dördüncü ayda testisin kordonları at nalı şeklini alır ve açık uçları rete testis ile devam eder. Böylece testis kordonları primitif germ hücreleri ve bez yüzey epitelinden gelişen Sertoli (destek) hücrelerinden oluşur. Gonadal sırtın kendisinin mezenşiminden köken alan interstisiyel (Leydig) hücreleri testis kordonları arasında yer alır ve gebeliğin 8.haftası itibari ile androjenik hormonları (testosteron ve androstenedione) salgılamaya başlar. Bu hormonlar dış genitalerin ve mezonefrik kanalların erkek yönünde farklılaşmasını uyarırlar (19).

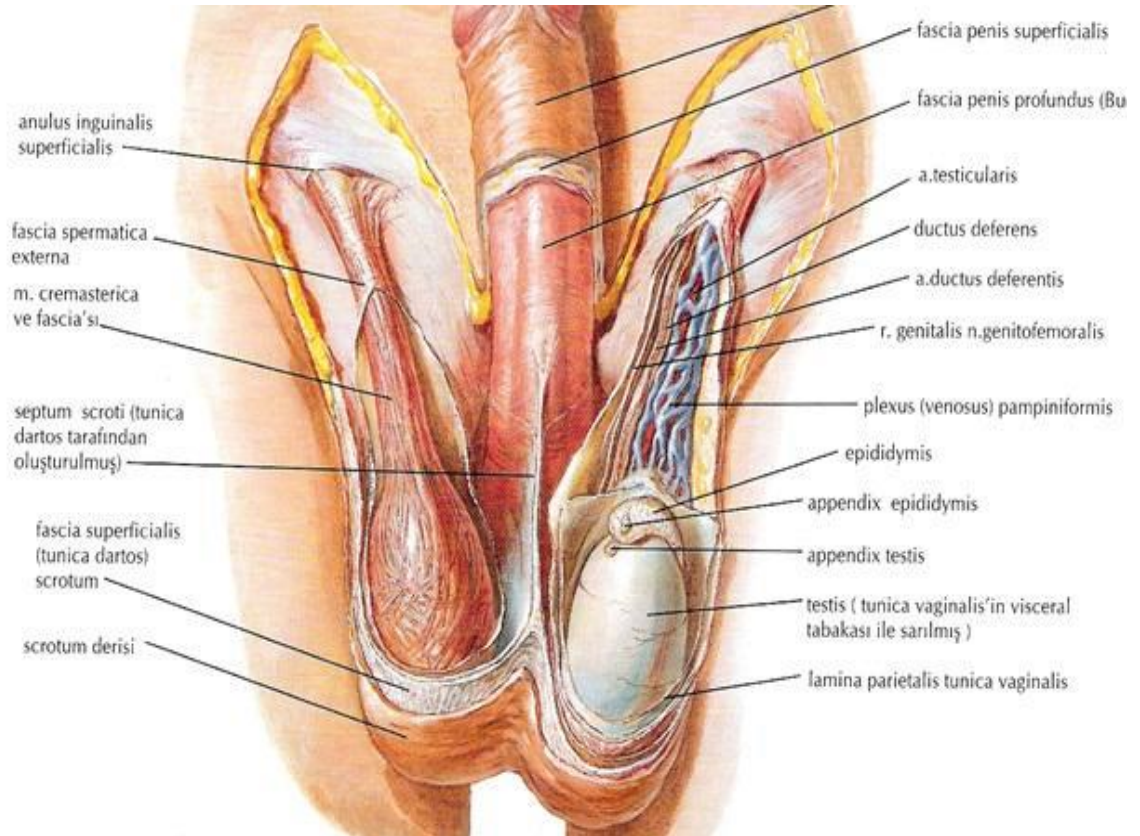
İnsan koryonik gonadotropin (HCG) hormonu testosteron üretimini uyarır. Sekiz ile on iki haftalık sürede hormonun miktarı en yüksek seviyeye ulaşır. Testosterona ek olarak fetal testisler antimüllerian hormon (AMH) ya da müllerian inhibitör madde (MIS) adındaki glikoprotein yapıdaki hormonu salgırlar. AMH, puberteye kadar, solid biçimde kalan testis kordonlarına puberte sırasında lümenlerini açarak seminifer tübüle dönüşen yapılar tarafından salgılanırlar ve seviyesi sonraları azalır. AMH, uterus ve tuba uterinaya farklılaşan müllerian kanallarının gelişimini baskılar. Seminifer tübüller meydana gelir gelmez rete testis tübülleri ile birleşirler ve duktuli eferenteslere girerler.

Efferent duktuslar mezonefrik sistemin boşaltım kanallarının tübüllerinin geride kalmış parçalarıdır ve bunlar rete testise sonraları duktus deferens olarak mezonefrik ya da Wolffian kanalları birbirine bağlar (19,20).

2.2. TESTİS ANATOMİSİ

Testis (orchis), funiculus spermaticus'a asılı olarak kıvrımlı bir deri kesesi olan scrotum içerisinde yerleşmiş erkek üreme hücreleri olan spermatozoonlar ile erkek seks hormonları olan androjenlerin üretiminden sorumlu olan temel üreme organıdır (21).

Scrotomun iç yüzü septum scroti ile iki ayrı bölüme ayrılır. Testisler bu boşluklarda yer alır. Testisler oval şekilli olup, yetişkinlerde 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm derinliğinde ve 3 cm genişliğinde ve 10-15 gr ağırlığındadır. Yaklaşık olarak aynı ağırlığa sahip olmalarına rağmen yapısal olarak farklılık gösteren testislerden, sol testis sağ testise göre daha aşağıda konumlanırken; sağ testis sol testise göre %10 daha ağırdır ve sıcaklıkları vücut sıcaklığından 3-4 °C daha düşüktür (21). Bunun nedeni sol tarafta yer alan funiculus spermaticus'un sağ tarafa göre uzun olmasıdır (22).



Şekil 2.2: Testis anatomisi (Sobotta İnsan anatomisi Atlası).

Scrotum üzerinde ince kıllar, ter bezleri ile özel bir kokuya sahip olan yağ bezleri bulunur. Deride bulunan sinir sonlanmaları, ısı değişikliğine son derece duyarlı olup önemli fonksiyona sahiptir. Testislerin iki kenarı, iki yüzü ve iki ucu vardır. Bunlar sırasıyla margo posterior (arka) ve margo anterior (ön); facialis medialis (iç), facialis lateralis (dış); extremitas superior ve extremitas inferior (alt)' dur (Şekil 2.2). Testislerin yönü scrotum içerisinde düz olmayıp, uzun eksenleri oblik pozisyonludur. Alt ucu arkaya ve içeri doğru, ön ucuysa öne ve dışarıya doğrudur. Ön kenar konveks olup arka kenar daha düzgündür. Özetlenecek olursa oblik pozisyonundaki uzun eksen yukarıdan aşağıya, dıştan içe ve önden arkaya doğru meyillidir. Arka kenarın iç kısmına epididymis tutunur. Testisin alt ucu extremitas inferior, cauda epididymis ile kaplıdır. Testisin üst ucu extremitas superiora caput epididymis yerleşmiştir (22,23).

Testisler, mesorchium (testis mesenterium'u) ile tunica vaginalis testis'i oluşturan tabakalar arasında asılı halde bulunur (22). Testisin ön kenarı visseral periton uzantısı olan epiorchiumla kaplıdır. Sadece arka kısmının lateralini periton örter. Fakat margo posteriorun orta kısmında yer alan sperm kanalları, testis damar ve sinirlerinin geçtiği mediastinum testis peritonsuzdur. Testisler basınca ve aşırı ısıya karşı duyarlıdır, böyle durumlarda fonksiyonlarını yitirebilirler. Bu nedenle karın içi sıcaklıkta fonksiyon göremezler (23).

Testis, capsula testis olarak adlandırılan asıl kılıf aracılığıyla tunica albuginea, tunica vasculosa ve lamina visceralis olmak üzere üç tabaka ile sarılıdır. Tunica vaginalis testisin dış yüzeyini saran seröz bir zar olup periton kesenin dışında gelişen fascia spermatica interna'nın iç yüzeyini saran periton uzantısıdır. İnguinal bölgeye doğru inen testis, saccus vaginalise girerek gömülür ve etrafı peritonla sarılır. Sonuçta saccus vaginalisin lamina visceralis katmanı ile spermatica internaya yapışan lamina parietalis katmanı oluşur. Erişkinde bu iki yaprağa tunica vaginalis testis adı verilir. Bu iki katman arasında içerisinde bir miktar sıvı bulunan cavitas scroti adı verilen bir kısım vardır. Bu aralıktaki sıvı seröz özellikte kaygan olup eklem sıvısına benzerdir. Tunica vaginalis testisin lamina visceralis ve lamina parietalis olmak üzere iki yaprağı vardır (22,23). Lamina visceralis (epiorchium), arka kenarı haricinde bütün testisi örtüp, arka kenar boyunca da medial ve lateralden epididymisi kısmen örter. Lamina visceralis, epididymis ve testisi birbirine bağlar (22). Lamina parietalis (periorchium) peritonun

fascia spermatica internayı döşeyen yaprağı olup faniculus spermaticusun ön ve iç kısmından yukarıya doğru uzanmaktadır (22,23).

Tunica vaginalisin iç tarafında ise tunika albuginea ve tunika vasculosa olmak üzere iki tabaka halinde testisi saran yapıları mevcuttur. Tunika albuginea mavimsi beyaz renkte, sıkı yapılı olan fibröz tabakadır. Vertikal bir bölme şeklinde mediastinum testisi testisin arka yüzeyinden girerek oluşturur. Mediastinum testis, testise giren, çıkan damarlar ile testis kanallarını içerir ve aynı zamanda da kanal ve damarları destekler. Tunika albugineanın iç yüzeyinden ayrılan bağ dokusu uzantısı olan septula testis periferden mediastinum testise uzanır. Septula testis, testisi 200-300 kadar lobul'e ayırmaktadır. Testis parankiminde üreme hücrelerini oluşturan tubuli seminiferi contortiler bulunmaktadır. Bu tubuluslar içerisinde ilerleyen septula testisten ayrılan bağ dokusu bulunur. Bağ dokusu içerisinde de leydig hücreleri (intersitisyel hücreler) bulunur. Testisin damarlarının girip çıktığı arka kısımda ise tunica vaginalis yoktur (22,23).

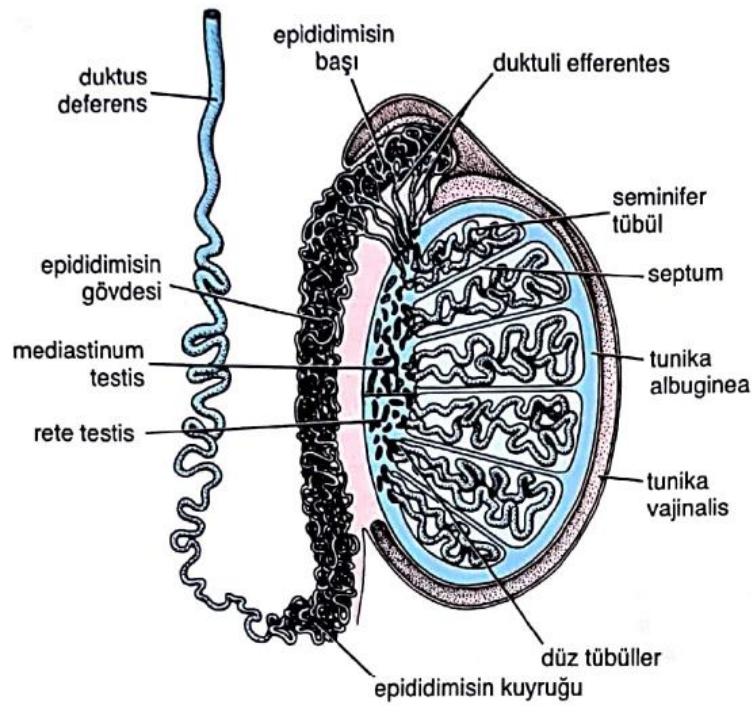
Aortun bir dalı olan a.testicularis testis ve epididymisi besler. A.testicularis birçok dala ayrılır ve bu dallardan epididymisi besleyen iki veya dört tanesi ise ductus deferens boyunca uzanır. Tunika albugineanın arka kısmını delip testise giren diğer dalları ise testisi beslemektedir. Testis ve epididymis venleri kıvrıntılı ven plexusu olan plexus panpiniformis, bunların daha sonra birleşmesiyle ise v.testicularis oluşur. Tunika vaginalisin iç yüzeyindeki damar tabakası ise tunica vasculosa'dır. Tunica vasculosa tüm septula testisi saran gevşek bağ dokusu özelliğinde tüm damarların arasını doldurmaktadır (22).

Her bir testiste 200-300 arası lobulus ve her bir lobulusta 1-3 arasında değişen sayıda tubuli seminiferi contorti bulunur, büyüklükleri ise bulundukları yere göre değişir. Testisin orta kısmında yer alanlar daha büyük ve uzundur. Tepe kısımları mediastinum testise, taban kısımları ise periferi yönelmiş halde bulunmaktadır. Tubuli seminiferi contortiler mediastinumuma yaklaştıkça düzleşir ve birbiri ile birleşerek yaklaşık olarak 20-30 arasında tubuli seminiferi rectiyi oluşturur. Rete testisi oluşturan tubuli seminiferi recti testisin fibröz bağ dokusu içerisine girerek yukarı ve arkaya geçerek birbirleriyle birleşir ve rete testis'i (Haller ağı) oluşturur. Rete testisten epididymise uzanan kanallar ise ductuli efferentes testisi oluşturur. Ductuli efferentes testis'ler caput epididymis'e ve ductus epididymis'e açılır (22-24).

2.3. TESTİS HİSTOLOJİSİ

Erkek üreme sistemi bir çift testis, genital boşaltım kanalları, aksesuar cinsiyet bezleri ve penisten oluşmaktadır. Aksesuar cinsiyet bezleri vezikula seminalis, prostat ve bulboüretal bezlerden oluşur. Testisin iki yönlü görevi vardır ve bunlar; spermatogenez (sperm üretimi) ve steroidogenez (androjenlerin sentezi) dir. Androjenler özellikle testosteron, spermatogenez için gerekli ve erkek embriyonun fenotipik erkek fetüs olarak gelişiminde önemli rolü vardır; seksüel dimorfizmden de sorumludur (25,26). Genital boşaltım kanalları ve aksesuar cinsiyet bezleri, yapısında yer alan düz kasların kasılması ile spermatozoonları dışarıya gönderen salgılarını üretirler. Bu salgılar aynı zamanda spermatozoonlar için gerekli besinleri sağlar. Spermatozoonlar, aksesuar bezler ve genital boşaltım kanalları penis yoluyla semeni (tohum) oluştururlar (26). Yetişkinlerde bir çift organ olarak abdominal boşlukta gelişen testisler daha sonra scrotum içerisine yerleşerek uzun bir muskolofasiyal kesenin ucunda asılı oval şekilli bir çift organdır. Abdominal duvara spermatik kordonlarla tutunurken skrotal ligamentlerle (gubernekulumun kalıntıları) scrotuma bağlıdır (25,27).

Testis oldukça yoğun ve kalın bir bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea ile çevrilidir. Embriyolojik gelişim esnasında retroperitonel olarak karın boşluğunun duvarında gelişirken ilerleyen zamanlarda skrotuma göç ederek spermatik kordonlarla asılı olarak bulunurlar. Skrotuma doğru göç ederken her bir testis, kendisi ile birlikte peritonu ve tunika vajinalis adı verilen seröz keseyi skrotuma sürükler (26-28). Tunika albuginea tabakası en kalın ve en belirgin tabakası olup, zengin damarlanma özelliği gösteren gevşek bağ dokusu yapısında olan tunika vaskuloza ile döşelidir. Testise giren ve çıkan kan ve lenf damarları ile kanallar bu tabaka içerisinde yol alır. Tunika albuginea tabakasının posterior yüzeyinin kalınlaşmasıyla mediastinum testis oluşur; buradan da testisi yaklaşık olarak 250 kadar piramidal lobüle (lobuli testis) ayıran bağ dokusu özelliğindeki septumlar uzanır (25-27).



Şekil 2.3: Testis ve üreme yollarını gösteren şematik çizim (25).

Testisi oluşturan uzantıların her birisi (lobüller) oldukça fazla kıvrımlı birkaç seminifer tübülden oluşur. Her bir lobül spermatozoonların üretildiği yer olup 1-4 kadar seminifer tübülden oluşur. Bu tübüller oldukça kıvrımlıdır; kan ve lenf damarları, sinirlerin bulunduğu gevşek bağ dokusu özelliğindeki leydig (intersitisyel) hücrelerinden meydana gelir. Lobül içerisindeki tübüllerden her biri halka şeklini alır ve uzun olması sebebiyle fazlasıyla kıvrımlıdır ve lobülün içerisinde kendi kendine katlanır. Halkanın uç kısımları mediastinuma yakındır ki burada düz ve kısa olarak bir yol izler. Tubulus rektus (düz tübül) olarak adlandırılan seminifer tübülün bu kısmı mediastinum içerisinde anastomozlaşan kanal sistemi olan rete testis olarak devam eder (25-27).

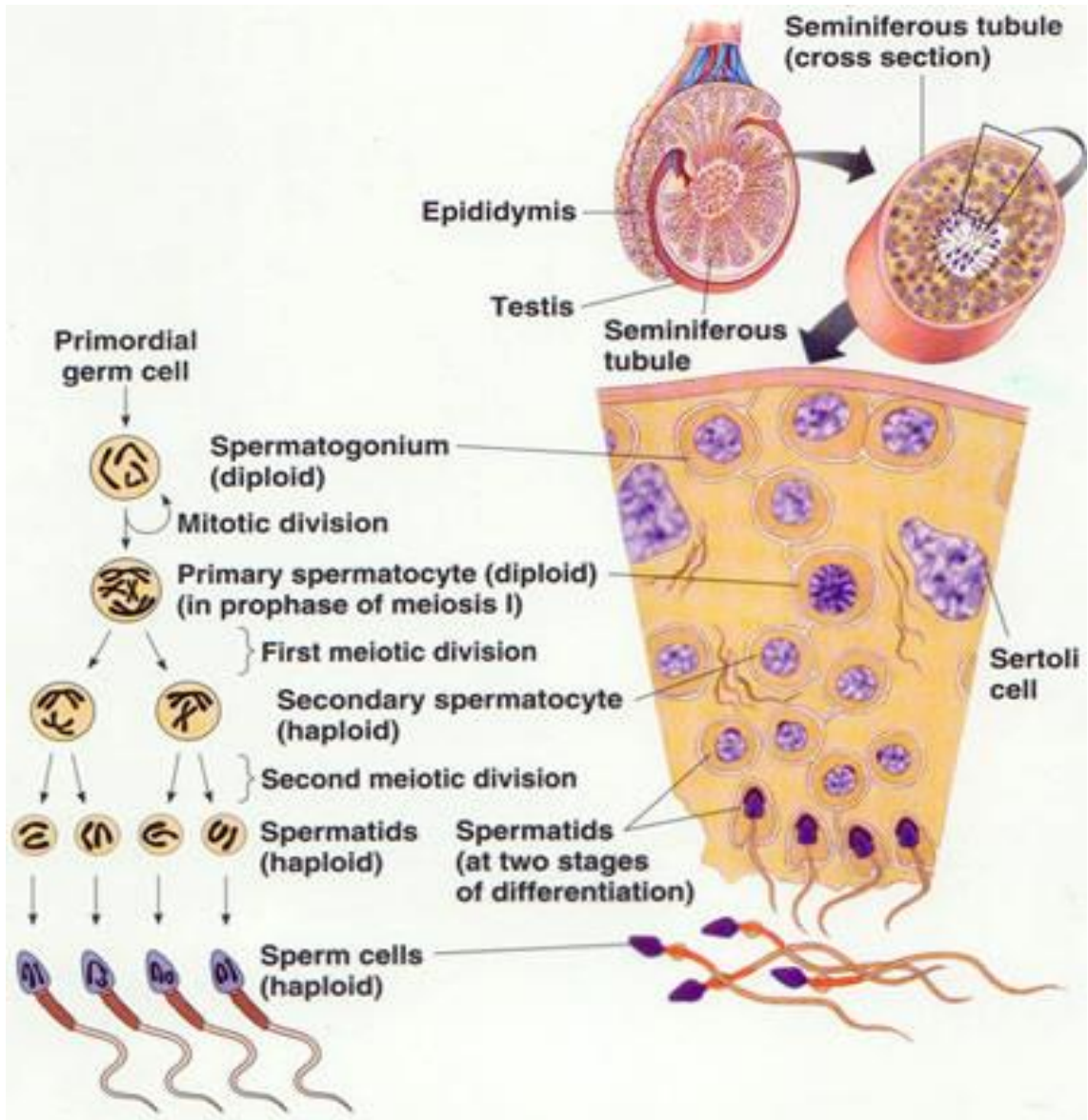
2.3.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller spermatozoidlerin üretildiği yerdir. Erişkin bir bireyde yapım hızı günde 2×10^8 hücredir. Her bir testiste yaklaşık olarak 250-1000 kadar seminifer tübül vardır. Her seminifer tübül karmaşık bir yapıda olup çok katlı bir epitele sahip, çapı yaklaşık olarak 150-200µm ve 30-70 cm uzunluğundadır. Tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Tübüller, bir kaç tabakadan oluşmuş fibroblast içeren fibröz bağ dokusu tarafından sarılır ve oldukça yoğun bir kapiller yatağa sahiptir (26,27).

Seminifer tübüller başlangıçları k r olan kıvrımlı bir yapıdadırlar. Tübüllerin kıvrımlı yapısı uçları lümene doğru daralarak tubuli rekti (düz tübüller) olarak adlandırılan kısa segmentler biçiminde devam eden kangallar şeklinde uzanırlar. Bu düz tübüler yapı, rete testis adı verilen yapılara seminifer tübüllerin bağlanması sağlar. Anastomoz yapmış rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 adet duktuli efferentes ile epididimin baş kısmına bağlanır (26).

Seminifer tübüller fibröz bağ dokusu kılıf ile oldukça belirgin bir bazal lamina ve karmaşık germinal (seminifer) epitelden oluşur. Seminifer tübülü çevreleyen birkaç kat fibroblast katmandan meydana gelir. En i te bazal laminaya yakın olan katman düz kas özelliği gösteren miyoid hücreleri içerir. Tübüllerin arasındaki boşlukları büyük bölümlerini leydig (interstisyel) hücreleri doldurur. Myoid hücreler, seminifer tübüllerde oluşan ritmik kasılmalardan sorumlu hücrelerdir. Bu ritmik kasılmalar spermilerin boşaltım kanallarına doğru ilerlemesini sağlar. Aynı zamanda kan testis bariyerinde de görev alır, yaşlanmayla birlikte bu tabaka kalınlaşır. Miyoid hücreler, membranları aracılığıyla birbirlerine tutunurlar ancak makromoleküllerin seminifer tübüllere geçişini de tam anlamıyla engelleyemezler (25,28).

Seminifer epitelde iki tip hücre vardır. Bunlar sertoli (destek) hücreleri ve spermatogenez serisini oluşturan hücrelerdir. Spermatogenez serisinin hücreleri 4-8 tabaka olarak belirli bir düzende sıralanmıştış, görevi spermatozoonları üretmektir. Spermatozoon üretimine ise spermatogenez denir. Spermatogenez süreci mayoz ve mitoz bölünmeleri ile hücreler, sonunda spermatozoitlere farklılaşır, bu aşamaya ise spermiyogenez denir. Spermatogenik hücreler belli bir düzene göre sıralanmış olup, hücreler olgunlaşmanın her aşamasında o evrenin özelliklerini göstermiş olmasıyla ortaya çıkar. Bu farklılaşma aşamalarının her biri seminifer tübülün herhangi bir yerinde gerçekleşir. Bazal membrana en yakın olan hücre spermatogonyum, seminifer tübülün lümenine en yakın olan hücre ise daha olgun bir yapı gösteren spermatiddir. Lümende ise spermiyumlar yer alır. Bazal membrandan seminifer tübülün lümenine kadar uzanan prizmatik, spermatogenik hücelere destek olan ve besleyen hücelere ise sertoli hücreleri denir (26,28).



Şekil 2.4: Seminifer tübül epiteli ve spermiyogenez evreleri (29).

Spermatogoniumlar devamlı olarak kendini yenileyen kök hücre topluluğudur. Yaklaşık 12µm çapında ve yuvarlak çekirdeğe sahip az olgunlaşmış diploid kök hücrelerdir. Bölündükleri zaman daha büyük çekirdeği olan seminifer tübülün üçte birini kaplayan primer spermatositleri oluştururlar. Yaklaşık 22 gün sonrasında ise mayoz bölünme ile primer spermatositler sekonder spermatositlere dönüşür. DNA replikasyonu gerçekleşmeden sekonder spermatositler tekrar mayoz bölünme geçirirler. İkinci mayoz bölünme sonucunda 9 µm çapında haploid DNA miktarı ile kromozom sayısına sahip yuvarlak şekilli spermatidler oluşur. Spermatidler lümene doğru ilerlerken şekilleri uzayan mitoz bölünmenin olmadığı olgunlaşmanın olduğu spermiyogenez gerçekleşir.

Spermiyogenez sonrasında küçük, yoğun, koni şekilli çekirdeği olan ve bir adet kamçıya sahip olan özelleşmiş spermatozoonlar oluşur. Günde 300 milyon civarında spermatozoon bu aşamalardan geçerek oluşturulur ve lümene bırakılır (26,28).

2.3.2. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyumlardan spermatozoon (sperm) oluşum sürecidir. Oldukça kompleks ve eşsiz bir seri olaylar zinciri şeklinde gerçekleşir. Süreç haploid sayıdaki dişi ve erkek germ hücrelerinin birleşmesiyle diploid sayıda kromozoma sahip zigot oluşumu ile başlar. Spermatogoniumlar yaklaşık olarak 12 µm çapında olup bazal laminanın üzerinde yer alan küçük bir hücrelerdir. Puberteden kısa bir süre önce, hipofizer gonadotropinlerin seviyesinin artışı etkisi ile spermatogenez başlar ve ömür boyu devam eder. Üç evreye ayrılır (25-28).

1. Spermatogonyal Faz: Spermatogonyumların mitoz ile bölünmesiyle kendi yerlerine geçecek olan primer spermatositlere ayrıldığı süreçtir.

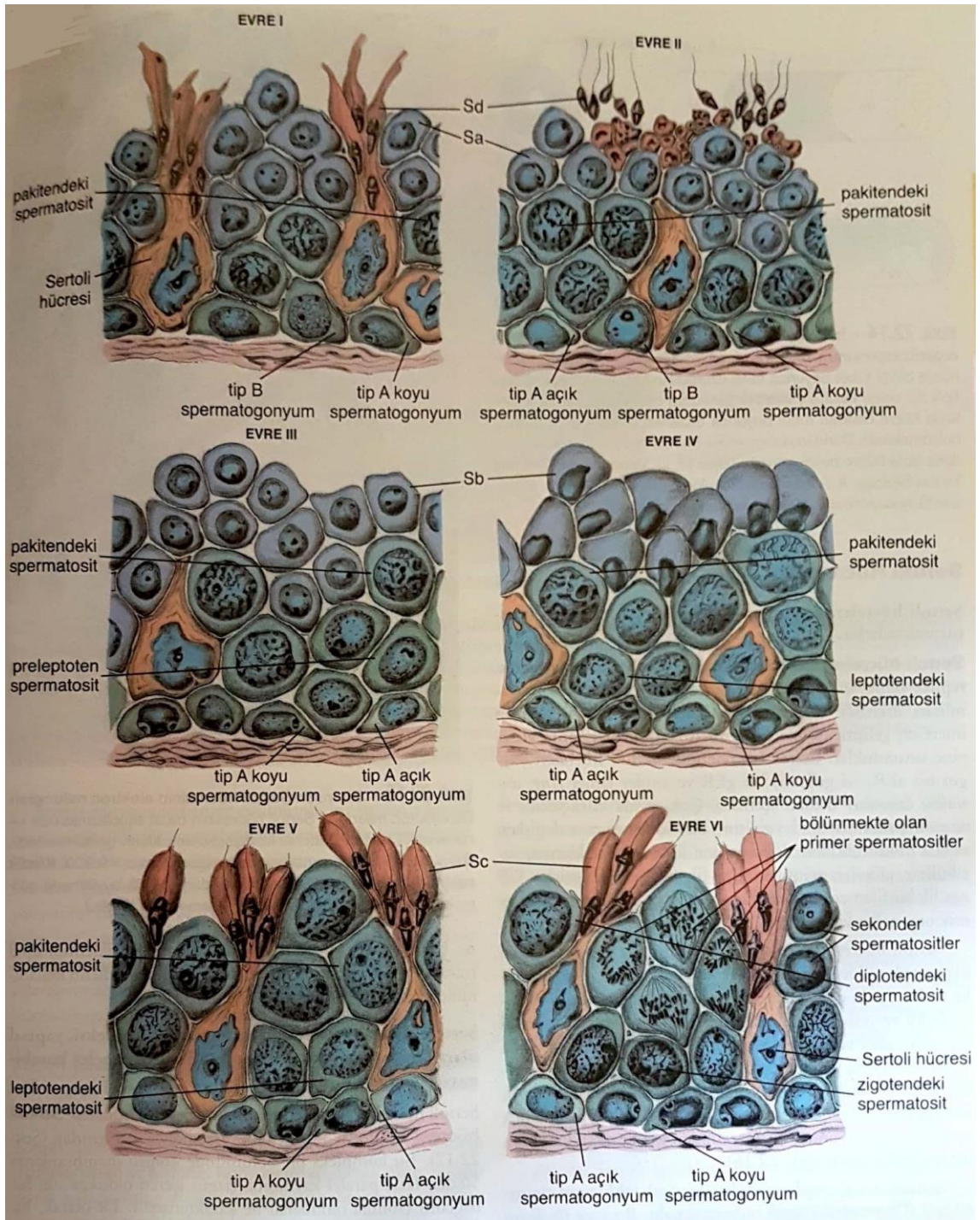
2. Spermatosit Faz (Mayoz): Primer spermatositlerin iki mayotik bölünme geçirerek kromozom sayısını ve DNA miktarlarını yarıya indirerek spermatid olarak adlandırılan haploid hücreleri oluşturduğu süreçtir.

3. Spermatid (Spermiyogenez) Faz: Spermatidlerin olgun (matür) sperm hücresine (spermatozoa) farklılaştığı süreçtir (25-28).

Spermatogenezis, tüm seminifer tübüllerinde kendiliğinden ya da senkronize olarak gerçekleşmez aksine seminifer epitel siklusu dalgalanma şeklinde değişik olgunlaşma fazlarının arka arkaya olaylanmasıyla gerçekleşir. Bu süreçte yavru hücreler birbirinden ayrılmaz ve birbirleriyle intrasellüler köprü (sinsityum) vasıtasıyla bağlantıda kalırlar. Oluşan bu sinsityum seminifer tübül boyunca germ hücrelerinin senkronize biçimde gelişiminden sorumlu olabilir. Spermatogenezin sonunda spermatidler spermiyasyon süreciyle son olgunlaşmayı geçirirler ve Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine salınırlar. Bütün bu olaylar zincirinde spermiyumlar testis tübüllerinden farklılaşmış olarak çıksalar da erkek genital kanallarındaki bezlerin sekresyonu ile oluşan ürünlerle daha da olgunlaşırlar (25-28).

Nükleus özelliklerine göre 3 tip spermatogonia tanımlanır.

1. **Tip A (Koyu) Spermatogonyumlar (Ad):** İnce granüllü kromatini, yoğun bazofilik, oval nükleusa sahiptir. Seminifer epitelin kök hücreleri olarak düşünülüp mitotik olarak inaktif olan hücreleri temsil ederler (hücre siklusunun Go fazında). Mitoza kaldıkları yerden düzensiz aralıklarla devam ederek bir çift soluk tip A (Ap) hücrelerine dönüşür ya da kök hücre olarak kalırlar.
2. **Tip A (Açık) Spermatogonyumlar (Ap):** İnce granüllü kromatinli oval bir nükleusu olan açık renk boyanan bir çekirdeğe, küresel mitokondriye, küçük bir golgi kompleksine, çok sayıda ribozoma sahiptir. Ap spermatogonyumlar ya sperm üretmek için farklılaşma sürecine girer (Tip B spermatogonia olarak) ya da aynı tip hücre (devamlılığı sürdürmek için) oluşturmak üzere yüksek mitotik aktivite gösterirler.
3. **Tip B Spermatogonyumlar:** Kromatini nükleer zarf boyunca ve merkezi nükleusun çevresinde geniş kümeler oluşturarak yoğunlaşmış bir kromatine sahiptir. Mitoza girer ve primer spermatositi oluşturur. Tip B spermatogonyumların görülmesi spermatogonal fazın son aşamasında olduğunun göstergesidir (25,27,28).



Şekil 2.5: İnsan seminifer epitelinin şematik çizimi (25).

Primer spermatosit $44+XY$ şeklinde 46 kromozom ($2n$) ve iki katı kadar DNA ($4d$) içerir. Oluşumlarının hemen sonrasında mayoz bölünmeye girer ve mayozun profazında 22 gün kadar kalır ve kromatinleri görülebilecek şekilde yoğunlaşma gösterir. Primer spermatositler spermatojenik serinin en büyük hücreleri olup çekirdeklerinde sarmalanma sürecinde de kromozomlarının bulunması ile ayırt edilir. Birinci mayozun

hemen sonrasında sekonder spermatosit olarak adlandırılan 23 kromozomlu küçük hücreler oluşur. DNA miktarı da yarıya iner (2d). Kesitlerde görülmesi zordur sebebi ise bu hücreler interfazda kısa süreli olarak kalırlar ve ikinci mayoza girerler. Bunun sonucunda 23 kromozomlu spermatid oluşur (25,26)

2.3.3. Spermiyogenez

Spermatozoon üretiminin son aşaması olup spermatidlerin dişi ovuma erkek DNA' sını aktarma için özelleşmiş hücreler olan spermatozoona dönüştüğü süreçtir. Bu aşamada hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermatidler 7-8 µm boyutunda nükleusları yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içerir. Spermatidler fiziksel olarak Sertoli hücrelerinin plazma membranıyla lümenle (jukstaluminal) özelleşmiş bağlantılar kurmuş olarak tutulu halde bulunurlar. Spermiyogenez akrozom oluşumu, çekirdek yoğunlaşması ile uzaması, kamçı oluşumu ve sitoplazma kaybından oluşan karmaşık bir süreçtir. Sonuç olarak seminifer tübül lümenine bırakılan olgun spermatozoonlar oluşur. Spermiyogenez 3 evreden oluşur (25,26).

2.3.3.1. Golgi Fazı (Dönemi)

Spermatid sitoplazması, çekirdeğin yakınında yer alan Golgi kompleksi, mitokondriyonlar, serbest ribozomlar, bir çift sentriyol ve düz endoplazmik retikulum tübülllerinden oluşur. Bu fazla sayıdaki Golgi kompleksinin olduğu bölgenin PAS (Periodic Asit-Schiff) pozitif granüllerin birikimi ile karakterize edilir. Proakrozomal olarak adlandırılan glikoproteinden zengin içerikli bölge ile akrozomal vezikül olan nükleus zarının yakınındaki membranla sınırlı bu yapılar birleşir. Bu aşamada flagellar nukleusu oluşturmak için nükleustan uzaklaşan sentriyoller tekrar nükleusa dönerek kuyrukla ilişkisi olan bağlantı parçasının oluşmasında katkıda bulunur. Bu iki yapının birleşiminden oluşan yapıya akrozom granülü denir. Sentriyoller arka kutba doğru göç ederek 9 adet periferik mikrotübül ve merkezi 2 adet mikrotübül parçalarının birleşimiyle spermiyumun kuyruğunun aksonemini oluşturacak olan yapıların şekillenmesini başlatır (26-28).

2.3.3.2. Kep Fazı (Şapka Dönemi)

Akrozomal vezikül nükleusun ön yarısını kapatıp genişler ve şapka gibi bu bölümü kuşatır (akrozomal kep). Nükleusun buraya yakın olan porları kaybolur ve membran kalınlaşır, nukleusu da yoğunlaşır (25,28).

2.3.3.3. Akrozomal Faz

Spermatid bu evrede kendini yeniden hizalar ve böylece baş kısmı Sertoli hücreleri içine iyice gömülür, bazal laminaya yönelir. Gelişmekte olan flagellum seminifer tübülün lümenine uzanır. Spermatidin nükleusu yoğunlaşıp yassılaşır ve uzar. Böylece nükleus ve onun etrafındaki akrozomun plazma membranının ön kısmı çok hızlı bir şekilde komşu pozisyonuna taşınırlar ve sitoplazma posteriora doğru yer değiştirip konumlanır. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kenarındaki spermatidin arka kutbundaki silindirik bir kılıf olan manşeti oluşturmak üzere görev alırlar (25,28).

Flagellum gelişimini önceden başlatan sentriyoller nükleusun arka yüzeyine taşınır. İmmatür sentriyol nükleusun arka yüzeyindeki sıkı bir oluğa tutunur. Sentriyoller ileride oluşacak olan spermin bağlantı parçasını (boyun bölgesi) oluşturmak için modifiye olurlar. Nükleusa tutunmuş olan sentriyolden dokuz adet kalın fibril gelişir. Aksonemin mikrotübüllerinin periferinde yer alan dış yoğun fiberler olarak kuyruğun içerisine doğru uzanır. Bu fiberler nükleusu flagellumla birleştirir ve böylece bu bölge bağlantı parçası olarak adlandırılır (25,28).

Büyümekte olan flagellumu saran plazma membranı posteriyore doğru hareket ederken, manşet kaybolur. Mitokondriyonlar, boyun bölgesinde yer alan kaba fibrillerin etrafı ile boyun bölgesinin posteriyör uzantısını sıkı heliks şeklinde saran kılıfı meydana getirmek üzere sitoplazmanın geriye kalan parçasından göç ederler. Bu bölgeye spermin orta parçası denir. İki sütun ve çok sayıda bağlantı kuşağından oluşan orta parçanın distalinde yer alan fibröz kılıf, esas parçanın dokuz adet olan longitudinal fibrini çevreler, neredeyse flagellumun uç kısmına kadar uzanır. Fibröz kılıfın distalinde yer alan bu kısa bölge ise kuyruğun son parçası olarak adlandırılır (25,28). Flagellumun (kamçı) hareketi mikrotübüller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşimi ile oluşur (26).

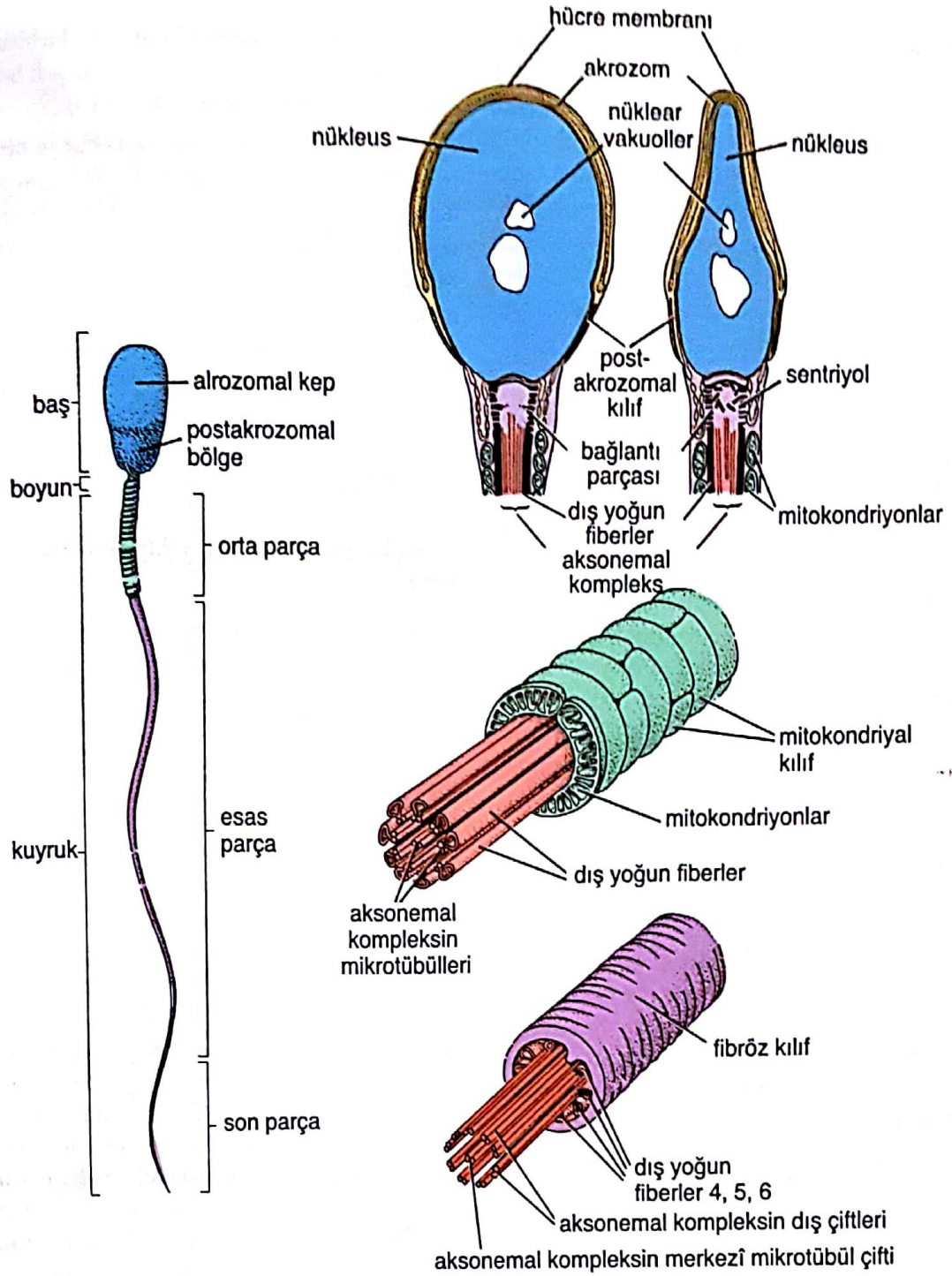
2.3.3.4. Olgunlaşma (Matürasyon) Fazı

Spermatidin şekillenmesinin son aşamasında flagellanın etrafındaki sitoplazma azalır ve matür (olgun) spermatozoon oluşur. Sitoplazma fazlalığı olarak isimlendirilen rezidüel cisimcik Sertoli hücrelerince fagosite edilir ve gelişmekte olan gametlerin karakteristik özelliği olan interselüler köprüler rezidüel cisimciklerde kalırlar. Spermatidler artık

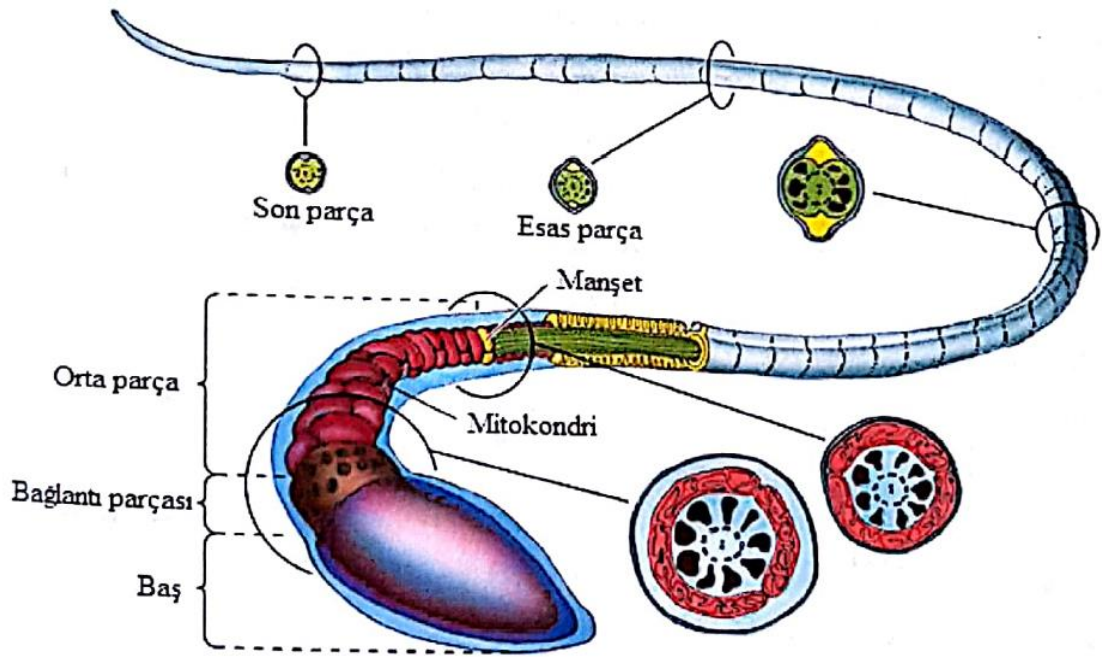
birbirine bağılı olmayıp Sertoli hücrelerinden salınıverirler. Spermatidlerin bu karmaşık süreçte seminifer tübül lümenine salınıverilmesine spermiasyon adı verilir.

Olgun insan spermi yaklaşık olarak 60 μm uzunluğundadır. Sperm başı yassı olup sivridir ve 4,5 μm uzunluğundadır. Nukleusun anterior bölümünün üçte ikisini kaplayan akrozomal kep, hyaluronidaz, nöraminidaz, akrozin ve asit fosfataz gibi tripsin benzeri proteazları içerir. Spermin kuyruğu boyun, orta parça, esas ve son parça olmak üzere 4 kısımdan oluşur.

1. Boyun; kısa olup sentriyolleri ve kuyruğun diğer parçalarına tutunmuş 9 adet yoğun fibriller bağlantı parçasını içermektedir.
2. Orta parça; boyundan annulusa kadar uzanır. Aksonem, dokuz adet dış yoğun fibril ve spiral şekilli mitokondriyal kılıfı içermektedir.
3. Esas parça; annulustan son parçaya kadar uzanan dairesel hatlara sahip fibröz kılıf ile kuşatılmış yoğun fibrillerin sardığı aksonemden oluşmaktadır.
4. Son parça; aksonemal kompleksi içermektedir (25,27).



Şekil 2.6: Bir insan spermatozoonunun diyagramı (25).



Şekil 2.7: Olgun spermatozoon (30).

2.3.4. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri (sustentaküler hücreler) uzun, prizmatik, spermatogenez serisindeki hücreleri saran ve seminifer epitelin çok tabakalı bazal laminası üzerinde bulunan, tepeleri ise lümene çoğunlukla seminifer tübül lümenine uzanan hücrelerdir. Sertoli hücreleri gelişmekte olan spermlerin mayoz bölünme sonrasında yüzeylerine tutundukları destek hücresi olarak görev yaparlar. Spermatogenik hücrelerinin etrafını çevreleyen çok fazla sayıda uzantısı olduğu için Sertoli hücrelerinin sınırlarının belirlenmesi zordur. Elektron mikroskobu incelemelerinde çok fazla agranüler endoplazmik retikulum, oldukça gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ve anüler lamel dizileri içerirler. Çok fazla sayıda küre biçimli uzun mitokondriyonları, oldukça gelişmiş Golgi kompleksi, sayıları değişken mikrotübülleri, lizozomlar, lipid damlacıkları, veziküller, glikojen granülleri ve filamentleri içerirler (25,26,28).

Nükleus, kendisini saran 7-9 nm'lik filament kılıf sayesinde diğer sitoplazmik organellerden ayrılmasını sağlar. Sertoli hücresinin, ökromatik nükleusu oval veya üçgen şeklinde olabilir ve fazlasıyla girintili olabilir. Çekirdeğin şekli ve yeri değişkendir (25,26,28). Yassı şekilli olup hücrenin bazaline paralel uzanabilir, üçgen veya oval şekilli olup bazale yakın veya biraz uzak olabilir. Sertoli hücresinin nükleusu

bazı türlerde kendisine özel üç parçalı yapıda, RNA ve DNA içeren cisimcik çiftiyle kuşatılan karyozom adı verilen bir nükleolus içerir (25).

İnsanlarda bu hücrelerin bazal sitoplazmalarında karakteristik Charcot-Böttcher (inklüzyon cisimcikleri) bulunur. Işık mikroskopik düzeyde de görülen bu cisimcikler fuziform kristalloidler 10-25 μm uzunluğunda ve 1 μm genişliğindedir. Elektron mikroskopik düzeyde paralel veya birbirine yakın, düz ve yoğun 15 μm çapında filament demetleri şeklinde görülür. Ancak kimyasal fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Son yapılan çalışmalarda CLA-1 (lipoprotein reseptör) proteinlerinin birikimi belirlenmiş olup bu durumun inklüzyon cisimciklerinin lipid düzeyinde ve Sertoli hücreleri tarafından lipidlerin kullanımında görevli oldukları şeklinde yorumlanmıştır (25,28).

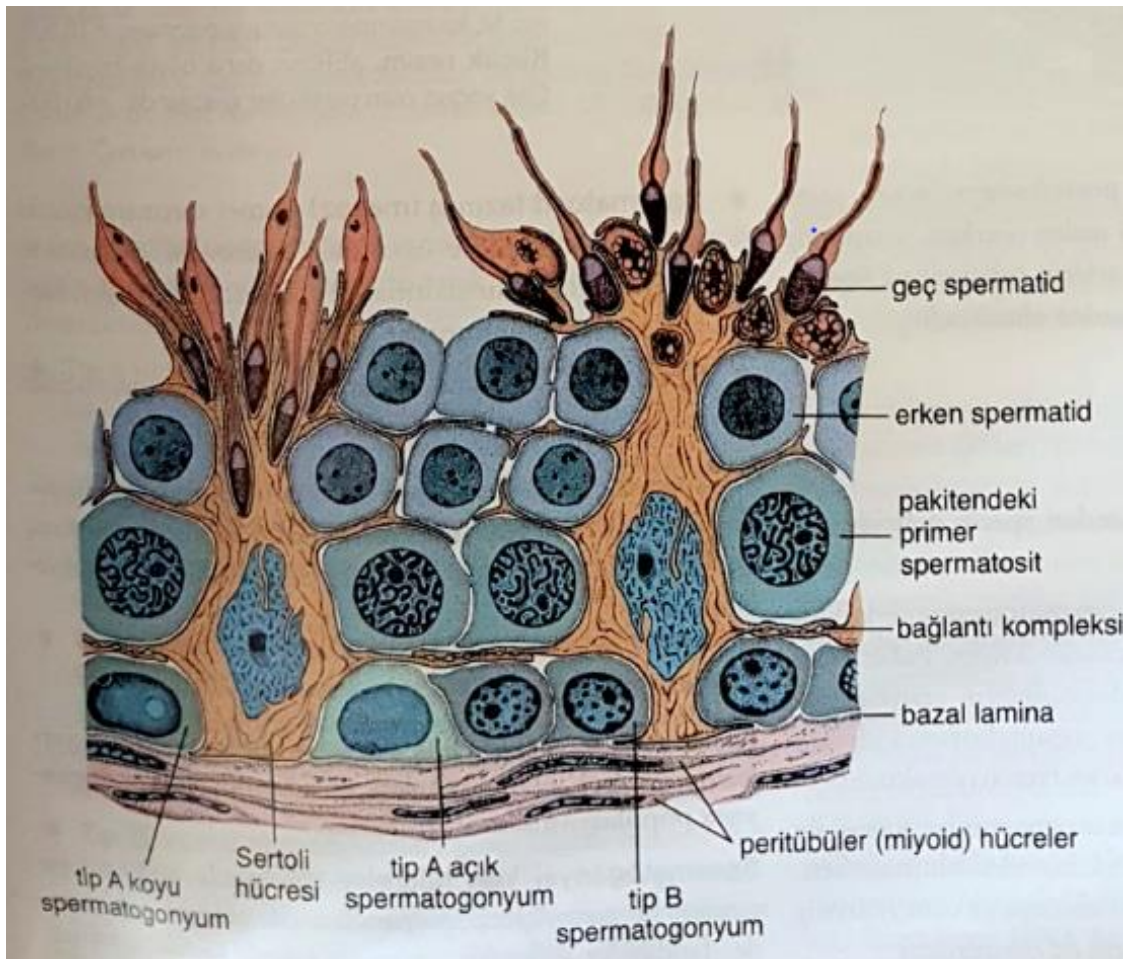
Sertoli hücresi- Sertoli hücresi sıra dışı biçimde bağlantıları yapısal biçimde kompleks olan membran ve sitoplazmik özelleşmeler kombinasyonundan oluşur. Bu özel bağlantı birimleri komşu membranlar arasında 50 den fazla paralel kaynaşma bölgeleri içeren zonula okludens (sıkı bağlantı) türü bir bağlantıdır. Bu bağlantı kompleksi ayrıca iki sitoplazmik komponent ile de karakterizedir.

1. Her hücrenin bağlantı bölgesinde plazma mebranına paralel seyreden yassılaştırmış agranüler endoplazmik retikulumun keseleri (sisternaları) uzanır.
2. Agranüler endoplazmik retikulum sisternaları ile plazma membranı arasında hegzogonal olarak paketlenmiş olarak bulunur.

Sertoli hücrelerinde benzer bir bağlantı kompleksi de spermatidlerin bulunduğu bölgede bulunur ancak sıkı bağlantı şeklinde olmayıp aktin filamentleri demetlerinden ve yassılaştırmış agranüler endoplazmik retikulundan yoksun olup gap junction türü bir bağlantıdır. Diğer bir bağlantı kompleksi de Sertoli hücreleri arasındaki özelleştirmiş oluklu bağlantılardır. Sertoli hücreleri ve erken dönem spermatogenetik hücrelerinin arasındaki desmozom türü bağlantılar ve Sertoli ile bazal lamina ara yüzündeki hemidesmozomlardır (25,28).

Sertoli hücresi –Sertoli hücresi bağlantı kompleksleri bazal epitelyal kompartman ile luminal kompartman olarak iki epitelyal kompartmandan oluşmaktadır. Olgun

spermatositler ve spermtidler bu bağlantı kompleksinin luminal tarafında sınırlıdır. B tipi spermatogonyumların mitozuyla üretilen erken spermatositler bağlantı kompleksinden geçebilmeli ve bazal laminanın luminal yüzeyine hareket edebilmelidir (25). Her iki kompartıman türünde de spermatogenik hücreler, Sertoli hücrelerinin bu kompleks bağlantıları ile kuşatılırlar. Bu yüzden Sertoli hücrelerine destekleyici hücreler ya da bakıcı hücreler adı verilmektedir. Sebebi ise spermatogenik hücreler ile dolaşım sistemi arasında metabolik substratların ve atıkların değişiminde fonksiyon göstermesidir. Ayrıca Sertoli hücreleri spermatogenezin son aşamasında rezidüel cisimcikleri lizozomlarla fagosit eder ve parçalar. Ayrıca farklılaşmasını tamamlayamayan spermatogenik hücreler de Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir (25,26).



Şekil 2.8: Bir seminifer tübülde Sertoli hücrelerinin yerleşimi, birbirleri ile bağlantıları ve gelişimin farklı evrelerindeki spermatogenik hücreleri gösteren çizim (25).

Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı kompleksi, kan testis bariyerinin bulunduğu alanlardır. Bu bariyer, seminifer tübül iç kısmı ile kan arasında bir bariyer bulunmasına ve dolayısıyla testis sıvısında kandan gelenden daha az madde olmasına neden olur. Ayrıca seminifer epitelde iyon, aminoasit, karbonhidrat ve protein kompozisyonu açısından fizyolojik kompartıman oluşturulması için de gereklidir. Testis kapilleri pencere tiptir, büyük moleküllerin geçişine izin verir. Spermatogonyumlar kanda bulunan maddelere kolayca erişebilir ama Sertoli hücreleri arasındaki bu engelleyici bağlantılar büyük moleküllerin Sertoli hücreleri arasındaki boşluğa geçmesine engel olur. Bu sayede spermatogenezin son aşamalarındaki haploid sayıdaki germ hücreleri (sekonder spermatosit, spermatid ve spermiyumlar) kandaki zararlı maddelerden korunmuş olur ve kişinin immün sisteminden izole edilirler (25,26,28).

Sertoli hücreleri sürekli genital kanallar yönünden seminifer tübül lümenine akan ve spermilerin taşınmasında rol oynayan ekzokrin salgı ürünleri olan testosteron ve androjen bağlayıcı protein (ABP) sıvısı salgılar. Testosteron spermatogenetik hücrelerin farklılaşmasını ve olgunlaşmasını sağladığı gibi fetüste mezonefrik (Wolf) kanallarından köken alan yapıların gelişimini de sağlar. ABP yüksek oranda testosteron bağlar. ABP üretimi FSH (Folikül uyarıcı hormon) ile testosteron kontrolü altında seminifer tübül içerisindeki spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını gerçekleştirir. Sertoli hücreleri testosteronu östradiole dönüştürür. Aynı zamanda bu hücreler ön hipofiz bezinden FSH salgılanmasını ve sentezini engelleyen inhibin adı verilen peptid salgısını gerçekleştirir (26,28).

Sertoli hücreleri Anti Müllerian Hormon (AMH) üretimini de sağlar. AMH; Müller kanalı baskılayıcı olarak da bilinir. Dönüştürücü büyüme faktörü ailesinden ve glikoprotein yapısında olup erkek fetüste parametonefrik (Müller) kanalın gerilemesini sağlar (26).

2.3.5. İnterstisyel Alan

Seminifer tübüllerin arasındaki interstisyel bağ dokusu kan ve lenf damarları ile sinir liflerini içeren gevşek bağ dokusu özelliğindedir. Bağ dokusu hücreleri olan fibroblastlar, mast hücreleri, makrofajların yanı sıra interstisyel hücreler (Leydig Hücreleri) olarak isimlendirilen testosteron üreten hücreler de yer alır. Leydig hücreleri bağ dokusu içerisinde tek tek ya da gruplar halinde görülür. Yuvarlak ya da poligonal

şekli, yuvarlak nükleusu olan, asidofil sitoplazmalı ve tipik olarak steroid sentezleyen hücre özelliği gösteren sitoplazmasında lipit damlacıkları içeren hücrelerdir.

Steroid sentezi yapan tüm hücrelerde olduğu gibi Leydig hücrelerinin de bol miktarda granülsüz endoplazmik retikulumu sahip olması sebebiyle bu hücrelerin sitoplazması eozinofil boyanır. Kolestrolden testosteron sentezi için gerekli olan enzimler agranüler endoplazmik retikulum ile ilişkilidir. Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında tubuloveziküler kristal mitokondrionlar da yer alır. Yine Leydig hücrelerinde lipofuksin pigmenti ile çubuk şeklindeki bir inklüzyon olan Reinke kristalleri fazlasıyla bulunur. Kristallerin yapı ve fonksiyonları tam olarak bilinmese de muhtemel bir protein ürünü olup yine Leydig hücrelerinin %50' sine yakın kısmında bulunduğundan tanısal amaçlı olarak kullanılmaktadır.

Leydig hücreleri erken fetal dönemde farklılaşıp testosteron salgılanmasını gerçekleştirirler. Testosteron erkek fetusun gonadlarının gelişimi, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu için esastır. Embriyoda, testosteron ve diğer androjenlerin salgılanması ve erkek fetusta normal gonadal gelişim için gereklidir. Pubertede testosteron salınımı sperm üretimi başlatılması, aksesuar bezlerin sekresyonunun başlatılması ve sekonder seks karakterlerinin gelişimi için gereklidir. Yetişkinde ise testosteron salgılanması spermatogenezin, genital boşaltım kanalları, bezlerin sekretuar aktiviteleri ve sekonder seks karakterleri için gereklidir (25,28).

Leydig hücreleri erkek fetusunun erkenden farklılaşmasında etken rol oynar ve fetal yaşamın yaklaşık olarak 5. ayından itibaren inaktif oldukları bir periyoda girerler. İnaktif haldeki Leydig hücrelerinin fibroblastlardan ayırdedilmesi güçtür. Puberte döneminde gonadotropik stimülasyona maruz kalan Leydig hücreleri androjen salgılayan hücelere dönüşüp ömür boyu aktif halde kalırlar (25).

2.4. METOTREKSAT (MTX)

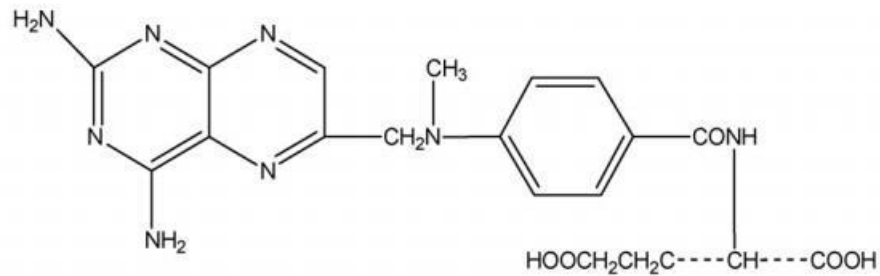
Metotreksat folik asit antagonist olan, kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan antimetabolitlerden birisidir (31). Antimetabolitler; DNA, RNA, proteinler ve diğer temel hücre yapılarının sentezi esnasında değişik basamaklarda etki gösterirler. Substrat ya da koenzimin üzerindeki özgül bağlanma noktalarını inhibe eder, böylece enzimin çalışma mekanizmasını inhibe etmiş olurlar. Antimetabolitler 3 grup altında incelenirler.

Bunlar; folik asit metabolitleri, primidin analogları ve pürin antimetabolitleridir (32). MTX, dihidrofolik asit analogudur. İlk kez 1948 yılında çocukların lösemilerini tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır (31). MTX solid ve hematolojik neoplazmanın tedavisinde kullanılmaktadır. MTX, yüksek dereceli lenfoblastik lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri gibi kanserlerin tedavisinde antiproliferatif olarak kullanılırken, romatoid artrit’de (RA), meme, testis, baş ve boyun kanseri gibi kanser türlerinde de kullanılmaktadır (33).

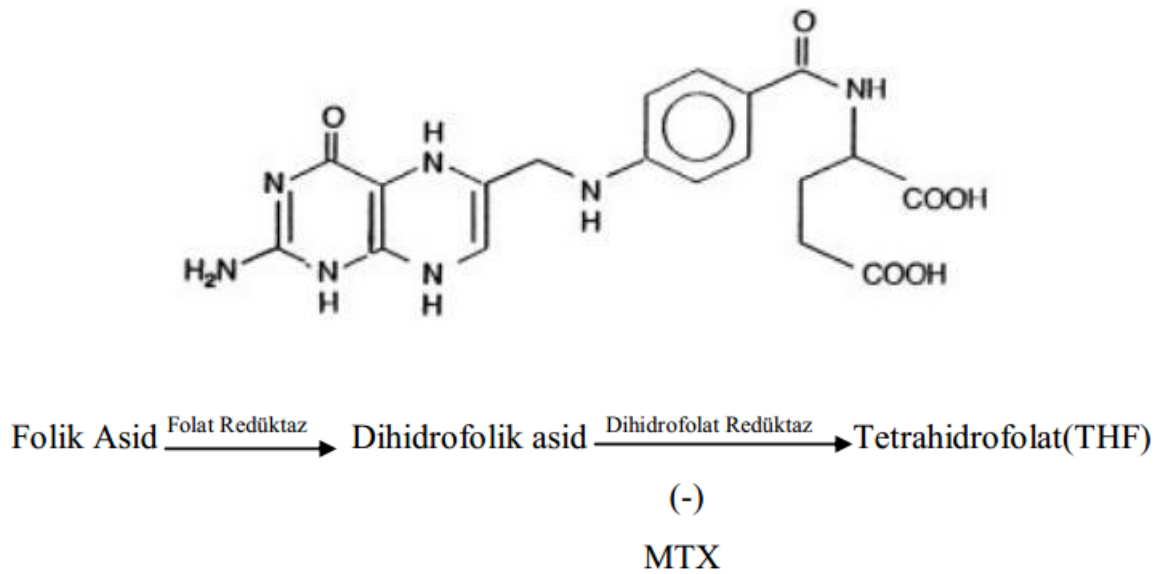
MTX’in düşük dozları hariç oral yolla kullanımı önerilmeyip, tümörün türüne göre değişmek üzere 5 mg/m² ile 12 g/m²’ye kadar kadar değişen doz aralığında ve her gün ile 3 haftada bir değişen sıklıkla kullanılabilir. MTX dozu 500 mg/m² ve üstünde uygulandığında ilaç kan düzeyinin izlenebilmesi için, yeterli doz ve sürede folik asit alınımına dikkat edilmesi gerekir. Kalsiyum folinat ile kurtarma tedavisi (leucovorine rescue), MTX infüzyonunun sona ermesinden sonra 15 mg/m² kalsiyum folinatın oral veya intravenöz yolla 6 saatte bir 8 veya 10 kez verilmesi olarak tanımlanır. MTX, lösemi ve lenfomanın meningeal tutulumuna karşı profilaktik ve karsinomatoziste tedavi amacıyla 12 mg/m² (maksimum 15 mg) intratekal (3-4. bel omuru hizasından subaraknoid aralığa verilmesi) yolla verildikten sonra iki doz daha verilerek pekiştirme uygulaması yapılır (32).

2.4.1. Metotreksatın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

MTX yapısal olarak folik aside benzediğinden dolayı, antimetabolitlerin folik asit metabolitleri grubunda yer almaktadır. Metotreksat folik asidin 4-amino –N10 – metil analogu olup dihidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin inhibitörüdür.



Şekil 2.9: Metotreksatın kimyasal yapısı (3).



Şekil 2.10: Dihidrofolatın molekül yapısı (3).

Vitamin şeklindeki besinlerden alınabilen folik asidin vücuttaki yararlı şekli, folinik asit ve diğer tetrahidrofolat türevi koenzimlerdir. Bu koenzimler timidilatın purinlerin, metionin ve glisin sentezinde görev alan tek-karbon transferi reaksiyonları için gereklidir. Folik asidin dihidrofolat türevi (FH₂) üzerinden tetrahidrofolat (FH₄)' a dönüşümü şeklinde olur. Metotreksat, özellikle hücre döngüsünün "S" evresinde kuvvetli etki gösterir. Kemik iliği, kıl kökleri ve spermatojenik hücreler gibi hızla bölünme geçiren hücrelerde ve çoğalma kapasitesi fazla olan bölgelerde de etki göstermektedirler (3,32).

Ayrıca MTX, folatta olduğu gibi, tümoral ve normal hücrelerde seri olarak bir dizi değişikliğe uğrayarak poliglutamat türevleri (MTX-PGs) meydana getirmektedir. Böylelikle poliglutamat türevleri, hücre içerisinde bir folat kaynağı gibi davranarak timidilat sentazı belirgin olarak inhibe eder. Ayrıca pürin sentezi erken aşamalarında kullanılan iki enzimi daha bloke eder. DHFR enziminin bloke olması sonucu birikmiş dihidrofolatpoliglutamat türevleri de timidilat sentaz ve diğer enzimler için de, inhibitör etki gösterir (34,35).

2.4.2. Metotreksatın Etki Mekanizması ve Farmakokinetik Özellikleri

Metotreksat, dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine bağlanarak enzimi geri dönüşel bir şekilde inhibe etmektedir. Tetrahidrofolat (THF) sentezinin inhibisyonu, pirimidin

timidilat ve pürin nükleotidlerinin biyosentezinin yavaşlamasına hatta durmasına neden olur. Bu yapı taşlarının üretilmemesi hücre bölünmesinde gerekli olan DNA ve RNA'nın sentezinde gerekli olan ATP üretimini inhibe etmektedir (36). Ayrıca FH4'e dönüşmeden kalan FH2, dihidrofolat poliglutamatlar (FH2Glu) ve metotreksatın poliglutamat türevleri (metotreksat Glu) şeklinde hücrede birikirler. Kanser hücresi içerisinde timidilat sentetaz ve transformilaz enzimlerinin inhibisyonundan poliglutamat metabolitleri sorumludur (32).

MTX'in hücrelerdeki toksik etkisini folinik asid (N5-formiltetrahidrofolat) antagonize etmektedir. Sulfonamidler ve salisilatlar, bu ilaç ile verilirse MTX'in bağlanma oranı azalır ve toksisitesi artabilir. MTX tümör hücrelerinde uzunca bir süre bağlı kalır. İstirahat halindeki hücrelerde MTX gibi antimetabolitlerin sitotoksik etkisi olmaz ancak hücre içerisinde uzun süre kalan MTX'in gizli (latent) sitotoksik etkisi hücre bölünmeye girdiği zaman belirgin hale gelir ve hücreyi öldürür. Standart dozda kan-beyin bariyerini geçemez ve tedavide kullanılan konsantrasyonlara ulaşamaz. Yüksek doz uygulamalarında ise BOS'ta terapötik konsantrasyonlara ulaşır. Böbrek yolu ile atılır ve emildiğinde yarılanma ömrü 8 saattir (32).

MTX, hücre içerisine aktif transport ile girebilmek için folat ile rekabete girerek hücre içerisine folatın yerine kendisi girer. MTX diğer folat türlerinde olduğu gibi karaciğerde poliglutamilasyona uğrar. Poliglutamasyon sonrasında MTX intrasellüler olarak uzun süre kalabilmektedir. Hidrolitik enzimlerin sayesinde tekrar eski haline dönebildiğinden haftalık olarak tek doz olarak kullanılması önerilmektedir (37).

MTX'in gastrointestinal sistem içerisinde emilimi doza bağımlı olduğu halde gıdaların emilimi üzerindeki etkisi hakkındaki bilgiler tam net olmamakla birlikte tartışmalıdır. Emilimden 1-2 saat sonra kan serum seviyesi pik seviyesine ulaşır. Genel kullanımdaki dozu 7,5-25 mg/hafta'dır ve tek seferde alınması önerilmektedir. Klinik olarak etkinliği açısından fark oluşturmaması nedeniyle bu dozun 2-3 eşit miktara bölünerek alınması hastanın toleransına göre tercih edilebilmektedir. 5-25 mg arasındaki dozları iyi emilirken % 60 oranında biyoyararlanım göstermektedir. Doz artırıldığında ise intestinal flora tarafından metabolize edilmesiyle atılmasının sağlanması sonucu emilimi azalır. Yaklaşık % 50'si serum proteinlerine bağlanır ve diğer albümine bağlanan maddeler ile rekabete girer. Verilen dozun %60-90'a kadar olan kısmı, 48 saat

içerisinde, en çok da ilk 8- 12 saat içerisinde değişmeden idrar ile atılır. MTX'in büyük çoğunluğunun böbreklerden atılımı, glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon ile geriye kalan kısmı da safra yoluyla atılır. Bu nedenle, renal kan akımını azaltan, nefrotoksik ya da zayıf organik asit yapısında olan ilaçlar ile birlikte kullanımı, renal atılımı azaltarak daha ciddi myelosupresyona neden olabilmektedir. MTX' in sistemik dolaşımdaki dozunun yaklaşık olarak %3' ü kadarı santral sinir sisteme geçmektedir (37-39).

MTX oral yol ile (30 mg/m^2) alındığı zaman gastrointestinal sistemden tamamına yakını emilir, artan dozlarında ise bu oran giderek azalmaktadır. Çocuklarda akut lenfositler lösemilerin nükslerinde absorpsiyonun bozulduğu bildirilmiştir. MTX üç yarı ömürlü bir düzenlenme gösterir (5 dakika, 2-3 saat, 8-10 saat) ve son ikisi yarılanma zamanları böbrek yetmezliği durumlarında ya da retansiyonu (tutulması) durumunda uzamaktadır. Emilimin bu son döneminde, böbrek hasarı yüzünden meydana gelebilecek uzama neticesinde, ilacın kemik iliği, gastrointestinal epitel ve cilt üzerindeki toksik etkilerinin artmasına sebep olur. MTX'in plevra ya da periton gibi vücut boşluklarına dağılımı yavaş olmaktadır. Ancak, asit ya da plevral efüzyon gibi nedenlerle meydana gelecek genişlemeler neticesinde bu bölgeler ilaç deposu gibi davranış sergiler ki bunun sonucunda ilacın yavaş salınımına sebep olurlar. Bu nedenle plazma konsantrasyonundaki artış devam eder ve daha ciddi toksisite bulguları gelişebilmektedir. Plazma-BOS yoğunlaşma oranına göre MTX'in SSS' ne geçişi düşüktür (39).

Romatolojik olgularda genel kullanım dozu; $10 \text{ mg/m}^2/\text{hafta}$ olup tek dozda alınması önerilmektedir. Fakat bu dozun 2-3 eşit miktara bölünerek alınması klinik etkinliği açısından fark oluşturmaması sebebiyle hastanın toleransına göre verilebilir. Bu dozdaki emilimi iyidir ve %60 oranında biyoyararlanım görülmektedir. Doz arttırıldığında ise intestinal flora tarafından metabolize edilerek atılması nedeniyle emilimi azalmaktadır (40).

2.4.3. Metotreksatın Yan Etkileri

MTX, folat metabolizmasını antagonize ederek antineoplastik özellik gösterir, kanser hücreleri ve hızlı bölünen hücrelerde de nükleik asitlerin yapımını engellemektedir (3). Antifolat tedavinin primer toksisitesi ve yaygın yan etkileri, kemik iliği, cilt ve

intestinal epitel hücreleri üzerinde olmaktadır. Normal hücreler üzerinde bu oluşan toksik etkileri önlemek için başka bir folat analogu olan 5-formil- tetrahidrofolatın MTX ile birlikte kullanımı özellikle yüksek doz MTX kullanımında yaygın olarak uygulanan bir protokoldür (41). Genellikle iki hafta içinde yan etkiler sonlanır, ancak renal fonksiyonları bozulmuş hastalarda ise ilaç atılımındaki azalmaya bağlı olarak kemik iliği depresyonu (myelosupresyon) uzayabilir (42).

Bu yaygın olarak görülen yan etkilerin yanı sıra, alopesi, interstisyel pnömoni, nefrotoksisite, hepatotoksisite, oogenez/ spermatogenezde defektler, dermatit, düşük ve teratojenite gibi yan etkiler de gözlemlenebilmektedir. Karaciğer enzimlerindeki artış, yüksek doz veya uzun süreli olarak MTX kullanımında beklenen bir sonuçtur, fakat bu durum genellikle geri dönüşümlüdür (42). Lösemi, psöriazis ve romatoid artrit MTX ile tedavisi sırasında gelişen hepatotoksisite, , nükleer polimorfizm, hepatosit nekrozu, kronik portal inflamasyon, fibrozis veya siroz şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Karaciğer hasarını oluşturan mekanizma tam olarak bilinmemekte, intrasellüler MTX-PG (MTX polyglutamat) birikimi ve folat azalmasının sorumlu olduğu düşünülmektedir (43).

Lökoverin ilave edilmiş, 1000 mg/m² ve üzeri MTX uygulaması, yüksek doz MTX olarak tanımlanmaktadır. Lökoverin ile birlikte uygulanan yüksek doz MTX'i, çoğu hasta iyi tolere edebilse dahi, MTX ve metabolitlerinin renal tübüllerde birikmesiyle yaşamı tehdit edici olan nefrotoksisite gelişebilir. Yüksek doz MTX' e bağlı olarak gelişen nefrotoksisite, 1970'li yıllarda ilaca bağlı morbidite (hasta olma oranı) ve mortalitenin (ölüm oranı) primer nedenini oluşturmaktaydı (44,45).

İntestinal epitel hücreleri de hızlı çoğalan hücreler olduğu için, MTX ile kolaylıkla inhibe olurlar. MTX, genellikle oral ve intestinal mukozada inflamasyona neden olur. Hücre çoğalmasının inhibe olmasının sonucunda intestinal bariyer fonksiyonlarında azalma gözlenir. Gastrointestinal yan etkilerin, MTX' in hücre içerisinde biriken metabolitlerinin folat seviyelerini azaltması ile geliştiği düşünülmektedir. Folat, santral sinir sisteminde yer alan nörotransmitterlerin metabolizmasında ve sentezinde kullanılır. MTX' e bağlı gelişen gastrointestinal yan etkilerinin dolaylı yoldan santral sinir sistemine bağlı yan etkiler olduğu ve böylece hücre içi folat seviyesindeki azalma sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (46).

MTX'e bağılı hematolojik yan etkilerin oluşumunda dihidrofolat redüktaz enziminin inhibisyonu neticesinde ortaya çıkan DNA sentezinde bozulma ve hızlı hücre değişimi kemik iliğinin baskılanmasına yol açmakta ve hematolojik yan etkilere sebep olmaktadır (47). Düşük doz MTX tedavisinde çok nadir de olsa pansitopeni gelişebilmektedir. MTX' in neden olduğu osteopati ilk olarak lösemi, kafa içi tümörler, osteosarkom nedeni ile yüksek dozda MTX kullanılan pediatrik hastalarda bildirilmiştir. Osteoporoz, kemik ağrısı ve özellikle distal tibia ve fibulada görülen stres kırıkları üçlüsü, MTX osteopatisini tanımlamaktadır. Yakın zamanlarda yapılan deneysel pek çok çalışmada ve vaka takdiminde yalnızca yüksek dozun değil, uzun süreli düşük doz kullanımının da MTX osteopatisi gerçekleştirebildiği gösterilmiştir (48).

Folat eksikliğinin MTX toksisitesi oluşmasında bir risk faktörü olduğundan dolayı MTX yanına eklenen folik asit ya da folinik asitin toksisiteyi önlemek için birbirinden farklı olmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte klinik tecrübeler özellikle yüksek dozda alınan folik asitin MTX etkinliğini azaltabileceğini ortaya koymuştur (46,49).

2.5. ELLAGİK ASİT (EA)

Ellagik asit (EA), bitkilerde fenol yapısında doğal olarak bulunur ve antimutajenik, antikanserojenik aktivite gösteren bir maddedir (50). EA ahududu, çilek, nar gibi üzüksü meyveler ile ceviz, kestane, fındık gibi kabuklu meyvelerin yapısında yer alır (51). Meyve ve sebzeler içerisinde, en fazla kırmızı (*Rubus ideaus*) ve siyah (*Rubus occidentalis*) ahududularda bulunan ellagik asit, vücudumuzda kansere sebep olan kimyasalları inaktif hale getirerek antikanserojen bir etki göstermekle birlikte yaşlanmayı geciktirici etkisi vardır. Özellikle kırmızı ahududular ile yapılan çalışmalarda ellagik asitin, bazı kanser türlerinde kanserli hücrelerin gelişimini engellediği gösterilmiştir (8,51,52). EA, antioksidan, antiinflamatuvar, antikarsinojenik, antiviral, antibakteriyel, antiproliferatif vb. bir dizi biyolojik özelliğe sahiptir (53).

EA, ellagitininlerin (ET) bazı kimyasal işlemler geçirmesi neticesinde oluşmaktadır. EA'in bir hücre tarafından algılanıp kullanılması için uygun bir formda bulunması gereklidir. Bu form, şeker molekülleri ile birleşmesiyle oluşur (54).

Bitkisel olarak üretilen EA gibi bitkisel formlardan elde edilen fenolik bileşiklerin sağlık açısından çok önemli olmalarının yanı sıra insan sağlığı için de olumlu etkilerinin

olduğu öngörülmektedir. Özellikle EA'nın bu olumlu etkilerinin birçok mekanizmayı etkilemesiyle, farklı yollar üzerinden gerçekleştiği iddia edilmektedir. EA antioksidan enzimlerin hem sentezini artırır, hem de aktivasyonunu hızlandırır, böylelikle oksidatif stresin olumsuz etkilerini ortadan kaldırır (55).

EA ve ET meyve, sebze, meyve bazlı içecekler, reçel ve marmelat gibi pek çok yapı içerisinde yer alır. Farklı çalışmalar coğrafi orijin, iklim, bitkinin türü ve birçok çevresel etmen neticesinde EA içeriği değişiklik göstermektedir. Özellikle üzüksü meyveler familyasından çilek, ahududu, kuşburnu, kiraz türlerinde yüksek EA konsantrasyonu vardır (55).

Tablo 2.1: Bazı bitki türlerinde bulunan EA miktarları. * mg/100g, **mg/L. (55).

Bitki	EA miktarı	Referans
Çilek	1.77*	[50]
Ahududu	5.37*	[50]
Böğürtlen	3.69*	[38]
Nar	1.73*	[50]
Mum ağacı	0.18*	[50]
Ahududu reçeli	2.25*	[51]
Ananas	0.08*	[51]
Çilek reçeli	2.01*	[50]
Nar suyu	66.87**	[51]
Ahududu suyu	28**	[51]

2.5.1. Ellagik Asitin Kimyasal Özellikleri

Molekül Formülü: $C_{14}H_6O_8$

Molekül Ağırlığı: 302.1 g/mol

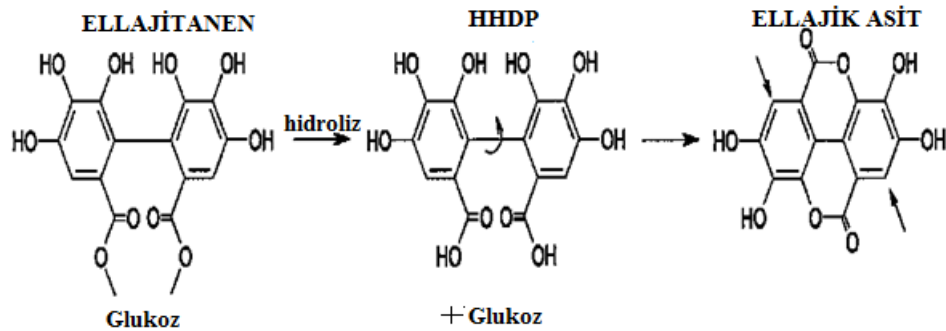
Yoğunluğu: 1.67g/cm^3 (56).

Ellagik asit (EA), birçok bitkide serbest ve ellagitanin (ET) glikozitleri şeklinde bulunan polifenolik lakton bir bileşiktir. EA 302.19g/mol molekül ağırlığı ile heksahidroksidifenik asidin dilaktonudur. Doğada zayıf bir asit olmakla birlikte, 360°C üzerindeki yüksek erime noktasıyla da çok kararlı bir bileşiktir. EA, hidrofilik kısmı

temsil eden dört fenolik ve iki lakton gruplarıyla (sırasıyla hidrojen bağ vericisi ve alıcısı olarak rol oynayabilir) ve lipofilik kısmı temsil eden dört halka ile de termodinamik açıdan oldukça kararlı bir moleküldür. EA molekülü lipofilik olarak üstün olan dört halkası sebebiyle ısıya fazlasıyla dayanıklıdır. Dört adet fenolik grup, EA'nın kalsiyum ve magnezyum gibi metal iyonlarıyla kompleks bir form oluşturmasını sağlamaktadır (56-58). EA; suda çözündüğü gibi (59) ayrıca metanolde, etanolde ve dimetil sülfoksitte iyi çözünmektedir (60).

ET bir ya da daha fazla hekza-hidroksi-difenol (HHDP) grubuyla karakterize olan ve genellikle glukoz ile bağlanan kompleks bir polifenol sınıfıdır (61). ET bileşikler HHDP'lerin ve glukoz gruplarının fazla sayıda bağlanma olasılığıyla özellikle fenollerin dimerik ve oligomerik yapıya dönüşebilme eğilimleri nedeniyle geniş bir yapısal çeşitliliğe sahiptirler (62,63). ET'ler doğada ve fizyolojik koşullarda kararsız durumdayken, genellikle hidroliz ve polimerizasyon reaksiyonlarına uğrayarak suda EA gibi kolayca hidrolizlenmeyen yapılara dönüşürler. ET'lerin asit, baz gibi maddelerle hidrolizi sonucu da HHDP'ler spontan olarak suda daha az çözünen EA'ya dönüşürler (64).

Metilasyon, glikozilasyon ve metoksilasyon gibi modifikasyonlarla EA sayısız türevine dönüşür ve böylelikle bitkilerde sayısız EA türevi içerir. Bu yapıların çözünürlüğü, mobilitesi, reaktivitesi de bu çeşitliliğe katkı sağlar. Bunun yanında hayvanlarda bulunan doğal mikrobiyota da bu çeşitliliği arttıran etmenlerden biridir. Sonuç olarak, hem bitkiler hem de hayvanlar sayısız EA türevi barındırmaktadır (65).



Şekil 2.11: Ellagitaninlerin hidrolizasyonu (61).

2.5.2. Ellagik Asitin Biyolojik Aktivitesi

EA'nın antioksidan, antikanserojenik, antiöstrojenik ve antimutajenik etkilerinin olduğu bilinmektedir. EA serumda kansere sebep olan kimyasalların temizlenmesini sağlar. Kansere hücrelerini temizler, hücresel DNA'da kanserojenlerin bağlanmasını engeller ve böylece yüksek oranda yıkıcı olan serbest oksijen radikallerinin temizlenmesini ya da bağlanmasını sağlar. Yıkıcı kanser hücrelerine karşı immün sistemi uyarır. Böylece antioksidan görevini yapmaktadır (66,67). Ayrıca EA lipid peroksidasyonunda E vitamininden daha fazla antioksidan etki göstermektedir (67).

EA'nın diğer bir etkisi de bakteriyel membranın fonksiyonlarını önleyip, mikroorganizmaların gelişimini engellemek olduğu düşünülmektedir. Ayrıca membran yüzeyine yerleşen EA benzeri fenolik fitokimyasallar hücre çevresinde bir hidrofobiklik yaratarak membran yapısında değişiklik meydana getirir (67).

Tablo 2.2: Bazı meyve türlerinde EA ve Antosiyanin miktarına bağlı gözlenen ORAK (Oksijen Radikalleri Absorbans Kapasitesi) değerleri (55).

Meyve türü	ORAK umol TE/g	Antosiyanin (mg/100g)	EA (mg/100g)
Siyah ahududu	168-190	214-589	5.37
Böğürtlen	58-100	83-326	3.69
Morion üzümü	46-90	109-155	5.83
Boysen üzümü	35-85	120-160	3.58
Kırmızı ahududu	27-50	20-65	3.39
Çilek	26	40	0.69-1.6
Portakal	8-37	-	-
Vişne	21	-	-
Elma	3-10	1-10	-
Yeşil üzüm	8-13	5	-

2.5.3. Ellagik Asitin Etki Mekanizması

EA'nın insan sağlığı üzerinde oluşturduğu koruyucu etkinin kimyasal mekanizmasının anlaşılması güçtür. Literatürde yer alan teorilerin çoğu hücresel çalışmalara dayanmaktadır. Bu teoriler, DNA'ya kanserojen maddelerin bağlanmasının

engellemesini, kanserojen etkinliğinin inhibisyonunu, kanserojen detoksifikasyonunun teşvikini ve kanserojenlerin reaktif formları ile kompleks oluşturmasını kapsamaktadır. Örneğin, antikanserojen etkileri konusunda farklı mekanizmaları olduğu bildirilen ferulik asit, kafeik asit ve ellagik asidin polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), mikotoksinler ve nitrozaminlerin kanserojen etkilerini inhibe ettikleri birçok in vitro çalışma ve deneysel hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Fakat diğer fenolik asitlerden farklı olarak EA doğrudan enjeksiyon yolu ile verilmesinin yanında oral yoldan verilen gıdalarla da antikanserojen etkili olduğu bildirilmektedir (68). EA'nın insan sağlığı üzerindeki önemli bir etkisinin de östrojen reseptör (ER) alt tipleri olan ER α ve ER β yoluyla östrojenik/antiöstrojenik aktivite olduğu bildirmiştir (69,70).

2.5.4. Ellagik Asitin Kanser Tedavisindeki Yeri

EA'nın antikanserojen etki mekanizmaları incelendiğinde, intestinal detoksifikasyon enzimleri olarak adlandırılan Faz II enzimlerini indükledikleri (örneğin glutathion-S-transferaz enziminin aktivitesini stimule etmekte ve karaciğerde sentezini artırmaktadır) böylelikle kanserojen maddenin bağırsakta emilimini inhibe ettikleri bilinmektedir. Ayrıca EA; prokanserojenlerin aktivasyonunu katalize eden Faz I enzimlerini de engelleyebilmektedir. Hayvan deneyleri sonuçlarında ise yalnızca enzim sistemi etkilenmemekte, aynı zamanda sitokrom P450 miktarında da düşüş gözlemlenmektedir (71).

EA'nın antikanserojen etki mekanizması konusunda yapılan bir diğer çalışmada ise EA ile DNA arasında kovalent bağların varlığı belirlenmiş olup neticesinde DNA'nın maskelenerek kanserojen madde ile bağlanması engellendiği belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada ise EA'nın DNA replikasyonu, kopyalama, rekombinasyon, hücre çoğalması ve farklılaşmasında önemli görevi olan Topoizomeraz I ve II enzimlerinin çalışmasını engelleyerek tümör hücresinin gelişimini durdurduğu bildirilmektedir. Ayrıca EA, aflatoksin B1'in DNA'ya bağlanma neticeleri ve mutasyonlar oluşturmasını önlediği de bildirilmiştir. Antikanserojen etki mekanizması konusundaki bir diğer çalışmada ise EA'nın serbest oksijen radikallerini ve kanserojenlerin reaktif metabolitlerini etkisiz hale getirip kanser başlangıcını engellediği de bildirilmektedir. Metabolik aktivite sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri, DNA zincirinin ayrılmasına ve mutasyon oluşumuna neden olmaktadır. EA ise bu süreci engelleyen kuvvetli bir antioksidandır (67,71).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı 17/02/2016 tarih ve 16/046 no'lu onayı doğrultusunda **TYL-2016-6674** no'lu proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen 30-60 günlük, ortalama 280-305 gr ağırlığında, 48 adet Wistar albino türü erkek sıçanlar kullanıldı. Kafesler içerisinde tutulan sıçanlarda günün normal düzenine uygun 21°C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlandı. Denekler ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Gruplar Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Çalışmada Hazırlanan Deney Grupları

Sıra	Gruplar n=8	Uygulamalar
1	Kontrol	Bu gruba ait sıçanlara intraperitoneal (i.p.) 1ml/kg mısırözü yağı uygulandı.
2	EA 40	Bu gruba ait sıçanlara ellagik asit 40 mg/kg (i.p.) olarak uygulandı.
3	EA 80	Bu gruba ait sıçanlara ellagik asit 80 mg/kg (i.p.) olarak uygulandı.
4	MTX	Bu gruba ait sıçanlara metotreksat 20 mg/kg (i.p.) olarak uygulandı.
5	MTX+EA 40	Bu gruba ait sıçanlara ellagik asit 40 mg/kg (i.p.) + metotreksat 20 mg/kg (i.p.) olarak uygulandı.
6	MTX+EA 80	Bu gruba ait sıçanlara ellagik asit 80 mg/kg (i.p.) + metotreksat 20 mg/kg (i.p.) olarak uygulandı.

Çalışmamızda kullanılan MTX, Koçak Farma® (50 mg/ 5ml) firmasından temin edildi.

Çalışmamızda kullanılan EA ise (%97ACROS® Organics) firmasından temin edildi.

3.1. DENEYSEL PROSEDÜR

Tüm uygulamalar günü aynı saatinde yapıldı. Kontrol grubuna (Grup 1) ait sıçanlara mısırözü yağı intraperitoneal (i.p.) olarak 12 gün boyunca verildi. EA 40 (Grup 2) grubuna ist sıçanlara ellagik asit 40 mg/kg/gün i.p. olarak 12 gün boyunca uygulandı. EA 80 (Grup 3) grubuna ait sıçanlara ellagik asit 80 mg/kg/gün i.p. olarak 12 gün boyunca uygulandı. MTX (Grup 4) grubuna ait sıçanlara metotreksat 20 mg/kg tek doz 3.gün i.p. olarak uygulandı. MTX+EA 40 (Grup 5) grubuna ait sıçanalara ellagik asit 40 mg/kg/gün i.p. olarak 12 gün boyunca uygulanıp, uygulamanın 3.gününde 4 saat sonra metotreksat 20 mg/kg tek doz i.p. olarak uygulandı. MTX+EA 80 (Grup 6) grubuna ait sıçanlara ellagik asit 80 mg/kg/gün i.p. olarak 12 gün boyunca uygulanıp, uygulamanın 3.gününde 4 saat sonra metotreksat 20 mg/kg tek doz i.p. olarak uygulandı. Deney süresinin sonunda tüm denekler ketamin + xylasine (50mg/kg-15mg/kg) kullanılarak genel anestezi altında uyutularak dekapite edilip testis dokuları çıkarıldı. Dekapitasyon sonrasında alınan testis dokularının bir bölümü histolojik incelemeler, diğer bölümü ise biyokimyasal incelemeler için kullanıldı. Biyokimyasal incelemeler için alınan testis dokuları -80 °C 'de saklandı.

Dekapite edilen sıçanlardan alınan testisler ışık mikroskopik incelemeler için %4'lük formaldehit ile tespit edildi. Tespit solüsyonunda 72 saat bekleyen testis dokuları bir gece akan musluk suyu altında yıkandıktan sonra artan alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarıldı ve ksilol ile şeffalandırıldıktan sonra parafine gömülerek bloklandı. Yapılan bu işlem basamakları Tablo 3.2'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Tablo 3.2: Işık Mikroskobu Doku Hazırlama Tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	%4 Formaldehid	72 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
2	Musluk suyu	1 gece	9	Absolü Alkol	1 saat
3	%50 Alkol	1 saat	10	Ksilen	20 dakika
4	%70 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dakika
5	%80 Alkol	1 saat	12	Ksilen	20 dakika
6	%96 Alkol	1 saat	13	Eriyik parafin (60°C)	1 gece
7	Absolü Alkol	1 saat	14	Bloklama	

Parafin bloklardan alınan 5-6µm’lik kesitler polilizin kaplı lamlara alındı. Hazırlanan lamalar rutin histolojik doku takibi metodu kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı. Dereceli alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla dokular Hematoksilen – Eozin (H&E) (Tablo 3.3) ile boyanarak önce artan alkol serilerinden sonra ksilolden geçirilip kapatıldı.

Tablo 3.3: Hematoksilen- Eozin Boyama Tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	13	Akarsu	5 dakika
2	Ksilen I	10 dakika	14	Eozin	3-5 dakika
3	Ksilen II	10 dakika	15	Akarsu	1 dakika
4	Ksilen III	10 dakika	16	%50 Alkol	1-2 dakika
5	Absolü Alkol I	5 dakika	17	%70 Alkol	1-2 dakika
6	Absolü Alkol II	5 dakika	18	%80 Alkol	1-2 dakika
7	%96 Alkol	5 dakika	19	%96 Alkol	1-2 dakika
8	%80 Alkol	5 dakika	20	Absolü Alkol I	1-2 dakika
9	%70 Alkol	5 dakika	21	Absolü Alkol II	1-2 dakika
10	%50 Alkol	5 dakika	22	Ksilen I	10 dakika
11	Akarsu	5 dakika	23	Ksilen II	10 dakika
12	Hematoksilen	5-8dakika	24	Kapatma	

3.2. JOHNSEN TESTİKÜLER BİYOPSİ SKORU

Bu skorlamaya göre, hasarlanmaya neden olan herhangi bir olay sonrasında, testis içerisinde yer alan tübüllerin içindeki hücrelerin dağılımı belli bir sıra takip ederek progressif bir şekilde kaybolur. Tübüllerdeki bu hasarlanmanın derecesinin değerlendirilmesinde Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) kullanıldı (Tablo 3.4). Histolojik incelemeler, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında iki uzman histolog tarafından birbirinden bağımsız olarak skorlandı ve değerlendirildi. Sonuçların değerlendirilmesi her gruptan seçilmiş 10 adet farklı preparattan 2' şer farklı tübülün 20'lik objektifle incelenmesi şeklinde yapıldı. Her grup için ayrı ayrı 200 adet tübül değerlendirilerek ortalama JTBS hesaplandı. Elde edilen veriler önceden hazırlanan bir forma işlendi. Grupların istatistiksel karşılaştırmaları için SPSS paket programı kullanıldı.

Tablo 3.4: Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Skor	Histolojik Bulgular	Skor	Histolojik Bulgular
1	Tübüller kesitte hiçbir hücre yoktur.	6	Az sayıda (5 / tübül) spermatid vardır.
2	Sadece sertoli hücreleri vardır.	7	Farklanma işareti olmaksızın fazla sayıda spermatid vardır.
3	Germ hücreleri olarak sadece spermatogonyumlar vardır.	8	Olgun spermatozoa olmaksızın geç spermatidler mevcuttur.
4	Az sayıda (5 / tübül) spermatosit vardır.	9	Az sayıda (5 / tübül) spermatozoa vardır.
5	Fazla sayıda spermatosit mevcuttur.	10	Fazla sayıda spermatozoanın görüldüğü tam spermatogenez mevcuttur.

3.3. TUNEL METODU

Deneklere ait tüm kesitlerde apoptotik hücreleri belirlemek için Roche® marka In Situ Cell Detection Apoptosis Fluorescein Kit' i kullanıldı ve boyama işlemi, kitin

prosedürüne göre yapıldı. Kısaca özetleyecek olursak, 5-6 µm kalınlığında alınan testis dokuları deparafinize edildi ve ardından rehidrate edildikten sonra PBS ile yıkandı. Daha sonra antijen geri kazanımı için 0.01 M sodyum sitrat tamponunda mikrodalga fırında 350 W'de 5 dakika bekletilen kesitler, ardından oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanan dokular daha sonra kitin içinden çıkan TUNEL reaksiyon karışımı ile 37 °C'de nemli ve karanlık ortamda 60 dakika inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanan dokulara 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile zıt boyama yapıldı. Gliserollü kapatma solüsyonu ile kapatılan dokular Olympus BX-51 floresan mikroskopta 450-500 nm dalga boyunda görüntülendi. Apoptotik indeks için her gruptan elde edilen on kesitten 20X objektifte on farklı alandaki apoptotik hücreler sayıldı. Apoptotik hücre sayımı birbirinden bağımsız iki uzman histolog tarafından değerlendirildi.

3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZLER (ELİSA METODU)

3.4.1. Malondialdehit (MDA) Düzey Tayini

Tekgenomik Biyoteknoloji'den temin edilen YH Biosearch Laboratory firmasının ticari kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı (Rat malondialdehyde (MDA) ELISA Kit Cat No:YHB0708Ra). Doku örneklerinin sonuçları nmol/mg protein olarak, serum örneklerinin sonuçları ise, nmol/ml olarak verildi.

3.4.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

Tekgenomik Biyoteknoloji'den temin edilen YH Biosearch Laboratory firmasının ticari kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı (Rat Super Oxidase Dimutase (SOD) ELISA Kit Cat No:YHB1021Ra). Doku örneklerinin sonuçları ng/mg protein olarak, serum örneklerinin sonuçları ise, ng/ml olarak verildi.

3.4.1.2. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Tekgenomik Biyoteknoloji'den temin edilen YH Biosearch Laboratory firmasının ticari kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı (Rat Catalase (CAT) ELISA Kit Cat No:YHB0207Ra). Doku örneklerinin sonuçları ng/mg protein olarak, serum örneklerinin sonuçları ise, ng/ml olarak verildi.

3.5. İSTATİKSEL ANALİZ

Tüm istatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 22.0 yazılım programında yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak belirlendi. Sonuçlar ANOVA yöntemiyle değerlendirildi. Post hoc analiz için Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel analizde önemlilik için $p < 0.05$ değeri kullanıldı.

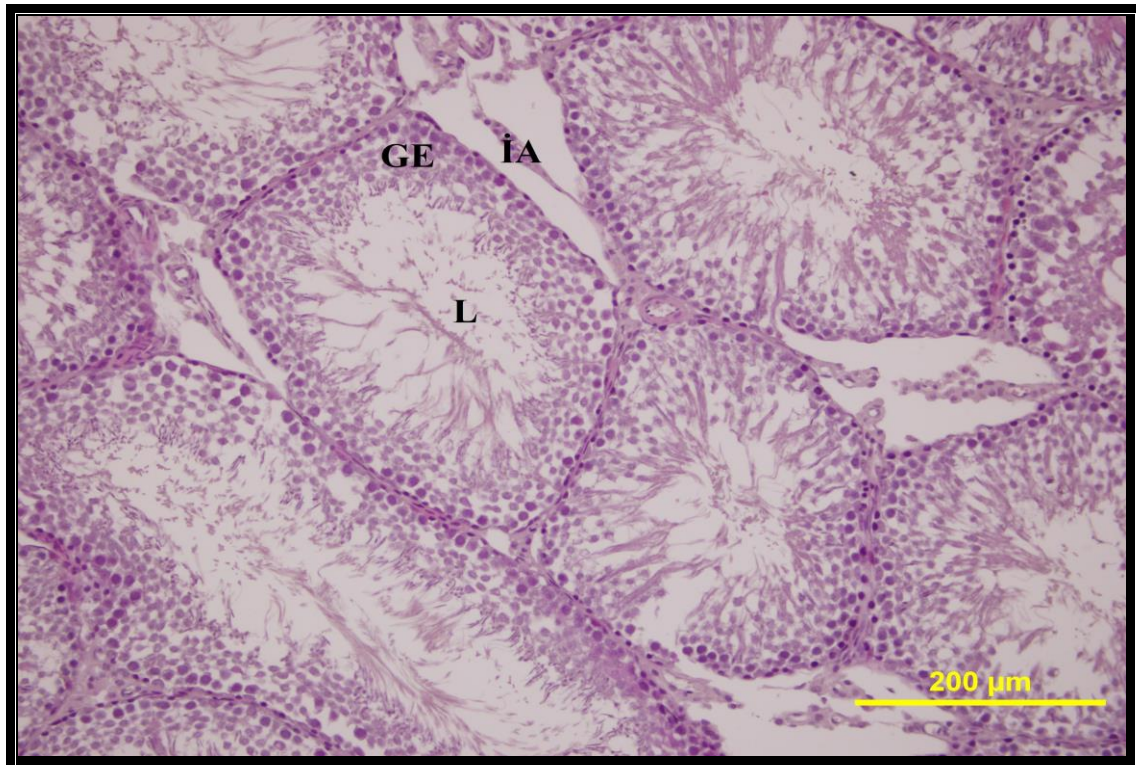
4. BULGULAR

Çalışmamızda intraperitoneal (i.p.) olarak EA ve MTX uygulanan sıçanların testisleri ışık mikroskopunda incelenerek değerlendirildi. Testis dokularında JTBS; MDA, CAT ve SOD enzim aktivite tayini için ELISA tekniği, apoptozis için TUNEL tekniği uygulandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Tübüller histopatolojik olarak değerlendirildi.

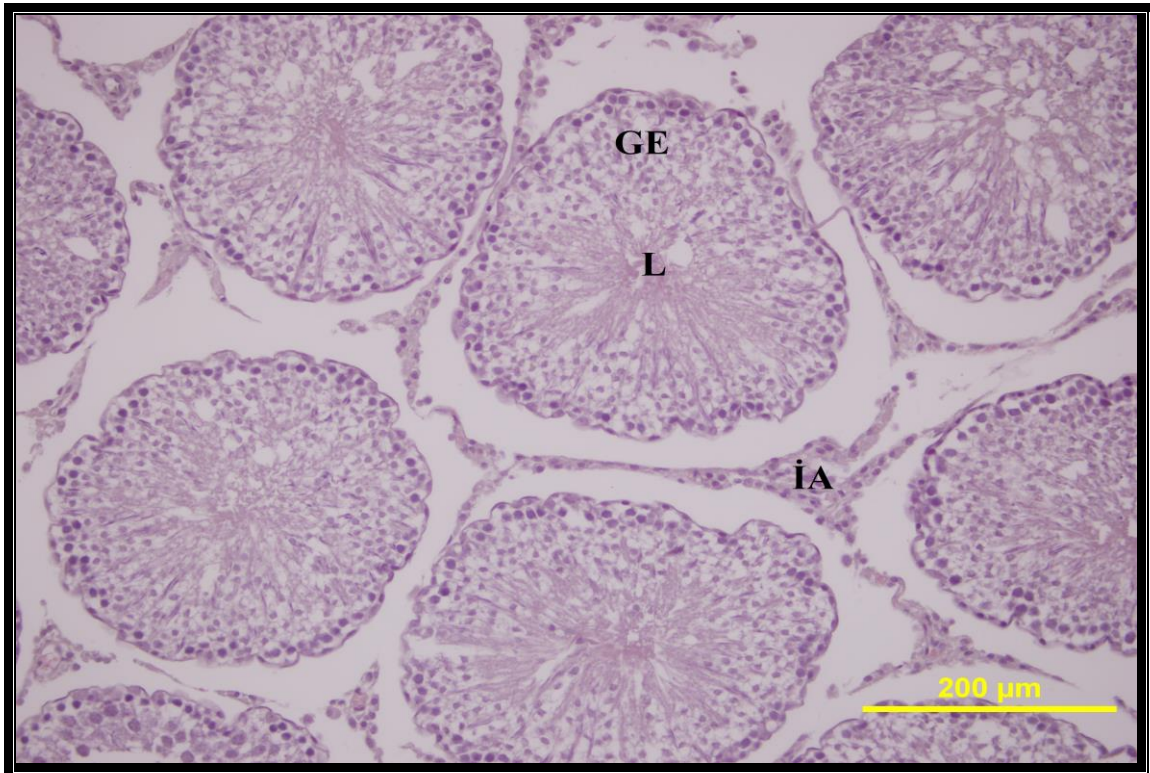
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubuna (Grup 1) ait testis dokusunun ışık mikroskopik incelemesinde Hematoksilin eosin (HE) ile boyalı kesitlerde tunika albuginea, seminifer tübül kontürleri, interstisyel alandaki (bağ dokusu) leydig hücreleri ve seminifer tübüldeki germinal epitel hücreleri normal olarak gözlemlendi. Seminifer tübül içerisinde yer alan germinal epitele ait spermatogenik hücre serilerinin yerleşimi bazal membrandan lümeneye doğru normal bir şekilde gözlemlendi (Şekil 4.1). EA 40 (Grup 2) uygulanan sıçanların testis dokularında da kontrol grubuna benzer histolojik bulgulara rastlandı (Şekil 4.2). EA 80 (Grup 3) uygulanan sıçanların testis dokularında germinal epitele ait hücre serilerinde düzensizlikle birlikte vakuol oluşumu, seminifer tübüllerin kontürlerinde ve germinal epitelinde düzensizlik gözlemlendi (Şekil 4.3). MTX (Grup 4) uygulanan sıçanların testis dokularında, seminifer tübül lümeninde olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri gözlemlendi. Ayrıca seminifer tübül lümeninde spermatozoa azlığı, germinal epitelde ve seminifer tübül bazal membranında düzensizliklerle birlikte vakuol oluşumu, interstisyel alanda ödem gözlemlendi. Bazı alanlarda bazal membran kayıpları gözlemlendi. Kesitlerde tubuli seminiferi kontortillerin bazal membran bozulmaları ileri düzeyde gözlemlendi. Spermatogenik hücre serilerinde primer ve sekonder spermatositlerin hasar derecesi giderek artan şekilde gözlemlendi. Lümendeki hücrelerin çekirdekleri yer yer belirgin izlendi ancak kuyruk yapıları yoktu ve geniş vakuoller vardı. İnterstisyel alandaki leydig hücreleri kısmen hasarlanmış olarak izlendi.

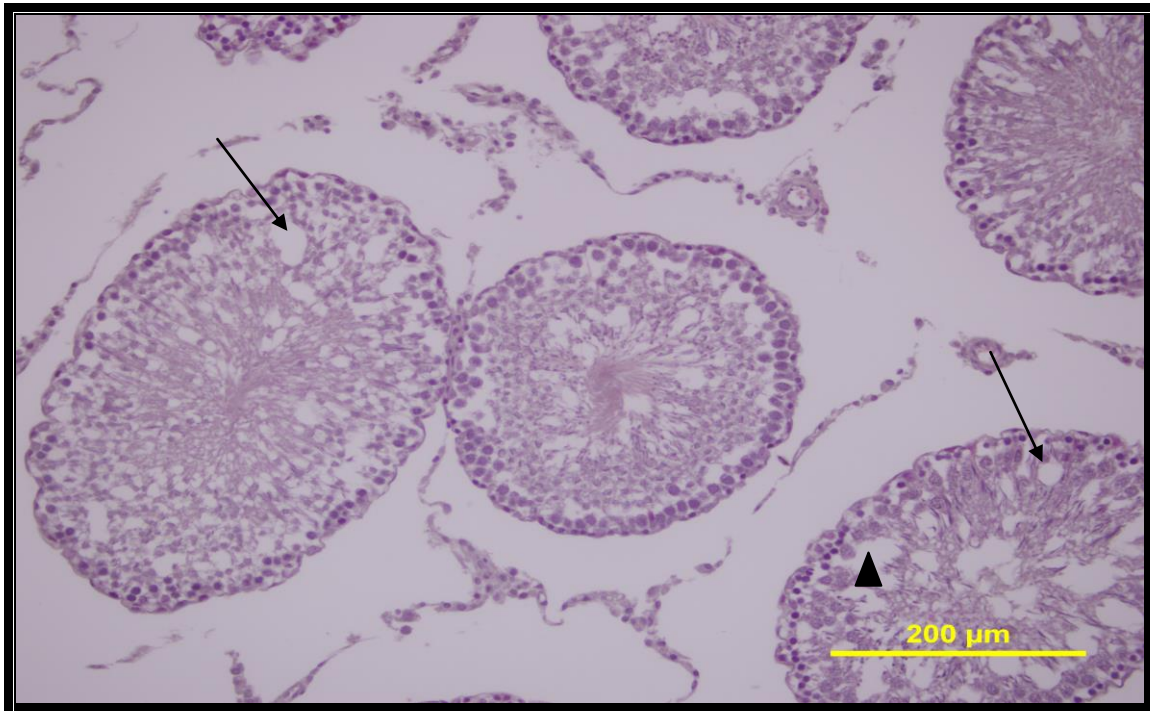
Spermatogonyum A ve B hücreleri ile spermatid ve spermatozoon hücreleri birbirlerinden ayırt edilemiyordu. Spermatid seri hücrelerine ait olması gereken hücre safhalarında interstisyel ödem ve hücrel boşluklar gözlemlendi (Şekil 4.4, Şekil 4.5). MTX 20+EA 40 (Grup 5) uygulanan sıçanların testis dokuları Grup 2 ile benzerlik göstermektedir. Az da olsa lümene doğru spermatojenik hücre serilerinde kayıplar izlenmekle birlikte lümende spermatoza yoğunluğu gözlemlendi. (Şekil 4.6). MTX+EA 80 (Grup 6) uygulanan sıçanların testis dokusunda germinal epitele ait spermatojenik hücre serilerinde bozulmalar ve yer yer vakuol oluşumu, hücre lümeninde dökülmelerle birlikte spermatozoa azlığı gözlemlendi. (Şekil 4.7).



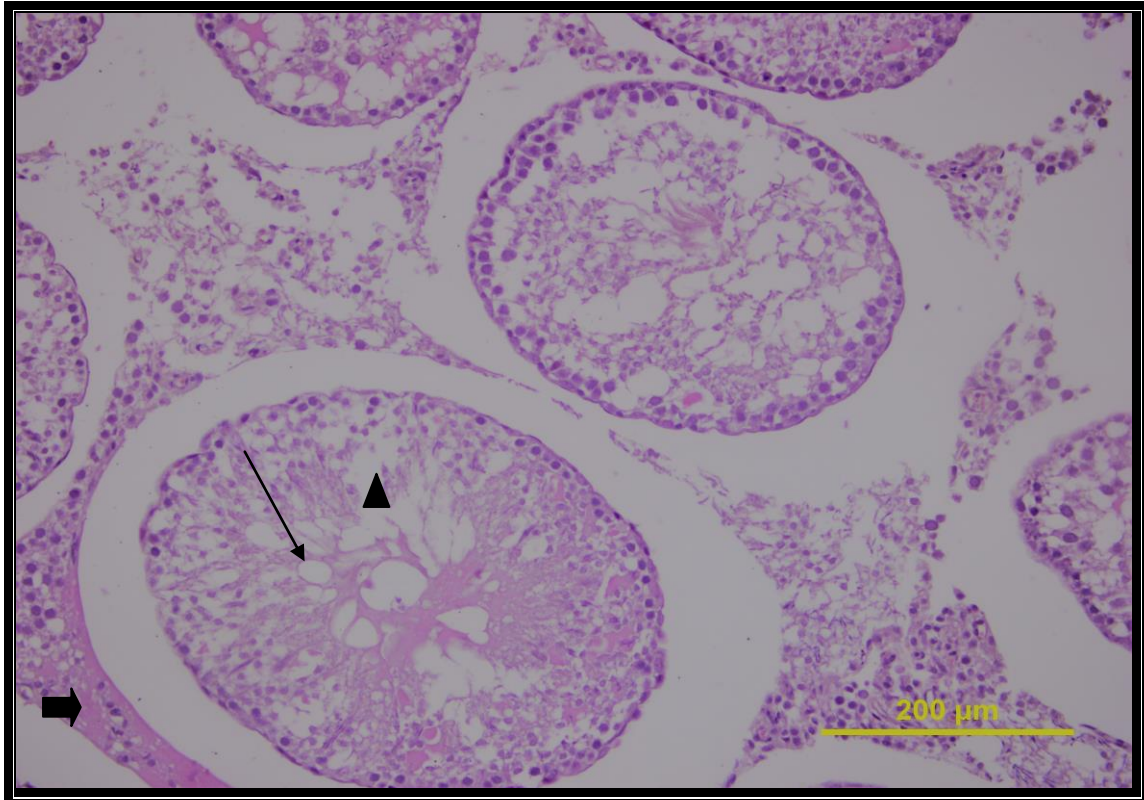
Şekil 4.1: Kontrol grubuna (Grup 1) ait sıçan testis dokusu. Seminifer tübüllerdeki germinal epitel (GE) normal olarak gözlenmektedir. Lümen (L), interstisyel alandaki Leydig hücreleri (İA) (H& E) X20.



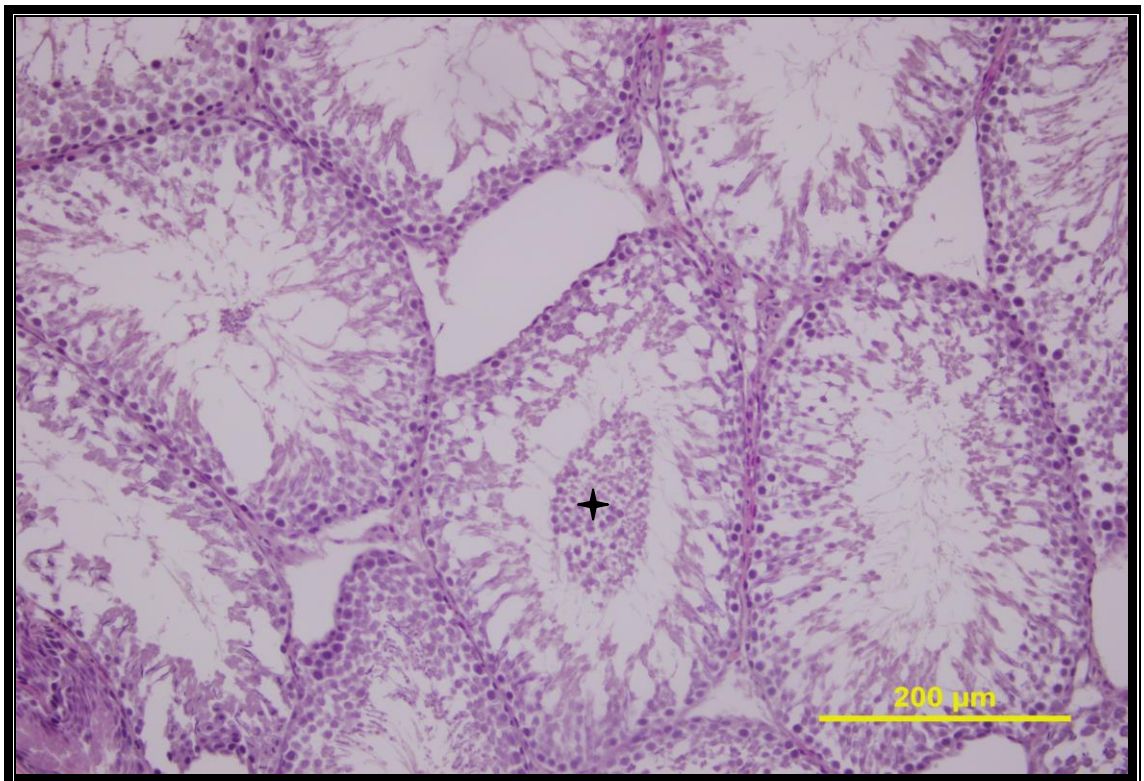
Şekil 4.2: EA 40 (Grup 2) uygulanan sıçan testis dokusu. Seminifer tübüllerdeki germinal epitel (GE) normal olarak gözlenmektedir. Lümen (L), interstisyel alandaki Leydig hücreleri (İA) (H& E) X20.



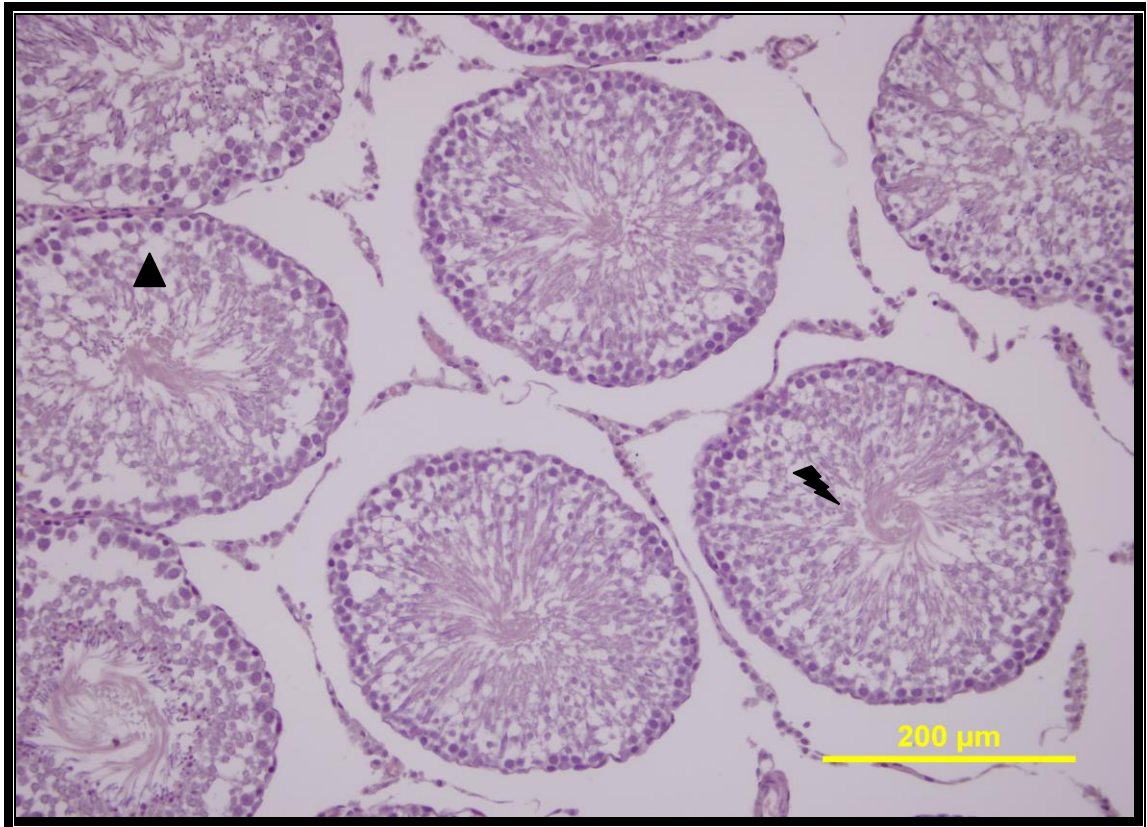
Şekil 4.3: EA 80 (Grup 3) verilen sıçanlara ait testis dokusu. Germinal epitele ait hücre serilerinde düzensizlikler(▲) ve vakuol (↘) mevcut (H&E) X20.



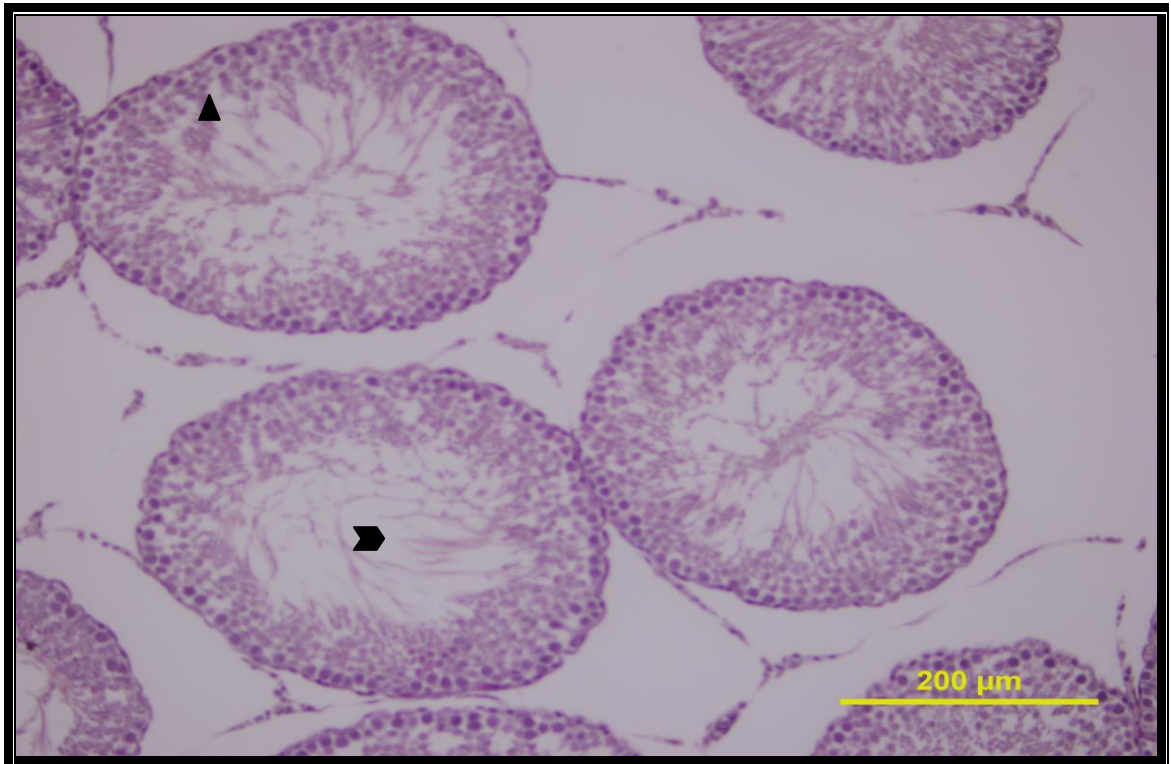
Şekil 4.4: Sadece MTX (Grup 4) uygulanan sıçan testis dokusu. Germinal epitele ait hücre serilerinde düzensizlikler (▲), geniş vakuoller (▼) ve interstisiyel alanda ödem (■) mevcut (H&E) X20.



Şekil 4.5: Sadece MTX (Grup 4) uygulanan sıçan testis dokusu. Lümeninde olgunlaşmamış germinal epiteli hücreleri (✦) (H&E) X20.



Şekil 4.6: MTX+EA 40 (Grup 5) uygulanan sıçan testis dokusu. Germinal epitele ait hücre serilerinde düzensizlikler (▲) ve lümende spermatozoa yoğunluğu (⚡) (H&E) X20.



Şekil 4.7: MTX+EA 80 (Grup 6) uygulanan sıçan testis dokusu. Germinal epitele ait hücre serilerinde düzensizlikler (▲) ve lümende spermatozoa azlığı (➡) (H&E) X20.

4.2. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru Sonuçları

JTBS sonuçları Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. Seminifer tübüllerdeki germinal epitelin değerlendirildiği JTBS sonuçlarına göre MTX uygulanan grupta biyopsi skoru kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış olarak belirlendi ($p<0,001$). MTX+EA 40 ve MTX+EA 80 gruplarındaki biyopsi skoru sadece kontrol grubuna göre sayısal olarak azalma göstermiştir ve azalış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). Ancak bu azalma MTX grubunda olduğu kadar olmasa da istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$).

Tablo 4.1: JTBS sonuçları. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir

	Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru
Grup 1 (n=8)	(9 $\pm$ 1.12)
Grup 2 (n=8)	(9 $\pm$ 0.65)
Grup 3 (n=8)	(9 $\pm$ 0.82)
Grup 4 (n=8)	(5 $\pm$ 1.87)*
Grup 5 (n=8)	(7 $\pm$ 1.58)*
Grup 6 (n=8)	(8 $\pm$ 1.95)
p değeri	<0,001

* Grup 1 ile karşılaştırıldığında $p<0,001$

4.3. Apoptotik Bulgular

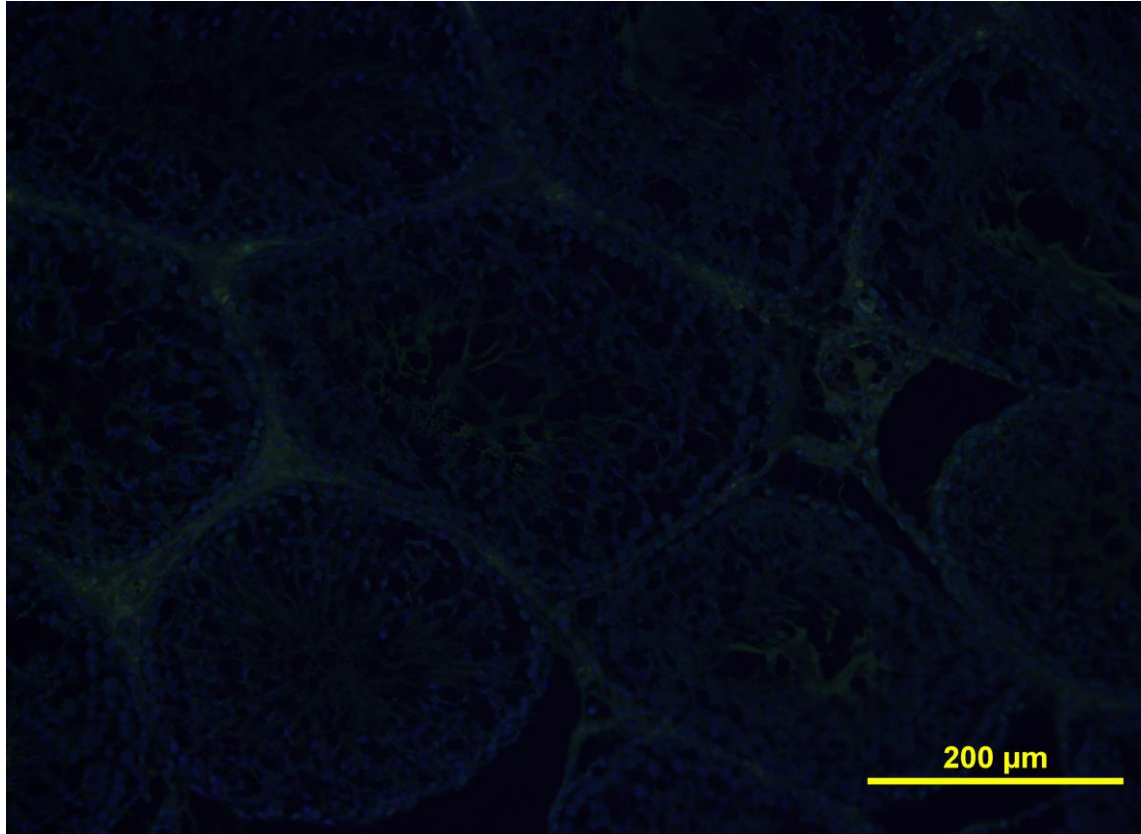
Çalışmamızda apoptotik bulguları belirlemek için TUNEL metodu kullanıldı. Apoptotik hücreler genel olarak testiste seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücrelerde gözlemlendi. MTX uygulanan Grup 4'teki apoptotik hücre sayısı kontrol grubuna göre artış gösterdi. Koruyucu amaçla verilen EA'nın; MTX+EA 80 (Grup 6) uygulamasında ise hem kontrol hem de sadece MTX uygulanan gruplara göre anlamlı bir şekilde artış gözlemlendi. Buna karşın MTX+EA 40 (Grup5) uygulanan gruptaki apoptotik hücre sayısı Grup 6'ya göre anlamlı bir şekilde azalmıştır.

Tablo 4.2: Apoptoz sonuçları. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir

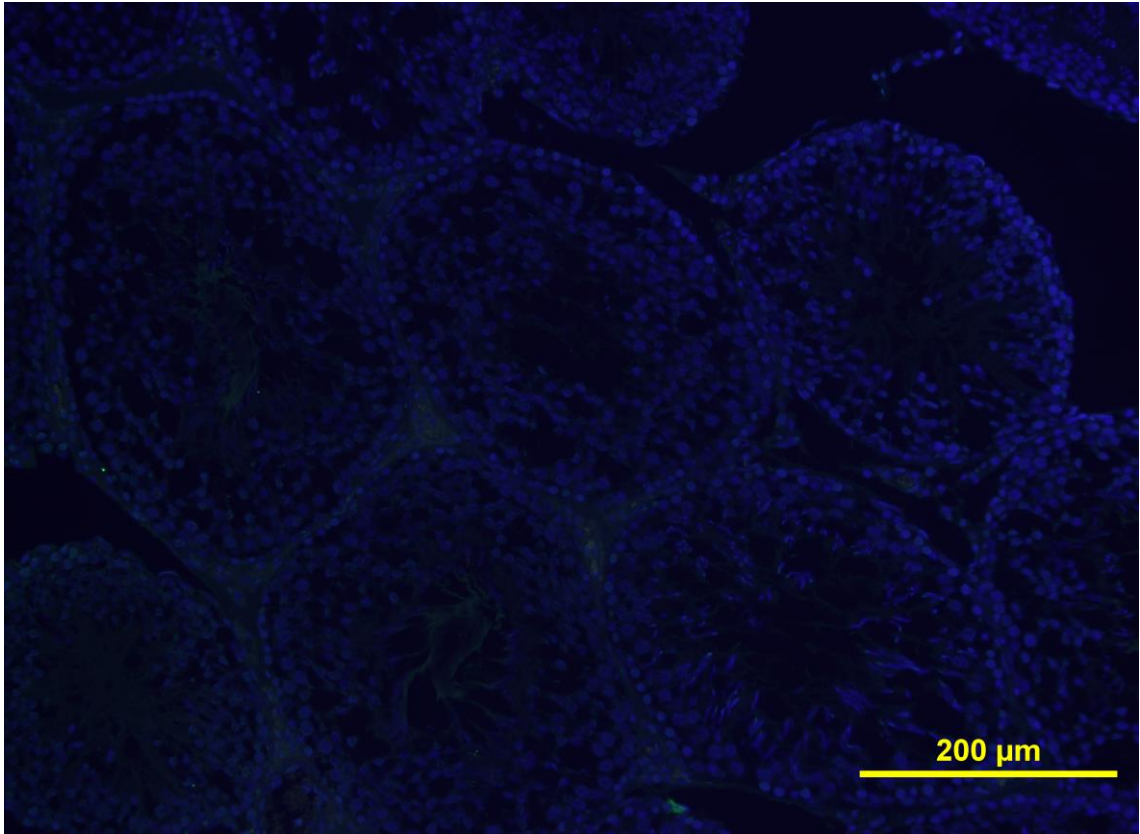
	Apoptoz
Grup 1 (n=8)	(0 $\pm$ 1.22)
Grup 2 (n=8)	(0 $\pm$ 1.06)
Grup 3 (n=8)	(1 $\pm$ 1.54)
Grup 4 (n=8)	(2 $\pm$ 1.82)*
Grup 5 (n=8)	(1 $\pm$ 1.48)
Grup 6 (n=8)	(3 $\pm$ 1.90)**
p değeri	<0,001

* Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

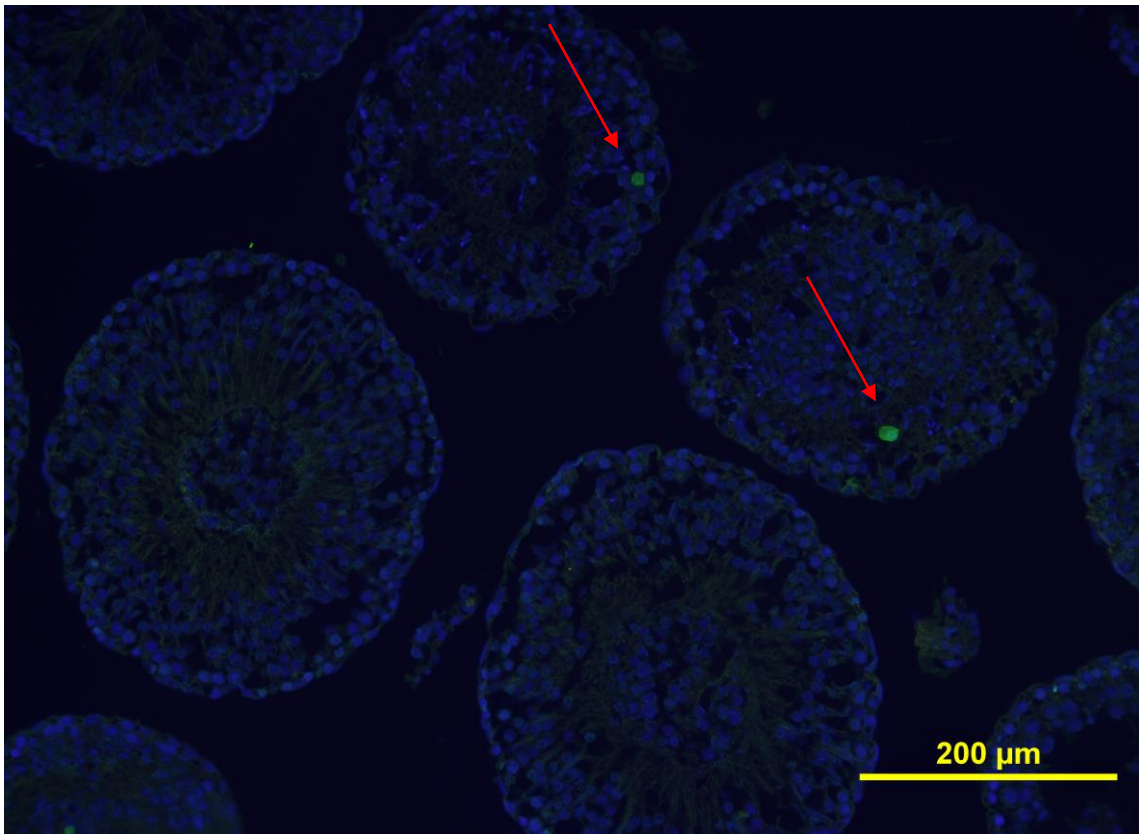
** MTX grubuyla karşılaştırıldığında



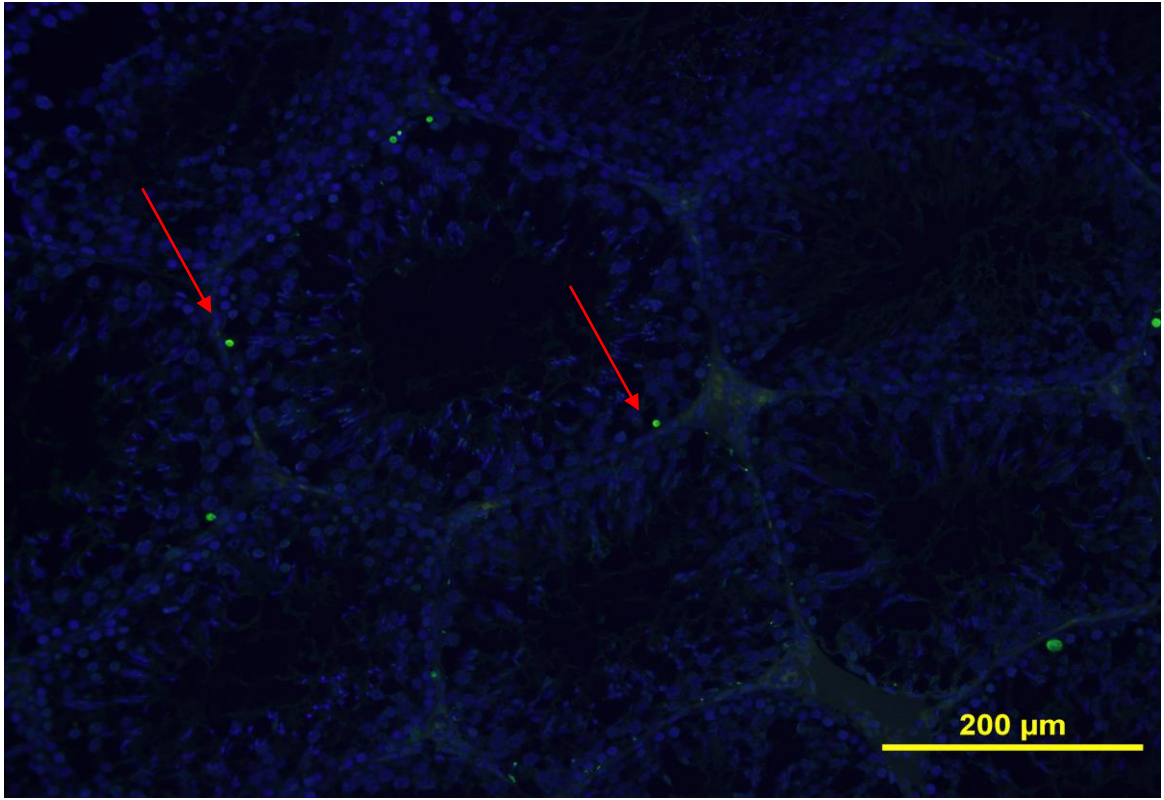
Şekil 4.8: Grup1'e ait testis dokusunda TUNEL boyamasında normal hücreler gözlemlendi (X20).



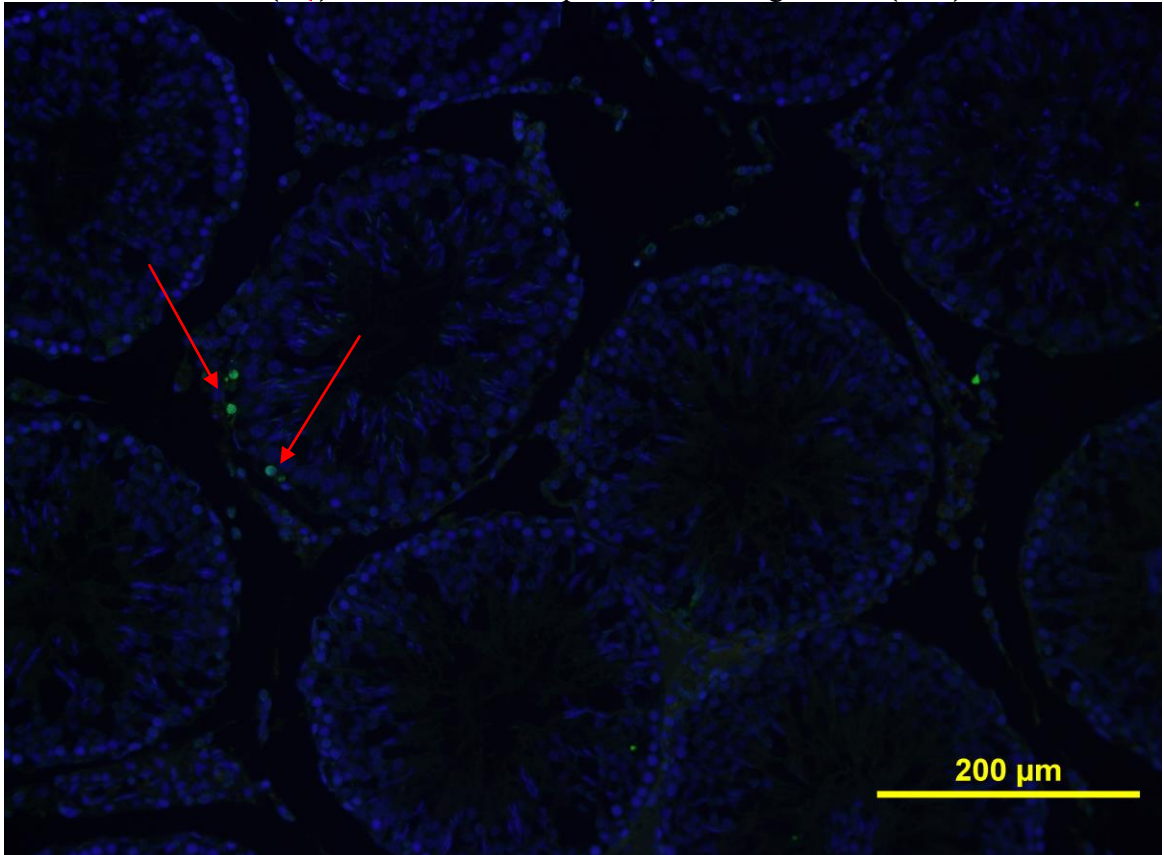
Şekil 4.9: Grup 2'ye ait testis dokusunda TUNEL boyamasında normal hücreler gözlemlendi (X20).



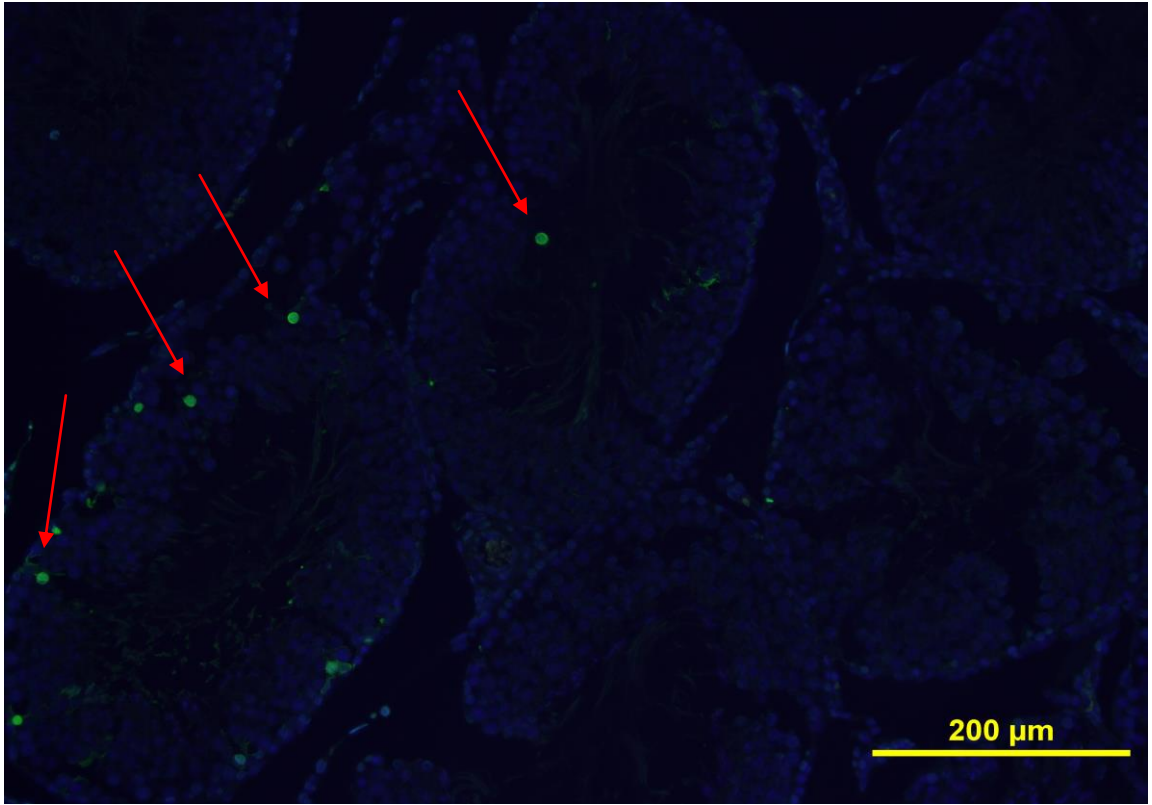
Şekil 4.10: Grup 3'e ait testis dokusunda TUNEL boyama yöntemi. Tünel pozitif hücreler (↘) seminiifer tübül epiteli içerisinde gözlemlendi (X20).



Şekil 4.11: Grup 4'e ait testis dokusunda TUNEL boyama yöntemi. Tunel pozitif hücreler (↘) seminifer tübül epiteli içerisinde görüldü (X20).



Şekil 4.12: Grup 5'e ait testis dokusunda TUNEL boyama yöntemi. Tunel pozitif hücreler (↘) seminifer tübül epiteli içerisinde görüldü (X20).



Şekil 4.13: Grup 6'ya ait testis dokusunda TUNEL boyama. Tunel pozitif hücreler (↘)seminifer tübül epiteli içerisinde gözlendi (X20).

4.4. Biyokimyasal Bulgular

Gruplar arası değerlendirme MDA düzeyleri ve CAT ve SOD enzim aktiviteleri testis dokusunda değerlendirilmiştir. CAT için yapılan analizler değerlendirildiğinde yalnızca MTX ve MTX+EA 80 uygulanan gruplar kontrol grubuyla aynı düzeyde olduğu MTX+EA 40 uygulanan grubun ise diğer gruplara göre nispeten daha düşük düzeyde olduğu tespit edildi. Ancak bu durum antioksidan aktivitesinin varlığını tam olarak göstermemektedir. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi ($p>0,05$). SOD için yapılan analizler değerlendirildiğinde yalnızca MTX uygulanan grup, kontrol grubuna göre düşük olup MTX+EA 40 ve MTX+EA 80 uygulanan gruplara göre yüksek bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi ($p>0,05$). MDA için yapılan analizler değerlendirildiğinde yalnızca MTX uygulanan grup kontrol grubuna göre düşük, MTX+EA 40 ve MTX+EA 80 uygulanan gruplara göre yüksek bulundu. Bu değerler de istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p>0,05$). Bu durum bize EA uygulamasıyla lipid peroksidasyon seviyesinin azaldığını yani antioksidan aktivitenin az da olsa arttığını göstermektedir. Biyokimyasal verilerin değerlendirilmesi, gruplara göre doku biyokimyasal sonuçları Tablo 4.3.'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Doku örneklerinde ortalama Katalaz (CAT), Süperoksit dismutaz (SOD), Malondialdehit (MDA) ölçümleri

	CAT	SOD	MDA
Grup 1 (n=8)	(10 ± 2)	(0.79±0.17)	(0.53±0.16)
Grup 2 (n=8)	(9 ± 3)	(0.59 ±0.11)	(0.48±0.14)
Grup 3 (n=8)	(8 ± 2)	(0.58±0.24)	(0.45±0.13)
Grup 4 (n=8)	(10 ± 1)	(0.8±0.66)	(0.44±0.07)
Grup 5 (n=8)	(8 ± 2)	(0.64±0.09)	(0.32±0.14)
Grup 6 (n=8)	(10 ± 1)	(0.62±0.41)	(0.28±0.09)
p değeri	>0,05	>0,05	>0,05

Tabloda CAT, SOD ve MDA değerleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

MTX, 2,4-diamino-N10-methyl propylglutamic acid kimyasal yapısını gösteren, çok sayıda hematolojik rahatsızlıklar ile romatoid artrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan birisidir. Bunların dışında meme kanseri, akut lenfoblastik lösemi (ALL), osteojenik sarkom, akciğer kanseri ve mesane kanserinin tedavilerinde de kullanılmaktadır. Hücre bölünmesini inhibe etmesinden dolayı kanser tedavisinde uzun zamandan beri kullanılan bu ilacın, oral ve intravenöz uygulamalarında, santral sinir sistemi dışındaki dokulardaki dağılımı iyidir (72).

MTX' in hem tedavideki etkinliği hem de toksik etkileri hastadan hastaya değişkenlik gösterebilmektedir (73). Bu sebeple diğer antineoplastik ilaçlardan farklı olarak MTX geniş bir doz aralığında kullanılmaktadır. Akut lenfoblastik lösemnin sürekli tedavisinde ve romatoid artrit, psöriazis gibi hastalıkların tedavisinde haftada 20 mg/m² dozda kullanılırken, onkolojik hastalıklarda 1000-33000 mg/m² gibi yüksek dozlarda uygulanmaktadır (72).

MTX'in hücrelerdeki toksik etkisini folinik asid (N5-formiltetrahidrofolat) antagonize etmektedir. Sulfonamidler ve salisilatlar, bu ilaç ile birlikte verilirse MTX'in bağlanma oranı azalır ve toksisitesi artabilir. MTX tümör hücrelerinde uzunca bir süre bağlı kalır. İstirahat halindeki hücrelerde MTX gibi antimetabolitlerin sitotoksik etkisi olmaz ancak hücre içerisinde uzun süre kalan MTX'in gizli (latent) sitotoksik etkisi, hücre bölünmeye girdiği zaman belirgin hale gelir ve hücreyi öldürür. Standart dozda kan-beyin bariyerini geçemez ve tedavide kullanılan konsantrasyonlara ulaşamaz. Yüksek doz uygulamalarında ise BOS'ta terapötik konsantrasyonlara ulaşır. Böbrek yolu ile atılır ve emildiğinde yarılanma ömrü 8 saattir (28).

MTX'in toksisitesi nefrotik, hematolojik ve merkezi sinir sistemi gibi çeşitli organlarda bildirilmesine rağmen gonad hasarı daha yaygın gözlemlenmiştir. Antikanser ajanların potansiyel yan etkileri zıt etkilerinden daha az araştırılmıştır; çünkü hayati tehlikesi olmayan semptomlar gonadların hasarından daha önceliklidir (74). Yapılan çalışmalar hem radyoterapi hem de kemoterapiden sonra gonadlarda önemli morfolojik değişikliklerin olduğunu göstermiştir. Fakat MTX' in gonadlar üzerindeki etkisine dair çok az çalışma vardır (6).

Bazı hipotezler, MTX etkilerinin oksidatif stresle ilişkili olduğunu öne sürmektedirler. Birçok çalışma MTX uygulanan insan ve hayvanlarda ROS' un uyardığı doku hasarının doğurganlığın patofizyolojisinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir; muhtemelen ROS üretimi DNA'yla ilişkili bazı enzimlerin engellenmesini artırır (75).

Yuluğ ve arkadaşlarının (76) yaptıkları çalışmada 30 mg/kg intraperitoneal 7. günde tek doz verilen MTX uygulamışlardır. MTX grubunda plazma ve doku MDA seviyelerini anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. SOD ve CAT aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulmuşlardır. MTX grubunda JTBS değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Histopatolojik olarak MTX grubunda yaygın spermatozoa kaybının yanı sıra seminifer tübül lümenlerinde olgunlaşmamış germinal epitel hücrelerini gözlemlemişlerdir. Yine bir başka çalışmada (77) sıçan testislerine 25 µg ve 50 µg 60 gün boyunca MTX intraperitoneal uygulamasında seminifer tübül çapında ve interstisyel boşluklarda azalma gözlemlemişlerdir. Leydig hücrelerinin morfolojisinde istatistiksel olarak anlamlı bozulmalar bulmuşlardır ($p<0.05$). Najafi ve arkadaşları (78) yaptıkları çalışmada intraperitoneal tek doz 20 mg/kg MTX uygulamasında; MDA ve CAT değerlerinde anlamlı olarak ($p<0.05$) artışa neden olduğunu göstermişlerdir.

Bükücü ve arkadaşları (79) yaptıkları çalışmada sıçan testisinde 3. gün intraperitoneal olarak tek doz 20 mg/kg dozunda MTX uygulamasından bir hafta sonra (10.gün) tek doz şeklinde tekrarlamışlardır. Histopatolojik olarak MTX'in belirgin bir hasara yol açtığını ($p<0,0001$) gözlemlemişlerdir. MTX verdikleri grubun MDA değerleri diğer tüm gruplardan anlamlı derecede yüksek olduğunu ($p<0,001$), SOD değerlerinin diğer gruplardakinden anlamlı derecede daha düşük ($p<0,001$) olduğunu gözlemlediler.

Düşük dozlarda ve uzun süreli yapılan bir çalışmada (6) testis dokusuna 0.7 mg/kg MTX 6 hafta boyunca haftada bir kez intravenöz uygulamışlar. Histopatolojik olarak tubuli seminiferi duvarlarında ve bazal membranlarında kalınlaşma, germ hücrelerinde maturasyon bozukluğu gözlemlenmiştir. Spermatojenik hücre serilerinde bozulma, lümende spermatozoon azlığı veya yokluğu gözlemlenmiştir. Süreye bağlı olarak ilaçtan en çok spermatositlerin ve spermatidlerin etkilendiğini, spermatogonyumların ise ilaçtan daha az etkilendiğini gözlemlenmiştir. Spermatozoonlarda sayıca azalma ve lümene verilmiş bozukluğuna bağlı olarak spermatozoonların derinlerde yerleşimi dikkatlerini çekmiştir. Sertoli hücre sitoplazmalarında yağ birikimi, interstisiyel dokuda ödem ve makrofajlarda artış gözlemlenmiştir. JTBS uygulamasında ise MTX uygulanan gruplarda skorlama puanını düşük olarak gözlemlenmiştir. Koehler ve arkadaşları (80) 6 mg/kg, 14 hafta boyunca haftada bir kez intravenöz MTX uyguladıkları tavşan testisinde çalışmışlardır. Histopatolojik olarak spermatogonyum sayısında azalma, tübüler membranda birkaç tübülde kalınlaşma ve sitoplazmada şişme gözlemlenmiştir.

Padmanabhan ve arkadaşları (81) tek doz 20 mg / kg MTX uygulayarak farelerde bir çalışma yapmışlardır. Sonuç olarak sperm başı anomalileri, seminifer tübül hasarı, sperm DNA hasarı TUNEL pozitif hücreler ve germ hücresi toksisitesinin olduğunu gözlemlenmiştir. Gökçe ve arkadaşları (47) yaptıkları çalışmada 20 mg/kg MTX tek doz intraperitoneal olarak verdikleri fare testislerinde MTX 'in tek başına toplam antioksidan kapasitesini ve miyeloperoksidaz aktivitesini kontrollerden daha fazla arttırdığını gözlemlenmiştir. Yine ışık mikroskopik incelemelerde interstisyel alan dilatasyonu, ödem, seminifer epitelin şiddetli parçalanması ve seminifer tübüllerin çapının azalmasıyla sonuçlandığını gözlemlenmiştir.

Testis dışındaki dokularda yapılan çalışmaların sonuçlarına bakacak olursak; araştırmacılar sıçan akciğerinde 5mg/kg 5 gün intraperitoneal (82) , böbrek dokusunda tek doz 20 mg/kg uygulamalarında (83,84), karaciğer 20 mg/kg tek doz intraperitoneal (85) MTX uygulamışlardır. MDA düzeylerinde artış, SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde azalma sonucuna ulaşmışlardır. Tunel pozitif apoptotik hücre ve histopatolojik olarak dejenerasyonlar gözlemlenmiştir.

Bizim çalışmamızda da tek doz intraperitoneal MTX (20 mg/kg) uygulanması sıçan testislerinde önemli ölçüde hasar oluşturmuştur. Bu hasar çoğunlukla spermatojenik seri

hücrelerinde dağılma, seri hücrelerinin sıralarında bozulma, bazal membranlarda kayıp ve lümene yakın alanlarda ise spermatozoon azlığı veya yoğunluğu gözlemlendi. Spermatojenik seri hücrelerinin olması gereken sıraları ayırt edilemiyordu. Histopatolojik değerlendirmelere göre spermatojenik hücre serilerinde primer ve sekonder spermatositlerin hasar derecesi giderek artan şekilde gözlemlendi. Seminifer tübül lümenindeki hücreler çekirdekli ancak kuyruk kaybına uğramıştı. İnterstisyel alandaki Leydig hücreleri de kısmen hasarlanmıştı ve ödem oluşumu mevcuttu. Spermatojenik seri hücrelerinin olması gereken sıraları ayırt edilemiyordu. Spermatid seri hücrelerinin olması gereken alanlarda vakuolizasyon izlendi. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar, benzer çalışmalarda sıçan testis dokusunda MTX'in oluşturduğu hasarlar ile benzerlik göstermektedir. JTBS ölçümleri seminifer tübüllerde MTX'in anlamlı şekilde hasara sebep olabileceğini düşündürdü. Biyokimyasal parametrelerden SOD ve CAT değerlerinin anlamlı bir sonuç göstermediğini ancak MDA değerinde MTX verilen grup 4 değerinin grup 5 ve özellikle grup 6 ya kıyasla yüksek olması nedeniyle anlamlı olarak değerlendirildi. SOD ve CAT değerlerinin anlamlı bulunmamasındaki nedenin ise yaptığımız çalışmada grup 6 (MTX+EA 80) hayvanlarına MTX verildikten sonraki deneyin 6. günü ölümle sonuçlanan kayıplar başlamış olmasıdır. Yedinci günde hayvanların kilolarında 50-60 gr kadar azalma, genital bölgelerinde şişkinlik ve ishal başlamış olup; 12. günde grupta 4 hayvanın kalması nedeniyle kurban edilmişlerdir. Apoptotik bulgularımız ise grup 4 kontrol grubuna göre artış göstermiş , grup 6 ise grup 4 'e göre artış göstermiştir. Bu durum bize oksidatif stres sonucu ortaya çıkan serbestoksijen radikallerinin birçok hastalığın oluşumuna neden olduğunu göstermiştir. Antioksidanlar canlı hücrede okside olabilecek protein, DNA, karbonhidrat ve lipid gibi maddelerin oksidasyonunu geciktirmektedir veya önlemektedir. Ancak vücuttaki antioksidan seviyesi yeterli olmadığı zaman bu dengeyi sağlamak için dışarıdan takviye alınabileceği gösterilmiştir. Ancak çalışmamızdaki grup 6'da oluşan apoptotik hücreler; MDA seviyesi ve histopatolojik görüntüler bizlere bu dozun grup 3' te verildiği gibi tek başına anlamlı olarak antioksidan enzim seviyesini artırıcı etki göstermediğini hatta verilen bu dozun ölümcül ve hipoksik doz olabileceği kanısını uyandırdı.

Antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik olarak incelenmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD) katalaz (CAT) glutatyon peroksidaz (GSH-Px) birinci derece enzimatlere, glutatyon redüktaz (GR) ve glukoz 6- fosfat dehidrojenaz (G6PD) ikinci

derece enzimatlere örnek gösterilmektedir. Non-enzimatik olanlar; mineral, vitamin, karotenoidler, organosülfür bileşikler, düşük moleköl ağırlıklı antioksidanlar, antioksidan ko-faktörler ve polifenoller şeklinde incelenirler (86).

Kanser başlangıcında; radyasyon, tetraklorodibenzodioksin (TCDD), benzen türevleri, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) ve aroklor gibi bazı kimyasallar ve yetersiz antioksidan tüketimi başlı başına önemli unsurlardandır. Yeterli düzeyde ve devamlı bitkisel antioksidan (karotenoid, vitamin C, folik asit, retinol) tüketimi oksidatif stresi DNA hasarını engellerken, gelişmiş hasarlı hücrelerin büyümelerini, tümoral yapının ilerlemesini ve metastazını da engellemektedirler (86).

EA, bitkilerde fenol yapısında doğal olarak bulunur ve antimutajenik, antikanserojenik aktivitesi gösteren bir maddedir (48). EA ahududu, çilek, nar gibi üzüksü meyveler ile ceviz, kestane, fındık gibi kabuklu meyvelerin yapısında yer alır (49). Meyve ve sebzeler içerisinde, en fazla kırmızı (*Rubus ideaus*) ve siyah (*Rubus occidentalis*) ahududularda bulunan EA, vücudumuzda kansere sebep olan kimyasalları inaktif hale getirerek antikanserojen bir etki göstermekte birlikte yaşlanmayı geciktirici etkisi vardır (50,51). Özellikle kırmızı ahududular ile yapılan çalışmalarda elde edilen EA' nın, bazı kanser türlerinde kanserli hücrelerin gelişimini engellediği gösterilmiştir (8).

Türk ve arkadaşları (87) yaptıkları çalışmada EA 2 mg/kg 8 hafta boyunca gavaj olarak uygulamışlardır. Araştırmacılar siklofosamid (CP) epididimal sperm konsantrasyonunda ve sperm motilitesinde belirgin azalmalar ve MDA düzeylerinde belirgin artışlar gösterdiğini ileri sürmektedirler. Sonuç olarak, CP ile indüklenen lipid peroksidasyonu sıçanların spermatojenik hücrelerinde yapısal ve işlevsel hasara ve apoptozise neden olmakla birlikte; Likopen (LC) ve EA'nın bu zararlı etkilerin gelişimine karşı koruma sağladığını gözlemlemişlerdir.

Al-kharusi ve arkadaşları (88) sisplatin (CCDP) ile indüklenen sıçan böbreklerinde EA' i 10 ve 30 mg/kg artan doz şeklinde oral yolla 9 gün uygulamışlardır. Histopatolojik olarak CCDP ile 10 mg/kg verilen grupta % 60' dan fazla tübüler nekroz izlenmişken CCDP ile 30 mg/kg verilen grupta bir kaç adet akut tübüler nekroz izlenmiş olup TUNEL boyamada apoptotik hücrelerde belirgin azalma gözlemlemişlerdir. Bir başka çalışmada (89) yine artan dozlarının sonuçlarını gözlemek için EA; 10, 25 ve 50 mg/kg dozlarını oral yolla vermişlerdir. 10 ve 25 mg/kg EA dozlarında kısmi koruma,

50 mg/kg EA dozunda ise tam koruma sağlanıp spermatozoal hasarı önlediğini gözlemlemişlerdir.

Yüce ve arkadaşları (90) yaptıkları çalışmada siklosporin A'nın oluşturduğu hasara karşı EA'ı 10 mg/kg oral yolla sıçanlarda uygulamışlardır. Histopatolojik olarak her üç dokuda da EA ile kombine verilen tüm gruplarda normal morfolojik bulgular, CAT değerinde yükselme gözlemlemişlerdir.

Yılmaz ve arkadaşları (91) akut pankreatitli sıçanlarda yaptıkları çalışmada L-arginin ile indüklenen akut pankreatitte EA'nın tedavi edici etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada EA 85 mg/kg oral yoldan uygulanıp 24 saat sonra denekler sakrifiye edilmiştir. Diğer gruba da aynı dozda EA+L-arginin uygulamasından sonra aynı işlemleri tekrarlamışlardır. Histopatolojik olarak ödem, kanama, şiddetli asiner nekroz, pankreatit derecesinde artış gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak EA'nın iltihaplanmayı azalttığı ve pankreatitte oksidatif stresi azaltarak belirgin düzelmelere neden olduğunu gözlemlemişlerdir.

Özkaya ve arkadaşları (92) yaptıkları çalışmada EA'ı 12 mg/kg uygulayarak oksidatif strese maruz kalan sıçanlarda biyokimyasal parametreler üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak incelenen bütün dokulardaki MDA değerleri H₂O₂ ve AlCl₃ gruplarında yüksek çıkmış, bu maddelerin radikal etki göstererek oksidatif stresi artırdığına delil teşkil ettiğini düşünmüşlerdir. Ellagik asit (EA) ve Hesperetin verilen tüm gruplarda serum, karaciğer ve beyin dokularında CAT enzim düzeylerinin kontrol grubuna göre oldukça yüksek çıktığını saptamışlardır. Bu sonuçlardan EA ve Hesperetin'in CAT enzim aktivitesini arttırdığını gözlemlemişlerdir.

T.Abas ve arkadaşları (93) sıçan böbreklerinde yaptıkları çalışmada deneyin 15. gününden sonra 8 hafta boyunca 25 mg/kg düzeyinde oral yolla NDEA (N-nitrozodietilamin) uygulamışlardır. EA grubunun MDA düzeylerinin, kontrol grubuna göre önemli derecede düşük çıktığını gözlemlemişlerdir (p=0,009). NDEA (N-nitrozodietilamin)+EA grubu, kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde düşük gözlemlemişlerdir (P=0,048). NDEA ve EA gruplarının CAT aktiviteleri, kontrol grubuna göre anlamsız düzeyde yüksek çıktığını göstermişlerdir (p=0,347), (p=0,602). EA+NDEA grubunun CAT aktiviteleri, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek çıktığını göstermişlerdir (p=0,027).

Bizim yaptığımız çalışmada grup 5 ve grup 6' da MDA değerinde MTX grubuna oranla anlamlı olarak düşük olduğunu gözlemledik. SOD ve CAT değerlerine baktığımızda anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Yine histopatolojik incelemelerimizde ise grup 5 te grup 4 e göre vakualizasyonun, spermatik hücre serisindeki düzensizliklerin ve bazal membrandaki düzensizliklerin azaldığını, apoptotik hücre sayısında azalmayı gözlemledik. Grup 6 da grup 4 e kıyasla MDA seviyesinin anlamlı derecede düşük olması bize EA'nın antioksidan aktivite gösterdiğini oksidatif stresi azalttığını göstermektedir. Ancak histopatolojik ve TUNEL metodu incelemelerinde ise grup 4' e kıyasla apoptotik hücre sayısında artış, spermatojenik hücre serisinde bozulmalar, vakulizasyon, spermatozoon azlığı ve hatta interstisiyel alanda ödem gözlemledik. Bu sonuçlara ilaveten MTX+EA80 grubuna ait sıçanların 6. gün itibari ile ölmeye başlaması, 7. gün itibari ile 50-60 gr kadar olan kilo kaybı bizlere antioksidan aktivitesinin gerçekleşmediğini göstermektedir. EA 80 mg/kg dozun hipoksik doz olduğu kanıtına varmış bulunmaktayız. EA'nın 60 mg/kg üzerindeki alımları organsal ve hücresel boyutta dejenerasyonlara neden olduğunu kanaatindeyiz.

Sonuç olarak MTX, birçok organı etkilediği gibi özellikle testisler üzerinde de anlamlı histopatolojik değişiklikler oluşturmaktadır. Ahududu, böğürtlen gibi meyvelerde bulunan EA'nın, MTX ile hasar oluşturulan testis dokusu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hasarı kısmen azaltarak koruyucu etki ortaya çıkarabildiğini söyleyebiliriz. MTX tedavisi almak zorunda kalan kişilere EA, besin takviyesi olarak önerilebilir ancak EA'nın doğru doz aralığında alınması gerekli olup yüksek dozlarının hipoksik etki yarattığını söyleyebiliriz.

6. KAYNAKLAR

1. Türk G, Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. Marmara Pharmaceutical Journal 2013; 17: 73-92.
2. Wright NA. Cell Proliferation in Carcinogenesis. In: The Cancer Handbook. Editor: MR Alison, Nature Publishing Group, London 2002: p114.
3. Atal S. Erişkin Erkek Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarında Kurkuminin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 2014; ss 35-40.
4. Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. Semin Arthritis Rheum 1998; 27: 277-292.
5. Sayılmaz A. Metotreksat (Mtx) Toksisitesinin Sıçan Testisinde Yarattığı Histolojik Değişimlere C Vitamininin Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya 2015; ss 30-35.
6. Işık A, Işılay L, Erdemli EA, Akbay C, Anafarta K. sıçan testisinde metotreksat'ın ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 1997; 3: 125-129.
7. Vardı N, Parlakpınar H, Ateş B, Otlı A. metotreksatın neden olduğu testiküler hasara karşı klorogenik asidin koruyucu etkileri. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences 2010, 30: 507-513.
8. Ekinci C. Elajik Asidin C6 Sıçan Glioma Hücre Kültürlerinde Sitotoksite ve Proliferasyon Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2009; ss 8-11.

9. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 2200-2206.
10. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 360-367.
11. Pehlivan M, Gülerüz M. Ahududu ve böğürtlenlerin insan sağlığı açısından önemi. *Bahçe* 2004; 33: 51-57.
12. Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1998; 38: 421-464.
13. Roberfroid MB. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective^{1,2,3}. *The American Journal Of Clinical Nutrition* 2000; 6: 1660-1664.
14. Glen A, Halvorson MD. Chemopreventive Properties of Phytochemical Ellagic Insurance Formula, Tuscon 2001; pp 15-37.
15. Kresty LA, Morse MA, Morgan C, P. Carlton S, Lu J, Gupta A, Blackwood M, Stone GD. Chemoprevention of Esophageal Tumorigenesis by Dietary Administration of Lyophilized Black Raspberries. *Cancer Research* 2001; 61: 6112-6119.
16. Nizamlioğlu M. Meyve sebzelerde bulunan fenolik bileşiklerin yapıları ve önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 2010; 5: 20-35.
17. Seyhan S. Türkiye’de Yetiştirilen Maviyemiş Türlerinde Ellajik Asit ve Resveratrol Miktarlarının Hplc Yöntemi İle Tayini, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul 2013.
18. Beslenme Desteği (2011). Erişim: [<http://www.beslenmedestegi.com/dogal-urun/ellagic-asit-nedir>], Erişim Tarihi:21 Ağustos 2017.
19. Sadler TW. Langman’s Medical Embryology (11 th ed). Çeviri: Basaklar AC. Bölüm: Ürogenital sistem. Kitap: Langman Medikal Embriyoloji. Türkçe 9.Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara 2010; ss 246-263.

20. Moore KL, Persaud Tvn. The Developing Human (10 th ed). Çeviri: Dalçık H. Kitap: Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Türkçe 10. Baskı. Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul 2016: ss 260-281.
21. Gökmen F. Sistematik Anatomi, İzmir Güven Kitabevi, İzmir, 2003; ss 549-554.
22. Sarsılmaz M. İnsan anatomisi (1.basım), Akademi Basın ve Yayıncılık, İstanbul, 2014; ss 589-591.
23. Aktümsek A. Anatomi ve Fizyoloji İnsan Biyolojisi, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2006; ss 90.
24. Arıncı K, Elhan A. Anatomi, Güneş Kitabevi, Ankara, 1997; ss 417-422.
25. Ross MH, Kaye GI. Histology (6 th ed). Çeviri: Baykal B. Kitap: Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Palme Yayıncılık, Ankara 2014; ss 784-816.
26. Junqueira LC, Carneiro J. Çeviri: Solakoğlu S, Aytekin Y. Kitap: Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2009; ss 418-434.
27. Gartner LP, Hiatt JL. Cell Biology and Histology (7 th ed). Çeviri: Hürdağ C. Kitap: Hücre Biyolojisi ve Histolojisi. İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul 2016; ss 350-362.
28. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji, İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık, İstanbul 2016; ss 333-353.
29. Dicle Üniversitesi (2017). Erişim: [<http://www.dicle.edu.tr/Contents/01baef8f-7b2e-4395-afc0-3132c45538c9.pdf>], Erişim Tarihi:21 Ağustos 2017.
30. Gartner LP. Color Text Book Histoloji (2 nd ed), W.B. Saunders Company, Pennsylvania 1997; pp 406-412.
31. Dökmeci İ. Farmakoloji İlaçlar ve Etkileri (1. Baskı), Alfa Yayınları, İstanbul 2007; ss 1254.
32. Kayaalp SO. Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Pelikan Yayıncılık, Ankara 2012; ss 347.
33. Oktar S, Gökçe A, Aydın M, Davarcı M, Meydan S, Öztürk OH. Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. Toxicology and industrial health 2010; 433-438.

34. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Methotrexate induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice. Intervention of folic and folinic acid, Mutation Research 2010; 673: ss 43–52.
35. Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology (9 nd ed), The McGraw- Hill Companies, Singapore 2004; pp 898- 931.
36. Aşçı H. Metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarında misoprostolün koruyucu etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2011; 2: 125-126.
37. Eray İC. Deneysel Kolit Modeli Üzerine Glutamin, N-Asetil Sistein Ve İntrarektal Metotreksat'ın Etkilerinin İncelenmesi, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana 2009; ss 24-31.
38. Sarıkaya M, Yıldırım M, Sarı F. Hemodiyaliz uygulanan hastalarda kemoterapi. Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2013; 4:1: 1-5.
39. Savran M. Ratlarda Metotreksat Kaynaklı Karaciğer Ve Böbrek Hasarında C Vitamininin Koruyucu Etkisinin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Isparta 2011; ss 4-18.
40. Karyağar EN. Uzun Süreli Metotreksat Tedavisi Alan Jüvenil İdiyopatik Artritli Çocuklarda Folik Asit Desteğinin Plazma Total Homosistein Düzeyine Etkisi, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı İstanbul Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul 2006; ss 21-35.
41. Masuzawa M, Nakao S, Miyamoto E, Yamada M, Murao K, Nishi K, Shingu K. Pentobarbital inhibits ketamine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens. Amicrodialysis study 2003; 96: 148 –52.
42. Acıpayam C. Metotreksat ile Barsak Epiteli Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Hesperidinin Koruyucu Etkisi, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana 2011; ss 3-25.
43. Mehdawi NAR. Curcumin Based Diazoles And Oxazoles With Potential Antibacterial Activities, An-Najah National University Faculty of Graduate Studies, Filistin, Nablus 2010.

44. Meistrich ML. Restoration of spermatogenesis by hormone treatment after cytotoxic therapy. *Acta Pzediatr Supply* 1999; 433: 19-22.
45. Kuzey GM. Temel Patoloji, Güneş Kitabevi, İstanbul-Ankara 2007.
46. Küçüksu MN, Ruacan ŞA. Klinik Onkoloji, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, Ankara 1978: ss 76-87.
47. Gökçe A, Oktar S, Koç A, Yönden Z. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. *Human and Experimental Toxicology* 2011; 30; 897–903.
48. Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M. Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats, *Andrologia* 2008; 41: ss 105–110.
49. Oğuz Y, Eyileten T, Karaman M, Ay SA, Yılmaz Mİ. Böbrek işlevleri bozuk iki olguda metotreksat kullanımına bağlı pansitopeni gelişmesi. *Türk Nefroloji Diyaliz Transplantasyon Dergisi* 2011; 20: ss 93-95.
50. Wood AW, Huang MT, Chang RL, Newmark HL, Lehr RE, Yagi H, Sayer JM, Jerina DM, Conney AH. Inhibition of the mutagenicity of bay region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: Exceptional activity of ellagic asit. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: ss 5513–5517.
51. Stoner GD, Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agent, *Journal of Cellular Biochemistry* 1995; 22: ss 169- 180.
52. Vasconcellos, J. A. (2000), *Functional Foods. Concepts and Health Benefits*. Erişim: [<http://www.leatherheadfood.com>], Erişim Tarihi:21 Ağustos 2017.
53. Umesalma S, Sudhandiran G. Chemomodulation of the antioxidative enzymes and peroxidative damage in the colon of 1,2-dimethyl hydrazineinduced rats by ellagic acid. *Phytother. Res.* 2010; 24: ss114–119.
54. Durak ZE. N-Nitrozodietilamin'in (Ndea) Rat Kalp Dokularında Adenozin Deaminaz, Ksantin Oksidaz, Nitrik Oksit Metabolizması Ve Oksidan / Antioksidan Sistemde Görev Alan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisinin Araştırılması Ellajik Asidin Etkisi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2012; ss 9-36.

55. Olğar Y. Ellagik Asidin Sıçan Kardiyomiyositlerinin Ontraktilitesi Ve Kalsiyum Akımları Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Antalya 2013; ss 3-13.
56. Bayraktar AÇ. N-Nitrozodietilamin'in (Ndea) Rat Karaciger Dokularında Dna Turn-Over'ında Görev Alan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisinin Arastırılması: Ellajik Asidin Etkisi, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2011; ss 1-46.
57. Akkoyun HT. Fötal Dönemde Nikotine Maruz Kalan Sıçanlarda Oluşan Böbrek Hasarının Engellenmesinde Ellagic Asitin Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum 2012; ss 63-73.
58. Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. J.Nutr. 2006; 136: 2481-2485.
59. Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Kumar MN. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006; 40: 206-210.
60. Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan LA, Faveal-Torres E, Aguilar CN. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins, Applied Microbiology Biotechnology, 2007; 78: 189-199.
61. Lei Z, Jervis J, Helm RF. Use of methanolysis for the determination of total ellagic and gallic acid contents of wood and food products, J. Agric 2001; 49: 1165-1168.
62. Niemetz R, Gross GG. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis, Phytochemistry 2005; 66: 2001-2011.
63. Marais JP, Mueller-Harvey I, Brandt EV, Ferreira D. Polyphenols condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (Sainfoin), J Agric Food Chem 2000; 48: 3440-3447.

64. Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J Chromatogr A* 2000; 896: 87-93.
65. Mullen W, Yokota T, Lean ME, Crozier A. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSn, *Phytochemistry* 2003; 64: 617-624.
66. Dündar M. Fitokimyasallar ve sağlıklı yaşam. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2001;2: 131-138.
67. Erenoğlu N. Farklı İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde Ellajik Asitin Sitotoksik Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 2012; ss 30-34.
68. Whitley AC, Sweet DH, Walle T. The dietary polyphenol ellagic acid is a potent inhibitor of hOAT1. *Drug Metabolism and Disposition* 2005; 33: 1097-1100.
69. Papoutsis Z, Kassi E, Tsiapara A, Fokialakis N, Chrousos GP, Moutsatsou P. Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic, *J Agric Food Chem.* 2005; 55: 7715-7720.
70. Larrosa, M, Gonzalez-Sarrias, A. Garcia-Conesa, M.T, Tomas-Barberan, F.A, Espin, J.C. Urolithins, Ellagic Acid-Derived Metabolites Produced by Human Colonic Microflora, Exhibit Estrogenic andAntiestrogenic Activities, *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 1611-1620.
71. Watzl, B, Leitzmann, C. Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln, Hippokrates, 2005; pp 254.
72. Kocaman N. Tekrarlayan dozlarda Metotreksat uygulamasının sıçan karaciğer dokusu üzerine etkileri. *Fırat Tıp Dergisi* 2013; 18: 141-145.
73. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity, *The Oncologist*, 2006; 11: 694-703.
74. Kim JC, Kim KH, Chung MK. Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats, *Reprod Toxicol* 1999; 13: 391–397.

75. Topal Z. Sıçanlarda Methotrexate Kaynaklı Testis Hasarına Karşı Melatoninin Antiapoptotik ve Antioksidan Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon 2012; ss 4-21.
76. Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C. Effect of resveratrol on methotrexate- induced testicular damage. The Scientific World Journal 2013; 2013:489659.
77. Shrestha S, et al. Effect of methotrexate (MTX) administration on spermatogenesis: an experimental on animal model. Nepal Medical College Journal 2007; 9: 230-233.
78. Najafi G, Atashfaraz E, Farokhi F. Attenuation of methotrexate-induced embryotoxicity and oxidative stress by ethyl pyruvate. Int J Fertil Steril 2016; 10: 232-238.
79. Bükücü NK. Sıçan Testisinde Metotreksatın Yaptığı Hasara Karsı Vitamin E Ve L-Karnitin'in Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep 2013; ss 2-11.
80. Koehler M, VValdherr R, Ludvvig Rl. Effects of MTX on rabbit testes, morphological changes. Pediatric Hematology Oncology 1986; 3: 335-41.
81. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: intervention of folic and folinic acid. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2009; 673: 43-52.
82. Kahraman H, et al. Protective effects of erythropoietin and N-acetylcysteine on methotrexate-induced lung injury in rats. Balkan Medical Journal 2013; 30: 99.
83. Öktem F, et al. Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. Toxicology and Industrial Health, 2006; 22: 241-247.
84. Erboğa M, et al. Quercetin ameliorates methotrexate-induced renal damage, apoptosis and oxidative stress in rats. Renal Failure 2015; 37: 1492-1497.

85. Vardı N, Parlakpınar H, Çetin A, Erdoğan A, Öztürk İÇ. Protective Effect of - Carotene on Methotrexate–Induced Oxidative Liver Damage Toxicologic Pathology 2010; 38: 592-597.
86. Yılmaz İ. Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 2010, 17: 143-153.
87. Türk G, Çeribaşı AO, Sakin F, Sönmez M, Ateşşahin A. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. Reproduction, Fertility and Development 2010; 22: 587-596.
88. AL-Kharusi N, et al. Ellagic acid protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: a dose-dependent study. Eur Rev Med Pharmacol Science 2013; 17: 299-310.
89. Girish C, et al. Ellagic acid modulates sodium valproate induced reproductive toxicity in male Wistar rats. Indian Journal of Physiology and Pharmacology 2014; 58: 416-422.
90. Yüce A, Ateşşahin A, Çeribaşı AO. Amelioration of cyclosporine a-induced renal, hepatic and cardiac damages by ellagic acid in rats. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2008; 103: 186-191.
91. Yılmaz EE, et al. Therapeutic effects of ellagic acid on L-arginin induced acute pancreatitis. Acta Cirurgica Brasileira 2016; 31: 396-401.
92. Özkaya A. Oksidatif Strese Maruz Kalan Ratların Bazı Biyokimyasal Parametrelerine Hesperetin Ve Ellagik Asidin Etkisi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ 2007; ss 2-59.
93. Abas MT. N-Nitrozodietilamin Verilen Rat Böbrek Dokusunda Oksidan / Antioksidan Sistemlerin Araştırılması: Ellagik Asitin Etkisi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara 2010; ss 8-53.