



**T. C
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇAN TESTİSİNDE METOTREKSATIN YAPTIĞI HASARA
KARŞI VİTAMİN E VE L-KARNİTİN'İN ETKİSİ**

Nezahat KESER BÜKÜCÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ

**Gaziantep
2013**

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih
Nezahat KESER BÜKÜCÜ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	I
ABSTRACT	ii
TABLO DİZİNİ	iii
RESİM DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
SİMGE VE KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Testis.....	2
2.1.1. Testis Histolojisi.....	2
2.1.1.1. Spermatogenez.....	3
2.1.1.2. Sertoli Hücreleri.....	4
2.1.1.3. İnterstisyel Doku.....	6
2.1.1.4. Leyding Hücresi.....	6
2.1.2. Testis Histofizyolojisi.....	7
2.1.2.1. Kan-Testis Bariyeri.....	8
2.2. Metotreksat.....	8
2.2.1. Etki Mekanizması.....	8
2.2.2. Yan Etkileri.....	10
2.2.3. Direnç Oluşması.....	11
2.2.4. Kullanıldığı Alanlar.....	11
2.3. Vitamin E.....	12
2.3.1. Kimyasal Yapısı.....	12
2.3.2. Doğal Kaynakları.....	13
2.3.3. Günlük Gereksinimi ve Vücudun Günlük İhtiyacı.....	13
2.3.4. Emilimi, Metabolizması ve Fonksiyonları.....	13
2.3.5. Yetersizliği.....	14
2.3.6. Aşırı Alınımı ve Toksisite.....	14
2.4. L- Karnitin.....	15
2.4.1. Biyokimyası ve Farmokokinetiği.....	15
2.4.2. Klinikte Kullanımı.....	17
3. MATERYAL METOD	18
3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı.....	18
3.2. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar.....	18
3.3. Biyokimyasal Ölçümler.....	19
3.4. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması.....	20
3.5. Elektron Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması.....	21
3.6. İstatistiksel Yöntem.....	22
4. BULGULAR	22
4.1. Vücut ve Organ Ağırlıkları.....	22
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	24
4.3. Histolojik Bulgular.....	25

4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular.....	36
4.4.1. Kontrol Grubu.....	36
4.4.2. MTX Grubu.....	37
4.4.3. LCMTX Grubu.....	38
4.4.4. VEMTX Grubu.....	38
5. TARTIşMA VE SONUÇ.....	52
KAYNAKLAR.....	56

ÖZET

SIÇAN TESTİSİNDE METOTREKSATIN YAPTIĞI HASARA KARŞI VİTAMİN VE L-KARNİTİN'İN ETKİSİ

Kanser tedavisinde kullanılan MTX; kemik iliği, GIS mukozası ve seminifer tübüller gibi hızlı bölünen hücreler içeren doku ve organlarda akut toksik yan etkilere yol açar. Biz bu çalışmada MTX'in sıçan testislerinde yaptığı hasarlar üzerine E vitamini ve L-karnitininin koruyucu etkisini araştırdık.

Bu çalışmada sıçanlar biri kontrol grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Hayvanlara 17 gün süren deney boyunca intraperitoneal yoldan E vitamini (250 mg/kg/gün), L-karnitine (500 mg/kg/gün) veya plasebo verildi. Kontrol haricindeki gruplara, deneyin 3. ve 10. günü intraperitoneal yolla 20 mg/kg metotreksat yapıldı.

Sadece metotreksat verilen gruptaki hayvanlarda kilo kaybı, testislerde ağırlık kaybı ve önemli histolojik hasarlar, malondialdehit değerlerinde yükselme ve süperoksit dismutaz değerlerinde düşme gözlemlendi. E vitamini ve L-karnitin metotreksatın sebep olduğu kilo kaybı ve testis ağırlığındaki düşüşleri etkilemezken, metotreksatın yol açtığı testiste histolojik hasarları azalttılar. E vitamini ve L-karnitin verilen gruplarda malondialdehit değerlerinde yükselme ve süperoksit dismutaz değerlerinde düşme, MTX grubundaki değerlere göre anlamlı derecede azalmıştı.

Anahtar kelimeler: Testis, metotreksat, E vitamini, L-karnitin, sıçan

ABSTRACT

EFFECTS OF VITAMIN E AND L-CARNITINE AGAINST METHOTREXATE-INDUCED INJURY IN RAT TESTIS

Methotrexate (MTX), used commonly as an anti-metabolite drug in cancer therapy, leads to acute toxic side effects in rapidly divided cells containing tissue or organs such as bone marrow, gastrointestinal mucosa, and seminiferous tubules. In this study, we investigated the protective effects of vitamin E and L-carnitine against MTX-induced injury in rat testis.

In this study, rats were divided in to 4 groups including control group. Vitamin E (250 mg/kg/day), L-carnitine (500 mg/kg/day), or placebo were administered to the rats for 17 days. MTX at 20 mg/kg was given intraperitoneally at day 3 and day 10 to all rats except controls.

Weight loss, testicular weight loss and marked histological injuries, increased malondialdehyde and decreased superoxide dismutase levels were observed in only MTX-treated group. Vitamin E and L-carnitine treatments did not affect MTX-induced weight loss and testicular weight loss, but these drugs inhibited the MTX-induced testicular histological injuries. Vitamin E and L-carnitine treatments suppressed the increases in malondialdehyde levels and decreases in superoxide dismutase levels.

In conclusion, vitamin E and L-carnitine treatments decrease the MTX-induced testicular histological injuries, and these results are supported with biochemical measurements.

Key words: Testes, methotrexate, vitamin E, L-carnitine, rat

TABLO DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Elektron Mikroskopik Doku Takibi İşleminde Dehidratasyon İşlemi.....	21
Tablo 2: Deney Sonrası Testis Ağırlıkları.....	23
Tablo 3: Gruplardaki MDA ve SOD Değerleri.....	24
Tablo 4: Kontrol ve Deney Gruplarındaki Toplam Histopatolojik Hasar İndeksi Değerleri.....	25

RESİM DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1: Kontrol Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	27
Resim 2: MTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	28
Resim 3: MTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	28
Resim 4: LCMTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	29
Resim 5: MTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	29
Resim 6: MTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	30
Resim 7: LCMTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	30
Resim 8: VEMTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	31
Resim 9: LCMTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	31
Resim 10: VEMTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	32
Resim 11: VEMTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	32
Resim 12: VEMTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	33
Resim 13: MTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	33
Resim 14: LCMTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	34
Resim 15: LCMTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	34
Resim 16: VEMTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	35
Resim 17: VEMTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü.....	35
Resim 18: LCMTX Grubu Işık Mikroskopik Görüntü	36
Resim 19: Kontrol Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	39
Resim 20: Kontrol Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	40
Resim 21: Kontrol Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	41
Resim 22: MTX Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	42
Resim 23: MTX Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	43
Resim 24: MTX Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	44
Resim 25: LCMTX Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	45
Resim 26: LCMTX Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	46
Resim 27: LCMTX Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	47
Resim 28: LCMTX Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	48
Resim 29: VEMTX Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	49
Resim 30: VEMTX Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	50
Resim 31: VEMTX Grubu Elektron Mikroskopik Görüntü	51

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Folik Asit Metabolizması.....	8
Şekil 2: Methotreksat'ın Moleküler Yapısı.....	9
Şekil 3: Hayvanların Vücut Ağırlıkları	23
Şekil 4: Gruplardaki her bir parametrenin ortalama hasar skorları.....	27

SİMGE VE KISALTMALAR

ALL: Akut lenfoblastik lösemi
BOS: Beyin omurilik sıvısı
DHRF: Dihidrofolat redüktaz
DNA: Deoksiribonükleik asid
FAD: Flavın adenin dinükleotid
FSH: Folikül uyarıcı hormon
GIS: Gastrointestinal sistem
GSH-Px: Selenyum glutasyon peroksidaz
i.m: İntra müküler
i.v: İntra venöz
KCl: Potasyum klorür
LD 50: Letal doz
LH:Lütein yapıcı hormon
MDA: Malondialdehit
MTX: Metotreksat
MPO: Miyeloperoksidaz
μ: mikron
NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid
NBT: Nitroblue tetrazolium
nm: nanometre
RNA: Ribonükleik asit
ROS: Reaktif oksijen türevleri
SOD: Süperoksit dismutaz
U/g: Ünite / gram

1. GİRİŞ

Bir folik asit antagonisti olan metotreksat (MTX); lösemi ve diğer malignitelerde sitotoksik bir ajan olarak ve düşük dozlarda da psoriasis ve romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıklarda yaygın olarak kullanılmaktadır (1, 2). Kanser tedavisinde kullanılan MTX'in yüksek proliferasyona sahip dokular üzerinde akut toksik yan etkilere neden olduğu bilinmektedir. MTX etkisine özellikle duyarlı olan hücreler; kemik iliği, GIS mukozası, kıl kökleri ve spermatogonik hücreler gibi hızlı bölünen hücrelerdir. MTX tedavisinde gonadal hasar yaygın olarak görülmesine rağmen, antikanser ilaçlarının bu yan etkisi diğer yan etkilerine göre daha az araştırılmıştır (3, 4).

Yapılan çalışmalar MTX'in, antioksidan enzim sisteminin etkinliğini azaltarak, hücreleri reaktif oksijen partiküllerine karşı hassas duruma getirip hasara neden olduğunu göstermektedir. Oksidatif stres testis seminifer tübüllerinde hasara ve germ hücrelerinde azalmaya yol açmaktadır (5). Bundan dolayı antioksidanlar oksidatif strese karşı testis dokusunun korunmasına yardım edebilir.

Diğer antioksidanlar gibi Vitamin E'de, oksijen radikallerinin hücre membranı lipidlerine karşı başlattıkları oksidatif reaksiyonu, antioksidan etkileriyle önler ve bu yolla hücrede koruyucu etkinlik gösterir (6).

Günümüzde yağ yakıcı etkisinden dolayı başlıca zayıflama amacıyla kullanılan L-Karnitin (L-carnitine), sperm kalitesini arttırdığı bildirilmiştir. Erkeklerde başlıca epididimiste üretilen karnitin hem kalitatif hem de kantitatif olarak sperm motilitesini ve diğer sperm parametrelerini etkileyerek fertilizasyon şansını yükseltmektedir (7).

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Testis

2.1.1. Testis Histolojisi:

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmuştur (8, 9, 10). Testisler erkekte temel üreme organı olup, testis torbası (skrotum) içinde yer alırlar (9,10). Skrotum, perinede yer alan, içinde testisleri ve epididimisleri barındıran kutaneöz fibromüsküler bir torbadır. Erken fetal dönemde, karın boşluğunda böbreklere yakın olarak yer alan testisler, fetüs geliştikçe aşağıya doğru hareket ederek (descensus) doğumdan hemen önce inguinal kanal aracılığı ile skrotuma inerler. Testislerin normal fonksiyonlarını yapabilmeleri için, karın boşluğundan skrotuma inmeleri zorunludur. Çünkü testislerin normal fonksiyon görebilmeleri (Ör: spermatazoon üretebilmeleri) için descensus ve skrotum içinde bulunması gerekir (9). Testisin başlıca görevlerinden ikisi, hormon ve spermatozoonları üretmektir. Testis, tunika albuginea denilen kalın kollejenaz bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Burada bezin içine giren fibröz septumlar bu yapıyı testiküler lobüller denilen yaklaşık 250 adet primidal bölmeye ayırırlar. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül yer alır. Bu bağ dokusunda bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel (leydig) hücreler bulunur. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirler. İnterstisyel hücreler testiküler androjenleri salgırlar.

Her bir seminifer tübül yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluktadır, karmaşık yapıda çok katlı epitel ile döşelidir. Her tübül sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller ya da tubuli rekti adıyla bilinen kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar (8). Mediastinumun bağ dokusunda bulunan rete testis, 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır. Seminifer tübüller fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz tunika propria

birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olarak bulunan en içteki katman düz kas özelliği gösteren yassılaştırmış miyoid hücrelerden oluşur. Epitel iki tip hücreden meydana gelmektedir; Sertoli ya da destek hücreleri ile spermatogenik seriyi oluşturan hücreler. Spermatagonik seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar. Bunlar erkek germ hücrelerinin sürekli farklılaşma sürecindeki çeşitli evrelerde bulunabilirler (8).

2.1.1.1. Spermatogenez:

Spermatozoa seminifer tübüllerde oluşur. Seminifer tübüllerin lümeninden tabanına doğru, spermatogenezin çeşitli evrelerinde farklı hücreler bulunmaktadır. Tübülün çevresini saran seroz zara dayanan, en tabandaki hücreler spermatogonialardır (11).

Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu olay üç faza ayrılabilir; spermatositogenez olarak adlandırılan evrede spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelir.

Spermatositler ardı ardına iki bölünme (mayoz bölünme) geçirerek kromozom sayılarını ve DNA miktarlarını eşit olarak her hücrede yarıya düşürerek spermatidleri oluştururlar. Spermatidlerin özenli bir hücre farklılaşma süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu safha spermiyogenezdir.

Spermatogenez, bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş bir germ hücresi olan, spermatogonyum ile başlar. Bu yaklaşık 12 µm çapında, nispeten küçük bir hücredir. Seksüel olgunlaşmada bu hücreler bir seri mitoz geçirirler ve yeni oluşan hücreler iki yol izleyebilir; bir ya da daha fazla mitotik bölünmeden sonra farklılaşmamış kök hücreler olan tip A spermatogonyumlar olarak devam ederler ya da süregelen mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip A spermatogonyumlar spermatogenik serinin kök hücreleridir. Tip B spermatogonyumlar ise primer spermatositlere farklılaşan öncül (progenitor) hücrelerdir. Birinci mayotik bölünmeden sonra sekonder spermatositler denilen ve yalnızca 23 kromozom içeren daha küçük hücreler oluşur. Daha sonra bu hücreler ikinci mayotik bölünmeye girerek 23 kromozom içeren spermatidleri oluşturur (8). Spermatitlerde spermatozoaya olgunlaşırlar. Tek bir spermatogonyumun bölünmesi ve olgunlaşması sırasında, bundan

oluşan yavrular geç spermatid döneme kadar sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı olarak bulunurlar. Bu durum görünürde her bir germ hücresi klonunun eş zamanlı olarak farklılaşmasını sağlamaktadır. Spermatidler spermiyogenez olarak adlandırdığımız bir farklılaşma süreci geçirirler. Bu süreçte akrozom oluşur, nükleus yoğunlaşır ve uzar, flagellum gelişir ve sitoplazmanın çoğu kaybolur. Sonuçta seminifer tübülün lümenine salınan olgun spermatozoon meydana gelir.

Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Bu köprüler her primer ve sekonder spermatositle spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Spermatogenez süresi tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma olur. Tek bir spermatogonyumdan oluşan tahmini spermatid sayısı 512'dir. Bu düzenli spermatogenez süreci boyunca insanlarda primitif bir germ hücresinden olgun bir spermin oluşması ortalama 64 günde gerçekleşmektedir. Spermatogenez, eş zamanlı ya da eş güdümlü olarak her seminifer tübülde aynı anda

gerçekleşmez, bu olay dalgalanma biçiminde olur (8,12).

2.1.1.2. Sertoli Hücreleri:

Sertoli hücreleri bazal membrandan tübül lümenine doğru uzanan oldukça büyük hücrelerdir ve germ hücrelerinin gelişimi için oldukça önemlidir. Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış piramidal hücrelerdir. Işık mikroskopunda, bu hücrelerin sınırları belirsiz olarak görülür, çünkü bunların spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları vardır. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda hücrelerin bol miktarda düz endoplazmik retikulum, bir miktar kaba endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozom içerdiği gösterilmiştir (8). Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış nukleusta çok sayıda kıvrımlar, belirgin bir nukleolus ve az miktarda heterokromatin görülür. Sertoli hücreleri birbirleriyle bazal ve yan bölgelerde tight junction denilen sıkı bağlantılarla birleşmişlerdir. Bu spermatogonyumlar içine kanda bulunan materyallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogenez sırasında spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan bir yolunu bulup

geçerek adluminal kompartmana çıkarlar. Burada spermatogenezin daha ileri safhaları, kandan gelen ürünlerden bir kan-testis bariyeri ile korunurlar. Bu bariyer Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile oluşturulur. Spermatositler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin flagellar kuyrukları geliştikçe bunlar Sertoli hücrelerinin apikal uçlarından çıkan püsküller şeklindeki çıkıntılar halinde görülürler. Sertoli hücreleri sıkı bağlantılar (gap junction) denilen temaslara hücreler arası iyonik ve kimyasal alışveriş yaparlar.

Sertoli hücrelerinin en az dört önemli fonksiyonu vardır:

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

2- Fagositoz: Spermiyogenez sırasında spermatidlerin fazla sitoplazması artık cisimcikler şeklinde dökülür. Bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücrelerindeki lizozomlar tarafından yıkılırlar.

3- Sekresyon: Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportunu da sağlayan bir sıvı salgırlar. Androjen bağlayıcı protein (ABP) sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından FSH ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiyol haline çevirebilirler. Bu hücreler aynı zamanda, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin adı verilen bir peptid salgırlar.

4- Anti-Müllerian Hormon üretimi: bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanalların gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise Wolf (mezonefrik) kanallardan köken alan yapıların gelişmesini sağlar.

Sertoli hücreleri üreme periyodu süresince bölünmezler. Bunlar özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, x-ışını ışınlaması gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdırlar ve bu zararlı etkiler karşısında spermatogenez seri hücrelerine göre çok daha dirençlidirler (8,13).

2.1.1.3. İnterstisyel Doku:

Testisin seminifer tübülleri arasındaki bağ dokusu birikintileri, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Testiküler kapillerler penceresidir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsade ederler. İnterstisyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun şebeke, bu organda alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının birleşimindeki benzerliği açıklamaktadır. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir. Bunlar arasında fibroblast, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Puberte sırasında ek bir hücre tipi belirgin hale gelir, bu yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir nukleusu ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan bir hücredir. Steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir (8,14).

2.1.1.4. Leydig Hücresi:

Leydig hücreleri erken f tal hayatta gelişen testiste çok sayıda bulunur. Plsentel kökenli gonadotropinlerin kan yoluyla f tal testise ulaşıp, leydig hücrelerini uyarması sonucu Leydig hücreleri sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretilirler. Testosteron sentezi mitokondri ve düz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilerek, hücre organelleri arası işbirliğine bir örnek oluşturur. Leydig hücrelerinin hem aktiviteleri hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonların bulunması embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler hamileliğin 18. haftasına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra gebelik boyunca ve hipofizden sonra salınan LH uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar. Leydig hücreleri insanda testis hacminin % 12'sini oluşturur. Tek ya da gruplar halinde, sıklıkla üçgen biçiminde kümeler şeklinde, bazen kan damarlarına yakın bulunurlar.

Büyük ovoid ya da poligonal biçimli hücrelerdir. Sitoplazması lipitten zengindir. Hematoksilen- eozin boyamalarında lipid eridiğinden sitoplazma vakuoler ve granüler görünüm kazanır, oldukça açık renkte boyanır (8,14).

2.1.2. Testisin Histofizyolojisi:

37 °C olan vücut içi sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin regulasyonunda ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35 °C'dir, bu birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Zengin bir venöz pleksus (*pampiniform pleksus*) her bir testiküler arterin etrafını sararak testiküler ısının artmasını önler. Daha düşük ısıda bir karşı kan ısı akımı sağlar. Diğer faktörler; skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki krameter kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir.

Kötü beslenme, alkolizm ve bazı ilaçların etkisi ile spermatogoniumlarda değişiklikler ve sonuçta spermatozoon yapımında bir azalma ortaya çıkar. X- ışını irradyasyonu ve kadmiyum tuzları spermatogenik seri hücrelerinde oldukça toksiktirler ve bu hücrelerin ölümüne sebep olarak hayvanlarda sterilitteye yol açarlar.

Spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi endokrin faktörler oluşturur. Spermatogenez, hipofizin foliküler stimulan (FSH) ve lüteinizan hormonlarının (LH) testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH interstisyel hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder. FSH'nin ise Sertoli hücrelerin etkileyerek adenilat siklaz yapımını stimüle ettiği ve sonuçta cAMP'nin artışına yol açtığı ve aynı zamanda androjen bağlayıcı proteinin sentez ve salgılanmasını sağladığı bilinmektedir. Bu protein testosteron ile bağlanır ve testosteronu seminifer tubüllerin lümenine taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır, östrojen ve progesteronlarla inhibe edilir. Spermatozoonlar epididimise, uygun bir medyum olan testiküler sıvı içinde taşınırlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş androjen bağlayıcı protein içerir (8).

2.1.2.1. Kan-Testis Bariyeri:

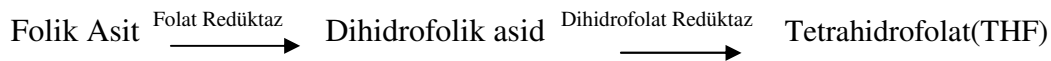
İnsanlar da dâhil pek çok türde, komşu Sertoli hücreleri arasında oluşturulmuş sıkı bağlantı birimleri insertisiyumdan kan ve lenfatik yolla gelen maddelerin seminifer tübüller içerisine geçişini kontrol eden bir bariyer olarak görev yaparlar. Puberte öncesi insan testisinde, komşu Sertoli hücrelerinin karşılıklı gelen membranları arasında sadece birbirine geçmiş parmaksı uzantılar görülür. Pubertenin başlamasıyla birlikte bunlar işlevsellik kazanırlar. Bu bariyerin oluşması ise, Sertoli hücrelerinin bölünmeyen hücre konumuna geçmesi ve spermatogenezisin başlaması ile eş zamanlı olarak gerçekleşir. Kan-testis bariyeri; immün sistem tarafından yabancı olarak tanımlanabilecek haploid erkek gamet için immünolojik bakımdan korunmuş bir bölgenin yaratılmasını, Sertoli hücreleri arasında bağlantıların sürdürülmesini ve yüksek seçicilikte geçirgenliği sayesinde, germ hücre gelişimi için ideal bir mikro çevrenin sürdürülmesini sağlamaktadır (15).

2.2. Metotreksat

2.2.1. Etki Mekanizması:

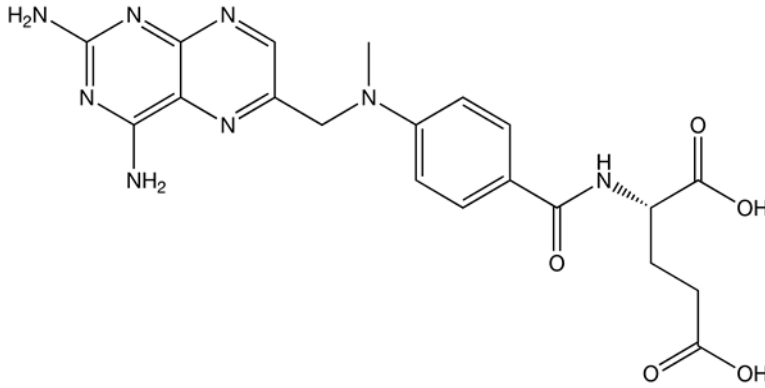
Bir folik asit antimetaboliti olan metotreksat (MTX) hücre siklusunun S dönemindeki hücreler üzerinde sitotoksik etki yapar (16).

MTX, kimyaca folik asidin 4-amino, N¹⁰ –metil analogudur. Folik asit ise DNA sentezinde önemli olan tetrahidrofolat öncülüdür (Şekil 1).



Şekil 1: Folik asit metabolizması

MTX'in moleküler yapısı Şekil 2. de gösterilmiştir.



Şekil 2: Methotrexat'ın Moleküler Yapısı (17).

Metotreksat, dihidrofolat redüktaz enzimini aktif noktasına sıkı bir şekilde bağlanıp inhibe ederek tetrahidrofolat sentezini durdurur. Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu DNA ve RNA için gerekli purin bazlarının (adenin ve guanin) sentezinin durmasına yol açar. Ayrıca protein sentezinin bozulmasına neden olur (16).

Metotreksat S dönemindeki hücreler üzerinde sitotoksik etki yapar. Metotreksat tümör hücrelerinde ve karaciğer ile böbrek hücrelerinde uzun süre bağlı kalır. Tümör hücrelerindeki bu durumun tedavi yönünden değeri vardır. Şöyle ki yukarıda belirtildiği üzere, antimetabolitler istirahat halindeki hücrelerde sitotoksik etki yapmazlar. Fakat bu durumdaki hücrede uzun süre kalan metotreksatın, latent sitotoksik etkisi vardır; hücre bölünmeye başladığı zaman bu etki belirgin hale geçer ve hücreyi öldürür (16).

Santral sinir sistemine ve BOS'a giremez; meninjeal tümörlerin tedavisi için intratekal verilmesi gerekir. Böbreklerde itrah suretiyle elimine edilir; eliminasyon yarılanma ömrü 8 saat kadardır (16).

Metotreksat, kullanıldığı duruma göre değişen dozlarda verilir. Akut lenfositik lösemisinin idame tedavisinde düşük dozda (5-25 mg/m²) oral verilir. Haftada 2 kez 25 mg/m² i.m. veya i.v. injeksiyon suretiyle de verilebilir. Aynı amaçla ayda bir, iki gün 175-525 mg/m² dozunda i.m. verilebilir. Ağır psöriyaziste immünosüpresan olarak haftada 5 gün ağızdan günde toplam 2,5 mg gibi düşük dozda veya haftada bir 10-25 mg i.v verilir. Koryokarsinomaya karşı gün aşırı 1 mg/kg i.m. dört doz enjekte edilir ve bu uygulama 3 haftada bir tekrarlanır. Osteosarkom, çocukluk çağı lösemileri ve

Hodgkin-dışı lenfomaya karşı kalsiyum folinat ile birlikte yüksek dozda (100-12.000 mg/m² dozunda) 10-60 dakika süren i.v. infüzyonla 3 haftada bir verilir. İnfüzyonun sona ermesinden sonra 15 mg/m² kalsiyum folinat i.m. olarak 6 saatte bir 8 doz injekte edilir. Bu yaklaşıma kanser kemoterapisinde özel bir ad konulmuştur. Lökovorin (folinik asid) ile kurtarma (leucovorine rescue) denilir (16).

Yüksek doz metotreksat belirgin nefrotoksik etki gösterdiği için uygulamadan önce hasta hidrate edilmeli ve idrar alkalileştirilmelidir. Kalsiyum folinat daha küçük dozda (gün aşırı 0,1 mg/ kg i.m. gibi) metotreksatın düşük dozları ile yapılan uygulamalarda da onun toksisitesini azaltmak için kullanılabilir; ayrıca metotreksata bağlı intoksikasyonda kullanılır. Metotreksat menenjiyal lösemi veya lenfomaların profilaksisi ve tedavisi ve menenjiyal karsinomatozisin tedavisi için maksimum 12 mg intratekal injekte edilir; uygulama BOS'ta tümör hücresi kaybolana kadar 4 günde bir tekrarlanır. Yukarıda sayılan tümörlerden başka, metotreksat meme, testis ve akciğer kanserleri, baş ve boyun kanseri ve mikozis fungoides'in tedavisinde de kullanılabilir (16).

2.2.2. Yan Etkileri:

MTX tedavisi esnasında ortaya çıkan yan etkiler oldukça yaygındır. Yan etkinin şiddeti değişiktir. En sık rastlanan yan etkiler hafif ve geri dönüşümlüdür. Bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme ve stomatit gibi yan etkiler sıklıkla dozla ilişkilidir. MTX tedavisi alan romotoid artritli hastaların yaklaşık %30'unda ilaç toksisitesi nedeniyle tedavi kesilir (18).

Kemik iliği depresyonu, ağız ve barsak mukozasında ülserasyon en sık görülen yan tesirlerdir. Hepatotoksik ve nefrotoksik etkileri vardır; akciğerlerde infiltrasyon yapabilir (16). Lösemi tedavisinde yüksek doz intravenöz veya intratekal MTX eklenmesi akut lenfoblastik lösemili (ALL) çocuklarda artan yaşam oranı ile ilişkilendirilmiştir. Fakat ilacın santral sinir sistemine belirgin toksik etkisi de vardır ve potansiyel olarak şiddetli nörolojik morbiditeye yol açabilir. Toksik etkiler tedaviden hemen sonra akut olarak ortaya çıkabilir veya uzun süre sonra progresif nörolojik ve kognitif bozukluklara yol açabilir (19). MTX alan lösemi hastalarında yaşam süresinde uzama ve radyoterapi gerekliliğinin azalma ile ilişkili bulunmuştur. Bununla birlikte intratekal MTX

tedavisinde nörotoksisite sık görülen komplikasyondur. MTX nörotoksitesi saptanan kişilerin serebral korteks, serebellum, bazal ganglionlarında fibrinoid nekroz, hyalin kalınlaşma ve kalsifikasyon gibi vasküler yapıda değişiklikler bulunmuştur (19).

2.2.3. Direnç oluşması:

Tümör hücrelerinde mutasyon sonucu dihidrofolat redüktazın (DHFR) metotreksata afinitesinin azalması, direnç gelişmesinde rol oynar. Ayrıca DHFR geninin aşırı ekspresyona uğraması (gen amplifikasyonu) sonucu hücrede bol miktarda tetrahidrofolat oluşması da dirençte rol oynar. Metotreksat, hücrelere folatı ve tetrahidrofolatı da taşıyan bir aktif transport olayı ile girer; mutasyon sonucu bu mekanizmanın bozulmasının da dirençte rol oynadığı deneysel tümörlerde gösterilmiştir (16).

2.2.4. Kullanıldığı Alanlar:

Metotreksat kanser tedavisinde sık kullanılan antimetabolit yapıdaki antifolat bir ilaçtır. Antifolatlar, DHFR'ı inhibe eder ve purin ve timidin biyosentezinin inhibe olmasına yol açar. Metotreksat lösemiler, lenfomalar, meme kanseri, baş ve boyun kanserlerinde kullanılır. MTX intratekal olarak tümörün leptomeningeal yayılımını önlemek içinde uygulanır (20).

MTX'in romatizmal hastalıklardan kanser metastazına kadar oldukça geniş kullanım endikasyonları bulunmaktadır. Çocuklarda gelişen akut lenfoblastik lösemi tedavisinde önemli bir ilaçtır. Hem remisyon indüksiyonunda hemde konsolidasyon sırasında yüksek dozda intramusküler kullanılır. Bu durumda kür şansı oldukça yüksektir Ancak erişkinlerde görülen lösemilerde, lösemik menenjitin önlenmesi ve tedavisi dışında MTX'in tedavi edici etkisi daha sınırlıdır. Meningeal karsinomatosis tedavisinde, meningeal lösemi ve lenfomanın profilaksi ve tedavisinde intratekal olarak kullanılır (21).

2.3. Vitamin E

1922 yılında bilim adamları Evans ve Bishop tecrübeleri sonucu göstermişler ki, sıçanları uzun zaman, yapısında % 18 kazein, % 54 nişasta, % 15 domuz yağı, % 5 tereyağı, % 4 inorganik maddeler bulunan besinle yemlediklerinde onlarda kısırlık olabilmektedir. Bu tür besinle beslenen dişi sıçanlar döllenme özelliği korumalarına rağmen dölü, gebeliğin sonuna kadar yaşatamamaktadır. Yani onlarda istenmeyen bir kürtaj olayı gözlenir. Erkeklerde tohum kanalcıklarında degeneratif değişimler olduğundan spermatogenez olayında bozukluklar gözlenir. Spermatozoitlerin kuyrukları kaybolur ve hareketsiz kalırlar. Deneyde kullanılan hayvanların yemeğine tereyağı ilavesinde ise bu bozukluklar ortadan kalkar. Bilim adamları bu tecrübelere dayanarak A, D, C vitaminlerinin etkileyemediği cinsel yetersizlikleri etkileyebilen farklı özelliklere sahip bir vitamin varlığını tespit etmişlerdir. Bu yağda çözülebilen vitamin, E vitamini (tokoferol) olarak adlandırılmıştır. Tokoferol yunanca Tokos= doğuş, Fero= Türetmek anlamına gelmektedir (22). Tanımlanmış 7 ayrı formu vardır. En çok üzerinde durulan formu α tokoferoldür.

2.3.1. Kimyasal Yapısı:

1936 yılında bilim adamı Evans buğday endosperminden alınabilen yağın sabunlaşmayan kısmının E vitaminine benzer aktiviteye sahip olduğunu belirtmiştir. Araştırmacılar yağı hidroliz etmekle E vitaminini saf olarak elde ettiler. Tokoferolun empirik formülü $C_{25}H_{50}O_2$ ’dır.

1938 yılında Emerson kimyasal yapısı ile birbirine benzer ve biyolojik etkisine göre E vitaminine yakın olan α , β ve γ -tokoferol elde etmiştir. α tokoferolün vitamin aktivitesi tokoferollerin diğer üyelerine göre daha yüksektir. 1938 yılında Karrer α -tokoferolü trimetilhidroksikinon ve fenolbromitden sentez yolu ile elde etmiştir. Vitamin etkisi gösteren ve bitkilerde sentezlenen 8 tane tabii tokoferol vardır. Bu tokoferoller tokol çekirdeğinden türerler. Tokoferoldeki farklılık tokol çekirdeğinin değişik yerlerine metil grubunun bağlanmasından kaynaklanır. Yan zincirlerinde doymamış yağlar bulunmaktadır. Tokoferollerin etkinliklerinde de farklılıklar bildirilmiştir. Tabiatta en fazla bulunan ve aktif olan α -tokoferoldür (22).

E vitamininin organizmadaki rolü, canlı hücrelerin tümünde ortak olan oksidatif metabolik yolda işlevinin olmasıyla anlaşılabilir.

2.3.2. Doğal Kaynakları:

Vitamin E bitkisel kaynaklardan izole edilmiştir. Tokoferol lipidlerle beraber dışarıdan besinlerle alınır. Normalde dışkı ve idrarda bulunmaz. Vitamin E kaynağı olan besinler bitkisel yağlar, tahıl taneleri, yeşil yapraklı sebzeler, et ve süt ürünleridir (22).

2.3.3. Günlük Gereksinimi Ve Vücudun Günlük İhtiyacı:

E vitamini besinlerde yaygın olarak bulunduğu ve özellikle, günlük besinin önemli bir miktarını oluşturan hububat türleri bu vitamini içerdiklerinden, erişkinlerde dengesiz bir diyet bile günlük gereksinimi karşılayabilir (16).

Günlük ihtiyaç vücut ebatlarına, kişinin fizyolojik durumuna, hatta beslenmede bulunan uzun zincirli yağların oranına göre değişmektedir. Buna karşın günlük E vitamini miktarı yetişkinlerde 10 ile 12 mg olarak kabul edilir. Yenilen rafine yağlar, yağda kızarmış yiyecekler bu ihtiyacı arttırmaktadır (16).

2.3.4. Emilimi, Metabolizması ve Fonksiyonları:

Tokoferol lipidlerle birlikte ince barsaklarda emilmektedir. Tokoferol daha sonra lipoprotein ve kilomikronlara bağlanarak lenf sıvısıyla plazmaya taşınır ve böylelikle tüm organizmaya dağılır (23).

Karaciğer, plazma ve yağ dokularında yüksek oranda vitamin E bulunur (22). Vitamin E'nin en önemli görevi öncelikle antioksidan etkiye sahip olmasıdır. Membranlarda bulunan doymamış yağ asitleri, flavoprotein oksidaz tarafından oluşturulan hidrojen peroksit üretimi ile oksitlenir. Oksidasyon esnasında ortaya çıkan süperoksit diğer radikaller ve peroksit, membran enzimleri sitokrom P450 oksidaz ve ksantin oksidaz tarafından katalizlenir ve diğer proteinlerle serbest radikalleri oluşturur. Doymamış yağ asitlerinin moleküllerinde otooksidasyon olayına çok yakın olan alil

hidrojenleri vardır. Bunlar serbest oksijenle, bir radikal reaksiyonu sonunda hidroperoksitlere dönüşürler (22).

Vitamin E'nin selenyum ile de ilişkisi vardır. Daha 1950 yıllarında hayvanlarda bazı klinik sendromların vitamin E ile anorganik bir maddenin yetersizliğinden ileri geldiği bilinmekteydi. Bu madde selenyum idi. Selenyum, glutatyon peroksidaz (GSH-P_x) enziminin ayrılmaz bir parçasıdır. Çünkü (GSH-P_x) hücre membranında peroksidasyon olayını önler, böylece hücre oksidatif dejenerasyondan korunmuş olur (22).

İmmun fonksiyonlar üzerinde vitamin E'nin önemli etkileri vardır. Humoral immünite üzerine de benzeri etki yaparak B-lenfositleri uyarır ve Ig sentez hızını artırır (22).

2.3.5. Yetersizliği:

Oski ve diğer araştırmacılar yağsız inek sütünden yapılan süt formülleriyle beslenen çocuklarda hemolitik anemi, in vitro eritrositlerin hidrojen peroksit'e karşı rezistanslarının azalması, trombositoz ve nadiren ödem ile seyreden bir sendrom gözlemişlerdir. Bu E vitamini eksikliğine bağlı olarak insanlarda görülen ilk hastalıktır. Süt formüllerine E vitamini ilavesiyle hastalığın önüne geçmek mümkün olmuştur (24).

E vitamininin yetersizliği sonucu hayvanlarda adale zayıflığı gözlenir. Bu tür hayvanların ayakları felç olur. Metabolizma bozulduğundan oksijen alma özelliği 2-2,5 defa artabilir. Besinlere E vitamini ilave edildiğinde oksijenin kullanımını normalleştirir. E vitamini antioksidan özelliği taşımaktadır. Besinlerde bulunan selenyum elementi vitamin E'nin emilmesinde etkili bir maddedir. Vitamin E ve Se yetersiz olduğu durumlarda kanatlılarda yumurtadan çıkma oranında azalma, semen konsantrasyonu ve fertilitede düşmeler söz konusudur. E vitamini besinlerde yaygın olduğundan avitaminozuna nadiren rastlanır (22).

2.3.6. Aşırı Alınımı ve Toksisite:

Prematüre bebeklerde, yüksek dozlarda E vitamini zararlı olabilmektedir. Toksik etkilerin arasında en göze çarpanlar sepsis sıklığında artma ve nekrotize edici

enterokolittir. Yetişkinlerde yüksek oral dozlar kullanılmasına karşın bu tür yan etkilere rastlanmamıştır (23).

Yalnız hayvanlarda fazla vitamin ilavesi ile kronik bir toksisite meydana gelebileceği bilinmektedir. Vitamin E'nin aşırı alınması vitamin K'nın emilimini baskılayacağından bu yönde bir bozukluk ortaya çıkabilir. Tokoferol yetmezliğinde toksik nitelikte olan hidroperoksitler meydana gelir. Organik peroksitler glutasyon peroksidaz eşliğinde alkollere indirgenerek toksik etkileri giderir (22).

2.4. L-Karnitin (L-Carnitine)

L-karnitin yapısal olarak aminoaside benzeyen vitamin benzeri bir moleküldür. İskelet kası, kalp, böbrek, karaciğer ve beyin gibi dokularda esansiyel aminoasitler olan lizin ve metioninden endojen olarak sentezlenir (25). L-Karnitin ilk kez 1905 yılında hayvan kaslarından izole edilmiş, kimyasal yapısı 1927'de belirlenmiştir (26).

Vücuttaki L-Karnitin %75'i diyet ile alınmaktadır. Geri kalan %25'i ise vücutta iskelet kası, kalp, beyin, karaciğer ve böbrek gibi organlarda esansiyel amino asitler olan lizin ve metioninden endojen olarak sentezlenebilmektedir. Bu olay için C vitamini, niasin, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), flavin adenin dinükleotid (FAD), piridoksin, demir ve S-adenozilmetionine gerek vardır (27). Diyetteki başlıca kaynakları et ve süt ürünleridir. Serbest karnitin plazma konsantrasyonu 30-70 µmol/L arasındadır. Kalp, iskelet kasları, yağ dokuları, epididimis ve seminal sıvı L-karnitinden zengindir. Epididimiste testosteronun etkisiyle L-karnitin düzeyi artmaktadır. Ancak burada L-karnitin sentezi yapılmaz, plazmadan sağlanır (27). L-karnitin plazma ve doku seviyelerini sürdürmesi; gastrointestinal emilim, endojen biyosentez, renal tübüler geri emilim ve taşıyıcı bağımlı transportla plazma ve doku arasında geçişlerle sağlanır (28).

2.4.1. Biyokimyası ve Farmakokinetiği:

L-karnitin küçük, suda eriyebilen ve memelilerde yağ metabolizmasında görev alan bir moleküldür. L-karnitin, mitokondri tarafından yağ asitlerinin normal oksidasyonu için gereklidir ve açıl KoA'nın transesterifikasyonu ve atılımı, dallı zincirli α-ketoasitlerin oksidasyonu, toksik açıl karnitin esterlerinin mitokondride yıkımı

olaylarına da katılır (27). L-Karnitin idrardan serbest şekilde günde total 200-500 µmol atılır. Erkeklerdeki eliminasyon oranı kadınlardan fazladır. Hemodiyaliz hastalarında L-karnitin kaybı oldukça fazladır. Bu nedenle dışarıdan verilme zorunluluğu vardır (27).

Oral doz olarak alınınca biyo-yararlanımı en düşük %16, en çok ise %87 arasındadır (29, 30).

İntravenöz yoldan uygulanan L-karnitin esas olarak renal yoldan atılır; metabolik bileşen, reversibl olarak L-karnitin esterlerine dönüşümü dışında tamamen ihmal edilebilir düzeydedir. Buna karşılık oral uygulamayı takiben, L-karnitin bağırsak bakteri florası tarafından trimetilamin ve -butiobetain açığa çıkacak şekilde yıkıma uğratılır. Sistemik dolaşıma hiçbir değişime uğramadan geçtiğinden ve ilaç miktarı yaklaşık %10-20 civarında olduğundan, oral yoldan uygulanan bir L-karnitin dozunun yaklaşık %80-90'ının eliminasyonundan bağırsak metabolizmasının sorumlu olduğu düşünülebilir. Sistemik döngüde, L-karnitin ekstraselüler volüm gibi merkez kompartmanlara dağılır. L-Karnitin fizyolojik dağılım hacmi, kaslarda karnitin depolanmasından dolayı yüksektir (31).

İnsanlarda yüksek dozda L-karnitin alımına bağlı toksisite bildirilmemiştir. Hayvanlarda ise letal doz (LD50) 19.2 g/kg'dır. Doz çalışmaları ile bir seferde 2 g'dan fazla verilmesinin kan konsantrasyonunu değiştirmediği gösterilmiştir. L-Karnitin ile yapılan koruma amaçlı çalışmalarda, 100-300 mg/kg/gün doz aralığı kullanılmıştır (32). İnsan vücudu L-karnitin üretmektedir ancak üretilen miktar vücut gereksiniminin ancak %10 u kadardır. Vücudumuz ortalama 20-25 mg L-karnitin barındırır. Vücudun günlük L-karnitin ihtiyacı 200-500 mg arasındadır. Fiziksel aktivite ve stres gibi faktörler eklenince bu ihtiyaç günlük 1200 mg'a kadar çıkabilir.

Besinlerden ileri gelen L-karnitin eksikliğine seyrek rastlanır. Daha çok metabolizmanın bozulması sonucu endojen kaynaklı eksiklikler görülür. Özellikle biyosentezinin bozulması aşırı elimasyonu ya da harcanmasından kaynaklanır. Bazı kalıtsal metabolizma hastalıklarında kanda organik asitlerin artması, harcanmasını arttırabilmektedir. Eksiklik belirtileri çizgili kas ve kardiyak bozukluklar şeklinde ortaya çıkar. Eforlarda kas zayıflıkları, miyaljiler, kaslarda yağ infiltrasyonu gibi çizgili kas bozuklukları ve kardiyomiyopati gibi kardiyak bozukluklar görülür (27).

2.4.2. L-Karnitinin Klinikte Kullanımı:

L-karnitin ve türevlerinin reaktif oksijen türevleri oluşumunu önleme, serbest radikalleri süpürme ve hücreleri peroksidatif strese koruma etkileri olduğu da bilinmektedir. Singlet oksijen süpürücü ve peroksil, hidroksil radikallerle etkileşimi ile biyolojik membran lipidlerini oksidasyona karşı koruma ve sonuç olarak lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA oluşumunu inhibe etme yeteneğindedirler (33).

Diyalize bağlı kas güçsüzlüğü ve kramplar, diyaliz sonrası görülen yorgunluk ve diyaliz sırasındaki hipotansiyonda L-karnitinin etkinliğini araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bunların çoğunda diyalizle ilişkili muskuler semptomlar ve yorgunlukta subjektif düzeltilmeler olduğu tespit edilmiş olsa da, çalışma dizaynlarının çeşitliliği, standardize olmayışları, çoğunda kontrol kolunun olmayışı tam bir değerlendirme yapılmasını engellemektedir (28). Uzun süreli diyaliz uygulamalarından sonra plazma ve doku L-karnitin düzeylerinin anlamlı ölçüde azaldığı bugün iyi bilinmektedir. Bunun temel nedeninin L-karnitin diyalizle uzaklaştırılması olduğu gösterilmiştir. Gerçekten de hemodiyalizden hemen sonra plazma L-karnitin düzeyi %75 civarında azalmaktadır (34). Hemodiyaliz hastalarında L-karnitin i.v verilmesinin diyaliz sırasında hipotansiyonu azalttığı, miyokardı koruduğu, anemi oluşumunu engellediği, kas gücü ve egzersiz kapasitesini olumlu etkilediği bildirilmektedir (35).

Kalp dokusunun öncelikli enerji kaynağı yağ asidi oksidasyonu olduğundan, kalp kasında L-karnitin yeterli düzeylerde bulunmalıdır. Dilate kardiyomiyopati ve konjestif kalp yetmezliği hastalarında toplam ve serbest miyokardiyal L-karnitin düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ayrıca diğer kardiyovasküler hastalıklar, periferik damar hastalığı, anjina, kardiyak aritmiler ve antrasikline bağlı gelişen kardiyotoksistelerde tedavi amacıyla kullanım potansiyeline sahiptir (36). L-Karnitin diğer kullanım alanlarına iskelet kası üzerindeki olumlu etkileri kas krampları, dispne ve dermansızlıkta azalma, egzersiz performansı, kas gücü, kas kitlesi ve tepe oksijen tüketiminde artış olarak sayılabilir. L-Karnitin hücre membranlarından uzun zincirli yağ asitlerini uzaklaştırmak suretiyle membran stabilizasyonuna katkıda bulunur (37). Artmış L-karnitin düzeyi ayrıca mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştirerek apoptozu kolaylaştırır. Membran geçirgenliğinin değişmesi insulin reseptörü gibi çeşitli reseptörlerin aktivitesini değiştirir (36). Erkek üreme fonksiyonlarında karnitinlerin

etkisi oldukça iyi tanımlanmıştır. Bununla beraber, karnitinin erkek infertilitesinin kontrolünü hangi mekanizma ile yaptığı henüz tam olarak açıklanamamıştır.

Daha önce yapılan çalışmalar epididimiste L-karnitin spermatozoa maturasyonuna olumlu etki ettiği gösterilmiştir. Testiste üretilen spermatozoalar immotil ve infertildir ve epididimiste postgonadal modifikasyona girerek fertil hale gelirler. Spermin motilitesini kazanması L-karnitin artışına paralel olduğu gösterilmiştir (37, 38). Son zamanlarda karnitin/asetilkarnitin kompleksinin, bakteriyel prostato-vesiküloepididimitisli hastalara uygulanmasıyla, ROS üretiminde azalma, sperm hareketliliği ve canlılığında artış ve spontan gebelik oranında yükselme gözlenmiştir (39).

3. MATERYAL METOD

3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı:

Çalışmada Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden elde edilen 26 adet ortalama 5-6 aylık genç erişkin, Wistar albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar ortama alışmaları için deneye başlamadan bir hafta önce diğerlerinden ayrılarak, ortam ışığının 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olarak ayarlandığı, ortam ısısının 21 ± 1 °C 'a sabitlendiği odalardaki tel kafeslere alındı. Deney süresince tüm hayvanlar standart yem ve çeşme suyu ile beslendiler.

Tüm hayvanların çalışma başlangıcında ve sakrifiye edilmeden önce tartılarak ağırlıkları kayıt edildi. Sıçanlar biri kontrol grubu olmak üzere dört gruba ayrıldı. Kontrol grubu (n=5) ve 3 deney grubu (n=7) olmak üzere 4 grup oluşturuldu.

3.2. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar:

1.grup MTX grubu (n=7) :

Bu gruptaki sıçanlara MTX (ABBOT LABORATORIES) enjeksiyonundan 3 gün önce başlanarak hayvanlar sakrifiye edilene kadar (17. gün), plasebo olarak (E vitamini ve karnitin yerine) aynı hacimde (0.5 ml) intraperitoneal serum fizyolojik verildi. 3. gün

intraperitoneal olarak 20 mg/kg dozunda MTX uygulandı. MTX enjeksiyonu bir hafta sonra (10. gün) tekrarlandı.

2.grup VEMTX grubu (n=7) :

Bu gruptaki sıçanlara 3. ve 10. günlerde yapılacak aynı dozdaki intraperitoneal MTX enjeksiyonlarının yanı sıra 17 gün boyunca her gün aynı saatte 250 mg/kg dozunda E vitamini (Aksu Farma) intraperitoneal olarak verildi.

3.grup LCMTX grubu (n=7) :

Bu gruptaki sıçanlara 3. ve 10. günlerde yapılacak aynı dozdaki intraperitoneal MTX enjeksiyonlarının yanı sıra 17 gün boyunca her gün aynı saatte 500 mg/kg dozunda L-carnitine (ASSOS) intraperitoneal olarak verildi (40).

4.grup Kontrol grubu (n=5) :

Bu gruptaki sıçanlara, MTX, E vitamini ve L carnitin yerine plasebo olarak aynı yollarla, aynı günlerde ve aynı hacimde serum fizyolojik enjekte edildi.

Tüm hayvanlar 17. gün sonunda 50 mg/kg intraperitoneal ketamin ile anestezi uygulanarak dekapitasyonla kurban edildi. Hayvanların testisleri komşu dokulardan temizlenerek hızlı bir şekilde çıkarılarak tartıldı. Elde edilen doku örneklerinin bir kısmı ışık mikroskopik inceleme için Bouin tesbit solüsyonu içine atıldı. Bir kısım testis doku örneği ise elektron mikroskopik inceleme için takibe alındı.

Hayvanlardan elde edilen dokuların bir kısmı ise MDA ve Süperoksit Dismutaz tayini için kullanıldı.

3.3. Biyokimyasal Ölçümler:

Biyokimyasal analizler için alınan testis doku örnekleri öncelikle soğuk (+4 °C) 0.15 M'lık potasyum klorür (KCl) ile yıkandı ve kurutma kâğıdı ile kurutuldu. Daha

sonra dokular homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 0.15 M'lık KCl çözeltisi içinde 16000 rpm'de 3 dakika homojenize edildi.

Homojenizasyon bir buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Homojenat 5000xg'de 1 saat (+4 °C'de) santrifüjlenerek süpernatant elde edildi ve analiz zamanına kadar (1 hafta) 40 °C'de bekletildi. Elde edilen süpernatanda, antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz (SOD) ile oksidatif hasarın bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) değerleri spektrofotometrik olarak tayin edildi.

SOD tayini: Süperoksit dismutaz enzim değerleri Sun ve ark.'nın modifiye ettiği metotla belirlendi (62). Bu metodun prensibi nitroblue tetrazolium'un (NBT) süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantinoksidaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Çalışmamızda SOD aktivitesi ünite/gram (U/g) doku proteini olarak ifade edildi.

MDA tayini: Lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metodu uygulanarak yapıldı (42). Tiyobarbitirik asit ile 90-95 °C'de reaksiyona giren malondialdehit, pembe renkli kromojen oluşturmaktadır. On beş dakika sonra hızla soğutulan numunelerin absorpsansları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Sonuçlar nanomol/gram (nmol/g) doku proteini olarak ifade edildi.

3.4. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması

Testis dokularının ışık mikroskopik incelemeler için ayrılan kısımları Bouin içinde fikse edildi. Yıkama ve dehidrasyon işlemlerinden sonra dokular parafin bloklar haline getirildi. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom (Shandon AS325) ile 6–7 µ kalınlığında her bloktan 10'ar kesit atlanarak kesit alınıp 4'er preparat hazırlandı. Hazırlanan preparatlar hematoxilen-eozin (HE) ve masson boyaları ile boyanıp, Olympus BX50 model ışık mikroskopunda değerlendirilerek fotoğrafları çekildi.

Hazırlanan preparatlar 6 parametrede 0'dan 4'e kadar skorlama ile incelendi. İncelen bu preparatlar ortalamaları alınarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.5. Elektron Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması:

Elektron mikroskobik incelemeler için Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 5'lik glutaraldehit solüsyonun içerisine alınan testis dokuları dişçi mumu ile kaplanmış petri kutularında 1 mm³ büyüklüğünde parçalara ayrılarak 4 saat süre ile +4°C'de tespit edildi. Tespit işleminden sonra, dokular Millonig fosfat tampon solüsyonunda yıkanarak aynı tampon içerisinde bir gece bekletildi. Ertesi gün Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 1'lik osmium tetraoksit solüsyonuna alınarak 2 saat süreyle ikinci tesbiti yapılan dokular tampon solüsyonu ile iki kez 10'ar dakika yıkanarak derecesi giderek artan alkol serilerinde dehidrate edildi (Tablo 1).

Tablo 1 . Elektron mikroskobik doku takip işleminde dehidratasyon işlemi.

SOLÜSYON	SÜRE
% 50 Etil alkolde +4° C'de	15 dakika
% 70 Etil alkolde +4° C'de	15 dakika
% 86 Etil alkolde +4° C'de	15 dakika
% 96 Etil alkolde +4° C'de	15 dakika
% 100 Etil alkolde +4° C'de	15 dakika
% 100 Etil alkolde +4° C'de	15 dakika
% 100 Etil alkolde oda ısısında	15 dakika
Propilen oksitte oda ısısında	15 dakika
Propilen oksitte oda ısısında	15 dakika
Propilen oksit + gömme materyali (rezin)	30 dakika

Oda ısısında şeffaflandırılan dokular, aşağıda belirtildiği gibi hazırlanan gömme materyali içerisinde bir gece süreyle rotatorda immerse edildi.

Gömme materyali :

Araldit CY 212 20 ml

Sertleştirici HY 964 20 ml

Hızlandırıcı DY 064 0.6 ml

Plastikleştirici-Dibütil Fitalat 1 ml

Ertesi gün doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak polietilen kapsüllere gömüldü ve 60° C'de etüvde 48 saat süreyle polimerize edildi. Daha sonra elde edilen bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomu ile yarı ince kesitler alınarak, toluidin mavisi ile

boyandı ve ince kesit alınacak alanlar belirlendi. 500 A° kalınlığında alınan kesitler bakır gridlere toplandı ve % 70'lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler Jeol JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu ile incelendi ve mikrograflar elde edildi.

3.6. İstatistiksel yöntem:

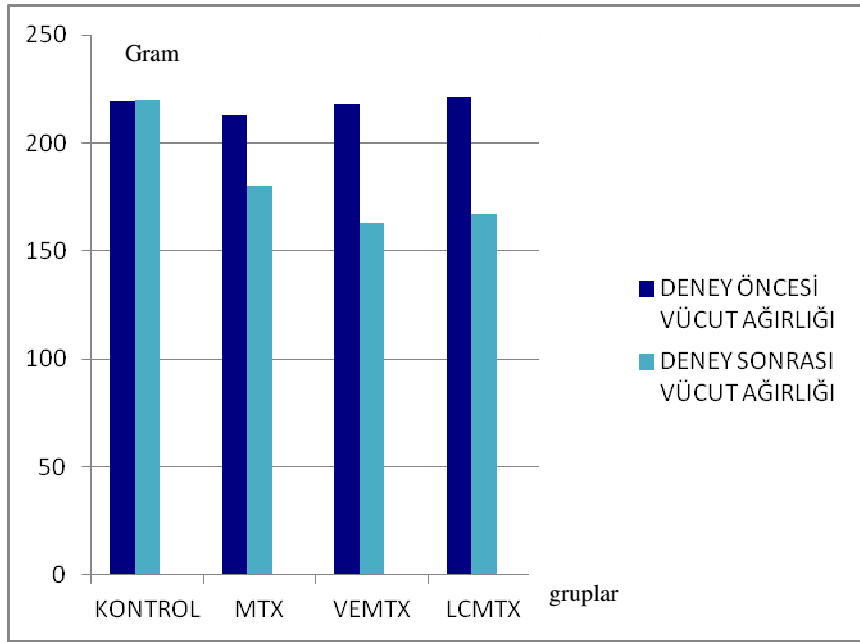
Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluk kontrolünde Kolmogorov Smirnov testi kullanılmıştır. Normal dağılıma sahip değişkenlerin 2'den fazla bağımsız grup karşılaştırılmasında ANOVA ve LSD çoklu karşılaştırma testi, normal dağılıma sahip olmayan değişkenler için Kruskal Wallis ve Dunn çoklu karşılaştırma testi, kullanılmıştır. Bağımlı iki ölçümün karşılaştırılmasında Eşleştirilmiş t testi kullanılmıştır. Tanıtıcı istatistik olarak frekans, yüzde ve ortalama $\pm$ std.sapma, medyan [%25-%75] değerleri verilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS for Windows version 11,5 paket programı kullanılmış ve $P \leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Vücut ve Organ Ağırlıkları

Deney gruplarının her birinde deney öncesi ağırlık bakımından anlamlı farklılık görülmedi ($p = 0,763$).

Deney boyunca kontrol grubundaki hayvanlarda ağırlık artışı gözlenirken, diğer tüm gruplarda kilo kaybı gözlemlendi ($p=0,001$). Bu gruplardaki kilo kaybı kendi aralarında kıyaslandığında anlamlı farklılık görülmedi. Hayvanlardaki ağırlıklar deney sonunda kontrol grubunda % 0,45 artarken diğer gruplarda MTX'de %15,49, VEMTX'de % 25,22, LCMTX'de % 24,43 'lük bir azalma oldu (Şekil 3).



Şekil 3: Hayvanların vücut ağırlıkları

Deney sonlandırıldıktan sonra hayvanların testis ağırlıklarının, kontrol grubuna göre tüm gruplarda daha düşük olduğu görüldü ($p= 0,001$). Fakat üç deney grubunun kendi içlerindeki testis ağırlık farkları istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 2).

Tablo 2 : Deney sonrası testis ağırlıkları

	N	Testis ağırlığı (ortalama) $\pm$ SD/g
KONTROL	5	2,6280 $\pm$ 0,1785
MTX	7	2,0243 $\pm$ 0,2533
VEMTX	7	1,8986 $\pm$ 0,3036
LCMTX	7	1,7714 $\pm$ 0,1190

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Gruplara ait testis doku örneklerinde, spektrofotometrik olarak lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ve SOD değerleri tayin edildi (Tablo 3).

MTX verilen gruptaki hayvanların MDA değerleri diğer tüm gruplardan anlamlı derecede yüksekti ($p=0,001$). MDA değeri LCMTX grubunda, VEMTX grubundakinden daha büyüktü ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,059$). Ayrıca tüm deney grubundaki hayvanların MDA değeri kontrol grubundakilerden daha yüksekti ($p=0,001$).

Tablo 3. Gruplardaki MDA ve SOD Değerleri

GRUPLAR	MDA nmol/g ortalama $\pm$ SD	SOD U/g ortalama $\pm$ SD
KONTROL	9,45 $\pm$ 0,947	131,20 $\pm$ 8,843
MTX	14,08 $\pm$ 1,712	96,29 $\pm$ 10,144
VEMTX	10,73 $\pm$ 1,684	123,00 $\pm$ 2,646
LCMTX	12,17 $\pm$ 0,592	115,00 $\pm$ 5,066

SOD değerlerine bakıldığında; MTX grubu SOD değeri diğer gruplardakinden anlamlı derecede daha düşüktü ($p<0,001$). VEMTX grubundaki SOD değeri, LCMTX grubundaki değerle karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde daha düşüktü ($p=0,048$). Kontrol grubu SOD değerleri diğer tüm gruplardan yüksek olmasına rağmen VEMTX grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak bulunan fark anlamlı değildi ($p=0,063$). Fakat diğer iki gruptan (MTX, LCMTX) anlamlı ölçüde yüksek olduğu görüldü.

4.3. Histolojik Bulgular

Kontrol grubunda normal seminifer tübüller gözlendi (Tablo 4). Deney gruplarında değişik derecelerde çeşitli histopatolojik bulgulara rastlandı. Gözlenen histopatolojik değişiklikler 6 parametrede sınıflandırarak bulguların şiddeti 0-4 arasında derecelendirildi.

Her bir grupta tüm parametrelerindeki toplam hasara bakıldığında, MTX'in belirgin bir hasara yol açtığı gözlendi ($p<0,0001$). Keza VEMTX ve LCMTX gruplarında da kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı hasar vardı ($p<0,001$ ve $p<0,0001$). Ancak bu iki gruptaki hasar indeksi MTX grubundan daha düşüktü. Böylece toplam hasara bakıldığında VEMTX ($p=0,0049$) ve LCMTX ($p=0,0278$), MTX'in sebep olduğu hasarı azaltmıştı (Tablo 4).

Tablo 4. Kontrol ve deney gruplarındaki toplam histopatolojik hasar indeksi değerleri.

	N	Toplam Hasar İndeksi ortalama $\pm$ SD
Kontrol	5	0.0183 $\pm$ 0,0425
MTX	7	0.9736 $\pm$ 0,6183
VEMTX	7	0.4921 $\pm$ 0,4308
LCMTX	7	0.5648 $\pm$ 0,4228

MTX'in yol açtığı hasarlar ile E vitamini ve L-karnitinin koruyuculuğunun hangi parametreleri ne kadar etkilediğini ortaya koymak için istatistiksel analizler yapıldı. Ayrıca sonuçlar şekil 4.'de grafik olarak gösterilmiştir.

Altı alt sınıfa ayırdığımız parametreleri A-B-C-D-E-F harfleriyle gösterdik (şekil.4) Bu parametreleri  zet olarak değerlendirirsek:

A. Germ hücrelerinde azalma: MTX grubundaki hasar düzeyi kontrol grubundan anlamlı derecede yüksekti ($p= 0,000048$). VEMTX grubunda hasar şiddetinin anlamlı olarak azaldığı gözlendi ($p=0,0294$). LCMTX grubunda da hasarda

bir azalma var ise de bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,1208$). Ancak VEMTX grubu ile LCMTX grubu arasında da anlamlı fark yoktu.

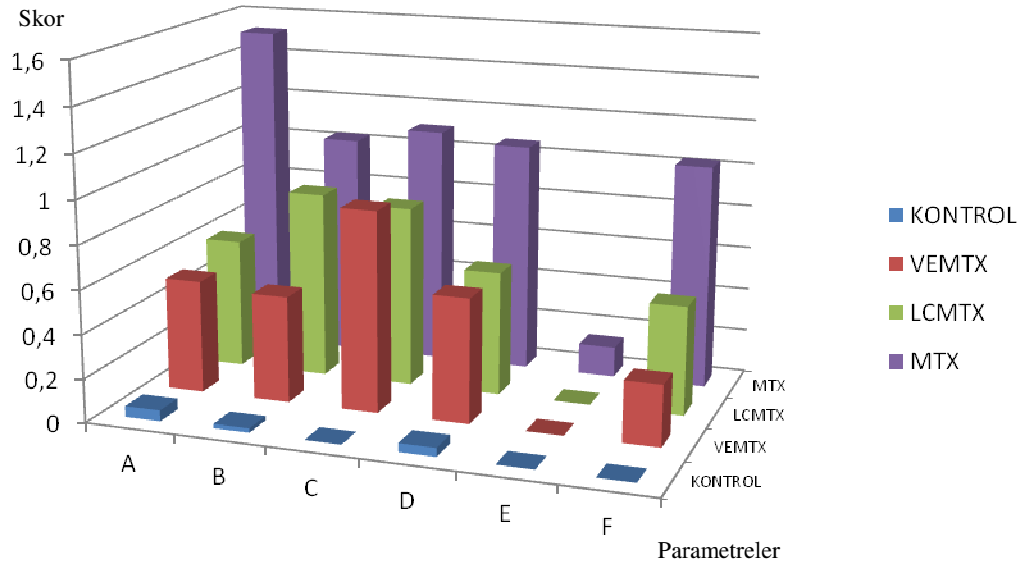
B. İnterstisyel alanda ödem: Bu parametrede de MTX grubundaki hasar düzeyi kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklı bulundu ($p=0,0018$). Diğer iki deney grubundaki hasar şiddeti MTX grubundakinden düşükse de istatistiksel anlamlılık yoktu. Vitamin E verilen gruptaki hasar şiddeti kontrol grubundan da farklı değildi. LCMTX ise kontrol grubuna göre daha fazla bir hasar şiddetine sahipti ($p=0,0190$). Bu parametredeki hasarı E vitamini daha güçlü engellemişti.

C. İnterstisyel alanda konjesyon: Bu parametrede de MTX grubu kontrol grubundan anlamlı düzeyde fazla hasar şiddetine sahipti ($p=0,0022$). VEMTX grubunda hasar şiddeti kontrol grubundan daha fazlaydı ($p=0,0299$). LCMTX grubu ise kontrole daha yakın bir hasara sahipti ve istatistiksel olarak kontrol grubuyla arasında fark yoktu ($p= 0,1143$). Bir diğer deyişle istatistiksel anlam olmamakla beraber LCMTX verilen hayvanlar bu parametre açısından daha iyi korunmuştu.

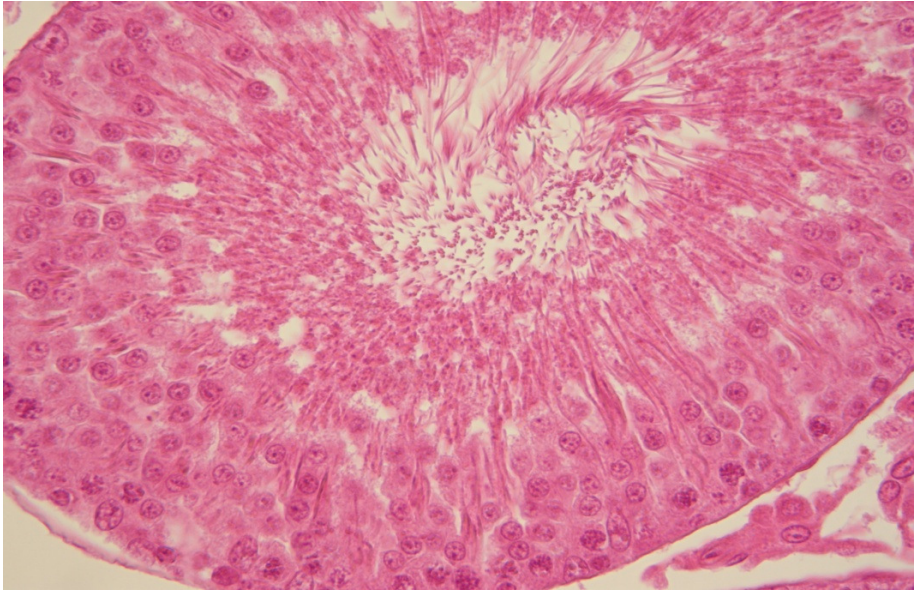
D. Hücrelerde vakuol: Bu parametremiz için MTX grubu kontrol grubundan anlamlı düzeyde şiddetli hasara sahipti ($p=0,0140$). VEMTX ve LCMTX gruplarında bir miktar hasar görülmekle beraber kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı değildi (her ikisi için de $p= 5677$).

E. Bazal laminada ayrılma: Bu parametremiz için MTX grubunda sadece 3 denekte bu hasar örneklerine rastladık. Diğer gruplarda bazal laminada ayrılmaya rastlanmadı.

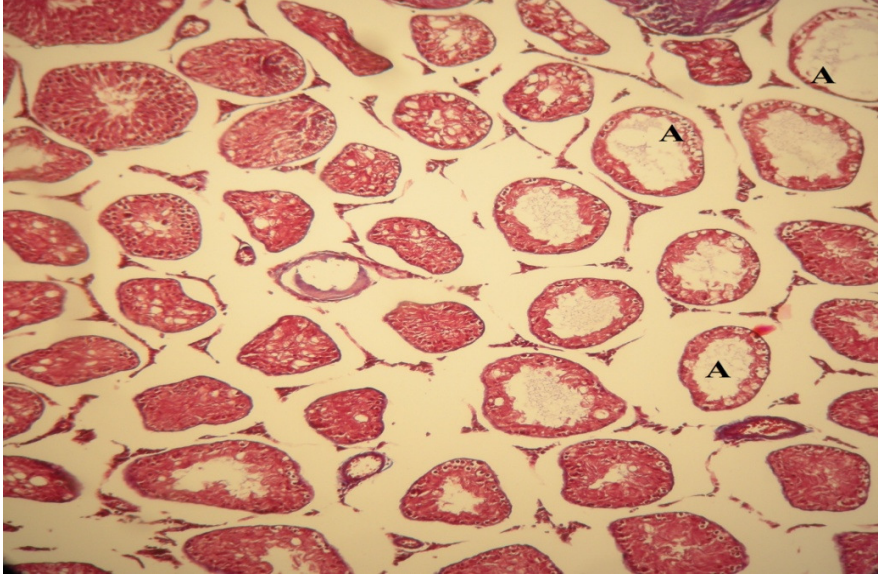
F. Spermatidlerin kaynaşarak oluşturduğu dev hücreler: MTX grubundaki dev hücreler kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede fazlaydı ($p= 0,0139$). Diğer gruplarda da az sayıda bu hücrelere rastlanmakla birlikte kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı değildi (VEMTX: $p=0,9345$, LCMTX: $P=0,1804$).



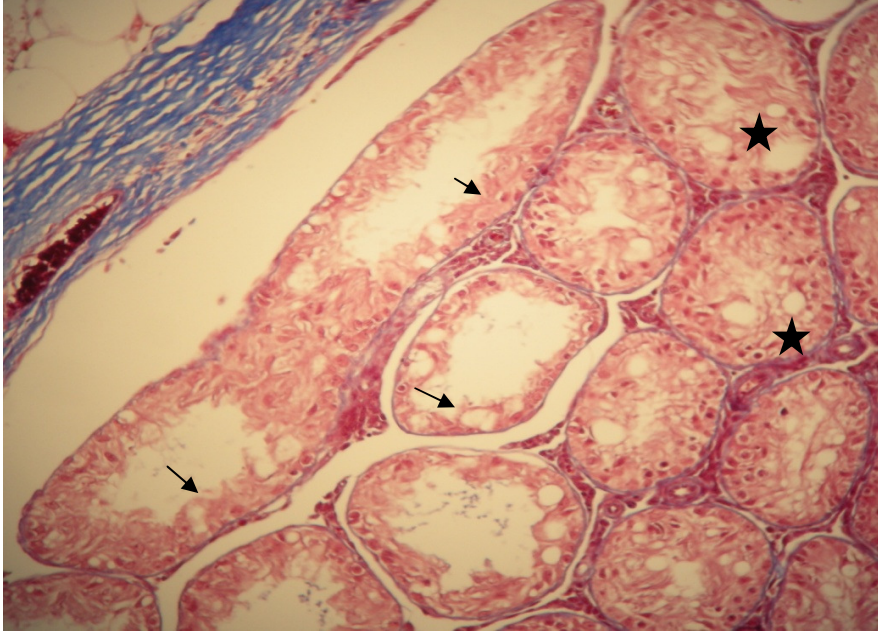
Şekil 4: Gruplardaki her bir parametrenin ortalama hasar skorları



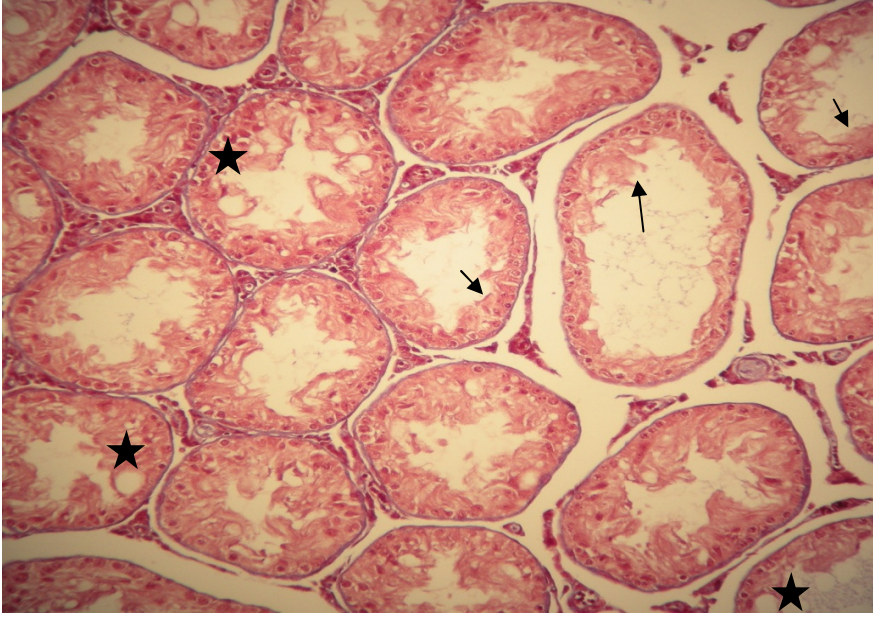
Resim 1. Kontrol grubu normal seminifer tübül. HE, X 400



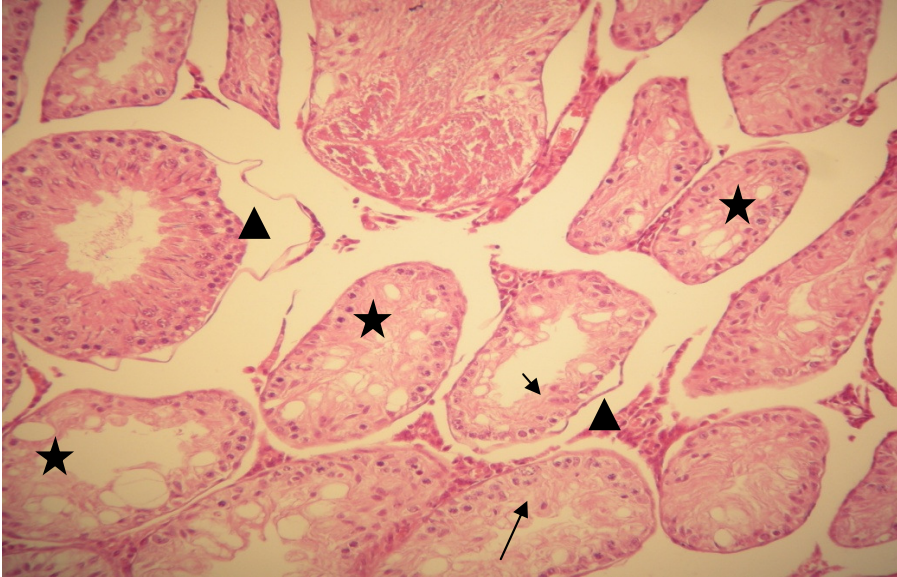
Resim 2. MTX grubu A: germ hücrelerinde azalma. Masson, X 100



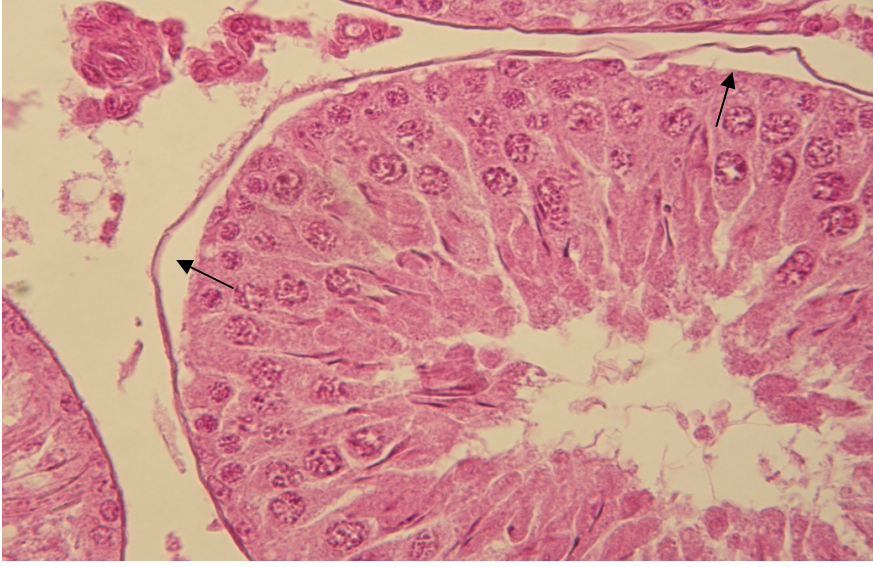
Resim 3. MTX grubu —→ germ hücrelerinde azalma ★ vaküolizasyon. Masson, X 200



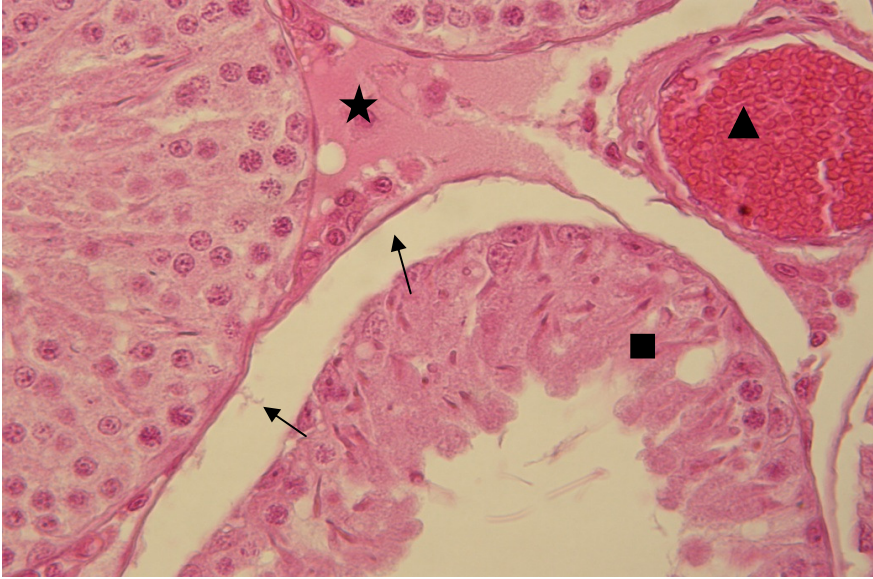
Resim 4. LCMTX grubu —→ germ hücrelerinde azalma ★ vakuolizasyon. Masson, X 200



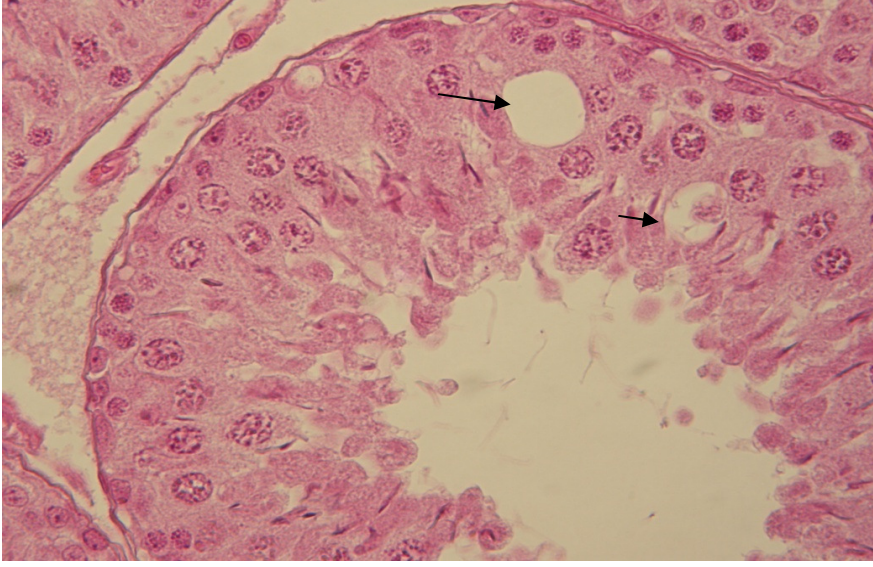
Resim 5. MTX grubu ▲ bazal laminada ayrılma ★ bazı seminifer tübüllerde vakuolleşme —→ germ hücrelerinde azalma. HE, X 200



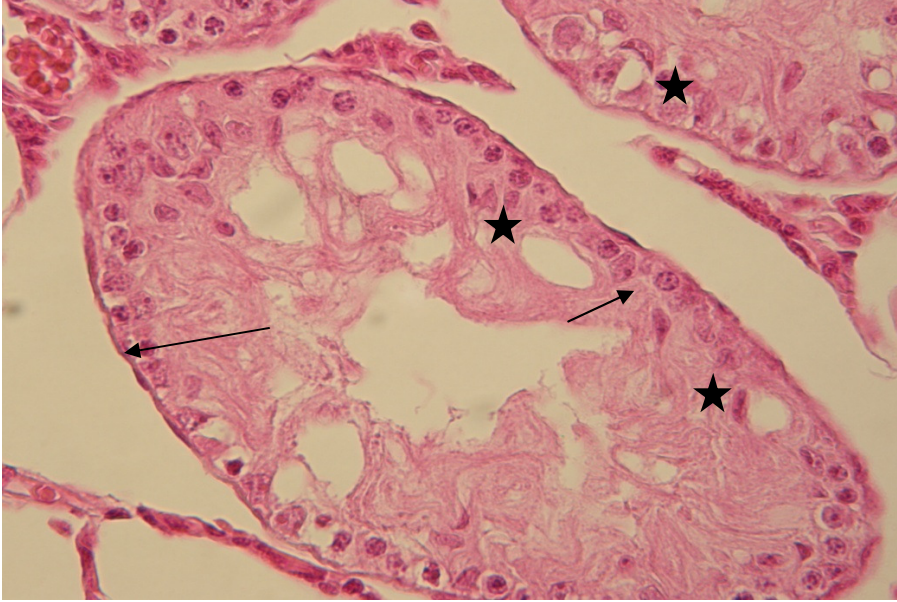
Resim 6. MTX grubu → bazal laminada ayrılma. HE, X 400



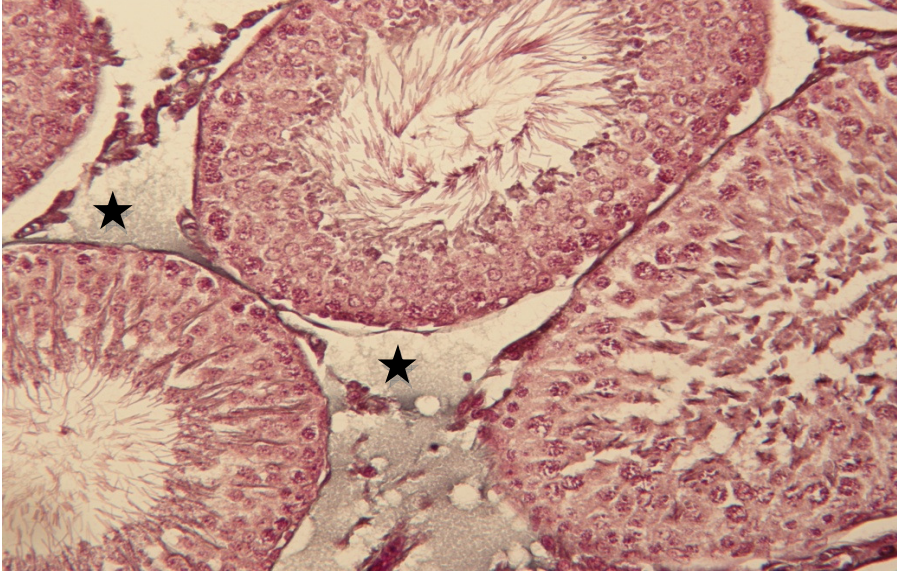
Resim 7. LCMTX grubu ★ intersistiyal alanda ödem → bazal laminada ayrılma
konjesyon▲ vakuolleşn■. HE, X 400



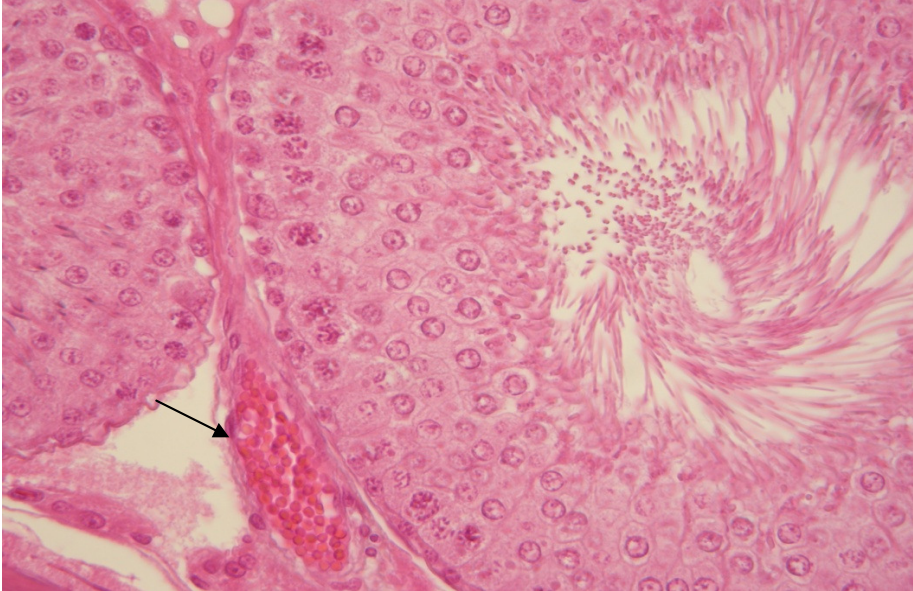
Resim 8. VEMTX grubu → vakuolizasyon. HE, X 400



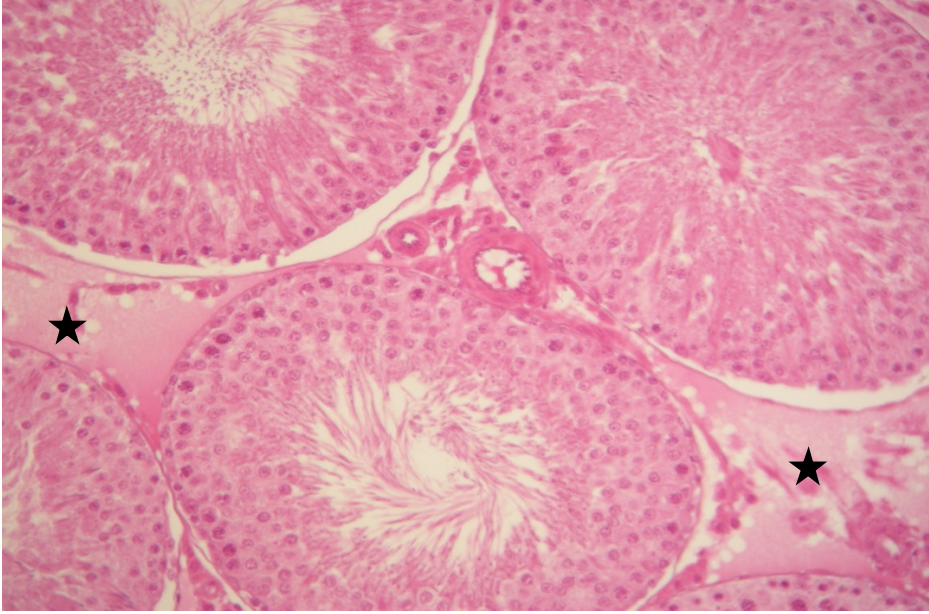
Resim 9. LCMTX grubu → germ hücrelerinde azalma ★ vakuol.
HE, X 400



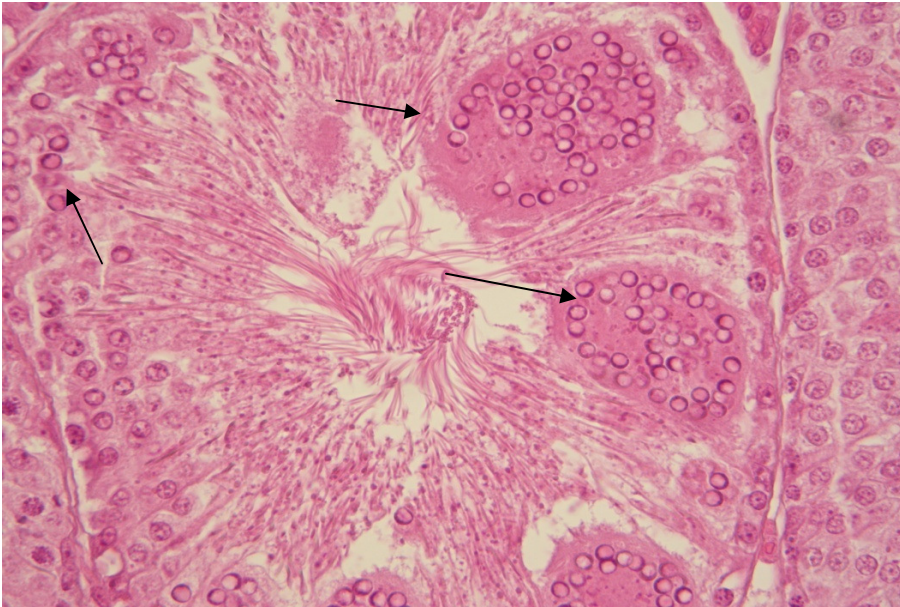
Resim 10. VEMTX grubu ★ İntersistiyal alanda ödem. Masson, X 200



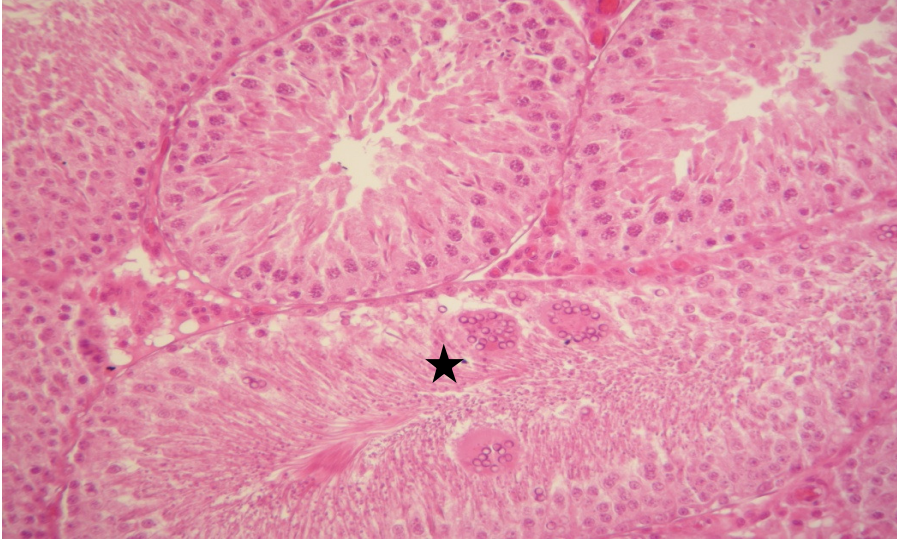
Resim 11. VEMTX grubu → konjesyon. HE, X 400



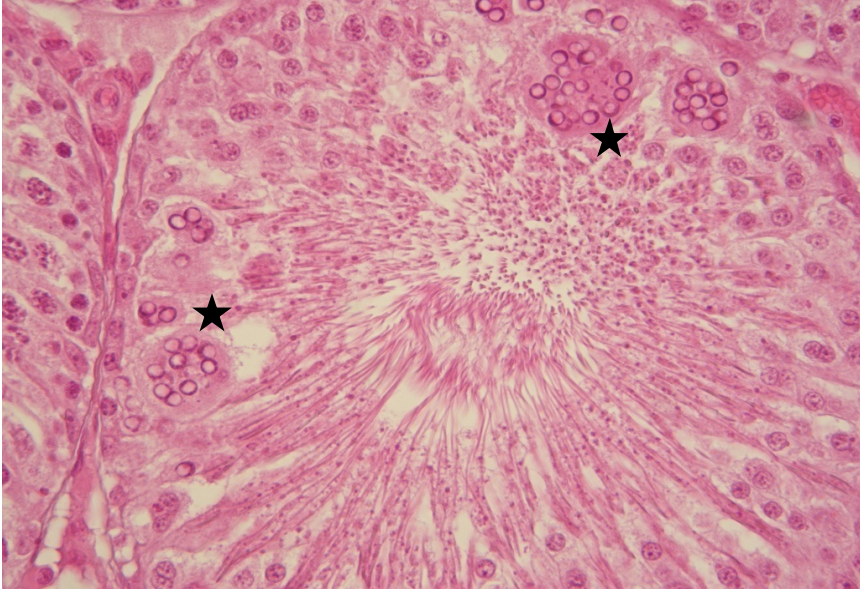
Resim 12. VETMX grubu ★ intersistiyal alanda ödem. HE, X 200



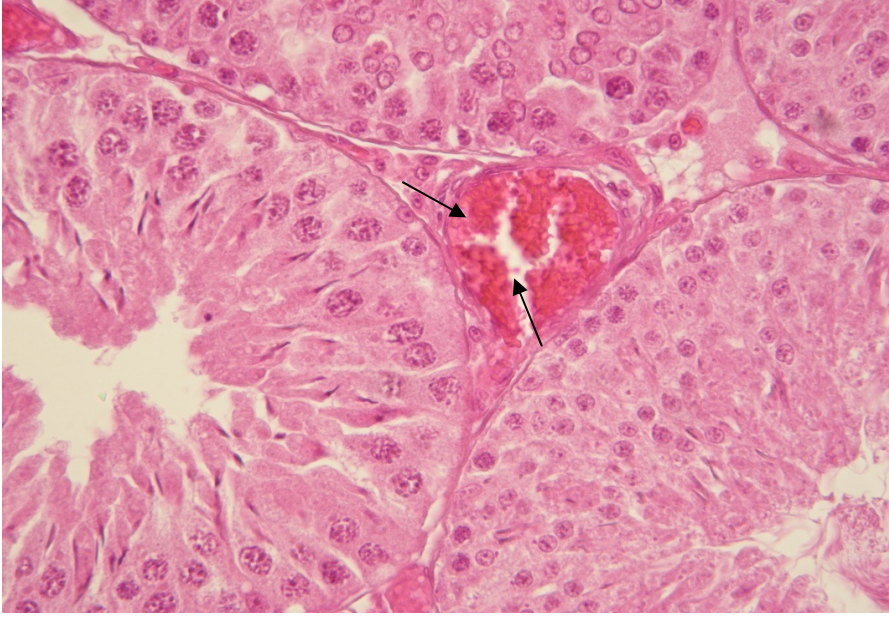
Resim 13. MTX grubu → spermatidlerin kümeleşmesi sonucu ortaya çıkmış dev hücreler. HE, X 400



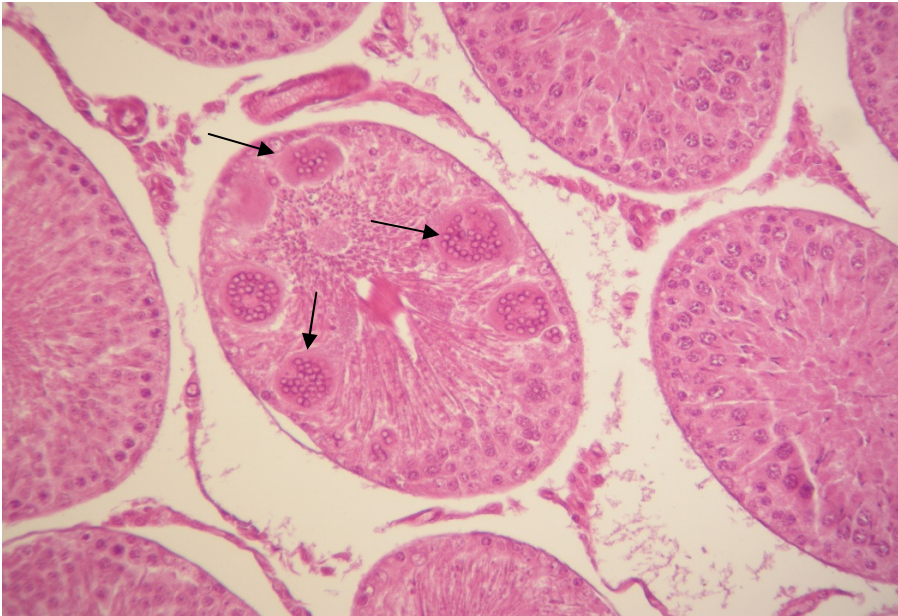
Resim 14. LCMTX grubu ★ dev hücreler. HE, X 200



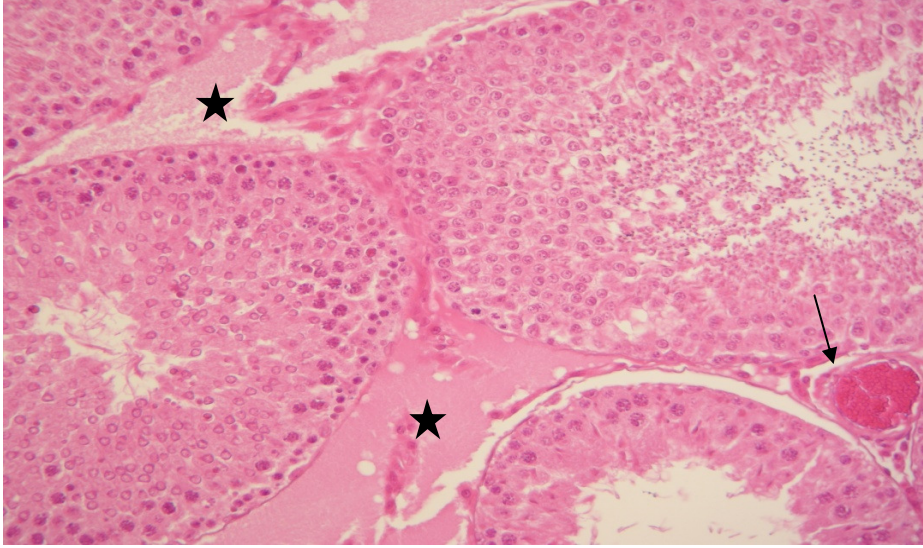
Resim 15. LCMTX grubu ★ dev hücreler. HE, X 400



Resim 16. VEMTX grubu → konjesyon. HE, X 400



Resim 17. VEMTX grubu → dev hücreler. HE, X 200



Resim 18. LCMTX grubu ★ intersistiyal alanda ödem → konjesyon.
HE, X200

4.4 Elektron Mikroskopik Bulgular

4.4.1. Kontrol Grubu

Kontrol grubuna ait sıçan testis doku örneklerinin elektron mikroskopik olarak incelenmesinde membrana proprianın normal yapıda olduğu gözlemlendi. Membrana propria, bazal lamina, kollajen lifler ve myoid hücrelerden oluşmaktaydı. Membrana proprianın iç hücresel tabakasında ince, uzun şekilli myoid hücreler bulunmaktaydı. Myoid hücrelerin etrafında kollajen lif demetlerinin varlığı gözlemlendi. Membrana proprianın iç hücresel olmayan tabakası üzerinde seminifer tübülde yer alan Sertoli hücrelerinin ve spermatogenik hücrelerin varlığı izlenmekteydi (Şekil 19).

Seminifer tübüllerin bazal laminası üzerine oturmuş olan Sertoli hücrelerinin bir tarafında derin bir çöküntüye sahip çekirdeği içerisinde belirgin bir çekirdekçik yer almaktaydı (Şekil 19). Sertoli hücrelerin sitoplazmasında çok iyi gelişmiş agranüler endoplazmik retikülüm sisternaları, belirgin Golgi kompleksi, az gelişmiş granüler

endoplazmik retikülüm sisternaları, lipid damlacıkları ve tübüler tip mitokondriyonlar izlenmekteydi.

Komşu Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantı kompleksleri yer almaktaydı. Bu bağlantı kompleksinin altında, bazal lamina üzerine oturmuş olan spermatogoniumlar bulunmaktaydı. Spermatogoniumların merkezi yerleşmiş yuvarlak çekirdekleri ve sitoplazmalarında dağınık halde bulunan mitokondrileri vardı (Resim 19).

Seminifer tübülün orta kısımlarında, spermatogoniumlardan daha büyük hücreler olan primer spermatositler yer almaktaydı (Resim 19 ve 20). Primer spermatositler, Sertoli hücrelerinin sitoplazması ile sarılmışlardı. Primer spermatositlerin çekirdekleri içerisinde, bölünmeyi simgeleyen sinaptonemal komplekslerin varlığı izlenmekteydi. Sekonder spermatositlerin orta derecede elektron dansiteye sahip olduğu görülmekteydi. Bu hücrelerin sitoplazmalarında mitokondriler ve çekirdeğin bir kutbuna yakın yerleşmiş Golgi kompleksi izlenmekteydi. Sekonder spermatositlerin üzerinde ve lümene yakın olarak yerleşim gösteren spermatidler bulunmaktaydı. Spermatidlerde çekirdek ve sitoplazmik organeller normal görünümdeydi. Seminifer tübülün apikal kısımlarında spermatozoonlar normal olarak izlenmekteydi. Spermatozoonların baş kısmı içerisinde, yoğun halde kromatin içeren, yassılaştırmış çekirdek, ayrıca çekirdeğin anterior kısmında akrozom bulunmaktaydı (Resim 20).

Seminifer tübüllerin aralarında yer alan Leydig hücreleri tek tek veya gruplar halinde seçildi. Hücrelerde oval ya da yuvarlak bir adet çekirdeğin varlığı gözlemlendi. Çekirdek kılıfı yer yer çekirdek içerisine doğru derin invajinasyonlar göstermekteydi. Sitoplazmada gelişmiş agranüler endoplazmik retikülüm sisternaları, tübüler krista içeren mitokondriler ve lipid damlacıkları belirgin olarak izlenmekteydi (Resim 21).

4.4.2. MTX Grubu

Metotreksat uygulanmış deney gruplarından alınan testis doku örneklerinin elektron mikroskopik olarak incelenmesinde, seminifer tübül etrafını saran membrana propriyada kalınlaşma olduğu, kollajen lif miktarının arttığı, bazal laminanın kalınlaştığı ve düzensizleştiği izlenmekteydi (Resim 22).

Sertoli hücreleri arasında, hücreler arası mesafenin arttığı, çeşitli büyüklüklerde düzensiz sarmalsı membranöz yapıların bulunduğu boşlukların oluştuğu görülmekteydi.

Sertoli hücrelerinin sitoplazmik dansitesinin arttığı, çekirdek içerisinde periferik yerleşimli heterokromatin kümeleşmesi bulunduğu, sitoplazmaları içerisinde agranüler endoplazmik retikülüm sisternalarının genişlediği, lizozomların ve lipid damlacıklarının arttığı gözlemlendi (Resim 22). Bunların yanında sitoplazmada farklı büyüklüklerde vakuollerin bulunduğu dikkati çekmekteydi.

Bazal lamina üzerinde yer alan spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri arasında hücreler arası aralıkların genişlediği, hücrelerin birbirlerinden ayrıldıkları izlenmekteydi. Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları içerisinde, dağınık, elektron dens yapılar şeklinde görülen litik alanların varlığı dikkati çekmekteydi (Resim 23).

İnterstisyel alanda yer alan Leydig hücreleri, makrofajlar ve kapillerler kontrol grubu ile benzer özelliklerde izlenmekteydi (Resim 24).

4.4.3. LCMTX Grubu

LCMTX grubundan alınan testis dokularının elektron mikroskopik olarak incelenmesinde, membrana propria yapısının kontrol grubu ile benzer özelliklere sahip olduğu görülmekteydi (Resim 25).

Sertoli hücrelerinin arasında yer alan sıkı bağlantı kompleksleri ve çekirdekleri normal görünümde izlenmekle birlikte, bu hücrelerin sitoplazmaları içerisinde agranüler endoplazmik retikülüm sisternalarında genişlemeler olduğu, lizozomlarda ve lipid damlacıklarında artış bulunduğu dikkati çekmekteydi (Resim 26).

Sertoli hücrelerinin arasında bulunan spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatozoonlar kontrol grubu ile benzer özelliklerdeydi (Resim 25 ve 27).

İnterstisyel alanda yer alan Leydig hücreleri ve kapillerler kontrol grubundan farklı değillerdi (Resim 28).

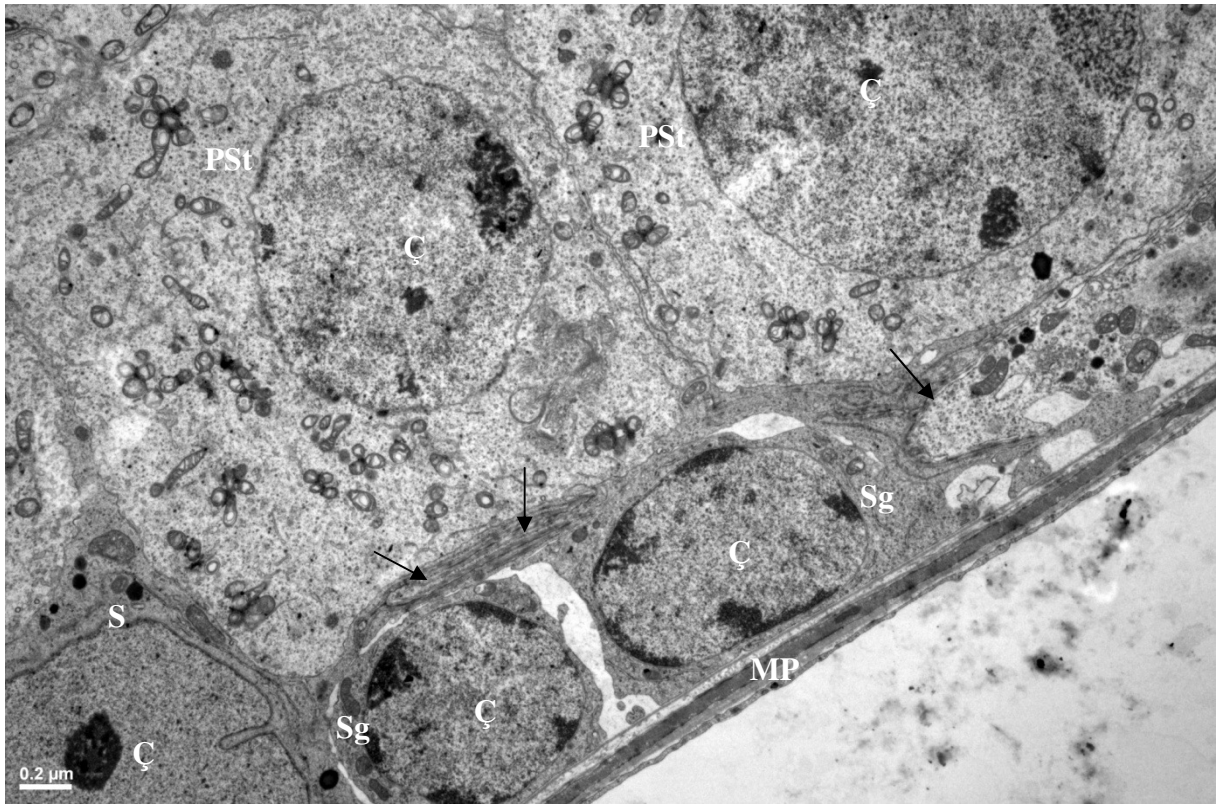
4.4.4. VEMTX Grubu

VEMTX grubundan alınan testis dokularının elektron mikroskopik olarak incelenmesinde, membrana propriyanın kontrol grubu ile benzer özelliklere sahip olduğu gözlemlendi (Resim 29).

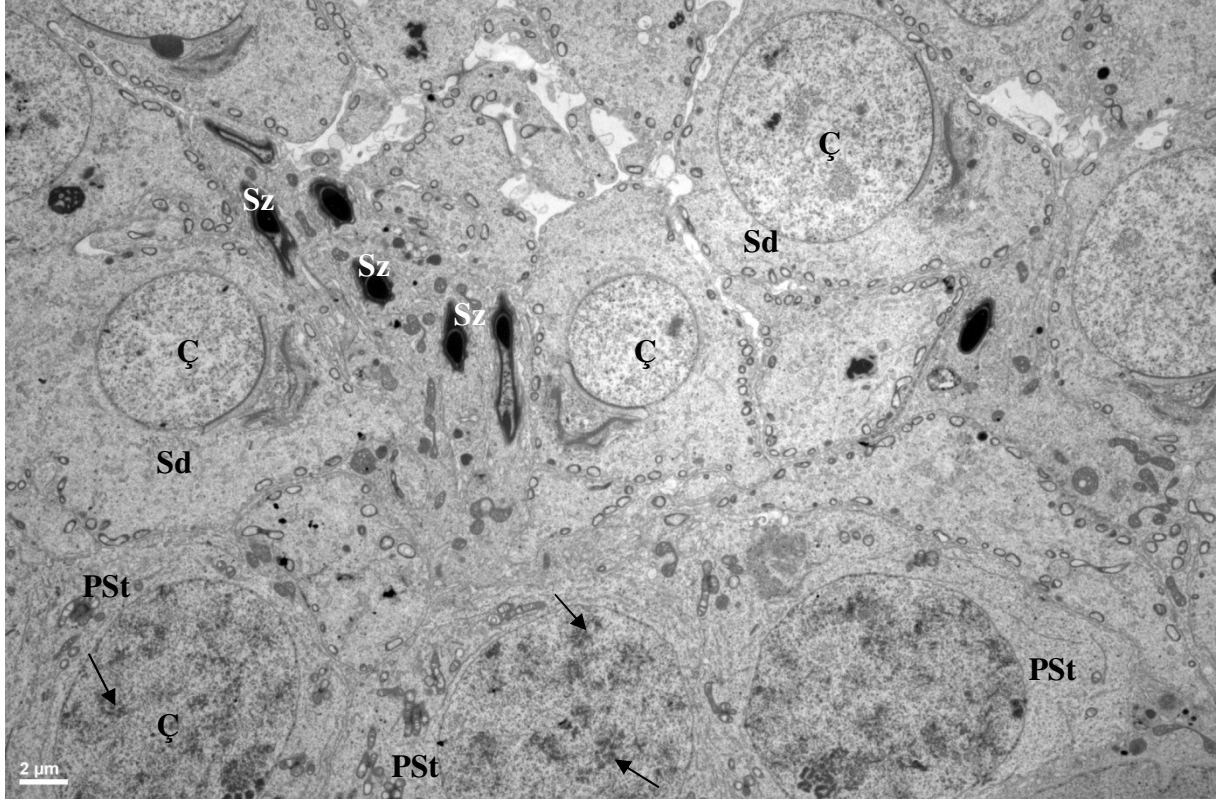
Sertoli hücrelerinin yer yer bazal laminadan ayrıldığı, Sertoli hücreleri arasında, hücreler arası mesafenin arttığı, çeşitli büyüklüklerde boşlukların olduğu ve bu boşluklarda sarmalimsi membranöz yapıların bulunduğu izlenmekteydi. Hücre çekirdeklerinde

periferal yerleşimli heterokromatin kümeleri olduğu, sitoplazmaları içerisinde agranüler endoplazmik retikülüm sisternalarında genişlemeler bulunduğu, lizozomların ve lipid damlacıklarının arttığı görülmektedir. Ayrıca Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları içerisinde, dağınık, elektron dens yapılar şeklinde görülen litik alanların varlığı dikkati çekmekteydi (Resim 29 ve 30).

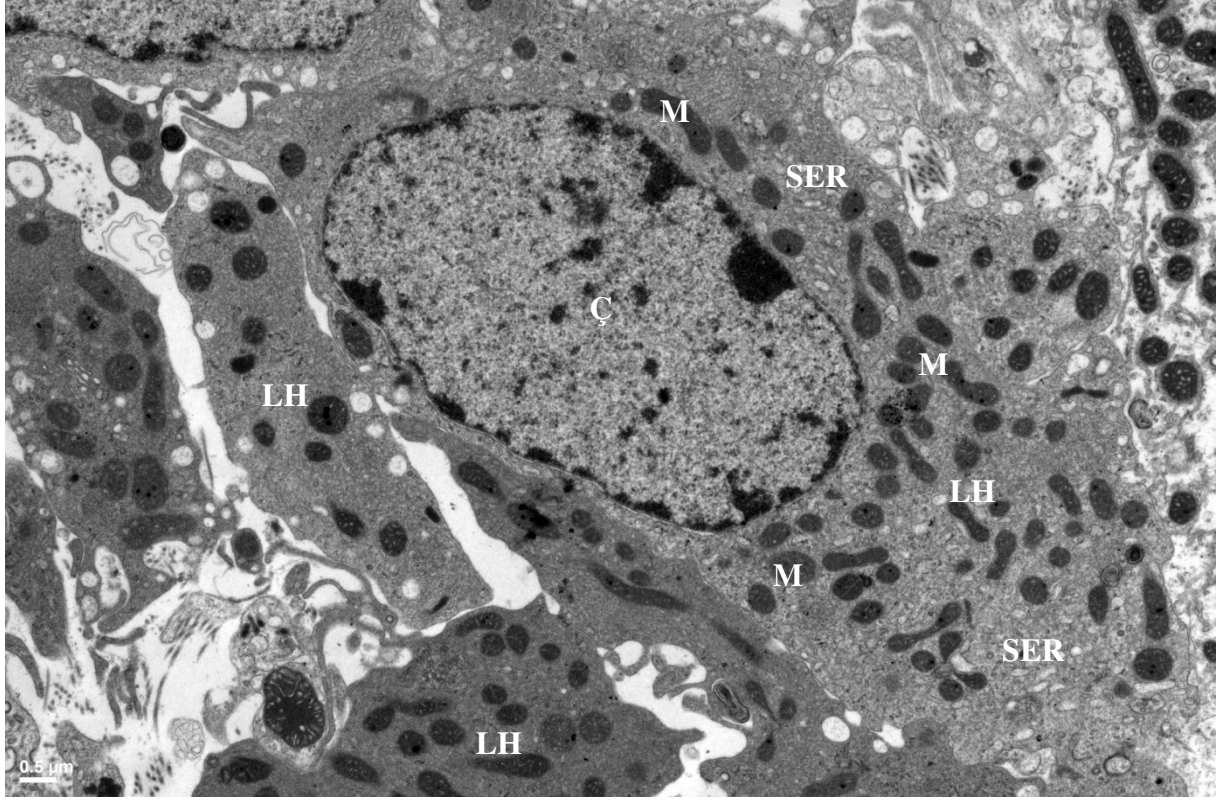
İnterstisyel alan içerisinde yer alan Leydig hücreleri, makrofajlar ve kapillerler normal görünümde bulunmaktaydı (Resim 31).



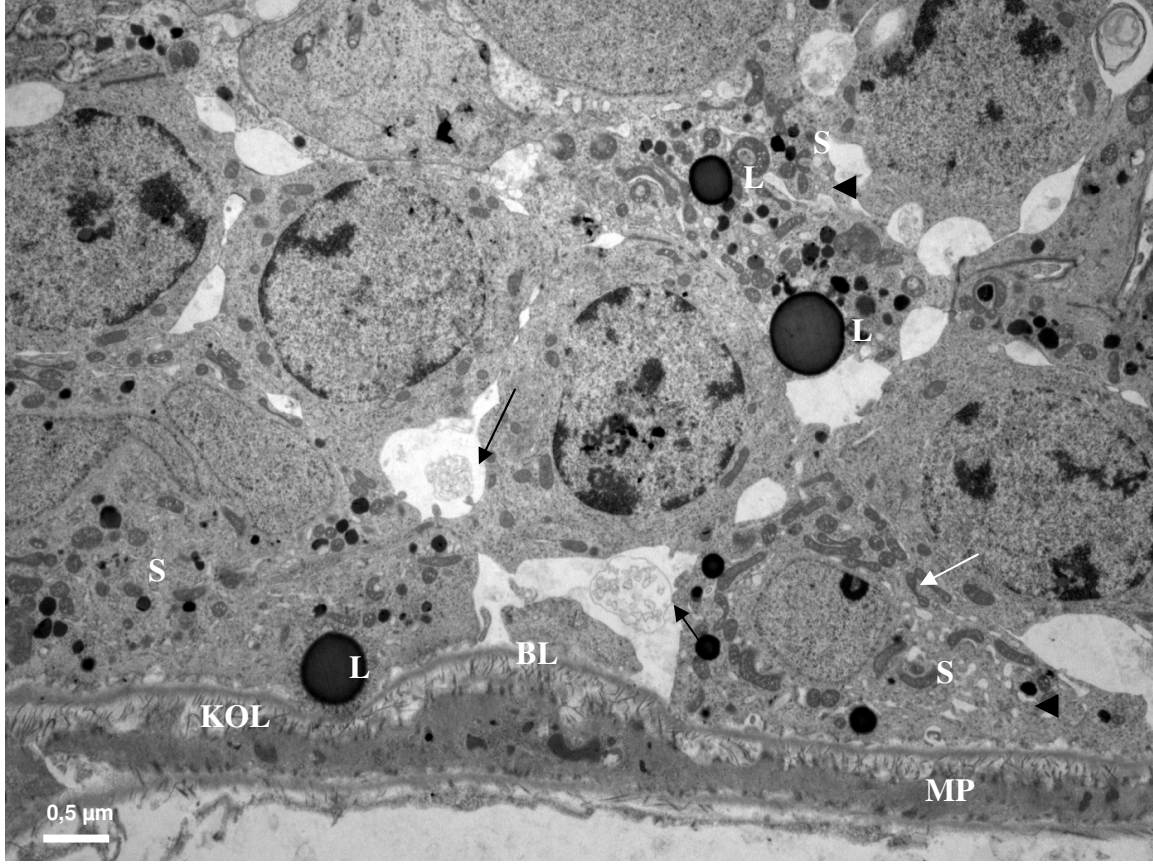
Resim 19: Kontrol Grubu. Seminifer tübüleri çevreleyen membrana proprianın (MP) normal yapıda olduğu gözlenmektedir. Membrana proprianın üzerinde seminifer tübülde yer alan Sertoli hücreleri (S), spermatogoniyumlar (Sg) ve primer spermatositler (PSt) izlenmektedir. Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantı kompleksleri (ok) normal olarak izlenmektedir. Çekirdek (Ç). Bar=0,2 µm.



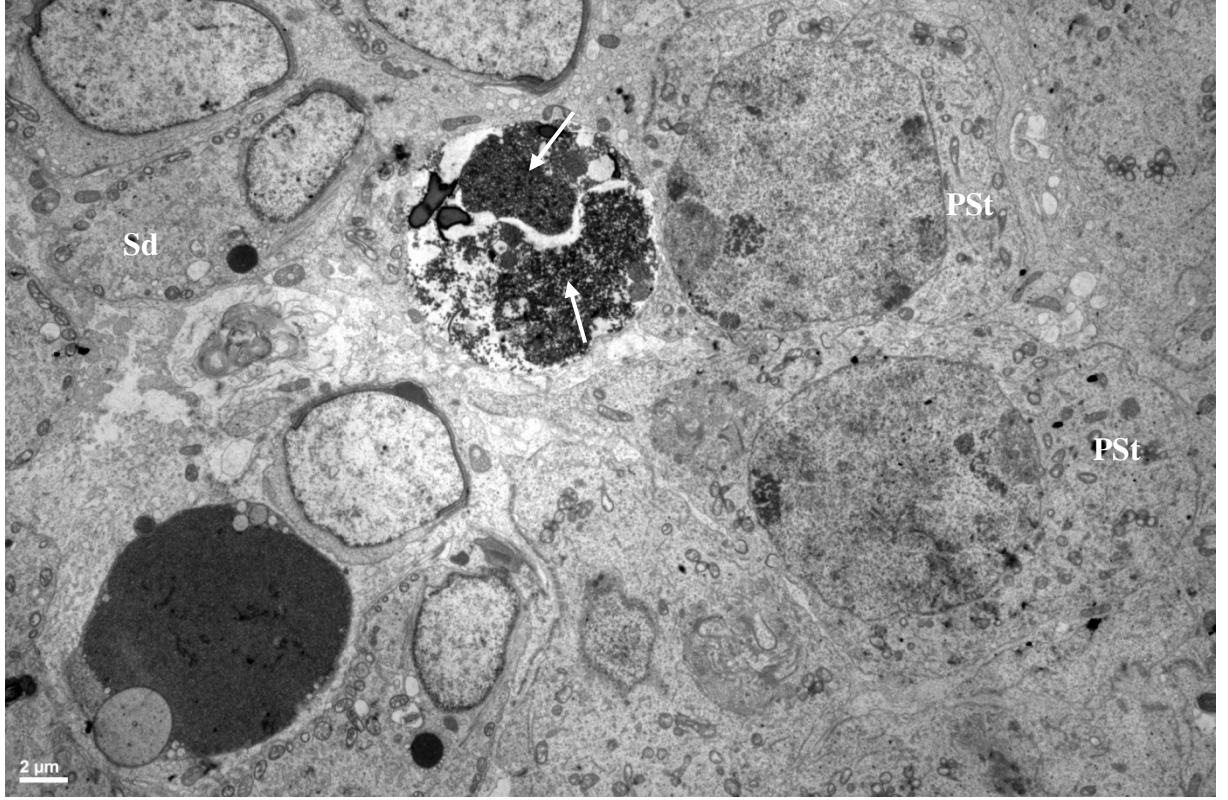
Resim 20: Kontrol Grubu. Normal görünümlü primer spermatositler (PSt), spermatidler (Sd) ve spermatozoonlar (Sz) ,Çekirdek (Ç), sinaptonemal kompleks (ok). Bar=2 µm.



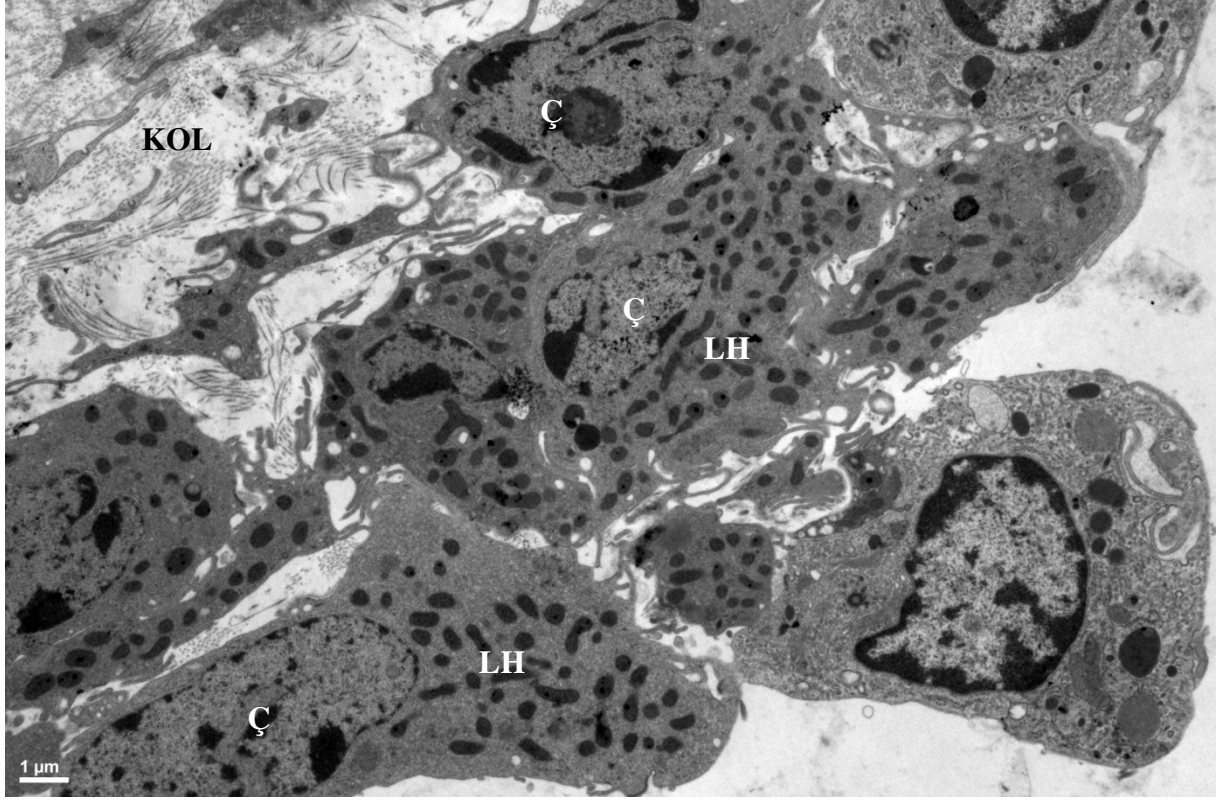
Resim 21: Kontrol Grubu. İnterstisyel alanda yer alan Leydig hücrelerinin (LH) sitoplazması içerisinde tübüler yapıda kristalara sahip mitokondriler (M) ve agranüler endoplazmik retikülüm sisternaları (SER), Çekirdek (Ç). Bar=0,5 µm.



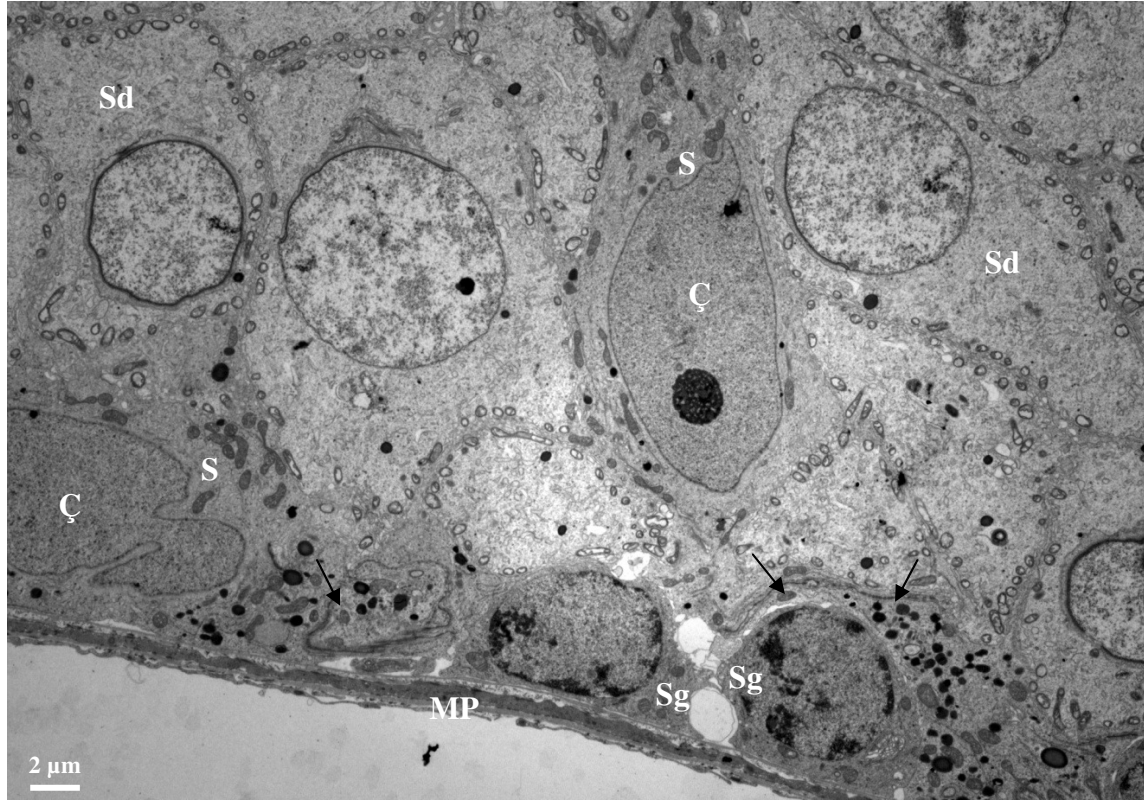
Resim 22: MTX Grubu. Seminifer tübül etrafını saran kalınlaşmış membrana propriya (MP), artmış kollajen lif (KOL), kalınlaşmış bazal lamina (BL), Sertoli hücreleri (S) arasındaki mesafeler artmış, çeşitli büyüklükte boşluklar oluşmuş ve bu boşlukların bazılarında sarmalimsi membranöz yapılar (siyah ok) gelişmiş, Sertoli hücrelerinin çekirdeği içerisinde çevresel yerleşimli heterokromatin kümeleşmesi (beyaz ok), genişlemiş agranüler endoplazmik retikülüm sisternaları (ok başı), artmış lizozomlar ve lipid damlacıkları (L) görülmektedir. Bar=0,5 μ m.



Resim 23: MTX Grubu. Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları içerisinde, dağınık elektron dens yapılar şeklinde görülen litik alanlar (beyaz ok) gözlenmektedir. PSt: Primer spermatosit, Sd: spermatid. Bar=2 μ m.

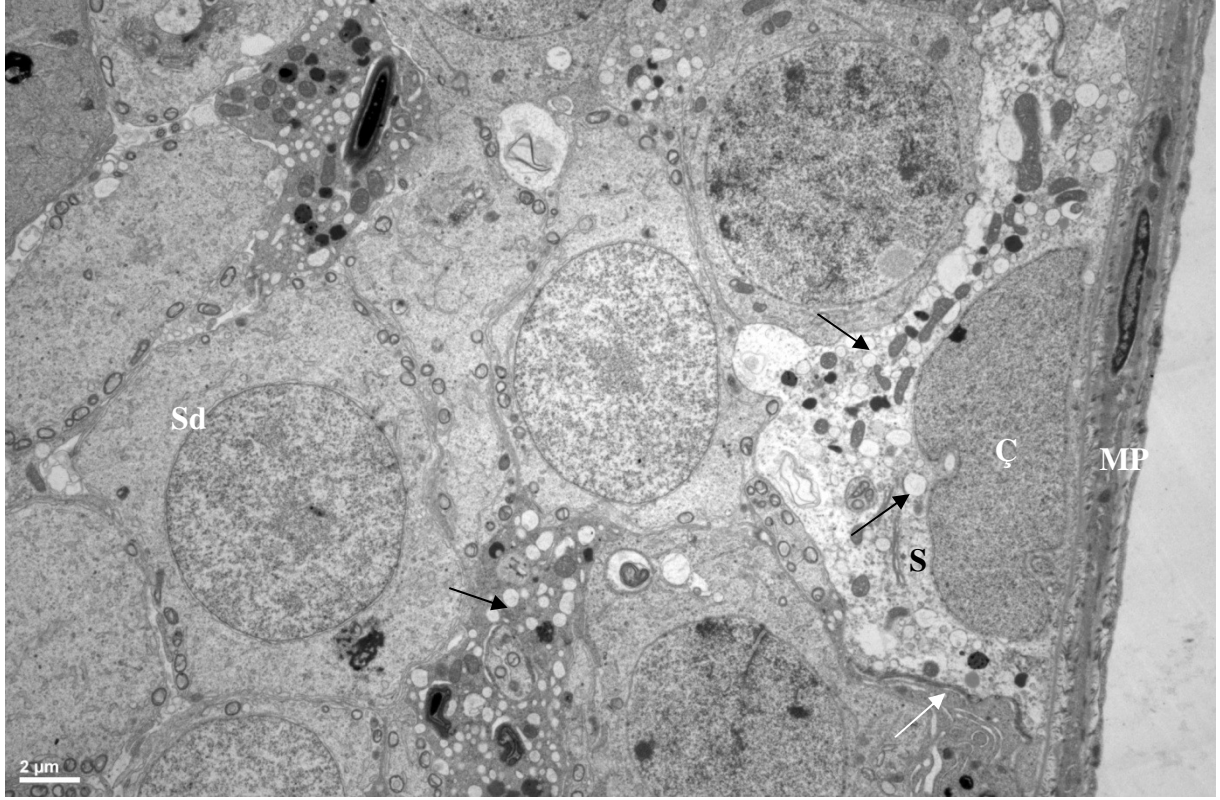


Resim 24: MTX Grubu. Normal görünümde Leydig hücreleri (LH) görülmektedir.
Ç: Çekirdek, KOL: kollajen lifler. Bar=1 µm.

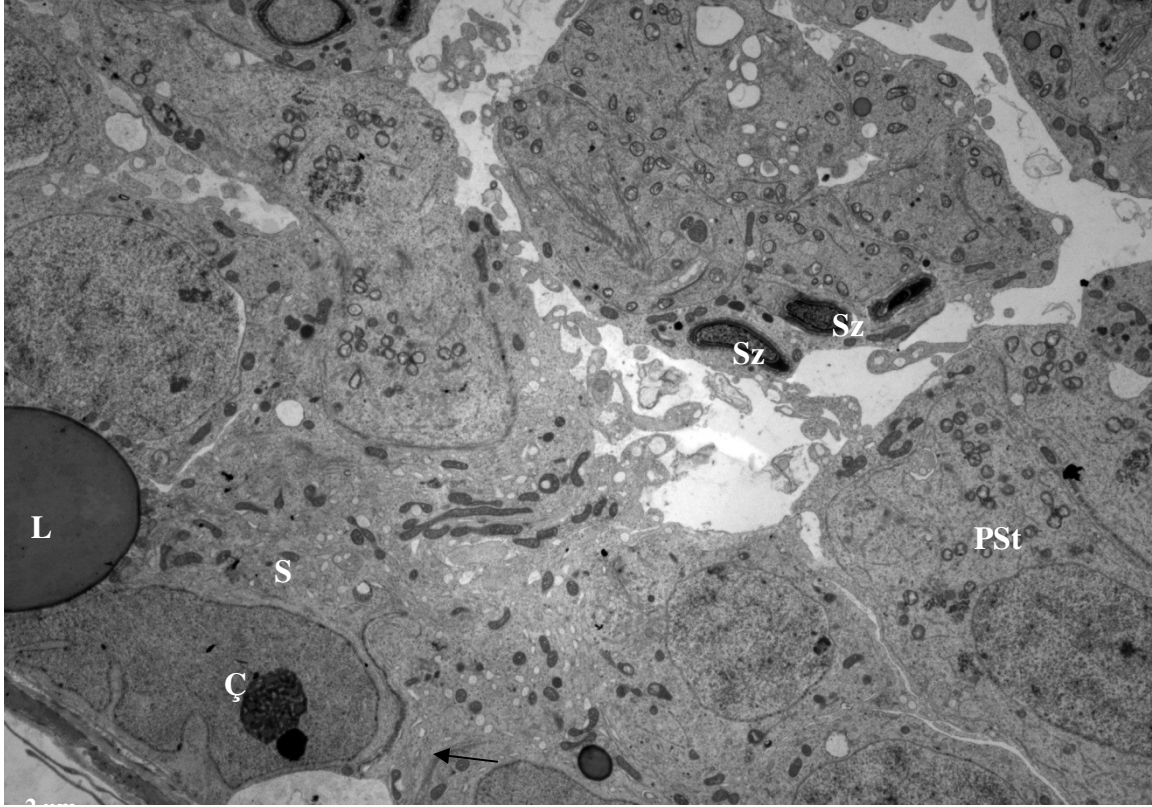


Resim 25 : LCMTX Grubu. Membrana propriyanın, Sertoli hücreleri (S) arasındaki sıkı bağlantı kompleksleri (ok), ve çekirdek (Ç) yapılarının normal olduğu izlenmekte.

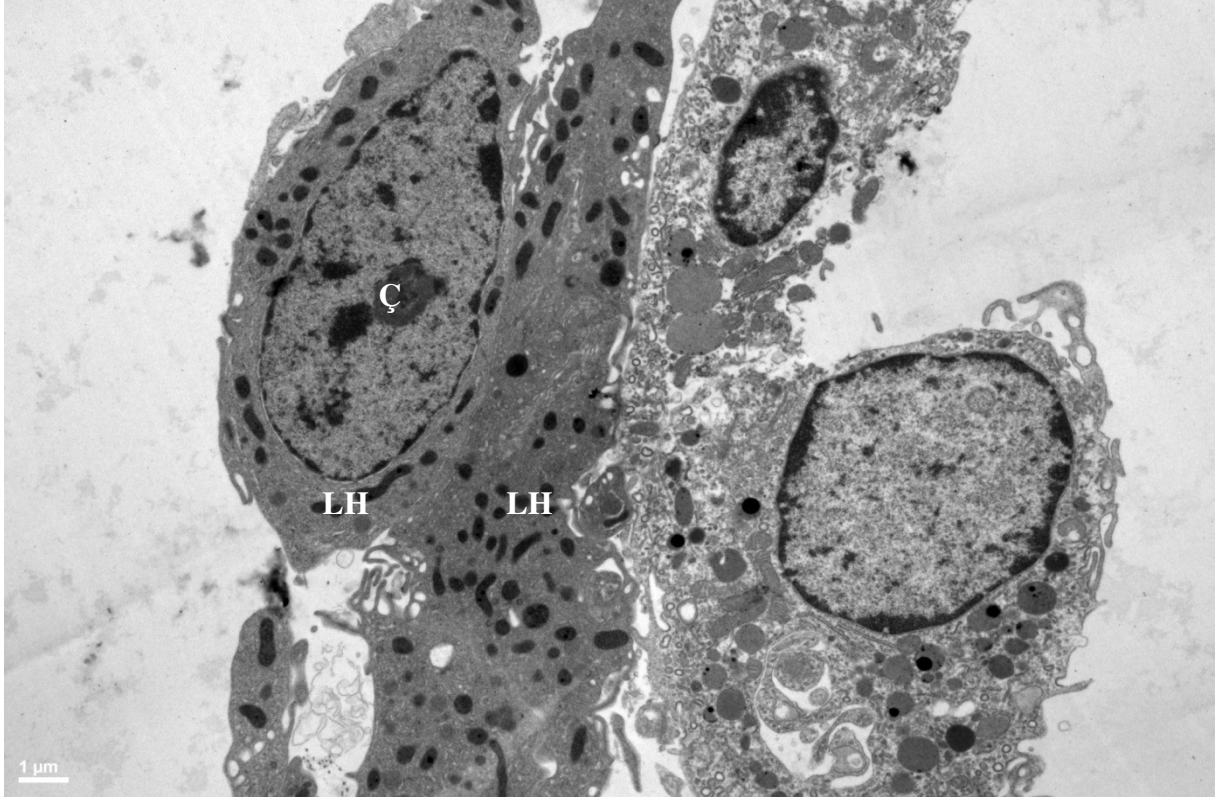
Sg: spermatogonium, Sd: spermatidler, MP: membrana propria. Bar=2 µm.



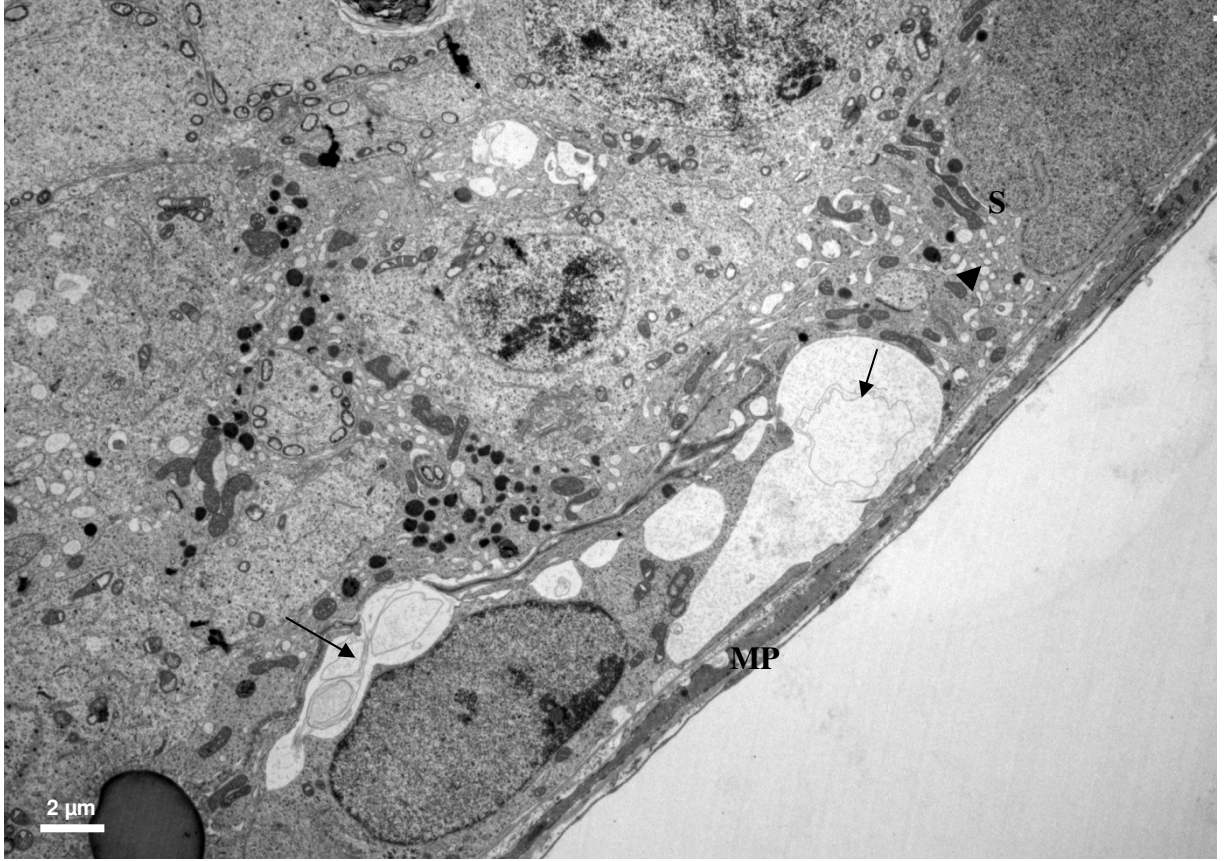
Resim 26 : LCMTX Grubu. Sertoli hücreleri (S) arasındaki sıkı bağlantı kompleksleri (beyaz ok), ve çekirdek (Ç) yapıların normal olduğu, agranüler endoplazmik retikülüm sisternalarının (siyah ok) genişlediği görülmekte. MP: Membrana propria, Sd: Spermatid. Bar=2 µm.



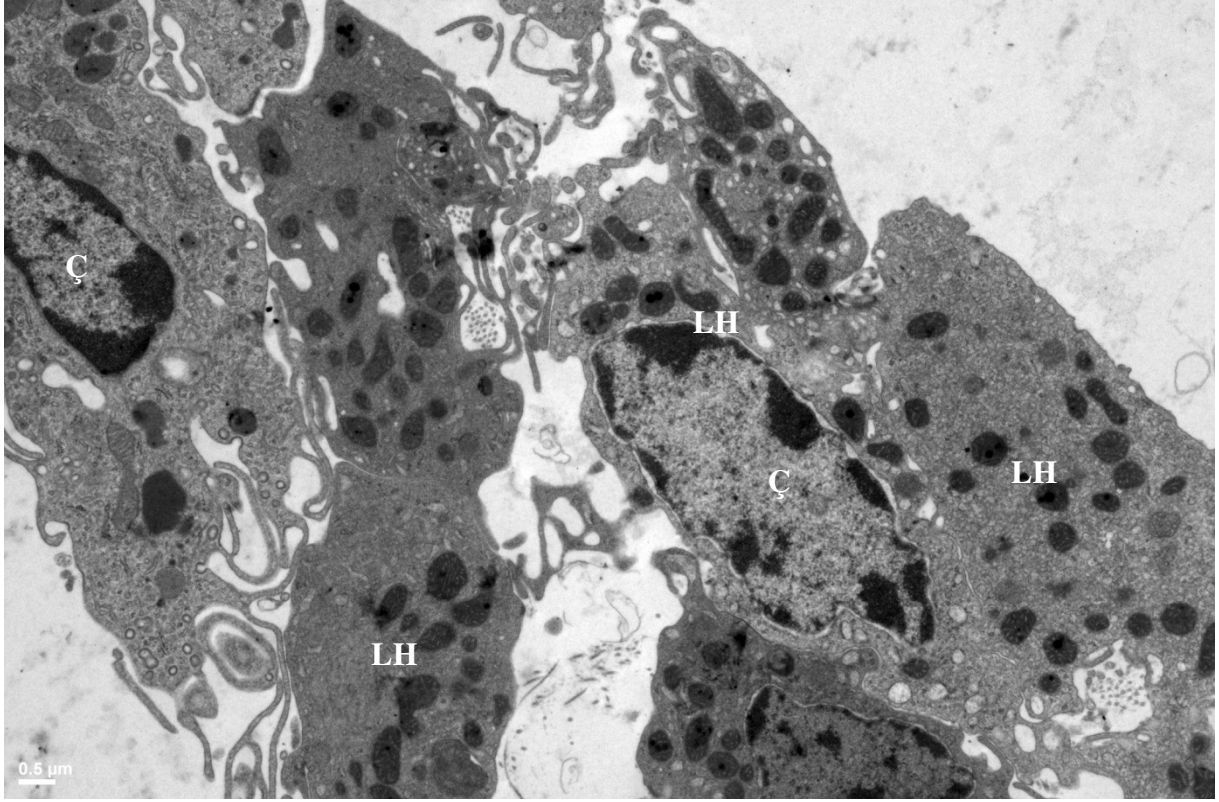
Resim 27: LCMTX Grubu. Lamina propriyanın (LP) üst kısmında bulunan Sertoli hücreleri (S), arasındaki sıkı bağlantı kompleksleri (ok), ve çekirdek (Ç) normal olarak izlenmekte. Sertoli hücresinin sitoplazması içerisinde artmış lipid damlacığı (L) görülmektedir. PSt: Primer spermatosit, Sz: spermatozoon (Sz). Bar=2 μ m.



Resim 28: LCMTX Grubu. Normal görünümde Leydig hücreleri (LH) ve Çekirdek (Ç).
Bar=1 µm.



Resim 30 : VEMTX Grubu. Membrana propria (MP) normal yapıda, Sertoli hücreleri (S), bazı alanlarda bazal laminadan ayrılmış, hücreler arası aralıkta membranöz sarmalımsı yapılar içeren boşluklar oluşmuş (ok), sitoplazmaları içerisinde genişlemiş düz endoplazmik retikülüm sisternaları (ok başı) görülmekte. Bar=2 μ m.



Resim 31: VEMTX Grubu. İnterstisyel alan içerisinde yer alan normal yapıda Leydig hücreleri (LH) görülmekte. Ç: Çekirdek. Bar=0,5 µm.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser günümüzün başat sağlık sorunlarından biridir ve gittikçe daha yaygın olarak görülmektedir. Giderek önemi artan soruna karşı bir yandan alternatif tedavi yolları araştırılırken, diğer yandan da antineoplastik ilaçların daha etkin kullanılabilmeleri için, yan etkilerini ekarte edebilecek mekanizmalar üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Bir folik asit antagonisti olan metotreksat yaygın olarak kullanılan bir antineoplastik ilaçtır. Ancak kullanımını yan etkileri kısıtlamaktadır. Yan etkilerinin yol açtığı bu kısıtlanmadan kurtulmanın bir yolu da, MTX ile birlikte, yan etkilerini azaltacak veya önleyecek ilaç veya ilaçların tedaviye eklenmesidir. Literatürde MTX toksisitesine karşı kullanılan kafeik asit, erdosteine, E vitamini, simvastatin gibi çok sayıda antioksidan maddelerle yapılan çalışmalar vardır (6, 41, 43, 44, 45). Biz de çalışmamızda MTX in testiküler doku hasarına karşı dışarıdan verilen vit E ve L karnitinin koruyucu etkisini araştırmayı amaçladık.

Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesini ve TAC seviyesini yükselten (46) MTX'in güçlü bir antienflamatuar madde olduğu öteden beri bilinmektedir (47). Yüksek MPO seviyesinin nötrofil infiltrasyonuna sebep olduğu ve serbest radikallerin dokularda lökosit (özellikle nötrofil) infiltrasyonunu tetiklediği bilinir (1, 48). MTX'e bağlı toksisite prositokinlerin artmış üretimi ile birlikte görülen inflammatuar cevabın oluşmasıyla karakterizedir (1, 48). Gao ve arkadaşları MTX'in ksenobiyotiklerin ve endotoksinlerin ince barsağa geçmelerine sebep olduklarını, bunun da makrofaj ve nötrofil infiltrasyonunu başlattıklarını ve sonunda reaktif oksijen türlerinin üretiminde artışa yol açtıklarını göstermişlerdir (49). Buradaki mekanizmaya benzer olarak Oktar ve arkadaşları MTX'in testis içine infiltre olan makrofaj ve nötrofiller aracılığı ile oksidatif stresin arttığını göstermişlerdir (50).

E vitamini membranlarda süperoksit ve lipid peroksidlerin aktivitelerini azaltarak, membranları lipid peroksidasyonuna karşı korur (51).

E vitamininin çeşitli toksik etkenlere karşı testisleri koruduğunu bildiren çok sayıda çalışma vardır (52). Maneesh ve arkadaşları 4 hafta boyunca oral yoldan ethanol uygulayarak testiküler oksidatif strese yol açtıkları sıçanlara yine oral yoldan α - tokoferol vererek, α - tokoferolün testis dokusu üzerindeki iyileştirici etkisine bakmışlardır. Ethanol uygulanan grupta ortaya çıkan testis ağırlığındaki azalma, α -

tokoferol verilen grupta yerini artışa bırakırken; yine ethanol etkisiyle testiste ortaya çıkan lipid peroksidasyonuna karşı α -tokoferolün koruyucu etki gösterdiği de belirlenmiştir (53). Şahintürk ve arkadaşları sıçanlar üzerindeki yapmış oldukları çalışmada 3-7 gün boyunca 100 mg/ kg Vit E verilmesinin etan dimetan sülfonata karşı koruyucu etki yaptığını ortaya koymuşlardır (54).

Marin-Guzman ve arkadaşları, domuzlar üzerinde yaptıkları çalışmada, diyetle alınan selenyum ve E vitamininin testis dokusu, semen kalitesi ve fertilizasyon üzerinde iyileştirici etkiler yaptığını belirtmişlerdir (55).

Chandra ve arkadaşları sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışma da verilen 50 ve 100 mg/kg E vitamininin, vanadium maddesinin zararlı etkilerine karşı testisleri koruduğunu saptamışlardır (56).

Mauer ve Mason yaklaşık 90 gün boyunca E vitamininden yoksun diyetle besledikleri sıçanların testis dokusu tübül duvarında ileri derecede dejenerasyon saptamışlar ayrıca testis ağırlığında da azalma olduğunu belirtmişlerdir. Bu sıçanlara 20 gün boyunca 10 mg d- α -tokoferil asetat ya da 25 mg d- α -tokoferil hidrokuinon verdiklerinde ise testis ağırlığında artış ve histolojik olarak da germinal epitelde düzelme olduğunu bildirmişlerdir (57).

L-karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin, hücresel enerji üretimi için parçalandığı yer olan mitokondriye taşınmalarında gerekli olan bir kofaktördür. L-karnitinin çeşitli toksik etkenlere karşı koruyuculuğu antioksidan ve antiperoksidatif etkilerine bağlanmaktadır (58, 59).

L-karnitin, MTX'in sebep olduğu organ hasarlarını ve lökosit ölümünü önlediği bildirilmiştir. L-karnitin antiapoptotik etkisi gösterilmiştir (60).

L-karnitin erkek üreme organlarında yaygın olarak bulunan endojen bir maddedir (61).

Sıçan testislerinde yapılmış bir çalışmada, L-karnitin radyasyonla artmış apoptotik germ hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir (52).

Bizim çalışmamızda deney öncesi hayvan vücut ağırlıkları bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu ($p = 0,763$). Deney boyunca kontrol dışındaki tüm gruplarda kilo kaybı gözlemlendi ($p=0.001$). Hayvanlar öldürüldükten sonraki testis ağırlıkları değerlendirildiğinde kontrol grubundaki hayvanların her iki testisin toplam

ağırlığının diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ($p= 0.001$). Fakat diğer gruplar arasındaki ağırlık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hayvanlar tüm deney gruplarında hem kilo kaybı hem testis ağırlığında bir kayba uğramışlardı, ancak deney grupları arasında anlamlı bir fark yoktu. Bir başka deyişle vitamin E ve L-karnitin MTX'in yaptığı hem vücut, hem de testis ağırlığındaki azalmayı etkilemedi.

Daha önceki çeşitli çalışmalarda 20 mg/Kg ya da daha yüksek dozlarda MTX'e maruz kalmanın kanda, karaciğerde, böbreklerde ve testislerde MDA seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (1,62). Daha düşük dozların (10 mg/Kg) kullanıldığı bazı çalışmalarda MDA seviyesinin etkilenmediği ve bunun düşük doz yanında, anestezi yapılmamış olmasının da önemli bir faktör olabileceği vurgulanmıştır (50). Gerçekten de anestezide kullanılan maddeler lipid peroksidasyonunu arttırabilmektedir (63). Etik kaygılarla anestezi uygulanan ve nispeten yüksek doz MTX (20 mg/Kg) verilen çalışmamızda, MDA düzeylerindeki anlamlı yükseliş, geçmiş çalışmalarla uyumlu olarak değerlendirilebilir. Deney hayvanlarımızın SOD değerlerine bakıldığında da MTX grubunun diğer gruplardan anlamlı düzeyde düşük olduğu görülmüştür. Deney gruplarındaki SOD değerlerindeki bu düşüş MDA değerlerindeki artışla paralellik göstermektedir.

MTX'in sperm sayısını düşürdüğü ve anormal başlı sperm oranında artışa sebep olduğu gösterilmiştir (64, 65). Yine MTX'in farklı dozlarda uygulanmasıyla seminifer tübüllerde çap incelmeleri, spermatogonik hücre içeriği azalması ve vakuolizasyona sebep oldukları, interstisyel alanda da ödem gibi değişikliklere yol açtıkları bildirilmiştir (64,66). Bizim çalışmamızda da MTX verilmesiyle benzer histolojik bulgular gözlemlendi. MTX'in yanı sıra E vitamini ve L-karnitin verilmesi bu hasarları tamamen ortadan kaldırmasa da anlamlı derecede azalttı.

Elektron mikroskopik olarak yaptığımız incelemelerde kontrol grubunda normal testis yapısı gözlenmiştir. MTX grubuna ait dokularda ise seminifer tübülü saran lamina probriyada kalınlaşma, kollejen lif miktarında artma, bazal laminada kalınlaşma ve düzensizlikler, sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar arasında hücreler arası mesafede artış gözlenmekteydi. Ayrıca Sertoli hücrelerinin çekirdeklerinde heterokromatin kümeleşmesi, sitoplazmalarında lizozom ve lipid damlacıklarında artış, agranüler endoplazmik retikulum sisternalarında genişleme, elektron dens yapılar şeklinde görülen dağınık litik alanlar ve sarmalımsı membranöz yapıların oluştuğu görülmüştür.

Bu bulgular genel olarak hücrelerde bir bozulmaya işaret etmektedirler. MTX grubunda da gözlenen bulguların bazıları, (sertoli hücrelerinin agranüler endoplazmik retikulum sisternalarında genişleme, lizozom ve lipid damlacıklarında artış, litik alanlar ve sarmalımsı membranöz yapılar içeren boşluklar gibi) VEMTX ve LCMTX gruplarında da görüldüyse de bu bulguların sayısı ve şiddeti MTX grubunda gözlenenlerden daha azdı.

 zet olarak, çalışmamızda sadece MTX verilen grupta deney sonrası dokular histolojik olarak incelendiğinde seminifer tübüllerdeki germ hücrelerinde azalma, intersistiyal alanda ödem ve konjesyon, seminifer tübülde vakuolleşme, bazal laminada ayrılma ve epitelde ortaya çıkan çok nükleuslu dev hücreler şeklinde hasarlara rastlanmıştır. Elektron mikroskopik bulgularda bunları teyit etmiştir. Tüm hasarları göz önüne aldığımızda hem vitamin E, hem L-karnitin MTX'in yaptığı histolojik hasarları kısmen önlemiştir. Nitekim bu koruyuculuğu biyokimyasal parametrelerden MDA ve SOD değerleri de desteklemektedir.

Sonuc olarak biz  alışmamızda; MTX'in testislerde önemli hasara neden olduğunu ve bu hasarı önlemede ya da azaltmada Vit E ve L karnitinin etkisinin olup olmayacağını görmeyi amaçladık. Elimizdeki sonuçlara göre vit E ve L karnitin MTX'in testislerdeki hasarını tamamen  nleyemese bile, hasar şiddetini önemli derecede azaltmaktadırlar.

KAYNAKLAR

1. Jahovic N, Şener G, Çevik H, Ersoy Y, Arbak S, Yeğen BC. Amelioration of methotrexate induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct* 2004; 22(3):169-178.
2. Şener G, Ekşioğlu-Demiralp E, Çetiner M, Ercan F, Yeğen BÇ. Beta glucan ameliorates methotrexate induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *European Journal Pharmacology* 2006; 542 (1-3):170-8.
3. Kim JC, Kim KH, Chung MK. Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anti cancer agent, in rats. *Reproductive Toxicology* 1999; 13(5):391-397.
4. Saxena AK, Dhungel S, Bhattacharya S, Jha CB, Srivastava AK. Effect of chronic low dose of methotrexate on cellular proliferation during spermatogenesis in rats. *Arch Androl* 2004; 50(1):33-35.
5. Işık A, Işılal L, Erdemli E A, Akbay C, Anafarta K. Sıçan testisinde Metotreksatin Işık ve Elektron Mikroskop Düzeyinde Etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 1997; Cilt 50, Sayı 3,125-129.
6. Yüncü M, Kanter M. Farelerde metotreksatin ince barsak mukozasında yaptığı hasara karşı e vitamininin koruyucu etkisi: Elektron Mikroskopik Çalışma. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2006; 4 (2) 1-6.
7. Coşkun Ö, Kutlubay R, Yakan B, Ekmekçioğlu O, Öztürk Ö. L-Carnitine uygulanan ratların testis dokusunda görülen morfolojik ve morfometrik değişiklikler. *T Klin Tıp Bilimleri* 1998; 18, 236-9.
8. Jungueria CL, Carneiro J, Kelley RO. Basic histology: Temel histoloji (Çev: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B.) Barış kitabevi, 1998. s: 407-419, 431-433.
9. Yıldırım M. İnsan anatomisi Nobel tıp kitabevi 2000; 224- 230.
10. Demirel Haydar A, Koşar Nazan Ş. İnsan Anatomisi ve Kineziyoloji; 2002;Nobel yayın dağıtım İstanbul ss.66-68.
11. Richard S, Snell MD. Ph. D. Tıp Fakültesi öğrencileri için klinik anatomi Çeviri editörü Yıldırım M. Nobel tıp kitapçevleri, İstanbul 1998; 316-317.
12. William F. Ganong (çev: Doğan A.) Tıbbi Fizyoloji Barış kitabevi 1994;464-467.
13. Yiğit R. Kontrol sistemleri, Sindirim ve Boşaltım Fizyolojisi Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2001; 67-78.
14. Kalaycı Ş. Histoloji. Uludağ Üniversitesi Basımevi Bursa 1986 Yayın no:2-034-0130. 260-288.
15. Borgen PI, Wong GY, Vlaims V, Potter C, Hoffmann B, Kinne DW, Osborne MP, McKinnon WM. Current management of male breast cancer. *Ann Surg* 1992; 215(5): 451-457.
16. Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Taş Ankara 1998; 388-393.
17. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b9/Methotrexate.png> (Erişim tarihi: 22.02.2013)
18. Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1998; 27(5):277-292.

19. Brock S, Jennings HR. Fatal acute encephalomyelitis after a single dose of intrathecal methotrexate. *Pharmacotherapy* 2004; 24:673-676.
20. Quinn CT, Kamen BA. A biochemical perspective of methotrexate neurotoxicity with insight on nonfolate rescue modalities. *J Invest Med* 1996; 44:522-30.
21. Goodman and Gillman. *The Pharmacological Basis of Therapeutics* Laurence L. Bruton (editör), John. S. Lazo, Keith L. Parker (editör Yardımcıları), McGraw-Hill. Tedavinin Farmakolojik Temeli. Çeviri editörü Süzer Ö. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2009; 1315-1405.
22. Mammadov R. Vitaminler 2002; Nobel yayıncılık Ankara. 32-40.
23. Egemen A. Vitaminlerin Sağlığımızdaki Önemi. Apa basımevi 1986 İstanbul; 70-82.
24. Oski FA, Barness LA. Vitamin E deficiency: a previously unrecognized cause of haemolytic anemia in the premature infant. *J Pediatr.* 1967 ; 70(2): 211-220.
25. Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu Rev Nutr* 1998; 18: 39–61.
26. Bieber LL. Carnitine. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:261-283.
27. Dökmeci İ. Vitaminler; Farmakoloji-Temel Kavramlar. Nobel Tıp Kitabevi, 2000 İstanbul s:789-820.
28. Hedayati SS. Dialysis-related carnitine disorder. *Semin Dial* 2006 ;19(4):323-328.
29. Li B, Lloyd ML, Gudjonsson H, Shug AL, Olsen WA. The effect of enteral carnitine administration in humans. *Am J Clin Nutr.* 1992; 55(4):838-845.
30. Bach AC, Schirardin H, Sihr MO, Storck D. Free and total carnitine in human serum after oral ingestion of L-carnitine. *Diabete Metab* 1983 ; 9(2):121-4.
31. Rebouche CJ, Chenard CA. Metabolic fate of dietary carnitine in human adults: identification and quantification of urinary and fecal metabolites. *J Nutr* 1991; 121(4):539-546.
32. Sezen O, Ertekin MV, Demircan B, Karslıoğlu I, Erdoğan F, Koçer I, Calik I, Gepdiremen A. Vitamin E and L-carnitine, separately or in combination, in the prevention of radiation-induced brain and retinal damages. *Neurosurg Rev* 2008;31(2):205-213.
33. Luo X, Reichetzer B, Trines J, Benson LN, Lehotay DC. L-carnitine attenuates doxorubicin-induced lipid peroxidation in rats. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(9-10):1158-1165.
34. Evans A. Dialysis-related carnitine disorder and levocarnitine pharmacology. *Am J Kidney Dis* 2003;41(4 Suppl 4):13-26.
35. Calvani M, Benatti P, Mancinelli A, D'Iddio S, Giordano V, Koverech A, Amato A, Brass EP. Carnitine replacement in end-stage renal disease and hemodialysis. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1033,52-66.
36. Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am J Kidney Dis* 2003;41.4-12.
37. Ruiz-Pesini E, Alvarez E, Enriquez JA, Lopez-Perez MJ. Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. *Int J Androl* 2001; 24: 335–340.
38. Gürbüz B, Yalti S, Ficicioglu C, Zehir K. Relationship between semen quality and seminal plasma total carnitine in infertile men. *J Obstet*

Gynaecol 2003; 23: 653–656.

39. Vicari E, Calogero AE. Effects off treatment with carnitines in infertile patients with prostatitis-epididymitis. Hum Reprod 2001; 16: 2338-2342.
40. Şener G, Ekşioğlu-Demiralp E, Çetiner M, Ercan F, Şirvancı S, Gedik N, Yeğen B.Ç. L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. Cell Biology And Toxicology.2006; 22: 47-60.
41. İraz M, Özerol E, Gülec M, Taşdemir S, İdiz N, Fadıllıoğlu E, Nazıroğlu M, Akyol O. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage tol iver in rat. Cell Biochem 2006. Funct. 24(4): 357-361.
42. Koç A, Duru M, Çıralık H, Akcan R, Söğüt S. Protective agent, erdosteine, against cisplatin-induced hepatic oxidant injury in rats. Mol Cell Biochem. 2005; 27: 79-84.
43. Muralikrishnan G, Amalan Stanley V, Sadasivan Pillai K. Dual role of vitamin C on lipid profile and combined application of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil treatment in fibrosarcoma-bearing rats. Cancer Lett. 2001; 28; 169(2):115-20.
44. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yeğen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. J Pineal Res. 2003; 34(4):282-287.
45. Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM. Silymarin modulates cisplatin-induced oxidative stres and hepatotoxicity in rats. J Biochemic Mol Biol. 2006; 39 (6): 656-661.
46. Gökçe A, Oktar S, Koç A, Yönden Z. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. Human and Experimental Toxicology,2011; 30(8): 897-903.
47. Mitchell MS, Wade MD, DeConti RC, Bertino JR, Calabresi P. Immunosuppressive effects of cytosine arabinoside and methotrexate in man. Annals of Internal Medicine, 1969; 70.535-547.
48. Uzar E, Şahin O, Koyuncuoğlu HR, Uz E, Bas O, Kilbas S, Yılmaz HR, Yürekli VA, Küçük H. Songur A. The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. Toxicology, 2006; 218: 125-133.
49. Gao F, Ueda S, Horie T. Effect of a synthetic analog of prostaglandin E1 on the intestinal mucosa of methotrexate-treated rats. Anticancer Res, 2001; 21(3B):1913-7.
50. Oktar S, Gökçe A, Aydın M, Davarcı, M, Meydan S, Öztürk HO, Koç A. Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. Toxicology and Industrial Health, 2010; 26(7): 433-438.
51. Topçu Tarladaçalışır Y, Uygun M, Akpolat M, Uz YH. E ve C vitaminlerinin cisplatin hepatotoksitesini önlemedeki etkilerinin histolojik olarak incelenmesi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2005; 22(3): 124-131

52. Uzun FG, Kalender S, Durak D, Demir F, Kalender Y. Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology*, 2009; 47: 1903–1908.
53. Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Experimental therapeutic intervention with alpha tocopherol in ethanol induced testicular injuries in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2007; 22(1): 138-142.
54. Sahinturk V, Guclu C, Baycu C. Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. *Asian J Androl*, 2007; 9 (1): 117-124.
55. Marin-Guzman J, Mahan DC, Chung YK, Pate JL, Pope WF. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J Anim Sci* 1997; 75: 2994-3003.
56. Chandra AK, Ghosh R, Chatterjee A, Sarkar M. Amelioration of vanadium-induced testicular toxicity and adrenocortical hyperactivity by vitamin E acetate in rats. *Mol Cell Biochem* 2007; 306: 189-200.
57. Mauer SI, Mason KE. Antisterility activity of d- α -tocopheryl hydroquinone in the vitamin E-deficient male hamster and rat. *J Nutr* 1975; 105: 491-494.
58. Berteli A, Conte A, Ronca G. L-Propionyl carnitine protects erythrocytes and low density lipoproteins against peroxidation. *Drugs Exp Clin Res*, 1994 ; 20:191–7.
59. Rauchova H, Koudelova J, Drahota Z, Mourek J. Hypoxia-induced lipid peroxidation in rat brain and protective effect of carnitine and phosphocreatine. *Neurochem Res*, 2002; 27: 899–904.
60. Ishii T, Shimpo Y, Matsuoka Y, Kinoshita K. Anti-apoptotic effect of acetyl-L-carnitine and L-carnitine in primary cultured neurons. *Jpn J Pharmacol*, 2000; 83: 119-124.
61. Hinton BT, Snoswell AM, Setchell BP. The concentration of carnitine in the luminal fluid of the testes and epididymis of the rat and other mammals. *J Reprod Fertil*, 1979; 56: 105-111.
62. Armağan A, Uzar E, Uz E, Yılmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoğlu HR, Soyupek S, Cam H, Serel TA. Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum Exp Toxicol*, 2008; 27(7):547-52.
63. Aydılek N. Comparison between xylazine-tiletamine-zolezapam and fentanyl-tiletamine-zolezapam anaesthetic combinations on plasma oxidative status in sheep. *Acta Veterinaria Brno*, 2007; 76: 573-578.
64. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male swiss mice. *Mutat Res*, 2008; 655: 59-67.
65. 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. *Mutat Res*, 2009; 673: 43-52.
66. Koehler M, Waldherr R, Ludwig R, Heinrich U, Brandeis WE. Effects of methotrexate on rabbit testes. Part 1: morphological changes. *Pediatr Hematol Oncol*, 1986; 3: 325-334.

