T.C.

FIRAT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA METOTREKSATIN OLUŞTURDUĞU LİPİD PEROKSİDASYON, OKSİDATİF STRES VE SPERM KALİTESİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE KİSSPEPTİNİN ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Arş. Gör. Mehmet GÜVENÇ

ELAZIĞ - 2015

ONAY SAYFASI

Prof.Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof.Dr. Mehmet ÇAY

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Mesut AKSAKAL

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Mesut AKSAKAL

Prof.Dr. Mine ERİŞİR

Prof.Dr. Nurettin AYDİLEK

Prof.Dr. Abdurrauf YÜCE

Prof.Dr. Doğan KURT

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince bana her konuda destek veren, bilgi, birikim ve tecrübelerinden yararlandığım kıymetli danışman hocam Prof.Dr. Mesut AKSAKAL'a saygılarımı sunar, teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, bu tez çalışmam esnasında, tez içeriğinin düzenlenmesinde, deneysel çalışmalarda bilgi ve desteklerini esirgemeyen, her aşamada bana yardımcı olan Prof.Dr. Abdurauf YÜCE hocama,

Tez çalışmam sürecinde, yorumları ve kritikleri ile bana yol gösterip, yardımcı olan Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Mehmet ÇAY hocama,

Spermatolojik analizlerde ve sonuçların yorumlanmasında benden yardımlarını esirgemeyen Dölerme, Suni Tohumlama ve Androloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Gaffari TÜRK hocama, deneysel aşamada bana yardımcı olan Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Ali Osman ÇERİBAŞI hocam ile birlikte Osman Sedat TANYERİ ve Serkan AKARSU'ya, desteklerinden dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, istatiksel çalışmalarda yardımcı olan Zootekni Anabilim Dalı öğretim elemanı Arş.Gör Yasin BAYKALIR'a, tez çalışması süresince yardımlarından dolayı mesai arkadaşım Arş.Gör. Gözde ARKALI'ya, çeşitli aşamalarda bana yardımcı olan bütün asistan arkadaşlarıma, bana her konuda destek verip, emeği geçen Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Ömer ATALAR hocama,

Beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca karşılıksız destek ve sevgileriyle her koşulda yanımda olan aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR **I**

İÇİNDEKİLER **II**

ŞEKİLLER LİSTESİ **VI**

TABLOLAR LİSTESİ **VII**

KISALTMALAR **VIII**

ÖZET **X**

ABSTRACT **XII**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **8**

2.1. Kanser ve Kemoterapi 8

2.2. Metotreksat 12

2.2.1. Etki Mekanizması 12

2.2.2. Metotreksat Farmakokinetiği 14

2.2.3. Metotreksat'ın Endikasyonları 15

2.2.4. Yan Etkileri 16

2.2.5. Kullanıldığı Alanlar 18

2.3. Antioksidan Sistem, Oksidatif Stres ve Kemoterapi 18

2.4. Kisspeptinler 22

2.5. Erkekte Üreme Fizyolojisi 28

2.5.1. Testisin Yapısı ve Spermatogenezis 28

2.5.2. Erkek Cinsel İşlevlerinin Hipotalamus ve Ön Hipofiz Bezinden Salgılanan Hormonlarla Kontrolü 32

2.5.2.1. GnRH'nın LH ve FSH Salgısını Artırıcı Etkisi 32

2.5.2.2. Gonadotropik Hormonlar: LH ve FSH 33

2.5.2.3. Testosteron Yapımının LH ile Düzenlenmesi 33

2.5.2.4. Ön Hipofiz FSH ve LH Salgısının Testosteron Tarafından Baskılanması-Testosteron Salgısının Negatif Geribildirimle Kontrolü 34

2.6. Testis Histolojisi 35

2.7. Spermatogenez 36

2.7.1. Mitoz 36

2.7.2. Mayoz Bölünme 37

2.7.3. Spermiyogenezis 38

2.7.3.1. Golgi fazı 38

2.7.3.2. Kep dönemi 39

2.7.3.3. Başlık (Cap) Aşaması 39

2.7.3.4. Olgunlaşma 40

3. GEREÇ VE YÖNTEM 41

3.1. Gereçler 41

3.1.1. Kullanılan Cihazlar 42

3.1.2. Kullanılan Diğer Malzemeler 43

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler 43

3.2. Yöntem 44

3.2.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması 44

3.2.2. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması 44

3.2.3. Protein Tayini 45

3.2.4. Doku ve Plazmada Lipit Peroksidasyon Tayini 45

3.2.5. Doku ve Plazma GSH-Px Tayini 46

3.2.6. Doku ve Plazmada Redukte Glutasyon (GSH) Düzeyinin Tayini 46

3.2.7. Doku ve Plazmada Katalaz Aktivitesinin Tayini 47

3.2.8. Spermatolojik Muayeneler 47

3.2.8.1. Epididimal Spermatozoon Yoğunluğu 47

3.2.8.2. Spermatozoon Motilitesi 48

3.2.8.3. Anormal Spermatozoon Oranı 48

3.2.9. Serum Testosteron Seviyesinin Belirlenmesi 49

4. İSTATİKSEL ANALİZ **49**

5. BULGULAR **50**

5.1. Serum Testesteron Düzeyleri 50

5.2. Plazma MDA Düzeyleri 51

5.3. Plazma GSH Düzeyleri 52

5.4. Plazma GSH.px Düzeyleri 53

5.5. Plazma Katalaz Düzeyleri 54

5.6. Testis Dokusu MDA Düzeyleri 54

5.7. Testis Dokusu GSH Düzeyleri 55

5.8. Testis Dokusu GSH.px Düzeyleri 56

5.9. Testis Dokusu Katalaz Düzeyleri 57

5.10. Üreme Organ Ağırlıkları 59

5.11. Spermatolojik Muayeneler 63

TARTIŞMA ve SONUÇ **67**

KAYNAKLAR **77**

ÖZGEÇMİŞ **93**

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Folik asit metabolizması 12

Şekil 2. Methotrexat 13

Şekil 3. Folik Asit 13

Şekil 4. Dihidrofolat 13

Şekil 5. Antioksidan ve Serbest Radikal 20

Şekil 6. Kisspeptin prekürsörü KP-145 ve karboksi terminal parçasından oluşan kisspeptin-54 (metastin), kisspeptin-14,13 ve 10 23

Şekil 7. Memelilerde Hipotalamo-Hipofizer Gonadal Aks 25

Şekil 8. Erkekte Üreme Sistemi (A) ve Testisin Yapısı (B) 29

Şekil 9. Seminifer Tübülün Enine Kesiti (A) ve Spermatogonyumdan sperm gelişmesine kadar olan aşamalar (B) 30

Şekil 10. Erkek Üreme Sisteminin Hormonal Düzenlenmesi 34

Şekil 11. Testis ve genital kanalların şematik görünümü 35

Şekil 12. Spermatogenez 36

Şekil 13. Serum Testesteron Düzeyleri 50

Şekil 14. Plazma MDA Düzeyleri 51

Şekil 15. Plazma GSH Düzeyleri 52

Şekil 16. Plazma GSH.px Düzeyleri 53

Şekil 17. Plazma Katalaz Düzeyleri 54

Şekil 18. Testis Dokusu MDA Düzeyleri 55

Şekil 19. Testis Dokusu GSH Düzeyleri 56

Şekil 20. Testis Dokusu GSH.px Düzeyleri 57

Şekil 21. Testis Dokusu Katalaz Düzeyleri 58

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Antimetabolit İlaçlar 11

Tablo 2. Sıçan Yemi Bileşimi 44

Tablo 3. Absolut üreme organ ağırlıkları 61

Tablo 4. Rölatif üreme organ ağırlıkları 62

Tablo 5. Spermatolojik parametreler. 64

Tablo 6. Plazma MDA, GSH, GSH.Px, Katalaz ve Serum Testosteron Düzeyleri 65

Tablo 7. Testis Dokusu MDA, GSH, GSH.Px ve Katalaz Düzeyleri 66

KISALTMALAR

HPG : Hipotalamus-hipofiz-gonad

MTX : Metotreksat

FA : Folik Asit

GPR54 : G Protein Coupled Receptor-54

LH : Luteinizan Hormon

FSH : Folikül Stimülan Hormon

GnRH : Gonadotropin releasing hormone

ICSH : İnterstisiyel hücre stimüle edici hormon

ABP : Androjen Bağlayıcı protein

TBA : Tiyobarbitürik asit

ROB : Reaktif oksijen bileşikleri

THF : Tetrahidrofolat

BOS : Beyin Omurilik Sıvısı

DHFR : Dihidrofolat redüktaz

MDA : Malondialdehit

GSH : Glutatyon

GSH-Red : Glutatyon redüktaz

GSH.px : Glutatyon peroksidaz

CAT : Katalaz

SOD : Süperoksit dismutaz

KO : Knock out

AVPV : Anterolateral Periventrikuler Nukleus

ME : Median Eminens

ARC : Arkuat Nukleus

POA : Preoptik Alan

Kiss1 : Kisspeptin nöronları

PAS : Periyodik asit shift

TBA : Tiyobarbitürik asit

$CHPO_4$: Cumenehidroperoksit

DTNB : 5,5-ditiyo-bis [2- nitrobenzoik asit]

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

MPO : Miyeloperoksidaz

ÖZET

Bu çalışma ratlara methotreksat (MTX) uygulamasının oksidatif stres, antioksidan sistem ve spermatogenez üzerine olan etkileri ve bu etkilere Kisspeptin-10 uygulamasının meydana getirdiği değişiklikleri araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Bu amaçla 48 wistar albino rat Kontrol Grubu kontrol (n:6, serum fizyolojik), 2. Grup MTX (n:10, i.p MTX 20 mg/kg tek doz), 3. Grup (n:6, i.p Kisspeptin-10, 50 nmol/kg, 5gün/doz), 4. Grup (n:6, Kisspeptin-10, 50 nmol/kg 10gün/doz), 5. Grup (n:10, MTX 20 mg/kg tek doz + Kisspeptin-10, 50 nmol/kg 5 gün/doz), 6. Grup (n:10, MTX 20 mg/kg tek doz + Kisspeptin-10, 50 nmol/kg 10 gün/doz) gruplarına ayrılmıştır.

Uygulama yapılan gruplarda plazma ve testis dokusu MDA, GSH, GSH.px ve Katalaz aktivitesi düzeylerine, spermatolojik parametrelere ve serum testesteron seviyelerine bakıldı.

13. gün sonunda testis dokusunda MTX uygulaması ile artan MDA düzeyi ($p<0.05$) 5. ve 6. gruplarda Kisspeptin uygulanması ile anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0.05$). Testis dokusu ve plazma GSH düzeyleri ise tedavi grupları olan 5. Ve 6. Gruplarda anlmalı bir artış göstermiştir. Testis dokusu GSH .px düzeyleri MTX uygulaması ile azalma gösterirken ($p<0.05$), 6. Grupta Kisspeptin uygulaması ile artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). Katalaz düzeylerinde ise plazma ve testis dokularında önemli farklılık görülememiştir. Serum testesteron düzeyleri MTX uygulaması ile önemli bir azalma göstermiş ($p<0.001$), meydana gelen bu azalma tedavi grubunda 10 günlük kisspeptin uygulaması ile normal

seviyesine gelmiştir ($p<0.001$). Spermatolojik parametrelerde MTX uygulaması ile azalma gösteren motilite ($p<0.001$) ve artan anormal spermatozoon oranları ($p<0.05$) tedavi grupları olan 5. ve 6. Gruplarda ise düzelme görülmüş, motilitede artış ($p<0.001$), anormal spermatozoon sayısında ise azalma ($p<0.05$) tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda MTX uygulaması ile olumsuz etkilenen üreme sisteminin kısa ve uzun süreli Kisspeptin-10 uygulaması ile bu olumsuz etkilerin ortadan kaldırılmasına yardımcı olabileceği görüşüne varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kisspeptin, Metotreksat, Antioksidan, Sperm Kalitesi

ABSTRACT

EFFECT OF KISSPEPTIN ON METHOTREXATE INDUCED LIPID PEROXIDATION, OXIDATIVE STRESS AND THE CHANGES IN SPERM QUALITY IN RATS

The purpose of this study is to determine effects of metotrexate on oxidative stress, antioxidative system and spermatogenesis and changes caused by Kisspeptin-10 administration on these effects.

For this purpose, total of 48 wistar albino rats are divided into groups as; group 1 control (n:6, saline), group II MTX (n:10, i.p MTX 20 mg/kg single dose), group III (n:6, i.p Kisspeptin-10, 50 nmol/kg, 5 days/dose), group IV (n:6, Kisspeptin-10, 50 nmol/kg, 10 days/dose), group V (n:10, MTX 20 mg/kg single dose + Kisspeptin-10, 50 nmol/kg 5 days/dose) and group VI (n:10, MTX 20 mg/kg single dose + Kisspeptin-10, 50 nmol/kg, 10 days/dose).

Plasma and testicular tissue MDA, GSH, GSH.px and activity of catalase levels, semen parameters and serum testesteron levels were measured in treated groups.

At the end of the study, MDA levels that increased by MTX applications in testicular tissue ($p<0.05$) showed significant decrease in group V and group VI by Kisspeptin administration ($p<0.05$).The levels of GSH in the testicular tissue and plasma were significantly increased in group V and group VI. While testicular tissue GSH.px levels decreased with MTX administration ($p<0.05$), while in group VI was increased by Kisspeptin adminstration($p<0.05$). Serum testesteron levels showed a significant decrease with MTX administration ($p<0.001$) and it returned the normal levels with 10 day Kisspeptin administration in treatment

group ($p<0.001$). In case of spermatological parameters with MTX administration, decreased motility ($p<0.001$), and increased rates of abnormal spermatozoon ($p<0.05$), an improvement was seen in treatment groups (group V and VI) with increased motility ($p<0.001$), and decreased abnormal spermatozoon counts ($p<0.05$).

As a result of the study, it was concluded that adverse effects on reproductive system with MTX administration may be eliminated with short and long-term Kisspeptin-10 administration.

Key Words: Kisspeptin, Methotrexate, Antioxidant, Sperm Quality

1. GİRİŞ

Birçok kemoteröpatikler, radyoterapi uygulamaları ve hatta birtakım cerrahi uygulamalar, üreme organı bozukluklarına, hipogonadizme neden olduğu gibi, kalıcı infertilite ve menopoza da neden olabilmektedir. Her ne kadar kansere yakalanma yaşının 60 yaş üzeri olduğu belirtilse de, tüm kanserlerin yaklaşık %4'ü 15-40 yaşlar arasında ortaya çıkmaktadır. Bu hastaların çoğu halen çocuk sahibi olmayan kişilerden oluşabilmektedir, bu nedenle tedavinin fertilite üzerine etkileri bu hastalar için çok önemli hale gelebilmektedir **(1).**

Son yıllarda yapılan çalışmalarda henüz çocuk sahibi olmamış genç erkeklerde; uygulanan sitotoksik kemoterapilerle uzun süreli remisyon ve kanserden tamamen kurtulma oranlarının bir hayli artmış olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, söz konusu hastalarda tedavi ile birlikte, yan etki olarak ortaya çıkan fertilite sıklığında bir azalmanın olduğu ifade edilmektedir **(2)**.

Verilere göre ABD'de her yıl 20.000'den fazla üreme dönemindeki genç ve çocuk kanser hastası kemoterapi ve/veya radyoterapi almaktadır. Bu hastaların yaklaşık olarak %80-90'ında tedavi uygulanmakta ve çoğunda fertilite problemi ortaya çıkmaktadır **(2).**

Kemoterapi alan evli çiftlerde tedavi sonrası %15-30'lara varan oranlarda infertilite görülmektedir **(3).**

Kemoterapötik ilaçların hemen hepsi hızlı bölünen hücreler üzerinde etki göstermektedir. Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden daha hızlı çoğalması ve büyümesi nedeniyle kemoterapötikler bu tipteki hücreleri ortadan kaldırmak için

ortaya çıkmıştır. Buna rağmen sağlıklı hücrelerde de aynı etkiler ortaya çıkmakta ve kemoterapi sonucu direkt olarak etkilenmektedir. Bu etkilenmeler çeşitli yan etkilere de neden olmaktadır. Yan etkiler genellikle kemik iliği, sindirim sistemi mukozası, kıl folliküllleri ve spermler gibi çabuk çoğalabilen hücreler üzerinde gerçekleşmektedir. Bunun dışında çeşitli kemoterapötikler kalp, böbrekler, mesane, akciğerler ve sinir sistemi gibi hayati fonksiyonları bulunan organlar üzerinde de istenmeyen etkiler meydana getirebilmektedir **(4,5).**

Kemoterapötikler sağlıklı doku ve hücrelerde de olumsuz etkilere sebep olduğu için erkeklerde infertilite ve sterilite gibi komplikasyonlar kemoterapötiklerin üreme sisteminde meydana getirdiği istenmeyen etkilerdir **(6,7,8).**

Spermatogenezis ve sperm kalitesini etkileyen parametrelerdeki sorunlar, hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) aksındaki aksaklıklar, cinsel işlev disfonksiyonu gibi semptomlar kemoterapötik ilaçların üreme sisteminde meydana getirdiği olumsuz etkiler arasında bulunmaktadır **(7,8,9).**

Kemoterapotik ilaçlar birçok kanser tedavisinde uygulanmaktadır bunlar; antimetabolitler, alkilleyiciler, antibiyotikler, mitotik inhibitörler, enzimler, sentetik yapılı hormonlar gibi ayrılırlar ve bunların farklı etki şekilleri mevcuttur **(10).**

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yüksek proliferasyona sahip dokular üzerine akut toksik yan etkilere neden olmakta ve bunların arasında gonadal hasar yaygın olarak görülmesine rağmen, anti kanser ilaçlarının bu yan etkisi diğer yan etkilere göre daha az araştırılmıştır **(11,12).**

Metotreksat (MTX) bir folik asit (FA) antagonisti olup; antimetabolit özelliği haricinde antiinflamatuvar, antiproliferatif, immünosupresif, antipsöriatik etkileri bulunmaktadır. Romatoid artrit gibi otoimmun hastalıkların tedavisinde, lenfoma, lösemi, osteosarkom, baş ve boyun bölgesinde bulunan tümörlerde, akciğer ve meme kanseri ile birlikte çeşitli kanser tiplerinde kemoterapide kullanılmaktadır. **(13).**

Çeşitli araştırmalar, MTX'in, antioksidan sistemin etkisini bozarak, hücreleri ROB(reaktif oksijen bileşikleri)'a karsı duyarlı hale getirip hasara sebebiyet verdiğini göstermektedir. Oksidatif stres, testis seminifer tübüllerinde hasara ve germ hücrelerinin azalmasına neden olmaktadır **(14,15).** Bu yüzden, antioksidanlar oksidatif strese karsı testis dokusunun korunmasına yardım edebilir **(16).**

MTX uygulamasının ratlarda spermatogenezis, üreme organları ve dolayısıyla fertilite üzerine olumsuz etkileri olduğu, yapılan çalışmalarda bildirilmiştir **(12,17,18).**

Bir nöropeptid ailesi olup, KİSS-1 geni (1q32) tarafından kodlanan kisspeptinler, 145 amino asit içeren Kiss-1 proteinidir. Kiss sözcüğündeki "ss" takısı supresör sekansı (suppressor sequence) ifade etmektedir ve bu gen bölgesi Hershey, Kiss çikolatasına ithafen Pensilvanya'da keşfedildiği için bu yörenin meşhur "Ki" öneki getirilerek aynı şekilde Kiss-1 geni adı verilmiştir **(19,20,21).**

Kisspeptin hipotalamusta arkuat nükleus ve anteroventral periventriküler çekirdekte bulunan nöronlardan gonodotropların etkisi ile sentezlenmektedir.

Kisspeptin henüz tam olarak tanımlanmamış homeostatik ve nöroendokrin fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamaktadır **(22).**

Kisspeptinin bilinen Kisspeptin-10,13,14, 52, ve 54 türevleri bulunmaktadır**(23)**.C- terminal dekapeptidini içeren bütün bu formlarından biri olan kisspeptin-10 kültüre edilmiş insan trofofoblast hücrelerinden salınmaktadır. **(24)**.Reseptörü ise G Protein Coupled Receptor-54 (GPR54)'dür, genellikle KİSS-1/GPR54 sistemi olarak tanımlanmaktadır **(25).**

Kisspeptinler hipofizden luteinizan hormon (LH) ve folikül stimulan hormon (FSH) salgılanmasını uyaran çok güçlü bir nöropeptitdir ve bu etkisini gonadotropin releasing hormone (GnRH) üzerinden yapmaktadır **(22).**

Ergenlik dönemine girişte, GnRH sekresyonunu yapan nöronların aktivasyonu başlamaktadır. Hipotalamusta sentezlenen bu hormon, Hipofizden FSH ve LH salınmasını uyarmakta ve gonadları aktifleştirmektedir **(26).**

Erkeklerde LH, Leydig hücrelerini stimüle ederek testosteron salınımını artırır. FSH ise Sertoli hücrelerinden Androjen Bağlayıcı protein (ABP) ve İnhibin salgılanmasını stimüle ederek spermatogenezisi uyarmaktadır **(27).**

Seminara ve ark. **(28)**, farelerdeki *Gpr54* geninin delesyonu sonucunda farelerin puberteye ulaşamadığını göstermişlerdir**.** *Kiss-1* geni bulunmayan knockout farelerde, hipogonadizm tespit edilmiştir. GPR54 bulunmayan farelerde (GPR54–/–) anormal seksual gelişim ve dolaşımda gonadotropinin düşük konsantrasyonlarda olduğu gözlenmiştir **(29).**

Kisspeptinin, GnRH fizyolojisi için önemli olmasından dolayı muhtemel iki temel terapotik etkisi araştırılmıştır. İlki reproduktif fonksiyonları hipotalamustan GnRH salınımını indükleyerek yapmak ki, kendisi hipogonadizm, infertilite ve anovulasyon üzerine tedavi edici potansiyeli belirlenmiştir. İkinci olarak ise prostat kanseri, prostat hiperplazisi, endometritis ve meme kanseri gibi reproduktif fonksiyonları baskılayarak hormon tedavisine izin verilmesini gerektiren durumları içermektedir **(30).**

Santral ve periferik kisspeptin uygulamalarının çeşitli hayvan modellerinde HPG ekseni uyardığı bildirilmiştir **(31).**

FSH ve LH seviyelerindeki ani yükselmelerin akut etkilerine yönelik çalışmalar çeşitli türlerde yapılmıştır. İlk defa Dhillo ve arkadaşları tarafından Kisspeptin'in insanlar üzerine etkisine yönelik çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada Kisspeptin-54 erkeklerde (0,125-40 pmol / kg / dk) uygulanmış ve doza bağlı olarak plazma LH, FSH ve testesteron seviyelerinde az miktarda artış gözlenmiştir **(31).**

George ve ark. **(32)**, yaptığı çalışmada, i.v Kisspeptin-10'u i.v bolus uygulaması doza bağımlı olarak plazma LH ve FSH seviyelerinde 1 μg/kg'a varan artışa neden olmuştur. Buna rağmen 3 μg/kg Kisspeptin-10 uygulaması plazma LH ve FSH seviyeleri üzerine istatiksel olarak anlamlı bir sonuç çıkarmaya yeterli olmamıştır ve altında yatan sebep tam olarak bilinmemektedir.

Kisspeptin'in kronik uygulamarında ise gondatotroplar/testesteron seviyelerinde ani yükselmeyi takip eden ani düşüşler gözlenmiştir **(30).**

Ayrıca periferal Kisspeptin-10 uygulanması prepubertal ve erişkin ratlarda plazma LH ve FSH, juvenil erkek maymunda ise LH salınmasını uyarmaktadır **(23,33,34,35).**

Thomson ve ark. **(23)** yapmış olduğu çalışmada kisspeptin-10'un 10 ve 30 nmol periferal uygulanmasını takiben 20 dakika sonra plazma LH seviyesinde anlamlı bir artış gözlenmezken 100 nmol uygulamada plazma LH seviyesinde önemli bir artış meydana gelmiştir. Buna ek olarak, iv ya da ip Kisspeptin-10 uygulamasının yetişkin erkek farelerde dolaşımda bulunan testosteron seviyesini artırdığı bildirilmektedir.

Kisspeptin'in üreme fonksiyonları üzerine oynadığı rol keşfedildikten sonra fizyolojik ve farmakolojik etkileri üzerine geçtiğimiz on yılda birçok çalışmalar Kiss1R agonistleri ve antagonistlerinin HPG aksı kontrol etmede yeni yaklaşımlar sağlanabileceğini göstermiştir. Klinik çalışmalarda ise kisspeptin agonist ve antagonistlerinin mükemmel güvenilirlikte olduğu ortaya konmuştur **(31,32,36,37,38).**

Çeşitli çalışmalarla oksidatif stres ve gonadotropinlerin ilişkili olduğu belirlenmiştir**.** Hipotalamus fonksiyon bozuklukları sonucu LH ve FSH üretiminde meydana gelen azalma oksidatif stres oluşumunu tetiklemektedir **(39,40).** Aydın M ve ark. **(41),** yaptığı çalışmada Kisspeptinin antioksidan etkilerinin olabileceğini belirtmişlerdir.

Son yıllarda kisspeptinin erkek üreme sistemi üzerine olan etkisi ve üreme hormonları üzerine yapılan çalışmalarda artış gözlenmekle birlikte sperm kalitesi ve antioksidan aktivite üzerine etkilerini gösteren çalışmalar kısıtlıdır.

Bu değerlendirmeler dikkate alınarak, bu çalışmada; kisspeptin uygulamasının, MTX'in yol açtığı birtakım etkileri (sperm kalitesi, ROB oluşumu, antioksidan enzim düzeyleri, serum testesteron düzeyi gibi) belirlenerek bu parametrelerde meydana gelebilecek değişimlerin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve Kemoterapi

Kanser, vücuttaki çeşitli dokulara ait birtakım hücrelerin normal özelliklerinin dışında değişim göstererek kontrolsüz çoğalması ile oluşan günümüzün en önemli hastalıklarındandır **(42).** Hücre sayısının artması, farklılaşması ve ölümünü düzenleyen genlerde meydana gelen bozukluk sonucu oluşan kanser, dünyada ölümle sonuçlanan hastalıkların başında gelmektedir **(43).**

Kanser, vücudun herhangi bir organında veya dokusunda başlayabilmekte ve yaşamının herhangi bir döneminde herkesi etkileyebilmektedir. Canlı vücudundaki tüm organlar, ihtiyaç halinde yenilerini oluşturmak üzere bölünen hücrelerden oluşmaktadırlar. Eğer hücreler ihtiyaç duyulmamasına rağmen bölünürlerse, tümör adında aşırı bir doku kitlesi meydana getirmektedirler. Tümörler, hayatı tehdit etmeyen benign karakterli ya da kanseröz özellikte malignant karakterli olabilirler. Malignant tümörler, komşu doku ya da organları istila ederek onlara sonunda ölümle sonuçlanacak zararlar verebilmektedirler **(44).**

Kanser hücrelerinde karakteristik olarak altı belirti bulunmaktadır; gelişim sinyalleri verebilme, sınırsız bölünme, büyümeyi önleyebilecek sinyallere karşı duyarsızlık, apoptozdan kaçma yetisi, invazyon ve metastaz yapabilme, çoğalma potansiyeline sahip olma ve anjiogenezi sürekli destekleyebilme özellikleridir **(45).**

Kanser tedavisi üzerine çalışmalara devam etmekle birlikte, çeşitli kemoterapötikler tedaviye yönelik olarak uygulanmaktadır. Kemoterapi, özellikle çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, doğal veya sentetik kimyasal, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavi şeklidir. 1960'lı yıllara kadar kemoterapi semptomatik amaçla, bazı klinik bulguların azaltılması ve hastanın yaşamını biraz daha uzatmak amacıyla kullanılmıştır. Ancak 1960'lı yıllardan itibaren hücre kinetiği bilgileri ve kinetik kavramları kemoterapi protokollerinde uygulanmaya başlanılmıştır. Bu bilgiler arttıkça yeni ilaçlar antikanser aktiviteleri açısından araştırılmaya başlanmıştır **(46)**.

Kanser oluşmayan sağlıklı yapılarda da birtakım olumsuz etkilere sahip olan kemoterapotikler, erkeklerde infertilite ve sterilite gibi üreme sisteminde istenmeyen etkilere sebep olmaktadır. Sperm kalitesinin bozulması, spermatogenezdeki aksaklıklar, ejakülasyon bozukluğu, hipogonadal aksta meydana gelen fonksiyon bozuklukları, cinsel disfonksiyon gibi yan etkiler kemoterapotik ilaçların üreme sisteminde oluşturduğu yan etkilerdir. Testisteki Leydig ve Sertoli hücreleri kemoterapotik ajanlara karşı bir miktar dayanıklı olmasına rağmen, germinal epitel bu ilaçlara oldukça hasastır. Bununla birlikte kemoterapide kullanılan ilaçlar, bunların doz ve uygulama zamanlarına bağlı olmakla beraber, eğer germinal epiteldeki kök hücreler zarar görmeyip sağlıklı kaldığında, spermatogenezde düzelme, tedavinin sonlandırılmasını mütakip belli süre içerisinde olabilmektedir **(7,47,48,49).**

Plazmada bulunan lipit hidroperoksitleri ve tiyobarbitürik asit (TBA)-reaktif bileşiklerin artış göstermesi, hastalarda kemoterapiklerin oksidatif hasara neden olduğunu göstermektedir **(50,51,52).** Kemoterapi ile oluşan ROB'un;

protein, lipid, DNA ve RNA gibi yapılarda hücre ölümüne kadar giden hasara yol açtığı belirtilmiştir **(53,54)**.

Kemoterapi ile birlikte lipit peroksidasyon ürünlerinin arttığı, dolaşımda serbest radikal tutucu etkinin ve A, E, C vitaminleri gibi plazma antioksidan düzeylerinin azaldığı gözlenmektedir. Kanser hastalarının antioksidan seviyelerinin, kemoterapi etkinliği bakımından önemli olduğu belirtilmiştir **(55,56,57,58)**. Antioksidanları tüketen ajanlarla tedavi edilen hastalarda, antioksidanların bu kaybı telafi etmek üzere kullanılması önerilmektedir **(59,60).** Kemoterapi ve kanserli insan ve hayvanlar ile ilgili çalışmalarda sperm ve testis doku dondurma işlemlerinin, hormon uygulamalarının, in vitro spermatogenezin testiküler biyopsi ile yapılması, testis transplantasyonu ve antioksidan uygulamaların kemoterapi öncesi ve sırasında ilaçların erkek üreme sistemi üzerindeki istenmeyen etkilerin önüne geçebileceği belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda kemoterapotiklerin genellikle oksidatif strese bağlı gelişen DNA hasarı oluşum mekanizmasıyla erkek üreme sisteminde istenmeyen sonuçlara yol açtığı ve bu etkilere karşı birçok antioksidanın koruyucu etkisinin olduğu belirtilmektedir **(7,8,61,62,63) .**

Kemoterapotikler, yapılarına göre sitotoksite gösteren antibiyotikler alkilleyiciler, antimetabolitler, hormon türevleri, alkoloidler, bazı enzimler, kortizoller gibi kategorilere ayrılmışlardır **(64).**

Antimetabolit ilaçlar, hücre metabolitlerine olan benzerliklerinden dolayı, enzimler gibi işlev gösteren metabolitlere benzer şekilde aktiviteyi bloke eder,

azaltır ya da bu moleküllerin içine girerek fonksiyonu olmayan bir yapı oluştururlar (Tablo 1) **(65).**

Tablo 1. Antimetabolit İlaçlar (65)

ANTİMETABOLİTLER		
FOLİK ASİT METABOLİTLERİ	***PÜRİN ANTİMETABOLİTLERİ***	***PİRİMİDİN ANALOGLARI***
Metotreksat	6-Merkaptopurin	5-Fluorourasil
Raltireksed	Tioguanin	Kapesitabin
Pemetreksed	Fludarabin	Sitozin
	Kladribin	Arabinozid
		Gemsitabin

Pürin veya pirimidin prekürsörlerinin sentezini inhibe ve DNA metilasyonunu önleyen antimetabolitler DNA ya da RNA sentezini durdururlar ve maksimum sitotoksisiteyi siklusun S fazında oluştururlar. Bu yüzden, kemik iliği, kıl folikülleri, üreme hücreleri gibi çabuk çoğalan hücrelerde bulunan bölünme hızı fazla tümörler üzerinde etki gösterirler. Bunlardan bazılarının farklı kimyasal yapılarının olması sebebiyle de nükleik asit ve nükleosid birleşimlerine girmekte ve toksik etki göstermektedirler **(7, 66).**

Antimetabolitlerin Temel Uygulama Alanları: Melojenik ve Akut Lenfositik Lösemiler, Meme Kanserleri, Osteosarkom ve Ewing's Sarkomunda, Hodgkin ve Nonhodgkin Lenfomalar, Prostat Karsinomaları, Testis Karsinomu, Wilms Tümörü gibi çeşitli tümör tedavilerinde kullanım alanları bulunmaktadır **(67).**

Antimetabolitlerin İstenmeyen Etkileri: Miyelotoksisite, immunsupresyon, hızlı çoğalan hücrelere olan toksisite, embriyotoksik ve teratojenik etki, karsinojenik ve mutajenik etki, bulantı ve kusma, lokal reaksiyon hiperürisemi, alerjik reaksiyonlar **(67)** .

2.2. Metotreksat

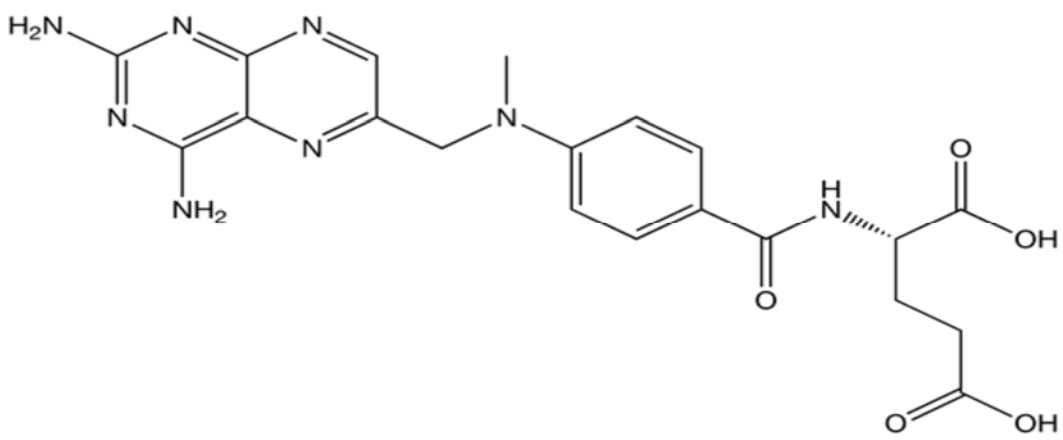
Bir folik asit antimetaboliti olan MTX; lösemi ve diğer malignitelerde kemoterapotik bir ajan olarak, ve düşük dozlarda da psoriazis ve romatoid artrit gibi inflamasyon hastalıklarında yaygın olarak kullanılmaktadır **(13,68).**

2.2.1. Etki Mekanizması

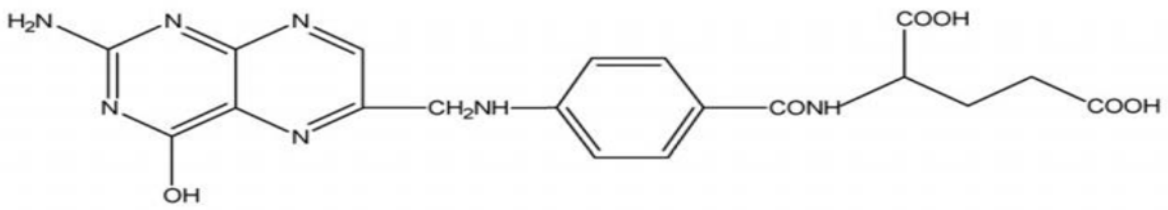
MTX, kimyaca folik asidin 4-amino, N10 –metil analogudur. Folik asit ise DNA sentezinde önemli olan tetrahidrofolat öncülüdür. (Şekil 1) **(69)**.

Folik Asit ($\xrightarrow{\text{Folat Redüktaz}}$) Dihidrofolik asid ($\xrightarrow{\text{Dihidrofolat Redüktaz}}$) Tetrahidrofolat (THF)

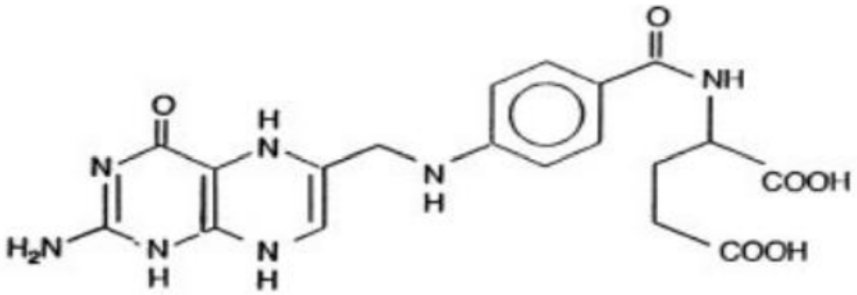
Şekil 1. Folik asit metabolizması (69)



Şekil 2. Methotrexat (70)



Şekil 3. Folik Asit (71)



Şekil 4. Dihidrofolat (72)

Metotreksat, dihidrofolat redüktaz enziminin aktif noktasına sıkı bir sekilde bağlanıp inhibe ederek tetrahidrofolat sentezini durdurur. Bu durum DNA ve RNA için gerekli purin bazlarının (adenin ve guanin) sentezinin durmasına yol açar. Ayrıca protein sentezinin bozulmasına neden olur **(69)**.

Sitotoksik etkisini, S dönemindeki hücreler üzerine gösteren MTX, özellikle tümör hücreleri, karaciğer ve böbrek hücrelerinde uzun süre bağlı kalır. Tümör hücrelerindeki bu durumun tedavi yönünden değeri vardır. Antimetabolitler istirahat halindeki hücrelerde sitotoksik etki yapmamalarına rağmen hücrede uzun süre kalan metotreksatın, latent sitotoksik etkisi vardır;

hücre bölünmeye başladığı zaman bu etki belirgin hale geçer ve hücreyi öldürür **(69).**

Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)'a ve santral sinir sistemine giremeyen MTX'in; meninjeal tümörlerin tedavisi için intratekal verilmesi gerekir. Böbreklerde itrah suretiyle elimine edilir; eliminasyon yarılanma ömrü 8 saat kadardır **(69)**.

2.2.2. Metotreksat Farmakokinetiği

Metotreksat, folik asitin hücreye aktif taşınması ile folik asit yerine yarışmacı olarak membrandan içeri girer. Diğer folatlara benzer olarak karaciğerde poliglutamilasyona uğramasını takiben MTX hücre içinde uzun süreler burada bulunabildiği için mevcut yapısından hidrolitik enzimler yardımıyla eski durumuna dönebilmesi nedeniyle haftada tek doz kullanımı tavsiye edilmektedir **(73)**.

MTX' ın sindirim sisteminden emilimi doza bağlı olarak değişir. Serumda pik seviyeye ulaşımı emilimi takiben 1-2 saat sonra gerçekleşir. Normal şartlarda kullanım dozu haftada 7,5-25 mg'dır ve bunun tek doz uygulanması tavsiye edilmektedir. Fakat bu dozun birden fazla eşit şekilde bölünmesi klinik olarak değişikliğe yol açmaması nedeniyle hasta durumu göz önüne alınarak seçim yapılır. 5/25 mg dozlarında emilimi iyi olup biyoyararlanımı % 60 oranındadır. Doz artırıldığı zaman intestinal flora yoluyla metabolize edilmesi ve bu şekilde atılması nedeniyle emilim azalmaktadır. %50'ye varan oranlarda albüminde bağlı bulunan diğer maddeler ve serum proteinlerine bağlanarak yarışmacı olur.

Uygulanan dozun %60-90'ı iki gün içinde, büyük bir bölümü de 12 saat içerisinde idrar yoluyla değişmeden itrah edilir. MTX' ın böbreklerden itrahı, glomerüler filtrasyonla birlikte tübüler sekresyon ile böbrek yoluyla ve az miktarda safrayla yapılır. Bu sebeple, renal dolaşımı azaltan, zayıf organik asitler ya da nefrotoksiklerle beraber uygulanması, böbreklerden atılımı azaltacağından myelosupresyona sebep olabilmektedir. İnsanlarda MTX metabolizması, genellikle düşük düzeyde olmasına rağmen yüksek dozlarda uygulamasını takiben 7- hidroksi-MTX benzeri metabolitler tespit edilebilir. MTX sistemik dolaşımdaki dozun yaklaşık %3'ü kadar santral sinir sistemine geçer **(73,74).**

Metotreksat, kanserli hücre membranından transportu kolaylaştırma amacıyla uygulama dozunun yüksek olması tavsiye edilmektedir. Hücre içerisinde ilaç yoğunluğunun artışı, dihidrofolat redüktaz (DHFR) artışına bağlı olarak MTX'e, DHFR afinitesinin azalması sonucu direnç oluşumunun da önüne geçilebileceği belirtilmektedir. MTX'in bahsedilen normalden fazla dozlarda uygulanması hücrede poliglutamatların oluşumuna neden olarak ilacın etki süresinde artış meydana getirmektedir. Bununla beraber yüksek doz uygulamaların etkinliği normal dozlarla kıyaslandığında kayda değer bir değişiklik gözlenmemektedir **(67,75,76).**

2.2.3. Metotreksat'ın Endikasyonları

Kemoterapide yüksek dozda (3-10g/m^2/gün) uygulanan MTX; koryokarsinomlar, lenfomalar, lösemiler, osteosarkomlar, göğüs kanseri, baş bölgesinde oluşan kanserler, ovaryum ve sidik kesesi kanserlerinde; diğer antineoplastik ilaçlarla beraber uygulanmaktadır **(18, 67, 77, 78).** Onkolojide

uygulanan dozlardan 100-1000 kat düşük dozlarda (1,000-33,000 mg/m^2) uygulanma durumunda; antiinflamatuar, hücre bölünmesini baskılayan etkisi sebebiyle psöriyazis, romatoid artritler, testikuler kanser, gastrointestinal kanalın ve karaciğerde oluşan bazı inflamatuar hastalıklar ve şiddetli astım durumlarında uygulanmaktadır **(18, 67, 77, 79,80,81)**.

2.2.4. Yan Etkileri

MTX tedavisi esnasında fazla sayıda ve şiddetli yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Yan etkinin şiddeti değişiktir. Sıklıkla 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 **(82)**.

Çeşitli yan etkiler şunlardır:

- Öncelikle ortaya çıkan belirtiler, ağızda ağrı ve ülserasyon oluşumlarıdır.
- Teratojen etki; gebeliğin bütün dönemlerinde metotreksat kullanımı zarar verebilmektedir **(83, 84)**.
- Kemik iliği baskılanması sonucunda trombositopeni, lökopeni, agranülositoz görülebilmektedir **(83,85) .**
- Radyoterapi ile intratekal uygulamalarda, baş ağrısı ile birlikte ateş ve ense bölgesinde sertlik ile karakterize araknoidit oluşumu meydana gelir. Uygulamayı takiben birkaç hafta içinde kraniyal ve

motor sinir paralizler; konvülsiyon ve koma şekillenmesi gözlenebilir **(86)**.

- Sindirim kanalında inflamasyon sonucu kusma, mide bulantısı, anoreksiya, abdominal ağrı görülebilir **(83).**
- Enfeksiyon duyarlılığı artabilmektedir **(67)**.
- Oral yolla uzun süreli sağaltımlarda siroz ve vena porta fibrozuna neden olabilir.
- Yüksek dozlarda uygulanması durumunda alopesi ve deride pigmentasyon ve fotosensibiliteye sebep olabilmektedir **(83).**
- Akciğerlerde infiltrasyon yapabilir.
- Düşük dozlarda saçlarda incelme gözlenmektedir **(84).**
- Gonadlara toksik etkilir, spermazoidlerde değişme ve oligospermiye gibi sperm kalitesinde bozukluklara neden olmaktadır **(67,83)**.

MTX gibi kemoterapotik ilaçların, hücreler üzerine sitotoksik etkisi bu hücreler için seçici olmaması nedeniyle çoğalma hızı yüksek olan kemik iliği, intestinal mukoza, kıl kökleri gibi sağlıklı dokularda da toksisite gözlenebilmektedir. Antikanser ilaçlar bunun yanında gonadlar üzerine de etkilidir **(87).**

MTX, oksidatif hasar yoluyla veya doğrudan toksisite göstererek testiküler hasara neden olmakta ve üreme sistemi üzerine olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Farelerde yapılan çalışmada MTX uygulaması ile seminifer tübüllerde

atrofiyle beraber vakualizasyon, hücresel deskuamasyon ve yapısal farklılıklar gözlenmiştir **(88).**

Farelerde yapılan araştırmada; MTX' in; sperm sayısında azalma, testis ağırlığı azalması, sperm baş anormalliklerinde artış, seminifer tübüller ve sperm DNA'sı üzerinde hasar oluşturduğu belirtilmiştir **(89)**.

2.2.5. Kullanıldığı Alanlar

Metotreksat kemoterapide sıklıkla kullanılan antimetabolit yapıdaki bir antifolattır. Antifolatlar, DHFR'ı ve purin ve timidin biyosentezini inhibe eder. Metotreksat lösemiler, lenfomalar, meme kanseri, baş ve boyun kanserlerinde kullanılır **(90)**.

MTX'in romatizmal hastalıklardan kanser metastazına kadar yaygın kullanım endikasyonları bulunmaktadır. Çocuklarda gelişen akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılan önemli bir ilaçtır. Hem remisyon indüksiyonunda hemde konsolidasyon sırasında yüksek dozda i.m kullanılır. Bu durumda kür şansı yüksek olmasına rağmen erişkinlerde görülen lösemilerde, lösemik menenjitin önlenmesi ve tedavisi dışında MTX'in tedavi edici etkisi daha sınırlıdır. Meningeal karsinomatozis tedavisinde, meningeal lösemi ve lenfomanın profilaksi ve tedavisinde intratekal olarak kullanılır **(91).**

2.3. Antioksidan Sistem, Oksidatif Stres ve Kemoterapi

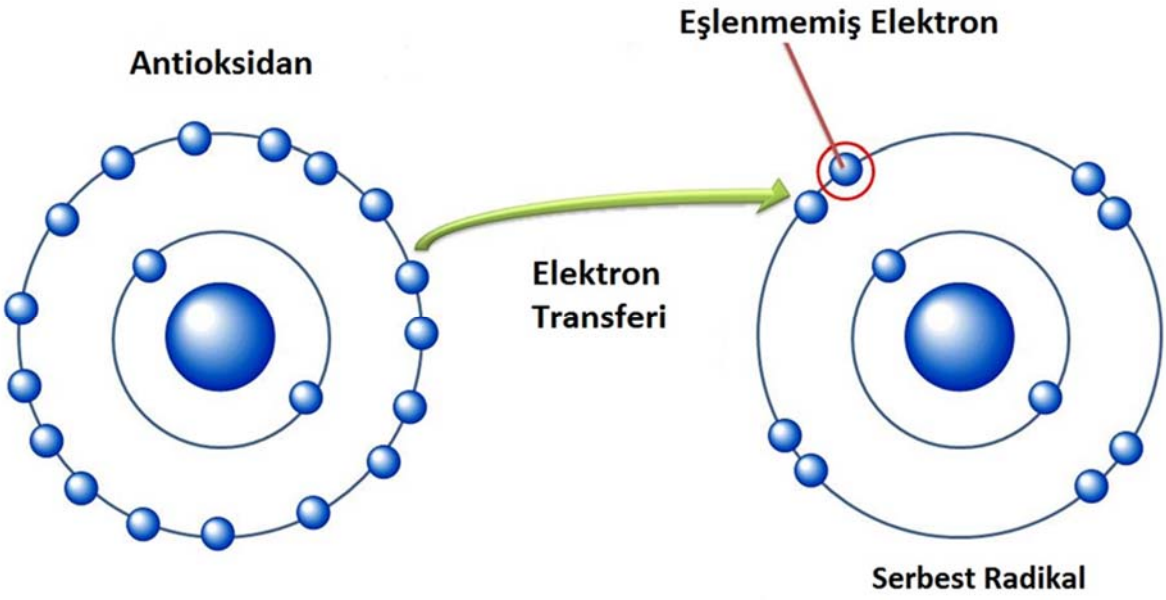
Serbest radikaller, eşlenmemiş elektron taşıyan moleküllerin atomik orbitali üzerinde bulunması olarak tanımlanır **(92,93).**Oksidatif stresin

tetiklenmesi ise ROB oluşumu artması ile şekillenmektedir. Temel olarak oksidatif stres, antioksidanlarla prooksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanlar yönünde artması şeklinde belirtilmiştir **(94,95).** Hücreler hafif seyirli oksidatif stres ile mücadele edebilmelerine rağmen antioksidan enzim sistemleri aktivasyonunu başlatırlar. Bununla birlikte, hücrenin savunma sistemleri yetersiz kaldığı zaman, ROB ve antioksidan arası denge bozulur. Bu durumda oksidan hasara duyarlı nükleotidler, proteinler, karbonhidratlar ve lipidler dahil olmak üzere çeşitli yapılar zarar görür **(96,97,98,99,100).**

Lipid peroksidasyon bir hidrojen atomunun reaktif bir radikal tarafından metil gruplarından koparılması ile başlar. Serbest radikal oluşması ve takiben moleküler oksijenin bağlanması ile lipit peroksidasyon oluşur **(101)**.

Lipid peroksidasyonu; zar lipid yapısında değişikliklere yol açması sonucu zar fonksiyonunda bozulma ve enzimlerle diğer hücre komponentleri üzerinde serbest radikallerin etkisiyle ortaya çıkan aldehitlerin toksik etkiler sonucu çeşitli yollarla hücrede hasara sebebiyet verdiği düşünülmektedir.Malondialdehit (MDA) lipit hidroperoksitleri ile son yıkım ürünü olan düşük molekül ağırlıklı lipit peroksidasyonunun belirteci olarak bildirilmiştir **(95,102)**.

Çeşitli kemoterapötikler ve radyoterapi uygulamaları serbest radikal oluşturarak hücre hasarına sebep olurlar, antioksidanlar ise serbest radikalleri ve oksidatif reaksiyonların etkisini ortadan kaldırmaktadırlar **(55,103)**.



Şekil 5. Antioksidan ve Serbest Radikal **(104)**

Kemoterapi uygulaması yapılan hastalarda, plazma lipit peroksitleri ile TBA-reaktif bileşikleri oluşumda meydana gelen artış, kemoterapotiklerin oksidatif hasara neden olduğunu göstermektedir **(50,52,105).**

Kemoterapi ile oluşan ROB'ların; nükleik asitler, protein ve lipid gibi yapılarda hücre ölümüyle sonuçlanan hasara oluşturmaktadır **(53,54)**.

Kemoterapi lipid peroksidasyona sebep olmasına rağmen, kemoterapi aracılı hücre sitoksisitesinden, ROB oluşumu sorumlu tutlmaktadır. Çeşitli çalışmalarda, kematerapötik ve antioksidan uygulanan araştırmalarda, antioksidanların, deney hayvanlarında doksorubisin, sisplatin gibi sitostatik ilaçlara bağlı antitümör etkiyi azaltmadığı ve sadece kemoterapi uygulananlara göre hayatta kalma süresinde artış olduğu belirtilmiştir **(106,107)**. Etkili bir antineoplastik olan metotraksat, akut lenfoblastik lösemi gibi hastalıklarda

klinikte sıklıkla uygulama alanı bulmaktadır **(24)**. Normalden fazla verilen dozlarda, nörokognitif bozukluk benzeri istenmeyen etkilere yol açmaktadır. Bu etkilerde, MTX uygulaması sonucu stimüle edilen oksidatif stresin de rolü olduğu belirtilmiştir **(108)**.

Antioksidanlar yardımıyla, kemoterapi uygulamaların bazı sitotoksik etkilerin önüne geçilebileceği belirtilmiştir. Çeşitli çalışmalarla antioksidanların kemoterapiye bağlı toksisite sebeplerini azalttığı belirtilmiştir **(59,55,109,110,111)**.

Kemoterapiye bağlı toksisitenin antioksidanlar tarafından indirgenerek, daha fazla etki edebilecek dozların kullanılabileceği belirtilmiştir **(109,112)**.

Antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu engellemeleri yanında hücre içi makromoleküllerin de korunmasını sağlarlar ve oksidasyona uğrayan substrata kıyasla mevcut, az derişimli bulunan ve bu substratta meydana gelen oksidasyonu geciktirebilen veya önüne geçen madde şeklinde tanımlanmaktadırlar **(113,114)**.

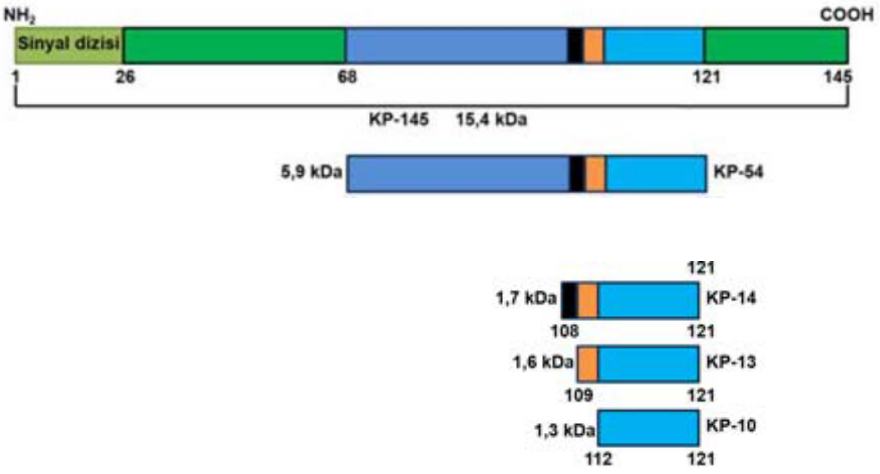
Lipid peroksidasyon oluşumundan hipotalamustaki hormonların hücre reseptörlerine zayıf bağlanması sorumlu tutulabilmektedir. Bu nedenle lipid peroksidasyondaki artış ve antioksidan seviyede meydana gelen azalma dolaşımdaki düşük testesteron ve gonadotrop seviyesiyle ilişki kurulması mümkündür **(115)**.

Antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik şeklinde iki gruba ayrılabilirler; bunların başlıcaları; Glutatyon (GSH), Glutatyon redüktaz (GSH-Red), Glutatyon peroksidaz (GSH.px), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT)'gibi enzimatik olanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar içerisinde; E ve C

vitaminleri, transferrin, seruloplazmin, ürat, bilirubin, albumin, β-Karoten, glukoz, piruvat, taurin, sistein, glutatyon ve melatonin bulunmaktadır **(116, 117).**

2.4. Kisspeptinler

Kisspeptinler, ilk olarak 1996 yılında keşfedilen ve metastaz süpresör geni olarak tanımlanan Kiss-1 geni tarafından kodlanan nöropeptidlerdir (19)**.** Bu gen tarafından kodlanan 145 amino asit yapısına sahip öncü protein, post-translasyonel modifikasyonlar sonucunda C-terminal bölgelerinde, 10,13,14,54 amino asit uzunluğunda (Şekil 6) çeşitli aktif formlarına dönüşmektedir ve bu sekansların hepsi GPR54'e bağlanarak etkisini gösterir **(118, 119)**. Bu formlar enerji metabolizması ve reprodüksiyon ile yakından ilişkili olan ve C-terminallerinde ortak arginin-fenilalanin motifine sahip olan RF-amid peptid hormon ailesi içerisinde yer almaktadır **(120,121,122).**



Şekil 6. Kisspeptin prekürsörü KP-145 ve karboksi terminal parçasından oluşan kisspeptin-54 (metastin), kisspeptin-14,13 ve 10 **(123)** .

Kiss sözcüğündeki "ss" takısı supresör sekansı tanımlamaktadır ve bu gen yapısı ilk olarak ABD'nin Pennsylvania Eyaleti'nin Hershey şehrindeki bilim adamları tarafından keşfedildiğinden dolayı bu bölgenin meşhur *Kiss* çikolatasına ithaf edilerek "Ki" ön eki getirilip, Kiss-1 geni olarak adlandırılmıştır **(19,20,21)**.

Kisspeptinler, arginin, fenilalanin amid peptid hormon ailesine bağlıdır **(124).**Kisspeptinlerin tüm fragmentleri G protein ile eşleşen GPR54'ü etkili bir şekilde aktive eder. Ancak en kısa yapıdaki kisspeptin-10 reseptör düzeyinde maksimum etki gösterir. Daha uzun formların in vivo etki başlangıcı daha yavaş ve muhtemelen daha uzun süreli etkilidirler **(22)**.

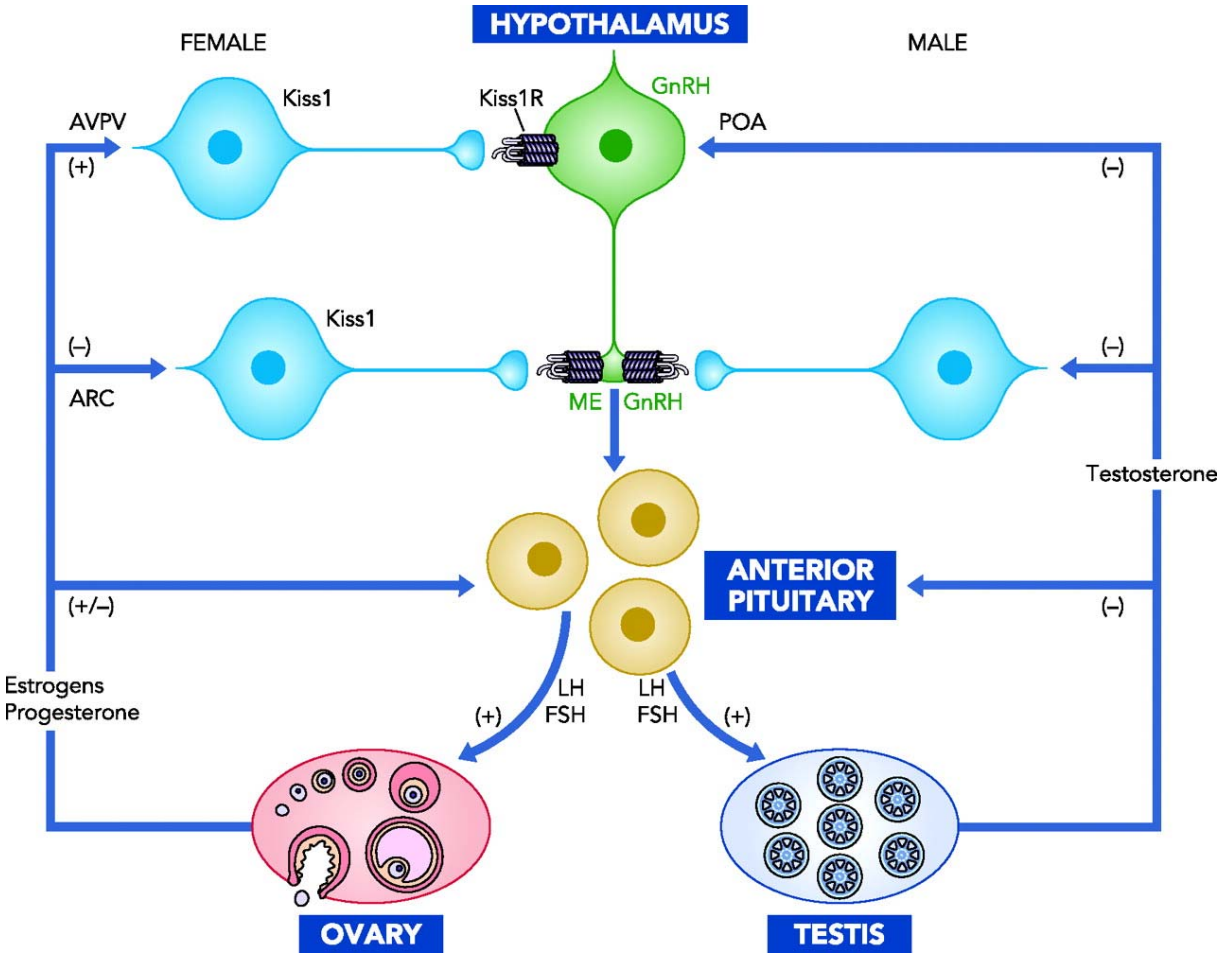
GPR54'ün ve ligandının histokimyasal yapısına bakıldığı zaman, çeşitli organlar, bezler ve dokularda salındığı ortaya çıkmıştır. Bunlar arasında hipotalamus, beyin sapı, hipofiz, omurilik, over, plasenta ve prostat vardır.Kisspeptinin bu farklı dokulardan salınımı, üreme sisteminin farklı basamaklarında düzenleyici rolü olabileceğini düşündürmektedir **(125, 126).**

Seminara ve ark. **(28)** farelerde GPR54 geni tahribatı sonucu farelerin puberteye ulaşamadığını belirlemişlerdir. De Roux ve ark. **(127)** ile Seminara ve ark. **(28)** aynı zamanda yaptıkları çalışmalar sonucunda idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm tanısı konulmuş hastalarda aynı zamanda GPR54 mutasyonu bulunduğunu belirmişlerdir ve GPR54 KO (knock out) farelere benzer şekilde, bu hastaların puberteye ulaşamama ve hipogonadotropik hipogonadizm haricinde sağlıklı oldukları bildirilmiştir **(28)**.

Bu çalışmaları takiben Funes ve ark. **(29)** GPR54 KO farelerde de aynı belirtilerin meydana geldiğini belirtmişlerdir. GPR54 ve Kiss-1 ekspresyonu değişikliklerinin de ergenliğe girme zamanının belirlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Navarro ve ark. **(128)** ratlarda erişkinliğe ulaşırken, Kiss-1 mRNA ve GPR54 mRNA seviyesinde artış şekillendiğini göstermişlerdir.

Erişkinliğe ulaşan hayvanlarda üreme başlangıcı önbeyin, hipofiz ve gonadların etkileşimini gerektirir. Puberte başlangıcında, kisspeptin nöroendokrin olaylardan sorumlu temel peptid olarak kabul edilir **(129).** Kisspeptin ve buna bağlı olarak GnRH salgılanmasını internal ve eksternal çeşitli faktörler düzenlerler **(130).** Ergenlik, GnRH üreten hipotalamustaki nöronların aktivasyonu ile başlar. Bununla beraber, dişi sıçanlarda kisspeptinin santral yolla kronik uygulanmasının pubertenin birkaç gün erken başlamasına sebep olduğu bildirilmiştir **(128).** Buna bağlı olarak puberte dönemlerinde, hayvan çalışmalarında kisspeptin nöronlarının aktivitelerinde artış olduğuyla ilgili çeşitli veriler elde edilmiştir **(128,131)**. Clarkson ve Herbison **(132)**, dişi farelerin hipotalamusunda, anteroventral ve preoptik periventriküler çekirdeklerinde

erkeklerinkine göre yaklaşık 10 kat daha fazla Kiss-1 nöronu kapsadığını göstermiştir.



Şekil 7. Memelilerde Hipotalamo-Hipofizer Gonadal Aks (133)

AVPV: Anterolateral Periventrikuler Nukleus **ME:** Median Eminens

ARC: Arkuat Nukleus **POA:** Preoptik Alan

Puberte döneminde GnRH'nın pulsatil salgılanması gonadotrop hormonlar FSH ve LH'nın salınmasını uyarır. Gonadlarla ilgili bu hareket, gamet oluşumu ve GnRH, FSH, LH gibi gonadal steroidlerin üretimini stimüle eder. Kisspeptin nöronları (Kiss1) steroid geri bildirim için GnRH sekresyonu üzerinde temel bir

başlatıcı etki gösterir. Dişilerde östrojen ve progesteronun yüksek seviyeleri GnRH/LH'nın preovulator dalgalanmalarını uyarmak için AVPV'deki Kisspeptin nöronlarını uyarırken arkuat nükleustaki (ARC) Kiss1 ekspresyonunu inhibe eder. Erkeklerde ise GnRH ve gonadotropların salınımı ARC'deki kisspeptin nöronlarının aktivitesi ile dolaşımdaki testesteron tarafından negatif geri beslemeyle düzenlenir**(Şekil 7) (133).**

İn vivo koşullarda kisspeptinin uygulanması, fare, sıçan, maymun ve koyunları içeren farklı türlerde plazma LH seviyesini artırdığı bildirilmiştir. Kisspeptin intraserebroventriküler, intravenöz (damar içi), intraperitoneal (karın içi), ya da subkutan (deri altı) yollar ile uygulandığı zaman, LH salınımını uyardığı gözlenmiştir **(134).**

Tovar ve ark. **(135),** yapmış olduğu çalışmada sırasıyla 0.3, 3 ve 30 nmol i.v kisspeptin-10 uygulaması sonucunda 3 ve 30 nmol düzeylerindeki uygulamanın 0.3 nmol'e göre LH uyarısı daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca 30 nmol uygulama ise 3 nmol'e göre istatiksel anlamlılık göstermese de daha yüksek oranda LH uyarısına sebep olmuştur **(135)**.

Ramzan ve ark. **(136),** fertil ve infertil erkekler üzerinde yapmış olduğu çalışmada fertil erkeklerde serum kisspeptin seviyesi ortalama 23.32 ng/ml bulunmuş olup, infertil erkeklerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

GPR54 agonistleri gecikmiş ergenlik tedavilerinde ergenliği başlatmak için potansiyel tedavi edici ve ovulasyon olmayan hastalarda ovulasyonu uyarıcı etkisi vardır **(37).**Yapılan bir çalışmada (8-30 saat) i.v. kisspeptin uygulaması

mevsimsel anöstrus olan koyunlarda, hayvanların %80 inde (% 20 si kontrol ile karışılatırıldığında) ovulasyon görülmüştür **(137)**.

İnfertil erkeklerde yapılan çalışmada serum Kisspeptin seviyelerinin sağlıklı erkeklere oranla düşük olduğu belirtilmiştir **(138).**

Kiss1 geninin spermatozoa fonksiyonlarını düzenlediği de yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur **(139).**

Thompson ve ark. **(140,141)**, kisspeptinin kronik olarak erişkin erkek sıçanlara uygulanmasının testiküler dejenerasyona sebep olduğunu, bu etkinin bir GnRH antagonisti olan cetrorelixin önce uygulanması ile *in vivo* olarak HPG aksı üzerine kisspeptinin etkisinin önlenebilirliğini göstermişlerdir**.** Kisspeptin-54'ün erişkin sıçanlara uzun süreli subkutan uygulaması testislerde, sertoli ve germ hücreleri kaybı ile sonuçlanan belirgin dejenerasyona sebep olmuştur **(140).** Kisspeptin-54'ün sebep olduğu bu testiküler dejenerasyonunun mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Kisspeptin'in spermatogenezis ve testiküler doku üzerine etkileri hakkında az sayıda bilgi mevcuttur **(34, 35, 142, 143).**

Kisspeptin-GPR54 sistemi üreme sistemini ve üreme sisteminde meydana gelebilecek hastalıkların tedavisinde kullanılması öngörülen bir peptiddir. Memelilerde kisspeptinin uygulanması HPG aksı güçlü bir şekilde uyarır. Bu nedenle infertilite, puberteye girmesi gecikmiş gençlerde potansiyel tedavi edici etkisi bulunmakta ve ovulasyonu olmayan hastalarda bu peptidin agonistlerinin ovulasyonu uyarıcı etkisi bulunmaktadır **(31)**.

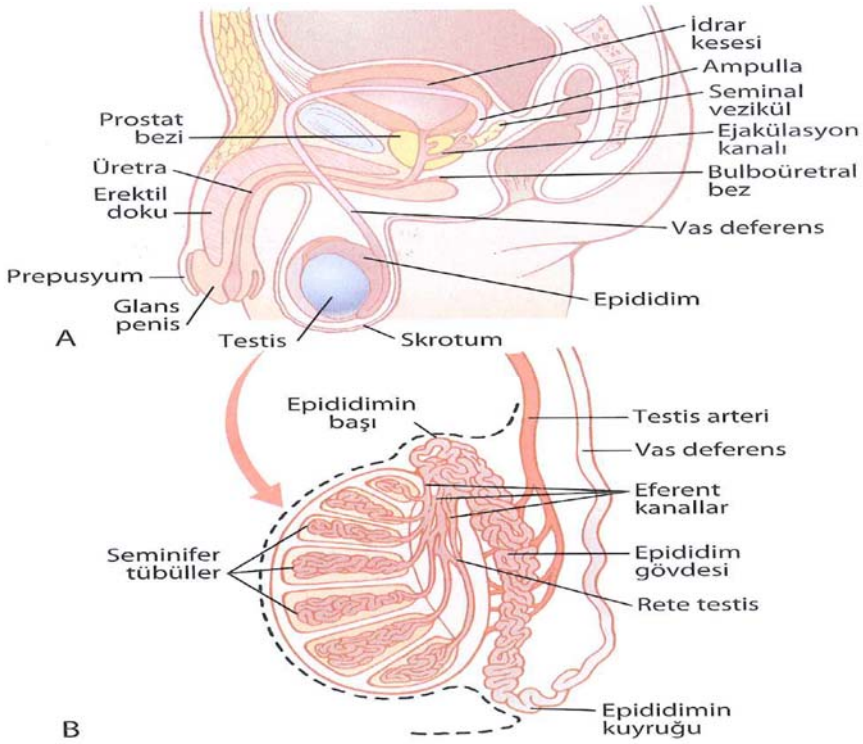
2.5. Erkekte Üreme Fizyolojisi

Erkek üreme sistemi iki testis, spermleri depolayan ve dışarı taşıyan bir kanallar sistemi, bu kanllara boşalan bezler ve penisten oluşur. Kanal sistemi, bezler ve penis erkek aksesuar üreme organlarını yapmaktadır **(144).**

Erkekte esas üreme fonksiyonu sperma hücresini (*spermatozoon'u)* oluşturmaktır (*spermatogenezis'tir).* Sperma hücresini *testis* oluşturur. Testis ayrıca erkek cinslik hormonu olan testesteron'u yapar. Testis iki ayrı doku taşır; birisi tubuli seminiferi'den oluşur ve sperma hücrelerini meydana getirir; diğeri *interstitiai hücrelerden* oluşur ve testosteron hormonunu meydana getirir (Şekil 8). Spermatogenezis için testosteron hormonuna ihtiyaç vardır **(145).**

2.5.1. Testisin Yapısı ve Spermatogenezis

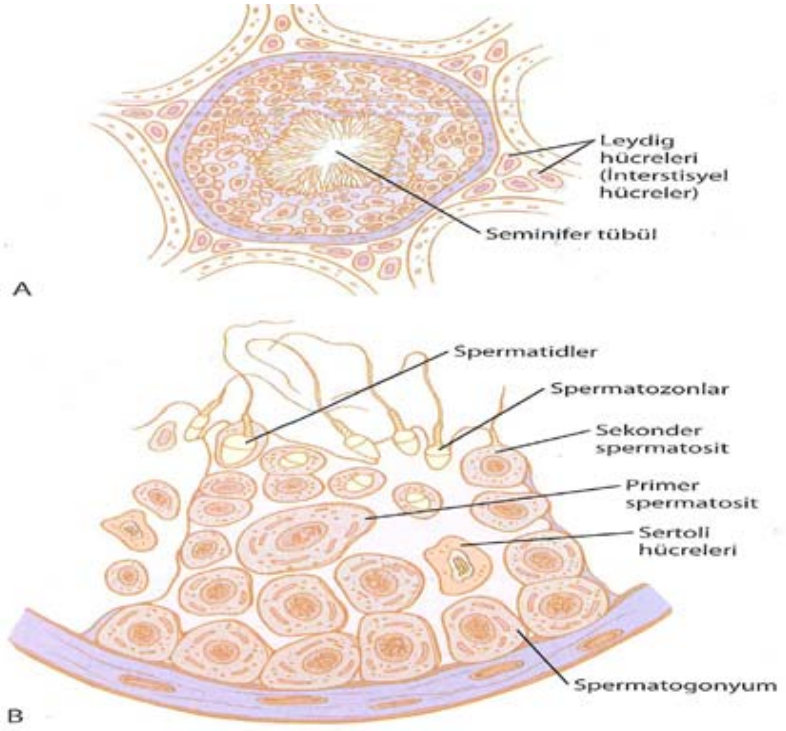
Testis birçok tubuli seminiferi'den yapılmıştır. Bu tubuller testisin ortasındaki *rete* adı verilen ağ manzarasındaki borulara açılırlar. Tubuli seminiferi'de oluşan spermatozoa reteye, buradan *epididimis* borularına geçerler. Epididimisin bir baş bir de kuyruk kısmı vardır. Kuyruk kısmı *ductus deferens* 'e eklidir. Spermatozoa ejekülasyon esnasında epididimisten ductus deferens'e, buradan ejekülasyon borusu (*ductus ejacuiatorius)* yoluyla *prostat* içinden geçen uretraya geçerler (Şekil 4). Tubuli seminiferi arasında Leydig'in interstisiyel hücreleri bulunur ki, bu hücreler erkek cinsiyet hormonu olan *testosteron'*u salgılar (Şekil 8) **(146).**



Şekil 8. Erkekte Üreme Sistemi (A) ve Testisin Yapısı (B) (147)

Testisi besleyen arterler (*arteria testicularis)* ve venalar (*vena testicularis)* birbirine paralel seyrederler; içlerinden akan kan birbirinin aksi yöndedir. Böylece arterler ve venalar arasında ters akım alış - veriş sistemi kurulmuştur; ısı ve testosteron alış - verişi sağlanır. Testisin interstisiyel hücrelerince salınan testosteron venalara girer, ters akım yoluyla venadan arterlere geçer, vücuda dağılır, testis ve özellikle skrotum sıcaklığı 32 C'de (genellikle 33C - 35C'de) tutulmak üzere hassas bir şekilde ayarlanır; zira sperma yapımı vücut iç sıcaklığından daha düşük bir sıcaklığa (33-35C) ihtiyaç gösterir. Deney hayvanlarında testisler vücut sıcaklığında tutulduklarında, sterilite görülür. Seminiferus tubul epitelyumunda bazal membrana en yakın hücreler, *spermatogonia,* ergenlik çağında mitotik olarak çoğalırlar ve primer

spermatositieri oluştururlar. Bu hücreler meiozis ile kromozom sayısını yarıya indirirler ve bunlardan sekunder spermatositler meydana gelir. Sekunder spermatositler de spermatidieri oluştururlar. Spermatogoniumdan spermatidlere kadar olan olgunlaşma evrelerinde hücreler birbirine sitoplasmik köprülerle bağlı bulunurlar **(146)**. (Şekil 9)



Şekil 9. Seminifer Tübülün Enine Kesiti (A) ve Spermatogonyumdan sperm gelişmesine kadar olan aşamalar (B) (147).

Spermatidier büyük Sertoli hücrelerinin sitoplazmasına gömülüdürler ve burada olgun *spermatozoa* meydana getirirler. İnsanda spermatogoniumdan spermatozoon oluşumuna kadar geçen süre ortalama 74 gün kadardır. Olgunlaşan spermatozoa Sertoii hücrelerinden serbest bırakılırlar ve tubul boşluğuna (tubul lumenine) girerler. Sertoii hücreleri *androjen bağlayıcı protein(ABP)* ve *inhibin*

salgılarlar. Androjen deyimi erkek cinsilk hormonları karşılığı olarak kullanılır. Androjenler sadece testis tarafından değil, diğer yerlerden, örneğin adrenal korteksten, salınan erkek cinslik hormonlarını da kapsar. Testis androjeni testosterondur. FSH Sertoili hücrelerinin ABP salgılamasını uyarır. Bu protein testosteron ve dihidrotestesteron bağlayarak hormonların taşınmasını, seminifer tubullerde yüksek yoğunlukta ve stabil olmasını sağlar. Testosteron spermatogenezisi uyarır.

Sertoili hücrelerinin salgıladığı *inhibin,* bir polipeptid, FSH salınmasını önler. Özet olarak, androjenler (testosteron) ve FSH gametogenezis (spermatogenezis) fonksiyonunun devamını sağlarlar. Adenohipofizden salınan LH ya da interstisiyel hücre stimüle edici hormon (ICSH) Leydig hücrelerinin testosteron salgılamalarını uyarır (Şekil 9) **(146)**.

Ejekulasyon ile penisten dışarı verilen *semen (*meni), seminal vezikül, prostat, bulbouretral bez salgıları ile spermatozoa taşıyan bir sıvıdır. Bir defalık ejekulasyonda 2.5-3,5 ml kadar semen çıkarılır ve 1 ml'de 100 milyon kadar spermatozoa bulunur. Mililitrede 20 milyonun altında spermatozoa bulunan erkekler sterildirler (çocuk yapamazlar). Semende yüksek yoğunlukta prostaglandinler bulunur. Hernekadar adını prostat bezinden almış iseler de prostaglandinler prostat bezinden değil seminal vezikülden gelirler **(146)**.

2.5.2. Erkek Cinsel İşlevlerinin Hipotalamus ve Ön Hipofiz Bezinden Salgılanan Hormonlarla Kontrolü

Her iki cinsiyette cinşel işlevler hipotalamustan GnRH salınmasıyla kontrol edilir. Bu hormon, LH ve FSH denilen gonadotropik hormonlar ön hipofiz bezini uyararak salınmasına yol açar. LH, testislerden testosteron salgılanmasını uyarırken, FSH spermatogenezi stimüle eder **(147)**.

2.5.2.1. GnRH'nın LH ve FSH Salgısını Artırıcı Etkisi

GnRH 10 amino asitli bir peptit olup, *hipotalamusun arkuat çekirdeğinden* salgılanır. Bu nöronların sonlanmalan başlıca, hipotalamusun medyan eminens bölgesinde gerçekleşir. Bu bölgedeki nöronlardan salgılanan GnRH, hipotalamus-hipofiz portal sistemi damarlarına serbestlenir. Daha sonra, GnRH portal kan yoluyla ön hipofize taşınır ve iki gonadotropin, LH ve FSH'nın salgılanmasını uyarır.

GnRH aralıklı olarak 1-3 saatte bir, birkaç dakika süreyle salgılanır. Hormonun uyarıcılık şiddeti, iki olaydan etkilenir: (1) Salgılama döngülerinin sıklığı ve (2) herbir döngüde salgılanan GnRH'nın düzeyi ön hipofizden salgılanan LH da GnRH gibi döngüler halinde, pulsatil olarak salgılanır. Oysa FSH salgısı, GnRH düzeyindeki küçük değişimlere bağlı olarak çok hafif artış ya da azalma gösterir. GnRH'daki uzun süreli değişimlere karşın, FSH birkaç saatten fazla bir dönem sonunda çok yavaş yanıt verir. GnRH salgısı ile LH salgısı arasındaki çok yakın ilişki nedeniyle, GnRH aynı zamanda *LH-serbestleştirici hormon* olarak kabul edilir **(147)**.

2.5.2.2. Gonadotropik Hormonlar: LH ve FSH

Gonadotropik hormonlar, FSH ve LH'ın testisler üzerine olan etkileri arasında net bir farklılık vardır (Şekil-10). FSH esas olarak sertoli hücrelerinin spermatogenez için gereken parakrin ajanları salgılamasını uyarır. LH ise aksine, esas olarak Lydig hücrelerinin testesteron salgılamasını uyarır. Leydig hücrelerinden salgılanan testesteron, bir hormon olarak önemli sistemik etkilerine ek olarak, interstisyel boşluklardan seminifer tübüllerin içine sızarak yerel şekilde parakrin tarzda etki gösterir. Testesteron, spermatogenezi kolaylaştırdığı sertoli hücrelerine girer. Yani, seminifer tübüllerdeki hücreler üzerine doğrudan bir etkisinin bulunmamasına karşın LH, spermatogenez için gereken testesteronun salgılanmasını uyarması nedeniyle esas olarak dolaylı bir etki göstermektedir **(144).**

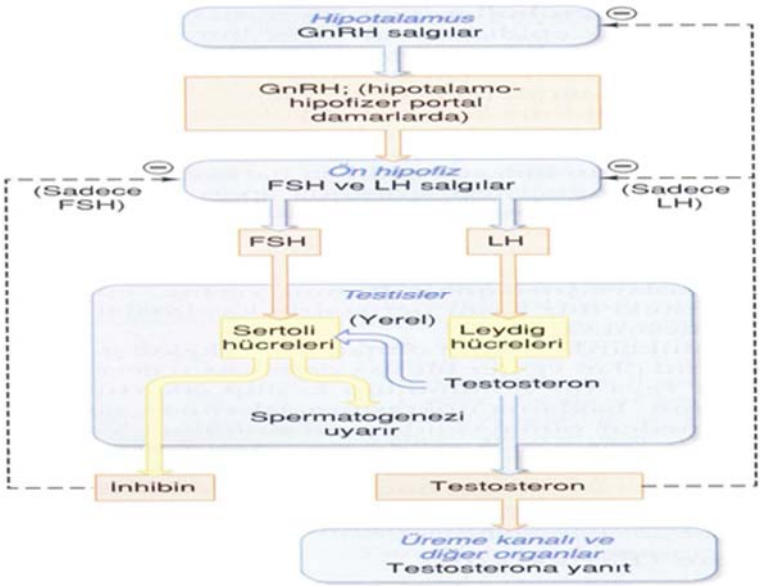
2.5.2.3. Testosteron Yapımının LH ile Düzenlenmesi

Testislerin *Leydig hücrelerinden testosteron* salgılanması, yalnızca hipofiz bezinden salgılanan LH'nın uyarısı ile gerçekleşir. Bunun da ötesinde, salgılanan testosteron miktarı, uyarıcı LH miktarıyla yaklaşık doğru orantılıdır.

Testislerde olgun Leydig hücreleri normalde doğumdan sonra birkaç hafta kadar bulunur; daha sonra 10 yaşından sonrasına kadar bulunmaz. Ancak, herhangi bir yaştaki çocuğa saflaştırılmış LH enjekte edildiğinde veya püberte döneminde LH salgısının arttığı durumlarda, testislerdeki fibroblastlara benzeyen interstisyel hücreler, işlevsel Leydig hücrelerine dönüşürler **(147)**.

2.5.2.4. Ön Hipofiz FSH ve LH Salgısının Testosteron Tarafından Baskılanması-Testosteron Salgısının Negatif Geribildirimle Kontrolü

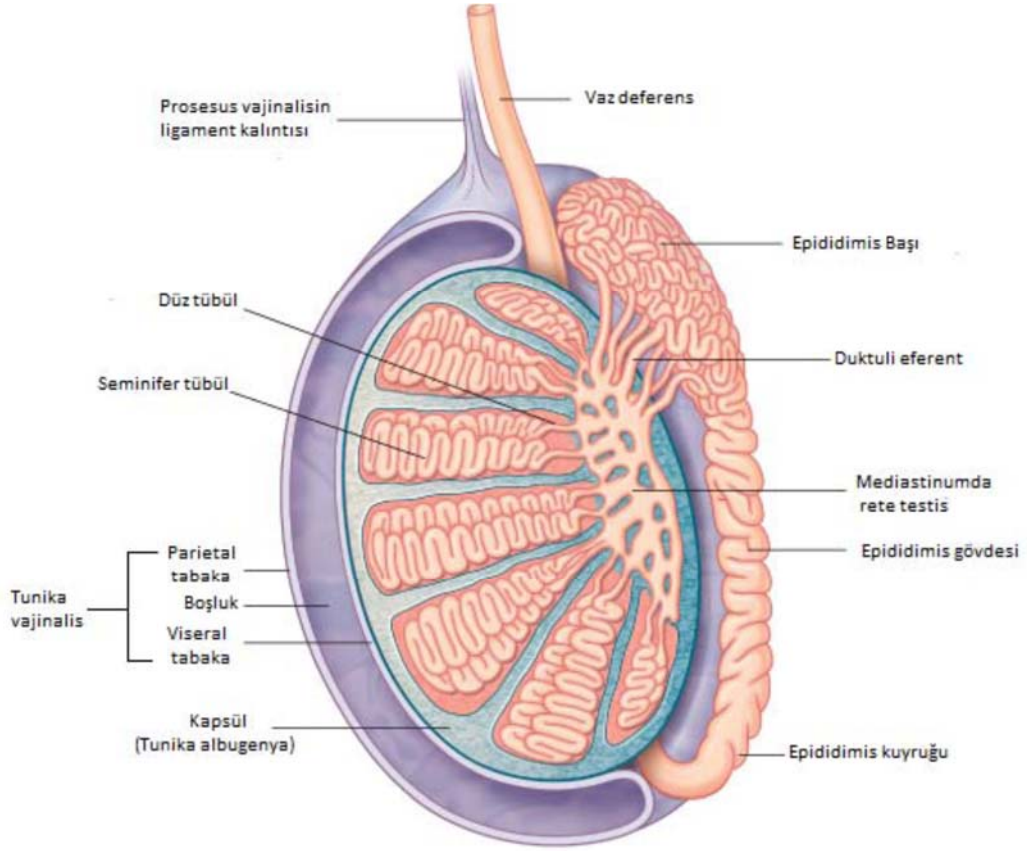
LH uyarısı ile testislerden salgılanan testosteron hormonu, ön hipofizden LH salgısını baskılar (Şekil-10). Bu baskılamanın büyük kısmı olasılıkla, testosteronun doğrudan hipotalamusa etkisi sonucu, GnRH salgısının azaltılmasına bağlıdır. Bu da daha sonra, ön hipofizden LH ve FSH salgısını azaltır ve LH'nın azalması da testislerin testosteron salgısında azalmaya neden olur. Böylece, testosteron salgısının çok fazla olması halinde, otomatik olarak negatif geri-bildirim etkisiyle hipotalamus ve ön hipofizin salgısı azaltılarak testosteron sekresyonu baskılanır ve hormon düzeyi normale getirilir. Buna zıt olarak, testosteronun çok az olması halinde hipotalamustan yüksek düzeyde GnRH salgılanır. Ön hipofizden LH ve FSH salgısı artar ve testiküler testosteron sekresyonu yükselir **(147)**.



Şekil 10. Erkek Üreme Sisteminin Hormonal Düzenlenmesi (144)

2.6. Testis Histolojisi

Testisler, spermatozoonun üretildigi ve erkek cinsiyet hormonu testosteronun üretilip salgılandığı ekzokrin ve endokrin işlevi olan yapılardır. Spermatogenezisin oluştuğu her bir seminifer tübül yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır **(148).**

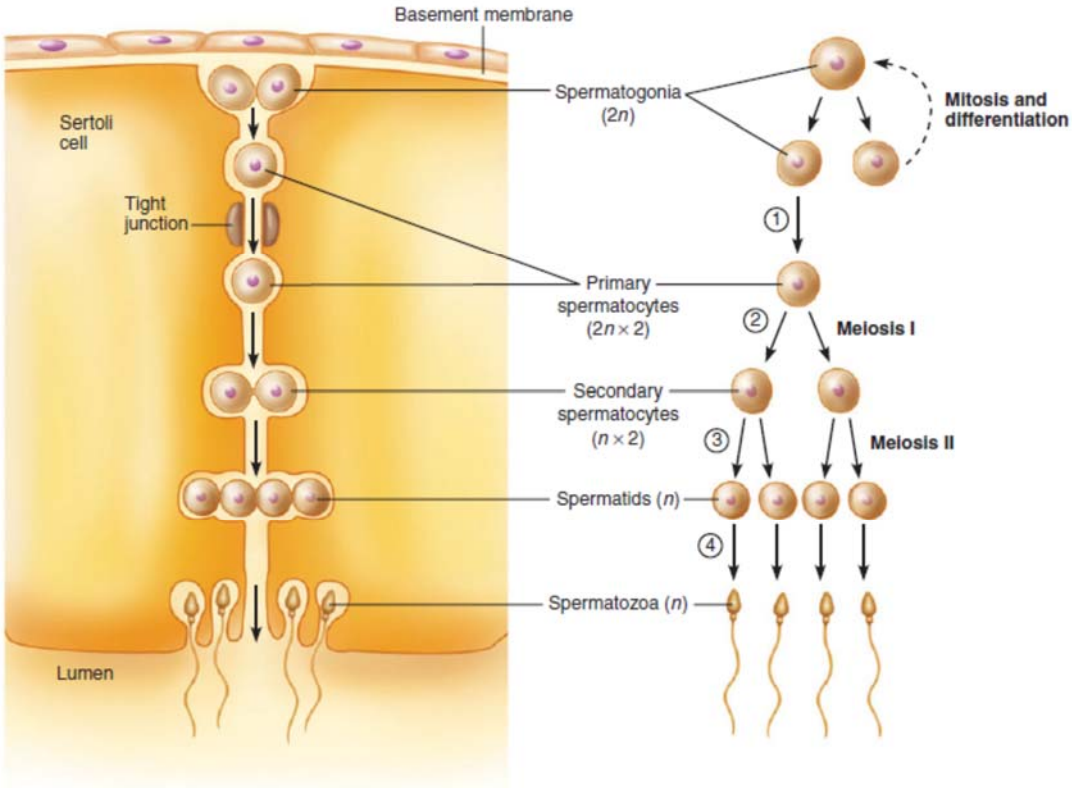


Şekil 11. Testis ve genital kanalların şematik görünümü (149)

Seminifer tübüller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve kompleks bir germinal veya seminifer epitelden oluşur (Şekil 11). Bu tübülü saran birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal lamina dışındaki tabakada düz kas özelliği gösteren yassılaşmış miyoid hücreler bulunur **(148).**

2.7. Spermatogenez

Spermatogenezde mitoz, mayoz ve spermiyogenez adı verilen üç biyolojik aktivite gerçekleşir. (Şekil-12) Bu aşamaların her biri spermatogenezin toplam süresinin yaklaşık 1/3'ünü kapsar **(145)**.



Şekil 12. Spermatogenez (150)

2.7.1. Mitoz

Spermatositogenez sırasında spermatogoniya mitoz bölünme geçirir ve mitozdan doğan hücrelerin bazıları her bir seminifer tübülün bazal membranına yakın bir noktada inaktif olarak kalır. Bu sayede, erkek kök hücreleri için bir rezerv oluşturulur ve bunlar ihtiyaç duyuldukça spermatogoniyanın yerini alır. Çok sayıda germ hücresi spermatogoniyanın mitozu yoluyla sağlanır. Erkek ve

dişi germ hücre üretimindeki (ömeğin spermatogenez ve oogenez) ana farklılıklar ,şunlardır: 1) Dişilerde üreme yaşamı boyunca oosit üretiminde sürekli azalma söz konusuyken, erkeklerde normalde azalan germ hücrelerinin yerine yenisi üretilir, 2) erkeklerde mitoz yoluyla spermatozoanın sayısı oldukya artmasına karşın, dişilerde doğuma yakın bir zamanda mitoz bolünme durur ve oogenez önceden şekillenmiş sınırlı sayıdaki germ hücre topluluğunun gelişmesi şeklinde devam eder **(145)**.

Bir fertil testisten infertil alıcı bir fare testisine farenin spermatogoniyal kök hiicreleri başarılı bir şekilde aktarılabilmektedir. Aynca, transjenik ratların işaretlenmiş testis hticreleri, immun sistemi zayıf olan farelere aktarılmış ve 110 gün sonra fare epididimisinde normal rat spermatozoasının bulunduğu kanıtlanmış ve rat spermatogenezinin oluştuğu doğrulanmıştır. Fare spermatogoniyasının dondurularak 196°C'de saklamnası sonrasında spermatogenezin alıclarının (fare) seminifer tilbtil- lerinde oluştugu belirlenmiştir. Bu yaklaşım, belirli bazı erkek germ hücre hatlarının biyolojik olarak ölümsüzleştirilmesi amacıyla kullanılabilir **(145)**.

2.7.2. Mayoz Bölünme

Birinci mayoz bölünme amacı primer spermatositten iki adet sekonder spermatosit oluşturmaktır. İkinci mayoz bölünmede ise sekonder spermatositlerin interfaz aşaması ve tam belirgin olmayan DNA sentezi şekillenir. Sekonder spermatositlerin her biri hücre bölünmesi gerçekleştirmeden iki tane spermatid oluşturlar **(151)**. Birinci mayoz sonucu, 4N olan primer spermatositteki DNA miktarı sekonder spermatositte 2N miktarına düşüş gösterir. İkinci mayozda ise

DNA, 1N'ye azalır. Homolog kromozomlar birinci mayoz bölünmede profazda ayrılırlarken, sekonder mayoz bölünmede interfaz aşamasında S safhasında ise kardeş kromatidler DNA miktarının iki katına çıkarılmadığı için, yavru hücreler olan haploid spermatidlere ayrılırlar **(151,152,153).**

2.7.3. Spermiyogenezis

Değişim dönemi olarak bilinen Spermiyogenez döneminde, spermatidlerin çekirdekleri küçülür, yoğunlaşır. Hücreler kuyruk oluşturarak spermatozoonlara dönüşürler. Spermatid özelliğini kazanan hücreler bir daha bölünme geçirmezler. Olgunlaşarak yine haploid sayıda kromozoma sahip spermiyumlara dönüşürler. Spermiyogenezde spermatogenetik hücreler gibi seminifer tübüllerde yer alan Sertoli hücreleri önemli role sahiptirler. Değişim süresince, spermatidler Sertoli hücre zarına bağlı kalırlar. Spermiyogenezde hücrelerin yeni özellikler kazanarak değişmesi dört dönemde incelenir **(154)**.

2.7.3.1. Golgi fazı

Golgide birikerek zarla çevrelenmiş bir akrozom vezikülünde yer alan bir adet akrozom granülü proakrozomal granüller olarak isimlendirilen periyodik asit shift (PAS)-pozitif küçük granüller meydana getirirler. Hücre yüzeyine yakın bir konuma gelen sentriyoller göç ederek akrozom yapısının şekillendiği bölgeye zıt olarak konumlanırlar. Sentriyoller tekrar çekirdeğe doğru göç ederken flagellar aksonem oluşumu başlar ve hareket ettikçe aksonem bileşenleri etrafında bağlanır **(152).**

2.7.3.2. Kep dönemi

Akrozomal vezikül çekirdeğin ön bölümünü kaplayacak şekilde genişleyip şapka gibi bu bölümü örter (akrozomal kep). Çekirdek zarının buraya bakan bölümünde porlar kaybolur, zar kalınlaşır ve çekirdek yoğunlaşır incelenir **(154)**.

2.7.3.3. Başlık (Cap) Aşaması

Proteaz benzeri hidrolitik enzimler içeren akrozom, hyaluronidaz, nörominidaz, asit fosfataz ve tripsin içerdiğinden dolayı lizozomun özelleşmiş bir yapısı olarak bulunmaktadır. Bu enzimler, yumurtayı saran korona radiata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği için akrozom reaksiyonu olarak adlandırılır ve fertilizasyon şekillenmesinin ilk aşamalarındandır. Bu fazda başını sertoli hücresine uzatan spermatid kendisini tekrar düzenleyerek gömülü halde bulunur. Spermatidin yoğunlaşan çekirdeği yassılaşarak uzar ve bununla birlikte akrozom hücre membranının ön tarafına geçer. Buradaki sitoplazmik mikrotübüller silindir şeklinde çekirdeği saran bir yapı oluşturur ve spermatidin arkasına doğru hareket eder ve Sentriyollerden birisi gelişim göstererek kamçıyı meydana getirir. Hücre membranı burada gelişim gösteren flagellumu çevreler. Flagellumun proksimal parçasını üzerinde toplanan Mitokondriler de orta parça olarak adlandırılan yapıyı şekillendirir. Buradaki yapı spermatozoonların hareketlerini oluşturan bölgedir **(152, 153)**.

2.7.3.4. Olgunlaşma

Sitoplazma miktarının azaldığı son dönemdir. Fazla sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır. Spermatidler birbirleri ile olan bağlantılarını kaybederler, Sertoli hücrelerinden ayrılarak lümene düşerler **(154).** Gönüllüler üzerinde yapılan araştırmalarda, testislere deneysel ^{3}H-timidin uygulanması sonucu insanda spermatogonyumdan spermatozoon oluşumuna kadar geçen sürenin yaklasık 64 gün olduğu gösterilmiştir. Yavaş bir süreç geçirmesine rağmen, spermatogenez, eş zamanlı olarak her seminifer tübülde aynı anda gerçeklesmez; bu olay bir dalgalanma biçiminde olur. Böylece, spermatogenez her bölgede farklı bir safha izleyerek, düzensiz bir görünüm alır. Bu olay da, seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonlar bulunurken, diğer bölgelerinde sadece spermatidlerin bulunduğunu açıklamaktadır. Seminifer epitel siklusu germinal epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikler dizisini ifade eder. İnsanda her bir siklus yaklasık 16 ± 1 gün sürer ve spermatogenez 4 siklustan sonra biter (64 ± 4.5 gün) **(152, 153)**.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'nın "26.03.2014 tarihli ve 78 no'lu izni" ile yapıldı. Çalışmada hayvan materyali olarak Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Ünitesi'nden temin edilen 48 adet, 4-5 aylık erkek Wistar-Albino cinsi (450 ± 30 g) sıçan kullanıldı ve araştırmanın deneysel bölümü Fırat Üniversitesi Hayvan Uygulama ve Araştırma Merkezi"nde yapıldı. Sıçanlar standart şartlarda (25 ± 2˚C sabit ısı, % 60-65 düzeyinde nem ve havalandırmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere) ve her gün altları temizlenen kafeslerde standart sıçan yemi ile **(Tablo-2)** ad-libitum olarak beslendi. Uygulamalara 1 haftalık adaptasyon süresinden sonra başlanıldı ve uygulamalar her gün 11:00 -12:00 saatleri arasında yapıldı. Hayvanlar her kafeste 5 hayvan olacak şekilde aşağıda belirtildiği gibi 6 gruba ayrıldı. Deney toplam 13 gün sürdü.

1. Grup kontrol (n:6), (13 gün boyunca intraperitonal (i.p) serum fizyolojik uygulandı),

2. Grup MTX (n:10), (Metotreksat 20 mg/kg (i.p) olarak tek doz uygulandı,

3. Grup Kisspeptin-5 (n:6), (Kisspeptin 50 nmol/kg (i.p) olarak 5 gün boyunca uygulandı.

4. Grup Kisspeptin-10 (n:6), (Kisspeptin 50 nmol/kg (i.p) olarak 10 gün boyunca uygulandı.

5. Grup MTX+Kisspeptin-5 (n:10), (Metotreksat 20 mg/kg (i.p) olarak tek doz uygulanmasını takip eden 3. Günden itibaren Kisspeptin 50 nmol/kg (i.p) olarak 5 gün boyunca uygulandı.

6. Grup MTX+Kisspeptin-10 (n:10), (Metotreksat 20 mg/kg (i.p) olarak tek doz uygulanmasını takip eden 3. günden itibaren Kisspeptin 50 nmol/kg (i.p) olarak 10 gün boyunca uygulandı.

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Laboratuar çalışmalarında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında bulunan aşağıda belirtilen ekipmanlar kullanılmıştır.

1. Spektrofotometre (Shimadzu)

2. Homojenizatör (Ultraturrax)

3. Hassas terazi (Shimadzu)

4. Deiyonize su cihazı (Nüve)

5. Soğutmalı santrifüj (Nüve)

6. Derin dondurucu (Uğur)

7. Buzdolabı (Profilo)

8. Analitik terazi (Precisa)

9. pH metre (Thermo Orion)

10. Etüv (Nüve)

11. Vorteks (Heidolph)

12. Dispenser (Brand)

13. Ayarlanabilir otomatik pipetler (Brand) (1,10, 20, 100, 1000 µL)

14. Isıtma Tablalı (+38ºC) Faz-Kontrast Mikroskobu (Olympus)

3.1.2. Kullanılan Diğer Malzemeler

1. Steril enjektör (5, 10 ml) (Hayat)

2. Steril insülin enjektörü (1 ml) (Hayat)

3. EDTA"lı kan tüpü (Venoject)

4. Jelli tüp (Vacutainer)

5. Eppendorf tüp (1,5, 2 ml) (Eppendorf)

6. Otomatik pipet uçları (10, 100 ve 1000 µl) (Brand)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıkta olup Merck (Almanya), Sigma (A.B.D) firmalarından temin edilmiştir. Kisspeptin-10 (Genscript-A.B.D) , Metotreksat (Koçak-Türkiye) firmalarından temin edilmiştir.

Tablo 2. Sıçan Yemi Bileşimi

SIÇAN YEMİ BİLEŞİMİ		KULLANILAN MADDELER
SU	En Çok (%) 12	**Buğday, Arpa, Soya Küspesi, Fındık Küspesi, Melas Mayası, Ayçiçeği Tohumu Küspesi, Pamuk Tohumu Küspesi, Mısır Proteini, Rasmol, Balık Unu, Tuz, Mermer Tozu, Melas, Tapiyoka, Sorgum, Kolza Küspesi, Sentetik Lisin, Sentetik Methionin, Premiksler, Kepek, Süt Tozu**
HAM PROTEİN	En Az (%) 24	
HAM SELÜLOZ	En Çok (%) 7	
HAM KÜL	En Çok (%) 8	
HCL'de ÇÖZÜLMEYEN KÜL	En Çok (%) 2,0	
NaCl	En Çok (%) 1,0	
KALSİYUM	En Az- En Çok (%) 1,0-2,8	
FOSFOR	En Az (%) 0,9	
SODYUM	En Az- En Çok (%) 0,5-0,7	
METABOLİK ENERJİ Kcal/kg	En Az (%) 2,650	

3.2. Yöntem

3.2.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması

Deneysel aşamanın sonunda 0,4 ml/kg sodyum pentobarbital ile anestezi altına alınan hayvanlardan enjektörlerle a. femoralis'in bifurkasyon bölgesinden girilerek EDTA'lı ve jelli tüplere yaklaşık 4-6 ml kan alındı. Kan örnekleri 3000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek plazma ve serumları ayrıldı. Elde edilen plazma ve serumlar analizlere kadar +4 C'de saklandı.

3.2.2. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması

Kan örneklerinin alınmasını takiben; hayvanlardan testis dokuları alındı. Doku örnekleri laktatlı ringer solüsyonu ile yıkandıktan sonra polietilen poşetlere

sarılıp etiketlendi ve analizlere kadar -20 C'daki derin dondurucuda saklandı. Analizlerin hemen öncesinde testis dokusu örneklerinden bir miktar tartılıp üzerine ağırlığının 9 katı fosfat tampon çözeltisi eklenerek (1/10 oranında) homojenizatör yardımı ile analizlere uygun şekilde homojenize edildi. Homojenize edilen doku örneklerinden santrifüj yardımıyla ayrılan homojenatlar polietilen tüplere alındı. Üreme oraganlarında yapılacak çalışmalar için testis ve epididimisleri yağ dokularından arındırıldıktan sonra tartıldı. Eklenti bezlerinden v. semilunaris ile ventral prostat çıkarılarak tartıldı. Absolut ve rölatif (Absolut organ ağırlığı (g) / vücut ağırlığı (g) X 100) üreme organ ağırlıkları kaydedildi.

3.2.3. Protein Tayini

Doku protein tayini Lowry**(155)** metodu kullanılarak yapılmıştır.

Fenol ayıracının bakır ile muamele edilip karışıma ilave edilmesiyle mor-mavi renk şekillenmiştir. Oluşan bu karışım 650 nm'de spektrofotometrede okunmasıyla protein tayini yapılmıştır.

3.2.4. Doku ve Plazmada Lipit Peroksidasyon Tayini

Plazma ve dokuda Lipit peroksit tayini (MDA) Placer ve ark. 'nın **(156)** tanımladığı spektrofotometrik yönteme göre belirlendi.

Prensip: pH'nın 3.4 oldugu aerobik bir ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın 100°C'de inkubasyonu pembe renkli bir kompleks oluşturur. Pembe rengin 532 nm'de spektrofotometrik olarak oluşumu ile lipit peroksidasyon saptanır. Belirlenen absorbans değeri MDA standart eğrisinden ya da yine standart

eğriden hesaplanan 0,0092 sabit rakamına bolünerek plazma MDA değeri nmol/ml, dokuda ise nmol/g protein olarak hesaplanır.

Standart eğri çizimi için 1,1,3,3 Tetraethoxypropane'den 10µ/10 ml absolut etanolde hazırlanarak +4 °C' de koyu bir şişede saklanır ve bu stok solusyondan farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak standart eğri çizilir.

3.2.5. Doku ve Plazma GSH-Px Tayini

Plazma ve dokuda GSH-Px aktivitesi duzeyi Lawrence ve arkadaşlanın **(157)**, belirttigi şekilde belirlendi.

Prensip: Plazma ve dokulardaki GSH-Px, GSH Cumenehidroperoksit ($CHPO_4$) ile oksidasyona uğratır. Renk ajanı olarak 5,5-ditiyo-bis (2- nitrobenzoik asit) (DTNB) solusyonu ile karıştırılması sonucu hem kör ve hem de örneklerde meydana gelen san renk kompleksinin spektrofotometrede 412 nm'de okunması sonucu belirlenir.

3.2.6. Doku ve Plazmada Redukte Glutasyon (GSH) Düzeyinin Tayini

Doku ve plazmada GSH duzeyi Sedlak ve Lindsay **(158)** 'ın belirttigi şekilde yapılmıştır.

Prensip: Plazmadaki bütün non-protein sulfidril grupla, GSH şeklinde bulunur. Renk ajanı olarak DTNB'nin sulfidril gruplarıyla reaksiyonu sonucu sarı renkli kompleks meydana gelir. Oluşan renk değişiminin köre karşı 412 nm'de spektrofotometrik ölçümüyle belirlenir.

3.2.7. Doku ve Plazmada Katalaz Aktivitesinin Tayini

Plazma katalaz enzimi tayini Goth'un **(159)** tarif ettigi şekilde yapıldı.

Prensip: Plazma, hidrojen peroksit (H_2O_2) içeren substrat ile inkube edilir. H_2O_2 katalaz aktivitesi ile H_2O ve O'e parçalanır. Ortama ilave edilen amonyum molibtat H_2O_2 ile birleşerek reaksiyon sonlandırılır. Bu süre içerisinde meydana gelen renk degişimi 405 nm'de köre karşı spektrofotometrik olarak belirlenir.

3.2.8. Spermatolojik Muayeneler

3.2.8.1. Epididimal Spermatozoon Yoğunluğu

Sağ epididimis petri kutusu içerisindeki 1 ml fizyolojik tuzlu suda (%0,9'luk NaCl) bistüri ve makas yardımıyla iyice parçalanarak 2 dakika boyunca bir pensle parçacıklar iyice ezildi. Sonra epididimal dokudaki bütün spermatozoonların sıvıya geçmesi için oda sıcaklığında 4 saat inkubasyona bırakıldı. Bekleme süresini takiben spermatozoon ihtiva eden süpernatant alyuvar pipetinin 0,5 çizgisine kadar, 5 g sodyum bikarbonat, 1 ml formalin, 25 mg eozin ve 100 ml distile su içeren solüsyon da 101 çizgisine kadar çekildi. Dolayısıyla süpernatant 1:200 oranında sulandırılmış oldu. 10 µl sulandırılmış süpernatant önceden lamel yapıştırılmış Neubauer lamının (0,1 mm derinlik, 0,0025 mm^2'lik alan, LABART, Munich, Germany) her iki sayım alanına lamelin kenarına pipetin ucu değdirilerek yerleştirildi. Neubauer lamı ışık mikroskobuna yerleştirilip 5 dakika beklenerek solüsyon içerisindeki spermatozoonların tüm alana homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Her iki sayım alanındaki tüm

karelere düşen spermatozoonlar ışık mikroskobunun 200'lük büyütmesinde sayıldı ve hesaplandı **(160).**

3.2.8.2. Spermatozoon Motilitesi

Bunun için bir lam, mikroskobun ısıtma tablasına yerleştirilerek sıcaklığının 37 ^{0}C'ye ulaşması sağlandı. Birkaç damla Tris buffer solüsyonu (Tris (hidroksimetil) aminometan 3,63 g, glukoz 0,50 g, sitrik asit 1,99 g ve distile su 100 ml) ısıtma tablası üzerindeki lama damlatıldıktan sonra sol kauda epididimisten kesit yapılarak alınan ve spermatozoon ihtiva eden küçük bir damla süspansiyon bu solüsyon üzerine yerleştirilip lamel yardımıyla karıştırılarak homojen bir hal alması sağlandı. Daha sonra 400'lük büyütmede gözle motilite yüzdesi belirlendi. Motilite tahminleri sol kauda epididimisten alınan bir damla süspansiyon için 3 farklı saha incelenerek yapıldı. Bu 3 farklı sahanın ortalama değerleri yüzde motilite oranı olarak hesaplandı **(160)**.

3.2.8.3. Anormal Spermatozoon Oranı

Anormal spermatozoon oranını tayin etmek için birkaç damla Tris buffer solüsyonu temiz, kuru ve önceden ısıtılmış (37 ^{0}C) bir lama damlatıldıktan sonra üzerine sol kauda epididimisten alınan küçük bir damla süspansiyon ve birkaç damla Eozin-Nigrozin karışımı boya (1,67 g eozin, 10 g nigrozin, 2,9 g sodyum sitrat, 100 ml distile su) damlatılarak bir lam yardımıyla karıştırılıp homojen hale getirildi. Daha sonra bu karışımdan ince frotiler çekilerek çok kısa sürede kuruması sağlandı. Kurutma işleminden sonra frotiler ışık mikroskobunun 400'lük

büyütmesinde incelendi. Bir frotide toplam 200 spermatozoon incelenip baş, kuyruk ve toplam anormal spermatozoon oranı yüzde olarak ifade edildi **(160).**

3.2.9. Serum Testosteron Seviyelerinin Belirlenmesi

Ratlardan alınan kan örenekleri jelli kan alma tüplerine konarak santrifuj edilip serum kısımları ayrılarak, Fırat Üniversitesi Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuarında kemiluminesans ölçüm otoanalizatöründe (Siemens Immulite 2000 xPi S.N. C0369) testosteron seviyeleri tespit edilmiştir.

4. İSTATİKSEL ANALİZ

Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ortalama standart hata($X \pm$ **Sx)** değerleri olarak sunuldu. $P<0.05$ değeri önemli olarak değerlendirildi.

Ölçülen tüm parametrelerde her gruba ait ham değerlerin normal dağılım gösterip göstermediklerini belirlemek için Shapiro-Wilk normallik testi uygulandı ve testin sonucunda tüm parametrelerdeki değerlerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi.

Grup ortalamalarını karşılaştırmak amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve gruplar arası farklılıkları belirlemek için de Duncan testi uygulandı.

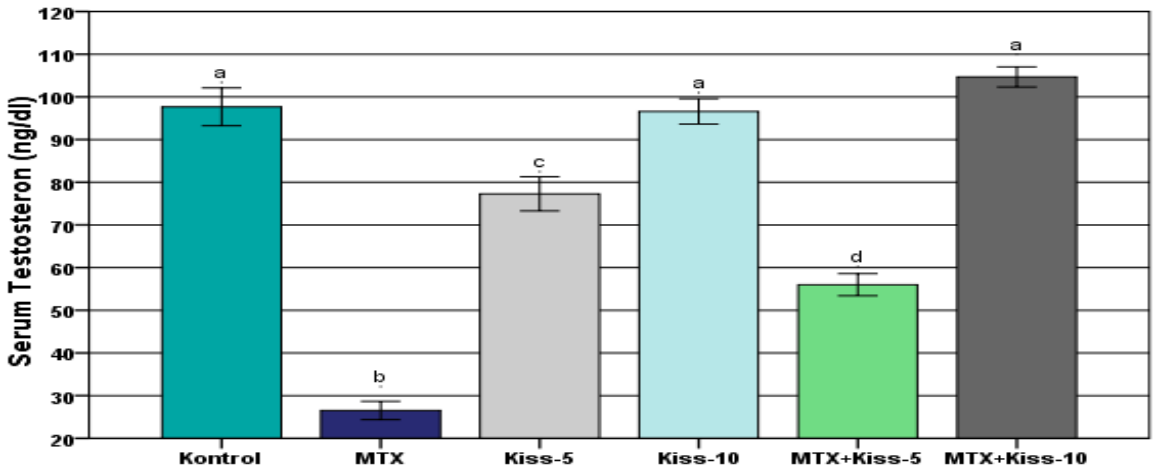
Yapılan tüm istatistiki analizlerde SPSS istatistik programı (22.0, Chicago, IL, USA) kullanılarak yapıldı.

5. BULGULAR

5.1. Serum Testesteron Düzeyleri

Şekil-13 ve Tablo-6 incelendiğinde;

Kontrol grubu serum testesteron seviyesi MTX grubundan yüksek olup, aralarında istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.001$). Kontrol grubu serum testesteron seviyesi, Kiss-5 grubundan yüksek olup istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Kontrol grubu serum testesteron seviyesi ile Kiss-10 grubu serum testesteron seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p>0.05$). Kiss-10 grubu serum testesteron seviyesi Kiss-5 grubundan yüksek olup, aralarındaki fark istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). MTX+Kiss-5 grubu serum testesteron seviyesi MTX grubundan yüksek olup, aralarındaki fark istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). MTX+Kiss-10 grubu serum testeron seviyesi MTX grubundan yüksek olup, aralarındaki fark istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). MTX+Kiss-10 grubu serum testesteron seviyesi ise MTX+Kiss-5 grubundan yüksek olup, aralarındaki fark istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).



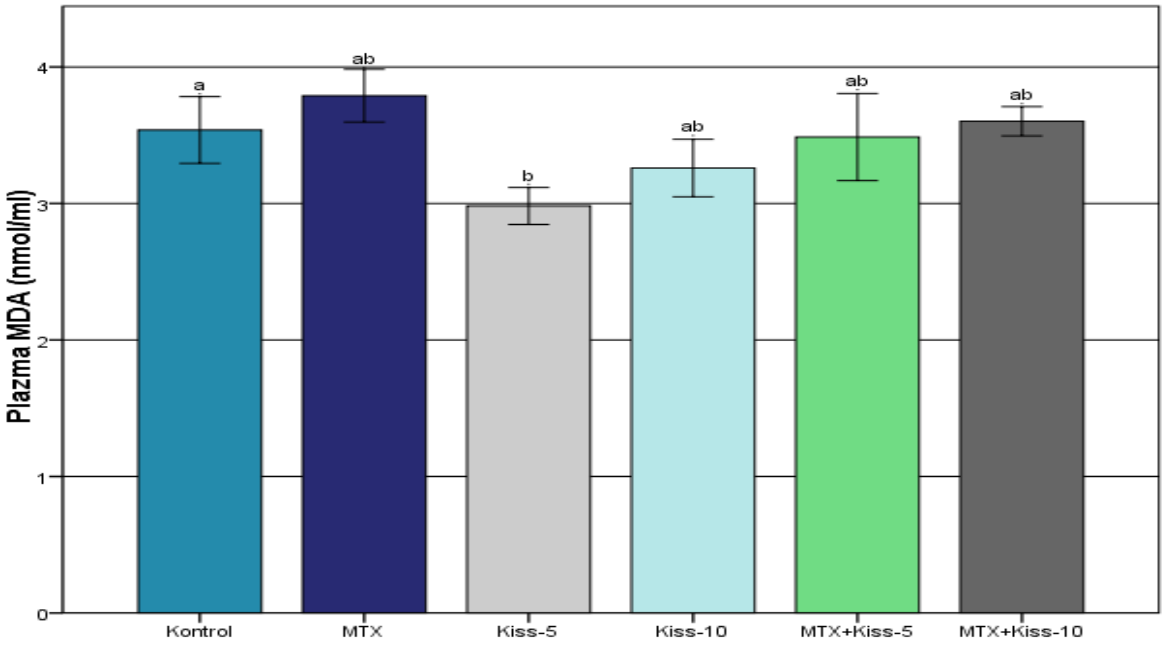
Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

Şekil 13. Serum Testesteron Seviyeleri

5.2. Plazma MDA Düzeyleri

Şekil-14 ve Tablo-6 incelendğinde;

Kontrol grubu plazma MDA düzeyi ile MTX Grubu plazma MDA düzeyi arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05). Kontrol Grubu plazma MDA düzeyi ile Kiss-10 Grubu Plazma MDA düzeyi arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05). Kontrol Grubu plazma MDA düzeyi Kiss-5 Grubundan yüksek olup istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05) . Kiss-10 Grubu plazma MDA düzeyi Kiss-5 Grubu MDA düzeyinden yüksek olup istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur(p<0.05). MTX grubu plazma MDA düzeyi ile MTX+Kiss-5 Grubu Plazma MDA düzeyi arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). MTX Grubu plazma MDA düzeyi ile MTX+Kiss-10 Grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). MTX+Kiss-5 Grubu plazma MDA düzeyi ile MTX+Kiss-10 Grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05).



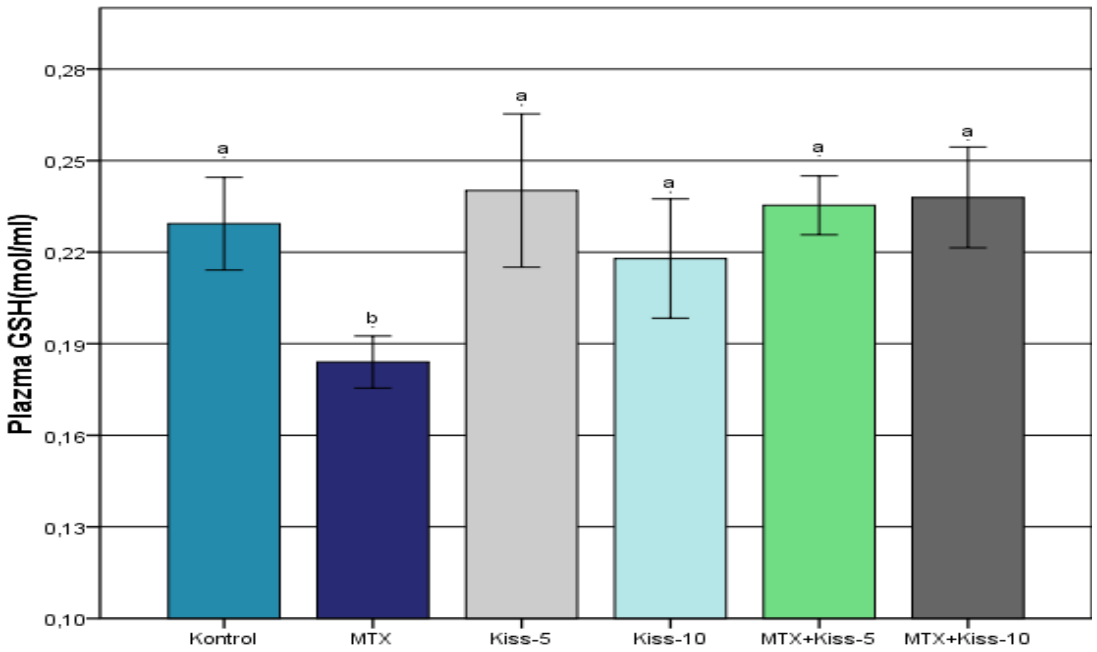
Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

Şekil 14. Plazma MDA Düzeyleri

5.3. Plazma GSH Düzeyleri

Şekil-15 ve Tablo-6 incelendiğinde;

Kontrol Grubu plazma GSH düzeyi MTX Grubundan yüksek olup, istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol grubu plazma GSH düzeyi ile Kiss-5 grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Kontrol grubu plazma GSH düzeyi ile Kiss-10 grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Kiss-5 grubu plazma GSH düzeyi ile Kiss-10 grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). MTX+Kiss-5 grubu plazma GSH düzeyi MTX grubundan yüksek olup istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). MTX+Kiss-10 grubu plazma GSH düzeyi MTX grubundan yüksek olup istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). MTX+Kiss-5 grubu plazma GSH düzeyi ile MTX+Kiss-10 grubu Plazma GSH düzeyi arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).



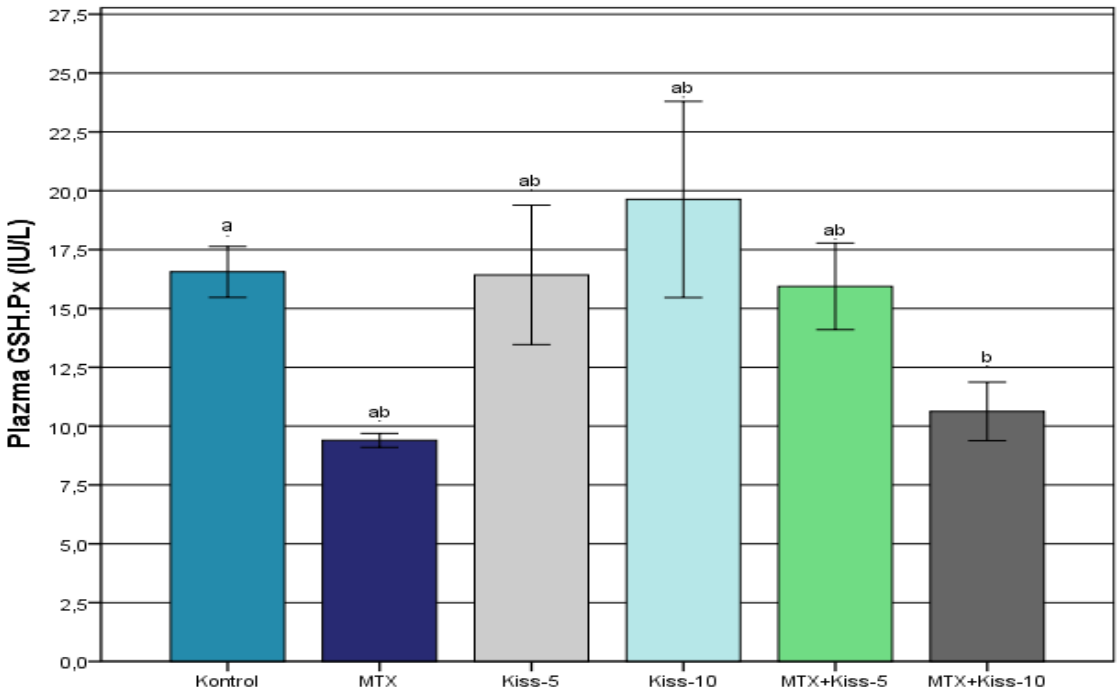
Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

Şekil 15. Plazma GSH Düzeyleri

5.4. Plazma GSH.px Düzeyleri

Şekil-16 ve Tablo-6 incelendiğinde;

Kontrol Grubu plazma GSH.px düzeyi MTX grubundan yüksek olup istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol grubu plazma GSH.px düzeyi ile Kiss-5 grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Kontrol grubu plazma GSH.px düzeyi ile Kiss-10 grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Kiss-5 grubu plazma GSH.px düzeyi ile Kiss-10 Grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). MTX grubu plazma GSH.px düzeyi ile MTX+Kiss-5 grubu arasında arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). MTX grubu plazma GSH.px düzeyi ile MTX + Kiss-10 grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). MTX+Kiss-5 grubu plazma GSH.px düzeyi ile MTX+Kiss-10 grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).



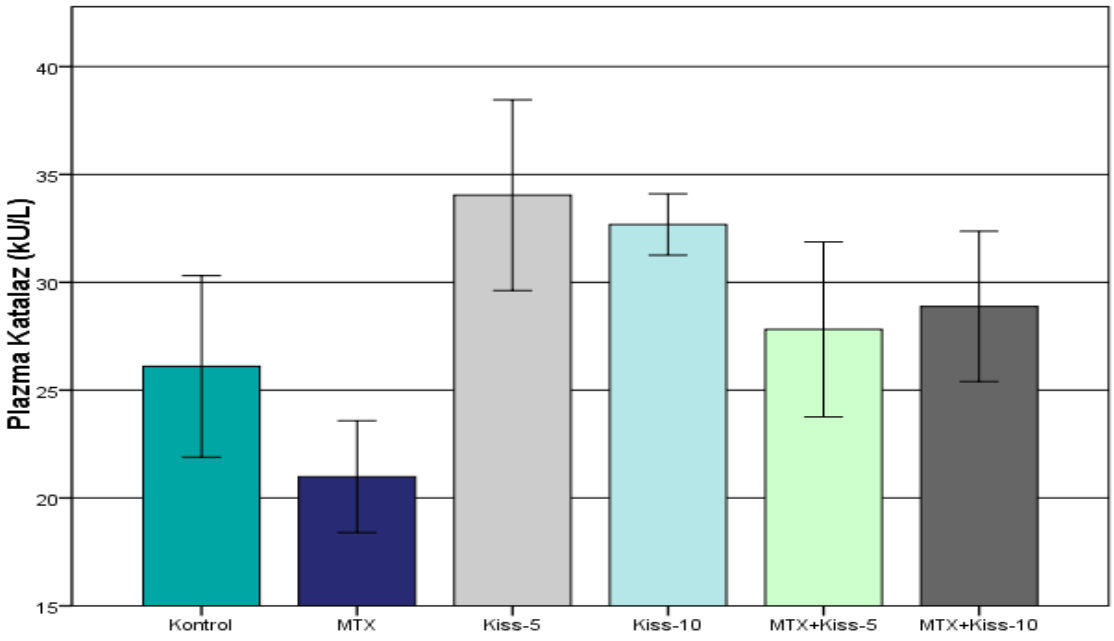
Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

Şekil 16. Plazma GSH.Px Düzeyleri

5.5. Plazma Katalaz Düzeyleri

Şekil-17 ve Tablo-6 incelendiğinde;

Gruplar arasında istatiksel bir farklılık bulunmamıştır(p>0.05).



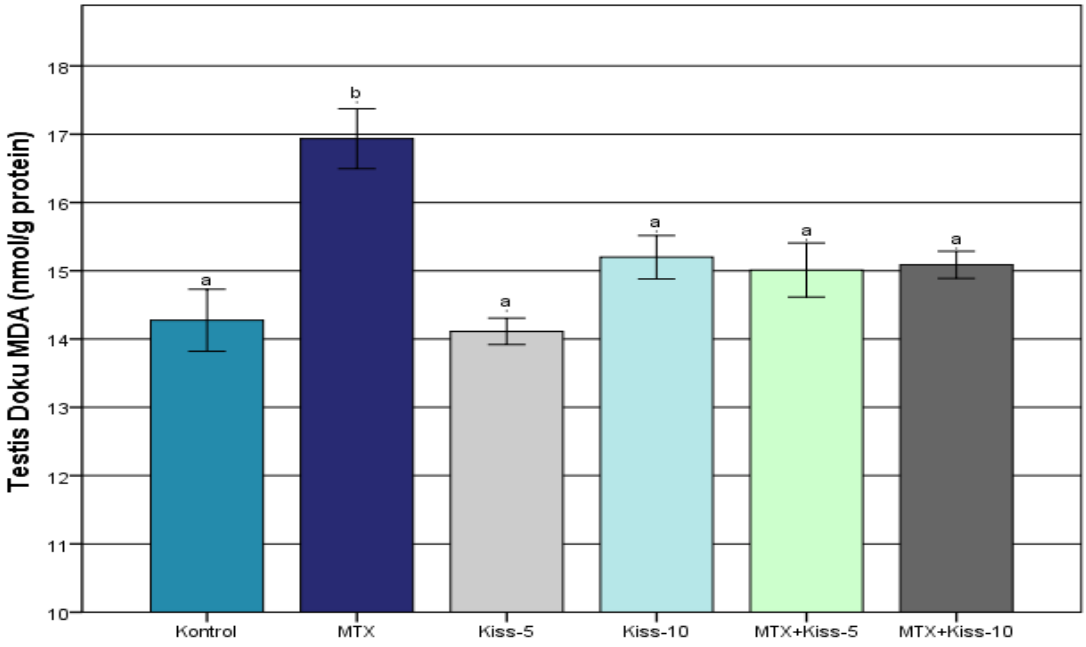
Şekil 17. Plazma Katalaz Düzeyleri

5.6. Testis Dokusu MDA Düzeyleri

Şekil-18 ve Tablo-7 incelendiğinde;

Kontrol Grubu doku MDA düzeyi MTX Grubu MDA düzeyinden düşük olup, istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Kontrol Grubu ve Kiss-5 Grubu doku MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). Kontrol Grubu ve Kiss-10 Grubu doku MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). Kiss-10 Grubu doku MDA düzeyi Kiss-5 Grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). MTX Grubu doku MDA düzeyi MTX+Kiss-5 Grubuna göre yüksek olup, istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). MTX Grubu doku MDA düzeyi MTX+Kiss-10 Grubuna göre yüksek

olup, istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). MTX+Kiss-5 Grubu ve MTX+Kiss-10 Grubu doku MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05).



Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

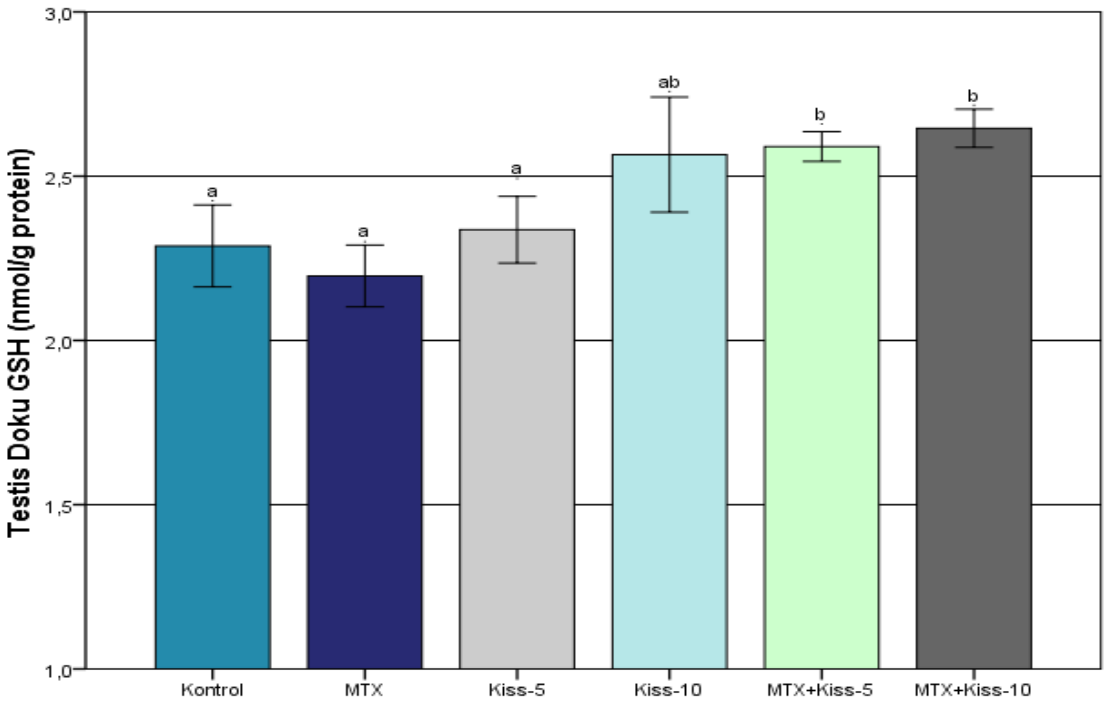
Şekil 18. Testis Doku MDA Düzeyleri

5.7. Testis Dokusu GSH Düzeyleri

Şekil-19 ve Tablo-7 incelendiğinde;

Kontrol Grubu ve MTX Grubu testis dokusu GSH düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). Kontrol Grubu ve Kiss-5 Grubu testis dokusu GSH düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). Kiss-5 Grubu ve Kiss-10 Grubu testis dokusu GSH düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). MTX+Kiss-5 Grubu testis dokusu GSH düzeyi MTX Grubundan yüksek olup istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). MTX+Kiss-10 Grubu testis dokusu GSH düzeyi MTX Grubundan yüksek olup istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). MTX+Kiss-5 Grubu ve

MTX+Kiss-10 Grubu testis doku GSH düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05).



Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

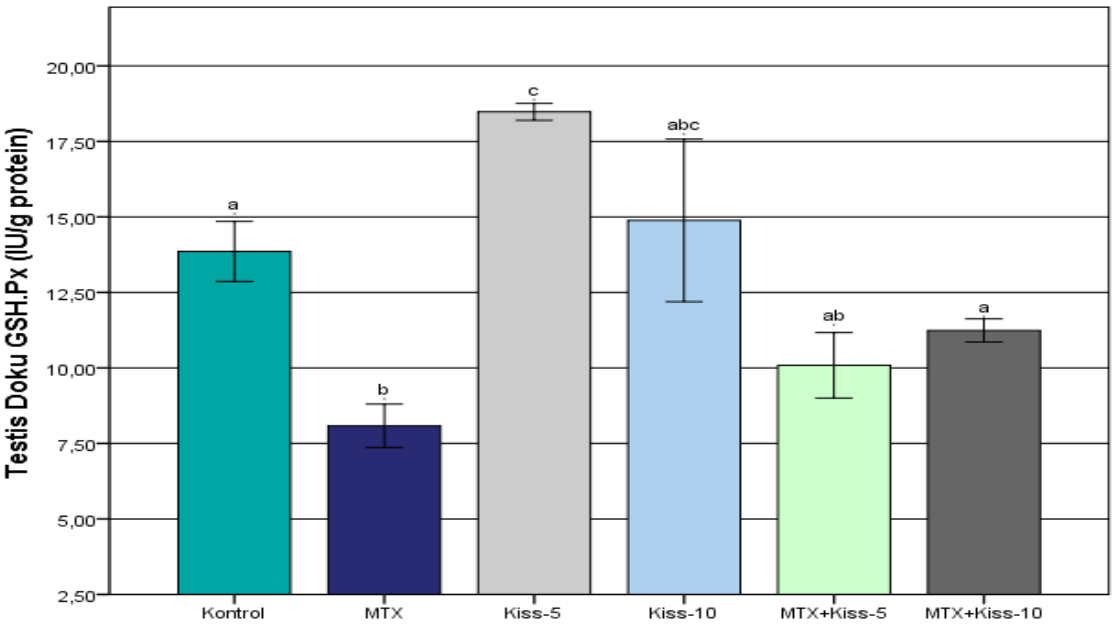
Şekil 19. Testis Doku GSH Düzeyleri

5.8. Testis Dokusu GSH.px Düzeyleri

Şekil -20 ve Tablo-7 incelendiğinde;

Kontrol Grubu GSH.px düzeyi, MTX Grubu GSH.px düzeyine göre yüksek olup istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Kiss-5 Grubu GSH.px düzeyi, Kontrol Grubu GSH.px düzeyine göre yüksek olup istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Kontrol Grubu ve Kiss-10 Grubu doku GSH.px düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). Kiss-5 Grubu ve Kiss-10 Grubu doku GSH.px düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). MTX Grubu ve MTX+Kiss-5 Grubu doku GSH.px düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). MTX+Kiss-10 Grubu

GSH.px düzeyi MTX Grubu GSH.px düzeyine göre yüksek olup istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). MTX+Kiss-5 Grubu ve MTX+Kiss-10 Grubu doku GSH.px düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).



Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

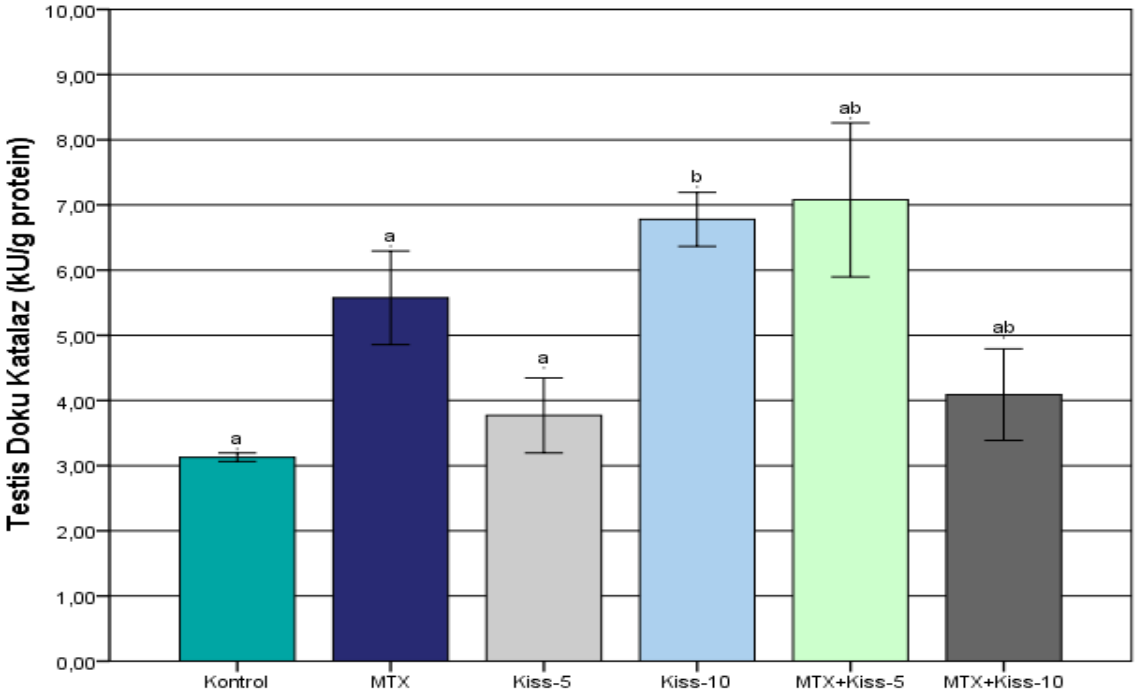
Şekil 20. Testis Doku GSH.px Düzeyleri

5.9. Testis Dokusu Katalaz Düzeyleri

Şekil-21 ve Tablo-7 incelendiğinde;

Kontrol Grubu doku katalaz düzeyi ile MTX Grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Kontrol Grubu ve Kiss-5 Grubu doku katalaz düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Kontrol Grubu doku katalaz düzeyi Kiss-10 Grubutan düşük olup, fark istatiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p<0.05$). Kiss-5 Grubu doku katalaz düzeyi Kiss-10 Grubutan düşük olup fark istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). MTX Grubu ve MTX+Kiss-5 Grubu doku katalaz düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). MTX Grubu ve MTX+Kiss-10 Grubu doku katalaz

düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). MTX+Kiss-5 Grubu doku katalaz düzeyi ile MTX+Kiss-10 Grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05).



Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

Şekil 21. Testis Doku Katalaz Düzeyleri

5.10. Üreme Organ Ağırlıkları

Absolut ve relatif üreme organ ağırlıkları Tablo-3 ve Tablo-4 ‘de verilmiştir. Absolut üreme organı ağırlıkları gruplar arası karşılaştırma yapıldığı zaman; testis, epididimis ve kauda epididimis ağırlıklarında önemli bir farklılık belirlenmemiştir ($p>0.05$). Vezikula semilunaris ağırlıkları kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman Kiss-10 grubunda anlamlı bir artış, MTX grubunda ise anlamlı bir azalma görülmektedir ($p<0.001$). Ventral prostat ağırlıkları gruplar arasında karşılaştırıldığında ise Kiss-5 grubunun kontrol grubuna göre ağırlıklarının artmış olduğu($p<0.05$), MTX grubu ile kontrol grubunun ve MTX+Kiss-5 ile MTX+Kiss-10 gruplarının MTX grubuna göre, ağırlıklarının değişmediği tespit edilmiştir ($p>0.05$). Relatif üreme organ ağırlıklarına bakıldığı zaman; testis ağırlıklarında bir farklılık gözlenmezken ($p>0.05$) epididimis, vezikula semilunaris ve ventral prostat ağırlıklarında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Tablo 3. Absolut üreme organ ağırlıkları

	Absolut üreme organ ağırlıkları (g)				
Gruplar	Testis (Sağ+Sol)/2	Epididimis (Sağ+Sol)/2	Sağ kauda epididimis	Vezikula semilunaris	Ventral prostat
Kontrol	1,775±0,086	0,673±0,026	0,254±0,017	1,426±0,127[a]	0,683±0,088[ab]
MTX	1,618±0,042	0,624±0,009	0,223±0,012	1,030±0,081[c]	0,623±0,047[a]
Kiss-5	1,796±0,114	0,628±0,024	0,260±0,018	1,550±0.050[a]	0,930±0,096[c]
Kiss-10	1,750±0,061	0,688±0,016	0,268±0,007	1,878±0,104[b]	0,840±0,069[bc]
MTX+Kiss-5	1,830±0,086	0,674±0,049	0,263±0,013	1,445±0,149[a]	0,664±0,047[ab]
MTX+Kiss-10	1,794±0,072	0,679±0,027	0,279±0,015	1,589±0,077[a]	0,756±0,039[abc]
Önemlilik	P>0.05	P>0.05	P>0.05	**P<0.001**	**P<0.05**

Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

Tablo 4. Rölatif üreme organ ağırlıkları

	Rölatif üreme organ ağırlıkları (Absolut organ ağırlığı (g)/vücut ağırlığı (g) X100)				
Gruplar	Testis (Sağ+Sol)/2	Epididimis (Sağ+Sol)/2	Sağ kauda epididimis	Vezikula semilunaris	Ventral prostat
Kontrol	0,385±0,019	0,149±0,005^{ab}	0.058±0,002^{a}	0,331±0,027^{a}	0,163±0,023^{ab}
MTX	0,364±0,008	0,136±0,005^{b}	0,049±0,002^{b}	0,230±0,012^{c}	0,139±0,009^{a}
Kiss-5	0,404±0,015	0,151±0,006^{ab}	0.059±0,003^{a}	0,376±0,020^{a}	0,226±0,019^{c}
Kiss-10	0,413±0,022	0,162±0,008^{a}	0,063±0,004^{a}	0,441±0,025^{b}	0,197±0,016^{bc}
MTX+Kiss-5	0,407±0,009	0,147±0,003^{ab}	0.058±0.001^{a}	0,323±0,018^{a}	0,144±0,010^{a}
MTX+Kiss-10	0,424±0,014	0,160±0,004^{a}	0,065±0,002^{a}	0,376±0,019^{a}	0,178±0,008^{ab}
Önemlilik	P>0.05	**P<0.05**	**P<0,01**	**P<0.001**	**P<0,01**

Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

5.11. Spermatolojik Muayeneler

Sperm motiliteleri gruplar arasında karşılaştırma yapıldığı zaman (Tablo-5); MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Tedavi gruplarının bulunduğu MTX+Kiss-10 grubunun motilitesinin MTX grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Toplam anormal spermatozoon oranları incelendiği zaman (Tablo-5); MTX grubunun kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği($p<0.05$), tedavi grubu olan MTX+Kiss-10 grubunda ise MTX grubuna göre anlamlı düşüş olduğu tespit edilmiştir($p<0.05$). Spermatolojik yoğunluklar ile ilgili gruplar arası karşılaştırma yapıldığı zaman anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$)(Tablo-5).

Tablo 5. Spermatolojik parametreler.

Gruplar	Spermatolojik parametreler				
	Motilite (%)	Yoğunluk (milyon/sağ kauda epididimis)	Anormal spermatozoon oranı (%)		
			Baş	Kuyruk	Toplam
Kontrol	82,00±2,00^{ab}	140,67±2,91	3,40±0,93	4,40±1,17^{a}	7,80±2,08^{a}
MTX	72,22±2,78^{c}	108,33±10,85	5,83±0,79	8,83±1,40^{b}	14,66±1,54^{b}
Kiss-5	83,33±3,33^{ab}	152,00±18,00	2,60±0,60	5,20±0,86^{a}	7,80±1,02^{a}
Kiss-10	88,66±2,26^{b}	150,67±14,14	5,33±1,99	3,67±0,67^{a}	9,00±1,69^{a}
MTX+Kiss-5	77,90±2,88^{ac}	132,40±17,75	7,20±0,80	4,80±1,56^{a}	12,00±2,30^{ab}
MTX+Kiss-10	82,00±3,74^{ab}	149,75±18,12	4,75±1,11	4,38±0,80^{a}	9,13±1,11^{a}
Önemlilik	**P<0,01**	P>0.05	P>0.05	**P<0.05**	**P<0.05**

Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

Tablo 6. Plazma MDA, GSH, GSH.Px, Katalaz ve Serum Testosteron Düzeyleri

Plazma MDA ve Antioksidan Düzeyleri, Serum Testesteron Düzeyi					
Grup	**MDA (nmol/ml)**	**GSH (nmol/ml)**	**GSH.px (IU/L)**	**Katalaz (ku/L)**	**Testesteron (ng/dl)**
Kontrol	3,53±0,12^{a}	0,22±0,007^{a}	16,55±1,08^{a}	26,10±4,20	97,66±2,21^{a}
MTX	3,78±0,09^{ab}	0,18±0,004^{b}	9,39±0,29^{ab}	20,98±2,59	26,50±1,06^{b}
Kiss-5	2,98±0,06^{b}	0,24±0,012^{a}	16,42±2,95^{ab}	34,03±4,42	77,26±2,00^{c}
Kiss-10	3,25±0,10^{ab}	0,21±0,009^{a}	19,63±4,16^{ab}	33,01±1,36	96,60±1,48^{a}
MTX+Kiss-5	3,48±0,15^{ab}	0,23±0,004^{a}	15,93±1,84^{ab}	27,81±4,05	56,00±1,29^{d}
MTX+Kiss-10	3,60±0.05^{ab}	0,23±0,004^{a}	10,62±1,24^{b}	29,31±3,33	103,70±1,42^{a}
Önemlilik	**p<0.05**	p<0.05	p<0.05	**p>0.05**	**p<0.001**

Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

Tablo 7. Testis Dokusu MDA, GSH, GSH.Px ve Katalaz Düzeyleri

Testis Dokusu MDA ve Antioksidan Düzeyleri				
Grup	**MDA (nmol/g protein)**	**GSH (nmol/g protein)**	**GSH.Px (IU/g protein)**	**Katalaz (kU/g protein)**
Kontrol	14,27±0,45^{a}	2,28±0,12^{a}	13,85±0,99^{a}	3,12±0,06^{a}
MTX	16,93±0,43^{b}	2,19±0,09^{a}	8,08±0,71^{b}	5,57±0,71^{a}
Kiss-5	14,11±0,19^{a}	2,33±0,10^{a}	18,87±0,28^{c}	3,77±0,57^{a}
Kiss-10	15,19±0,31^{a}	2,56±0,17^{ab}	14,88±2,69^{abc}	6,77±0,41^{b}
MTX+Kiss-5	15,01±0,39^{a}	2,59±0,04^{b}	10,08±1,08^{ab}	7,07±1,18^{ab}
MTX+Kiss-10	15,08±0,62^{a}	2,64±0.05^{b}	11,24±0,38^{a}	4,08±0,38^{ab}
Önemlilik	**p<0.05**	**p<0.05**	**p<0.05**	**p<0.05**

Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser günümüzün başlıca sağlık sorunlarından birisi olarak görülmekte ve gittikçe daha da yaygınlaşmaktadır. Kanser görülme sıklığında meydana gelen artışla beraber çeşitli tedavi yolları da araştırılmakta, bir yandan da mevcut tedavi yöntemlerinin olumsuz etkileri ve bunların ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmalar da yapılmaktadır.

Antikanserojen ilaçlaran biri olan MTX 'in kullanımı hastalarda çok sayıda istenmeyen etkilere neden olabilmektedir. Kemoterapötikler normal doku ve hücrelerde de istenmeyen etkilere neden olduğu için erkek infertilitesi ve sterilitesi kemoterapötik ilaçların üreme sisteminde meydana getirdiği istenmeyen etkilerdir **(7, 8, 47).**

Antineoplastik ilaçların yol açtığı olumsuz etkilerden kurtulmak amacıyla yan etkileri azaltacak veya önleyecek ilaç veya ilaçlar tedaviye eklenebilmektedir. Literatürde MTX toksisitesine karsı kullanılan çeşitli antioksidan maddelerle yapılan çalısmalar vardır **(161,162,163,164,165).**

Üreme ile ilgili bir peptid olan Kisspeptin, pubertenin başlamasını sağlayan bir çeşit moleküler düğme gibi davranır. Erişkinliğe ulaşan hayvanlarda üreme başlangıcı önbeyin, hipofiz ve gonadların etkileşimini gerektirir. Puberte başlangıcında kisspeptin, nöroendokrin olaylardan sorumlu temel peptid olarak kabul edilir **(129).**Kisspeptin salgılanmasını ve buna bağlı olarak GnRH salgılanmasını internal ve eksternal çeşitli faktörler düzenlerler **(130)**. Son yıllarda, memelilerin üremesi üzerine kisspeptinin rolü yoğun olarak çalışılmaktadır. Kisspeptin üretimini etkileyen faktörler gonadal fonksiyonlarda

değişikliklere yol açabilmektedir **(166)**. Bütün bu bilgilerden yola çıkılarak yapılan bu çalışmada farmasötik potansiyele sahip yeni maddeler arayışında büyük bir potansiyele sahip bir nöropeptid olan kisspeptinin uygulamasının, MTX'in üreme sisteminde yol açtığı olumsuz etkiler ve infertilite sorunları üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla antioksidan enzim düzeyleri, serum testesteron seviyeleri ve sperm kalitesi parametrelerinden elde edilen sonuçlar belirlenip, MTX-infertilite ilişkisi ve Kisspeptin-MTX etkileşimleri irdelenmiş ve üreme sistemi ile antioksidan sistemde meydana gelen değişimler incelenmiştir.

Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesini yükselten MTX'in güçlü bir antienflamatuar madde olduğu bilinmektedir **(164)**.Yüksek MPO seviyesinin nötrofil infiltrasyonuna neden olduğu ve serbest radikallerin dokularda lökosit infiltrasyonunu uyardığı belirtilmiştir**.** MTX'e bağlı toksisite prositokinlerin artmış üretimi ile birlikte görülen inflamatuar cevabın oluşmasıyla karakterizedir **(68, 167)**. Gao ve arkadaşları **(168),** MTX'in ksenobiyotiklerin ve endotoksinlerin ince barsağa geçmelerine sebep olduklarını, bunun da makrofaj ve nötrofil infiltrasyonunu başlattığını ve sonunda reaktif oksijen türlerinin üretiminde artışa yol açtıklarını göstermişlerdir. Bu etkiyle aynı doğrultuda, Oktar ve arkadaşları **(88)** MTX'in testis içine infiltre olan makrofaj ve nötrofiller aracılığı ile oksidatif stresin arttığını göstermişlerdir.

Yapılan çalışmalarda 20 mg/k ya da daha yüksek dozlarda MTX'e maruz kalmanın kanda, karaciğerde, böbreklerde ve testislerde MDA seviyesini arttırdığı ifade edilmiştir **(68, 169)**. 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 **(88)**.Yapmış olduğumuz çalışmada da MTX uygulanan grupta testis dokusunda MDA düzeyinin artmış olduğu görülmektedir. (Tablo 6-7) (Şekil 14, Şekil 18)

Antikanser ilaçların kullanımını takiben gelişen maruziyetin hüceresel ve molüker yönlerinin incelenmesi amacıyla spermatogenez ve gonadal hasar kapsamlı olarak incelenmiştir **(170, 171).**

Bazı özel enzimler, canlının üreme yeteneğini koruması için oksidatif stres oluşumuna karşı önemli rol oynamaktadır. Dolayısıyla bu koruyucu mekanizma gonadlar için büyük önem taşımaktadır. Bu enzimler arasında ROB ve bunları zararsız hale getiren SOD, GSH-Px, glutatyon redüktaz ve CAT bulunmaktadır. Bunlar arasında da SOD ve GSH.Px'ın erkek üreme sisteminde ROB ve serbest radikalleri temizlemede görev alan en önemli enzimler olduğu ifade edilmektedir **(172).**

GSH.Px'ın erkek ve dişi üreme sisteminde fizyolojik açıdan önemli rolünün olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir **(173).** GSH.Px seminal vezikül, prostat bezi ve vaz deferens epiteli gibi yapılarda yüksek miktarda salınmaktadır **(172)**.Bununla birlikte MTX'in, antioksidan enzim sisteminin etkinligini azaltarak, hücreleri ROB'a karsı hassas duruma getirip hasara neden olduğunu göstermektedir. Oksidatif stres testis seminifer tübüllerinde hasara ve germ hücrelerinde azalmaya yol açmaktadır **(14,15).** Bu yüzden, antioksidanlar oksidatif strese karsı testis dokusunun korunmasına yardım edebilir **(16).**

Vardı ve ark. **(174,175)**, Armağan ve ark. **(169)** ve Yuluğ ve ark. **(176)** yapmış oldukları çalışmalarda; ratlarda MTX uygulanması sonucu testis

dokusunda MDA düzeyinde artış, katalaz ve glutatyon peroksidaz değerlerinde azalma olduğunu belirlemişlerdir. Yaptığımız çalışmada; (Tablo 7) (Şekil 18,20) testis dokusu MTX grubunda MDA seviyesinin arttığı, GSH.Px seviyesinin azaldığı görülmüştür (P<0.05). Bu durum MTX 'in oksidatif stresi arttırdığını göstermektedir. Bilindiği gibi MTX, hücrelerde NADPH'ı azaltıp glutatyonun tükenmesine yol açarak hücrenin ROB'a karşı duyarlı olmasına ve dolayısıyla oksidatif strese sebep olmaktadır**(174)**.

Ratlarda testis üzerinde metotreksatla yapılan çalışmalarda testis ağırlığı, seminifer tubül çapı ve germinal epitel kalınlığında azalmalarla **(177)** birlikte dejenerasyonların şekillendiği **(174)**, tüm spermatogenik hücreler olmak üzere özellikle spermatosit ve spermatidlerde öldürücü, Sertoli ve Leydig hücrelerinin büyüklüklerinde de azaltıcı **(12)** etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca farelerdeki sitogenetik çalışmaların sonuçları metotreksatın germ hücrelerinde çeşitli düzeylerde kromozamal aberasyonlar, DNA hasarı ve apoptosis oluşturduğunu, epididimal sperm sayısı ve motilitesinde azalmalara ve anormal sperm oranlarında da artışlara neden olduğunu göstermektedir**(71,79,81)**.Daha önce yapılmış çalışmalarda MTX'in, gonadal hasara neden olduğu, spermatozoon sayısında ve kalitesinde meydana gelen düşüşler ile anormal spermatozoon oranında meydana gelen artışın dihidrofolat redüktaz sentezinin inhibisyonu sonucu DNA replikasyonunun şekillenememesiyle oluştuğu bildirilmiştir**(12,177,179,180).** Çalışmamızda da bu verilere benzer şekilde, MTX uygulaması yapılan grupta serum testesteron seviyesinde(Tablo-6) anlamlı azalma (p<0.05) tespit edilirken, spermatozoon motilitesinin düştüğü (p<0,01), anormal spermatozoon oranının arttığı (p<0.05) belirlenmiştir (Tablo 5-6).

Kisspeptin ve GPR54 sistemi, HPG eksenin düzenlenmesinde çok kritik bir rol oynamaktadır. GPR54 pubertal gelişim ve üreme fonksiyonları için gerekli bir yapı konumundadır **(140)**.

GPR54 mutasyonları insanlarda hipogonadotropik hipogonadizm ve ergenliğe girememeye sebep olmuştur **(28, 127, 181)**.

Kisspeptin-10 veya kisspeptin-54'ün merkezi ya da periferik uygulanması HPG aksı uyarır **(31, 33, 128, 142)**.

Kisspeptin-10 in vivo ve in vitro ortamda GnRH salınımını uyarır ve HPG aks üzerindeki bu etkisi GnRH antagonistleri tarafından bloke edilebilir **(34, 35, 142, 143)**.

Çalışmamızda ratlara uyguladığımız günlük 50 nmol/kg kisspeptin-10 - reseptöre bağlanması ve aktivasyonu için en kısa moleküler yapıyı içermesi sebebiyle tercih edilmiştir **(124, 182).**

Kisspeptinlerin, intraserebral (i.c.), intraserebroventriküler (i.c.v.), intrahipotalamik (i.h.), sistemik intravenöz (i.v.), intraperitonel (i.p.) ve subkutan (s.c.) gibi farklı yollarla verildiğinde LH salgılanmasında değişikliklere yol açmaktadır **(22, 35, 128, 183)**.

Çeşitli çalışmalarda, primatlarda kisspeptine karşı HPG aksının desensitizasyonunun hipotalamik GPR54'ün desensitizasyonu olduğunu öne sürülmüştür **(184)**. HPG aksı üzerinde Kisspeptin-10, -14, ve -54'ün akut olarak uygulanması sonucunda farklı etkilerin ortaya çıktığı görülmüştür. *In vitro* ortamda, Kisspeptin-10, -14, ve -54'ün, GPR54 ile etkileşiminin benzediği

bildirilmiştir **(124)**. Ayrıca, kisspeptin-10 ya da kisspeptin-54'ün, *in vivo* olarak ventrikül içine uygulanmasıyla, gonadotropin salgılanmasının uyarılmasında benzer etkiye yol açtığı tespit edilmiştir **(142)**. Kisspeptin-10 ve -14 gibi daha kısa formlarının, subkutan uygulanması sonucunda akut dönemde plazma LH seviyesini artırırken, kronik dönemde artışın anlamlı olmadığı, kisspeptin-14'ün plazma total testosteron seviyesini önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır **(140)**.

Farklı bir çalışmada ise kisspeptin-10 uygulamasının testesteron seviyesini düşürdüğü, bu olayın LH salgılanmasındaki düşüşten daha çok testis dejenerasyonunun sorumlu olabileceği Ramzan ve Qureshi **(185)** tarafından öne sürülmüştür. Bu veriye paralel olarak çalışmamızda beş günlük uygulama yapılan kisspeptin-10'un serum testesteron seviyesini kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşürdüğü, on günlük uygulamanın ise önemli bir farklılık oluşturmadığı tespit edilmiştir**(Tablo 6)** .

Thompson ve ark. **(140),** yapmış olduğu çalışmada s.c. olarak kisspeptin-54 ün sürekli uygulanmasının kisspeptine karşı HPG aksında bir desensitizasyon oluşmasına karşın, dolaşımdaki gonadotropinlerin baskılanmasına neden olmadığını belirtmiştir. Ramzan ve ark. **(185)** ise puberte öncesi erkek sıçanlarda kisspeptinin sürekli verilmesi, FSH seviyesini değiştirmezken LH salgılanmasında azalmasına neden olduğu, bunun HPG aksının duyarlılığının azalması ile ilişkili olmadığını bildirmiştir. Thompson ve ark. **(141)** Kisspeptin-54' ün tetiklediği testis dejenerasyonunun gonadotropinler aracılığı ile oluştuğu hipotezini desteklemek amacıyla, kisspeptin-54'ün (5 nmol) bir kez i.c.v. yüksek doz uygulanmasının testiküler dejenerasyona sebep olduğunu göstermişlerdir. **(23, 33, 182)**.

Ramzan ve ark. **(185),** yapmış olduğu çalışmada Kisspeptin-10 uygulamasının testis ağırlıklarında bir farklılığa yol açmadığını bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada bu veriye paralel olarak kullandığımız Kisspeptin-10'un intraperitonel olarak uygulanması sonucunda, 5 ve 10 günlük uygulamalarda, testis ağırlıklarında anlamlı farklılıklar bulunmazken absolut ve relatif vezikula seminalis ağırlıklarında, MTX+Kiss-10 grubunun MTX grubuna göre ve Kiss-10 grubunun kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir($p<0.001$) (Tablo 3,4).

Kiss-1 ve GPR54 sisteminin sperm ve spermatogenez üzerine etkileri irdeleyen çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Çalışmamızda (Tablo 5) on gün süreyle uygulanan Kisspeptin-10'un motilite üzerine kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yükseldiği ($p<0,01$) görülürken, yoğunluk ve anormal spermatozoon sayısında ise bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Çeşitli çalışmalarla oksidatif stres ve gonadotropinlerin ilişkili olduğu belirlenmiştir**.** Hipotalamus fonksiyon bozuklukları sonucu LH ve FSH üretiminde meydana gelen azalma oksidatif stres oluşumunu tetiklemektedir. **(39, 40)**Hurtado ve ark. **(40),** yaptığı çalışmada bir varikosel hastasında serum LH ve FSH düzeylerine paralel olarak SOD ve katalaz düzeylerinin de arttığı görülmüştür. Sex steroidleri, özellikle östrojenin etkili bir antioksidan olduğu, serbest radikal süpürücü ve lipid peroksidasyon durdurucu özelliğe sahip olduğu çeşitli çalışmalarda da bildirilmiştir **(186,187).** Bununla birlikte testesteronun direkt antioksidan etkisinin olmadığı belirtilmiştir **(188).**

Hipotalamik hormonların hücre membran reseptörlerine bağlanmasında yaşanan sorunlar ve bunun sonucunda dolaşımdaki gonadotropların ve testesteronun azalması lipid peroksidasyona yol açabilmektedir**(115)**. Lipid peroksidasyonun artışı hücre içi ileti sisteminde sorunlara yol açarak hipotalamik hormonların salınımında düzensizliğe sebep olabilmektedir **(189)**.Bununla birlikte fizyolojik olarak salgılanan LH'nın etkinliği de rat testisinde intersitisyel dokuda lipid peroksidasyonun pro okside olmasını da metabolize etmektedir **(190)**.

Navenot ve ark. **(191)** yaptıkları araştırmada, GPR54 sisteminin kisspeptin yardımıyla uyarılmasının tümör hücrelerinde Rho ve rhokiinasın indüklenmesiyle apoptotik etki gösterebileceğini belirtmişlerdir. RhoA çeşitli hücre içi iletişimi sağlayan kritik bir moleküldür. ROB, Rho GTPaz aktivitesini artırıp, GDP salınmasına sebep olarak etkinlik gösterdiği belirtilmiştir**(192)**. Ayrıca RhoA'nın metastaz baskılayıcı rolünün olabileceği de bildirilmiştir**(193)**.

Son yıllarda kisspeptinin HPG aks ve üreme sistemi üzerine etkisine yönelik çalışmalar bulunmaktadır **(26,32,37).**Bununla birlikte kisspeptinin antioksidan özelliğine yönelik çalışmalar son derece kısıtlıdır **(41).** Aydın M. ve ark. karaciğer dokusu üzerinde yapmış olduğu çalışmada kisspeptinin lipid peroksidasyonu düşürdüğünü ve antioksidan etkisinin olabileceğini belirtmişlerdir **(41).** Çalışmamızda testis dokusunda kisspeptin ve MTX kombine uygulanmasının sadece MTX uygulamasına göre MDA seviyesini anlamlı ($p<0.05$) bir şekilde düşürdüğü tespit edilirken (Tablo 7) (Şekil 18), plazma MDA sevilerinde ise anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiş, MTX uygulaması ile azalma gösteren testis dokusu GSH.Px düzeyinin MTX+Kiss-10 grubunda artış göstermesi($p<0.05$), ayrıca plazma ve testis dokusu GSH seviyelerinin ise 5 ve 10

günlük Kisspeptin uygulaması ile anlamlı artışlar ($p<0.05$) göstermesi(Tablo 6-7)(Şekil 13,14,19,20) bu veriyi destekler niteliktedir. Dokularda, kisspeptinin metastaz baskılayıcı etkisi sayesinde RhoA aracılı olarak ROB oluşumunun önüne geçebileceği ve bu şekilde antioksidan etkinliğini gösterebileceğini düşündürmüştür.

Sonuç Olarak;

Bu çalışmayla, MTX 'in doku MDA düzeylerini artırdığı, bunun yanında antioksidan etkili GSH, GSH.px, ve Katalaz düzeylerini düşürdüğü ve serum testesteron seviyesini azalttığı tespit edilmiştir. Kisspeptin ve MTX'in 5 ve 10 günlük kombine uygulanmasıyla ise doku MDA düzeyini azalttığı, doku ve plazma GSH seviyelerini arttırdığı, testis dokusu MTX+Kiss-10 grubunda GSH.Px seviyesini artırdığı, azalan serum testesteron seviyesini ise 10 günlük uygulama ile tekrar eski seviyesine çıkarttığı belirlenmiştir. MTX uygulaması sonucu azalan sperm motilitesi ve artan toplam anormal spermatozoon oranlarının Kisspeptin ile MTX 'in kombine 10 gün uygulanması sonucu, motilite oranının arttığı ve anormal spermatozoon oranının düştüğü gözlenmiştir.

Kisspeptin uzun yıllardır yapılan çalışmalarla HPG aks ve üreme sistemi üzerine etkili bir peptid olduğu bilinmekte ve bu yönde her geçen gün yeni araştırmalar literatüre sunulmaktadır. Bu peptidin üreme sistemine olan etkileri

hakkında birçok çalışmalar bulunsa da oksidatif stres ve antioksidan enzim üzerine olan etkileriyle ilgili çalışmalar son derece kısıtlıdır. Çalışmamızda kisspeptinin MTX'in artırdığı MDA düzeyini azaltması, yine MTX uygulaması ile azalan GSH ve GSH.px düzeylerinde artış göstermesi ve sperm parametrelerinde iyileştirici etkilerinin tespit edilmesi, bu peptidin antioksidan etkinliği ve erkek infertilitesinin düzelmesine yardımcı olabileceği düşüncesini ortaya koymaktadır. Fakat kisspeptinin farklı formları ve analoglarının antioksidan etkinliğinin daha detaylı olarak irdelenmesi, spermatogenez üzerine olan çalışmaların daha detaylandırılması daha fazla veri elde edilmesini sağlayarak bu peptidin terapotik etkilerinin daha belirgin olarak ortaya çıkmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Şen F, A.A., *Kanser Tedavisine Bağlı Geç Yan Etkiler* Klinik Gelişim (24): p. 30-32.

2. İ, Ö., *Kemoterapi ve erkek infertilitesi.* Androloji (45): p. 23-27.

3. Schrader M, M.M., Straub B, Miller K. , *The impact ofchemotherapy on male fertility: a survey of the biologic, basis and clinical aspects.* . Reprod Toxicol **15** (611): p. 7.

4. R Pazdur, L.C., WJ Hoskins, LD Wagman, *In:Cancer Management: A Multidisciplinary Approach Medical, Surgical & Radiation Oncology.* PRR, New York: p. 21-38.

5. Ragheb AM, S.E., *Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonadotoxicity.* . Anticancer Agents Med Chem **10**: p. 92-102.

6. Sabanegh ES, R., *Male fertility after cancer.* Urology **73** (225): p. 31.

7. Ragheb, A.M. and E.S. Sabanegh, Jr., *Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonadotoxicity.* Anticancer Agents Med Chem, 2010. **10** (1): p. 92-102.

8. Schrader, M., et al., *The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspects.* Reprod Toxicol, 2001. **15** (6): p. 611-7.

9. Demirci U, B.M., Büyükberber S, Coşkun U., *Late side effects of cancer therapy.* Int J Hematol Oncol **4** (250).

10. Kayaalp, O., *Tıbbi Farmakoloji*. 1994: Feryal Matbaası, Ankara 1047.

11. Kim, J.C., K.H. Kim, and M.K. Chung, *Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats.* Reprod Toxicol, 1999. **13** (5): p. 391-7.

12. Saxena, A.K., et al., *Effect of chronic low dose of methotrexate on cellular proliferation during spermatogenesis in rats.* Arch Androl, 2004. **50** (1): p. 33-5.

13. Feagan, B.G. and A. Alfadhli, *Methotrexate in inflammatory bowel disease.* Gastroenterol Clin North Am, 2004. **33** (2): p. 407-20, xi.

14. Gao F, T.H., Igarashi K, Horie T, *Correlation between methotrexate induced intestinal damage and decrease in polyamine content.* Life Sci 2002. **72 (6)** (669).

15. Babiak, R.M., et al., *Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress.* Cell Biochem Funct, 1998. **16** (4): p. 283-93.

16. Vernet, P., R.J. Aitken, and J.R. Drevet, *Antioxidant strategies in the epididymis.* Mol Cell Endocrinol, 2004. **216** (1-2): p. 31-9.

17. Sukhotnik, I., et al., *Methotrexate induces germ cell apoptosis and impairs spermatogenesis in a rat.* Pediatr Surg Int, 2013. **29** (2): p. 179-84.

18. Nouri, H.S., Y. Azarmi, and M. Movahedin, *Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats.* Andrologia, 2009. **41** (2): p. 105-10.

19. Lee, J.H., et al., *KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene.* J Natl Cancer Inst, 1996. **88** (23): p. 1731-7.

20. Lee JH, W.D., *Identification of highly expressed gene in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display.* Int J Cancer, 1997. **71** (1035).

21. Lee, D.K., et al., *Discovery of a receptor related to the galanin receptors.* FEBS Lett, 1999. **446** (1): p. 103-7.

22. Mikkelsen, J.D., et al., *Comparison of the effects of peripherally administered kisspeptins.* Regul Pept, 2009. **152** (1-3): p. 95-100.

23. Thompson, E.L., et al., *Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.* J Neuroendocrinol, 2004. **16** (10): p. 850-8.

24. Bilban M, G.-T.N., Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, Malli R, Sharabi A, Hiden U, Graier W, Knofler M, Andreae F, Wagner O, Quaranta V, Desoye G, *Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts.* J Cell Sci. , 2004. **117**: p. 1319-1328.

25. Shahed, A. and K.A. Young, *Differential ovarian expression of KiSS-1 and GPR-54 during the estrous cycle and photoperiod induced recrudescence in Siberian hamsters (Phodopus sungorus).* Mol Reprod Dev, 2009. **76** (5): p. 444-52.

26. Kuohung, W. and U.B. Kaiser, *GPR54 and KiSS-1: role in the regulation of puberty and reproduction.* Rev Endocr Metab Disord, 2006. **7** (4): p. 257-63.

27. M, K., *Üremenin endokrin işlevi. In: Burtis CA, Ashwood ER. (Eds). Klinik kimyada temel ilkeler, Ankara: Palme yayıncılık.* 2005: p. 876-897.

28. Seminara, S.B., et al., *The GPR54 gene as a regulator of puberty.* N Engl J Med, 2003. **349** (17): p. 1614-27.

29. Funes S, H.J., Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A *The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system.* Biochem Biophys Res Commun. , 2003. **312**: p. 1357-1363.

30. Matsui, H. and T. Asami, *Effects and therapeutic potentials of kisspeptin analogs: regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.* Neuroendocrinology, 2014. **99** (1): p. 49-60.

31. Dhillo, W.S., et al., *Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90** (12): p. 6609-15.

32. George, J.T., et al., *Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men.* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96** (8): p. E1228-36.

33. Navarro, V.M., et al., *Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54.* Endocrinology, 2005. **146** (1): p. 156-63.

34. Shahab, M., et al., *Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102** (6): p. 2129-34.

35. Matsui, H., et al., *Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320** (2): p. 383-8.

36. Scott, G., et al., *Double-blind, randomized, placebo-controlled study of safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of TAK-683, an investigational metastin analogue in healthy men.* Br J Clin Pharmacol, 2013. **75** (2): p. 381-91.

37. Dhillo, W.S., et al., *Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92** (10): p. 3958-66.

38. Chan, Y.M., et al., *Kisspeptin administration to women: a window into endogenous kisspeptin secretion and GnRH responsiveness across the menstrual cycle.* J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97** (8): p. E1458-67.

39. Muthuvel, R., et al., *Antioxidant effect of ascorbic acid on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in hypothalamus of albino rats.* Clin Chim Acta, 2006. **365** (1-2): p. 297-303.

40. Hurtado de Catalfo, G.E., et al., *Oxidative stress biomarkers and hormonal profile in human patients undergoing varicocelectomy.* Int J Androl, 2007. **30** (6): p. 519-30.

41. Aydin, M., Oktar, S., Yonden Z., Ozturk O. H., Yilmaz B. *Direct and indirect effects of kisspeptin on liver oxidant and antioxidant systems in young male rats.* Cell Biochem Funct, 2010. **28** (4): p. 293-9.

42. NA, W., *Cell proliferation in carcinogenesis. In: The Cancer Handbook. Editor: MR Alison.* Nature Publishing Group, London, 2002. **114**.

43. Olah, E., *Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination.* The Journal Of The International Federation Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine, 2005. **16**.

44. Baloglu E, H.J., Chatterjee SK, Ravindra R, Bane S, Kingston DG, *Synthesis and biological evaluation of C-3'NH/C-10 and C-2/C-10 modified paclitaxel analogues.* Bioorg Med Chem 2003. **11**: p. 1557-1568.

45. E, O., *Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination.* The Journal Of The International Federation Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine, 2005. **16**.

46. Pizzo PA, P.D., *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* Lippincott: Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.

47. Sabanegh, E.S., Jr. and A.M. Ragheb, *Male fertility after cancer.* Urology, 2009. **73** (2): p. 225-31.

48. Trottmann, M., et al., *Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation.* Eur Urol, 2007. **52** (2): p. 355-67.

49. Yeter, K., *Kemoterapi Alan Hastalara Verilen Eğitimin Yaşam Kalitesi Üzerine Etkisi*. 2006, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü: Eskişehir.

50. Sangeetha, P., et al., *Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer.* Free Radic Biol Med, 1990. **8** (1): p. 15-9.

51. Q, L.J., *Supplementation with antioxidants prior to bone marrow transplantation.* Wiener Klinische Wochenschrift, 2002. **109 (19)**: p. 771-776.

52. Lin, J.Q., *Effect of nutrition intervention on antioxidant capacity and lipid peroxide in patients with bone marrow transplantation.* Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002. **22** (6): p. 530-2.

53. Crohns, M., et al., *Concurrent decline of several antioxidants and markers of oxidative stress during combination chemotherapy for small cell lung cancer.* Clinical Biochemistry, 2009. **42** (12): p. 1236-1245.

54. Brea-Calvo, G., et al., *Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q10 levels in cancer cell lines.* Free Radic Biol Med, 2006. **40** (8): p. 1293-302.

55. Simone, C.B., Simone, N. L., Simone, V., *Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1.* Alternative Therapies in Health and Medicine, 2007. **13**: p. 22-28.

56. Seifried, H.E., Anderson, D. E., Fisher, E. I., Milner, J. A., *A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species.* The Journal Of Nutritional Biochemistry, 2007. **18 (9)**: p. 567-579.

57. Bairati, I., Meyer, F., Gélinas, M., Fortin, A., Nabid, A., Brochet, F., Mercier, J. P., Têtu, B., Harel, F., Mâsse, B., Vigneault, E., Vass, S., del Vecchio, P., Roy, J., *A randomized trial of antioxidant vitamins to prevent second primary cancers in head and neck cancer patients.* Journal of the National Cancer Institute, 2005. **97**: p. 481-488.

58. Seifried, H.E., et al., *The antioxidant conundrum in cancer.* Cancer Res, 2003. **63** (15): p. 4295-8.

59. Ladas, E.J., et al., *Antioxidants and cancer therapy: a systematic review.* J Clin Oncol, 2004. **22** (3): p. 517-28.

60. Blumenthal, R.D., et al., *Anti-oxidant vitamins reduce normal tissue toxicity induced by radio-immunotherapy.* Int J Cancer, 2000. **86** (2): p. 276-80.

61. Ceribasi, A.O., et al., *Toxic effect of cyclophosphamide on sperm morphology, testicular histology and blood oxidant-antioxidant balance, and protective roles of lycopene and ellagic acid.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2010. **107** (3): p. 730-6.

62. Meistrich, M.L., *Restoration of spermatogenesis by hormone treatment after cytotoxic therapy.* Acta Paediatr Suppl, 1999. **88** (433): p. 19-22.

63. Tempest, H.G., et al., *Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients.* Hum Reprod, 2008. **23** (2): p. 251-8.

64. Özalp, D., E.A., *Farmakoloji, 4, Baskı, Nobel tıp kitabevleri İstanbul.* 2008

65. Akyol, H., *Kemoterapinin temel ilkeleri, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi.* Hemşire Programı, 2004.

66. Page R, T.C., *Principles of chemotherapy. In:Cancer Management: A Multidisciplinary Approach Medical, Surgical & Radiation Oncology.* New York, 2004: p. 21-38.

67. Dökmeci, İ., *Farmakoloji ilaçlar ve etkileri, 1. Baskı, Alfa Yayınları, İstanbul.* 2007.

68. Jahovic, N., et al., *Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats.* Cell Biochem Funct, 2004. **22** (3): p. 169-78.

69. Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Tas Ankara 1998.* 1998: p. 388-393.

70. Bükücü NK., *SIÇAN TESTİSİNDE METOTREKSATIN YAPTIĞI HASARA KARŞI VİTAMİN E VE L-KARNİTİNİN ETKİSİ*. 2013, Gaziantep Üniversitesi Gaziantep.

71. Padmanabhan, S., et al., *Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: Intervention of folic and folinic acid.* Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2009. **673** (1): p. 43-52.

72. Uzar, E., *Metotreksat Uygulanan Ratların Siyatik Sinir Ve Medülla Spinalisinde Oksidan /Antioksidanların Durumu: Kafeik Asit Fenetil Ester'in Antioksidan Koruyucu Etkisi*. 2006, Süleyman Demirel Üniversitesi: Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı.

73. Eray, İ.C., *Deneysel Kolit Modeli Üzerine Glutamin, N-Asetil Sistein Ve İntrarektal Metotreksat'ın Etkilerinin İncelenmesi*. 2009, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı: Adana.

74. Savran, M., *Ratlarda Metotreksat Kaynaklı Karaciğer Ve Böbrek Hasarında C Vitamininin Koruyucu Etkisinin Araştırılması*. 2011, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Isparta.

75. Krakower, G.R. and B.A. Kamen, *In situ methotrexate polyglutamate formation in rat tissues.* J Pharmacol Exp Ther, 1983. **227** (3): p. 633-8.

76. Kutluana, U., Oruç, N., Yılmaz, M., Yönetci, N., Kaptanoğlu, B., Özütemiz, Ö., *Ratlarda metotreksata bağlı oksidatif intestinal hasarda leflunomidinin koruyucu etkisinin araştırılması.* Akademik gastroentroloji dergisi, 2011. **10 (1)**: p. 23-27.

77. Arora, V., et al., *Curcumin ameliorates reserpine-induced pain-depression dyad: behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences.* Psychoneuroendocrinology, 2011. **36** (10): p. 1570-81.

78. Widemann, B.C. and P.C. Adamson, *Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity.* Oncologist, 2006. **11** (6): p. 694-703.

79. Choudhury, R.C., S.K. Ghosh, and A.K. Palo, *Potential transmission of the cytogenetic toxic effects of methotrexate in the male germline cells of Swiss mice.* Environ Toxicol Pharmacol, 2001. **10** (3): p. 81-8.

80. Jahovic, N., et al., *Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats.* J Pineal Res, 2003. **34** (4): p. 282-7.

81. Padmanabhan, S., et al., *Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: intervention of folic and folinic acid.* Mutat Res, 2009. **673** (1): p. 43-52.

82. van Ede, A.E., et al., *Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity.* Semin Arthritis Rheum, 1998. **27** (5): p. 277-92.

83. Aran, M., *Klinikte kanser kemoterapisi*. 1974, İstanbul: Sermet matbaası. 26-27.

84. Kantemir, İ., *Kanser ve tedavisi (Özellikle kemoterapi)*. 1969, İAnkara: Güzel İstanbul Matbaası.

85. Kane, D., et al., *Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate.* Arthritis Rheum, 2004. **50** (10): p. 3286-95.

86. Bozan, E., Gürelik, G, *Proliferatif Vitreoretinopati Tedavisinde Yeni Deneysel Ajanlar.* Ret - Vit, 2004. **12**: p. 214-223.

87. Vardı, N., Parlakpınar, H., Ateş, B., Otlu, A, *Metotreksatın Neden Olduğu Testiküler Hasara Karşı Klorogenik Asidin Koruyucu Etkileri.* Turkiye Klinikleri J Med Sci, 2010. **30 (2)** (507).

88. Oktar, S., et al., *Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice.* Toxicol Ind Health, 2010. **26** (7): p. 433-8.

89. Padmanabhan, S., et al., *Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice.* Mutat Res, 2008. **655** (1-2): p. 59-67.

90. Quinn, C.T. and B.A. Kamen, *A biochemical perspective of methotrexate neurotoxicity with insight on nonfolate rescue modalities.* J Investig Med, 1996. **44** (9): p. 522-30.

91. Bruton, L., *Tedavinin Farmakolojik Temeli*. 2009, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 1315-1405.

92. Young, I.S. and J.V. Woodside, *Antioxidants in health and disease.* J Clin Pathol, 2001. **54** (3): p. 176-86.

93. Halliwell, B., *Free radicals and antioxidants: a personal view.* Nutr Rev, 1994. **52** (8 Pt 1): p. 253-65.

94. Bhuvarahamurthy, V., N. Balasubramanian, and S. Govindasamy, *Effect of radiotherapy and chemoradiotherapy on circulating antioxidant system of human uterine cervical carcinoma.* Mol Cell Biochem, 1996. **158** (1): p. 17-23.

95. Berk, M., et al., *Glutathione: a novel treatment target in psychiatry.* Trends Pharmacol Sci, 2008. **29** (7): p. 346-51.

96. Gutteridge, J.M., *Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection.* Chem Biol Interact, 1994. **91** (2-3): p. 133-40.

97. Zadak, Z., et al., *Antioxidants and vitamins in clinical conditions.* Physiol Res, 2009. **58 Suppl 1**: p. S13-7.

98. Wildburger, R., Mrakovcic, L., Stroser, M., Andrisic, L., Borovic Sunjic, S., Zarkovic, K., Zarkovic, N, *Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence?: Review Citation.* Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 2009. **29 (1)**: p. 189-193.

99. Berger, M.M., *Can oxidative damage be treated nutritionally?* Clinical Nutrition, 2005. **24** (2): p. 172-183.

100. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Oxygen Free-Radicals and Iron in Relation to Biology and Medicine - Some Problems and Concepts.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1986. **246** (2): p. 501-514.

101. Halliwell B, G.J., *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford. 2007, Oxford Universty Press.

102. Gülçiçek, O.B., *Deneysel Tıkanma İkterinde Curcuminin Oksidatif Stres Ve Hepatik Hasar İlişkisi*. 2008: Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2.Genel Cerrahi Kliniği.

103. Prasad, K.N., et al., *Pros and cons of antioxidant use during radiation therapy.* Cancer Treatment Reviews, 2002. **28** (2): p. 79-91.

104. *http://lilywell.com/free-radicals-antioxidants/.* 2015 (cited 2015; Available from: http://lilywell.com/free-radicals-antioxidants/.

105. Clemens, M.R., et al., *Supplementation with antioxidants prior to bone marrow transplantation.* Wien Klin Wochenschr, 1997. **109** (19): p. 771-6.

106. Weijl, N.I., F.J. Cleton, and S. Osanto, *Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity.* Cancer Treat Rev, 1997. **23** (4): p. 209-40.

107. Jaakkola, K., et al., *Treatment with antioxidant and other nutrients in combination with chemotherapy and irradiation in patients with small-cell lung cancer.* Anticancer Res, 1992. **12** (3): p. 599-606.

108. Caron, J.E., et al., *Oxidative stress and executive function in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia.* Pediatr Blood Cancer, 2009. **53** (4): p. 551-6.

109. Block, K.I., et al., *Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials.* Cancer Treat Rev, 2007. **33** (5): p. 407-18.

110. Blumenthal, R.D., et al., *Anti-oxidant vitamins reduce normal tissue toxicity induced by radio-immunotherapy.* International Journal of Cancer, 2000. **86** (2): p. 276-280.

111. Borek, C., *Dietary antioxidants and human cancer.* Integr Cancer Ther, 2004. **3** (4): p. 333-41.

112. Christen, W.G., J.M. Gaziano, and C.H. Hennekens, *Design of Physicians' Health Study II--a randomized trial of beta-carotene, vitamins E and C, and multivitamins, in prevention of cancer, cardiovascular disease, and eye disease, and review of results of completed trials.* Ann Epidemiol, 2000. **10** (2): p. 125-34.

113. Agarwal, A. and L.H. Sekhon, *The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility.* Hum Fertil (Camb), 2010. **13** (4): p. 217-25.

114. Seifried, H.E., et al., *A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species.* Journal of Nutritional Biochemistry, 2007. **18** (9): p. 567-579.

115. Abou-Seif, M.A.M. and A.A. Youssef, *Oxidative stress and male IGF-1, gonadotropin and related hormones in diabetic patients.* Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2001. **39** (7): p. 618-623.

116. Urso, M.L. and P.M. Clarkson, *Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation.* Toxicology, 2003. **189** (1-2): p. 41-54.

117. Fang, Y.Z., S. Yang, and G. Wu, *Free radicals, antioxidants, and nutrition.* Nutrition, 2002. **18** (10): p. 872-9.

118. Greives, T.J., et al., *Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction.* Endocrinology, 2007. **148** (3): p. 1158-66.

119. Hameed, S., C.N. Jayasena, and W.S. Dhillo, *Kisspeptin and fertility.* J Endocrinol, 2011. **208** (2): p. 97-105.

120. Kauffman, A.S., D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction.* Trends in Neurosciences, 2007. **30** (10): p. 504-511.

121. Dardente, H., et al., *RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod.* J Neuroendocrinol, 2008. **20** (11): p. 1252-9.

122. Clarke, I.J., *Control of GnRH secretion: one step back.* Front Neuroendocrinol, 2011. **32** (3): p. 367-75.

123. Kafa İM, E.Ö., *Kisspeptinler ve Kisspeptin Nöronları: Üreme Sistemi Üzerine Etkileri ve Hipotalamik Yerleşimleri* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2011. **37 (1)**: p. 53-60.

124. Kotani, M., et al., *The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54.* J Biol Chem, 2001. **276** (37): p. 34631-6.

125. Castellano, J.M., et al., *Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation?* Endocrinology, 2006. **147** (10): p. 4852-62.

126. Muir, A.I., et al., *AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1.* J Biol Chem, 2001. **276** (31): p. 28969-75.

127. de Roux, N., et al., *Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100** (19): p. 10972-10976.

128. Navarro, V.M., et al., *Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide.* Endocrinology, 2004. **145** (10): p. 4565-74.

129. Dungan, H.M., D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *Minireview: Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion.* Endocrinology, 2006. **147** (3): p. 1154-1158.

130. Popa, S.M., D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction.* Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 213-38.

131. Han, S.K., et al., *Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty.* Journal of Neuroscience, 2005. **25** (49): p. 11349-11356.

132. Clarkson, J. and A.E. Herbison, *Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons.* Endocrinology, 2006. **147** (12): p. 5817-25.

133. d'Anglemont de Tassigny, X. and W.H. Colledge, *The role of kisspeptin signaling in reproduction.* Physiology (Bethesda), 2010. **25** (4): p. 207-17.

134. Smith, J.T., D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling.* Reproduction, 2006. **131** (4): p. 623-30.

135. Tovar, S., et al., *Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats.* Endocrinology, 2006. **147** (6): p. 2696-704.

136. Ramzan, M.H., et al., *Insight into the Serum Kisspeptin Levels in Infertile Males.* Archives of Iranian Medicine, 2015. **18** (1): p. 12-17.

137. Caraty, A., et al., *Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes.* Endocrinology, 2007. **148** (11): p. 5258-67.

138. Ramzan, M.H., et al., *Insight into the serum kisspeptin levels in infertile males.* Arch Iran Med, 2015. **18** (1): p. 12-7.

139. Pinto, F.M., et al., *Characterization of the kisspeptin system in human spermatozoa.* International Journal of Andrology, 2012. **35** (1): p. 63-73.

140. Thompson, E.L., et al., *Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291** (5): p. E1074-82.

141. Thompson, E.L., et al., *Kisspeptin-54 at high doses acutely induces testicular degeneration in adult male rats via central mechanisms.* British Journal of Pharmacology, 2009. **156** (4): p. 609-625.

142. Gottsch, M.L., et al., *A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse.* Endocrinology, 2004. **145** (9): p. 4073-7.

143. Irwig, M.S., et al., *Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat.* Neuroendocrinology, 2004. **80** (4): p. 264-72.

144. STRANG, E.P.W.H.R.K.T., *VANDER İNSAN FİZYOLOJİSİ*. 2014, ANKARA: Ayrıntı Basımevi.

145. REECE (Editör), W.O., *DUKES Veteriner Fizyoloji*, ed. W.O. REECE. 2008, Malatya: Medipress.

146. A, N., *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji* 18. Baskı 2010, Ankara: Meteksan A.Ş 1106-1116.

147. Guyton&Hall, *Tıbbi Fizyoloji*. 12. Baskı, ed. Guyton&Hall. 2013: Nobel Tıp Kitapevi.

148. Ovalle WK, N.P., *Temel Histoloji*. 2009: Güneş Tıp Kitapevi.

149. Drake RL, V.W., Mitchell AWM, *Gray's Anatomi, Tıp Fakültesi Öğrencileri için*. 2007, Ankara: Güneş Kitabevi.

150. Stanfield, C.L., *PRINCIPLES OF Human Physiology*. 2013, United States of America: Pearson Education.

151. Abraham, L., *Üreme Sistemi, Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. 2006, Ankara: Palme Yayıncılık. 531-564.

152. Gartner, L.P., Hiatt, J.L., *Color textbook of histology*. Vol. 3. Baskı. Phiadelphia: SaundersCompany.

153. Junqueira, L.C., Carneiro, J., *Temel Histoloji*. Vol. 10. Baskı. 2009, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.

154. M., E., *Özel Histoloji*. 2009: Medipress Yayıncılık

155. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randal RJ (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. J Biol Chem. 193; 265-275.

156. Placer, Z.A., L.L. Cushman, and B.C. Johnson, *Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems.* Anal Biochem, 1966. **16** (2): p. 359-64.

157. Lawrence, R.A. and R.F. Burk, *Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver.* Biochem Biophys Res Commun, 1976. **71** (4): p. 952-8.

158. Sedlak, J. and R.H. Lindsay, *Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent.* Anal Biochem, 1968. **25** (1): p. 192-205.

159. Goth, L., *A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range.* Clin Chim Acta, 1991. **196** (2-3): p. 143-51.

160. Turk, G., et al., *Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats.* Theriogenology, 2007. **67** (4): p. 778-85.

161. Yüncü M, K.M., *Farelerde metotreksatın ince barsak mukozasında yaptığı hasara karsı e vitamininin koruyucu etkisi: Elektron Mikroskobik Çalısma.* Tıp Arastırmaları Dergisi 2006. **4 (2)**: p. 1-6.

162. Iraz, M., et al., *Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat.* Cell Biochemistry and Function, 2006. **24** (4): p. 357-361.

163. Muralikrishnan, G., V. Amalan Stanley, and K. Sadasivan Pillai, *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. **169** (2): p. 115-20.

164. Gokce, A., et al., *Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury.* Hum Exp Toxicol, 2011. **30** (8): p. 897-903.

165. Mansour HH, H.H., Fahmy NM, *Silymarin modulates cisplatin-induced oxidative stres and hepatotoxicity in rats.* J Biochemic Mol Biol, 2006. **39 (6)**: p. 656-661.

166. Oakley, A.E., D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *Kisspeptin signaling in the brain.* Endocr Rev, 2009. **30** (6): p. 713-43.

167. Uzar, E., et al., *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** (2-3): p. 125-33.

168. Gao, F., S. Ueda, and T. Horie, *Effect of a synthetic analog of prostaglandin E1 on the intestinal mucosa of methotrexate-treated rats.* Anticancer Res, 2001. **21** (3B): p. 1913-7.

169. Armagan, A., et al., *Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat.* Hum Exp Toxicol, 2008. **27** (7): p. 547-52.

170. Johnson, F.E., et al., *Testicular cytotoxicity of intravenous procarbazine in rats.* Surg Oncol, 1993. **2** (1): p. 77-81.

171. Saxena, A., Singh, G, *Effect of cyclophosphamide on the seminiferous tubules and leydig cells in rat.* J Anat Soc, 1990. **32**: p. 101-107.

172. Fujii, J., et al., *Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues.* Asian J Androl, 2003. **5** (3): p. 231-42.

173. Kaneko, T., et al., *The expression of glutathione reductase in the male reproductive system of rats supports the enzymatic basis of glutathione function in spermatogenesis.* Eur J Biochem, 2002. **269** (5): p. 1570-8.

174. Nigar VARDI, H.P., Burhan ATEŞ,Ali OTLU, *Metotreksatın Neden Olduğu Testiküler Hasara Karşı Klorogenik Asidin Koruyucu Etkileri.* Turkiye Klinikleri J Med Sci 2010. **30 (2)** (507).

175. Vardi, N., et al., *Antiapoptotic and antioxidant effects of beta-carotene against methotrexate-induced testicular injury.* Fertil Steril, 2009. **92** (6): p. 2028-33.

176. Yulug, E., et al., *Effects of resveratrol on methotrexate-induced testicular damage in rats.* ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 489659.

177. Serati Nouri H, Azarmi YA, Movahedin M. Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. Andrologia 2009;41:105-10.

178. Badri, S.N., G. Vanithakumari, and T. Malini, *Studies on methotrexate effects on testicular steroidogenesis in rats.* Endocr Res, 2000. **26** (2): p. 247-62.

179. Shrestha, S., et al., *Effect of methotrexate (MTX) administration on spermatogenesis: an experimental on animal model.* Nepal Med Coll J, 2007. **9** (4): p. 230-3.

180. Tomoda, R., et al., *Low-dose methotrexate inhibits lung metastasis and lengthens survival in rat osteosarcoma.* Clin Exp Metastasis, 2005. **22** (7): p. 559-64.

181. Semple, R.K., et al., *Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90** (3): p. 1849-55.

182. Ohtaki, T., et al., *Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor.* Nature, 2001. **411** (6837): p. 613-7.

183. Patterson, M., et al., *Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats.* Journal of Neuroendocrinology, 2006. **18** (5): p. 349-354.

184. Seminara, S.B., et al., *Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (Macaca mulatta): a finding with therapeutic implications.* Endocrinology, 2006. **147** (5): p. 2122-6.

185. Ramzan, F. and I.Z. Qureshi, *Intraperitoneal kisspeptin-10 administration induces dose-dependent degenerative changes in maturing rat testes.* Life Sci, 2011. **88** (5-6): p. 246-56.

186. Garcia-Segura, L.M., I. Azcoitia, and L.L. DonCarlos, *Neuroprotection by estradiol.* Prog Neurobiol, 2001. **63** (1): p. 29-60.

187. Hamden, K., et al., *Protective effects of estrogens and caloric restriction during aging on various rat testis parameters.* Asian Journal of Andrology, 2008. **10** (6): p. 837-845.

188. Reyes, M.R., A. Sifuentes-Alvarez, and B. Lazalde, *Estrogens are potentially the only steroids with an antioxidant role in pregnancy: in vitro evidence.* Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica, 2006. **85** (9): p. 1090-1093.

189. King, T.S., et al., *Phorbol esters stimulate in vitro GnRH release from the hypothalamus of the estrogen-primed, ovariectomized rat: inhibitory effects of cocaine.* Neuroendocrinology, 1992. **56** (4): p. 526-32.

190. Peltola, V., et al., *Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis.* Endocrinology, 1996. **137** (1): p. 105-12.

191. Navenot, J.M., N. Fujii, and S.C. Peiper, *Activation of Rho and Rho-associated kinase by GPR54 and KiSS1 metastasis suppressor gene product induces changes of cell morphology and contributes to apoptosis.* Mol Pharmacol, 2009. **75** (6): p. 1300-6.

192. Heo, J. and S.L. Campbell, *Mechanism of redox-mediated guanine nucleotide exchange on redox-active Rho GTPases.* J Biol Chem, 2005. **280** (35): p. 31003-10.

193. Gelman IH, Gao L. SSeCKS/Gravin/AKAP12 metastasis suppressor inhibits podosome formation via RhoA- and Cdc42-dependent pathways. Mol Cancer Res 2006; 4: 151–158

ÖZGEÇMİŞ

1985 Yılında Antalya'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Antalya'da tamamladım. 2004 yılında başladığım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 2009 yılında mezun oldum. 2010 yılı Ekim ayında Araştırma Görevlisi olarak girdiğim Fırat Üniveristesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında 2011 yılı Şubat ayında doktora eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalında Araştıma görevlisi olarak görevimi sürdürmekteyim.