T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINA EDARAVON'UN ETKİLERİ

Çağrı ÇELİK

DANIŞMAN
Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

İSTANBUL-2020

Bu çalışma 22.01.2020 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi
Kimya Bölümü
Biyokimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ayşen YARAT
Marmara Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Temel Bilimler Bölümü
Biyokimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Nuriye AKEV
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Özlem SAÇAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi
Kimya Bölümü
Biyokimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Sevim TUNALI
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi
Kimya Bölümü
Biyokimya Anabilim Dalı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'nın abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 31124 numaralı tez projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca yardımlarını esirgemeyen, tezimin konusunu veren ve tez çalışmalarım boyunca tecrübelerinden yararlandığım, desteğini gördüğüm danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çeşitli aşamalardaki ilgi, yardım ve desteğinden dolayı, Sayın Prof. Dr. Özlem SAÇAN'a çok teşekkür ederim. Çalışmalarımda desteğini esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Sevim TUNALI'ya ve Doktor Öğretim Görevlisi Bertan Boran BAYRAK'a teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca her aşamada fikirlerinden yararlandığım Sayın Doktor Öğretim Görevlisi İsmet Burcu TÜRKYILMAZ'a da çok teşekkür ederim. Her aşamada yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Arş. Gör. Onur ERTİK ve Arş. Gör. Eda DAĞSUYU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'ne teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca desteğini esirgemeyen annem Nuran ÇELİK, kardeşim Ece ÇELİK ve babam Ersan ÇELİK'e sonsuz minnettarım.

Ocak 2020 Çağrı ÇELİK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **viii**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **ix**
ÖZET ..... **xi**
SUMMARY ..... **xiii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. TESTİS 3
2.1.1. Testisin Anatomisi 3
2.1.2. Testisin Histolojisi 3
2.1.2.1. Seminifer tübül epiteli 5
2.1.2.2. Sertoli hücreleri 6
2.1.2.3. Leydig hücreleri 7
2.1.2.4. Spermatogenik seri hücreleri 8
2.1.2.5. Spermiyogenez 9
2.1.2.6. İnterstisyel alan 10
2.1.2.7. Testisin histofizyolojisi 10
2.1.2.8. Kan testis bariyeri ve ara bağlantılar 11
2.1.2.9. Oksidatif stres ve infertilite 11
2.2. SERBEST RADİKALLER 12
2.2.1. Serbest Radikal Türleri 13
2.3. ANTİOKSİDANLAR 15
2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar 15
2.4. VALPROİK ASİT 17
2.5. EDARAVON 20
2.5.1. Edaravon'un kimyasal yapısı 20
2.5.2. Edaravon'un Biyolojik Aktivitesi 21
2.5.3. Edaravon'un etki mekanizması 21
3. MALZEME VE YÖNTEM **23**
3.1. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN CİHAZLAR 23

3.2. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASALLAR 23
3.3. DENEY HAYVANLARI 26
3.4. DENEY HAYVANLARINDA TESTİS HASARININ OLUŞTURULMASI 26
3.5. TESTİS ÖRNEKLERİNİN ALINMASI 27
3.6. TESTİS DOKUSU HOMOJENİZATLARININ HAZIRLANMASI 27
3.7. TESTİS DOKUSUNDA GLUTATYON (GSH) MİKTAR TAYİNİ 27
3.8. TESTİS DOKUSUNDA LİPİD PEROKSİDASYONU (LPO) TAYİNİ 29
3.9. TESTİS DOKUSUNDA ASİT FOSFATAZ (ACP) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ 31
3.10. TESTİS DOKUSUNDA ALKALEN FOSFATAZ (ALP) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ 32
3.11. TESTİS DOKUSUNDA LAKTAT DEHİDROJENAZ (LDH) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ 34
3.12. TESTİS DOKUSUNDA KATALAZ (CAT) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ 35
3.13. TESTİS DOKUSUNDA SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ 36
3.14. TESTİS DOKUSUNDA GLUTATYON PEROKSİDAZ (GPX) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ 38
3.15. TESTİS DOKUSUNDA GLUTATYON REDÜKTAZ (GR) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ 39
3.16. TESTİS DOKUSUNDA GLUTATYON-S-TRANSFERAZ (GST) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ 41
3.17. TESTİS DOKUSUNDA GAMA GLUTAMİL TRANSFERAZ (GGT) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ 42
3.18. TESTİS DOKUSUNDA SODYUM-POTASYUM ATPAZ (NA^+/K^+-ATPAZ) AKTİVİTESİ TAYİNİ 43
3.19. TESTİS DOKUSUNDA PROTEİN KARBONİL (PC) MİKTAR TAYİNİ DENEYİNDE 47
3.20. TESTİS DOKUSUNDA TOTAL PROTEİN MİKTARI TAYİNİ 48
4. BULGULAR 51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 57
KAYNAKLAR 63
EKLER 77
ÖZGEÇMİŞ 78

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Testisin Yapısı. 3

Şekil 2.2: Skrotum.....4

Şekil 2.3: Seminifer Tübül. 5

Şekil 2.4: Sertoli Hücreleri.....6

Şekil 2.5: Leydig Hücreleri. 7

Şekil 2.6: Spermiyogenez.....10

Şekil 2.7: Serbest Radikal ve Antioksidan. 12

Şekil 2.8: Valproik Asidin Kimyasal Formülü. 18

Şekil 2.9: Edaravon'un Kimyasal Formülü.....20

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1: Deney ve kontrol grubu sıçanlarının testis dokusu GSH ve LPO değerleri. 51

Tablo 4.2: Deney ve kontrol grubu sıçanlarının testis dokusu ACP, ALP ve LDH aktivite değerleri. 52

Tablo 4.3: Deney ve kontrol grubu sıçanlarının testis dokusu CAT ve SOD aktivite değerleri. 53

Tablo 4.4: Deney ve kontrol grubu sıçanlarının testis dokusu GPx, GR ve GST aktivite değerleri. 54

Tablo 4.5: Deney ve kontrol grubu sıçanların testis dokusu GGT, Na^+/K^+-ATPaz aktiviteleri ve PC değerleri. 55

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

α : Alfa

β : Beta

γ : Gama

µL : Mikrolitre

µM : Mikromolar

mg : Miligram

mL : Mililitre

mM : Milimolar

nm : Nanometre

nM : Nanomolar

Kısaltmalar **Açıklama**

ACP : Asit Fosfataz

AEİ : Antiepileptik İlaçlar

ALP : Alkalen Fosfataz

ALS : Amyotrofik Lateral Skleroz

ANSA : 1-Amino-2-naftol-4-sülfonik Asit

ATP : Adenozin 5'-trifosfat

CAT : Katalaz

EDA : Edaravon

EDTA : Etilendiamin Tetraasetik Asit

FSH : Folikül Uyarıcı Hormon

GABA : Gama Amino Bütirik Asit

GGT : Gama Glutamil Transferaz

GPx : Glutatyon Peroksidaz

GR : Glutatyon Redüktaz

GSH : İndirgenmiş Glutatyon

GSSG : Yükseltgenmiş Glutatyon

GST : Glutatyon -S-transferaz

LDH : Laktat Dehidrojenaz

LH : Luteinleştirici Hormon

LPO : Lipid Peroksidasyonu

NADH : İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit

NADPH : İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

Na^+/K^+ ATPaz : Sodyum-Potasyum ATPaz

PC : Protein Karbonil

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

SOD : Süperoksit Dismutaz

TBA : Tiyobarbitürik Asit

TCA : Trikloroasetik Asit

TEP : 1,1',3,3'-Tetraetoksipropan

VPA : Valproik Asit

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINA EDARAVON'UN ETKİLERİ

Çağrı ÇELİK

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Valproik asit (VPA), 1960'lı yıllardan bu yana epilepsi tedavisinde kullanılmaya başlanan bir ilaçtır. Geniş bir aktivite yelpazesine sahip olan valproik asidin uzun soluklu kullanımı hepatotoksite, teratojenite ve pankreatit vb. gibi ciddi yan etkilere neden olabilmektedir. Edaravon yarı ömrü 5,4 dakika olan serbest radikal tutucudur. Edaravon'un antioksidatif, antiapoptotik, nöroprotektif ve antienflamatuvar etkileri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu etkilerini lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ve serbest radikalleri temizleyerek gösterir. Hidroksil radikallerini yakalayarak araşidonik asidin lipoksijenaz metabolizmasını azaltır ve alloksanın neden olduğu lipid peroksidasyonunu inhibe eder ve aktif oksijen türlerini bastırır. Bu çalışmada sıçanlarda testis hasarı oluşturmak için valproik asit, koruyucu madde olarak ise sentetik bir antioksidan olan edaravon kullanıldı. 1. Grup (kontrol grubu) sıçanlara günde bir kez serum fizyolojik 7 gün süre boyunca intraperitoneal olarak verildi. 2.Grup sıçanlara günde 30 mg/kg edaravon 7 gün süre ile intraperitoneal olarak verildi. 3. Grup sıçanlara günde 0.5 g/kg valporik asidin 7 gün süre ile verilmesi ile testis hasarı oluşturuldu. 4. Grup sıçanlara 7 gün süre ile 0.5 g/kg valproik asit verildi. Bu grup sıçanlara

valproik asidin verilmesinden 2 saat sonra 30 mg/kg edaravon 7 gün süre ile intraperitoneal olarak verildi. Edaravon'un valproik asit ile oluşturulan hasarın üzerindeki etkisinin gözlenmesi bağlamında testis dokusunda glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyonu (LPO) tayini, asit fosfataz (ACP), alkalen fosfataz (ALP), laktat dehidrojenaz (LDH), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-transferaz (GST), gama glutamil transferaz (GGT) ve sodyum-potasyum ATPaz (Na^+/K^+-ATPaz) aktivitesi tayinleri ile protein karbonil (PC) ve total protein miktar tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan, valproik asidin oluşturduğu testis hasarının edaravon verilmesi ile önlenebileceği öne sürülebilir.

Ocak 2020, 93 sayfa.

Anahtar kelimeler: Edaravon, Valproik Asit, Testis, Sıçan

SUMMARY

M.Sc. THESIS

EFFECT OF EDARAVONE ON VALPROIC ACID INDUCED TESTIS INJURY IN RATS

Çağrı ÇELİK

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Valproic acid (VPA) has been used in the treatment of epilepsy since the 1960s. Long-term use of valproic acid, which has wide range activity, is associated with serious side effects such as hepatotoxicity, teratogenicity and pancreatitis. Edaravone is a free radical scavenger with a half-life of 5.4 minutes. Studies have shown edaravone has antioxidative, antiapoptotic, neuroprotective and anti-inflammatory effects. It acts by inhibiting lipid peroxidation and removing free radficals. By capturing hydroxyl radicals, it reduces lipoxygenase metabolism of arachidonic acid, inhibits lipid peroxidation caused by alloxane, and suppresses active oxygen species. In this study, valproic acid was used to induce testicular damage in rats, while edaravone, a synthetic antioxidant was used to protect against the effects of VPA. Group 1 (control group) rats were given physiologic saline intraperitoneally once daily for 7 days. Group 2 rats were given 30 mg / kg edaravone intraperitoneally daily for 7 days. Testicular injury was induced by administering 0.5 g / kg valproic acid to Group 3 rats for 7 days. Group 4 rats were given 0.5 g / kg valproic acid for 7 days. Two hours after valproic acid

administration to this group of rats, 30 mg / kg edaravone was given intraperitoneally for 7 days. To observe the effect of edaravone on valproic acid induced damage, glutathione (GSH) and lipid peroxidation (LPO), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), gamma glutamyl transferase (GGT) and sodium-potassium ATPase (Na^+/ K^+ -ATPase) activity determinations, protein carbonyl (PC) and total protein content was determined in the testicular tissue. The results showed that the damage caused by valproic acid can be reversed with edaravone.

January 2020, 93 pages.

Keywords: Edaravone, Valproic Acid, Testis, Rat

1. GİRİŞ

Testisler erkek üreme sistemini oluşturan kısımlardan birisidir, endokrin ve ekzokrin salgıları olan bir bez niteliği taşır. Testislerin ekzokrin ürünü cinsiyet hücreleri, endokrin ürünü ise testosteron hormonudur. Testisin başlıca iki görevi vardır, bunlar hormon ve spermatozoonları üretmektir. Testis, kalın bir kollajenöz bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir ve bağ dokusu kan ve lenf damarları ve Leydig hücreleri içerir. Embriyonal gelişim sırasında belirgin hale gelen Leyding hücreleri ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişmesinden sorumlu olan erkeklik hormonu testosteronu üretmektedirler ve steroid salgılayan hücre özelliği gösterirler.

Erkek fertilisinde spermatogonyal kök hücrelerinin önemli etkileri vardır. Spermatogenez, hipofizin folikülü uyarıcı (FSH) ve luteinleştirici (LH) hormonlarının testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH interstisyel hücreler üzerine etki eder. Ayrıca spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını uyarır.

Orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektronu bağımsız olarak barındıran atom veya moleküller serbest radikaller olarak isimlendirilmektedir. Kararsız ve oldukça reaktif olan bu yapılar, fizyolojik ya da patolojik reaksiyonlar sırasında başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girip, onları oldukça reaktif hale getirirler. Serbest radikaller, reaktif yapıları sebebiyle nükleik asitler ve proteinler ile etkileşerek vücuda zararlı etkilerde bulunabilirler ve bunun sonucunda organizmada oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stres; vücutta antioksidanlar ile serbest radikaller arasındaki dengenin oksidanlar lehine değişmesidir. Serbest radikallerin çoğu oksijene dayanır, oksijenin dışında, azot kaynaklı radikaller de oluşabilir. Oksijen kaynaklı olan radikallere reaktif oksijen türleri (ROS) denir. ROS ile indüklenmiş oksidatif stresin erkek infertilitesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Erkek üreme sistemindeki aşırı ROS ve oksidatif stres, sperm konsantrasyonunda, morfolojide ve spermin hareket kabiliyetinde negatif değişikliklere sebep olup spermlere zarar verir, ayrıca semen parametrelerini etkileyerek infertiliteye neden olur.

Antioksidan maddeler, radikallerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek radikal metabolitlerinin üretilmesini önleyen ve bu radikallerden kaynaklanan hücre hasarlarının onarılmasını sağlayan maddelerdir.

Valproik asit (VPA) ilk kez 1882 yılında Burton tarafından sentezlenmiştir (Burton,1882). Organik çözücülerle iyi çözünebilen, suda ise oldukça az çözünen renksiz bir sıvıdır. VPA, epilepsi türlerinin çoğunu etkileyen, özellikle yetişkin ve çocuk gruplarında oldukça yaygın kullanılan antiepileptik bir ilaçtır. Valproik asit, plazma proteinlerine %90-95 oranında

bağlanır. İlaç başta karaciğer olmak üzere çeşitli yollarla metabolize olur. Sodyum iyon kanallarının inaktivasyonunu hızlı bir şekilde arttırır, kalsiyum kanallarını bloke ederek kalsiyum akışını azaltır, nörotransmiter salınımını azaltır. VPA kullanımına bağlı olarak hepotoksite, polikistik over ve sperm fonksiyonunda azalma olduğu bildirilmiştir.

Edaravon sentetik bir serbest radikal tutucudur. Edaravon, nöronal hasar ve ölüme sebep olan serbest hidroksil radikallerini ve peroksinitrit radikallerini temizler. Serbest radikal oluşumu ve oksidatif strese karşı hücre zarı hasarı yoluyla lipid peroksidasyonunun kapsamını sınırlandırarak hastalığın ilerlemesini geciktirir. Edaravon'un yaklaşık %50'si fizyolojik pH'ta anyonik bir formda bulunur; bu form beyindeki ROS ile kuvvetli reaksiyona girebilir. Edaravon hem suda hem yağda etkinlik gösteren düşük molekül ağırlıklı bir ajandır. Bu şekilde hem C vitamini hem de E vitamini özelliklerine sahip olup, diğer serbest radikal kurtarıcılarının aksine kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilir. Etkilerini, lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ve serbest radikalleri temizleyerek gösterir.

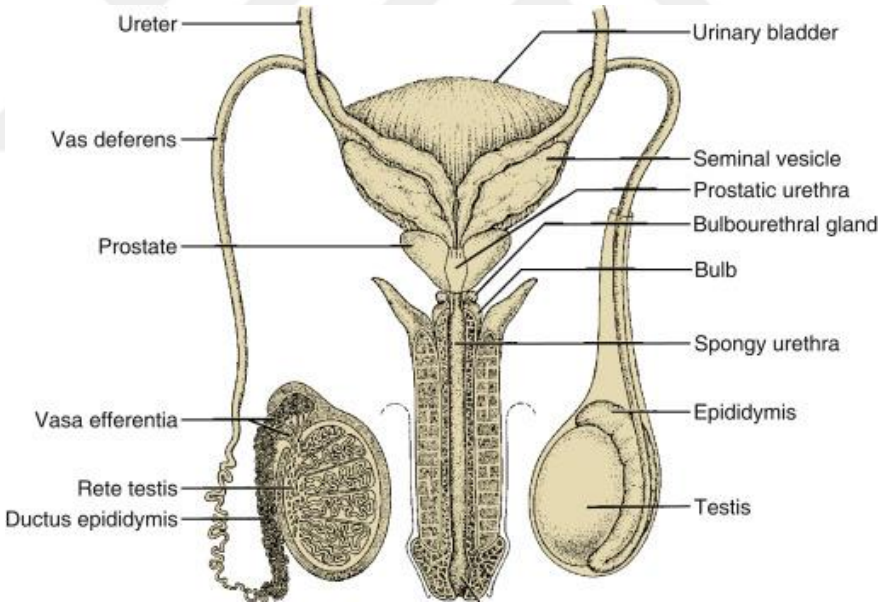
Bu çalışmada valproik asit ile sıçanlarda oluşturulan testis hasarı üzerine edaravon’un etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. TESTİS

2.1.1. Testisin Anatomisi

Tetisler, 4-5 cm uzunluğa, 2,5 cm genişliğe, 3 cm kalınlığa ve 20-25 gr ağırlığa sahiptirler (Arıncı ve Elhan, 2006). Aynı boyutlarda olmalarına rağmen yapı olarak sol testis sağ testise göre biraz daha aşağıda kalır. Ağırlık olarak ise sağ testis sol testise göre %10 daha ağırdır (Drake ve diğ., 2007). Embriyonal yaşamın başlarında karın boşluğu ile bel omurlarının iki yanında gelişmeye başlayan testisler gebeliğin 7. ayında skrotuma gelirler (Yavaş, 2010). Testisler endokrin ve ekzokrin salgıları olan bir bez niteliği taşır. Testislerin ekzokrin ürünü cinsiyet hücreleridir. Endokrin ürünü ise testosteron hormonudur (Şekil 2.1).



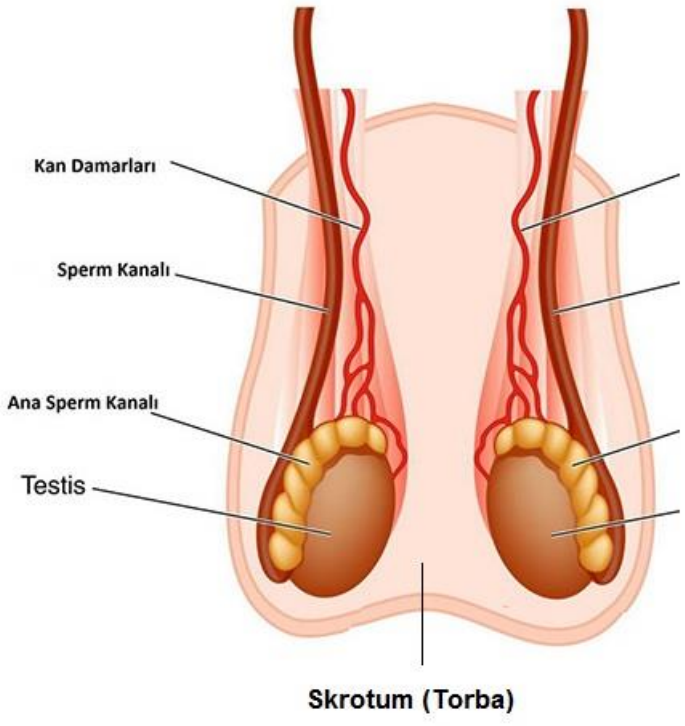
Şekil 2.1: Testisin Yapısı.

2.1.2. Testisin Histolojisi

Erkek üreme sistemini oluşturan kısımlar penis, testisler, genital kanallar ve yardımcı bezlerdir. Testisin başlıca iki görevi vardır. Bunlar hormon ve spermatozoonları üretmektir (Junqueira ve Carneiro, 2005). Erkek üreme sistemi, gametin sürekli üretimi, beslenmesi ve

geçici olarak depolanması ile erkek seks hormonlarının sentezinden ve salgılanmasından sorumludur (Abraham, 2006).

Testisler çift olarak skrotum içinde yer alırlar (Şekil 2.2). Testislerin karın içinden daha düşük bir sıcaklıkta saklanmasında skrotumun önemli bir rolü vardır (Junqueira ve Carneiro, 2005). Testis, tunika albuginea adında kalın bir kollajenöz bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir. Mediastinum testis (rete testis), tunika albugineanın testisin arka yüzünde kalınlaşması ile oluşur ve bu kısımdaki fibröz septumlar ile yaklaşık iki yüz elli adet piramidal bölgeye ayrılır. Bu bölgelere testiküler lobüller denilir. Testiküller lobüller genellikle birbirleri ile bağlantılıdır ve oluşumlarını sağlayan uzantılar kesintisiz değildir.



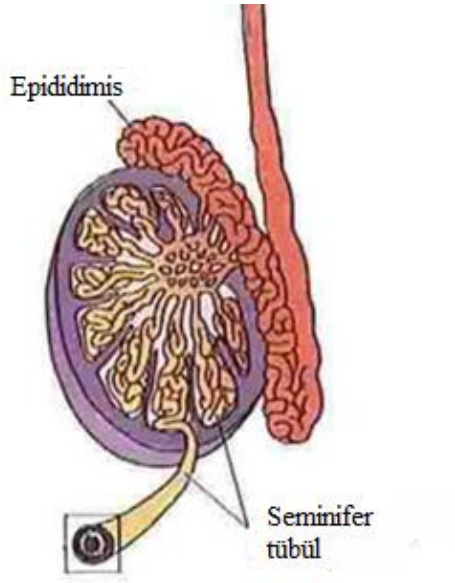
Şekil 2.2: Skrotum.

Tübüller bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve Leydig hücreleri içeren gevşek bağ dokusu ile sarılıdır. Leydig hücreleri interstisyel hücrelerdir. Erkek üreme hücreleri olan spermatozoonlar seminifer tübüller tarafından üretilir. Leydig hücreler ise testis androjenlerini

salgılar (Junqueira ve Carneiro 2005; Abraham, 2006). Uçları U şeklindedir ve rete testise açılırlar. Testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar gibi seminifer epitelyum ürünlerini toplayan kanallara rete testis denir. Seminifer epitel kollajen lifler, kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan bir duvar ve bazal membran ve fibroblastlar ile çevrilidir. Kasılabilir özellikteki miyoloid hücreler ritmik kasılma hareketleri ile hareketsiz olan spermleri rete testisine ilerletirler (Abraham, 2006).

2.1.2.1. Seminifer tübül epiteli

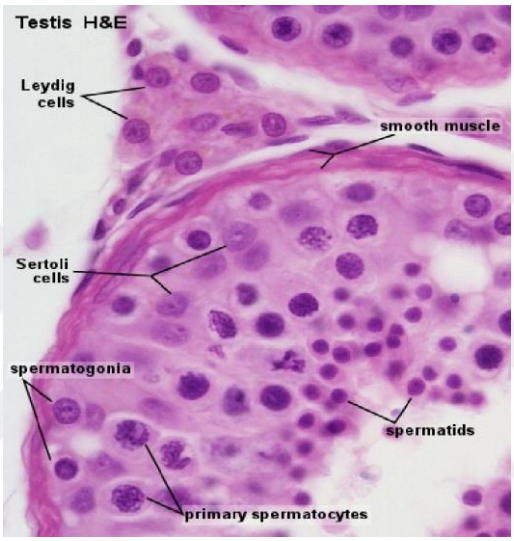
Seminifer tübüllerin her biri yaklaşık 150-250 μm çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır (Şekil 2.3). Karmaşık yapıda çok katlı bir epitel ile döşelidir. Bir testisteki seminifer tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metre civarındadır (Arıncı ve Elhan, 2006). Seminifer tübüller kıvrımlıdır ve uçlarına doğru lümeni daralarak düz tübüller ya da tübüli rekti olarak anılan kısa segmentler halinde devam eden kanallar şeklinde uzanır. Bu düz tübüller, seminifer tübülleri rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu kısma bağlar (Junqueira ve Carneiro, 2005).



Şekil 2.3: Seminifer Tübül.

2.1.2.2. Sertoli hücreleri

Puberteye (ergenliğe) kadar seminifer epitel için baskın hücre tipi olan Sertoli hücreleri puberteden sonra, seminifer tübüllerdeki hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. İleri yaşlarda erkeklerde spermatogenik hücre popülasyonu azaldığı zaman, Sertoli hücreleri tekrar epitelin baskın elemanı haline gelir (Abraham, 2006) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Sertoli Hücreleri.

Bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzanan prizmatik hücreler olan Sertoli hücrelerinin sınırları, spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıdaki yan uzantı sebebiyle ışık mikroskobunda tam olarak belirlenemez. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, Sertoli hücrelerinin yüksek miktarda düz endoplazmik retikuluma, az miktarda granüllü endoplazmik retikuluma, iyi gelişmiş bir golgi kompleksine ve çok sayıda mitokondri ile lizozoma sahip olduğu görülmüştür. (Welsch, 1999; Junqueira ve Carneiro 2005; Abraham, 2006;).

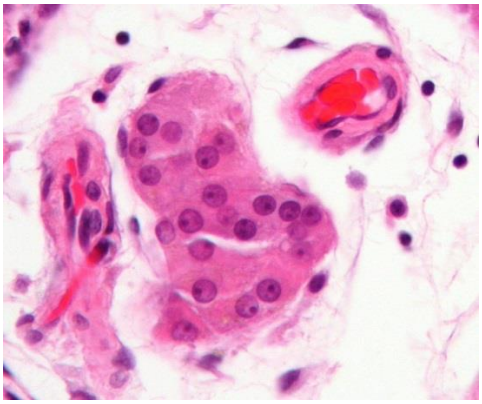
Sertoli hücreleri oldukça önemli fonksiyonları olan hücrelerdir. Bu fonksiyonlar,

- Gelişmesini sürdüren spermatogenik hücreleri korumak, desteklemek ve beslemek.
- Spermiyogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan artık cisimcikleri fagositoz ile yok etmek.

- Spermin seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak ve protein ve iyonlardan zengin bir sıvıyı salgılamak (Abraham, 2006).
- Seminifer tübülde gerçekleşen spermatogenezde testosteron hormonunun zengin yani derişik hale gelmesini sağlayan androjen-bağlayıcı proteini (ABP) salgılamak.
- Testosteronu dişi cinsiyet hormonu olan östradiol haline dönüştürmek folikül stimüle edici hormon (FSH) sentezini, salgılanmasını inhibe eden bir peptid salgılamak.
- Spermatogenezin ileri aşamalarında cinsiyet (germ) hücrelerini kandaki zararlı maddelere karşı koruyan kan-testis bariyerini oluşturmak (Junqueira ve Carneiro, 2005).

2.1.2.3. Leydig hücreleri

Embriyonal gelişim sırasında diğer bir hücre tipi belirgin hale gelir. Yuvarlak veya poligonal şekilli olan, küçük lipid taneciklerince zengin, eozinofilik sitoplazması bulunan bir hücreyi oluşturmaktadır. Bu hücreler steroid salgılayan hücre özellikleri gösteren Leydig hücreleridir. Bu hücreler, ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişmesinden sorumlu olan erkeklik hormonu testosteronu üretmektedirler. Testosteron üretilmesi mitokondri ve düz endoplazmik retikulumunda bulunan enzimler sayesinde gerçekleştirilmektedir (Junqueira ve diğ., 1998; Ovalle ve Nahirney, 2009).



Şekil 2.5: Leydig Hücreleri.

Fetal dönemde, gebeliğin 18. haftasından itibaren, testisteki Leydig hücre populasyonu baskın haldedir. Bu dönemde fetal Leydig hücreleri tarafından üretilen androjenler erkek üreme kanalının gelişiminde önemli role sahiptir. Leydig hücreleri fetal testis içinde, gebeliğin 8. ayında, ilk kez ortaya çıkarlar ve sayıları yavaş yavaş artar. Daha sonrasında doğuma çok az kalana dek sayıları azalır (Zikrin ve Chen, 2000; Abraham, 2006). Testiküler steroidogenez, yeni doğanlarda doğumdan sonraki ilk 2-3 ay içinde üst seviyelere ulaşıp daha sonra azalır. Lüteinleştirici hormon (LH) artışı androjen seviyesini aktive edene kadar, pubertede androjen seviyeleri düşük kalır (Junqueira ve Carneiro, 2005).

Puberteden sonra, bir siklik adenozin monofosfat (cAMP) aracılı mekanizma tarafından LH ile uyarılmanın ardından Leydig hücreleri, 5-alfa-redüktaz enzimi varlığı ile dihidrotestosterona dönüştürülebilen testosteron üretir.

Serumdaki testosteronun yaklaşık %95'i Leydig hücreleri, %5'i ise adrenal korteks tarafından üretilir (Abraham, 2006) (Şekil 2.5).

2.1.2.4. Spermatogenik seri hücreleri

Seminifer hücreleri, iki tip hücreden oluşur. Bunlar Sertoli veya destek hücreleri ile spermatogenetik seriyi oluşturan hücrelerdir.

Spermatogenetik seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmiş hücrelerdir (Feldman ve diğ., 2005). Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları meydana getirirler (Junqueira ve Carneiro, 2005).

Spermatogonyal kök hücrelerinin erkek fertilitesinde önemli rolleri vardır. Bu hücreler kısmen sessiz hücrelerdir. Bu sebeple radyasyon ve kanser kemoterapisine dirençlidirler. Mitozla bölünen spermatogonyumlar, mayotik bölünen spermatositler ve farklılaşmakta olan spermatidler ise kanser kemoterapisine ve radyasyona karşı duyarlıdırlar. Radyoterapi ve kanser kemoterapisinin sonlandırılmasıyla, spermatogonyal kök hücreleri spermatogenik süreci yeniden oluşturabilirler. Postmitotik Sertoli hücreleri bu tedavilere yüksek oranda dirençlidirler (Abraham, 2006).

Cinsel olgunluk çağına gelindiğinde mitoz bölünme ile çoğalmalar başlar ve yeni hücreler meydana gelir. Yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izleyebilir. Tip A spermatogonyumlar, A koyu ve A açık spermatogonyumlar olarak gözlenir. Devam eden bölünmeler süresince farklılaşarak tip B spermatogonyumları meydana getirirler.

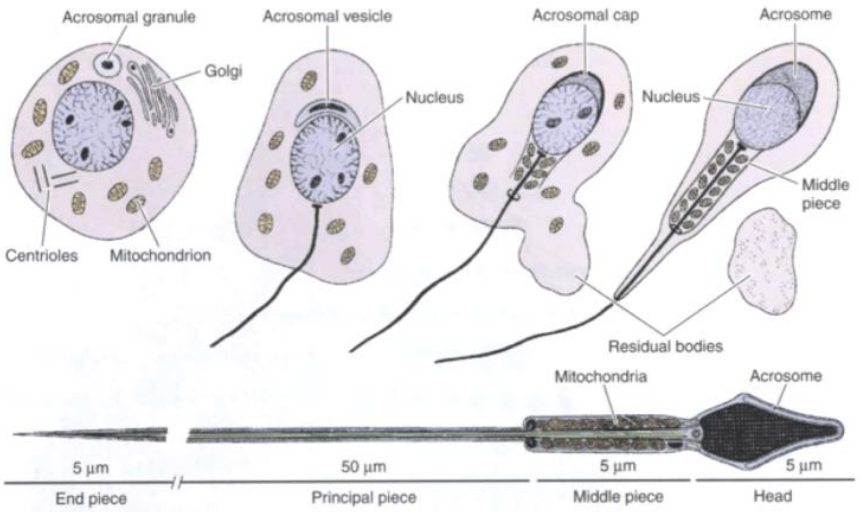
Başarılı mitotik bölünmelerden sonra, tip B spermatogonyumlar, son S fazını (DNA sentezi) tamamlayıp mayoz bölünmenin profaz aşamasına girer. Spermatogenik hücrelerin yaşam süresindeki esas DNA sentez aktivitesinin bu son turu, mayozun profaz I aşamasına başlayan bir primer spermatositin spermatogonyuma göre iki kat DNA miktarına sahip olacağını belirler (Abraham, 2006).

B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir. Spermatositler iki başarılı mayotik hücre bölünmesi geçirirler. Hücre bölünmesi sonrasında Sertoli hücreleri arasındaki tıkayıcı bağlantıların hemen üzerinde, seminifer tübülün adluminal kompartmanında yer alırlar. Dolayısıyla, mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içinde meydana gelir (Junqueira ve Carneiro, 2005; Abraham, 2006).

Birinci mayoz bölünme uzun, ikinci mayoz bölünme çok kısa (dakikalar) sürdüğünden, primer spermatositler seminifer tübüllerde en fazla gözlemlenen hücrelerdir. (Abraham, 2006; Junqueira ve Carneiro, 2005).

2.1.2.5. Spermiyogenez

Spermiyogenez spermatogenezin son aşamasıdır. Spermatidler, Sertoli hücre sitoplazma kriptaları içinde yer alırlar (Abraham, 2006). Bu aşamada hücre bölünmesi meydana gelmez (Junqueira ve Carneiro, 2005). Önce akrozom oluşur, nükleus yoğunlaşır ve uzar, flagellum gelişir ve sitoplazmanın çoğu kaybolur. Sonuç olarak ise seminifer tübülün lümenine salınan olgun spermatozoon oluşur (Junqueira ve Carneiro, 2005) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Spermiyogenez.

Spermiyogenez golgi fazı, akrozomal evre ve olgunlaşma evresi olmak üzere 3' e ayrılır.

2.1.2.6. İnterstisyel alan

Testislerde seminifer tübüller arasındaki boşluklar bağ dokusu, kan, sinirler ve lenf damarlarıyla doludur. Testiküler kapillerler pencerelidir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin geçişine olanak sağlar. Bağ dokusu içerisinde fibroblastlar, farklılaşmış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar gibi farklı tipte hücreler bulunur. Ergenlikle birlikte belli hücre tipleri daha işlevsel hale gelerek öne çıkar. Bu hücreler, testisin interstisyel olarak da adlandırılan Leydig hücreleridir (Junqueira ve Carneiro, 2005).

2.1.2.7. Testisin histofizyolojisi

İnsanda iki testisten günlük yaklaşık spermatozoon yapımı iki yüz milyon kadardır. Bu büyük bir miktar gibi görünse de diğer türlere göre düşük bir sayıdır. İnsanda her iki testis yaklaşık sekizyüzbin adet kıvrımlı borucuk içerir. Bunların her biri 30-70 cm uzunluğuna sahiptir. Oluşan ejakulat miktarı ise 2-5 ml' dir. Bu ejakulat 40-100 milyon/ml spermatozoon barındırır. Bu sayı 20 milyonun altına düşerse infertiliteden söz edilir (Hatipoğlu ve Turgut, 1996). Endokrin faktörler spermatogenez üzerinde en etkin ve önemli etki gösterirler. İnsanda ergenlikle başlayan spermatogenez süreklidir ve ölünceye kadar azalarak da olsa devam eder.

Üreme hücre epiteli toksik ajanlar, alkol, çeşitli enfeksiyon hastalıkları ve beslenme yetersizliklerine (vitamin A ve E vitamin eksikliği) karşı duyarlıdır (Abraham, 2006).

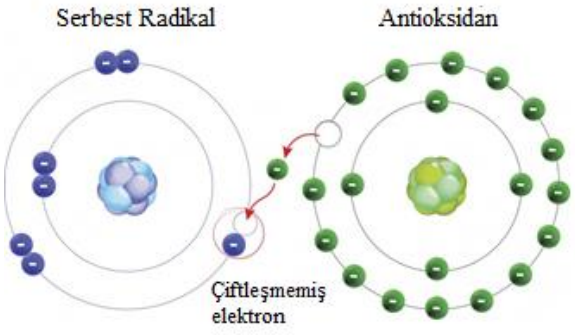
2.1.2.8. Kan testis bariyeri ve ara bağlantılar

Testis içerisinde sperm üretimi, kan testis bariyeri adı verilen testis yapısına bağlıdır. Sperm üretimi, testis içerisinde bulunan antikorları bağışıklık sisteminden ayıran, kan testis bariyeri adı verilen testis yapısına bağlıdır. Kan testis bariyerinin işlev kaybı, doğrudan infertiliteye yol açar. Kan testis bariyerinin gelişen spermler ve immün sistem arasında oluşabilecek etkileşimi ortadan kaldırma özelliği vardır. Bu bariyer seminifer tübüllere immünoglobulinlerin geçmesini engeller ve bu sayede serumlarında yüksek oranda sperm antikoru bulunan hastalarda bile herhangi bir fertilite bozukluğu görülmez.

Testiküler kapiler pencereli tiptedir ve büyük moleküllerin serbestçe geçişine izin verirler. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlar bu bariyerden sorumludur. Erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı maddelere karşı korunmasında bu sıkı bağlantılar önemli rol oynarlar (Junqueira ve Carneiro, 2005).

2.1.2.9. Oksidatif stres ve infertilite

Antioksidanlar vücudu serbest radikallerin zararlı etkilerini koruyan maddelerdir. Sezer ve Keskin, 2014). Serbest radikaller, reaktif yapıları sebebiyle nükleik asitler, lipidler, karbohidratlar ve proteinler üzerinde zararlı etki oluşturabilirler (Büyükuslu ve Yiğitbaşı, 2015). Bunun sonucu olarak, serbest radikal oluşumundaki artış meydana gelirse ve bu artışı antioksidan savunma sistemi gideremiyorsa vücutta oksidatif stres meydana gelir (Lobo ve diğ., 2010). Reaktif oksijen türleri (ROS) ile oluşturulmuş oksidatif stresin erkek cinsiyeti üzerinde önemli rol oynayabileceği bildirilmektedir (Hamada ve diğ., 2013). Aşırı ROS ve oksidatif stres, sperm konsantrasyonunda, morfolojide ve motilitede olumsuz etkilere sebep olup sperm oluşumuna ve spermlere zararlı etki gösterir. Ayrıca semen parametrelerini etkiler (Khosrowbeygi ve Zarghami, 2007). Sperm membran hasarı ve DNA hasarının kaynağını ROS oluşturur. Bunun sonucunda erkek infertilitesi ortaya çıkar (Agarwal ve diğ., 2014).



Şekil 2.7: Serbest Radikal ve Antioksidan.

Fazla miktarda çoklu doymamış yağ asitleri sperm membranlarında bulunur. Doymamış yağ asitlerinin fazla miktarda bulunması nedeni ile bu membranlar oksidatif strese duyarlı hale gelir ve spermin yumurtayı dölleme yeteneği ile sperm hareketi de etkilenir (Tremellen, 2008). Hipertansiyon, gut, tip 2 diyabet, koroner kalp hastalıkları, felç, dislipidemi, osteoartrit, uyku apnesi, çeşitli kanser türleri ve obezite gibi hastalıklar oksidatif strese neden olurlar ve sperm fonksiyonlarının bozulmasına ve testisin hasar görmesine neden olurlar (Palmer ve diğ., 2012).

2.2. SERBEST RADİKALLER

Kolaylıkla bozunan ve oldukça reaktif olan serbest radikaller, fizyolojik ya da patolojik reaksiyonlar sırasında başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girip, onları oldukça reaktif hale getirirler. Bunun sonucunda radikal olmayan yapılar, radikal yapılara dönüşürler (Durmuş, 2005; Bilge, 2010; Lobo ve diğ., 2010) (Şekil 2.7).

Biyolojik sistemlerde önemli serbest radikaller reaktif oksijen (ROS), reaktif nitrojen (RNS) ve reaktif kükürt türleridir. ROS ve RNS radikal ve radikal olmayan oksijen ve azot bileşikleri içerirler. Serbest radikaller organik ya da inorganik molekül olabilirler. Bunlar pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötr halde bulunabilirler (Durmuş, 2005; Bilge, 2010; Karabulut ve Gülay, 2016).

Serbest radikallerin oluşumu endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlıdır. Mitokondride elektron taşıma sistemi, ksantin oksidaz, fagositoz, lipid peroksidasyonu, inflamasyon ve egzersiz endojen kaynaklardır. Ekzojen kaynaklar ise radyasyon, pestisitler, sigara kullanımı, endüstriyel çözücüler, ilaçlar ve ozon olarak sıralanabilir. Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonların sonucunda organizmada serbest radikaller sürekli olarak oluşur. Fagositozda, solunum zincirinde, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P450 sisteminde enzimatik reaksiyonlar yer alırlar. Oksijen ve oksijen türlerinin organik bileşiklerle oluşturduğu reaksiyonlar ise enzimatik olmayan reaksiyonlardır (Bilge, 2010; Lobo ve diğ., 2010).

2.2.1. Serbest Radikal Türleri

Serbest radikal türleri, hücresel metabolizmanın ürünleridir. ROS ve RNS canlı sistemlerde hem yararlı hem de zararlı etkilerinden dolayı çift role sahiptir. Yararlı etkileri arasında, ROS ve RNS'nin ortamda düşük konsantrasyonda bulundukları zaman, hücrenin zararlı ajanlara karşı savunulması ve hücre sinyal sistemlerinin fonksiyonlarının korunması vardır. Yüksek konsantrasyonda bulunmaları halinde ise, oksidatif stres ve nitrosatif stres potansiyel biyolojik hasarı meydana getirir. Bu hasara RNS ve ROS'un yüksek konsantrasyonda bulunması neden olur. Bunun sonucunda ise hücrenin savunma sisteminde çökme meydana gelir. Bu savunma sistemlerine antioksidan sistemler denir. Enzimatik veya non-enzimatik antioksidanların zarar görmesi ile oksidatif hasar oluşur. Bu durum yaşamsal faaliyetlerin sürdürülmesinde gerekli olan siklusların hepsini etkiler.

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$): Moleküler oksijene bir elektron eklenmesi ile oluşan yapıdır. Oldukça kuvvetli ve aktif bir indirgeyicidir. Süperoksit anyonu, metabolik prosesler yoluyla veya fizyolojik olarak oksijenin aktivasyonu ile meydana gelebilir. Ayrıca enzim ve metal katalizli reaksiyonlar ile de oluşabilir. Serbest radikal özelliği taşımasına rağmen, direkt olarak polipeptitler, karbohidratlar, nükleik asidler veya lipidlerle etkileşime girmez. Buna ek olarak, H_2O_2 kaynağıdır ve geçiş metallerini indirgeme özelliğinden dolayı da önemlidir. Süperoksit radikali, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüştürülür.

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2\bullet^-$$

$$O_2\bullet^- + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$2\ O_2\bullet^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Oksijenin iki elektron ile indirgenmesi veya süperoksit radikalinin dismutasyon reaksiyonu sonucu oluşmaktadır.

$$O_2 + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

$$2\ O_2\bullet^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Hidrojen peroksit, yapısında çiftleşmemiş elektron barındırmamaktadır. Radikal özelliği taşımamasına rağmen, biyolojik sistemler için oldukça önemlidir. Çünkü hidrojen peroksit, hidroksil radikali oluşturmak üzere Fenton reaksiyonu olarak bilinen reaksiyona demir veya bakır iyonları ile girebilir ya da süperoksit radikali ile Haber-Weiss reaksiyonuna katılabilir.

Fenton reaksiyonu:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + {}^-OH$$

Haber-Weiss reaksiyonu:

$$O_2\bullet^- + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + \bullet OH + {}^-OH$$

Hidrojen peroksit, hücresel düzeyde glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) enzimleri ile giderilmektedir.

Hidroksil radikali (•OH): Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarının yanısıra iyonize edici radyasyon ve alkilhidroperoksitlerin bozunması yolları ile de oluşmaktadır. Yarılanma süresi 1 nanosaniye kadardır. Kuvvetli bir radikaldir. DNA bazlarına veya DNA'nın deoksiriboz iskeletine etki ederek yapıda hasar meydana getirmektedir.

Singlet oksijen ($^1O_2$): Moleküler oksijenin dış orbitallerinde bulunan elektronlardan birinin enerji alarak spin değiştirmesi ile oluşur. Bu yolla meydana gelen singlet oksijen, çok aktif bir

yapı olup membran lipidleri ve bunun gibi birçok molekülü oksitleyebilecek özelliktedir (Halliwell ve Guttridge, 1984).

Peroksil radikalleri: Lipid peroksidasyonu sürecinde çoklu doymamış serbest yağ asidlerinden bir hidrojen atomu ayrılması sonucunda meydana gelir. Hem süperoksit radikallerinden hem de hidroksi radikallerinden daha uzun ömürlüdür. Peroksil radikali hücrede difüzyon ile yer değiştirir. Hücrenin farklı yerlerinde peroksidasyonu başlatabilir. Lipid peroksidasyonunun daha ileri aşamalarında ise alkoksil ve diğer hidroperoksil radikalleri oluşur (Gülçin, 2006).

2.3. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar, radikal oluşumunu sınırlandıran, oluşan biyokimyasal reaksiyonların değişimine yol açan, radikallerin ortadan kaldırılmasını ve kusurlu moleküllerin tamir edilmesini ve süpürülmesini farklı ve çeşitli yollarla gösteren radikallerle hızlı bir şekilde reaksiyona maddelerdir. Hücreler ve dokular, radikal ürünlerin ve reaksiyonların biyomoleküler ve hücresel yapılara verdiği zararın önlenmesine yönelik bir sisteme sahiptir (Dündar ve Aslan, 1999).

Antioksidan savunma sistemleri etkilerini aşağıdaki gibi gösterir (Dündar ve Aslan, 1999):

- Zararlı metabolitin meydana gelmesinin önlenmesi
- Vücutta meydana gelen radikallerin süpürülmesi
- Vücutta meydana gelen hücre hasarının tamir edilmesi
- İkincil radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması
- Vücutta oluşan antioksidan kapasitenin arttırılması

Enzimatik ve enzimatik olmayan (nonenzimatik) antioksidanlar, radikallerin etkisini gidermek için membranda, hücre içinde ve hücre dışında bulunurlar (Lobo ve diğ., 2010).

2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar organizmamızda meydana gelen radikalleri gidermeden sorumlu olan endojen enzim sistemleridir (SOD, CAT, GP_x, GR, GST vb.).

SOD; süperoksit anyonun oksijen ve hidrojen peroksit oluşumunu katalize eder. SOD aktivitesi, bakır, çinko ve mangan elementleriyle ilişkilidir (Dündar ve Aslan, 1999; Lobo ve diğ., 2010).

Süperoksit dismutaz 1968'de oksijenli solunum yapabilen canlılarda saptanmış olup, süperoksit anyon radikalinin, moleküler oksijene ve hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler. Reaksiyonda oluşan hidrojen peroksit, antioksidan enzimlerden olan katalaz ve glutatyon peroksidaz ile ortamdan uzaklaştırılır (Fridovich, 1983).

SOD enzimi organizmayı süperoksit radikallerinin zararlı etkilerinden korur. Normal metabolizmada hücrelerde yüksek oranlarda süperoksit radikal oluşumu meydana geldiği halde, SOD enziminin sayesinde hücre içindeki süperoksit radikal düzeyi düşük seviyede tutulmaktadır. SOD, fagosite olmuş bakterilerin hücre içerisinde etkisiz şekle getirilmesinde etkili olmaktadır. Bu sebeple SOD, granülosit fonksiyonu için oldukça önem arz etmektedir. Lenfositlerde de granülositlere göre oldukça fazla oranda SOD enzimi bulunmaktadır. SOD enziminin sahip olduğu yüksek katalitik aktivite sebebiyle hücrelerde süperoksit radikali birikmez. Diğer yandan gerçekleşen farklı patolojik durumlarda süperoksit yapımı artar ve süperoksit için belli bazı reaksiyonlar ortaya çıkar. Metal iyonlarını indirgeyen süperoksit radikali, metallerin bağlı bulundukları proteinlerden salınımlarına ve metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikalinin oluşum reaksiyonlarının hızlanmasına neden olur. Aynı zamanda kofaktörlerin oksidasyon seviyelerinin bozulmasını sağlar. Süperoksit radikali diğerlerine göre oldukça zayıf bir reaktiftir. Ancak buna rağmen indirgenmiş serbest nükleotidleri, bazı amino asitleri ve glutatyon, askorbik asit, ürik asit, tokoferol gibi antioksidan bileşikleri oksitleme etkisi vardır. Süperoksit radikali, hidrofobik özellikteki hücre zarı ortamında daha fazla çözünürlüğe sahiptir ve çok daha uzun ömürlüdür. Hücre zarındaki yüzeyler, yapılarında bulunan fosfolipidlerin etkisi ile asidik özelliktedir. Bu sebeple süperoksit radikali bu ortamlarda daha kolay proton alır ve hidroperoksit radikalini ($HOO^{\cdot}$) oluşturur. ($HOO^{\cdot}$) radikali çok reaktiftir ve hücre zarlarında lipid perokidasyonunu (LPO) başlatabilir. Aynı zamanda tokoferol vb. gibi antioksidanları oksitleyebilir (Andersen ve diğ., 1997).

$$2\ O_2{\bullet}^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

GPx; hidroperoksitlerin düşük konsantrasyonlarının giderilmesinden sorumlu dört selenyum kofaktörü içeren selüler bir enzimdir. Eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili olan antioksidan enzimdir (Dündar ve Aslan, 1999; Lobo ve diğ., 2010).

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$$

$$LOOH + 2GSH \xrightarrow{GPx} LOH + GSSG + H_2O$$

GR; GPx ile hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonu (GSSG) indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüştüren enzimdir. Koenzimi pentoz fosfat yolunda oluşan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) olup prostetik grubu flavin adenin dinükleotit (FAD)' tir (Shan ve diğ., 1990; Aydemir ve Sarı, 2009).

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

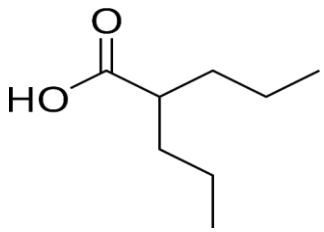
GST; indirgenmiş glutatyonun endojen ve eksojen kaynaklı çeşitli bileşiklerle konjugasyonunu katalizler (Valko ve diğ., 2006; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009).

$$RX + GSH \xrightarrow{GR} GSR + HX$$

$$LOOH + 2GSH \xrightarrow{GST} GSSG + LOH + H_2O$$

2.4. VALPROİK ASİT

Valproik asit (VPA), ilk kez 1882 yılında Burton tarafından sentezlenmiş, ancak 1963 yılına dek antiepileptik özelliğinden söz edilmemiştir (Grant ve Barot, 1976). VPA ilk zamanlar barbitürat hipnotikleri için bir çözücü olarak kullanılmıştır. Daha sonra bir raslantı sonucu test ilaçlarından daha etkili bir antiepileptik etkiye sahip olduğu keşfedilmiştir. Kimyasal yapı olarak VPA, 2-propil pentanoik ya da dipropil asetik asit olarak da anılan, basit dallı zincirli karboksilik bir asit olarak bilinmektedir (Şekil 2.8). Organik çözücülerle iyi çözünebilen suda ise oldukça az çözünen renksiz bir sıvıdır (Kusunoki ve diğ., 1988). Valproik asit, epilepsi türlerinin (fokal, sekonder, jeneralize, tonik klonik, absans, myokloni gibi) çoğunu etkileyen, özellikle yetişkin ve çocuk gruplarında oldukça yaygın kullanılan antiepileptik bir ilaçtır (Toprak, 2010).



Şekil 2.8: Valproik Asidin Kimyasal Formülü.

VPA çeşitli ilaçlarla etkileşebilir. Trisiklik antidepresanları potansiyelize edebilir. Aspirin valproatın plazma proteinlerine bağlanmasını azaltarak serbest fraksiyonun konsantrasyonunu arttırır ve ilacın metabolizmasını inhibe eder. VPA; Fenitoin (PHT) ile karmaşık şekilde etkileşir, başlangıçta serbest PHT serum konsantrasyonunu arttırabilir, sonra birkaç hafta içinde düşme olur ve 1-4 ay içinde PHT düzeyi normale döner. Fenobarbital (PB) verilmekte olan hastaya valproat da verilmeye başlanırsa, bu ilaç PB serum düzeyini arttırır, belirgin sedasyon ve daha ciddi santral sinir sistemi (SSS) depresyonu belirtilerine neden olabilir (Doğdu, 2013).

VPA uzun soluklu bir kullanımı bazı durumlarda hepatotoksite, teratojenite ve pankreatit gibi ciddi yan etkilere neden olabilmektedir. İlacın yan etkileri ve oluşabilecek toksisitenin takibi önem arz etmektedir (Levin ve diğ., 1997; Herzog ve Schacter., 2001).

VPA, serum proteinlerine bağlanabilme özelliğindedir. Plazma proteinlerine % 90-95 oranında bağlanır. Özellikle de albümine bağlanabilir. Terapötik etki ve toksisite için proteine bağlı olmayan VPA etkili olmaktadır. Albümin kısıtlığında, yani hipoalbüminemisi olan kişilerde proteine bağlı olmayan VPA düzeyi artacağından toksisite riski de artar (Haroldson ve diğ., 2000; Rugino ve diğ., 2003).

VPA çok çeşitli aktivitelere sahiptir ve günümüzde epilepsi tedavisinde çok yaygın olarak kullanılır. İlaç, çeşitli psikiyatrik hastalıkların tedavisinde de sıklıkla kullanılmaktadır (Löscher, 1999; Johannessen, 2000; Perucca, 2002; Nalivaeva ve diğ., 2009). VPA histon deasetilaz enzimini inhibe eder (Lv ve diğ., 2011). Nitrojen atomu içermemesi ile klinik

kullanımdaki diğer tüm antiepileptik ilaçlardan (AEİ) yapısal olarak belirgin farklılık gösterir (Löscher, 1999; Perucca. 2002; Bialer, 2012). VPA, farklı uygulama yollarından sonra çabucak emilir ve biyoyararlanımı türlere bağlı olup, insanlarda neredeyse %100'dür. Plazma proteinlerine, çoğunlukla albümine bağlanır (≥%90). Bağlanma derecesi, artan ilaç konsantrasyonu ile azalır. VPA'nın yarı ömrü 9 ila 18 saat arasındadır. İlaç başta karaciğer olmak üzere çeşitli yollarla metabolize olur. Uygulanan VPA dozunun yalnızca küçük bir kısmı idrarda değişmeden atılır (Löscher, 1999; Perucca, 2002).

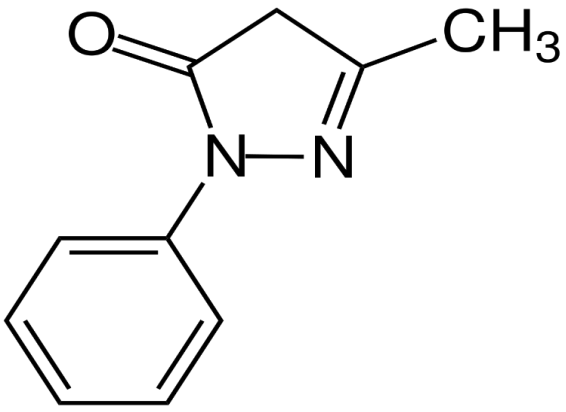
Uzun yıllardır kullanılmasına rağmen VPA'nın etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bilinen majör etki mekanizması, kullanılan diğer AEİ'ler gibi iyon kanalları üzerine olan etkisidir. Sodyum iyon kanalı modülatörüdür ve bu kanalların inaktivasyonlarını hızlandırır. Bu sayede aksiyon potansiyelinin uzamasını engelleyerek nöronal membran dengelenmesini sağlar. Buna bağlı olarak da nörotransmiter salınımı, fokal ateşleme ve nöbet yayılımı azalır. Bunlara ek olarak kalsiyum iyon kanallarının bloke edilmesini de sağlar. Bu kanallar üzerinden kalsiyum akışını azaltır ve bu eylemin sonucu olarak nörotransmiter salınımını düşürür. Çalışmalarda VPA'nın gama amino bütirik asit (GABA) metabolizmasını etkileyerek inhibitör etkileri güçlendirdiği ve böylece nöronal hipereksitabiliteyi azaltma yeteneğine sahip olduğu da bildirilmiştir. Diğer yandan yapılan çalışmalar ile VPA'nin GABA üzerine etkilerini gösteren kanıtlar elde edilmiştir. Bu kanıtlar, VPA etkisi ile beyin GABA düzeylerinde yükselme olduğunu ve GABA bozunmasının inhibe edilmesi ile GABA yanıtlarının güçlendirildiğini gösterir (Löscher, 1999; Johannessen, 2000; Perucca, 2002; Giri ve diğ., 2016). VPA'nın klinik kullanımı sonucunda çeşitli yan etkiler gelişebilmektedir. Bu etkiler arasında gastrointestinal etkiler, saç dökülmesi ve kilo artışı bildirilmiştir. Buna ek olarak, daha önemli olan, spina bifida, kalp anormallikleri, iskelet ve böbrek malformasyonları gibi ciddi doğum kusurlarının yanısıra bilişsel fonksiyonlarda azalma ve otizm ile ilişkili teratojenite bulguları gözlenmiştir. Ayrıca, VPA kullanımına bağlı olarak hepotoksisite, polikistik over ve sperm fonksiyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (Perucca, 2002; Vajda ve Eadie, 2014). VPA'nın yan etkileri arasında kilo artışı, hiperinsülinemi ve insülin direnci, hiperleptinemi ve leptin direnci başta olmak üzere birçok metabolik bozukluk sayılabilir. VPA tedavisi alan hastalarda görülen kilo artışı hipertansiyon ve ateroskleroz gibi kronik vasküler komplikasyonlarla ilişkili dislipidemi ve metabolik sendrom gelişimini

tetikleyebilir. Aynı zamanda oksidatif stres ile ürik asit ve homosistein seviyelerindeki yükselme, uzun süre VPA tedavisi alan hastalarda aterosklerotik risk oluşturabilir (Belcastro ve diğ., 2013).

2.5. EDARAVON

2.5.1. Edaravon'un kimyasal yapısı

Edaravon (3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on, MCI-186) hidrazin ve 3-oksopropiyonik asit esterlerinin kondansasyonu ile sentezlenmektedir (Şekil 2.9). Amin, keto ve enol olmak üzere üç tautomerik formu vardır. Edaravon'un pKa değeri 7,0'dır. Edaravon'un yaklaşık %50'si fizyolojik pH'ta anyonik bir formda bulunur; bu form beyindeki ROS ile kuvvetli reaksiyona girebilir (Yamamoto ve diğ., 1996). Edavaron'un düşük molekül ağırlığı vardır. Hem suda hem de yağda çözünebilme özelliğine sahiptir. (Qin ve diğ., 2016). Hem C vitamini hem de E vitamini özelliklerine sahip olan edavaron kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilir. Bu durum onu diğer serbest radikal kurtarıcılarından ayırmaktadır. Ayı zamanda bu durum edavaron'un nöroprotektif etkisi üzerinde de rol aynar (Masuda ve diğ., 2017).



Şekil 2.9: Edaravon'un Kimyasal Formülü.

2.5.2. Edaravon'un Biyolojik Aktivitesi

Edaravon yarı ömrü 5,4 dakika olan serbest radikal tutucudur. Antioksidatif, antiapoptotik, nöroprotektif ve anti-enflamatuvar etkileri bildirilmiştir (Kokura ve diğ., 2005; Masuda ve diğ., 2017). Edaravon, iskemik inme ve amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi dejeneratif nörolojik bozukluklar gibi birçok serebral vasküler bozukluktan kaynaklanan nöronal hasar / ölüm ile yüksek oranda ilişkili olan serbest hidroksil radikallerini ve peroksinitrit radikallerini temizler (Qin ve diğ., 2016). Nöroprotektif ve antioksidan etki gösterir. Serbest radikal oluşumu ve oksidatif strese karşı hücre zarı hasarı yoluyla lipid peroksidasyonunun kapsamını sınırlandırarak hastalığın ilerlemesini geciktirir (Inokuchi ve diğ., 2009). İskemik inme durumunda bölgesel kan akımı ve serebral ödemdeki azalmayı tersine çevirdiği belirtilmiştir (Hironaka ve diğ., 2011).

2.5.3. Edaravon'un etki mekanizması

Edavaron etkilerini, lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ve serbest radikalleri temizleyerek gösterir. Edaravon prostasiklin üretimini arttırır, hidroksil radikallerini yakalayarak araşidonik asidin lipoksijenaz metabolizmasını azaltır ve alloksanın neden olduğu lipid peroksidasyonunu inhibe ederek aktif oksijen türlerini bastırır (Masuda ve ve diğ., 2017). Nöronlar, endotel hücreleri ve miyokard hücreleri de dahil olmak üzere çok çeşitli hücreleri hedefler. Edaravon'un direkt olarak hidroksil radikalini kurtarıp, lipoksijenaz aktivitesini inhibe etmesi nedeniyle kardiyak iskemi reperfüzyon hasarını önlemede önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür. Birçok çalışmada, edaravon'un beyin ve karaciğer hasarı durumunda iskemi başladığı zaman verildiğinde bile koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Amemiya ve diğ., 2005). Aynı zamanda edaravon'un antioksidatif etkisinin olduğu ve apoptozisi azalttığı görülmüştür (Inokuchi ve diğ., 2009). Edaravon iskemi reperfüzyon beyin hasarında Bax/Bcl 2 bağımlı antiapoptotik mekanizmayla nöroprotektif etki gösterir (Amemiya ve diğ., 2005). Deneysel retina dekolmanında Bcl 2 ekspresyonunu arttırır ve fotoreseptör hücre ölümünü düzenler (Roh ve diğ., 2011). Edaravon'un antiapoptotik etkisinin yanısıra antienflamatuar etkisi de bulunmaktadır (Yuan ve diğ., 2014). Yapılan deneysel hayvan çalışmaları ile edaravon'un Retinitis pigmentosa modellerinde oksidatif stresi azalttığı görülmüştür. Ayrıca

dış nükleer tabakadaki incelmeyi ve apoptoza uğrayan hücre sayısını azalttığı da yapılan çalışmalar ile görülmüştür (Tsuruma ve diğ., 2012).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN CİHAZLAR

Buzdolabı: Arçelik

Derin Dondurucu: Beko -20 °C, New-Brunswick Scientific -76 °C

Distile Su Cihazı: Brand MonoDest 3000

Etüv: Memmert UNB 500

pH Metre: Hanna pH/ORPvMeter HI 2211

Santrifüj Cihazı: Denley BS400

Soğutmalı Santrifüj Cihazı: Sigma Laboratory Centrifuges 3K30

Sonikatör: Bandelin Sonorex

Spektrofotometre: Shimadzu UV-Visible Mini UV-1240, Shimadzu UV-1700 UV-Visible Spectrophotometer

Su Banyosu: Memmert WB 14

Terazi: Radwag XA 60/220/X Hassas Terazi, Radwag XA AS 220/C/2 Hassas Terazi

UV Lambası: DESAGA MinUVIS Abnehmbar removable UV 254/366 nm

Vorteks: Fisons Whirlimixer

3.2. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASALLAR

Glutatyon (GSH) için miktar tayini deneyinde çöktürme çözeltisi için metafosforik asit (HPO_3, Carlo Erba 407465), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA, Merck 8421) ve sodyum klorür (NaCl, Merck 106404) kullanılmıştır. Deneyin uygulanmasında ise 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB, Sigma D8130), disodyum fosfat (Na_2HPO_4, Fluka 71642) ve glutatyon (GSH, Fluka 49750) kullanılmıştır.

Lipid peroksidasyonu (LPO) tayininde trikloroasetik asit (TCA; $C_2HCl_3O_2$, Merck 100807), hidroklorik asit (HCl, Merck 100314), sodyum hidroksit (NaOH, Fluka 71691), tiyobarbitürik asit (TBA; $C_4H_4N_2O_2S$, Fluka 88481), n-bütanol ($C_4H_{10}O$, Merck 100988) ve 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP, Aldrich T9889) kullanılmıştır.

Asit fosfataz (ACP) enzim aktivitesi tayini deneyinde sitrik asit ($C_6H_8O_7$, Sigma C7254), sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7$, Merck 6447), 4-nitrofenilfosfat ($C_6H_6NO_6P$, Fluka 71770) ve sodyum hidroksit (NaOH, Fluka 71691) kullanılmıştır.

Alkalen fosfataz (ALP) enzim aktivitesi tayininde hidroklorik asit (HCl, Merck 100314), dietanolamin ($C_4H_{11}NO_2$, Sigma-Aldrich 31590), 4-nitrofenilfosfat ($C_6H_6NO_6P$, Fluka 71770) ve sodyum hidroksit (NaOH, Fluka 71691) kullanılmıştır.

Laktat dehidrojenaz (LDH) enzim aktivitesi tayininde indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit (NADH, Fluka 43420), sodyum pirüvat ($C_3H_3O_3Na$, Merck 6619) tampon olarak ise tris (Hidroksimetil) aminometan (Tris; $C_{14}H_{11}NO_3$, Merck 108382), hidroklorik asit (HCl, Merck 100314) ile etilendiamin tetraasetik asit (EDTA, Merck 8421) kullanılmıştır.

Katalaz (CAT) enzim aktivitesi tayininde hidrojen peroksit (H_2O_2, Merck 108600) ve tampon için disodyum fosfat (Na_2HPO_4, Fluka 71642) ve monopotasyum fosfat (KH_2PO_4, Riedel de Häen 04243) kullanılmıştır.

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesini tayin etmek için disodyum fosfat (Na_2HPO_4, Fluka 71642) ve monopotasyum fosfat (KH_2PO_4, Riedel de Häen 04243) ve etilendiamin tetraasetik asit (EDTA, Merck 8421) tampon hazırlamada kullanılmış olup deneyin uygulanmasında ise riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$, Sigma 47861) ve o-dianisidin hidroklorür ($C_{14}H_{16}N_2O_2 \cdot 2HCl$, Fluka 33430) kullanılmıştır.

Glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi tayininde glutatyon (GSH; $C_{10}H_{17}N_3O_6S$, Fluka 49750), indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH, Sigma N1630), glutatyon redüktaz (GR, Sigma G3664), hidrojen peroksit (H_2O_2, Merck 108600), fosfat tamponunda ise disodyum fosfat (Na_2HPO_4, Fluka 71642), monopotasyum fosfat (KH_2PO_4,

Riedel de Häen 04243), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA, Merck 8421) ve sodyum azit (NaN_3, Fluka 71289) kullanılmıştır.

Glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi tayininde indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH, Sigma N1630), yükseltgenmiş glutatyon (GSSG, Sigma G4376), tampon olarak ise tris (Hidroksimetil) aminometan (Tris; $C_{14}H_{11}NO_3$, Merck 108382), hidroklorik asit (HCl, Merck 100314) ile etilendiamin tetraasetik asit (EDTA, Merck 8421) kullanılmıştır.

Glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesi tayininde glutatyon (GSH, Fluka 49750), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB; $C_6H_3ClN_2O_4$, Fluka 24440), etanol (C_2H_5OH, Riedel de Häen 32221) ve tampon çözeltisi için ise disodyum fosfat (Na_2HPO_4, Fluka 71642) ve monopotasyum fosfat (KH_2PO_4, Riedel de Häen 04243) kullanılmıştır.

Gama glutamil transferaz (GGT) enzim aktivitesi tayininde magnezyum klorür ($MgCl_2$, Fluka 63065), tris (Hidroksimetil) aminometan (Tris; $C_{14}H_{11}NO_3$, Merck 108382), hidroklorik asit (HCl, Merck 100314), glisilglisin (Merck 104233), L-glutamik asid p-nitroanilid (Fluka 19523) ve trikloroasetik asit (TCA; $C_2HCl_3O_2$, Merck 100807) kullanılmıştır.

Sodyum-Potasyum ATPaz (Na^+/K^+-ATPaz) aktivitesi tayininde kullanılan malzemeler; sodyum klorür (NaCl, Merck 106404), potasyum klorür (KCl, Riedel de Häen 12636), magnezyum klorür ($MgCl_2$, Fluka 63065), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA, Merck 8421), ouabain ($C_{29}H_{44}O_{12}$, Sigma 03125), adenozin 5'-trifosfat (ATP, Sigma A26209), trikloroasetik asit (TCA; $C_2HCl_3O_2$, Merck 100807), sülfürik asit (H_2SO4, Merck 100748), amonyum molibdat ($(NH_4)_2MoO_4$, Merck 1181), sodyum disülfit ($Na_2S_2O_5$, Merck 6357), sodyum sülfit (Na_2SO_3, Merck 6652), 1-amino-2-naftol-4-sülfonik asit (ANSA; $C_{10}H_9NO_4S$, Fluka 08751), monopotasyum fosfat (KH_2PO_4, Riedel de Häen 04243) ve tris (Hidroksimetil) aminometan (Tris; $C_{14}H_{11}NO_3$, Merck 108382) dır.

Protein karbonil (PC) miktar tayini hidroklorik asit (HCl, Merck 100314), trikloroasetik asit (TCA; $C_2HCl_3O_2$, Merck 100807), guanidin hidroklorür (CH_6ClN_3, Fluka 50950), 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH; $C_6H_6N_4O_4$, Merck 3081), etanol (C_2H_5OH, Riedel de Häen 32221) ve etil asetat ($C_4H_8O_2$, Merck 822277) kullanılarak yapılmıştır.

Total protein miktar tayininde ise sodyum hidroksit (NaOH, Fluka 71691), sodyum karbonat (Na_2CO_3, Analar 10240), bakır sülfat ($CuSO_4$, Panreac), dipotasyum tartarat ($C_4H_4K_2O_6$, Merck 5160), sodyum tungstat (Na_2WO_4, Merck 6672), sodyum molibat (Na_2MoO_4), hidroklorik asit (HCl, Merck 100314), brom (Br_2), sodyum klorür (NaCl, Merck 106404), fosforik asit (H_3PO_4, Merck 100563) ve lityum sülfat ($LiSO_4$, Riedel de Häen 13029) kullanılmıştır.

3.3. DENEY HAYVANLARI

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 25.03.2010 tarihli ve 54 sayılı izni ile bu çalışma yapılmıştır. Çalışmada, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı Laboratuvarından temin edilen, 38 adet 2.5-3 aylık Sprague Dawley türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Normal pellet yem ve musluk ile beslenen sıçanlar çalışmada 4 gruba ayrılmıştır.

1.Grup: Kontrol Sıçanlar (n=8)

2.Grup: Kontrol+ Edaravon Verilen Sıçanlar (n=10)

3.Grup: Valproik Asit Verilen Sıçanlar (n=10)

4.Grup: Valproik Asit ve Edaravon Verilen Sıçanlar (n=10)

3.4. DENEY HAYVANLARINDA TESTİS HASARININ OLUŞTURULMASI

Çalışmamızda testis hasarı oluşturmak için valproik asit kullanıldı. Sentetik bir antioksidan madde olan edaravon ise koruyucu madde olarak verildi. 1. Grup (kontrol grubu) sıçanlara günde bir kez serum fizyolojik 7 gün süre boyunca intraperitoneal olarak verildi. 2. Grup sıçanlara günde 30 mg/kg edaravon 7 gün süre ile intraperitoneal olarak verildi. 3.Grup sıçanlara günde 0.5 g/kg valporik asidin 7 gün süre ile verilmesi ile testis hasarı oluşturuldu. 4.Grup sıçanlara 7 gün süre ile 0.5 g/kg valporik asit verildi. Bu grup sıçanlara valproik asidin verilmesinden 2 saat sonra 30 mg/kg edaravon 7 gün süre ile intraperitoneal olarak verildi (Cakmak ve Yanardag, 2015)

3.5. TESTİS ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Son edaravon ve valproik asit uygulamasından 16 saat sonra aç bırakılan sıçanların testisleri eter anestezisi altında alındı. Alınan testis dokuları iki kez % 0.9'luk NaCl ile yıkandıktan sonra %0.9'luk NaCl içinde -78˚C'de saklandı.

Testis Dokusunda Yapılan Deneyler: Glutatyon, lipid peroksidasyonu, protein karbonil düzeyleri ve antioksidan savunma sistemi enzimleri ve total protein miktar tayinleri yapılmıştır.

3.6. TESTİS DOKUSU HOMOJENİZATLARININ HAZIRLANMASI

Testis homojenizatları hazırlanırken testislerin üzerinde zar soyulup makasla ufak parçalara ayrıldı ve tartıldı. Tartılan dokular %0.9'luk NaCl ile homojenize edilip %10'luk (w/v) testis dokusu homojenizatları hazırlandı. Hazırlanan bu homojenizatlar 10.000 rpm'de +4˚C'de 10 dakika boyunca santrifüje edildi. Santrifüjden sonra testis dokularının süpernantları ependorflara konularak numaralandırıldı ve deney günü kullanılmak için -78°C'lik derin dondurucuya konuldu.

3.7. TESTİS DOKUSUNDA GLUTATYON (GSH) MİKTAR TAYİNİ

Testis dokusunda GSH miktar tayini için Ellman metodu kullanıldı. Bu metodda Ellman ayıracı ile -SH gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan sarı renkli ürünün spektrofotometrede 412 nm de absorbans değeri ölçüldü (Beutler, 1975).

Kullanılan Çözeltiler

Çöktürme Reaktifi

Metafosforik asidden 1.67 gram, EDTA dan 0.2 gram ve sodyum klorürden 30 gram tartılıp distile suda çözüldü. Toplam hacim distile su ile 100mL'ye tamamlandı.

Sodyum Sitrat Çözeltisi (%1)

1 g sitrik asit distile suda çözülerek hacmı 100mL'ye tamamlandı. Bu çözelti DTNB'nin hazırlanmasında kullanılır.

Belirtme Reaktifi (%40 DTNB, Ellman Ayıracı)

10 mg DTNB tartıldı. Hacmı 25 mL'ye sodyum sitrat çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti koyu renkli şişede saklanmalıdır.

Sekonder Sodyum-Fosfat Çözeltisi (0.3M)

10.649 gram Na_2HPO_4 tartılıp distile su ile çözülür ve 250mL'ye tamamlanır.

GSH Standart Çözeltisi (%100mg)

10 mg GSH 10 mL distile suda çözülerek hazırlanır. Taze hazırlanmalıdır.

GSH Çalışma Standartları (%2, %4, %6, %8, %10)

%100 mg'lık standart çözelti kullanılarak distile su seyreltme yapılır.

Deneyin Yapılışı

Alınan 0.5 mL'lik testis homojenizatlarının üzerine 0.75 mL çöktürme reaktifi eklenip 5 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüje edilir. Ardından üst faz alınır ve aşağıdaki tablodaki gibi çalışılır.

Çözeltiler	Kör	Standart	Numune
Süpernatant	-	-	0.5mL
Distile Su	0.5mL	-	-
Çalışma Standardı	-	0.5mL	-
Sekonder Na-Fosfat Çözeltisi	2mL	2mL	2mL

Belirtme Reaktifi	0.25mL	0.25mL	0.25mL
Karıştırılıp 5 dakika sonra spektrofotometrede absorbans değerleri köre karşı 412nm dalga boyunda okunur.			

Glutatyon miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

Glutatyon Miktarı (nmol GSH/mg protein) = (N_{abs}/St_{abs}) x [(2.5 x A) / 307.3] x 10^6 / P

307.3 = Glutatyon'un molekül ağırlığı

A = % mg standart konsantrasyonu

P = % mg doku proteini

3.8. TESTİS DOKUSUNDA LİPİD PEROKSİDASYONU (LPO) TAYİNİ

Testis dokusunda lipid peroksidasyonu tayininde Ledwozyw metodu kullanıldı. Bu yöntemde tiyobarbitürik asit (TBA) ve LPO ürünleri arasındaki reaksiyon sonucu meydana gelen pembe-kırmızı rengin absorbansı spektrofometrede 532 nm'de ölçüldü (Ledwozym ve diğ., 1986).

Kullanılan Çözeltiler

1.22 M TCA Çözeltisi (0.6N HCl içinde)

0.6 N HCl için %37'lik HCl den 12.43 mL alınır ve distile su ilave edilir. Ardından hacmi 250 mL'ye distile su ile tamamlanır. 1.22M TCA için ise 49.83 g TCA tartılıp 0.6 N HCl ile çözülüp 250 mL'ye tamamlanarak hazırlanır.

NaOH Çözeltisi (1N)

4g NaOH tartılır. Biraz distile su ile çözülüp ardından hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

TBA Çözeltisi

500 mg TBA tartılıp 69 mL distile su ve 6 mL NaOH ile çözülerek hazırlanır.

Standart Çözelti (4.4nM/mL TEP)

İlk olarak stok standart hazırlandı. 0.1mL 1,1,3,3-tetraetoksipropan distile suda çözüldü, hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Çalışma standardı olarak LPO stok standardından 0.1 mLalındı. Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

N-Bütanol

Deneyin Yapılışı

Testis homojenizatları, standart örnekler ve kör aşağıdaki tabloya göre çalışılmıştır.

Çözeltiler	**Kör**	**Standart**	**Numune**
Homojenizat	-	-	0.5mL
TCA Çözeltisi	2.5mL	2.5mL	2.5mL
Tüpler iyice karıştırılıp 15 dakika bekletilir.			
Standart Çözelti	-	0.5mL	-
Distile Su	0.5mL	-	-
TBA Çözeltisi	0.75mL	0.75mL	0.75mL
Tüpler iyice karıştırılıp ağızları kapatılarak 30 dakika kaynar su banyosunda bekletilir.			
N-Bütanol	2mL	2mL	2mL
İyice karıştırılıp 10 dakika 4000rpm'de santrifüje edilip bütanol fazı 532nm'de okunur.			

LPO miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

LPO Miktarı (nmol MDA/mg protein) = (N_{abs}/St_{abs}) x (4.4/P) x 100

4.4 = Standart çözelti (nmol/mL TEP)

P = % mg cinsinden doku protein miktarı

3.9. TESTİS DOKUSUNDA ASİT FOSFATAZ (ACP) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ

Bu deneyde Walter ve Schutt metodu uygulanmıştır. Asit fosfataz (ACP) enzimi substrat olarak kullanılan 4-nitrofenilfosfat'ı ortamın pH'sına bağlı olarak p-nitrofenil'e hidroliz etmektedir. Meydana gelen ürünün 405 nm'de verdiği absorbans değeri spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Walter ve Schutt, 1974).

Kullanılan Çözeltiler

Sitrat Tamponu (50mM, pH 4.8)

0.38 g sitrik asit, 0.88 g sodyum sitrat ve 0.203 g 4-nitrofenilfosfat ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra hepsi karıştırılarak hacim 90 mL'ye tamamlanır. pH 4.8'e ayarlandıktan sonra hacim 100 mL'ye tamamlanır.

NaOH Çözeltisi (0.1N)

0.4g NaOH biraz distile suda çözülüp toplam hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Hazırlanan %10'luk doku homojenizatları 4000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilir ve süpernatant alınır. Serum fizyolojik ile 1/50 oranında seyreltildi.

Çözeltiler	Kör	Numune
Sitrat Tamponu	1 mL	1 mL
Süpernatant	-	0.2 mL
Distile Su	0.2 mL	-
37˚C'de 30 dakika inkübasyon		
NaOH Çözeltisi	2 mL	2 mL
405 nm'de okunur		

ACP Aktivitesi (U/L)= (Abs x 28.8) x V yardımı ile hesaplanır.

V = Seyreltme miktarı

3.10. TESTİS DOKUSUNDA ALKALEN FOSFATAZ (ALP) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ

Bu deneyde Walter ve Schutt metodu uygulanmıştır. Alkalen fosfataz enzimi substrat olarak 4-nitrofenilfosfat'ı kullanıp ortamın pH'sına bağlı olarak p-nitrofenol'e hidroliz etmektedir. Meydana gelen ürünün 405 nm'de verdiği absorbans değeri spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Walter ve Schutt, 1974).

Kullanılan Çözeltiler

HCl Çözeltisi (0.1 N)

Çözeltiyi hazırlarken 0.828 mL d=1.19 g/mL, HCl (%37'lik) çözeltisinden alınarak üzerine biraz distile su üzerine ilave edilir. Ardından distile su ile hacmi 100 L'ye tamamlanır.

Tampon Çözelti (pH 9.8)

1.052 g dietanolamin, 8 mL 0.1N HCl, 46.4 mg 4-nitrofenilfosfat 85 mL distile suda çözülür. pH 9.8'e 0.1N HCl ile ayarlanır ve 100 mL'ye tamamlanır.

NaOH Çözeltisi (0.05 N)

0.2 g NaOH biraz distile su ile çözülür ve hacim 100 mL'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Çözeltiler	**Kör**	**Numune**
Tampon Çözeltisi	2 mL	2 mL
Distile Su	0.05 mL	-
Homojenizat	-	0.05 mL
Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilir		
NaOH Çözeltisi	10 mL	10 mL
405 nm'de okunur		

%10'luk testis dokusu homojenizatları tablodaki gibi kör ve numune olarak çalışılır.

ALP aktivitesi (U/L)= Abs x 434 x V formülü kullanılmıştır.

V = Seyreltme miktarı

3.11. TESTİS DOKUSUNDA LAKTAT DEHİDROJENAZ (LDH) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ

Bu denemede Bais ve Philcox yöntemi kullanılmıştır. LDH, EDTA içeren Tris-HCl pH 7.4 tamponunda NADH varlığında pirüvatın laktata dönüşünü 37˚C'de katalizler (Bais ve Philcox,1994).

Kullanılan Çözeltiler

Tris-HCl Tamponu (56mM, pH 7.4)

0.678 g Tris tartılıp biraz distile suda çözülüp 100 mL'ye tamamlanır. Ardından 56 mM'lık HCl ile pH 7.4'e ayarlanır. 56 mM EDTA için 0.2084 g EDTA tartılıp 100mL tamponda çözülür.

NADH Çözeltisi (170µM)

12.4 mg NADH tartılıp 100mL Tris-HCl tamponunda çözülür.

Pirüvat Çözeltisi (14mM)

37.25mg pirüvat tartılıp distile su ile çözülüp 25mL'ye tamamlanır. Bu çözelti 37˚C'de bekletilip kullanılır.

Deneyin Yapılışı

Aşağıdaki tabloya göre testis homojenizatları ve kör çalışılmıştır.

Çözeltiler	**Kör**	**Numune**
Tris-EDTA-NADH Çözeltisi	2 mL	2 mL
Homojenizat	-	50 µL
Karıştırılıp 37˚C'de 5 dakika inkübe edilir		

Pirüvat Çözeltisi	250 µL	200 µL
Karıştırılıp 1 dakika daha inkübe edildikten sonra 339nm'de 3 dakika absorbans değeri okunur.		

LDH Aktivitesi (U/L) = $((\Delta OD/min) / 6{,}3x10^{-3}) \times (V_T / V_N) \times f$

V_T= toplam hacim

V_N= örnek hacmi

f= seyreltme miktarı

3.12. TESTİS DOKUSUNDA KATALAZ (CAT) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ

Testis dokusunda CAT aktivitesi, Aebi yöntemine göre tayin edildi. Yöntem, H_2O_2'nin katalaz enzimi vasıtasıyla H_2O'ya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans değerinin azalmasının 240nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Aebi, 1984).

Kullanılan Çözeltiler

Fosfat Tamponu (50 mM, pH 7.0)

KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 100 mL ve 50 mM olacak şekilde tartılıp distile su ile hazırlanır. Ardından fosfat tamponunun pH'ı 7.0'a ayarlanır.

H_2O_2 Çözeltisi (30 mM)

%35'lik H_2O_2'den 258 µL alınıp 50 mM fosfat tamponu ile hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Testis homojenizatları aşağıdaki tabloya göre çalışılır.

Çözeltiler	Kör	Numune
Homojenizat	-	0.5 mL
Serum Fizyolojik	0.5 mL	-
H_2O_2 Çözeltisi	2 mL	2 mL
1 dakika sonra 240 nm'de absorbans değeri okunur		

CAT Aktivitesi (U/mL) = ((ΔOD) / 0.0436) x (V_T / V_N) x f

V_T= toplam hacim

V_N= örnek hacmi

f= seyreltme miktarı

3.13. TESTİS DOKUSUNDA SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ

Testis dokusunda SOD enziminin aktivitesinin belirlenmesinde Mylorie ve ark. tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır (Mylorie ve diğ.,1986).

Kullanılan Çözeltiler

Fosfat Tamponu (50 mM, pH 7.8)

1.7011 g KH_2PO_4 tartıldı. Biraz distile su ile çözüldü ve ardından hacmi 250 mL'ye distile su ile tamamlanır. 1.4196 g Na_2HPO_4 tartılıp biraz distile su ile çözülüp 200 mL'ye tamamlanır

ve bu çözeltiler kullanılarak 250 mL olacak şekilde pH 7.8'e ayarlanır. Ardından 0.1 mM EDTA için 9.3 mg EDTA tartılır ve 250 mL'lik tamponla çözülüp tampon hazırlanmış olur.

Fosfat Tamponu (10 mM, pH 7.5)

Hazırlanan 50 mM'lık çözeltiler 10 mM'a seyreltilip pH 7.5'e ayarlanır.

o-dianisidin-HCl (6 mM)

19 mg o-dianisidin-HCl tartılıp distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.

Riboflavin Çözeltisi (0.2 mM)

25 ml 10 mM'lık pH 7.5 tamponu kullanılarak hazırlanan riboflavin çözeltisi için 1.825 mg riboflavin tartılıp çözülür.

SOD Stok Standardı (120 IU/mL)

120 IU olarak hazırlanan stok standardı 2,4,6,8 ve 10 IU olacak şekilde seyreltilip çalışılır.

Deneyin Yapılışı

Testis homojenizatları aşağıdaki tabloya göre çalışılmıştır.

Çözeltiler	**Kör**	**Standart**	**Numune**
Tampon	2.7 mL	2.6 mL	2.6 mL
o-dianisin-HCl	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Standart Çözelti	-	0.1 mL	-
Homojenizat	-	-	0.1 mL
Riboflavin Çözeltisi	0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL
460 nm'de okunur. Ardaından 8 dakika UV ışık altında bekletildikten sonra tekrar okunur.			

Testis dokusu homojenizatının SOD aktivitesi standart grafik yardımıyla (U/mg protein, dakika) cinsinden hesaplanarak tayin edildi.

3.14. TESTİS DOKUSUNDA GLUTATYON PEROKSİDAZ (GPX) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ

Testis dokusundaki glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi, Wendel yöntemine göre tayin edildi. Glutatyon peroksidaz, H_2O_2 varlığında GSH'ın okside glutatyona dönüşümünü katalizler. GPx reaksiyonu ile oluşan okside glutatyon, NADPH'ın indirgeyici substrat olarak kullanıldığı glutatyon redüktaz reaksiyonu ile tekrar indirgenmiş glutatyona dönüşür. Bu reaksiyonlar sırasında koenzimin yükseltgenmesi ile oluşan absorbans değerindeki azalma 366nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülerek GPx aktivitesi hesaplanır (Wendel, 1981).

Kullanılan Çözeltiler

Fosfat Tamponu (0.25 M, pH 7.0)

KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 100 mL ve 0.25 M olacak şekilde tartılıp distile su ile hazırlanır. Ardından bu çözeltiler kullanılarak pH 7.0'a ayarlanır. Daha sonra 2.5 mM EDTA hazırlamak için 9.30 mg EDTA ve 2.5 mM Sodyum-azit hazırlamak için ise 16.2mg sodyum-azit tartılıp bu tamponda çözülür ve tampon hazırlanmış olur.

GSH Çözeltisi (10 mM)

76.7mg GSH tartılır ve distile su ile 25 mL'ye tamamlanarak hazırlanır. Bu çözeltinin taze hazırlanması gerekir.

NADPH Çözeltisi (2.5 mM)

20.8 mg NADPH tartılır ve fosfat tamponu ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlanır. Bu çözelti deneyden önce taze olarak hazırlanmalıdır.

Glutatyon Redüktaz Çözeltisi (6 U/mL)

13.3µL glutatyon redüktaz 1mL fosfat tamponuyla çözülüp hazırlanır. Taze hazırlanmalıdır.

H_2O_2 Çözeltisi (12 mM)

%35'lik H_2O_2'den 10 µL alınıp 10 mL distile suya katılır.

Deneyin Yapılışı

Testis örnekleri ve kör aşağıdaki tabloya göre hazırlandı.

Çözeltiler	**Kör**	**Numune**
Fosfat Tamponu	0.6 mL	0.4 mL
Homojenizat	-	0.2 mL
GSH Çözeltisi	0.1 mL	0.1 mL
NADPH Çözeltisi	0.1 mL	0.1 mL
Glutatyon Redüktaz	0.1mL	0.1mL
H_2O_2	0.1mL	0.1 mL
366nm'de 5 dakika boyunca absorbans değeri okunur.		

GPx Aktivitesi (U/L) = (ΔOD/min) x 0,803x10^3 x f

f= seyreltme miktarı

3.15. TESTİS DOKUSUNDA GLUTATYON REDÜKTAZ (GR) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ

Deneyde Beutler metodu kullanılmıştır. Okside glutatyonun glutatyon redüktaz ile indirgenmesi sonucunda yükseltgenen NADPH miktarının hesaplanması ile ölçülür (Beutler, 1971).

Kullanılan Çözeltiler

Tris-HCl Tamponu (50mM, pH 8.0)

0.6g Tris tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanır. 0.41 mL %37'lik HCl son hacim 100mL olacak şekilde distile suya eklenir. Ardından bu iki çözelti pH 8.0 olacak şekilde ayarlanır. 1mM EDTA için 37.2 mg EDTA tartılıp 100 mL tamponda çözülerek tampon hazırlanmış olur.

NADPH Çözeltisi (2mM)

8.3 mg NADPH tartılıp 5 mL Tris-HCl tamponunda çözüldü. Taze hazırlanır.

GSSG Çözeltisi (20mM)

61.5 mg GSSG tartılıp 5mL Tris-HCl tamponunda çözülür. Taze hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

Testis homojenizatı ve kör aşağıdaki tabloya göre çalışılmıştır.

Çözeltiler	**Kör**	**Numune**
Tris-HCl Tamponu	900 µL	870 µL
NADPH Çözeltisi	50 µL	50 µL
GSSG Çözeltisi	50 µL	50 µL
Homojenizat	-	30 µL
340 nm'de 5 dakika boyunca absorbans değeri okunur.		

GR Aktivitesi (U/g protein) = (ΔOD / (dakika x 6.22)) x (V_T / V_N) x f / g protein

V_T= toplam hacim

V_N= örnek hacmi

f= seyreltme miktarı

3.16. TESTİS DOKUSUNDA GLUTATYON-S-TRANSFERAZ (GST) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ

Testis dokusunda GST enzim aktivitesi tayininde Habig ve Jakoby metodu kullanıldı. Bu metod GSH ve CDNB'nin konjugasyonu sonucunda oluşan ürünün spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (Habig ve Jakoby, 1981).

Kullanılan Çözeltiler

Fosfat Tamponu (0.2M, pH 6.6)

KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 100 mL ve 0.2 M olacak şekilde tartılıp distile su ile ayrı ayrı hazırlanır. Ardından bu çözeltiler belirli oranda karıştırılarak pH 6.6'ya ayarlanır.

GSH Çözeltisi (60mM)

1.84 mg GSH tartılıp 1mL distile su ile çözüldü. her deneyden önce taze hazırlanır.

CDNB Çözeltisi (60mM)

12 mg 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) tartıldı. 1 mL absolü etanol ile çözüldü. Çözelti deneyden önce taze olarak hazırlandı.

Deneyin yapılışı

Testis örnekleri ve kör aşağıdaki tabloya göre çalışılmıştır.

Çözeltiler	Kör	Numune
Fosfat Tamponu	2 mL	1.5 mL
Homojenizat	-	0.5 mL
GSH Çözeltisi	50 µL	50 µL

CDNB Çözeltisi	50 µL	50 µL
Distile Su	0.9mL	0.9mL
340nm'de 3 dakika boyunca spektrofotometrede absorbans değeri okunur.		

GST aktivitesi (U/mg protein) = (ΔOD/dakika) x 0.625 x f / mg protein

ΔOD: Absorbans farkı

f: Seyreltme miktarı

3.17. TESTİS DOKUSUNDA GAMA GLUTAMİL TRANSFERAZ (GGT) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ

Testis dokusunda gama glutamil transferaz (GGT) aktivitesi tayini Szasz metoduna göre tayin edildi. Bu yöntem reaksiyon sonucu oluşan p-nitroanilin miktarının 405 nm'de spektrofotometrede absorbans değerinin belirlenmesi esasına dayanır (Szasz, 1969).

Kullanılan Çözeltiler

Tris-HCl Tamponu (185 mM, pH 8.25)

1.1205g Tris tartılıp 50 mL distile su ile çözülür. Daha sonra 185 mM HCl ile pH 8.25'e ayarlanır ve 100 mL'ye tamamlanır.

Substrat Çözeltisi

4 mM γ-glutamil-p-nitroanilid, 40 mM glisilglisin ve 11mM $MgCl_2$ 50mL tampon ile çözülür.

TCA Çözeltisi (%25)

25g TCA tartılıp biraz distile su ile çözülür. Ardından distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Deneyin yapılışı aşağıdaki tablodaki gibidir.

Çözeltiler	Kör	Numune
Homojenizat	-	0.2 mL
Substrat Çözeltisi	0.8 mL	0.8 mL
Distile Su	0.2 mL	-
37˚C'de 10 dakika inkübasyon		
TCA Çözeltisi	1 mL	1 mL
5 dakika santrifüj. Üst fazın absorbansı 405 nm'de 3 dakika köre karşı ölçülür		

GGT (U/L) = ((ΔOD/dakika) / 0.0099) x (V_T / V_N) x f

V_T= Toplam hacim

V_N= Örnek hacmi

f= Seyreltme miktarı

3.18. TESTİS DOKUSUNDA SODYUM-POTASYUM ATPAZ (NA^+/K^+-ATPAZ) AKTİVİTESİ TAYİNİ

Bu deneyde Ridderstap ve Bonting yöntemi (1969) kullanılmıştır. Homojenizatın uygun miktarda ATP ile inkübasyonu sırasında ATP'nin hidrolizi ile açığa çıkan inorganik fosfat tayinine dayanmaktadır. Bunun için önce total ATPaz tayin edilir. Sonra ouabain varlığında Mg^{2+}-ATPaz tayin edilip aradaki fark Na^+/K^+-ATPaz aktivitesini verir. (Ridderstap ve Bonting, 1969).

Kullanılan Çözeltiler

Tris-HCl Tamponu (30mM, pH 7.4)

0.363g Tris biraz distile suda çözüldü. pH'ı 7.4'e 30mM HCl ile getirilip hacmi 100mL'ye tamamlanır.

A Çözeltisi

0.5844 g NaCl, 37.3 mg KCl, 0.122 g $MgCl_2$, 3.72 mg EDTA tartılıp, biraz Tris-HCl tamponuyla çözülür. Ardından hepsi karıştırılıp son hacim 100mL'ye tamponla tamamlanır.

B Çözeltisi (6mM $MgCl_2$)

30.49 mg $MgCl_2$ tartılıp distile su hacmi 25 mL'ye ile getirilir.

Ouabain Çözeltisi

46.8mg ouabain tartılıp 4 mL distile su ile çözülür.

ATP Çözeltisi (11mM)

0.2442g ATP tartılıp 11mL distile su ile çözülür.

TCA çözeltisi (%100 ve %5)

10g TCA tartılıp 10mL'ye distile su ile tamamlanarak %100 TCA çözeltisi hazırlanır. 5g TCA'yı 100mL'ye distile suda çözerek %5'lik TCA çözeltisi hazırlanır.

H_2SO_4 Çözeltisi (5M)

27.2 mL derişik H_2SO_4 100 mL distile suya tamamlanır.

Molibdat Reaktifi

1.25g Amonyum molibdat tartılıp 10 mL distile su ile çözülür. 15 mL 5 M H_2SO_4 eklenir ve hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.

Sodyum-disülfit (%15)

7.5 g sodyum-disülfit tartılıp hacmi 50 mL'ye distile su ile tamamlanır.

Sodyum-sülfit (%20)

2 g Sodyum-sülfit tartılıp 10 mL distile suda çözülür.

Fiske-Subarrow Çözeltisi (ANSA; 1-Amino-2-naftol-4-sülfonik asit)

25mg ANSA, 9.75mL Na-disülfit ve 0.25mL Na-sülfit karıştırılarak çözülerek hazırlanır.

Stok Standart Çözeltisi (%8 Fosfor)

17.57mg KH_2PO_4, 0.5mL 5M H_2SO_4 eklenerek suda çözülür ve hacmi 50mL'ye tamamlanır.

Çalışma Standart Çözeltisi (%0.2, %0.4, %0.6, %0.8)

Hazırlanan %0.8'lik stok çözeltiden seyreltilerek %0.2, %0.4, %0.6 ve %0.8'lik çözeltiler hazırlanır. Seyreltmeler %5'lik TCA ile yapılır.

Deneyin Yapılışı

Deney tüpleri total ATPaz ve Mg^{2+}-ATPaz şeklinde ayrı ayrı hazırlanıp aşağıdaki tabloya göre hazırlanır.

Çözeltiler	**Kör**	**Total ATPaz**	**Mg^{2+}-ATPaz**
A Çözeltisi	0.75 mL	0.75 mL	-
B Çözeltisi	-	-	0.75 mL
Ouabain Çözeltisi	-	-	0.50 mL
Distile Su	0.60 mL	0.50 mL	-
ATP Çözeltisi	0.55 mL	0.55 mL	0.55 mL

37˚C'de 5 dakika inkübe edilir.			
Homojenizat	-	0.1 mL	0.1 mL
30 dakika 37˚C'de inkübe edilir. Ardından buza koyulup devam edilir.			
%100 TCA	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Tüpler karıştılıp 10 dakika bekletilir.			
10 dakika santrifüje edilip süpernatantlar ayrı tüplere alınır.			

Standartlar çalışılırken standart körü için 0.5 mL %5'lik TCA kullanılır. Standart olarak da daha önce hazırlanan %0.2, %0.4, %0.6 ve %0.8'lik çözeltilerden 0.5 mL kullanılır. Ardından amonyum molibdat, ANSA ve distile su aşağıdaki tabloya göre eklenerek çalışılır.

Çözeltiler	**Kör**	**Total ATPaz**	**Mg^{2+}-ATPaz**
Süpernatant	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Amonyum Molibdat	0.1mL	0.1 mL	0.1 mL
ANSA	40 µL	40 µL	40 µL
Distile Su	0.36 mL	0.36 mL	0.36 mL
10 dakika oda sıcaklığında bekletilip 680 nm'de absorbans ölçülür.			

Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı

µmol Pi/(mg protein x h) = (645 x A) / (% mg protein x 60)

A: Numunenin içerdiği % mg fosfor miktarı

3.19. TESTİS DOKUSUNDA PROTEİN KARBONİL (PC) MİKTAR TAYİNİ DENEYİNDE

Testis dokusunda protein karbonil (PC) miktar tayini Levine metoduna göre yapıldı. Testis dokusu protein karbonil miktarı, 2,4-dinitrofenilhidrazinin karbonil gruplarıyla reaksiyona girerek 2,4-dinitrofenilhidrazonu oluşturması prensinine bağlı olarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Levine ve diğ., 1990).

Kullanılan Çözeltiler

HCl Çözeltisi (2.5M)

20.72 mL %37'lik HCl toplam hacim 100 mL olacak şekilde distile suya eklenir.

TCA Çözeltisi (%20)

10 g TCA tartılıp son hacim 50 mL olacak şekilde distile su ile ayarlanır.

DNPH Çözeltisi (2,4-Dinitrofenilhidrazin, 10mM)

0.4954 g tartılan DNPH 250 mL'ye 2.5 M HCl ile tamamlanır.

Guanidin-HCl Çözeltisi (6M)

57.318 g Guanidin-HCl son hacim 100 mL olacak şekilde distile su ile çözülür.

Etil Alkol-Etil Asetat Çözeltisi (1:1)

Deneyin Yapılışı

Deney aşağıdaki tabloya göre çalışılmıştır.

Çözeltiler	Kör	Numune
Homojenizat	0.5 mL	0.5 mL
DNPH Çözeltisi	-	2 mL
HCl Çözeltisi	2 mL	-
Tüpler 60 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilip her 15 dakikada bir karıştırılır.		
TCA Çözeltisi	2.5 mL	2.5 mL
5 dakika buzda bekletildikten sonra santrifüj edilir ve üst faz atılır.		
Çökelti 3 kere 2 mL (1:1) EtOH:EtAc ile yıkanır.		
Guanidin-HCl Çözeltisi	1 mL	1 mL
10 dakika 37˚C'de bekletilir. sonra 370nm'de okunur.		

Protein karbonil miktarı şu formüle göre hesaplanır.

Protein Karbonil Miktarı (nmol karbonil / mg protein) = [Abs x 90.9] / mg protein

3.20. TESTİS DOKUSUNDA TOTAL PROTEİN MİKTARI TAYİNİ

Lowry metoduna göre protein tayini yapıldı (Lowry ve ve diğ.,1951).

Kullanılan Çözeltiler

A Reaktifi (%2 Na_2CO_3; 0.1N NaOH içinde)

Önce 0.1 N NaOH hazırlanır. 1g NaOH distile suda çözülerek hacmi 250mL'ye tamamlanır. Ardından 5 g Na_2CO_3 tartılıp hazırlanan NaOH (0.1N) çözeltisi ile çözüldü. Toplam hacim 250 mL'ye tamamlandı.

B Reaktifi (% 0.5 CuSO4; % 1 dipotasyum tartarat içerisinde)

1 g dipotasyum tartarat distile su ile çözülerek 100mL'ye tamamlanır. 10 mg $CuSO_4$ tartılır ve %1'lik 2mL dipotasyum tartarat çözeltisiyle çözülerek hazırlanır.

C Reaktifi

50mL A reaktifi ve 1mL B reaktifi karıştırılarak hazırlanır.

E Reaktifi (Folin)

100g sodyum tungstat, 25g sodyum molibdat, 700mL distile su, 50mL %85'lik fosfat asidi ve 100mL HCl bir balona konuldu. 10 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Üzerine 150g $LiSO_4$, 50mL distile su ilave edilir. Bir iki damla brom ilave edilir. 15 dakika kaynatılarak bromun fazlası uzaklaştırılır, soğutulur ve distile su hacmi 1L'ye tamamlandı. (Bu stok folin çözeltisidir, denemede kullanılırken 1:2 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılır.)

Protein Standart Çözeltisi (%10, %8, %6, %4, %2)

Albumin kullanılarak hazırlanan stok çözelti seyreltilerek %10, 8, 6, 4 ve 2'lik çözeltiler hazırlanmıştır.

Deneyin Yapılışı

Testis dokusunda protein miktar tayini aşağıdaki tabloya göre çalışılmıştır.

Çözeltiler	Kör	Standart	Numune
Standart Çözelti	-	0.5 mL	-
Homojenizat	-	-	0.5 mL
Standart Çözelti	-	0.1 mL	-
Serum Fizyolojik	0.5 mL	-	-

C Reaktifi	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
Tüpler karıştırılıp 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir			
Folin Çözeltisi	0.25 mL	0.25 mL	0.25 mL
Tüplerin 30 dakika sonra 500 nm'de absorbans değeri okunur.			

Hesap yapılırken standart eğri denklemi kullanılır. Seyreltme miktarına göre çıkan sonuç seyreltme miktarı ile çarpılır.

4. BULGULAR

Çalışmada valproik asit ile oluşturulan testis hasarına edaravon'un etkileri araştırıldı. Sıçanların testis dokularında incelenen biyokimyasal parametrelerin sonuçları Tablo 4.1-4.5'te verildi.

Testis dokusundaki GSH ve LPO değerleri Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1: Deney ve kontrol grubu sıçanlarının testis dokusu GSH ve LPO değerleri.

Gruplar	**GSH (nmol GSH / mg protein) ***	**LPO (nmol MDA / mg protein) ***
Kontrol	1.53 ± 0.63	3.46 ± 0.85
Kontrol + EDA	1.91 ± 1.06	1.37 ± 0.26[a]
VPA	3.94 ± 1.17[a]	4.99 ± 1.04[a]
VPA + EDA	2.20 ± 0.48[b]	2.77 ± 0.45[c]
P_{ANOVA}	0.0001	0.0001

*Ortalama ± SD

[a]P < 0.0001 Kontrol grubuna göre

[b]P < 0.001 VPA grubuna göre

[c]P < 0.0001 VPA grubuna göre

Elde edilen verilere göre testis dokusu homojenizatlarının GSH değerlerinde gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu bulundu (P_{ANOVA} = 0.0001). VPA grubunda GSH değerlerinde anlamlı bir artış olduğu görüldü (P < 0.0001). EDA verilen VPA grubunda, VPA grubuna göre GSH değerlerinde azalma olduğu görüldü (P < 0.001) (Tablo 4.1).

Tablodaki veriler birbiri ile kıyaslandığında testis dokusu homojenizatlarının LPO değerlerinin gruplar arasında anlamlı farklılıkları olduğu görüldü (P_{ANOVA} = 0.0001). EDA verilen grupta anlamlı bir azalma olduğu gözlendi. (P < 0.0001). VPA uygulanan grupta ise anlamlı bir artış olduğu görüldü (P < 0.001). EDA verilen VPA grubunda, VPA grubuna göre GSH değerlerinde azalma olduğu görüldü (P < 0.0001) (Tablo 4.1).

Testis dokusundaki ACP, ALP ve LDH aktivite değerleri Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2: Deney ve kontrol grubu sıçanlarının testis dokusu ACP, ALP ve LDH aktivite değerleri.

Gruplar	**ACP (U / g protein) ***	**ALP (U / g protein) ***	**LDH (U / g protein) ***
Kontrol	28.66 ± 1.63	27.10 ± 2.36	16.99 ± 4.05
Kontrol +EDA	26.14 ± 3.25	33.41 ± 5.08	20.33 ± 5.71
VPA	35.62 ± 3.50[a]	46.04 ± 7.81[a]	36.88 ± 4..48[a]
VPA + EDA	27.66 ± 2.64[b]	37.97 ± 5.68[c]	15.92 ± 2.37[b]
P_{ANOVA}	0.0001	0.0001	0.0001

*Ortalama ± SD

[a]P < 0.0001 Kontrol grubuna göre

[b]P < 0.0001 VPA grubuna göre

[c]P < 0.05 VPA grubuna göre

Elde edilen sonuçlara göre testis dokusu homojenizatlarının ACP aktivite değerlerinde gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu görüldü (P_{ANOVA} = 0.0001). VPA grubunda anlamlı bir artış olduğu görüldü (P < 0.0001). EDA verilen VPA grubunda ise VPA grubuna göre ACP aktivitelerinde azalma olduğu saptandı (P < 0.0001) (Tablo 4.2).

ALP aktivite değerlerine bakıldığında gruplar arasında anlamlı değişiklikler olduğu gözlendi (P_{ANOVA} = 0.0001). VPA uygulanan sıçanlarda ise kontrol grubuna göre ALP aktivite değerlerinde artış olduğu gözlendi (P < 0.0001). EDA verilen VPA grubunda ise VPA grubunda ALP aktivite değerleri azaldı (P < 0.05) (Tablo 4.2).

LDH aktivite değerleri arasında anlamlı farklılıklar olduğu saptandı (P_{ANOVA} = 0.0001).VPA verilen grupta LDH aktivite değerleri anlamlı olarak arttı (P < 0.0001). VPA + EDA verilen grupta LDH aktivitesi azaldı (P < 0.0001) (Tablo 4.2).

Testis dokusundaki CAT ve SOD aktivite değerleri Tablo 4.3'te verildi.

Tablo 4.3: Deney ve kontrol grubu sıçanlarının testis dokusu CAT ve SOD aktivite değerleri.

Gruplar	**CAT** **(U / mg protein) ***	**SOD** **(U / mg protein) ***
Kontrol	2.53 ± 1.22	0.28 ± 0.05
Kontrol + EDA	4.12 ± 0.72[a]	0.46 ± 0.07[c]
VPA	4.13 ± 0.60[a]	0.71 ± 0.07[c]
VPA + EDA	2.41 ± 0.91[b]	0.31 ± 0.08[d]
P_{ANOVA}	0.0002	0.0001

* Ortalama ± SD

[a]P < 0.001 Kontrol grubuna göre

[b]P < 0.001 VPA grubuna göre

[c]P < 0.0001 Kontrol grubun göre

[d]P < 0.0001 VPA grubuna göre

Dört grubun CAT aktivite değerleri arasında anlamlı değişiklikler oldu (P_{ANOVA} = 0.0002). EDA verilen grubun CAT aktivite değerleri anlamlı olarak arttı (P < 0.001).VPA verilen grubun kontrol grubuna göre CAT aktivite değerleri arttı (P < 0.001). EDA verilen VPA grubunda CAT aktivite değerleri azaldı (P < 0.001) (Tablo 4.3).

Dört grubun SOD aktivite değerleri arasında farklılıklar olduğu görüldü (P_{ANOVA} = 0.0001) (Tablo 4.3). EDA verilen grupta SOD aktivite değeri anlamlı bir artış gösterdi (P < 0.0001) (Tablo 4.3). SOD aktivite değeri VPA grubunda arttı (P < 0.0001). EDA verilen VPA grubunda SOD aktivite değerinde azalma olduğu bulundu (P < 0.0001) (Tablo 4.3).

Testis dokusundaki GPx, GR ve GST aktivite değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4: Deney ve kontrol grubu sıçanlarının testis dokusu GPx, GR ve GST aktivite değerleri.

Gruplar	**GPx (U/g protein) ***	**GR (U/g protein) ***	**GST (U/mg protein) ***
Kontrol	299.0 ± 25.8	11.94 ± 1.90	0.43 ± 0.05
Kontrol +EDA	274.9 ± 60.4	12.96 ± 1.59	0.46 ±0.06
VPA	491.4 ± 36.79[a]	16.85 ± 1.95[a]	0.61 ± 0.05[a]
VPA + EDA	335.1 ± 34.7[b]	11.80 ± 1.19[b]	0.51 ± 0.03[b]
P_{ANOVA}	0.0001	0.0001	0.0001

* Ortalama ± SD

[a]p < 0.0001 Kontrol grubuna göre

[b]p < 0.0001 VPA grubuna göre

Dört grubun GPx aktivite değerleri birbiriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı değişiklikler olduğu gözlendi. (P_{ANOVA} = 0.0001). VPA verilen grupta GPx aktivitesi anlamlı olarak arttı (P < 0.0001). EDA verilen VPA grubunda ise GPx aktivite değerinde azalma görüldü (P < 0.0001) (Tablo 4.4).

Elde edilen verilere göre GR aktivite değerleri değişiklikler olduğu gözlendi. (P_{ANOVA} = 0.0001). VPA verilen grubun GR aktivite değerinde artış olduğu gözlendi (P < 0.0001). EDA verilen VPA grubunda ise anlamlı bir azalma olduğu görüldü (P < 0.0001) (Tablo 4.4).

Dört grubun GST aktivite değerleri birbiriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı değişiklikler olduğu gözlendi. (P_{ANOVA} = 0.0001). VPA verilen grubun kontrol grubuna göre GST aktivite değerleri anlamlı olarak arttı (P < 0.0001). EDA verilen VPA grubunda ise GST aktivite değerlerinde VPA grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu görüldü (P < 0.0001)

Testis dokusundaki GGT, Na^+/K^+-ATPaz aktiviteleri ve PC değerleri aşağıda verildi.

Tablo 4.5: Deney ve kontrol grubu sıçanların testis dokusu GGT, Na^+/K^+-ATPaz aktiviteleri ve PC değerleri.

Gruplar	**GGT (U/g protein) ***	**Na^+/K^+-ATPaz (nmol Pi/mg Protein) ***	**PC (nmol/mg protein) ***
Kontrol	35.58 ± 8.83	18.53 ± 3.08	1.72 ± 0.72
Kontrol + EDA	43.98 ± 7.48	10.44 ± 1.72[c]	2.53 ± 0.39
VPA	60.36 ± 9.59[a]	9.98 ± 1.83[a]	5.34 ± 0.79[a]
VPA + EDA	44.77 ± 6.66[b]	12.10 ± 1.63[d]	2.81 ± 0.60[b]
P_{ANOVA}	0.0001	0.0001	0.0001

* Ortalama ± SD

[a]p < 0.0001 Kontrol grubuna göre

[b]p < 0.0001 VPA grubuna göre

[c]p < 0.0001 Kontrol grubuna göre

[d]p < 0.05 VPA grubuna göre

Dört grubun GGT aktivite değerleri arasında anlamlı değişiklikler saptandı (P_{ANOVA} = 0.0001). VPA verilen grupta GGT aktivite değerleri arttı (P < 0.0001). EDA verilen VPA grubunda GGT aktivite değerlerinde bir azalma olduğu görüldü (P < 0.0001) (Tablo 4.5).

Elde edilen veriler incelendiğinde Na^+/K^+-ATPaz aktivite değerlerinde gruplar arasında anlamlı değişiklikler olduğu gözlendi (P_{ANOVA} = 0.0001). EDA verilen grupta kontrol grubuna göre Na^+/K^+-ATPaz aktivite değerinde azalma olduğu görüldü (P < 0.0001). VPA verilen Na^+/K^+-ATPaz grubunda ise azalma olduğu gözlendi (P < 0.0001). EDA verilen VPA grubunda ise VPA grubuna göre Na^+/K^+-ATPaz değerinde bir artış olduğu saptandı (P < 0.05) (Tablo 4.5).

PC değerleri birbiriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlendi. (P_{ANOVA} = 0.0001). PC değerleri VPA verilen grupta arttı (P < 0.0001). EDA verilen VPA grubunda ise PC değerlerinde anlamlı azalma olduğu bulundu (P < 0.0001) (Tablo 4.5).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Epilepsi, bilinen en eski ve en sık görülen nörolojik hastalıklardan biridir. Bu hastalık düşük sosyo-ekonomik düzey, sağlık bakımından sınırlı yararlanma ve nörosistiserkoz gibi çevresel faktörler ile ilişkilidir (Banerjee ve diğ., 2009). Epilepsi; hastanın fiziksel değişikliklere, günlük ilaç kullanımında uyuma, yineleyen doktor muayenelerine ve akut tıbbi acil durumlara hazırlıklı olmasını gerektiren ve yaşam kalitesini olumsuz olarak etkileyen bir hastalıktır (Uysal ve Ercan, 2005). Epilepsi hastaları ile yapılan çalışmalarda, bu hastalığın düşük yaşam kaliteli kişilerde fazla olduğunu göstermektedir (Ünal ve Saygı, 2005).

Farklı psikiyatrik ve nörolojik durumlarda yaygın kullanılan antiepileptik ve duygudurum düzenleyici bir ilaç olan valproik asit (VPA), nörolojide epilepsi, nöropatik ağrı, tremor ve migren profilaksisinde de kullanılmaktadır. Bu rahatsızlıkların yanısıra, bipolar bozukluk, dürtü kontrol bozuklukları, travma sonrası stres bozukluğu, tedaviye dirençli depresyon ve tedaviye dirençli şizofreni tedavisinde kullanılabilmektedir (Tunca ve Özerdem, 2010).

Diğer antiepileptik ilaçlarda olduğu gibi VPA'nın temel etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. VPA geniş tedavi edici özelliğiyle oldukça güvenli bir ilaç olmasının yanı sıra, nörolojik bozukluklar, bulantı, kusma, gastrointestinal, pankreatit, hematolojik, hormonal (tiroid fonksiyon bozukluğu, menstrüel düzensizlik), kanama, hipotansiyon, taşikardi, solunum yetmezliği, serum karnitin düzeyinde düşme, lipid, karbohidrat ve üre siklusunda bozukluk ve buna bağlı metabolik değişiklikler (Schmidt , 1984; McElroy ve Keck, 1989; Sztajnkrycer, 2002; Goldberg-Stern ve diğ., 2014) gibi yan etkiler de gösterebilmektedir (Tunca ve Özerdem, 2010).

VPA'nın birçok teratojen etkisinin olduğu literatürde gösterilmiştir (Mirza ve Sharma, 2019). Bu teratojen etkiler içerisinde; santral sinir sistemi, kardiyovasküler, kas iskelet, ürogenital anormalilerinin yanısıra kraniofasiyal anomali, majör organik malformasyon ve gelişme geriliği ile karakterize "fetal valproat sendromu" DiLiberti ve ark. (Huot ve diğ., 1987) tarafından tanımlanmış ve daha sonraki yıllarda otizm üzerinde sonuçlar raporlanmıştır (DiLiberti ve diğ., 1984; Huot ve diğ., 1987; Sharony ve diğ., 1993). Doğum öncesi dönemde fenobarbital, VPA, fenitoin gibi antiepileptik ilaçlara (AEİ) maruz bırakılan deney

hayvanlarında davranışsal yan etkilerin olduğu, deneklerde anormal dönme, hiperaktivite, öğrenme güçlükleri, gelişme geriliği ve alansal öğrenme beceri kayıplarının olduğu ileri sürülmüştür (Weisenburger ve diğ., 1990; Vorhees ve diğ., 1994; Schilling ve diğ.,1999). Bununla birlikte özellikle deneysel çalışmalarda erken rahim içi dönemde AEİ'lara maruz kalan deney hayvanlarında artmış apoptozis, nörojenezis ve sinaptojenesizde bozulma tespit edilmiştir (Bittigau ve diğ., 2003). Bu konuda en çok VPA, fenobarbital, karbamazepin, fenitoin, lamotrijin, levetirasetam ile ilgili çalışmalar söz konusudur (Inoyama ve Meador 2015). EDA oksidatif strese karşı hücrenin hayatta kalmasını teşvik eden ve potansiyel olarak apoptozu inhibe eden serbest radikal peroksil radikalleri ve peroksinitrit gidericidir. EDA güçlü bir serbest radikal tutucu olup antioksidan özelliğe sahip bir maddedir (Abe ve diğ., 1988).

Glutatyon, serbest radikallerin etkilerini azaltmada görevi olan non protein bir tripeptittir. Organizmada önemli bir antioksidan maddedir. Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinin peptit bağı ile bağlanması sonucu meydana gelir ve yapısında serbest tiyol grubu içermesi nedeni ile antioksidan özellik gösterir (Ali ve diğ, 2014; Rushwort ve Megson, 2014). GSH hücreleri organizmada oluşan veya dışarıdan alınan oksidan maddelere karşı koruyan bir maddedir (Mitchell ve Russo, 1987). Glutatyon amino asitlerin hücre içine taşınmasında, protein ve DNA sentezinde önemli bir rol oynar. Gadea ve diğ., (2013) spermanın dondurulmasında GSH'ın kriyoprotektan amaçlı olarak kullanılabileceğini ve ortama GSH ilave edilmesinin yararlı sonuçlar gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Otistik hastalarda yapılan bir çalışmada GSH/GSSH oranının ve total GSH düzeylerinin azaldığı, tiyoredoksin ve tiyoredoksin redüktaz aktivitelerinin arttığı bildirilmiştir (Kar ve diğ., 2019). Çalışmamızda VPA uygulanması ile GSH düzeyinin arttığı, EDA uygulanması ile bu değerin azaldığı saptanmıştır. Yapısında sülfidril grubu bulunan maddelerin VPA uygulanması ile artmış olabileceği öne sürülebilir.

Testiküler membranlar oksidatif bozulmaya karşı dayanıksız çoklu doymamış yağ asidleri bakımından zengin olan yapılardır. LPO membranların işlevini yitirmesine neden olur.

Dokularda ve serumda MDA (LPO) düzeyleri artar. MDA düzeyinin artışı oksidatif stresin oluştuğunun bir göstergesidir (Dąbrowska ve diğ., 2019). VPA uygulanılan sıçanlarda testis LPO değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. VPA grubuna EDA uygulanması ile LPO değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum membran bütünlüğünün ve yağ asidi kompozisyonunun değişerek hücrelerin oksidatif hasara karşı duyarlılığının artması ile açıklanabilir (Sharma ve diğ., 2011). Sıçanlarda dokorubisin ile oluşturulan testis hasarında testis LPO değerinin arttığı görülmüştür. Bu gruba balık yağı omega-3-yağ asidleri verilmesi ile LPO değerinin azldığı Uygur ve diğ tarafından bulunmuştur (Uygur ve diğ., 2014). Sodyum valproat verilerek oluşturulan testis hasarında testis LPO değerinin arttığı görülmüştür (Al- Salmi ve diğ., 2019). Bu sıçanlara düşük ve yüksek dozda L-sistein verilmesi ile artmış olan LPO değerinin azaldığı saptanmıştır. Sıçanlarda endosulfan ile oluşturulan testis hasarında testis LPO değerinin arttığı, taurin verilmesi ile bu değerin azaldığı bulunmuştur (Aly ve diğ., 2014).

Valproik asit verilen sıçanlarda testiste meydana gelen oksidatif stres ile ilgili hasarda testis LPO değerinin arttığı, artmış olan LPO değerinin ise E vitamini verilmesi ile azaldığı görülmüştür (Ourique ve diğ., 2016). D-galaktoz ile oluşturulan testis hasarında artmış olan LPO değerinin karnosin verilmesi ile azaldığı öne sürülmüştür (Aydın ve diğ., 2018). Asetilsalisilik asit ile oluşturulan testis hasarında LPO değerinin arttığı, GSH değerinin azaldığı görülmüştür. Bu sıçanlara melatonin verilmesi ile testis hasarının önlendiği görülmüştür (Altintaş ve diğ., 2014).

Asit fosfataz enzimi çeşitli izoformlarda insan vücudunun hemen her bölgesinde bulunmaktadır. Enzim, özellikle kan hücrelerinde bulunması nedeniyle, organizmaya yayılmış durumdadır. Eritrosit ve trombositlerde önemli miktarda bulunmakla beraber lökositlerde de mevcuttur. Asit fosfataz (ACP) hidrolaz sınıfı enzimlerdendir. Bu enzim, plazma hücreleri, megakaryositler ve trombositlerde bulunan lizozomal bir enzimdir (Catowsky, 1981). İnsan T-lenfositleri için asit fosfataz (ACP) enziminin spesifik bir enzim olduğu Yang ve diğ., (1982) tarafından ileri sürülmüştür. Ayrıca lizozomlarda bulunması sebebiyle tüm hücrelerde asit fosfataz vardır denilebilmektedir. Sağlıklı erkek bireylerin, vücudundaki asit fosfataz miktarının büyük bir çoğunluğu prostat kaynaklıdır. Dolayısıyla

insan semenindeki miktarı diğer vücut sıvılarına oranla çok daha yüksektir. Asit fosfatazlar ayrıca pankreas, böbrekler, akciğerler, bağırsaklar, böbrek üstü bezleri, iskelet kasları, overler, timus, kalp kası, paratiroidler, uterus, safra kesesi, deri, testisler ve diğer dokularda da bulunmaktadır. Prostattaki asit fosfataz aktivitesi ise diğer dokuların birkaç yüz katı kadardır (Curtius ve diğ., 1974; Richterich ve Colombo, 1978; Tietz 1986; Calbreath 1992).

Asit fosfataz çeşitli vücut sıvılarında bazı patolojik durumlarda yükselme göstermektedir. Asit fosfataz düzeyindeki farklılıkların en fazla önem taşıdığı klinik durum prostat karsinomudur. Prostat kanserli hastaların serumlarında prostat kaynaklı asit fosfataz miktarı oldukça yüksektir. Hastalığın ilerleme evrelerine göre serum prostatik asit fosfataz miktarı artmaktadır (Tietz 1986; Calbreath 1992).

Çalışmamızda, sıçanlara VPA uygulanması ile testis ACP aktivitesi artış göstermiştir. VPA verilmiş sıçanlara EDA uygulanmasının artmış olan ACP aktivitesini anlamlı olarak düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu durum testiste VPA ile meydana gelen hasarın EDA uygulanması ile önlenebildiğini göstermektedir.

Özden ve arkadaşları (2007) testis tümörüne sahip hastalarda serum ALP ve LDH aktivite değerlerinin arttığını bildirmişlerdir. Çetinkaya ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada da ALP aktivitesini epilepsi ilacı olarak karbamazepin kullanan grupta yüksek bulmuşlardır. Tablo 4.2’ ye göre ALP ve LDH aktivitelerinin VPA uygulanması ile kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, EDA uygulanması ile bu değerlerin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Bu da VPA’ nın testis üzerine olan olumsuz etkisinin EDA uygulanması ile düzelebileceğini göstermektedir.

Oksidatif stres, ROS ve antioksidan sistem arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşur. Aşırı ROS üretimi anormal semen parametrelerine ve kısırlığa neden olabilir (Daggulli ve diğ., 2014). Ayrıca oksidatif stres ile testiste oluşan hasar erkeklerde kısırlığa yol açabilir. Oksidatif stres, erkeklerde infertilitenin ana nedenlerinden biridir (Vardi ve diğ., 2009).

Antioksidan enzimler, özellikle SOD ve CAT, O_2 ile reaksiyona girer ve sırasıyla H_2O_2. GPx, okside membran bileşenlerinden oluşan alkil (R), RO ve ROO radikallerini yakalar ve substrat olarak GSH kullanır (Çeribaşı ve diğ., 2012). Hem GSH hem de GPx, oksidatif stresdeki serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynar (Türedi ve diğ.,. 2015). Testislerde, antioksidan savunma mekanizmaları ROS'a karşı korunmada kritik öneme sahiptir. Çeşitli antioksidanlar, vitaminler ve GSH, ROS'a karşı savunma mekanizmalarında yer almaktadır. SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimler, erkek üreme organlarının ROS'un zararlı etkilerine karşı korunmasında önemli rol oynamaktadır (Yuluğ ve diğ., 2013).

Çalışmamızda VPA verilen sıçanlarda CAT, SOD, GPx, GR ve GST aktivitelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı saptandı. Bu da VPA' nın testis dokusunda ROS türevlerini arttırarak hasara yol açtığını göstermektedir. VPA' lı gruba EDA uygulanması ile enzim aktivitelerinin azaldığı bulundu. Bu durum EDA'nın VPA uygulanan sıçanlarda koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi peroksizomal enzimlerin, aktivitesindeki önemli bir artışın; bu enzimlerin, organları oksidatif hasardan koruyarak hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasında etkin bir şekilde rol oynadığını gösterdiği literatürde bildirilmektedir (Pratibha ve diğ., 2006).

Pratibha ve diğ., (2006) yaptıkları çalışmada, sisplatin muamelesinden sonra hepatik dokudaki gama glutamil transpeptidaz aktivitesinin arttığı görülmüştür. Çalışmamızda VPA uygulanması ile kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olan GGT aktivitesi EDA uygulanması ile VPA gruba göre anlamlı olarak azalmıştır.

Na^+/K^+- ATP az α ve β alt ünitelerinden oluşmuş birkaç membran segmenti içeren amfipatik yapıda heterodimerik bir proteindir. α alt ünitesi testislerde ve spermin orta bölgesinde bulunmaktadır (Blanco ve Mercer, 1998; Crambert ve diğ., 2000; Lingrel ve diğ.,2003; Woo ve diğ., 2000). Geleneksel proteomik çalışmalarda Na^+/K^+- ATP azın önemli bir iyon taşıma özelliğine sahip olduğu ve membranın intrasellüler ve ekstrasellüler kısmında lokalize olduğu bildirilmektedir (Schmalzing ve diğ.,1997; Hu ve Kaplan 2000; Hebert ve diğ., 2003).

Çalışmamızda VPA uygulanması ile Na^+/K^+- ATPaz aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Antioksidan bir madde olan EDA verilmesi ile azalan bu aktivitenin arttığı tespit edilmiştir. Bu durum bozulmuş olan testis dokusun EDA uygulanması ile düzelebildiğini göstermektedir.

Oksidatif stresin metabolizma üzerindeki dejeneratif etkileri yapılan birçok çalışma ile ileri sürülmüştür. Yüksek oksidatif stresin testis fizyolojisi ve sperm fonksiyonu üzerinde derin etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Agarwal ve Said 2005).

Canlılarda oksijenli solunum sunucu meydana gelen ROS' lar DNA, protein ve lipidler gibi hücre ve organel bileşenlerinde oksidatif hasara neden olur. Bu şekilde meydana hasarın sebep olduğu yapı değişimleri apoptoza ve yaşlanmaya neden olacak şekilde biyolojik olarak fonksiyon kayıplarına neden olur (Berlett ve Stadtman 1997). Proteinlerin oksidasyonunu yavaşlatan etkenlerin canlıların yaşam sürelerini arttırdıkları bilinmektedir (Stadtman, 2001). Protein oksidasyonunun en yaygın olarak ölçülen ürünlerinden biri de protein karbonillerdir. PC düzeylerinin saptanması, oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntemdir (Evans ve diğ., 1999; Gülbahar, 2007).

Çalışmamızda VPA uygulanan grupta PC miktarı kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, EDA uygulanması ile PC değerinin azaldığı bulunmuştur. EDA'nın testis dokusunda oksidatif stres sonucu meydana gelen hasarı önlediği söylenebilir. PC miktarında meydana gelen azalma, EDA'nın proteinlerin oksidatif hasarının önlendiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, epilepsi hastalığının tedavisinde kullanılan VPA'nın testis dokusu üzerinde oluşturduğu hasarın sentetik bir antioksidan olan EDA tarafından önlenebileceği öne sürülebilir. EDA'nın testis dokusu üzerinde koruyucu etkisinin olduğunun bulunması, epilepsi hastalarının ilaç olarak kullandığı VPA'nın oluşturduğu komplikasyonların önlenmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

Abe, K., Yuki, S., Kogure, K., 1988, Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger, *Stroke*, 19, 480-485.

Abraham, L., 2006, Üreme Sistemi, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi.* Demir R.(Çeviren), 1.

Aebi, H., 1984, Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.

Agarwal, A., Said, T.M., 2005, Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: A clinical approach, *British Journal of Urology International*, 95, 503-507.

Agarwal, A., Durairajanayagam, D., Halabi, J., Peng, J., Vazquez-Levin, M., 2014, Proteomics, oxidative stress and male infertility, *Reproductive Biomedicine Online*, 29, 32-58.

Ali, N., Rashid, S., Nafees, S., Hasan, S. K., Sultana, S., 2014, Beneficial effects of chrysin against methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 385, 215-223.

Altintas, R., Polat, A., Parlakpinar, H., Vardi, N., Beytur, A., Oguz, F., Sagir, M., Yildiz, A., Duran, R., 2014, The effect of melatonin on acetylsalicylic acid-induced kidney and testis damage, *Human and Experimental Toxicology*, 33, 383-395.

Al-Salmi,F.A., Al-Eisa, R., Hamza, R.Z., Khaled, H.E., El-Shenawy, N.S., 2019, Protective effect of L-cycsteine against sodium valproate-induced oxidant injury in testis of rats, International Journal of Pharmacology, 15, 248-256.

Aly, H.A.A., Khafagy, R.M., 2014, Taurine reverses endosulfan-induced oxidative stress and apoptosis in adult rat testis, *Food and Chemical Toxicology*, 64, 1-9.

Amemiya, S., Kamiya, T., Nito, C., Inaba, T., Kato, K., Ueda, M., Katayama, Y., 2005, Anti-apoptotic and neuroprotective effects of edaravone following transient focal ischemia in rats, *European Journal of Pharmacology*, 516, 125-130.

Andersen, H.R., Nielsen, J.B., Nielsen, F., Grandjean, P., 1997, Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes, *Clinical Chemistry*, 43(4), 562-568.

Arıncı, K., Elhan, A., 2006, *Anatomi,* Ankara: Güneş Kitabevi 1. cilt, 330 s.

Aydemir, B., Sarı, E. K., 2009, Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi, *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2, 56-60.

Aydın, A.F., Küçükgergin, C., Çoban, J., Doğan-Ekici, I., Doğru-Abbasoğlu, S., Uysal, M., Koçak-Toker, N., 2018, Carnosine prevents testicular oxidative stress and advanced glycation end product formation in D-galactose-induced aged rats, *Andrologia*, 50, e12939.

Bais, R., Philcox, M., 1994, Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase (I-Lactate: NAD+Oxidoreductase, EC 1.1.1.27). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 32, 639-655.

Banerjee, P.N., Filippi, D., Hauser, W.A., 2009, The descriptive epidemiology of epilepsy—a review, *Epilepsy Research*, 85(1), 31-45.

Belcastro, V., D'Egidio, C., Striano, P., Verrotti, A., 2013, Metabolic and endocrine effects of valproic acid chronic treatment, *Epilepsy Research*, 107, 1-8.

Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 20313-20316.

Beutler, E., 1971, Red cell metabolism, *A manuel of biochemical methods, 12th Academic Press.*, London, 68-70.

Beutler, E., 1975, Glutathione in: Red cell metabolism. *A manual of biochemical methods*, 2nd ed., *Grune and Stratton*, New York, USA, 112-114.

Bialer, M., 2012, Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs), *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 887-895.

Bilge, M., 2010, *Hemodiyaliz Hastalarında Serbest Radikallerin Organizmaya Ve Antioksidan savunma Sistemleri Üzerine Etkileri* (Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya).

Bittigau, P., Sifringer, M., Ikonomidou, C., 2003, Antiepileptic drugs and apoptosis in the developing brain, *Annals of The New York Academy of Sciences*, 993, 103-114.

Blanco, G., Mercer, R. W., 1998, Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 275, F633-F650.

Burton, B.S., 1882, On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate, *Journal of American Chemical Society*, 3, 385-395.

Büyükuslu, N., Yiğitbaşı, T., 2015, Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5, 197-203.

Cakmak, H., N., Yanardag, R., 2015, Edaravone, a free radical scavenger, protects liver against valproic acid induced toxicity, *Journal of the Serbian Chemical Society*,80, 627-637.

Calbreath, D.F., 1992, *Clinical Chemistry: A fundamental textbook*, First Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Catowsky, D., 1981, Leucocyte cytochemical and immunological techniques, In "*Practical Haematology*", Eds., J.V. Dacie and S.M. Lewis, 143-174, 7th edition, Churchill Livingstone.

Cetinkaya, Y., Sezikli, H., Ekmekci, D., Gul, Z. B., Tutkavul, K., & Tireli, H., 2014, The effect of valproic acid or carbamazepine at bone metabolism in epileptic patients/Epilepsi hastalarinda karbamazepin veya valproik asit kullaniminin kemik metabolizmasina etkisi, *Epilepsi: Journal of The Turkish Epilepsi Society*, 20, 29-35.

Crambert, G., Hasler, U., Beggah, A. T., Yu, C., Modyanov, N. N., Horisberger, J. D., Lelièvre, L., Geering, K., 2000, Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 1976-1986.

Curtius, H.C., Roth, M., 1974, *Clinical Biochemistry: Principles and methods*, Vol. II., First Edition, Walter de Gruyter, Berlin.

Çeribaşı, A.O., Sakin, F., Türk, G., Sönmez, M., Ateşşahin, A., 2012, Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64, 717-724.

Dabrowska, Z., Dąbrowska, E., Onopiuk, B., Onopiuk, P., Orywal, K., Mroczko, B., Pietruska, M., 2019, The protective impact of black chokeberry fruit extract (Aronia melanocarpa L.) on the oxidoreductive system of the parotid gland of rats exposed to cadmium, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-11.

Daggulli, M., Dede, O., Utangac, M. M., Bodakci, M. N., Hatipoglu, N. K., Penbegul, N., Sancaktutar, A.A., Bozkurt, Y.Y., Türkçü, G., Yüksel, H., 2014, Protective effects of carvacrol against methotrexate-induced testicular toxicity in rats, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7, 5511.

DiLiberti, J.H., Farndon, P.A., Dennis, N.R., Curry, C.J., 1984, The fetal valproate syndrome, *American Journal of Medical Genetics*, 19, 473–481.

Doğdu, S., 2013 *Epilepsi Hastalığı ve Tedavi Yöntemleri*, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı Bitirme Ödevi, Kayseri.

Drake, R.I., Vogl, W. Mitchell, A.W.M., 2007, *Gray's Anatomi*, Çev:Yıldırım, M., Ankara: Güneş kitabevleri.

Durmuş, A.S., 2005, Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve kırık iyileşmesi, *Fırat Üniversitesi Doğu Araştırmaları Dergisi*, 3, 20-27.

Dündar, Y., Aslan, R., 1999, Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller – antioksidanlar, *İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi*, 2, 134-142.

Evans, P., Lyras, L., Halliwell, B., 1999, Measurement of protein carbonyls in human brain tissue, *Methods in Enzymology*, 300, 145-156.

Feldman, G.J., Mullin, J.M., Ryan, M.P., 2005, Occludin: structure, function and regulation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 883-917.

Fridovich, I., 1983, Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23, 239-257.

Gadea, J., Gumbao, D., Gómez-Giménez, B., Gardón, J. C., 2013, Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa, *Reproductive Biology*, 13, 24-33.

Giri, V.P., Giri, O.P., Khan, F.A., Kumar, N., Kumar, A., Haque, A., 2016, Valproic acid versus lamotrigine as first-line monotherapy in newly diagnosed ıdiopathic generalized tonic–clonic seizures in adults–a randomized controlled trial, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10, FC01.

Goldberg-Stern, H., Yaacobi, E., Phillip, M., de Vries, L., 2014, Endocrine effects of valproic acid therapy in girls with epilepsy: a prospective study. *European Journal of Paediatric Neurology*, 18, 759-765.

Grant, R. H. E., Barot, M. H., 1976, The use of sodium valproate (Epilim) in severely handicapped patients with epilepsy. *In Clinical and Pharmacological Aspects of Sodium Valproate (Epilim) in The Treatment of Epilepsy* (pp. 14-21), MCS Consultants Tunbridge Wells.

Gülbahar, Ö., 2007, Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilişkisi, *Turkish Journal of Geriatrics*, 10, 43-48.

Gülçin, İ., 2006, Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid), *Toxicology*, 217, 213-220.

Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981, Assays for differentiation of glutathione S-transferases, *Methods in Enzymology*, 77, 398-405.

Halliwell, B., Gutteridge, J., 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochemical Journal*, 219, 1-14.

Hamada, A., Sharma, R., Du Plessis, S.S., Willard, B., Yadav, S.P., Sabanegh, E., Agarwal, A., 2013, Two-dimensional differential in-gel electrophoresis–based proteomics of male gametes in relation to oxidative stress, *Fertility and Sterility*, 99, 1216-1226.

Haroldson, J. A., Kramer, L. E., Wolff, D. L., Lake, K. D., 2000, Elevated free fractions of valproic acid in a heart transplant patient with hypoalbuminemia, *Annals of Pharmacotherapy*, 34, 183-187.

Hatipoğlu, M.T., Turgut, H.B., 1996, *Anatomi Terimleri Söyleyiş ve Yazım Kılavuzu*. Ankara: SBAD Yayınları.

Hebert, H., Purhonen, P., Thomsen, K., Vorum, H., Maunsbach, A. B., 2003, Renal Na, K-ATPase structure from cryo-electron microscopy of two-dimensional crystals, *Annals of The New York Academy of Sciences*, 986, 9-16.

Herzog, A.G., Schachter, S.C., 2001, Valproate and the polycystic ovarian syndrome: final thoughts, *Epilepsia*, 42, 311-315.

Hironaka, K., Inokuchi, Y., Fujisawa, T., Shimazaki, H., Akane, M., Tozuka, Y.,Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hara, H., Takeuchi, H., 2011, Edaravone-loaded liposomes for retinal protection against oxidative stress-induced retinal damage, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79, 119-125.

Hu, Y. K., Kaplan, J. H., 2000, Site-directed chemical labeling of extracellular loops in a membrane protein the topology of the Na,K-ATPase α-subunit, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 19185-19191.

Huot, C., Gauthier, M., Lebel, M., Larbrisseau, A., 1987, Congenital malformations associated with maternal use of valproic acid, *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 14, 290-293.

Inokuchi, Y., Imai, S., Nakajima, Y., Shimazawa, M., Aihara, M., Araie, M., Hara, H., 2009, Edaravone, a free radical scavenger, protects against retinal damage in vitro and in vivo, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329, 687-698.

Inoyama, K., Meador, K. J., 2015, Cognitive outcomes of prenatal antiepileptic drug exposure, *Epilepsy Research*, 114, 89-97.

Johannessen, C.U., 2000, Mechanisms of action of valproate: a commentatory, *Neurochemistry International*, 37, 103-110.

Junqueira, L. C., Carneiro, J., Robert, O., 1998, *Kelley a Lange Medical Book*. Çeviri editörü: Prof. Dr. Yener Aytekin Barış Kitabevi.

Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2005, *Temel Histoloji*. Çev: Aytekin, Y., Solakoğlu, S., İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 418-428.

Kar, F., Cihaner, Ö., Hacıoğlu, C., Kanbak, G., 2019, Autism: Evaluation Of psychological, biochemical and environmental factors, *Biological Diversity and Conservation*, 12, 206-212.

Karabulut, H., Gülay, M. Ş., 2016, Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4,50-59.

Khosrowbeygi, A., Zarghami, N., 2007, Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *Biomed Central Clinical Pathology*, 7, 6.

Kokura, S., Yoshida, N., Sakamoto, N., Ishikawa, T., Takagi, T., Higashihara, H., Nakabe, N., Handa, O., Naito, Y., Yoshikawa, T., 2005, The radical scavenger edaravone enhances the anti-tumor effects of CPT-11 in murine colon cancer by increasing apoptosis via inhibition of NF-κB, *Cancer Letters*, 229, 223-233.

Kusunoki, M., Yamamura, T., Ichii, S., Fujita, S., Nakai, T., Utsonomiya, J., 1988, The effects of sodium valproate on plasma somatostatin and insulin in humans, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 67, 1060-1063.

Ledwożyw, A., Michalak, J., Stępień, A., & Kądziołka, A., 1986, The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis, *Clinica Chimica Acta*, 155, 275-283.

Levin, T.L., Berdon, W.E., Seigle, R.R., & Nash, M.A., 1997, Valproic-acid-associated pancreatitis and hepatic toxicity in children with endstage renal disease, *Pediatric Radiology*, 27, 192-193.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods in Enzymology*, 186, 464-478.

Lingrel, J., Moseley, A. M. Y., Dostanic, I. V. A., Cougnon, M., He, S., James, P., Woo, A., O'Connor, K., Neumann, J., 2003, Functional roles of the α isoforms of the Na, K-ATPase, *Annals of The New York Academy of Sciences*, 986, 354-359.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118-126.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951, Protein measurment with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Löscher, W., 1999, Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action, *Progress in Neurobiology*, 58, 31-59.

Lv, L., Sun, Y., Han, X., Xu, C. C., Tang, Y. P., Dong, Q., 2011, Valproic acid improves outcome after rodent spinal cord injury: potential roles of histone deacetylase inhibition, *Brain Research*, 1396, 60-68.

Masuda, T., Shimazawa, M., Hara, H., 2017, Retinal diseases associated with oxidative stress and the effects of a free radical scavenger (Edaravone). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-14.

McElroy, S.L., Keck, P.E., 1989, Valproate in psychiatric disorders: Literature review and clinic guidelines, *The Journal of Clinical Psychiatry*, 50, 23-29.

Mirza, R., Sharma, B., 2019, Beneficial effects of pioglitazone, a selective peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonist in prenatal valproic acid-induced behavioral and biochemical autistic like features in Wistar rats, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 76,6-16.

Mitchell, J.B., Russo, A., 1987, The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity, *The British Journal of Cancer*, 8, 96-104.

Mylroie, A.A., Collins, H., Umbles, C., Kyle, J., 1986, Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 82, 512-520.

Nalivaeva, N.N., Belyaev, N.D., & Turner, A.J., 2009, Sodium valproate: an old drug with new roles, *Trends in Pharmacological Sciences*, 30, 509-514.

Ourique, G.M., Saccol, E.M.H., Pês, T.S., Glanzner, W.G., Schiefelbein, S.H., Woehl, V.M., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., Gonçalves, P.B.D., Barreto, K.P., 2016, Protective effect

of vitamin E on sperm motility and oxidative stress in valproic acid treated rats, *Food and Chemical Toxicology*, 95,159-167.

Ovalle, W. K., & Nahirney, P.C., 2009, *Netter Temel Histoloji*. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (çeviren). Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 304-306.

Özden C, Özdal Ö. L., Koyuncu H.H., Seçkin S., Memiş A., 2007, Farklı histopatolojili iki taraflı eş zamanlı testis, tümörü: olgu sunumu, *Türk Üroloji Dergisi*, 33, 238-240.

Palmer, N.O., Bakos, H.W., Fullston, T., Lane, M., 2012, Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition, *Spermatogenesis*, 2, 253-263.

Perucca, E., 2002, Pharmacological and therapeutic properties of valproate, *Central Nervous System Drugs*, 16, 695-714.

Pratibha, R., Sameer, R., Rataboli, P. V., Bhiwgade, D. A., Dhume, C. Y., 2006, Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats, *European Journal of Pharmacology*, 532, 290-293.

Qin, T., Lei, L. Y., Li, N., Shi, F. R., Chen, M. H., Xie, L., 2016, Edaravone improves survival and neurological outcomes after CPR in a ventricular fibrillation model of rats, *The American Journal of Emergency Medicine*, 34, 1944-1949.

Ridderstap, A. S., Bonting, S. L., 1969, Na^+-K^+-activated ATPase anc exocrine pancreatic secretion in vitro, *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 217, 1721-1727.

Richterich, R., Colombo, J.P., 1978, *Klinische Chemie: Theorie, Praxis, Interpretation*, Fourth Edition, S. Karger, Basel.

Roh, M.I., Murakami, Y., Thanos, A., Vavvas, D.G., Miller, J.W., 2011, Edaravone, an ROS scavenger, ameliorates photoreceptor cell death after experimental retinal detachment, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 3825-3831.

Rugino, T. A., Janvier, Y. M., Baunach, J. M., Bilat, C. A., 2003, Hypoalbuminemia with valproic acid administration, *Pediatric Neurology*, 29, 440-444.

Rushworth, G.F., Megson, I.L., 2014, Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits, *Pharmacology & Therapeutics*, 141, 150-159.

Schilling, M.A., Inman, S.L., Morford, L.L., Moran, M.S., Vorhees, C.V., 1999, Prenatal phenytoin exposure and spatial navigation in offspring: effects on reference and working memory and on discrimination learning, *Neurotoxicology and Teratology*, 21, 567-578.

Schmalzing, G., Ruhl, K., Gloor, S. M., 1997, Isoform-specific interactions of Na, K-ATPase subunits are mediated via extracellular domains and carbohydrates, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 1136-1141.

Schmidt, D., 1984, Adverse effects of valproate. *Epilepsia*, 25, S44-S49.

Sezer, K., Keskin, M., 2014, Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veterinerlik Dergisi*, 28(1), 49-56.

Shan, X.Q., Aw, T.Y., Jones, D.P., 1990, Glutathione-dependent protection against oxidative injury, *Pharmacology and Therapeutics*, 47, 61-71.

Sharma, S., Sharma, V., Pracheta, S.S.H., 2011, Therapeutic potential of hydromethanolic root extract of Withania somnifera on neurological parameters in swiss albino mice subjected to lead nitrate, *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3, 52–56.

Sharony, R., Garber, A., Viskochil, D., Schreck, R., Platt, L. D., Ward, R., Buehler, B.A., Graham J.M. Jr., 1993, Preaxial ray reduction defects as part of valproic acid embryofetopathy, *Prenatal Diagnosis*, 13, 909-918.

Stadtman, E. R., 2001, Protein oxidation in aging and age related diseases, *Annals of The New York Academy of Sciences*, 928, 22-38.

Szasz, G., 1969, A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase, *Clinical Chemistry*, 15, 124-136.

Sztajnkrycer, M.D., 2002, Valproic acid toxicity: overview and management, *Journal of Toxicology Clinical Toxicology*, 40, 789-801.

Tietz N.W., 1986, *Textbook of Clinical Chemistry*, First Edition, WB Saunders Company, Philadelphia.

Toprak, Ç., 2010, *Çocuk Nöroloji Hastalarının Sosyodemografik Özellikleri*, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır.

Tremellen, K., 2008, Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective, *Human Reproduction Update*, 14, 243-258.

Tsuruma, K., Yamauchi, M., Inokuchi, Y., Sugitani, S., Shimazawa, M., Hara, H., 2012, Role of oxidative stress in retinal photoreceptor cell death in N-methyl-N-nitrosourea–treated mice, *Journal of Pharmacological Sciences*, 118, 351-362.

Tunca Z, Özerdem A., 2010, *Duygudurum Dengeleyici İlaçlar. Temel Psikofarmakoloji*, Editör: N. Yüksel, Türkiye Psikiyatri Derneği Yayınları Ankara, 2010, pp. 729-732.

Türedi, S., Yuluğ, E., Alver, A., Kutlu, Ö., Kahraman, C., 2015, Effects of resveratrol on doxorubicin induced testicular damage in rats, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67, 229-235.

Uygur, R., Aktas, C., Tulubas, F., Uygur, E., Kanter, M., Erboga, M., Caglar, V., Topcu, B., Ozen, O.A., 2014, Protective effects of fish omega-3 fatty acids on doxorubicin-induced testicular apoptosis and oxidative damage in rats, *Andrologia*, 46, 917-926.

Uysal, S., Ercan, T., 2005, Epilepsi, spor, psikososyal yaşam, *Türk Pediatri Arşivi,* 40, 68-71.

Ünal, A., Saygı, S., 2005, Epilepsi Hastalarında Görülen Psikiyatrik Bozukluklar, *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Science,* 1, 40-45.

Vajda, F.J., Eadie, M.J., 2014, The clinical pharmacology of traditional antiepileptic drugs. *Epileptic Disorders*, 16, 395-408.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.

Vardi, N., Parlakpinar, H., Ates, B., Cetin, A., Otlu, A., 2009, Antiapoptotic and antioxidant effects of β-carotene against methotrexate-induced testicular injury, *Fertility and Sterility*, 92, 2028-2033.

Vorhees, C.V., Rauch, S.L., Hitzemann, R.J., 1991, Prenatal valproic acid exposure decreases neuronal membrane order in rat offspringhippocampus and cortex, *Neurotoxicology and Teratology*, 13, 471–474.

Walter, K., Schutt, C., 1974, *Acid and alkaline phosphatase in serum (two point method)*, In Method of Enzymatic Analysis, vol 2, *Verlag Chemie GmbH*, Boca Raton, FL, 856-860.

Weisenburger, W.P., Minck, D.R., Acuff, K.D., Vorhees, C.V., 1990, Dose-response effects of prenatal phenytoin exposure in rats: effects on earlylocomotion, maze learning, and memory as a function of phenytoin-induced circling behavior, *Neurotoxicology and Teratology*, 12, 145–152.

Welsch, U., 1999. *Sobotta histoloji*, (Çev., Erbengi, T., Örs, Ü., Güven, C., Şatıroğlu G., Tekelioğlu, M.) 5. Baskı, Beta Yayıncılık,

Wendel, A., 1981, Glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology*, 77, 325-333.

Woo, A.L., James, P.F., Lingrel, J.B., 2000, Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 20693–20699.

Yamamoto, Y., Kuwahara, T., Watanabe, K., Watanabe, K., 1996, Antioxidant activity of 3methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 5, 333–338.

Yang, K., Bearman, R.M., Pangalis, G.A., Zelman, R.J., Rappaport, H., 1982. Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes, *American Journal of Clinical Pathology*, 78, 141-149.

Yavaş, G., 2010, *Toluen inhalasyonuna bağlı olarak sıçanlarda testis ve epididimiste meydana gelen yapısal değişikliklere vitamin C'nin etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi, Ankara.

Yuan, Y., Zha, H., Rangarajan, P., Ling, E.A., Wu, C., 2014, Anti-inflammatory effects of edaravone and scutellarin in activated microglia in experimentally induced ischemia injury in rats and in BV-2 microglia, *Biomedcentral Neuroscience*, 15, 125-127.

Yuluğ, E., Türedi, S., Alver, A., Türedi, S., Kahraman, C., 2013, Effects of resveratrol on methotrexate-induced testicular damage in rats, *The Scientific World Journal*, 2013, 1-6.

Zikrin, B. R., Chen, H., 2000, Regulation of leydig cell steroidogenic function during aging, *Biology of Reproduction*, 63, 977-981.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Çağrı ÇELİK
Doğum Yeri	Fatih
Doğum Tarihi	07.03.1988
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
Telefon	532 746 88 88
E-Posta Adresi	cagricelik77@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik Fakültesi
Bölümü	Kimya
Mezuniyet Yılı	2017

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Enstitü Adı	Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	Biyokimya Programı

Makale ve Bildiriler
C. Celik, B. B. Bayrak, N. Hacihasanoglu Cakmak, R. Yanardag, 2018,Effect of edaravone on valproic

acid induced testis injury in rats, 1st International Symposium on Graduate Research in Science Focus on Entrepreneurship and Innovation (ISGRS 2018), 4-6 October 2018, Istanbul/Turkey, pp.224