

## SİÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI TESTİS HASARI ÜZERİNDE SHİLAJİTİNİN HİSTOPATOLOJİK ETKİLERİ

Sıçanlarda Metotreksata Bağlı Testis Hasarında Shilajit'in Histopatolojik Etkileri

Eray GÜVEN<sup>1</sup>, Züleyha ERİŞGİN<sup>2</sup>, Yavuz TEKELİ OĞLU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD.

<sup>2</sup>Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD.

### ÖZ

**AMAÇ:** Günümüzde antimetabolit grubunun kullanılmayan tek formu olan Metotreksat (MTX) meme, mesane ve testis kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada da MTX kullanımıyla ilgili, testiste oluşan histopatolojik değişikliklere karşı Shilajit'in (PS) etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Yirmi dört adet Sprague Dawley erkek sıçan 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmamıştır. MTX grubuna, tek doz intraperitoneal (i.p.) 20 mg/kg MTX, MTX+PS grubuna deney süresinin (7 gün) ilk gününde tek doz i.p. 20 mg/kg MTX ve MTX verilmeyen 15 dk önce 2 ml/kg distile suda 100 mg/kg PS çözülerek gavaj yoluyla verildi. İlk günü takiben gün aşırı, toplamda üç kez olacak şekilde 2 kez daha 2 ml/kg distile suda 100 mg/kg PS çözülerek gavaj yoluyla verildi. PS grubuna, ilk gün ve akabinde gün aşırı toplamda üç kez olacak şekilde sadece 2 ml/kg distile suda 100 mg/kg PS çözülerek gavaj yoluyla verildi. Yedinci günün sonunda, hayvanların tümü sakrifiye edilerek sol testisleri alındı. Testis dokusu örnekleri ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirildi.

**BULGULAR:** Gruplar arası, vücut ve testis ağırlıkları karşılaştırıldı. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ). Histopatolojik değerlendirilmede; MTX grubunda seminifer tübül çapında ve tübül epitel kalınlığında anlamlı derecede azalma gözlenirken ( $p<0.04$ ), MTX+PS grubunda MTX grubuna göre seminifer tübül çapında ve tübül epitel kalınlığında azalmanın daha az olduğu gözlemlendi ( $p<0.04$ ). Morfolojik değerlendirilmede; MTX grubuna ait testis kesitlerinde, lümeninde olgunlaşmamış seminifer tübül epitel hücreleri ve spermatozoa azlığı, seminifer tübül epitelinde ve bazal membranda düzensizlikler ve interstisyel alanda ödem izlendi. MTX+PS grubuna ait testis kesitlerinde ise, seminifer tübül epitelinde düzensizlik olan ve lümenine olgunlaşmamış seminifer tübül epitel hücrelerinin dökmüş olduğu birkaç tübül dişi şeklinde her hangi bir patolojiye rastlanmadı.

**SONUÇ:** Bulgularımız, MTX'in testis dokusunda hasar meydana getirdiğini ve PS uygulamasının bu hasarı önemli ölçüde düzeltebileceğini göstermektedir. Sonuç olarak PS'nin, MTX tedavisinde oluşan testis hasarını önlenmesinde yararlı olabileceğini düşünebiliriz.

**ANAHTAR KELİMELER:** Metotreksat, Shilajit, Sıçan, Testis

**AMAÇ:** Antimetabolit grubunun sadece formunu kullanan metotreksat meme, mesane ve testis kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Shilajit'in (PS) Metotreksat (MTX) ile indüklenen testis hasarındaki etkilerini histopatolojik olarak incelemeyi amaçladık.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Yirmi dört Sprague Dawley erkek rat dört gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu tedavi edilmedi. Grup MTX tek doz intraperitoneal (ip) 20 mg/kg MTX'e, Grup MTX+PS 15 dakika önce gava-ge ile 2ml/kg salin içinde 100 mg/kg PS'ye ve ardından tek doz ip 20 mg'a maruz bırakıldı. /kg MTX. İlk PS dozundan sonra, deney boyunca (7 gün) gün aşırı aynı dozda iki kez verildi. Grup PS, sonda ile 2 ml/kg salin içinde sadece 100 mg/kg PS'ye maruz bırakıldı. Deney sonunda (7. gün) tüm hayvanlar sakrifiye edildi ve sol testisleri alındı.

Testis dokusu örnekleri ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirildi.

**BULGULAR:** Tüm gruplar kendi aralarında testis ve vücut ağırlıkları na göre karşılaştırıldı. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p>0.05$ ). Histopatolojik değerlendirilmede; seminifer tübüllerin çap ve epitel kalınlığında Grup MTX'te anlamlı olarak azaldı ( $p<0.04$ ) ve Grup MTX+PS'de Grup MTX'e göre azalma daha azdı ( $p<0.04$ ). Morfolojik değerlendirilmede; Grup MTX'te olgunlaşmamış tübül epitel hücreleri, lümeninde sperm miktarında azalma, tübül epitel ve bazal membranda düzensizlikler ve interstisyel boşlukta ödem gözlemlendi. Grup MTX+PS'de seminifer tübüllerinde düzensizlik ve immatür tübül epitel hücrelerini temsil eden birkaç tanesi dişi şeklinde patolojik değişiklik gözlemlendi.

**SONUÇ:** Bulgularımız, (MTX) testis hasarına neden olabileceğini ve PS tedavisinin bu hasarı önleyebileceğini gösterdi. Sonuç olarak PS, MTX tedavisi sonrası testis hasarını önlenmesinde faydalı olabilir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Methotrexate, Shilajit, Rat, Testis

giriş

Kanser tedavisinde kullanılan en etkili tedavi yöntemlerinden biri kemoterapidir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar çoklu organ sistemlerinde akut toksik yan etkiler oluşturmaktadır. Gastrointestinal sistemde, merkezi sinir sisteminde ve hematolojik tablo üzerinde yan etkileri bilinmektedir. Ayrıca, kemoterapide sık olarak görülen gonadal hasar, anti-kanser ajanlarının potansiyel yan etkileri arasında yer almaktadır (1, 2). Metotreksat (MTX), hücre bölünmesini inhibe ettiği için uzun yıllardır anti-kanser ilacı olarak kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır (3, 4). Dihidro folat redüktaz enzimini inhibe eden MTX; DNA, RNA ve ATP sentezinde gerekli olan tetrahidrofolat (THF) sentezini durdurarak timidinilat, pürin nükleotidleri ve aminoasitlerin sentezinde azalmaya neden olur. Böylece nükleik asit ile protein metabolizmasını önler (5). Ayrıca bir folik asit antagonisti olan MTX, oksidatif stres sonucu organ toksisitesine neden olabilir (3, 4).

Kanserli erkek hastalarda, tedavi sonucu hasar gören fertilité üzerinde durulması gereken bir durumdur. Kemoterapi sonucu artan serbest radikaller, testis dokusunda hasara neden olmakta ve spermatogenez olumsuz yönde etkilemektedir. Erkek bireylere MTX uygulaması, artan oksidatif stres neticesinde testis ve üreme hücrelerinin yapısında hasar oluşturabilmekte ve bu hasar infertiliteye yol açmaktadır (6, 7, 8). MTX tedavisi almış bir erkek bireyde, testiküler hasar oluşarak başta oligospermi oluşmakta, spermatogenez ve fertilité zarar görmektedir (9-12). Son yıllarda doğal ürünlere olan ilginin artması ve tıbbi özelliklerinin incelenmeye başlamasıyla beraber birçok doğal ürün gibi Shilajit de (PS) araştırma konusu olmuştur. PS aynı zamanda salajit, shilajatu, mumie ya da mummiyo olarak da adlandırılmaktadır. Özellikle Hindistan yarımadasındaki Himalaya dağ dizilerinde 0.6 km ile 5 km arasındaki yüksekliklerinde bulunan kaya katmanlarından süzülüp ve değışken kıvam gösteren soluk siyahımsı kahverengi bir sıvıdır. PS, doğal habitatının kaya rizosferlerindeki mikrobiyal metabolitler ile bitki ve organik humuslu maddelerin kompleks bir karışımından oluşmaktadır ve birçok ülkede binlerce yıldır geleneksel tıbbi sistemlerinin (Ayurveda) bir parçası olarak kullanılmaktadır (13).

Özellikle PS ile ilgili yapılan bir çalışmada, PS'nin toplam sperm sayısı, sperm hareketini, serum testosteron, follikül stimülan hormon (FSH) ve spermatogenezin başlaması ve devamı için gerekli olan lüteinizan hormon (LH) seviyesini önemli derecede artırdığı gösterilmiştir (14). PS serbest radikal seviyesinin baskılanması üzerine de önemli derecede katkı yapmaktadır. Polimerizasyona neden olan hidroksil radikallerine karşı, metil metakrilat korumasını sağladığı ve etkili bir biçimde nitrik oksit serbest radikallerinin etkisini azalttığı ifade edilmiştir (13-16). Çalışmamızda, antioksidan özelliği olan PS'nin, kemoterapi tedavisi almış olan erkek bireylerin üreme sisteminde oluşabilecek yan etkilerin önlenmesinde, sağlayacağı katkıları açısından incelenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Deney Hayvanları ve Etik Kurul

Çalışmamız, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra başlatıldı (Tarih: 15.01.2013, Sayı : 5). KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlanan, 24 adet Sprague Dawley erkek sıçan (6 haftalık, 150-200 gr) kullanıldı. Hayvanlar KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezinde, tip III kafeslerde, 22±2 °C sıcaklıkta, % 50±5 ortalama nem, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde sağlandı. Ortamda, içme suyu olarak çeşme suyu verilerek, standart sıçan yemi ile beslenildi.

### Deney Prosedürü

Deney grupları ve verilen madde miktarları aşağıda özetlenmiştir (Tablo 1):

Tablo 1: Deney grupları ve verilen madde miktarları

Gruplar	Uygulama	Denek Sayısı
1. Grup Kontrolü	Herhangi bir uygulamaya tabii değildir.	6
2. MTX Grubu	Tek dozi, p. 20mg/kg MTX	6
3. MTX+PS Grubu	Tek dozi, p. 20mg/kg MTX + 100mg/kg PS (gavaj yoluyla)	6
4. PS Grubu	100mg/kg PS (gavaj yoluyla)	6

MTX: Metotreksat  
Not: Şilajit

Yedinci günün sonunda, deney hayvanları derin anestezik (Ketamin 50 mg/kg) altında sol testisleri

alı ndı ktan sonra kansı zlaştı rma yöntemi ile sak rifiye edildi. Çı karı lan testislerin ağ ı rlı kları has sas terazide ölçüldü ve vertikal olarak 2'ye bö lünerek histolojik incelemeler için Bouin tespit solüsyonuna alı ndı . Fiksasyon solüsyonunda 72 saat bekletilen dokular, artan alkol serilerinden ve ksilol'den geçirilerek doku takibi işleminden sonra parafin blok haline getirildi. Parafin blok lardan (tam otomatik mikrotom, LEICA RM 2255, Almanya) 4µm'lik kesitler alı narak, hematoksi len&ezoin ile boyandı . Hazı rlanan preparatlarda ortalama 10-12 seminifer tübülde, tübül çapı ve germinal epitel kalı nlı ğ ı Olympus DP 71 (Japan) kameralı ı şı k mikroskopunda (Olympus, BX51, Japan) Analysis 5 Research (Olympus Soft İma ging Solution, Germany) programı ile hesaplandı ve aynı mikroskopta spermatogenetik hücre ler ve interstisyel alanları n fotoğ rafları çekilerek değ erlendirme yapı ldı .

### İ statistiksel Analizler

SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 13.1, SSPs Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanı larak verilerin analizi yapı ldı . Her bir gruba ait sayı sal veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (SS) olarak verildi ve Kruskal Wallis varyans analizi (post hoc olarak Bonferroni dü zeltmeli Mann-Whitney U testi) ile karşı laştı rı ldı . Tüm karşı laştı rmalarda  $p < 0.05$  değ eri anlamlı kabul edilmiştir.

### BULGULAR

#### Vücut ve Testis Ağ ı rlı ğ ı na Ait Bulgular

Elde edilen istatistiksel verilere göre kontrol grubuna ait sı çanları n vücut ve testis ağ ı rlı kları diğ er gruplar ile karşı laştı rı ldı ğ ı nda istatistiksel açı dan anlamlı bir farklı lık bulunmadı (Tablo 2).

Tablo 2: Deneş Gruları nı n Vücut ve Testis Ağ ı rlı ğ ı na Ait Ortalama ve Standart Sapmalar

Gruplar	Vücut Ağ ı rlı ğ ı (gr)	Testis Ağ ı rlı ğ ı (gr)
Kontrol Grubu	228,17 $\pm$ 41,53	1,15 $\pm$ 0,23
MTX Grubu	187,17 $\pm$ 36,57	1,13 $\pm$ 0,20
MTX+PS Grubu	202,33 $\pm$ 21,77	1,20 $\pm$ 0,32
PS Grubu	216,50 $\pm$ 35,17	1,15 $\pm$ 0,16

MTX: Metotreksat  
Not: Şilajit

### Morfometrik Bulgular

Kontrol grubu ile PS grubu karşı laştı rı ldı ğ ı nda istatistiksel açı dan anlamlı bir fark bulunmazken, kontrol grubuna göre MTX grubunda seminifer tübül çapı nda ve germinal epitel kalı nlı ğ ı nda istatistiksel açı dan anlamlı derecede azalma gözlemlendi. MTX grubuna göre MTX+PS grubunda seminifer tübül çapı nda ve germinal epitel kalı nlı ğ ı nda istatistiksel açı dan azalmanın daha az oldu ğ u gözlemlendi (Tablo 3).

Tablo 3: Deneş Gruları na Ait Morfometrik Ölçümlerin Ortalama ve Standart Sapma Değ erleri

Gruplar	Seminifer TübülÇapı (µm)	Germinal EpitelKalı nlı ğ ı (µm)
Kontrol Grubu	273,72 $\pm$ 11,70	107,13 $\pm$ 2,79
MTX Grubu	200,77 $\pm$ 7,55	71,97 $\pm$ 3,65
MTX+PS Grubu	237,94 $\pm$ 6,26	96,86 $\pm$ 1,72
PS Grubu	263,51 $\pm$ 4,79	109,44 $\pm$ 4,73

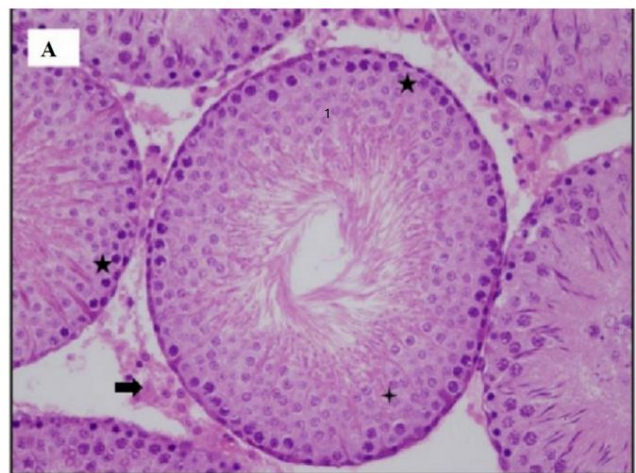
MTX: Metotreksat  
Not: Şilajit

<sup>a</sup> .MTX grubundakideğ erlerkontrolgrubunagö reanlamlı birşekildeazalmı ştı (p<0,04).

<sup>b</sup> .MTX+PSgrubundakideğ erlerMTXgrubunagö reanlamlı birşekildedahayüksektir (p<0,04).

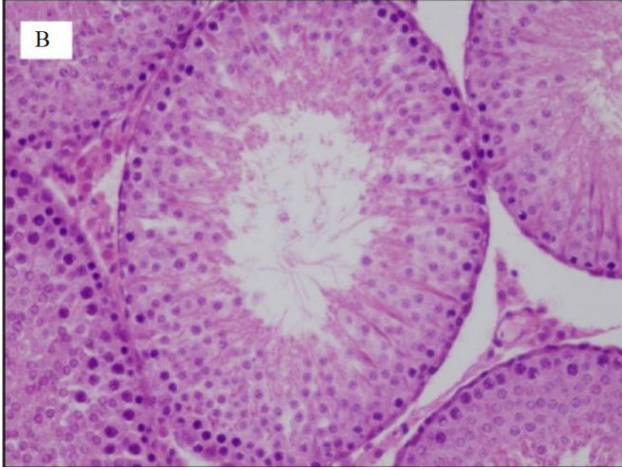
### Morfolojik Bulgular

Testiküler dokuya histopatolojik değ erlendirmede, Kontrol ve PS grupları nda, seminifer tübüllerin spermatogenik seriye ait hücreler ve interstisyel dokuda Leydig hücreleri ile normal yapı da oldu ğ u gözlemlendi ve değ erlendirme herhangi bir patolojiye rastlanmadı (Resim 1, 2). MTX grubunda ise, seminifer tübül lümeninde olgunlaşmamı ş germinal epitel hücreleri gözlemlendi. Ayrıca seminifer tübül lümeninde spermatozoa azlı ğ ı ,

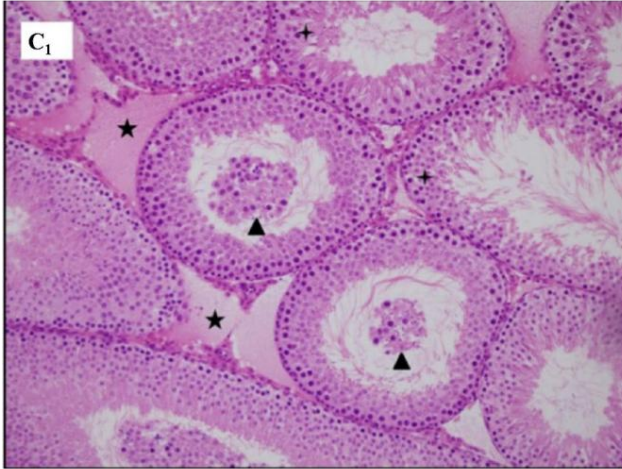


Resim 1. Kontrol grubuna ait normal yapı daki testis kesit görüntüsünde, (1), seminifer tübüller (★) spermatogenik seriye ait hücreler (●) ve (●) (interstisyel alandaki Leydig hücreleri (●) izlenmektedir (A; H&E, X400)

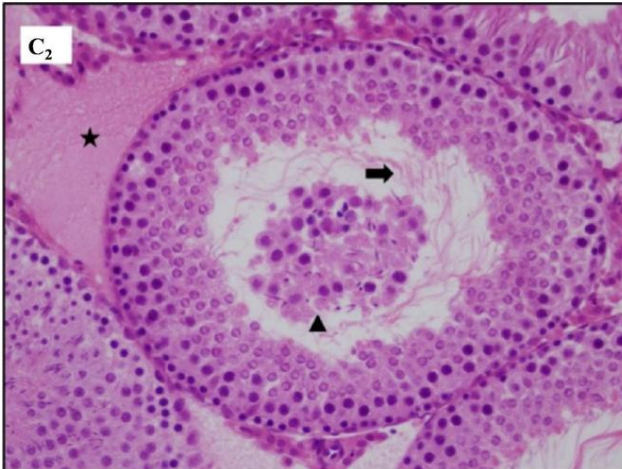
germinal epitelde ve seminifer tübül bazal membranında düzensizlikler, interstisyel alanda ödem gözlemlendi (Resim 3, 4). MTX+PS grubunda, germinal epitelde düzensizlik ve lümenine germinal epitel hücrelerinin dökülmüş olduğu birkaç tübül dışı lümeninde herhangi bir patolojiye rastlanmadı (Resim 5, 6).



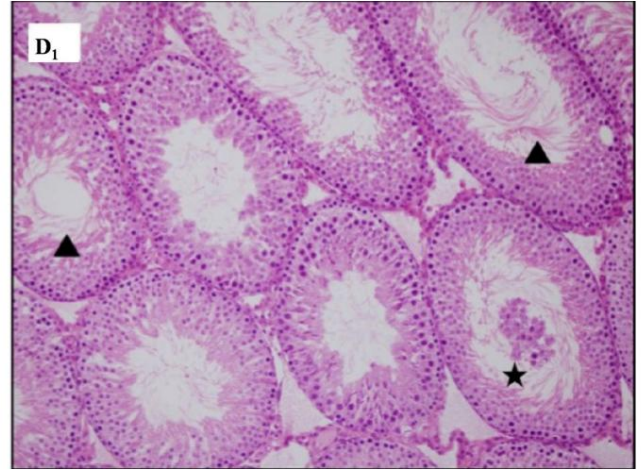
Resim 2. PS Grubuna ait testis kesit görüntüsünde seminifer tübüllerin histolojik yapısının kontrol grubuna benzer olduğu izlenmektedir (B; H&E, X400)



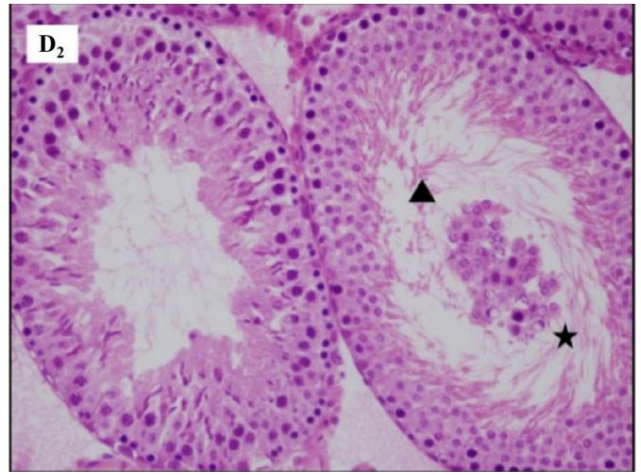
Resim 3. MTX grubuna ait testis kesit görüntüsünde, lümeninde olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri (▲), seminifer tübül germinal epitelinde düzensizlikler (●) ve interstisyel alanda ödem (\*) izlenmektedir (C1; H&E, X200)



Resim 4. MTX grubuna ait testis kesit görüntüsünde, lümeninde olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri (▲), lümen dışı epitelde dökülmüş hücreler (●) ve interstisyel alanda ödem (\*) izlenmektedir (C2; H&E, X400)



Resim 5. MTX+PS grubuna ait testis kesit görüntüsü, lümeninde spermatozoa yoğunluğu (▲) ve az sayıda lümeninde olgunlaşmamış germinal hücrelerin görüldüğü seminifer tübülleri (●) göstermektedir (D1; H&E, X400)



Resim 6. MTX+PS grubuna ait testis kesit görüntüsü, lümeninde spermatozoa yoğunluğu (▲) ve az sayıda lümeninde olgunlaşmamış germinal hücrelerin görüldüğü seminifer tübülleri (●) göstermektedir (D2; H&E, X400)

## TARTIŞMA

MTX, ALL, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, meme ve mesane gibi pek çok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan sitotoksik bir ilaçtır (17). Hücre siklusunu etkileyip, DNA prekürsörlerinin sentezini inhibe eden bu sitotoksik ilaçlar, testiküler doku gibi yüksek mitotik aktiviteye sahip organlar için ayrı bir risk arz etmektedir (4, 7). Erkek fertilitesi spermatozoyumlarının devamlı kendini yenilemesine ve spermatojenik hücrelere farklılaşmasına bağlı olduğundan, antikanser ilaçları testiküler dokuyu yapısal ve fonksiyonel olarak etkilemekte ve fertilité üzerine olumsuz etkileri olabilmektedir (1, 2). MTX'e bağlı toksisite gelişiminin, serbest oksijen radikalleri ve hidrojen peroksit ile ilişkilili olduğu gösterilmiştir (18). Son dönemlerde yapılan çalışmalarda, MTX ile oluşan org

sarı nı önlemek için melatonin, E vitamini gibi antioksidan ajanlar kullanılmı ştı r (19-21). Antik zamanlardan beri Ayurveda tı bbı nda en büyük keşiflerden biri olan PS' den de, erkek üreme bozuklukları nı n tedavisinde yararlanılmı ştı r. PS ile ilgili yapı lan bir çalı şmada PS'nin toplam sperm sayısı nı , sperm hareketini, serum testosteron seviyesini, FSH ve spermatogenezin başlaması ve devamı için gerekli olan LH seviyesini önemli derecede artı rdı ğ ı belirtilmiştir (13, 14). Biz de bu çalı şmada MTX' e dayalı testis hasarı nda bir antioksidan olarak bilinen PS'nin koruyucu etki sinin olup olmadı ğ ı nı araştı rdı k.

Çalı şmamı zda baktı ğ ı mız parametrelerden biri olan, MTX'in vücut ve testis ağı rlı ğ ı üzerine etkisine bakıldı ğ ı nda anlamlı bir azalmaya neden olmadı ğ ı görülmüştür. Bu bulgu Padmanabhan ve ark. ve Armağ an ve ark.'nı n bulguları nı des tekler nitelikteydi (1, 6). MTX'in testiküler doku üzerine yaptı ğ ı etkiye bakıldı ğ ı nda, daha önce ki çalı şmalar MTX'in seminifer tübül çapı nda ve germinal epitel kalı nlı ğ ı nda azalmaya neden oldu ğ u belirtilmiştir (22-24). Işı k ve ark.'nı n yapmı ş oldu ğ u bir çalı şmada MTX'in seminifer tübül membranı nda kalı nlaşmalara neden oldu ğ u, germ hücrelerinde maturasyon ve sı ralanma bozuklu ğ u oldu ğ u ve lümende spermatozoa azlı ğ ı ya da yoklu ğ u ifade edilmiştir (4). Koehler ve ark.'nı n yapmı ş oldu ğ u bir çalı şmada ise tavşanlarda kullanılan MTX'in tübüler bazal membranda kalı nlaşmalara neden oldu ğ u, spermatogonium sayısı nda azalma oldu ğ u ve var olan spermatogoniumlarda şişme meydana geldi ğ i ifade edilmiştir (22). Bayram ve ark.'nı n yapmı ş oldukları bir çalı şmada ise ratlarda kullanılan MTX'in oogeneze ve spermatogenezde bozukluklara neden oldu ğ u gösterilmiştir (12). Russel ve ark., Vardi ve ark., Daggulli ve ark.'nı n yapmı ş oldukları çalı şmaları MTX'in testis histolojisi ni bozdu ğ u belirtilmiştir (11, 25, 26). El-Sheikh ve ark. ise MTX'in serum testosteron seviyesini düşürdü ğ ünü, testiküler doku hasarı nı artı rdı ğ ı nı , tümör nekroz faktör- $\alpha$  seviyesini ve nükleer faktör- $\kappa$  B ve siklooksijenaz-2 ekspresyonunu artı rdı ğ ı nı bildirmiştir (5). Bizim çalı şmamı zda da MTX uygulaması nı n, testis seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalı nlı ğ ı nda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalmaya yol açtı ğ ı görül müştür. Ayrıca seminifer tübülün bazal membranı nda açılımlar, interstisyel alan

lümende olgunlaşmamı ş germ hücreleri gözlenmiştir. Bu morfolojik değ erlerdeki azalma ve morfolojik değ işikliklerin spermatogenez sürecini olumsuz etkileyebilece ğ i kanaatinde yiz. Bununla birlikte PS ile verilen MTX uygulaması nda, MTX grubu ile karşı laştı rıldı ğ ı nda, morfolojik değ erlerde anlamlı bir artış gö rülmüştür. Ayrıca, testis seminifer tübül lümeni birkaç olgunlaşmamı ş germ hücresi içerse de kontrol grubuna yakı n bir mikroskobik göster mektedir.

Sonuç olarak, MTX kullanımı na ba ğ lı testiküler dokuda histopatolojik hasar oluşmakta ve bu hasar kı smen antioksidan karakterli PS kullanımı ile önlenmektedir. Ancak çalı şmamızı n sonuçları nı n desteklenebilmesi açısı ndan farklı doz ve sürelerde yeni çalı şmaları nı yapı lması ge rekemektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Farelere germ hücrelerinde metotreksat'ın neden oldu ğ u sitotoksikite ve genotoksikite: folik ve folinik asidin müdahalesi. *Mutas Res* 2009; 673(1): 43-52.
2. Kim JC, Kim KH, Chung MK. Sı çanlarda yeni bir antrasiklin antikanser ajanı olan DA-125'in testiküler sitotoksitesisi. *Üreme Toxicol* 1999; 13: 391-7.
3. Şener G, Demiralp EE, Çetiner M, Ercan F, Yeğ en BÇ. B-glukan, antioksidan ve immünomodülatör etkileri yoluyla metotreksat'ın neden oldu ğ u oksidatif organ hasarı nı iyileştirir. *Eur J Pharmacol*. 2006; 542: 170-8.
4. Işı k A, Işı lay L, Erdemli EA, Akbay C, Anafarta K. Sı çan testisinde metotreksat'ın ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 1997; 50: 3.
5. Azza AK El-Sheikh, Mohamed A. Morsy, Abdulla Y. Al-Taher. Çok ilaca dirençli protein (Mrp) 3, metotreksat'ın neden oldu ğ u testis hasarı na karşı resveratrol koruması nda yer alabilir. *Yaşam Bilimleri*. 2014; 119(1-2): 40-46
6. Armağ an A, Uzar E, Uz E ve ark. Kafeik asit fenetil ester, testislerde metotreksat'ın neden oldu ğ u oksidatif stresi modüle eder fare. *Hum Exp Toksikol* 2008; 27: 547-552.
7. Ateşşahin A, Şahna E, Türk G ve ark. Sı çanlarda sisplatin kaynaklı testiküler toksisiteye karşı melatoninin kemoprotektif etkisi. *J Pineal Res*. 2006; 41: 21-7.
8. Ateşşahin A, Karahan İ , Türk G, Gür S, Yılmaz S, Çeribaşı A. Sı çanlarda sperm özelliklerinde sisplatin kaynaklı değ işiklikler, testis hasarı ve oksidatif stres üzerinde likopenin koruyucu rolü. *Toksikol ço ğ altı n*. 2006; 21: 42-7.
9. Sussman A, Leonard JM. Sedef hastalı ğ ı , metotreksat ve oligospermi. *Arch Dermatol* 1980; 116: 215-217.

10. Morris LF, Harrod MJ, Menter MA ve Silverman AK. Erkeklerde metotreksat ve üreme: olgu sunumu ve öneriler. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29: 913-916.
11. Vardı N, Parlakpınar H, Ateş B, Çetin A, Otlı A. Betakarotenin metotreksata bağlı testis yaralanması na karşı antiapoptotik ve antioksidan etkileri. *Fertil Steril* 2009; 92: 2028-2033.
12. Bayram M, Ozogul C, Dursun A, Ercan ZS, Isik I, Dilekoz E. Metotreksatın endosalpenks üzerindeki etkilerinin ışık ve elektron mikroskopu ile incelenmesi. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 120: 96-103.
13. Agarwal SP, Khanna R, Karmarkar R, Anwer MK, Khar RK. Shilajit: Bir İnceleme. *Fitoterapi Arş.* 2007; 21: 401-405.
14. Biswas TK, Pandit S, Mondal S ve ark. Oligospermide işlenmiş Shilajit'in spermatojenik aktivitesinin klinik değerlendirilmesi. *Androloji.* 2010; 42(1): 48-56.
15. Park JS, Kim GY, Han K. Sıçanlara kronik olarak uygulanan Shilajit'in spermatojenik ve ovojenik etkileri. *J Ethno Pharmacol* 2006; 107: 349-353.
16. Aiello A, Fattorusso E, Menna M, Vitalone R, Schröder HC, Müller WE. Mumijo Geleneksel Tıbbi: Antarktika'dan Fosil Tortuları (Kimyasal Bileşim ve Faydalı Biyoaktivite). *Kanıta Dayalı Tıbbın Alternatif Med.* 2011;738131.
17. PJ Hashkes, ML Becker, DA Cabral, RM Laxer, AS Paller, CE Rabinovich, et al. Methotrexate: eski bir ilaç için yeni kullanımlar. *J. Pediatr.* 2014; 164: 231-236.
18. Hess JA, Khasawneh MK. Kanser metabolizması ve oksidatif stres: Metotreksatın dihidrofolat olmayan redüktaz etkileri yoluyla karsinogenez ve kemoterapiye ilişkin görüşler. *BBA Kliniği.* 2015; 7(3):152-61.
19. Muralikrishnan G, Amalan Stanley V, Sadasivan Pillai K. C vitamininin lipid profili üzerindeki ikili rolü ve fibrosarkom taşıyan sıçanlarda siklofosamid, metotreksat ve 5-fluorourasil tedavisinin kombine uygulaması. *kanser Letonya* 2001; 169 (2): 115-20.
20. Ökten F, Yılmaz HR, Özgüner F ve ark. Sıçanlarda metotreksatın neden olduğu renal oksidatif stres: yeni bir antioksidanın rolü kafeik asit fenetil ester. *Toksikol End Sağlığı.* 2006; 22(6): 241-7.
21. Jahovic N, Çevik H, Şehirli AO, Yeğen BC, Şener G. Melatonin, ratlarda metotreksata bağlı hepatorenal oksidatif hasarı önler. *J Pineal Res.* 2003; 34(4): 282-7.
22. Köhler M, Vvaldherr R, Ludvwig RL. MTX'in Tavşan Testisleri Üzerindeki Etkileri. Bölüm 1: Morfolojik Değişiklikler. *Pediatr Hemat Oncol* 1986; 3(4): 335-41.
23. Shrestha S, Dhungel S, Saxena AK, Bhattacharya S, Maskey D. Metotreksat (MTX) uygulamasının spermatojenik üzerindeki etkisi: hayvan modeli üzerinde deneysel. *Nepal Med Coll J.* 2007; 9(4): 230-3.
24. Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M. Sıçanlarda metotreksatın neden olduğu testiküler disfonksiyon üzerinde büyüme hormonunun etkisi. *Androloji.*2009; 41(2): 105-10.
25. Russell LD, Russell JA. Sıçan testisinin beş kemoterapötik ajanın uygulanması na kıssa süreli morfolojik tepkisi. *Ben J Anat.* 1991; 192(2): 142-68.
26. Dağgözü M, Dede O, Utangaç MM ve ark. H. Sıçanlarda metotreksatın neden olduğu testiküler toksisiteye karşı karvakrolün koruyucu etkileri. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7(12): 5511-5516.