

SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI TESTİS HASARI ÜZERİNE SHILAJİTİNİN HİSTOPATOLOJİK ETKİSİ

HISTOPATHOLOGICAL EFFECTS OF SHILAJIT ON METHOTREXATE INDUCED TESTICULAR DAMAGE IN RATS

Eray GÜVEN¹, Züleyha ERİŞGİN², Yavuz TEKELİOĞLU¹

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD.

²Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD.

ÖZ

AMAÇ: Günümüzde antimetabolit grubunun kullanılan tek formu olan Metotreksat (MTX) meme, mesane ve testis kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada MTX kullanımına bağlı, testiste oluşan histopatolojik değişikliklere karşı Shilajitin (PS)'in etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Yirmi dört adet Sprague Dawley erkek sıçan 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. MTX grubuna, tek doz intra peritoneal (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 verilmeden 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 doku örnekleri ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirildi.

BULGULAR: Gruplar arası, vücut ve testis ağırlıkları karşılaştırıldığında kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Histopatolojik değerlendirmede; 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 ki azalmanın daha az olduğu gözlemlendi ($p<0.04$). Morfolojik değerlendirmede; MTX grubuna ait testis kesitlerinde, lümende olgunlaşmamış seminifer tübülepitel hücreleri ve spermatozoa azlığı, seminifer tübül epitelinde ve bazal membranında 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 dökülmüş olduğu birkaç tübül dışında herhangi bir patolojiye rastlanmadı.

SONUÇ: Bulgularımız, MTX'in testiküler dokuda hasar meydana getirdiğini ve PS uygulamasının bu hasarı önemli ölçüde düzelterebileceğini göstermektedir. Sonuç olarak PS'nin, MTX tedavisinde oluşan testis hasarının önlenmesinde yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.

ANAHTAR KELİMELER: Metotreksat, Shilajit, Sıçan, Testis

ABSTRACT

OBJECTIVE: Methotrexate, only using form of antimetabolite group, has been used for breast, bladder and testicular cancer treatment. In this study, we aimed to examine histopathologically the effects of Shilajit (PS) on Methotrexate (MTX) induced testis damage.

MATERIALS AND METHODS: Twenty four Sprague Dawley male rats were divided up four groups. Control group was not treated. Group MTX was exposed to a single dose intraperitoneal (i.p.) 20 mg/kg MTX, Group MTX+PS was exposed to 100 mg/kg PS in 2ml/kg saline by gavage before 15 minutes and then a single dose i.p. 20 mg/kg MTX. After first dosage of PS, it was given at the same dosage two times at the every other day during the experiment (7days). Group PS was exposed to only 100 mg/kg PS in 2ml/kg saline by gavage. At the end of experiment (7th day), all animals were sacrificed and left testises were taken. Testicular tissue samples were evaluated as histopathologically on the light microscope.

RESULTS: When all groups compared with each other according to testicular and body weights, there was no statistically significant difference between all groups ($p>0.05$). At the histopathological evaluation; the diameter and epithelial thickness of seminiferous tubules significantly decreased in Group MTX ($p<0.04$) and reduction was less in Group MTX+ PS compared with Group MTX ($p<0.04$). At the morphological evaluation; immature tubular epithelial cells, decreasing of sperm amount in the lumen, irregularities in the tubule epithelium and in the basal membrane, and edema in the interstitial space were observed in Group MTX. It was observed no pathological changes in the seminiferous tubules except a few ones that represented irregularities and immature tubular epithelial cells in Group MTX+ PS.

CONCLUSION: Our results showed that (MTX) might give rise to testicular damage and the treatment of PS may prevent this damage. As a result, PS may be useful for the prevention of testicular damage after MTX treatment.

KEYWORDS: Methotrexate, Shilajit, Rat, Testis

GİRİŞ

Kanser tedavisinde kullanılan en etkili tedavi yöntemlerinden biri kemoterapidir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar çoklu organ sistemlerinde akut toksik yan etkiler oluşturmaktadırlar. 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 timidilat, 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 önemle üzerinde durulması gereken bir durumdur. Kemoterapi sonucu artan serbest radikaller, testis dokusunda hasara neden olmakta ve spermatogenezi 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 sızan ve değişken kıvam gösteren soluk siyahımsı kahverengi bir sıvıdır. PS, doğal habitatın kaya rizosferlerindeki mikrobiyal metabolitler ile bitki ve organik humuslu maddelerin kompleks bir karışımından oluşmaktadır ve birçok ülkede binlerce yıldır geleneksel tıp sistemlerinin (Ayurveda) bir parçası olarak kullanılmaktadır (13). Modern

tıpta PS ile ilgili yapılan bir çalışmada, PS'nin toplam sperm sayısını, sperm hareketini, serum testosteron, follükül stimulan 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 radikale 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 katkılar 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 sıcaklık, % 50±5 ortalama nem, 12 saat aydınlık/ karanlığın sağlandığı ortamda, içme suyu olarak çeşme suyu verilerek, standart sıçan yemi ile beslendi.

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. Kontrol Grubu	Herhangi bir uygulama yapılmadı.	6
2. MTX Grubu	Tek doz i.p. 20mg/kg MTX	6
3. MTX + PS Grubu	Tek doz i.p. 20mg/kg MTX + 100mg/kg PS (gavaj yoluyla)	6
4. PS Grubu	100mg/kg PS (gavaj yoluyla)	6

MTX: Metotreksat
PS: Shilajitin

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

alındıktan sonra kansızlaştırma yöntemi ile sakrifiye edildi. Çıkarılan testislerin ağırlıkları hassas terazide ölçüldü ve vertikal olarak 2'ye bölünerek histolojik incelemeler için Bouin tespit solüsyonuna alındı. Fiksasyon solüsyonunda 72 saat bekletilen dokular, artan alkol serilerinden ve ksilol'den geçirilerek doku takibi işleminden sonra parafin blok haline getirildi. Parafin bloklardan (tam otomatik mikrotom, LEICA RM 2255, Almanya) 4µm'lik kesitler alınarak, hematoksi-len&ezin ile boyandı. Hazırlanan preparatlarda ortalama 10-12 seminifer tübülde, tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskobunda (Olympus, BX51, Japan) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı ile hesaplandı ve aynı mikroskopta spermatogenetik hücreler ve interstisyel alanların fotoğrafları çekilerek değerlendirme yapıldı.

İstatistiksel Analizler

SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 13.1, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak verilerin analizi yapıldı. Her bir gruba ait sayısal veriler ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verildi ve Kruskal Wallis varyans analizi (post hoc olarak Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi) ile karşılaştırıldı. Tüm karşılaştırmalarda $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Bulgular

Elde edilen istatistiksel verilere göre kontrol grubuna ait sıçanların vücut ve testis ağırlıkları diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı (**Tablo 2**).

Tablo 2: Deney Gruplarının Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Ortalama ve Standart Sapmalar

Gruplar	Vücut Ağırlığı (gr)	Testis Ağırlığı (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
PS: Shilajitin

Morfometrik Bulgular

Kontrol grubu ile PS grubu karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmazken, kontrol grubuna göre MTX grubunda seminifer tübül çapında ve germinal epitel kalınlığında istatistiksel açıdan anlamlı derecede azalma gözlemlendi. MTX grubuna göre MTX+PS grubunda seminifer tübül çapında ve germinal epitel kalınlığında istatistiksel açıdan azalmanın daha az olduğu gözlemlendi (**Tablo 3**).

Tablo 3: Deney Gruplarına Ait Morfometrik Ölçümlerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

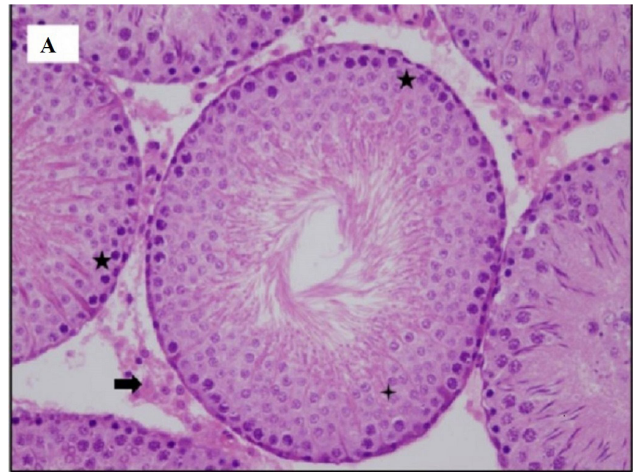
Gruplar	Seminifer Tübül Çapı (µm)	Germinal Epitel Kalınlığı (µm)
Kontrol Grubu	273.72 \pm 11.70	107.13 \pm 2.79
MTX Grubu	200.77 ^a \pm 7.55	71.97 ^a \pm 3.65
MTX + PS Grubu	237.94 ^b \pm 6.26	96.86 ^b \pm 1.72
PS Grubu	263.51 \pm 4.79	109.44 \pm 4.73

^a : MTX grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p < 0,04$).

^b : MTX+PS grubundaki değerler MTX grubuna göre anlamlı bir şekilde daha yüksektir ($p < 0,04$).

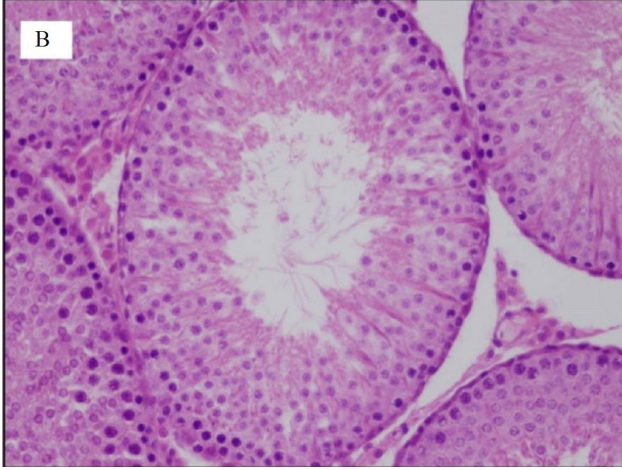
Morfolojik Bulgular

Testiküler dokuya ait histopatolojik değerlendirmede, Kontrol ve PS gruplarında, seminifer tübüllerin spermatogenik seriye ait hücreler ve interstisyel dokuda Leydig hücreleri ile normal yapıda olduğu gözlemlendi ve değerlendirme herhangi bir patolojiye rastlanmadı (**Resim 1, 2**). MTX grubunda ise, seminifer tübül lümeninde olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri gözlemlendi. Ayrıca seminifer tübül lümeninde spermatozoa azlığı,

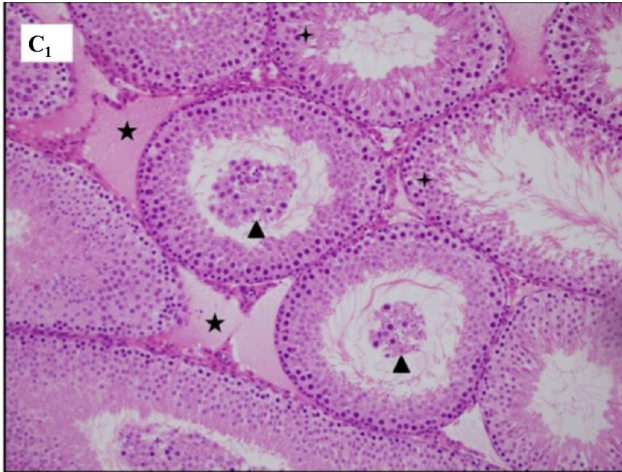


Resim 1. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki testis kesit görüntüsünde, seminifer tübüller (★), spermatogenik seriye ait hücreler (+) ve interstisyel alandaki Leydig hücreleri (➡) izlenmektedir (A; H&E, X400)

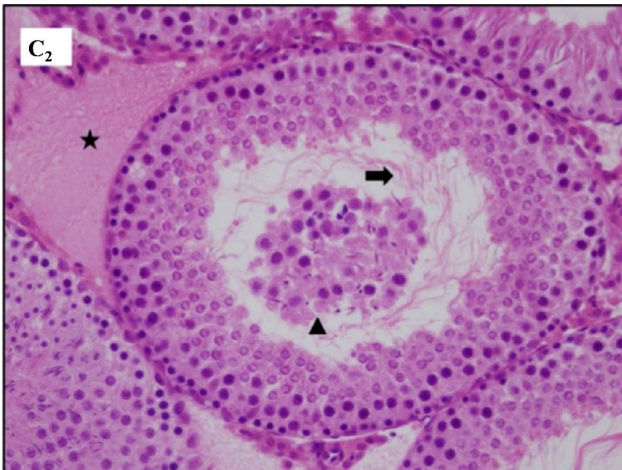
germinal epitelde ve seminifer tübül bazal membranında düzensizlikler, interstisyel alanda ödem gözlemlendi (**Resim 3, 4**). MTX+PS grubunda, germinal epitelde düzensizlik ve lümenine germinal epitel hücrelerinin dökülmüş olduğu birkaç tübül dışında herhangi bir patolojiye rastlanmadı (**Resim 5, 6**).



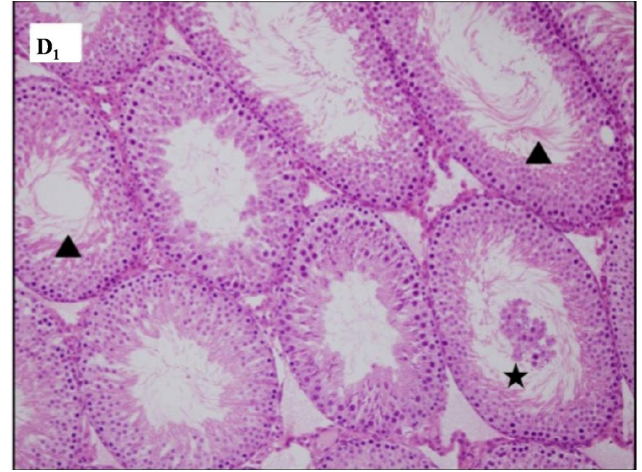
Resim 2. PS Grubuna ait testis kesit görüntüsünde seminifer tübüllerin histolojik yapısının kontrol grubuna benzer olduğu izlenmektedir (B; H&E, X400)



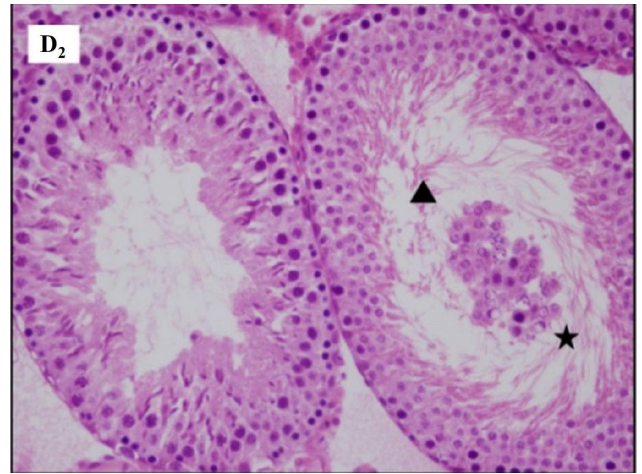
Resim 3. MTX grubuna ait testis kesit görüntüsünde, lümeninde olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri (▲), seminifer tübül germinal epitelinde düzensizlikler (✦) ve interstisyel alanda ödem (★) izlenmektedir (C1; H&E, X200)



Resim 4. MTX grubuna ait testis kesit görüntüsünde, lümeninde olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri (▲), lümeninde spermatozoa azlığı (➡) ve interstisyel alanda ödem (★) izlenmektedir (C2; H&E, X400)



Resim 5. MTX+PS grubuna ait testis kesiti görüntüsü, lümeninde spermatozoa yoğunluğu (▲) ve az sayıda lümeninde olgunlaşmamış germinal hücrelerin görüldüğü seminifer tübüller (★) izlenmektedir (D1; H&E, X200, X400)



Resim 6. MTX+PS grubuna ait testis kesiti görüntüsü, lümeninde spermatozoa yoğunluğu (▲) ve az sayıda lümeninde olgunlaşmamış germinal hücrelerin görüldüğü seminifer tübüller (★) izlenmektedir (D2; H&E, X200, 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 spermatojonyumların 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 ilişkili olduğu gösterilmiştir (18). Son dönemlerde yapılan çalışmalarda, MTX ile oluşan organ ha-

sarını önlemek için melatonin, E vitamini gibi antioksidan ajanlar kullanılmıştır (19-21). Antik zamanlardan beri Ayurveda tıbbında en büyük keşiflerden biri olan PS'den de, erkek üreme bozukluklarının tedavisinde yararlanılmıştır. PS ile ilgili yapılan bir çalışmada PS'nin toplam sperm sayısını, sperm hareketini, serum testosteron seviyesini, FSH ve spermatogenezin başlaması ve devamı için gerekli olan LH seviyesini önemli derecede artırdığı belirtilmiştir (13, 14). Biz de bu çalışmada MTX'e dayalı testis hasarında bir antioksidan olarak bilinen PS'nin koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırdık.

Çalışmamızda baktığımız parametrelerden biri olan, MTX'in vücut ve testis ağırlığı üzerine etkisine bakıldığında anlamlı bir azalmaya neden olmadığı görülmüştür. Bu bulgu Padmanabhan ve ark. ve Armağan ve ark.'nın bulgularını destekler nitelikteydi (1, 6). MTX'in testiküler doku üzerine yaptığı etkiye bakıldığında, daha önceki çalışmalar MTX'in seminifer tübül çapında ve germinal epitel kalınlığında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (22-24). Işık ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada MTX'in seminifer tübül membranında kalınlaşmalara neden olduğu, germ hücrelerinde maturasyon ve sıralanma bozukluğu olduğu ve lümende spermatozoa azlığı ya da yokluğu ifade edilmiştir (4). Koehler ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada ise tavşanlarda kullanılan MTX'in tübüler bazal membranda kalınlaşmalara neden olduğu, spermatogonium sayısında azalma olduğu ve var olan spermatogoniumlarda şişme meydana geldiği ifade edilmiştir (22). Bayram ve ark.'nın yapmış oldukları bir çalışmada ise ratlarda kullanılan MTX'in oogenez ve spermatogenezde bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir (12). Russel ve ark., Vardi ve ark., Daggulli ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmaları MTX'in testis histolojisini bozduğu belirtilmiştir (11, 25, 26). El-Sheikh ve ark. ise MTX'in serum testosteron seviyesini düşürdüğünü, testiküler doku hasarını artırdığını, tümör nekroz faktör- α seviyesini ve nükleer faktör- κ B ve siklooksijenaz-2 ekspresyonunu artırdığını bildirmiştir (5). Bizim çalışmamızda da MTX uygulamasının, testis seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalmaya yol açtığı görülmüştür. Ayrıca seminifer tübülün bazal membranında açılmalar, interstisyel alanda ödem ve

lümende olgunlaşmamış germ hücreleri gözlenmiştir. Bu morfometrik değerlerdeki azalma ve morfolojik değişikliklerin spermatogenez sürecini olumsuz etkileyebileceği kanaatindeyiz. Bununla birlikte PS ile verilen MTX uygulamasında, MTX grubu ile karşılaştırıldığında, morfometrik değerlerde anlamlı bir artış görülmüştür. Ayrıca, testis seminifer tübül lümeni birkaç olgunlaşmamış germ hücresi içerse de kontrol grubuna yakın bir mikroskopi göstermektedir.

Sonuç olarak, MTX kullanımına bağlı testiküler dokuda histopatolojik hasar oluşmakta ve bu hasar kısmen antioksidan karakterli PS kullanımı ile önlenmektedir. Ancak çalışmamızın sonuçlarının desteklenebilmesi açısından farklı doz ve sürelerde yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: intervention of folic and folinic acid. *Mutas Res* 2009; 673(1): 43-52.
2. Kim JC, Kim KH, Chung MK. Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reprod Toxicol* 1999; 13: 391-7.
3. Şener G, Demiralp EE, Çetiner M, Ercan F, Yeğen BÇ. B-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol*. 2006; 542: 170-8.
4. Işık A, Işılçay L, Erdemli EA, Akbay C, Anafarta K. Sıçan testisinde metotreksat'ın ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 1997; 50: 3.
5. Azza A.K. El-Sheikh, Mohamed A. Morsy, Abdulla Y. Al-Taher. Multi-drug resistance protein (Mrp) 3 may be involved in resveratrol protection against methotrexate-induced testicular damage. *Life Sciences*. 2014; 119(1-2): 40-46
6. Armagan A, Uzar E, Uz E ve ark. Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum Exp Toxicol* 2008; 27: 547-552.
7. Ateşşahin A, Şahna E, Türk G ve ark. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res*. 2006; 41: 21-7.
8. Ateşşahin A, Karahan İ, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Çeribaşı A. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol*. 2006; 21: 42-7.
9. Sussman A, Leonard JM. Psoriasis, methotrexate, and oligospermia. *Arch Dermatol* 1980; 116: 215-217.

- 10.** Morris LF, Harrod MJ, Menter MA, and Silverman AK. Methotrexate and reproduction in men: case report and recommendations. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29: 913-916.
- 11.** Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Otlu A. Antiapoptotic and antioxidant effects of betacarotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril* 2009; 92: 2028-2033.
- 12.** Bayram M, Ozogul C, Dursun A, Ercan ZS, Isik I, Dilekoz E. Light and electron microscope examination of the effects of methotrexate on the endosalpinx. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 120: 96-103.
- 13.** Agarwal SP, Khanna R, Karmarkar R, Anwer MK, Khar RK. Shilajit: A Review. *Phytother Res.* 2007; 21: 401-405.
- 14.** Biswas TK, Pandit S, Mondal S ve ark. Clinical evaluation of spermatogenic activity of processed Shilajit in oligospermia. *Andrologia.* 2010; 42(1): 48-56.
- 15.** Park JS, Kim GY, Han K. The spermatogenic and ovogenic effects of chronically administered Shilajit to rats. *J Ethno Pharmacol* 2006; 107: 349-353.
- 16.** Aiello A, Fattorusso E, Menna M, Vitalone R, Schröder HC, Müller WE. Mumijo Traditional Medicine: Fossil Deposits from Antarctica (Chemical Composition and Beneficial Bioactivity). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;738131.
- 17.** P.J. Hashkes, M.L. Becker, D.A. Cabral, R.M. Laxer, A.S. Paller, C.E. Rabinovich, et al. Methotrexate: new uses for an old drug. *J. Pediatr.* 2014; 164: 231–236.
- 18.** Hess JA, Khasawneh MK. Cancer metabolism and oxidative stress: Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate. *BBA Clin.* 2015; 7(3):152-61.
- 19.** Muralikrishnan G, Amalan Stanley V, Sadasivan Pillai K. Dual role of vitamin C on lipid profile and combined application of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil treatment in fibrosarcoma-bearing rats. *Cancer Lett.* 2001; 169 (2): 115-20.
- 20.** Oktem F, Yılmaz HR, Ozguner F ve ark. Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health.* 2006; 22(6): 241-7.
- 21.** Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yeğen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res.* 2003; 34(4): 282-7.
- 22.** Koehler M, VValdherr R, Ludvvig RL. Effects of MTX on Rabbit Testes. Part 1: Morphological Changes. *Pediatr Hemat Oncol* 1986; 3(4): 335-41.
- 23.** Shrestha S, Dhungel S, Saxena AK, Bhattacharya S, Maskey D. Effect of methotrexate (MTX) administration on spermatogenesis: an experimental on animal model. *Nepal Med Coll J.* 2007; 9(4): 230-3.
- 24.** Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M. Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia.* 2009; 41(2): 105-10.
- 25.** Russell LD, Russell JA. Short-term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. *Am J Anat.* 1991; 192(2): 142-68.
- 26.** Dagguli M, Dede O, Utangaç MM ve ark. H. Protective effects of carvacrol against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. *nt J Clin Exp Med.* 2014; 7(12): 5511–5516.