

**LEVOTİROKSİNİN ERKEK REPRODUKTİF SİSTEM
HÜCRE DİZİLERİNDE TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Tuğçe TARTICI

Eskişehir 2024

**LEVOTİROKSİNİN ERKEK REPRODUKTİF SİSTEM
HÜCRE DİZİLERİNDE TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Tuğçe TARTICI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sinem ILGIN

(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Merve BAYSAL)

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2024

ÖZET
LEVOTİROKSİNİN ERKEK REPRODUKTİF SİSTEM
HÜCRE DİZİLERİNDE TOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Tuğçe TARTICI

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2024

Danışman: Prof. Dr. Sinem ILGIN
(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Merve BAYSAL)

Levotiroksin; birçok vücut fonksiyonu regülasyonunda yer alan tiroid hormonlarının ikamesinde kullanılan sentetik bir moleküldür. Hormon bazlı bir ajan olması ve tüm dünyada en sık reçete edilen ilaçlardan olması reproduktif etkileri üzerinde araştırma yapma gereği oluşturmuştur. Erkek reproduktif sistem dizileri üzerine hem genomik hem de non-genomik etkiler ile spermatogenezi ve androjenik aktiviteyi etkilemektedir. Çalışmada TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücre hatları üzerine doza bağımlı hücre canlılığı MTT ve nötral kırmızı deneyleri ile test edilerek bu konsantrasyonlardan hareketle inhibitör konsantrasyon 50 belirlenmiştir, bu konsantrasyonlardan hareketle reaktif oksijen türleri oluşumu Diklorofloresin-diasetat yöntemi ile spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve DNA hasarının tespiti Comet testi ile saptanmıştır. Sonuçlara göre levotiroksinin konsantrasyon bağımlı olarak TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonda levotiroksin hücrelerde ROT üretimini indüklemiştir, fakat bu istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmemiştir. Diğer taraftan TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücrelerinde levotiroksin DNA hasarı açısından anlamlı değişikliklere neden olmamıştır. Sonuç olarak levotiroksinin TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücrelerinde tespit edilen sitotoksik etkisi reproduktif toksisitenin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Levotiroksin, TM3 Leydig hücreleri, TM4 Sertoli hücreleri, Sitotoksosite, Reaktif oksijen türleri, DNA hasarı.

ABSTRACT
LEVOTHYROXINE IN MALE REPRODUCTIVE SYSTEM CELL LINES
ASSESSMENT OF TOXICITY

Phc. Tuğçe TARTICI

Department of Pharmaceutical Toxicology
Anadolu University, Institute of Health Sciences, January 2024

Supervisor: Prof. Dr. Sinem ILGIN
(Co-Supervisor: Asst. Prof. Merve BAYSAL)

Levothyroxine is a synthetic molecule that replaces thyroid hormones that regulate many body functions. The fact that it is a hormone-based agent and one of the most frequently prescribed drugs all over the world has created a need for research on its reproductive effects. It affects spermatogenesis and androgenic activity with genomic and non-genomic effects on male reproductive system sequences. In the study, dose-dependent cell viability was tested with MTT and neutral red experiments on TM4 Sertoli and TM3 Leydig cell lines, and the inhibitory concentration 50 was determined based on these concentrations. Based on these concentrations, the formation of reactive oxygen species was determined spectrophotometrically by the Dichlorofluorescein-diacetate method, and the detection of DNA damage was determined by the Comet test. Levothyroxine decreases the viability of TM3 Leydig and TM4 Sertoli cells in a concentration-dependent fashion, as demonstrated by the results. Although levothyroxine has been observed to induce reactive oxygen species (ROS) production in cells at high concentrations, this effect has not been determined to be statistically significant. Conversely, levothyroxine has not induced substantial alterations with regard to DNA damage in TM3 Leydig and TM4 Sertoli cells. The cytotoxic impact of levothyroxine on TM3 Leydig and TM4 Sertoli cells is therefore regarded as suggestive of reproductive toxicity.

Keywords: Levothyroxine, TM3 Leydig cells, TM4 Sertoli cells, Cytotoxicity, Reactive oxygen species, DNA damage.

TEŞEKKÜR

Tez süreci boyunca her daim yanımda olan, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım, yoluma ışık olan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Sinem ILGIN'a;

Süreç boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, değerli desteklerini esirgemeyen kıymetli hocam, ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Merve BAYSAL'a;

Bir danışman kadar üzerimde maddi manevi emeği olan sevgili hocam Öğr. Gör. Büşra KORKUT ÇELİKATEŞ'e;

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı sevgili hocam Prof. Dr. Bülent ERGUN'a, Prof. Dr. Özlem ATLI EKLİOĞLU'a, Arş. Gör. Abdullah Burak KARADUMAN'a, Arş. Gör. Merve GÜVEN'e desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Parçası olmaktan gurur duyduğum 9. Bölge Eskişehir Eczacı Odası ailesinin başta Ecz. Metin KAMIŞ olmak üzere 2023 yılı tüm yönetim kurulu üyelerine desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

En kıymetli hazinem; manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme, dostlarıma ve bu yıl kaybettiğim tüm meleklerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Tuğçe TARTICI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Levotiroksin	3
2.1.1. Levotiroksin etki mekanizması	4
2.1.2. Farmakolojik aktiviteleri	6
2.1.3. Advers etkileri	8
2.1.4. Levotiroksinin toksisitesi	10
2.2. Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid Aksı ile Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı	11
2.2.1. Tiroid hormonlarının testis üzerine etkileri	13
2.2.1.1. Sertoli hücre proliferasyonu ve fonksiyonel olgunlaşmasında tiroid hormonunun rolü	14
2.2.1.2. Tiroid hormonunun sertoli hücre metabolizması üzerindeki etkisi	15
2.2.1.3. Leydig hücre farklılaşması ve işlevinde tiroid hormonlarının rolü	15
2.2.2. Tiroid hormon bozuklukları ve erkek reproduktif sistemi üzerine etkileri	16
2.2.3. Erkek üreme fonksiyonlarını düzenlemede tiroid hormonlarının diğer hormonlar ve büyüme faktörleriyle ilişkisi	19
2.3. İlaçların Neden Olduğu Erkeklerdeki Reprodüktif Advers Etkiler	20

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

	<u>Sayfa</u>
2.3.1. Levotiroksinin neden olduğu erkeklerdeki reproduktif advers etkiler	25
2.4. İn Vitro Reproduktif Toksisite Modelleri	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	31
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	32
3.3. Kullanılan Hücre Hatları	33
3.4. Yöntemler.....	33
3.4.1. Hücre hatlarının çoğaltılması	33
3.4.2. Hücre canlılığının belirlenmesi	34
3.4.2.1. MTT sitotoksisite testinin uygulanması	35
3.4.2.2. Nötral kırmızı deneyinin uygulanması	35
3.4.3. Reaktif oksijen üretiminin belirlenmesi	35
3.4.3.1. DCFDA/H2DCFDA testinin uygulanması	36
3.4.4. DNA hasarının belirlenmesi	37
3.4.4.1. Comet testinin uygulanması	37
3.4.5. Veri analizi	38
4. BULGULAR	38
4.1. Sitotoksite Testleri	39
4.1.1. MTT sitotoksisite testi	39
4.1.2. Nötral kırmızı testi	40
4.2. DCFDA/H2DCFDA Testi	41
4.3. Comet Testi	42
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	44
5.1. Sonuç	44
5.2. Tartışma	44
5.3. Öneriler	47
KAYNAKÇA	49
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Levotiroksinin farmokokinetik özeti	6
Tablo 2.2. Levotiroksinin farmakodinamiğine genel bakış	7
Tablo 2.3. Tiroidin spermatogenez ve erkek infertilitesindeki rolünü anlamak için yapılan çalışmaların listesi	18
Tablo 2.4. İnsan spermatogenezini bozma potansiyeline sahip FDA onaylı ilaçlar .	23

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Tiroid hormonu homeostazında yer alan temel fizyolojik sistemlerin basitleştirilmiş şeması	4
Şekil 2.2. T4 ve T3'ün hücre içine girişi	5
Şekil 2.3. Tiroid hormon salgılanmasının düzenlenmesi	11
Şekil 2.4. HPT aksı	12
Şekil 2.5. T3'ün spermatogenez üzerine etkisinin özeti	13
Şekil 4.1. Levotiroksinin TM3 Leydig hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri(%)	39
Şekil 4.2. Levotiroksinin TM4 Sertoli hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri(%)	39
Şekil 4.3. Levotiroksinin TM3 Leydig hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri(%)	40
Şekil 4.4. Levotiroksinin TM4 Sertoli hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri(%)	41
Şekil 4.5. Levotiroksinin TM3 Leydig hücrelerinde ROT üretimi üzerine etkileri	41
Şekil 4.6. Levotiroksinin TM4 Sertoli hücrelerinde ROT üretimi üzerine etkileri	42
Şekil 4.7. Levotiroksinin TM3 Leydig hücre DNA'sı üzerine etkileri	42
Şekil 4.7. Levotiroksinin TM4 Sertoli hücre DNA'sı üzerine etkileri	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
ATCC	: American Type Culture Collection
DCFDA	: 2',7'-Diklorofloresin Diasetat
DIO	: Deiyonidaz
DMEM-F12	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
EDC	: Endokrin Bozucu Kimyasallar
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GDNF	: Glial Hücreden Türetilen Nörotrofik Faktör
GPx	: Glutatyon Peroksidaz
HPG	: Hipotalamus-Hipofiz-Gonadal
HPT	: Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid
LH	: Lüteinleştirici Hormon
LT4	: Levotiroksin
MTT	: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil Tetrazolyum Bromür
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PRL	: Prolaktin
ROS/ROT	: Reaktif Oksijen Türevleri
rT3	: Reverse T3
SHBG	: Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin
T3	: 3,5,3'triyodotironin
T4	: Tetrayodotironin veya Tiroksin
TBHP	: tert-Butilhidroperoksit
TM3	: Leydig Hücreleri
TM4	: Sertoli Hücreleri
TPO	: Tiroid Peroksidaz Otoantikoru
TR	: Tiroid Reseptörü
TRH	: Tirotropin Salgılayan Hormon
TSH	: Tiroid Uyarıcı Hormon

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite, küresel olarak tüm çiftlerin yaklaşık %13-15'ini etkilemektedir. Prevalansı değişken olup epidemiyolojik olarak erkek infertilitesi, gelişmekte olan ülkelerde daha az olduğu belgelendirilmiştir. Gelişmiş ülkelerde nüfusun yaklaşık %10-15'ini etkilemekte ve olguların yaklaşık yarısı anormal semen üretimi ile ilgili olup erkek faktöründen kaynaklanmaktadır [1-3].

Azaltılmış, baskılanmış veya tamamen eksik spermatogenez; erkek infertilitesi ile ilişkili yaygın bir faktördür. Baskılanmış spermatogenezin veya spermatogenik başarısızlığın, genetik kusurlar dahil olmak üzere çeşitli nedenleri vardır. Ancak edinilmiş faktörler de önemli bir rol oynamaktadır. Pek çok terapötik ilacın da spermatogenezini bozarak geçici veya kalıcı gebe kalma gücüne yol açtığı bildirilmiştir [1].

Spermatogonya, Sertoli veya Leydig hücrelerine zarar veren herhangi bir ilaç, spermatogenezini ve sperm olgunlaşmasını etkileyerek doğurganlık üzerinde olumsuz etkilere yol açabilmektedir. İnsan spermatogenezini etkileme olasılığı en yüksek olan ilaçlar hormon bazlı ajanlar olarak bulunmuştur [1].

Hormonlar, hücreler arası iletişimde temel faktörlerdendir. Çeşitli fizyolojik işlevlere katılmak için endokrin bezler tarafından kimyasal haberciler salgılanmaktadır. Tiroid bezi insan vücudunun fizyolojisini kontrol etmede merkezi bir yer tutmaktadır. Tiroid hormonları metabolizmayı, büyümeyi ve diğer birçok vücut fonksiyonunu kontrol etmesiyle bilinmekte olup tiroid bezi tarafından üretilen ana hormonlar tiroksin veya tetraiyodotironin (T4) ve triiyodotironindir (T3) [4, 5].

Tiroid bezi, ön hipofiz bezi ve hipotalamus; hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı adı verilen kendi kendini düzenleyen bir devreyi oluşturmaktadır. Hipotalamustan tiotropin salgılayan hormon (TRH), ön hipofiz bezinden tiroid uyarıcı hormon (TSH) ve T4, homeostaz sürdürmek için uyum içinde geri bildirimle çalışmaktadır [5].

Tiroid hormonları testis üzerinde çeşitli şekillerde etki etmekte ve etkilerini Leydig, Sertoli ve germ hücreleri dahil olmak üzere farklı hücre tipleri üzerinde göstermektedir. Tiroid hormonları hem Sertoli hem de Leydig hücrelerinde proliferasyonu ve farklılaşmayı düzenlemektedir. Tiroid hormonlarının fazlalığı veya eksikliği, semen anormallikleri de dahil olmak üzere testis fonksiyonunda değişikliklere neden olmaktadır. Daha sık olarak, hipertiroidizm azalmış semen hacmi ve azalmış sperm yoğunluğu, hareketliliği ve morfolojisi ile ilişkilendirilirken, hipotiroidizm azalmış sperm morfolojisi ile ilişkilendirilmektedir [6, 7].

Levotiroksin (LT4), vücudun doğal tiroid hormonu olan tiroksinin sentetik bir versiyonu olup uzun süredir hipotiroidizmin tedavisi için kullanılır, ayrıca dünyanın en yaygın şekilde reçete edilen ilaçlarından biridir [8].

Hipotiroidi tüm dünyada en sık görülen tiroid fonksiyon bozukluğu olup tiroid bezi tarafından salgılanan tiroid hormonlarında eksiklik şeklinde tanımlanmaktadır. Hastaların %99'undan fazlasındaki hipotiroidi nedeni tiroid bezi ilişkili-primer hipotiroidi iken, nadiren sekonder santral hipotiroidi görülebilmektedir. Primer hipotiroidizm, tiroid bezindeki bir sorundan kaynaklanmaktadır. En yaygın neden otoimmün bir durum olup, Hashimoto tiroidi olarak adlandırılır. Bunun yanı sıra tiroidektomi sonrası iyatrojenik hipotiroidizmde görülmektedir. Sekonder hipotiroidizm, sorunun hipofiz bezinde olduğu ve tiroid stimüle edici hormon (TSH) üretiminde azalma olduğu zaman gözlenmektedir. Tersiyer hipotiroidizm nadirdir ve sorun hipotalamusta azalmış tiroid salgılatıcı hormon (TRH) üretimidir [8-10].

Oral levotiroksin; primer, sekonder ve tersiyer hipotiroidizmin tedavisi için ve tirotropine bağımlı iyi diferansiye tiroid kanserini yönetmek için cerrahi ve radyoiodin tedavisine ek olarak hipofiz tirotropin supresyonu için Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayına sahiptir [11-13].

Hipotiroidizm sıklığı yaşlanma ile artış göstermekte ve kadınlarda erkeklere göre 5-10 kat daha sık görülmektedir. Hipotiroidizm özellikle iyot eksikliği olan bölgelerde sıklıkla gözlenmektedir. Ayrıca tiroid peroksidaz otoantikoru (TPO) pozitif olan ve TSH düzeyi normalin üst sınırlarında olan bireylerde hipotiroidizm gelişme sıklığı artmaktadır. Aşikâr hipotiroidizm sıklığı %0,1-2 arasında bildirilmiştir. Subklinik hipotiroidizm ise çok daha yaygın görülmektedir. Yetişkinlerde %4-10 arasında ve özellikle yaşlı kadınlarda %5 civarında görülebilmektedir [14].

Hipotiroidizm erkeklerde daha az yaygın olsa da tiroid hormonu eksikliği, büyüme hormonunu, glukokortikoidleri ve gonadal işlevi değiştiren değişiklikler de dahil olmak üzere vücudun tüm organlarını etkilemektedir [2].

Dolayısıyla erkek reproduktif advers etkileri için; hormon bazlı bir ajan olan levotiroksinin, sık reçete edilen bir ilaç olması nedeniyle erkek reproduktif hücre dizilerine olabilecek toksik etkilerinin araştırılması kaçınılmaz olmuştur.

Bu tez çalışmasında; levotiroksinin erkek reproduktif toksisitesinin *in vitro* değerlendirilmesi ve olası toksisitenin mekanizması anlamlandırılması adına; Sertoli ve Leydig hücrelerinde hücre canlılığına etkisinin 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil

tetrazolyum bromür (MTT) ve nötral kırmızısı testleri ile belirlenmesi, olası DNA hasarının Comet yöntemi ile tespit edilmesi, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretiminin 2',7'-diklorofloresin diasetat (DCFDA) yöntemi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

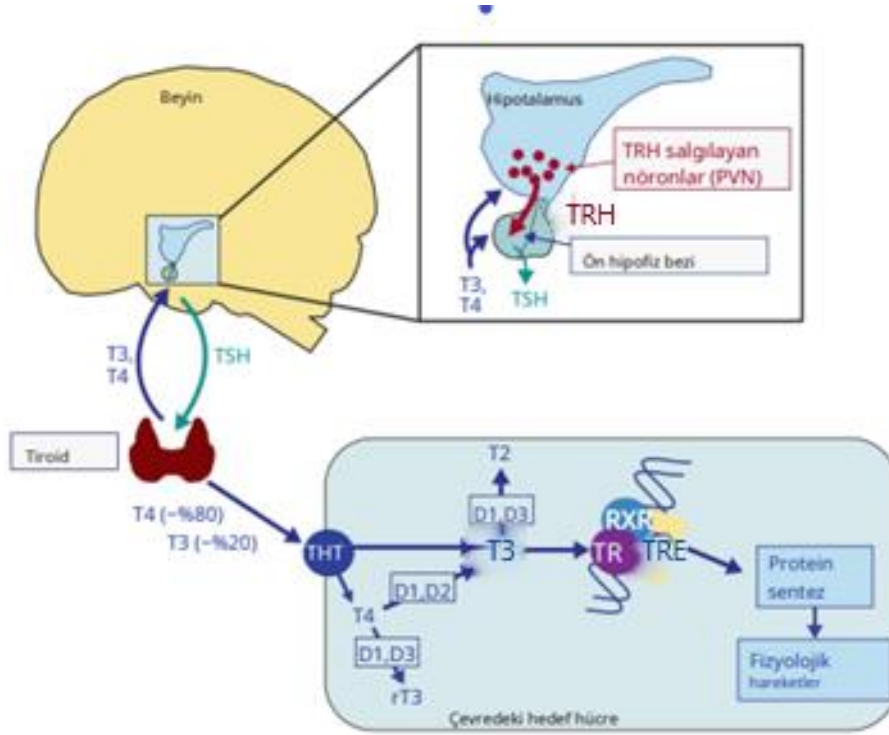
2.1. Levotiroksin

Tiroid folikülü iyodotironin hormonu tiroksin (T4) ve 3,5,3'triiyodotironin (T3) üretmektedir. Tiroksinin levo izomerinin hormonal etkinliği, dekstro izomerinden 10-20 kez daha fazla olup ilaç olarak bu izomer kullanılır ve adı levotiroksin'dir [15, 16].

2.1.1. Levotiroksin etki mekanizması

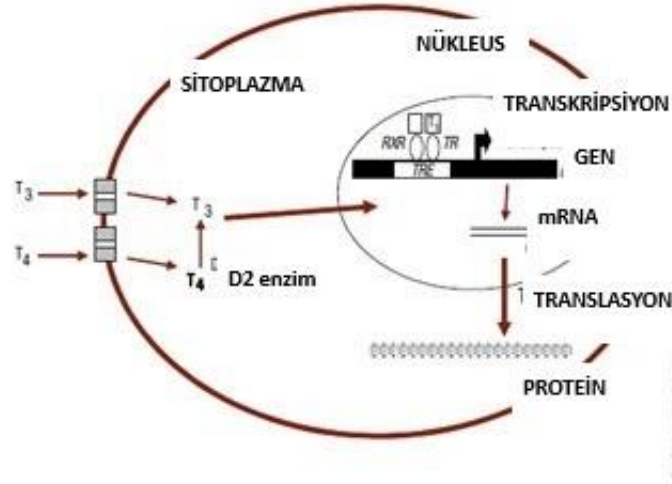
Hipotalamus tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) salgılayarak ön hipofizi TSH salgılaması için uyarmaktadır. TSH ise tiroidi tiroksin (T4) (%80) ve L-triiodotironin (T3) (%20) salgılaması için uyarmaktadır. T4'ün yüzde ellisi daha sonra aktif metaboliti T3'e dönüştürülmektedir [17].

Tiroid hormonları lipofiliktir ve taşıma proteinlerine bağlı olarak dolaşırlar. Tiroid hormonunun yalnızca bir kısmı (yaklaşık %0,2) bağlanmamış ve aktiftir [5].



Şekil 2.1. Tiroid hormonu homeostazında yer alan temel fizyolojik sistemlerin basitleştirilmiş şeması [18]

Taşıyıcı proteinler arasında tiroksin bağlayıcı globulin (TBG), transtiretin ve albümin bulunmaktadır. TBG, T4'ün çoğunluğunu (üçte ikisi) taşımaktadır. Transtiretin, tiroksin ve retinol taşımaktadır. T3 ve T4 hedef bölgesine ulaştığında, bağlayıcı proteinlerinden ayrılarak difüzyon veya taşıyıcı aracılı taşıma yoluyla hücelere girebilmektedirler [5].



Şekil 2.2. *T₄ ve T₃'ün hücre içine girişi [19]*

Deiyodinazlar, T₄'ü aktif T₃'e veya aktif olmayan reverse T₃'e (rT₃) dönüştürmektedir. Üç tip deiyodinaz vardır. Tip I (DIO1) ve II (DIO2) karaciğer, böbrekler, kaslar ve tiroid bezlerinde bulunmaktadır. Tip III (DIO3) deiyodinazlar santral sinir sistemi ve plasentada bulunmaktadır. DIO1 ve DIO2, T₄'ü aktif T₃ formuna dönüştürmekte ve DIO3, T₄'ü aktif olmayan rT₃ formuna dönüştürmektedir [5].

Tiroid reseptörleri hem T₃ hem de T₄'e bağlanabilen transkripsiyon faktörleridir. Bununla birlikte, T₄'ün reseptör bölgesine olan afinitesi T₃'ten yaklaşık on kat daha düşüktür. Sonuç olarak, T₄ nispeten inaktiftir. T₃ bağlanması için reseptörler, ligand bağlanmasından önce çekirdekte DNA'ya bağlanmıştır. T₃ veya T₄ daha sonra ilgili dokudaki nükleer alfa veya beta reseptörlerine bağlanarak belirli genlerin ve hücreye özgü tepkilerin aktivasyonuna yol açan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır [5, 20].

Reseptörler farklı dokularda farklı konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Hormona duyarlı dokularda (hipofiz, karaciğer, böbrek, kalp, iskelet kası, akciğer ve bağırsak) çok sayıda tiroid hormon reseptörü bulunurken, hormona duyarlı olmayan dokularda (dalak, testis) az sayıda reseptör bölgesi bulunmaktadır. T₃'e anabolik yanıtı olmayan beyinde ise ortalama sayıda reseptör bulunmaktadır. Bazı durumlarda vücut homeostazının korunması amacı ile nükleer reseptörlerin sayısı değişebilmektedir. Örneğin, açlık hem dolaşımdaki T₃ hormonunda hem de hücrel T₃ reseptörlerinde azalmaya neden olmaktadır. Bu durum, T₃'ün etkisinin farklı dokular üzerindeki varyasyonlarının nedeni olabilmektedir [5, 20].

Tiroidin metabolik süreçler üzerindeki çoğu etkileri nükleer reseptörlerin aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu aktivasyon, artmış RNA formasyonuna ve sonrasında protein sentezine yol açmaktadır [20].

Bu süreç kesintiye uğradığında (primer, sekonder ve tersiyer hipotiroidizmde görüldüğü gibi), levotiroksin, vücudun tiroid tarafından endojen T4 üretimini taklit edebilir. Eksojen levotiroksin endojen T4'ten ayırt edilemez [18].

2.1.2. Farmakolojik aktiviteleri

Sentetik levotiroksin stabilitesi, içeriğinin basitliği, düşük maliyeti, yabancı alerjenik protein içermemesi, serum düzeylerinin laboratuvarında kolay ölçülmesi ve yarılanma ömrünün uzun olması (7 gün) sonucu günde tek doz verilebilmesi nedenleri ile tiroid replasman ve supresyon tedavisi için tercih edilen preparattır. Bunun yanı sıra, T4 hücre içerisinde T3'e dönüşmekte olup bu nedenle T4 replasmanı her iki hormonu da sağlamaktadır [20].

Levotiroksinin farmakokinetik özellikleri Tablo 2.1.'de, farmakodinamik özellikleri Tablo 2.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Levotiroksinin farmokokinetik özeti [18]

Farmakokinetik	Açıklama
Ana absorpsiyon bölgesi	İnce bağırsak (jejunum ve ileum)
Biyoyararlanım	Ötiroid kişide %70-80; hipertiroid hastalarında biraz daha yüksek olabilir
Maksimum Konsantrasyona Ulaşma Süresi	2-3 saat
Dağılım hacmi	11-15 litre
Protein bağlama	T4>%99,9 T3= %99,8
Yarılanma ömrü	T4 = Ötiroid ve hipotiroid hastalarda sırasıyla 6,2 ve 7,5 gün T3 = Ötiroid ve hipotiroid hastalarda sırasıyla 1 ve 1,4 gün
Klirens	T4 = Ötiroid ve hipotiroid hastalarda sırasıyla 0,055 ve 0,038 l/sa

Tablo 2.2. Levotiroksinin farmakodinamiğine genel bakış [18]

Fizyolojik süreç	Hipotiroidizmin etkisi	Hipotiroidili bir hastada LT4 replasmanının temel etkileri
Enerji harcaması	Azaltır.	Dinlenme enerji harcaması ve metabolik hızdaki azalmaları tersine çevirir.
Lipid profilleri	Esas olarak hepatik LDL reseptörleri azaltma yoluyla dislipidemi teşvik eder.	Total ve LDL kolesterolü ve diğer dislipidemi belirteçlerini azaltır. İntrahepatik lipid içeriğini (yükseldiğinde) azaltır.
Kan şekeri kontrolü	Açık hipotiroidizm bozulmuş glukoz toleransını azaltır. Subklinik hipotiroidizm insülin direncini ve diyabet riskini artırır.	Tirotoksikozda bozulmuş glukoz toleransını değişikliklerini düzeltir. İnsülin duyarlılığını artırır. Glikoz toleransını artırır.
İnflamasyon	Artan sistemik inflamasyon	Azaltılmış sistemik inflamasyon belirteçleri
Pıhtılaşma	Koagülopatiyeye neden olur. Subklinik hipotiroidizm prokoagülan duruma neden olur.	Eksiklikleri düzeltir. Fibrinoliz belirteçlerini ve pıhtılaşmayı iyileştirir.
Beyin	Değişen ruh hali/duygu durumu	İyileştirilmiş ruh hali/duygu durumu
Yağ dokusu	İlımlı ağırlık artışı Kahverengi yağ aktivasyonu azalışı	Hipotiroidizmde kilo alımını tersine çevirir.
Kalp	Mevcut kardiyak sorunları şiddetlendirir. Azalan kardiyak kontraktilite Artan kan basıncı	Kardiyak yapı ve fonksiyondaki anormallikleri tersine çevirir.
Kemik	Tiroid hormonları kemik yoğunluğunu azaltır.	Aşırı tedavi ve hipertiroidizm aşırı kemik kaybına neden olabilir. Tiroid fonksiyonu özellikle kırık riski taşıyan kişilerde dikkatle değerlendirilmelidir.
Böbrek	Hipotiroidizm böbrek fonksiyonunu azaltabilir.	Glomerüler filtrasyon hızında hipotiroidizmin neden olduğu azalmayı tersine çevirir. Bazı yarar kanıtları (Ürik asit ve albümin atılımında azalma)

2.1.3. Advers etkileri

Sağlıklı olan ve birkaç aydır hipotiroidizm teşhisi konan yetişkinler, ihtiyaç duyulduğunda her 6 ila 8 haftada bir 12,5 ila 25 mcg/gün doz ayarlaması ile 1,6 mcg/kg/gün başlangıç dozu almalıdır.

Kalp hastalığı olan yetişkinler veya 65 yaş üstü yaşlılar ve hipotiroidizm başlangıç dozu 25 mcg/gün, doz ayarlaması ise her 4-6 haftada bir 12.5-25 mcg olmalıdır [21].

Advers ilaç reaksiyonları (sistem organ sınıflamasına göre) [21]

Kardiyovasküler advers ilaç reaksiyonları

- Anjina pektoris
- Taşikardi
- Çarpıntı
- Aritmi
- Miyokard enfarktüsü
- Atriyal fibrilasyon

Nöropsikiyatrik advers ilaç reaksiyonları

- Endişe
- Uykusuzluk

Gastrointestinal advers ilaç reaksiyonları

- Kilo kaybı
- Tükenmişlik
- İshal
- Kusma

Dermatolojik advers ilaç reaksiyonları

- Deri döküntüsü
- Saç dökülmesi
- Diyaforez

Endokrin advers ilaç reaksiyonları

- Guatr
- Menstrüel düzensizlikler
- Isı intoleransı
- Azalan kemik mineral yoğunluğu (TSH baskılanmasının bir sonucu)

Hepatik advers ilaç reaksiyonları

- Artan karaciğer enzimleri

- İmmünoalerjik hepatit

İlaç etkileşimleri

- Kalsiyum karbonat, demir fumarat ve sevelamer levotiroksine bağlanır ve levotiroksinin emilimini azaltır.
- Safra asidi kenetleyicileri (örn., kolesevelam, kolestiramin, kolestipol) ve iyon deęiřtirici reçineler (örn., polistirensülfonat) levotiroksin emilimini azaltır.
- Levotiroksin ve orlistat ile eşzamanlı olarak tedavi edilen hastaları, emilimin azalması nedeniyle tiroid fonksiyonundaki değişiklikler açısından izlenmelidir.
- Mide asiditesi, levotiroksinin yeterli emilimi için bir ön kořuldur. Sükralfat, antiasitler ve proton pompası inhibitörleri hipoklorhidriye neden olabilir ve levotiroksin emilimini azaltabilir.
- Furosemid, T4'ün TBG'ye bağlanmasını inhibe ederek serbest T4'te bir artışa yol açar; aynı zamanda TBG'deki T4 bağlama bölgeleri için rekabet eder, bu nedenle tek bir yüksek doz furosemid, toplam T4 seviyesini aniden düşürebilir.
- Fenitoin ve karbamazepin, levotiroksinin protein bağlanmasını azaltır ve toplam ve serbest T4, %20 ila %40 oranında azaltılabilir. Bununla birlikte, çoğu hasta normal TSH seviyelerine sahiptir ve klinik olarak ötiroiddir.
- Serum TBG'sini artıran ilaçlar arasında östrojen, tamoksifen, klofibrat, opioidler, mitotan, flouourasil ve kapesitabin bulunur. Postmenopozal kadınlarda östrojen tedavisi, ortalama TSH konsantrasyonunda bir artış ile ilişkilidir. Hızlı östrojen artışı, tedavi edilen hipotiroid kadınlarda artmış TBG ve TSH değerleri ile ilişkilidir.
- Androjenler ters etkiye sahiptir ve serum TBG konsantrasyonlarını düşürür, bu nedenle levotiroksin dozunda bir azalma gerektirir.
- Propranolol ve amiodaron, T4'ün T3'e dönüşümünü azaltır. Karbamazepin, fenobarbital ve rifampin, karaciğer mikrozomal enzimlerini indükler, levotiroksin metabolizmasını artırır ve serum konsantrasyonunu azaltır.
- Dopamin, glukokortikoidler ve oktreotid gibi ilaçlar TSH konsantrasyonunu azaltabilirken, lityum, iyot ve sülfonamidleri tiroid hormon sentezine müdahale eder.
- İmmün kontrol noktası inhibitörü tedavisi (Pipembrolizumab, nivolumab, ipilimumab) ile tedavi edilen hastalarda, immünkontrol noktası inhibitörünün

kesilmesini gerektirebilecek immün bağlantılı advers olaylara bağı olarak hipotiroidizm gelişebilir.

- Levotiroksinin emilimi soya fasulyesi, papaya ve greyfurt tüketimine bağı olarak bozulabilir.

Kontrendikasyonlar

- Akut miyokard infarktüsü
- Düzeltilmemiş adrenal yetmezlik
- Akut miyokardit, pankardit
- Aktif kardiyak aritmiler
- Tirotoksikoz
- Hipertiroidizm

2.1.4. Levotiroksinin toksisitesi

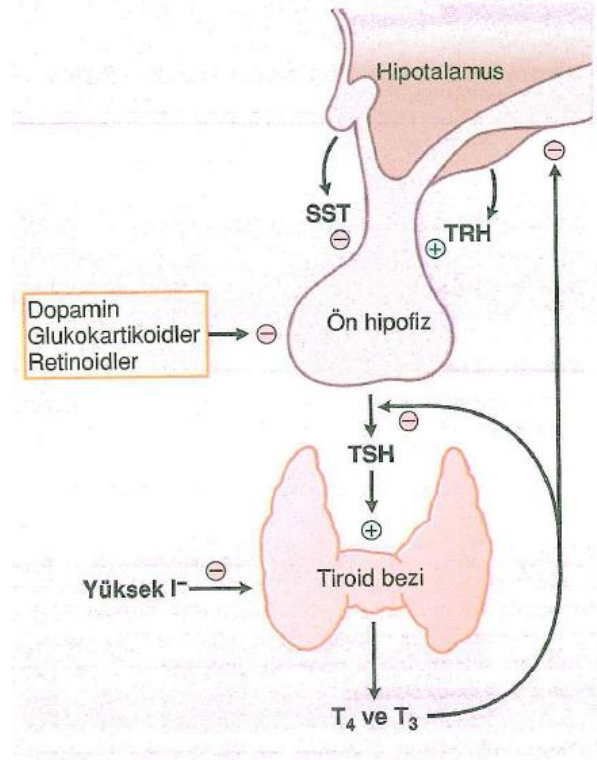
Genel olarak, yanlış doz almaktan (aşırı doz) kaynaklanan advers olaylar, sıklıkla hipertiroid benzeri bir tablo veya levotiroksin tabletlerinin yardımcı maddesine karşı alerjik bir reaksiyon oluşturur. Levotiroksin tabletindeki boya (tartrazin sarısı), laktoz, akasya ve hatta gluten gibi yardımcı maddelere karşı nadiren alerji oluşabilir. Bu nedenle, levotiroksine karşı alerji veya intolerans, jel kapsüllerin değerlendirilmesi de dahil olmak üzere ürün değiştirilerek yönetilebilir. Levotiroksin ile tedavi edilen yaşlı kişiler arasında, günde 75 mcg'den daha yüksek dozlarda levotiroksin, artmış atriyal fibrilasyon riski ile ilişkilidir [22-24].

Levotiroksin toksisitesi nadirdir; ancak, büyük olasılıkla çocuklar veya yaşlı yetişkinler tarafından kazara yutulması durumunda meydana gelir. Genellikle serumdaki yüksek total T4 ve T3, baskılanmış serum TSH'yi ve yüksek serbest T4 ve serbest T3'ü ortaya çıkarır. Tiroksin ve triiyodotironin seviyeleri, alımdan 1 ila 2 saat sonra yükselir. Doz aşımının ilk aşamasında (aldıktan 6-12 saat sonra), toksisitenin yaygın belirtileri titreme, taşikardi, hipertansiyon, anksiyete ve ishal olacaktır. Nadiren konvülsiyonlar, akut psikoz, aritmiler ve akut miyokard enfarktüsü oluşabilir.

Levotiroksin doz aşımını tedavi edecek bir antidot bulunmamaktadır. Tedavi seçenekleri arasında gastrik lavaj, aktif kömür, kolestiramin, glukokortikoidler, beta blokerler, propiltiourasil ve destekleyici önlemler yer almaktadır [21].

2.2. Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid Aksı ile Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı

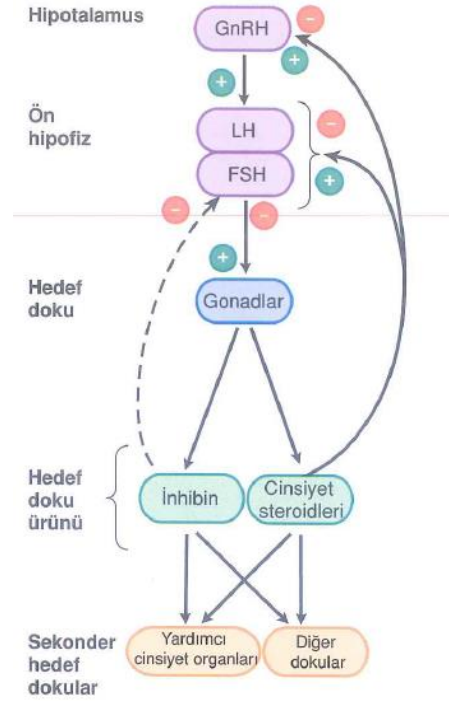
Tiroid hormonu, kalp, santral sinir sistemi, otonom sinir sistemi, kemik, gastrointestinal sistem ve metabolizma dahil olmak üzere vücuttaki hemen hemen her organ sistemini etkilemektedir. Genel olarak, tiroid hormonu intranükleer reseptörüne bağlandığında, metabolik hızı ve termojenezi arttırmak için genleri aktive etmektedir. Artan metabolik hız, artan oksijen ve enerji tüketimini içermektedir [5].



Şekil 2.3. Tiroid hormon salgılanmasının düzenlenmesi [16]

Tiroid hormonunun düzenlenmesi hipotalamusta başlamaktadır. Hipotalamus, ön hipofiz bezine giden hipotalamik hipofiz portal sistemine TRH salgılamaktadır. TRH, hipotalamusun periventriküler çekirdeğindeki hücre gövdeleri tarafından oluşturulan bir peptid hormonu olup ön hipofizdeki tirotropin hücrelerini TSH salınması için uyarmaktadır. TSH kana salınır ve tiroid foliküler hücresinin bazolateral yüzündeki tiroid salgılatıcı hormon reseptörüne (TSH-R) bağlanır. Bu da tiroidi %80 tiroksin (T4) ve %20 L-triiodotironin(T3) salgılaması için uyarmaktadır [5, 17].

Tiroid uyarıcı hormon, tiroid bezinin T3 ve T4 salgıladığını bildirmek için tiroid epitel hücrelerindeki TSH reseptörüne bağlanır. Buna hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı (HPT aksı) adı verilmektedir [25].



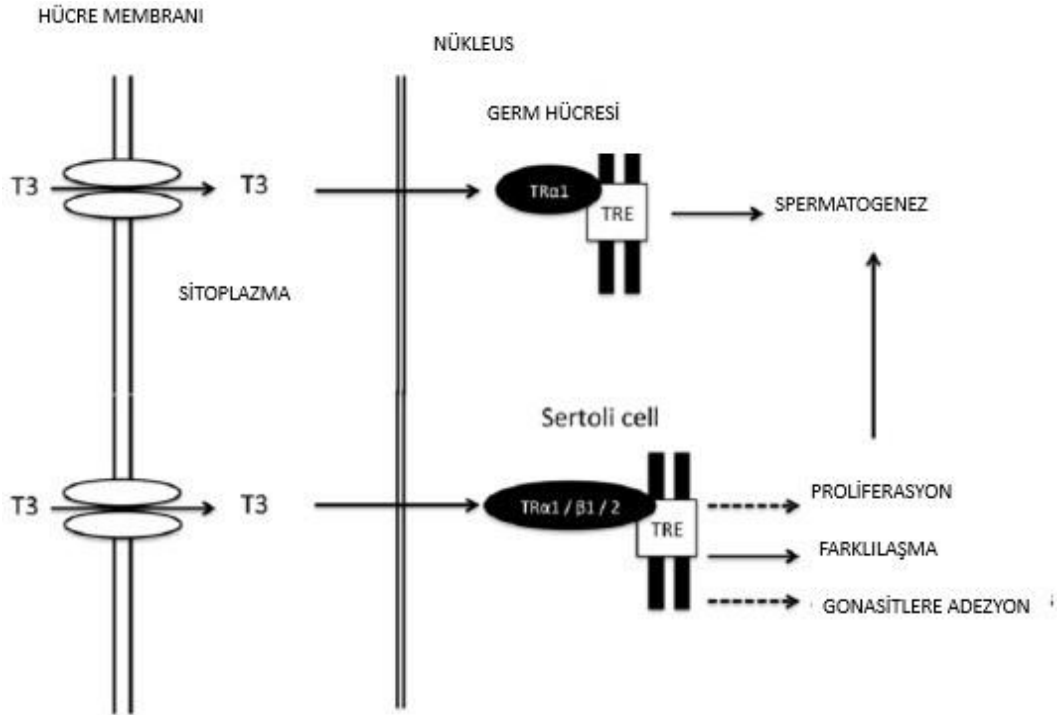
Şekil 2.4. HPT aksı [16]

Lüteinize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormonun (FSH) ön hipofiz tarafından üretilmektedir. Bu iki hormonun üretimi, hipotalamus tarafından yapılan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) tarafından uyarılmaktadır. LH, FSH ve testosteronun spermatogenezini nasıl düzenlediği büyük ölçüde bilinmektedir. Spermatogenez sürecinin başarıyla tamamlanması için testosteron gereklidir, aksi takdirde spermiyogenez sırasında yuvarlak spermatidlerin spermatozoaya dönüşümü bozulur. Bu dönüşümde ve spermatogonyumun spermatozoidlere farklılaşmasında FSH önemli rol oynamaktadır. Germ hücrelerinde testosteron ve FSH için reseptör bulunmadığından, bu hormonlar germ hücrelerinin beslenmesinden sorumlu olan Sertoli hücreleri aracılığıyla hareket etmektedir. Testosteron, LH uyarımı ile Leydig hücreleri tarafından üretilmekte olup bu yolak hipotalamus-hipofiz-gonadal eksen (HPG eksen) olarak bilinmektedir [25].

2.2.1. Tiroid hormonlarının testis üzerine etkileri

Testislerin androjen üretimi ve spermatogenez olmak üzere iki ana işlevi bulunmaktadır. Spesifik olarak, Leydig hücreleri androjenik hormonlar (testosteron, androstenedion ve dehidroepiandrosteron) üretmekte, Sertoli hücreleri ise spermatogenez teşvik eder ve FSH stimülasyonu ile androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılamaktadır [26].

3,5,3'-triiodotironin ve T4, genomik ve genomik olmayan etkilerle testisin işleyişini düzenler. Genomik etkiler, T3'ün çekirdekteki aynı kökenli reseptörüne bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Sertoli ve Leydig hücreleri, burada hormon-reseptör kompleksi tiroid hormonu yanıt elemanlarına bağlandıktan sonra gen transkripsiyonunu ve protein sentezini aktive eder [6].



Şekil 2.5. T3'ün spermatogenez üzerine etkisinin özeti [6]

3,5,3'-triiodotironin Sertoli hücrelerinin gelişimi ve farklılaşmalarını düzenleyerek germ olmayan hücreler üzerinde etki eder. T3, Sertoli hücre çoğalmasını durdurarak, ergenlik döneminde sayılarını belirler ve nöral hücre adezyon molekülünün ekspresyonunu engelleyerek gonositler ile bunlar arasındaki bağlantıyı değiştirir [6].

Bazı TH fonksiyonları, en azından kısmen nükleer reseptörlerden bağımsız olabilir ve çekirdeğin dışında gerçekleşebilir. Ekstra-nükleer yollar, onları "genomik" olarak tanımlanan ve tiroid hormon reseptörlerin (TR) aracılık ettiği gen transkripsiyonunun

düzenlemesinden ayırmak için "genomik olmayan" olarak tanımlanır. Bununla birlikte, sonuçta transkripsiyonu da etkileyebilirler ve TR'lerin alternatif olarak eklenmiş izoformları aracılığıyla aracılık edilebilirler. İki gen ($TR\alpha$ ve $TR\beta$), alternatif ekleme ($TR\alpha1$, $TR\alpha2$, $TR\alpha3$, $TR\beta1$ ve $TR\beta2$) ile elde edilen beş izoformu kodlar. $TR\alpha2$ ve $TR\alpha3$, hormon bağlama alanından yoksundur ve transkripsiyonu baskılayarak tiroid hormonu yanıt elemanının bağlanması için T3 ile rekabet ettiği gösterilmiştir. Germ hücrelerinde $TR\alpha1$, Sertoli hücrelerinde $TR\beta1$ ve $TR\beta2$ baskın izoformdur [6, 27].

Tiroid hormonlarının nongenomik etkileri, spermatozoonun sitoplazmik membranında, sitoplazmasında, hücre iskeletinde ve mitokondrilerinde bulunan nükleer olmayan reseptörlere bağlanmalarından, siklikadenozinmonofosfat sentezini ve Ca^{2+} salınımını ve nihayetinde sperm hareketliliğini artırmalarından kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalar, T4'ün spermlerin flagellar hareketlerini (hipermotilite) hızlı bir şekilde arttırdığı ve sonuç olarak yüzerek geri kazanılan sperm sayısını arttırdığı göstermektedir [6].

Tiroid hormonları, bir dizi antioksidan sisteme dayanan testisin redoks durumunu düzenler. Sperm orta parçasında en bol bulunan mitokondriyal protein, selenyum içeren protein ailesini içeren glutatyon peroksidazdır (GPx). Testiste, GPx hem antioksidan etki (sitoplazmada bulunduğu) ve hem antiapoptotik etki (mitokondriyal bölgeye yerleştirildiğinde) sahiptir. Testisteki diğer antioksidan sistemler arasında süperoksitdismutaz, γ -glutamiltransferaz, katalaz, glutatyon-S-transferaz, sitokrom C, melatonin, C vitamini, E vitamini ve çinko bulunmaktadır. İlginç bir şekilde, γ -glutamil ekspresyonu transferaz ve katalaz tiroid hormonları tarafından artırılırken, GPx ve sitokrom C negatif olarak düzenlenmektedir [6].

2.2.1.1. Sertoli hücre proliferasyonu ve fonksiyonel olgunlaşmasında tiroid hormonunun rolü

Memeli testisinde Sertoli hücreleri, spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesinde anahtar rol oynayan seminfer epitelin ana yapısal bileşenini temsil eder. Bunlar, ilkel seminfer kordların oluşumunu sağlayan erkek gonadın organizasyon merkezi görevi gören bir olay olan Sry genini ifade ederek fetal gonad içinde farklılaştığı bilinen ilk hücre tipidir. Doğumdan sonra, olgunlaşmamış Sertoli hücreleri, bölünmeyi durdurdukları ve proliferatif olmayan yetişkin formlarına farklılaşmaya başladıkları ergenliğin başlangıcına kadar çoğalmaya devam eder.

Ergenlikte bulunan Sertoli hücrelerinin sayısının hem yetişkin testis büyüklüğü hem de sperm çıkışı ile yakından ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Bu noktada, yeterli sayıda Sertoli hücrelerinin oluşturulması gelecekteki erkek doğurganlığı için çok önemlidir. Ergenlik yaklaştıkça, Sertoli hücreleri birbirleriyle ve bitişik germ hücreleriyle spesifik hücreler arası bağlantılardan oluşan karmaşık bir ağ oluşturur [28].

Fizyolojik koşullar altında T3, Sertoli hücre proliferasyonunu inhibe eder ve spermatogenez için gerekli olan olgunlaşmayı destekler. Sertoli hücrelerinin olgunlaşması, morfolojilerinde ve işlevlerinde radikal bir değişikliğe yol açan bir dizi değişikliği içeren karmaşık, çok adımlı bir süreçtir. Bu süreç, Sertoli hücre farklılaşmasıyla ilişkili spesifik proteinlerin baskılanması veya up-regülasyonu ile karakterize edilir ve tiroid hormonunun bu belirteçlerin bir kısmının ekspresyonunu etkilediği görülmektedir Testis hücrelerinde, Cx43 en bol bulunan boşluk bağlantı proteindir ve son araştırmalar, postnatal testiste bu proteinin artan seviyeleri ile T3'ün Sertoli hücre proliferasyonu üzerindeki inhibe edici etkisinin ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu gözlem ileoleamid ve glisirretinik asit gibi boşluk bağlantılarının spesifik blokerleri T3'ün inhibe edici etkisini tersine çevirdiğinde daha da doğrulanmıştır [26, 28].

2.2.1.2. Tiroid hormonunun sertoli hücre metabolizması üzerindeki etkisi

Germ hücrelerinin seminifer tübüllerde yaşamasının, Sertoli hücreleri tarafından üretilen birçok faktörün sağlanmasına bağlıdır. Yapılan çalışmalar, Sertoli hücrelerinin aktif olarak Laktata dönüştürülen ve germ hücreleri tarafından enerji substratı olarak kullanılan glikozu metabolize ettiğini göstermiştir. Glikoz metabolizması üzerindeki etkilerine ek olarak, tiroid hormonları olgunlaşmamış Sertoli hücrelerinde protein sentezini de uyarır. Hem T4 hem de T3, farklı mekanizmalarla Sertoli hücrelerinde aminoasit birikimini destekler. T3 etkisi, bir protein biyosentezi inhibitörü olan sikloheksimit tarafından kısmen bloke edilirken, T4'ün güçlü uyarıcı etkisi değişmeden kalır, bu da T4 etkilerinin genomik olmayan mekanizmalar tarafından modüle edildiğini gösterir [28].

2.2.1.3. Leydig hücre farklılaşması ve işlevinde tiroid hormonunun rolü

Memelilerin testislerinde iki farklı Leydig hücresi popülasyonu bulunur. Fetal Leydig hücreleri, fetal erkekleşme için androjenlerin üretiminden ve neonatal dönemde birincil testiküler testosteron kaynağından sorumludur. Erişkin Leydig hücreleri, testis interstisyumunun peritübüler mezenkimal Leydig hücre öncüllerinden farklılaşır. Erişkin

Leydig hücrelerinin popülasyonu, olgun memeli testislerinde androjenlerin en bol bulunan ve birincil kaynağıdır [28].

Dolaşımdaki TH seviyelerindeki dalgalanmalar, androjenlerin sentezinde, salgılanmasında, dolaşım seviyelerinde, metabolizmasında ve fizyolojik etkisinde değişikliklere yol açar [7].

Lüteinize edici hormon, androjenlerin üretiminden sorumlu olan Leydig hücrelerinde steroidogenezi indükler. FSH gibi, LH'nin biyosentezi de TH'lerin etkisine tabidir. Farklı çalışmalarda tiroid hormonlarının Leydig hücre steroidogenezi üzerindeki doğrudan etkilerinin kanıtı gösterilmiştir. T3'ün keçi Leydig hücrelerinde LH kaynaklı androjen sekresyonunu doğrudan uyardığı ve arttırdığı, hipotiroidizmin ise sıçan testisinde LH'ye yanıt olarak testosteron ve siklikadenozinmonofosfat üretimini azalttığı bildirilmiştir. Tiroid bezi bozukluklarının ayrıca Leydig hücrelerini dolaylı olarak etkileyebilen hipotalamo-hipofiz-testis eksenindeki değişikliklerle ilişkili olduğu gösterilmiştir [7,28].

2.2.2. Tiroid hormon bozuklukları ve erkek reproduktif sistemi üzerine etkileri

Hipotiroidizm, seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) seviyelerinde bir azalmaya ve toplam serum testosteron seviyelerinde bir azalmaya ve ayrıca gonadotropin seviyelerinde, özellikle LH ve FSH bir azalmaya neden olabilmektedir. LH ve FSH düzeylerindeki düşüş nedeniyle uzamış pubertal öncesi hipotiroidizm vakalarında, sırasıyla Leydig ve Sertoli hücreleri olgun hücrelere farklılaşmak için daha az uyarılır ve spermatogenezi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu, testislerdeki hücre sayısını artırır ancak olgun hücre sayısını azaltır. Bu nedenle hipotiroidili hastalarda testis boyutunda artış ve seminifer tübüllerdeki matür germ hücrelerinde önemli bir düşüş gözlenmektedir. Neyse ki, hipotiroidizm erkeklerde çok nadirdir ve genel popülasyonda sadece %0,1'inde görülmektedir. Hipotiroidizmin spermatogenez üzerindeki etkisinin umut verici yönü, hasta hipotiroidizm için tedavi edildiğinde ve ötiroid duruma döndüğünde anormal ve negatif semen parametrelerinin tümü değilse de birçoğunun düzeltilmesidir [4, 29].

Primer hipotiroidizm; tiroid hormonu (levotiroksin) replasman tedavisi ile geri dönüşümlü olan hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkilidir. Primer hipotiroidizmi olan erkeklerde serbest testosteron konsantrasyonları azalır ve tiroid hormonu ikamesi serbest testosteron konsantrasyonlarını normalleştirmektedir [2].

Hipertiroidizm, yüksek serum total T4 seviyeleri durumu ile ilişkilidir. Hipertiroidizm, testosteronun çoğunun bağlayıcı moleküllere bağlı olması nedeniyle

kandaki serbest testosteronun azalmasıyla birlikte SHBG seviyelerinde artış, bağlı testosteronda artış ile ilişkilidir. Hipertiroidizm öncelikle androjenlerin ve östrojenlerin metabolizmasını etkiler. Hipertiroidizm, 5-alfa metabolitlerinin artan üretimi ve androjenlerin östrojenlere dönüşümündeki artışla ilişkilidir. Benzer şekilde, östrojen metabolitlerinin salgılanmasında bir artış olduğu ve bunların tümü, hipertiroidizmden mustarip erkeklerde klinik olarak mevcut olma eğiliminde olan yüksek östrojen biyoaktivitesine yol açtığı kaydedilmiştir. Benzer şekilde, tiroid hormonunun GnRH'ye gonadotropin duyarlılığı üzerinde doğrudan etkisi vardır ve muhtemelen LH ve FSH üretiminin metabolik yolunda bir bozulmaya yol açar. Seks hormonlarındaki bu değişiklikler jinekomastiye, libidonun azalmasına ve erektil disfonksiyona yol açabilir [4, 29].

Hipertiroidizmin moleküler düzeydeki sonuçlarının yanı sıra testislerde hücresel düzeyde de çeşitli etkileri vardır. Birincil rahatsızlık, hipertiroidizmin Sertoli hücre proliferasyonunun erken kesilmesine neden olmasıdır. Bu nedenle, daha az sayıda olgun Sertoli hücresi vardır, bu da gelişmekte olan germ hücrelerini beslemek için yetersiz sayıda Sertoli hücresi nedeniyle sperm üretiminin yanı sıra testis boyutunun azalmasına neden olur. Benzer şekilde, hipertiroidizimli erkeklerde Leydig hücrelerinin çoğalması uyarılır ve yetişkin testislerindeki toplam Leydig hücresi sayısı en az %70 artar. Bunun, T4'ün androjen reseptörlerini inhibe etme, testosteron seviyesini artırma ve sonuçta HPG'ye daha fazla gonadotropin salgılaması için sinyal verme yeteneğinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir [4].

Tirotoksikoz sırasında dolaşımdaki tiroid hormonlarının fazlalığı, hastaların yarısından fazlasında nozospermi ile sonuçlanır. Oligozoospermi ve teratozoospermi, tirotoksik hastaların yaklaşık %40'ında bulunur. Bu anormallikler sıklıkla azalmış bir semen hacmi (hipopoz) ile ilişkilidir. Bu nedenle, azalmış sperm yoğunluğu, hareketliliği ve morfolojisi ile birlikte semen hacmindeki genel bir azalma, tirotoksik erkek hastaların ana semen değişiklikleridir [6].

Hipotiroidizm ve hipertiroidizm gibi tiroid hastalıklarının testis gelişimi üzerinde gerçekten bir etkisi vardır ve mevcut araştırmalar, anormal tiroid profilinin anormal spermatogenez ve erkek kısırlığına yol açabileceğini göstermiştir. Daha da ilginç hem hipotiroidizmin hem de hipertiroidizmin doğurganlığı benzer yollarla, yani öncelikle sperm motilitesini azaltarak etkilemesidir [4].

Tablo 2.3. *Tiroidin spermatogenez ve erkek infertilitesindeki rolünü anlamak için yapılan çalışmaların listesi [25]*

ÇALIŞMA	SAY I	GÖZLEM	SONUÇ	TEDAVİ TİPİ	SONUÇ
Primer hipotirodizm ve insan spermatogenezi	10 erke k	Semen kalitesi üzerinde olumsuz etki, ejakülat hacminde azalma, sperm hareketliliğın de azalma	Ergenlik sonrası erkeklerde semen kalitesini olumsuz etkileyebilir, ancak doğurganlık tedavisi ile geri yüklenir.	Tiroksin	Seminal anormallikle r tedavi ile tersine çevrildi.
İnsan spermatogenezi üzerinde hipotirodizm yan etkisi: prospektif, kontrollü çalışma	35 erke k	Anormal morfoloji, azalmış motilite	Motilite tedavi ile tersine döndü, ancak morfoloji üzerine etkisi yoktur. Hipotirodizm spermatogenezi olumsuz etkiler, ancak tedavi ile düzeltilemezse iyileştirilebilir	Tiroksin	Morfolojiyi etkilemedi ancak sonrasında motiliteyi iyileştirdi.
Hipertiroidizmi olan infertil erkeklerde yükselmiş plazma testosteronu ve gonadotropin seviyeleri	3 erke k	Sperm sayısında azalma, sperm hareketliliğın de azalma	Testesteron, folikül stimüle edici hormon ve lüteinleştirici hormon seviyelerinde ki farklılık	Propiltiouras il (hastaya göre değışen doz)	Anormallikler tersine çevrildi.

Tablo2.3. (Devam) *Tiroidin spermatogenez ve erkek infertilitesindeki rolünü anlamak için yapılan çalışmaların listesi* [25]

ÇALIŞMA	SAYI	GÖZLEM	SONUÇ	TEDAVİ TİPİ	SONUÇ
Hipertiroidizmde testis fonksiyonu	16 Erkek	Azalan sperm hareketliliği, azalan sperm morfolojisi, HPG aksında anormallikler	Tiroid hormonu, cinsiyet steroidi üretimleri üzerindeki etkileri yoluyla dolaylı olarak spermatogenezi etkileyebilir. Seminal parametrelerde anormallikler, seks steroid seviyeleri ve gonadotropin seviyelerinin tümü not edildi.	Radyoiyot ve propranol	Tüm seminal ve hormonal anormallikler geri döndü.
Tiroid değişiklikleri ile ilişkili erkek üreme işlevi	23 erkek	Azalmış sperm hareketliliği	Hipertiroidizm anormal seminal parametrelere katkıda bulunur, ancak geleneksel tiroid tedavisiyle kolayca tersine çevrildi.	Metimazol	Tüm seminal parametreler normalleştirildi.

2.2.3. Erkek üreme fonksiyonlarını düzenlemede tiroid hormonlarının diğer hormonlar ve büyüme faktörleriyle ilişkisi

Prolaktin

Fizyolojik prolaktin dozlarının Sertoli hücreleri üzerindeki doğrudan etkisinin, Sertoli hücre çoğalması ve metabolizmasında önemli bir rol oynayan ABP'nin sentezini arttırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, hipotiroidi hastalarında kontrollere kıyasla belirgin şekilde daha yüksek prolaktin seviyeleri gözlemlenmiştir [30].

Büyüme hormonu

Artan büyüme hormonu ve akromegali seviyeleri, tiroid fonksiyon bozukluğu ile ilişkili olabilmektedir. Akromegalik hasta arasında erektil disfonksiyon prevalansı, özellikle uzun hastalık süresinde %42,1 oranındadır [30].

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1

IGF-bağlayıcı proteinleri bloke ederek IGF3'ün biyoaktivitesini artırarak, T3 ve IGF-3'ün tip A farklılaşmamış spermatogonyanın proliferasyonunu ve baskın farklılaşmasını arttırdığını çalışmalar göstermektedir [30].

Leptin

Hipotiroidizm kilo alımı ve obezite ile ilişkilidir. Leptin, adipositler tarafından üretilir ve üreme dokuları üzerinde merkezi ve periferik etkileri olduğu bilinmektedir. Leptin reseptörlerinin ekspresyonu, erkek üreme fonksiyonlarını etkileyen Leydig hücreleri, prostat ve seminal veziküllerde gözlenir. Leptinin testislerde testosteronu inhibe ettiği bulunmuştur ancak dolaylı olarak GnRH fonksiyonunu regüle edebilen bir etkisi vardır. Hiperleptinemi, sitokin sinyal-3 ekspresyonunu indükler, fosforile sinyal transdüktörünü inhibe eder ve transkripsiyon-3 ekspresyonunu aktive eder. Bu, testislerin ağırlık ve hacminde yanı sıra seminifer tübüllerin çapı ve spermatoisitlerin sayısında bir azalmaya neden olur. Ayrıca tiroid hormonları ile leptin arasında da bir etkileşim vardır; tiroid uyarıcı hormon ile leptin ve vücut kitle indeksi arasında pozitif bir korelasyon kaydedilmiştir. Hipotiroid hastalarında, hipotiroidizmin neden olduğu vücut ağırlığı artışının üstesinden gelmek için serum leptin seviyeleri arttırılabilir [30].

2.3. İlaçların Neden Olduğu Erkeklerdeki Reprodüktif Advers Etkiler

Spermatogonya, Sertoli hücreleri veya Leydig hücrelerine zarar veren herhangi bir ilaç, spermatogenez ve sperm olgunlaşma sürecini etkileyebilir. Testis veya epididim mikro çevresinde zararlı değişikliklere neden olan ilaçlar ayrıca spermatogenez ve sperm olgunlaşmasını etkileyerek doğurganlık üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir. İlaçlar hipotalamik-hipofiz-gonad eksenini etkileyerek endokrin bozucu kimyasallar (EDC) görevi de görebilir [1, 31].

Kematerapötik ajan doğrudan androjen reseptörleri üzerinde etkili olabilir, hedef dokudaki endojen androjenlerin aktivitesini değiştirebilir veya hipotalamus/hipofizdeki geri bildirim döngülerini bozarak gonadotropin salınımının modifikasyonuna neden olabilir. Bu durumda bozulmuş testosteron üretimi ve/veya spermatogenez ile sonuçlanabilmektedir. Diğer EDC aktiviteleri, prolaktin, östrojen, kortizol, tiroid

hormonu veya SHBG seviyeleri üzerindeki etkiler yoluyla dolaylı olabilir. Bu hormonların ve SHBG'nin uygun şekilde düzenlenmesi normal üreme fonksiyonu için gereklidir [31].

Dolaşımdaki prolaktin düzeylerinde artış yaygın görülen bir olumsuz ilaç etkisidir. Sonucu ise daha düşük gonadotropin ve testosteron salgısıdır. İlaçlar ayrıca Leydig hücreleri, Sertoli hücreleri veya germ hücreleri üzerindeki etkiler de dahil olmak üzere seminifer tübül epiteli üzerinde doğrudan toksisiteye sahip olabilir. Bazı durumlarda spermatogenez ciddi şekilde bozulur. Sperm testislerden ayrıldıktan sonra epididimde bir hafta veya daha uzun süre kalır. Bazı ilaç etkilerinin zamanlamasından sperm epididimal geçiş sırasında zarar gördüğü açıktır. Ayrıca ejakülasyon refleksinde de bozulma olabilir, bu da seminal plazma salınmasında veya dışarı atılmasında değişikliklere neden olabilir. Ejakülasyon sonrasında bile seminal plazmaya maruz kalmak sperm fonksiyonunu değiştirebilir ve bazı ilaçlar bu aşamada spermi etkileyebilir. Erkek üremesi üzerindeki en kritik etkiler doğurganlığın azalması ve/veya yavrular üzerindeki sağlık etkileridir. Bir diğer husus ilaçların metabolizmasıdır. Eşlik eden durumlar nedeniyle metabolik sistemler yetersizse ilaçlar daha toksik hale gelebilmektedir [31].

İnsan spermatogenezini etkileme olasılığı en yüksek olan ilaçlar hormon bazlı ajanlar olarak bulunmuştur. Spermatogenez üzerinde etkileri olması en olası olan bir sonraki ilaç kategorisi, antineoplastik ajanlardır. Sitotoksik ilaçların yanı sıra, diğer ilaçlar da erkeklerin doğurganlığını çeşitli mekanizmalarla etkileyebilir. Hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen hormonlarının modifikasyonu yoluyla veya hormonal olmayan mekanizmalar yoluyla, ilaçlar doğrudan ve dolaylı olarak cinsel işlev bozukluğuna ve spermatogenez bozukluğuna ve epididimal olgunlaşmanın değişmesine neden olabilir [1, 32].

Hormonların, hormon ikamelerinin ve hormon antagonistlerinin spermatogenez üzerindeki etkisi

Hormonlar, hormon ikameleri ve hormon antagonistleri, erkek doğurganlığı üzerindeki olumsuz etkileriyle iyi bilinir. Libidodaki değişikliklere ek olarak, bu ajanlar ayrıca özel bir spermatotoksik ajan sınıfını temsil eder. Hormon bazlı tedaviler ve testosteron, hipotalamik-hipofiz-gonadal eksenini inhibe ederek hipogonadotropik hipogonadizme yol açabilir. Bu, spermatogenezin kısmen veya tamamen engellenmesiyle sonuçlanır ve bu da oligospermiye, kriptozoospermiye ve hatta azospermiye yol açabilir.

Hormonlar aynı zamanda germ hücrelerini Sertoli hücre fonksiyonunu modüle ederek etkileyebilir, çünkü bu hücreler hem FSH hem de testosteron için reseptörleri ekspres eder. Erkek hormonları veya bunların türevlerini içeren tüm ilaçlar, sperm çoğalmasını ve/veya olgunlaşmasını bozma, spermatogenezi baskılama ve potansiyel olarak oligozoospermiye yol açacak şekilde testis fonksiyonunu inhibe etme potansiyeline sahiptir [1, 32].

Antineoplastik ajanların spermatotoksitesisi

Antineoplastik ajanlar, erkeklerde hem germ hücrelerine hem de destekleyici Sertoli hücrelerine zarar verme potansiyeline sahiptir ve çoğu kemoterapi kürünün hemen ardından ciddi oligozoospermi veya azospermiye yol açar. Hızla bölünen farklılaşan spermatogonia, daha yavaş çoğalan hücrelere göre daha hassastır. Çoğu alkile edici antineoplastik ajan, germ hücreler için toksiktir ve DNA'yı çapraz bağlama yeteneklerinden dolayı uzun süreli azospermi üretir. Busulfan, spermatogoniyal kök hücreleri öldürdüğü için en yüksek oranda kısırlaştırıcı antineoplastik ajanlardan biri olarak kabul edilir. Buna karşılık, diğer antineoplastik ajanlar azospermiye neden olmaz veya yalnızca farklılaşan spermatogoniayı öldürdükleri için sperm sayısında yalnızca geçici ve/veya orta düzeyde azalmalara neden olur [1].

Antiinflatuar ilaçların etkileri

Anti-inflatuar ilaçlar, bağışıklık hücrelerinden hücre yüzey reseptörlerine, sinyal moleküllerine ve reseptörlere kadar geniş bir yelpazede hedeflere sahiptir. Sekiz anti-inflatuar ilacın etiketleri, bunların spermatogenezi olumsuz etkileme potansiyeline sahip olduklarını ve sperm motilitesinde ve/veya sayısında değişiklikler bildirdiklerini göstermektedir [1].

İnsan spermatogenezini etkileyen diğer ilaçlar

Spermatogenezi etkilediği bildirilen FDA onaylı ilaçların neredeyse yarısı bu üç ana kategoriye uymamakta ve çeşitli nedenleri olmasına rağmen bu ilaçların en yaygın etkisi epididimittir. Örneğin, trisiklik antidepressanlar ve seçici serotonin geri alım inhibitörleri, merkezi dopamin salgılanmasını bloke ederek hiperprolaktinemiden sorumludur ve dolaylı olarak hipogonadizme neden olur, böylece hormon sinyalleşmesini ve spermatogenezi etkilemektedir [1, 32].

İnsan spermatogenezini bozma potansiyeline sahip FDA onaylı ilaçlar Tablo 2.4.'de listelenmiştir.

Tablo 2.4. İnsan spermatogenezini bozma potansiyeline sahip FDA onaylı ilaçlar [1]

İlaç Kategorisi	İlacın Genel Adı	İnsan Spermatogenezinde Olumsuz Etki
Analjezik	Metadon Hidroklorür	Sperm hareketliliğinde ve seminal vezikül salgılarında azalma, anormal sperm morfolojisi
	Pregabalin	Epididimit (nadir)
	Gabapentin	Epididimit (nadir)
Anti-Aritmik Ajan	Amiodaron Hidroklorür	Epididimit (nadir)
Anti-Bakteriyel Ajan	Lomefloksasin Hidroklorür	Epididimit, orşit (hastaların <%1'i)
Antikonvülsan	Nitrofurantoin	Spermatojenik tutuklama/düşük sperm sayısı (yüksek dozlar)
	Dapson	Orşit, erkek kısırlığı
	Lamotrijin	Epididimit (nadir)
Antidepresan	Klomipramin Hidroklorür	Epididimit (seyrek)
	Levomilnasipran Hidroklorür	Epididimit, seminal vezikülit
	Paroksetin Mesilat/Paroksetin Hidroklorür	Azalmış sperm kalitesi, epididimit
Antihipertansif Ajan	Fluvoksamin Maleat	Hematospermi
	Venlafaksin	Orşit (nadir)
	Nifedipin	Yumurtayı dölleme yeteneğinde geri dönüşümlü azalma
Anti-Enfektif Ajan	Vorikonazol	Epididimit
Antiinflamatuvar Ajan	Kolşisin	Azoospermi veya oligozoospermi
Anti-Enfektif Ajan	Kortizon Asetat	Spermatozoa hareketliliği ve sayısındaki değişiklikler
	Deksametazon/Deksametazon Sodyum Fosfat	Spermatozoa hareketliliği ve sayısındaki değişiklikler
	Metilprednizolon/Prednizon	Spermatozoa hareketliliği ve sayısındaki değişiklikler
	Sülfasalazin	Geri dönüşümlü oligozoospermi ve kısırlık
Anti-Enfektif Ajan	TriamsinolonHeksasetonid	Spermatozoa hareketliliği ve sayısındaki değişiklikler

Tablo 2.4. (Devam) *İnsan spermatogenezini bozma potansiyeline sahip FDA onaylı ilaçlar* [1]

İlaç Kategorisi	İlacın Genel Adı	İnsan Spermatogenezinde Olumsuz Etki
Antineoplastik Ajan	Busulfan	Spermatozoa ve testis dokusunda hasar, azospermi, testis atrofisi
	Klorambusil	Azospermi
	Siklofosfamid	Spermatogenez, testis atrofisi, azospermi, oligozoospermi ile etkileşime girer
	Dabrafenib Mesilat	Bozulmuş spermatogenez, azalmış sperm sayısı
	Degarelix	Testis Atrofisi
	Fludarabin Fosfat	Spermatozoa ve testis dokusunda hasar
	Merkaptopürin	Oligospermi
	Metotreksat Sodyum	Oligospermi (geri dönüşümlü)
	ProkarbazinHidroklorür	Azospermi
	TriptorelinPamoat	Testis Atrofisi
	Vinblastin Sülfat	Azospermi
	Vinorelbin Tartarat	Spermatozoa hasarı
	Talidomid	Orşit
Anti-Parkinson Ajanı	Pramipeksol	Epididimit, orşit
	Dihidroklorür	
Antipsikotik Ajan	Ketiapin Fumarat	Orşit (seyrek)
Reddetme Önleyici İlaç	Everolimus	Azoospermi veya oligozoospermi
Antiviral Ajan	Delavirdin Mesilat	Hematospermi, epididimit
	Gansiklovir/Gansiklovir Sodyum	Testiküler hipotrofi, aspermatogenez
	Valgansiklovir	Spermatogenezinin inhibisyonu
Kardiyovasküler Ajan	Bosentan	Azalan sperm sayısı
Hormonlar, Hormon İkameleri ve Hormon Antagonistleri	KlomifenSitat	Testis Tümörleri
	Dutasterid	Azalmış sperm sayısı, semen hacmi ve sperm hareketliliği

Tablo 2.4. (Devam) *İnsan spermatogenezini bozma potansiyeline sahip FDA onaylı ilaçlar* [1]

İlaç Kategorisi	İlacın Genel Adı	İnsan Spermatogenezinde Olumsuz Etki
	Finasterid	Azalan ejakülat hacmi ve boşalma başına toplam sperm (tersinir)
	Flutamid	Testosteron ile etkileşim, azalmış sperm sayısı
	Histrelin Asetat	Testis Atrofisi
	Löprolid Asetat	Bastırılmış testikülersteroidogenez, testis atrofisi
	Metiltestosteron	Oligospermi, baskılanmış spermatogenez
	Nandrolone Dekanoat	Testis fonksiyonunun inhibisyonu, testiküleratrofi ve oligozoospermi, epididimit
	Nilütamid	Testis atrofisi
	Oksandrolon	Bastırılmış spermatogenez, testis fonksiyonunun inhibisyonu, testis atrofisi, oligozoospermi, epididimit
	Oksimetolon	Testis fonksiyonunun inhibisyonu, testiküleratrofi, oligospermi, seminal hacimde azalma, epididimit
	Testosteron/Testosteron Cypionate/Testosteron Enanthate/Testosteron Undecanoate	Bastırılmış spermatogenez/oligospermi
Bağışıklık Bastırıcı	Sirolimus	Azospermi (geri dönüşümlü)
Fosfodiesteraz Tip 5 İnhibitörü	Tadalafil	Azalan sperm konsantrasyonu
Periferik Sinir Sistemi Ajanı	Sevimelin Hidroklorür	Epididimit
Radyoaktif Bileşik	Sodyum İyodür I ¹³¹	Testis fonksiyonunda bozulma/geçici kısırılık

2.3.1. Levotiroksinin neden olduğu erkeklerdeki reproduktif advers etkiler

Bir önceki bölümde de incelendiği üzere; ilaçların üreme işlevi (spermatogenez, sperm parametreleri ve cinsel işlev) üzerindeki etkileri, iyi bilinen birkaç reprotoksik farmakolojik sınıf dışında genellikle belirsizdir. Bazı durumlarda, erkeklerde veri bile

yoktur ve bir ilacın erkek üreme organları için toksisitesi yalnızca hayvan modellerine (kemirgenler) dayalı olarak belirlenir.

Pazarlama izni almak amacıyla farmasötik bir madde geliştirildiğinde, hayvanlarda (kemirgenler + diğer memeli türleri) gerçekleştirilen klinik öncesi güvenlik çalışmaları, insan doğurganlığı üzerindeki olası olumsuz etkileri tahmin etmenin bir yoludur.

İnsanlarda, çalışmaların çoğu küçük örneklem ve hatta vaka serileri üzerinde yapılır ve her zaman bir plasebo grubu veya kontrol grubu içermez. Belirli sayıda çalışma, bir ilacın dozu ve etkisi arasındaki ilişkiyi, kalan hastalığın erkek doğurganlığı üzerindeki etkilerini (hastalığın kendisinin etkisi) dikkate almamaktadır.

Sentetik levotiroksin dozaj formlarının reproduktif advers etkilerine yönelik hem Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu hem de FDA tarafından onaylanan ilaçların kısa ürün bilgisinde hayvan çalışmasının mevcut olmadığı, güvenli doz aralığında herhangi reproduktif yan tesirlere rastlanmadığı yönündedir [32].

2.4. *In vitro* reproduktif toksisite modelleri

İlaçların güvenlik değerlendirmesi, İnsan Kullanımına Yönelik İlaçlar için Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Uluslararası Konseyi (ICH) tarafından yayınlanan kılavuzlarda belirtilmiştir.

Hedef popülasyona bağlı olarak farmasötikler, genel olarak aşağıdakileri içeren ICH S5 kılavuzuna göre üreme döngüsünün ilgili tüm aşamalarında teste tabi tutulmalıdır:

- 1) Doğurganlık ve erken embriyonik gelişim,
- 2) Embriyo-fetal gelişim,
- 3) Doğum öncesi ve sonrası gelişim.

Bileşikler ilgili periyot boyunca uygulanır ve ebeveyn hayvanlar ve yavrular üzerindeki etkilerin karakterizasyonu sonunda yer alır. Bu çalışmalar tipik olarak test koşulu başına 16-20 litre kemirgen ve tavşan gerektirir ve bunların uygulamaları ICH M3 (klinik dışı güvenlik çalışmaları), S6 (biyofarmasötikler) ve S9 (anti kanser ilaçları) kılavuzlarında yer alır [33].

Kimyasalların ve ilaçların düzenleyici üreme ve gelişimsel güvenlik testleri şu anda yalnızca *in vivo* olarak hayvan modelleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir ve en tipik olarak sıçanlarda ve tavşanlarda gerçekleştirilir. Şu anda, birleşik gelişimsel ve üreme toksisitesi analizi alanları, Avrupa Birliği düzenleyici toksisite testlerinde en yüksek sayıda hayvanı gerektirmektedir [34].

Alternatif gelişimsel ve üreme toksisitesi modelleri, düzenleyici risk değerlendirmesi için hayvanların 3R'lerinin (azaltma, iyileştirme ve yerine koyma) ilkeleriyle tutarlıdır.

Şu anda, Avrupa Birliği Hayvan Testlerine Alternatifler Referans Laboratuvarı tarafından sağlanan Hayvan Deneilerine Alternatif Yöntemler Veritabanı, gelişimsel toksikoloji testi için onaylanmış üç *in vitro* yöntem içermektedir. Bu sistemler, sıçan uzuv tomurcuğu mikrokütletesti, sıçan implantasyon sonrası bütün embriyo kültürü testi ve fare embriyonik kök hücre testini içerir. En popüler öngörücü gelişimsel toksisite deneyleri, embriyonik kök hücreler, kemirgen bütün embriyo kültürü ve zebra balığıdır. Bunların her biri, ilaç keşfi ve geliştirmede faydası kanıtlanmış, oldukça iyi geliştirilmiş teknikleri içerir [33, 34].

Erkek ve dişi reprodüktiftoksitesisi için *in vitro* veya *ex vivo* yöntemler daha az yerleşiktir, ancak ilaç geliştirmede, özellikle mekanizmaları aydınlatmak veya yan ürün bileşikleri taramak için yararlı olabilecek umut verici deneyler geliştirilmektedir [34].

Erkek üreme sistemini etkilediği bilinen çok sayıda kimyasalın spermatogenez sürecine doğrudan müdahale ederek bunu yaptığı görülse de olumsuz erkek üreme sonuçlarıyla sonuçlanabilecek bir dizi başka hedef de vardır. En spesifik örnek dolaylı ya da direkt yoldan HPG aksını etkileyen bileşiklerdir. Örneğin, beslenme eksikliği ve kritik vitamin ve minerallere (örn. A vitamini ve çinko) aşırı maruz kalma, normal erkek üreme fonksiyonunu bozabilir. Benzer şekilde, karaciğer üzerinde doğrudan etkisi olan kimyasallar (örn. karbontetraklorür), cinsiyet steroidlerinin normal metabolizmasını bozarak, klirensinde değişikliklere (özellikle erkeklerde hidroksi testosteronların glukuronid ve sülfat konjugatlarının) yol açarak HPG eksenini dolaylı olarak etkileyebilir ve erkek üremesini bozmaktadır [35].

Testiküler toksisiteye yönelik öngörücü tarama analizleri, ilaç keşfinde küçük miktarlarda (mg) bileşik kullanarak potansiyel ilaç adayları arasındaki testis duyarlılığını hızlı bir şekilde taramasına olanak tanımaktadır. Bir adayın testis toksisitesi dağıtım, metabolizma veya atılım özellikleriyle daha da modüle edilebileceğinden, *in silico* veya *in vitro* bölümlene veya taşıma modelleri, *in vitro* testis toksisitesi verileriyle birlikte dozun değerlendirilmesinde yararlı olabilir [35].

Monokültürler

Germ hücre monokültürleri, gen ekspresyonunu ve testis faktörlerinin farklılaşmadaki rollerini anlamak için ideal bir yaklaşımı temsil eder. En basit kültürler

hormonlardan ve büyüme faktörü takviyesinden yoksundur ve zorunlu olarak kısa sürelidir; 24 saat sonra hücrelerin %50'sinden fazlası canlılığını kaybeder. Bu tür kültürler sıklıkla farklılaşmanın ani belirtilerini veya *in vitro* fertilizasyon için hücre uygunluğunu incelemek için kullanılır [36].

Daha uzun vadeli kültürler (haftalar ila aylar), fetal dana serumunun değişen konsantrasyonları ve büyüme faktörlerinin eklenmesi gibi deneylerin ardından mümkün hale gelmiş fakat tam anlamı ile spermatogonyal kök hücrelerin muhafaza edilebildiği ve çoğalabildiği, mayoz bölünmeye uğradığı ve spermiogenezi tamamlayabildiği bir *in vitro* kültür sisteminin kurulması henüz mevcut değildir. Bunun nedeni, germ hücrelerinin tanımlanmış alt popülasyonlarının izolasyonu ve saflaştırılmasındaki zorluk ve erkek germ hücre dizilerinin oluşturulması, germlerin hayatta kalmasını ve farklılaşmasını destekleyen optimal biyokimyasal ve biyofiziksel koşullar hakkındaki eksik bilgimizdir. Örneğin, Sertoli hücresinden salgılanan faktör, glial hücreden türetilen nörotrofik faktör (GDNF), spermatogonial kendini yenilemeyi ve farklılaşmayı kontrol eder. Yerleşik monokültürlerdeki ve GDNF'den yoksun besleyici-germ hücre ortak kültürlerindeki spermatogonia çoğalmayı durdurur ancak farklılaşmaya devam eder ve çoğalma diğer büyüme faktörlerinin eklenmesiyle onarılamaz. Germ ve besleyici hücreler arasındaki doğrudan hücre-hücre temasının da normal spermatogenez için önemli olduğu ve germ hücresi monokültürlerinde bulunmadığı görülmektedir. Bu nedenle, spermatogenezi özetlemek için modellerin yapılması düşünüldüğünde hem germ hücrelerini hem de Sertoli hücrelerinin dikkate alınması gerekir. İzole edilmiş spermatogonia veya kök hücrelerin haploit spermatidler halinde olgunlaştırıldığı modeller muhtemelen bir testiste meydana gelen toksikolojik olarak savunmasız tüm süreçleri yakalamayacaktır. Sertoli hücrelerinin mevcut olmasını gerektirecektir [34-36].

Besleyici Hücreler

Monokültürler bireysel büyüme faktörlerinin incelenmesini kolaylaştırırken, Sertoli-germ hücresi ortak kültürleri, germ hücresi hayatta kalma faktörleri olarak Sertoli hücreleri aracılığıyla etki eden testosteron veya dihidrotestosteronun rolü gibi parakrin etkilerinin bir bütün olarak incelenmesi için faydalıdır. Sertoli-germ hücresi ortak kültürleri de germ hücreleri üzerinde ortaya çıkan etkileri göstermektedir.

In vitro kültüre edilmiş yetişkin tipi Sertoli hücreleri, farklılaşmanın tüm aşamalarında germ hücreleriyle doğru hücre bağlantıları oluşturamayabilir. Bu primer yetişkin Sertoli'ye alternatif mevcut az sayıdaki germ hücresine güçlü bir şekilde

yapışmayan ve nispeten daha saf elde etmek için prepubertal immatur Sertoli hücrelerinin kullanılabilir. Prepubertal Sertoli hücreleri de mitotik olarak aktiftir, oysa yetişkin Sertoli hücreleri *in vitro* bölünmez ve dolayısıyla tükenebilir, ancak bunların ömrü testosteron ve FSH takviyesiyle arttırılabilir. Ancak olgunlaşmamış Sertoli hücreleri tam yetişkin hücre fenotipini eksprese etmez ve bu nedenle FSH ve androjenlere hâlâ yanıt verebilse de germ hücresi tutunması ve hayatta kalması için gerekli olan belirli büyüme faktörlerini veya proteinleri eksprese edemeyebilir. Diğer bir alternatif ise fare TM4, 15P-1 veya SK11 hücreleri gibi Sertoli hücrelerinden türetilmiş ölümsüzleştirilmiş hücre çizgilerinin kullanılmasıdır; bunların tümü Sertoli hücrelerine özgü genlerin bir aralığını eksprese eder ve bu nedenle uygundur [34, 36].

Besleyici hücreler olarak geliştirilen diğer birçok hücre dizisinden testis hücrelerinin yetiştirilmesinde kullanılan en başarılı soylardan biri Vero hücreleridir; bu hücrelerin spermatozoa olgunlaşma kültürlerinde sıradan ortamdaki daha iyi performans gösteren şartlandırılmış bir ortam ürettiği rapor edilmiştir; bu etki, FSH ve testosteronun desteklenmesi durumunda daha da artar. Mezonefrik kökenli Vero hücrelerinin burada epididim hücreleri gibi davranması mümkündür. Vero hücrelerinin Sertoli hücre temasını ne ölçüde taklit ettiği belirsizdir. Vero hücrelerinin hücre-hücre teması yoluyla spermatozoa hareketliliğini koruduğu görülse Vero hücrelerinin farklılaşmanın diğer aşamalarında erkek germ hücrelerine bağlanma kapasitesi ayrıntılı olarak araştırılmamıştır. Spermatoγονiyal kök hücre kültürleri için, STO fare fibroblastlarının da muhtemelen LIF ve Wnt ailesi üyelerinin salgılanması yoluyla farklılaşmayı teşvik etmek için yeterli olduğu görülmektedir. Sığır embriyonik fibroblastları benzer şekilde işlev görebilir [36].

Testosteron, seminifer tübüller arasındaki boşluklarda yaşayan Leydig hücrelerinden gelir. Bunlar kendi başlarına kolayca izole edilebilir ve korunabilir. Leydig veya tüm ana steroidleri sentezleyen ve salgılayan ve bu sentezdeki değişikliklerin aslında sadece *in vivo* hormon değişiklikleriyle değil, aynı zamanda üreme toksisitesiyle de oldukça iyi korelasyon gösterdiği bir h295R adrenal hücre dizisi daha genel olarak kullanılabilir [34].

Seminifer tübül kültürü testisin parakrin ortamı kısmen veya çoğunlukla korumasından ve bakımını yapmak nispeten basit görünmekte olduğu için tercih edilebilmektedir. Kültür doğası gereği spermatogenezin tüm aşamalarını destekleme kapasitesine sahiptir ve tüm doku ile spermatogenik döngünün eş zamanlı

gözlemlenmesine olanak tanıyabilir fakat birkaç günden fazla muhafaza edilmesi, tübül lümeninin kaçınılmaz olarak çökmesi ve dolayısıyla büyüme faktörleri ve metabolitlerin difüzyon kinetiğinin değişmesi nedeniyle zor olabilmektedir [37].

Testis parçalarının eksplant kültürü yenidoğan fare testis parçalarını kullanan ve spermatogonyadan başlayarak tamamen işlevsel spermatozoa elde edilebilir. Androjen üreten Leydig hücreleri de dahil olmak üzere testis parakrin sisteminin tüm bileşenleri eksplant kültürlerinde mevcuttur ve yalnızca fetal sıgır serumu ve antibiyotiklerle desteklenen Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı (DMEM) gibi oldukça basit ortamlarda germ hücresi çoğalmasını sürdürebilir [37, 38].

Ortak Kültür

Sertoli ve germ hücrelerinin ortak kültürü bir süredir kullanılan bir modeldir. Bu model, 28 günlük sıçanların testislerinin fiziksel olarak parçalanmasını, ardından enzimatik sindirimi ve yüksek oranda Sertoli/germ hücrelerine sahip küçük hücre kümelerini izole etmek için santrifüj sedimantasyonunu içerir. Sertoli hücreleri hücre kültürü yüzeyine bağlanarak germ hücrelerinin bağlandığı birleşik bir tek tabaka oluşturur. Kültürler, Sertoli hücreleri ve yuvarlak germ hücrelerinin (spermatositler ve spermatogonia) yanı sıra birkaç peritübüler hücre de içerir. Bu kültürlerde eksik olan testis hücre tipleri, uzun spermatidleri ve Leydig hücrelerini içeren karmaşık interstisyel popülasyonu içerir. Bu kültür sisteminde, testis toksik maddelerinin germ hücrelerinin Sertoli hücre tek katmanından ayrılmasına neden olduğu rapor edilmiştir ve ortama salınan germ hücrelerinin sayısı ölçülebilir. Toksik maddeler ayrıca bağlı kalan hücrelerin canlılığının azalmasına da neden olabilir; ancak germ hücrelerinin salınması sadece hücre ölümünün bir sonucu olmayabilir.

Ortak kültürün avantajı toksisite tespitinde primer hedef sertoli ve germ hücrelere hızlı ve kolay tespit edilebilir fakat öte yandan bileşiğin metabolitlerinin toksisitesini aydınlatmak için yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte uzun süreli maruziyetin sonuçları veya hormonal bozulma veya olgun spermatid bozulmayı tespit mümkün olamamaktadır [35].

Üç boyutlu kültür yaklaşımları, erkek üreme sistemi de dahil olmak üzere birçok hücre kültürü platformuna yavaş yavaş entegre edilmektedir. Erkek üreme son noktalarını değerlendirmek için kemirgen ve insan dokusundan çeşitli *in vitro* modeller oluşturulmuştur ve bu modeller, 10 günlük ve 28 günlük sıçanlardan Sertoli/germ hücre ortak kültürlerini içermektedir. Bu kültür sistemleri, çoğu bu dinamik dokuda gerekli olan

karmaşık biyokimyasal ve fizyolojik sistemleri sürdüremediği için testis dokusu tepkisinin kısa değerlendirmeleri için kullanılmıştır [35].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Levotiroksin

Bilim İlaç Sanayii ve Ticaret A.Ş.

DMEM-F12Medium

WisentBioProducts

Penisilin-Streptomisin çözeltisi

WisentBioProducts

Fötal sığır serumu

CapricornScientific

Tripsin-EDTA çözeltisi	CapricornScientific
Dulbecco's fosfat tamponlu serum fizyolojik (DPBS) (Ca ⁺² ve Mg ⁺² içermeyen)	Sigma-Aldrich
Fosfat tamponu çözeltisi (PBS) tableti	Bioshop
Tripan mavisi	Bio-Rad
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Carlo Erba
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)	Serva
Nötral kırmızı (NK) çözeltisi (% 0,33)	Sigma-Aldrich
Hidroklorik asit (% 36,5-38)	Sigma-Aldrich
Absolü etanol	Sigma-Aldrich
Glasiyel asetik asit	Sigma-Aldrich
Formaldehit çözeltisi (% 37)	Merck
Kalsiyum klorür dihidrat	Merck
Normal erime noktalı agar	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Düşük erime noktalı agar	Sigma-Aldrich
Etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA-Na ₂)	Sigma-Aldrich
Tris(hidroksimetil)aminometan	Serva
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) (%30)	Merck
SYBR Green I boyası	Invitrogen
DCFDA/H ₂ DCFDA Cellular ROT Assay Kit	Abcam

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Biyogüvenlik kabini	Heal Force
Mikroplaka okuyucusu	Biotek
İnkübatör (CO ₂ dönüşümlü)	ThermoFisherScientific
Otoklav	Hirayama
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf

pH metre	MettlerToledo
Ters mikroskop	Leica
Hücre sayım cihazı	Bio-Rad
Hücre sayım slaytı	Bio-Rad
Hassas terazi	Ohaus
Elektroforez tankı	CleaverScientific
Elektroforez güç kaynağı	Thermo-Scientific
Floresan ışık mikroskobu	Leica
CometAssay IV görüntü analiz sistemi	Perceptive Instruments
Hücre kültür şişesi	Nest
96 kuyucuklu hücre plakası	Nest
Otomatik pipetler	Eppendorf
Pipet uçları	Vertex
Polipropilen tüp	Isolab
Steril polipropilen santrifüj tüpü	Nest
Steril serolojik pipet	LP
Steril rezervuar	Axygen
Kilitli kapaklı mini santrifüj tüpleri (2 ml)	Microcult
Lam	Menzel
Lamel	Thermo-Scientific
Şırınga ucu filtre (0,22 µM)	Aisimo Corporation

3.3. Kullanılan Hücre Hatları

TM3 (CRL-1714TM) fare Leydig hücreleri ve TM4 (CRL-1715TM) fare Sertoli hücreleri American Type Culture Collection (ATCC) kuruluşundan temin edildi.

3.4. Yöntemler

Hücreler, %5 horse serumu, %2,5 fetal sıgır serumu ve %1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren DMEM-F12 (1:1) besiyerinde inkübe edildi (37 °C, %5 CO₂).

Deneylerde pasaj numaraları 4-10 olan hücreler kullanıldı.

3.4.1. Hücre hatlarının çoğaltılması

Deneylerde kullanılan TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücrelerinin çoğaltılması ve deneye hazırlanması için 2-3 günde bir rutin olarak pasajlama işlemi yapıldı.

1. Ölü hücreler ve metabolik artıklardan uzaklaştırmak için inkübatörden alınan hücre kültür şişesi hafifçe çalkalanarak besiyerine artıkların geçmesi sağlandı ve steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atıldı.

2. Kültür şişesine 5 ml fosfat tamponu ilave edilerek hücreler yıkandı ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldı.
3. Kültür şişesine hücreleri bulunduğu yüzeyden ve birbirinden kopararak homojen süspanse edilebilmesi için proteaz aktivasyonu gösteren tripsin EDTA çözeltisi (75 cm²'lik kültür şişelerine 32 ml) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletildi (37 °C, %5 CO₂).
4. İnkübatörden alınan kültür şişelerinin üzerine 20–25 ml besiyeri ilave edilerek hücreler süspanse edildi ve 1:20 ila 1:200 oranlarında bölünerek yeni kültür şişelerine alındı.
5. Kültür şişeleri inkübasyona bırakıldı (37 °C, %5 CO₂).

3.4.2. Hücre canlılığının belirlenmesi

Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla MTT ve Nötral Kırmızısı (NK) olmak üzere iki farklı yöntem kullanıldı. MTT yöntemi hücrenin metabolik aktivasyonundan hareketle sitotoksiteyi belirlenmesinde kullanılan kolorimetrik analiz yöntemi olup MTT adı verilen sarı renkli tetrazolyum tuzunun mitokondrideki NADPH aracılı oksidoredüktif aktivite ile çözünmeyen mor formazan kristallerine indirgenmesi prensibine dayanır. Formazan kristal yoğunluğu ile canlılık arasında pozitif korelasyon bulunur. NK yöntemi, katyonik bir boya olan nötral kırmızının aktif taşımayla lizozomlara bağlanması ve dahil olması prensibine dayanılarak gerçekleştirilir; 540 nm'de spektrofotometreyle kantitatif olarak analiz olanağı sunmaktadır [39- 41].

Hücre kültürlerinin plakaya ekilmesi

1. İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesi sağlanmak için hafifçe çalkalandı ve sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atıldı.
2. Kültür şişesine proteaz aktivasyonu için tripsin-EDTA çözeltisi 2 ml eklenerek hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatöre bırakıldı.
3. İnkübatörden alınan kültür şişelerinin içine ilave edilen tripsin-EDTA çözeltisinin en az iki katı kadar besiyeri ilave edilerek enzim aktivasyonu durduruldu ve sonrasında pipet yardımıyla santrifüj tüpüne alındı.
4. Santrifüj sonrasında hücre pelleti taze besiyeri ile süspande hale getirildi. Hücre süspanسیونundan 10 µl alınarak 10 µl tripan mavisi ile karıştırılarak otomatik hücre sayma cihazında sayıldı.

5. 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre plakasına ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.4.2.1 MTT sitotoksisite testinin uygulanması

1. Levotiroksinin 0,1-200 μM 8 seri konsantrasyonu (çözeltiler DMSO içinde hazırlandı) büyüme kontrol ve çözücü kontrol ile plakalara uygulandı. 24 saat inkübasyona bırakıldı (37 °C, %5 CO_2).
2. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre plakasının üst kısmı ters çevrilerek atıldı.
3. Hücreler fosfat tamponu ile yıkandı ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldı.
4. MTT çözeltisi (5 mg/ml) ve besiyeri 1:10 oranında karıştırıldı. Hücre plakasına 100 μl /kuyucuk olacak şekilde bu çözelti karışımından ilave edildi. 3 saat inkübasyona bırakıldı (37 °C, %5 CO_2).
5. 3 saatlik inkübasyon süresi sonunda plakalar ters çevrilerek üst kısmı atıldı.
6. Hücre plakasına DMSO çözeltisi 100 μl /kuyucuk olacak ilave edildi ve kuyucukların mikropłaka okuyucuda 540 nm'de absorbans değerleri okundu.
7. Levotiroksinin herbir konsantrasyonu için % inhibisyon değerleri hesaplandı. Non-lineer regresyon analizi ile maddelerin inhibitör konsantrasyon 50 değerleri hesaplandı.

3.4.2.2. Nötral kırmızı deneyinin uygulanması

1. Hücrelerin plakalara ekimi ve maddelerin uygulama aşamaları MTT testinin uygulanması kısmında bahsedildiği gibi gerçekleştirildi.
2. Kültür ortamı uzaklaştırılıp 200 μl NK içeren besiyeri ilave edildi ve 3 saat inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon ardından NK çözeltisi uzaklaştırılarak 200 μl formol-kalsiyum çözeltisi ile muamele edilmiş ve 300 μl Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen fosfat tamponu çözeltisi (DPBS) ile yıkama işlemi yapıldı.
4. Hücrelere alınan boyanın ekstraksiyonunun gerçekleşmesi için plakalar 200 μl asetik asit-etanol çözeltisi ile 20 dakika çalkalayıcıda bekletildi.
5. Kuyucuklarda oluşan renk şiddeti mikropłak okuyucuda 540 nm'de okundu.
6. Levotiroksinin herbir konsantrasyonu için % inhibisyon değerleri hesaplandı.

3.4.3. Reaktif oksijen üretiminin belirlenmesi

Reaktif oksijen türlerin aşırı üretimi veya antioksidan savunma moleküllerinin tükenmesi nedeniyle hücre içi redoks dengesinde bir değişiklik olduğunda, lipidlerin, doku proteinlerinin, DNA'nın ve diğer biyomoleküllerin oksidasyonuna neden olan

oksidatif stres meydana gelir ve anormal hücre sinyalleşmesine, işlev bozukluğuna yol açabilmekte hatta hücre ölümü ve apoptoz ile sonuçlanabilmektedir. ROT tespiti için kullanılan DCFH-DA (2,7-dikloroföresin diasetat) membranı serbestçe geçebilen, floresans içermeyen bir kimyasaldır. Hücreye girdikten sonra hücre içi esteraz ile hidrolize olup DCFH (diklorofloresin) açığa çıkar. ROT varlığında DCFH, hücre zarından geçemeyen güçlü yeşil floresan bir madde olan DCF'ye oksitlenir. DCF, 502 nm'lik uyarılma dalga boyuna ve 525 nm'lik emisyon dalga boyuna yakın bir maksimum dalga zirvesine sahiptir ve yoğunluk hücre içi reaktif oksijen türlerinin seviyesiyle orantılıdır [42, 43].

Hücre kültürlerinin plakaya ekilmesi

1. Önceki bölümde anlatıldığı üzere TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücrelerinin hücre süspansiyonları hazırlandı.
2. 2.5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre plakasına ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı (37 °C, %5 CO₂).

3.4.3.1. DCFDA/H₂DCFDA testinin uygulanması

Deneyler DCFDA/H₂DCFDA Cellular ROS Assay Kit belirtilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirildi.

1. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre plakasının üst kısmı ters çevrilerek uzaklaştırıldı.
2. 1X Tampon çözeltisi 100 µl/kuyucuk olacak şekilde eklendi.
3. 1X Tampon çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldı ve seyreltilmiş DCFDA çözeltisi (25 µM) 100 µl/kuyucuk olacak şekilde eklendi ve 45 dakika inkübe edildi (37 °C, %5 CO₂).
4. İnkübasyon süresi sonunda DCFDA çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldı. 1X Tampon çözeltisi 100 µL/kuyucuk olacak şekilde eklendi.
5. Levotiroksinin IK50- IK50/2- IK50x2 konsantrasyonlarında deneyler gerçekleştirildi. TM3 hücreleri için sırasıyla 121,22 µM; 60,61 µM; 242,44 µM uygulandı. TM4 hücreleri için ise sırasıyla 114,16 µM; 57,08 µM; 228,32 µM konsantrasyonları ile birlikte çözücü kontrol ve pozitif kontrol [tert-Butilhidroperoksit (TBHP), 100 µM] plakalara uygulandı. 4 saat inkübasyona bırakıldı (37 °C, %5 CO₂).
6. İnkübasyon süresi sonunda kuyucukların floresan intensitesi, floresan plaka okuyucusu kullanılarak ölçüldü (Eksitasyon: 485 nm/ emisyon: 535 nm).

7. Tüm ölçümlerden blank okumalar çıkarıldı ve kontrole göre oranlanarak kat artışı belirlendi.

3.4.4. DNA hasarının belirlenmesi

DNA hasarının değerlendirilmesi için Comet testi uygulandı. Comet, DNA'nın bir agaroz jel içinde fikse edilip elektroforetik olarak yürütülmesi prensibine dayanmaktadır. Kısaca, agaroz içindeki tek hücreli süspansiyonlar mikroskobik slaytlar üzerine katmanlanır, membranları parçalamak ve histonları çıkarmak için deterjan ve yüksek molariteli NaCl ile parçalanır ve ardından elektroforezlenir. İplik kopmalarının varlığında DNA, floresan boya ile boyandığında ve floresan mikroskobu altında görüntülendiğinde kuyruklu yıldızın kuyruğunu andıran bir görüntü oluşturarak anoda doğru göç eder. DNA'nın fragmentleri hasardan dolayı farklı elektrik yüklerine ve molekül ağırlıklarına sahiptir ve bunun sonucunda DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederek kuyruklu yıldız formunda bir görüntü oluşturmaktadır. Hasarsız olan DNA'lar ise kuyruk oluşturmamaktadır [44, 45].

Hücre kültürlerinin plakaya ekilmesi

1. Önceki kısımda anlatıldığı üzere TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücrelerinin hücre süspansiyonları hazırlandı.
2. 2.5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre plakasına ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı (37°C , %5 CO_2).

3.4.4.1. Comet testinin uygulanması

1. Levotiroksinin her iki hücre dizisinde MTT testi sonuçlarına göre \geq %80 hücre canlılığı gösteren ortak konsantrasyonları olan $1 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$ ve $100 \mu\text{M}$ ile çalışıldı. 24 saat maruziyet sonunda besiyeri uzaklaştırılıp fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra hücreler tripsin-EDTA ile toplandı.
2. Santrifüj (2500 rpm hızda, 4°C 'de) 5 dakika üst kısım uzaklaştırılıp hücreler $100 \mu\text{l}$ soğuk PBS ile resüspande edildi (Deney sırasında buz üzerinde bekletildi).
3. $50 \mu\text{l}$ hücre süspansiyonu $100 \mu\text{l}$ düşük erime noktalı agar ile karıştırılıp, normal erime noktalı agar ile kaplı lamlara lamel yardımıyla yayıldı ve 10 dk buzdolabında agarın sabitlenmesinden sonra lamel dikkatlice lam üzerinden alındı.
4. Şalelere yerleştirilen lamlar 1 saat 4°C 'de lizis çözeltisinde bekletildi ve süre sonunda lamlar soğuk distile su ile 5 dakika bekletilerek yıkandı.
5. Elektroforez tankına boşluk kalmayacak şekilde yerleştirilen lamlar alkali tampon çözeltisi ile 20 dakika bekletildi.

6. 25 volt, 300 miliamper 20 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirildi ve lamalar soğuk distile su ile 5 dakika bekletilerek yıkandı.
7. Yıkama işleminden sonra lamalar nötralizasyon tamponunda 15 dakika bekletildi ve lamalar 24 saat boyunca oda sıcaklığında, ışıktan korunarak kurumaya bırakıldı.
8. Kurumuş lamalar 50 µl SYBR Green I boya çözeltisi ile boyanarak Comet Assay IV yazılımı ile analiz edildi.
9. Her konsantrasyon iki tekrarlı çalışıldı ve 100 x 2 hücre değerlendirildi.
10. Deneyler iki kez tekrarlandı.
11. DNA hasarını karşılaştırma parametresi olarak % kuyruk yoğunluğu kullanıldı.

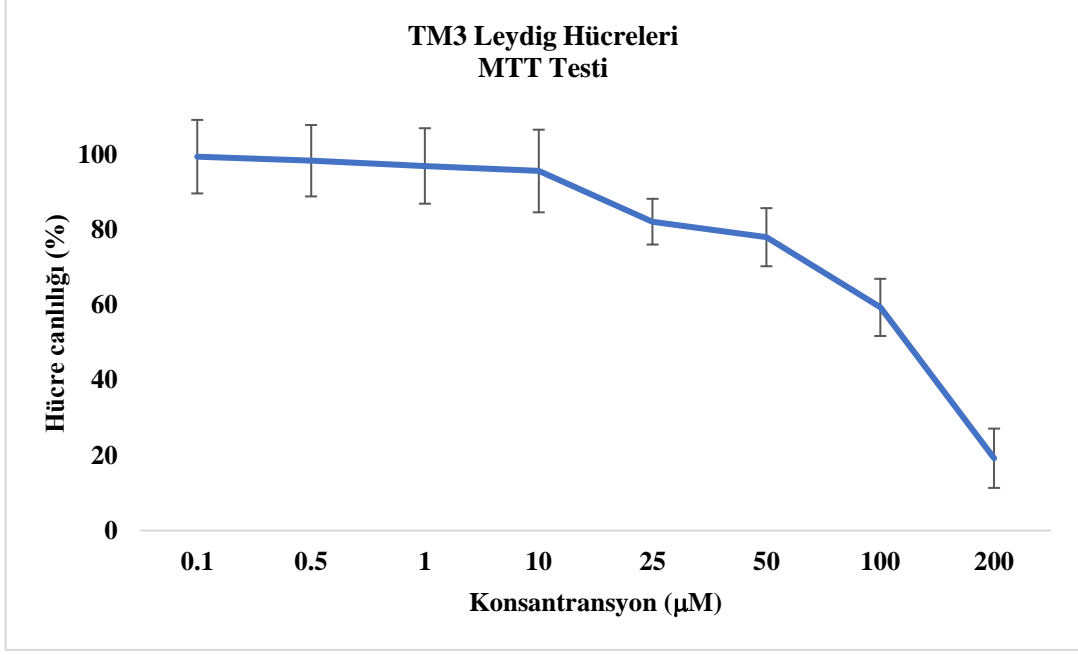
3.4.5. Verilerin analizi

Verilerin analizi GraphPad Prism 9.0 programı kullanılarak yapıldı. Tüm veriler normal dağılım açısından Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi; varyansın homojenliği ise Bartlett ve Brown-Forsythe testleri ile kontrol edildi. DCFDA/H2DCFDA testi sonuçlarının istatistiksel değerlendirmeleri, normal dağılım gösterdiği ve homojen varyanslara sahip olduğu için tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD post hoc analizi ile yapıldı. Comet deneyi sonuçlarının istatistiksel değerlendirmeleri ise normal dağılım gösterdiği, homojen varyanslara sahip olmadığı için Brown-Forsythe ve Welch ANOVA testi ile Dunnett's T3 post hoc analizi kullanılarak yapıldı. Veriler, ortalama \pm ortalamanın standart hatası olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

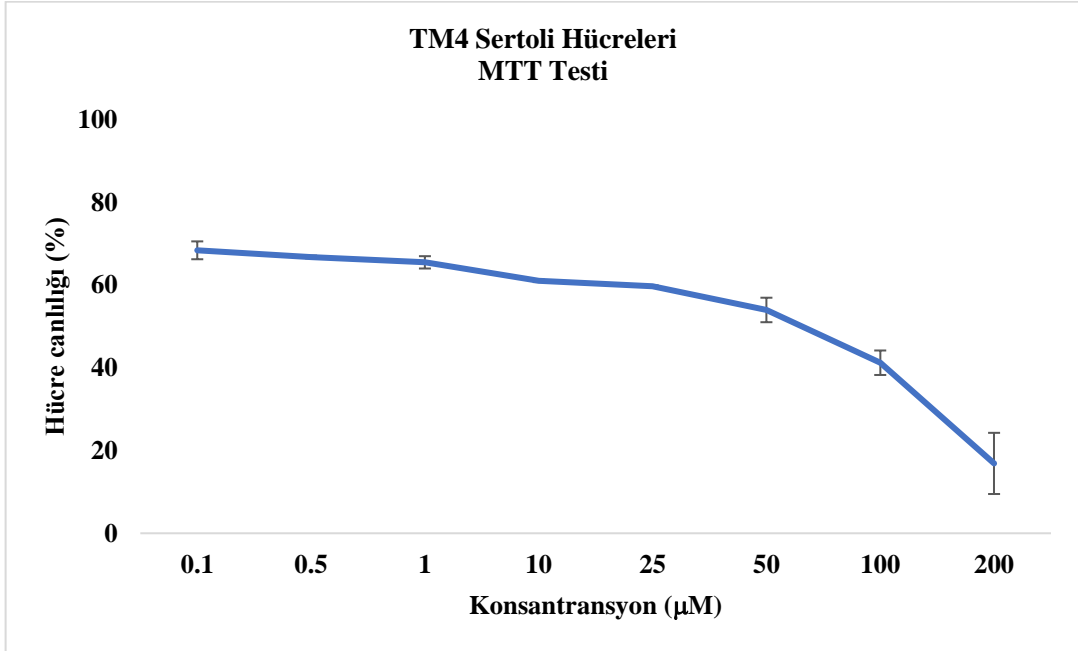
4.1. Sitotoksite Testleri

4.1.1. MTT sitotoksisite testi



Şekil 4.1. Levotiroksinin TM3 Leydig hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri (%)

0,1 – 200 µM olmak üzere 8 farklı konsantrasyonda TM3 Leydig hücrelerine uygulanan levotiroksin konsantrasyon bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır. Bu grafiğe göre levotiroksinin İK50 değeri TM3 Leydig hücrelerinde 121,22 µM olarak hesaplanmıştır.

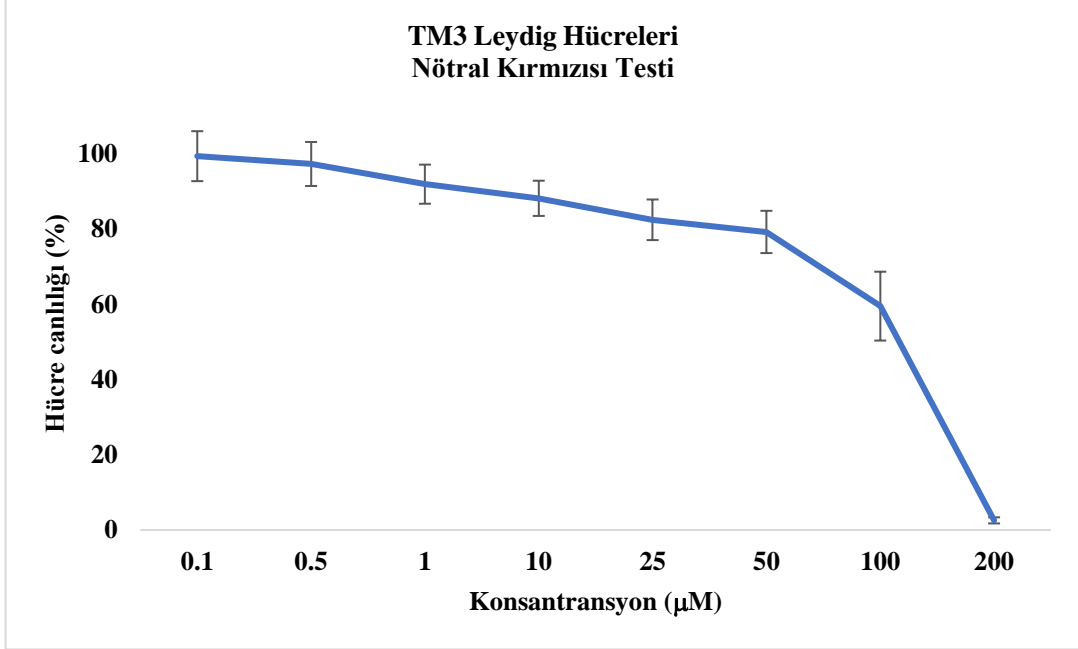


Şekil 4.2. Levotiroksinin TM4 Sertoli hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri (%)

0,1 – 200 µM olmak üzere 8 farklı konsantrasyonda TM4 Sertoli hücrelerine uygulanan levotiroksin konsantrasyon bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır. TM3 Leydig hücrelerinden farklı olarak levotiroksinin daha düşük

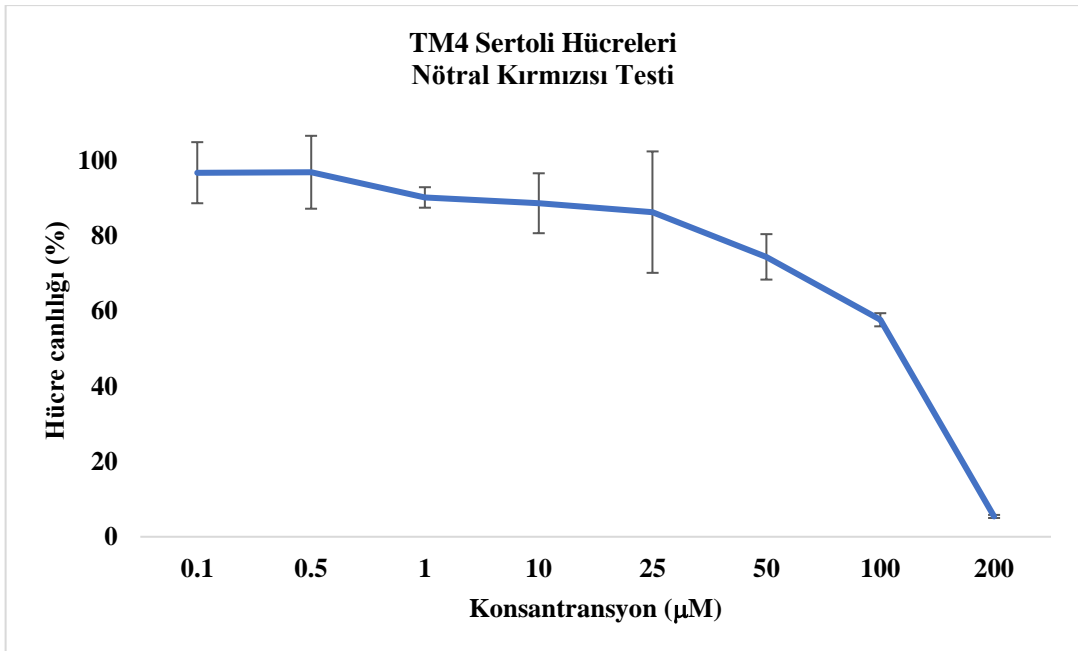
konsantrasyonlarında TM4 Sertoli hücrelerinde hücre canlılığı azalmıştır. Bu grafiğe göre levotiroksinin İK50 değeri TM4 Sertoli hücrelerinde 114,16 μM olarak hesaplanmıştır.

4.1.2. Nötral kırmızı testi



Şekil 4.3. Levotiroksinin TM3 Leydig hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri (%)

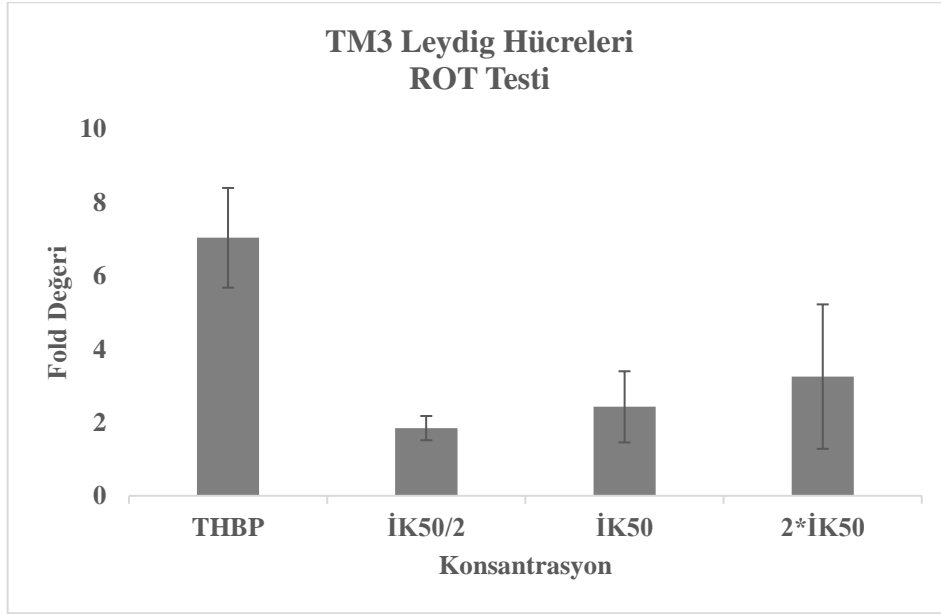
0,1 – 200 μM olmak üzere 8 farklı konsantrasyonda TM3 Leydig hücrelerine uygulanan levotiroksin konsantrasyon bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır. Bu grafiğe göre levotiroksinin İK50 değeri TM3 Leydig hücrelerinde 104,16 μM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.4. Levotiroksinin TM4 Sertoli hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri (%)

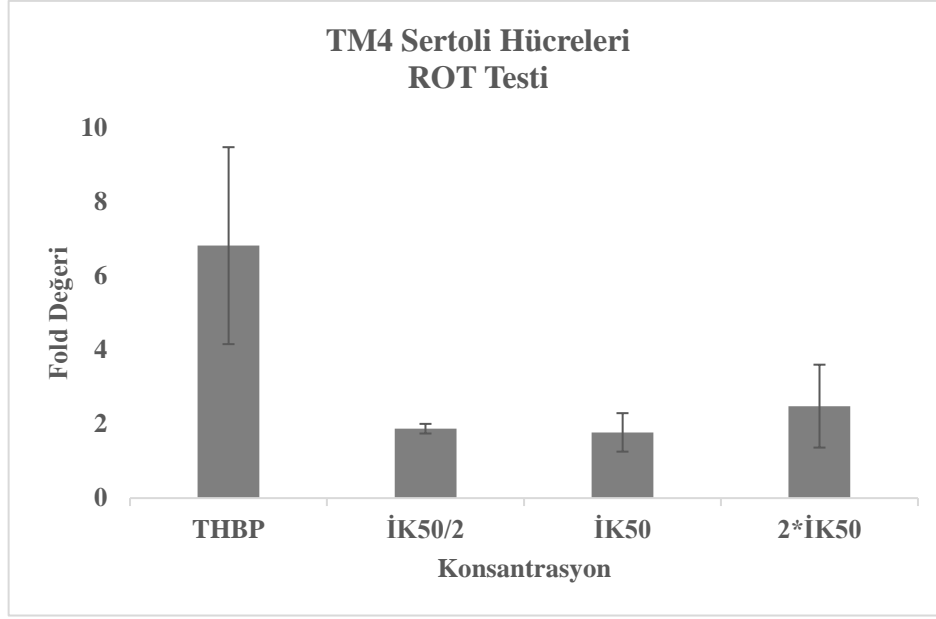
0,1 – 200 μ M olmak üzere 8 farklı konsantrasyonda TM4 Sertoli hücrelerine uygulanan levotiroksin konsantrasyon bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır. Bu grafiğe göre levotiroksinin İK50 değeri TM4 Sertoli hücrelerinde 104,61 μ M olarak hesaplanmıştır.

4.2. DCFDA/H2DCFDA Testi



Şekil 4.5. Levotiroksinin TM3 Leydig hücrelerinde ROT üretimi üzerine etkileri

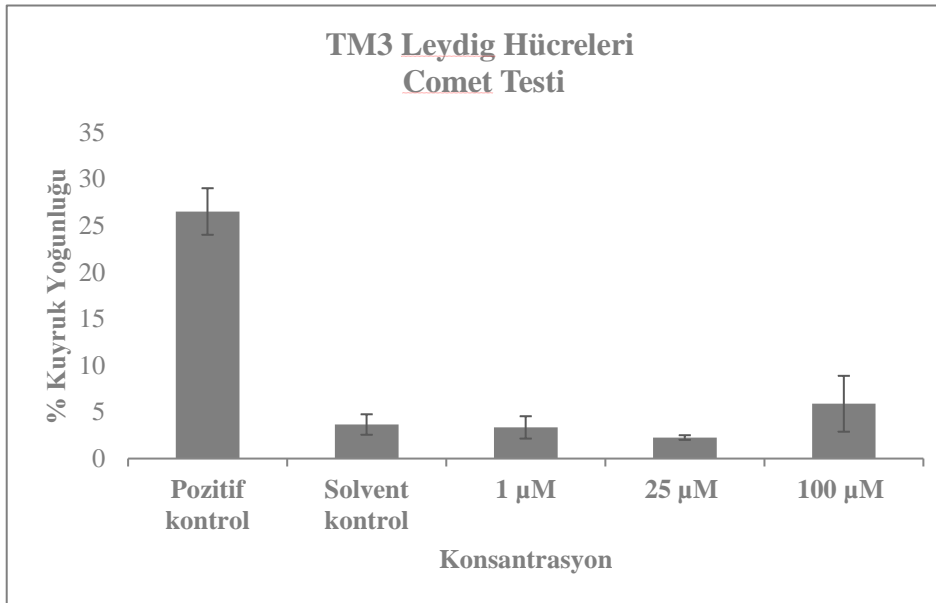
TM3 Leydig hücrelerinde ROT testi için konsantrasyonlar İK50/2, İK50 ve 2*İK50 olarak seçilmiştir. Buna göre levotiroksinin konsantrasyon bağımlı olarak TM3 Leydig hücrelerinde kontrol grubuna göre ROT üretimini yüksek konsantrasyonda indüklemiştir. Fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmemiştir.



Şekil 4.6. Levotiroksinin TM4 Sertoli hücrelerinde ROT üretimi üzerine etkileri

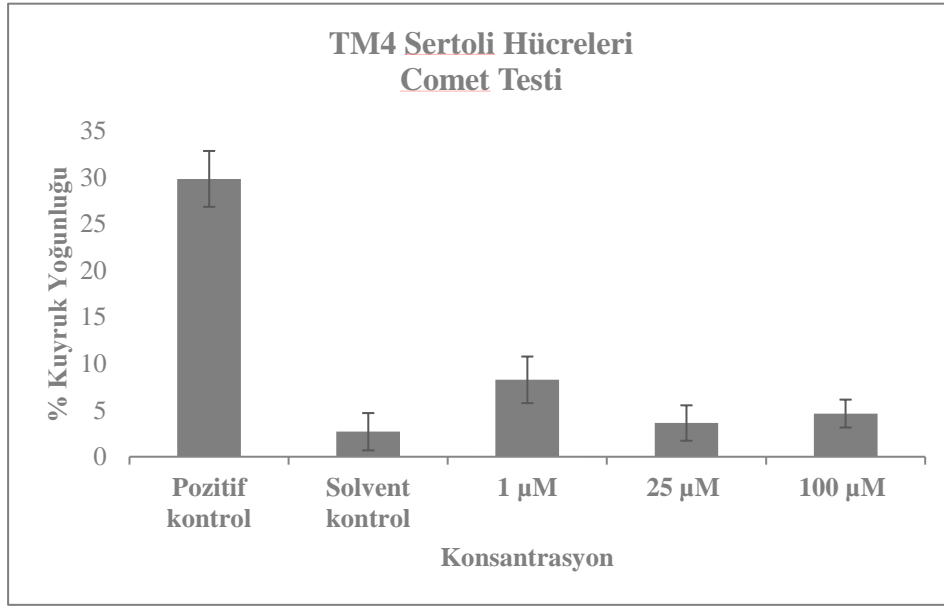
TM4 Sertoli hücrelerinde ROT testi için konsantrasyonlar İK50/2, İK50 ve 2*İK50 olarak seçilmiştir. Buna göre levotiroksinin konsantrasyon bağımlı olarak TM4 Sertoli hücrelerinde kontrol grubuna göre ROT üretimini indüklemiştir. Fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmemiştir.

4.3. Comet Testi



Şekil 4.7. Levotiroksinin TM3 Leydig hücre DNA'sı üzerine etkileri

TM3 Leydig hücrelerinde Comet testi için konsantrasyonlar 1 μ M, 25 μ M ve 100 μ M olarak seçilmiştir. Buna göre levotiroksinin 100 μ M konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile TM3 Leydig hücrelerinde solvent kontrol grubuna göre % kuyruk yoğunluğunu arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. Levotiroksinin TM4 Sertoli hücre DNA'sı üzerine etkileri (%)

TM4 Sertoli hücrelerinde Comet testi için konsantrasyonlar 1 μ M, 25 μ M ve 100 μ M olarak seçilmiştir. Buna göre TM3 Leydig hücrelerinden farklı olarak levotiroksinin 1 μ M konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile TM4 Sertoli hücrelerinde solvent kontrol grubuna göre % kuyruk yoğunluğunu arttırdığı tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda bu artış daha az belirgindir.

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

5.1. Sonuç

Levotiroksin hem MTT testinde hem nötral kırmızısı testinde TM3 Leydig hücrelerinde ve TM4 Sertoli hücrelerinde anlamlı hücre canlılığını azaltmış, sitotoksik etki göstermiştir. Yüksek konsantrasyonda levotiroksin TM3 Leydig hücrelerinde belirgin olmak üzere ve TM4 Sertoli hücrelerinde hafif olmak üzere ROT üretimini indüklemiştir. Comet testi ile TM3 Leydig hücrelerinde levotiroksin sitotoksik etki göstermediği 1 µM konsantrasyonda DNA hasarını indüklememiştir. Ancak TM4 Sertoli hücrelerinde levotiroksin sitotoksik etki göstermediği 1 µM konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da DNA hasarını indüklemiştir. Diğer taraftan TM3 Leydig hücrelerinde levotiroksin sitotoksik etki gösterdiği 100 µM konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da DNA hasarını indüklemiştir.

5.2. Tartışma

Günümüzde erkeklerde reproduktif sağlık düzeyindeki olumsuz değişiklikler dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ifade edilmektedir. Dünya çapında erkeklerde sperm kalitesinin düşme eğiliminde olduğu öne sürülmektedir. Çok sayıda araştırmadan elde edilen kanıtlar da sperm sayısı, konsantrasyonu, motilitesi ve normal morfolojisindeki azalmanın işaret ettiği gibi, erkeklerde sperm kalitesinin yıllar içinde azaldığı iddiasını desteklemektedir [46 - 50]. Bu noktada sperm kalitesinin erkek fertilitésinin ana belirleyicisi olduğu vurgulanmalı [51], dolayısıyla erkek infertilitésinin de dünya çapında yaygınlaştığı ifade edilmelidir. Sperm kalitesindeki azalmanın nedenleri olarak pestisitler, ağır metaller, hava kirleticileri, endokrin bozucular gibi çevresel maruziyetler, obezite, sigara içimi, alkol tüketimi gibi yaşam tarzı faktörleri ve genetik yatkınlık sayılmaktadır [51 - 53]. Diğer taraftan tedavide kullanılan birçok ilacın da sperm kalitesini olumsuz etkilediği rapor edilmiştir [54]. Reproduktif yaştaki birçok erkek klinik uygulamada kardiyovasküler hastalıklar, depresif bozukluklar gibi çeşitli hastalıklar için uzun süreli ilaç tedavisine ihtiyaç duymaktadır. Ancak ilaç tedavisinin erkek fertilitésini üzerindeki etkileri çoğu zaman yeterli değerlendirilmemektedir [55]. İlaçlar erkeklerde fertilitéyi doğrudan gonadotoksik etkiler, HPG eksenindeki değişiklikler, ejakülasyon ve erektil fonksiyonlardaki bozukluklar ve libido üzerindeki olumsuz etkiler olmak üzere dört temel mekanizma ile etkileyebilmektedir [55, 56]. İlaçlar gonadotoksik etkileri ile testisteki germ hücrelerine doğrudan zarar vererek veya destekleyici Sertoli hücrelerinin fonksiyonunu inhibe ederek spermatogenezi

etkileyebilmektedir [56, 57]. Ayrıca hipotalamus-hipofiz eksenini veya Leydig hücreleri aracılığıyla testisin endokrin fonksiyonunu bozarak testosteron seviyesindeki değişiklikler ile de spermatogenezi etkileyebilmektedir. Son olarak intratestiküler vaskülarizasyonu veya epididimal fonksiyonu değiştirerek de sperm parametrelerini etkileyebilmektedir [57]. Bu etkiler sıklıkla sperm üretiminin baskılanmasına veya optimal olmayan sperm olgunlaşmasına, hareketliliğine veya morfolojisine neden olmaktadır [56].

T4 ve T3 tiroid hormonları, birçok memeli dokusunda gelişimin, farklılaşmanın ve metabolizmanın düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [58 - 61]. Ancak tiroid hormonlarının erkek üreme sistemi üzerindeki biyolojik etkileri hakkındaki bilgiler sınırlıdır [59]. Testis dokusu uzun yıllar tiroid hormonuna yanıt vermeyen bir organ olarak kabul edilmiştir [60]. Ancak testiste fonksiyonel tiroid hormon reseptörlerinin, çeşitli iyodotironin deiyodinazların ve tiroid hormonu taşıyıcılarının varlığı gösterilmiştir [60]. Çalışmalar, tiroid hormonlarının, kan-testis bariyerinin oluşumu da dahil olmak üzere testis gelişimi sırasında Sertoli hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenlediğini göstermiştir. Ayrıca Leydig hücre farklılaşmasını düzenleyerek steroidogenezi de etkilediği gösterilmiştir [60]. Yetişkin insanlarda ve kemirgenlerde tiroid hormon seviyelerindeki değişiklikler testiste spermatogenezi ve steroidogenezi bozabilmekte, sonuçta erkek fertilitésinin azalmasına neden olabilmektedir [59, 60, 62]. Ayrıca HPG ekseninin düzenlenmesinde fonksiyonel kusurlara yol açtığı da ifade edilmektedir [59, 61]. Hem hipo- hem de hipertiroitizm testis boyutunu ve Sertoli, Leydig ve germ hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını etkilemekte ve bunun sonucunda steroidogenez, spermatogenez ve erkek fertilitési etkilenmektedir [59, 61, 63]. Dolayısıyla normal testis ve üreme fonksiyonu için tiroid hormon seviyelerinin kritik olduğunu söylemek mümkündür. Hipotiroidizm, tiroid hormonları olan T4 ve T3'ün eksikliği ile ilişkili çok yaygın kronik bir hastalıktır [58, 62, 64]. Hipotiroidizmin en sık görülen şekli (%99) primer hipotiroidizm, TSH seviyelerinin artmasına eşlik eden serbest T4 seviyelerinin azalmasıyla karakterizedir [58, 62]. Diyabetten sonra en sık görülen endokrin bozukluktur ve genel popülasyonun %5'ini etkilemektedir ve tahminen hastaların %5'ine de tanı konulamamaktadır [58]. Hipertansiyon, dislipidemi, infertilite, bilişsel bozukluklar ve nöromusküler fonksiyon bozuklukları hipotiroidizme eşlik eden komorbid durumlardır [58, 65]. Hipotiroidili sıçanlarda, Sertoli hücre farklılaşmasının baskılandığı ve spermatositlerin olgun germ hücrelerine dönüşmesinin etkilendiği, sonuç

olarak sperm kalitesinin azaldığı belirlenmiştir [61]. Ayrıca hipotiroidi hastalarında normal sperm morfolojisinin azaldığı rapor edilmiştir [61, 66]. Levotiroksin, hipotiroidizmi tedavisinde ilk seçenek ilaç olarak tedavinin temelini oluşturmaktadır [58, 62, 67]. Ancak hipotiroidizm tedavisinde sıklıkla kullanılan bu ilacın erkeklerde reproduktif advers etkilerine tanımlayan bir adet çalışmanın bulunuyor olması dikkat çekicidir. Bu çalışmada sağlıklı insanlardan toplanan sperm örneklerine levotiroksin uygulamasının sperm motilitesini önemli ölçüde azalttığı ve sperm DNA hasarını indüklediği gösterilmiştir [61]. Bu noktadan hareketle bu tez çalışması kapsamında reproduktif yaşlarda hipotiroidizm tedavisinde tekrarlayan dozlarda kullanılan levotiroksinin TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücrelerinde *in vitro* reproduktif toksisitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücre dizileri BALB/c fare testisinden elde edilmekte ve yerinde Leydig ve Sertoli hücreleriyle morfolojik ve hormonal özellikleri açısından benzerlik göstermektedir [68].

Çalışmamızda hem MTT testi hem de nötral kırmızısı testi sonuçlarına göre levotiroksinin TM3 Leydig hücrelerinde ve TM4 Sertoli hücrelerinde hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Seminifer tübüllerin bazal bölümünde yer alan Sertoli hücreleri testis gelişiminde ve spermatogenezde önemli rol oynamaktadır [69 - 71]. Sertoli hücreleri sadece spermatogonia proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesi için fonksiyonel proteinleri salıvermekte kalmaz, aynı zamanda inhibin B ve anti-Müllerian hormonu gibi hormonları da salıvermektedir. Aslında laktatlar ve lipitler de dahil olmak üzere spermatogenez için gerekli besinlerin çoğunluğu Sertoli hücreleri tarafından sağlanmaktadır. [70]. Ayrıca Sertoli hücreleri, spermatogenez için ayrı bir mikro ortam sağlamak üzere bir kan-testis bariyeri oluşturmak veya gelişimlerini düzenlemek üzere germ hücrelerine bağlanmak için kendi aralarında veya germ hücreleriyle hücre bağlantıları oluşturmaktadır [69, 70]. Bu nedenle Sertoli hücrelerinin sayısı, spermatogenezin ve dolayısıyla erkek fertilitésinin sürdürülmesi için gerekli olan germ hücrelerinin popülasyon büyüklüğünü tanımlamaktadır [70]. Diğer taraftan Leydig hücreleri erkek reproduktif sisteminin gelişimi ve sağlığı için gerekli olan androjeni sentezlemekte ve salıvermektedir. Androjen sentezi ve salıverilmesinde birçok mekanizma rol oynamasına rağmen Leydig hücrelerinin canlılığı testosteron üretimini belirleyen en önemli faktördür [72]. Leydig hücreleri, testosteron üretimiyle testis gelişimine, spermatogenez ve erkek fertilitésine katkıda bulunmaktadır [71]. Dolayısıyla Leydig ve Sertoli hücrelerine zarar veren ksenobiyotiklerin spermatogenez ve

steroidogenezi olumsuz olarak etkileyebileceği aşıkardır. Çalışmamızda levotiroksinin TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücrelerindeki sitotoksik etkisi ilacın reproduktif toksisitenin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Hücrel ROT üretimi hücre ölümüne ve DNA hasarına katkıda bulunan bir etken olarak ifade edilmektedir [73, 74]. Çalışma sonuçlarımız, levotiroksine maruz bırakılan TM3 Leydig ve TM4 Sertoli hücrelerinde ROT üretiminin arttığını işaret etmektedir. Bu noktada son yıllarda levotiroksin tedavisi ile kanser riski arasındaki ilişkiyi tanımlayan çalışmaların varlığı vurgulanmalıdır. Levotiroksin kullanan hastalarda kullanmayan hastalara göre genel kanser riskinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Bu tür bir ilişki mitokondriyal fonksiyonun artmasına bağlı olarak aşırı ROT üretimi gerçeğiyle açıklanmıştır. Artan ROT seviyesi kanser gelişimini tetikleyen vücutta artan oksidatif stresle ilişkilendirilmiştir [67, 75, 76]. Tiroit hormonları, bazal metabolizmayı hızlandırma ve mitokondrideki solunum hızını değiştirme kapasiteleri nedeniyle ROT üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca tiroit hormonları hücre antioksidan mekanizmalarını da farklı şekillerde etkileyerek sonucun tahmin edilmesi zor olan çok değişkenli bir durum yaratmaktadır. Çünkü tiroit hormonlarının enzimatik ve enzimatik olmayan serbest radikal temizleyicilerin de seviyelerini arttırdığı ifade edilmektedir [77]. Bu durumu destekler nitelikte tedavi görmemiş hipotiroidi hastalarında MDA seviyesi yüksek ölçülmüştür. Hastaların levotiroksin tedavisinden sonra MDA seviyesinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir [78, 79]. Bu noktada tiroit hormonlarının oksidatif stresin çeşitli yönlerini aynı anda etkilemesi, farklı ve hatta zıt etkilere neden olması çalışmalarda elde edilen farklı sonuçları açıklayabilmektedir. Ancak genel prensip, yüksek tiroit hormon seviyelerinin oksidatif stresi tetiklediği, buna karşın azalmış tiroit hormon seviyelerinin tespit edilemeyen ila hafif oksidatif strese yol açtığı şeklindedir [77].

5.3. Öneriler

Tez çalışması kapsamında levotiroksinin reproduktif toksisitesini işaret eden temel bulgular elde edilmiştir. Ancak reproduktif yaşlarda tekrarlayan dozlarda hipotiroidizmin tedavisinde sıklıkla kullanılan bir ilaç olarak levotiroksinin deney hayvanlarında insan dozlarına eş değer maruziyetlerde reproduktif advers etkilerinin tanımlanması gerekmektedir. Bu noktada sadece testiküler düzeydeki etkilerinin değil aynı zaman HPG eksenini üzerindeki etkilerinin de yani pretestiküler advers etkilerinin de aydınlatılması gerekmektedir. Ayrıca levotiroksin tedavisi altındaki hipotiroidili hastaların fertilité potansiyelleri, sperm parametreleri ve reproduktif hormon seviyeleri epidemiyolojik

alışmalar ile değerlendirilmelidir. Elbette hipotiroidizm de erkeklerde reproduktif patolojiler için bir risk faktörüdür. Hipotiroidiye ek olarak levotiroksin tedavisi ile ilişkilendirilebilecek reproduktif advers etkiler hastaların fertilitate açısından takip edilmesinin gerekliliğine dikkat çekecektir. Dahası hastalarda olası fertilitate problemleri için alternatif tedavi protokolleri ya da fertilitateyi potansiyelize edebilecek stratejilerin geliştirilmesine odaklanılacaktır.

KAYNAKÇA

- [1] Ding, J., Shang, X., Zhang, Z., Jing, H., Shao, J., Fei, Q., Li, H., Rayburn, E.R. (2017). FDA-approved medications that impair human spermatogenesis. *Oncotarget*, 8(6), 10714-10725.
- [2] Shrivastava, A. (2020). Effect of levothyroxine replacement on testosterone, LH, FSH levels in men with over hypothyroidism. *Journal of Diabetes Medication & Care*, 2(1).
- [3] Cates, W., Farley, T.M. and Rowe, P.J. (1985). Worldwide patterns of infertility: is Africa different?. *Lancet (London, England)*, 2(8455), 596–598.
- [4] Rajender, S., Monica, M.G., Walter, L., Agarwal, A. (2011). Thyroid, spermatogenesis, and male infertility. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 3(3), 843–855.
- [5] Shahid, M.A., Ashraf, M.A. and Sharma, S. (2022). Physiology, Thyroid Hormone. *StatPearls*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500006/> (Erişim Tarihi: 03.01.2024)
- [6] La Vignera, S. and Vita, R. (2018). Thyroid dysfunction and semen quality. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 32:1-5.
- [7] Castañeda Cortés, D.C., Langlois, V.S. and Fernandino, J.I. (2014). Crossover of the hypothalamic pituitary-adrenal/interrenal, -thyroid, and -gonadal axes in testicular development. *Frontiers in endocrinology*, 5, 139.
- [8] Chiovato, L., Magri, F. and Carlé, A. (2019). Hypothyroidism in context: where we've been and where we're going. *Advances in Therapy*, 36, 47-58.
- [9] Vanderpump, M.P. (2011). The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull*, 99, 39-51.
- [10] Chaker, L., Bianco, A.C., Jonklaas, J., Peeters, R.P. (2017). Hypothyroidism. *Lancet*, 390 (10101), 1550-1562.
- [11] Cooper, D.S., Halpern, R., Wood, L.C, Levin, A.A., Ridgway, E.C. (1984). L-Thyroxine therapy in subclinical hypothyroidism. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.*, 101(1), 18-24.
- [12] Haugen, B.R., Alexander, E.K., Bible, K.C., Doherty, G.M., Mandel, S.J., Nikiforov, Y.E., Pacini, F., Randolph, G.W., Sawka, A.M., Schlumberger, M., Schuff, K.G., Sherman, S.I., Sosa, J.A., Steward, D.L., Tuttle, R.M., Wartofsky, L. (2015). American Thyroid Association Management Guidelines for Adult

- Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*, 26(1), 1-133.
- [13] Calissendorff, J. and Falhammar, H. (2020). To treat or not to treat subclinical hypothyroidism, what is the evidence? *Medicina*, 56(1), 40.
- [14] Atmaca, H. (2012). Hipotiroidizm. *Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi- Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29, 301-308.
- [15] Kayaalp, S.O. (2002). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* (10.Baskı). Ankara: Hacettepe Taş Yayınları.
- [16] Hilal-Dandan, R. And Brunton, L.L. (2017). *Goodman ve Gilman'ın Farmakoloji ve Tedavi El Kitabı* (Çev: Ş. Remzi Erdem). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.
- [17] Rousset, B., Dupuy, C., Miot, F., Dumont, J. (2015). Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion. *Endotext*.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25905405/> (Erişim tarihi: 03.01.2024)
- [18] Hennessey, J.V. (2021). *70 Years of Levothyroxine*, Cham: Springer.
- [19] Wajner, S.M., Wagner, M.S. and Maia, A.L. (2009). Clinical implications of altered thyroid status in male testicular function. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 53(8), 976–982.
- [20] Katzung, B.G. (2021). *Temel ve Klinik Farmakoloji*. (Çev: R.L. Büyükuysal, K. Erol, Ş. Kalkan, A. Ulugöl, A.G. Akkan, E. İnan, Ç.H. Karadağ, G. Ulak, A.Y. Üresin, S. Gidener). Ankara: Nobeltıp Kitabevleri.
- [21] Eghtedari, B. And Correa, R. (2022). Levothyroxine. In *StatPearls*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539808/> (Erişim tarihi: 03.01.2024)
- [22] Choi, Y.H., Choi, W.Y., Kang, H.C., Koh, Y.I., Bae, E.H., Kim, S.W. (2012). Drug rash induced by levothyroxine tablets. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 22(10), 1090.
- [23] Jonklaas, J., Bianco, A.C., Bauer, A.J., Burman, K.D., Cappola, A.R., Celi, F.S., Cooper, D.S., Kim, B.W., Peeters, R.P., Rosenthal, M.S., Sawka, A.M. (2014). American Thyroid Association Task Force on Thyroid Hormone Replacement Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 24(12), 1670–1751.

- [24] Gong, I.Y., Atzema, C.L., Lega, I.C., Austin, P.C., Na, Y., Rochon, P.A., Lipscombe, L.L. (2021). Levothyroxine dose and risk of atrial fibrillation: A nested case-control study. *American heart journal*, 232, 47–56.
- [25] Singh R., Hamada A.J. and Agarwal A. (2011). Thyroid Hormones in Male Reproduction and Fertility. *The Open Reproductive Science Journal*, 3, 98-10.
- [26] Mazzilli, R., Medenica, S., Di Tommaso, A. M., Fabozzi, G., Zamponi, V., Cimadomo, D., Rienzi, L., Ubaldi, F. M., Watanabe, M., Faggiano, A., La Vignera, S., & Defeudis, G. (2023). The role of thyroid function in female and male infertility: a narrative review. *Journal of endocrinological investigation*, 46(1), 15–26.
- [27] Giammanco, M., Di Liegro, C. M., Schiera, G., Di Liegro, I. (2020). Genomic and non-genomic mechanisms of action of thyroid hormones and their catabolite 3,5-diiodo-l-thyronine in mammals. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 4140.
- [28] Wagner, M.S., Wajner, S.M. and Maia, A.L. (2008). The role of thyroid hormone in testicular development and function. *The Journal of endocrinology*, 199(3), 351–365.
- [29] Krajewska-Kulak E. and Sengupta P. (2013). Thyroid function in male infertility. *Frontiers in endocrinology*, 4, 174.
- [30] Alahmar A., Dutta S., Sengupta P. (2019). Thyroid hormones in male reproduction and infertility. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 8(5): 203-210.
- [31] Drobnis, E.Z. and Nangia, A.K. (2017). Male Reproductive Functions Disrupted by Pharmacological Agents. *Advances in experimental medicine and biology*, 1034, 13–24.
- [32] Semet, M., Paci, M., Saias-Magnan, J., Metzler-Guillemain, C., Boissier, R., Lejeune, H., Perrin, J. (2017). The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology*, 5(4), 640–663.
- [33] Niethammer M., Burgdorf, T., Wistorf E., Schönfelder, G., Kleinsorge, M. (2022). In vitro models of human development and their potential application in developmental toxicity testing. *Development*. 149 (20): dev200933.

- [34] Brannen, K.C., Chapin, R.E., Jacobs, A.C., Green, M.L. (2016). Alternative Models of Developmental and Reproductive Toxicity in Pharmaceutical Risk Assessment and the 3Rs. *ILAR journal*, 57(2), 144–156.
- [35] Parks Saldutti, L., Beyer, B. K., Breslin, W., Brown, T. R., Chapin, R.E., Champion, S., Enright, B., Faustman, E., Foster, P.M., Hartung, T., Kelce, W., Kim, J.H., Lobo, E.G., Piersma, A.H., Seyler, D., Turner, K. J., Yu, H., Yu, X., Sasaki, J.C. (2013). In vitro testicular toxicity models: opportunities for advancement via biomedical engineering techniques. *Altex*, 30(3), 353–377.
- [36] Hunter, D., Anand-Ivell, R., Danner, S., & Ivell, R. (2012). Models of in vitro spermatogenesis. *Spermatogenesis*, 2(1), 32–43.
- [37] Oatley, J.M., de Avila, D.M., Reeves, J. J., & McLean, D. J. (2004). Testis tissue explant culture supports survival and proliferation of bovine spermatogonial stem cells. *Biology of reproduction*, 70(3), 625–631.
- [38] Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubota, Y., & Ogawa, T. (2011). In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, 471(7339), 504–507.
- [39] Chacon, E., Acosta, D., Lemasters, J.J. (1996). *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 209-223.
- [40] Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827.
- [41] Ates, G., Vanhaecke, T., Rogiers, V., & Rodrigues, R. M. (2017). Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. *Methods in molecular biology Clifton, N.J.1601*, 19–26.
- [42] Oparka, M., Walczak, J., Malinska, D., Van Oppen, L.M.P.E., Szczepanowska, J., Koopman, W.J.H., Wieckowski, M.R. (2016). *Methods*, San Diego: Calif, 109, 3–11.
- [43] Gardiner, B., Dougherty, J. A., Ponnalagu, D., Singh, H., Angelos, M., Chen, C. A., & Khan, M. (2020). *Measuring Oxidants and Oxidative Stress in Biological Systems*. Cham (CH): Springer ,39-60.
- [44] Collins A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*, 26(3), 249–261.

- [45] Cordelli, E., Bignami, M., Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology research*, 10(1), 68–78.
- [46] Mendiola, J., Jørgensen, N., Mínguez-Alarcón, L., Sarabia-Cos, L., López-Espín, J. J., Vivero-Salmerón, G., Ruiz-Ruiz, K. J., Fernández, M. F., Olea, N., Swan, S. H., & Torres-Cantero, A. M. (2013). Sperm counts may have declined in young university students in Southern Spain. *Andrology*, 1(3), 408–413.
- [47] Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., Pinotti, R., & Swan, S. H. (2017). Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human Reproduction update*, 23(6), 646–659.
- [48] Jørgensen, N., Joensen, U. N., Jensen, T. K., Jensen, M. B., Almstrup, K., Olesen, I. A., Juul, A., Andersson, A. M., Carlsen, E., Petersen, J. H., Toppari, J., & Skakkebaek, N. E. (2012). Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *BMJ Open*, 2(4), e000990.
- [49] Virtanen, H., Sadv, S., Vierula, M., & Toppari, J. (2013). Finland is following the trend—sperm quality in finnish men. *Asian Journal of Andrology*, 15(2), 162-164.
- [50] Huang, C., Li, B., Xu, K., Liu, D., Hu, J., Yang, Y., Nie, H., Fan, L., & Zhu, W. (2017). Decline in semen quality among 30,636 young Chinese men from 2001 to 2015. *Fertility and sterility*, 107(1), 83–88.e2.
- [51] Kumar, N., Singh, A.K. (2022). Impact of environmental factors on human semen quality and male fertility: a narrative review. *Environ Sci Eur*, 34, 6.
- [52] Mendiola, J., Torres-Cantero A.M., Agarwal, A. (2009). Lifestyle factors and male infertility: an evidence-based review. *Arch Med Sci*, 5 (1A), 3–12.
- [53] Krzastek, S. C., Farhi, J., Gray, M., & Smith, R. P. (2020). Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential. *Translational Andrology and Urology*, 9(6), 2797–2813.
- [54] Ding, J., Shang, X., Zhang, Z., Jing, H., Shao, J., Fei, Q., Rayburn, E. R., & Li, H. (2017). FDA-approved medications that impair human spermatogenesis. *Oncotarget*, 8(6), 10714–10725.

- [55] Mo, P., Zhao, Z., Ke, X., Fan, Y., & Li, C. (2023). Effects of clinical medications on male fertility and prospects for stem cell therapy. *Front Cell Dev Biol*, 11, 1258574.
- [56] Nudell, D. M., Monoski, M. M., & Lipshultz, L. I. (2002). Common medications and drugs: how they affect male fertility. *The Urologic Clinics of North America*, 29(4), 965–973.
- [57] Semet, M., Paci, M., Saïas-Magnan, J., Metzler-Guillemain, C., Boissier, R., Lejeune, H., & Perrin, J. (2017). The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology*, 5(4), 640–663.
- [58] Barreira, A., Santos, A. F. M., Dionísio, M., Jesus, A. R., Duarte, A. R. C., Petrovski, Ž., Paninho, A. B., Ventura, M. G., & Branco, L. C. (2023). Ionic Levothyroxine Formulations: Synthesis, Bioavailability, and Cytotoxicity Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8822.
- [59] Hernandez A. (2018). Thyroid Hormone Role and Economy in the Developing Testis. *Vitamins and Hormones*, 106, 473–500.
- [60] Gao, Y., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2014). Thyroid hormone function in the rat testis. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 188.
- [61] Xian, H., Wang, F., Teng, W., Yang, D., & Zhang, M. (2017). Thyroid hormone induce a p53-dependent DNA damage through PI3K/Akt activation in sperm. *Gene*, 615, 1–7.
- [62] Chiovato, L., Magri, F., & Carlé, A. (2019). Hypothyroidism in Context: Where We've Been and Where We're Going. *Advances in Therapy*, 36(Suppl 2), 47–58.
- [63] Wagner, M. S., Wajner, S. M., & Maia, A. L. (2009). Is there a role for thyroid hormone on spermatogenesis?. *Microscopy Research and Technique*, 72(11), 796–808.
- [64] Zamwar, U. M., & Muneshwar, K. N. (2023). Epidemiology, Types, Causes, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment of Hypothyroidism. *Cureus*, 15(9), e46241.
- [65] Liu, H., Li, W., Zhang, W., Sun, S., & Chen, C. (2023). Levothyroxine: Conventional and Novel Drug Delivery Formulations. *Endocrine Reviews*, 44(3), 393–416.
- [66] La Vignera, S., & Vita, R. (2018). Thyroid dysfunction and semen quality. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 32, 2058738418775241.

- [67] Wu, C. C., Islam, M. M., Nguyen, P. A., Poly, T. N., Wang, C. H., Iqbal, U., Li, Y. J., & Yang, H. C. (2021). Risk of cancer in long-term levothyroxine users: Retrospective population-based study. *Cancer Science*, 112(6), 2533–2541.
- [68] Uchida, T., Ohashi, Y., Morikawa, E., Tsugita, A., Takeda, K. (2001) Proteome Analysis of the Effects of 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on Murine Testicular Leydig and Sertoli Cells. *Journal of Health Science*, 47(2), 136–144.
- [69] Chang, L., Wang, J., She, R., Ma, L., & Wu, Q. (2017). In vitro toxicity evaluation of melamine on mouse TM4 Sertoli cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 50, 111–118.
- [70] Ge, X., Pan, P., Jing, J., Hu, X., Chen, L., Qiu, X., Ma, R., Jueraitetibaik, K., Huang, X., & Yao, B. (2018). Rosiglitazone ameliorates palmitic acid-induced cytotoxicity in TM4 Sertoli cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 98.
- [71] Park, H., Park, H. S., Lim, W., & Song, G. (2020). Ochratoxin A suppresses proliferation of Sertoli and Leydig cells in mice. *Medical Mycology*, 58(1), 71–82.
- [72] Liu, X., Xu, L., Shen, J., Wang, J., Ruan, W., Yu, M., & Chen, J. (2016). Involvement of oxidative stress in tri-ortho-cresyl phosphate-induced autophagy of mouse Leydig TM3 cells *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1), 30.
- [73] Lee, Y.H., Cheng, F.Y., Chiu, H.W., Tsai, J.C., Fang, C.Y., Chen, C.W., Wang, Y.J., 2014. Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. *Biomaterials*, 35, 4706-4715.
- [74] Gong, Y., & Han, X. D. (2006). Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reproductive Toxicology*, 22(4), 623–630.
- [75] Wändell, P., Carlsson, A. C., Li, X., Sundquist, J., & Sundquist, K. (2020). Levothyroxine treatment is associated with an increased relative risk of overall and organ specific incident cancers - a cohort study of the Swedish population. *Cancer Epidemiology*, 66, 101707.
- [76] Cornelli, U., Belcaro, G., Recchia, M., & Finco, A. (2013). Levothyroxine and lung cancer in females: the importance of oxidative stress. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11, 75.

- [77] Villanueva, I., Alva-Sánchez, C., & Pacheco-Rosado, J. (2013). The role of thyroid hormones as inductors of oxidative stress and neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 218145.
- [78] Chakrabarti, S. K., Ghosh, S., Banerjee, S., Mukherjee, S., & Chowdhury, S. (2016). Oxidative stress in hypothyroid patients and the role of antioxidant supplementation. *Indian J Endocrinol Metab*, 20(5), 674–678.
- [79] Masullo, L. F., Magalhães, R. A., Lemes, R. P. G., de Almeida Filho, T. P., de Castro, M. F., Maia Filho, P. A., Cunha, T. O. V., Quidute, A. R. P., Fontenele, E. G. P., Sun, G., & Martins, M. R. A. (2018). Levothyroxine Replacement Improves Oxidative Status in Primary Hypothyroidism. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 655.