



The histopathological evaluation of healing effects of vitamin C administered before methotrexate therapy on testicular injury induced by methotrexate

Metotreksat tedavisi öncesi uygulanan C vitamininin, testiküler hasar üzerine iyileştirici etkilerinin histopatolojik değerlendirmesi

Aysun Sayılmaz¹, Yasemin Yuyucu Karabulut², Aydan Özgörgülü¹

ABSTRACT

Objective: Methotrexate (MTX) leads to acute toxic side effects in tissues or organs containing rapidly dividing cells such as seminiferous tubules. In this study, we investigated the protective effects of vitamin C against MTX-induced injury in rat testis.

Material and methods: A total of 31 rats were divided into 4 groups, including the control group. The study was completed within 4 weeks and the rats received daily doses of 2 mL/kg SF, 100 mg/kg vitamin C and 10 mg/kg/day MTX i.p according to their groups. The mean seminiferous tubular diameter, germinal epithelial cell thickness, and mean testicular biopsy score were determined by histologic examination of each group.

Results: The vitamin C + MTX group showed more similarity with the control group. Statistically significant results were achieved between groups as for mean seminiferous tubular diameter, germinal epithelial cell thickness, and mean testicular biopsy score. When compared with the group which received vitamin C after MTX therapy, values for mean seminiferous tubular diameter, germinal epithelial cell thickness, and mean testicular biopsy score were significantly higher in the group which received vitamin C before initiation of MTX therapy.

Conclusion: Vitamin C decreased MTX-induced testicular histological injuries, especially when used before MTX therapy.

Keywords: Vitamin C; methotrexate; testis.

ÖZ

Amaç: Metotreksat'ın (MTX) seminifer tübül gibi hızlı bölünen hücrelerde akut toksik hasara yol açabildiği bilinmektedir. antioksidan etkinliğini azaltarak testis dokusu ve germ hücrelerinde hasara neden olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda rat testisinde MTX ile birlikte kullanılan C vitamininin MTX'in toksik etkileri üzerine olan iyileştirici sonuçlarını göstermek amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntemler: Çalışmamızda 31 rat biri kontrol grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Çalışma 4 haftalık bir sürede tamamlandı. Ratlara ait oldukları gruplar göz önünde bulundurulacak şekilde günlük 2 mL/kg SF, 100 mg/kg vitamin C ve 10 mg/kg/gün MTX i.p. uygulandı. Histolojik inceleme ile gruplara göre ortalama seminifer tübül çapı, germinal epitel tabaka kalınlığı ve ortalama testiküler biyopsi skorları belirlendi.

Bulgular: MTX öncesi vitamin C uygulanan grubun kontrol grubu ile benzer bulgulara sahip olduğu görüldü. Gruplara göre ortalama seminifer tübül çapı, germinal epitel tabaka kalınlığı ve testiküler biyopsi skorları arasında anlamlı istatistiksel sonuçlara ulaşıldı. C vitamininin MTX tedavisi öncesi ve sonrası uygulanması arasında yapılan karşılaştırmada tedavi öncesi vitamin C uygulanan grupta ortalama seminifer tübül çapı, germinal epitel tabaka kalınlığı ve testiküler biyopsi skoru belirgin olarak yüksek saptandı.

Sonuç: C vitamininin özellikle MTX tedavisi öncesinde kullanıldığında MTX'in toksik etkilerini önemli ölçüde azalttığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Vitamin C; metotreksat; testis.

¹Necmettin Erbakan University
Meram School of Medicine,
Institute of Health Sciences,
Konya, Turkey

²Department of Pathology,
Mersin University School of
Medicine, Mersin, Turkey

Submitted:
03.03.2016

Accepted:
09.04.2016

Correspondence:
Yasemin Yuyucu Karabulut
E-mail:
yykarabulut@yahoo.com.tr

©Copyright 2016 by Turkish
Association of Urology

Available online at
www.turkishjournalofurology.com

Giriş

Folik asit antagonisti olan metotreksat (MTX), kemoterapötik amaçlarla malign tümörlerde kullanılan bir ajandır.^[1-4] Uzun zamandır kullanılan bir kemoteropatik olan MTX, hücre siklusunun S döneminde sitotoksik etki yaparak, hücre bölünmesini inhibe eder. Testisin germinatif epiteli, kıl folikülü hücreleri vb. hızlı bölünen hücreler MTX'in etkisine duyarlıdır. MTX, akut lenfoblastik lösemi, osteosarkom, koriokarsinom, non-Hodgkin's ve lenfoma, göğüs kanseri, mesane kanseri, baş ve boyun kanseri gibi birçok neoplazinin ve neoplazi olmayan romatoid artrit, sedef hastalığı tedavilerinde kullanılmaktadır.^[5,6] MTX'in testiste bulunan seminifer tübüllerdeki hasarı sperm sayısını azalttığı ve MTX kullanıldıktan sonra sperm DNA'sının da hasarlandığı gösterilmiştir.^[6,7]

Yapılan çalışmalar MTX'in hücreler üzerine etkisi, hücrelerin antioksidan etkinliğini azaltarak, reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkilerine açık hale gelmelerini ve böylece testis dokusu ve germ hücrelerinde hasara neden olduklarını göstermektedir. Seminifer tübüllerde atrofiye, germinal hücrelerde de apoptoza neden olduğu görülmüştür.^[4-8] Antioksidan materyallerin metotreksatın toksik etkilerini azaltmaktaki rolleri yoğun olarak çalışılmıştır.^[4] C vitamini, seminal plazmadaki antioksidan kapasitesinin kırılmasında önemli bir zincirdir. C vitamini spermatogenezi desteklemektedir.^[9,10]

Bu çalışmada, C vitamininin MTX'in testis dokusu üzerinde yaptığı olumsuz etkiyi azaltıp azaltmadığının histopatolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntemler

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'nden 2014-065'nolu etik kurul onayı alınmıştır.

Çalışmada merkezimizde ağırlıkları 300-550 gr arasında değişen 10-12 haftalık 31 adet erkek rat kullanıldı. 22±2°C oda sıcaklığı, %60 nem oranı, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ritim sağlandı.

Deney hayvan grupları

Ratlar; I. grup (n=7) kontrol, II. grup (n=8) MTX tedavisi alan, III. grup (n=8) MTX ve ardından C vitamini alan, IV. Grup (n=8) C vitamini alıp ardından MTX alan grup olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

Grup I (kontrol grubu): Ratlara 2 hafta + 10 gün boyunca izotonik salin solüsyonu 2 mg/kg/gün intraperitoneal (ip.) olarak uygulandı.

Grup II (MTX grubu): Ratlara 2 hafta süresince haftada 1 gün tek doz MTX, 10 mg/kg/gün intraperitoneal (i.p) uygulandı.^[6]

Grup III (MTX + C vit grubu): Ratlara önce 2 hafta süresince haftada 1 gün tek doz MTX, 10 mg/kg/gün intraperitoneal (i.p) uygulandıktan sonra 10 gün boyunca günlük C vitamini, tek doz 100 mg/kg/gün intraperitoneal (ip.) uygulandı.

Grup IV (C vit + MTX grubu): Ratlara ilk 10 gün süresince günlük tek doz C vitamini 100mg/kg/gün intraperitoneal (i.p)

uygulandıktan sonra 2 hafta boyunca haftada 1 gün tek doz MTX, 10 mg/kg/gün intraperitoneal (ip.) uygulandı.

Deneyin sonunda %10'luk ketamin 20 mg/kg ve %2'lik ksilazin 3 mg/kg intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Anestezi altında testisler çıkarıldı.

Histopatolojik hazırlık ve inceleme

Testisler %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Daha sonra uygun doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinden alınarak akan çeşme suyu altında yıkandı. Yıkanan dokular artan alkol serilerinden (%70, %80, %90, %96) geçirilerek dehidrate edildi ve ksilen ile şeffaflandırıldı. Şeffaflandırılan testis dokuları, parafinde bekletildikten sonra oda ısısında parafin içine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan HM 325 MİKRON marka mikrotom ile 4-5 mikrometre kalınlığında kesitler elde edilerek, lam üzerine alındı. Alınan kesitler Hemotoksilen & Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Shift (PAS) boyaları ile boyandı. Hazırlanan preparatlardan 10'ar adet seminifer tübül gelişimi güzel seçilerek, Olympus CX31 marka mikroskopta X400'lük büyütmede, gruplara göre ortalama seminifer tübül çapı (OSTÇ), germinal epitel tabaka kalınlığı (GETK) ve testiküler biyopsi skor (TBS) değerleri belirlendi.^[7] Her grupta rastgele 20 seminifer tübül için ayrı bir skor verildi ve bunların hesaplanan ortalamaları ile grupların ortalama testiküler biyopsi skorları (Johnsen skorları) belirlendi.^[11] OSTÇ mikroskop uyumlu mikrometre yardımı ile hesaplandı. GETK bazal membrandan lümene doğru epitelyal hücreler sayılarak hesaplandı.^[7]

Deney grupları için hesaplanan ortalamalar arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldı, farklılığın hangi gruplar arasında olduğu Tukey karşılaştırma testi uygulanarak tespit edildi.

Bulgular

Histolojik değerlendirme sonucunda gruplara göre OSTÇ, GETK ve TBS değerleri Tablo 1'de verilmiştir (Şekil 1-4). Buna göre; kontrol grubu- MTX (p<0,001) ile MTX + Cvit grubu - MTX (p<0,05) ile Cvit +MTX grubu- MTX (p<0,01) ile karşılaştırıldığında OSTÇ, GETK ve TBS değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı değerlere ulaşıldı. OSTÇ, GETK ve TBS, MTX sonrası C vitamini uygulanan grupta sadece MTX uygulanan gruba göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Aynı zamanda C vitamininin MTX tedavisi öncesi ve sonrası uygulanması arasında yapılan karşılaştırmada tedavi öncesi C vitamin uygulanan grupta OSTÇ, GETK ve TBS değerleri belirgin olarak yüksek saptandı.

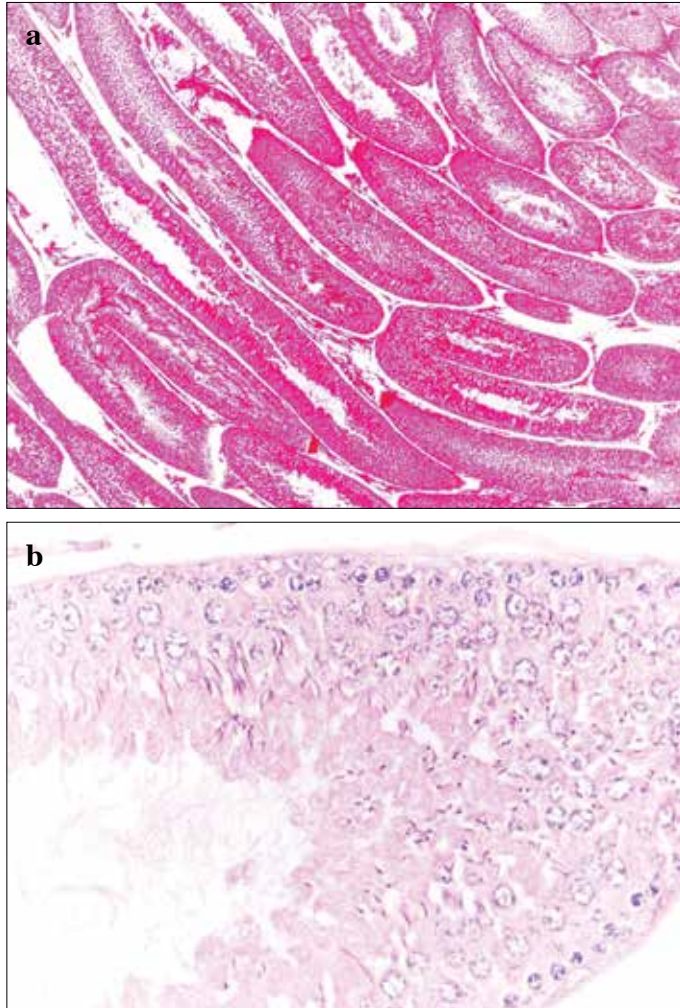
Tartışma

Metotreksatın testiküler toksisitesi üzerinde, infertiliteyi açıklayabilecek önemli yan etkileri vardır. Spermatogenez sırasında, anti-kanser ilaç kullanımının, hücresel ve moleküler yönden gonadal hasarı değerlendirebilmek için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır.^[11-14] Birçok yetişkin erkek, MTX ile başarılı bir şekilde tedavi olduktan sonra, bu kişilerde oligospermi görülmüştür.^[6,14-17] Birincil ve ikincil spermatosit boyutlarında değişiklik, spermatid ve Leydig hücre büyüklüklerinde farklılığa neden olmaktadır.^[18]

Tablo 1. Gruplara göre OSTÇ, GETK ve TBS değerleri

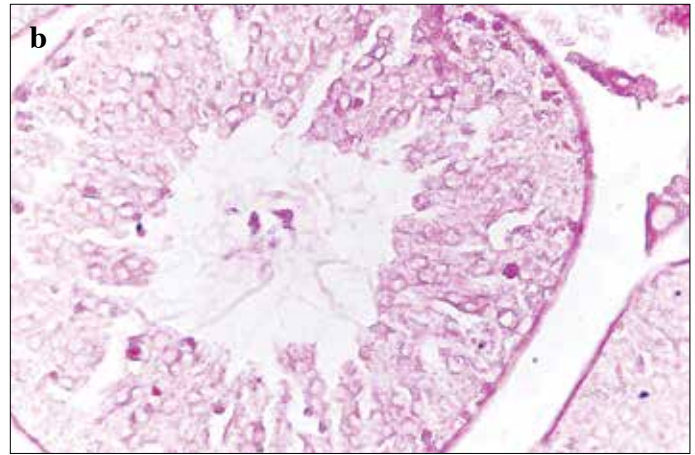
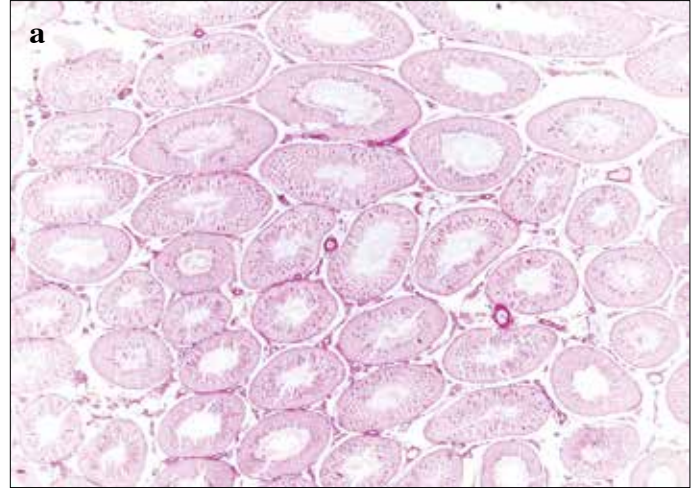
Grup	OSTÇ±SS (µm)	GETK (Ortalama±SS)	TBS±SS
Kontrol	222,25±12,82	6,05±1,31	9,71±0,45
MTX ^a	180,75±10,79	3,45±1,05	3,74±1,44
MTX + C vitamini ^b	186,25±9,11	4,41±1,09	5,60±1,89
C vitamini + MTX ^c	198,25±7,82	5,11±1,25	7,17±1,68

^aKontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,001. ^bMTX grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05. ^cMTX grubu ile karşılaştırıldığında p<0,01. OSTÇ: ortalama seminifer tübül çapı; MTX: metotreksat; GETK: germinal epitel tabaka kalınlığı; TBS: tetsiküler biyopsi skor; SS: standart sapma



Şekil 1. a, b. Kontrol grubuna ait seminifer tübülerin H&E boyası ile görüntüsü (x40) (a). x200 (b)

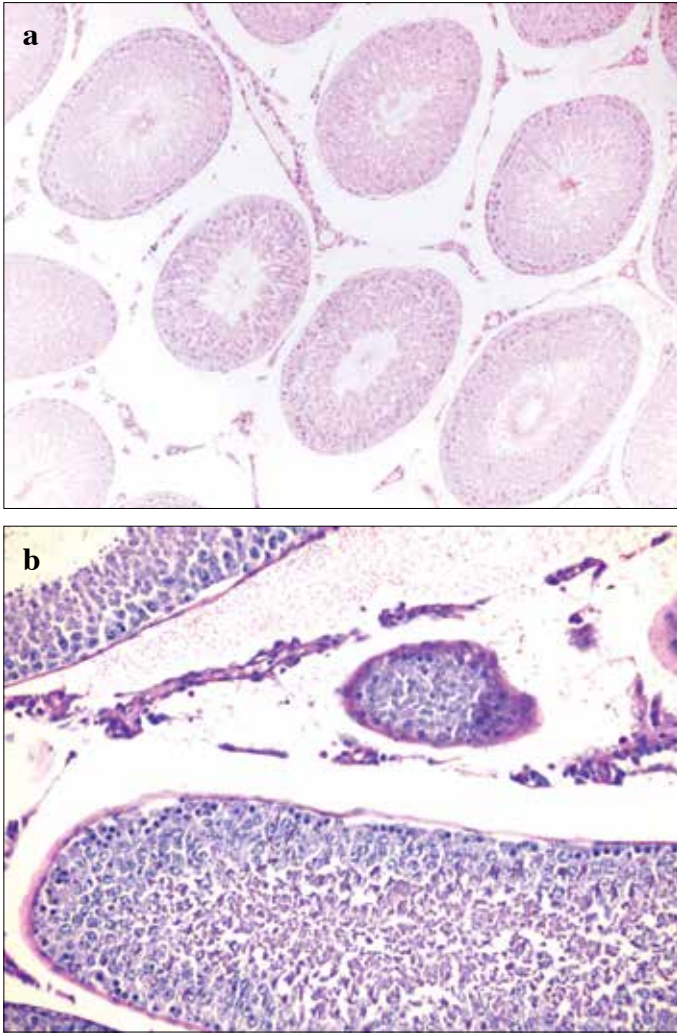
Mevcut çalışmalarda da belirtildiği üzere, MTX'in, testiste bulunan seminifer tübüllerdeki hasarın, sperm sayısını azalttığı ve MTX kullanıldıktan sonra sperm DNA'sının da hasarlandığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, MTX'in hücreler üzerine et-



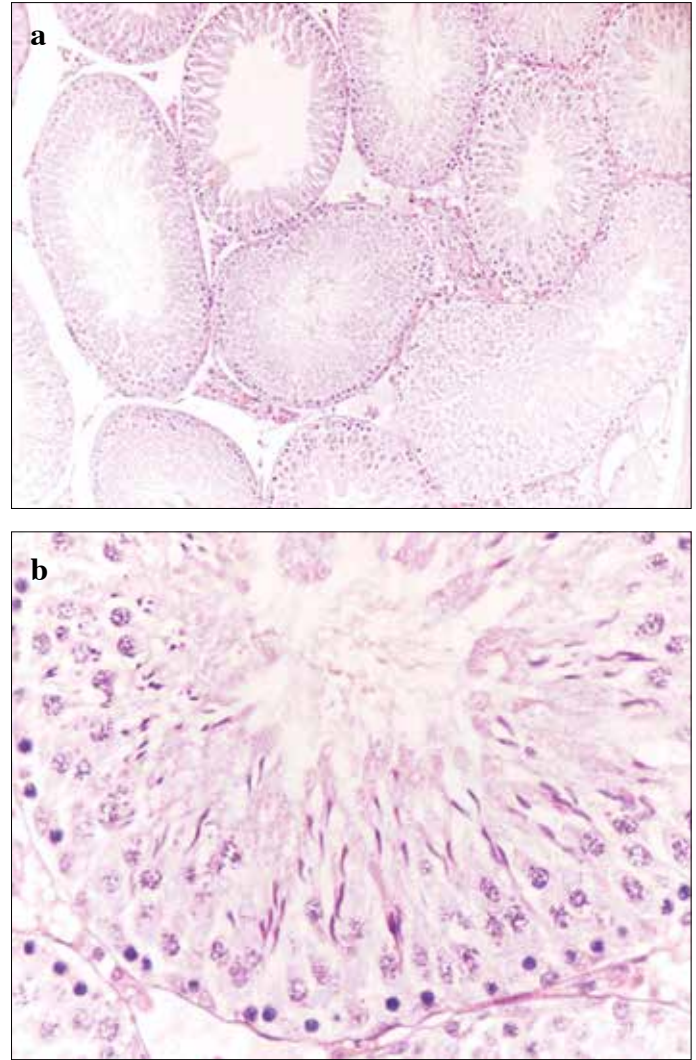
Şekil 2. a, b. (a) MTX grubuna ait seminifer tübülerin H&E boyası ile görüntüsü (x40). (b) Leydig hücreleri yanısıra tübülleri birbirinden ayıran ödematoz boşluklar (x200)

kisi, hücrelerin antioksidan etkinliğini azaltarak, ROS etkilerine açık hale gelmelerini ve böylece testis dokusu ve germ hücrelerinde hasara neden olduklarını göstermektedir.^[14-17] Seminifer tübüllerde atrofiye, germinal hücrelerde de apoptoza neden olduğu görülmüştür.^[8] Farelerde ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda, MTX'in testis ağırlığında azalmaya, sperm sayısında azalmaya, sperm başında anormalliklerin artışına, seminifer tübül ve sperm DNA'sında hasara sebep olduğu gösterilmiştir.^[19-21]

Vardı ve ark.^[8] larının yapmış oldukları bir çalışmada, MTX'in antioksidan enzim sisteminin etkinliğini azalttığı ve hücreleri reaktif oksijen partiküllerine karşı hassas hale getirdiği ve testiste hasara neden olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stres testis dokusunda hasara neden olmuş ve kullandıkları bir antioksidan olan klorojenik asitin testis hasarını azalttığı ve seminifer tübülleri oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı koruduğu gösterilmiştir. Ahmed ve ark.^[22] yapmış oldukları bir çalışmada, ratlarda cisplatine bağlı oluşan oksidatif hasara karşı vitamin C, DPPD ve L-Sistein'in antioksidan aktivitesini değerlendirmişlerdir. Antioksidan enzimlerin SOD, CAT ve GST aktivitelerinde anlamlı bir düşmenin eşlik et-



Şekil 3. a, b. MTX + C vitamini grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x100) (a). PAS boyası ile görüntüsü (x200) (b)



Şekil 4. a, b. C vitamini + MTX grubuna ait seminifer tübüllerin H&E boyası ile görüntüsü (x100) (a). (x400) (b)

tiği, belirgin lipid peroksidasyonu, total peroksidaz ve süperoksit anyon düzeylerinin ise yükseldiği izlenmiştir. Sisplatin ile tedavi edilmiş ratların testisleri kontrol grubuyla kıyaslanmış ve glutasyon, E vitamini ve C vitamini içeriğinin anlamlı olarak düştüğü izlenmiştir. Sisplatinin C vitamini, DPPD veya L-sistein ile birlikte verilmesi, sisplatinin süperoksit anyon ve antioksidan içerikler üzerinde etkisini düşürdüğü görülmüş, sisplatin enjeksiyonundan önce C vitamini, DPPD veya L-sistein verilmesinin histolojik tabloyu düzelttiği ve apoptotik hücre sayısını azalttığı saptanmıştır.^[22] Çalışmamızda da antioksidan olarak kullandığımız C vitamini MTX'den önce ve sonra olacak şekilde iki şekilde uygulanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. C vitamininin önceden verilmesinin metotreksatın testis dokusuna yapmış olduğu hasarı azaltması antioksidanların koruyucu etkisinin güzel bir örneğidir. Spermatogenez saniyede 1000 sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir ve oksidatif stresle hasar görmektedir. Testis bu hasardan korunmayı sağlayabilmek için çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyiciler

içermektedir. C vitamini seminal plazmadaki antioksidan kapasitenin kırılmasında önemli bir zincirdir ve spermatogenez desteklemektedir.^[9] Bizim çalışmamızda da Johnsen TBS neticesinde C vitamini + MTX grubunda MTX + C vitaminine oranla daha anlamlı ve yüksek değerler bulunmuştur. Öncesinde herhangi bir antioksidan almayan ratlarda, antioksidan alan ratlara oranla seminifer tübüllerin çoğunda, hücrelerin bazal membrandan ayrılıp lümene döküldüğü, spermatogenetik seri hücrelerin yer yer kayba uğradığı izlendi. Bu iki grubu kıyasladığımızda C vitamininin MTX hasarını en aza indirip, seminal plazmayı büyük oranda koruduğu izlendi. Mevcut bulgular, MTX tedavisi öncesi C vitamini kullanımının ucuz ve pratik olduğunu göstermektedir.

Bir başka çalışmada Aitken ve ark.^[23] antioksidan alımının oksidatif stresin testiste yarattığı hasarları en aza indirdiğini ve koruyucu etkilerini göstermişlerdir. Prasad ve ark.^[10] yaptığı çalışmalarda C vitamini ve E vitamininin eksikliğinin oksidatif stresi başlattığı vurgulanmış, C vitamininin membran bütünlüğünü ve hücrel

fonksiyonları koruyarak oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Benzer bir çalışmada MTX ile uyarılmış testis hasarına karşı bir antioksidan olan resveratrol'ün biyokimyasal, histopatolojik ve apoptotik düzeylerde koruyucu etkisine işaret etmektedir.^[4] Çalışmada sıçanlar kontrol grubu, MTX grubu, resveratrol grubu ve MTX + resveratrol grubu olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. MTX grubundaki sıçanlara 7 gün boyunca hergün i.p yolla 30 mg/kg/gün MTX uygulanmış. Tedavi grubundaki sıçanlara 20 mg/kg resveratrol i.p yolla 10 gün süresince uygulanmıştır. Diğer bir grup olan MTX + resveratrol grubuna ise 3 gün süresince 30 mg/kg/gün MTX i.p yolla uygulandıktan sonra resveratrol 7 gün süreyle 20 mg/kg olarak uygulanmıştır. Deney sonunda MTX+resveratrol grubunun TBS değeri anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur.^[4] Çalışmamızda antioksidanlar kullanılarak yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak TBS yanı sıra OSTÇ ve GETK değerleri de hesaplanmış olup, sonuçların çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı değerler sergilemesi dikkat çekicidir.

Çalışmamızın sonucunda elde edilen histopatolojik bulgular, bir antioksidan olan C vitamininin kemoterapi öncesi uygulanmasının MTX'e bağlı testis hasarını belirli bir ölçüde önleyebileceğini göstermektedir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Necmettin Erbakan University Meram School of Medicine.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – A.S., A.Ö.; Design – Y.Y.K.; Supervision – A.Ö., Y.Y.K.; Resources – A.S., Y.Y.K.; Materials – A.S., Y.Y.K.; Data Collection and/or Processing – A.S.; Analysis and/or Interpretation – Y.Y.K., A.Ö.; Literature Search – A.S., Y.Y.K.; Writing Manuscript – Y.Y.K., A.S.; Critical Review – A.Ö.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'nden alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – A.S., A.Ö.; Tasarım – Y.Y.K.; Denetleme – A.Ö., Y.Y.K.; Kaynaklar – A.S., Y.Y.K.; Malzemeler – A.S., Y.Y.K.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – A.S.; Analiz ve/veya Yorum – Y.Y.K., A.Ö.; Literatür Taraması – A.S., Y.Y.K.; Yazıyı Yazan – Y.Y.K., A.S.; Eleştirel İnceleme – A.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Kaynaklar

- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001;53:135-59.
- Kayaalp OS, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 1. Cilt, Pelikan Yayıncılık, 12. Baskı, 2009: 51-7.
- Türk G. Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. *Marmara Pharmaceutical Journal* 2013;17:73-92. [CrossRef]
- Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C. Effects of resveratrol on methotrexate-induced testicular damage in rats. *ScientificWorldJournal* 2013;2013:489659. [CrossRef]
- Cole PD, Zebala JA, Alcaraz MJ, Smith AK, Tan J, Kamen BA. Pharmacodynamic properties of methotrexate and Amino-trexate during weekly therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;57:826-34. [CrossRef]
- Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M. Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia* 2009;41:105-10. [CrossRef]
- Bozlu M, Coskun B, Çayan S, Acar D, Aktas S, Ulusoy E, Akbay E. Inhibition of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase decreases long-term histologic damage in testicular ischemia-reperfusion injury. *Urology* 2004;63:791-5. [CrossRef]
- Vardı N, Parlakpınar H, Ateş B, Otlı A. Metotreksatın neden olduğu testiküler hasara karşı klorojenik asidin koruyucu etkileri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010;30:507-13. [CrossRef]
- AL-Asadi FS. Effect of vitamin c on apoptotic germ cells of cryptorchid testis in rabbits. *Bas J Vet Res* 2011;10:23-6.
- Vijayprasad S, Bb G, Bb N. Effect of vitamin C on male fertility in rats subjected to forced swimming stress. *J Clin Diagn Res* 2014;8:5-8. [CrossRef]
- Johnsen SG: Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and result in 352 hypogonadal males. *Hormones* 1970;1:2-25.
- Saxena AK, Singh C. Effect of cyclophosphamide on the seminiferous tubules and leydig cells in rat. *Anat Soc* 1990;32:101-7.
- Jahuson, FE, Doubek, WG, Tolman, KC, Janney, CG. Testicular cytotoxicity of intravenous procarbazine in rats. *Surg Oncol* 1993;2:77-81. [CrossRef]
- Kim JC, Kim KH, Chung MK. Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reprod Toxicol* 1999;13:391-7. [CrossRef]
- Schilsky RL, Lewis BJ, Sherins RJ, Young RC. Gonadal dysfunction in patients receiving chemotherapy for cancer. *Ann Intern Med* 1980;93:109-14. [CrossRef]
- Sussman A, Leonard JM. Psoriasis, methotrexate and oligospermia. *Arch Dermatol* 1980;116:215-7. [CrossRef]
- Morris LF, Harrod MJ, Menter MA, Silverman AK. Methotrexate and reproduction in men: case report and recommendations. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:913-6. [CrossRef]
- Saxena AK, Dhungel S, Bhattacharya S, Jha CB, Srivastava AK. Effect of chronic low dose of methotrexate on cellular proliferation during spermatogenesis in rats. *Arch Androl* 2004;50:33-5. [CrossRef]
- Can G. Antineoplastik İlaçların Yan Etkileri ve Hemşirelik Yaklaşımları. *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi* 2005;2:8-15.
- Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: Intervention of folic and folinic acid. *Mutation Research* 2009;673:43-52. [CrossRef]
- Johnson FE, Farr SA, Mawad M, Woo YC. Testicular cytotoxicity of intravenous methotrexate in rats. *J Surg Oncol* 1994;55:175-8. [CrossRef]
- Ahmed EA, Omar HM, elghaffar SKh, Ragb SM, Nasser AY. The antioxidant activity of vitamin C, DPPD and L-cysteine against Cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 2011;49:1115-21. [CrossRef]
- Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxi Med Cell Langev* 2008;1:15-24. [CrossRef]