



## Yetişkin Sıçanlarda Testis Hücreleri ve Kalsinörin Immunopozitifliği Üzerine Ketaminin Etkileri: Bir Immunohistokimyasal ve Histopatolojik Çalışma

Yıldırım KALKAN<sup>1✉</sup>, Levent TÜMKAYA<sup>1</sup>, Habib BOSTAN<sup>2</sup>, Yakup TOMAK<sup>2</sup>,  
Durdu ALTUNER<sup>3</sup>, Orhan BAŞ<sup>4</sup>, Orhan Ünal ZORBA<sup>5</sup>, Hakkı UZUN<sup>5</sup>

1. Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Rize.
2. Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Rize.
3. Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Rize.
4. Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Rize.
5. Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Rize.

**Özet:** Bu çalışmada, sıçanlara uygulanan uzun süreli ketaminin testis germ hücreleri ve kalsinörin immunopozitif hücreler üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Otuz adet, yetişkin Sprague-Dawley erkek sıçan her grupta 6'şar adet olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. On dört gün süreyle ve günde iki defa olmak üzere, grup 1, 2, 3 ve 4'e sırasıyla 40, 60, 80 ve 100 mg/kg ketamin hidroklorid ve grup 5'e ise sadece % 0,9 NaCl intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Bu çalışmada, ketamin uygulanan gruplarda testis bağ dokusunda ödem ve germ hücrelerinde dejenerasyonlar gözlemlendi. Grup 3 ve 4'te, tubulus seminiferus lumenlerinde sperm miktarındaki azalmanın grup 1 ve 2'ye göre daha fazla olduğu belirlendi. Uzun süreli ve yüksek doz ketamin kullanımının bir sonucu olarak, spermatogenetik germ hücreleri ve Leydig hücreleri miktarında da azalma olduğu tespit edildi. Ayrıca, immunohistokimyasal yöntemler ile boyanmış testis dokusu kesitlerinde, kalsinörin'in değişik derecelerde, (+)'dan (+++)'a kadar, immunoreaktivite verdiği gözlemlendi. Sonuç olarak, uzun süreli ve yüksek doz ketamin kullanımının testis intersitisyel dokularında, sperm yoğunluğunda ve germ hücre miktarlarında histopatolojik ve immunohistokimyasal değişiklikler yapabileceği belirlenmiş oldu. Ayrıca, uzun süreli ketamin infüzyonunun erkek infertilitesine neden olabileceği de düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** İmmunohistokimya, Kalsinörin, Ketamin, Sıçan, Testis.

### Effects on Calcineurin Immunopositivity and Testes Cells of Ketamine in Adult Rat: An Immunohistochemistry and Histopathological Study

**Abstract:** In this study, we aimed to investigate the effects of long-term ketamine upon testis germ cells and the regional distributions of calcineurin immunopositive testis germ cells in adult male rats. Thirty adult male, Sprague-Dawley rats were divided into one control and four treatment groups, with 6 rats in each. Rats in treatment groups of 1, 2, 3 and 4 received ketamine at doses of 40, 60, 80 and 100 mg/kg intraperitoneal (i.p.), respectively, while those in group 5 (as control) received i.p. 0.9 % NaCl. In this study, we observed degeneration in germ cells and oedema in testis connective tissue. However, we determined that ketamine remained in tissue for a long term and high-dose resulted in a decrease in the numbers of germ cells and Leydig cells. However, there were varying degrees, from (+) to (+++), of calcineurin immunoreactivity in testicular tissue sections stained with immunohistochemical methods. The results suggest that long-term use of high-dose ketamine may cause male infertility due to histopathological and immunohistochemical changes in testicular interstitial tissues, as well as changes in sperm density and germ cell number.

**Key words:** Immunohistochemistry, Calcineurin, Ketamine, Rat, Testes.

## GİRİŞ

**K**etamin, tıbbi tedavide analjezik ve anesteziik etki amacıyla kullanılan bir ilaçtır (Reich, 1989). Aynı zamanda sempatomimetik etkisiyle katekolamin salınımını arttırdığı bilinmektedir. (White ve Ryan, 1996). Yüksek dozu insanlarda sayıklama, amnezi, yüksek tansiyon, şiddetli konfüzyon, aşırı korku, depresyona neden olurken düşük dozlarının kas titremeleri ve çift görmeye neden olduğu bildirilmiştir (Craven, 2007). Ketaminin uzun süreli yanık pansumanlarında, kronik ağrı tedavilerinde, alkol bağımlılığı tedavisinde ve ilaç dışı kötüye kullanım şeklinde uygulandığı ifade edilmiştir (Krupitsky ve ark., 1997; Goldberg ve ark., 2005; Krystal ve ark., 2006; Dahan ve ark., 2011; Sorensen ve ark., 2011). Ayrıca, ketaminin seksüel aktiviteyi artırıcı etkisine bağlı olarak eğlence mekânlarında kullanıldığı da bildirilmektedir (Smith ve ark., 2002).

Ketamin, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi aşamalarında kalsiyum mobilizasyonu ve mitokondriyal ATP sentezini azaltarak yapısal bozukluklar oluşturabilmektedir (Chen ve Chen 2010). Ketaminin ekstrasellüler kalsiyum seviyelerinde artışa neden olduğu ve bunun sonucunda, kalsinörin immuno-reaktivitesini azalttığı da tespit edilmiştir (Chen ve Chen 2010). Kalsinörin, kalsiyum tarafından aktive edilen bir efektör olup, mitoz ve mayoz bölünmede, hücre farklılaşması, hücre yaşlanması ve apoptozis gibi hücrenel süreçlerde önemli bir mesajcı görevini üstlenmektedir. Bağışıklığı baskılayıcı maddeler için hedef molekül olan kalsinörin, T lenfositler başta olmak üzere birçok hücrenin sinyal transdüksiyonu, immun cevap genlerinin aktivasyonu (Loh ve ark., 1996a, 1996b; Shibasaki ve ark., 2002; Sugiura ve ark., 2002; Rusnak ve ark., 2000) ve fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi biyolojik yaşam süreçlerinde önemli görevler yapmaktadır (Nishio ve ark., 2000; Yamashita ve ark., 2000). Vücutta bütün dokularda geniş bir dağılıma sahip olan kalsinörin (Miyamoto ve ark., 1994; Su ve ark., 1995; Sugiura, 2002), testislerde spermatogoniyalardan spermatosite kadar olan germ hücrelerinin olgunlaşma ve

farklılaşmalarını arttırdığı, başkalaşım geçiren spermatidlerde çekirdek kromatininin tekrar biçimlenmesinde rol oynadığı bildirilmektedir (Miyamoto ve ark., 1994; Su ve ark., 1995; Moriya ve ark., 1995).

Kalsinörin, memeli hücrelerinde kalsiyum düzenleyici birçok aşamada fosfataz fonksiyonlarını ortaya çıkartan önemli bir enzimdir. Semen içinde % 2-10 oranında bulunan spermin yaşayabilmesi için ortamda kalsiyum, çinko, laktöz ve albumin gibi birçok maddenin bulunması gereklidir. Kalsiyum, kalmodiline bağlanarak kalsinörini aktive eder ve intrasellüler kalsiyum seviyesinin artmasına neden olur (McKinsey ve ark., 2002). Sitoplazma içindeki iyonize kalsiyum konsantrasyonu ekstrasellüler sıvıdakienden 1000 kat daha azdır (Wacker ve ark., 1968). İntrasellüler kalsiyum seviyesinde artış sırasında ekstrasellüler kalsiyum seviyesinde düşüş meydana gelirken, kalsiyum tarafından aktive edilen kalsinörin azalma meydana gelir. Aktive olmuş kalsinörin NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) proteinlerinin defosforilasyonunu sağlayarak immun yanıt ve sitokin aktivasyonuna aracılık etmektedir. (Bushinsky ve ark., 1998; Guyton, 2001; Mulero ve ark., 2009). Ayrıca, kalsinörin GABA (Gamma-aminobutyric acid), NMDA (N-Methyl-D-aspartate) ve dopamin gibi birçok reseptöre de bağlanır (Bannai ve ark., 2009).

Daha önceden yapılan çalışmalarda, uzun süreli ketamin kullanımına bağlı olarak testislerde oluşabilecek histopatolojik ve immunohistokimyasal değişikliklerle ilgili yayınlara rastlanmamış olması bizim bu çalışmayı yapmamıza neden olmuştur. Bu araştırmada, sıçanlara uygulanan uzun süreli ve yüksek doz ketaminin testis germ hücreleri ve kalsinörin immunopozitif hücreler üzerine etkileri histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Hayvan deneyleri için kullanılan yöntemler "National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" protokolüne göre düzenlendi. Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan gerekli izinler alındı (Tarih: 27.04.2010, Karar no: 14). Çalışmada 30 adet 250-300 gr. ve yaklaşık 250 günlük Sprague-Dawley erkek sıçan kullanıldı. Bütün hayvanlar 7-8 mm pelet sıçan yemi ve su ile ad libitum olarak beslendi. 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortam sağlamak için otomatik fotoperiyot ile beyaz floresan ışık kullanılıp, ortam ısıları  $20 \pm 30^{\circ}\text{C}$  ve rutubet oranı % 55-60 olarak belirlendi. Hayvanlar her grupta altı adet olacak şekilde beş eşit gruba ayrıldı. On dört gün süreyle ve günde iki defa grup 1, 2, 3 ve 4'e sırasıyla 40, 60, 80 ve 100 mg/kg ketamin hidroklorid (Parke Davis & Co, UK) ve grup 5'e ise sadece 1 ml % 0,9 NaCl i.p. olarak uygulandı. Bu sürenin sonunda ketamin ile anestezi edilen deney hayvanlarının kuyruk venasından 2 ml kan heparinli tüplere alındıktan sonra hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edildi. Hayvanların kan-kalsiyum analizi otoanaliz cihazı ile yapıldı (Architect c16000 Autoanalyzer, Abbott Diagnostics, MA, USA). Histolojik incelemeler için hayvanların testis dokuları % 10'luk nötral formaldehit solüsyonuna alındı. Yirmi dört saat fiksatif içinde bekledikten sonra yaklaşık 6-8 saat arası akar suda yıkandı ve etanolksilen serilerinden geçilerek otomatik doku takibi (Citadel 2000, Thermo Fisher Scientific Shandon, England) yapılarak parafin içine gömüldü. Dokular rutin hematoksilin-eozin (H&E) ve immunohistokimyasal boyama için 4-5  $\mu\text{m}$  kalınlığında kesildi.

Monoklonal antikor kullanarak hücre antijenlerini buldukları yerde göstermek için immunoperoksidaz boyamanın üretici tarafından tavsiye edilen prosedürü uygulandı. Alınan kesitler 20 dakika ksilen içerisinde bekletilip alkol serilerinden geçirildikten sonra distile suda yıkandı. 400 Watt güçte 30 dakika Sitrat buffer solüsyonu içinde ısıtıldı ve soğutuldu. Beş dakika distile suda ve 10 dakika PBS'de yıkandı-

tan sonra 10 dakika % 3  $\text{H}_2\text{O}_2$  solüsyonunda tutuldu ve PBS ile yıkandı. Sekonder bloklayıcı maddede 10 dakika bekletildi. Her bir preparat primer antikorun [Purified Mouse Anti-Calceinurin (29/Calceinurin,) BD Biosciences, USA] 1/200 dilüsyonunda 75 dakika bekletildi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra biotin ile işaretlenmiş sekonder antikorda (Mini Flex Kit, DAKO, Denmark) 20 dakika bekletildi. PBS ile yıkandı, kromojen (3-3 Diaminobenzidin-DAKO) ile renklendirilerek Harris hematoksilin ile çekirdek boyaması yapıldı. Negatif kontroller için primer antikor yerine PBS kullanıldı. Preparatlar uygun kapatma maddesi (Entellan, Merck, Germany) ile kapatılarak fotoğrafları çekildi.

İmunohistokimyasal boyamalar sonucunda dokulardaki immunopozitif reaksiyonlar, hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olmak üzere 3 kategoriye ayrıldı. Spermatogenezisin gelişim aşamaları Johnsen'in Testiküler Biyopsi Skorlama yöntemi (Johnsen, 1970) ile değerlendirildi.

## İstatiksel Analiz

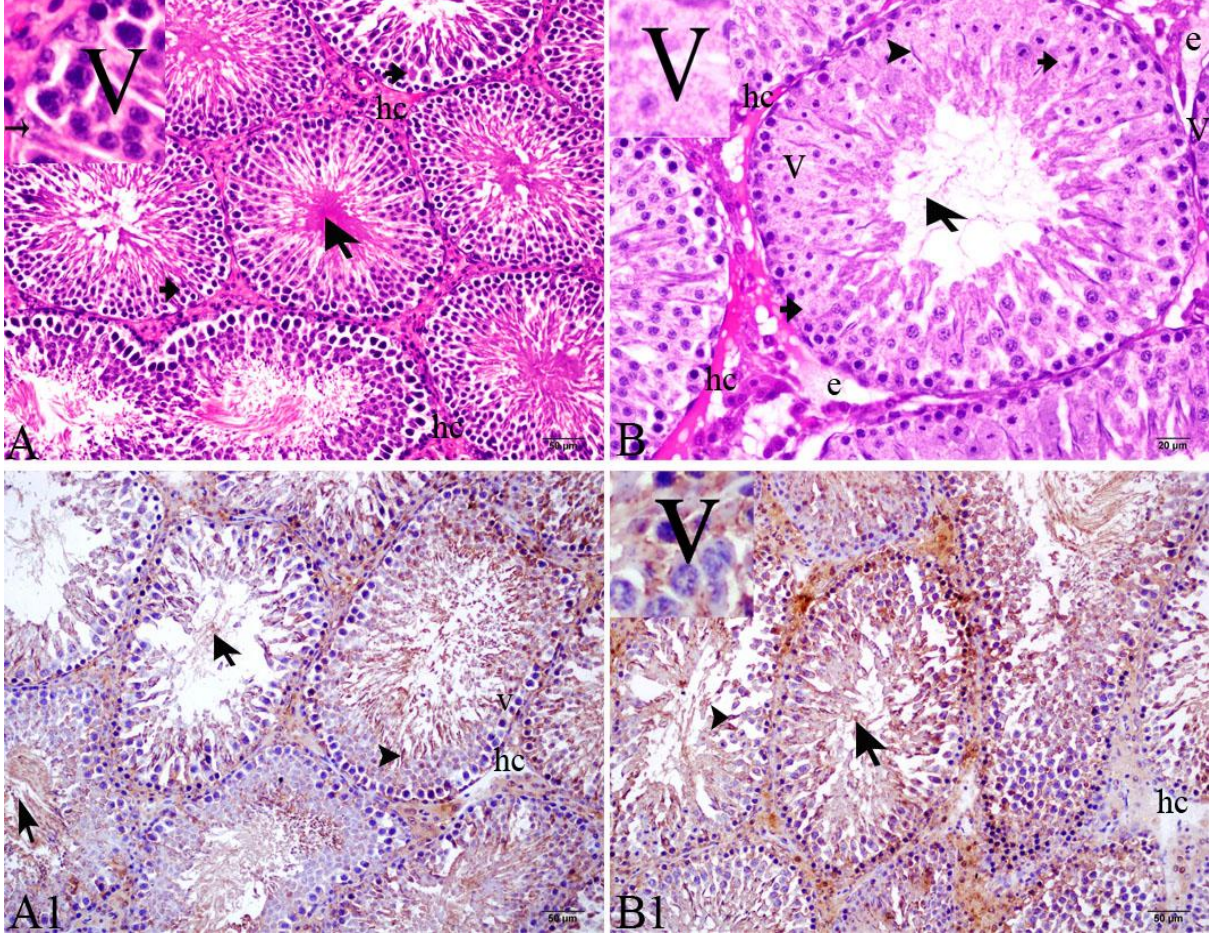
Her bir testisten rastgele elde edilen on adet preparat kalsinörünün immunoreaktivitesi yönünden incelendi. Her gruptan elde edilen preparatlardan toplam 120 alan (+), (++) , (+++) kategorilerine göre değerlendirildi. Sıçan testislerindeki hücrelerin kalsinörünün immunoreaktivitesini istatistiksel değerlendirme için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları belirlemek için ise Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test yapıldı (SPSS 18 for Windows, IBM, Chicago, IL, USA) (Tablo 1). Kalsiyum seviyelerinin gruplar arasındaki dağılımları istatistiksel yönden ANOVA ile incelendi ve çoklu karşılaştırmalar için LSD testi uygulandı (SPSS 18 for Windows, IBM, Chicago, IL, USA) (Tablo 2).

## SONUÇ

Çalışmamızda, deney gruplarına ait histolojik yarı kantitatif değerlendirmeler tablo 1 ve 2'de, kan-

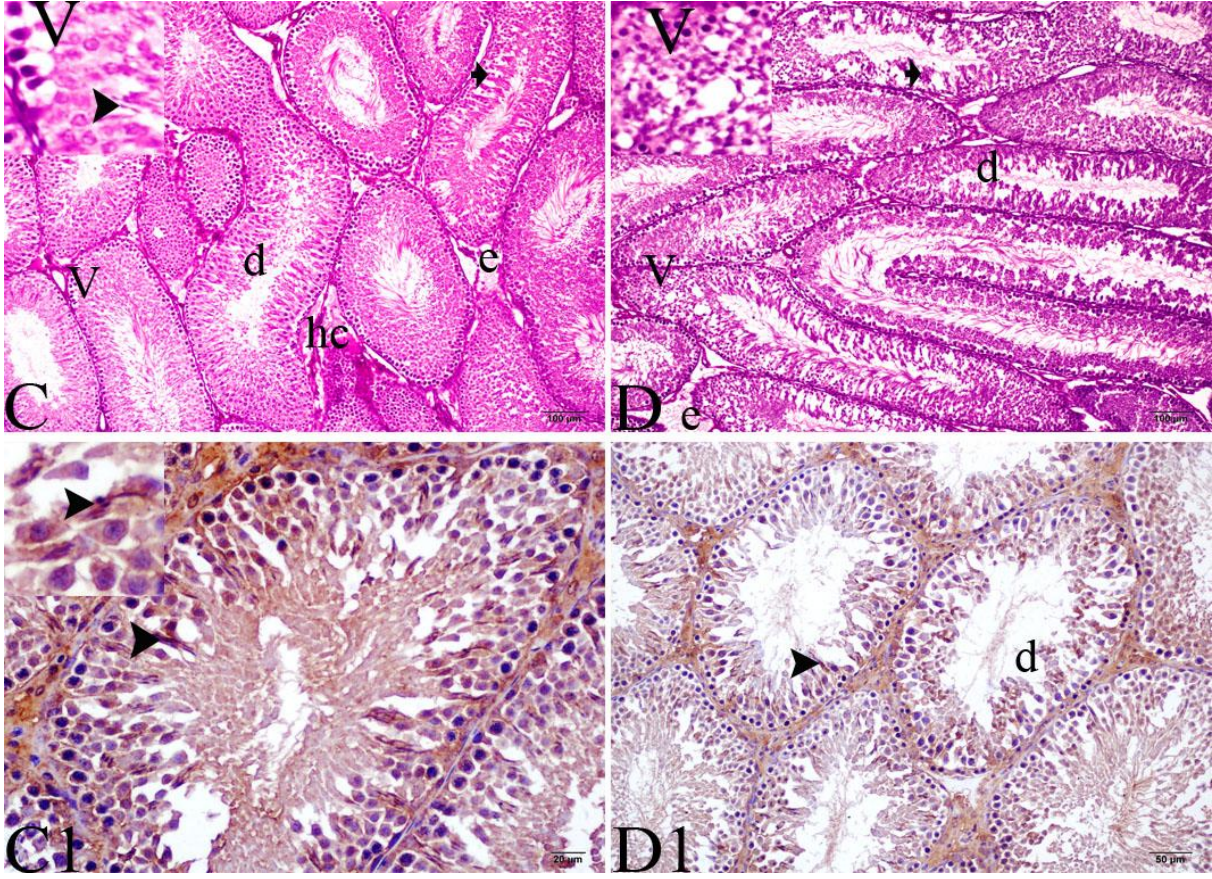
kalsiyum değerleri ise tablo 3’de gösterilmiştir. H&E ile boyanan kesitlerin histopatolojik incelenmesinde, grup 5 ile diğer gruplar karşılaştırıldığında; grup 1’de önemli bir patolojik bozukluk gözlenmezken, grup 2,

3 ve 4’de spermatogenik germ hücrelerinin dizilimlerinde bozukluk ve primer spermatositlerin morfolojilerinde değişiklikler gözlemlendi.



**Şekil 1.** Grup 1 ve 2’nin sıçan testislerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal incelenmesi; **(A)** Grup 1- Ketamin 40 mg/kg; büyük ok: sperm, küçük ok: dejeneratif hücre, ince ok: sertoli hücrelerinde vakuolizasyon, v: vakuolizasyon, hc: hiyalinleşme, H&E, X20, bar: 50 µm. **(B)** Grup 2-Ketamin 60 mg/kg; büyük ok: sperm, d: dejeneratif hücre, v: vakuolizasyon, hc: hiyalinleşme, Siyah ok başı: sperm başı, e: ödem, H&E, X40, bar: 20 µm. **(A1)** Grup 1- Ketamin 40 mg/kg; büyük ok: sperm, v: vakuolizasyon, hc: hiyalinleşme, siyah ok başı: sperm başı, Anti-Calcineurin / immunoperoksidaz boyama (IP), X20, bar: 50 µm. **(B1)** Grup 2- Ketamin 60 mg/kg; büyük ok: sperm, hc: hiyalinleşme, Ly: Leydig hücresi, siyah ok başı: sperm başı, Anti-Calcineurin / immunoperoksidaz boyama, X20, bar: 50 µm.

**Figure 1.** The histopathological and immunohistochemical examination of rat testes of group 1 and 2; **(A)** Group 1- Ketamine 40 mg/kg; large arrow: spermium, small arrow: degenerative cells, thin arrow: vacuolization in sertoli, v: vacuolization, hc: hyaline cast, H&E, X20, bar: 50 µm. **(B)** Group 2- Ketamine 60 mg/kg; large arrow: spermium, d: degenerative cells, v: vacuolization, hc: hyaline cast, black arrowhead: part of the sperm head, e: edema, H&E, X40, bar: 20 µm. **(A1)** Group 1- Ketamine 40 mg/kg; large arrow: spermium, hc: hyaline cast, black arrowhead: part of the sperm head, v: vacuolization, Anti-Calcineurin / immunoperoxidase staining (IP), X20, bar: 50 µm. **(B1)** Group 2- Ketamine 60 mg/kg; large arrow: spermium, hc: hyaline cast, black arrowhead: part of the sperm head, v: vacuolization, Anti-Calcineurin / IP, X20, bar: 50 µm.

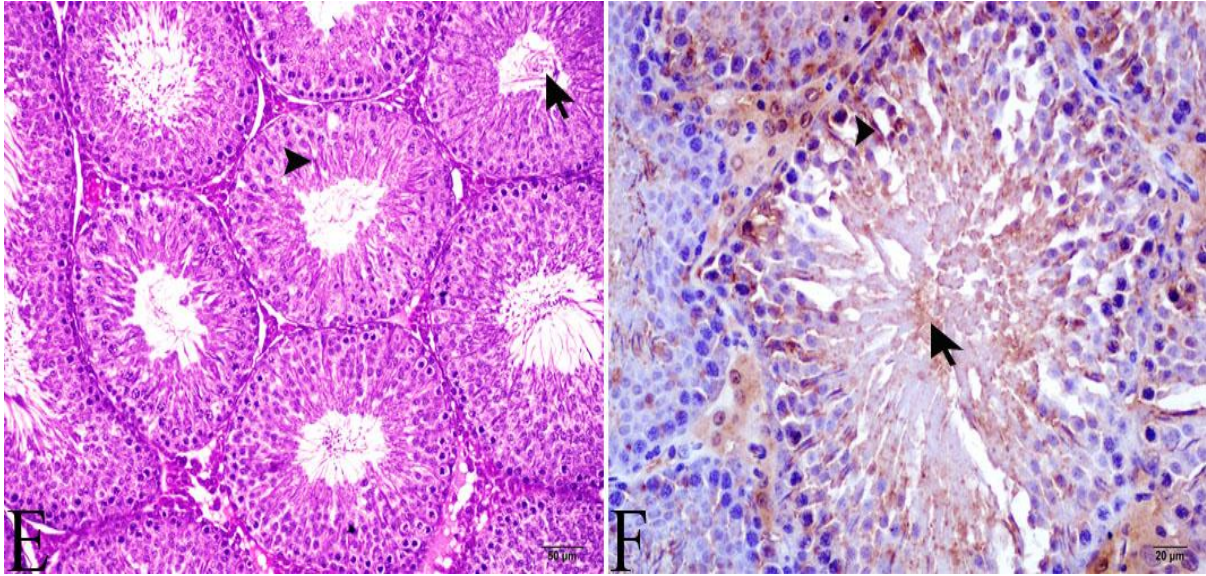


**Şekil 2.** Grup 3 ve 4'un sıçan testislerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal incelenmesi; **(C)** Grup 3- Ketamin 80 mg/kg; siyah ok başı: sperm başı, küçük ok: dejeneratif hücre, e: ödem, v: vakuolizasyon, d: dejeneratif tubul, hc: hiyalinleşme, H&E, X10, bar: 100 µm. **(D)** Grup 4- Ketamin 100 mg/kg; küçük ok: dejeneratif hücre, e: ödem, v: vakuolizasyon, d: dejeneratif tubul, hc: hiyalin dökümü, H&E, X10, bar:100 µm. **(C1)** Grup 3- Ketamin 80 mg/kg; siyah ok başı: sperm başı, Anti-Calceineurin/ IP boyama, X40, bar:20 µm. **(D1)** Grup 4- Ketamin 100 mg/kg; siyah ok başı: sperm başı, d: dejeneratif tubul, Anti-Calceineurin/ IP boyama, X20, bar:50 µm.

**Figure 2.** The histopathological and immunohistochemical examination of rat testis of the group 3 and 4; **(C)** Group 3- Ketamine 80 mg/kg; black arrowhead: part of the sperm head, small arrow: degenerative cell, e: edema, v: vacuolization, d: degenerative tubule, hc: hyaline cast, H&E, X10, bar: 100 µm. **(D)** Group 4- Ketamine 100 mg/kg; small arrow: degenerative cell, e: edema, v: vacuolization, d: degenerative tubule, hc: hyaline cast, H&E, X10, bar:100 µm. **(C1)** Group 3- Ketamine 80 mg/kg; black arrowhead: part of the sperm head, Anti-Calceineurin/ IP stain, X40, bar:20 µm. **(D1)** Group 4- Ketamine 100 mg/kg; black arrowhead: part of the sperm head, d: degenerative tubule, Anti-Calceineurin/ IP stain, X20, bar:50 µm.

Primer spermatositlerin düzgün-yuvarlak ve mitotik şekilli çekirdek yapıları kaybolarak nekroz olduğu tespit edildi. Özellikle primer spermatositlerde gözlenen vakuolizasyonlar ve hücre dejenerasyonları grup 4'te grup 3'e göre daha belirgindi (Şekil 2A ve B). Grup 1 ve 2'de ise germ hücrelerinde ve Sertoli hücrelerinde vakuolizasyonlar az gözlenirken (Şekil 1 A), grup 3 ve 4'te daha fazla hücre dejenerasyonları ve vakuolizasyonlar meydana geldiği görüldü. Bunlara ek olarak, interstisyel

bağ doku alanlarında ödem, hiyalinleşme ve vakuolizasyonlar tespit edildi. Grup 3 ve 4'e ait seminifer tubulus lümenlerinde sperm yoğunluklarında belirgin azalmalar olduğu gözlemlendi. Grup 4'te spermatogenetik germ hücre dizilimlerinde yoğun hücre kayıpları belirlendi. Birçok tubulusta erken ve geç spermatidlerin oluşum basamakları gözlenmezken, bazı lümenlerin merkeze yakın alanlarında az miktarda olgun sperm tespit edildi (Şekil 1, 2 ve 3).



**Şekil 3.** Kontrol grubu sıçan testislerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal incelenmesi; **(E)** Grup 5; büyük ok; sperm, siyah ok ucu: Sperm başı, H&E, X20, bar: 50 µm. **(F)** Grup 5; büyük ok; sperm, siyah ok ucu: Sperm başı, Anti-Calcineurin/ IP boyama, X40, bar: 20 µm

**Figure 3.** The histopathological and immunohistochemical examination of the control group rat testes; **(E)** Group 5; large arrow: spermium, black arrowhead: part of the sperm head, H&E, X40, bar: 20 µm **(F)** Group 5; large arrow: spermium, black arrowhead: part of the sperm head, Anti-Calcineurin/ IP stain, X40, bar: 20 µm

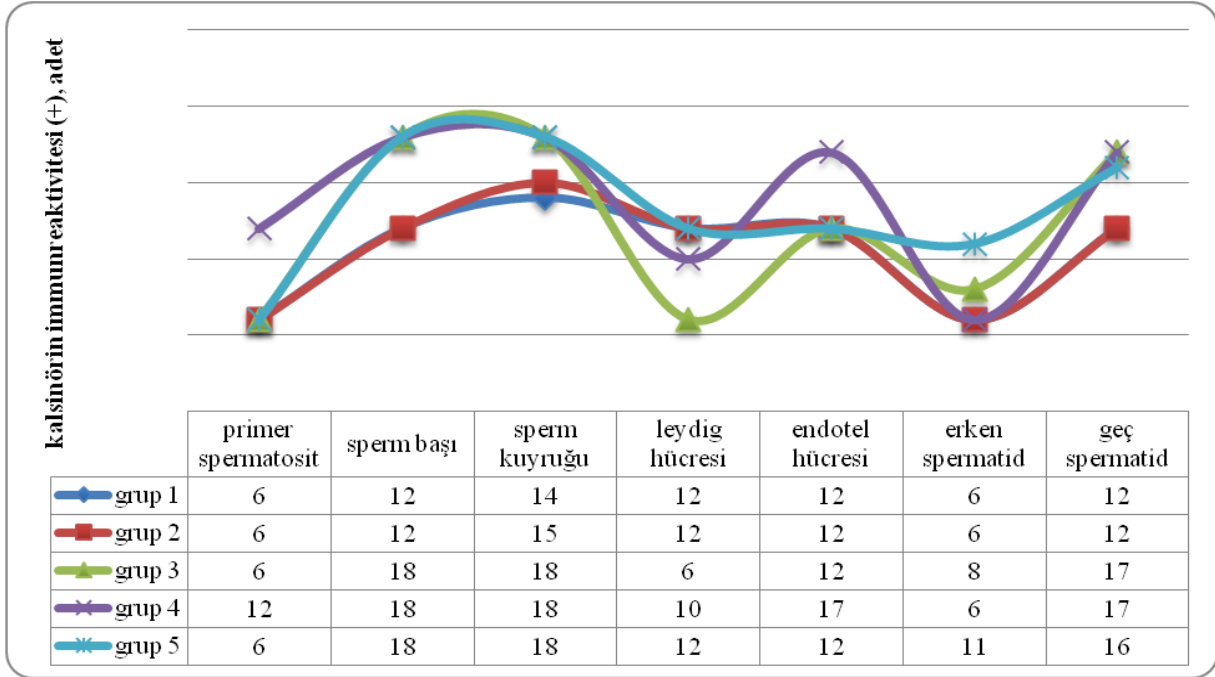
İmunohistokimyasal yöntemler ile boyanmış kesitlerde, kalsinörin immunopozitifliğinin testis dokularının farklı alanlarında (+)'dan (+++)'a kadar değişik derecelerde immunoreaktivite verdiği gözlemlendi. Buna göre; bütün gruplarda özellikle olgun spermilerin baş ve kuyruk ucuna yakın alanlarının (++) ve (+++) olarak daha koyu renkle boyandığı gözlemlendi (Şekil 1). Primer spermatositler ve erken spermatidlerin, geç spermatidlere göre daha az immunoreaktivite gösterdiği tespit edildi (Şekil 2).

Bazı Leydig hücreleri ve damar endotel hücreleri orta derecede pozitif (++) boyanmasına karşın (Şekil 1-B1), interstisyel alan içindeki hiyalin yapıları ile benzer immunoreaktivite gösterdi (Şekil 1-A1). Grup 3 ve 4'de lümeneye yakın alanlarda yerleşmiş olan geç dönem spermatidlerin, akrozomal kep aşamasındaki erken dönem spermatidlere göre daha koyu boyanıp şiddetli immunopozitiflik (+++) gösterdikleri belirlendi (Tablo1 ve Tablo 2), (Şekil 1, 2 ve 3).

**Tablo 1.** Testislerdeki kalsinörin immunoreaktivitesinin yarı kantitatif değerlendirilmesi.

**Table 1.** Semi-quantitative assessment of calcineurin immunoreactivity in the testes.

Gruplar	n	Primer spermatosit	Sperm başı	Sperm kuyruğu	Leydig hücresi	Endotel hücresi	Erken spermatid	Geç spermatid
Grup 1	6	+	++	++	++	++	+	++
Grup 2	6	+	++	++	++	++	+	++
Grup 3	6	+	+++	+++	+	++	+	+++
Grup 4	6	++	+++	+++	+	++	+	+++
Grup 5	6	+	+++	++	++	++	++	++

**Tablo 2.** Sıçan testis hücrelerinin kalsinörünün immunoreaktivitesinin sayısal skorlarının grafiksel gösterimi.**Table 2.** Graphical monitoring of the numerical scores of the calcineurin immunoreactivity of rat testis cells.**Tablo 3.** Deney gruplarındaki sıçanların kalsiyum seviyeleri değer aralığı ve ortalama standart sapma.**Table 3.** The Std. Error  $\pm$  Mean and value range of calcium levels in rats of experimental groups.

Gruplar	Kalsiyum değer aralığı	Ortalama $\pm$ Standart Hata
Grup 1	5,6-6,8 mg/dL	5,93 $\pm$ 0,19
Grup 2	5,9-6,9 mg/dL	6,27 $\pm$ 0,159
Grup 3	7,0-8,3 mg/dL	7,42 $\pm$ 0,193
Grup 4	7,8-8,9 mg/dL	8,20 $\pm$ 0,18
Grup 5	5,3-6,5 mg/dL	5,88 $\pm$ 0,19

Karşılaştırılan beş grubun primer spermatozoid, sperm başı, sperm kuyruğu, Leydig hücresi, endotel hücresi, erken spermatid ve geç spermatidlerde immunohistokimyasal boyama yönünden pozitif immunoreaktiviteleri istatistiksel olarak incelendi. Yapılan değerlendirmelerde, grup 4 ile grup 5'deki primer spermatozoidlerin ( $p=0,002$ ) ve Leydig hücrelerinin ( $p=0,002$ ) diğer gruplara göre immunoreaktivitelerinin anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlendi. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmadı ( $p>0,05$ ).

Deney gruplarına ait kalsiyum değerleri karşılaştırılmasında kontrol grubuna göre uygulama gruplarının kan kalsiyum oranının daha fazla olduğu

belirlendi (Tablo 3). Grup 5 ile grup 1 ve 2 arasında istatistik yönden anlamlı farklılık bulunmazken ( $p>0,05$ ), grup 5 ile grup 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olduğu saptandı ( $p<0,05$ ).

## TARTIŞMA

Cerrahi işlemlerin sorunsuz yapılabilmesi için canlıların derin uyku halinde bulunması önemlidir. Ketamin, bu amaçla kullanılan disosiyatif ilaçlarının yanı sıra en sık kullanılan analjezik ve anesteziye etkili bir ilaç olarak bilinir (Reich ve Silvey, 1989). Anesteziye maddelerin uygulama şekli ve süresine göre dokularda bir takım değişiklikler şekillendirdiği

bildirilmektedir (Heys ve ark., 1989; Salo ve ark., 1992; Beal ve ark., 2000; Arras ve ark., 2001). Bu çalışmada da uzun süreli uygulanan ketaminin testis dokusu ve doku kalsinörünü üzerine etkileri immuno-histokimyasal ve histopatolojik yöntemlerle belirlenmiştir.

Ketaminin, dopamin aktivitesini artırarak seksual uyarılma ve istekte önemli bir rol oynadığı kabul edilmesine karşın (Melis ve Argiolas, 1994), çalışmamız ile ilacın uzun süreli kullanımının testis dokularında dejeneratif ve histopatolojik değişiklikler yaptığı belirlendi. Ketamin uygulamaları, hücrelerde çekirdek yoğunlaşması ve sitoplazmadaki organellerin bozulması ile karakterize apoptotik hücre ölümlerini arttırabilmektedir (Takadera ve ark., 2006). Grup 3 ve 4'te primer spermatositlerde meydana gelen morfolojik değişikliklerin hücresel dejenerasyonlara bağlı olduğu, karyolizis yapısında ve apoptotik eozinofilik hücre görünümüne sahip olduğu tespit edildi.

Mitoz ve mayoz bölünme, hücre farklılaşması, hücre yaşlanması ve apoptoziste önemli rol üstlenen kalsinörin (Nishio ve ark., 2000; Yamashita ve ark., 2000), vücudumuzun bütün dokularında değişik yoğunluklarda dağılmış ve aktif halde bulunan bir proteindir (Miyamoto ve ark., 1994). Kalsinörin, testislerdeki germ hücrelerinin farklılaşma aşamalarında önemli görevler yapar. Spermatogonyumlardan spermiyuma kadar geçen spermatotogenesis ve spermiyogenezis safhalarındaki germ hücrelerinin olgunlaşma ve farklılaşmalarını arttırdığı, başkalaşım geçiren spermatidlerde ise çekirdek kromatininin tekrar biçimlenmesi ve olgun spermiyuma dönüşmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Tash ve ark., 1988; Su ve ark., 1995; Moriya ve ark., 1995).

Bu çalışmada, kontrol grubuna nazaran diğer gruplarda erken spermatidlerin immunopozitifliğinin düşük olması ile ketaminin kalsinörin immunoreaktivitesini olumsuz olarak etkilediği ve yüksek doz uygulanan grup 3 ve 4'ün tubulus lümenlerindeki sperm miktarında azalma meydana getirdiği

görüldü. Bütün grupların olgun spermiyumlarının baş ve kuyruk kısımlarında immunopozitivitenin (+)'dan yüksek olarak gözlenmesi, ketaminin spermiyogenezis aşamasındaki germ hücrelerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığını gösterdi. Ayrıca, erken dönem spermatidlerinin gelişim süreçlerinde meydana gelen immunoreaktivitenin geç dönem spermatidlere göre azlığı ile yüksek doz ketaminin kalsinörin üzerine etkili olduğu gösterilmiştir.

Kalsinörin akrozomal kep safhasından itibaren testis germ hücrelerinin çekirdeği içinde birikmeye başladığı bildirilmiştir (Moriya ve ark., 1995). Çalışmamızda, erken dönem spermatidlerinin immunopozitifliğinin düşük olması kalsinörin birikiminin reaktivite verecek kadar sağlanmadığını gösterilmesi bakımından önemlidir.

Takrolimus gibi immun sistemi baskılayıcı etkisi olan ve kalsinörünü inhibe eden maddeler sertoli hücrelerinin miktarında azalma ve spermatogenik germ hücrelerinde dejenerasyonlar yaparak seminifer tubuluslarda önemli histopatolojik hasarlar meydana getirdiği ifade edilmiştir (Canequim ve ark., 2009). Sertoli hücreleri tarafından immun sistemi baskılayıcı moleküllerin üretildiği bildirilmiştir (De Cesaris ve ark., 1992). Yapılan çalışmalarda takrolimus gibi ketamininde immun sistemi baskılayıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (Wilson ve ark. 1971). Çalışmamızda, sertoli hücrelerinin morfolojilerinde bozukluklar olduğu, apikal sitoplazmalarının lümenine kadar ulaşmadığı gözlemlendi. Yüksek doz ketaminin uzun süreli kullanımından kaynaklanan kalsinörin miktarındaki azalmanın sertoli hücrelerindeki değişikliklerin nedeni olabileceği kanaatine varıldı.

Ketaminin ekstrasellüler kalsiyum seviyelerinde artışa neden olduğu bildirilirken (Chen ve Chen 2010) intrasellüler kalsiyum seviyesinde azalmanın ise hücre ölüm miktarını arttırdığı kabul edilmektedir (Farber ve ark., 1981). İntrasellüler kalsiyum homeostazisi hücrenin normal fonksiyonunun oluşturulması sürecinde çok önemlidir. Kalsiyum



iyonlarında artma ve azalma apoptozisin mümkün olan sebeplerindedir (McConkey ve ark., 1997; Berridge ve ark., 1998; Li ve ark., 2000). Çalışmamızda, kan kalsiyum seviyesindeki azalmanın kalsinörin immunoreaktivitesini azaltığı tesbit edildi.

Ketamin, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi aşamasında kalsiyum mobilizasyonu ve mitokondriyal ATP sentezini azaltarak yapısal bozukluklar oluşturduğu bildirilmektedir (Chen ve Chen 2010). Bu çalışmamızda, kalsiyum seviyelerinde meydana gelen artışın uzun süreli kullanım ve doza bağlı olduğu, hücresel immunoreaktiviteyi etkilediği ve germ hücre yapılarının gelişim serilerinde dejenerasyonlar ile sitoplazmik vakuolizasyonlar meydana getirdiği gözlemlendi.

Çalışmamızdaki kan kalsiyumun değer aralığının (5,3-8,9 mg/dL) klinik yönden tolerans değerlerinin çok üstünde veya çok altında olmaması (5,3-13 mg/dL) kalsiyumda meydana gelen çok az değişikliğin bile immunoreaktiviteyi etkileyebileceğini gösterdi.

Sonuç olarak, uzun süreli ve yüksek doz ketamin kullanımının testis intersitisyel dokularında, sperm yoğunluğunda ve germ hücre miktarlarında azalma, tubul yapılarında dejenerasyon, sertoli ve germ hücrelerinde vakuolizasyon, intersitisyel alan içinde hiyalinizasyon gibi histopatolojik ve immunohistokimyasal değişiklikler yapabildiği, ilacın uzun süreli ve kronik infüzyon kullanımının erkeklerde fertilitate bozukluklarına sebep olabileceği kanaatine varıldı.

## KAYNAKLAR

- Arras M., Autenried P., Rettich A., Spaeni D., Rüllicke T., 2001. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp. Med.*, 51, 443-56.
- Bannai H., Levi S., Schweizer C., Inoue T., Launey T., Racine V., Sibarita JB, Mikoshiba K., Triller A., 2009. Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics. *Neuron*, 62, 670-682.
- Beal MW., Brown DC., Shofer FS., 2000. The effects of perioperative hypothermia and the duration of anesthesia on postoperative wound infection rate in clean wounds: a retrospective study. *Vet. Surg.*, 29, 123-127.
- Berridge MJ., Bootman MD., Lipp P., 1998. Calcium--a life and death signal. *Nature*. 395, 645-648.
- Caneguim BH., Cerri PS., Spolidório LC., Miraglia SM., Sasso-Cerri E., 2009. Structural alterations in the seminiferous tubules of rats treated with immunosuppressor tacrolimus. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 25, 7-19.
- Chen JT., Chen RM., 2010. Mechanisms of ketamine-involved regulation of cytochrome P450 gene expression. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 6, 273-281.
- Craven R., 2007. Ketamine. *Anaesthesia*, 62, 48-53.
- Dahan A., Olofsen E., Sigtermans M., Noppers I., Niesters M., Aarts L., Bauer M., Sarton E., 2011. Population pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of ketamine-induced pain relief of chronic pain. *Eur. J. Pain.*, 15, 258-267.
- De Cesaris P, Filippini A, Cervelli C, Riccioli A, Muci S, Starace G, Stefanini M, Ziparo E., 1992. Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured in vitro: biological effects on lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186, 1639-1646.
- Farber JL., 1981. The role of calcium in cell death. *Life Sci.*, 29, 1289-1295.
- Goldberg ME., Domskey R., Scaringe D., Hirsh R., Dotson J., Sharaf I., Torjman MC., Schwartzman RJ., 2005. Multi-day low dose ketamine infusion for the treatment of complex regional pain syndrome. *Pain Physician*, 8, 175-179.
- Heys SD., Norton AC., Dundas CR., Eremin O., Ferguson K., Garlick PJ., 1989. Anaesthetic agents and their effect on tissue protein synthesis in the rat. *Clin. Sci. (Lond.)*, 77, 651-655.
- Huang R-Q., and Dillon GH., 1998. Maintenance of recombinant type A g-aminobutyric acid receptor function: role of protein tyrosine phosphorylation and calcineurin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 286, 243-255,

- Johnsen SG., 1970. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1, 2-25.
- Johnson-Delaney C., 1996. *Exotic Animal Companion Medicine Handbook for Veterinarians*, Lake Worth, FL: Zoological Education Network.
- Krupitsky EM., Grinenko AY., 1997. Ketamine psychedelic therapy (KPT): a review of the results of ten years of research. *J. Psychoactive Drugs*, 29, 165-183.
- Krystal JH., Madonick S., Perry E., Gueorguieva R., Brush L., Wray Y., Belger A., D'Souza DC., 2006. Potentiation of low dose ketamine effects by naltrexone: potential implications for the pharmacotherapy of alcoholism. *Neuropsychopharmacology*, 31, 1793-1800.
- Li M., Kondo T., Zhao QL., Li FJ., Tanabe K., Arai Y., Zhou ZC., Kasuya M., 2000. Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through  $Ca^{2+}$ -calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways. *J. Biol. Chem.*, 275, 39702-39709.
- Loh C., Carew JA., Kim J., Hogan PG., Rao A., 1996. T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. *Mol. Cell Biol.*, 16, 3945-3954.
- Loh C., Shaw KT., Carew J., Viola JP., Luo C., Perrino BA., Rao A., 1996. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J. Biol. Chem.*, 271, 10884-10891.
- McConkey DJ., Orrenius S., 1997. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 357-366.
- McKinsey TA., Zhang CL., Olson EN., 2002. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem. Sci.*, 27, 40-7.
- Melis MR., Argiolas A., 1995. Dopamine and sexual behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* Spring, 19, 19-38.
- Miyamoto K., Matsui H., Tomizawa K., Kuwata Y., Itano T., Tokuda M., and Hatase O., 1994. In situ localization of rat testis-specific calcineurin B subunit isoform b1 in the developing rat testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203, 1275-1283.
- Moia LJ., Matsui H., de Barros GA., Tomizawa K., Miyamoto K., Kuwata Y., Tokuda M., Itano T., Hatase O., 1994. Immunosuppressants and calcineurin inhibitors, cyclosporin A and FK506, reversibly inhibit epileptogenesis in amygdaloid kindled rat. *Brain Res.*, 648, 337-341.
- Moriya M., Fujinaga K., Yazawa M., and Katagiri C., 1995. Immunohistochemical localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin, in the mouse testis: its unique accumulation in spermatid nuclei. *Cell Tissue Res.*, 281, 273-281.
- Mulero MC., Aubareda A., Orzaez M., Messeguer J., Serrano-Candelas E., Martinez-Hoyer S., Messeguer A., Perez-Payá E., Pérez-Riba M., 2009. Inhibiting the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T cells) signaling pathway with a regulator of calcineurin-derived peptide without affecting general calcineurin phosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, 284, 9394-9401.
- Nishio H., Matsui K., Tsuji H., Tamura A., Suzuki K., 2000. Immunolocalization of calcineurin and FKBP12, the FK506-binding protein, in Hassall's corpuscles of human thymus and epidermis. *Histochem. Cell Biol.*, 114, 9-14.
- Reich DL., Silvay G., 1989. Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Can. J. Anaesth.*, 36, 186-197.
- Ritta MN., Calamera JC., Bas DE., 1998. Occurrence of GABA and GABA receptors in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 4, 769-773.
- Rusnak F., Mertz P., 2000. Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.*, 80, 1483-1521.
- Salo M., 1992. Effects of anaesthesia and surgery on the immune response. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 36, 201-220.
- Shibasaki F., Hallin U., Uchino H., 2002. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J. Biochem.*, 131, 1-15.
- Smith KM., Larive LL., Romanelli F., 2002. Club drugs: methylenedioxymethamphetamine, flunitrazepam, ketamine hydrochloride, and gammahydroxybutyrate. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 59, 1067-1076.

- Sorensen AG., Barnung S., Rasmussen LS., 2011. Ketamine is used and abused in new ways. *Ugeskr Laeger*. 173, 2123-2126.
- Su Q., Zhao M., Weber E., Eugster HP., Ryffel B., 1995. Distribution and activity of calcineurin in rat tissues, Evidence for post-transcriptional regulation of testis-specific calcineurin. *B. Eur. J. Biochem.*, 230, 469-474.
- Sugiura R., Sio SO., Shuntoh H., Kuno T., 2002. Calcineurin phosphatase in signal transduction: lessons from fission yeast. *Genes Cells.*, 7, 619-627.
- Sugiura R., 2002. Functional analysis of calcineurin-mediated signalling pathway using fission yeast as a model system. *Nihon Yakurigaku Zasshi.*, 119, 155-161.
- Takadera T., Ishida A., Ohyashiki T., 2006. Ketamine-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 210, 100-107.
- Tash JS., Krinks M., Patel J., Means RL., Klee CB., and Means AR., 1988. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J. Cell Biol.*, 106, 1625-1633.
- White JM., Ryan CF., 1996. Pharmacological properties of ketamine. *Drug Alc. Review*, 15, 145-155.
- Wilson RD., Priano LL., Traber D., et al., 1971. An investigation of possible immunosuppression from ketamine and 100% oxygen in normal human children. *Anesth & Analg.*, 50, 464-470.
- Yamashita M., Katsumata M., Iwashima M., Kimura M., Shimizu C., Kamata T., Shin T., Seki N., Suzuki S., Taniguchi M., Nakayama T., 2000. T cell receptor-induced calcineurin activation regulates T helper type 2 cell development by modifying the interleukin 4 receptor signaling complex. *J. Exp. Med.*, 191, 1869-1879.