



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GENİSTEİN VE VİTAMİN E'NİN TM3 LEYDİĞ
HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

Simge KARA

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

Danışman

Prof. Dr. Melike ERKAN

Aralık, 2009

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GENİSTEİN VE VİTAMİN E'NİN TM3 LEYDİĞ
HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

Simge KARA

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

Danışman

Prof. Dr. Melike ERKAN

Aralık, 2009

İSTANBUL

Bu çalışma 28/12/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Melike ERKAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Tülay İREZ
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Tuncay ORTA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Yard. Doç. Dr. Meliha İNCELİ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin T-2859 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, bir fitoöstrojen olan genisteinin ve vitamin E'nin TM3 Leydig hücreleri üzerine yapmış olduğu etkilerin açığa çıkarılması amacıyla yapılmıştır.

Tüm lisansüstü eğitimim boyunca yetişmemde emeği geçen, hem engin bilgi ve tecrübeleriyle hem de sonsuz manevi desteğiyle her zaman yanımda olan ve yol gösteren çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Melike ERKAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında her zaman yanımda ve destek olan, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, dostluğunu ve güler yüzünü esirgemeyen çok sevgili arkadaşım Araş. Gör. Yasemin TUNALI-AYUN'a, zor zamanlarda manevi desteğiyle her zaman yanımda olan ve bütün engellerin aşılabileceği konusunda bana iyi bir örnek olan çok sevgili arkadaşım, ablam Biyolog Mediha ÖZEREN-ESER'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın istatistik değerlendirmelerinde yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Günay CAN'a, "Genisteinin" temininden dolayı Mikro-Gen İlaç San. A.Ş.'ye ve Zafer AYTİŞ'a teşekkürü bir borç bilirim. Tezimin tamamlanması sürecinde, her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen çok sevgili arkadaşlarım, Araş. Gör. Ebru GÜREL, Uzm. Biyolog Serap EKİNCİ ve Biyolog Çağdaş ÜNİŞ teşekkür ederim.

Birlikte pek çok güzellikler paylaştığımız, en dar zamanlarımda yanımda olan, manevi olarak her zaman destek olan sevgili arkadaşım Biyolog Hilal GÜRLER'e, yine tez çalışmam sırasında manevi destekleriyle yanımda olan arkadaşlarım Su Ürünleri Mühendisi Mehmet Resul AYUN'a ve Matematik Mühendisi Mehmet ERTEKİN'e çok teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca olduğu gibi lisansüstü eğitimim boyunca da sonsuz teşvik ve emekleriyle bugüne gelmemi sağlayan, maddi, manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, canım ANNEM'e, BABAM'a ve kardeşim BERKER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	İ
İÇİNDEKİLER	İİ
ŞEKİL LİSTESİ.....	İV
TABLO LİSTESİ	VI
SEMBOL LİSTESİ	VII
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2. 1. TESTİSİN GENEL YAPISI	3
2. 2. LEYDİĞ HÜCRESİ	4
2. 3. GENİSTEİN	7
2. 4. OKSİDATİF HASAR.....	11
2. 5. VİTAMİN E	13
2. 6. APOPTOZ.....	15
2.6.1.Apoptozun düzenlenmesi.....	15
2.6.2. Apoptozun gösterilmesi	17
3. MALZEME VE YÖNTEM	19
3. 1.KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	19
3. 2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ	19
3. 3. GENİSTEİN VE VİTAMİN E KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI	20
3. 4. ÇOĞALMA HIZI	22
3.4.1. Hemositometre Yöntemi.....	22
3.5. APOPTOZ.....	22
3.6. OKSİDATİF HASAR.....	23

3.6.1. Membran Lipit Peroksidasyonun Tayini.....	23
3.6.2. Proteinlerdeki Oksidatif Hasarın Tespiti	24
3. 3. İSTATİSTİK ANALİZ.....	25
4. BULGULAR	26
4.1.ÇOĞALMA HIZI	26
4.1.1.Hemositometrik yöntem	26
4.2. APOPTOZ	35
4.3. OKSİDATİF HASAR.....	42
4.3.1. Lipit Peroksidasyonu	42
4.3.2. Proteinlerdeki oksidatif hasar.....	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
6.KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ.....	69

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.2.1. Leydig hücrelerinde steroidogenez.....	6
Şekil 2.3.1. Fitoöstrojenlerin sınıflandırılması (Gültekin,2004).....	7
Şekil 2.3.2. Genistein ve östrodiol'ün moleküler yapısı (Nevala, 2001).....	8
Şekil 2.4.1. Serbest radikallerin oluşum mekanizması	11
Şekil 2.4.2. Serbest radikallerin hücrelerde yarattığı etkiler.....	12
Şekil 2.5.1. Vitamin E'nin moleküler yapısı.....	13
Şekil 2.6.1.1. Apoptotik düzenlenmenin intrinsik ve ekstrinsik yolları (Holcik ve Sonenberg, 2005).	15
Şekil 2.6.1.2. Apoptozun mitokondriyal yolu (Holcik ve Sonenberg, 2005).	17
Şekil 4.1.1.1. TM3 hücrelerinde 24 ve 48 saatin sonunda kontrol ve genisteinin tek başına ve vitamin E ile birlikte uygulandığı deney gruplarında toplam hücre sayısı.	28
Şekil 4.1.1.2. 24 saat süre sonunda kontrol ve genistein uygulanmış deney gruplarında, hücre canlılığındaki değişim	29
Şekil 4.1.1.3. 24 saat süre sonunda kontrol ve genistein ile birlikte vitamin E uygulanmış deney gruplarında, hücre canlılığındaki değişim	30
Şekil 4.1.1.4. 48 saat süre sonunda kontrol ve genistein uygulanmış deney gruplarında, hücre canlılığındaki değişim.....	31
Şekil 4.1.1.5. 48 saat süre sonunda kontrol ve genistein ile birlikte vitamin E uygulanmış deney gruplarında, hücre canlılığındaki değişim	32
Şekil 4.1.1.6. Genistein ve Vitamin E uygulanmış kontrol ve deney gruplarındaki % canlılık oranı (* p<0.01).	34
Şekil 4.2.1. Kontrol ve deney gruplarında 24 ve 48 saat için apoptotik indeks değerleri (*p<0.01).....	37
Şekil. 4.2.2. 24 saatin sonunda kontrol ve tek başına genistein verilen deney gruplarında görülen apoptotik hücreler (→).....	38
Şekil. 4.2.3. 24 saatin sonunda kontrol ve vitamin E ile birlikte genistein verilen deney gruplarında görülen apoptotik hücreler (→).....	39

Şekil. 4.2.4. 48 saatin sonunda kontrol ve tek başına genistein verilen deney gruplarında görülen apoptotik hücreler (→)	40
Şekil. 4.2.5. 48 saatin sonunda kontrol ve vitamin E ile birlikte genistein verilen deney gruplarında görülen apoptotik hücreler (→).....	41
Şekil 4.3.1.1. Genistein ve Vitamin E uygulanmış kontrol ve deney gruplarında ml'deki TBARS değerleri (* p<0.01).	44
Şekil 4.3.2.1. Kontrol ve Genistein ve Vitamin E uygulanmış deney gruplarında tiol gruplarının (-SH) miktarı	46

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.3.1. Fitoöstrojenler ve östrodiolün ortak özellikleri.....	8
Tablo 3.3.1. Kontrol, Genistein ve Vitamin E uygulanan deney grupları.....	21
Tablo 4.1.1.1. Kontrol ve Deney Gruplarında Toplam Hücre Sayısı.....	27
Tablo 4.1.1.2. TM3 Leydig hücrelerinde kontrol ve deney gruplarının 24 ve 48 saat sürenin sonunda % canlılık oranı	34
Tablo 4.2.1. TM3 Leydig hücrelerinde 24 ve 48 saat süre sonunda belirlenen apoptoz indeksi değerleri.	36
Tablo.4.3.1.1. 24 ve 48 saat süreyle genistein ve Vitamin E uygulanmış TM3 Leydig hücrelerinde TBARS değerleri (nmol/ml).....	43
Tablo.4.3.2.1. 24 ve 48 saat süreyle Genistein ve Vitamin E uygulanmış TM3 Leydig hücrelerinde tiol gruplarının miktarı (-SH) nmol/ml.....	45

SEMBOL LİSTESİ

5α-DHT	: 5 α - dihidrotestosteron
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
ATCC	: American Type Cell Collection
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bcl-2	: Lenfoma-lösemi 2 genli B hücresi
DAB	: Diaminobenzidin
DER	: Düz yüzlü Endoplazmik Retikulum
ERα	: Östrojen reseptör α
ERβ	: Östrojen reseptör β
HSD	: Hidroksisteroid dehidrogenaz
LH	: Luteinizan hormon
MAP	: Mitojen aktive eden protein
NF-κB	: Nüklear faktör kapa beta
P₄₅₀arom	: Aromataz enzimi
P450scc	: P450 yan zincir kıran enzim sistemi
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PKA	: Protein Kinaz A
PTK	: Protein tirozin kinaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SHBG	: Seks hormonu bağlayıcı globulin
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif türleri
TdT	: Terminal deoksinukleotidil transferaz
TUNEL	: <i>in situ</i> DNA uç işaretlemesi

ÖZET

GENİSTEİN VE VİTAMİN E’NİN LEYDİĞ TM3 HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

Bu çalışmada genisteinin TM3 Leydig hücreleri üzerindeki sitotoksitesinin ve bir antioksidan olan Vitamin E’nin bu hasardan hücreyi koruyucu etkisinin toplam hücre sayısı, hücre canlılığı, hücrelerdeki apoptotik indeks, lipid peroksidasyonu ve proteinlerdeki oksidatif hasar belirlenerek araştırılması amaçlanmıştır. Özellikle fast-food yiyecekler ve diğer işlenmiş gıdalarda düşük maliyet nedeniyle et ürünleri yerine fitoöstrojenleri içeren soya ürünlerinin kullanılması yaygındır. Fitoöstrojenler endojen östrojene benzer aktiviteler gösterebilen bitkisel kaynaklı kimyasallardır ve son yıllarda yapılan bazı epidemiyolojik çalışmalarla önem kazanmıştır. Endojen östrojen varlığında dışarıdan ilaç olarak ya da diyetle alınan fitoöstrojenler doza bağlı olarak infertiliteye neden olabilmektedir. Genistein soya ve soya ürünlerinde bulunan steroid olmayan bir fitoöstrojendir ve özellikle östrojen reseptör β (ER- β)’ya bağlanarak hem östrojenik hem de anti-östrojenik etki gösterebilir. Yapılan çalışmalarda, genisteinin timosit, lösemi ve testis hücrelerinde apoptozu teşvik ettiği ve oksidatif hasara yol açtığından toksik etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, vitamin E’nin önemli bir antioksidan olması ve hücreyi oksidatif hasardan koruması nedeniyle, insan ve hayvanların beslenmesinde ek besin olarak önemi bilinmektedir. Yaptığımız çalışmada vitamin E’nin genisteinle beraber bir antioksidan olarak etkisi gösterilmiştir.

Çalışmamızda, genisteinin tek başına ve vitamin E ile birlikte TM3 Leydig hücreleri üzerine olan etkisi araştırılarak, yüksek dozlarda apoptoza ve lipid peroksidasyonuna neden olduğu; vitamin E ile birlikte uygulamalar sonucunda ise vitamin E’nin bu toksisiteyi azalttığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmanın genisteinin Leydig hücrelerindeki çok fonksiyonlu etkisinin moleküler düzeyde yapılacak çalışmalara temel olabileceği düşünülmektedir.

SUMMARY

EFFECTS OF GENISTEIN AND VITAMINE E ON TM3 LEYDIG CELLS

In this study, Genistein-induced cytotoxicity and the protective effect of Vitamine E which is an antioxidant supplementation from this damage on TM3 Leydig cells were purposed to research by determination of total cell number, cell viability, proportion of apoptosis, oxidative damage of protein and TBA reactive species. Soya and soybean product is used instead of meat products because of low cost price, especially in fast-food and other processed foods. In the past few years, phytoestrgens are being important with several epidemiological studies. In presence of endogen estrogen, phytoestrogens that take as a medicine or diet may cause infertility depend on dosage. Genistein especially binds to estrogen receptor β (ER- β), acting as estrogen agonist or antagonist. Phytoestrogens which act as an endogen estrogen are phytochemical. Genistein has also been demonstrated to induce apoptosis in cells as thymocytes, leukemia cells and testis cells and it is toxic and causes oxidative damage.

Antioxidant are spent up enough portion for being obviate oxidative stress which create free radicals and being decrease their effects to minimum. Vitamine E a dietary factor is essential for reproduction in humans and animals. It is an antioxidant in all mammalian cells. Vitamine E is a chain breaking antioxidant that prevents the propagation of free radical reaction and thus protects cells from oxidative damage.

In our study, by the research of the effect of the Genistein and Genistein with Vitamine E on TM3 Leydig cells, it were come to the conclusion that genistein in higher doses cause apoptosis and lipid peroxidation; by reason of with Vitamine E application Vitamine E decrease this toxicity. This study is thought to be a base for molecular studies which are concern with the multifunctional effect of genistein on Leydig cells.

1. GİRİŞ

Soya, kolesterol ve doymuş yağlar içermeyen yapısı, yüksek kaliteli protein içeriği ile çok yönlü olarak yararlanılabilen bitkisel bir gıda maddesidir. Soya ürünleri beslenme ve sağlık açısından son derece önemlidir ve alternatifsiz bir üründür. Çünkü bütün canlılar, hem gelişmeyi sürdürme, hem de sağlıklı dokuların bakımını ve sürekliliğini sağlamak için proteine ihtiyaç duyar. Diğer protein kaynaklarına göre soya listenin başında yer alır (Forumfood). Genistein soya ve soya ürünlerinde bulunan doğal fitoöstrojenlerden bir izoflavondur (Rucinska ve ark., 2008, Opalka ve ark., 2004).

Genistein, östradiol ile yarışarak östrojen reseptörlerine özellikle de son zamanlarda tanımlanan östrojen reseptör β (ER- β)'ya bağlanırlar ve hem östrojenik hem de anti-östrojenik etki gösterebilirler (Dixon ve Ferreira, 2002). Genistein G2/M fazında hücre siklusunun gelişimini durdurur ve timosit, lösemi ve testis hücrelerinde apoptozu indükler (Kumi-Diaka ve ark., 1998.) Genisteinin apoptotik aktivitesi, diagnostik patolojide ve embriyogenezde fazlasıyla önemli bir alanda saptanan apoptoz yolu ile hücre ölümünden itibaren önem kazanmıştır. Bu nedenden dolayı genisteinin kimyasal bir koruyucu ve teröpotik potansiyelinin incelenmesi klinik önem taşır (Kumi-Diaka ve ark., 1999.)

DNA'daki oksidatif hasar yaşam ile bağdaşmayan yüksek düzeylere ulaştığında apoptoz gerçekleşmektedir (Burçak and Andican, 2004.) Serbest radikallerin yarattığı oksidatif stresin önlenmesi ve etkisinin en aza indirilmesi için yeterli miktarda antioksidan tüketilmelidir (Coşkun, 2005). Vitamin E insan ve hayvanların çoğalması için gerekli bir diyet faktörü ve tüm memeliler için bir antioksidandır (Murugesan ve ark.,2007.) *İn vivo* ve *in vitro* çalışmalar göstermiştir ki serbest radikal reaksiyonlarının oluşmasını önleyen bir zincir kıran antioksidan olan Vitamin E Leydig hücrelerinde oksidant indükleyen lipid peroksidasyonunu önleyerek hücreyi oksidatif hasardan korumaktadır ve hücrelerin testosteron üretme yeteneği üzerine anlamlı koruyucu etkisi vardır (Murugesan ve ark., 2007, Murugesan ve ark., 2008.)

Bu çalışmada, genistein ve vitamin E'nin TM3 Leydig hücreleri üzerine etkisi incelenmiştir. Tezin "Genel Kısımlar" bölümünde Leydig hücreleri, Genistein ve Vitamin E ayrıntılı olarak anlatılmış, incelenecek etkiler olan apoptoz ve oksidatif hasar tanımlanmıştır

Tezin "Malzeme ve Yöntem" bölümünde laboratuvarında uygulanan işlemler ayrıntılı şekilde anlatılmıştır. Yapılan bu işlemler sonucunda elde edilen veriler tezin "Bulgular" bölümünde belirtilmiştir.

Tezin "Tartışma ve Sonuç" bölümünde ise, elde edilen veriler değerlendirilmiş ve bu veriler mevcut literatür bilgisi ile yorumlanarak sonuca varılmıştır.

Bu çalışma, ülkemizde de çok fazla miktarda tüketilen soya ve soya ürünlerinde bulunan genisteinin TM3 Leydig hücreleri üzerindeki sitotoksitesinin ve bir antioksidan olan vitamin E'nin bu hasardan hücreyi koruyucu etkisi, toplam hücre sayısı, hücre canlılığı ve hücrelerdeki apoptotik indeksin belirlenmesi ve proteinlerdeki oksidatif hasar ile beraber lipid peroksidasyonun saptanarak açığa çıkarılması amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2. 1. TESTİSİN GENEL YAPISI

Memelilerde esas eşey organları olan testisler, seminifer tübüller ve interstisiyal alandan oluşmaktadır. Seminifer tübüller, sperm üretimi ve spermlerin boşaltıcı kanallara taşınmasından sorumluyken; interstisiyal alanda bulunan Leydig hücresi, üreme hormonlarının çoğunun üretiminden sorumludur. Ergin erkeklerde Leydig hücrelerinden salınan bu hormonlar spermatogenez, steriodogenez ve normal üreme fonksiyonlarının sürdürülebilmesini sağlar (Abrahamsohn, 2005).

Seminifer tübüller, spermatogenik siklusun farklı evrelerinde bulunan farklılaşmış germ hücreleriyle Sertoli hücrelerini içerir ve kan damarları yoktur. Sertoli hücreleri birbirleriyle ve peritubuler miyoid hücrelerle, sıkı bağlantılar sayesinde kan-testis bariyerini oluştururlar (Denef, 1998; Jegou, 1992). Primordiyal germ hücreleri, spermatogenez evrelerini geçirirken aynı zamanda kan-testis bariyerini aşarak seminifer tübül lümenine doğru ilerlerler (Limoges, 1998).

Seminifer tübüllerin arasındaki boşluklarda interstisiyal doku bulunur. Bu doku; Leydig hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, miyoid hücreler, lenfositler ve plazma hücrelerini içerir. İnterstisiyal alanda aynı zamanda testiküler parankima sınırları, kan ve lenf damarları da bulunur. Leydig hücreleri, testiküler androjenlerin çoğunu özellikle de testosteronun üretimi ve salınımından sorumludur. Bu hormonların salınması, ergin erkeklerde sperm üretimi (spermatogenez) ve ikincil eşey karakterinin düzenlenerek sürdürülmesi için önemlidir (Limoges, 1998).

Testiste hücrelerarası iletişim, komşu hücrelerin ya ekstraselüler alana saldıkları parakrin faktörlerle ya da hücrelerarası bağlantılar yoluyla olduğu bilinmektedir (Perez Armendariz ve ark., 1994; Saez, 1994; Varanda ve Carvalho, 1994; Pelluso ve ark.,

1996). Hücrelerarası iletişim; steroidogenez, spermatogenez ve sperm maturasyonu için önemli bir ön koşuldur (Miller ve ark. 1983; Saez, 1994).

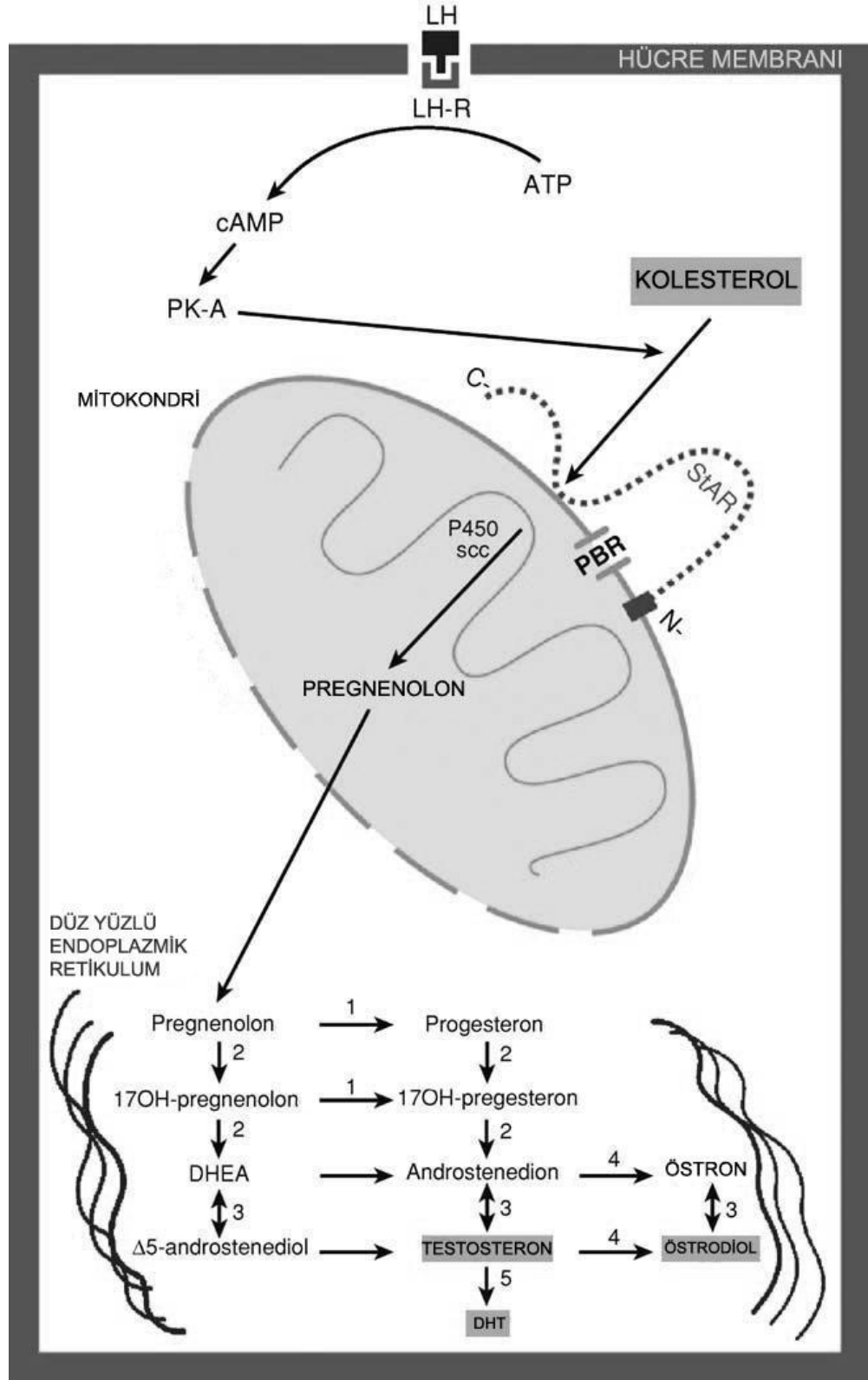
2. 2. LEYDİĞ HÜCRESİ

Leydig hücresi diğer bir adıyla interstisiyal hücre ilk defa Franz Leydig tarafından 1850 yılında tanımlanmıştır. Keşfedildikten yaklaşık 50 yıl sonrasına kadar fonksiyonu bilinmemesine rağmen, Bouin ve Ancel tarafından 1903 yılında erkeğe özgü özellikleri veren faktörlerin Leydig hücresinden kökenlendiği, ayrıca sperm üretimi ve sekonder eşey karakterlerinin oluşumunu teşvik ettiği önerilmiştir (Bremmer 1981; Christensen, 2007).

1935 yılında Leydig hücresinin bir hormonu olan testosteron izole edilmiştir. 1960'ların sonu ve 1970'lerin başında, hipotalamus-hipofiz-testis eksenindeki başlıca hormonal etkileşimler ve Leydig hücrelerinde steroidlerin temel biyosentez ve metabolik yolları açığa çıkarılmıştır (Saez, 1994).

Testiste androjen üretiminin büyük kısmı Leydig hücrelerinde yapılmaktadır. Testiste en çok salınan androjen testosterondur (Hall, 1994). Testosteron, Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında bulunan lipit damlacıklarındaki kolesterolden sentezlenir ve bu olaya steroidogenez denir. Leydig hücrelerinde steroidogenez; Luteinizan hormonun (LH) reseptörüne bağlanarak, adenosin trifosfat (ATP)'tan cAMP sentezini uyarması ile başlar. Kolesterolün, sitoplazmadan mitokondriye taşınmasında gerekli olan Protein Kinaz A (PKA)'yı cAMP aktifleştirir (Haider, 2004). Kolesterolün mitokondirinin dış zarından iç zarında, P450scc enzim sisteminin bulunduğu yere taşınmasında iki taşıyıcı protein vardır: 1- StAR, 2- Periferel-Tip Benzodiazepine Reseptör (PBR) (Stocco, 1996). P450scc kolesterolü pregnenolona çevirir ve pregnenolon hemen testosteronun sentezinin meydana geleceği düz yüzlü endoplazmik retikuluma (DER) taşınır. DER pregnenolonun testosterona çevrilmesinde gerekli olan birçok hidrosisteroid dehidrogenaz (HSD) enzimlerini içerir (Haider, 2004). HSD, Leydig hücrelerinde steroidogenez için gerekli olan enzimlerdendir (Habert, 2001) ve özellikle 3 β -hidrosisteroid dehidrogenaz, testosteron üretiminde gerekli olan anahtar enzimdir (Haider ve ark., 1986) (Şekil 2.2.1).

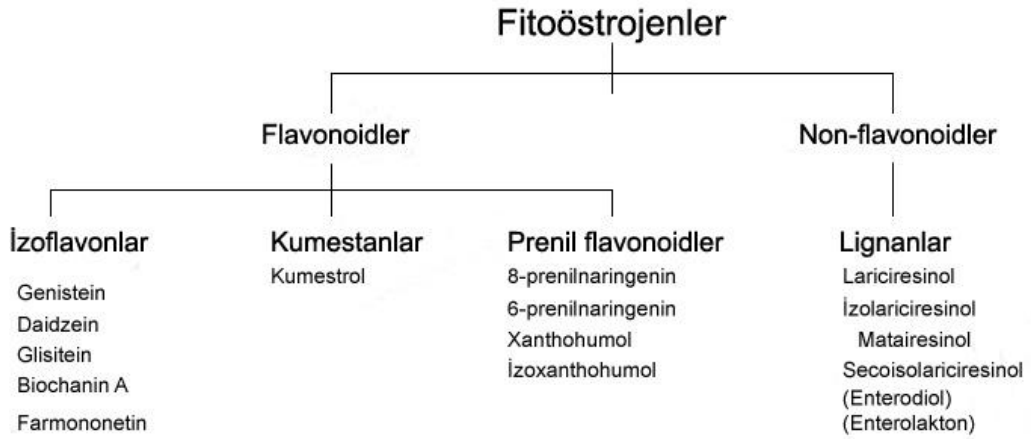
Testisten salınan diğer iki androjen; androstenedion ve dihidroepiandrosteron olup bu iki hormon testosteron ile karşılaştırıldığında daha az derecede androjeniteye sahiptir. Androjenlerin üretiminin dışında Leydig hücreleri testosteronu, 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) ve dişi eşey hormonu olan östradiole çevirebilir (Hall, 1994). Androjenlerin östradiole geri dönüşümü olmaksızın çevrilmesinde sitokrom P450 aromataz (P450arom) enzimi sorumludur (Carreau ve ark., 1999) ve bu enzim omurgalılarda steroidogenik hücrelerin endoplazmik retikulumlarında bulunur (Haider, 2004). Leydig hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde, östrojenlerin rolleri olduğunu gösteren bir çok çalışma vardır (Hess ve Carnes, 2004; Majdic ve ark., 1997; Ciocca ve ark., 1986; Delbes ve ark., 2005; Rochira ve ark., 2005; Carreau ve ark., 2006). Östrojenler erkek üreme sisteminde, ergenliğe kadar Leydig ve Sertoli hücrelerinin fonksiyonlarını düzenlerken (Majdic ve ark., 1997), fetal Leydig hücrelerinin gelişmelerini inhibe eder (Delbes ve ark., 2005) ve östrojen ile ilgili proteinler Leydig hücrelerinde steroidogenezi negatif olarak kontrol eder (Ciocca ve ark., 1986).



Şekil 2.2.1. Leydig hücrelerinde steroidogenez. LH, Luteinizan Hormon; LH-R, Luteinizan Hormon reseptörü; PK-A, Protein kinaz A; P450_{scc}, P450 yan zincir kıran enzim sistemi; DHEA, Dehidroepiandrosteron; DHT, Dihidrotestosteron. Reaksiyon 1, 3β-HSD; Reaksiyon 2, sitokrom P450 17α hidroksilaz; Reaksiyon 3, 17β-HSD; Reaksiyon 4, sitokrom P450 aromataz; Reaksiyon 5, 5α-redüktaz

2. 3. GENİSTEİN

Fitoöstrojenler, endojen östrojene benzer bitkisel kaynaklı maddeler olup, en fazla soya ürünlerinde olmak üzere meyvelerde, sebzelerde ve baklagillerde bulunmaktadır (Clevenger, 1964; Naim ve ark., 1974). Fitoöstrojenler, flavonoidler ve non-flavonoidler olarak ikiye ayrılır. Flavonoidleri, izoflavonlar, kumestanlar ve prenil flavonoidler oluştururken, non-flavonoidleri lignanlar oluşturur (Şekil 2. 3. 1) (Gültekin, 2004).



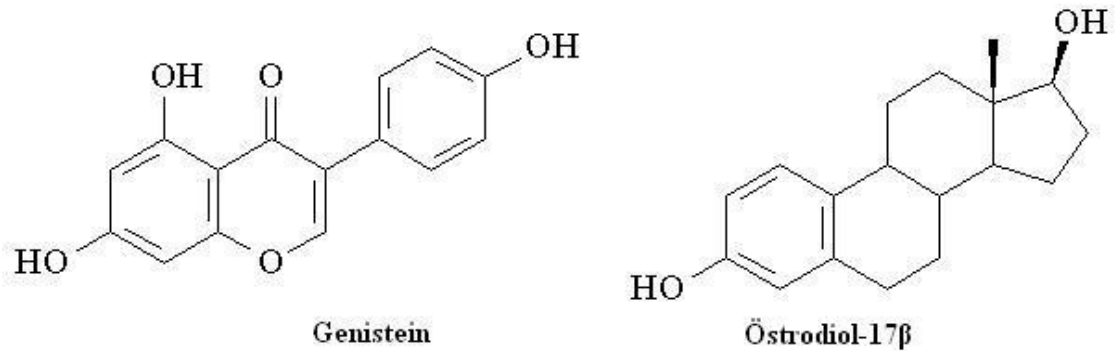
Şekil 2.3.1. Fitoöstrojenlerin sınıflandırılması (Gültekin, 2004).

Fitoöstrojenler, östrodiol (17β -östrodiol) hormonuna moleküler yapı bakımından benzediğinden östrodiolle reseptör düzeyinde yarışır ve östrodiolle göre birkaç kat daha düşük afinite ile bağlanır (Setchell ve Cassidy, 1999; Benassayag ve ark., 2002; Dixon ve Ferreire, 2002; Maskarinec, 2003; Gültekin, 2004). Fitoöstrojenlerin östrodiolle ortak özellikleri tablo 2.3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.3.1. Fitoöstrojenler ve östrodiolün ortak özellikleri.

- ❖ Östrojen reseptörlerine (ERs) bağlanmak için gerekli fenolik halkanın varlığı
- ❖ Reseptöre bağlanmada, östrojen halkasını taklit eden izoflavon halkasının rolü
- ❖ Östradiole benzer olarak düşük moleküler ağırlıkları ($C_{18}H_{24}O_2$) (MA=272)
- ❖ İzoflavonların nukleusunda iki aromatik hidroksil grubu arasındaki uzaklık östrodiolün iki hidroksil grubu arasındaki uzaklığa neredeyse özdeştir
- ❖ 4',5 ve 7 pozisyonlarında hidroksil gruplarının hidroksilasyonlarının ideal modeli, (örneğin genistein)

İzoflavonlar, hücreler üzerinde çok çeşitli etki göstermeleri nedeniyle üzerinde en çok çalışılan fitoöstrojen grubudur. Genistein, steroid olmayan ve en güçlü östrojenik aktiviteyi gösteren izoflavondur (Şekil 2.3.2) (Opalka ve ark., 2004; Cassidy ve Faughnan., 2000). Doğada glikozid halde bulunan genistein oral yolla alımından sonra, kalın bağırsaktaki bakteriler tarafından hidrolize edilir ve aglikon hale dönüşerek absorbe olur. Glukorine edilen bu aglikonlar karaciğerde sülfatlandıktan sonra enterohepatik dolaşıma katılırlar ve öncelikle idrarla dışarı atılırlar (McClain ve ark., 2006).

**Şekil 2.3.2.** Genistein ve östrodiol'ün moleküler yapısı (Nevala, 2001).

1996 tarihine kadar tek bir tip olarak bilinen östrojen reseptörü, insan ve sıçanlarda ERβ denilen yeni bir alt tipin tanımlanmasıyla günümüzde ERα ve ERβ olarak iki tipe ayrılmıştır. (Kuiper ve ark., 1996). ERα ve ERβ buldukları yerlere göre birbirinden farklıdır. Şöyle ki, ERα Leydig hücresi, rete testis, efferent tübüller, epididimis, vas

deferens ve bulbo-üretal bezde bulunurken, ER β bunlara ilaveten Sertoli hücresi, peritübüler miyoid hücreler, spermatozoidler, prostat ve seminal vesikülde de bulunmaktadır (Sharpe, 1998). 17 β -östrodiol, ER α ve ER β 'ya eşit derecede afinite ile bağlanırken; genistein, hem ER α ve ER β 'ya bağlanır, fakat ER β 'ya bağlanma ER α 'ya göre 20-30 kat daha yüksek afinite ile olmaktadır (Barkhem ve ark., 1998; McClain ve ark., 2006; Klein ve King, 2007).

Genisteinin başlıca etkisi, östrojenik ve antiöstrojenik aktivitesidir (Dixon ve Ferreira, 2002). Genistein östrojenik etkisini, doğrudan östrojen reseptörüne bağlanarak ya da dolaylı olarak 17 β - östrodiolün metabolik yıkımından sorumlu olan sitokrom p450 CYP1A1 enzimini inhibe ederek gösterebilir. (Bouker ve Hilakivi-Clarke, 2000; Okazaki ve ark., 2002; Collins ve ark.,1997). Ayrıca genistein'in *in vitro* çalışmalarda pS2 ve c-fos genleri gibi östrojen bağımlı genleri de aktive ettiği gözlenmiştir (Bouker ve Hilakivi-Clarke, 2000). Genistein antiöstrojenik etkisini de, aromataz enzimini baskılayarak androjenlerin östrojenlere dönüşümünü bloke ederek gösterir. Ayrıca genisteinin, östronu östradiole çeviren 17 β -östradiol oksidoredüktaz enzimini ve östrodiol sekresyonu için gerekli 17 β -hidrosisteroid oksidoredüktaz tip I enzimini baskılayarak da bu etkisini gösterdiği bilinmektedir (Collins ve ark.,1997; Bouker ve Hilakivi-Clarke, 2000; Okazaki ve ark., 2002).

Genisteinin testosteronla ilgili etkileri şu şekilde açıklanmıştır. Öncelikle seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG)'e bağlı haldeki testosteron ve östrojenle yer değiştirerek SHBG'yi etkiler. Böylece östrojenlerin ve testosteronun hedef hücreye girişini azaltır (Dixon, 2004). Ayrıca, hormon metabolizmasında görevli olan 17 β -hidrosisteroid dehidrogenaz ve 5 α -redüktazı da içeren enzimleri inhibe eder ve bu enzimlerin aktivasyonun azalması plazma testosteron seviyesinin ve dihidrotestosteron (DHT) seviyesinin düşmesine neden olur (Allen ve ark., 2001).

Genistein hücre çoğalmasını inhibe ederek, apoptotik hücre ölümünü ve kanser hücre farklılaşmasını indükleyerek, hücre siklusunu düzenleyerek, antioksidan etki göstererek ayrıca tirozin kinaz ve özellikle topoizomeraz II gibi ATP bağımlı enzimlerin inhibisyonunda önemli bir rol oynayarak, hücrelerin östrojen reseptörlerinden bağımsız olarak antikanser ve kimyasal koruyucu olarak gösterdikleri etkiler bakımından dikkate

değer bulunmuştur (Akiyama ve ark., 1987; Bouker ve Hilakivi-Clarke, 2000; McClain ve ark., 2006).

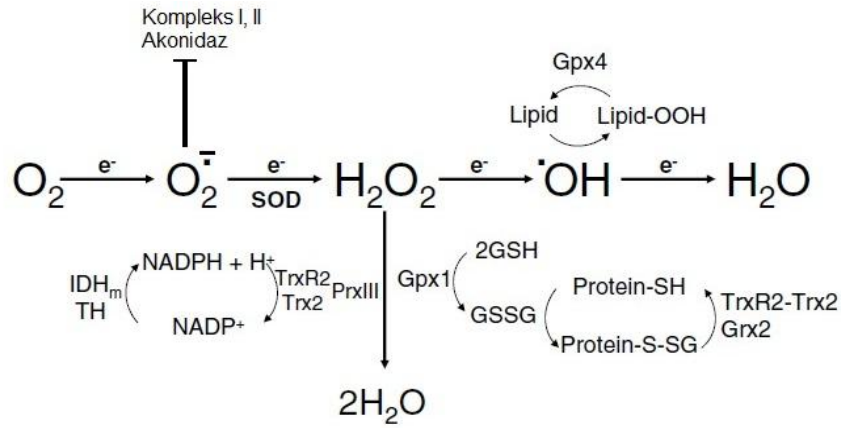
Genistein testiküler hücre soylarında apoptozu, teşvik ederken, G2/M fazında hücre siklusunu durdurarak büyüme ve çoğalmasını inhibe etmektedir. (Kumi-Diaka, 1999; Sarkar ve Li, 2003; Opalka ve ark., 2004). Genisteinin apoptozu teşviki ile ilgili moleküler mekanizmada Bax ve Bcl-2 proteinleri temel rol oynamaktadır. Şöyle ki normal şartlarda hücrede Bax ekspresyonunun artması apoptozu teşvik ederken, Bcl-2 hücreyi apoptozdan korur. Oysa ki, genisteinin 48 saat ve daha uzun süreli uygulamaları sonucunda meme kanseri hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonunu azaltırken, Bax protein ekspresyonu ise önemli derecede artmaktadır (Sarkar ve Li, 2003). Genistein aynı zamanda hücresel canlılık için önemli olan Akt sinyal yolağının güçlü bir inhibitörüdür ve bu etki sayesinde genistein uygulanmış hücrelerin apoptoza gitmesini indüklediği düşünülmektedir (Franke ve ark., 1997; Sarkar ve Li, 2003).

Genistein hücre büyümesini ve farklılaşmasını kontrol eden protein tirozin kinazı (PTK) inhibe etmektedir (Nedeljkoviæ ve ark., 2001; Sarkar ve Li, 2003). PTK inhibisyonuyla, fosfokinaz C ya da fosfotidilinositol kinaza bağlanarak G2 fazında hücre siklusunun durmasına neden olur (Nedeljkoviæ ve ark., 2001; Traganos ve ark., 1992). Genistein, DNA replikasyonunda, transkripsiyonunda ve rekombinasyonunda görev alan DNA topoizomeraz II'yi inhibe ederek büyüme faktörlerinin ya da MAP kinazların downregülasyonu ile apoptoza neden olmaktadır (Nedeljkoviæ ve ark., 2001; Sarkar ve Li, 2003; Traganos ve ark., 1992).

Genistein reaktif oksijen türlerine karşı serbest radikalleri süpürerek ve strese cevap ile ilişkili genlerin ekspresyonunu inhibe ederek antioksidan ve koruyucu etkiye sahiptir (Ruiz-Larrea ve ark., 1997; Zhou ve Lee 1998; Sarkar ve Li, 2002). Oksidatif stres NF-KappaB'nin DNA'ya bağlanmasını aktive eder (Toledano ve Leonard, 1991). Genistein, oksidatif stres tarafından uyarılan NF-κB'nin inhibe edilmesi yoluyla antioksidan etki göstermektedir (Davis ve ark., 2001; Sarkar ve Li, 2002). Bu etki çoğunlukla membran lipitleri ve lipoprotein partiküllerindeki oksidatif hasara karşı etkilidir (Wiseman ve ark., 2002).

2.4. OKSİDATİF HASAR

Dış yörüngesinde en az bir çiftlenmemiş elektron içeren, nötr veya iyonize tüm atom yada moleküllere “serbest radikal” denir. Çok reaktif olan bu radikaller, organizmada karşılaşabilecekleri; lipit, nükleik asit ve aminoasitlerle etkileşirler ve hücrede hasara neden olurlar. Yüksek karbonlu yağ asitleri, radikal reaksiyonlara en fazla girenlerdir (Dökmeci, 2000). Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirlerse, hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye (oksidatif hasara) ‘oksidatif stres’ denir. Zararlı maddeler olan toksinler, vücuda genellikle solunan hava, tüketilen besinler ve su yoluyla alınır. Ayrıca vücuttaki bazı normal metabolik süreçlerin yan ürünü olarak da toksinler oluşabilir (Russell ve ark., 2006) (Şekil 2.4.1).

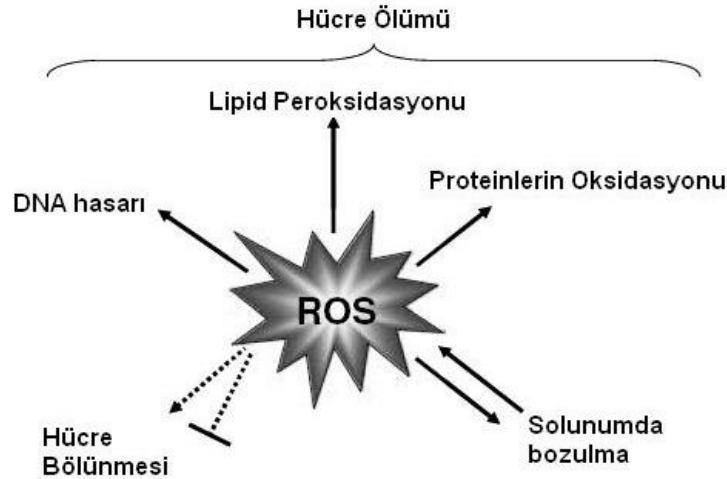


Şekil 2.4.1. Serbest radikallerin oluşum mekanizması

Lipit peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve membranda bulunan yüksek karbonlu doymamış yağ asitlerinin oluşturduğu fosfolipitlerin, serbest oksijen radikalleri aracılığı ile oksitlenip, peroksit türevlerine dönüşmesini içeren ve serbest radikallerin lipitler üzerinde etkilerinin en iyi tanımlandığı kimyasal bir olaydır (Kayaalp, 1998). Superoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerdir. Lipit peroksidasyon reaksiyonları genel olarak iki çeşittir. Non-enzimatik lipit peroksidasyonu, herhangi bir radikalın polianstüre yağ asidindeki metilen karbonundan hidrojen atomunun uzaklaştırılması

reaksiyonlarını kapsar. Enzimatik lipit peroksidasyonunda ise, siklooksijenaz ve lipooksijenaz reaksiyonları sonucunda oluşan hidroperoksid ve endoperoksidler reaksiyon ürünleridir. Membranın lipit/protein oranı, fosfolipit miktarı, yağ asitlerinin bileşimi, yağ asitlerinin doymamışlık derecesi ve membranın akışkanlığı membrandaki lipit peroksidasyonunu etkileyen faktörlerdendir ve bunun sonucunda, membran transport sistemleri bozulur, hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulur, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve buna bağlı olarak proteazlar aktive olur, hücre içi organellerde oluşan lipit peroksidasyonu litik enzimlerin salgılanmasına bağlı hasarlar gelişir (İnan ve Gül, 2002). Aldehit yapılı lipit peroksidasyon ürünleri sistein amino asidinin –SH grupları ile veya lizin, histidin ile kovalent olarak bağlanır. –SH gruplarının kaybı, okside glutatyonun aşırı oluşumu sonucunda, doğrudan doğruya oksidasyon ile veya reaktif bir metabolit ile arilasyon şeklinde meydana gelebilir (de Zwart ve ark., 1999) (Şekil 2.4.2).

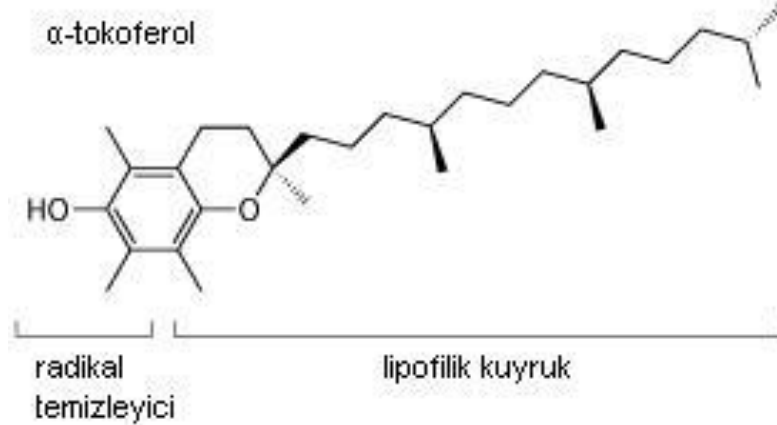
Proteinlerdeki oksidatif hasar ise hücrenin proteinlerinde yapısal değişikliğe yol açar. Bu hasarın başlıca moleküler mekanizmaları, protein karbonil oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiol (P-SH) gruplarının kaybı, nitrotirozin (NT) ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) oluşumu olarak sıralanabilir (Shacter E., 2000a). Reaktif oksijen türleri (ROS) metal katalizli protein oksidasyonuna neden olarak karbonil gruplarının oluşumuna, fragmentasyon veya çapraz bağlanmaya neden olur ve çeşitli mekanizmalarla protein yapısını modifiye eder. Oksidatif hasarlı olan reseptör, enzim ve transport proteinlerinin fonksiyonlarında bozulma olabilir (Jaescheke, 1995) (Şekil 2.4.2).



Şekil 2.4.2. Serbest radikallerin hücrelerde yarattığı etkiler

2. 5. VİTAMİN E

Vitaminler, vücutta metabolik olayların normal bir şekilde işlemesi ve sağlıklı durumun sürdürülmesi için gerekli olan organik maddelerdir (İnan ve Gül, 2002). İnsanlar dahil bütün hayvanlar için temel bir madde olarak kabul edilen, bitkisel kaynaklı vitamin E, tokoferoller ve tokotrienoller (tokoller) olarak bilinen, yağda eriyen bileşiğin genel adıdır (McDowell, 1989; Nevberne ve Corner, 1989; Rice ve Kendy, 1988). Günümüzde, doğada vitamin E'nin sekiz formu bulunmaktadır. Bunların dördü tokoferol (α , β , γ , δ) diğer dördü ise tokotrienol (α , β , γ , δ) olarak iki gruba ayrılır (McDowell, 1989; Nevberne ve Corner, 1989; Putnam ve Comben, 1987; Levin ve Clouatre, 2009). En aktif antioksidant etki gösterenler tokoferoller sırası ile α , β , γ , δ tokoferollerdir (Kosowski ve Clouatre, 2009; Simone ve Palozza, 2009). Kroman (2 metil-6 kroman) türevleri olan tokoferoller benzen ile piran halkasından oluşmuştur (Aras ve ark., 1976). 6-kromanol halkası ve buna bağlı üçü asimetrik, 16 karbonlu bir isoprenoid yan zincirden oluşur (Dökmeci, 2000).



Şekil 2.5.1. Vitamin E'nin moleküler yapısı.

Tokoferoller, bitkisel ve hayvansal besinlerde oldukça fazla bulunurlar. Bunlar arasında yeşil yapraklı sebzeler, yağlı tohumlar ve bunların yağları, tahıllar, kuru baklagiller, et, yumurta ve balık sayılabilir (Zielinski, 2009; Harinantenaina, 2009).

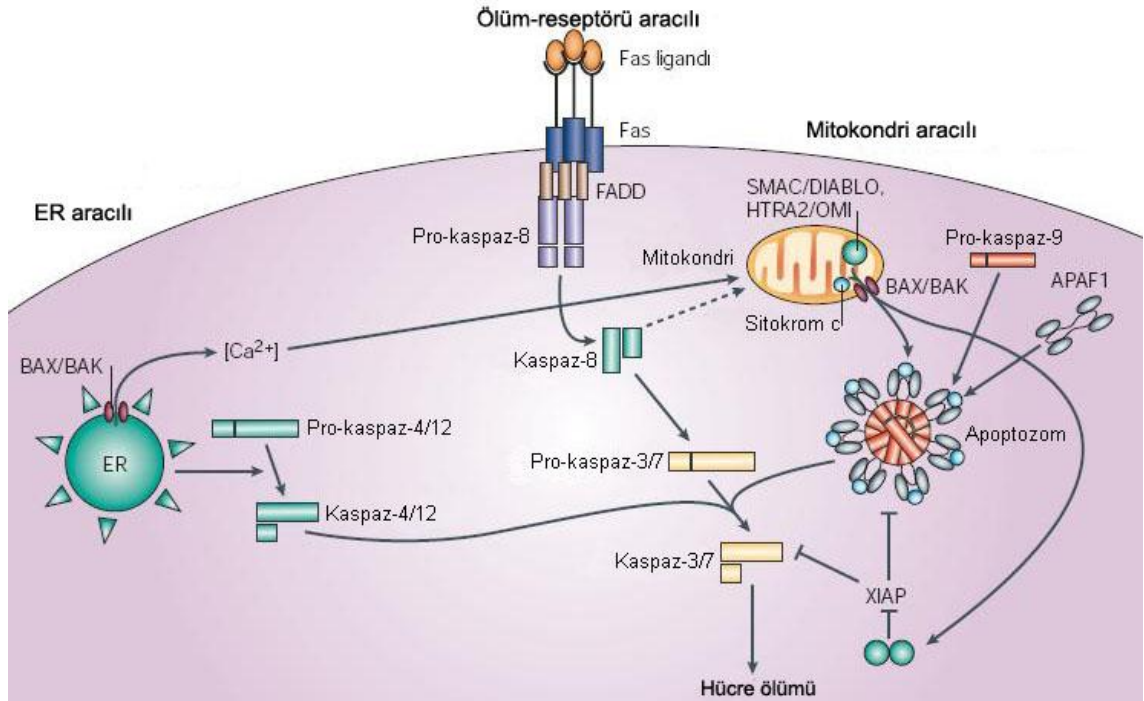
Tokoferollerin, biyolojik sistemlerde potansiyel bir antioksidan olarak rol oynadığı bilinir. Tokoferoller bu etkilerini, hücrelerdeki doymamış yağ asitlerinin lipit peroksidasyonunu önleyerek ve membranın bütünlüğünü sağlayarak gerçekleştirirler (Simone ve Palozza, 2009; McDowell, 1989; Nevberne ve Corner, 1989; Putnam ve Comben, 1987; Rice ve Kendy, 1988; Siddons ve Mills,1981; Ulrey, 1981). Oksidasyon sırasında oluşan serbest radikaller daha sonra peroksidasyon ile mitokondriyal, mikrozomal ve hücre membranındaki fosfolipitlerden olan doymamış yağ asitlerini okside eder (Nevberne ve Corner, 1989). Sonuçta bu membranların yapısını ve metabolizmasını bozan peroksit ve hiperoksitler oluşur. Tokoferollerin fenol halkası üzerindeki hidroksil grubu, bir proton vermek suretiyle peroksit ve hiperoksik radikallerini doyurur ve böylece peroksit radikallerinin aktivitelerini azaltır (Nevberne ve Corner, 1989; Rice ve Kendy, 1988).

2. 6. APOPTOZ

Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, normal gelişim ve doku homeostazında önemli rol oynayan biyolojik bir süreçtir (Woodle and Kulkarni, 1998). Apoptoz için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir (Anzar, 2002). Apoptotik hücre ölümü, temel olarak iki aşamadan meydana gelir. Bunlardan birincisi sağlam organeller içeren, membranla çevrelenmiş birkaç parçaya ayrılacak olan nükleus ve kromatinin yoğunlaşması, ikincisi de apoptotik cisimler olarak adlandırılan parçalanmış hücre elemanlarının komşu hücreler tarafından fagosite edilerek hızlı bir şekilde bozulmasıdır (Schwartzman ve Cidlowski, 1993).

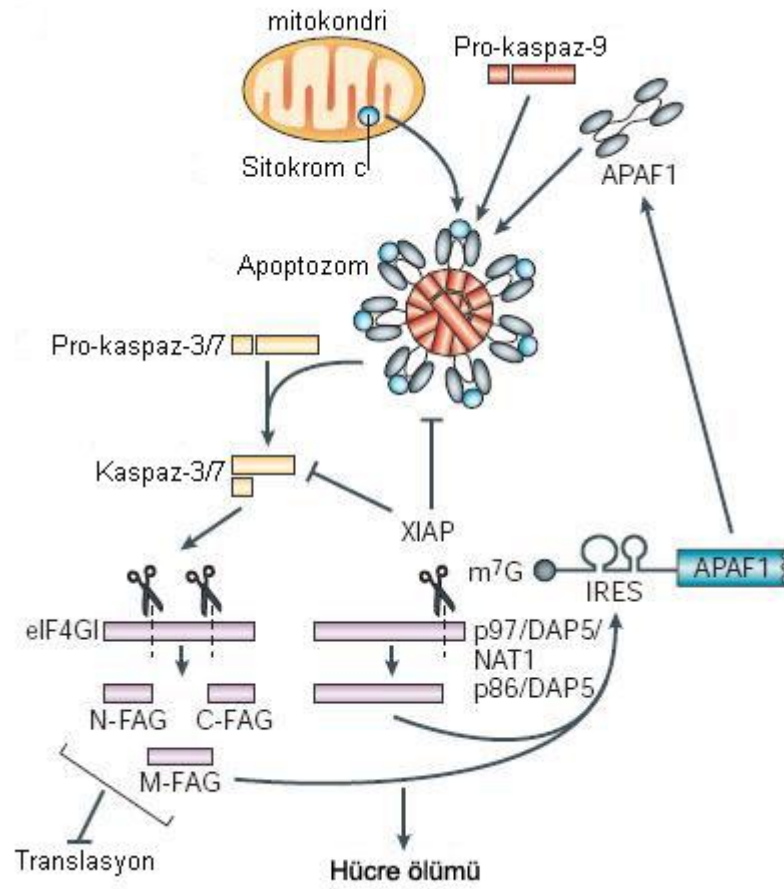
2.6.1. Apoptozun düzenlenmesi

Apoptoz çeşitli fizyolojik ve fizyolojik olmayan durumların bir parçası olduğundan, apoptozun düzenlenmesini ve moleküler metabolizmasını anlamak önemlidir. Apoptoz, DNA hasarı gibi hücre içi stres sonucu aktive edilen intrinsik yolla ya da Fas ve TNFR-1 gibi ölüm reseptörlerini aktive eden hücre dışı faktörlerin oluşmasının sonucu olarak ekstrinsik yolla gerçekleşebilir (Shi, 2001) (Şekil 2.6.1.1).



Şekil 2.6.1.1. Apoptotik düzenlenmenin intrinsik ve ekstrinsik yolları (Holcik ve Sonenberg, 2005).

Mitokondriyal apoptoz da denilen intrinsik yol, homeostazda ve hayvan gelişiminde önemlidir. Apoptoz tetiklendikten sonra, sitokrom c, mitokondri membranlar arasından sitoplazmaya geçer. Sitokrom c'nin salınması kaspazlar denilen özel protein grubunun aktivasyonunu tetikler. Kaspazlar sistein proteazlarının bir grubudur ve başlatıcı ve efektör kaspazlar olarak gruplandırılırlar. Efektör kaspazlar başlatıcı kaspazlar tarafından aktive edilirken, başlatıcı kaspazlar kendi kendilerini aktive ederler (Deveraux ve Reed, 1999; Miller, 1999). Sitokrom c mitokondriden salındıktan sonra, Apaf-1 e bağlanır ve onu aktive eder (Jiang ve Wang, 2000; Purring ve ark., 1999). Bu kompleks daha sonra dATP ya da ATP'ye bağlanır ve apoptozom denilen prokaspaz-9'u aktive eden multimerik bir yapıya dönüşür (Saleh ve ark. 1999). Aktivasyondan sonra kaspaz-9 apoptozomla birlikte, özellikle en önemli efektör kaspaz olan prokaspaz-3'ü hedefleyen bir holoenzime dönüşür (Şekil 2.6.1.2) (Jiang ve Wang 2000; Shi, 2001). Ektrinsik yol; ektraselüler ligand bağlayıcı ölüm reseptörleri tarafından aktive edilen hem kaspaz aktivasyonunun hemde hücre tipine göre mitokondriyal yolun daha fazla yükseltgenmesiyle sonuçlanır. Fas ve TNFR1 en çok çalışılan ölüm reseptörleridir (Şekil 2.6.1.1) (Holcik ve Sonenberg, 2005; Liston ve ark., 2003; Gebauer ve Hentze, 2004; Ashkenazi ve Dixit, 1998)



Şekil 2.6.1.2. Apoptozun mitokondriyal yolu (Holcik ve Sonenberg, 2005).

Apoptoz pek çok gen tarafından kontrol edilmektedir. Bunlardan biri de anti-apoptotik bir protein olan bcl-2 proteinidir (Tanaka ve ark., 2000). Bcl-2, hücreleri apoptozdan koruduğu belirlenen ilk gendir (Garcia ve ark., 1992). Bu anti-apoptotik etkisini mitokondriden sitokrom-c salınmasını ve buna bağlı olarak efektör kaspazların aktivasyonunu önleyerek gösterir (Goldstein ve ark., 2000). Bcl-2 apoptozu inhibe edip hücrenin yaşamını uzatırken, bax apoptozu neden olmaktadır. Her ikisi protein de normalde denge halindedir (Lotem ve Sachs, 1995).

2.6.2. Apoptozun gösterilmesi

Apoptotik indeks, apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere oranı ile belirlenmektedir. Bunun için öncelikle apoptozun hücrelerde görünür hale getirilerek belirlenmesi gerekir (Güleş ve Eren, 2008). DNA'nın spesifik endonukleaz aktivitesi aracılığı ile oligonukleozomal büyüklükteki 180-200 baz çiftlik parçalara ayrılması

birçok hücre tipinde apoptoz sırasında meydana gelen en temel biyokimyasal olaydır (Barnett ve Barnett, 2006). Apoptozda meydana gelen DNA fragmentasyonun belirlenmesi için Gavrielli ve arkadaşları (1992) tarafından oluşturulan ilk yöntem TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling) tekniğidir. Bu yöntem, DNA zincirinin 3' OH bölgesine biyotinle konjuge edilmiş nukleotidleri eklemekle görevli terminal transferaz enziminin etkisini ortaya çıkarmıştır (Didenko, 2006). TUNEL yöntemi en sık kullanılan metodlardan biridir (Barnett ve Barnett, 2006).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Genistein ve Vitamin E farklı sürelerde ve dozlarda TM3 Leydig hücre soyuna uygulanmıştır. Genistein'in belirlenen dört farklı dozu tek başına ve Vitamin E ile birlikte uygulanarak sitotoksik etkisi hemositometre sayımı ile, apoptotik etkisi DNA fragmentasyonundaki kırıkları işaretleyen TUNEL yöntemi ile, hücrelerdeki lipid peroksidasyonu TBA serbest radikallerinin ve proteinlerdeki oksidatif hasarlar SH gruplarının spektrofotometrik olarak gösterilmesiyle araştırılmıştır.

3. 1. KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Deneylelerimizde kullanılan TM3 hücre soyu 11-13 günlük farelerin Leydig hücrelerinden elde edilmiş tümörük olmayan bir hücre soyudur. Laboratuvarımıza ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center'dan getirilmiş olup *in vitro* koşullarda haftada iki-üç kez düzenli pasajları yapılarak yetiştirilmektedir. Hücreler % 5 Horse Serum, % 2,5 Fetal Bovine Serum, 2.5 mM L-Glutamine, 0.5 mM Sodium Pyruvate, 1.2 g/L Sodium Bicarbonate, 15 mM HEPES ve PSA (Penisilin-Streptomisin-Amfoterin) ilave edilmiş 50:50 DMEM/F12 kültür medyumunda, % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren nemli ortamda, 37°C'de inkübe edilerek yetiştirilmektedir.

3. 2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

Deneylelerimizde kullanılan hücreler, yetiştirildikleri kültür kapları içinde yeterli yoğunluğa eriştiklerinde haftada iki-üç defa düzenli pasajları yapılmaktadır. Bu amaçla, hücreler tripsinle 37°C'de 5 dakika muamele edildikten sonra pipetaj yapılarak toplanır ve santrifüj tüpüne aktarılır. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılır. Dipte bulunan hücre çökeltisi üzerine uygun kültür medyumunu ilave edilerek, her deney için gerekli sayıda hücre kültür kaplarına ekilir.

3. 3. GENİSTEİN VE VİTAMİN E KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

Genistein'in deneylerde kullanılan konsantrasyonları, diyetle alınabilen doz seviyeleri temel alınarak saptanmıştır (Kumi-Diaka, 1998). Tüm deneylerde kullanılan Genistein (Mikro-Gen İlaç San. A.Ş.'den temin edilmiştir) toz haldedir ve +4°C'de ışıktan uzak olarak saklanmıştır. Bu toz haldeki Genistein % 1 DMSO içeren medyum içerisinde uygun dozlarda hazırlanmıştır. Bu şekilde dört farklı final konsantrasyonu G10 (10 µg/ml Genistein), G20 (20 µg/ml Genistein), G50 (50 µg/ml Genistein) ve G100 (100 µg/ml Genistein) oluşturulmuştur ve kontrol gruplarına % 1 DMSO içeren medyum verilmiştir (Tablo 3.3.1).

Deneylerde Vitamin E'nin en aktif ve en fazla bulunan formu olan α -tokoferol kullanılmıştır (Kosowski ve Clouatre, 2009; Simone ve Palozza, 2009). Uygulanacak doz seviyesi *in vitro* ortamdaki antioksidan doz olan 50 µM olarak belirlenmiştir (Takacs ve ark., 2001). Hazırlanan stok solüsyonlar +4°C'de saklanmıştır. (Tablo 3.3.1).

Hazırlanan Genistein ve Genistein + Vitamin E solüsyonları 0.2 µm milipor filtre ile steril edilerek, farklı zamanlarda (24 ve 48 saat) 24 saatte medyumları değiştirilerek uygulanmıştır.

Tablo 3.3.1. Kontrol, Genistein ve Vitamin E uygulanan deney grupları.

Genistein		Genistein+Vitamin E	
Kontrol Grubu I	% 1 DMSO içeren medyum	Kontrol Grubu II	50 µM Vitamin E + % 1 DMSO içeren medyum
G10	10 µg/ml Genistein + % 1 DMSO içeren medyum	G10+VE	50 µM Vitamin E + 10 µg/ml Genistein + % 1 DMSO içeren medyum
G20	20 µg/ml Genistein + % 1 DMSO içeren medyum	G20+VE	50 µM Vitamin E + 20 µg/ml Genistein + % 1 DMSO içeren medyum
G50	50 µg/ml Genistein + % 1 DMSO içeren medyum	G50+VE	50 µM Vitamin E + 50 µg/ml Genistein + % 1 DMSO içeren medyum
G100	100 µg/ml Genistein + % 1 DMSO içeren medyum	G100+VE	50 µM Vitamin E + 100 µg/ml Genistein + % 1 DMSO içeren medyum

3.4. ÇOĞALMA HIZI

3.4.1. Hemositometre Yöntemi

Canlılık testi için, hücreler altı kuyulu kültür kaplarına kuyucuk başına 5×10^5 olacak şekilde ekim yapıldı. Deney sürelerinin tamamlanmasıyla, kuyucuklardaki medyumlar atılarak PBS'le yıkandıktan sonra her kuyucuğa 400 µl tripsin eklendi ve 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardan pipetaj yapılarak toplanan hücreler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj sonrasında supernatant atıldı. Dipte bulunan hücre çökeltisi büyüme medyumuyla pipetaj yapıldıktan sonra 1:1 olacak şekilde tripan mavisi eklendi ve hemositometreyle canlı ve ölü hücre sayımı yapıldı. Sonuçlara göre toplam hücre sayısı ve % canlılık oranı grafikleri elde edildi.

3.5. APOPTOZ

Tunel yöntemi ile apoptoza uğrayan hücrelerin tayini için TM3 Leydig hücreleri, 48 kuyulu kültür kaplarına her kuyucuğa $1,25 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekimleri yapıldı. Deney sürelerinin bitiminde kuyucuklardan deney medyumları çekilerek hücreler PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH:7,4)'le yıkandıktan sonra 200'er µl tripsin eklendi. 5 dakika inkübasyon sonunda üzerine medyum eklenen hücreler pipetaj yapılarak toplandıktan sonra 2000 rpm'de santrifüj yapıldı. Dipteki hücre çökeltisi üzerine 100 µl medyum eklendikten sonra poly L-lyzin kaplı lamlara konarak havada kurutuldu. DNA uçlarında kırıklar bulunan hücreleri işaretlemek için Chemicon marka Apoptag® Plus Peroksidase *In Situ* Apoptosis Detection kiti kullanıldı. Hücreler fiksasyon için PBS'de hazırlanmış % 1 paraformaldehit içerisinde 10 dakika bekletildi. Son fiksasyon için de -20°C'de 2:1 oranında etanol:asetik asit karışımında 5 dakika tutuldu. Hücreler PBS'le yıkandıktan sonra endojen peroksidazın bloke edilmesi için PBS içerisinde hazırlanmış % 3 H₂O₂ çözeltisinde 5 dakika bekletilirler. Lamlardaki hücrelerin etrafı dikkatle kurtulduktan sonra dengeleyici tamponda (Equilibration Buffer) 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra kırılan DNA parçalarının 3' OH uçlarına dioksijenin işaretli dUTP'yi bağlayan TdT enzimi ve dUTP'den oluşan Working Strength TdT enzim karışımı taze olarak hazırlanarak bir saat süreyle nemli ortamda, 37°C'de uygulandı ve hücrelerin üzeri plastik lamelle kapatıldı. Bir saatin sonunda plastik lameller kaldırılıp hücreler TdT enzim aktivitesini durdurmak için durdurma/yıkama

tamponunda (Working Strength Stop/Wash Buffer) 10 dakika bekletildiler ve PBS'le yıkandılar. Lamlardaki hücrelerin etrafı dikkatle kurulandıktan sonra antikor peroksidaz konjugatı (Anti-Digoxigenin Peroksidaz) oda ısısında ve nemli ortamda 30 dakika uygulandı. PBS'le yıkanan hücreler, işaretli hücrelerin mikroskopta görünür hale geçmesi için DAB (diaminobenzidin) kromojeni ile 4-6 dakika muamele edildiler ve işaretli hücrelerin görünür hale geldiği mikroskopta gözlemlendikten sonra reaksiyon saf suyla sonlandırıldı. İşaretlenmeyen hücrelerin görünür hale gelebilmesi için zıt boya olarak metil mavisi 10 dakika uygulandı. Saf su ve n-butanolle yıkanan hücreler gliserin-jelatin kapatma solusyonuyla kaplanarak lamelle kapatıldılar. Kontrol ve deney gruplarına göre hazırlanan preparatlarda normal nukleus ve apoptotik nukleuslar Olympus marka IX71 model faz kontrast mikroskobunda incelendi ve Nikon marka fotoğraf makinesiyle fotoğrafları çekildi. Her preparat için 1000 hücre sayılarak apoptotik indeks saptandı.

3.6. OKSİDATİF HASAR

3.6.1. Membran Lipit Peroksidasyonun Tayini

Lipit peroksidasyonu, Buege ve Aust'un (1978) yöntemiyle ölçüldü. Bu yöntem tiyobarbitürik asit reaktif türleri olan TBARS olarak da adlandırılır. Tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddelerin bir molekülü ile iki molekül tiyobarbitürik asitin kondansasyonu sonucunda oluşan renkli kompleksin 535 nm dalga boyundaki absorbansının spektrofotometrik olarak tayin edilmesi esasına dayanır. Sıklıkla kullanılan bu yöntemle lipit hidroperoksitlerinden türeyen çeşitli aldehitlerin miktarı ölçülür.

Kullanılan Çözeltiler

Stok Çözelti:

- % 15 triklorasetik asit
- % 0.375 tiyobarbitürik asit
- 0.25 N hidroklorik asit

Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
HÜCRE SÜSPANSİYONU	0,5ml	-
PBS	-	0,5ml
STOK ÇÖZELTİ	1ml	1ml

Örneklerin pipetlenmesi işleminden sonra kapakları kapatılan tüpler 20 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra soğutulan tüpler 10 dakika 2000 g'de santrifüj edilip, süpernatantın absorbansı 535 nm'de köre karşı okundu.

Hesaplama

$$\text{TBARS (nmol/ml)} = \frac{1.5 \times A_{\text{örnek}} \times 10^6}{0.5 \times 1.56 \times 10^5}$$

TBARS için molar ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Toplam hacim: 1.5 ml

Kullanılan örnek hacmi: 0.5 ml

$A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı

3.6.2. Proteinlerdeki Oksidatif Hasarın Tespiti

Tiol grupları Sedlak ve arkadaşlarının (1968) metoduna göre tayin edildi. Bu metoda göre 5-5'-ditiobis-(-2-nitrobenzoik asit)'in tiol grupları tarafından indirgenmesi sonucunda 1 mol -SH grubu başına 1 mol 2-nitro-5 tiobenzoik asit oluşur. Oluşan bu sarı renkli ürünün absorbansı 412 nm dalga boyunda ölçülür.

Kullanılan çözeltiler

-0,01 M DTNB (5,5'-ditio-bis(-2-nitrobenzoik asit) çözeltisi (19,8 mg DTNB 5 ml'ye absölu metanol ile tamamlanır)

-Tris tamponu (0,2 M, pH:8,2): 12,1g Tris bir miktar saf suda çözüldükten sonra üzerine 3,362g EDTA (0,2 M'a karşılık) ilave edilir 1 N HCl ile pH8,2'ye ayarlanır, 50 ml'ye saf su ile tamamlanır.

Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
HÜCRE SÜSPANSİYONU	250µl	-
PBS	-	250µl
TRİS TAMPONU	750µL	750µL
DTNB	50µL	50µL
METANOL	3950µl	3950µl

Tüpler 15 dakika karanlıkta vortekslenerek inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 3000g'de santrifüjlendi. Örneklerin absorbansı 412 nm'de okundu.

Hesaplama

$$SH(\text{mmol/ml}) = \frac{A}{\epsilon} \times D$$

Oluşan 2-nitro 5 merkaptobenzoik asit için ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon=13600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

A= Örnek absorbansı

D= dilüsyon faktörü

3. 3. İSTATİSTİK ANALİZ

Deney gruplarında, uygulanan doz ve zamana bağlı olarak, canlı ve ölü hücre sayıları, Apoptotik indeks, SH grupları ve TBARS miktarı saptandıktan sonra ANOVA, Mann-Whitney U ve Wilcoxon testi uygulanarak istatistiksel analizler hesaplandı. Sonuçların değerlendirilmesinde $p<0.01$ ve $p<0.05$ anlamlılık seviyesi temel alındı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Genisteinin dört farklı dozu tek başına ve bu dozların Vitamin E ile birlikte, TM3 Leydig hücreleri üzerine etkileri 24. ve 48. saatlerde hücrenin çoğalmasını, apoptozu ve oksidatif hasarı bakımından araştırıldı. Bu amaçla bu dozların tek başlarına ve vitamin E ile birlikteki dozlarının TM3 hücrelerinin çoğalmasına etkisi, hemositometrede canlı ve ölü hücre sayımı yapılarak ortaya çıkarılmıştır. Yine aynı gruplarda apoptotik indeks TUNEL yöntemi ile hesaplandı. Lipit peroksidasyonunu gösteren TBA reaktif türlerinin ve proteinlerdeki oksidatif hasarlar ise tiol gruplarının gösterilmesiyle de hücrelerdeki oksidatif hasar belirlenmiştir.

4.1.ÇOĞALMA HIZI

4.1.1.Hemositometrik yöntem

Kontrol ve deney gruplarında 24 ve 48 saat sürenin sonunda TM3 Leydig hücrelerinde oluşan hücre canlılığındaki değişim Olympus IX71 marka faz-kontrast mikroskopunda incelenerek Nikon marka fotoğraf makinesiyle fotoğrafları çekildi (Şekil 4.1.1.2- Şekil 4.1.1.5).

Genisteinin dört farklı dozu tek başına ve aynı dozların vitamin E ile birlikte TM3 Leydig hücrelerine 24 ve 48 saatlerde çoğalmayla nasıl bir etkisi olduğunu hücreleri tripan mavisi ile boyayarak hemositometre yöntemi ile (canlı ve ölü hücre sayımı yapılarak) tespit edildi. 24. saat sonunda kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile kontrol grubu II ve genisteinin bu dört farklı dozunun vitamin E ilave edilerek oluşturulduğu dozları toplam hücre sayısı bakımından karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı gözlenmiştir. Oysa ki, 24 saatte kontrol grubu I ve genisteinin tek başına kullanıldığı dozlar karşılaştırıldığında, toplam hücre sayısı bakımından, kontrol grubu I'e göre deney gruplarında anlamlı bir azalma gösterilmiştir ($p<0.01$). Kontrol grubu II ve vitamin E ilave edilmiş genistein dozları toplam hücre sayısı bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubu II'ye göre G10+VE deney grubu

arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, G20+VE, G50+VE ve G100+VE deney grupları arasında anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 4.1.1.1).

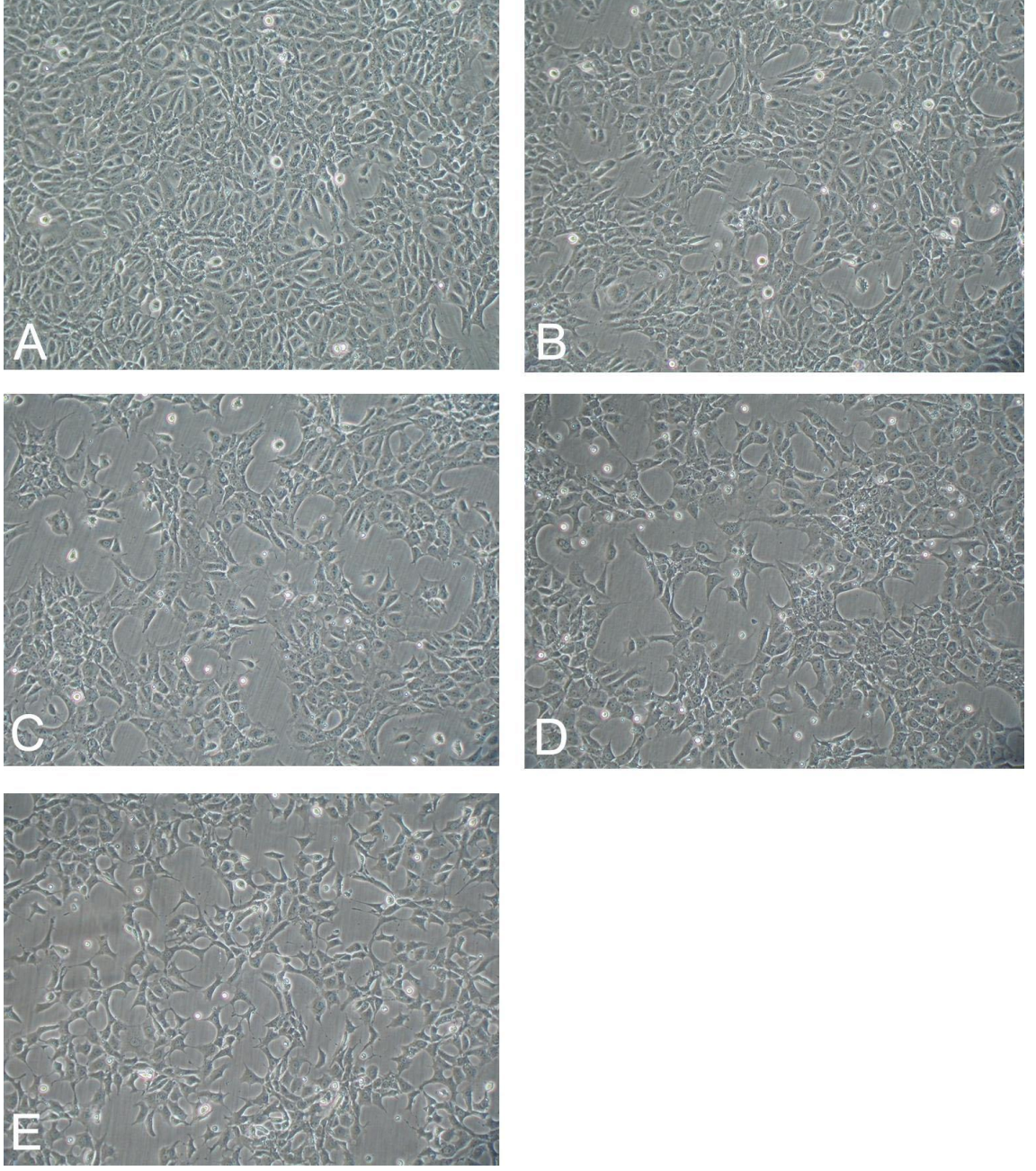
48. saat sonunda kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile kontrol grubu II ve genisteinin bu dört farklı dozunun vitamin E ilave edilerek oluşturulduğu dozları toplam hücre sayısı bakımından karşılaştırıldığında, G10 ile G10+VE, G20 ile G20+VE, G50 ile G50+VE ve G100 ile G100+VE arasında anlamlı bir azalma bulunmaktadır ($p<0.01$). Oysa ki, 48 saatte kontrol grubu I ve genisteinin tek başına kullanıldığı dozlar karşılaştırıldığında, toplam hücre sayısı bakımından, kontrol grubu I'e göre deney gruplarında anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0.01$). Kontrol grubu II ve vitamin E ilave edilmiş genistein dozları toplam hücre sayısı bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubu II'ye göre deney grupları arasında anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 4.1.1.1).

Kontrol ve deney grupları 24 ve 48 saat sonunda zamana bağlı olarak karşılaştırıldığında ise, toplam hücre sayısı bakımından kontrol grubu I ve II'de anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Vitamin E verilmeyen deney gruplarında anlamlı bir artış gözlenmezken vitamin E ile birlikte genistein verilen deney gruplarında toplam hücre sayısı anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.1.1.1).

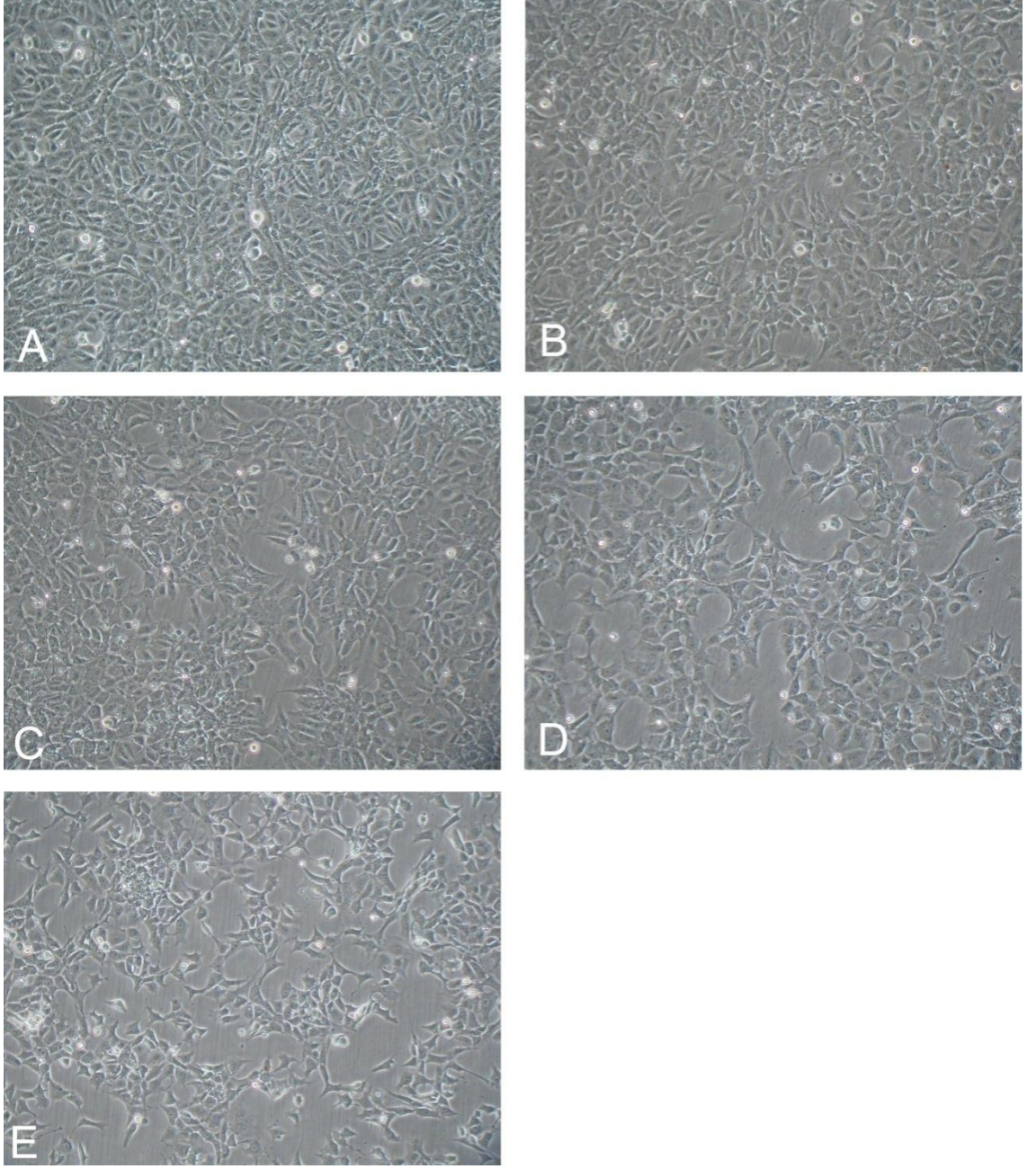
Tablo 4.1.1.1. Kontrol ve Deney Gruplarında Toplam Hücre Sayıları

	0 Saat	24 saat	48 saat
KONTROL I	500000	1184000 ± 170940	2080000 ± 297842
G10	500000	832000 ± 194931	960000 ± 137258
G20	500000	576000 ± 141194	608000 ± 19663
G50	500000	512000 ± 137747	416000 ± 34268
G100	500000	512000 ± 117512	320000 ± 31814
KONTROL II	500000	1248000 ± 286042	1920000 ± 202286
G10+VE	500000	928000 ± 140492	768000 ± 40345
G20+VE	500000	736000 ± 110426	128000 ± 50596
G50+VE	500000	608000 ± 64888	160000 ± 29982
G100+VE	500000	448000 ± 46085	128000 ± 26030

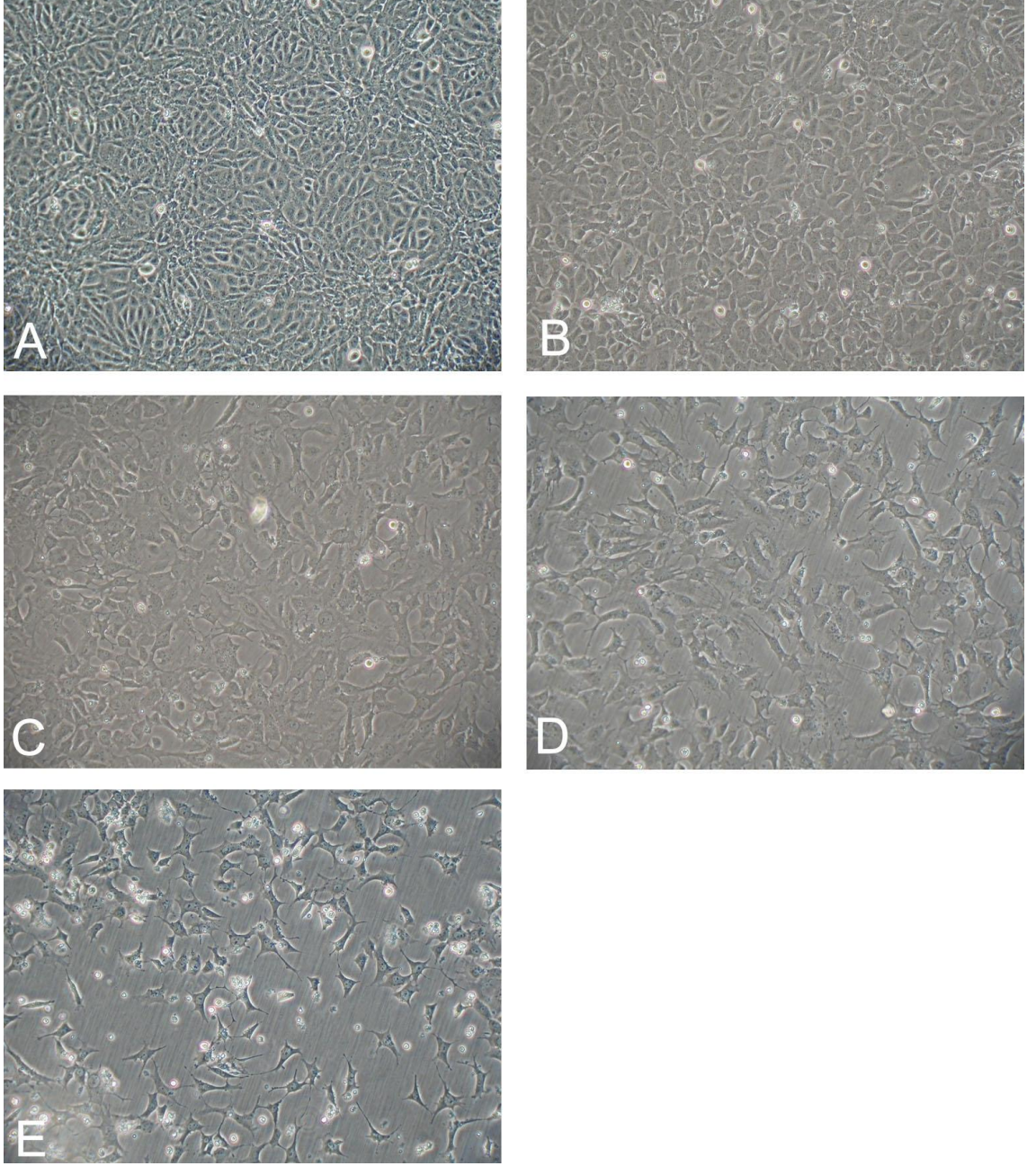
Şekil 4.1.1.1. TM3 hücrelerinde 24 ve 48 saatin sonunda kontrol ve genisteinin tek başına ve vitamin E ile birlikte uygulandığı deney gruplarında toplam hücre sayısı.



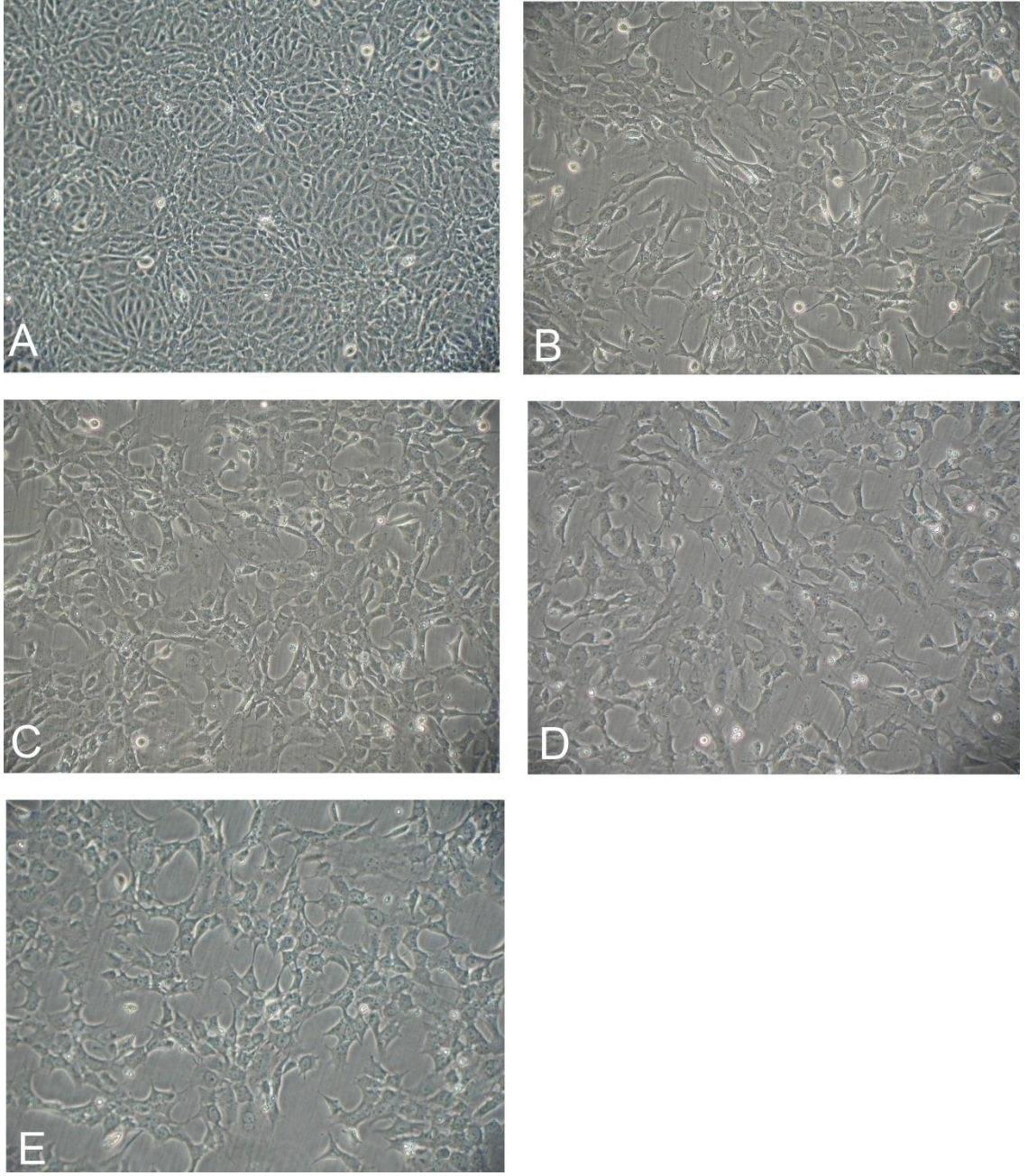
Şekil 4.1.1.2. 24 saat süre sonunda kontrol ve genistein uygulanmış deney gruplarında, hücre canlılığındaki değişim **A:** Kontrol grubu **B:** G10 **C:** G20 **D:** G50 **E:** G100



Şekil 4.1.1.3. 24 saat süre sonunda kontrol ve genistein ile birlikte vitamin E uygulanmış deney gruplarında, hücre canlılığındaki değişim **A:** Kontrol **B:** G10+VE **C:** G20+VE **D:** G50+VE **E:** G100+VE



Şekil 4.1.1.4. 48 saat süre sonunda kontrol ve genistein uygulanmış deney gruplarında, hücre canlılığındaki değişim **A:** Kontrol grubu **B:** G10 **C:** G20 **D:** G50 **E:** G100



Şekil 4.1.1.5. 48 saat süre sonunda kontrol ve genistein ile birlikte vitamin E uygulanmış deney gruplarında, hücre canlılığındaki değişim **A:** Kontrol grubu **B:** G10+VE **C:** G20+VE **D:** G50+VE **E:** G100+VE

TM3 Leydig hücrelerinin 24 ve 48 saat sonunda kontrol ve deney gruplarındaki % canlılık oranları tablo 4.1.1.2'de verilmiştir. 24. saat sonunda kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile kontrol grubu II ve genisteinin bu dört farklı dozunun vitamin E ilave edilerek oluşturulduğu dozları % canlılık bakımından karşılaştırıldığında bu gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Oysa ki, 24 saatte kontrol grubu I ve genisteinin tek başına kullanıldığı dozlar karşılaştırıldığında % canlılık oranı bakımından, kontrol grubu I'e göre G10 deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken, kontrol grubu I ile diğer deney grupları arasında anlamlı bir azalma gösterilmiştir ($p<0.01$). Kontrol grubu II ve vitamin E ilave edilmiş genistein dozları % canlılık oranı bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubu II'ye göre G10 VE deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken, kontrol grubu II ile diğer deney grupları arasında anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 4.1.1.6).

48 saat sonunda kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile kontrol grubu II ve genisteinin bu dört farklı dozunun vitamin E ilave edilerek oluşturulduğu dozları % canlılık oranı bakımından karşılaştırıldığında ($p<0.01$), kontrol grubu I ile kontrol grubu II arasında anlamlı bir artış olduğu gözlenirken, diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Oysa ki, 48 saatte kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile genisteinin tek başına kullanıldığı dozlar karşılaştırıldığında, % canlılık oranı bakımından, kontrol grubu I'e göre G100 deney grubunda anlamlı bir azalma gözlenirken ($p<0.01$), diğer deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Kontrol grubu II ve vitamin E ilave edilmiş genistein dozları toplam % canlılık oranı bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubu II'ye göre G10+VE deney grubunda anlamlı bir fark gözlenmezken, kontrol grubu II'ye göre diğer deney gruplarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 4.1.1.6).

Kontrol ve deney grupları 24 ve 48 saat sonunda zamana bağlı olarak karşılaştırıldığında ise, % canlılık oranı bakımından sadece kontrol grubu II'de anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Kontrol grubu I ve deney gruplarında ise zamana bağlı olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.1.1.6).

Tablo 4.1.1.2. TM3 Leydig hücrelerinde kontrol ve deney gruplarındaki 24 ve 48 saat sürenin sonunda % canlılık oranı.

	0 saat	24 saat	48 saat
KONTROL I	100	70,69 ± 10,62	73,57 ± 15,15
G10	100	69,20 ± 8,24	72,90 ± 3,13
G20	100	55,30 ± 9,21	61,73 ± 15,01
G50	100	44,25 ± 10,02	53,00 ± 21,62
G100	100	36,00 ± 18,54	42,00 ± 15,35
KONTROL II	100	72,75 ± 9,19	90,40 ± 5,98
G10+VE	100	60,33 ± 14,62	76,50 ± 4,05
G20+VE	100	52,44 ± 12,68	63,00 ± 15,67
G50+VE	100	47,85 ± 15,17	55,00 ± 13,19
G100+VE	100	45,50 ± 22,37	42,80 ± 13,72

Şekil 4.1.1.6. Kontrol ve genisteinin tek başına ve vitamin E ile birlikte uygulanmış deney gruplarında % canlılık oranı (* p<0.01).

4.2. APOPTOZ

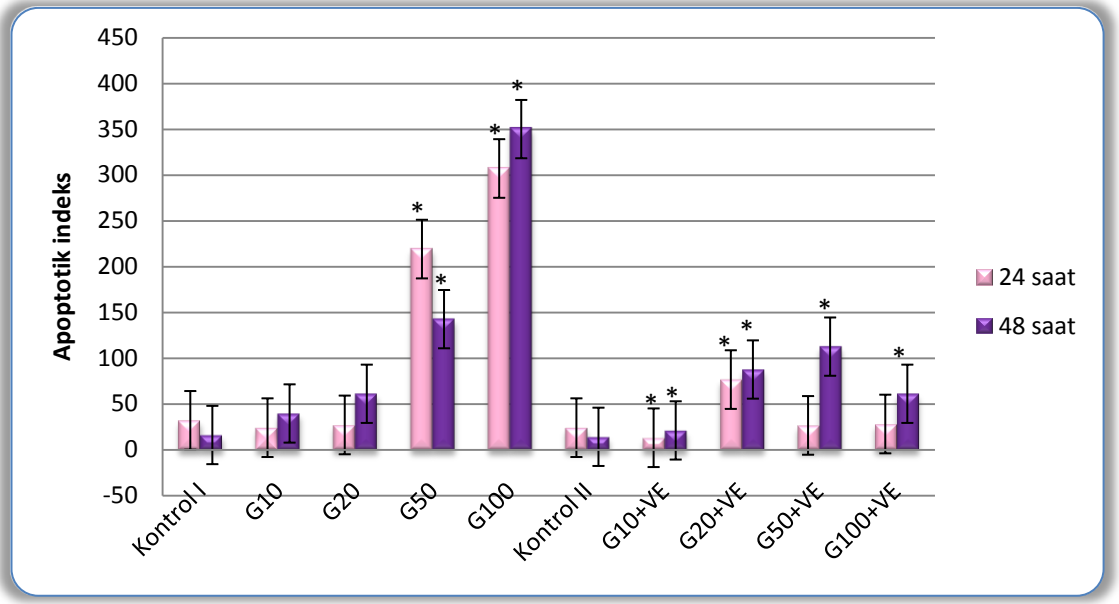
TM3 Leydig hücrelerinin 24 ve 48 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında her preparat için 1000 hücre sayılarak hesaplanan apoptotik indeks değerleri tablo 4.2.1’de verilmiştir. 24. saat sonunda kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile kontrol grubu II ve genisteinin bu dört farklı dozunun vitamin E ilave edilerek oluşturulduğu dozları apoptotik indeks bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubu I ile kontrol grubu II arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. G10 ile G10+VE, G50 ile G50+VE ve G100 ile G100+VE deney grupları arasında anlamlı bir azalma gözlenirken G20 ile G20+VE deney grubu arasında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.01$). Oysa ki, 24 saatte kontrol grubu I ve genisteinin tek başına kullanıldığı dozlar karşılaştırıldığında apoptotik indeks bakımından, kontrol grubu I’e göre G10 ve G20 deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken, G50 ve G100 deney gruplarında anlamlı bir artış gözlenmektedir (Şekil 4.2.2). Kontrol grubu II ve vitamin E ilave edilmiş genistein dozları apoptotik indeks bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubu II’ye göre G10+VE deney grubu arasında anlamlı bir azalma gözlenirken, G20+VE grubunda anlamlı bir artış bulunmaktadır. Kontrol grubu II’ye göre G50+VE ve G100+VE deney grupları arasında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.2.1 ve Şekil 4.2.3).

48 saat sonunda kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile kontrol grubu II ve genisteinin bu dört farklı dozunun vitamin E ilave edilerek oluşturulduğu dozları apoptotik indeks bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubu I ile kontrol grubu II arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. G10 ile G10+VE, G50 ile G50+VE ve G100 ile G100+VE deney grupları arasında anlamlı bir azalma gözlenirken G20 ile G20+VE deney grubu arasında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Oysa ki, 48 saatte kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile genisteinin tek başına kullanıldığı dozlar karşılaştırıldığında, apoptotik indeks bakımından, kontrol grubu I’e göre deney gruplarında anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 4.2.4). Kontrol grubu II ve vitamin E ilave edilmiş genistein dozları apoptotik indeks bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubu II’ye göre deney gruplarında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 4.2.1 ve Şekil 4.2.5).

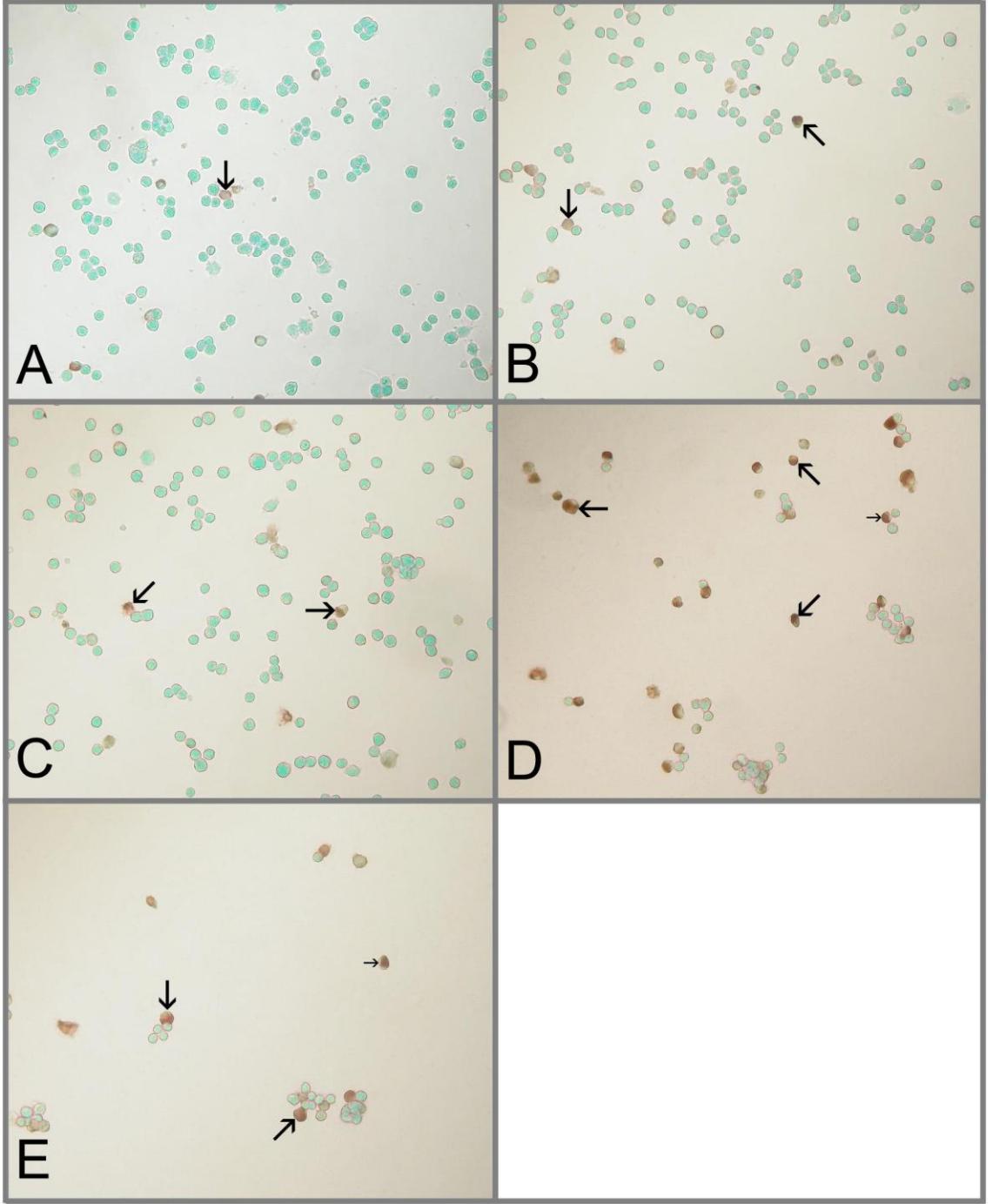
Kontrol ve deney grupları 24 ve 48 saat sonunda zamana bağı olarak karşılaştırıldığında ise, apoptotik indeks bakımından G10 ve G20 deney grubunda 48. saatte anlamlı bir artış bulunurken G50 deney grubunda anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Kontrol grubu I ve G100 deney grubunda ise zamana bağı olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Genisteinin vitamin E ile birlikte verildiği deney gruplarında ise G10+VE, G50+VE ve G100+VE deney gruplarında anlamlı bir artış gözlenirken kontrol grubu II’de anlamlı bir azalma görülmüştür. G20+VE deney grubunda zamana bağı olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.2.1).

Tablo 4.2.1. TM3 Leydig hücrelerinde 24 ve 48 saat süre sonunda belirlenen apoptotik indeks değerleri.

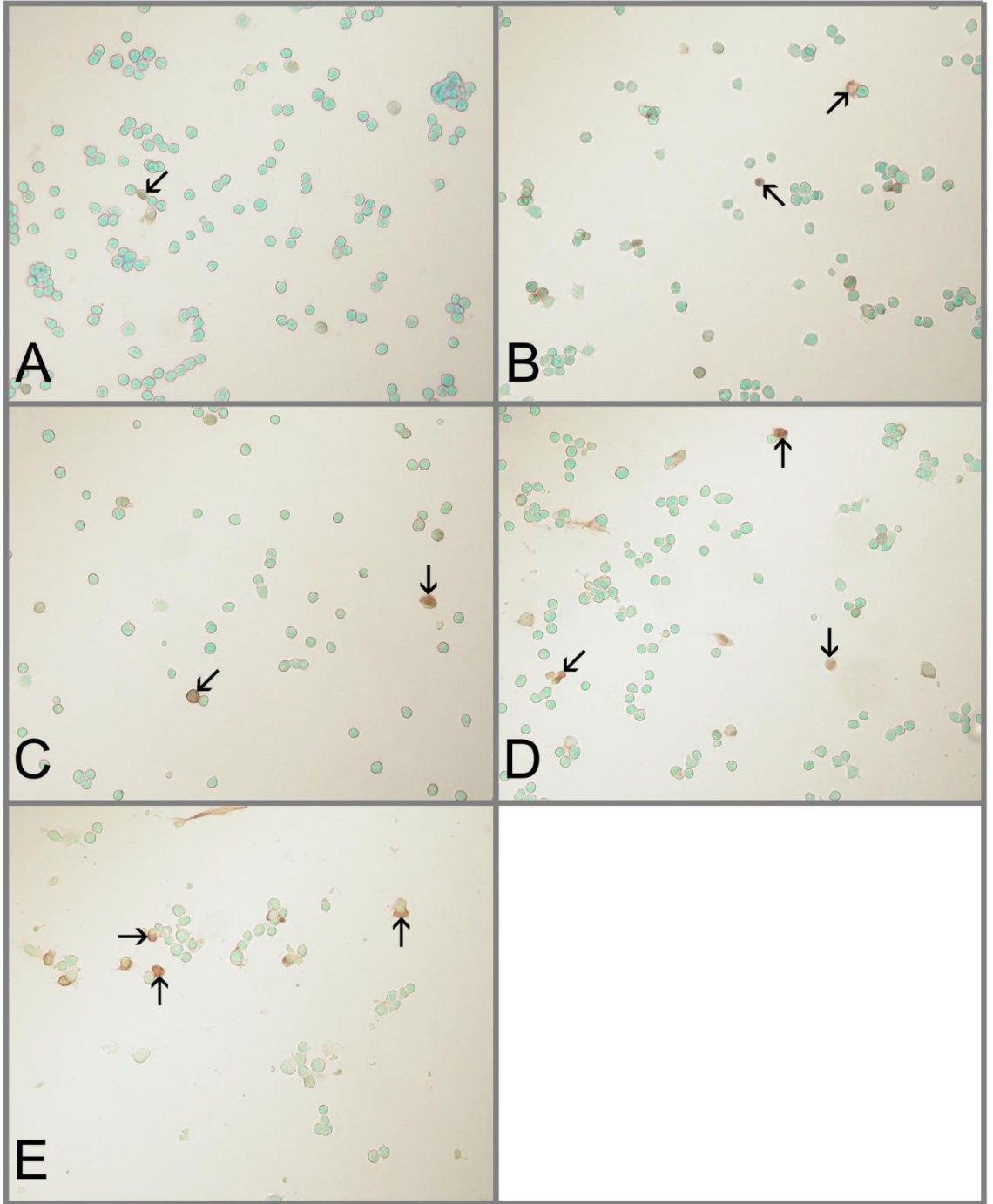
	24 saat	48 saat
KONTROL I	32 ± 17,03	16 ± 4,20
G10	24 ± 7,40	39 ± 8,41
G20	27 ± 6,26	61 ± 3,85
G50	219 ± 42,86	142 ± 22,86
G100	307 ± 19,16	350 ± 46,48
KONTROL II	32 ± 6,90	14 ± 3,74
G10+VE	13 ± 3,58	21 ± 2,90
G20+VE	76 ± 9,85	87 ± 5,61
G50+VE	26 ± 6,72	112 ± 12,26
G100+VE	28 ± 6,05	61 ± 7,29



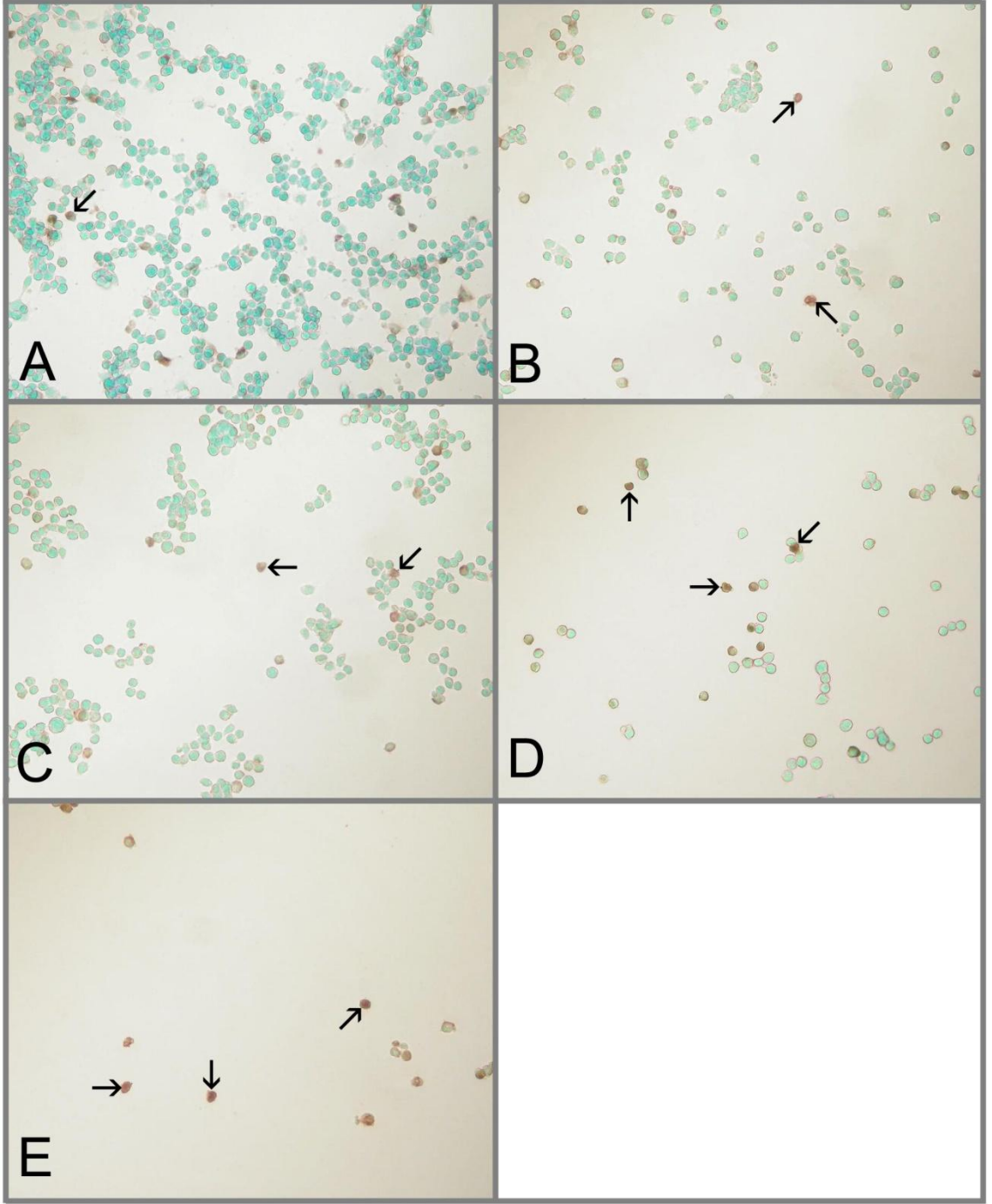
Şekil 4.2.1. Kontrol ve deney gruplarında 24 ve 48 saat için apoptotik indeks değerleri (*p<0.01).



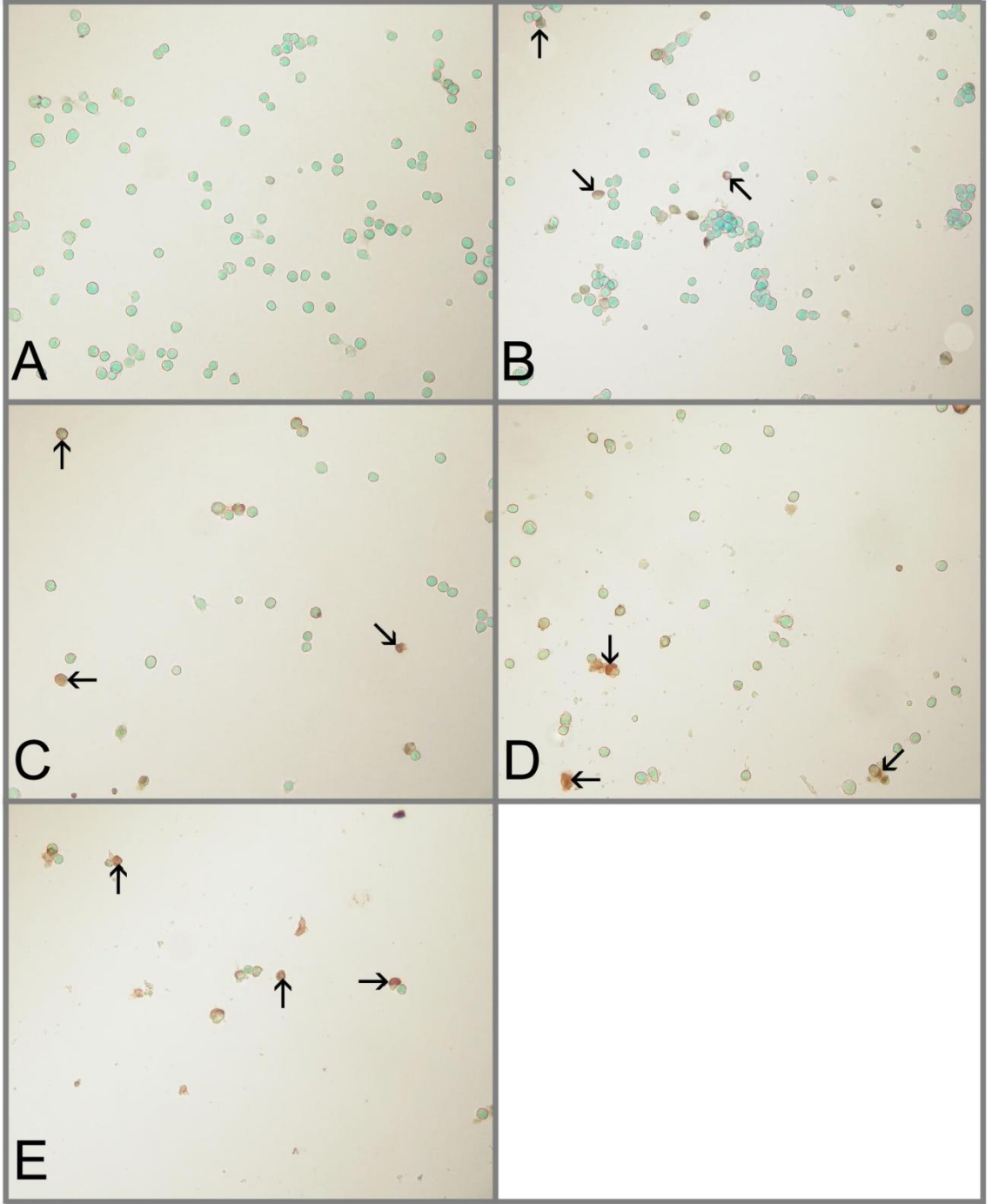
Şekil. 4.2.2. 24 saatin sonunda kontrol ve tek başına genistein verilen deney gruplarında görülen apoptotik hücreler (→) **A:** Kontrol grubu **B:** G10 **C:** G20 **D:** G50 **E:** G100



Şekil. 4.2.3. 24 saatin sonunda kontrol ve vitamin E ile birlikte genistein verilen deney gruplarında görülen apoptotik hücreler (→) **A:** Kontrol grubu **B:** G10+VE **C:** G20+VE **D:** G50+VE **E:** G100+VE



Şekil. 4.2.4. 48 saatin sonunda kontrol ve tek başına genistein verilen deney gruplarında görülen apoptotik hücreler (→) **A:** Kontrol grubu **B:** G10 **C:** G20 **D:** G50 **E:** G100



Şekil. 4.2.5. 48 saatin sonunda kontrol ve vitamin E ile birlikte genistein verilen deney gruplarında görülen apoptotik hücreler (→) **A:** Kontrol grubu **B:** G10+VE **C:** G20+VE **D:** G50+VE **E:** G100+VE

4.3. OKSİDATİF HASAR

4.3.1. Lipit Peroksidasyonu

TM3 Leydig hücrelerinin 24 ve 48 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan TBARS değerleri tablo 4.3.1.1'de verilmiştir. 24. saat sonunda kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile kontrol grubu II ve genisteinin bu dört farklı dozunun vitamin E ilave edilerek oluşturulduğu dozları TBARS değerleri bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubu II'de kontrol grubu I'e göre anlamlı bir azalma bulunmuştur. G50 ile G50+VE ve G100 ile G100+VE deney grupları arasında anlamlı bir azalma gözlenirken G10 ile G10+VE ve G20 ile G20+VE deney grubu arasında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.01$). Oysa ki, 24. saatte kontrol grubu I ve genisteinin tek başına kullanıldığı dozlar TBARS değerleri bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubu I'e göre G10, G50 ve G100 deney grupları arasında anlamlı bir artış bulunurken, G20 deney grubunda anlamlı derecede azalma görülmüştür. Kontrol grubu II ve vitamin E ilave edilmiş genistein dozları TBARS değerleri bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubu II'ye göre deney gruplarının TBARS değerlerinin anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 4.3.1.1).

48 saat sonunda kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile kontrol grubu II ve genisteinin bu dört farklı dozunun vitamin E ilave edilerek oluşturulduğu dozları TBARS değerleri bakımından karşılaştırıldığında, sadece G10+VE deney grubu G10 deney grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). Diğer deney gruplarında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Oysa ki, 48 saatte kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile genisteinin tek başına kullanıldığı dozlar, TBARS değerleri bakımından karşılaştırıldığında, anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p<0.01$). Kontrol grubu II ve vitamin E ilave edilmiş genistein dozlarında ise TBARS değerleri bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubu II'ye göre deney gruplarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p<0.01$) (Şekil 4.3.1.1).

Kontrol ve deney grupları 24 ve 48 saat sonunda zamana bağlı olarak karşılaştırıldığında ise, TBARS değerleri bakımından G10 ve G100 deney grubunda anlamlı bir azalma gözlenirken, G20 deney grubunda anlamlı derecede artış

gözlenmiştir ($p<0.05$). Kontrol grubu I ve G50 deney grubunda ise azalma anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubu I ve II'de anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Kontrol grubu II'de TBARS değeri anlamlı derecede artarken, Vitamin E ile birlikte genistein verilen deney gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.3.1.1).

Tablo.4.3.1.1. 24 ve 48 saat süreyle genistein ve Vitamin E uygulanmış TM3 Leydig hücrelerinde TBARS değerleri (nmol/ml)

	24 saat	48 saat
KONTROL I	0,451±,02	0,327±,36
G10	0,721±,08	0,212±,02
G20	0,317±,09	0,404±,15
G50	0,644±,06	0,519±,12
G100	0,885±,40	0,269±,15
KONTROL II	0,144±,04	0,510±,32
G10+VE	0,702±,22	0,663±,34
G20+VE	0,798±,37	0,519±,34
G50+VE	0,355±,18	0,481±,30
G100+VE	0,634±,45	0,423±,13

Şekil 4.3.1.1. Kontrol ve genisteinin tek başına ve vitamin E ile birlikte uygulanmış deney gruplarında ml'deki TBARS değerleri (* p<0.01).

4.3.2. Proteinlerdeki oksidatif hasar

TM3 Leydig hücrelerinin 24 ve 48 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan –SH gruplarının miktarı tablo 4.3.2.1'de verilmiştir. 24. saat sonunda kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile kontrol grubu II ve genisteinin bu dört farklı dozunun vitamin E ilave edilerek oluşturulduğu dozları –SH gruplarının miktarı bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubu II'de kontrol grubu I'e göre anlamlı bir artış bulunurken, G50+VE deney grubunda G50'ye göre anlamlı bir azalma görülmüştür (p<0.01). Diğer deney gruplarında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Oysa ki, 24. saatte kontrol grubu I ve genisteinin tek başına kullanıldığı dozlar karşılaştırıldığında –SH gruplarının miktarı bakımından, kontrol grubu I'e göre G20 ve G50 deney grupları arasında anlamlı bir artış bulunurken (p<0.01), G10 ve G100 deney gruplarında kontrol grubu I'e göre anlamlı bir fark görülmemiştir. Kontrol grubu II ve vitamin E ilave edilmiş genistein dozları –SH grupların miktarı bakımından karşılaştırıldığında, bu deney grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.3.2.1).

48 saat sonunda kontrol grubu I ve genisteinin dört farklı dozu ile kontrol grubu II ve genisteinin bu dört farklı dozunun vitamin E ilave edilerek oluşturulduğu dozları –SH gruplarının miktarı bakımından karşılaştırıldığında vitamin E ile birlikte verilen deney gruplarında anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir ($p<0.01$). Oysa ki, 48 saatte kontrol grubu I ve genisteinin tek başına kullanıldığı dozlar karşılaştırıldığında, -SH gruplarının miktarı bakımından, anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Kontrol grubu II ve vitamin E ilave edilmiş genistein dozlarında ise –SH gruplarının miktarı bakımından karşılaştırıldığında sadece kontrol grubu II'ye göre G20+VE deney grubunun anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 4.3.2.1).

Kontrol ve deney grupları 24 ve 48 saat sonunda zamana bağlı olarak karşılaştırıldığında ise, tiol gruplarının miktarı bakımından kontrol grubu I ve II'de anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Sadece genistein uygulanan deney gruplarında tiol gruplarında anlamlı bir fark bulunmazken, Vitamin E ile birlikte genistein verilen deney gruplarında tiol grupları zamana bağlı olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.3.2.1).

Tablo 4.3.2.1. 24 ve 48 saat süreyle Genistein ve Vitamin E uygulanmış TM3 Leydig hücrelerinde tiol gruplarının miktarı (-SH) nmol/ml

	24 saat	48 saat
KONTROL I	$24 \times 10^6 \pm 5,87$	$70 \times 10^6 \pm 4,04$
G10	$40 \times 10^6 \pm 32$	$57 \times 10^6 \pm 5,45$
G20	$79 \times 10^6 \pm 32,3$	$50 \times 10^6 \pm 3,94$
G50	$138 \times 10^6 \pm 95,8$	$65 \times 10^6 \pm 3,76$
G100	$47 \times 10^6 \pm 21,5$	$65 \times 10^6 \pm 4,96$
KONTROL II	$47 \times 10^6 \pm 19,5$	$146 \times 10^6 \pm 2,83$
G10+VE	$62 \times 10^6 \pm 8,38$	$120 \times 10^6 \pm 5,83$
G20+VE	$79 \times 10^6 \pm 6,79$	$210 \times 10^6 \pm 1,08$
G50+VE	$48 \times 10^6 \pm 6,68$	$133 \times 10^6 \pm 2,19$
G100+VE	$43 \times 10^6 \pm 25,7$	$126 \times 10^6 \pm 4,22$

Şekil 4.3.2.1. Kontrol ve genisteinin tek başına ve vitamin E ile birlikte uygulanmış deney gruplarında tiol gruplarının (-SH) miktarı (*p<0.01).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Soya izoflavonları, soyanın çok tüketildiği ülkelerin beslenmesinde yüzyıllardır önemli bir yer tutmaktadır. (Munro ve ark., 2003). Genistein, soyadan elde edilen doğal bir izoflavondur (Rucinska ve ark., 2008) ve yapısal olarak östrojene benzemesine rağmen, östrojen ile karşılaştırıldığında daha zayıf östrojenik aktivite göstermektedir (Park ve Shin, 2004; Kuiper ve ark., 1998; Kuiper ve ark., 1997; Burton ve Wells, 2002; McClain ve ark., 2006; Sarkar ve Li, 2002; Liggins ve ark., 2000). Özellikle son yıllarda genistein çeşitli kanser ve diğer kronik hastalıklardan, hem korunma hemde bu hastalıkların tedavisinde kullanılan çok güçlü bir ajandır (Pollowski ve Mazurek, 2000).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, östrojenin erkek üreme sistemi üzerine fizyolojik rolünün bulunduğunu ve normal spermatogenez için gerekli olduğunu göstermiştir (O'Donnell ve ark., 2001). Östrojen, erkek üreme sistemindeki Sertoli hücresi, Leydig hücresi ve germ hücrelerinde sentezlenir ve salınır (Hess ve ark., 2001). Ayrıca kendileri tarafından sentezlenen ve salınan bu hormon bu hücrelerin gelişimi ve fonksiyonları üzerinde etkilidir (Vicdan, 2007). Dışarıdan alınan östrojenler ya da besinlerde bulunan fitoöstrojenler, endojen östrojenlerin varlığında erkek üreme sistemini olumsuz etkileyebilmektedir (Vicdan, 2007; Vicdan ve ark., 2007). Hancock ve arkadaşları (2009), genisteinin verilen doza bağlı olarak Leydig hücrelerinde testosteron sentezini inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Opalka ve ark., 2004; Svechnikov ve ark., 2005; Chen ve ark., 2007). Ayrıca Wang ve arkadaşları (1994) genisteinin Leydig hücrelerinde androjenlerden östrojenin yapılmasında sorumlu enzim olan aromatazı inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda, genisteinin dört farklı dozu ve bu dozların vitamin E ile birlikte toplam hücre sayısına etkisi *in vitro* olarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, hem tek başına genisteinin farklı dozlarının, hem de bu dozların vitamin E ile birlikte verilen gruplarında 10-100µg/ml genistein konsantrasyonunun 24. ve 48. saatlerde toplam TM3 hücre sayısını önemli bir şekilde azalttığı gözlenmiştir. Bu azalmanın, ya genisteinin

G2/M fazında hücre büyümesini durdurması, ya da hücreleri apoptoza teşvik etmesiyle olabileceğini düşünmekteyiz (Shao ve ark., 1998; Constantinou ve ark., 1998; Polkowski ve Mazurek, 2000; Xu ve Loo, 2001; Sarkar ve Li, 2003; Yu ve ark., 2004; Park ve Shin, 2004;.Chodon ve ark., 2006a, 2006b; Touny ve Banerjee, 2006)

Genisteinin hücre canlılığına etkisiyle ilgili olarak birçok çalışma yapılmıştır. Kumi-Diaka ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları çalışmada testiküler hücre soylarına (TM3 Leydig hücresi, TM4 Sertoli hücresi, GC1 germ hücresi) 10, 20, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat boyunca genistein uygulamışlar ve 20 µg/ml genistein konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığında düşüş meydana geldiğini bulmuşlardır. 1999 yılında yapılan bir çalışmada yine testiküler hücrelerde (TM3 Leydig hücresi, TM4 Sertoli hücresi, GC1 germ hücresi) 10 µg/ml ile 100 µg/ml arasında değişen genistein konsantrasyonları 48 saat süreyle uygulanmış ve genisteinin dozuna bağlı olarak hücre canlılığında azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir (Kumi-Diaka ve ark., 1999). TM4 Sertoli hücreleriyle yapılan diğer bir çalışmada ise; 15, 30, 45 ve 60 µg/ml konsantrasyonlarda 6, 12 ve 24 saat boyunca genistein uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre de 15 µg/ml dozunun hücre canlılığını etkilemediği bulunurken, 30, 45 ve 60 µg/ml dozlarında ise hücre canlılığında azalma olduğunu belirtmişlerdir (Kumi-Diaka ve Butler, 2000). Meme kanseri (MCF-7), kolon kanseri (HT-29), hepatosit karsinoma ve adenokarsinoma hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmalarda artan genistein konsantrasyonunun doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (Hsieh ve ark., 1998; Yu ve ark., 2004; Zou ve ark. 2008; Chodon ve ark., 2007).

Yaptığımız çalışmada, TM3 Leydig hücrelerinin canlılığı ile ilgili sonuçlarımız, hem tek başına genistein hemde genistein + vitamin E verilen gruplarda 20-100 µg/ml genistein konsantrasyonununun 24. ve 48. saatlerde TM3 hücrelerinin canlılığını önemli bir şekilde azaltması bu konuyla ilgili yukarıda bahsedilen çalışmalarla paralellik göstermektedir. Genisteinin TM3 hücrelerinde bu hücre canlılığını baskılama aktivitesi, hormon bağımlı ve bağımsız kanser hücre soylarında ve diğer hücre soylarındaki gibi olduğu düşünülmektedir (Okura ve ark., 1988; Naik ve ark., 1994; Murrill ve ark., 1996). Genisteinin hücre canlılığını baskılama mekanizmasının ortaya çıkarılması oldukça zordur. Bunun sebebi genisteinin çok fonksiyonlu bir tabiatı olması ve etki

mekanizmasının hedef hücreye göre çeşitlilik göstermesidir (Okura ve ark., 1988). Ancak genisteinin hücrede tirozin kinaz ve topoizomerez I ve II'nin aktivasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Akiyama ve ark., 1987; Okura ve ark., 1988). Hücre çoğalmasının canlılığını ve farklılaşmasını bu yolla bloke etmektedir. Genisteinin, testiküler hücrelerdeki baskılayıcı etkisi de diğer hücrelerde meydana gelen metabolik baskılama yoluyla aynı olabilir (Akiyama ve ark., 1987; Okura ve ark., 1988; Naik ve ark., 1994; Murrill ve ark., 1996). Genisteinin, testiküler hücrelerin çoğalması ve canlılığına yapmış olduğu bu baskının tam olarak ortaya çıkarılması için çalışmalar halen yoğun olarak devam etmektedir (Choi ve ark., 2009; Fang ve ark., 2009).

Yaptığımız bu çalışmalar sonucunda, genisteinin yüksek dozlarının, hem TM3 hücrelerinde hemde prostat kanseri gibi bazı diğer hücrelerde (Naik ve ark., 1994; Spinozzi ve ark., 1994; Kyle ve ark., 1997) apoptozu teşvik ettiği gözlenmiştir ve TM3 hücrelerinin apoptoz mekanizmasına çok duyarlı olduğu vurgulanmıştır (Kumi-Diaka ve ark., 1998). Kumi-Diaka ve arkadaşlarının (1998) yaptıkları çalışmaya göre 10 µg/ml genistein dozu 24. Saatte apoptozu teşvik ederken, 50 µg/ml ve 100 µg/ml genistein dozları ise 72. saatte apoptozu teşvik etmesi, apoptozun genisteinin dozuna ve zamana bağlı olduğunu belirtmişler. Yapılan başka bir çalışmaya göre, HT-29 kolon kanser hücrelerine 72 saat genistein uygulanması sonucunda, 60-120 µM gibi yüksek konsantrasyonlarda apoptozun teşvik edildiği, 60 µM'dan düşük dozlarda ise apoptozun teşvik edilmediği sonucuna varılmıştır (Yu ve ark., 2004). Benzer bir çalışmada fare embriyonik fibroblast (NIH 3T3) hücrelerinde, 5-90 µM genisteinin 24 saat uygulanması sonunda 5 ve 10 µM konsantrasyonlarda apoptozda bir fark bulunmazken, daha yüksek dozlar olan 60 ve 90 µM konsantrasyonlarda apoptotik hücrelerde anlamlı bir fark bulunmuştur (Rucinska ve ark., 2008).

Bizim çalışmamız sonucunda genisteinin 24 ve 48. saatlerde 50-100 µg/ml dozlarında apoptozu teşvik ettiği gözlenmiştir. Genisteinin vitamin E ile birlikte verilen gruplarında ise 50 ve 100 µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda apoptozdaki artışın vitamin E'nin etkisiyle azaldığı bulunmuştur. G50 ve G100 dozlarında apoptozda bulunan artış hücre canlılığı ve toplam hücre sayısındaki azalma ile korelasyon gösterdiği için, hücre canlılığı ve toplam hücre sayısındaki azalmanın sebebinin, hücrelerin apoptozu uğradığının bir göstergesi olduğu düşünülmektedir. Genisteinin düşük konsantrasyonları

olan 10 ve 20 µg/ml dozlarının ise apoptoza etki etmediği gözlenmiştir. G10 dozu vitamin E ile birlikte verildiğinde apoptozda görülen azalma vitamin E'nin düşük konsantrasyonlardaki genisteinle birlikte hücreyi önemli ölçüde apoptozdan koruduğu düşünülmektedir. Genisteinin bu dozunda toplam hücre sayısının kontrole göre anlamlı derecede azalmasına rağmen % canlılık oranı ve apoptotik indekste anlamlı bir fark bulunmaması, genisteinin hücre büyümesini G2/M fazında durdurarak mitozu önleme etkisiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Shao ve ark., 1998; Constantinou ve ark., 1998; Cappeletti ve ark., 2000; Pollowski ve Mazurek, 2000; Sarkar ve Li, 2003; Touny ve Banerjee, 2006). G20 dozunda ise kontrole göre anlamsız bulunan apoptotik indeksin G20+VE verilen deney grubunda kontrole göre anlamlı derecede artmış olması lipid peroksidasyonu ve protein hasarı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Oksidatif hasarın; lipidler, proteinler ya da DNA gibi hücrelerdeki önemli moleküllere zarar verdikleri bilinmektedir (Dalle-Donne ve ark., 2003). Bu hasar hücrelerde reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından meydana getirilmektedir (Cai ve ark., 1997). Genisteinin lipid peroksidasyonuna etkilerini araştıran çalışmalar sadece genisteinin çok düşük olan antioksidan dozlarının lipid peroksidasyonunu önleyip önleyemeyeceği ile ilgilidir. Oysa ki, genisteinin hücre için toksik olduğu düşünülen dozları ile ilgili lipid peroksidasyonunu araştıran çok az *in vivo* ve *in vitro* çalışma bulunmaktadır (Cai ve ark., 1997; Fang ve ark., 2003; Chodon ve ark., 2008). Genisteinin, Leydig hücrelerinde lipid peroksidasyonuna etkileri şimdiye kadar araştırılmamıştır. Bizim çalışmamızda, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan Tiyobarbitürik asit reaktif türleri (TBARS) genistein verilen deney gruplarında 24. saatte doza bağlı olarak artarken 20 µg/ml dozunda diğerlerinden farklı olarak azalma görülmüştür. Genistein+vitamin E verilen deney gruplarında ise doza bağlı olarak TBARS'da artış devam etmiştir. Genisteinin 50 ve 100 µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarında artan lipid peroksidasyonuna vitamin E'nin koruyucu etkisi bulunduğu düşünülürken, 10 µg/ml ve 20 µg/ml konsantrasyonlarında ise vitamin E'nin, lipid peroksidasyonunun artışında etkili olabileceği düşünülmektedir. Lipid peroksidasyonunda 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki artış apoptozdaki artışla ve hücre sayısındaki azalma ile korelasyon gösterdiğinden, bu dozlarda görülen apoptozun oksidatif hasar sonucu ortaya çıktığını düşünülmektedir. 48. saatte ise genistein dozlarının lipid peroksidasyonu üzerine etkisi görülmemiştir. Bu durum bize genisteinin lipid

peroksidasyonuna olan etkisinin 24 saatten uzun uygulamalarda etkili olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca, G20 deney grubuna göre G20+VE deney grubunda lipid peroksidasyonunda artış görülmüştür bu sonuca bağlı olarak, G20+VE deney grubunda genisteinin vitamin E ile birlikte verildiği diğer deney gruplarından farklı olarak yüksek apoptotik indeks göstermesinin lipid peroksidasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Ott ve ark., 2007).

Reaktif oksijen türleri proteinlerdeki tiol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açmaktadır (Shacter E., 2000b; Hu, 1994). Oksidatif protein hasarı protein tiol düzeylerindeki azalma ile karakterizedir (Hu, 1994). Rucinska ve ark., (2008) yaptıkları çalışmada 5-90 μ M 24 saat uygulama sonucunda düşük dozlarda bile genisteinin protein tiol gruplarında oksidasyona sebep olduğunu, yüksek dozlarda (90 μ M) ise protein-tiol gruplarında meydana gelen oksidasyonun ise kontrole kıyasla yaklaşık % 50 arttığını göstermişlerdir. Genisteinin düşük dozlarda bile protein oksidasyonuna neden olması, genisteinin bu dozlarda pro-oksidan etki gösterdiğini ifade etmişlerdir. Bunun sonucunda genisteinin toksik olduğu ve proteinlerde oksidatif hasara neden olduğunu vurgulamışlardır. Bizim bulgularımız sonucunda, serbest tiol gruplarında 24. saatte 20 ve 50 μ g/ml verilen deney gruplarında artış meydana gelmiştir. Bu da bize genisteinin proteinlerdeki hasar üzerine etkisinin toksik olmadığı, hatta protein hasarı üzerine olumlu etkileri bulunduğunu düşündürmektedir. 48. saatte ise genistein proteinlerdeki oksidatif hasara etki etmezken vitamin E ile birlikte verilen tüm gruplarda proteinlerdeki oksidatif hasar engellenmiştir. Bu da bize genisteinin 24 saatte protein hasarı üzerine iyileştirici etkisi bulunurken, 48. saatte bu etki azalmıştır ve vitamin E'de ise aksine 24 saatte olumlu etki görülmezken 48 saatte proteinlerdeki oksidatif hasarı önlenmektedir.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre, genistein yüksek konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonu ve apoptotik indeksi arttırırken, toplam hücre sayısı ve hücre canlılığını azaltmıştır. Buna göre toplam hücre sayısındaki ve hücre canlılığındaki azalmanın sebebinin lipid peroksidasyonuna bağlı olarak gerçekleşen apoptoz olabileceği düşünülmektedir. Genisteinin yüksek konsantrasyonları ile birlikte vitamin E uygulanan deney gruplarında ise toplam hücre sayısı ve hücre canlılığında, vitamin E uygulanmayan gruplara göre görülen artış ve apoptoz ile lipid peroksidasyonundaki

azalma; vitamin E'nin, genisteinin yüksek konsantrasyonlardaki etkisine karşı koruyucu rolü olduğunu göstermektedir. Genisteinin düşük konsantrasyonlarında ise toplam hücre sayısı azalırken, hücre canlılığı ve apoptotik indekste kontrole göre fark bulunmaması; genisteinin düşük konsantrasyonlarının, Leydig hücrelerinde apoptoza neden olmadığı, fakat hücre büyümesini G2/M fazında durdurmuş olabileceği düşünülmektedir. Bunların aksine, genistein 20 µg/ml konsantrasyonu, vitamin E ile birlikte verildiğinde, görülen lipid peroksidasyonunda ve apoptozdaki artış, bu dozun vitamin E ile birlikte etkisinin daha ayrıntılı olarak araştırılmasının gerekli olduğunu göstermektedir. Ayrıca genisteinin 20 ve 50µg/ml konsantrasyonlarında, 24. saatte Leydig hücrelerinde, proteinlerdeki oksidatif hasar azalırken, diğer dozlarda ve 48. saatte herhangi bir protein oksidasyonuna neden olmamıştır.

Sonuç olarak, genistein yüksek dozlarda hücre sayısını ve canlılığını azaltmakta ve lipid peroksidasyonuna bağlı olarak apoptozu teşvik etmektedir. Bu sitotoksik etki bir antioksidan olan vitamin E ile giderilebilmektedir. Düşük dozlarda ise genisteinin sitotoksik etkisi bulunmamaktadır.

6.KAYNAKLAR

ABRAHAMSOHN, P.A., 2005, *The Male Reproductive System*, Basic histology text and atlas, McGraw-Hill Companies Inc., Brazil, 418-434.

AKIYAMA, T., ISHIDA, J., NAKAGAWA, S., OGAWARA, H., WATANABE, S., ITOH, N., SHIBUYA, M., FUKAMI, Y., 1987, Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases, *The Journal of Biological Chemistry*, 262 (12), 5592-5595.

ALLEN, S.W., MUELLER, L., WILLIAMS, S.N., QUATTROCHI, LC., RAUCY, J., 2001, The use of a highvolume screening procedure to assess the effects of dietary flavonoids on human CYP1A1 expression, *Drug Metab Dispos*, 29, 1074–1079.

ANZAR, M., HE, L., BUHR, M.M., KROETSCH, T.G., PAULS, K.P., 2002, Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility, *Biology of Reproduction*, 66 (2), 354-360.

ARAS, K., ERŞEN, G., KARAHAN, S., 1976, *Vitaminler*, Tıbbi Biyokimya, Ankara Basımevi, Ankara, 161-169.

ASHKENAZI, A. VE DIXIT, V.M., 1998, Death receptors: signaling and modulation, *Science*, 281(5381),1305-1308.

BARKHEM, T., CARLSSON, B., NILSSON, Y., ENMARK, E., GUSTAFSSON, J., NILSSON, S., 1998, Differential response of estrogen receptor α and estrogen receptor β to partial estrogen agonists/antagonists, *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 54, 105-112.

BARNETT, Y.A. ve BARNETT, C.R. NJ., 2006, *Methods in Molecular Medicine, Vol. 38: Aging Methods and Protocols*, Humana Press Inc., Totowa.

BENASSAYAG, C., PERROT-APPLANAT, M., FERRE, F., 2002, Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells, *Journal of Chromatography B*, 777, 233-248.

BOUKER, K.B. ve HILAKIVI-CLARKE, L., 2000, Genistein: Does it prevent or promote breast cancer, *Environ Health Perspect*, 108, 701-708.

BREMMER W.J., 1981, The testis, the testis, Burger H, de Kretser D (Eds) Raven Press, New York, 1-5.

BUEGE, J.A., ve AUST, S.D., 1978, *Microsomal lipid peroxidation*, Methods in Enzymology, 12, 302-310.

BURÇAK, G. ve ANDİCAN, G., 2004, Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma, *Cerrahpaşa J Med*, 35, 159-169.

BURTON, J.L. VE WELLS, M., 2002, The effect of phytoestrogens on the female genital tract, *J Clin Pathol* 2002, 55, 401-407.

CAI, Q., RAHN, R.O., ZHANG, R., 1997, Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals, *Cancer Letters*. 119(1), 99-107.

CAPPELLETTI, V., FIORAVANTI, L., MIODINI, P., Dİ FRONZO, G., 2000, Genistein blocks breast cancer cells in the G(2)M phase of the cell cycle, *J Cell Biochem*. 79(4), 594-600.

CARREAU, S., GENISSEL, C., BILINSKA, B., LEVALLET, J., 1999, Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male, *International Journal of Andrology*, 22, 211-223.

CARREAU, S., DELALANDE, C., SILANDRE, D., BOURGUÏBA, S., LAMBARD S., 2006, Aromatase and estrogen receptors in male reproduction, *Molecular and Cellular Endocrinology* 246, 65–68

CASSIDY, A. ve FAUGHNAN, M., 2000, Phyto-estrogens through the life cycle, *Proceedings of the Nutrition Society*, 59, 489-496.

CHEN, Y., JEFFERSON, W.N., NEWBOLD, R.R., PADILLA-BANKS, E., PEPLING, M.E., 2007, Estradiol, Progesterone, and Genistein Inhibit Oocyte Nest Breakdown and Primordial Follicle Assembly in the Neonatal Mouse Ovary in Vitro and in Vivo, *Endocrinology*, 148(8), 3580-3590.

CHODON, D., RAMAMURTY, N., SAKTHISEKARAN, D., 2007a, Preliminary studies on induction of apoptosis by genistein on HepG2 cell line, *Toxicology in vitro*, 21(5), 887-891.

CHODON, D., MUMTAZ BANU, S., PADMAVATHI, R., SAKTHISEKARAN, D., 2007b, Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by genistein in experimental hepatocellular carcinoma, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 297(1-2), 73-80.

CHODON, D., ARUMUGAM, A., RAJASEKARAN, D., DHANAPAL, S., 2008, Effect of Genistein on Modulating Lipid Peroxidation and Membrane-bound Enzymes in N-Nitrosodiethylamine-induced and Phenobarbital-promoted Rat Liver Carcinogenesis, *journal of health science* 54(2), 137-142.

CIOCCA,, D.R., WINTERS, C.A., DUFAU, M.L., 1986, Expression of an estrogen-regulated protein in rat testis Leydig cells, *Journal of steroid biochemistry*, 24(1), 219-29.

COLLINS, B.M., MCLACHLAN, J.A., ARNOLD, S.F., 1997, The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast *Steroids*, 62, 365-372.

COŞKUN, T., 2005, Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 48, 69-84.

CONSTANTINO, A.I., KAMATH, N., MURLEY, J.S., 1998, Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells, *European Journal of Cancer*, 34(12), 1927-1934.

CLEVENGER, S. (1964). Flower pigments. *Scientific American*, 210, 84-92.

DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., GIUSTARINI, D., MILZANI, A., COLOMBO, R., 2003, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica Chimica Acta* 329(1-2), 23-38.

DAVIS, J.N., KUCUK, O., DJURIC, Z., SARKAR, F.H., 2001, Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF-kappaB activation by TNF-alpha in blood lymphocytes, *Free Radic Biol Med* 30, 1293-1302

DELBES, G., LEVACHER, C., DUQUENNE, C., RACINE, C., PAKARINEN, P., HABERT, R., 2005, Endogenous Estrogens Inhibit Mouse Fetal Leydig Cell Development via Estrogen Receptor, *Endocrinology*, 146(5), 2454-2461.

DENEFF, C., 1998, Autocrine/Paracrine intermediates in hormonal action and modulation of cellular responses to hormones. *Section 7: The endocrine system*, Oxford University Press, New York, I, 461-514.

DEVERAUX Q. L. ve REED J. C., 1999, IAP family proteins -- suppressors of Apoptosis, *Genes & Development*, 13(3), 239-252.

DİDENKO, V.V., 2006, *In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol: 203, Humana Press Inc., Totowa, NJ.

DIXON, R.A. ve FERREIRA, D., 2002, Molecules of interest genistein, *Phytochemistry*, 60, 205-211.

DIXON, R.A., 2004, Phytoestrogens, *Annual Reviews*, 55, 225-261.

DÖKMECİ, İ., 2000, *Farmakoloji Temel Kavramlar Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 714- 720.

FANG, S.C., HSU, C.L., LİN, H.T., YEN, G.C., 2009, Anticancer Effects of Flavonoid Derivatives Isolated from *Millettia reticulata* Benth in SK-Hep-1 Human Hepatocellular Carcinoma Cells, *J Agric Food Chem*,

FRANKE T.F., KAPLAN D.R., CANTLEY L.C., 1997, PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88(4), 435–437.

FORUMFOOD, 2008, *Soya ve soya ürünleri*, [online], <http://www.forumfood.net/showthread.php?t=10787>, [Ziyaret tarihi: 10 Aralık 2009].

GARCÍA, I., MARTİNOU, I., TSUJİMOTO, Y., MARTİNOU, J.C., 1992, Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene, *Science*, 258(5080), 302-304

GAVRIELLİ, H.G., SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S.A., 1992, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J. Cell. Biol.* 119, 493-501.

GEBAUER, F. ve HENTZE, M.W., 2004, Molecular mechanisms of translational control, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(10), 827-835.

GOLDSTEİN, J.C., WATERHOUSE, N.J., JUİN, P., EVAN, G.I., GREEN, D.R., 2000, The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant, *Nature Cell Biology*, 2, 156-162.

GÜLEŞ, Ö. ve EREN, Ü., 2008, Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73-78.

GÜLTEKİN, E., 2004, *Phytoestrogen contents of selected foods*, Thesis (MSc). The Middle East Technical University.

HABERT, R., LEJEUNE, H., SAEZ, J.M., 2001, Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179, 47-74.

HAİDER S.G., 2004, Cell Biology of Leydig Cells in the Testis, *International Review of Cytology*, 233, 181-241.

HAİDER, S. G., PASSİA, D. VE OVERMEYER, G., 1986, Studies on fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity, *Acta Histochemica*, 32, 197-202.

HALL, P.F., 1994, Testicular steroid synthesis: Organization and regulation, *The Physiology of Reproduction*, Knobil, E., Neill, J.D. (Eds) Raven Press, New York, 1, 1335- 1362.

HARİNANTENAINA, L., 2009, *Tocotrienols in Plants: Sources and Importance*, Tocotrienols Vitamin E Beyond Tocopherols, CRC Press, New york, 43-60.

HESS, R.A. ve CARNES, K., 2004, The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison, *Anim. Reprod.*, 1 (1), 5-30.

HESS, R.A., BUNICK, D., BAHR, J., 2001, Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract – a review, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 178, 29-38.

HOLCİK, M. ve SONENBERG, N., 2005, Translational control in stress and apoptosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(4), 318-327.

HSIEH, C.Y., SANTELL, R.C., HASLAM, S.Z., HELFERICH, W.G., 1998, Estrogenic Effects of Genistein on the Growth of Estrogen Receptor-positive Human Breast Cancer (MCF-7) Cells *in Vitro* and *in Vivo*, *Cancer Research*, 58, 3833-3838.

HU, M.L., 1994, Measurement of Protein Thiol Groups and Glutathione in Plasma, *Methods in enzymology*, 233, 380-385

İNAN, Y. ve GÜL M., 2002, *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 18-297.

JAESCHKE, H., FISHER, M.A., LAWSON, J.A., SIMMONS, C.A., FARHOOD, A., JONES D.A., 1995, Activation of Caspase 3 (CPP32)-Like Proteases Is Essential for TNF--Induced Hepatic Parenchymal Cell Apoptosis and Neutrophil-Mediated Necrosis in a Murine Endotoxin Shock Model, *The Journal of Immunology*, 160, 3480-3486.

JEGOU, B., 1992, The Sertoli Cell, *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 6(2), 273-311.

JİANG X. ve WANG X., 2000, Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1, *The Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31199-31203.

KAYAALP, S.O., 1998, *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*, Hacettepe-Taş yayıncılık, Ankara, 153-154.

KLEİN, C.B., KING, A.A., 2007, Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224, 1-11.

KOSOWSKİ, A., ve CLOUATRE, D.L., 2009, *Vitamin E: Natural vs. Synthetic*, Tocotrienols Vitamin E Beyond Tocopherols, CRC Press, New york, 61- 75.

KUIPER, G.G.J.M., ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M., NILSSON, S., GUSTAFSSON, J.A., 1996, Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary, *PNAS*, 93 (12), 5925-5930.

KUIPER, G.G.J.M., LEMMEN, J.G., CARLSSON, B.O., CORTON, J.C., 1997, Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β , *Endocrinology*, 138(3), 863-870.

KUIPER, G.G., SHUGHRUE, P.J., MERCHENTHALER, I., GUSTAFSSON, J.A., 1998, The Estrogen Receptor β Subtype: A Novel Mediator of Estrogen Action in Neuroendocrine Systems, *Frontiers in Neuroendocrinology* 19(4), 253-286.

KUMI-DIAKA, J. ve BUTLER, A., 2000, Caspase-3 protease activation during the process of genistein-induced apoptosis in TM4 testicular cells, *Biology of the Cell*, 92, 115-124

KUMI-DIAKA, J., RODRIGUEZ, R., GOUDAZE, G., 1998, Influence of genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) on the growth and proliferation of the testicular cell lines, *Biology of the Cell*, 90, 349-354.

KUMI-DIAKA, J., NGUYEN, V., BUTLER, A., 1999, Cytotoxic potential of the phytochemical genistein isoflavone (4',5,7-trihydroxyisoflavone) and certain environmental chemical compounds on testicular cells, *Biology of the Cell*, 91, 515-523.

KYLE, E., NECKERS, L., TAKIMOTO, C., CURT, G., BERGAN, R., 1997, Genistein-Induced Apoptosis of Prostate Cancer Cells is Preceded by a Specific Decrease in Focal Adhesion Kinase Activity, *Molecular Pharmacology*, 51(2), 193-200.

LEVİN, N.E. ve CLOUATRE, D.L., 2009, *Tocotrienols in Vitamin E: Hype or Science?*, Tocotrienols Vitamin E Beyond Tocopherols, CRC Press, New York, 13- 20.

LİGGİNS, J., GRİMWOOD, R., BİNGHAM, S.A., 2000, Extraction and Quantification of Lignan Phytoestrogens in Food and Human Samples, *Analytical Biochemistry*, 287(1), 102-109.

LİMOGES, M., 1998, *Apoptosis in primary cultures of rat Leydig cells*, Doktora, Dalhousie University Halifax, Nova Scotia.

LİSTON, P., FONG, W.G., KORNELUK, R.G., 2003, The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2, *Oncogene*, 22(53), 8568-8580.

LOTEM, J. ve SACHS, L., 1995, Regulation of *bcl-2*, *bcl-X_L* and *bax* in the control of apoptosis by hematopoietic cytokines and dexamethasone, *Cell Growth & Differentiation*, 6, 647-653.

MAJDİC, G., SHARPE, R.M., SAUNDERS, P. T. K., 1997, Maternal oestrogen/xenoestrogen exposure alters expression of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) in the fetal rat testis, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 127, 91-98.

MASKARINEC, S., 2003, The effect of phytoestrogens on hot flashes, *Nutrition Bytes*, 9 (2), 1-9.

McCLAIN, R.M., WOLZ, E., DAVIDOVICH, A., PFANNKUCH, F., EDWARDS, J.A., BAUSCH, J., 2006, Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats, *Food and Chemical Toxicity*, 44, 56-80.

McDOWELL, L.R., 1989, *Vitamins in Animal Nutrition – Comparative Aspects to Human Nutrition*, Vitamin A and E. Academic Press, London, 10–52, 93–131.

MİLLER S.C., BOWMAN B.M., ROWLAND H.G., 1983, Structure, cytochemistry, endocytic activity and immunoglobulin (Fc) receptor of rat testicular interstitial-tissue macrophages. *The American journal of anatomy*, 168(1), 1-13.

MILLER, L.K., 1999, An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends in Cell Biology*, 9(8), 323-328.

MUNRO, I.C., HARWOOD, M., HLYWKA, J.J., STEPHEN, A.M., DOULL, J., FLAMM, W.G., ADLERCREUTZ, H., 2003, Soy Isoflavones: A Safety Review, *Nutrition Reviews*, 61(1), 1-33.

MURRILL, W.B., BROWN, N.M., ZHANG, J.X., MANZOLILLO, P.A., BARNES, S., LAMARTINIERE, C.A., 1996, Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats, *Carcinogenesis*. 17(7), 1451-7.

MURUGESAN, P., MUTHUSAMY, T., BALASUBRAMANIAN, K., ARUNAKARAN, J., 2007, Effects of vitamins C and E on steroidogenic enzymes mRNA expression in polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposed adult rat Leydig cells, *Toxicology*, 232, 170-182.

MURUGESAN, P., MUTHUSAMY, T., BALASUBRAMANIAN, K., ARUNAKARAN, J., 2008, Polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) inhibits testosterone biosynthesis and antioxidant enzymes in cultured rat Leydig cells, *Reproductive Toxicology*, 25(4), 447-454.

NAİK, H.R., LEHR, J.E., PIENTA, K.J., 1994, An *in vitro* and *in vivo* study of antitumor effects of genistein on hormone refractory prostate cancer, *Anticancer Research*, 14(6B), 2617-9.

NAİM, M., GESTETNER, B., ZİLKAH, S., BİRK, Y., BONDÍ, A., 1974, Soybean isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity, *Journal of Agricultural and Chemistry*, 22 (5), 806–810.

NEDELJKOVIÆ, A., RADULOVIIÆ, S., BJELOGRLIÆ, S., 2001, Pleiotropic effect of genistein makes it a promising cancer protective compound, *Archive of Oncology*, 9, 171-4.

NEVALA, R., 2001, *Effects of genistein and daidzein on arterial tone and blood pressure in rats*, Yüksek Lisans/Doktora, Institute of Biomedicine Pharmacology University of Helsinki.

NEVBERNE, P.M., VE CORNER, M.W., 1989, *The Vitamins*, Clinical Biochemistry of domestic animals, Academic Press Inc., New York, 4, 796-834.

O'DONNELL, L., ROBERTSON, K.M., JONES, M.E., SIMPSON, E.R., 2001, Estrogen and spermatogenesis, *Endocrine Reviews*, 22 (3), 289-318.

OKAZAKI, K., OKAZAKI, S., NAKAMURA, H., KITAMURA, Y., HATAYAMA, K., WAKABAYASHI S., TSUDA, T., KATSUMATA T., NISHIKAWA, A., HIROSE M., 2002, A repeated 28-day oral dose toxicity study of genistein in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals, *Archives of Toxicology*, 76, 553-559.

OKURA, A., ARAKAWA, H., OKA, H., YOSHINARI, T., MONDEN, Y., 1988, Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [VAL 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 157(1), 183-189.

OPALKA, M., KAMIŃSKA, B., CIERESZKO, R., DUSZA, L., 2004, Genistein affect testosterone secretion by Leydig cells in roosters (*Gallus gallus domesticus*), *Reproductive Biology*, 4 (2), 185-193.

PARK, O.J. ve SHIN, J.I., 2004, Proapoptotic potentials of genistein under growth stimulation by estrogen, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1030, 410-418.

PELLUSO, J.J., PAPPALARDO A., TROLISE M.P., 1996, N-cadherin-mediated cell contact inhibits granulosa cell apoptosis in progesterone-independent manner, *Endocrinology*, 137(4), 1196-1203.

PEREZ ARMENDARÍZ, E.M., ROMANO M.C., LUNA J., MİRANDA C., BENNETT M.V., MORENO A.P., 1994, Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cell from mouse testis, *American Journal of Physiology*, 267 (2 pt 1), C570-580.

POLKOWSKI, K., MAZUREK, A.P., 2000, Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 57 (2), 135-155.

PURRING, C., ZOU, H., WANG, X., MCLENDON, G.L., 1999, Stoichiometry, free energy, and kinetic aspects of cytochrome c:Apaf-1 binding in apoptosis, *Journal of American Chemical Society*, 121, 7435-7436.

PUTNAM, M.E., COMBEN, N., 1987, Vitamin E, *Vet. Rec.*, 121, 541-545.

RICE, D., ve KENDY, S., 1988, Vitamin E: Punciton and Effects of Deficiency. *Br. Vet. J.*, 144, 482-496.

ROCHIRA, V., GRANATA, A.R.M., MADEO, B., ZIRILLI, L., ROSSI, G., CARANI, G., 2005, Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years&quest, *Asian Journal of Andrology*, 7, 3-20.

RUCINSKA, A., ROSZCZYK, M., GABRYELAK, G., 2008, Cytotoxicity of the isoflavone genistein in NIH 3T3 cells, *Cell Biology International*, 32 (8), 1019-1023.

RUIZ-LARREA, M.B., MOHAN, A.R., PAGANGA, G., MILLER, N.J., BOLWELL, G.P., RICE-EVANS, C.A., 1997 Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res* 26: 63-70.

SARKAR, F.H. VE LI Y., 2002, Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein, *Cancer and Metastasis Reviews*, 21, 265-280.

SARKAR, F.H. VE LI Y., 2003, Soy Isoflavones and Cancer Prevention, *Cancer Investigation*, 21(5), 744-757.

SAEZ J.M., 1994, Leydig Cells: Endocrine, paracrine and autocrine regulation, *Endocrine Reviews*, 15(5), 574-626.

SALEH, A., SRINIVASULA, S.M., ACHARYA S., FISHEL R., ALNEMRI E.S., 1999, Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation, *The Journal of Biological Chemistry*, 274(25), 17941-17945.

SCHWARTZMAN, R.A., CIDLOWSKI, J.A., 1993, Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death, *Endocrine Reviews* 14 (2), 133-151.

SETCHELL, K.D.R. ve CASSIDY, A., 1999, Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health, *The Journal of Nutrition*, 129, 758-767.

SEDLAK, J. ve LINDSAY, RH., 1968, Estimation of total protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, *Anal, Biochem.* 25, 192- 205.

SHARPE, R.M., 1998, The roles of oestrogens in the male, *TEM*, 9 (9), 371-377.

SHACTER, E., 2000a, Quantification and significance of protein oxidation in biological samples, *Drug Metabolism Reviews*, 32 (3-4), 307-326.

SHACTER, E., 2000b, *Protein oxidative damage*, Methods in Enzymology, Academic Press, 319, 428-436.

SHI Y., 2001, A structural view of mitochondria-mediated apoptosis, *Nature Structural Biology* 8(5), 394-401.

SHAO, Z.M., WU, J., SHEN, Z.Z., BARSKY, S.H., 1998, Genistein Exerts Multiple Suppressive Effects on Human Breast Carcinoma Cells, *Cancer Research*, 58, 4851-4857.

SIDDONS, R.C. ve MILLS, C.F.,N, 1981, Glutathione peroxidase activity and erythrocyte stability in calves differing in selenium and vitamin E status?, *Brit. J. Nutr.*, 46, 345-355.

SIMONE, R., ve PALOZZA, P., 2008, *Antioxidant activity of tocotrienols in cells and serum*, Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols, CRC Press, 99-106.

SPINOZZI, F., PAGLIACCI, M.C., MIGLIORATI, G., MORACA, R., GRIGNANI, F., RICCARDI, C., NICOLETTI, I., 1994, The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells, *Leuk Res.*, 18(6), 431-439.

SQUIER, M.K.T., MILLER, A.C.K., MALKINSON, A.M., COHEN, J.J., 2005, Calpain activation in apoptosis, *Journal of Cellular Physiology*, 159(2), 229 – 237.

STOCCO, D.M. ve CLARK B.J., 1996, Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis, *Biochemical Pharmacology*, 51(3), 197-205.

SVECHNIKOV, K., SUPORNILCHAI, V., STRAND, M.L., WAHLGREN, A., SEIDLOVA-WUTTKE, D., WUTTKE W., SÖDER, O., 2005, Influence of long-term dietary administration of procymidone, a fungicide with anti-androgenic effects, or the phytoestrogen genistein to rats on the pituitary–gonadal axis and Leydig cell steroidogenesis, *Journal of Endocrinology*, 187, 117-124.

TANAKA, K., IWAMOTO, S., GON, G., NOHARA, T., IWAMOTO, M., TANIGAWA, N., 2000, Expression of survivin and Its Relationship to Loss of Apoptosis in Breast Carcinomas, *Clinical Cancer Research*, 6, 127

TRAGANOS, F., ARDELT, B., HALKO, N., BRUNO, S., DARZYNKIEWICZ, Z., 1992, Effect of genistein on the growth and the cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells, *Cancer Research*, 52, 6200-6208.

TOLEDANO, M.B., LEONARD, W.J., 1991, Modulation of transcription factor NF- κ B binding activity by oxidation-reduction in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 4328-4332.

TOUNY, L.H.E. ve BANERJEE, P.P., 2006, Identification of both Myt-1 and Wee-1 as necessary mediators of the p21-independent inactivation of the cdc-2/cyclin B1 complex and growth inhibition of TRAMP cancer cells by genistein, *The Prostate*, 66(14), 1542 – 1555.

ULREY, D.E., 1981, Vitamin E for swine, *Journal of Animal Science.*, 53(4), 1039-1055.

VARANDA W.A. ve CARVALHO A.C., 1994, Intercellular communication between mouse Leydig cell, *American Journal of Physiology* 267(2 pt 1), C563-569.

VİCDAN, K., 2007, Erkek üreme sisteminin gelişimi ve fonksiyonları üzerinde östrojenin rolü, *İnfertilite*, 213-216.

VİCDAN, K., ERDOĞAN, D., ÖZOĞUL, C., ELMAS, Ç., 2007, *Effects of dietary phytoestrogens on mouse testis: evaluation by electron microscopy and Caspase-3 immunostaining*, *Journal Turkish-German Gynecol Assos*, 8 (3), 290-296.

WISEMAN, H., CASEY, K., BOWEY, E.A., DUFFY, R., DAVIES, M., ROWLAND, I.R., LLOYD, A.S., MURRAY, A., THOMPSON R., CLARKE D.B., 2004, Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults, *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(3), 692-699.

WOODLE, E.S., KULKARNI, S., 1998, Programmed Cell Death, *Transplantation*, 66(6), 681-691.

WANG, H ve MURPHY, P.A., 1994, Isoflavone content in commercial soybean foods, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1666-1673.

XU, J. ve LOO G., 2001, Different effects of genistein on molecular markers related to apoptosis in two phenotypically dissimilar breast cancer cell lines, *Journal of Cellular Biochemistry*, 82(1), 78 – 88.

YU, Z., LI, W., LIU, F., 2004, Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells, *Cancer letters*, 215(2), 159-166.

ZHOU, Y., LEE, A.S., 1998, Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy. *J Natl Cancer Inst* 90, 381–388.

ZWART DE, L.L., MEERMAN, J.H.N., COMMANDEUR, J.N.M., VERMEULEN, N.P.E., 1999, Biomarkers of free radical damage : Applications in experimental animals and in humans, *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2), 202-226.

ZIĘLIŃSKI, H., 2009, *Tocotrienols: Distribution and Sources Cereals—Role in Human Health*, Tocotrienols Vitamin E Beyond Tocopherols, CRC Press, New york, 23-42.

ZOU, H., ZHAN, S., CAO, K., 2008, Apoptotic activity of genistein on human lung adenocarcinoma SPC-A-1 cells and preliminary exploration of its mechanisms using microarray, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(9), 583-589.

ÖZGEÇMİŞ

27.07.1985 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Sancaktar Hayrettin İlkokulunda, orta öğrenimimi Çapa Ortaokulunda, lise öğrenimimi Pertevniyal Lisesinde tamamladım. 2003 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım ve 2007 yılında mezun oldum. Aynı yıl, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu yüksek lisans sınavını kazanarak Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.