

T.C
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KARBON TETRAKLORÜR UYGULANMIŞ SIÇANLARDA
KURKUMİN'İN TESTİS ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİSİ**

AYSEL BAYRAMOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ METE KEÇECİ

ZONGULDAK

2022

T.C
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KARBON TETRAKLORÜR UYGULANMIŞ SIÇANLARDA
KURKUMİN'İN TESTİS ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİSİ**

AYSEL BAYRAMOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ METE KEÇECİ

ZONGULDAK

2022

ÖNSÖZ

Araştırmamın yürütülmesi sırasında bilimsel uyarı ve önerilerinden yararlandığım ayrıca yüksek lisans hayatımın her sürecinde bilgi, öneri ve görüşlerini paylaşan tez danışmanım değerli hocam, sayın Dr. Öğretim Üyesi Mete KEÇECİ'ye,

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve bilgi birikimleriyle kendisinden çok şeyler öğrendiğim, tez çalışmam süresince beni yönlendiren, çalışmamın gerçekleşmesinde büyük destek sağlayan, değerli hocam Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH'A,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel katkılarıyla hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü Doç.Dr. Zehra SAFİ ÖZ'e

Yoğun ve stresli okul hayatımda ve tez çalışmamın her aşamasında motivasyon ve desteklerini esirgemeyen sevgili öğrenci arkadaşlarım Hülya Ece KUYUCU, Hatice Nur AKILLI, Şahinaz ATALAY, Ali Serdar KARATAŞ, Özgecan AYDIN ve Veteriner Hekim Osman CENGİL'e

Tüm hayatım boyunca hedeflerimi gerçekleştirmem için her yönde destekleyen, yüksek lisans eğitimim süresince de maddi ve manevi destekleri ile beni güçlü kılan kıymetli aileme,

Sonsuz ve en içten duygularımla teşekkür ediyorum.

Bu tezi özlemle andığım ve desteğini hep yanımda hissettiğim rahmetli annem Sevdâ BAYRAMOVA'ya ithaf ediyorum.

Bu tez çalışması Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2022-98210206-02)

Aysel BAYRAMOVA

Aralık 2022, ZONGULDAK

ÖZET

Aysel BAYRAMOVA, ‘Karbon Tetraklorür Uygulanmış Sıçanlarda Kurkumin’in Testis Üzerindeki Koruyucu Etkisi’, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji AD, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2022

Karbon tetraklorür, pestisitlerin, temizlik maddeleri ve çözücülerin üretiminde, kloroflorokarbonların sentezinde kullanılan kanserojen bir kimyasaldır. Karbon tetraklorür’ün, oksidatif strese neden olarak, sıçan testislerinde yapısal bozukluklara yol açtığı bilinmektedir. ‘*Curcuma longa*’nın rizomlarından elde edilen kurkumin yaygın olarak kullanılan bir nutrasötiktir. Yapılan bilimsel çalışmalarla kurkumin’in antiapoptotik, antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri açıklanmıştır.

Çalışmamızda 24 adet, erişkin 300-350 gr ağırlığında *Wistar albino* erkek sıçanlar kullanılarak 4 grup oluşturulmuştur. Kontrol grubu: 3 hafta boyunca her gün gavaj yoluyla 1 ml zeytinyağı uygulamasına tabi tutulmuştur. Kurkumin grubu: 3 hafta boyunca her gün, günde 1 kez zeytinyağında çözünmüş 200 mg/kg kurkumin gavaj yoluyla verilmiştir. Karbon tetraklorür grubu: 3 hafta boyunca gün aşırı olarak 1/1 oranda zeytinyağında çözünmüş 0.5 ml/kg Karbon tetraklorür intraperitoneal enjeksiyonla verilmiştir. Kurkumin+karbon tetraklorür grubu: 3 hafta boyunca her gün, günde 1 kez, gavaj yolu ile zeytinyağında çözünmüş 200 mg/kg kurkumin ve gün aşırı 0.5 ml/kg karbon tetraklorür intraperitoneal enjeksiyonla verilmiştir. Deney sonunda deneklerden çıkarılan testis dokuları uygun şekilde işlemlendirilmiş ve histopatolojik değerlendirmeler yapılmıştır. Testis kesitlerinde immünohistokimyasal yöntemle kaspaz-3 ve tümör nekroz faktör- α ekspresyonlarındaki değişiklikler değerlendirilmiştir. Doku örneklerinde malondialdehit ve süperoksit dismutaz analizleri yapılmıştır. Serum örneklerinde serum testosteron düzeyi çalışılmıştır.

Yapılan histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal analizler sonucunda, karbon tetraklorür’ün neden olduğu testis doku hasarında kurkuminin antiinflamatuvar, antiapoptotik ve antioksidan özellikleriyle koruyucu etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Karbon tetraklorür, Kurkumin, Testis, Tübül çapı, Oksidatif stres

ABSTRACT

Aysel BAYRAMOVA, 'Protective Effect of Curcumin on Testis in Carbon Tetrachloride Administered Rats', Zonguldak Bulent Ecevit University, Institute of Health Sciences, Department of Histology and Embryology, Master of Science Thesis, Zonguldak, 2022

Carbon tetrachloride is a carcinogenic chemical used in the production of pesticides, cleaning agents and solvents, and in the synthesis of chlorofluorocarbons. Carbon tetrachloride is known to cause structural defects in rat testicles by causing oxidative stress. Derived from the rhizomes of *Curcuma longa*, curcumin is a widely used nutraceutical. Antiapoptotic, antiinflammatory and antioxidant effects of curcumin have been explained by scientific studies.

In our study, 4 groups were formed using 24 adult *Wistar albino* male rats weighing 300-350 g. Control group: 1 ml of olive oil was applied by gavage every day for 3 weeks. Curcumin group: 200 mg/kg curcumin dissolved in olive oil was given by gavage once a day, every day for 3 weeks. Carbon tetrachloride group: 0.5 ml/kg Carbon tetrachloride dissolved in olive oil at a ratio of 1/1 every other day for 3 weeks was given by intraperitoneal injection. Curcumin+ carbon tetrachloride group: In addition to 200 mg/kg curcumin dissolved in olive oil by gavage once a day for 3 weeks, carbon tetrachloride was given by 0.5 ml/kg intraperitoneal injection every other day. At the end of the experiment, testicular tissues removed from the subjects were processed appropriately and histopathological evaluations were made. Changes in caspase-3 and tumor necrosis factor- α expressions were evaluated by immunohistochemical method in testicular sections. Malondialdehyde and superoxide dismutase analyzes were performed on tissue samples. Serum testosterone level was studied in serum samples.

As a result of histopathological, immunohistochemical and biochemical analyzes, it was observed that curcumin has a protective effect with its anti-inflammatory, anti-apoptotic and antioxidant properties in testicular tissue damage caused by carbon tetrachloride.

Keywords: Carbon tetrachloride, Curcumin, Testis, Tubule diameter, Oxidative stress

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL ve ONAY:	iii
ÖNSÖZ	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
TABLO DİZİNİ	x
ŞEKİL DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Erkek Genital Sistem	4
2.2.Testis Embriyolojisi.....	5
2.3.Testis Histolojisi	5
2.3.1.Seminifer tübüller	7
2.3.2.Sertoli hücreleri.....	8
2.3.3.İnterstisyel bağ doku.....	9
2.3.4.Spermatogenetik hücreler	10
2.4.Spermatogenez.....	10
2.5.Spermiyogenez	13
2.6.Karbon Tetraklorür ve Kullanım Alanları	14
2.6.1.Karbon tetraklorürün etki mekanizmaları.....	15
2.6.2.Karbon tetraklorürün insan organizması üzerindeki etkileri	16
2.6.3.Karbon tetraklorür kaynaklı testis toksisitesi.....	17
2.7.Oksidatif Stres ve İnfertilite.....	18
2.8.Kurkumin	20
2.8.1.Kurkumin'in antiapoptotik etkisi.....	22
2.8.2.Kurkumin'in anti-inflamatuar etkisi	24
2.8.3.Kurkumin'in antioksidan etkileri.....	25
3.GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1.Deney Hayvanları	26
3.2.Kimyasalların Hazırlanması	26
3.3.Vücut Ağırlıklarının Ölçümü.....	27

3.4.Dokuların Alınması	27
3.5.Dokuların Hazırlanması	28
3.6.Kesitlerin Alınması ve Boyanması	29
3.7.Histolojik Değerlendirme ve Cosentino Skorlaması	32
3.8.Morfometrik İncelemeler	33
3.9.İmmünohistokimyasal İncelemeler	34
3.10.Biyokimyasal Analizler	35
3.11.İstatiksel Analiz	35
4.BULGULAR	36
4.1.Vücut Ağırlıkları	36
4.2.Testis Ağırlıkları	37
4.3.Biyokimyasal Bulgular	38
4.4.Histolojik Bulgular	40
4.4.1.Hematoksilen eozin boyama	40
4.4.2.Cosentino skor değerlendirilmesi	51
4.4.3.Tübül çapı değerlendirilmesi	52
4.4.4.Epitel yüksekliği değerlendirilmesi	52
4.4.5.PAS	54
4.4.6.Mason trikrom	55
4.5.İmmünohistokimyasal Bulgular	56
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇLAR	66
7. KAYNAKLAR	68
8. EKLER	76
9. ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMH	: Anti Müller hormon
CAT	: Katalaz
CCl₃	: Triklorometil Radikali
CCl₃OO	: Triklorometil Peroksil
CCl₄	: Karbon Tetraklorür
CO₂	: Karbondioksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EPA	: ABD Çevre Koruma Kurumu
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
GPX	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon S-Transferaz
H/E	: Hematoksilen eozin
İL-2	: İnterlökin 2
İp	: İntraperitoneal
LH	: Luteinleştirici hormon
MDA	: Malondialdehit
OS	: Oksidatif Stres
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SRX	: Sex-Determining Region Y
TBF	: Testis Belirleyici Faktör
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1. Spermatogenezde basamaklar.	12
2. İnsan Katılımcılarda kurkuminin moleküler hedefleri	22
3. Deney grupları.....	27
4. Doku takibinde kullanılan kimyasallar ve süreleri.....	28
5. Testis dokusu için H/E boyama protokolü.	30
6. Testis dokusu için PAS ve Masson trikrom boyama protokolü.	32
7. Cosentino testis hasarının histolojik derecelendirme sistemi.....	33
8. Denek ağırlıklarının karşılaştırılması.	37
9. Testis ağırlıklarının karşılaştırılması.....	37

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Erkek genital sistem	4
2. Testis ve epididimis histolojisi	7
3. İntratestiküler organizasyonun şematik gösterimi	9
4. Spermatogenetik seri hücreleri.....	12
5. Spermiyogenez ve olgun spermin yapısı.....	14
6. Kurkuminin etkileri.....	21
7. Curcuma longa ve kurkumin'in çalışmalarındaki etkileri.....	24
8. Testis dokularının eksizyonu.....	28
9. Grupların MDA düzeylerinin karşılaştırması.....	38
10. Grupların SOD düzeylerinin karşılaştırması.....	39
11. Grupların serum testosteron düzeylerinin karşılaştırması.....	40
12. Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması, x50.....	41
13. Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması, x100.....	42
14. Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması, x200.....	42
15. Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması, x400.....	43
16. Kurkumin grubuna ait kesitin H+E boyaması, x50.....	43
17. Kurkumin grubuna ait kesitin H+E boyaması, x100.....	44
18. Kurkumin grubuna ait kesitin H+E boyaması, x400.....	44
19. CCL ₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması, x50.	45
20. CCL ₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması, x100.	46
21. CCL ₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması, x200.	46
22. CCL ₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması. Damar konjesyonu, x100.....	47
23. CCL ₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması. Dev hücre oluşumu, Ax200, B x400.	47
24. CCL ₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması, A x200, B x400.	47
25. Kurkumin+ CCL ₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması, x50.	48
26. Kurkumin + CCL ₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması, x100.	49
27. Kurkumin + CCL ₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması, x200.	49
28. H+E boyanmış preparatlarda bütün grupların karşılaştırmaları, A x100, B x200, C x400.....	50
29. Grupların Cosentino skor değerleri.....	51
30. Gruplara göre tübül çapı değerlendirmeleri.	52
31. Gruplara göre epitel yüksekliği değerlendirmeleri.	53
32. Bütün gruplar için Tübül çapı ve Epitel yüksekliği ölçümleri, x200.....	53
33. PAS boyanmış preparatlarda bütün grupların karşılaştırmaları, A x100, B x200, C x400.....	54
34. Mason trikrom preparatlarında bütün grupların karşılaştırmaları, A x100, B x200, C x400.	55
35. Tüm gruplarda TNF- α ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.	56

36. TNF- α immünreaktivitesi için H-SCORE değerlendirmesi.....	57
37. Tüm gruplarda kaspaz-3 ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.	58
38. Kaspaz-3 immünreaktivitesi için H-SCORE değerlendirmesi.	58



1. GİRİŞ

Çevresel toksik maddeler ve çeşitli kimyasallar, metabolik aktivasyon yoluyla serbest radikaller gibi oldukça reaktif maddelere dönüşerek vücudumuzun farklı organlarında ciddi hücresel hasara neden olmaktadır (1). Çevre kirliliği kaynakları arasında endüstriyel ve tehlikeli atık alanları yer alır. Karbon tetraklorür (CCl_4) 15 Kasım 1990 tarihli ABD Temiz Hava Yasası Değişiklikleri (CAAA90) kanunu ile imzalanan Temiz Hava Yasası'nda listelenen 190 tehlikeli hava kirleticisi listesinde yer almaktadır (2).

Berrak, yanıcı olmayan, kolayca buharlaşan CCl_4 doğal olarak oluşmamasına rağmen, çevrede her yerde bulunur. CCl_4 'e en çok maruz kalanlar bu kimyasalı üreten veya kullanan endüstrilerde çalışan işçilerdir. Bu işçiler hava taşımacılığı çalışanları, kuru temizlemeciler, tehlikeli atık çalışanları, müze çalışanları, pestisit uygulayıcıları, ilaç üreticileri, çelik fabrikası, telefon ve telgraf ekipmanı üreticileri, kalay atık geri kazanım operasyonlarında çalışanlardır. Bu bileşen başta karaciğer ve böbrek olmak üzere akciğer, testis, beyin, kalp ve diğer dokularda güçlü toksik etkiye sahiptir (1,3).

CCl_4 'ün insanlar için toksik olduğunun bilinmesine rağmen halen tahılların fümigasyonunda, kuru temizlemede, yangın söndürücülerin doldurulmasında ve insektisit olarak kullanılmaktadır (4).

CCl_4 oldukça toksik, bilinen bir hayvan ve potansiyel bir insan kanserojendir. Deney hayvanlarında CCl_4 uygulaması serbest radikaller yoluyla lokalize hücresel hasara neden olan ajanların incelenmesi için sık kullanılan bir model haline gelmiştir (5).

Oksidatif stres, serbest radikallerin üretimi ile vücudun enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanır (6). Testislerde artan oksidatif stres, germ hücre apoptozisine, seminifer tübüllerde germ hücre dejenerasyonuna, testislerde mikrovasküler kan akışı ve endokrin sinyallemede değişikliklere yol açar ve erkek infertilitesinde bir tetikleyici olarak görülür (7). Aynı zamanda oksidatif stres, sperm hücresi plazma zarında bulunan protein ve lipidlerin eş zamanlı olarak hasar görmesi sonucu DNA'nın bütünlüğünü bozarak sperm fonksiyonu üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir (8).

CCl₄ tarafından indüklenen doku hasarındaki ilk adım, sitokrom P450 aracılı triklorometil radikali (CCl₃) ve triklorometil peroksil (CCl₃OO) serbest radikallerinin oluşumudur. Testislerin CCl₄ için büyük bir afinitesi vardır. Testisler CCl₄'ün toksik metabolitlere dönüşmesini aktive eden sitokrom P450 içerir ve CCl₄ birikmesi bu organda hasara neden olur. CCl₃ serbest radikallerinin aşırı üretimi, membran lipid ve protein oksidasyonunu başlatır ve sonunda çeşitli patolojik değişikliklere yol açar (4).

Tıbbi bitkilerdeki polifenolik bileşikler gibi eksojen antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyerek antioksidan savunma oluşturabilir (9). Bu bitkilerde bulunan ve oksidatif hasarı önlemeye yardımcı olabilecek antioksidanlara artan bir ilgi vardır. Bitkisel ürünler uzun zamandan beri ilaç kaynağı olarak kullanılmakta ve bu nedenle mevcut araştırmalar artık bitki kaynaklı doğal olarak oluşan antioksidanları bulmaya yöneliktir. Doğal antioksidanların yan etkileri olmaması ve ekonomik olmaları dünyadaki son bilimsel gelişmelerde tercih edilmesi nedeni olarak görülmektedir (10). Kurkumin, Asya'nın tropikal bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilen çok yıllık bir bitki olan *Curcuma longa* Linn'in (Zerdeçal) toz haline getirilmiş kuru köksapından elde edilir. Kurkumin, anti-inflamatuar, anti-oksidan, antifungal, antibakteriyel ve antikanser aktiviteler göstermiştir (11,12).

Bu çalışmada CCl₄ kaynaklı testis dokusu hasarında, kurkumin'in koruyucu etkisini göstermek amaçlanmıştır.

Çalışmamızda Testis dokusunun Hematoksilen-Eozin ile boyanmış preparatlarında, kontrol ve kurkumin gruplarının normal doku morfolojisi sergilediği gözlemlenmiştir. CCl₄ grubunda ise seminifer tübüllerde atrofi, germinal hücrelerde dejenerasyon, disorganizasyon, tübül lümeninde immatür hücreler, çok çekirdekli sinsityal hücre oluşumu ve damar konjesyonu gibi testiküler lezyonlar izlenmiştir. CCl₄ ile birlikte kurkumin verilen deneklerin testis dokularında, bazı tübüllerde hasar gözlense de genellikle normale yakın yapıda seminifer tübüller, düzenli germinal epitel, normal interstisyel alan dikkati çekmiştir. TNF- α ve kaspaz-3 ifadelerinin, CCl₄ grubunda diğer gruplara göre daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Oksidatif stres göstergesi olarak çalışılan malondialdehit düzeyleri, CCl₄ grubunda en yüksek seviyede bulunmuştur. Antioksidan bir enzim olan süperoksit dismutaz düzeyleri açısından tüm gruplar karşılaştırıldığında, kurkumin tedavisinin enzim seviyesini

yükselttiği gör÷lm÷şt÷r. Ayrıca CCl₄ grubundaki deneklerin serum tetstosteron düzeylerinde de diğer gruplara göre belirgin düzeyde düş÷ş saptanmıştır.

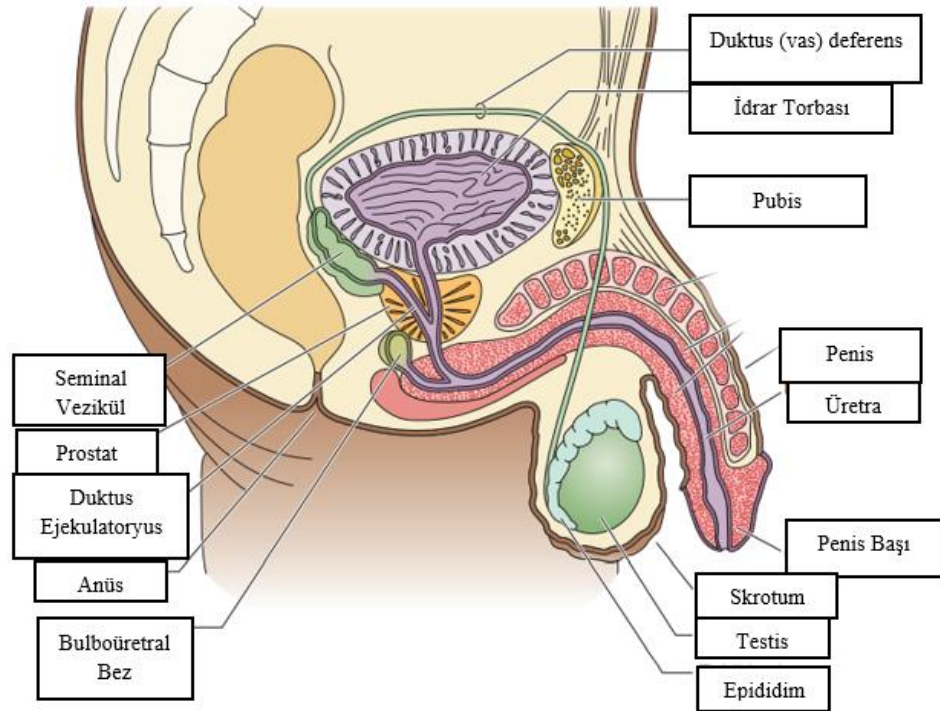


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Genital Sistem

Sperm üretmek erkek genital sistemin en önemli görevlerinden biridir. Erkeklerde pubertede spermatogenez sonucunda her bir spermatogonyumdan dört adet spermiyum oluşumu başlar. Erkek germ hücresinin dişi genital sisteminin katkısı olmadan fertilize etme kapasitesi yoktur. Yardımcı bezler sayesinde hareket etme özelliği kazanan spermiler oositi dölleme yeteneğini dişi genital sisteminde kapasitasyon geçirerek kazanır (13).

Erkek genital sistem iç (testis, epididim, duktus (vas) deferens) ve dış (penis, skrotum) genital organlar olmak üzere ikiye ayrılır. Tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens ve duktus ejakulatoryus erkek genital kanal sistemini, seminal vezikül, prostat ve bulboüretral bez ise yardımcı bezleri oluşturur (14) (Şekil1).



Şekil 1. Erkek genital sistem (14).

2.2. Testis Embriyolojisi

Y kromozomu kısa kolu üzerindeki cinsiyeti belirleyen bölge SRY geni seksüel dimorfizmin anahtarıdır. Bu genin sentezlediği protein testis belirleyici faktör (TBF) varsa fetüsün cinsiyeti erkek olarak gelişir. Embriyonun cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlenmiştir. Gelişimin yedinci haftasına kadar gonadlar erkeğe veya dişiye ait morfolojiye sahip değildir.

TBF'yi belirleyen faktör olan SRY geninin etkisi sonucunda, primitif cinsiyet kordonları olan medullar kordonları (testis) oluşturmak üzere, çoğalarak medullanın derinliklerine doğru ilerlerler. Bezin hilusuna doğru ilerleyen kordonlar, sonrasında rete testisi oluşturacak olan hücre dizileri halinde dağılırlar. Testis kordonlarını yüzey epitel tabakasından yoğun fibröz bağ doku tabakası olan tunika albuginea ayırır. Dördüncü aydan itibaren at nalı şeklini alan testis kordonlarının açık kalan uçları rete testisle devam eder. Sertoli hücreleri bezin yüzey epitelinden gelişir. İnterstisyel leydig hücreleri ise gonadal sırtın mezenşiminden köken alır. Testisler genital kanal ve dış genital organların gelişimini gestasyonun sekizinci haftasından, yani leydig hücrelerinin testosteron üretmeye başlamasından sonra etkilemeye başlar. Testis kordonları pubertede lümenleri açılarak seminifer tübüllere dönüşürler. Seminifer tübül kanalları daha sonra rete testis tübülleri ile birleşir ve duktuli eferenteslere ulaşırlar. Duktuli eferentesler rete testisle sonra duktus deferens adını alacak olan mezonefrik veya wolffian kanalları ile birbirine bağlanırlar (15).

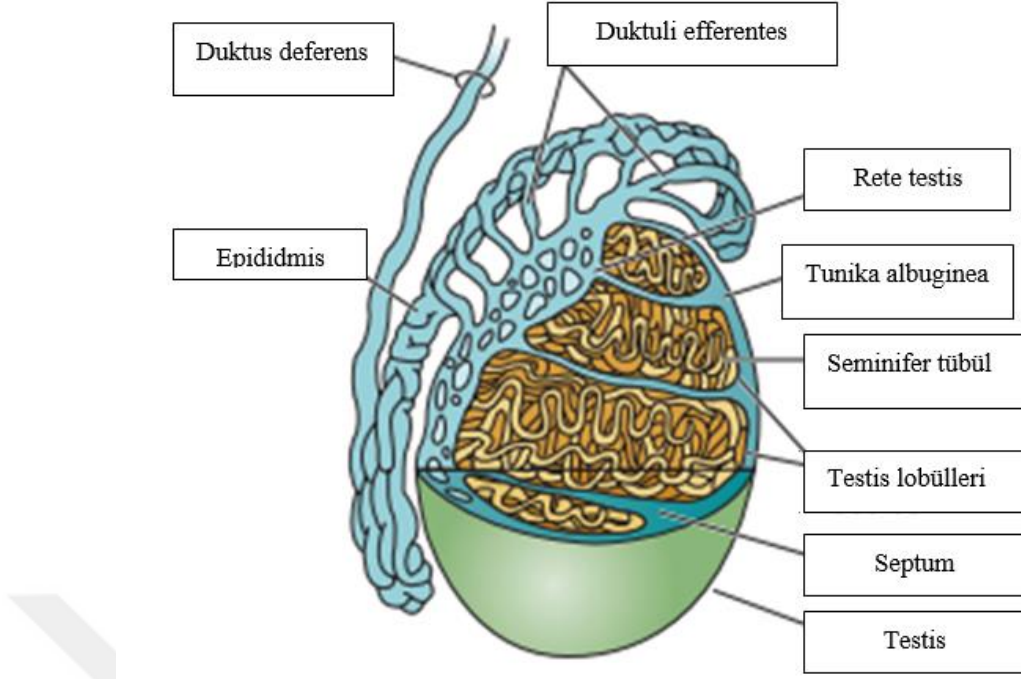
2.3. Testis Histolojisi

Testisler skrotumun içerisinde yer alan hem ekzokrin hem de endokrin fonksiyonu olan bir çift oval organdır. Testislerin ekzokrin fonksiyonu spermatogenez (sperm üretimi) endokrin fonksiyonu ise steroidogenezdir (seks hormonları olarak bilinen andorjenleri sentezlemek).

Androjenlerden en önemlisi olan testosteron spermatogenez, embriyonun erkek fetüse gelişimi ve seksüel dimorfizmden sorumludur (16).

Testis üç tabakalı bir kapsül ile çevrilidir. Bu kapsülün en altında kan damarları içeren gevşek bağ dokusu yapısındaki tunika vasküloza bulunur. Tunika albuginea kapsülün en kalın ve belirgin tabakasıdır. Testise giren, çıkan kan ve lenf damarları, kanallar tunika albuginea'nın arka yüzünden kalınlaşarak oluşan mediastinum testis denilen bu tabaka içinde bulunur. Tunika vajinalis testisin anterolateral yüzeyinde bulunan mezotel ile döşeli iki katlı periton tabakasıdır. Testis içinde kapsülden itibaren uzanan septumlar tarafından ayrılan lobüller kan damarları, sinirleri, interstisyel hücreleri ve seminifer tübülleri içerir. Bu lobüller insanlarda 250'ye ulaşmaktadır. Bu lobüllerin her biri 1-4 adet seminifer tübül içerir. Lobüllerin apeksinde bulunan tubuli rekti düz seyreden tübüller olarak bilinmektedir (17).

Düz tübüller rete testis ile devam etmektedir (Şekil 2). Rete testis tek bir apikal silyum ve mikrovillus içeren tek katlı kübik veya prizmatik epitel ile döşelidir. Duktuli efferentes rete testisi epididmisin baş kısmına bağlamaktadır. Burada bulunan kanalların epiteli yalancı çok katlı prizmatik silyumlu epiteldir. Epitelin kısa boylu hücrelerinde silyum yerine mikrovillus bulunur. Hücrelerin boyutlarındaki farklılıktan dolayı epitel girintili çıkıntılı görünümündedir. Kanallarda bulunan sirküler kas tabakası ve silyumlar sayesinde spermiyumların kanal boyunca hareketi sağlanır. Duktuli efferentes hücreleri aynı zamanda seminifer tübübüllerden salgılanan sıvının büyük kısmını reabsorbe eder (17).



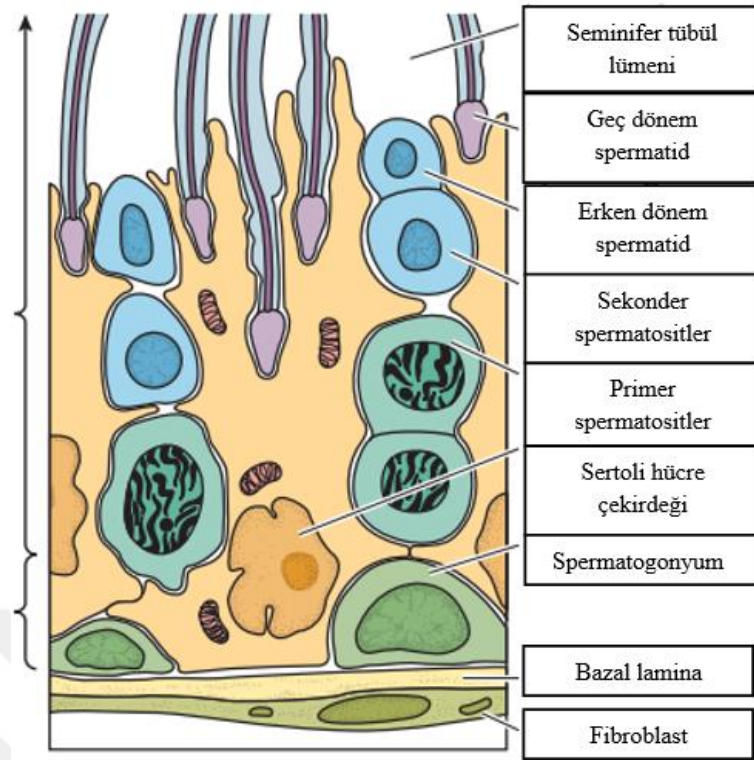
Şekil 2. Testis ve epididmis histolojisi (18).

2.3.1. Seminifer tübüller

Çok katlı epitel ile döşeli olan çapı yaklaşık 150-250 mikrometre, uzunluğu 30-70 santimetre olan bu tübüller her testiste 250-1000 adet bulunmaktadır. Seminifer tübüller kıvrımlı kör uçlu tübüllerdir. Rete testise bağlanmak için bu tübüller tubuli rekti (düz tübüller) olarak devam eder. Duktuli efferentes ile rete testis epididimisin baş kısmına bağlanır. Seminifer tübüller germinal epitel, bazal lamina ve fibröz bağ dokusundan oluşmaktadır. Epitel altında bulunan fibroblast içermeyen tunika propriya tabakasında düz kas hücrelerine benzer, kontraksiyonu sonucunda spermiyumların lümene itilmesini sağlayan miyoid hücreler bulunmaktadır. İnsanlarda 3-5 sıra halinde bulunan bu tabaka kemirgenlerde tek tabaka halinde bulunur. Bu tabaka peritübüler doku olarakta bilinmektedir. Spermatogenetik hücreler seminifer tübüllerde üretilir. Tübüllerde aynı zamanda germ hücrelerine destek olan beslenmesini sağlayan sertoli hücreleri de bulunur (19).

2.3.2. Sertoli hücreleri

Sertoli hücrelerinin koruma, besleme, fagosit etme, bariyer görevleri bulunmaktadır. Gelişmekte olan germ hücrelerini destekleyen, besleyen aynı zamanda koruyan önemli hücrelerdendir. Gelişimlerini tamamlamamış spermatogenetik hücreleri fagosit eder. Tübülde bulunun diğer hücrelerden farklı olarak bölünme yetenekleri yoktur. Bazal sitoplazmaları lümene kadar uzanan, belirgin yuvarlak ökramatik nükleuslu hücrelerdir. Soluk boyanan sitoplazmalarının apikal bölümlerinde gelişim sürecinde olan spermatozoonların başları bulunmaktadır. Spermatogenetik hücreleri saran çok sayıda uzantıları olduğu için ışık mikroskopunda sınırlarını seçmek güçtür. Komşu sertoli hücreleri birbirine zonula okludens türü bağlantı, bazal lamina ile ise hemidesmozomlar ile bağlanır (Şekil 3). Erken dönem spermatogenetik hücreler ile sertoli hücreleri arasında ise desmozom benzeri bağlantılar bulunur. Bu bağlantı kompleksleri kan testis bariyeri olarak bilinen bariyeri oluşturmaktadır. Bazalde erken dönem primer spermatositler ve spermatogonyumlar, lümende olgun spermatositler ve spermatidler bulunur. Olgunlaşarak lümene ulaşmaya çalışan spermatogenetik hücreler sertoli hücreleri arasındaki bariyeri aşmalıdırlar. Kan testis bariyeri kandan gelen zararlı maddelere karşı germ hücrelerinin korunması için önemlidir. Yüksek oranda testosteron bağlayan androjen bağlayıcı protein (ABP) sertoli hücreleri tarafından sentezlenir. Ayrıca sertoli hücreleri plazminojen aktivatörleri, transferin ve folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımını baskılayan inhibin sentezlerler. Erkek fetüste paramезonefrik kanalın gerilemesini sağlayan Anti-Müllerian hormon (AMH) salgırlar. Bu kanal erkek karakterlerinin gelişimi için çok önemlidir (20).



Şekil 3. İntratestiküler organizasyonun şematik gösterimi (18).

2.3.3. İnterstisyel bağ doku

Yapısal olarak testis seminifer tübülleri ile bunlar arasında yer alan interstisyel bağ dokudan oluşmaktadır. İnterstisyel alan seks steroid hormonu olarak bilinen testosteron sentezleyen Leydig hücrelerini içermektedir. İnterstisyel kompartman aynı zamanda peritübüler myoid hücreler, kan damarları, mast hücreleri, lenfatikler, fibroblastlar, nörovasküler hücreler ve makrofajlardan oluşmaktadır. Leydig hücreleri yuvarlak çekirdekli, yuvarlak veya poligonal şekilli, asidofil sitoplazmalı hücrelerdir. Steroid sentezledikleri için sitoplazmalarında bol miktarda lipid damlacıkları bulunur.

Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteron kolesterolden bir dizi aşamada sentezlenir. Bu hormon gonodotropin salgılanması, spermatogenez, embriyonik ve fetal yaşam sırasındaki cinsiyet farklılaşması, erkeklerde penis büyümesi, vücut kılları, erkek tipi ses, kasların gelişmesi gibi sekonder seks karakterlerinin gelişimini ve sperm oluşmasını sağlayan önemli bir hormondur. Leydig hücreleri endokrin sekresyonunu sentezledikleri testosteon hormonunu kan veya lenf dolaşımına boşaltarak yapar. Bu hücreler testis hacminin %5-12'sini oluşturur. Leydig

hücrelerinin sitoplazmasında “Reinke kristali” denilen yapılar bulunur. Bu yapılar leydig hücre tümörlerinde tanısal amaçlı kullanılmaktadır (14).

2.3.4.Spermatogenetik hücreler

Spermatogenetik hücreler sürekli çoğalan ve olgunlaşmış spermlere farklılaşan hücrelerdir. Gelişim evresinde gonadal yolk kesesinden kaynaklanan ve gonadal kabartılarda kolonize olan primordial germ hücreleri bölünerek spermatogonyumlara, spermatogonyumlar spermatositlere, spermatidlere ve en son olgun spermiyumlara dönüşürler. Bu hücreler gelişim evrelerinin durumuna göre sertoli hücreleri arasında düzenli bir tabakalanma göstermektedirler. En immatür hücre olan spermatogonyumlar bazal membran üzerine otururlar. Lümene doğru sırayla primer spermatositler, sekonder spermatositler ve lümende gelişimini tamamlamış en olgun germ hücresi olan spermiyumlar bulunmaktadır (21)(Şekil 3).

2.4. Spermatogenez

Spermatogenez, diploid spermatogonyanın seminifer tübüllerde haploid spermatozoaya farklılaştığı, kompleks olaylar dizisidir. Otokrin, endokrin ve parakrin faktörlerle düzenlenen gonodotropinlerin etkisi altında devam eder. Sertoli hücrelerini uyaran Folikül-Stimulan Hormon (FSH) ve leydig hücrelerini uyaran Lütenizan hormon (LH) bu süreçte önemli olan hormonlardır.

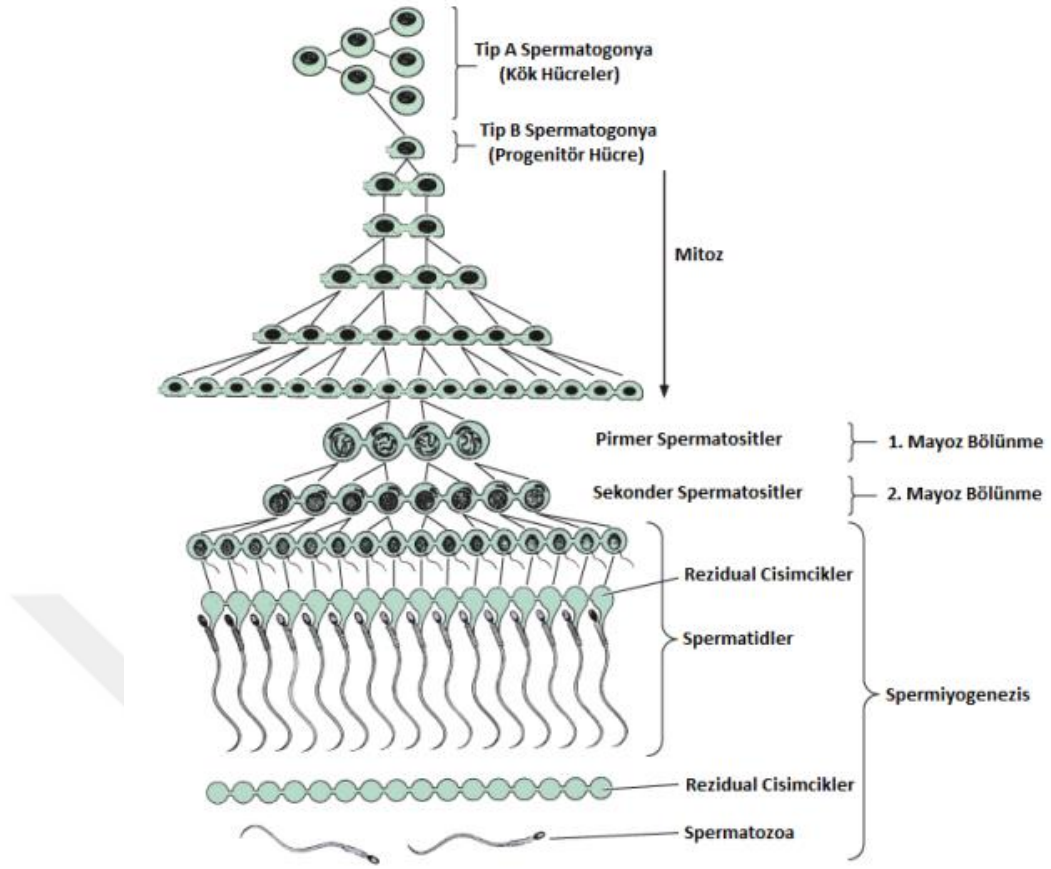
Spermatogenez insanda ortalama 74 gün sürer. Spermatogonyal kök hücreler farklılaşma ve yenilenme özelliklerinden dolayı haploid yapıda spermatozoa hücresine dönüşür. Germ hücreleri her aşama sonrasında, seminifer tübüllerin bazal kompartmanından ayrılarak, lümene doğru ilerlerler. Bu süreç puberte ile birlikte başlar ve genellikle ölüme kadar kesintisiz devam eder, ancak yaşla birlikte üretilen sperm miktarında hafif bir azalma görülebilmektedir (22).

Primordiyal germ hücrelerinden köken alan spermatogonyumlar mitoz geçirerek spermatositleri oluşturur. Spermatogonyumlar üçe ayrılırlar. Tip A koyu

spermatogonyumlar yoğun bazofilik nükleuslu ince granüler kromatine sahip, kök hücre olarak kaldığı düşünülen hücrelerdir. Tip A açık spermatogonyumlar ince granüler, açık boyanan nükleuslu, çok sayıda mitoz geçirerek sayılarını artıran hücrelerdir. Tip B spermatogonyumlar ise Tip A açık spermatogonyumlardan farklılaşan, nükleolus çevresinde kaba kümeler yapan yuvarlak nükleuslu hücrelerdir.

Tip B spermatogonyumlar mitozla bölünerek primer spermatositleri oluşturur. Normalin iki katı kromozom sayısına ($4n$) ve iki katı DNA'ya sahip primer spermatositler DNA'larını replike ederek mayoz bölünme için hazırlanırlar. Büyük nükleusları ve geniş sitoplazmaları ile primer spermatositler ışık mikroskopunda kolayca seçilirler. Primer spermatositler birinci mayozu geçirerek sekonder spermatositleri oluşturur.

Oluşan bu hücreler kısa süre içinde ikinci mayoza girdikleri için kesitlerde bu hücrelere az rastlanır. 22 otozom ve bir seks kromozomu (X veya Y), $2n$ sayıda DNA'ya sahip sekonder spermatositler DNA sentezlenmeden ikinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Sekonder spermatositlerden ikinci mayoz bölünme sonucunda spermatidler oluşur (Şekil 4). Spermatidler 23 kromozom ve n sayıda DNA'ya sahip hücrelerdir (23) (Tablo 1).



Şekil 4. Spermatogenetik seri hücreleri (23).

Tablo 1. Spermatogenezde Basamaklar (22).

Hücre tipi	Kromozom sayıları	Hürenin girdiği süreç
Spermatogonyum (Ad, Ap ve B tipleri)	Diploid (2N)/46	Spermatositogenez (mitoz)
Primer spermatosit	Diploid (2N)/46	Mayoz I
Sekonder spermatosit	Haploid (N)/23	Mayoz II
Dört spermatid	Haploid (N)/23	Spermiyogenez
Dört fonksiyonel spermatozoid	Haploid (N)/23	Spermiasyon

2.5. Spermiyogenez

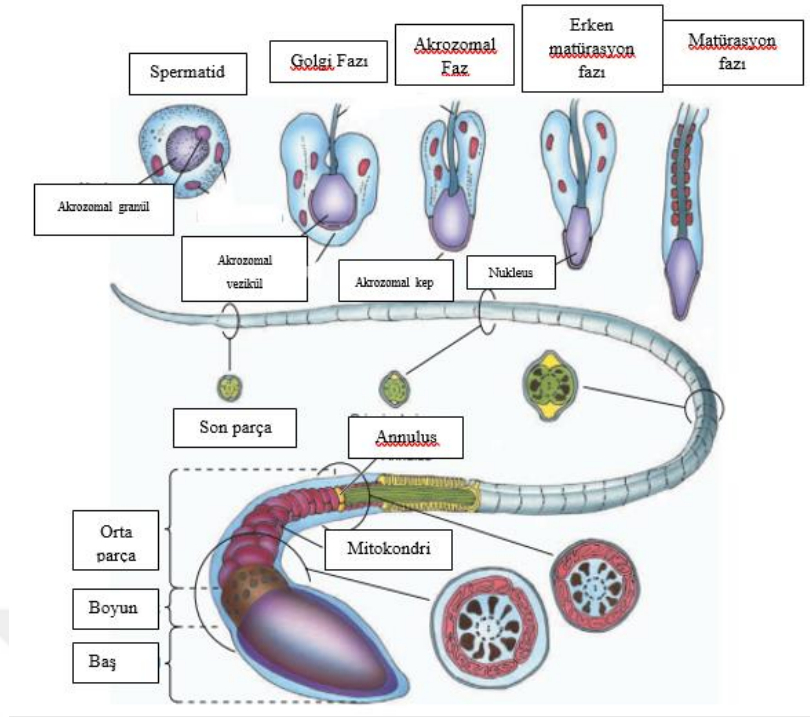
Spermiyogenez, spermatidlerin sitoplazmalarının büyük kısmını kaybettiği ve spermatozoaya dönüştüğü aşamadır. Spermiyogenezin dört aşaması vardır; Golgi fazı, kap fazı, akrozomal faz ve olgunlaşma fazı (Şekil. 5).

Golgi fazı, adından da anlaşılacağı gibi, hidrolitik enzimlerin Golgi aygıtı tarafından akrozomal granül içeren akrozomal vezikül oluşturmak üzere birbirleriyle kaynaşan kesecikler halinde paketlenmesini içerir. Ayrıca flagellar aksonem ve bağlantı parçası oluşum sürecindedir. Akrozomal vezikül sadece başlık fazında genişlemekle kalmaz, aynı zamanda nükleer membrana yapışır ve onu kısmen sarar ve akrozom olarak bilinir hale gelir.

Akrozomal faz sırasında spermatid çekirdeği düzleşir ve küçülür, tüm hücre uzar ve mitokondri tek bir yerde toplanır. Ek olarak, geçici silindirik bir mikrotübül topluluğu olan bir manşet oluşur ve bu da spermatidin bir spermatozoona dönüşürken uzunluğunun daha da artmasına neden olur. Baş kısmı ayrıştıkça, gelişen spermatozoonun ana ve orta parçaları arasındaki bağlantıyı belirleyen halka oluşur. Mitokondri orta parçada toplanır ve dış yoğun lifler ve fibröz kılıf oluşur.

Spermiyogenezin son aşaması, spermatidlerin fazla sitoplazmalarını saldığı ve spermatozoayı sinsityumdan serbest bıraktığı olgunlaşma aşamasıdır. Spermatozoa, dişi üreme kanalında kapasitasyona uğrayana kadar hareketsizdir. Sertoli hücrelerin hücre kalıntıları fagosite ettiği süreç spermiyasyon olarak bilinir.

Spermatozoa, bir baş ve uzun bir kuyruktan oluşan yaklaşık 65 µm uzunluğunda haploid hücredir. Sperm hücresinin başı 5 µm'den daha kısadır ve haploid çekirdeği ve nükleer zar ve plazma zarı ile temas eden enzim dolu akrozomu barındırır. Spermatozoon yumurtayı çevreleyen zona pellucida'daki ZP3 molekülü ile temas ettiğinde, sperm akrozom reaksiyonuna girerek, nöraminidaz, hiyalüronidaz, aril sülfataz, akrosin (tripsin benzeri bir enzim) ve akrozomda bulunan asit fosfataz enzimlerini serbest bırakır. Bu enzimler spermatozoon yolu üzerindeki zona pellucida'yı bozarak spermin yumurtaya ulaşmasını ve yumurtayı döllemesini kolaylaştırır (24).



Şekil 5. Spermiyogenez ve olgun spermin yapısı (25).

2.6. Karbon Tetraklorür ve Kullanım Alanları

1839 yılında klor ile kloroform reaksiyonu sonucu Fransız kimyager Henri Viktor Regnault tarafından sentez edilen karbon tetraklorür (CCl_4) günümüzde esas olarak metandan sentezlenir (26). CCl_4 şeffaf, renksiz, sıvı halde bir maddedir. doğal bulunmasada bir sıra kimyasal reaksiyon sonucunda oluşabilir. Bir karbon atomu dört klor atomuna sahip tetrahedral yapıda olan bu kimyasal atmosferde 30-100 yarı yıllık ömüre sahiptir (27). CCl_4 'ün zararlı etkilerine rağmen, çeşitli yağlar, vernikler, cilalar, kauçuk mumlar, böcek öldürücüler, yangın söndürücü ve pestisitlerin üretimi, reçine çözücü olarak ve organik bileşiklerin ana maddelerinde, temizlik maddeleri ve çözücülerin üretiminde, kloroflorokarbonların sentezinde yaygın olarak kullanılırken, toksisitesi keşfedildikten sonra kullanımı kısıtlanmıştır. Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi (EPA) CCl_4 'ü Grup B2 kanserojen sınıfına dahil etmiştir (28).

2.6.1. Karbon tetraklorürün etki mekanizmaları

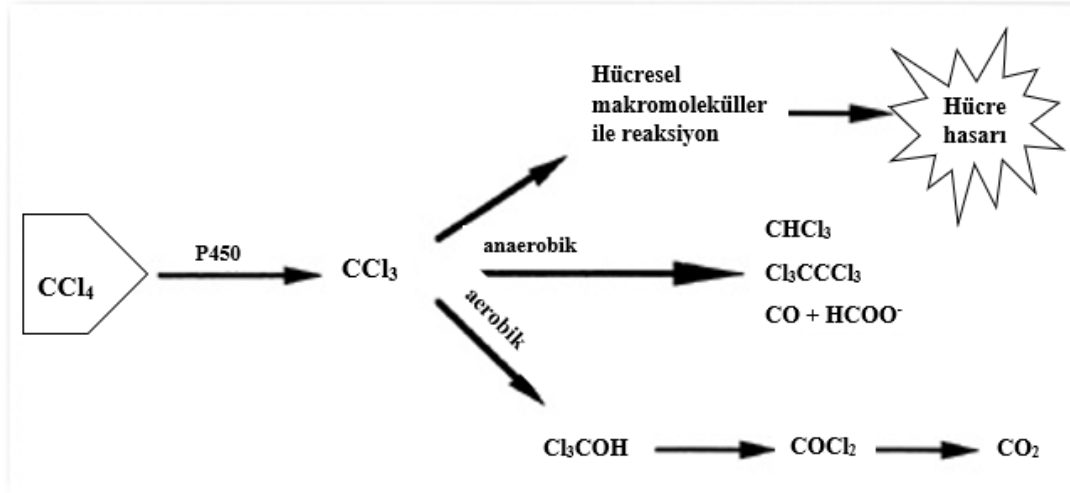
CCl_4 , soluma, yutma ve deriden emilim yoluyla vücuda girer. Birincil maruziyet şekli solunum yoludur. İnsanlarda solunum sisteminde maruziyet sonrası pulmoner absorpsiyonun %60 olduğu tahmin edilmektedir. Yağ ve alkol CCl_4 'ün bağırsakta emilimini arttırdığı için gastrointestinal sistemde CCl_4 'ün emilimini hızlandırır (28,29).

CCl_4 'ün kolayca buharlaşması nedeniyle çevredeki havadan küçük miktarlarda olsa da maruziyeti söz konusudur bu sebepten CCl_4 'ün kimyasal atık olarak havaya, suya ve toprağa karışması kontrol edilemez (30).

CCl_4 'ün oluşturduğu hasarda ilk reaksiyon, tek bir elektronun C-Cl bağına aktarılmasıyla sitokrom P450 aracılı transferin olmasıdır. Bu olay, bir ara metabolit olan CCl_3 oluşumuna ve daha sonra oksijen varlığında triklorometil peroksil radikaline CCl_3OO dönüşmesine sebep olur. CCl_4 'ün oluşturduğu bu reaktif serbest radikal metabolitleri, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatır veya hücre zarının bozulmasına, mikrozomal enzimlerin sızmasına ve dolayısıyla protein ve yağ asitlerine kovalent olarak bağlanarak hücre hasarına neden olur. Lipid peroksidasyon ürünleri oldukça reaktiftir ve konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre sinyallemede seçici değişikliklere, protein ve DNA hasarına ve sitotoksiteye neden olan etkiler ile sonuçlanır (28).

CCl_4 toksisitesi sonucunda oluşan lipid peroksidasyonunu oksidatif strese neden olur ve lipid peroksidasyonu belirteci olarak bilinen MDA (Malondialdehit) seviyesini artırır. CCl_4 yağda çözünebilme özelliğinden dolayı hücre membranından geçmekte ve karaciğerde aşırı lipid birikimine, karaciğerde doku düzeyinde bozulmalara ve siroza neden olabilmektedir (31). CCl_3 radikali ayrıca anaerobik reaksiyonlara girerek kloroform (CHCl_3), heksakloroetan (Cl_3CCl_3) ve karbon monoksit (CO) dahil olmak üzere çeşitli toksinlerin oluşumuna neden olur.

Aerobik metabolizmada, CCl_3 radikali, daha sonra CO_2 oluşturmak üzere hidrolize edilen fosgenin (COCl_2) bir öncüsü olan triklorometanol (Cl_3COH) oluşturur (32).



Şekil 6. CCl₄ metabolizması ürünleri (32).

CCl₄ 'ün ilk hedef organı karaciğer olmakla beraber, testislere, böbreklere, beyine ve akciğerlere zarar veren bir kimyasal olduğu belirtilmiştir (33). Hayvan modellerinde fetüs için toksik olmamasına rağmen, yapılan çalışmalar sonucu, insan fetüsü için gelişimin sonraki aşamalarında işlevsel olabileceğini ve sigara dumanı gibi anne maruziyetleri tarafından indüklenebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, insan fetüsünün CCl₄'ün olumsuz etkilerine duyarlılığı, gelişim aşamasına ve maruz kalma süresine ve konsantrasyonuna bağlı olabilir (32).

2.6.2. Karbon tetraklorürün insan organizması üzerindeki etkileri

Yalnızca 3-5 ml kadar CCl₄'ün insanlar tarafından oral yolla alınması ile bütün dokulara dağılır ve ölüm ile sonuçlanabilir. En fazla yağ dokusunda biriken bu kimyasal %50-80'i akciğerler tarafından absorbe edilir ve yaklaşık %4'ü direkt olarak CO₂'e dönüştürülerek akciğerlerle, az miktarda da böbrekler yoluyla atılır. Kuru temizlemeciler, müze çalışanları, pestisit uygulayıcıları, oto tamirciler, hava taşımacılığı çalışanları, telefon ve telegraf ekipmanı üretenler, yaşam alanları kimya fabrikalarına yakın olanlar CCl₄'e en çok maruz kalabilecek insan grupları olarak söylenebilir. Maruziyet kaynağından uzaklaştırma ve diğer hepatotoksik maddelerden kaçınma dışında, kronik CCl₄ maruziyetinin etkilerine yönelik herhangi bir tedavi mevcut değildir.

Sıvı CCl₄ cilde bulaştığında maruz kalan kişilerin giysileri çıkarılmalı ve cilt bol miktarda su ve sabun ile yıkanmalıdır. CCl₄ müköz membranları biraz tahriş ettiğinden, maruz kalan gözler en az 15 dakika su ile yıkanmalıdır. Gastrik gavaj ve aktif kömür uygulaması CC₄ almış hastalar için uygun tedavi yöntemleridir (5).

CCl₄ ile zehirlenmelerde merkezi sinir sisteminde; baş dönmesi, hafıza kaybı, baş ağrısı, gastrointestinal sistemde; karın ağrısı, bulantı kusma, ishal ayrıca görme bulanıklığı ve optik sinirlerde hasar ortaya çıkabilmektedir (34).

2.6.3. Karbon tetraklorür kaynaklı testis toksisitesi

CCl₄ toksisitesinde hedef organlardan biride spermatogonial kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşmasını dengeleyerek sperm üreten organ olan testistir (35).

Erkek infertilitesi, dünya nüfusunun %30'unu etkilemektedir. Erkek üreme sisteminde sigara kullanımı, antidepresan ilaçlar ve alkol tüketiminin neden olduğu testosteron azalması, sperm kalitesi ve seks hormonlarındaki bozukluklara neden olur. Fertiliteyi etkileyen diğer çeşitli sorunlar arasında erektil disfonksiyon, erken boşalma, sperm kalitesizliği sayılabilir. Bütün bu sorunlar testistlerde serbest oksijen radikallerinin birikmesi sonucunda oluşabilmektedir (36).

CCl₄'ün, reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir. Spermatozoa, döllenme sırasında plazma zarına gerekli akışkanlığı sağlamak için PUFA'ya ihtiyaç duyar. Bununla birlikte, bu spermatozoayı doğurganlığın azalmasıyla ilişkili olan ROS saldırılarına karşı özellikle savunmasız hale getirir. Serbest radikaller, sperm zarındaki PUFA'ya bağlanır ve peroksi ve alkoksi radikalleri üretir, bunlar da lipid peroksitler üretir sonuçta sperm sayısını azaltır, antioksidan enzim düzeylerini düşürür, nekroz veya hasara yol açar. ROS, germ hücrelerinin nekrozunu ve apoptozunu indükler ve seminifer tübüllerin çapını azaltır (37).

CCl₄, sıçan testislerinin seminifer tübüllerinde germ hücre kaybına, germ hücre dejenerasyonuna, mitozun inhibisyonuna, interstisyel bağ dokunun kaybolmasına ve sertoli hücrelerinde yapısal bozulmalara neden olur (38).

CCl₄'ün sıçan testislerinde kaspaz-3 pozitif hücre sayısını arttırdığı belirtilmiştir. Testislerde masif nekroz ve oksidatif stres kaspaz 3'ü aktive eder ve apoptozu artırır. Spermier içerisinde artan ROS, sperm veya seminal plazma antioksidan savunma mekanizmalarını bozar ve oksidatif strese neden olabilir. CCl₄, MDA seviyesini arttırırken SOD, GSH-Px ve CAT seviyelerini düşürür (35,39).

2.7. Oksidatif Stres ve İnfertilite

İnfertilite 1 senelik korunmasız cinsel ilişkiden sonra hamile kalmama durumu olarak tanımlanmaktadır. İnfertilite bütün dünyada yaygın şekilde görülen, % 8-12 insidansa sahip bir sağlık sorunudur. Bu sorun kadın infertilitesi, erkek infertilitesi ve açıklanamayan faktörler şeklinde sınıflanan bir manifestasyona sahiptir. Yaşanan erkek infertilitesi erkek nüfusunun %7'sini etkilemektedir. Erkek infertilitesi hormonal sorunlar, fiziksel nedenler, yaşam tarzı, psikolojik faktörler, genetik hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda yaşa bağlı olarak da infertilite oluşabilmektedir. Erkek infertilitesini değerlendirmek için, tıbbi öykü, fizik muayene, endokrin değerlendirme ve semen analizi gibi testler kullanılmaktadır (40).

Klinefelter sendromu ve kistik fibrozis gibi genetik faktörler infertiliteye yol açmaktadır. Hormonal kaynaklı infertilite hipofiz bezinden salınan FSH ve LH hormonlarının düzensiz salgılanmasından dolayı oluşabilir. Enfeksiyon sonucunda üreme organlarında infertiliteye neden olan hastalıklar; tüberküloz, cinsel yolla bulaşan hastalık (klamidya), gonore (bel soğukluğu) gibi hastalıklardır.

Sağlıklı spermierin vücut sıcaklığından daha düşük sıcaklıklarda üretildiği bilinmektedir. İnmemiş testis (Kriptorşizm) durumunda vücut sıcaklığında yüksek ısıya maruz kalan testislerin sperm üretimi bozulur ve infertiliteye neden olabilir.

Varikosel erkeklerin %10'da rastlanır ve testislerin etrafındaki damarların anormal gelişimidir. Yapılan bir araştırmada infertil olmayan erkeklerin %20'sinde

varikosel öyküsü olan erkeler de tespit edilmiştir. Ayrıca testis travmaları, tümör tedavilerinde kullanılan kemoterapi ilaçları ve radyasyon, çevresel faktörler, sigara, uyuşturucu kullanımı gibi kötü alışkanlıklarda infertilite nedenlerindendir (41).

ROS, oksijen (O_2) içeren moleküllerin serbest radikal türevleridir. Serbest radikal, son derece reaktif olan eşleşmemiş bir elektrona sahip molekül veya elementtir. Süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH^-), peroksil (ROO^-) radikalleri infertilitede tanımlanan klinik olarak önemli ROS'lardan bazılarıdır (42).

ROS ve antioksidan seviyelerindeki dengesizliği ifade eden oksidatif stres, erkeklerde kısırlılığın ana nedenlerinden biridir (43). Mevcut literatür, ROS'un infertil erkeklerin %30-80'inde bulunan bir faktör olabileceğini bildirmektedir (44). Kapasitasyon, hiperaktivasyon ve akrozomal reaksiyon dahil olmak üzere spermin fizyolojik işlevi için az miktarda ROS gereklidir lakin, yüksek ROS seviyeleri, yalnızca lipid peroksidasyonu veya DNA hasarı yoluyla değil, aynı zamanda spermatozoadaki enzimlerin ve proteinlerin oksidasyonunun inaktivasyonu yoluyla kısırlılığa neden olabilmektedir (43).

İnflamasyon ve enfeksiyon da ayrıca bir ROS kaynağı olarak gösterilmiştir. İnfertil erkeklerde subklinik enfeksiyon prevalansı %10 ile %35 arasında değişmektedir. Üretra, prostat, seminal veziküller, deferent kanallar, epididim, testisler de dahil olmak üzere erkek aksesuar bezi enfeksiyonu olan hastalarda ROS'un daha yüksek bulunduğu gösterilmiştir (45,46).

Endüstriyel maruziyetler de ROS üretiminin ve sperm DNA hasarının nedenlerindendir. Kadmiyum, kurşun, demir ve bakır gibi ağır metallere, böcek ilaçlarına, fitalat ve kirliliğe maruz kalma sperm hasarına yol açabilmektedir (47).

Pestisitler ve fitalatlar oksidatif strese neden olmakla birlikte hayvan modellerinde hipotalamus-hipofiz-gonad aksı bozmaktadır. Gonadotropin salgılatıcı hormonun inhibisyonu (GnRH), LH ve FSH salınımını inhibe eder. Sonuçta, gametogenez ve steroidogenez inhibisyonuna neden olur, bu da testiküler atrofinin yanı sıra sperm fonksiyonu üzerinde zararlı etkilere yol açar (48,49).

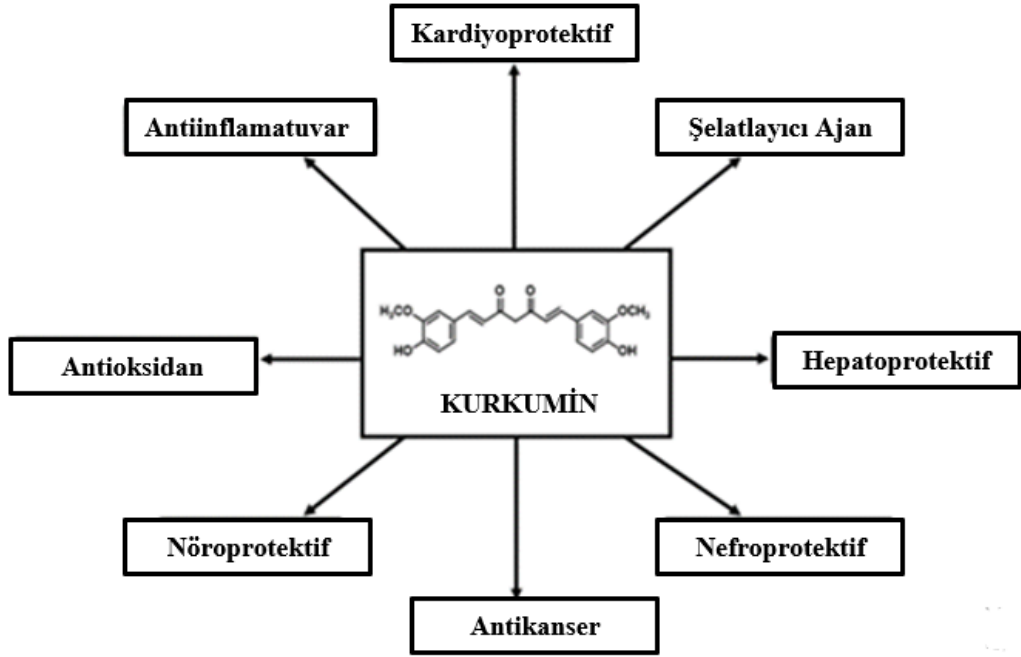
2.8. Kurkumin

İki yüzyıl önce Harvard Koleji laboratuvar bilimcileri Vogel ve Pelletier tarafından *Curcuma longa*'nın (zerdeçal) rizomlarından elde edilen “sarı renklendirici madde” olan Kurkumin yaygın olarak kullanılan bir nutrasötiktir. 1842’de Vogel Jr saf bir kurkumin preparatı elde etmiş yalnız formülünü belirlememiştir. Bununla birlikte, Milobedzka ve Lampe, kurkuminin kimyasal yapısını diferuloilmetan (1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-dion), olarak tanımlamış ve aynı grup 1913’te bu bileşiği sentezleyebilmiştir. Kurkuminin ana maddesi olan zerdeçal, Asya ülklerinde köri baharatı olarak ve geleneksel tıpta tedavi edici bir ajan olarak kullanılmaktadır (50,51).

Zerdeçal köri baharatı olarak ve tıpta kullanılmanın yanısıra; gıda, kozmetik ve tekstilde renklendirici, böcek kovucu olarak kullanılmaktadır (52).

Zerdeçalda tanımlanan CUR (Kurkumin), DMC (demethoxyKurkumin) ve BMC (bisdemethoxyKurkumin) gibi maddelerin hepsi bir arada kurkuminoidler (CCM) olarak adlandırılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi CCM’leri güvenli olarak kabul etmiştir. Yapılan klinik çalışmalar CCM’lerin günlük güvenli oral dozunun 12 gram olduğunu göstermiştir (50,53,54).

Zerdeçal %70 karbonhidrat, %13 su, %6 protein, %6 uçucu yağlar %5 yağ, %3 mineral ve %3–5 kurkuminoidler (CUR %77, DMC %17, BMC %3-6) ve eser miktarda vitamin (B1, B2, C ve niasin) içermektedir (55). Yapılan bilimsel çalışmalarla kurkuminin antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve başka etkileri açıklanmıştır.



Şekil 6. Kurkuminin etkileri (56).

Çok sayıda çalışmada kurkuminin sayısız sinyal molekülü ile doğrudan etkileşime girdiği gösterilmiştir. Bu klinik öncesi çalışmalar, klinik çalışmalarda kurkuminin etkinliğini değerlendirmek için sağlam bir temel oluşturmuştur. Aşağıdaki tabloda, insan katılımcılarda yapılan çalışmalarda çok sayıda hastalığa karşı kurkuminin aktivitelerini ve etki mekanizmalarını gösteren sonuçlar özetlenmiştir (50).

Tablo 2. İnsan Katılımcılarda Kurkuminin Moleküler Hedefleri (50).

Hastalıklar	Biyomarkrlar
Kolorektal Kanser	GST↓ M ₁ G↓ PGE ₂ ↓ Bcl-2↓ p53↑ Bax↑ TNF-α↓
Pankreas Kanseri	MDA↓ GSH↑ IL-6↓ IL-8↓ IL-10↓ NF-kB↓ COX-2↓ pSTAT3↓
Prostat Kanseri	PSA↓
Multipl Miyelom	NF-kB↓ COX-2↓ pSTAT3↓ NTT↓ Paraprotein↓
Kanser Lezyonları	Vitamin C↑ Vitamin E↑ MDA↓ 8-OHdG↓
Baş ve Boyun Kanseri	IKKβ↓ IL-8↓
İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı	CRP ↓ ESR ↓ CDAI ↓ p38 MAPK ↓ IL-1β↓ MMP-3↓ IL-10↑
Osteoartrit	CRP↓ IL-1β↓ IL-6↓ sCD40L↓ sVCAM1↓ ESR↓
H.pylori enfeksiyonu	sPGII ↓ sPG I ↓
Sedef Hastalığı	PhK↓ TRR↓ CD8 + T cells↓
Akut Koroner Sendrom	TC↓ LDL↓ HDL↑ TG↑
Ateroskleroz	Lipid peroksidaz↓ TC↓ HDL↑
Tip 2 Diyabet	MDA↓ ET-1↓ IL-6↓ TNF-α HOMA-β↑ adiponektin↑ C-peptid↓ HOMA-IR↓
Diyabetik Nefropati	TGF- β ↓ IL- 8 ↓
Böbrek Nakli	Kreatinin↓ HO-1↑
β-Talasemi	MDA↓ SOD↓ GSH-Px↓ NTBI↓ GSH↑
Antihepatotoksisite	AST↓ ALT↓ Bilirubin↓ ESR ↓
Arsenik Maruziyeti	Katalaz↑ GSH↑ SOD↑ GPX ↑ ROS↓

2.8.1. Kurkumin'in antiapoptotik etkisi

Kurkumin antioksidan, anti-inflamatuvar, antimikrobiyal, antiviral etkileri için bütün dünyada bilim adamlarının dikkatini çekmiştir; bunlar arasında antikanser potansiyeli özellikle tanımlanmış ve halen araştırılmaktadır. Kurkuminin büyüme faktörlerine, transkripsiyon faktörlerine, kinazlara, inflamatuvar sitokinlere

proapoptotik ve antiapoptotik proteinlere etki ettiği bildirilmiştir. Bu polifenol bileşik, tek başına veya diğer ajanlarla birlikte, kanser tedavisi için etkili bir ilacı temsil edebilmektedir (57).

Araştırmalar sonucu zerdeçal ve kurkuminin gonad hücrelerini ROS ve kanserojen ajanlara karşı koruduğu bildirilmiştir. Zerdeçal ve Kurkumin, normal hücre dizilerinde Bcl-2 ve Bcl-XL gibi anti-apoptotik faktörleri artırabilir ve Bax gibi apoptotik ajanları azaltabilir. Ayrıca zerdeçal ve kurkuminin farklı etkileri, çalışılan çeşitli modellerde kullanılan dozlara ve hücre tipine bağlıdır. Kurkuminin reme hasarları üzerindeki terapötik etkisi in vitro ve in vivo çalışmalarda zerdeçal ekstraktından daha etkili olmuştur (58).

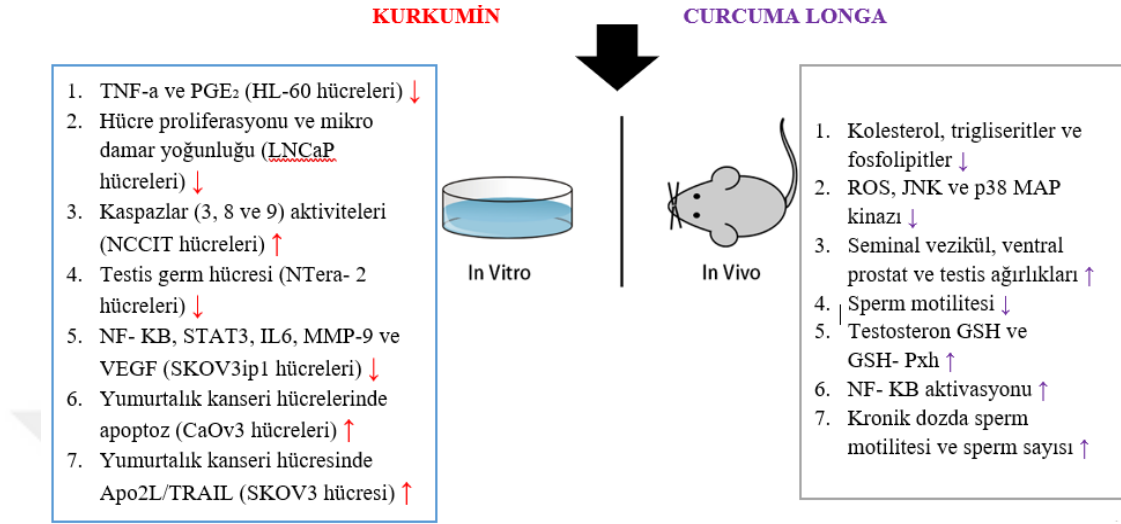
Patofizyolojik durumlarda, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki denge sıklıkla değişir ve bu da doku homeostazının kaybıyla sonuçlanır. Yetersiz veya aşırı apoptoz, ülseratif kolit, Crohn hastalığı ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarının başlamasına neden olan bir faktör olabilir (59).

Yapılan bir çalışmada kurkuminin sıçanların testislerini obezite ve diyabetin neden olduğu hasara karşı koruyabileceği gösterilmiştir. Diyabetik gruplardaki hayvanların testislerinde seminifer tübül atrofi, dejenerasyon, vakuolizasyon, seminifer tübül lümeninde spermatidlerin kaybolması görülürken, kurkuminin yüksek yağlı diyetle beslenen, diyabetik sıçanlarda testislerin seminifer tübüllerinin morfolojisini belirgin şekilde koruduğu belirtilmiştir (60).

İn vivo çalışmalarda Kurkuminin, insan nötrofil apoptozu üzerindeki proapoptotik etkisi; hem androjene bağımlı hem de androjenden bağımsız prostat kanseri hücreleri üzerindeki, hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığını ve apoptozun boyutunu önemli ölçüde arttırdığını; androjene bağımlı prostat kanseri hücrelerinde mikro damar yoğunluğunu önemli ölçüde azalttığı; insan malign testis germ hücrelerinde kaspaz (3, 8 ve 9) aktiviteleri, Bax ve sitoplazmik Cyt-C seviyeleri dahil olmak üzere apoptotik belirteçleri arttırdığı, ancak Bcl-2 seviyesini düşürdüğü; insan malign testis germ hücrelerinin canlılığını inhibe ettiği belirtilmiştir.

İn vitro çalışmalarda ise, erkek sıçanlarda kolesterol, trigliseritler ve fosfolipidlerin serum seviyelerini düşürdüğü; testis, epididim ve seminal vezikül ağırlıklarını, ayrıca epididimiste spermatozoa sayısı, hareketlilik ve canlılığını koruduğu; seminifer

tübüllerinin boyutunu, spermatogonia, spermatosit ve spermatidlerin sayısını, leydig hücrelerini normale yakın tuttuğu gösterilmiştir (61) (Şekil. 8).



Şekil 7. Curcuma longa ve kurkumin'in çalışmalarındaki etkileri (61).

2.8.2. Kurkumin'in anti-inflamatuar etkisi

1969'da Lucknow'daki Merkezi İlaç Araştırma Enstitüsü'nde zerdeçal rizomunun anti-inflamatuar aktivitesinin sistematik araştırmaları sonucu kurkuminin bu bitkinin ana inflammatuar bileşeni olduğu gösterilmiştir. Kurkumin gibi doğal anti-inflamatuar ürünlerin inflamasyonun önlenmesinde kullanımı son yıllarda ilgi odağı olmaktadır. Zerdeçalın anti-inflamatuar etkisi üç özelliğinden kaynaklanmaktadır; ilk olarak zerdeçal, histaminin neden olduğu inflamasyonu azaltır; ikincisi, vücudun doğal anti-inflamatuar adrenal hormonu olan kortizolün etkisini artırır ve uzatır ve son olarak zerdeçal, hücrel atıkların ve inflammatuar bileşiklerin sıklıkla tutulduğu küçük eklemlerdeki dolaşımı ve toksinlerin atılmasını iyileştirir (62).

Proinflammatuar sitokinler olan Tumor nekroz faktörü alfa ve interleukinler, hem inflammatuar süreçte hem de kanser hastalığında önemli role sahiptir. TNF-α, NF-κB'yi aktive eder, ardından inflammatuar genler, inflammatuar sitokinler, adezyon molekülleri ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) eksprese edilir. Bu nedenle, TNF-α'nın

transkripsiyonu ve dolayısıyla inflamatuvar genlerin ekspresyonu kurkumin tarafından bloke edilebilir (63).

2.8.3. Kurkumin'in antioksidan etkileri

Antioksidan özellikleri olan doğal ürünler, oksidatif stres ile ilişkili bozukluklarda potansiyel terapötik adaylar olarak kabul edilmektedir. Antioksidan bileşikler olarak fenolik asitler, polifenoller ve flavonoidler, serbest radikalleri etkiler ve oksidatif mekanizmaları önler. Oksidatif stres vücuttaki serbest radikaller ve antioksidan belirteçleri arasında dengesizlikten dolayı oluşur. Oksidatif stres bozuklukları, serbest radikaller tarafından başlatılır ve nükleik asitlerin, proteinlerin, lipidlerin oksidasyonuna yol açar. Bu nedenle kanser gibi bozuklukların patofizyolojisinde oksidatif stres önemlidir. Zerdeçal ve Kurkuminin antioksidan etkileri hem deneysel hem de klinik çalışmalarla gösterilmiştir (62).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız için Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi (ZBEÜ) Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 04.11.2021 tarihinde 2021-26-04/11 protokol numaralı etik kurulu onayı alınmıştır. Araştırmanın her aşamasında yapılan bütün işlemler etik kurul yönergesinde belirlenen kurallara göre gerçekleştirilmiştir. Mevcut çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (2022-98210206-02).

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamız ZBEÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve ZBEÜ Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında yürütülmüştür. ZBEÜ Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarında üretilen genç erişkin 24 adet 8-12 haftalık, 300-350 gr ağırlığında Wistar albino türü erkek sıçanlar deneyde kullanılmıştır. Sıçanlar rastgele olarak biri kontrol grubu üçü deney grubu olmak üzere toplam 4 gruba ayrılmıştır. Tüm denekler deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşullarında (sıcaklık 22 ± 1 °C, nem oranı $55 \pm 8\%$, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda), günlük içme suyu ve %21 ham protein içerikli pellet yemlerle ad libitum olarak beslenmiştir. Deney grupları Tablo 3'deki gibi oluşturulmuştur.

3.2. Kimyasalların Hazırlanması

Çalışmamızda testis dokusunda deneysel hasar oluşturmak amacıyla ZBEÜ Mühendislik Fakültesi, Maden Mühendisliği bölümünden temin edilen CCl_4 (Saf Kimya, Türkiye) ile CCl_4 'e bağlı testis hasarı üzerine koruyucu etkisini göstermek istediğimiz ve Antioksidan özellikleri çok sayıda araştırmacı tarafından gösterilmiş kurkumin (Sigma Aldrich, Almanya) kullanıldı.

Deney başlayana dek üretici tarafından tavsiye edildiği üzere -20 °C muhafaza edilen kurkumin zeytin yağında çözünerek kilogram başına 200 milligram gavaj

yoluyla hayvanlara verildi. Oda sıcaklığında muhafaza edilen CCl₄ 1/1 oranında zeytinyağında çözülerek kilogram başına 0.5 ml intraperitoneal olarak enjekte edildi.

Tablo 3. Deney Grupları.

Kontrol Grubu (n=6)	3 hafta boyunca her gün gavaj yoluyla 1 ml zeytinyağı uygulamasına tabi tutulmuştur.
Kurkumin Grubu (n=6)	3 hafta boyunca her gün, günde 1 kez zeytinyağında çözünmüş 200 mg/kg kurkumin gavaj yoluyla verilmiştir.
CCl₄ Grubu (n=6)	3 hafta boyunca gün aşırı olarak 1/1 oranda zeytinyağında çözünmüş 0.5 ml/kg CCl ₄ intraperitoneal (ip) enjeksiyonla verilmiştir.
Kurkumin+CCl₄ Grubu (n=6)	3 hafta boyunca her gün, günde 1 kez, gavaj yolu ile zeytin yağına çözünmüş 200 mg/kg kurkumin ve gün aşırı 0.5 ml/kg CCl ₄ ip enjeksiyonla verilmiştir.

3.3. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü

Deneyin başından itibaren, her ilaç uygulaması öncesi denekler tartılmış ve ağırlıkları istatistiksel analizler için kaydedilmiştir.

3.4. Dokuların Alınması

21. günün sonunda, 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/ Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye) intraperitoneal yoldan verilerek, tüm denekler derin anestesi altında sakrifiye edilmiştir. Deneklerin abdominal bölgesi kesilerek, abdominal aortadan kan örnekleri alınmış, ardından testisler total olarak çıkarılmıştır. Sağ ve sol testisler çevresindeki dokulardan temizlenerek, hassas terazi (Ohaus, Adventurer Pro AV264C) ile tartılmış ve sonuçlar deney defterine kaydedilmiştir. Tartım sonrası sol testis, fiksatifin tunika albugineayı kolay geçebilmesi için, insülin iğnesi ile her iki kutbundan delinerek ve %10'luk formaldehit çözeltisine konulmuştur. Sağ testis ve serum örnekleri ise daha sonra biyokimyasal parametrelerin çalışılabilmesi için -80 °C'lik derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 8. Testis dokularının eksizyonu.

3.5. Dokuların Hazırlanması

Işık mikroskopik incelemeler için; her deneğin sol testis dokusu %10'luk formol (MERCK) çözeltisi içine alınmıştır. Fiksatif içerisindeki testis dokuları kesilebilir sertliğe ulaştıktan sonra testisler enine olacak şekilde önce ortadan iki eşit parçaya ve daha sonra bu parçalar da yeniden ikiye bölünerek kasetlere alınmıştır. Etiketlenmiş kasetlere alınmış dokular %10'luk formol çözeltisinde toplamda 2 gün bekletildikten sonra akar su altında 1 gece boyunca yıkanmış ve daha sonra aşağıda tarif edildiği şekilde rutin doku takibi işlemi uygulanmıştır (Tablo. 3). Etüvde 24 saat sıvı haldeki parafinde bekletilen dokular yine parafine (MERCK) gömülerek bloklanmıştır.

Tablo 4. Doku Takibinde Kullanılan Kimyasallar ve Süreleri.

Kimyasal	Uygulama Süresi
%70 alkol	2 x 1 saat
%90 alkol	2 x 1 saat
%96 alkol	2 x 1 saat
%100 alkol	2 x 1 saat
Toluen 1	15 dakika
Toluen 2	15 dakika
Sıvı Parafin	1 gün

3.6. Kesitlerin Alınması ve Boyanması

Doku takibi yapıldıktan sonra elde edilen bloklardan Shandon Finesse 325 marka silindirli mikrotom kullanılarak testis dokusunun tamamı bitene kadar 5µ kalınlığındaki kesitler alınmış, elde edilen kesitler 37C° sıcaklıktaki su banyosunda kırışıklıkları giderildikten sonra lamlara alınmıştır. Kesitler kurduktan sonra 1 gece etüvde bekletilmiş, daha sonra boyama işlemine tabi tutulmuştur. Testisin genel histolojik yapı özelliklerini değerlendirmek için elde edilen kesitlere Hematoksilen-Eozin (H/E), Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Masson Trikrom boyamaları uygulanmış ve boyanan preparatlar Axio Lab A1 (Zeiss Germany) marka ışık mikroskopunda incelenmiştir.

Hematoksilen-Eozin (H/E) boyama: Hematoksilen-Eozin boyaması testis dokusunun genel morfolojisini gözlemlemek amacıyla yapılmıştır. H/E boyamada 2 boya kullanılmaktadır. Bunlardan hematoksilen çekirdekleri, eozin ise sitoplazmayı boyamaktadır. Toluene (MERCK) ile deparafinizasyon işlemi yapıldıktan sonra kesitler yoğunluğu azalan alkol serilerinden geçirilerek suya indirilmiş, ardından nükleus boyanması için hematoksilende, sitoplazma boyanması için ise eozinde bekletilmiştir. Ardından dokudaki fazla boyadan arındırılan kesitler alkol serilerinden geçirilip toluene ile şeffaflaştırılmış ve entellan (MERK) ile kapatılmıştır (Tablo 5).

PAS (Periyodik Asit Schiff) bir mukopolisakkarid boyasıdır. Bu boyamaya Schiff reaktifini hazırlamakla başlanmıştır. Kaynayan 100 cc distile su 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 1 gram bazık fuksin ilave edilip filtre kağıdı yardımıyla bir behere süzölmüştür. Süzölen solüsyonun içine 2g potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) eklendikten sonra karışım koyu bordo rengini almıştır. Karışıma yavaş yavaş 20cc, 1N HCl eklendikten sonra içine 300 mg aktif kömür ilave edilip yine filtre kağıdı kullanılarak huni ile koyu renkli bir şişe içine süzdürölmüştür. Süzdürme işleminden sonra elde edilen karışım zeytinyağı rengini almıştır. Schiff çözeltisi hazırlandıktan sonra üzerinde minimum hava kalacak şekilde şişelenip, buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Daha sonra yıkama solasyonu hazırlanmıştır. %10'luk 10cc potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) 10cc 1N HCl, 180 cc çeşme suyu ile karıştırılmış ve karışım 3

ayrı şaleye bölünmüştür. Son olarak 1 gram periyodik asit 100cc distille su karıştırılarak periyodik asit solüsyonu hazırlanmıştır.

PAS boyaması içim tolue ile parafinden arındırılan kesitler yoğunluğu azalan alkol serilerinden geçirilerek suya indirilmiştir. Daha sonra periyodik asit solüsyonunda bekletilen kesitler akan suyun altında yıkanmış ardından distile su ile çalkalandıktan sonra karanlık ortamda schiff solüsyonunda bekletilmiştir. Ardından kesitler tekrar çeşme suyu altına alınıp yıkanmış, daha sonra nükleus boyaması için hematoksilende uygun sürede bekletildikten sonra yine akan çeşme suyunda morartmaya bırakılmıştır. Son olarak yoğunluğu artan alkol serilerinden hızlıca geçirilen kesitler, absölü alkolde bekletildikten sonra, tolue ile şeffaflaştırılıp entellan ile kapatılmıştır. Sonuç olarak hematoksilin ile nükleus mavi-mor, Schiff reaktifi ile glikoprotein ve glikokaliks içeren yapılar, bazal membranlar leylak renginde boyanmıştır (Tablo 6a).

Tablo 5. Testis Dokusu İçin H/E Boyama Protokolü.

Kimyasal	Süresi
Toluen 1	15dk
Toluen 2	15dk
%100 alkol	1 dk
%96alkol	3 dk
%90 alkol	3dk
%70 alkol	5dk
Durgun Su	3dk
Hemotoksilen	15 dk
Asit Alkol	Batır çıkar
Morartma	20dk
Eozin	5 dk
%70 ,%90 alkol	Batır çıkar
%96	5dk
%100	2x10dk
Toluen 1,2	2x15dk

Maason trikrom boyaması bağ ve destek dokularını ayırt etmek için kullanılan üçlü (Weigert, Ponzo ve Light Green) boyama yöntemidir. Weigert hematoksilen ile nükleusların koyu kahverengi, ponzo ile sitoplazmaların kırmızı, ışık yeşili ile ise bağ dokusu yeşil renge boyanır. Masson boyaması için önce weigert hematoksilen solüsyonunun hazırlanmıştır. Weigert hematoksilen için A ve B eriyikleri ayrı ayrı hazırlanmıştır. A eriyiği 1 gram hematoksilen, 100 cc %96 alkol, B eriyiği 4cc FeCl₃, 1 cc HCl, 95 cc distille su kullanılarak hazırlanmış ve bu karışımlar boyaya başlamadan önce eşit miktarda alınıp karıştırılmıştır. Fuksinli Ponzo boyası için %1'lik Ponceauxlidine (SİGMA) (1 gram ponzo + 100 cc distille su), %1'lik Asit fuksin (1 gram asit fuksin + 100 cc distille su) karıştırılarak hazırlanmıştır. Light Green (MERCK) boyası 2 gram ışık yeşili, 3-4 damla asetik asit, 100cc distille su ile hazırlanmıştır. Bu çözeltinin renginin bulanık olmaması gerekmektedir. Boyama için parafinden arındırılıp, suya indirilen preparatlar önce Weigert boyasında bekletildikten sonra çeşme suyunda morartmaya bırakılmış, ardından sitoplazmaların boyanması için fuksinli ponzo boyasında bekletilmiştir. Daha sonra fazla boyaları arındırmak için asetik asit, bağ dokuların boyanması için fosfotungustik asit solüsyonlarında (FLUKA) bekletilen kesitlere ışık yeşili ile muamele edilmiştir. Çeşme suyu ile yıkanan kesitler alkol serilerinden geçirilip dehidrate edilmiş, toluen ile şeffaflaştırılıp entellan ile kapatılmıştır (Tablo 6b).

Tablo 6. Testis Dokusu İçin PAS ve Masson Trikrom Boyama Protokolü.

Kimyasal	Süresi	Kimyasal	Süresi
Toluen 1	15dk	Toluen 1	15dk
Toluen 2	15dk	Toluen 2	15dk
%100 alkol	1 dk	%100 alkol	1 dk
%96alkol	3 dk	%96alkol	3 dk
%90 alkol	3dk	%90 alkol	3dk
%70 alkol	5dk	%70 alkol	5dk
Durgun Su	3dk	Durgun Su	3dk
Periyodik asit	15 dk	Weigert	10dk
Akar su	10dk	Morartma	15dk
Distille su çalkalama	x 3	Ponzo	10dk
Schiff	20dk	%1 Asetik asit	Batır çıkar
Yıkama Solüsyonu1.2.3	5dk	Fosfotungustik asit	15dk
Akar su	5dk	%1 Asetik asit	Batır çıkar
Hemotoksilen	10dk	Light green	3 dk
Morartma	20dk	%1 Asetik asit	Batır çıkar
%70,,%90 alkol	Batır çıkar	%70 ,%90 alkol	Batır çıkar
%96	5dk	%96	5dk
%100	2x10dk	%100	2x10dk
Toluen 1,2,3	2x15dk	Toluen 1,2	2x15dk

3.7. Histolojik Değerlendirme ve Cosentino Skorlaması

Histolojik değerlendirmeler yapılması için, bütün deneklere ait H+E, Masson trikrom ve Periyodik Asit Schiff boyaları ile boyanmış preparatlar ışık mikroskobu (Zeiss, Axio Lab A1, Almanya) kullanılarak incelenip fotoğraflanmıştır. H+E ile boyanmış preparatlara Cossentino ve arkadaşları tarafından oluşturulan Cosentino

skorlanması (64) yapılmıştır. Buna göre, her kesitte rastgele 10 yuvarlak seminifer tübül seçilerek spermatozoa ve spermatid kaybı, germ hücre tabakasının yokluğu, germ hücre tabakalarının dejenerasyonu, germ hücre tabakalarının düzensizleşmesi, tübülün parçalanması parametreleri 0-4 arasında skorlanmıştır.

Tablo 7. Cosentino Testis Hasarının Histolojik Derecelendirme Sistemi.

1	Spermatozoa ve spermatid kaybı
2	Germ hücre tabakasının yokluğu
3	Germ hücre tabakalarının dejenerasyonu
4	Germ hücre tabakalarının düzensizleşmesi
5	Tübülün parçalanması

Cosentino skorum sistemiinde tüm parametreler aşağıda belirtildiği şekilde, 0-4 arasında skorlanmıştır; 0; hasar yok, 1; hafif, 2; orta, 3; şiddetli, 4; çok şiddetli hasar.

3.8. Morfometrik İncelemeler

Her denek için yuvarlak veya yuvarlağa yakın olan rastgele 20 Tübül, her gruptan ise 120 tübülde tübül çapı ve epitel yüksekliği ölçülmüştür (59,65,66). Tübüler çapı belirlemek için kullanılan tübüllerde epitel yüksekliği ölçümü de yapılmıştır. Her seminifer tübülde birbirine dik iki tübül çapı ölçülmüş ve en küçük ölçüm o tübülün çapı olarak kabul edilmiştir. Yine her tübül için birbirine dik 4 farklı bölgede ölçülen seminifer tübül epitel yüksekliklerinden en küçük olanı o tübülün seminifer epitel yüksekliği olarak kabul edilmiştir. Tüm ölçümler Axio Lab A1(Zeiss Germany) marka ışık mikroskopunda, AxioVision Rel. 4.8 programı kullanılarak ve X200 büyütme altında gerçekleştirilmiştir.

3.9. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Hem intrensek hem de ekstresek apoptoz yollarında efektör kaspaz olarak adlandırılan ve bir apoptozis belirteci olan kaspaz-3 ve bir proinflamatuvar sitokin olan TNF α ekspresyonundaki değişiklikler semikantitatif histolojik skorlama yapılarak saptanmıştır. İmmünohistokimyasal boyamalarda Tnf- α (Novus bio.) ve kaspaz-3 (Abcam) primer antikorları kullanılmıştır.

Ekspresyon düzeylerini araştırmak amacıyla immünohistokimyasal ABC (Avidin-Biotin Kompleks) yöntemi uygulanmıştır. Formaldehit fiksasyonuna bağlı oluşan antijen maskelenmesini ortadan kaldırmak için X10 sitrat buffer tamponu içerisine alınan lamlara mikrodalga fırında ısı aracılı antijen retrieval uygulanmıştır. PBS ile yıkanan lamlara endojen peroksidaz aktivitesini nötralize etmek için %3 H₂O₂ ile 20 dakika muamele edilmiştir. Yine PBS ile yıkanan dokulara nonspesifik bağlanmayı önlemek amacıyla yapılan 7 dk'lık Ultra V block uygulamasını takiben üretici tarafından tavsiye edilen dilüsyonlarda hazırlanan kaspaz-3 (Abcam) ve TNF- α (Novus bio.) primer antikorları nemli bir ortamda 1 saat oda ısısında uygulanmıştır. Primer antikor aşamasından sonra, kesitler PBS' e alınmış, ardından uygun sekonder antikor ile 30 dk muamele edildikten sonra tekrar PBS'e alınan kesitlere 20 dk Streptavidin peroksidaz kompleksi uygulanmıştır. Süre bitiminde PBS'e alınan kesitlere mikroskop altında kromojen olarak diaminobenzidine (DAB) uygulanmıştır. Ardından zıt boyama Mayer's hematoksilen ile yapılmış ve kesitler alkol serilerinden geçirilip, toluen ile muamele edildikten sonra entellan ile kapatılmıştır. Son olarak Zeiss marka Axio Lab araştırma mikroskobu kullanılarak H-SCORE yapılmıştır. Böylece Ekspresyon düzeyleri semikantitatif (0, boyanma yok; 1+, zayıf fakat tespit edilebilir boyanma; 2+ orta ya da belirgin boyanma; 3+, yoğun boyanma) olarak değerlendirilmiştir.

Her bir kesit için HSCORE değeri, her bir yoğunluk kategorisine ait boyanmış hücre yüzdesinin yoğunluk ile çarpımından elde edilmiştir. $HSCORE = \sum i \times P_i$; i ; yoğunluk skoru, P_i ; hücre yüzdesi (Sapmaz-Metin et al. 2013). Skorlama Işık mikroskopunda, X40 objektif büyütmesinde her kesit üzerinde rastgele seçilen 20 alanda yapılmış olup, istatistiksel analizler için ortalama skorlar kullanılmıştır.

3.10. Biyokimyasal Analizler

Testis dokusunda SOD (Rel assay, Türkiye) ve MDA (Rel assay, Türkiye) ölçümleri kolorimetrik olarak yapılırken serum örneklerinde Testosteron (Elabscience, Amerika Birleşik Devletleri) düzeyi ELISA yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (67,68).

3.11. İstatiksel Analiz

Verilerin analizi için SPSS 24.2 paket programı kullanılmıştır. Deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları, testis ağırlıkları, seminifer tübül çapı ve epitel yüksekliği, biyokimyasal parametrelerin indeksi ortalama±standart sapma olarak hesaplanmıştır. İmmunohistokimyasal H-SCORE ve Cosentino skorlaması sonucu elde edilen değerlerin indeksi medyan (min-max) olarak hesaplanmıştır. Öncelikle deneklere ait verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Shapiro-Wilk testi ile incelenmiş, normal dağılım gösteren niceliksel değerlerin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Gruplar arasında fark bulunduğunda bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemede varyansların homojenlik durumuna göre, Bonferroni ya da Dunnet doğrulama testleri yapılmıştır. Normal dağılım gösteren niteliksel değerlerin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. İkili karşılaştırmada Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, wistar albino sıçanlar üzerinde intraperitoneal yolla uygulanan karbon tetraklorürün testis seminifer tübüllerinde meydana getireceği harabiyet üzerine güçlü bir antioksidan olan kurkumin'in koruyucu etkisi incelenmiştir. Bu amaçla deneysel çalışmada aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

1. Sıçanların vücut ağırlık değişiminin değerlendirilmesi,
2. Testis ortalama ağırlık değişiminin değerlendirilmesi,
3. Biyokimyasal analizler.
4. Testis histolojik boyamaları,
5. Testis morfometrik değerlendirmeleri
6. Cosentino Testiküler Skor değerlendirmesi ve
7. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler.

4.1. Vücut Ağırlıkları

Deneyin başladığı ilk gün sıçanların ağırlıkları ölçülmüş ve rastgele 4 gruba ayrılmıştır. Çalışma boyunca tüm gruplara ait deneklerin vücut ağırlıkları Deney süresince her gün kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Deneyin ilk günü ve son günü kaydedilen denek ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırmasında ağırlıklar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo 8).

Tablo 8. Günlere Göre Deney Ağırlığı Değişimi. Veriler Ortanca (Minimum-Maksimum) Olarak Sunulmuştur.

	Kontrol grubu	Kurkumin grubu	CCl4 grubu	CCl4+Kurkumin grubu
İlk gün ağırlıkları (gr)	267.83 (255-286)	269.17 (260-280)	234.00 (220-252)	295.67 (258-319)
Son gün ağırlıkları (gr)	303.83 (265-336)	286.00 (265-306)	223.00 (208-238)	268.17 (236-298)

4.2. Testis Ağırlıkları

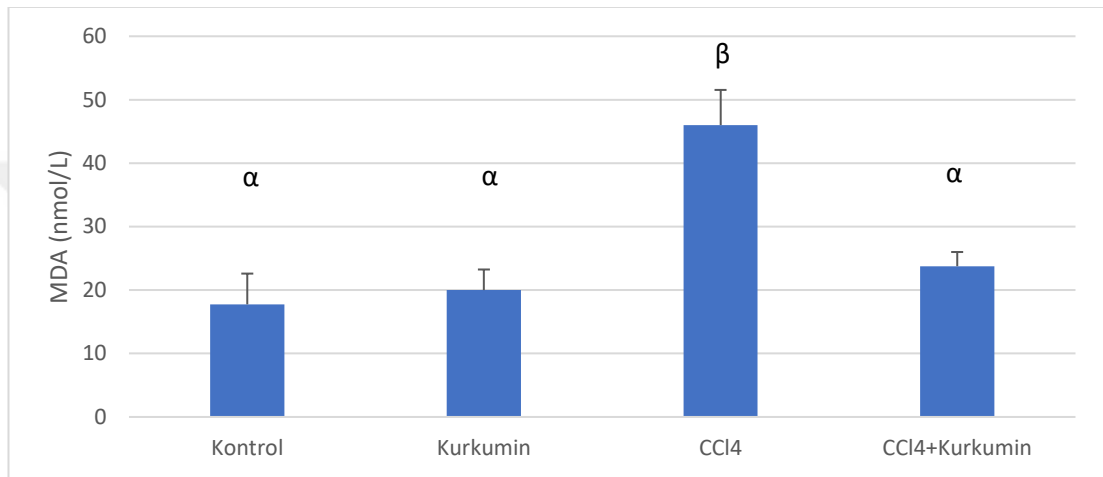
Deney sonunda çıkarılan sağ ve sol testislerin ağırlıkları ölçülmüş ve 100 gram vücut ağırlığı başına düşen sağ ve sol testis ağırlıkları hesaplanmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde hem sağ hem de sol testis ağırlıkları açısından kontrol ve kurkumin grupları ile CCl4 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). CCl4 grubu ile CCl4+Kurkumin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasa da CCl4+Kurkumin grubunda sağ ve sol testis ağırlıklarının CCl4 grubuna göre düşük olduğu gözlenmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. Testis Ağırlıklarının Karşılaştırılması. Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur. * $p<0.05$ CCl4 ile karşılaştırıldığında.

	Kontrol grubu	Kurkumin grubu	CCl4 grubu	CCl4+Kurkumin grubu
Sağ testis ağırlığı/vücut ağırlığı x100	0.454* (0.372-0.525)	0.488* (0.418-0.513)	0.578 (0.509-0.654)	0.510 (0.381-0.706)
Sol testis ağırlığı/vücut ağırlığı x100	0.451* (0.408-0.521)	0.488* (0.409-0.512)	0.576 (0.521-0.637)	0.504 (0.388-0.702)

4.3. Biyokimyasal Bulgular

Malondialdehit (MDA) Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünüdür. Gruplar arasında MDA seviyeleri karşılaştırıldığında CCl₄ grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.01$). Kontrol grubu ile CCl₄+Kurkumin grupları arasında ise fark bulunmamıştır (Şekil 9).



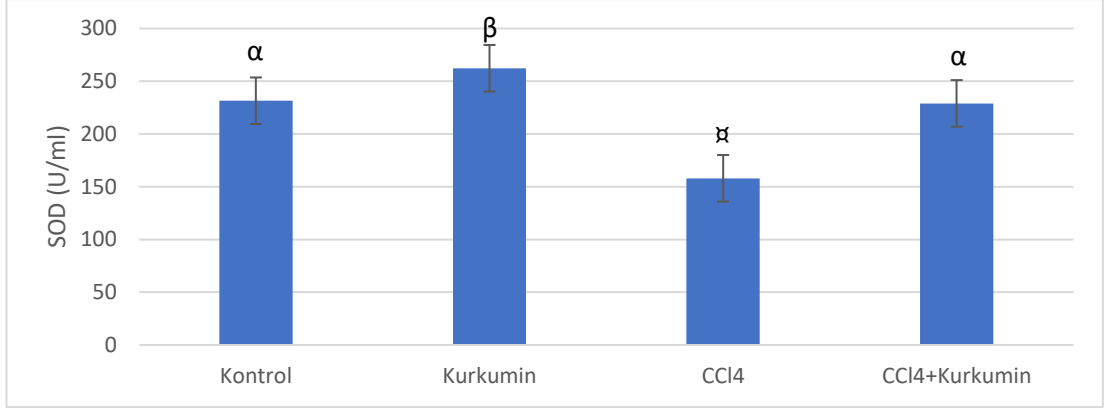
Şekil 9. Grupların MDA düzeylerinin karşılaştırması.

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Aynı işaretler benzer grupları gösterir.

^β $p<0.01$ kontrol, kurkumin ve CCl₄+kurkumin grupları ile karşılaştırıldığında.

Süperoksit dismutaz (SOD); Serbest radikalleri nötralize eden ve serbest radikal hasarını tamir etmeye yardımcı olan maddelere antioksidan maddeler denir. Antioksidan savunma sistemi; enzimatik ve non-enzimatik yollarla serbest oksijen radikallerini nötralize ederler. SOD, serbest oksijen radikallerine enzimatik olarak etki eder. SOD düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol ve tedavi gruplarının benzer düzeyde olduğu dikkat çekti (Şekil10). Kurkumin grubunda SOD düzeyi diğer gruplardan anlamlı düzeyde yüksek iken, CCl₄ grubunda SOD düzeyi diğer gruplardan anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.01$).



Şekil 10. Grupların SOD düzeylerinin karşılaştırması.

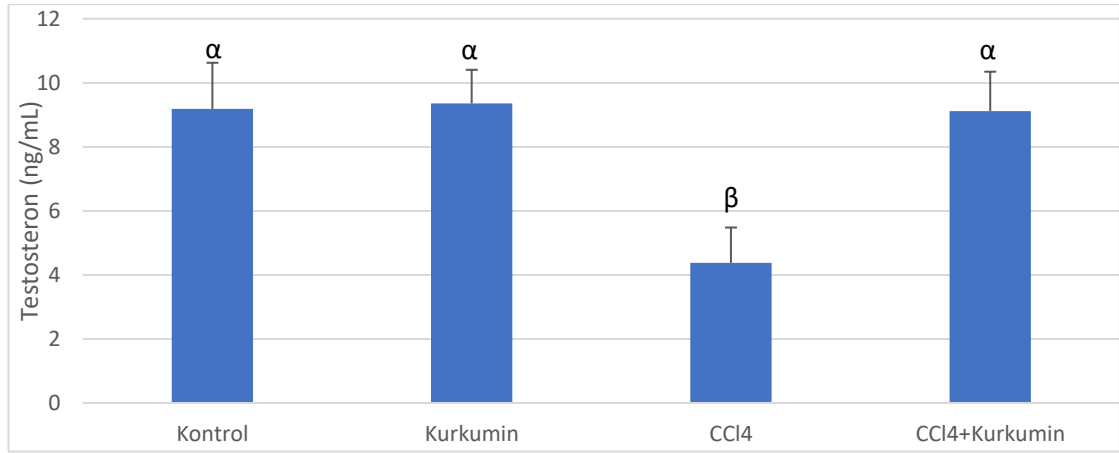
Aynı işaretler benzer grupları gösterir.

^αp<0.01 kurkumin ve CCl₄+kurkumin grupları ile karşılaştırıldığında

^βp<0.01 kontrol, CCl₄ ve CCl₄+Kurkumin gruplarıyla karşılaştırıldığında

^αp<0.01 kontrol, kurkumin ve CCl₄+kurkumin grupları ile karşılaştırıldığında

Tetosteron; leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteron gonodotropin salgılanması, spermatogenez, embriyonik ve fötal yaşam sırasındaki cinsiyet farklılaşması, erkeklerde penis büyümesi, vücut kılları, erkek tipi ses, kasların gelişmesi gibi sekonder seks karakterlerinin ve sperm oluşmasını sağlayan önemli bir hormondur. Gruplar arasında serum testosteron düzeyleri karşılaştırıldığında CCl₄ grubu testosteron düzeyi diğer gruplara göre anlamlı derecede düşüş göstermiştir (p<0.01) (Şekil 11).



Şekil 11. Grupların serum testosteron düzeylerinin karşılaştırması.

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur.

Aynı işaretler benzer grupları gösterir.

$p < 0.01$ kontrol, kurkumin ve CCl₄+kurkumin grupları ile karşılaştırıldığında

4.4. Histolojik Bulgular

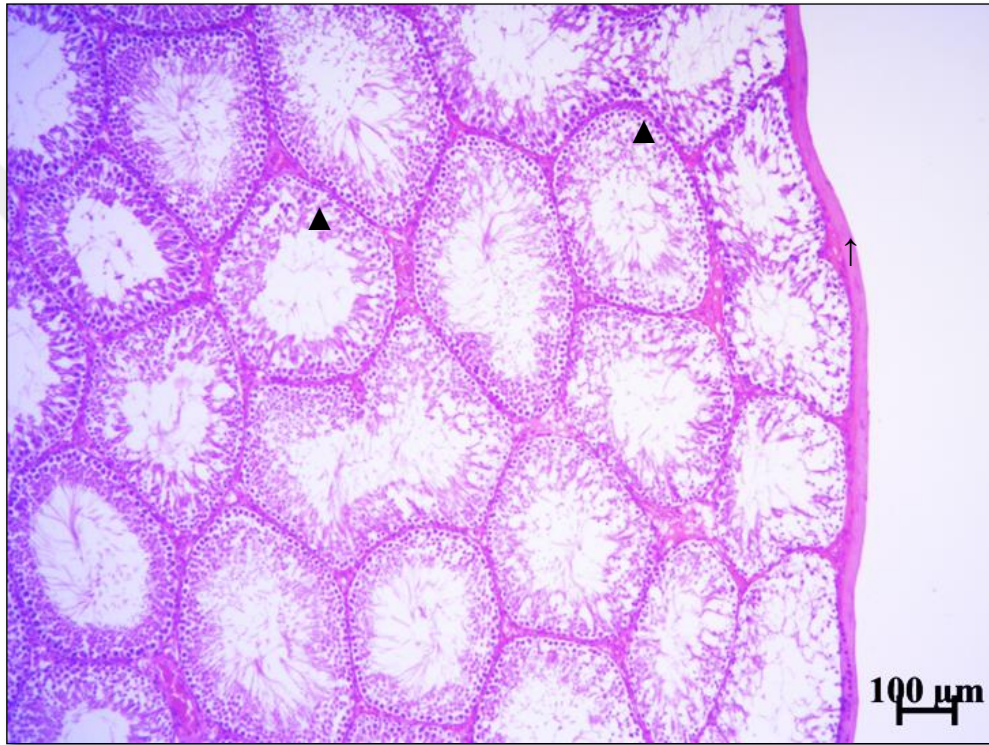
Histolojik bulgular yapılan Hematoksilen Eozin, Periyodik Asit-Schiff, Masson Trikrom boyaması yapılan preparatlar üzerinden değerlendirildi

4.4.1. Hematoksilen eozin boyama

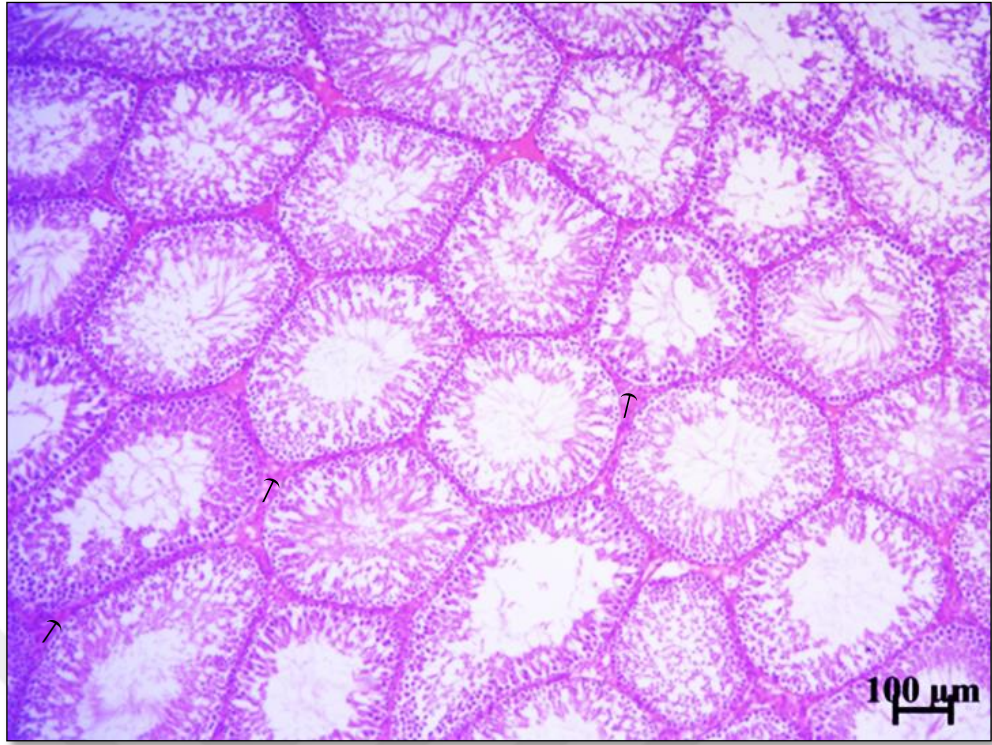
Kontrol grubuna ait testis dokusunun Hematoksilen Eozin ile boyanmış enine kesitlerinde, küçük büyütmede çok sayıda seminifer tübül içeren, Tunika albuginea, ile çevrili testis dokusunda, interstisyel bağ dokusu arasında, kan damarları, tek tek veya gruplar halinde eozinofilik sitoplazmalı, yuvarlak şekilli Leydig hücreleri incelendi. Seminifer tübüller içinde değişik gelişim aşamalarındaki spermatogenik hücreler normal yapıda idi. Seminifer tübül bazal membranından itibaren sırasıyla spermatogonyumlar ve primer spermatositlerden başlayan ve spermatozoolara kadar giden hücreler arasında düzenli spermatogenik hücre serileri dikkat çekti. Ayrıca normal görünümlü bazal membran üzerinde yerleşik, sitoplazması soluk boyanan,

sitoplazmik uzantıları seminifer tübül lümenine kadar uzanan sertoli hücrelerine sahip olduğu gözlemlendi. Spermatidler sertoli hücre sitoplazmaları içerisine gömülü oldukları izlendi.

Kurkumin uygulanan sıçanların testis dokularında seminifer tübüllerin germinal epitel hücreleri normal yapıda ve kontrol grubundakiler ile benzer morfolojide oldukları gözlemlendi.



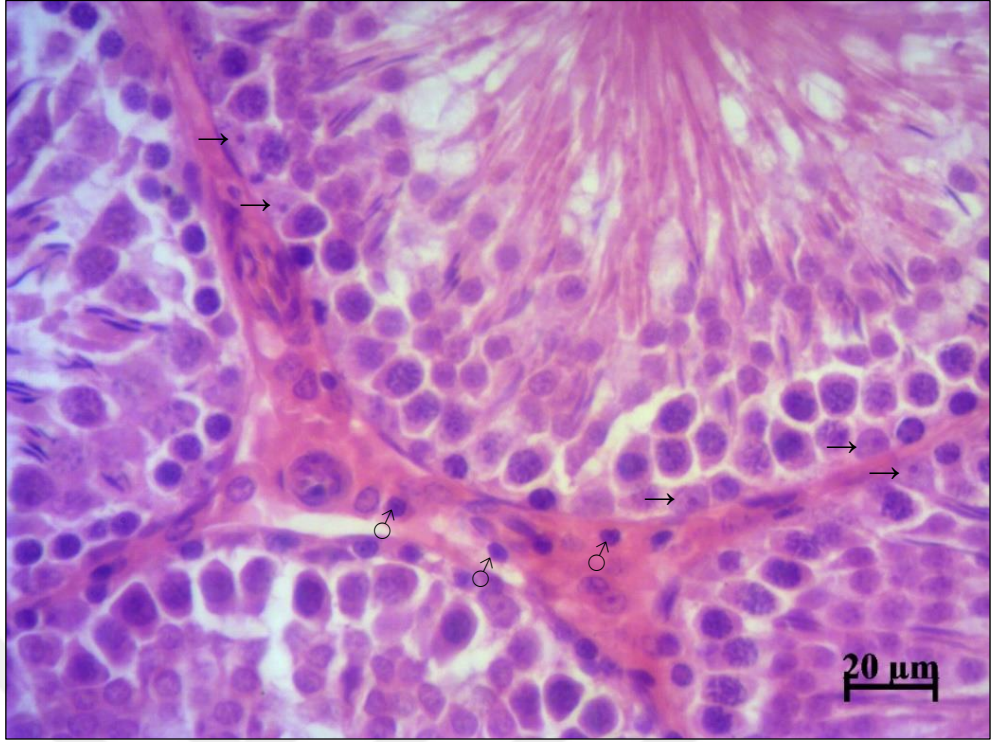
Şekil 12. Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması. Tunika Albuginea (↑) altında düzgün görünümlü seminifer tübüller (▲) izlenmektedir x50.



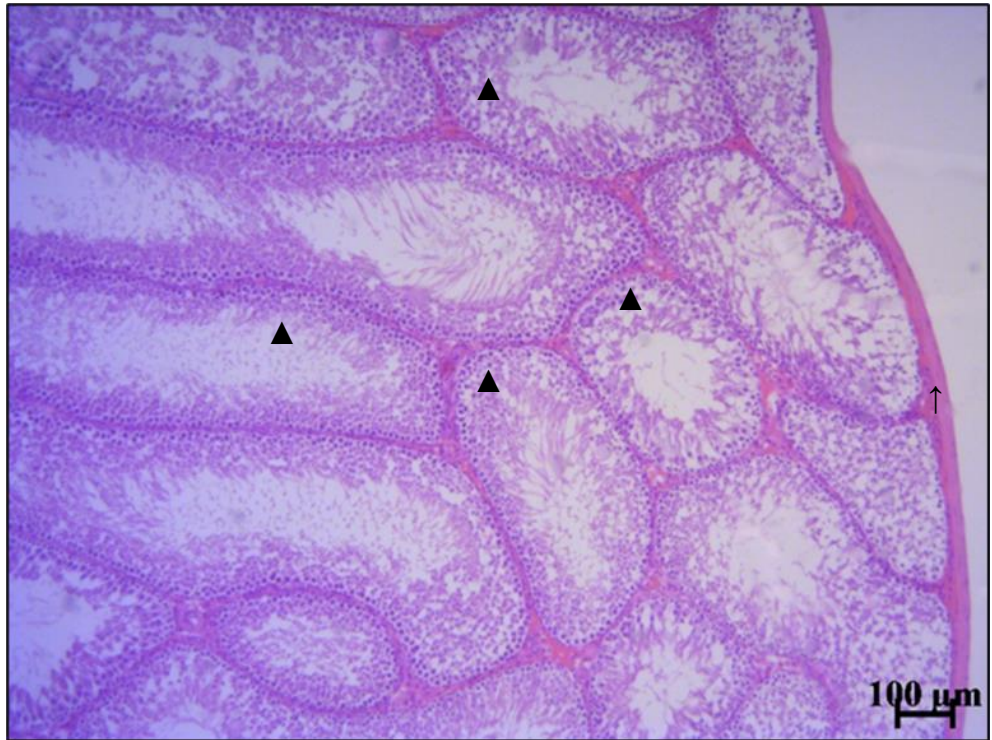
Şekil 13. Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması. Spermatogenezin aktif olduğu, düzgün sınırlara sahip, normal yapıda seminifer tübüller arasında yer alan interstisyel alan (↗) gözlenmektedir x100.



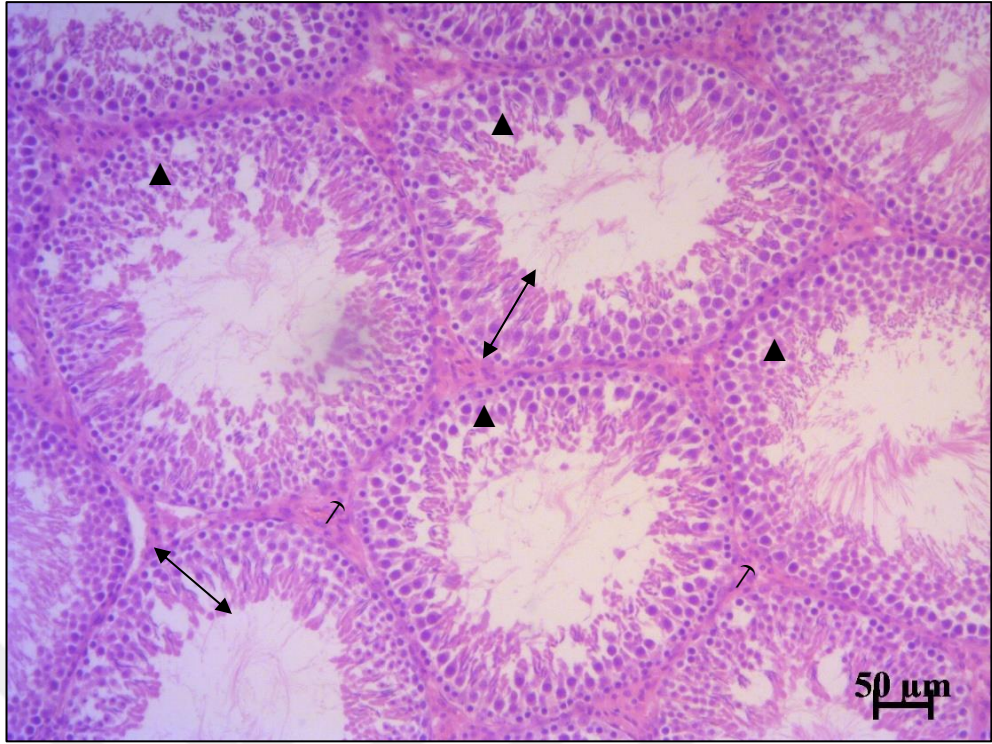
Şekil 14. Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması. Seminifer tübül bazal membranından lümene kadar düzenli görünümde spermatogenik seri hücreleri izlenmektedir (↗) x200.



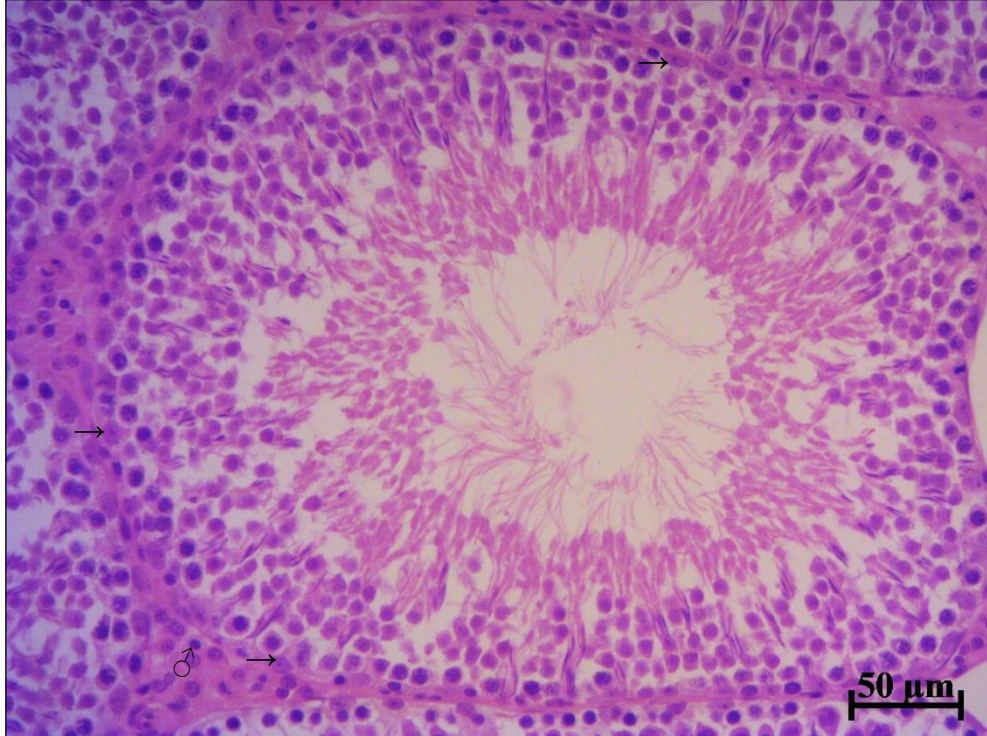
Şekil 15. Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyaması. Seminifer tübül bazalinde sitoplazması lümene uzanmış sertoli hücreleri (→) ve interstisyel alanda leydig hücreleri izlenmektedir (♂), x400.



Şekil 16. Kurkumin grubuna ait kesitin H+E boyaması. Tunika albuginea (↑) altında düzgün görümlü seminifer tübüller (▲) izlenmektedir, x50.

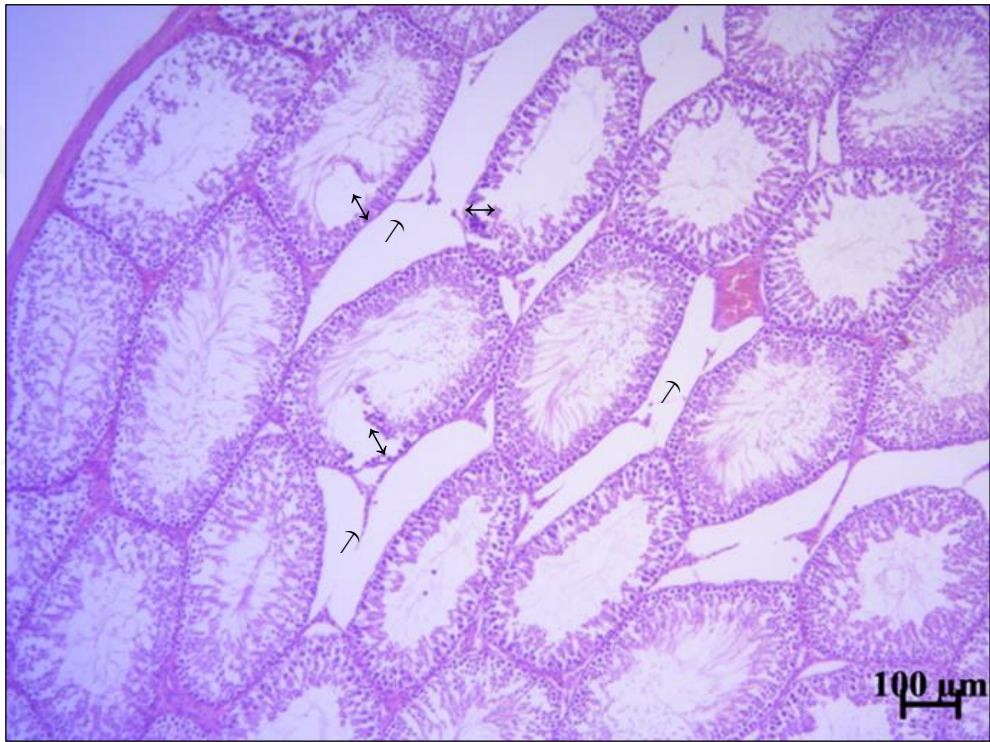


Şekil 17. Kurkumin grubuna ait kesitin H+E boyaması. Seminifer tübüllerin (▲) etrafında düzgün bazal membran ve interstisyel alanlar (↗) izlenmektedir. Germinal epiteli oluşturan spermatogenik seri hücreler (↕) düzgün görünümde, x100.

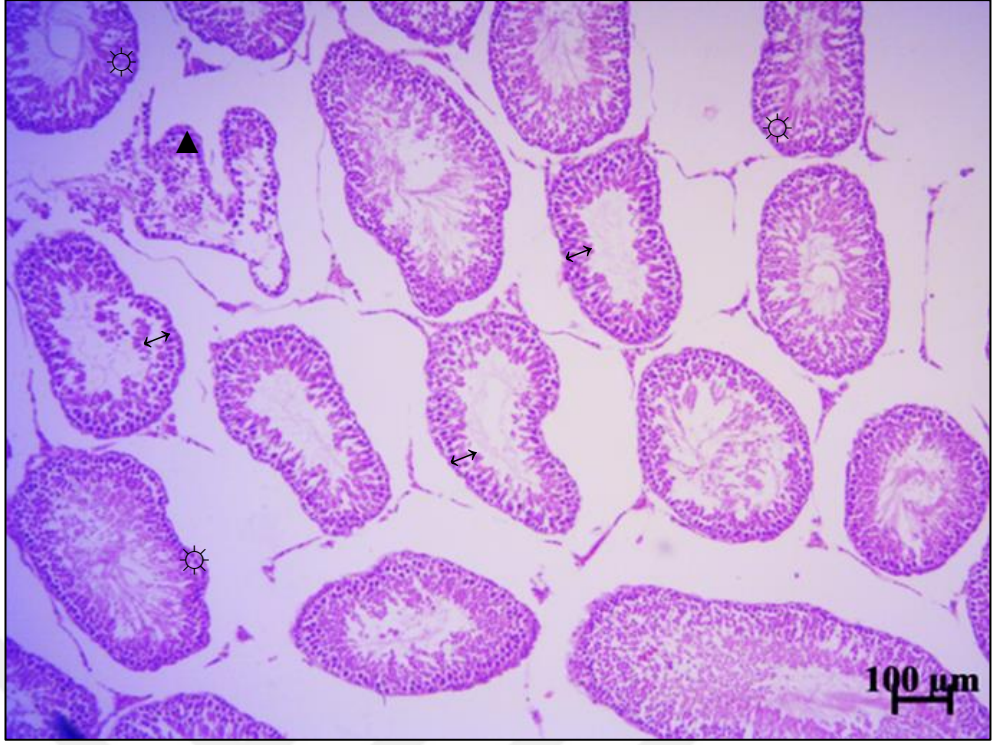


Şekil 18. Kurkumin grubuna ait kesitin H+E boyaması. Seminifer tübül bazalinde sitoplazması lümene uzanmış sertoli hücreleri (→) ve interstisyel alanda leydig hücreleri izlenmektedir (♂), x400.

CCl₄ verilen sıçanların testis dokusu kesitlerinde kontrol ve kurkumin grubunun aksine seminifer tübül ve interstisyel alanın normal histolojik yapıdan uzaklaştığı gözlemlendi. Seminifer tübüllerin germinal epitelinde incelmeye, bazal membranların tübül epitelinden ayrılması, bazı tübüllerde bazal membranın parçalanması belirgindi. Seminifer tübül epitelini oluşturan germinal epitel alanında hücre kayıpları ve düzensizleşme gözlemlendi. Bazı Seminifer tübüller germinal epitelden tamamen yoksundu. Ayrıca seminifer tübül lümeninde immatür hücre ve tübüllerde dev hücre (çok çekirdekli sinsitiyal hücre) oluşumlarına rastlandı. İnterstisyel alanda yer yer azalmalar damar konjesyonu gibi değişiklikler gözlemlendi.



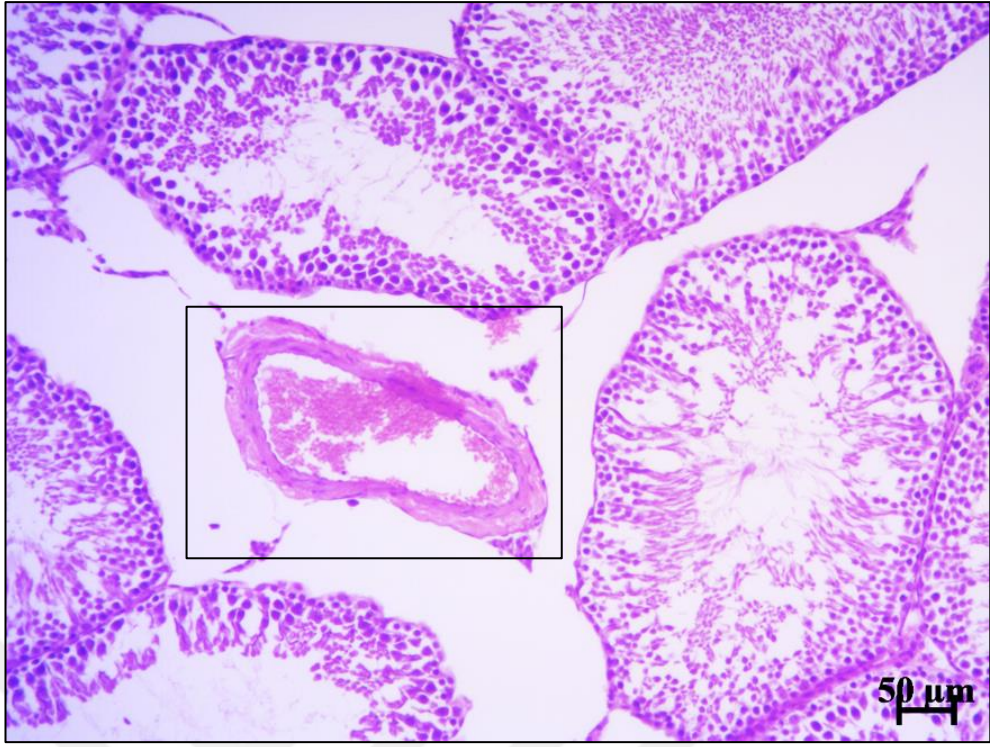
Şekil 19. CCl₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması. Bazal membrandan ayrılmış germinal hücreler (↕), interstisyel alanın yeryer azalması (↷) görülmekte, x50.



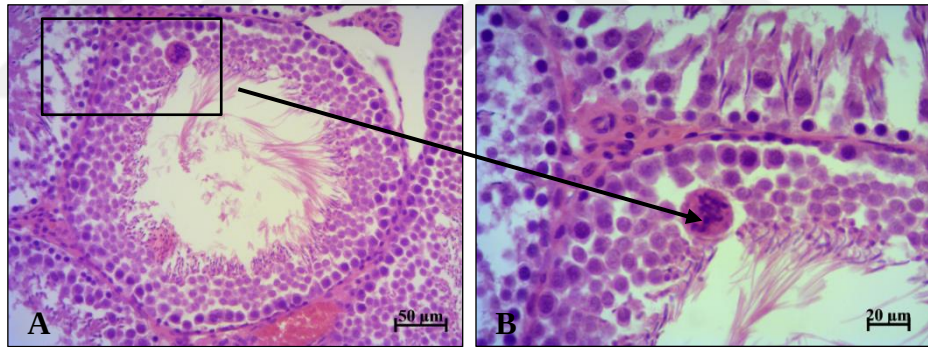
Şekil 20. CCL₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması. Parçalanmış seminifer tübüller (▲), tübül büzüşmeleri (⊙), germinal hücrelerde dejenerasyon ve germinal epitelde incelme (↔) görülmekte, x100.



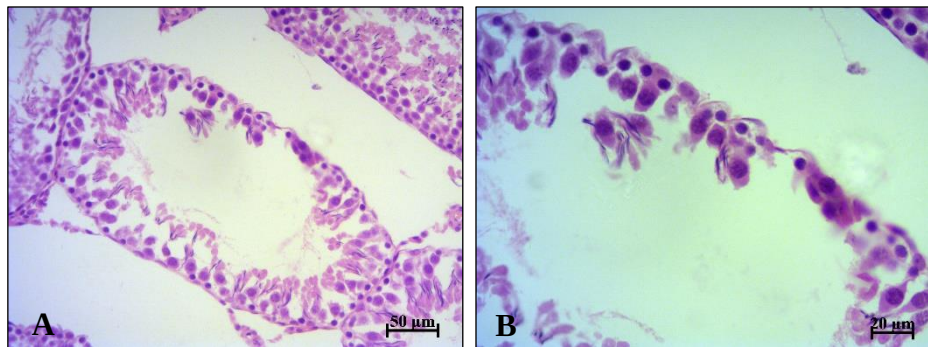
Şekil 21. CCL₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması. Seminifer tübül lümeninde immatür hücreler (○), germinal epitelde dejenerasyon (↓) görülmekte, x200.



Şekil 22. CCL₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması. Damar konjesyonu görülmekte (□), x100.



Şekil 23. CCL₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması. Dev hücre oluşumu izlenmekte, Ax200, B x400.

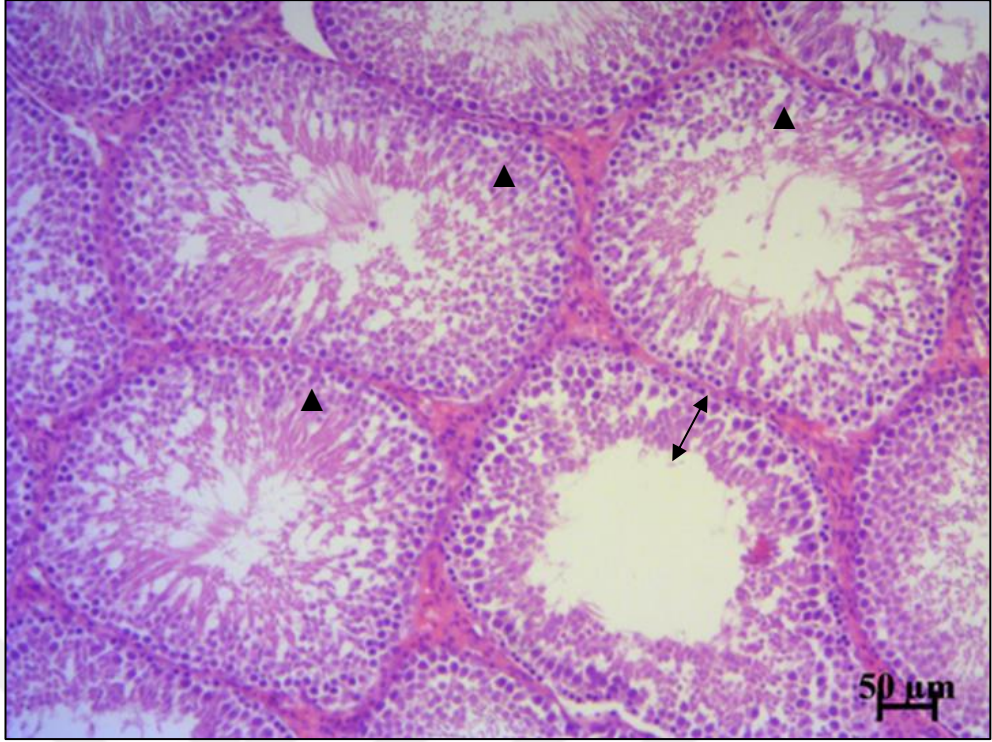


Şekil 24. CCL₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması. Seminifer tübülde epitelin tamamen incilmesi ve hücre kayıpları A x200, B x400.

CCl₄ ve kurkuminin birlikte verildiği grupların testis dokuları incelendiğinde hasarlı tübüllerin yanında normal histolojik yapıya sahip çok sayıda Seminifer tübüllere de rastlandı. CCl₄ grubuna göre dejenerasyonun daha ılımlı olduğu seminifer tübüller ile birlikte normal görünümlü, spermatogenik seri hücrelerinin normal yapıda olduğu çok sayıda tübül gözlemlendi. İnterstisyel alanda CCl₄ grubuna göre kayıplar azalmıştı, tübül lümeninde CCl₄ grubuna göre az sayıda immatür hücre görüntülendi. Ayrıca CCl₄+kurkumin grubunun CCl₄ grubundan en önemli farkı bu grubun testis kesitlerinde hiç dev hücreye rastlanmamasıydı.



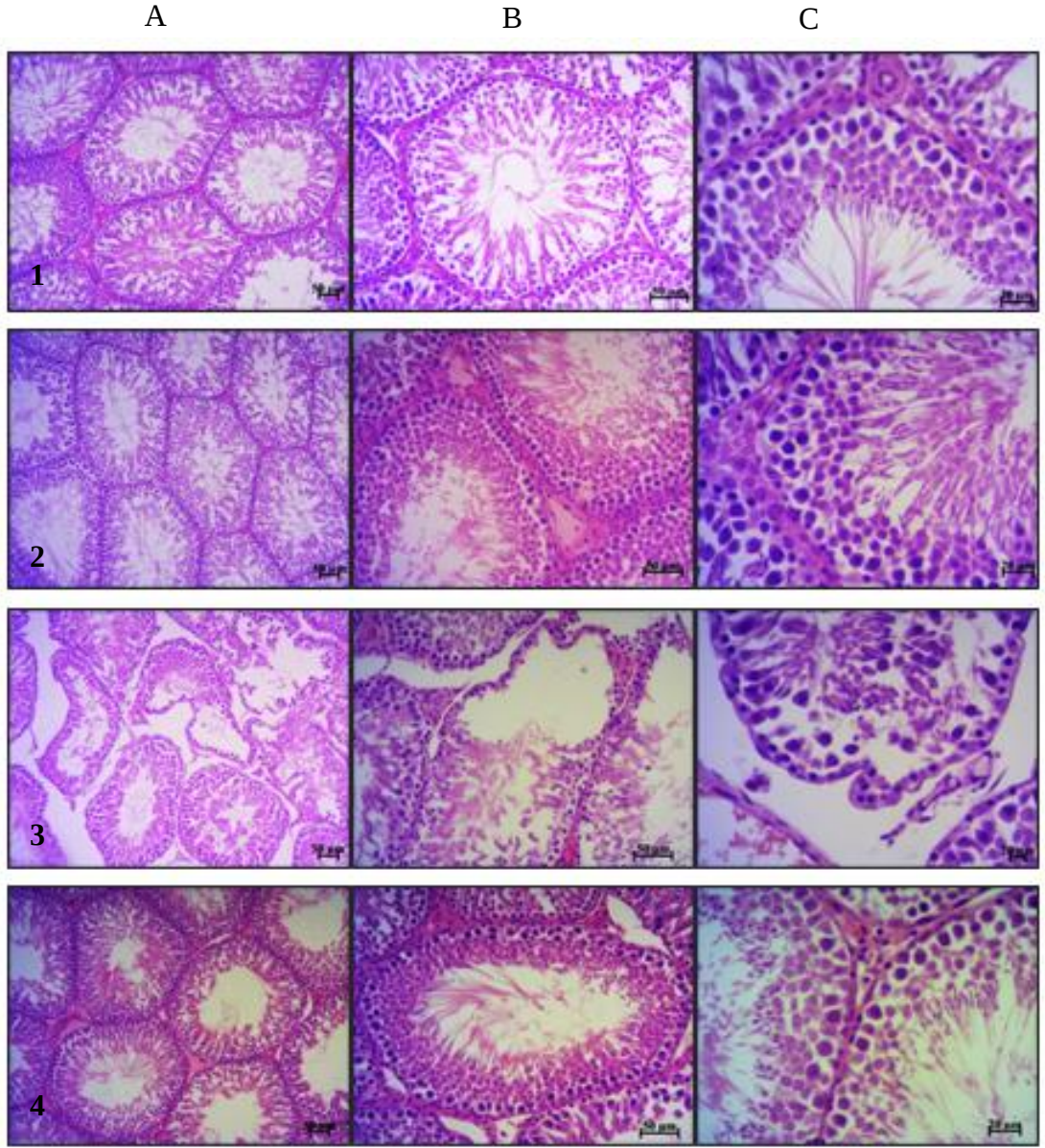
Şekil 25. Kurkumin+ CCl₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması. Bazal membranları düzgün görünümlü seminifer tübüller (▲) ve CCl₄ grubuna göre daha normal interstisyel alan izlenmektedir, x50.



Şekil 26. Kurkumin + CCL₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması. Germinal epiteli incelmış (↕) seminifer tübüllern yanında çok sayıda normal görünümlü Seminifer tübüller görülmekte (▲), x100.



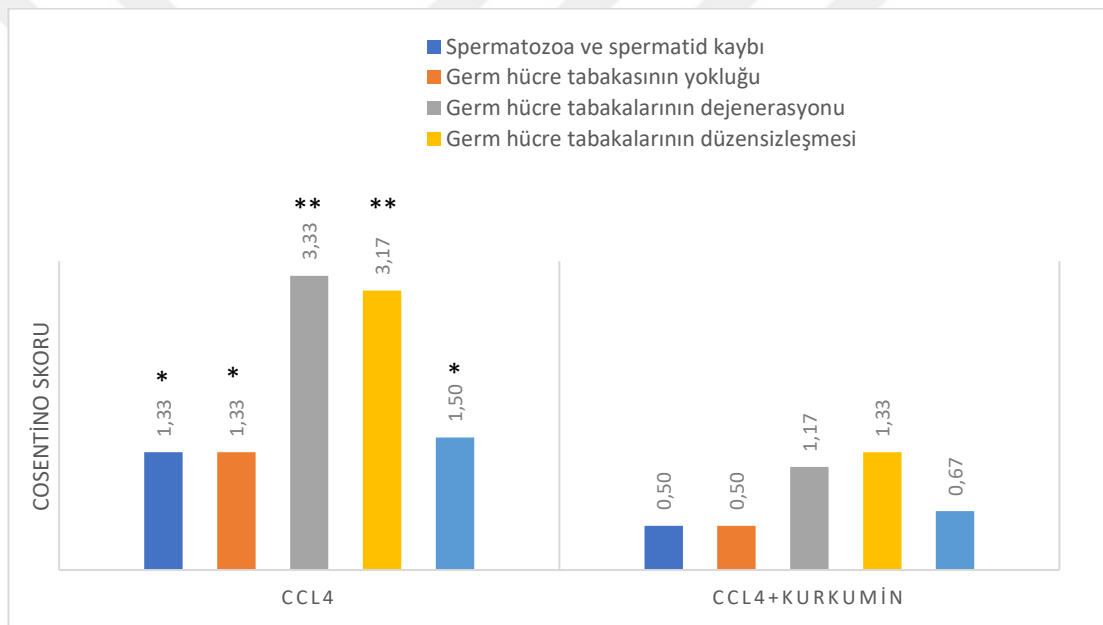
Şekil 27. Kurkumin + CCL₄ grubuna ait kesitin H+E boyaması, x200. Seminifer tübül bazalinde sitoplazması lümene uzanmış sertoli hücreleri (→) ve normal görünümlü spermatogenik seri hücreleri (↕) izlenmekte, x400.



Şekil 28. H+E boyanmış preparatlarda bütün grupların karşılaştırmaları. 1. Satır Kontrol, 2. Satır Kurkumin, 3. Satır CCl₄, 4. Satır. CCl₄ +Kurkumin. A x100, B x200, C x400.

4.4.2. Cosentino skor değerlendirilmesi

Deney gruplarına testis hasarı için yapılan Cosentino skor değerlendirmesi şekil 29’da gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda CCl₄ ile diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Özellikle germ hücre tabakasının dejenerasyonu ve germ hücre tabakasının düzensizleşmesi parametreleri CCl₄ ve tedavi grubu arasında $p<0.01$ düzeyinde anlamlı fark tespit edilmiştir. CCl₄+ Kurkumin grubu ile CCl₄ grubu arasındaki bu fark, CCl₄ ile oluşturulan testis hasarında Kurkumin tedavisinin olumlu sonuç verdiğini göstermiştir.



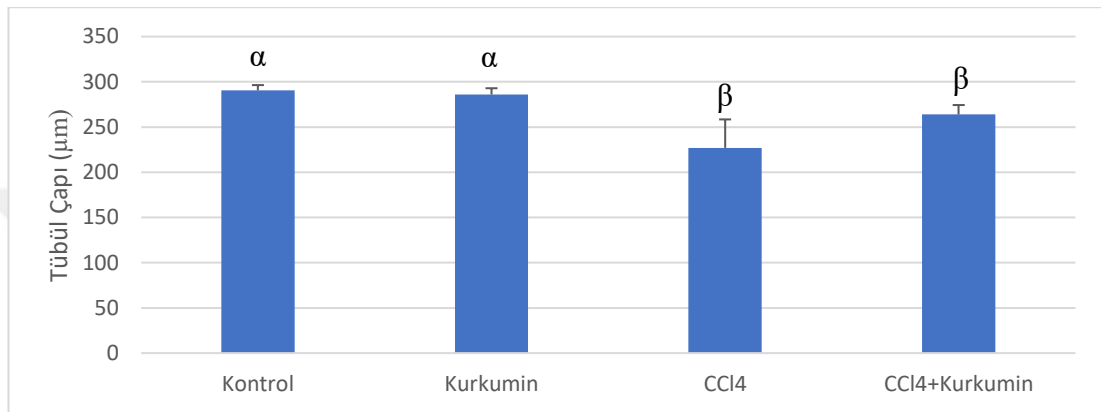
Şekil 29. Grupların Cosentino skor değerleri.

Veriler ortanca (minumum-maksimum) olarak hesaplanmıştır.

* $p<0.05$ ** $p<0.01$

4.4.3. Tübül çapı değerlendirilmesi

Bütün denek gruplarının tübül çapı değerlendirmesi sonucu elde edilen istatistiksel analizler şekil 30’da gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre CCl₄ grubu ile CCl₄+Kurkumin grubu arasında anlamlı fark bulunmasada, kontrol ve Kurkuminle bu gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol ve Kurkumin grubu arasında fark bulunmamıştır.



Şekil 30. Gruplara göre tübül çapı değerlendirmeleri.

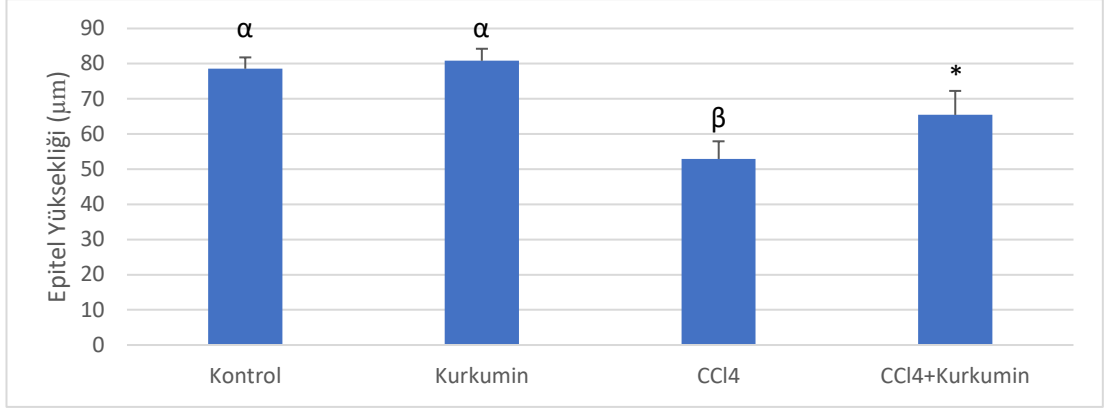
Değerler ortalama $\pm$ Standart sapma olarak sunulmuştur. Aynı işaretler benzer grupları gösterir.

^α $p<0.05$ CCl₄ ve CCl₄+kurkumin grupları ile karşılaştırıldığında

^β $p<0.05$ kontrol ve kurkumin gruplarıyla karşılaştırıldığında

4.4.4. Epitel yüksekliği değerlendirilmesi

Epitel yüksekliği bütün denek grupları için karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur (Şekil 28). Kontrol grubu ile Kurkumin grubu verileri birbirine benzemektedir. Kontrol ve Kurkumin grubu ile CCl₄ ve CCl₄+kurkumin grubu arasında anlamlı fark vardı ($p<0.01$). CCl₄ grubu ve CCl₄+Kurkumin grupları arasında bulunan anlamlı fark kurkuminle tedavinin etki ettiğini göstermiştir.



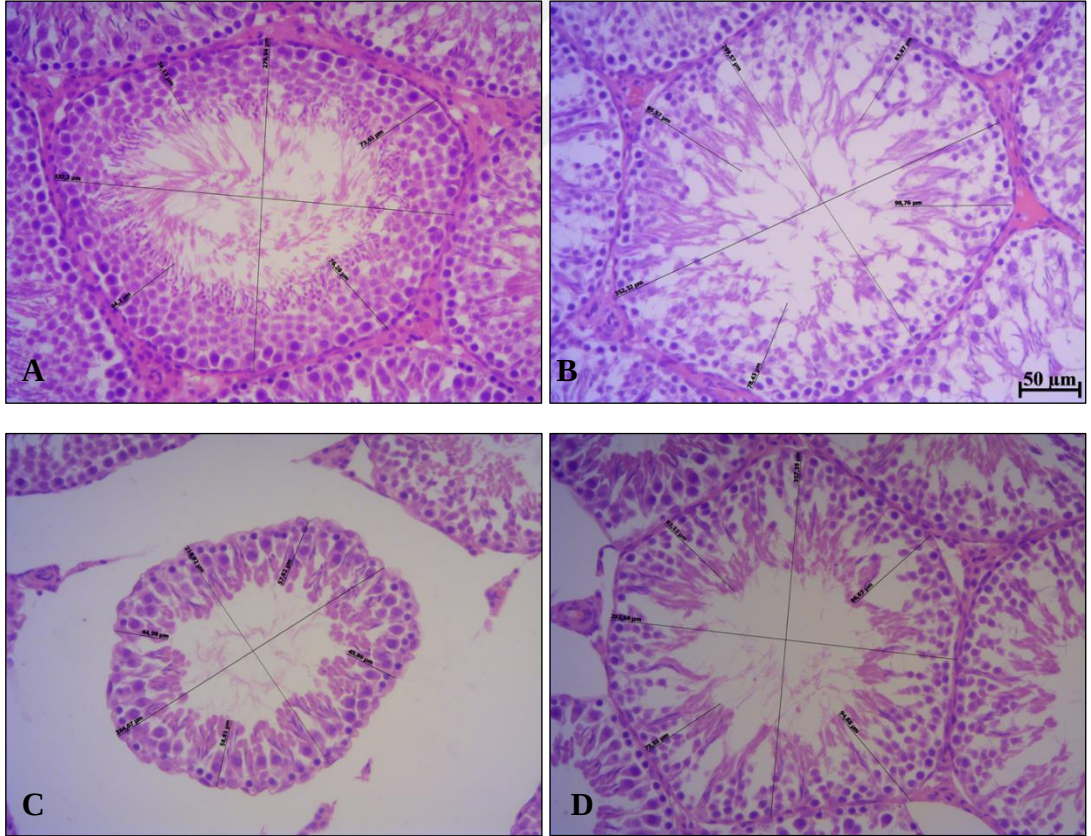
Şekil 31. Gruplara göre epitel yüsekliği değerdendirmeleri.

Değerler ortalama $\pm$ Standart sapma olarak sunulmuştur. Aynı işaretler benzer grupları gösterir.

^α $p < 0.01$ CCl₄ ve CCl₄+Kurkumin gruplarıyla karşılaştırıldığında

^β $p < 0.01$ kontrol, kurkumin ve CCl₄+kurkumin grupları ile karşılaştırıldığında

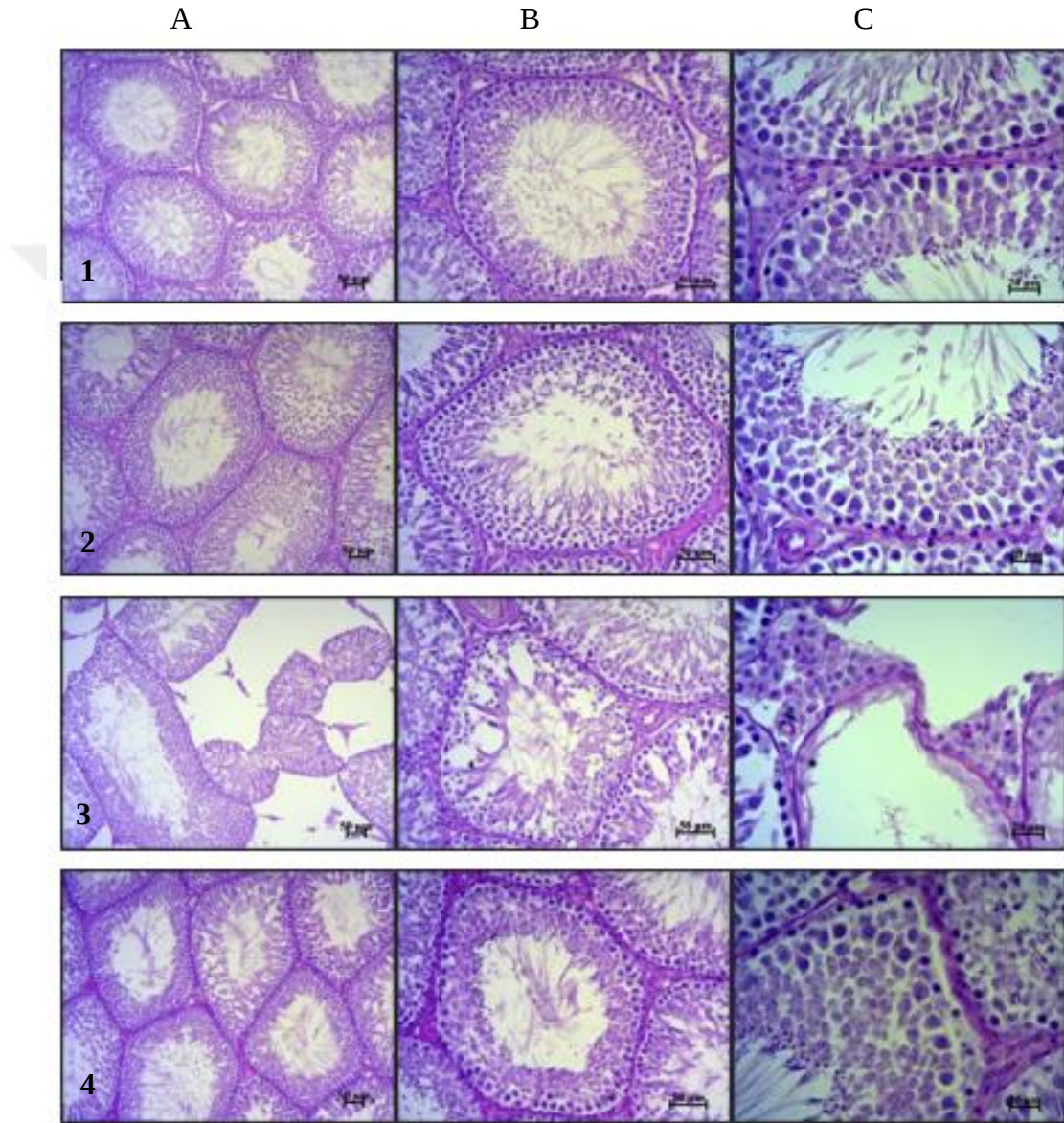
* $p < 0.01$ Kontrol, kurkumin ve CCl₄ grupları ile karşılaştırıldığında



Şekil 32. Bütün gruplar için Tübül çapı ve Epitel yüsekliği ölçümleri. H+E, x200. A. Kontrol, B. Kurkumin, C. CCl₄, D. CCl₄ + Kurkumin.

4.4.5.PAS

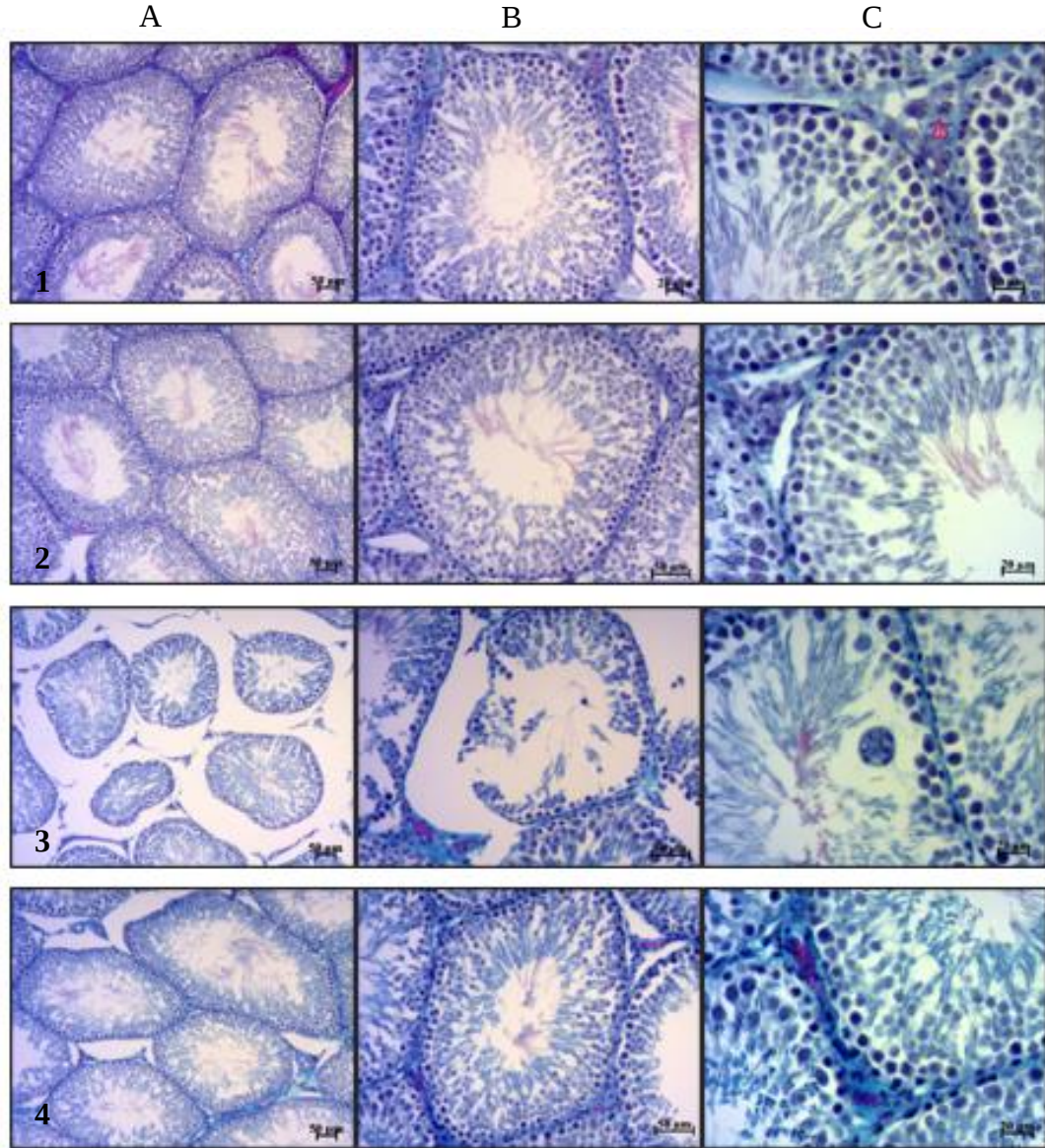
Bütün grupların PAS boyamasında CCl₄ grubunda bazal membranların düzensizliği belirgindi, buna karşın diğer gruplarda bazal membranların doğal yapısını koruduğu gözlemlenmiştir (Şekil 33).



Şekil 33. PAS boyanmış preparatlarda bütün grupların karşılaştırmaları. 1. Satır Kontrol, 2. Satır Kurkumin, 3. Satır CCl₄, 4. Satır. CCl₄ +Kurkumin. A x100, B x200, C x400.

4.4.6. Mason trikrom

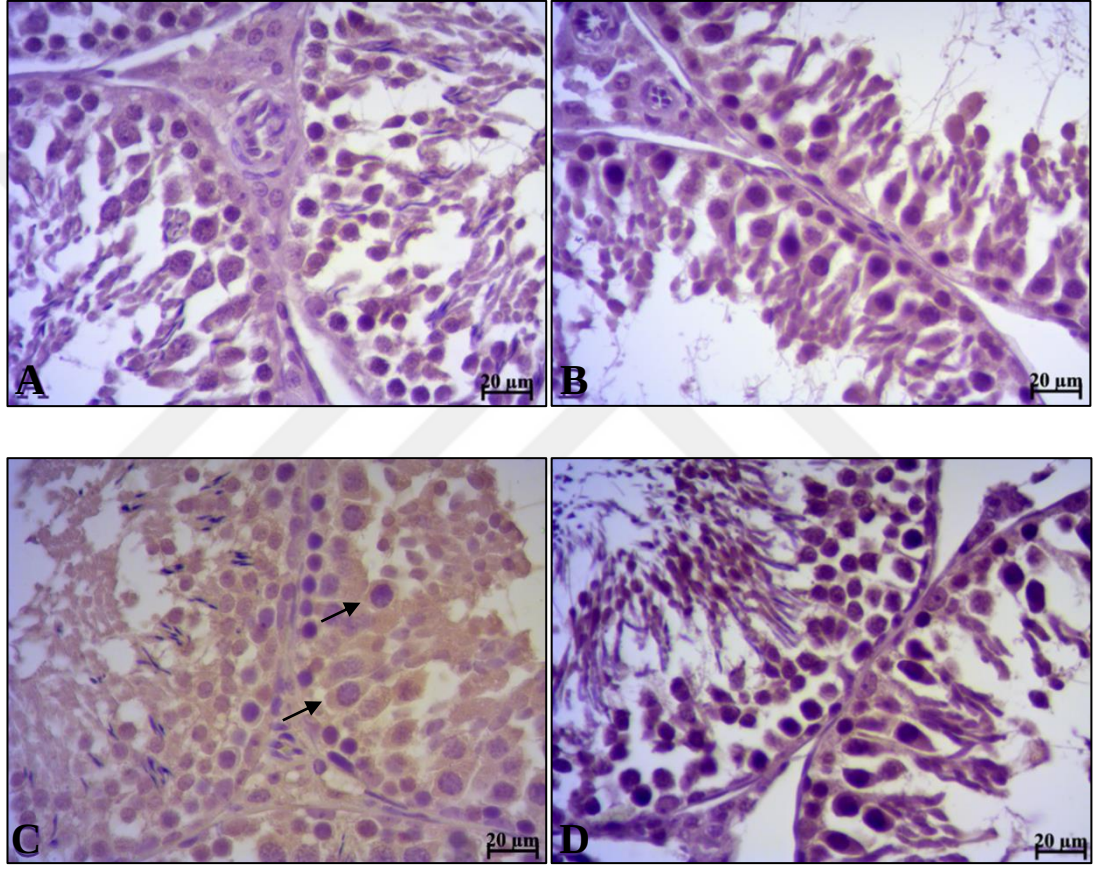
Tüm gruplara ait Mason Trikrom boyamaları karşılaştırıldığında CCl₄ grubunda interstisyel alanda ödem dikkat çekmekteydi (Şekil 34).



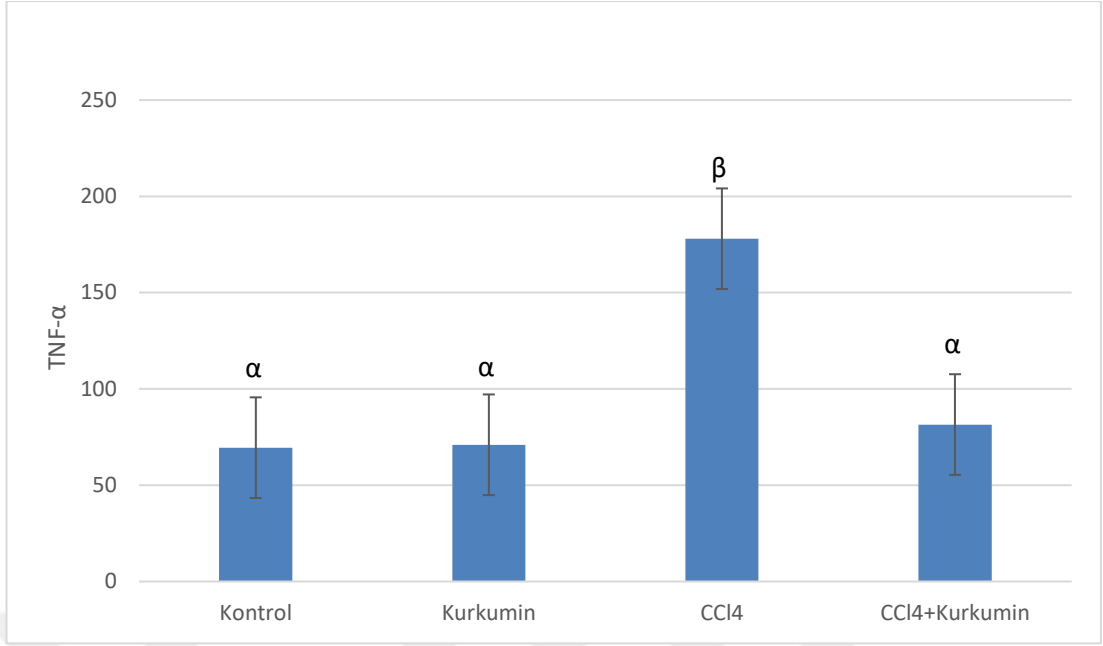
Şekil 34. Mason trikrom preparatlarında bütün grupların karşılaştırmaları. 1. Satır Kontrol, 2. Satır Kurkumin, 3. Satır CCl₄, 4. Satır. CCl₄ +Kurkumin. A x100, B x200, C x400.

4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

TNF- α için yapılan immunohistokimyasal boyadan elde edilen H-SCORE sonucunda CCl₄ grubu ile Kontrol, Kurkumin ve CCl₄+Kurkumin arasında anlamlı fark vardı ($p<0.05$). CCl₄ grubunda TNF- α ekspresyonu anlamlı düzeyde yükselmiştir (Şekil 35,36).



Şekil 35. Tüm gruplarda TNF- α ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. Kontrol grubu, B. Kurkumin grubu, C. CCl₄ grubu, D. Kurkumin+CCl₄ grubu, (→) Tnf- α ile boyanmış spermatogenik hücre sitoplazmaları, x400.

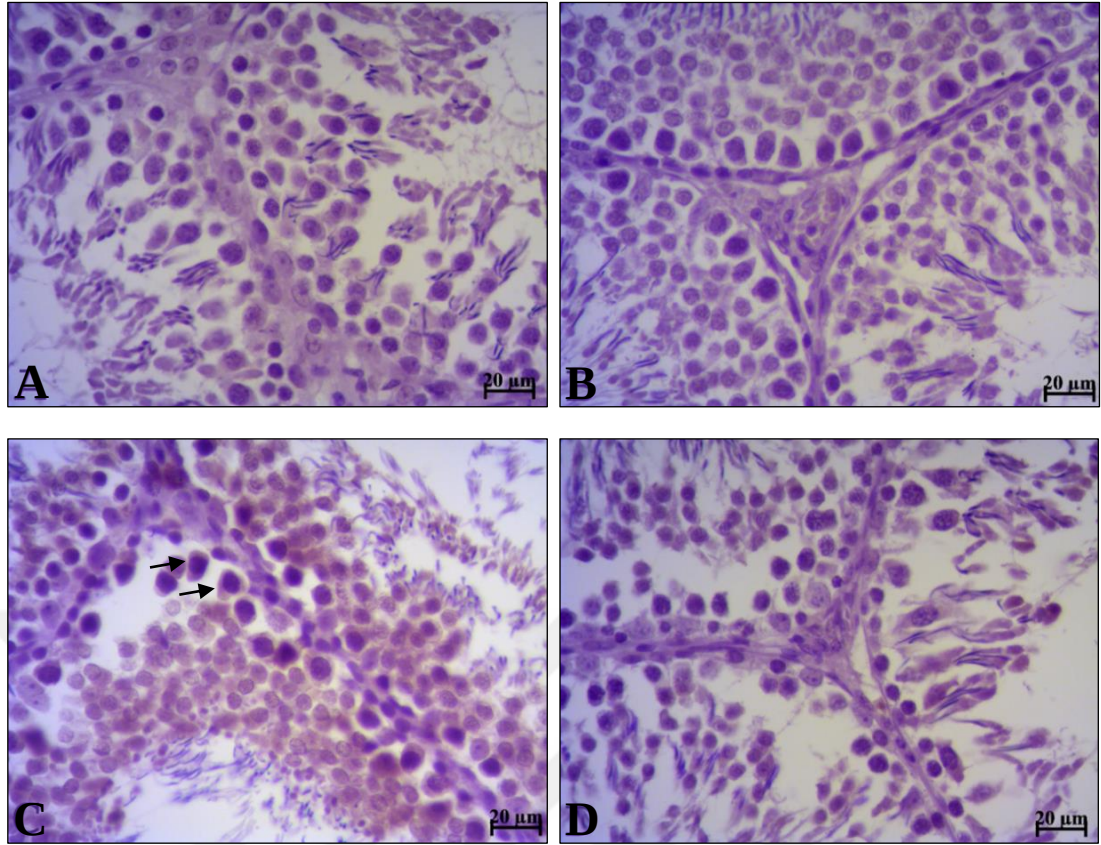


Şekil 36. TNF- α immünreaktivitesi için H-SCORE değerlendirilmesi.

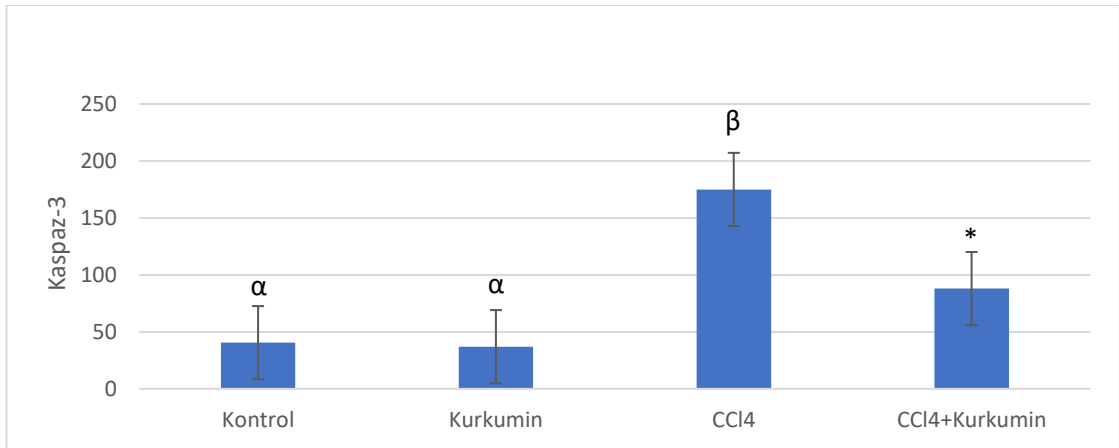
Değerler ortanca (min-maks) olarak hesaplanmıştır. Aynı işaretler benzer grupları gösterir.

^β $p < 0.05$ kontrol, kurkumin ve CCl₄+kurkumin grupları ile karşılaştırıldığında.

Kaspaz-3 immünreaktivitesi için bütün gruplar kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı düzeyde fark bulunmuştur. CCl₄'e bağlı kaspaz-3 ekspresyonunda, kontrol, kurkumin ve CCl₄-kurkumin gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde artış olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Kontrol ile Kurkumin ve Kontrol ile CCl₄+Kurkumin grupları arasında anlamlı fark bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 37,38).



Şekil 37. Tüm gruplarda kaspaz-3 ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. Kontrol grubu, B. Kurkumin grubu, C. CCl₄ grubu, D. Kurkumin+CCl₄ grubu, (→) Kaspaz-3 ile boyanmış spermatogenik hücre sitoplazmaları, x400.



Şekil 38. Kaspaz-3 immünreaktivitesi için H-SCORE değerlendirilmesi.

Değerler ortanca (min-maks) olarak hesaplanmıştır. Aynı işaretler benzer grupları gösterir.

^α $p < 0.05$ CCl₄ ve CCl₄+Kurkumin gruplarıyla karşılaştırıldığında.

^β $p < 0.05$ kontrol, kurkumin ve CCl₄+kurkumin grupları ile karşılaştırıldığında.

* $p < 0.05$ kontrol, kurkumin ve CCl₄ grupları ile karşılaştırıldığında.

5. TARTIŞMA

Serbest radikaller nedeniyle oluşan oksidatif stres hem erkek hem de kadınlarda üreme fonksiyonlarını etkileyen bir dizi patolojik değişikliklerin oluşumunu sağlar (69). Oksidatif stres (OS) ve ROS idiopatik erkek kısırlığında öngörülen mekanizmalardandır (70). ROS, düşük seviyelerde gerekli olmasına rağmen, yüksek seviyelerde patolojik bir duruma neden olmaktadır. Son yıllarda oluşum mekanizmalarını ve sonuçlarını anlamak için olası ROS kaynaklarını belirlemeye yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır. Erkek germ hattı ile ilgili olarak, ROS hem endojen hem de eksojen olarak üretilebilir(71). Eksojen bir kaynak olan hava kirliliğinin erkek üreme parametreleri üzerindeki zararlı etkileri bilinmektedir (72).

CCl₄ 15 Kasım 1990'da kanunla imzalanan Temiz Hava Yasası'nda listelenen 190 tehlikeli hava kirleticisi ve Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu tarafından B2 grubu, olası insan kanserojeni olarak sınıflandırmıştır (73,74). Bu tehlikeli bileşiğe evde temizlik malzemelerinden açık alanlarda ise üretim ve kullanımlardan kaynaklanan salınımlardan ya da yeraltı suyuna sızabileceği çöplüklere atılması nedeniyle maruziyet söz konusudur (75). Yapılan çalışmalarda karbon tetraklorüre maruz kalan hayvanlarda infertilite ve testislerde dejeneratif değişiklikler gözlenmiştir (73,75).

Çalışmamızda oksidatif strese yoluyla testis hasarına neden olan karbon tetraklorürün ve güçlü bir antioksidan olan kurkuminin erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri araştırıldı. Wistar albino sıçanlara 3 hafta boyunca gün aşırı 0.5 ml/kg dozunda uygulanan CCl₄'ün testis dokusuna verdiği hasar üzerine 3 hafta boyunca 200mg/kg dozunda verilen kurkuminin koruyucu etkileri değerlendirildi.

Holeçek ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada Wistar albino sıçanlara 45 gün boyunca haftada üç kez 2 ml/kg dozunda intragastrik CCl₄ maruziyeti sonucunda CCl₄ verilen hayvanların vücut ağırlığında azalma görülmüştür (76).

Rafiee ve ark. yaptığı diğer bir çalışmada ise 4 hafta boyunca haftada iki kez zeytinyağında seyreltilmiş 1 ml/kg CCl₄ intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve

hayvanların testis ağırlıkları karşılaştırıldığında CCl₄ grubunda anlamlı bir azalma fark edilmiştir (39).

Lipidler hücre zarlarının ana bileşenidir ve hücrelerin yapısal bütünlüğünü korumada önemli bir role sahiptir. Lipitlerin aşırı oksidasyonu, hücre zarlarının fiziksel özelliklerini bozar ve proteinlerin, nükleik asitlerin kovalent modifikasyonuna neden olabilir. Lipid peroksitler, hücrelerde oksidatif stres tarafından üretilen önemli bir biyomolekül sınıfıdır (77). Çalışmalar oksidatif stresin lipid peroksidasyonunu arttırarak SOD, CAT ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzim aktivitelerini azalttığını göstermiştir (78,79).

Sahreen ve ark. yaptığı çalışmada Sprague Dawley sıçanlarına 8 hafta boyunca haftada iki kez zeytinyağında çözülmüş 0.5 ml/kg ip CCl₄ uygulaması sonucunda CAT ve SOD aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) azalma gözlemlenmiştir. Aynı grup CCl₄ uygulamasının serum testosteron ($p<0.05$) düzeyini düşürdüğünü ve testis histomorfolojisinde germ hücrelerinde azalma, germinatif epitelde hasarlar ve bazal membranda ayrılmalar olduğunu göstermiştir (80).

Serbest radikallerdeki bir artış veya antioksidan sistemlerdeki azalmanın neden olduğu oksidatif stres, hayvan modellerinde çok çalışmıştır (81). MDA, oksidatif stres kaynaklı lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve sıklıkla lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılır.

Hashem ve ark. haftada iki kez zeytinyağı ile seyreltilmiş 3 ml/ kg CCl₄ ip olarak enjekte etmiş ve CCl₄ verilen grupta MDA düzeyinin önemli ölçüde arttığını ($p<0.05$) ve GPX, GSH, CAT ve SOD düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını ($p<0.05$) göstermiştir. Bu çalışmada CCl₄ uygulanmış hayvanların testis ağırlıklarında ve serum testosteron düzeyinde bir azalma ($p<0.05$) gözlemlenmiştir(82).

İnflamasyon, immünolojik komplikasyonlar, kanser, metabolik hasarı içeren neredeyse tüm hastalık süreçlerinde görünmektedir. TNF- α , apoptoz ve inflamasyon gibi fizyolojik olayları düzenleyen ve farklı hastalıkları etkileyen bir proinflamatuvar sitokindir (83).

Hashem ve ark. yaptığı çalışmada diğer gruplara kıyasla CCl₄ uygulanmış hayvanlarda TNF- α ekspresyonunda anlamlı artış ($p<0.05$) gözlemlenmiş ve histolojik olarak testis dokusunda dejenere tübüller, büzülmüş bazal membran, germ hücre

dejenerasyonu, tübül lümeninde spermatozoa yokluğu gibi patolojik değişiklikler gözlemlenmiştir (82).

Rahmouni ark. yaptıkları bir çalışmada 10 hafta boyunca gavaj yoluyla zeytinyağı içinde 2 ml/kg CCl₄ uygulanmış sıçanlarda SOD, CAT ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimlerde anlamlı azalma ($p<0.05$), MDA seviyesinde kayda değer bir artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda serum testosteron düzeyinde anlamlı bir azalma ($p<0.01$), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, seminifer tübüllerde karbon tetraklorür kaynaklı disorganizasyon ve atrofi saptanmıştır (84).

Moselhy ve ark. Wistar albino türü sıçanlara 7 gün boyunca ip 0.5ml/kg CCl₄ uygulamış ve çalışma sonucunda, kontrol ile karşılaştırıldığında CCl₄ grubu sıçanlarda lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA düzeyinde önemli bir artış, antioksidan SOD ve CAT aktivitelerinde önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir (85).

Al-Olayan ve ark. sıçanlara 10 hafta boyunca haftalık 2 ml/kg CCl₄ uygulamış, deney sonunda interstisyel ödeme bağlı olarak testis ağırlıklarında diğer gruplara kıyasla anlamlı bir artış ($p<0.05$) gözlemlenmiştir. Karbon tetraklorür, kontrol grubuna kıyasla SOD ve CAT aktivitelerini ve serum testosteron düzeyini düşürmüş, MDA seviyesini yükseltmiştir ($p<0.05$). Bununla birlikte, CCl₄ grubunda, testislerin histolojisinde farklılıklar gözlenmiştir. Bu grupta atrofik seminifer tübüller, seminifer tübüllerin bazal membranlardan ayrılması, germ hücrelerinin çoğunlukla dejenerasyonu, interstisyumda genişlemeler gözlemlenmiştir (86).

Parlak Ak ve ark. Sprague-Dawley cinsi ratlara mısır yağı (1:1) içerisinde 0.5 ml/kg/ dozunda CCl₄ gavaj yoluyla 14 gün boyunca uygulamış ve sonuç olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CCl₄ grubunun MDA düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek, bunun yanı sıra, GSH düzeyi ile SOD ve KAT aktivitelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda CCl₄ grubunda germinal hücrelerde dejenerasyon, nekroz, disorganizasyon, deskuamasyon ve kayıp, seminifer tübüllerde atrofi, çok çekirdekli sinsityal hücre oluşumu, spermatojenik ve maturasyon arresti ve interstisyel bölgede ödem ve damar konjesyonu gibi testiküler lezyonlar gözlenmiştir. Aynı çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CCl₄ grubunun Johnson skorlaması değerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu ve CCl₄ grubunda kaspaz-

3 immünreaktivitesi bakımından güçlü yoğunlukta pozitiflik tespit edildiği bildirilmiştir (87).

Sönmez ve ark. Wistar albino sıçanlara 1 hafta boyunca zeytinyağı ve hafif alkali çözelti içerisinde çözünmüş 0.25 ml/kg CCl₄ uygulamasının MDA düzeyinde anlamlı ($p<0.001$) artışa ve GSH-Px ve CAT aktivitelerinde anlamlı ($p<0.01$) azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda CCl₄ uygulaması testis ağırlıklarında anlamlı azalmaya ($p<0.001$) sebep olmuştur. Bununla birlikte testis histomorfolojisinde germinal hücrelerde nekroz, dejenerasyon, deskuamasyon, disorganizasyon ve azalma, tübüllerde atrofi, bazal membranda kalınlaşma, interstisyel ödem ve konjesyon, multinükleer sinsityal hücre oluşumu ve spermatojenik arrest sadece CCl₄ verilmiş gruplarda gözlemlenmiştir. Yapılan Johnsen skorlamasında CCl₄ grubu diğer gruplara göre anlamlı fark ($p<0.001$) gösterdiği bildirilmiştir. Kontrol grubuna göre sadece CCl₄ verilen grupta seminifer tübül çaplarında ve germinal hücre tabakası kalınlığında anlamlı azalma ($p<0.001$) saptanmıştır (37).

Bizim çalışmamızda da literatür taraması sonucu elde ettiğimiz bulgulara benzer bulgulara rastlandı. Çalışmamızda CCl₄ verilen grupta lipid peroksidasyon ürünü MDA miktarı diğer bütün gruplara kıyasla anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.01$). Serbest radikallerin oluşumunu baskılayan SOD düzeyi diğer gruplara göre CCl₄ grubunda anlamlı derecede düşük ($p<0.01$) bulundu. Çalışmamızda serum testosteron düzeyi CCl₄ uygulanmış sıçanlarda diğer gruplara göre anlamlı derecede azalmıştı ($p<0.01$).

Bununla birlikte farklı histolojik boyamaların ışık mikroskobu görüntülemelerinde CCl₄ grubuna ait testis kesitlerinde seminifer tübüllerin germinal epitelinde incelleme, tübül epitellerinin bazal membranlardan ayrılması, bazı tübüllerde parçalanma gibi bulgular gözlemlendi. Seminifer tübüllerde ondülasyon, büzüşme, tübül epitelini oluşturan germinal epitel alanında hücre kayıpları ve düzensizleşme gözlemlendi. Bazı seminifer tübüller germinal epitelden tamamen yoksundu. Ayrıca seminifer tübül lümeninde immatür hücre ve tübüllerde dev hücre (çok çekirdekli sinsityal hücre) oluşumlarına rastlandı. İnterstisyel alanda yer yer genişlemeler, damar konjesyonu gibi testiküler lezyonlar da gözlemlendi.

Tüpül çapı değerlendirmelerinde CCl₄ grubu ile CCl₄+Kurkumin grubu arasında anlamlı fark bulunmasada, kontrol ve kurkuminle CCl₄ grubu ile CCl₄+Kurkumin grupları arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Epitel yüksekliği bütün gruplar arasında karşılaştırıldığında kontrol grubu ile kurkumin grubu verileri birbirine benzemektedir. Kontrol ve Kurkumin grubu ile CCl₄ ve CCl₄+kurkumin grubu arasında anlamlı fark vardı ($p<0.01$). CCl₄ grubu ve CCl₄+Kurkumin grupları arasında bulunan anlamlı fark kurkuminle tedavinin etki ettiğini göstermektedir.

İbrahim ve ark.'ları CD1 albino farelere 8 hafta boyunca haftada iki kez zeytin yağında çözünmüş 0.5 ml/kg CCl₄'ü intraperitoneal olarak enjekte etmiş ve testis üzerindeki hasarları gözlemlemiştir. CCl₄ uygulanmış grup, normal kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CCl₄'ün MDA seviyelerini önemli ölçüde artırırken ($P < 0.01$), CAT ve SOD ve GSH aktivitelerini azalttığı görülmüştür. ($P < 0.05$). Mevcut araştırma CCl₄ grubu farelerin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IL- 2 seviyesinde ve kaspaz- 3 aktivitesinde anlamlı ($P < 0.05$) artışa, testosteron ve 17 β estradiol anlamlı düşüşe ($P < 0.05$) sahip olduğunu ortaya koydu. Ayrıca, testislerin mevcut histopatolojik kesitleri, CCl₄ grubunda, seminifer tübüllerin bazılarında spermatojenik serilerin kaybıyla dejenerasyona neden olduğunu, merkezde spermatozoa bulunmadığını, eksik spermatojenik seriye sahip olduğunu göstermiştir (88).

Bitkisel gıdalar, lif, C vitamini, karotenoidler, antioksidanlar, potasyum, magnezyum, flavonoidler, doymamış yağlar, bitkisel protein ve diğer bileşikler, daha düşük kronik hastalık ve erken ölüm riskine katkıda bulunabilecek birçok besin ve bileşen içerir (89–92). Kurkumin, Doğu tıbbında uzun süredir kullanılmaktadır ve Batı tıbbında sadece nonsteroid antiinflatuar ilaç (NSAID) olarak değil, aynı zamanda kemopreventif, antitümör ve antioksidan özellikleri nedeniyle de dikkat çekmektedir (93–95).

Çeşitli araştırmalar, kurkuminin lipid peroksidasyonunu önlediğini ve farklı kanser türlerinde glutatyon-s-transferaz (GST), GSH, SOD ve GPx dahil olmak üzere antioksidan aktivitelerini arttırdığını göstermiştir (96,97).

Oksidatif hasar, inflamasyon ve apoptoz, diyabetik testis hasarının ana nedenlerindendir. Zha ve ark.'nın yaptığı çalışma zerdeçalın diyabetik testis hasarını önlediğini göstermiştir. T2DM farelerine, yüksek yağlı bir diyetle beslendikten sonra, 8 hafta boyunca intraperitoneal olarak 40 mg/kg enjekte edilmiş ve 16 hafta süreyle

100 ve 200 mg/kg kurkumin oral olarak uygulanmıştır. Sonuç olarak, zerdeçal, diyabet kaynaklı mikroyapısal anormallikleri kısmen önlemiş ve tedavi edilmemiş T2DM sıçanlarına kıyasla serum testosteron seviyelerini önemli ölçüde artırmıştır. Ek olarak, kurkumin, apoptotik proteinleri düzenleyerek testiküler apoptozu azaltmış ve MDA ekspresyonunu aşağı doğru düzenleyerek, oksidatif stres seviyelerini belirgin şekilde düşürmüştür (98).

Sudjarwo ve ark. Wistar sıçanlarına 40 gün boyunca günde bir kez, oral yol ile, 50 mg/kg kurşun asetat vermiş ve 100 mg, 200 mg ve 400 mg/kg oral yolla verilmiş kurkuminin testis üzerine koruyucu etkileri incelenmiştir. MDA, SOD ve GPx değerlerinde 100 mg, 200 mg kurkumin uygulamasıyla pozitif kontrol arasında anlamlı fark bulunmasada 400 mg/kg verilmiş kurkumin grubuyla pozitif kontrol arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Kurkumin ile tedavi edilen sıçanlarda seminifer tübüllerin sayısı ve morfolojik bütünlüğü korunmuştur. Gözlemler, kurşun asetatın testiküler toksik etkilerini kurkumin ile azaltıldığını göstermektedir (99).

Kurkuminin birincil etki mekanizması, serbest radikal oluşumunu engellemek ve serbest radikalleri temizlemektir (99,100). Ayrıca kurkumin antiinflamatuvar özellikleri ile proinflamatuvar sitokinler; interlökin-8 (IL-8), interlökin-1 (IL-1), TNF- α 'yı ve nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini azalttığı bildirilmiştir.

İnflamatuvar bağırsak hastalığı, artrit, pankreatit ve maligniteler dahil olmak üzere birçok kronik hastalıkta kurkuminden fayda sağlanmıştır (101–103).

Ahmed ve ark.'larının yaptığı çalışmada Wistar Albino sıçanlara Romatoid artriti indüklemek için deri altından 0.1 ml tek doz CFA (Complete Freund's adjuvant) enjekte edilmiştir. Kurkumin grubu sıçanlara günlük olarak oral sonda ile CMC (karboksimetil selüloz) içinde çözünmüş 100 mg/kg kurkumin oral olarak uygulanmıştır. Sonuçta CFA ile indüklenen artritlik sıçanlarda, normal sıçanlarla karşılaştırıldığında, serum TNF- α düzeyinde anlamlı bir artış varken kurkumin ile tedavi edilen sıçanlar, artritlik kontrol sıçanları ile karşılaştırıldığında TNF- α seviyesinde belirgin bir düşüş sergilemiştir ($p<0.05$). Ayrıca kurkumin ile tedavi edilen artritlik sıçanlar, artritlik kontrol ile karşılaştırıldığında GSH, GST, GPx ve SOD seviyelerinde önemli bir artış göstermiştir. Sonuç olarak, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri ve histopatolojik değişikliklerdeki iyileştirici rolleri

nedeniyle mezenkimal kök hücreler ve kurkumin kombinasyonunun testis ve diğer dokular üzerinde koruyucu etkisi gösterilmiştir (101).

Mercantepe ve ark.'nın yaptığı çalışmada Sprague Dawley cinsi sıçanlara ip enjeksiyonla tek doz 5 mg/kg sisplatin verilmiştir. Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmüş 100 mg/kg kurkumin 7 gün boyunca oral olarak uygulanmıştır. Sonuç olarak kurkumin ile tedavi edilen grupta, seminifer tübüllerde çok az interepitelyal vakuolizasyon görülmüştür. Kurkumin grubunda spermatogonyum ve spermatitlerin normal görünümde olduğu, seminifer tübüllerdeki sperm sayısının sisplatin grubundan çok daha fazla olduğu gözlenmiştir. İnterstisyel alanın hyalinizasyonu sisplatin grubuna göre daha az yoğun bulunmuştur. Benzer şekilde, seminifer tübüllerin bazal tabakasının sisplatin grubuna göre daha az düzensiz olması dikkat çekmiştir. Aynı zamanda sisplatin grubunda özellikle tip A ve tip B spermatogonia, primer spermatositler ve spermatidler olmak üzere seminifer tübüllerin germinal epitelinde NF- κ B/p65, kaspaz-3 için yoğun sitoplazmik boyanma gözlemlenirken, kurkumin ile tedavi edilen grupta bu belirteçlerin negatif olduğu saptanmıştır. Kaspaz kaskadı, apoptozu indüklemeye anahtar bir rol oynar. Öncelikle, kaspaz-3'ün aktivasyonu, apoptozu indükleyen geri dönüşümsüz bir olaydır. Bu nedenle araştırmalar apoptotik hücreleri değerlendirmek için kaspaz-3 ekspresyonunu kullanmaktadır (104).

Bizde çalışmamızda CCl₄ grubundaki kaspaz-3 pozitif hücre sayısının kontrol grubundaki hücrelere göre anlamlı olarak arttığı (p<0.05), CCl₄+ Kurkumin grubunda ise anlamlı düzeyde azaldığını gözlemledik. Benzer şekilde TNF- α ekspresyonunda da diğer gruplarla karşılaştırıldığında CCl₄ grubunda anlamlı bir artış gözlemlenirken (p<0.05), kurkumin ile tedavi edilmiş sıçanlarda TNF- α ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığını (p<0.05) gözlemledik.

Bulgularımızı yukarıda özetlenen çalışmalar ışığında değerlendirdiğimizde CCl₄'ün oksidatif stres yaratıcı etkisi ile apoptozu tetiklediği, bununla birlikte artan oksidanların testis histolojisini olumsuz yönde etkilediğini, inflamasyonu artırdığını düşünmekteyiz. Bununla birlikte elde ettiğimiz sonuçlar çerçevesinde kurkuminin CCl₄ kaynaklı testis toksisitesine karşı potansiyel bir antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik ajan olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

1. Deneklerimizin ağırlıklarını deney süresi boyunca tarttık. Deneyin ilk günü ve son günü kaydedilen denek ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırmasında ağırlıklar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.
2. Hem sağ hem de sol testis ağırlıkları açısından kontrol ve kurkumin grupları ile CCl₄ grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. CCl₄ grubu ile CCl₄+Kirkumin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasa da CCl₄+Kirkumin grubunda sağ ve sol testis ağırlıklarının CCl₄ grubuna göre düşük olduğu gözlemlendi.
3. Oksidan-antioksidan dengeyi değerlendirmek için MDA ve SOD ölçümü yapıldı. Gruplar arasında MDA ve SOD değerleri açısından anlamlı fark bulundu.
4. Gruplar arası histopatolojik değerlendirmede CCl₄ grubunda testis dokusundaki hasarın çok belirgin olduğunu, seminifer tübüllerde düzensizleşme ondülasyon, büzüşme, bazal membranların tübül epitelinden ayrıldığı, bazı tübüllerde parçalanma, seminifer tübüllerin germinal epitelinde incelleme, hücre kayıpları, ayrıca seminifer tübül lümeninde immatür hücre ve dev hücre (çok çekirdekli sinsitiyal hücre) oluşumlarına rastlandı. İnterstitiyel alanda genişleme, damar konjesyonu gibi testiküler lezyonlar gözlemlendi. CCl₄+ Kirkumin grubunda ise doku hasarının biraz daha azaldığını, normal görünümlü seminifer tübüllerin yanında hasarlı tübüllerin de bulunduğunu gözlemlendi.
5. Seminifer tübül çapı gruplar arasında kıyaslandığında, CCl₄ grubu seminifer tübül çapı ile CCl₄+Kirkumin grubu arasında fark bulunmasa da CCl₄ grubu ile kontrol ve kurkumin grupları arasında fark bulundu.
6. Epitel yüksekliği bütün denek grupları için karşılaştırıldığında, Kontrol grubu ile Kirkumin grubu verileri birbirine benzemektedir. Kontrol ve Kirkumin grubu ile CCl₄ ve CCl₄+Kirkumin grubu arasında anlamlı fark vardı.
7. Apoptotik süreci değerlendirmek için kaspaz 3 ekspresyonları indirekt immunohistokimyasal yöntemle gösterildi. Sonuç olarak, CCl₄ grubu ile Kontrol, Kirkumin ve CCl₄+Kirkumin arasında anlamlı fark vardı. CCl₄ grubunda kaspaz-3 ekspresyonu anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi.
8. İnflamasyonu değerlendirmek için TNF- α ekspresyonunun İmmünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi sonucunda CCl₄ grubu ile Kontrol, Kirkumin ve

CCl₄+Kurkumin arasında anlamlı fark vardı. CCl₄ grubunda TNF- α ekspresyonu anlamlı düzeyde yüksek olduğunu gözlemlendi.

Yaptığımız literatür taramaları sonucunda CCl₄ nedeni ile ortaya çıkan testis hasarında kurkuminin etkinliğini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bulgularımız birlikte değerlendirildiğinde çalışmamızın literatürdeki boşluğu dolduracağını öngörmekteyiz. Kurkuminin CCl₄ kaynaklı infertilitede tedavi edici bir ajan olarak kliniğe katkı verebileceğini düşünmekteyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Unsal V, Cicek M, Sabancilar İ. Toxicity of carbon tetrachloride, free radicals and role of antioxidants. 36rd edition. pp. 279-95, Reviews on Environmental Health. De Gruyter Open Ltd; 2021.
2. Richard W. Boubel. Fundamentals of Air Pollution. Ed: Daniel A. Vallero. 4th Edition, British Library Cataloguing-in-Publication Data, 2008.
3. Andrew M. Papa and David P. Rall. Environmental Medicine. Washington, D.C.: National Academies Press; 1995.
4. Abdel Moneim AE. Prevention of carbon tetrachloride (CCl₄)-induced toxicity in testes of rats treated with *Physalis peruviana* L. fruit. Toxicol Ind Health 32(6):1064–73, 2016.
5. Andrew M. Papa and David P. Rall. Environmental Medicine. 7th Edition, pp.249-252. Washington, National Academies Press, 1995.
6. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes. Ed: Cheng CY. Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, 2009.
7. Badr GM, Algefare AI, Alfwuaires MA. Antioxidant Potential of Parsley Leaf (*Petroselinum crispum*) Essential Oil on Hypothyroidism and Testicular Injury in Mice Intoxicated by Carbon Tetrachloride. Biomed Res Int, 2021.
8. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. 14th Edition, pp.470-85. Nature Reviews Urology. Nature Publishing Group, 2017.
9. Khan MR, Younus T. Prevention of CCl₄-induced oxidative damage in adrenal gland by *Digera muricata* extract in rat. Pak J Pharm Sci (4):469–73, 2011.
10. Venkatanarayana G, Sudhakara G, Sivajyothi P, Indira P, Indira P. Protective effects of curcumin and vitamin e on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats. Excli Journal. 11:641-650, 2012.
11. Yao Q, Lin Y, Li X, Shen X, Wang J, Tu C. Curcumin ameliorates intrahepatic angiogenesis and capillarization of the sinusoids in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. Toxicol Lett, 222(1):72–82, 2013.
12. Rivera-Espinoza Y, Muriel P. Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. Liver International, 29(10):1457–66, 2009.
13. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2.Basım, s.335–336, İstanbul Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2015.

14. Aşçı R. Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. 1.Basım, İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık Hiz. Tic. Ltd.; 2013.
15. T.W. Sadler. Medikal Embriyoloji. (Çev.Ed: Başaklar C) s.246-247, Ankara: Palme Yayıncılık; 2011.
16. Ross HM PJ. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. (Çev.Ed: Baykal B) s.784-788, Palme Yayıncılık. Ankara: 2014.
17. Eşrefoğlu M. Özel Histolji. 2.Basım, s.330–338, İstanbul Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2015.
18. Gartner LP HJ. Erkek Genital Sistem. 3.Basım, s.490, Philadelphia: Saunders, 2007.
19. Junqueira L.C CJ. Temel Histoloji. (Çev.Ed: Solakoğlu S, Aytekin Y) s.432-435, Nobel Tıp Kitapevi, Ankara, 2006.
20. Eşrefoğlu M. Özel Histolji. 2.Basım, s.344–346, İstanbul Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2015.
21. Skinner MK and Griswold MD. Sertoli Cell Biology. Ed: Michael K. Skinner, Michael D. Griswold, Elsevier Academic Press, California-USA, 2005.
22. Kızılay F, Altay B. Spermatogenez, Spermiyogenezis ve Klinik Yansımaları. Androloji Bülteni. 21:177–84, 2019.
23. Gilbert S.F. Gelişimsel Biyoloji. 6.Basım, Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
24. Gartner LP HJ. Male Reproductive System. Saunders, an imprint of Elsevier Inc. (978-0-7020–3114), 2011.
25. Kessel RG, Randy H. Tissues and organs: a text-atlas of scanning electron microscopy. San Francisco: Freeman; 1979.
26. Burukoğlu Dönmez D, Bayçu C, Musmul A. Effect of quercetin on CCl₄ induced testicular injury in adult male rats. Journal Of Medicine, 39(1):65–65, Osmangazi, 2017.
27. K. D. Thrall MEVRA. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and pbpk modeling. J Toxicol Environ Health A, 60(8):531–48, 2000,
28. Unsal V, Cicek M, Sabancilar İ. Toxicity of carbon tetrachloride, free radicals and role of antioxidants. Rev Environ Health, 36(2):279–95, 2021.

29. Weber LWD, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*, 33(2):105–36, 2003.
30. Rail DP, Pope AM, Carrie EI, David PR., editors. *Environmental Medicine*. Washington, D.C.: National Academies Press; 1995.
31. Lin HM, Tseng HC, Wang CJ, Lin JJ, Lo CW, Chou FP. Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn extract against CCl₄-iduced oxidative damage in rats. *Chem Biol Interact*, 171(3):283–93, 2008.
32. *Environmental Medicine*. Washington, D.C.: National Academies Press; 1995.
33. Yıldırım AB, Karabulut D. Karbon tetraklorürün neden olduğu akciğer hasarında l-karnitinin antiapoptotik ve histopatolojik değişiklikler üzerindeki rolü. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20;189–94, 2020.
34. Koçak Y, Oto G, Ekin S, Yücel UM, Bakır A. Deneyisel karbon tetraklorür toksisitesinde *Allium Schoenoprasum* L. etanol ekstresinin serum total sialik asit ve lipid bağlı sialik asit düzeyleri üzerinde koruyucu etkisi. *Van Sag Bil Derg*, 13(1):25-31, 2020.
35. Abdel Moneim AE. Prevention of carbon tetrachloride (CCl₄)-induced toxicity in testes of rats treated with *Physalis peruviana* L. fruit. *Toxicol Ind Health*. 32(6):1064–73, 2016.
36. Isidori AM, Pozza C, Gianfrilli D, Isidori A. Medical treatment to improve sperm quality. *Reprod Biomed Online*, (6):704–14, 2006.
37. Sönmez M, Türk G, Çeribaşı S, Çiftçi M, Yüce A, Güvenç M, et al. Quercetin attenuates carbon tetrachloride-induced testicular damage in rats. *Andrologia*. 46(8):848–58, 2014.
38. Terzi EH, Kükner A, Öztürk S, Özoğul C, Üyetürk U. The effect of heparin on the carbon tetrachloride induced changes in rat testis. *Acta Medica Anatolia*, 27;2(2):56, 2014.
39. Rafiee F, Nejati V, Heidari R, Ashraf H. Protective effect of methanolic extract of *Berberis integerrima* Bunge root on carbon tetrachloride-induced testicular injury in Wistar rats. *Int J Reprod Biomed*, 14(2):133–40, 2016.
40. Serdaroğulları M. Causes of Male Infertility. *Experimed*, 25;10(3), 2020.
41. Anadolu Sağlık Merkezi. İnfertilite ve nedenleri. Ataşehir Tıp Merkezi. [/https://www.anadolusaglik.org/](https://www.anadolusaglik.org/).
42. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl*, 13(1):43–52, 2011.

43. Barati E, Nikzad H, Karimian M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell Mol Life Sci*, 77(1):93–113, 2020.
44. Wagner H, Cheng JW, Ko EY. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab J Urol*, 16(1):35–43, 2018.
45. Trum JW, Mol BWJ, Pannekoek Y, Spanjaard L, Wertheim P, Bleker OP, et al. Value of detecting leukocytospermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. *Fertil Steril*, 70(2):315–9, 1998.
46. Plante M, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril*, 62(2):387–93, 1994.
47. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility a clinical perspective. *Hum Reprod Update*, 14(3):243–58, 2008.
48. Queiroz EKR, Waissmann W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad Saude Publica*, 22(3):485–93, 2006.
49. Wagner H, Cheng JW, Ko EY. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab J Urol*, 16(1):35–43, 2018
50. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. 15rd edition. pp.195-218, *AAPS Journal*, 2013.
51. Milobedzka J, Kostanecki StV, Lampe V. About Curcuminns. Reports of the German Chemical Society, 43(2):2163–70, 1910.
52. Zorofchian Moghadamtousi S, Abdul Kadir H, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A Review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res Int*, 1–12. 2014.
53. Lao CD, Ruffin MT, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med*, 17;6(1):10, 2006.
54. Gopi S, Jacob J, Varma K, Jude S, Amalraj A, Arundhathy CA, et al. Comparative oral absorption of curcumin in a natural turmeric matrix with two other curcumin formulations. An Open-label Parallel-arm Study. *Phytotherapy Research*, (12):1883–91, 2017.
55. Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules*, 24(16):2930, 2019.
56. Hewlings S, Kalman D. Curcumin: a review of its effects on human health. *Foods*, 22;6(10):92, 2017.

57. Giordano A, Tommonaro G. Curcumin and cancer. *Nutrients*, 11(10):2376, 2019.
58. Mohebbati R, Anaeigoudari A, Khazdair MR. The effects of *Curcuma longa* and curcumin on reproductive systems. *Endocr Regul*, 26;51(4):220–8, 2017.
59. Topcu-Tarlacalisir Y, Akpolat M, Uz YH, Kizilay G, Sapmaz-Metin M, Cerkez Kayabekir A, et al. Effects of curcumin on apoptosis and oxidoinflammatory regulation in a rat model of acetic acid-induced colitis: the roles of c-jun n-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Med Food*, 16(4):296–305, 2013.
60. Zhao L, Gu Q, Xiang L, Dong X, Li H, Ni J, et al. Curcumin inhibits apoptosis by modulating Bax/Bcl-2 expression and alleviates oxidative stress in testes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Ther Clin Risk Manag*, 13:1099-105, 2017.
61. Mohebbati R, Anaeigoudari A, Khazdair MR. The effects of *Curcuma longa* and curcumin on reproductive systems. *Endocr Regul*, 26;51(4):220–8, 2017.
62. Memarzia A, Khazdair MR, Behrouz S, Gholamnezhad Z, Jafarnejhad M, Saadat S, et al. Experimental and clinical reports on anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of *Curcuma longa* and curcumin, an updated and comprehensive review. *BioFactors*, 19;47(3):311–50, 2021.
63. Giordano A, Tommonaro G. Curcumin and Cancer. *Nutrients*, 5;11(10):2376, 2019.
64. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett ATK. Histological Changes Occurring in the Contralateral Testes of Prepubertal Rats Subjected to Various Durations of Unilateral Spermatic Cord Torsion. *Journal of Urology*, 133(5):906–11, 1985.
65. Utomo B, Daningtia NR, Yuliani GA, Yuniarti WM. Effects of a standardized 40% ellagic acid pomegranate (*Punica granatum* L.) extract on seminiferous tubule histopathology, diameter, and epithelium thickness in albino Wistar rats after heat exposure. *Vet World*, 17;12(8):1261–5, 2019.
66. Rahma N, Wurlina W, Madyawati SP, Utomo B, Hernawati T, Safitri E. Kaliandra honey improves testosterone levels, diameter and epithelial thickness of seminiferous tubule of white rat (*Rattus norvegicus*) due to malnutrition through stimulation of HSP70. *Open Vet J*, 11(3):401–6, 2021.
67. Casini AF, Ferrali M, Pompella A, Maellaro E, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice. *Am J Pathol*, 123(3):520–31, 1986.

68. Kakkar P, Das B, Viswanathan PN. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J Biochem Biophys*, 21(2):130–2, 1984.
69. Keçeci M. Sıçan Ovaryan Foliküllerinde Radyasyona Bağlı Apoptozis Üzerine Shilajitin Etkileri. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2014.
70. Alahmar A. Role of oxidative stress in male infertility: An updated review. *J Hum Reprod Sci*, 12(1):4, 2019.
71. Ribas-Maynou J, Yeste M. Oxidative stress in male infertility: causes, effects in assisted reproductive techniques, and protective support of antioxidants. *Biology (Basel)*, 10;9(4):77, 2020.
72. Carre J, Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri R. Does air pollution play a role in infertility: a systematic review. *Environ Health*, 16(1):82, 2017.
73. Carbon tetrachloride. /<https://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-4-ccl-4-0/>
74. U.S. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS) on Carbon tetrachloride. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development. 1999.
75. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Carbon tetrachloride. Public Health Service, US Department of Health and Human Services. 1994;
76. Holecek M, Vodenicarovova M. Muscle wasting and branched-chain amino acid, alpha-ketoglutarate, and ATP depletion in a rat model of liver cirrhosis. *Int J Exp Pathol*, 99(6):274–81, 2018.
77. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 482(3):419–25, 2017.
78. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Shabestari MM, Azad FJ, Farkhondeh T, Bafandeh F. Effect of chronic exposure to cadmium on serum lipid, lipoprotein and oxidative stress indices in male rats. *Interdiscip Toxicol*, 8(3):151–4, 2015.
79. Momeni H, Eskandari N. Curcumin protects the testis against cadmium-induced histopathological damages and oxidative stress in mice. *Hum Exp Toxicol*, 39(5):653–61, 2020.
80. Sahreen S, Khan MR, Khan RA, Shah NA. Effect of Carissa opaca leaves extract on lipid peroxidation, antioxidant activity and reproductive hormones in male rats. *Lipids Health Dis*, Jun 20; 12:90, 2013.

81. Botsoglou NA, Taitzoglou IA, Botsoglou E, Zervos I, Kokoli A, Christaki E, et al. Effect of long-term dietary administration of oregano and rosemary on the antioxidant status of rat serum, liver, kidney and heart after carbon tetrachloride-induced oxidative stress. *J Sci Food Agric*, 89(8):1397–406, 2009.
82. Hashem AS. Defensive impact of propolis against CCl₄ actuated rats' testicular damage. *J Adv Vet Anim Res*, 8(1):70–7, 2021.
83. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(2):135–41, 2002.
84. Rahmouni F, Daoud S, Rebai T. *Teucrium polium* attenuates carbon tetrachloride-induced toxicity in the male reproductive system of rats. *Andrologia*, 51(2):13182, 2019.
85. Moselhy SS, Ghoneim MA, Khan JA. In vitro and in vivo evaluation of antimicrobial and antioxidant potential OF STEVIA EXTRACT. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 13(6):18–21. 2016.
86. Al-Olayan EM, El-Khadragy MF, Metwally DM, Abdel Moneim AE. Protective effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on testes against carbon tetrachloride intoxication in rats. *BMC Complement Altern Med*, 22;14(1):164, 2014.
87. Parlak Ak T, Yaman M, Tatlı Seven P, Gül Baykalır B, İflazoğlu Mutlu S, Sur Arslan A, et al. Ratlarda karbon tetraklorür kaynaklı testis hasarı üzerine krisinin etkileri: biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal değerlendirme. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 30;16(3):320–9, 2021.
88. Ibrahim AM, Morad MY, El-Khadragy MF, Hammam OA. The antioxidant and anti-inflammatory effects of *Eremina desertorum* snail mucin on experimentally induced intestinal inflammation and testicular damage. *Biosci Rep*, 42(10), 2022.
89. Aune D. Plant Foods, Antioxidant Biomarkers, and the Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and Mortality: A Review of the Evidence. *Adv Nutr*, 10(Suppl_4), S404–21, 2019;
90. Slavin JL, Martini MC, Jacobs DR, Marquart L. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *Am J Clin Nutr*, 70(3 Suppl, 459S-463S, 1999.
91. Lampe JW. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr*, 70(3 Suppl):475S-490S. 1999.
92. Fardet A. New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre? *Nutr Res Rev*, 23(1):65–134, 2010.

93. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Curcumin. *Adv Exp Med Biol*, 595:105-25, 2007.
94. Mukhopadhyay A, Basu N, Ghatak N, Gujral PK. Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. *Agents Actions*, 12(4):508–15, 1982.
95. Reddy AC, Lokesh BR. Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. *Food Chem Toxicol*, 32(3):279–83, 1994
96. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant And Anti-Inflammatory Properties Of Curcumin. In: *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*. Boston, 2007.
97. Zia A, Farkhondeh T, Pourbagher-Shahri AM, Samarghandian S. The role of curcumin in aging and senescence: Molecular mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 134:111119, 2021.
98. Zha W, Bai Y, Xu L, Liu Y, Yang Z, Gao H, et al. Curcumin attenuates testicular injury in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Biomed Res Int*, 7468019, 2018.
99. Sudjarwo SA, Sudjarwo GW, Koerniasari. Protective effect of curcumin on lead acetate-induced testicular toxicity in Wistar rats. *Res Pharm Sci*, Oct;12(5):381-90, 2017.
100. Agarwal R, Goel SK, Behari JR. Detoxification and antioxidant effects of curcumin in rats experimentally exposed to mercury. *J Appl Toxicol*, 30(5):457–68, 2010.
101. Ahmed RH, Galaly SR, Moustafa N, Ahmed RR, Ali TM, Elesawy BH, et al. Curcumin and mesenchymal stem cells ameliorate ankle, testis, and ovary deleterious histological changes in arthritic rats via suppression of oxidative stress and inflammation. *Stem Cells Int*, 3516834, 2021.
102. Abe Y, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res*, 39(1):41–7, 1999.
103. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*, 15;75(4):787–809, 2008.
104. Mercantepe T, Unal D, Tümkaya L, Yazici ZA. Protective effects of amifostine, curcumin and caffeic acid phenethyl ester against cisplatin-induced testis tissue damage in rats. *Exp Ther Med*, 15(4):3404–12, 2018.

8. EKLER

Ek 1: Türkçe Etik Kurul Onayı



T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 04/11/2021
TOPLANTI NO : 2021/09

- 1- Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2021-26-04/11 Protokol no'lu "Karbon Tetraklorür Uygulanmış Sıçanlarda Kurkumin'in Testis Üzerindeki Koruyucu Etkisi" konulu çalışmanın Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

AŞLI GİBİDİR

Prof. Dr. Emine YILMAZ CAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

Ek 2: İngilizce Etik Kurul Onayı



T.C.
Zonguldak Bülent Ecevit University
Animal Experiments Local Ethical Committee



Date of Meeting : November 4, 2021
Meeting No : 2021/09

- 1- Research Application Registered by 2021-26-04/11 and titled "Protective Effect of Curcumin on Testis in Carbon Tetrachloride Administered Rats" has been approved by the animal experiments Local Ethical Committee

Prof. Dr. Emine YILMAZ CAN
Animal Experiments Local Ethical Committee Director

9. ÖZGEÇMİŞ

2012 yılında liseden mezun oldum. 2015 yılında Bakü Baza Tıp Koleji Ebelik bölümünde önlisans eğitimimi tamamladım. 2018 yılında Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden mezun oldum. 2019 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. Halen aynı anabilim dalında çalışmalarımı sürdürmekteyim.

