

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

4- NONİLFENOL MARUZİYETİNİN WİSTAR ALBİNO
SIÇANLARDA SPERMATOGENEZ ÜZERİNE YAPISAL VE
FONKSİYONEL ETKİLERİ: CURCUMİN'İN KORUYUCU
ROLÜ

ÇİĞDEM ÖZARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. MERYEM AKPOLAT FERAH
DOÇ. DR. ZEHRA SAFİ ÖZ

ZONGULDAK

2020

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

4- NONİLFENOL MARUZİYETİNİN WİSTAR ALBİNO
SIÇANLARDA SPERMATOGENEZ ÜZERİNE YAPISAL VE
FONKSİYONEL ETKİLERİ: CURCUMİN'İN KORUYUCU
ROLÜ

ÇİĞDEM ÖZARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. MERYEM AKPOLAT FERAH
DOÇ. DR. ZEHRA SAFİ ÖZ

Bu Tez Çalışması Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2018-98210206-01)

ZONGULDAK

2020

KABUL VE ONAY:

“4- NONİLFENOL MARUZİYETİNİN WİSTAR ALBİNO SIÇANLARDA SPERMATOGENEZ ÜZERİNE YAPISAL VE FONKSİYONEL ETKİLERİ: CURCUMİN’İN KORUYUCU ROLÜ.” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

31.01.2020

Başkan: Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH



Üye: Doç. Dr. Kanat GÜLLE



Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mete KEÇECİ



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

TARİH: 26.02.2020



Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince beni yönlendiren, bilimsel katkıları ile hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH'a, hiçbir zaman beni geri çevirmeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ'e ve Süleyman Demirel Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Öğretim Üyesi sayın Doç. Dr. Kanat GÜLLE'ye içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmanın gerçekleşmesinde büyük destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Zooloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Nurhayat BARLAS'a, ve yüksekisans eğitimim boyunca katkılarını esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Öğretim Üyesi Habib KHOSHVAGHTİ ve Dr. Öğretim Üyesi Mete KEÇECİ'ye, çalışmalarım esnasında, ihtiyaç duyduğum her anda bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Büşra ÇETİNKAYA ÜN'e ve MSc. Nurten GÜLERYÜZ'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de beni maddi ve manevi destekleriyle güçlü kılan kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çiğdem ÖZARSLAN

Ocak 2020, ZONGULDAK

ÖZET

Çiğdem ÖZARSLAN. 4- Nonilfenol Maruziyetinin *Wistar albino* Sıçanlarda Spermatogenez Üzerine Yapısal ve Fonksiyonel Etkileri: Curcumin'in Koruyucu Rolü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2020.

Nonilfenol (NP), endokrin sistem bozucu bir kimyasaldır ve toksik etkiye sahiptir. Çevredeki kirliliğe bağlı olarak, nonilfenole maruz kalan canlılarda, başta üreme sorunları olmak üzere, birçok sağlık sorunları meydana gelmektedir.

Nonilfenol; sperm kalitesini, sayısını, motilitesini etkileyerek testis ve epididimiste morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler ortaya koymaktadır. Nonilfenol, DNA, protein ve lipit hasarına neden olarak, apoptozu tetiklemektedir. Ayrıca, canlılarda Ca^{+2} seviyesindeki artışa bağlı olarak endoplazmik retikulum stresine yol açmaktadır.

Curcumin, *Curcuma longa*'dan elde edilen, kısa ve kalın kökleri olan Zingiberaceae familyasının bir üyesidir. Curcuminin; antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antikanserojen ve antifungal etkileri bulunmaktadır.

Çalışmamızda insanların farkında olmadan çok fazla temasta olduğu, endokrin sistemi bozucu etkiye sahip bir çevresel toksik madde olan “nonilfenol” ve güçlü bir antioksidan olan “curcumin” in erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri araştırıldı. 8 haftalık *Wistar albino* sıçanlara gün aşırı 100 mg/kg dozda 35 gün boyunca nonilfenol ve curcumin verildi. Sakrifikasyon sonrası deneklerden alınan epididimislerden elde edilen örneklerde, sperm parametreleri değerlendirildi. Alınan testis biyopsi örnekleri, rutin işlemlerden geçirildi. Hazırlanan preparatlarda histopatolojik değerlendirmeler yapıldı. Testis kesitlerinde immunohistokimyasal yöntemle kaspaz-3, GRP78/BiP ve PARP-1 ekspresyonlarındaki değişiklikler değerlendirildi. TUNEL yöntemi kullanılarak apoptotik hücre indeksi çıkarıldı.

Tüm değerlendirmeler ışığında; curcuminin nonilfenol kaynaklı bozulan spermatogenez sonucu gelişebilecek olan infertilitenin önlenmesinde, hem sperm parametrelerini düzelterek hem de testis dokusunda meydana gelen hasarları önleyerek, fertilitenin korunmasında etkili olabileceği tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Nonilfenol, Curcumin, Spermatogenez, Apoptoz, ER stresi

ABSTRACT

Çiğdem ÖZARSLAN. Structural and functional effects of exposure to 4-nonylphenol on spermatogenesis in *Wistar albino* rats: the protective role of Curcumin. Enstitute of Health Science, Department of Histology and Embryology, Master of Science Thesis, Zonguldak, 2020.

Nonylphenol (NP) is a chemical that disrupts the endocrine system and has a toxic effect. Depending on the pollution in the environment, living organisms exposed to nonylphenol have many health problems, especially reproductive problems.

Nonylphenol causes morphological and functional changes in testicles and epididymis by affecting sperm quality, quantity, and motility. Nonylphenol causes DNA, protein, and lipid damage, inducing apoptosis. It also causes endoplasmic reticulum stress due to the increase of Ca^{+2} level in living organisms.

Curcumin is obtained from *Curcuma longa* and is a member of the Zingiberaceae family with short and thick roots. Curcumin has antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anticarcinogenic, and antifungal effects.

In this study, the effects of "nonylphenol", an environmentally toxic substance which has endocrine system disrupting effect, and "curcumin", a powerful antioxidant, on the male reproductive system were examined. Eight weeks old *Wistar albino rats* were given nonylphenol and curcumin at a dose of 100 mg/kg every other day for 35 days. The sperm parameters were evaluated in the samples obtained from the epididymis taken from the subjects after sacrifice. Testicular biopsy specimens were subjected to routine procedures. Histopathological evaluations were performed on the preparations. Alterations in the caspase-3, GRP78/BiP, and PARP-1 expressions in testicles were evaluated by immunohistochemical methods. The apoptotic cell index was prepared using the TUNEL method.

In the light of all evaluations; the prevention of infertility-induced impaired spermatogenesis that may develop nonylphenol result of curcumin, both with improving sperm parameters and by preventing damage to the testicular tissue was found to be effective in preserving fertility.

Keywords: Nonylphenol, Curcumin, Spermatogenesis, Apoptosis, ER Stress

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
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	3
2.1. Testis Gelişimi.....	3
2.2. Testis Histolojisi.....	4
2.2.1. Seminifer tübüller	5
2.2.1.1. Sertoli hücresi.....	5
2.2.1.2. Spermatogenik hücreler	6
2.2.2. Spermatogenez.....	7
2.2.3. İnterstisyum	11
2.3. Alkilfenol Etoksilatlar (AFE).....	11
2.3.1. Nonilfenol (NP)	12
2.4. Apoptoz	14
2.5. Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi	15
2.5.1. Glikozla düzenlenen protein yetmişsekiz (GRP78/BiP)	16
2.6. Kaspaz-3	17
2.7. PARP-1.....	18
2.8. Curcumin	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Deney Hayvanları.....	21
3.2. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü	22
3.3. Dokuların Alınması	22
3.4. Sperm Değerlendirmesi	22
3.5. Dokuların Hazırlanması	23
3.6. Kesitlerin Alınması ve Boyanması.....	24

3.7. Histolojik Değerlendirme	25
3.8. Johnsen Skorlama Yöntemi	25
3.9. İmmünohistokimyasal İncelemeler	26
3.10. İn Situ DNA Uç İşaretleme Metodu (TUNEL) Analizi	27
3.11. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR	29
4.1. Vücut Ağırlığı	29
4.1.1. Deney öncesi vücut ağırlığı	29
4.1.2. Deney sonu vücut ağırlığı	30
4.1.3. Deney öncesi ve sonu vücut ağırlıklarının karşılaştırılması	31
4.2. Testis ve Epididim Ağırlıkları	32
4.3. Sperm Değerlendirmesi	33
4.3.1. Sperm sayımı (milyon/ml) değerlendirmesi	33
4.3.2. Hareketli sperm (Motilite) (%) değerlendirmesi	34
4.3.3. Sperm vitalite (canlılık) (%) değerlendirmesi	35
4.3.4. Sperm morfoloji (%) değerlendirmesi	36
4.4. Histolojik Bulgular	38
4.4.1. Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama	38
4.4.2. Periyodik Asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyama	44
4.5. Johnsen Skoru Değerlendirilmesi	45
4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular	47
4.6.1. Kaspaz-3 immunreaktivitesinin değerlendirilmesi	47
4.6.2. PARP-1 immunreaktivitesinin değerlendirilmesi	49
4.6.3. GRP78/BiP İmmunreaktivitesinin Değerlendirilmesi	50
4.7. TUNEL Bulguları	52
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR	59
7. KAYNAKLAR	60
8. EKLER	70
Ek 1: Türkçe Etik Kurul Onayı	70
Ek 2: İngilizce Etik Kurul Onayı	71
9. ÖZGEÇMİŞ	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

AF	: Alkilfenol
AFE	: Alkilfenol etoksilat
AMH	: Antimüllerian hormon
ATF6	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
ATP	: Adenozin trifosfat
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
Ca ²⁺	: Kalsiyum
CHOP	: C/EBP homologus protein
DAB	: 3,3-diaminobenzidine
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ER	: Endoplazmik retikulum
FSH	: Folikül stimule edici hormon
GADD34	: Büyüme durdurma ve DNA hasar geni 34
GRP78/BiP	: Glukoz düzenleyici protein 78
HCl	: Hidrojen Klorür
H-E	: Hematoksilen- Eozin
IRE1	: Inositol gerektiren kinaz 1
Kaspaz-3	: Cysteine aspartate specific proteases 3
kDA	: Kilodalton
LH	: Luteinleştirici Hormon
NAD ⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NP	: Nonilfenol
PARP-1	: Poli (ADP-riboz)polimeraz-1
PAS	: Periyodik asid Schiff
PAS+H	: Periyodik asid Schiff+Hematoksilen
PERK	: Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz
SRY	: Sex-determining region
TdT	: Deoksinükleotidil
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UPR	: Katlanmamış protein cevabı
XBP1	: X-box bağlayıcı protein
K ₂ S ₂ O ₅	: Potasyum Metabisülfid

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1. Johnsen testiküler biyopsi skoru	26
2. Deney öncesi vücut ağırlıkları	29
3. Deney sonu vücut ağırlıkları	30
4. Deney öncesi ve deney sonu denek ağırlıklarının ortalama farkları	31
5. Testis ve epididim ağırlıkları	32
6. Sperm değerlendirmeleri	33
7. Johnsen skoru değerleri	46
8. Kaspaz-3, PARP-1, GRP78/BiP immunoreaktivitesi için H-skor değerleri	47
9. Apoptotik indeks değerleri	52



ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Testisin anatomik yapısı.....	3
2. Spermatogenik seri hücreler.....	7
3. Spermatogenik hücre serilerini gösteren diyagram.....	8
4. 4-Nonilfenol'ün moleküler yapısı.....	13
5. NP'nin apoptoz yolağı.....	16
6. Deney öncesi vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.....	29
7. Deney sonu vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.	30
8. Deney başlangıcı (D.B) ve deney sonu (D.S) vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.	32
9. Sperm sayımı (milyon/ml) değerlendirmesi.....	34
10. Hareketli sperm (%) değerlendirmesi.	34
11. Canlı sperm (%) değerlendirmesi.....	35
12. Sperm vitalite testi eozin-nigrosin boyaması. (→) Pembe renk boyanmış cansız sperm, (Δ) Şeffaf olarak görünen canlı sperm. Eozin-nigrosin x20.....	36
13. Normal morfolojili sperm (%) değerlendirmesi.....	37
14. NP uygulanan sıçanlarda sperm morfoloji değerlendirmesi için Spermac Stain boyaması. (A) Normal sperm (B), (C), (D), (E), (F), (→) baş anomalileri (Δ) kuyruk anomalileri. x40.	37
15. Kontrol grubuna ait sıçan testisinde, seminifer tübüllerin etrafını saran düzgün bazal membran (→) ve interstisyel alanlar (★) izlenmektedir. H&E, x10.....	39
16. Curcumin grubuna ait sıçan testisinde, seminifer tübüllerin etrafında düzgün görünümlü bir bazal membran (→) ve interstisyel alanlar (★) izlenmektedir. Germinal epiteli oluşturan spermatogenik seri hücreler (↔) oldukça düzgün görünümlüdür. H&E, x10.....	39
17. NP grubuna ait sıçan testisinde, seminifer tübüllerin etrafında bazal membran kayıpları (→) ve ödemli interstisyel alanlar (★) izlenmektedir. Ayrıca hem germinal epitelde hem de interstisyel alanda vakuoller (▲) gözlemlenmektedir. H&E, x10.....	40
18. NP grubuna ait sıçan testisinde, bazal membran kayıplarının (→) yanında seminifer tübüllerin birleşmesi dikkat çekmektedir. Ödemli (★) ve vakuollü (▲) interstisyel alanlar izlenmektedir. H&E, x10.....	40
19. NP grubuna ait sıçan testisinde, seminifer tübüllerde büzüşmeler ve bazal membranda ondülasyonlar (→) gözlenmektedir. Seminifer tübül lümeninde olgunlaşmamış germ hücreleri (*) dikkat çekmektedir. H&E, x10.....	41
20. NP grubuna ait sıçan testisinde, bazal membran (→) kayıpları sonucu birleşmiş seminifer tübüller gözlenmektedir. Ayrıca germinal epiteli oluşturan spermatogenik seri hücrelerde düzensizlikler hatta spermatogenik seri hücrelerin olmadığı boş seminifer tübüller izlenmektedir. Seminifer tübül lümeninde olgunlaşmamış germ hücreleri (*) dikkat çekmektedir. H&E, x10....	41

21. NP+C grubuna ait sıçan testisinde, dejeneratif değişikliklerin azalmış olduğu, normal kontürlü bazal membran (→) ve düzgün germina epitele (↔) sahip seminifer tübüller gözlenmektedir. Ayrıca hem seminifer tübüllerde hem de interstisyel alanda görülen vakuollerde (▲) azalma izlenmektedir. H&E, x10..	42
22. H&E boyalı preparatlarda tüm grupların karşılaştırmaları. A, B: Kontrol, C, D: Curcumin, E, F: Nonilfenol, G, H: Nonilfenol+Curcumin. Sacale bar: (A, C, E, G) 50 µm, (B, D, F, H) 10 µm. A, C, E, G : (↔) Germinal epitel, (→) Bazal membran, (★) İnterstisyel alan, B, D, H: (→) Bazal membran, (★) spermatozoonlar, F: (→) Bazal membran, (★) İnterstisyel alan.....	43
23. Testis dokusuna ait PAS-Hematoksilen boyaması. A: Kontrol, B: Curcumin, C: Nonilfenol, D:Nonilfenol+Curcumin. Sacale bar:10 µm. (→) PAS pozitif boyanmış bazal membran ve spermatid hücreleri.	45
24. Johnsen skorlaması.	46
25. Kaspaz-3 immünreaktivitesi için H-skor.	48
26. Testis seminifer tübüllerinde kaspaz-3 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi. A: Kontrol, B: Curcumin, C: Nonilfenol, D: Nonilfenol+Curcumin. Scale bar:50 µm. (→) Kaspaz-3 ile boyanmış spermatogonik hücreler.	48
27. PARP-1 immünreaktivitesi için H-skor.	49
28. Testis seminifer tübüllerinde PARP-1 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi. A: Kontrol, B: Curcumin, C: Nonilfenol, D: Nonilfenol+Curcumin. Scale bar:50 µm. (→)PARP-1 ile boyanmış spermatogonik hücreler.....	50
29. GRP78/BiP immünreaktivitesi için H-skor.....	51
30. Testis seminifer tübüllerinde GRP78/BiP ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi. A: Kontrol, B: Curcumin, C: Nonilfenol, D: Nonilfenol+Curcumin. Scale bar:50 µm. (→)GRP78/BiP ile boyanmış spermatogonik hücreler.	51
31. Apoptotik indeks değerlendirmesi.	52
32. Testis seminifer tübüllerinde TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin ifadesi. A: Kontrol, B: Curcumin, C: Nonilfenol, D: Nonilfenol+Curcumin. Scale bar: 50 µm.....	53

1. GİRİŞ

Çevre kirliliği çağımızın en önemli sorunlarından biridir. Doğada biriken toksik maddeler çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu toksik maddelerin çoğu, östrojenik ve karsinojeniktir. Bazıları ise hormon benzeri etkiye sahiptirler ve çevresel endokrin bozucu kimyasallar olarak adlandırılmaktadırlar (1). Sanayileşme ve teknolojinin gelişmesiyle birlikte canlılar bu kimyasal ajanlara maruz kalmaktadır. Kimyasal ajan maruziyeti canlılarda pek çok sağlık ve üreme sorunlarına neden olmaktadır (2).

Çevresel endokrin bozucu maddelerin çoğunu diklordifeniltrioksetan, poliklorbifeniller, dietilstilbestrol ve alkilfenol etoksilatlar (AFE'ler) oluşturmaktadır. AFE bileşikler; evlerde ve endüstriyel alanlarda, özellikle plastik eşyalarda, deterjanlarda, kozmetikte ve boyalarda kullanılmaktadır. AFE'ler daha çok sularda birikerek biyolojik bozunuma dayanabilen, östrojenik özellik gösteren nonilfenole (NP) dönüşmektedir (3).

Canlılarda birçok hormonu taklit eden bu endokrin bozan maddeler, kalıtsal değişikliklere, hücre hasara, doza bağlı olarak apoptoza giden hücre sayısının artışına özellikle erkek üreme sisteminde testiküler ve hormonal bozukluklara ve infertiliteye neden olmaktadır (2).

NP, seminifer tübüllerin histolojisi üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir ve yetişkin erkekler arasında görülen semen miktarında ve kalitesinde düşüşe neden olabilecek bir endokrin bozucu kimyasaldır. Çeşitli çalışmalar, NP'nin testiküler gelişimi engellediğini, düzensiz ve büzülmüş bir bazal membran görünümü sergilediğini ve seminifer tübül dejenerasyonunu artırdığını göstermiştir.

NP'ye maruz kalma epididim başında sperm sayısının düşmesine, hareketli sperm yüzdesinin azalmasına ve sperm morfolojisinde çeşitli anormalliklere neden olmaktadır (4, 5).

Duan ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada; NP ile tedavi edilen gruplarda apoptotik indeksin arttığı gözlemlenmiştir. NP tarafından indüklenen apoptozda, kaspaz-3 aktivasyonu ve mitokondriyal depolarizasyonun rol aldığı bildirilmiştir (5).

Endoplazmik retikulum (ER), ökaryot hücrelerde protein katlanmasının düzenlendiği önemli bir organdır. NP tedavisinin Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinde değişikliklere neden olduğu ortaya koyulmuştur. NP'nin neden olduğu hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış, endoplazmik retikulum (ER) stresine bağlı apoptozu

indüklemektedir. NP, ER'de katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikimini sağlamaktadır ve ER stresine neden olmaktadır (6). Protein katlanmasından sorumlu glikoz düzenleyici protein (GRP78/BiP); ER'de Ca^{+2} miktarının azalması ve glikozillenmemiş proteinlerin birikmesi gibi stres durumlarında hücre yaşamının devamlılığında oldukça önemli bir rol oynamaktadır (7).

Testiste spermatogenez hücreleri, yüksek seviyede çoklu doymamış membran lipitleri içermektedir ve NP bu hücreleri lipid peroksidasyonuna karşı savunmasız kılmaktadır. Lipid peroksidasyon DNA ile etkileşime girebilir ve iplikçik kırılmalarına ve DNA parçalanmasına neden olabilmektedir. PARP-1, özellikle DNA hasarında ortaya çıkmakta ve DNA tamirinde görev almaktadır (5, 8).

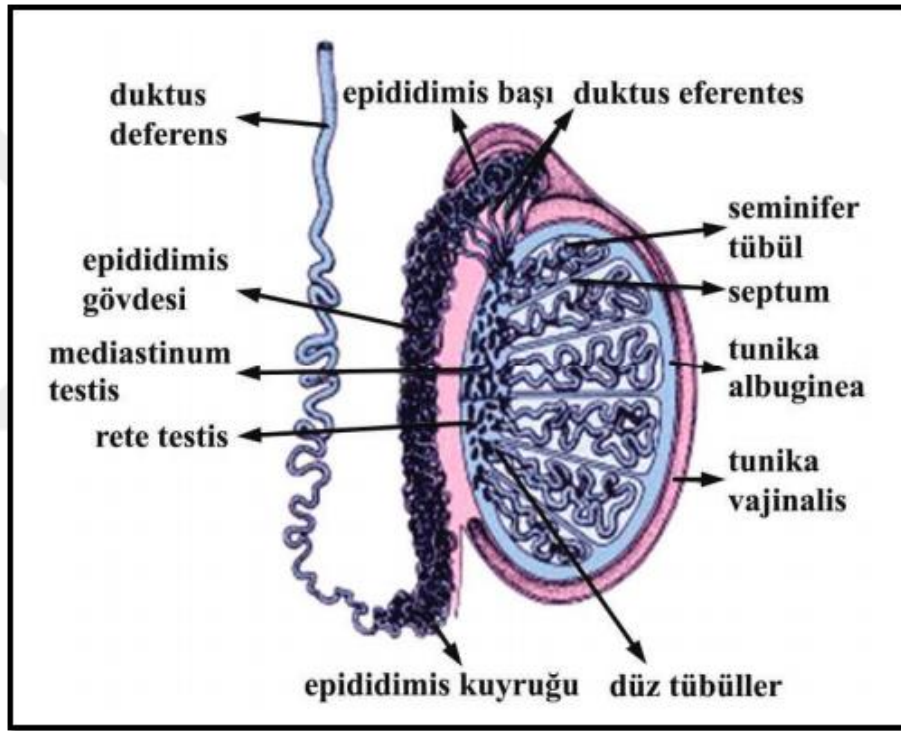
Zerdeçal (*Curcuma longa*), Hindistan ve Çin'de yaygın olarak bulunan Zingiberaceae familyasına ait çok yıllık, otsu bir bitkidir. Büyük yaprakları ve sarı çiçekleri bulunur. Hindistan'da uzun yıllardır yaygın olarak baharat ve ilaç olarak kullanılmaktadır. Curcumin, zerdeçal bitkisinin yeraltında yetişen köklerinden elde edilen doğal sarı bir pigmenttir ve bitkinin %2-5'ini oluşturur (9, 10). Curcumin, moleküler ağırlığı düşük polifenol bir bileşiktir (11). β konumunda bağlanmış 2 keton grubu içerir ve bu yapı Curcumin'in antioksidan olma özelliğinde rol oynar (12). Curcumin; antiinflamatuar, antioksidan, antitümöral, antibakteriyel, antiviral, antidiyabetik, yara iyileşmesi, proapoptotik gibi geniş bir etkiye sahiptir (13).

Çalışmamızda insanların farkında olmadan çok fazla temasta olduğu, endokrin sistemi bozucu etkiye sahip çevresel toksik bir madde olan "nonilfenol" ve güçlü bir antioksidan olan "curcumin" in erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri araştırıldı. Erkek *Wistar albino* sıçanlara gün aşırı 100 mg/kg dozda 35 gün boyunca nonilfenol ve curcumin verildi. Sakrifikasyon sonrası deneklerden alınan epididimislerden sperm parametreleri (konsantrasyon, motilite, vitalite, morfoloji) değerlendirildi. Deneklerin testis dokuları alındı, rutin işlemlerden geçirildi, kesit alındı ve hematoksilin-eozin, PAS (Periyodik Asit- Schiff) ile boyandı. Histopatolojik değerlendirme yapıldı. Testis parafin kesitlerinden immunohistokimyasal yöntem ile kaspaz-3, GRP78/BiP ve PARP-1 ekspresyonlarındaki değişiklikler değerlendirildi. TUNEL yöntemi kullanılarak apoptotik hücre indeksi çıkarıldı ve değerlendirildi.

Tüm değerlendirmeler ışığında; curcuminin nonilfenol kaynaklı bozulan spermatogenez sonucu gelişebilecek olan infertilitenin önlenmesinde, hem sperm parametrelerini düzelterek hem de testis dokusunda meydana gelen hasarları önleyerek, fertilitenin korunmasında etkili olabileceği tespit edildi.

2. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi testislerden, genital boşaltım kanallarından, aksesuar cinsiyet bezlerinden ve penisten oluşmaktadır. Testisler, vücut boşluğunun dışında bulunan, skrotumun içerisinde yer alan iki tane oval şekilli organdır. Testis, spermatogenez (sperm üretimi) ve steroidogenez (androjenlerin sentezlenmesi) olmak üzere iki fonksiyona sahiptir (14).



Şekil 1. Testisin anatomik yapısı (20).

2.1. Testis Gelişimi

Embriyonun genotipi döllenme sırasında spermde bulunan X veya Y kromozomuna bağlı olarak belirlenmiş olsa da 7. haftadan önce her iki cinstede gonadların görünümü birbirine benzerdir (15, 16). Genital kabartılar ilk olarak 5. haftada mezonefrozun medialinde sölomik epitel hücrelerin çoğalmasıyla sağda ve solda olmak üzere bir çift halinde gonadları oluşturmak için ortaya çıkarlar (15). Gonad taslağının sölom epitel hücreleri mezoblast içine girerek primitif cinsiyet

kordonlarını oluştururlar ve bu dönemde cinsiyet ayrımı yapılması mümkün değildir (17). Bu evredeki gonad, “farklanmamış gonad” adını alır. Farklanmamış gonad dışta bir korteks ve içte medulladan oluşur (18).

Cinsiyetin belirlenmesi SRY (Sex belirleyici bölge) geni etkisiyle olur. Eğer embriyo SRY taşıyorsa; farklanmamış gonadın medullası üzerinde gelişerek testis belirleyici faktörü (TDF) kodlar ve meduller kordonlar (seminiferöz kordonlar) oluşur yani testis oluşumu başlar. Meduller kordonlar yüzey epitelinden kalın fibröz bir kapsül olan tunika albuginea ile ayrılır. Meduller kordonlar; dış kısımlarından seminifer tübülleri, iç kısımlarından tubuli rektiyi ve dallanıp anastomoz yaparak rete testisi oluştururlar. Rete testis, mezonefrik tübüllerden köken alan efferent kanallar ile birleşir. Seminifer tübüller mezenşim ile ayrılmışlardır ve puberteye kadar lümenleri yoktur. Puberteden itibaren lümenleri gelişir. Fetal testiste, seminifer tübülün çoğunu Sertoli hücreleri oluşturur (14, 15, 16).

Testis taslağı geliştikten sonra meduller kordonların içine ve Sertoli (destek) hücrelerinin aralarına yerleşen primordiyal germ hücreleri “spermatogonyum” adını alır. Puberteye kadar G₀ fazında bekleyecek olan spermatogonyumların gelişimi, spermatogenetik seri hücrelerinin oluşumu ve mayotik aktiviteye sahip olmaları ancak pubertede mümkün olur (15).

Antimülleriyan hormon (AMH) salgılayan Sertoli (destek) hücreleri meduller kordonların hücrelerinden oluşur. AMH'nin salınması puberteye kadar devam eder ve uterus ve tuba uterinalara farklı mülleriyan (paramezonefrik) kanalların gelişimini engeller (18).

Mezenşimden gelişen Leydig -interstisyel- hücreleri 8. haftadan itibaren androjenik hormonları –testosteron ve androstenedione- sentezlemeye başlar. Testosteron üretimini hCG (insan koryonik gonadotropin) hormonu uyarır. Salgılanan testosteron hormonu erkek genital kanal ve dış genital organlarının gelişimi için büyük öneme sahiptir (15, 18). Testisler gelişimini tamamladıktan sonra karın duvarından skrotuma inguinal kanal yoluyla inerler (17).

2.2. Testis Histolojisi

Spermiyum üretimi ve atılımı ile ekzokrin, tetosteron üretimi ile endokrin fonksiyonu olan testisler skrotumda deri ile kuşatılmış, bir çift oval şekilli organdır. Skrotum testislere sperm üretimi için gereken düşük sıcaklığı sağlar. Testis, en dışta

abdominal periton uzantısı olan tunika vajinalis, onun altında yoğun sıkı bağ (bir fibroelastik bağ) dokusu olan tunika albuginea ve en içte yoğun kan damarlarının bulunduğu gevşek bağ dokusu yapısında tunika vaskülozadan oluşan kalın bir kapsül tabakası ile kuşatılmıştır. Tunika vajinalis bir miktar salgı yapar ve bu salgı testisin serbest hareketini sağlayarak testisi oluşabilecek travmalara karşı korur (14, 17).

Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak testis mediastenini oluşturur. Kan ve lenf damarları, genital boşatım kanalları testise giriş çıkışında buradan geçer. İnce bağ dokusu yapısındaki septum, mediastinum testisten içeri doğru girerek testisi testiküler lobüllere ayırır. Her testis lobülü kan damarları, sınırlar ve Leydig (interstisyel) hücrelerinin bulunduğu gevşek bağ dokusu ile kuşatılmış seminifer tübüllerden oluşur. Seminifer tübüller kıvrımlı bir yapıya sahiptirler ve spermiumlar bu tübüllerde üretilir (16, 19).

Seminifer tübüller, lobüllerin apeksine doğru kıvrımlarını kaybederek düz tübül (tubuli rekti) şeklinde seyrederek. Tubuli rekti, boşaltıcı kanal sisteminin ilk segmentini oluşturur. Düz tübüller, tek katlı kübik epitelden oluşan, rete testis adını alan mediastinumda bulunan, anastomozlaşan kanallar ile devam eder. Rete testis birleşerek duktuli efferentes meydana gelir ve epididimise bağlanır (15, 16).

2.2.1. Seminifer tübüller

Testisin büyük çoğunluğunu kıvrımlı kanallar olan seminifer tübüller oluşturmaktadır. Her bir seminifer tübül, tunika propria ile çevrelenmiş germinal epitelden meydana gelmektedir. Tunika propria, fibroblast içermeyen özel bir bağ dokudan oluşur ve bazal membran altında miyoid hücre ve kollajen lif tabakası içerir. Bu hücreler bazal membran ile sarılı ve aktin filamentlerinden zengindir. Hücrelerin kasılması tübül lümenindeki olgun spermilerin kanallara iletilmesini sağlar. Germinal epitel, sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler olmak üzere iki hücre grubu barındıran çok katlı bir epiteldir (21).

2.2.1.1. Sertoli hücresi

Destek ya da sustentaküler hücreler olarak da bilinen sertoli hücreleri, puberteden sonra çoğalmazlar ve seminifer tübül epitelinin yaklaşık %10'unu oluştururlar. Olgunlaşmakta olan spermiumları destekleyen, koruyan, besleyen

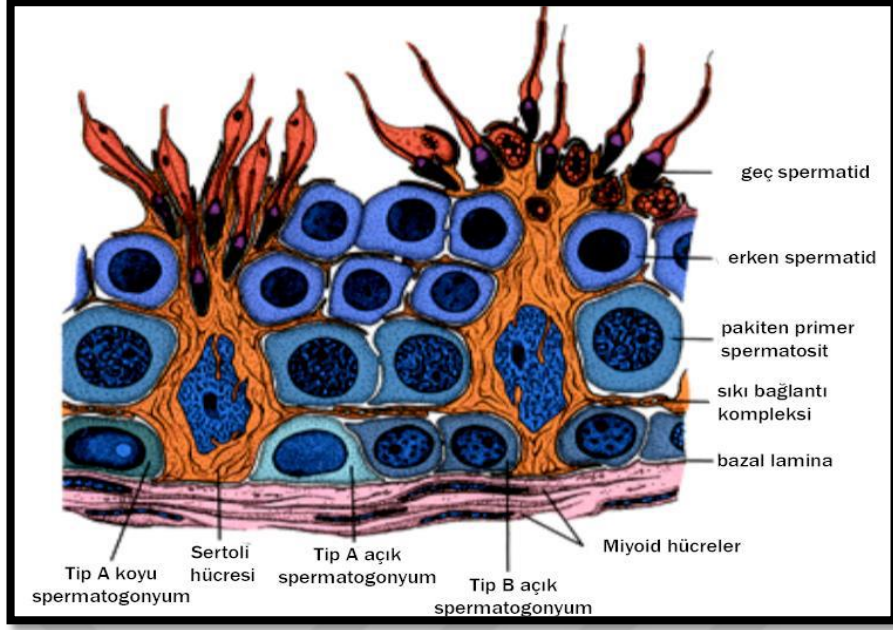
sertoli hücreleri, seminifer tübülün bazaline yerleşik üçgen şekilli, belirgin nükleolusu ve ökromatik nükleusu bulunan, organel bakımından zengin hücrelerdir. Serbest uçları lümeneye kadar uzanır. Ayrıca olgunlaşmamış spermatogenetik hücreleri fagosite etme özelliğine de sahiptir (22, 23, 24).

Sertoli hücreleri birbirlerine sıkı bağlantı kompleksleriyle bağlanmışlardır. Sıkı bağlantıların bulunması kan-testis bariyerinin oluşmasını sağlar. Kan-testis bariyeri, gelişmekte olan sperm hücrelerini otoimmün yanıtta ve zararlı makromoleküllerden korur. Ayrıca kandaki zararlı maddelerin gelişen seminifer tübül epiteline geçmesini engeller (23, 24, 25).

Sertoli hücreleri, seminifer tübül içerisinde spermin normal olgunlaşması için gereken testosteron konsantrasyonunun artması için FSH uyarımı ile androjen bağlayıcı proteini salgılar. Dolayısıyla spermatojenizi uyarır. Testosteron hormonunun artmasıyla Sertoli hücrelerinin salgıladığı inhibin hormonu hipotalamusun nöronları üzerinde negatif feedback (geri bildirim) gösterir. İnhibin hormonu, hipofiz bezinden FSH salınımını baskılar. Sertoli hücresi ayrıca fetusta erkek karakterinin gelişimi için gerekli olan Müller kanalının gerilemesini sağlayan AMH'yi salgılar (17, 25).

2.2.1.2. Spermatojenik hücreler

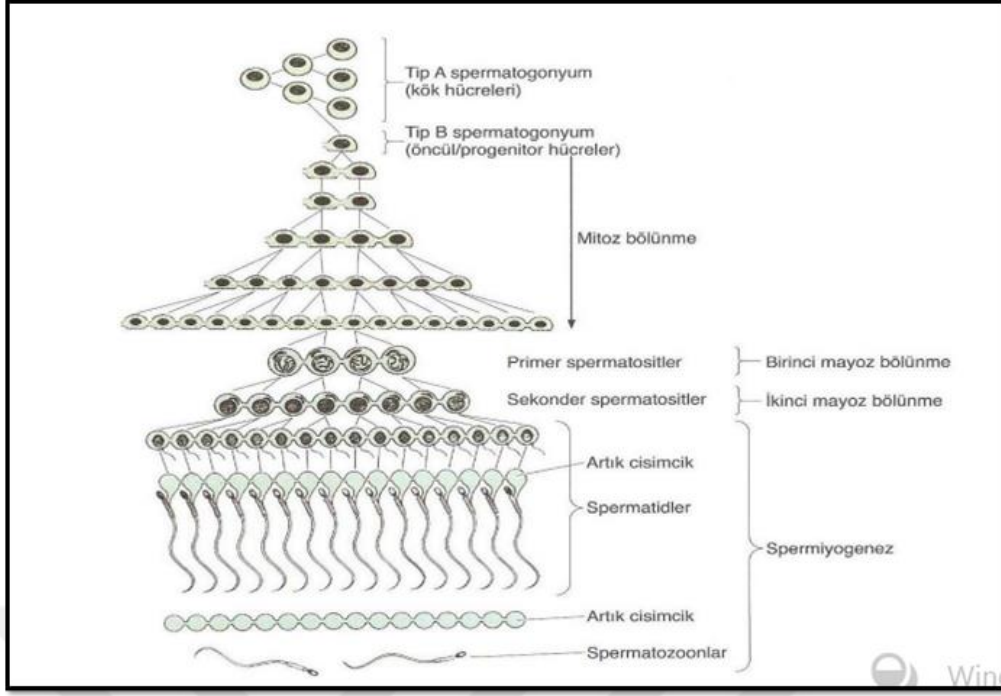
Seminifer tübülde, bazal lamina ile lümen arasında, sertoli hücrelerinin uzantılarınca sıralanmış hücre serileridir. Düzenli olarak bölünürler ve olgun spermata farklılaşırlar. Spermatojenik hücreler, testisin erken gelişim evresinde gonadal yolk kesesinden köken alan ve gonadal kabartılarda çoğalan primordiyal germ hücrelerinden gelişirler. Seminifer tübül duvarındaki spermatojenik seri hücreler, bazalden lümeneye doğru farklılaşarak gelişim gösterirler. Bazalde Sertoli hücrelerinin arasına oturan en az gelişim gösteren immatür hücreler spermatojenyumlardır. Spermatojenyumlar olgunlaştıkça spermata sitler, spermata tidler ve spermatozoon şeklinde dizilim gösterirler (26).



Şekil 2. Spermatogenik seri hücreler (27).

2.2.2. Spermatogenez

Spermatogenez, bir spermatozoid hücrelerinden bir sperm hücresi oluşumu sürecidir. Puberteden önce, pitüiter gonadotropinlerin seviyelerinin artması ile başlayarak yaşam boyu devam eder. İnsanlarda spermatogenez süresi 64-74 gün olmasına karşın ratlarda 48-56 gün olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, spermilerin matürasyon sürecinin, yani germ hücrelerinin farklılaşarak olgun hale geldikleri periyodun 14 gün sürdüğü bildirilmiştir. Spermatogenez, spermatozoidal faz, spermatozoid faz (mayoz) ve spermatozoid fazı (spermiyogenez) olmak üzere üç farklı faza ayrılmaktadır (28, 29).



Şekil 3. Spermatogenik hücre serilerini gösteren diyagram (30).

Spermatogonyal faz: Bu süreçte, seminifer tübülün bazalinde yer alan spermatogonyal kök hücreler mitoz geçirerek kendi yerlerine geçecek olan hücre popülasyonunu oluştururlar. Spermatogonyal kök hücrelerin kökeni postnatal testisteki gonositlerdir ve spermatogenez sürecinin devamlılığı bu kök hücreler ile sağlanmaktadır (28, 31).

Spermatogonyum hücreleri, histolojik olarak nükleuslarının görünümü esas alınarak 3 sınıfa ayrılırlar. Bunlar, koyu tip A spermatogonyum, açık tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyumlardır. Gonositler, doğumdan sonraki 6. günde tip A spermatogonyumlara, 8. günde de tip B spermatogonyumlara farklılırlar.

Koyu tip A spermatogonyumlar, ince granüllü kromatine sahip, yoğun bazofilik, oval şeklinde nükleuslu hücrelerdir. Çeşitli aralıklarla bölünerek yine koyu tip A spermatogonyumları ya da açık tip A spermatogonyumları meydana getirirler. Koyu tip A spermatogonyumlar kök hücre olarak kalırlar.

Açık tip A spermatogonyumlar, oval nükleuslu, açık renk boyanan ince granüllü kromatine sahiptirler. Bu hücreler ya farklılaşarak olgunlaşarak spermium halini alır ya da ardışık birkaç mitoz bölünme geçirerek çoğalırlar ve tip B spermatogonyumları oluştururlar. Açık tip A spermatogonyumların seminifer tübül epitelinin kök hücreleri olduğu düşünülmektedir.

Tip B spermatogonyumlar, yuvarlak nukleuslu, kromatini nuklear zar boyunca ve nukleolus çevresinde kümeler şeklinde yoğunlaşan hücrelerdir (28, 32).

Spermatosit fazı (Mayoz): Tip B spermatogonyumlar bölünerek primer spermatositleri oluştururlar. Bu fazda primer spermatositler, mayoza uğrarlar. Mayoza uğramaları kromozom sayılarını ve DNA miktarını azaltır. Primer spermatositler oluştuktan sonra, DNA'larını replike edip iki katına çıkararak mayoz bölünme için hazırlanırlar. Primer spermatositlerin her biri, $2n$ sayıda kromozom, iki katı DNA ($4d$) içerir. Primer spermatositler mayoz bölünmeye girerler. Mayoz 1'in profaz evresindeki primer spermatositler, kromatin yoğunlaşması nedeniyle daha büyük görünürler. Yaklaşık 10-22 gün sonra, 1. Mayoz bölünme ile primer spermatositlerden sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositler kısa süre içinde 2. Mayoz bölünme geçirdiklerinden dolayı histolojik kesitlerde görülmesi zordur. Oluşur oluşmaz bölünürler ve spermatidleri oluştururlar. Sekonder spermatositler, primer spermatositlerle kıyaslandıklarında oldukça küçüktürler. Bu hücreler, n kromozom sayısına ve $2d$ DNA miktarına sahip haploid hücrelerdir. 2. Mayoz'dan önce DNA replikasyonu olmamaktadır. Bu aşamadan sonra oluşan spermatidlerin her biri n kromozoma sahiptir (28, 33).

Spermatid fazı (Spermiyogenez): Spermatidler, olgun bir sperm hücresine farklılaşırken spermiyogenez adı verilen karmaşık bir olgunlaşma süreci geçirir. Morfolojik olarak yuvarlak şekilli ve hareketsiz spermatidler uzayarak uzun ve olgun spermelere dönüşürler. Bir günde üretilen yaklaşık 300 milyon tane spermatozoon seminifer tübül lümenine bırakılır. 2. Mayoz bölünmenin sonunda oluşan her bir haploid spermatid 22 otozom ve bir X ya da Y kromozomu taşır. Haploid sperm bir oositi fertilize ettiği zaman diploid hale gelirler. Spermiyogenez, golgi fazı, kep fazı, akrozom fazı ve olgunlaşma (matürasyon) fazı olmak üzere 4 fazdan oluşmaktadır.

Golgi fazı: Proakrozomal granüller, glikoproteince zengindirler ve bu nedenden dolayı PAS pozitif boyanırlar. Bu granüller, golgi kompleksinin çekirdeğe bitişik bölümünde akrozomal vezikülü oluşturmak için bir araya gelirler. Akrozomal vezikülün bulunduğu kısım olgunlaşmakta olan spermin ön kutbunu belirler. Bu fazda, sentriyoller buldukları jukstanüklear bölgeden arka kutba göç eder. Sentriyol, sperm kuyruğunun $9+2$ mikrotübül yapısında olan aksonemini oluşturmaya başlar.

Kep fazı: Bu fazda akrozomal veziküller, nükleusun ön bölümünü kaplayacak şekilde yayılarak akrozomal kep dediğimiz yapıyı oluşturur. Kepin altındaki nüklear membranda porlar kaybolur, membran kalınlaşır ve nükleus yoğunlaşır.

Akrozom fazı: Bu fazda spermatidde belirgin bir şekil değişikliği görülür. Spermatid baş kısmından Sertoli hücrelerinin arasına gömülür ve gelişmekte olan flagellum (kamçı) tübülün lümenine doğru uzanır. Yoğunlaşan nükleus yassılaşıp uzar. Akrozom, apikal plazma membranına doğru taşınırken, sitoplazma posteriyora doğru yer değiştirir. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kısmından spermatidin arka kutbuna uzanırlar ve silindirik bir kılıf olan manşeti oluştururlar.

Flagellum gelişimini başlatmış olan sentriyoller, nükleusun arka yüzeyine taşınarak gelişen spermin boyun bölgesini oluştururlar. Nükleusa tutunan sentriyoller dokuz adet kalın fibril oluşturur. Bu fibriller kuyruğun içine doğru uzanarak nükleusu flagellum ile birleştirirler. Bu bölgeye bağlantı parçası denir. Flagellum yüzeyini kaplamak için plazma membranı posteriyora doğru uzanır. Manşet kaybolur. Mitokondriler, boyun bölgesinde ve bu bölgenin posteriyor uzantısında sıkı bir kılıf oluştururlar. Mitokondri kılıf ile karakterize edilmiş bu bölge, spermin kuyruğunun orta parçasıdır. Orta parçanın distalinden flagellumun ucuna kadar uzanan, fibröz kılıfın distalinde kalan kısa segment kuyruğun son kısmıdır.

Olgunlaşma (maturasyon) Fazı: Bu fazda, sitoplazma miktarı azalır ve olgun spermatozoon oluşur. Fazla sitoplazma (rezidüel cisimcik) Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermatid hücreleri birbirleriyle olan bağlantılarını kaybederek Sertoli hücrelerinden ayrılırlar ve lümene düşerler. Bu süreç “spermiasyon” denir.

Olgun bir insan sperm hücresi, ortalama 60 mikrometre uzunluğundadır. Baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşur. Baş kısmı yaklaşık 4,5 mikrometre uzunluğunda, koni şeklindedir ve küçük yoğun bir nükleus içerir. Nükleusun büyük kısmını saran akrozomal kep, fertilizasyon sırasında spermatozoonların oositin zona pelusidasını ve korona radyatasını aşabilmesini sağlayan ve ovuma başka spermlerin girmesini önleyen enzimler içermektedir. Kuyruk kısmı ise boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört bölüme ayrılır. Boyun, sentriyolleri ve kalın fibrillerin başlangıcını içerir. Orta parça, kuyruğun hareketi için gerekli olan enerjiyi sağlayan mitokondrileri içerir. Esas parça, kalın fibrillerin ve aksonemal kompleksin dışındaki fibröz kılıfı içerirken son parça, sadece aksonemal kompleksi içerir (28, 32, 33).

Olgun bir sıçan spermi, insan sperminden yapısal olarak farklılık göstermektedir. Olgun sıçan sperminin baş kısmı yaklaşık 2,5 mikrometre uzunluğunda kanca şeklindedir. Yoğun bir nükleus ve daha az yoğun olan akrozomdan oluşur. Orta bölümü mitokondri ve sentrolleri içeren heliks şeklinde bir yapıdan oluşur. Kuyruk kısmı, uzun aksiyal filamentler içerir. Ratlarda, olgun spermatozoa oluşumu yaklaşık 14 gün sürmektedir. Spermatogenez ratlarda 45 günlükken (1,5 aylık) başlamaktadır. Optimum sperm üretimi 75 günlükken (2-2,5 aylık) gerçekleşmektedir (34).

2.2.3. İnterstisyum

Seminifer tübüllerin arasında yer alan interstisyum, gevşek bağ dokusu yapısındadır. Yoğun kan ve lenf damarları, sinir lifleri içerir. Bağ dokusuna ait olan fibroblast, makrofaj ve mast hücrelerinin yanında testosteron hormonu üreten Leydig hücreleri (insterstisyel hücreler) bulunur. Bu hücreler interstisyel alanda tek tek ya da gruplar halinde bulunabilirler. Leydig hücreleri, yuvarlak nükleuslu, asidofilik sitoplazmalı ve sitoplazmasında çok sayıda lipit damlacığı içeren poligonal ya da yuvarlak şekilli hücrelerdir. Bu hücrelerde sıklıkla, lipofuksin pigmenti ve muhtemelen hücrenin bir protein ürünü olarak düşünülen, çubuk şekilli ayırt edici kristaller olan Reinke kristalleri bulunmaktadır. Leydig hücreleri salgıladıkları testosteron hormonunu kan ve lenf kapillerine boşaltarak endokrin fonksiyonu yaparlar.

Testosteronun salgılanması embriyonik gelişimde erkek fetusun gonadlarının normal gelişimi için, cinsel olgunlaşma döneminde sperm üretimi ve sekonder seks karakterlerinin gelişimi için, erişkin dönemde spermatogenez, genital boşaltım kanalları, sekonder seks karakterlerinin ve aksesuar bezlerinin devamlılığı için gereklidir (35, 36).

2.3. Alkilfenol Etoksilatlar (AFE)

Her geçen gün gelişen teknoloji ve sanayileşme çevre kirliliğine büyük katkıda bulunmaktadır. Çevre kirliliğinin en büyük sebeplerinden biri de doğada biriken toksik maddelerdir ve ekolojik dengenin bozulmasının yanı sıra doğada yaşayan canlılar içinde tehdit oluşturmaktadır (2). Bu toksik maddelerin bazıları

hormon benzeri etkiye sahiptirler ve çevresel endokrin bozucu kimyasallar olarak adlandırılmaktadırlar (1). Endokrin bozucular, endokrin sistemin sentezlediği hormonları taklit ederek canlıların sağlığı üzerinde olumsuz etki yaratmaktadır (37).

Endokrin bozucu kimyasalların başında alkilfenol etoksilat bileşikleri (AFE) gelmektedir. Alkilfenol etoksilat bileşikleri; deterjanlar, plastik eşyalar, boyalar, kozmetik gibi günlük kullandığımız malzemelerde, pestisitlerde ve herbisitlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstride kullanılmasından dolayı AFE'lerin bir yılda dünyadaki üretimi yaklaşık 500.000 metrik tonun üzerindedir. Bu miktarın yarısından fazlasının (yaklaşık %60) dere, göl, nehir ve denizlerde biriktiği ortaya konmuştur (2).

Sularda biriken AFE'ler, biyolojik bozunuma uğrarlar ve nonilfenol, oktil fenol, bütilfenol gibi östrojenik özellik gösteren AF bileşikler haline dönüşmektedirler. Alkil fenollerler biyolojik bozunuma AFE'lerden daha dayanıklıdırlar (38, 39).

AF'ler hidrofobik ve lipofilik özelliklere sahiptirler. Hidrofobik özelliği bu bileşiklerin su kaynaklarında çökerek buradaki sedimanlar içerisinde, lipofilik özelliği ise suda yaşayan canlılarda birikmesini sağlar (40, 41). Canlılardaki birikimi sulardaki birikiminden çok fazladır (42). Doğada bulunan AF'lerin yaklaşık %82'sini nonilfenol oluşturmaktadır (2).

2.3.1. Nonilfenol (NP)

Nonilfenol, dokuz karbonlu zincirden oluşan alkil fenollerin bir alt grubu olan organik bir bileşiktir. Bu yapı nonilfenole suda çözünememe, etanol, DMSO (Dimetil sülfoksit) ve yağlarda iyi çözünme özelliği verir (43). Nonilfenol, visköz özellikte hafif sarı mat bir sıvıdır. 25 °C'deki yoğunluğu 0.952 g/ml, sudaki çözünürlüğü 4,9 mg/L'dir (44). Biyolojik bozunuma dayanıklı kimyasalların başında gelmektedir.

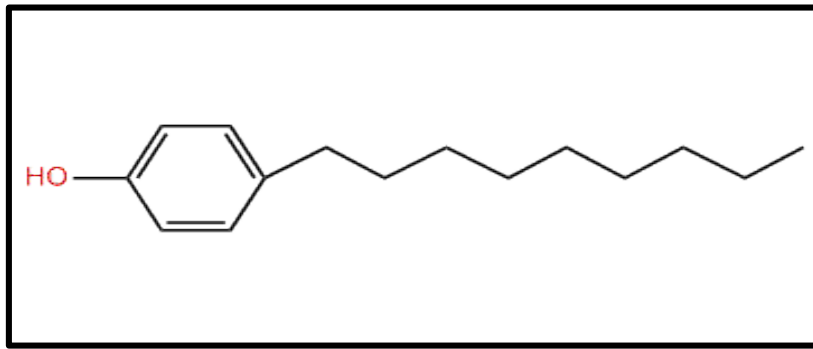
Nonilfenol'ün hedef organları arasında, gözler, cilt, gastro- intestinal sistem, solunum sistemi, karaciğer, beyin, tiroit, pankreas, böbrek, mesane, göğüs, erkek ve dişi üreme sistemi yer almaktadır. Bir çok çalışmada, doza bağlı olarak NP'ün seminifer tübül dejenerasyonuna, anormal sperm morfolojisine, azalmış sperm sayısı ve hareketliliğine yol açtığı gözlemlenmiştir (45, 46).

Nonilfenol, östrojenik, toksik ve karsinojenik etkilere sahip, ksenoöstrojen bir kimyasal maddedir (1). Endokrin sistemde doğal hormonları taklit ederek, salınımını engeller ve uyarır. Dolayısıyla hormonal sisteme zarar verir. Yapılan çalışmalarda NP'ye maruz kalan canlılarda FSH, LH ve testosteron seviyelerini azalttığı belirtilmiştir (2, 5).

NP'nin yarılanma ömrünün, sıcak havalarda ortalama 10-15 saat olduğu saptanmıştır. NP'nin sudaki yarılanma ömrünü, Amerikan Çevre Dairesi, ortalama 150 gün olarak tahmin etmiştir. NP, lipofilik özelliği ve yarılanma ömrünün uzun olması nedeniyle, canlılarda önemli düzeyde birikime yol açarak toksik etki yaratmaktadır (38, 47). NP'lerin kontaminasyonu ve toksisitesi, insan sağlığı ve gelişimi için potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır (5).

İnsan ve alabalıkların, östrojen reseptörlerinin, östrojenleri bağlamada benzer özellik göstermeleri nedeni ile östrojenik aktivitenin değerlendirilmesi ve tümör çalışmalarında alabalıkların uygun deneysel hayvan modelleri olduğu düşünülmüş ve bu nedenle çalışmalarda sıklıkla kullanılmıştır. Östrojenlerin, alabalıklarda karaciğer tümörlerini geliştirmekte etkili oldukları ileri sürülmüştür (39). Soto ve ark.'na göre, östrojenik NP, erkek balıkların dişileşmesine ve MCF-7 hücrelerinin gelişmesine yol açmaktadır. MCF-7 hücreleri, insanlarda meme kanseri hücrelerinin proliferasyonuna neden olan hücrelerdir (48).

Nonilfenol doza bağlı olarak vücutta birikir ve prooksidan etki yaratır. Antioksidan- prooksidan dengenin bozulması lipid peroksidasyonunu indükler ve oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stres, ER stresini tetikler ve hücreyi apoptoza götürür (2). NP, testiste ER Ca^{+2} pompalarını inhibe ederek hücre içi Ca^{+2} homeostazının bozulmasını sağlayıp hücre ölümüne yol açmaktadır (49).



Şekil 4. 4-Nonilfenol'ün moleküler yapısı (50).

2.4. Apoptoz

Normal fizyolojik koşullar altında hasarlı ya da yaşlı hücreler, genetik olarak düzenlenen programlanmış hücre ölümü olan apoptoz ile kendi kendilerini öldürür. Apoptoz; gelişim, yaşlanma, dokuda hücre bütünlüğünün dengesinin korunması gibi hemostatik bir mekanizmanın sağlanması için fizyolojik olarak gerçekleşir.

Hücre apoptoz için sinyal aldıktan sonra birçok morfolojik ve biyokimyasal değişimler gözlenir. Hücre sitoplazması büzülür ve hücre hacminde azalma meydana gelir. Hücre kondanse olmaya başlar. Hücre iskeleti elemanları dağılır ve nükleus zarı erimeye başlar. Nükleus DNA'sı fragmantasyona uğrar. Mitokondri bütünlüğü bozulur. Apoptozun son basamağı apoptotik cisimciklerin oluşumu ve hücrenin parçalanmasıdır. Hücreler parçalandıktan sonra fagosite edilirler. Apoptozda inflamasyon oluşmaz (51,52).

Apoptotik sinyal yolları, mitokondriyal yolak, endoplazmik retikulum yolak ve ölüm reseptör yollarını içerir. Bu hücre yolları hücrenin, hücre ölümü için programlanmasını sağlar (53).

Fas / FasL sinyali, ölüm reseptörü sinyal yolunun önemli bir elemanıdır. Fas, TNF (tümör nekroz faktörü) reseptör ailesinden olan bir hücre membran proteinidir. Fas ligand, Fas reseptörüne bağlanarak programlı hücre ölümünü ve prokaspazların aktif kaspazlara dönüşümü için bir hücre sinyal kaskadını başlatır. Kaspazlar, DNA tamir enzimi olan, poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) ve DNA protein kinazı yıkar ve kromatinde kırılmalar görülür. Böylece apoptoz gerçekleşmiş olur.

Apoptozda en önemli düzenleyici fonksiyon Bcl-2 ailesi proteinlerinden gelen iç sinyal yolağıdır. Bcl-2 ailesi, anti-apoptotik ve pro-apoptotik olarak ikiye ayrılarak, hücrenin ölmesini ya da yaşamasını belirler. Bax proteini, mitokondriyondan sitoplazmaya sitokrom c salınımını uyarır ve hücreleri parçalamaktan sorumlu kaspaz denilen proteolitik enzimlerin kaskadlarını aktive eder. Sitokrom c'nin düzenli salınımı, mitokondriyonların bcl-2 proteinlerince apoptozu başlatmak için öncü olduğu düşünülmektedir. Bcl-2'nin Bax'a bağlanması, Bax proteininin hücre hasarlayıcı etkisini önler (51, 54, 55).

2.5. Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi

Endoplazmik retikulum (ER), ökaryot hücrelerde salgı proteinlerinin sentezlenmesi, katlanması ve olgunlaşması fonksiyonlarının gerçekleştiği yerdir. Bir çok hücrel aktivite için gerekli bir organeldir. ER nükleus dış zarının devamı şeklindedir. (56).

ER protein sentezinde kalite kontrol merkezi olarak tanınmaktadır. Proteinlerin doğru şekilde katlanıp katlanmadığı, yanlış katlanmışsa düzeltilmesi, düzeltilemez ise yanlış katlanmış proteinlerin parçalanması ER'nin en önemli görevlerindendir (56-58).

ER'de şaperon adı verilen proteinlerin doğru şekilde katlanmasına yardımcı moleküller bulunmaktadır. Aynı zamanda bu moleküller iyi birer kalsiyum tamponlayıcı proteinlerdir. Etkin olmaları için kalsiyuma ihtiyaçları vardır. ER, sitozolden daha fazla kalsiyum içermektedir. Hücre membranındaki ve hücre dışına gönderilecek olan proteinler, ER'nin sitozole bakan yüzeylerinde bulunan ribozomlar tarafından ER'nin lümenine taşınırlar. ER'ye gelen, yeni sentezlenmiş proteinler, N-bağımlı glikolizasyon, hidroksilasyon, lipidizasyon, disülfid bağ oluşumu gibi posttranslasyonel modifikasyonlara uğramadan katlanamazlar (58-61).

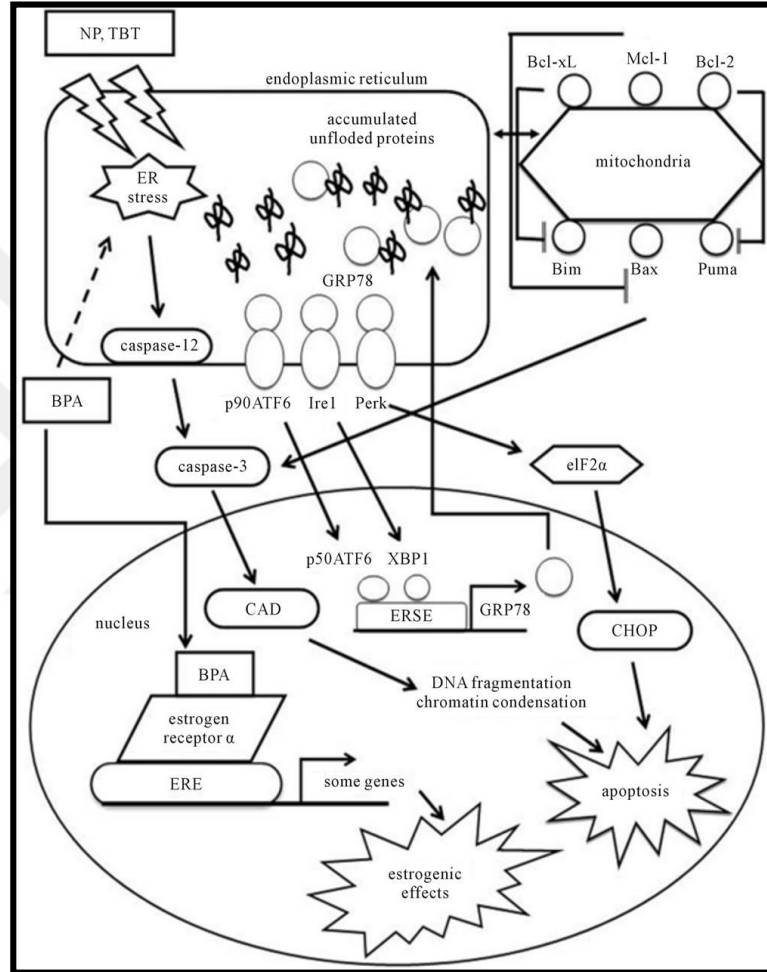
Kalsiyum homeostazının bozulması, N-bağımlı glikolizasyon inhibisyonu, oksidatif stres, hipoksi, ortam sıcaklığı, dışarıdan etki eden çeşitli stresler ve mutasyonlar gibi birçok etken proteinlerin doğru katlanmasında etkilidir. Bu etkenler, ER lümeninde, katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikimine yol açmaktadır. Hücrenin, hatalı katlanmış protein yüküyle başa çıkamadığı bu durum, ER stresi olarak adlandırılmaktadır (59, 62).

ER stresi oluştuğundan sonra hücre homeostazının tekrar sağlanması ve bu durumdan minimum zararla kurtulması için, hücre içi sinyal yollarından oluşan, katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak adlandırılan bir grup olaylar dizisi aktifleşmektedir. UPR ile önce hücrenin yaşamının devamlılığı hedeflenir. Başarısız ve protein birikimi devam ederse, hücre apoptoza yönlendirilir (63-65).

UPR'nin aktivasyonu 3 farklı sensör proteini tarafından düzenlenmektedir. Bunlar; PERK (Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz), ATF6 (Aktive edici transkripsiyon faktörü 6) ve IRE1 (Inositol gerektiren kinaz 1)'dir. Bu yollar, katlanmamış proteinlerin birikmesini önleme, şaperonları ve katlanmayı sağlayan

enzimleri kodlayan genlerin translasyonunun artırılması ve protein sentez yükünün azaltılması gibi çeşitli hücrel cevaplarda görev alır. (61, 66), (Şekil 5).

Proteinlerin, her katlanma basamağının doğru şekilde tamamlanması için, protein katlanmasından sorumlu moleküller bulunmaktadır. Bunlar; GRP78/BiP, GRP94, kalneksin ve kalretikulindir (57).



Şekil 5. NP'nin apoptoz yolağı (67).

2.5.1. Glikozla düzenlenen protein yetmişsekiz (GRP78/BiP)

Monomerik veya dimerik yapıda olan GRP78/BiP, 78 kDa ağırlığındadır. Oligomerik formda depo edilir. Monomerik yapıdaki GRP78/BiP şaperon görevi görmektedir. ER dışında, mitokodri ve nükleusta da bulunmaktadır. GRP78/BiP protein katlanmasının ve yıkımının sağlanması, proteinin ER'de translasyonun düzenlenmesi, UPR cevabının düzenlenmesi, proteinin kalite kontrolünün

sağlanması, kalsiyum bağlanması ve apoptozun düzenlenmesi gibi önemli mekanizmalarda görev alır. GRP78/BiP, stres olmadığı durumlarda, PERK, IRE1 ve ATF6 sensör proteinlerine bağlı olarak bulunur. Bu proteinler stres oluştuğunda inaktif formdan aktif forma dönüşürler ve nükleusa sinyal göndererek katlanmamış protein cevabı oluştururlar (68).

PERK; ER membranında, ökaryotik başlatma faktörü (eIF) 2 α 'yı fosforiller ve inaktive eder. Böylece, ER stresine karşı, hücredeki protein yükü azaltılır ve katlanmamış proteinlerin düzeltilmesi sağlanır. Ancak transkripsiyon faktörü ATF4 gibi daha özgül mRNA'ların translasyonu devamlılığını sürdürür ve miktarlarında artış görülür. ATF4 nükleusa girdikten sonra CHOP (C/EBP homologus protein), GADD34, ATF3 gibi genlerin transkripsiyonunu aktive eder. ATF4 tarafından aktive olan CHOP, hücreyi apoptoza götürecektir olan sinyali başlatır (69, 70), (Şekil 5).

ATF6; ER stresi ile karşılaşınca transkripsiyonel modifikasyona uğrar. ATF6 golgi kompleksine gönderilir. Burada ATF6, önce site-1 proteazla (S1), sonra site-2 proteazla (S2) etkileşime girerek kırılmaya uğrar ve nükleusa gönderilir. Sonuç olarak, ER katlama kapasitesini yükseltir ve strese karşı korunma sağlamaya çalışır (71).

IRE1; transotofosforilasyon ve RNAaz aktivasyonuna veya direkt katlanmamış proteinlere bağlanarak aktif olurlar. Aktive edilmiş IRE1'in RNAaz aktivitesi ile mRNA X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1)'den 26 nükleotid kırılır. Kırılmış mRNA translasyona uğrar ve transkripsiyon faktörüne dönüşür. Bu durum, ER şaperonlarının ve enzimlerin upregulasyonuna neden olur (72, 73).

2.6. Kaspaz-3

Kaspazlar açık adı "Cysteine Aspartate Specific Proteases" olan apoptozun gerçekleşmesinde önemli rol oynayan, sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Tüm kaspazlar benzer aminoasit dağılımına sahiptirler. Bu benzerlik, substrat spesifikliği ve yapısal açıdan da kaspazların benzer özellikte olmasını sağlar. Kaspazların tümü, inaktif olarak, proenzimler şeklinde sentez edilirler. Kaspazlar uzun, oldukça yüksek değişime sahip ve aktivasyonun düzenlenmesi için önemli rol oynayan NH terminal kısım, yaklaşık 20 kDa ağırlığında geniş alt ünite ve 10 kDa ağırlığında küçük alt ünite olmak üzere üç bölümden meydana gelir (74, 75). Kaspaz-3, apoptozda efektör

kaspazların en önemlisidir. Diğer kaspazlar gibi aktif merkezinde sistein molekülü taşır.

Kaspaz-3, mitokondriyal yolak, endoplazmik yolak ve ölüm reseptörlü yolların her biriyle de aktive edilir. Kaspaz-3, başlatıcı kaspazlar olan, kaspaz-8 ve kaspaz-9 tarafından aktive edilmektedir. Kaspaz-3 aktive olduktan sonra, hücrelerdeki hedef proteinlerini spesifik bölgelerinden kesmektedir. Kaspaz-3 aktive olup kesme işlemi gerçekleştikten sonra morfolojik değişiklikler gerçekleşir. Tüm bu basamaklar apoptozun gerçekleşmesinde önemli rol oynar (76, 77).

2.7. PARP-1

PARP-1 18 üyeli PARP ailesinin ilk keşfedilen üyesi'dir. Yaklaşık 113 kDa ağırlığındadır. PARP-1, DNA tamirinde görevli bir protein olup özellikle DNA hasarında ortaya çıkar. PARP-1'in hücredeki substratı NAD'dir. PARP-1, DNA zincirinin kırılması sonucu aktive olarak NAD⁺'in riboz ve nikotinamid arasındaki bağlarını parçalar. Parçalanma sonucu, hedef proteinlerin aspartik asit, glutamik asit ve lizin rezidülerine ADP-riboz birimlerinin kovalent olarak eklenmesi sağlanır. Bu olaylar proteinlerin konformasyonunu değiştirir ve DNA ile olan bağlarını düzenler. PARP-1, DNA kırıklarına bağlanarak, ya DNA tamir mekanizmasını aktifleştirir ya da BER yolağını inhibe ederek hücrenin ölümüne neden olur (8, 78-81).

PARP-1, aynı zamanda genomik kararlılığın düzenlenmesi, hücre içi yüksek miktarda NAD⁺ tüketimi sonucunda nekrotik hücre ölümü, telomeraz aktivitesinin düzenlenmesi, protein degradasyonu, yaşlanma, transkripsiyonel düzenlenme gibi birçok fizyolojik olayda rol alır (8).

2.8. Curcumin

Zerdeçal (*Curcuma longa*), Hindistan ve Çin'de yaygın olarak bulunan Zibgiberaceae familyasına ait çok yıllık, otsu bir bitkidir. Büyük yaprakları ve sarı çiçekleri bulunur. Anavatanı Güney Asya'dır. Hindistan'da uzun yıllardır baharat ve ilaç olarak kullanılmaktadır. Hint safranı, Safran kökü, Zerdeçöp, Turmerik olarak da bilinmektedir. Curcumin, zerdeçal bitkisinin yeraltında yetişen köklerinden elde edilen doğal sarı bir pigmenttir ve bitkinin %2-5'ini oluşturur (9, 10).

Kimyasal özellikleri, ilk kez 1910 yılında tanımlanan Curcumin, moleküler ağırlığı düşük polifenol bir bileşiktir (11). β konumunda bağlanmış 2 keton grubu içerir ve bu yapı curcuminin antioksidan olma özelliğinde rol oynar (12).

Moleküler formülü $C_{21}(H_{20})O_6$, moleküler ağırlığı 368.37 g/mol olan Curcuminin erime noktası 183 °C'dir. Curcumin hidrofobik özellikte olup organik çözücülerde iyi çözünmektedir (11, 13).

Curcuminin özünde 4 farklı curcuminoid vardır. Bunlar; yaklaşık %77 oranında curcumin (diferuloilmetan), %17 oranında demethoksicurcumin (p-hidroksikinnamoil-feruloil-metan) ve %3 oranında bis-demethoksicurcumin (pp'-dihidroksi-dikinnamoilmetan) ve cyclocurcumin (13, 82). Curcuminin hidroksil grupları antioksidan, metoksil grupları antiinflamatuvar ve antiproliferatif özellik göstermesinde büyük öneme sahiptir (83).

Curcumin, hidrofobik özelliğinden dolayı hücre membranında lokalize olmaktadır. Moleküler yapısından dolayı, plazma membranından kolayca geçer ve sitoplazmada birikir. Çekirdeğe giremez. Curcumin, lipofilik özellikte olan plazma membranı, ER, nükleus zarı gibi membranöz yapıların içinde daha yoğun bulunmaktadır. Curcumin, dolaşımında ya çok düşük seviyede ya da hiç bulunmamaktadır (84). Bağırsaklarda renksiz ve daha az polar olan tetrahidrocurcumine dönüşen curcumin, burada emilir, diğer dokulara dağılır ve en son karaciğerde glukoronlanarak safra yolu ile atılır. Oral yolla alındığında, %75'i dışkı ile, %25i idrarla atılır. İntraperitoneal uygulandığında oral yolla alınandan farklı olarak %11'inin safrada depolandığı belirtilmiştir (85).

Curcumin; antiinflamatuvar, antioksidan, antitümöral, antibakteriyel, antiviral, antidiyabetik, yara iyileşmesi, proapoptotik gibi geniş bir etkiye sahiptir (13).

Yapılan çalışmalarda, curcuminin kaspaz-3 ile aktivasyonunun apoptozu harekete geçirerek antitümöral özellik gösterdiği gözlenmiştir (86). Başka bir çalışma; curcuminin, apoptoz ile ilişkili olan Fas-Fas-L genlerinin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (87).

Curcuminin serbest radikalleri tutma özelliği vardır ve bu özelliğiyle DNA'yı oksidatif strese korur. Yapılan çalışmalar, curcuminin lipid peroksidasyonunu inhibe ederek antioksidan özellik gösterdiğini ortaya koymuştur (88).

Curcumin, inflamatuvar hastalıkların tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Curcumin, araşidonik asit metabolizmasında, siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimini inhibe ederek doğal inflamasyon mediatörlerinin oluşumunu engelleyerek antiinflamatuvar etkisini gösterir (89, 90).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın planlanma aşamasında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na başvuruldu ve 08/02/2018 tarihli 2018-06-02/02 protokol nolu Etik Kurul onayı alındı (Sayı: 91330202-). Araştırmanın her aşamasında yapılan tüm işlemler etik kurul yönergesinde belirtilen kurallara uygun olarak gerçekleştirildi. Mevcut çalışma, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2018-98210206-01 nolu tez projesi ile desteklenmiştir.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, 8 haftalık, ağırlıkları 120-200 g arasında değişen 24 adet erkek *Wistar albino* sıçan kullanıldı. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip, vücut ağırlıkları birbirine yakın olan denekler aynı grupta olacak şekilde; biri kontrol 3'ü deney grubu olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Tüm denekler, deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşulları (22±1 °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle beslendi.

Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu;

- I. Kontrol Grubu (n=6):** 35 gün boyunca gün aşırı gavaj yolu ile mısır yağı (NP ve cucuminin çözücüsü) verildi.
- II. Curcumin Grubu (n=6):** 35 gün boyunca gün aşırı gavaj yolu ile 100 mg/kg dozda curcumin verildi.
- III. Nonilfenol Grubu (n=6):** 35 gün boyunca gün aşırı gavaj yolu ile 100 mg/kg dozda 4-nonylphenol verildi.
- IV. Nonilfenol+Curcumin Grubu (n=6):** 35 gün boyunca, gün aşırı gavaj yolu ile 100 mg/kg dozda 4-nonylphenol ve 100 mg/kg dozda curcumin verildi.

3.2. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü

Deneyin başladığı ilk günden itibaren, her uygulama öncesi, uygulanacak madde dozunu belirlemek için denekler tartıldı. Deney süresinin sonunda tüm denekler tartılarak, son ağırlıklar istatistiksel değerlendirmeler için kaydedildi.

3.3. Dokuların Alınması

35 günün sonunda, 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye) intraperitoneal (i.p.) yoldan verilerek, tüm denekler derin anestesi altında sakrifiye edildi. Deneklerin abdominal bölgesi açılarak, abdominal aortadan kan örnekleri alındı, ardından epididimler ve testisler total olarak çıkarıldı. Sağ ve sol testisler çevresindeki dokulardan temizlendi, hassas terazi (Ohaus, Adventurer Pro AV264C) ile tartıldı, sonuçlar deney defterine kaydedildi. Tartım sonrası sağ testis, fiksatifin tunika albugineayı kolay geçebilmesi için, insülin iğnesi ile her iki kutbundan delindi. Ardından sağ testis %10'luk formaldehit çözeltisine konuldu. Sol testis ve serum örnekleri ise biyokimyasal parametrelerin çalışılabilmesi için, -80 °C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

3.4. Sperm Değerlendirmesi

Sperm değerlendirilmesi için, herbir deneğin sağ epididimlerinin kauda kısmı, 1cm olacak şekilde kesilerek çıkartıldı ve tartıldı. Epididimlere bistüri ucuyla çizikler atıldı ve 1ml serum fizyolojik (SF) bulunan ependorflara konuldu. 37 °C sıcaklığı olan su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Elde edilen örneklerde sperm parametreleri (konsantrasyon, motilite, vitalite ve morfoloji) değerlendirildi.

Sperm konsantrasyonunu ve motilitesini değerlendirmek için makler çemberi (Makler Counting Chamber, Sefi Medikal, Haifa, İsrail) kullanıldı. Çemberin lamına 10 µl örnek damlatıldı ve ışık mikroskopuyla (Zeiss, Axio Lab A1, Almanya) incelendi. Çemberde rastgele 10 kareye denk gelen spermeler (X200 büyütmede) sayıldı. Mililitredeki sperm sayısının milyon (10^6) cinsinden hesaplanması için elde edilen sonuç 1 milyon ile çarpıldı. Sperm motilitesinin değerlendirilmesi için, 100 kareye denk gelen spermeler hareketli ve hareketsiz olmalarına göre sayıldı, yüzde oranları hesaplandı.

Sperm morfolojisini değerlendirmek için, elde edilen örneklerden lama 20 µl damlatıldı ve periferik yayma yöntemi ile yayılarak kurutuldu. Bu şekilde her denek için hazırlanan lamlar, Spermac Stain boya seti (Box 152. Wellington, 7654, South Africa) ile aşağıda belirtilen yöntemle göre boyandı.

Spermac boyama yöntemi:

Sperm bir lam üzerine yayıldı. 10 dk kurutulduktan sonra 15dk fiksatorde bekletildi ve distile su ile yıkandı. Ardından sırasıyla A, B ve C boya larında 90 saniye bekletildi. Her denek için hazırlanan preparatlarda, ışık mikroskopunda X400 büyütmede, 100 sperm sayıldı. Morfolojik açıdan normal veya anormal (baş, boyun ve kuyruk defekli) olarak sınıflandırıldı. Normal sperm lerin yüzdesi hesaplanarak istatistiksel analiz yapıldı. Değerlendirmeler sırasında anormal morfolojiye sahip sperm ler fotoğraflandırılarak literatür bilgisine göre değerlendirildi (91-93).

Sperm vitalite değerlendirmesi için, cansız hücrelerin boyayı tutma prensibine dayanan eozin-nigrosin boyama yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, cansız hücreler eozini alıp pembe renge boyanır ve canlı hücreler boyayı tutmayarak şeffaf olarak kalır. Nigrosin ise, arka planla sperm ler arasındaki kontrastı artırmak ve farkedilmelerini sağlamak için kullanılır. VitalScreen boyama seti (VitalScreen, FertiPro, Belgium) yöntemine uygun olarak, her denek için preparatlar hazırlandı. Sperm başları pembe renk boyananlar cansız sperm, şeffaf olarak kalanlar canlı sperm olarak belirlendi. Hazırlanan her bir preparatta 100 sperm sayıldı ve canlılık oranı hesaplandı. VitalScreen boyama yöntemi; 50 µl örnek bulunan bir ependorf içerisine 2 damla Eozin Y karıştırılarak 10 dk bekletildi. Ardından 3 damla nigrosin eklenerek tekrar 10 dk bekletildi. Elde edilen karışımdan 20 µl bir lam üzerine yayıldı ve ışık mikroskopunda (Zeiss, Axio Lab A1, Almanya), X400 büyütmede kurumadan hızlı bir şekilde değerlendirildi.

3.5. Dokuların Hazırlanması

Işık mikroskopik değerlendirmeler için, her bir denegin sağ testisi, %10'luk formaldehit çözeltisi içine alındı. Tüm deneklerin sakrifikasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, sağ testis örnekleri enine olacak şekilde 4 parçaya bölünerek etiketlenmiş kasetlere alındı. Dokular formaldehit çözeltisinde 2 gün bekletildikten sonra, akar musluk suyu altında 1 gece boyunca yıkandı. Örnekler dehidratasyon için

sırası ile %70, %90, %96 ve %100 alkol serilerinden 2x1 saat olacak şekilde geçirildi. Ardından 2x6 dk toluende bekletilerek şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Örnekler sıvı parafine alınarak 1 gün etüvde bekletildikten sonra etiketlenerek parafin blok haline getirildi.

3.6. Kesitlerin Alınması ve Boyanması

Elde edilen her bir bloktan 5µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, testisin histolojik özelliklerini ortaya koyacak olan Hematoksilen-Eozin (H-E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS)+Hematoksilen ile boyandı.

Hematoksilen-Eozin boyaması:

Hematoksilen-Eozin boyaması testis dokusunun genel morfolojisini gözlemlemek amacıyla yapıldı. Toluen ile deparafinizasyon işlemi yapıldıktan sonra, kesitler, yoğunluğu azalan alkol serilerinden geçirilerek suya indirildi. Daha sonra hücre nükleus boyanması için hematoksilende (Bio-optica, 0506002/L) 12 dakika bekletildi. Çeşme suyuna alındıktan sonra, %1'lik asit alkolde çalkalanıp, akan musluk suyu altında 30 dakika morartma işlemi yapıldı. Morartmadan sonra sitoplazma boyanması için kesitler 3 dakika eozinde bekletildi ve çeşme suyunda çalkalandı. Son olarak yoğunluğu artan alkol serilerinden hızlıca geçirilen kesitler, absöü alkolde 2x10 dk bekletildikten sonra, toluen ile şeffaflaştırılıp (2x10 dk), entellan (MERK) ile kapatıldı.

PAS+H boyasının hazırlanması

Schiff reaktifinin hazırlanışı: Kaynayan 100 cc distile su içerisine 1g bazik fuksin eklendi. Solüsyon devamlı karıştırılarak 60°C' ye kadar soğutuldu. Süzgeç kağıdı yardımıyla bir şişeye süzdürüldü. Süzdürülen solüsyonun içine 6g K₂S₂O₅ ilave edildi. K₂S₂O₅'in iyice çözünmesi ile vişneçürüğü renginde bir solüsyon elde edildi. Karışıma yavaş yavaş 60 cc, 1N HCl ilave edildi. Elde edilen karışım, ağzı kapalı bir şişe içerisinde 24 saat +4°C'de buzdolabında saklandı. Ertesi gün içine 200 mg aktif kömür eklendi ve süzgeç kağıdı ile koyu renkli bir şişe içine süzdürüldü. (Süzme işlemi sırasında akan sıvı şeffaf açık sarı renkte olmalıdır).

Yıkama solüsyonu hazırlanışı:

A) %10'luk $K_2S_2O_5$ Hazırlanışı: 10 g $K_2S_2O_5$ ve 100 ml distile su karıştırıldı.

B) 1N HCl Hazırlanışı: 84 cc HCl (%37'lik) ve 916 ml distile su karıştırıldı.

A ve B karışımlarından 10'ar ml alındı ve üzerine 180 ml musluk suyu ilave edilerek yıkama solüsyonu elde edildi. Bu solüsyon 3 şaleye bölündü.

Periyodik Asitin Hazırlanışı: 1 g Periyodik Asit, 100 ml Distile su içinde çözüldü.

Periyodik Asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyama protokolü:

Toluen ile parafinden arındırılan kesitler yoğunluğu azalan alkol serilerinden geçirilerek suya indirildi. Daha sonra periyodik asit solüsyonunda 15 dakika bekletildi ve 10 dakika akan suyun altında bırakıldı. Ardından 3 kez distile su ile çalkalandıktan sonra karanlık ortamda schiff solüsyonunda 20 dakika bekletildi. Hazırlanan yıkama solüsyonu 3 şaleye bölündü ve kesitler yıkama solüsyonlarında 5'er dakika bekletildi. Ardından kesitler 5 dakika akan suyun altına alındı. Daha sonra nükleus boyaması için hematoksilende 10 dakika bekledikten sonra, akar musluk suyu altında 30 dakika morartmaya bırakıldı. Son olarak yoğunluğu artan alkol serilerinden hızlıca geçirilen kesitler, absolü alkolde 2x10 dk bekletildikten sonra, toluen ile şeffaflaştırılıp (2x10 dk), entellan (MERK) ile kapatıldı.

3.7. Histolojik Değerlendirme

Histolojik değerlendirme için, tüm deneklere ait H-E ve PAS+H ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu (Zeiss, Axio Lab A1, Almanya) kullanılarak incelendi ve fotoğraflandı.

3.8. Johnsen Skorlama Yöntemi

Testiste seminifer tübül duvarında spermatogenezin değerlendirilmesi Johnsen kriterlerine göre yapıldı (Tablo 1). Bu puanlama sistemine göre incelenecek olan seminifer tübül kesitlerine verilecek puanların toplamı, sayılan tübül sayısına bölünerek ortalama puan hesaplandı (94).

Tablo 1. Johnsen testiküler biyopsi skoru (94).

Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru	Kriterler
Skor 10:	Germ epiteli çok tabakalı, açık santral lümen, çok miktarda spermatozoa.
Skor 9:	Germ epiteli çok tabakalı ancak disorganize, lümendeki epitel hücreleri spermatozoalarla karışmış.
Skor 8:	Germ epiteli çok tabakalı, lümende 10'dan daha az spermatozoa.
Skor 7:	Çok miktarda spermatid, ancak hiç spermatozoa yok.
Skor 6:	Hiç spermatozoon yok, spermatid sayısı 10'dan daha az.
Skor 5:	Bir kaç tane spermatosit, spermatid veya spermatozoa yok.
Skor 4:	Spermatozoa ve spermatid hiç yok, spermatosit sayısı 5'den az.
Skor 3:	Sadece bir kaç spermatogonyum.
Skor 2:	Bir kaç Sertoli hücresi, germ hücresi hiç yok.
Skor 1:	Seminifer tübülde hiç hücre yok.

Heterojen veriler bulunan deneklerde ise ağırlıklı ortalamaları alınarak hesaplandı.

3.9. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Testis biyopsi örnekleri ile hazırlanan parafin bloklardan Shandon Finesse 325 marka silindirik mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Pozitif şarjlı lamlara alınan kesitlerde; apoptoz belirteci olarak kaspaz-3, ER stresi belirteci GRP78/BiP ve DNA onarıcı bir enzim olan PARP-1 ekspresyonundaki değişiklikler immünohistokimyasal ABC (Avidin-Biotin Kompleks) yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

Kesitler ilk olarak deparafinizasyon işlemi için, 58 °C 'de inkübe edilip sırasıyla ksilen ve alkol serilerinden geçirilerek distile suya alındı. Dokuda formaldehit fiksasyonundan kaynaklanan reseptör maskelenmesini önlemek için sitrat tamponuna alınan kesitlere mikrodalgada yüksek ısı uygulandı. Antijenik determinant bölgelerinin açığa çıkarılmasından sonra, kesitler distile suya alınıp 20 dk oda sıcaklığında tutuldu. Daha sonra kesitler fosfat tamponu (PBS; pH 7.6) ile (2x5 dk) yıkandı. Hücre membranlarını açmak için, kesitler PBS-Triton X

solüsyonunda 5 dk bekletildikten sonra PBS ile (2x5 dk) yıkandı. Kesitlerin çevresi hidrofobik kalemle çizildi. Nemli kabin içine alınan kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek amacıyla, %3'lük hidrojen peroksit ile 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Kesitler, PBS ile yıkandı (2x5 dk). Nonspesifik antikor bağlanmalarını önlemek amacıyla kesitlere %1'lik preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) 5 dk uygulandı. Daha sonra nemli kabin içinde kesitler primer antikorlar (anti-PARP-1; Abcam-ab6079, USA, anti-caspase-3; Abcam-ab4051, anti-GRP78/BiP; Abcam-ab108613) ile oda ısısında 1'er saat inkübe edildi. PBS ile (2x5 dk) yıkanan kesitler, nemli kabin içerisinde sekonder antikor (Dako Biotinylated Link, K0609) ile 30 dk inkübe edildi. Ardından tekrar PBS ile (2x5 dk) yıkayıp, 10 dk Streptavidin peroksidaz kompleksi (Streptavidin HRP, Dako, K0609) ile inkübe edildi. Ardından PBS ile (2x5 dk) yıkama yapıldı. Nemli kabindeki kesitlere kromojen (3',3-diaminobenzidine; DAB, Vector, SK-4100) damlatıldı. Mikroskop ile kontrol edilerek, immün reaksiyon gerçekleşince, kesitler distile suya alınarak kromojen reaksiyonu sonlandırıldı. Yıkamanın ardından, zıt boyama 1 dk Mayer'in Hematoksilen'i (Bio-optica, 0506002/L) ile yapıldı. Distile su ile (3x3 dk) yıkandı. Son olarak, kesitler alkol serilerinden geçirilip, ksilen ile muamale edildikten sonra entellan ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar Zeiss marka Axio Lab A1 görüntüleme sistemli ışık mikroskobu altında X40 objektif büyütmesinde her kesit üzerinde rastgele seçilen 10 alanda histolojik-skorlama yapılarak, semikantitatif olarak değerlendirildi. 0, boyanma yok; 1+, zayıf fakat tespit edilebilir boyanma; 2+,orta ya da belirgin boyanma; 3+, yoğun boyanma şeklinde ifade edildi. Her bir kesit için H-skor 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). İstatistiksel analizler için ortalama skorlar kullanılmıştır.

3.10. İn Situ DNA Uç İşaretleme Metodu (TUNEL) Analizi

TUNEL analizi, parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler üzerinde ApopTaq Plus Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kit (S7101-KIT, Millipore) kullanılarak yapıldı.

Kesitler, deparafinize edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için %3'lük H₂O₂'de 15 dk muamele edildi ve PBS ile (2x5 dk) yıkandı.

Dokular, -20°C'de soğutulmuş olan permeabilizasyon solüsyonunda 8 dakika +4°C'de inkübe edildi ve PBS ile (2x5 dk) yıkandı. Ardından dengeleme tamponunda oda ısısında 30 dk inkübe edildi. Daha sonra digoksinin işaretli dUTP kuyruğunun bağlanması için 37°C'de 1 saat terminal deoksinükleotidil (TdT) transferaz enzim solüsyonu ile inkübe edildi. Ardından kesitler oda ısısında 10 dakika durdurma/yıkama tamponunda yıkandı. Antidigoksinin peroksidaz antikoru ile oda ısısında 30 dk inkübe edilen kesitler PBS ile (2x5 dk) yıkanmasının ardından peroksidaz substrat için 3,3-diaminobenzidine (DAB) kullanılarak boyandı. Hematoksilen ile 1 dk zıt boyama yapıldıktan sonra akan suyun altında 20 dakika morartmaya bırakıldı ve yoğunluğu artan alkol serilerinden geçirilen kesitler, toluen ile şeffaflaştırma işlemi yapılarak, entellan ile kapatıldı. Işık mikroskobu ile incelendi.

Tüm gruplara ait deney hayvanlarının testis kesitlerindeki apoptoz tayini için TUNEL yöntemi uygulandıktan sonra, apoptotik indeks çıkarıldı. Apoptotik indeks, her bir denek için seminifer tübül kesiti başına ortalama apoptotik hücre sayısı olarak hesaplandı. Apoptotik hücre tespiti, her kesit için Zeiss Axio Lab A1 model mikroskop ile X40 büyütmede rastgele seçilen 10 seminifer tübül incelenerek yapıldı.

3.11. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi için GraphPad Prism 5.03 paket programı kullanıldı. Deney öncesi ve sonu vücut ağırlıkları, testis ve epididim ağırlıkları, sperm parametrelerinin indeksi ortalama \pm standart sapma olarak hesaplandı., İmmunohistokimyasal analiz sonuçları, TUNEL metodu, histopatolojik skorlama ve Johnsen skorlaması sonucu elde edilen değerlerin indeksi medyan (min-max) olarak hesaplandı. Öncelikle deneklere ait verilerin normal dağılım gösterip göstermedikleri ve varyanslarının homojenliği test edildi. Tüm grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Alt grupların ikişerli karşılaştırması ise Dunn testi kullanılarak yapıldı. Tüm değerlendirmeler için istatistik anlamlılık sınır değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığı

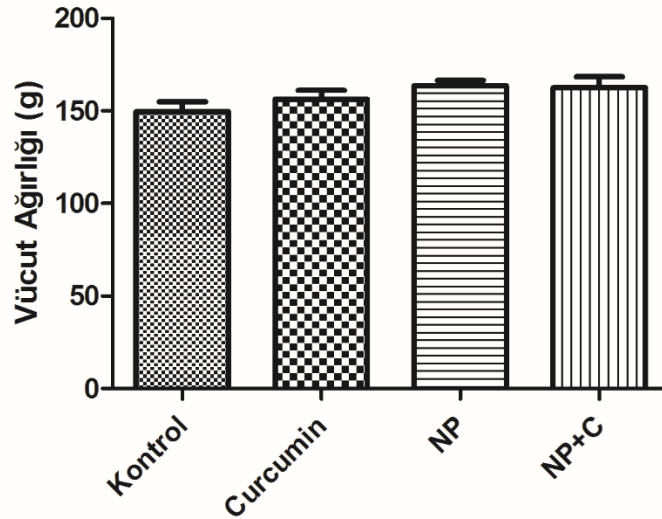
4.1.1. Deney öncesi vücut ağırlığı

Deney başlamadan önce deneklerin ilk ağırlıkları ölçüldü ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 2. Deney öncesi vücut ağırlıkları (g).

	Kontrol Grubu n=6	Curcumin Grubu n=6	NP Grubu n=6	NP+C Grubu n=6	p
Vücut Ağırlıkları (g)	149.5±13.31	156.2±12.12	163.5±7.064	162.5±14.32	p>0.05

Değerler Ortalama ± Standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 6. Deney öncesi vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.

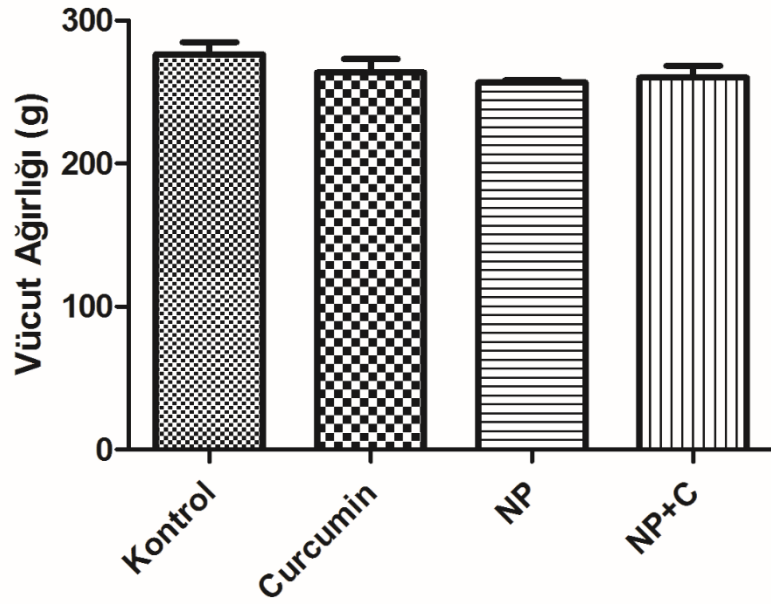
4.1.2. Deney sonu vücut ağırlığı

Deney sonunda ölçülen deneklerin vücut ağırlıkları istatistiksel analiz yapıldı ve gruplar arası anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 3. Deney sonu vücut ağırlıkları (g).

	Kontrol Grubu n=6	Curcumin Grubu n=6	NP Grubu n=6	NP+C Grubu n=6	p
Vücut Ağırlıkları (g)	276.3±21.08	263.5±23.79	256.5±4.324	260.0±20.53	$p>0.05$

Değerler Ortalama ± Standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 7. Deney sonu vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.

4.1.3. Deney öncesi ve sonu vücut ağırlıklarının karşılaştırılması

Deneklerin deney başlangıç ağırlıkları ile deney sonu vücut ağırlıkları kıyaslandığında; kontrol, curcumin, NP, NP+C gruplarının deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptandı ($p < 0.0001$). Ortalama farklar ele alındığında; en fazla vücut ağırlığındaki artış kontrol grubundaki denekler arasında gözlemlenirken, en az kilo artışı ise NP grubunda gözlemlendi. Fakat her bir deney grubu diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlemlenmedi (D.B: $p > 0.05$, D.S: $p > 0.05$).

Tablo 4. Deney öncesi ve deney sonu denek ağırlıklarının ortalama farkları (g).

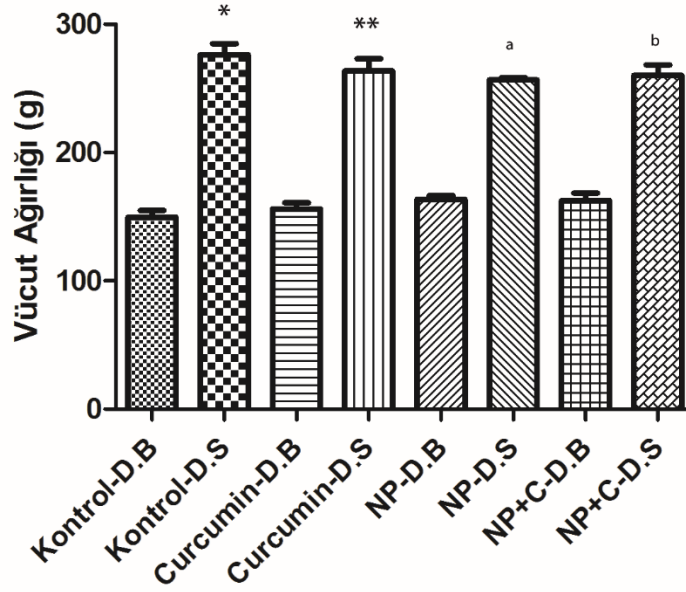
	Kontrol Grubu n=6	Curcumin Grubu n=6	NP Grubu n=6	NP+C Grubu n=6
Ortalama Farkları (g)	+126.8	+107.3	+93	+97.5
p	<0.0001*	<0.0001**	<0.0001 ^a	<0.0001 ^b

* $p < 0.0001$ Kontrol-D.B ile kıyaslandığında.

** $p < 0.0001$ Curcumin-D.B ile kıyaslandığında.

^a $p < 0.0001$ NP-D.B ile kıyaslandığında.

^b $p < 0.0001$ NP+C-D.B ile kıyaslandığında.



Şekil 8. Deney başlangıcı (D.B) ve deney sonu (D.S) vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.

4.2. Testis ve Epididim Ağırlıkları

Tablo 5'te gösterildiği gibi deneklerin sağ testis, sol testis, sağ epididim ve sol epididim ağırlıkları ölçüldü ve gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$).

Tablo 5. Testis ve epididim ağırlıkları (g).

	Kontrol Grubu n=6	Curcumin Grubu n=6	NP Grubu n=6	NP+C Grubu n=6	p
Sağ Testis	1.493±0.05391	1.580±0.2542	1.410±0.07239	1.415±0.1234	$p>0.05$
Sol Testis	1.470±0.05865	1.550±0.1501	1.415±0.06745	1.402±0.1367	$p>0.05$
Sağ Epididim	0.4850±0.02881	0.5083±0.07139	0.4567±0.01862	0.4783±0.04355	$p>0.05$
Sol Epididim	0.4983±0.08377	0.4833±0.05820	0.4933±0.02658	0.4767±0.06088	$p>0.05$

Değerler Ortalama ± Standart sapma olarak verilmiştir.

4.3. Sperm Değerlendirmesi

Deneklere ait sperm parametreleri (sperm sayımı (milyon/ml), sperm motilitesi (%), sperm canlılığı (%) ve normal morfolojili sperm (%)) değerlendirildi. Gruplara ait bulgular Tablo 6’da verilmiştir. Bu parametreler göz önüne alındığında, NP maruziyetinin, deneklerin sperm sayısını ve kalitesini olumsuz yönde etkilediği gözlemlendi.

Tablo 6. Sperm değerlendirmeleri.

	Kontrol Grubu n=6	Curcumin Grubu n=6	NP Grubu n=6	NP+C Grubu n=6	p
Sperm Sayısı (milyon/ml)	169.0 (162.0-184.0)	163.0** (154.0-180.0)	77.00*** (70.00-96.00)	145.0 ^a (132.0-154.0)	0.0001
Hareketli Sperm (%)	77.50 (72.00-86.00)	72.50* (63.00-81.00)	41.50*** (31.00-50.00)	61.50 ^a (54.00-70.00)	0.0001
Canlı Sperm (%)	82.00 (76.00-92.00)	80.00** (76.00-88.00)	45.00*** (38.00-60.00)	69.00 ^a (58.00-74.00)	0.0001
Normal Morfoloji (%)	73.50 (69.00-80.00)	63.50* (58.00-70.00)	30.00*** (22.00-38.00)	53.50 ^a (49.00-60.00)	0.0001

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak hesaplanmıştır.

*** p<0.05 Kontrol ile kıyaslandığında.

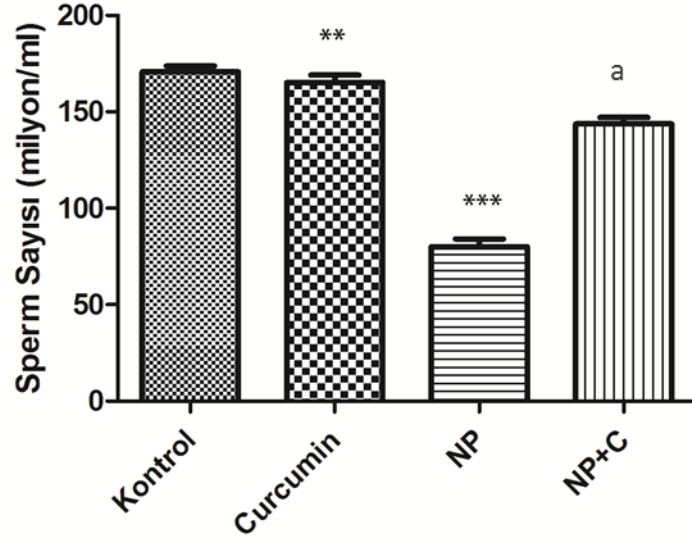
** p<0.05 NP ile kıyaslandığında.

* p<0.05 NP ile kıyaslandığında.

^ap<0.05 NP ile kıyaslandığında.

4.3.1. Sperm sayımı (milyon/ml) değerlendirilmesi

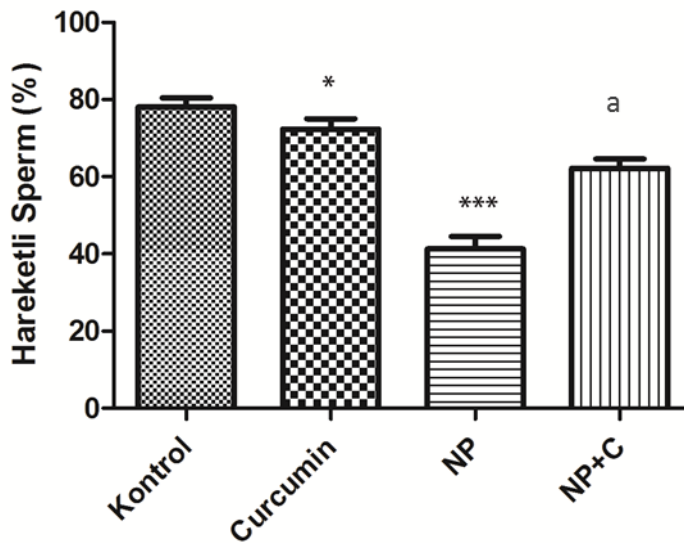
Yapılan sperm sayımında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (p=0.0001). NP grubu kontrole göre kıyaslandığında anlamlı bir düşüş görüldü (*p<0.05). Curcumin grubu NP grubu ile kıyaslandığında, curcumin grubu ile NP grubu arasında anlamlı bir fark saptandı (**p<0.05). NP+C grubu NP grubu ile kıyaslandığında, sperm sayısının anlamlı düzeyde artmış olduğu saptandı. (^ap<0.05), (Tablo 6).



Şekil 9. Sperm sayımı (milyon/ml) değerlendirmesi.

4.3.2. Hareketli sperm (Motilite) (%) değerlendirmesi

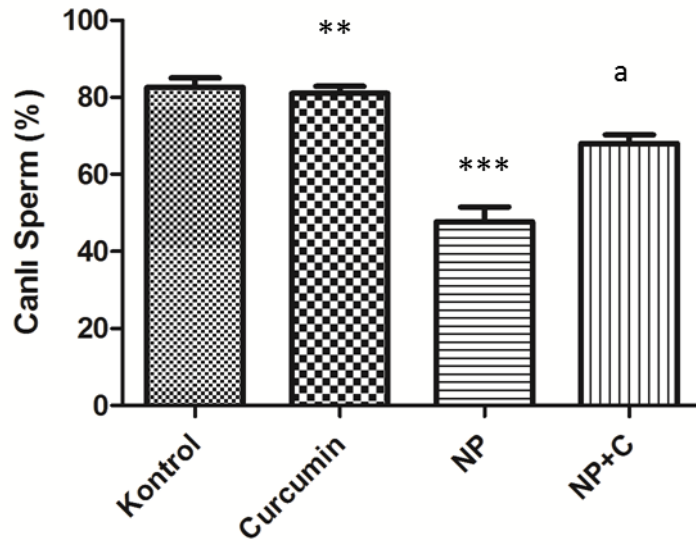
Sperm motilitesi değerlendirildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p=0.0001$). Gruplar kendi aralarında kıyaslandığına; NP (***) $p<0.05$ grubunun, kontrol, curcumin (* $p<0.05$) ve NP+C (^a $p<0.05$) grubuna göre daha düşük sperm motilitesine sahip olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturduğu görüldü (Tablo 6).



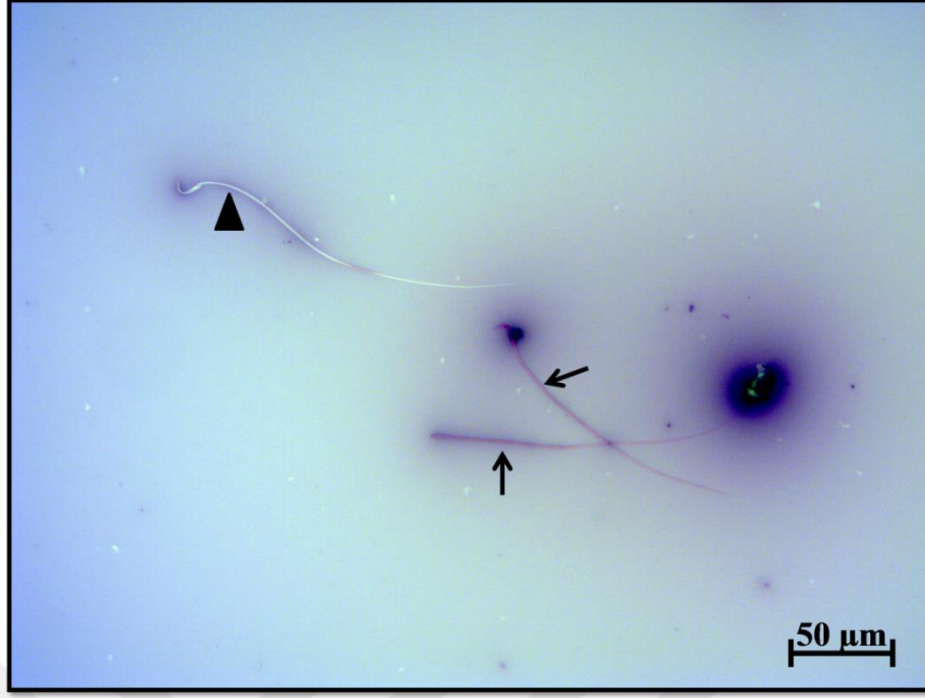
Şekil 10. Hareketli sperm (%) değerlendirmesi.

4.3.3. Sperm vitalite (canlılık) (%) değerlendirmesi

Eozin-nigrosin boyama yöntemi ile sperm vitalitesi değerlendirildiğinde, kontrol grubuna kıyasla, NP grubunda çok sayıda cansız sperm varlığı gözlemlendi. İstatistiksel olarak da, kontrol, curcumin (** $p < 0.05$) ve NP+C (^a $p < 0.05$) grubuna kıyasla NP grubunda canlı sperm sayısında (***) anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi (Tablo 6).



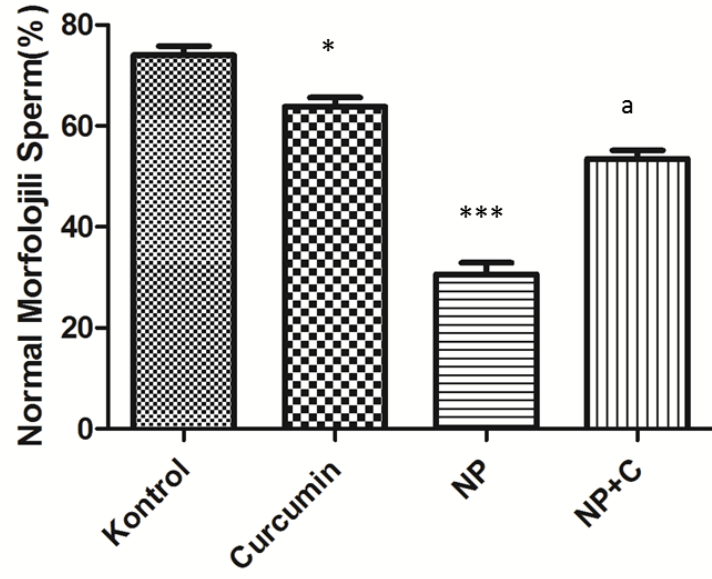
Şekil 11. Canlı sperm (%) değerlendirmesi.



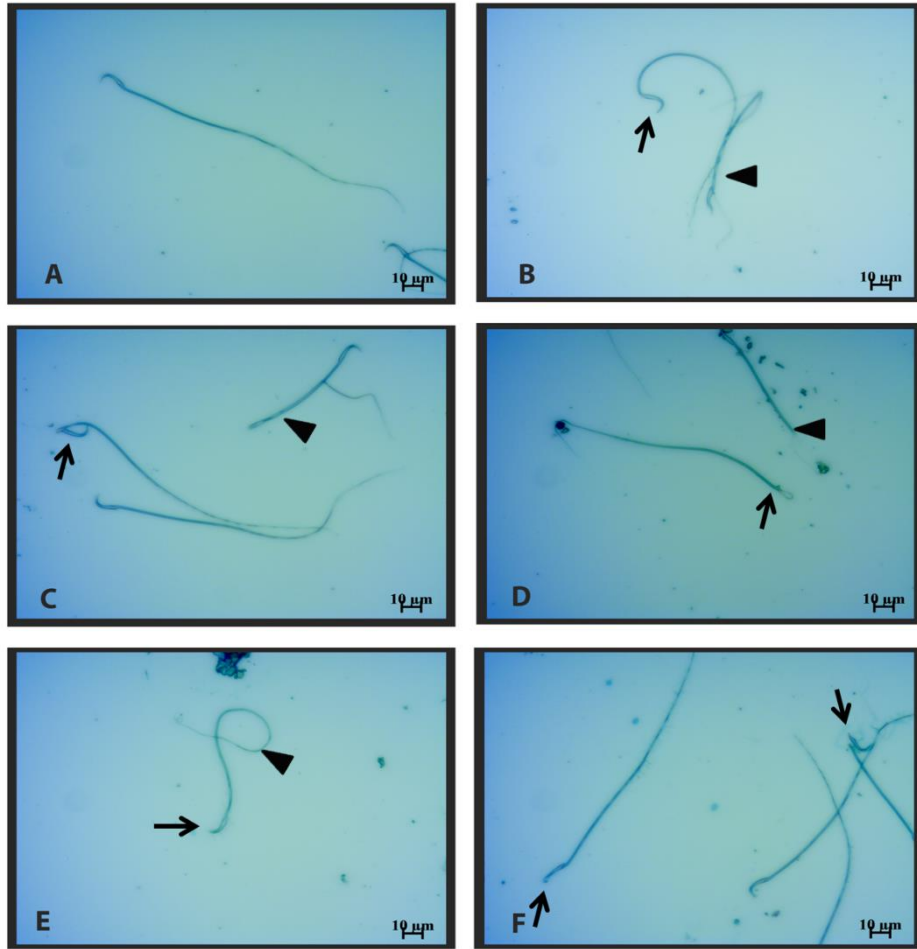
Şekil 12. Sperm vitalite testi eozin-nigrosin boyaması. (→) Pembe renk boyanmış cansız sperm, (▲) Şeffaf olarak görünen canlı sperm. Eozin-nigrosin x20

4.3.4. Sperm morfoloji (%) değerlendirmesi

Sperm morfoloji değerlendirmesi için Spermac Stain ile boyanan preparatlarda, her denek için 100 hücre normal ve anormal olarak değerlendirildi. Normal spermelerin yüzde oranları hesaplandı ve anormal spermeler fotoğraflandı (Şekil 14). Normal morfolojiye sahip spermelerin yüzdeleri gruplar arası kıyaslandığında anlamlı sonuçlar elde edildi ($p=0.0001$). NP grubu; kontrol (***) $p<0.05$), curcumin ($*p<0.05$) ve NP+C grupları ($^ap<0.05$) ile kıyaslandığında, NP'ye bağlı olarak normal morfolojiye sahip sperm sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu saptandı (Tablo 6).



Şekil 13. Normal morfolojili sperm (%) değerlendirmesi.



Şekil 14. NP uygulanan sıçanlarda sperm morfoloji değerlendirmesi için Spermac Stain boyaması. (A) Normal sperm (B), (C), (D), (E), (F), (→) baş anomalileri (Δ) kuyruk anomalileri. x40.

4.4. Histolojik Bulgular

4.4.1. Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama

Kontrol ve Curcumin Grubu

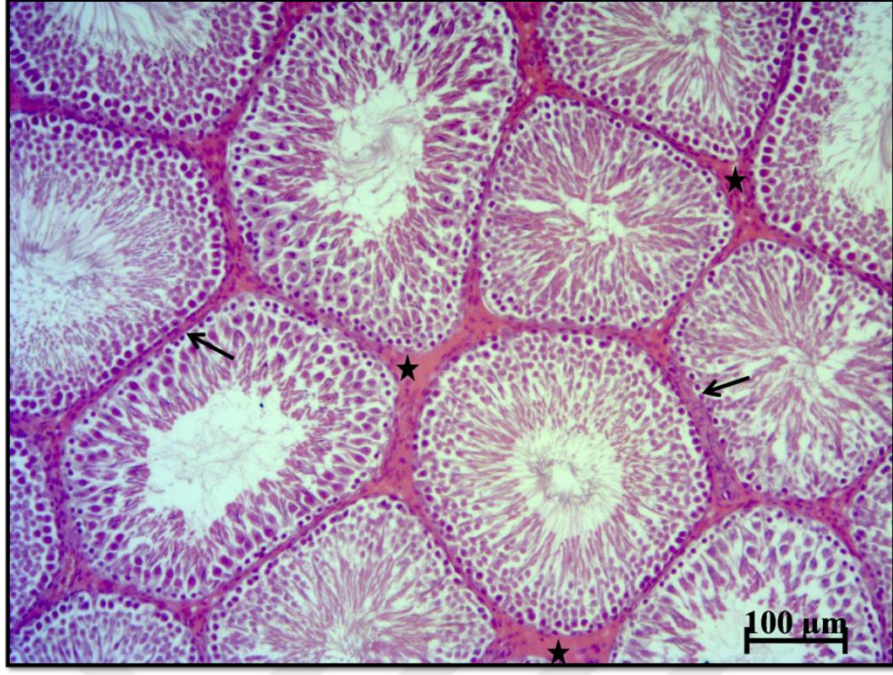
Kontrol ve curcumin grubunu oluşturan sıçan testis dokularının ışık mikroskobu incelemelerinde, seminifer tübüller ve interstisyel alan normal histolojik yapıya sahipti. Seminifer tübüller, normal seyirde olan spermatogenik seri hücreler tarafından oluşturulan çok katlı bir epitel tabakası ile döşenmişti. Gelişmekte olan spermatidlerin klasik görüntüleri olan kuyruk lümeninde baş epitel duvarına yönelik şekilde olduğu gözlemlendi. Ayrıca düzgün görünümlü bir bazal membran ve bazal membran üzerinde yerleşik sitoplazması soluk renk boyanan, uzantıları seminifer tübül lümenine kadar devam eden Sertoli hücrelerine sahip olduğu görüldü. İnterstisyel alanda, bağ doku hücreleri, kan damarları ve tek tek ya da gruplar halinde, eozinofilik sitoplazmalı, yuvarlak şekilli Leydig hücreleri gözlemlendi (Şekil 15, 16, 22).

NP Grubu

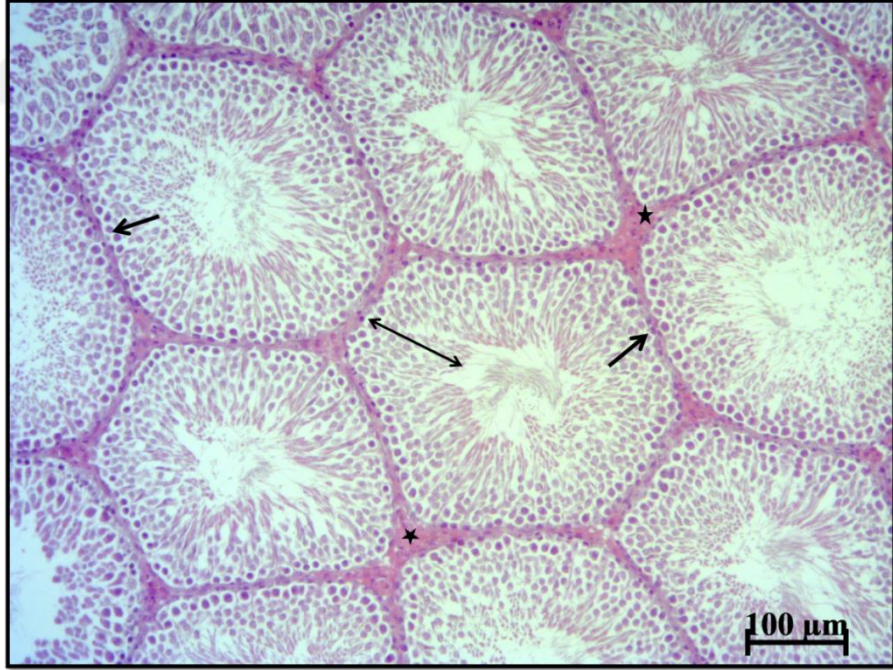
NP verilen gruptaki sıçanların testis dokusu incelendiğinde; kontrol ve curcumin grubuna göre seminifer tübül ve interstisyel alanın normal histolojik yapıya sahip olmadığı gözlemlendi. Seminifer tübül epitelinde incelme ve yer yer vakuolizasyon gözlemlendi. Bazal membranın düzensizleştiği, seminifer tübül epitelinden ayrıldığı ve bazı tübüllerde yok olduğu gözlemlendi. Seminifer tübül epitelini oluşturan spermatogenik hücre serisinde kayıplar ve düzensizlikler gözlemlendi. Bazı tübüller bu seri hücrelerden yoksundu. Ayrıca bazı seminifer tübüllerin lümeninde immatür germinal epitel hücreleri izlendi. İnterstisyel alanda, ödem ve vakuoller gözlemlendi. Bazı bölgelerde Leydig hücrelerinde azalma gözlemlendi (Şekil 17, 18, 19, 20, 22).

NP+C Grubu

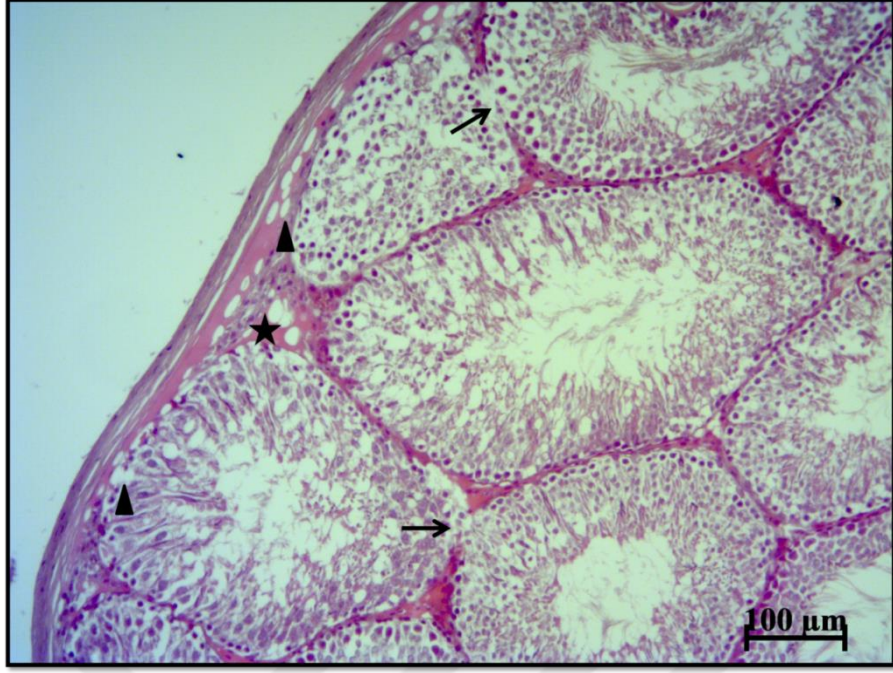
NP ve curcumin'in birlikte verildiği grupların testis dokuları incelendiğinde; hasarlı tübüllere rastlansa da tübüllerin çoğunluğu normal histolojik yapıya sahipti. NP grubuna göre seminifer tübüllerde daha az disorganize olmuş spermatogenik seri hücreler ve bazal membran yapısının daha düzgün olduğu gözlemlendi. Seminifer tübül epitelinde az miktarda vakuole ve tübül lümeninde az sayıda immatür hücrelere rastlandı. İnterstisyel alanda hafif ödem gözlemlendi (Şekil 21, 22).



Şekil 15. Kontrol grubuna ait sıçan testisinde, seminifer tübüllerin etrafını saran düzgün bazal membran (→) ve interstisyel alanlar (★) izlenmektedir. H&E, x10



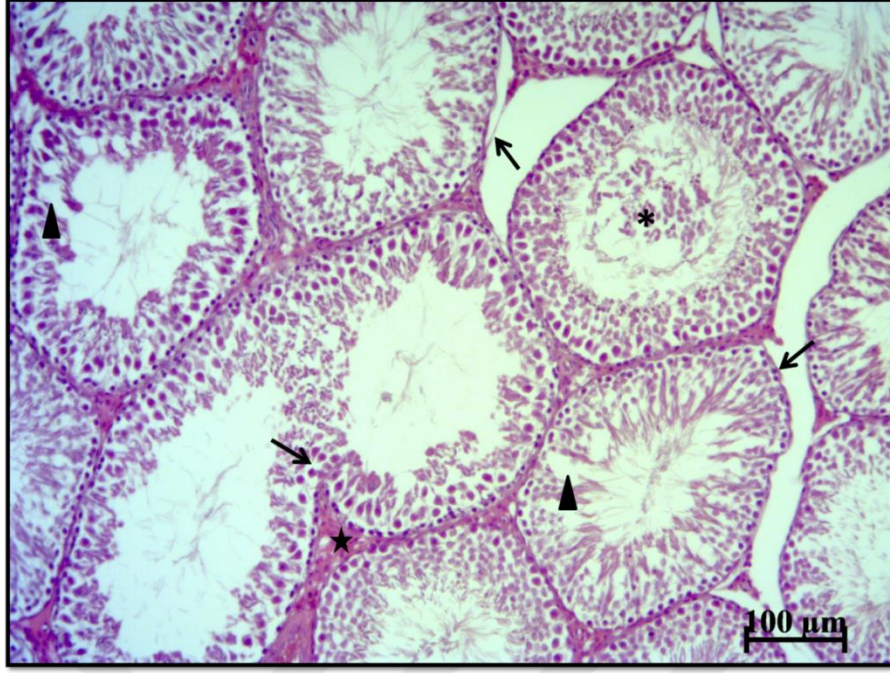
Şekil 16. Curcumin grubuna ait sıçan testisinde, seminifer tübüllerin etrafında düzgün görümlü bir bazal membran (→) ve interstisyel alanlar (★) izlenmektedir. Germinal epiteli oluşturan spermatogenik seri hücreler (↔) oldukça düzgün görümlüdür. H&E, x10



Şekil 17. NP grubuna ait sıçan testisinde, seminifer tübüllerin etrafında bazal membran kayıpları (→) ve ödemli interstisyel alanlar (★) izlenmektedir. Ayrıca hem germinal epitelde hem de interstisyel alanda vakuoller (▲) gözlemlenmektedir. H&E, x10



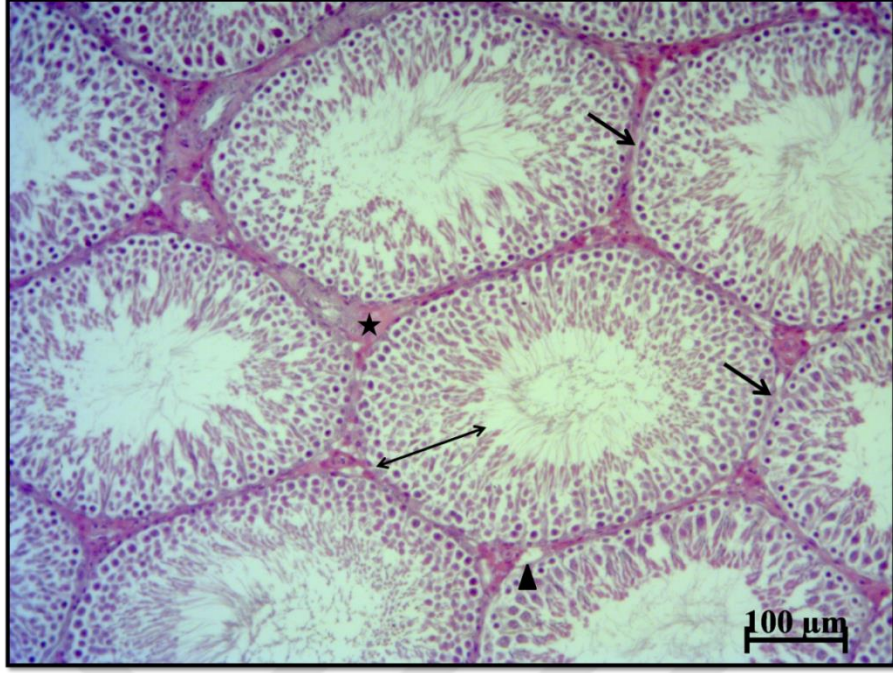
Şekil 18. NP grubuna ait sıçan testisinde, bazal membran kayıplarının (→) yanında seminifer tübüllerin birleşmesi dikkat çekmektedir. Ödemli (★) ve vakuollü (▲) interstisyel alanlar izlenmektedir. H&E, x10



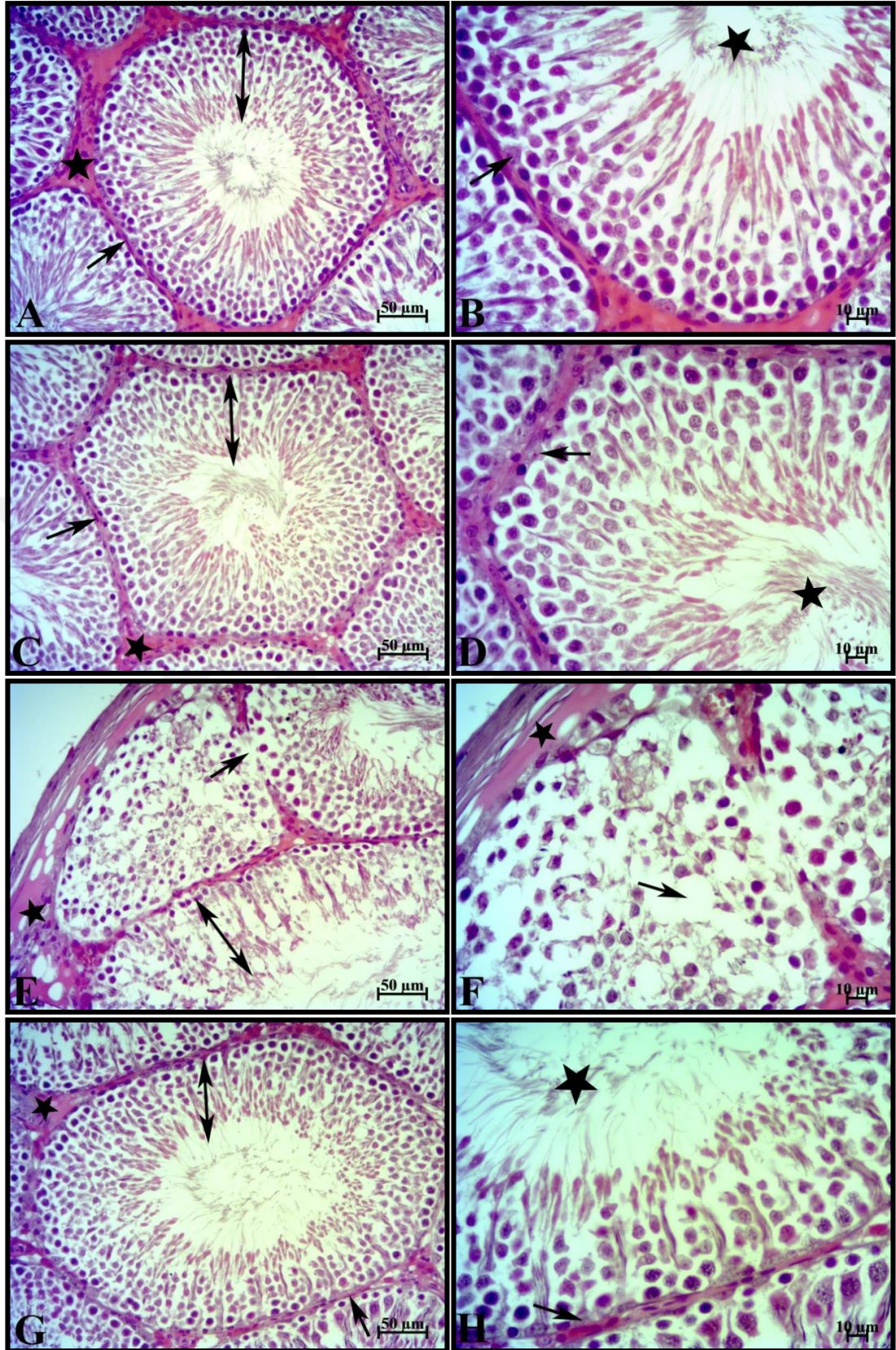
Şekil 19. NP grubuna ait sıçan testisinde, seminifer tübüllerde büzüşmeler ve bazal membranda ondülasyonlar (→) gözlenmektedir. Seminifer tübül lümeninde olgunlaşmamış germ hücreleri (*) dikkat çekmektedir. H&E, x10



Şekil 20. NP grubuna ait sıçan testisinde, bazal membran (→) kayıpları sonucu birleşmiş seminifer tübüller gözlenmektedir. Ayrıca germinal epiteli oluşturan spermatogenez seri hücrelerde düzensizlikler hatta spermatogenez seri hücrelerin olmadığı boş seminifer tübüller izlenmektedir. Seminifer tübül lümeninde olgunlaşmamış germ hücreleri (*) dikkat çekmektedir. H&E, x10



Şekil 21. NP+C grubuna ait sıçan testisinde, dejeneratif değişikliklerin azalmış olduğu, normal kontürlü bazal membran (→) ve düzgün germina epitele (↔) sahip seminifer tübüller gözlenmektedir. Ayrıca hem seminifer tübüllerde hem de interstisyel alanda görülen vakuollerde (▲) azalma izlenmektedir. H&E, x10



Şekil 22. H&E boyalı preparatlarda tüm grupların karşılaştırmaları. A, B: Kontrol, C, D: Curcumin, E, F: Nonilfenol, G, H: Nonilfenol+Curcumin. Sacale bar: (A, C, E, G) 50 µm, (B, D, F, H) 10 µm. A, C, E, G : (↔) Germinal epitel, (→) Bazal membran, (★) İnterstisyel alan, B, D, H: (→) Bazal membran, (★) spermatozoonlar, F: (→) Bazal membran, (★) İnterstisyel alan.

4.4.2. Periyodik Asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyama

Kontrol ve Curcumin Grubu

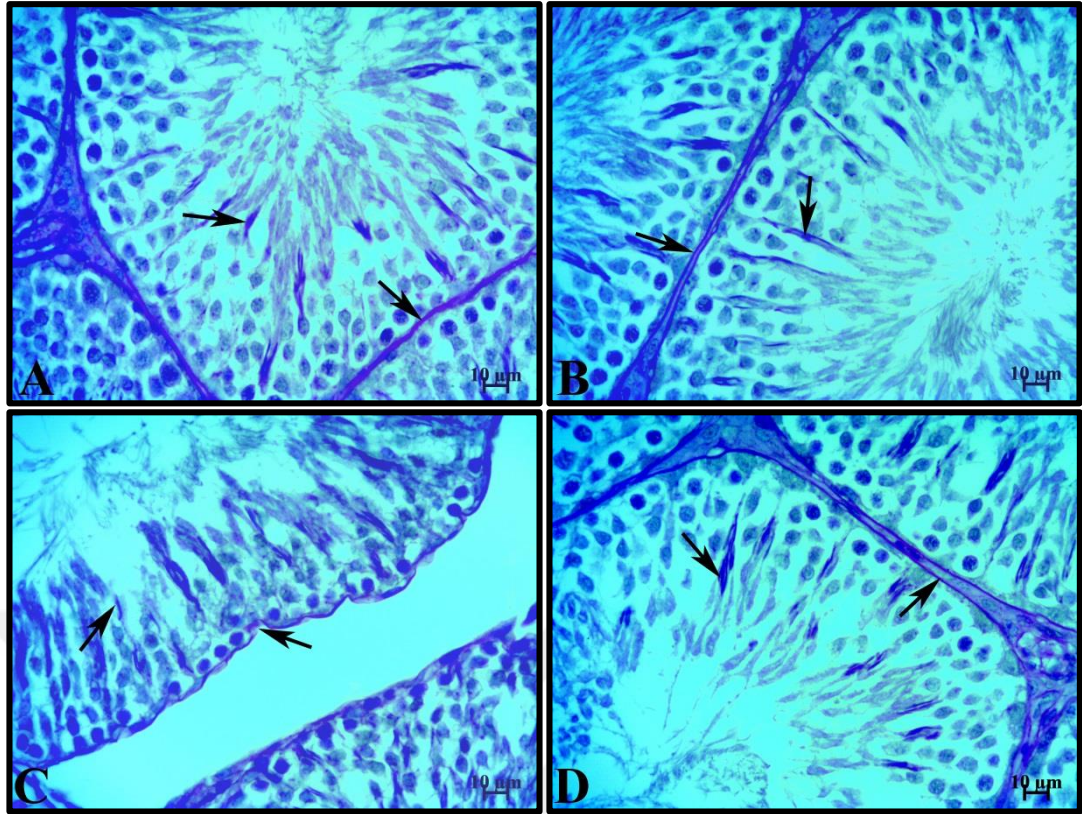
Kontrol ve curcumin grubundaki deneklerin PAS+H boyalı testis dokusu incelendiğinde, PAS pozitif (mor-menekşe renginde) akrozom yapısı ile kep aşamasındaki spermatidler gözlemlendi. Seminifer tübülün bazaline dönük çengel şeklindeki baş kısımları ve kuyrukları lümenine uzanan olgun spermatozoa kolaylıkla ayırt edildi. PAS pozitif boyanan glikoprotein yapıdaki bazal membran ayrımı rahatlıkla yapıldı ve düzenli, normal histolojik yapıda idi (Şekil 23).

NP Grubu

NP uygulanan gruptaki sıçan testis dokuları incelendiğinde, normal yapıda gözlenen bazal laminanın yanı sıra çok sayıda düzensiz sınırlara sahip dejeneratif tübüllerin etrafında ondülasyon gösteren bazal lamina dikkat çekmekte idi. Bazı yan yana konumlanmış tübüllerde bazal lamina kaybı ve kaynaşmış tübüller gözlemlendi. Ayrıca seminifer tübül lümenine yakın yerleşimli erken ve geç spermatidler gözlemlendi (Şekil 23).

NP+C Grubu

NP ve curcumin'in birlikte verildiği grupların PAS+H ile boyanmış testis dokuları incelendiğinde; düzgün bazal lamina ile çevrili normal histolojik yapıya sahip seminifer tübüller çoğunlukta idi. Lümenine yakın PAS pozitif boyanan akrozom yapılı erken ve geç spermatidler gözlemlendi (Şekil 23).



Şekil 23. Testis dokusuna ait PAS-Hematoksilen boyaması. A: Kontrol, B: Curcumin, C: Nonilfenol, D:Nonilfenol+Curcumin. Sacale bar:10 µm. (→) PAS pozitif boyanmış bazal membran ve spermatid hüceleri.

4.5. Johnsen Skoru Değerlendirilmesi

Deney gruplarının testis hasar ve spermatogenez değerlendirmesi tablo 7’de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu, gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0.0007$). NP verilen grupta, kontrol, curcumin ve NP+C gruplarına göre testis hasarının artmasıyla spermatogenezin olumsuz etkilendiği saptandı ($p<0.05$). NP+C uygulanan grupta Johnsen skor değerinin NP grubuna göre yüksek olması, NP’ye bağlı oluşan testis hasarından korunmada, curcumin tedavisinin olumlu sonuç verdiğini göstermiştir.

Tablo 7. Johnsen skoru değerleri.

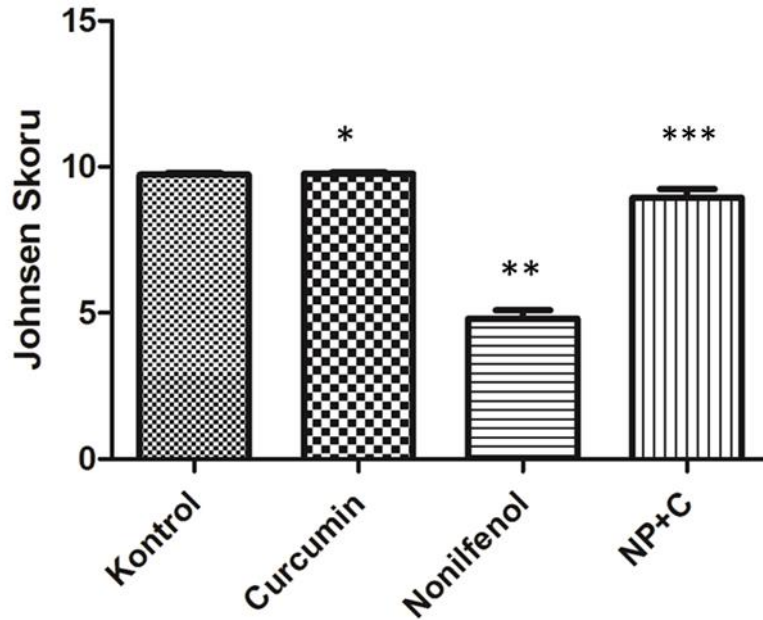
	Kontrol Grubu n=6	Curcumin Grubu n=6	NP Grubu n=6	NP+C Grubu n=6	p
Johnsen Skoru	9.750 (9.600-9.900)	9.800* (9.600-9.900)	4.650** (3.900-5.700)	9.050*** (8.100-9.800)	0.001

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak hesaplanmıştır.

* $p < 0.05$ NP ile kıyaslandığında.

** $p < 0.05$ Kontrol ile kıyaslandığında.

*** $p < 0.05$ NP ile kıyaslandığında.



Şekil 24. Johnsen skorlaması.

4.6. İmmunohistokimyasal Bulgular

Tablo 8. Kaspaz-3, PARP-1, GRP78/BiP immunoreaktivitesi için H-skor değerleri.

	Kontrol Grubu n=6	Curcumin Grubu n=6	NP Grubu n=6	NP+C Grubu n=6	p
Kaspaz-3	120.5 (110.0-128.0)	116.5*** (109.0-123.0)	212.0** (200.0-229.0)	140.0* (130.0-149.0)	0.0001
PARP-1	132.5 (119.0-140.0)	131.0*** (120.0-151.0)	247.5** (231.0-257.0)	163.5* (157.0-173.0)	0.0001
GRP78/BiP	121.5 (110.0-130.0)	128.0*** (123.0-140.0)	243.5** (231.0-259.0)	136.0* (125.0-142.0)	0.001

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak hesaplanmıştır.

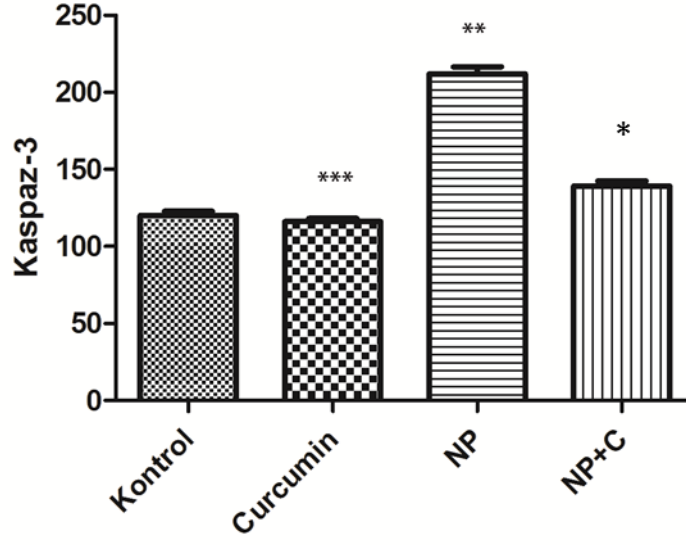
* $p < 0.05$ NP ile kıyaslandığında.

** $p < 0.05$ Kontrol ile kıyaslandığında.

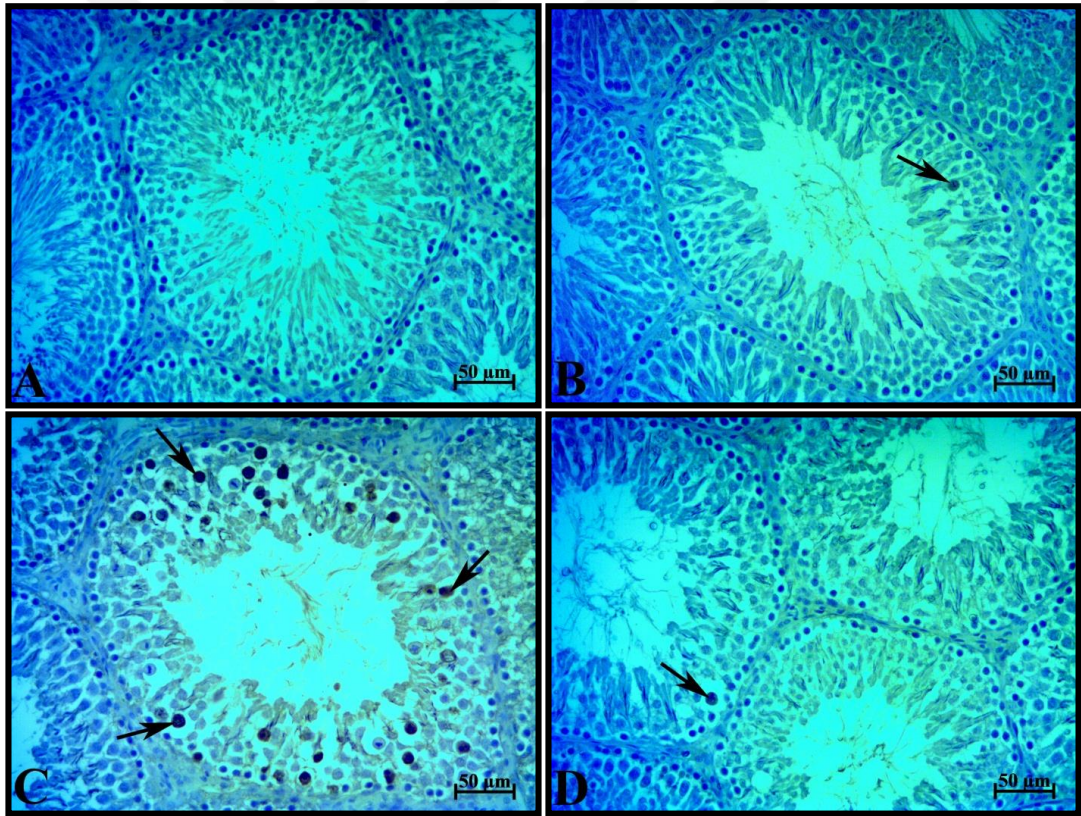
*** $p < 0.05$ NP ile kıyaslandığında.

4.6.1. Kaspaz-3 immunreaktivitesinin değerlendirilmesi

Kaspaz-3 immünoreaktivitesi için tüm deney grupları kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı bir fark saptandı ($p=0.0001$). NP'ye bağlı kaspaz-3 immünreaktivitesinde kontrol, curcumin ve NP+C gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde artış olduğu saptandı ($p < 0.05$). Kontrol ile curcumin, kontrol ile NP+C ve curcumin ile NP+C grupları arasında ise anlamlı bir farklılık görülmediği tespit edildi ($p > 0.05$) (Tablo 8).



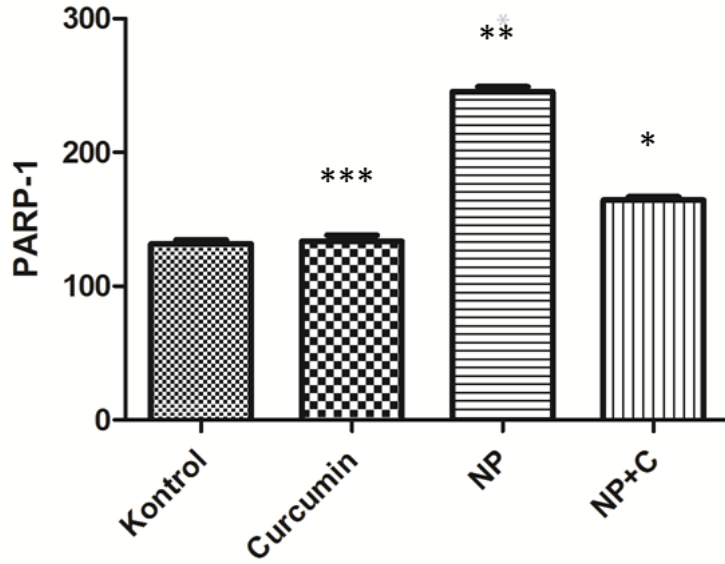
Şekil 25. Kaspaz-3 immünreaktivitesi için H-skor.



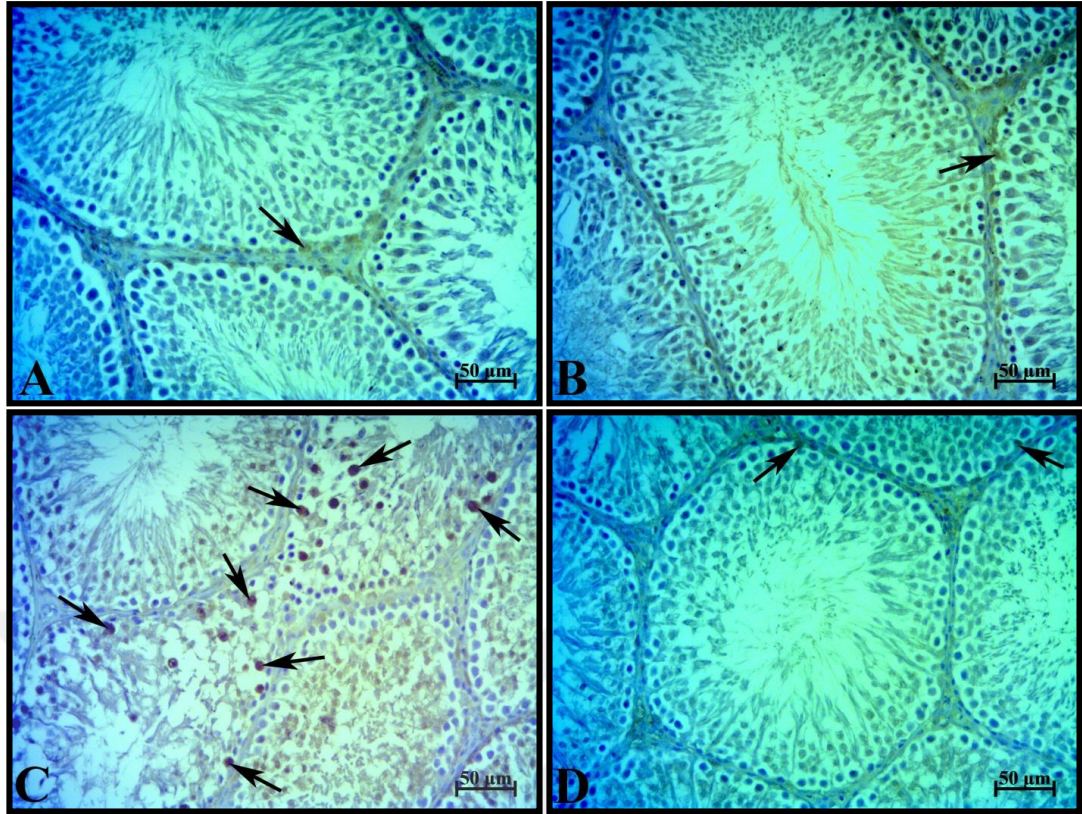
Şekil 26. Testis seminifer tübüllerinde kaspaz-3 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi. A: Kontrol, B: Curcumin, C: Nonilfenol, D: Nonilfenol+Curcumin. Scale bar:50 µm. (→) Kaspaz-3 ile boyanmış spermatogenik hücreler.

4.6.2. PARP-1 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

PARP-1 immünreaktivitesi için tüm deney grupları kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı bir fark saptandı ($p=0.0001$). Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında, kontrol ile curcumin, kontrol ile NP+C, curcumin ile NP+C grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). NP grubu, kontrol, curcumin ve NP+C grupları ile kıyaslandığında, NP toksisitesine bağlı olarak PARP-1 immünreaktivitesinde anlamlı düzeyde artış olduğu gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 8).



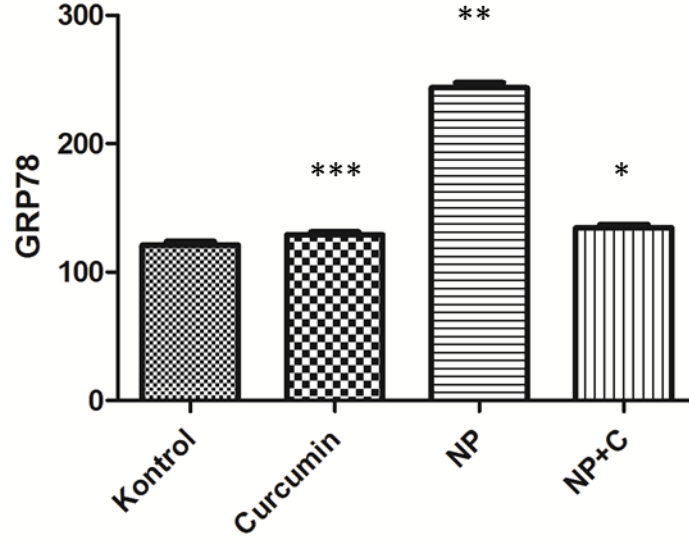
Şekil 27. PARP-1 immünreaktivitesi için H-skor.



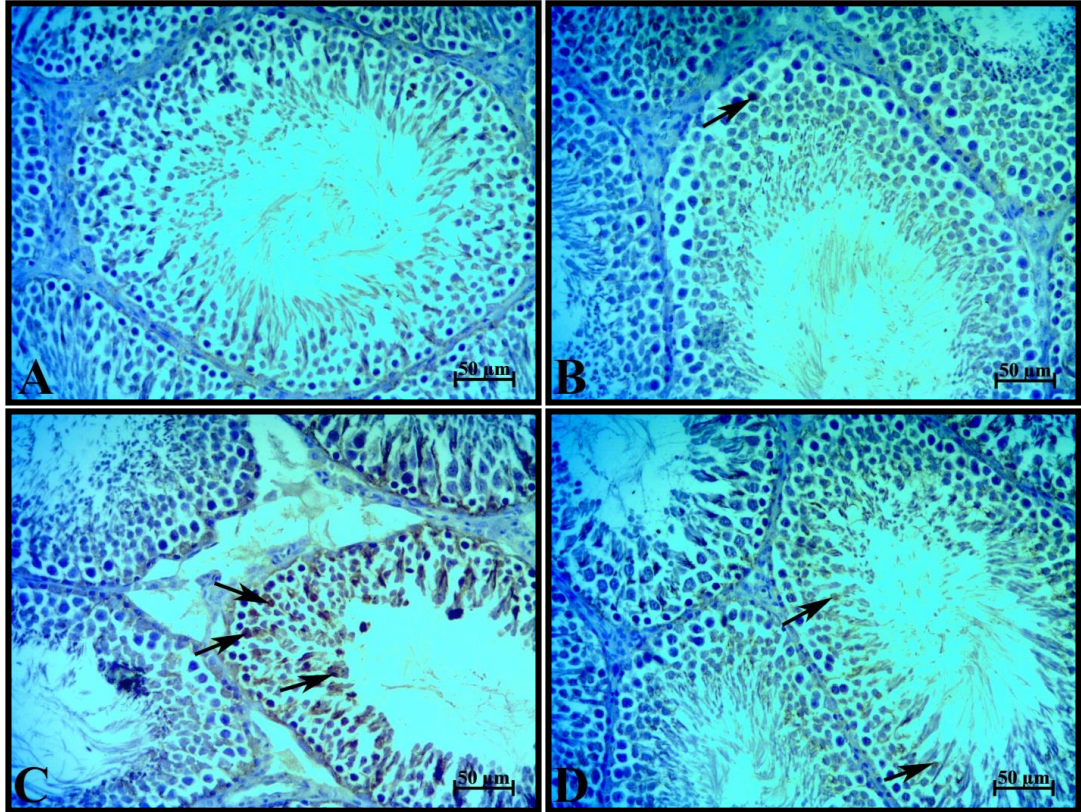
Şekil 28. Testis seminifer tübüllerinde PARP-1 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi. A: Kontrol, B: Curcumin, C: Nonilfenol, D: Nonilfenol+Curcumin. Scale bar:50 µm. (→)PARP-1 ile boyanmış spermatogenik hücreler.

4.6.3. GRP78/BiP İmmunreaktivitesinin Değerlendirilmesi

GRP78/BiP immünoreaktivitesi için tüm deney grupları kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı bir fark saptandı ($p=0.001$). Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında, kontrol ile curcumin, kontrol ile NP+C ve curcumin ile NP+C grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$). NP grubu, kontrol, curcumin ve NP+C gruplarıyla kıyaslandığında GRP78 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olduğu saptandı ($p<0.05$), (Tablo 8).



Şekil 29. GRP78/BiP immünreaktivitesi için H-skor.



Şekil 30. Testis seminifer tübüllerinde GRP78/BiP ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi. A: Kontrol, B: Curcumin, C: Nonilfenol, D: Nonilfenol+Curcumin. Scale bar:50 µm. (→)GRP78/BiP ile boyanmış spermatogjenik hücreler.

4.7. TUNEL Bulguları

NP ve curcuminin spermaogenik seri hücreler üzerindeki apoptotik etkisini değerlendirmek amacı ile yaptığımız TUNEL analizi sonuçları Tablo 9'da verilmiştir. Tüm gruplar birbirleri ile kıyaslandığında anlamlı sonuçlar elde edildi ($p=0.0001$). NP grubundaki apoptotik indeksin kontrol, curcumin ve NP+C gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0.05$).

Tablo 9. Apoptotik indeks değerleri.

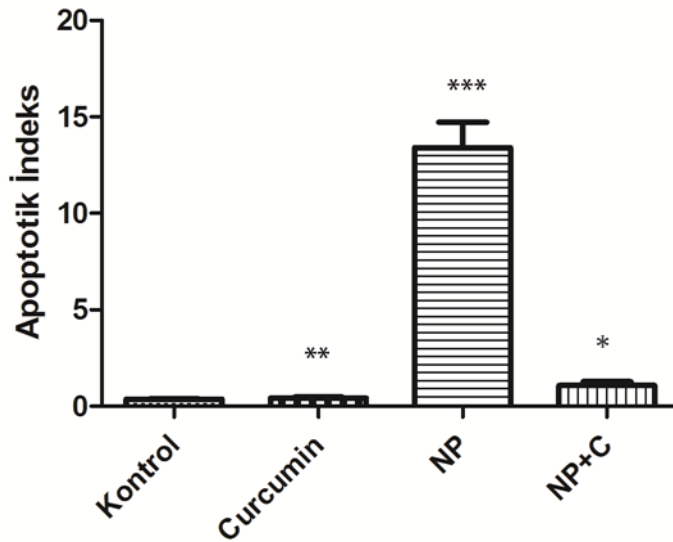
	Kontrol Grubu n=6	Curcumin Grubu n=6	NP Grubu n=6	NP+C Grubu n=6	p
Apoptotik İndeks	0.4000 (0.3000-0.4000)	0.4000** (0.2000-0.6000)	13.50*** (9.000-17.00)	1.000* (0.4000-1.900)	0.0001

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak hesaplanmıştır.

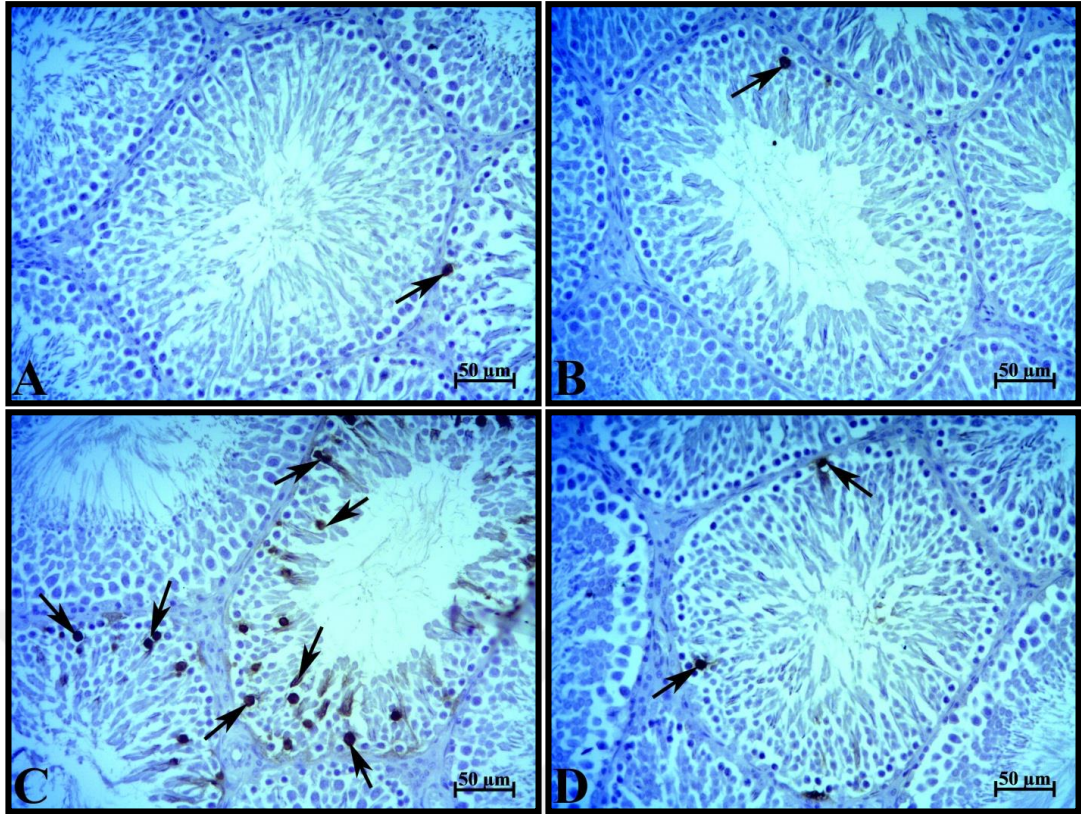
*** $p<0.05$ Kontrol ile kıyaslandığında.

** $p<0.05$ NP ile kıyaslandığında.

* $p<0.05$ NP ile kıyaslandığında.



Şekil 31. Apoptotik indeks değerlendirmesi.



Şekil 32. Testis seminifer tübüllerinde TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin ifadesi. A: Kontrol, B: Curcumin, C: Nonilfenol, D: Nonilfenol+Curcumin. Scale bar: 50 µm.

5. TARTIŞMA

Endüstriyel ürünlerde, kozmetikte, plastik eşyalarda, deterjanlar gibi her gün temasta olduğumuz ürünlerde bulunan NP, endokrin sistemi bozucu etkisi yanında, toksik ve karsinojenik etki gösterir (2). Fenolik yapıya sahip kimyasalların çoğu östrojenik aktiviteye sahiptir ve NP’de bu maddeler arasında yer almaktadır (4). Canlılar absorpsiyon, göz teması, cilt teması, yutma ve soluma ile NP ile karşı karşıya gelmektedir. NP için hedef organlar arasında; gözler, cilt, gastrointestinal sistem, solunum sistemi, karaciğer, beyin, tiroid, pankreas, böbrek, mesane, kadın ve erkek üreme sistemleri bulunur (4). Sağlıklı gönüllülerden alınan insan plazma örneklerinde 0.2-0.3 ng / ml NP gözlemlendiği bildirilmiştir (95, 96). WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından yürütülen Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programının (IPCS) toksikokinetik çalışmalarına göre, NP’in toksikokinetiği ile ilgili çalışmaların çoğu oral maruziyeti ile ilgili olup bu konuda da sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. (97).

Çalışmamızda; endokrin sistemi bozucu etkiye sahip bir çevresel toksik madde olan “nonilfenol” ve güçlü bir antioksidan olan “curcumin” in erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri araştırıldı. *Wistar albino* sıçanlara 35 gün, gün aşırı, 100mg/kg dozda uygulanan NP’nin testis dokusuna verdiği hasarı ve sperm parametrelerine olan etkisini, dolayısıyla fertilitéyle olan ilgisini, ayrıca yine 35 gün, gün aşırı, 100mg/kg dozda uygulanan curcuminin, NP kaynaklı oluşabilecek hasarlara karşı koruyucu etkisi değerlendirildi.

Chitra ve ark.’nın deneysel hayvan modelleri ile yaptıkları çalışmalarda NP’nin hayvan ağırlıkları üzerinde hiç bir etki oluşturmadığı, ancak germ hücre tüketimine bağlı olarak testis ve epididim ağırlıklarında belirgin derecede bir azalma meydana getirdiği gösterilmiştir (98). Duan ve ark. ise ilk vücut ağırlıkları, son vücut ağırlıkları, vücut ağırlığı artışı veya testis ağırlıkları ile gruplar arasında testisin ağırlık katsayısı arasında anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir (5). Çalışmamızda ise tüm grupların hayvan ağırlıklarında, testis ve epididim ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

NP’nin östrojen benzeri etkileri, testis bozukluklarına neden olduğu ile ilişkilendirilmiştir (99). Sperm parametreleri, sperm kalitesi ve fertilizasyon potansiyelini değerlendirmek için iyi bir yöntemdir (100, 101). Lee ve ark. 1999 çevresel bir kirletici olan NP’nin, normal üreme sistemine müdahale ettiği ve seminifer tübüllerin farklılaşması, sperm sayısının azalması ve hareket kabiliyeti gibi

testiküler anormalliklere neden olduğunu göstermiştir (102). Aly ile Ye ve ark. yapmış olduğu çalışmada benzer şekilde azalmış sperm sayısı ve hareketliliği, seminifer tübül dejenerasyonu ve anormal sperm morfolojisi gözlemlenmiştir (45, 46). Chitra ve ark. (2002), erkek sıçanlara 45gün boyunca 1, 10, 100µg/kg, oral yolla nonilfenol verildiğinde, epididimal sperm sayısının doz arttıkça azaldığını ve antioksidan savunmanın aşıldığını ileri sürmüşlerdir (98). De Jager ve ark. sperm sayısındaki azalmanın testis dejenerasyonu ve spermatogenezin eksikliğinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (103).

Biz de çalışmamızda değerlendirmiş olduğumuz sperm parametrelerinde, sperm sayısında, motilitesinde ve vitalitesinde diğer araştırmacıların bulguları ile benzerlik gösterecek şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma, aynı zamanda anormal sperm morfolojisinde anlamlı bir artış olduğunu gözlemledik.

Duan ve ark.; 7 haftalık sıçanlara, 20 gün boyunca 2 günde bir 0, 25, 50 ve 100 mg/kg olmak üzere farklı dozlarda intraperitonel yolla NP uygulamışlardır. Uygulama sonrası NP'nin testis dokusu üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. 0 ve 25 mg/kg doz verilen sıçanlarda testis dokusu normal bir morfoloji ve yapı ortaya koyarken, 50 ve 100 mg/kg dozda NP uygulanan sıçanların testis dokusunda, seminifer tübül dejenerasyonları, büzülmüş bazal membran, düzensiz ve tamamlanmamış spermatogenez gözlemlenmiştir. Ayrıca 100 mg/kg dozda NP uygulanan sıçanlarda bazı seminifer tübüllerde spermatid ve sperm bulunmadığını ortaya koymuşlardır (5). Han ve ark., yapmış oldukları çalışmada NP uygulanmış sıçanlarda, testis dokusunda vakuollerin önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir (104).

Çalışmamızda NP uygulanan testis dokularını incelediğimizde, seminifer tübül epitelinde incelmeye ve vakoulizasyon, spermatogenik hücre serisinde kayıplar ve düzensizlikler, hatta boş tübüller gözlemlendi. Ayrıca lümende immatür germinal epitel hücreleri saptandı. (Şekil 18, 19, 20). Bazal membranda ise düzensizlik, seminifer tübül epitelinden ayrılma ve bazı tübüllerde yok olduğu gözlemlendi. İnterstisyel alanda ödem ve vakuoller gözlemlendi.

Apoptoz programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen fizyolojik bir olaydır. Hücre apoptoz için sinyal aldıktan sonra birçok biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler gözlenir. Hücrede olan değişiklikleri gözlemlemek amacıyla birçok yöntem geliştirilmiştir. TUNEL yöntemi, DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar (8). Kaspaz kaskadları ise oksidatif stres aracılı apoptoz ile ilgilidir (105). Noorimotlagh ve ark. çalışmalarında, NP ile tedavi edilen gruplarda apoptotik

indeksinin arttığı gözlemlenmiştir (4). NP tarafından indüklenen apoptozda, kaspaz-3 aktivasyonu ve mitokondriyal depolarizasyonun rol aldığı bildirilmiştir (5). Urriola-Muñoz ve ark. yaptıkları deneysel çalışmada, testis dokusunda apoptozu belirlemek için TUNEL ve immunohistokimyasal olarak da aktif kaspaz-3 boyaması yapmışlardır. Sonuç olarak, NP (50mg/kg)'nin germ hücre apoptozunu indüklediğini bildirmişlerdir (106).

Biz de yapmış olduğumuz çalışmada TUNEL boyamasını ve kaspaz-3 immunoreaktivitesini değerlendirdik. NP uygulanan grupta diğer gruplara oranla apoptotik hücre sayısında ($p=0.0003$) ve kaspaz-3 ($p=0.0002$) immunoreaktivitesinde anlamlı bir artış olduğunu gözlemledik.

Oksidatif stresin artışı, DNA, protein veya lipit hasarına neden olmaktadır. Hücrede oluşan bu hasarlar DNA tamir mekanizmasını ve apoptozu indükler. (107, 108). Sakkas ve ark. , düşük döllenme oranlarının sperm hücrelerinde meydana gelen DNA hasarıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (109). Karadeniz ve ark. (2010) NP'nin elektrokimyasal tespiti ve NP ile DNA arasındaki etkileşimin izlenmesini tek kullanımlık grafitte algılayıcı teknolojileri ve DPV (Diferansiyel puls voltametri) tekniğini kullanarak gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak NP'ye bağlı DNA hasarının, NP'ye bağlı DNA oksidasyonu ile özellikle de guanin oksidasyonu ile gerçekleştiğini belirtmişlerdir (110).

PARP-1, özellikle DNA hasarında ortaya çıkan ve DNA tamirinde görev alan bir proteindir. Yüksek miktardaki DNA hasarlarında, hasardan dolayı PARP-1 aktivasyonu tetiklenerek PARP-1 in hücredeki substratı olan NAD'ın hücrede tükenmesine neden olur. Hücre tekrar NAD sentezlemek için ATP kullanmakta ve enerji tüketiminin etkisiyle hücre ölümü meydana gelmektedir (8).

Biz de çalışmamızda, DNA hasarını tespit etmek amacıyla testis dokusunda, DNA tamir enzimi olan PARP-1'in immunoreaktivitesini değerlendirdik. NP grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, NP grubundaki PARP-1 ekspresyonunda anlamlı artış olduğunu saptadık ($p= 0.0002$) (Şekil 27).

ER, hücrenin apoptoza gitmesinde rol oynayan önemli bir organeldir (111). Proteinlerin katlanması ve birleştirilmesi, lipid biyosentezi ve hücrel Ca^{+2} depolanması için önemli olan ER, homeostazdaki değişikliklere karşı hassastır. Ca^{+2} homeostazındaki değişiklikler ve ER'de katlanmamış proteinlerin birikimi de dahil olmak üzere çeşitli uyarılar ER stresine neden olmaktadır ve uzun süreli ER stresi apoptozise yol açmaktadır (112).

Protein katlanmasından sorumlu GRP78/BiP; ER'de Ca^{+2} miktarının azalması ve glikozillenmemiş proteinlerin birikimi gibi stres durumlarında hücre yaşamının devamlılığında oldukça önemli bir rol oynamaktadır. GRP78/BiP, ER stres sinyalizasyonunu yönlendirmede de çok önemlidir. Strese girmemiş hücrelerde GRP78/BiP; IRE1, PERK ve ATF6 gibi çeşitli ER stres sensörlerinin lüminal alanlarına bağlanır. Açılmış proteinler ER lümeninde biriktikçe GRP78/BiP, protein katlanmasına yardımcı olmak için bu ER stres sensörlerinden ayrılır. Sonuç olarak, salınan IRE1 ve PERK aktivasyona girer ve ER-stres sinyal yolunun açılmasına neden olur ve bu da hedef gen GRP78/BiP'in ekspresyonunu artırır (6, 27, 66, 113, 114).

Gong ve ark. hücre kültüründe yaptıkları çalışmada; NP tedavisinin Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinde değişikliklere neden olduğunu, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışın Ca^{+2} bağımlı şaperonların aktivasyonunu engelleyip protein katlanmasını bozarak ER stresine neden olduğunu ve ER stresine bağlı apoptozu indüklediğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca, 20-30 μ M NP tedavisi ile GRP78/BiP ekspresyonunun ciddi şekilde arttığını ve ER-stres sinyal yolağının aktivasyonunu ortaya koyduğunu bildirmişlerdir (6).

ER stres belirteci olan GRP78/BiP'in ekspresyonunu belirlemek amacı ile biz de çalışmamızda tüm grupların testis dokusunda GRP78/BiP immunoreaktivitesini değerlendirdik. Boyanma derecesine göre yaptığımız histolojik skorlamada, NP grubunun GRP78/BiP ekspresyonunda diğer gruplara göre anlamlı bir artış olduğunu gözlemledik ($p= 0.0006$) (Şekil 29).

Curcumin, *Curcuma longa*'dan elde edilen, kısa ve kalın kökleri olan Zingiberaceae familyasının bir üyesidir. Curcuminin antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antikanserojen ve antifungal etkileri bulunmaktadır (9, 10). Bu özellikleriyle curcumin uzun yıllardır araştırmacıların ilgi odağı olmuş ve tedavi amaçlı kullanımı artmıştır (10, 11, 12, 84, 88).

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, curcuminin antiapoptotik etkilere sahip olduğunu ve sıçan timositlerinde toksik deksametazon ile indüklenen apoptoz ve meme kanseri hücrelerinde kemoterapinin indüklediği apoptozu karşı etkili olduğunu göstermiştir (115, 116). Curcumin, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, sitokrom c'nin mitokondriyal salınması ve reaktif oksijen türlerinde azalma dahil olmak üzere ultraviyole ışın maruziyeti kaynaklı apoptotik değişiklikleri önler. Bazı çalışmalar curcuminin testis hasarlarına karşı olumlu etkilerini ortaya koymaktadır (117, 118).

Mohamadpour ve ark. ; curcuminin kronik değişken stres oluşturulan sıçanların testis dokusu ve testosteron, FSH, LH hormonları üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmalarında kronik değişken stres oluşturulan yetişkin erkek Sprague-Dawley sıçanlara, 15 gün boyunca 100 mg / kg dozda curcumin vermişlerdir. Sonuç olarak kontrole kıyasla kronik değişken stres uygulanan deneklerin hormon seviyelerinde anlamlı bir düşüş gözlenirken, curcumin ile tedavi edilen grupta hormon seviyelerinin kontrole yakın olduğunu bildirilmişlerdir. Ayrıca curcuminin kronik değişken stresle oluşan seminifer tübül hasarını önemli ölçüde azalttığını da bildirmişlerdir (119).

Salama ve ark.'nın sperm parametreleri üzerine yaptıkları çalışmada; curcuminin sperm sayısını ve motilitesini artırdığını, sperm anomalilerini ise azalttığını belirtmişlerdir. (120).

Akpolat ve ark. ; radyasyona bağlı oluşan ince bağırsaktaki hasara karşı curcuminin koruyucu etkisini araştırmışlar ve ileumda radyasyon ile oluşan hasarın curcumin ile kısmen nlendiğini bildirmişlerdir (121).

Sharma ve ark. 2010 yılında yapmış oldukları çalışmalarında; sıçanlara 14 ve 28 gün boyunca 30 mg/kg oksidatif stres oluşturan bir pestisit olan lindane ve 100 mg/kg curcumin uygulanmıştır. Lindane uygulanan gruplarda testis ve epididim ağırlıklarında düşüşler gözlenirken curcumin tedavili gruplarda bu düşüşün daha az olduğu tespit edilmiştir. Yine lindane uygulanan gruplarda sperm başı, sperm motilitesi ve sperm kuyruklarında morfolojik değişiklikler gözlenmiş, curcumin tedavili gruplarda ise bu değişikliklerin minimal düzeyde olduğu bildirilmiştir (122).

Çalışmamızda; curcuminin NP'ye bağlı testis dokusunda meydana gelen morfolojik hasarı, apoptotik indeksi ve ER stres belirteci olarak kullandığımız GRP78/BiP immünreaktivitesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür. Ayrıca curcuminin, DNA hasarı ile ilişkili olarak sentezlenen PARP-1 ve apoptotik bir belirteç olan kaspaz-3 ekspresyonunu da anlamlı düzeyde düşürdüğü saptanmıştır.

Curcuminin; NP'ye bağlı sperm kalitesi, sayısı, motilitesi ve vitalitesinde ortaya çıkan bozuklukları da önleyerek, fertilizasyon kazancını artırıcı yönde katkı sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇLAR

Bu tez çalışması; testis dokusunda NP toksisitesine karşı curcuminin etkisinin araştırıldığı ilk deneysel araştırma olması nedeni ile büyük bir önem arz etmektedir.

Tüm verilerimizi değerlendirdiğimizde; NP'nin testis dokusunda hasar oluşturarak, seminifer tübüllerde spermatogenezi bozarak, sperm kalitesini, sayısını, motilitesini etkileyerek, fonksiyonel değişikliklere neden olarak, fertilizasyonu etkileyebilecek, kimyasal bir ajan olduğu ortaya konmuştur.

Çalışmamızda; curcuminin NP'ye bağlı testis dokusunda meydana gelen morfolojik hasarı, apoptotik indeksi ve ER stres belirteci olarak kullandığımız GRP78/BiP immünreaktivitesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür. Ayrıca curcuminin, DNA hasarı ile ilişkili olarak sentezlenen PARP-1 ve apoptotik bir belirteç olan kaspaz-3 ekspresyonunu da anlamlı düzeyde düşürdüğü saptanmıştır.

Curcuminin; NP'ye bağlı sperm kalitesi, sayısı, motilitesi ve vitalitesinde ortaya çıkan bozuklukları da önleyerek, fertilizasyon kazancını artırıcı yönde katkı sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. U.S. environmental protection agency (USEPA). Welcome to the global endocrine disruptor research inventory. <http://www.epa.gov>. Washington, D.C. 2001.
2. Karafakıoğlu YS, Fidan A.F, Cigerci İ.H, Dündar Y, Aslan R. Nonilfenol'ün sıçan böbrek ve testis dokusunda indüklediği oksidatif stres üzerine taurinin koruyucu etkisi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi 7(1): 459-467, 2007.
3. Jie Y, Xuefeng Y, Mengxue Y, Xuesong Y, Jing Y, Yin T. Jie X. Mechanism of nonylphenol-induced neurotoxicity in F1 rats during sexual maturity. Wien Klin Wochenschr 128(11-12):426-34, 2016.
4. Noorimotlagh Z, Haghghi NJ, Ahmadimoghadam M, Rahim F. An updated systematic review on the possible effect of nonylphenol on male fertility. Environ Sci Pollut Res Int 24(4):3298-3314, 2016.
5. Duan P, Hu C, Butler HJ, Quan C, Chen W, Huang W, Tang S, Zhou W, Yuan M, Shi Y, Martin FL, Yang K. 4-Nonylphenol induces disruption of spermatogenesis associated with oxidative stress-related apoptosis by targeting p53-Bcl-2/Bax-Fas/FasL signaling. Environ Toxicol 32(3):739-753, 2017.
6. Gong Y, Wu J, Huang Y, Shen S, Han X. Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. Toxicol Lett 186(2):84-95, 2009.
7. Lepretti M, Paoletta G, Giordano D, Marabotti A, Gay F, Capaldo A, Esposito C, Caputo I. 4-Nonylphenol reduces cell viability and induces apoptosis and ER-stress in a human epithelial intestinal cell line. Toxicol In Vitro 29(7):1436-44, 2015.
8. Wang XG, Wang Z, Tong WM, Shen Y. PARP-1 Val762Ala Polymorphism reduces enzymatic activity. Biochemical and Biophysical Research Communications 351(1):122-126, 2007.
9. Akpolat M, Tarladaçalışır YT, Uz YH, Metin MS, Kızılay G. Kanser tedavisinde curcuminin yeri. Yeni Tıp Dergisi 27: 142-147, 2010.
10. Akpolat M, Kanter M, Uzal MC. Protective effects of curcumin against gamma radiation-induced ileal mucosal damage. Arch Toxicol 83(6):609-17, 2008.

11. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 595: 103-125, 2007.
12. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos* 27(4):486-94,1999.
13. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences* 78(18):2081-7, 2006.
14. Ross HM, Pawlina JL. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. (Çev.Ed: Baykal B) 6. Basım, s.784-785, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
15. Tapul L. *Genel ve Özel Embriyoloji Ders Kitabı*. s.75-77, İstanbul Tıp Kitabevleri, 2018
16. Ronald W. Dudek. *BRS: Embriyoloji*. (Çev.Ed: İrez T, Erkan M) s.180-182, İstanbul Tıp Kitabevi, 2016.
17. Sadler TW. *Langman's Medical Embriyology*. Eleventh Edition, s.246-263, 2005.
18. Moore KL, Persaud TVN. *Klinik Yönler ile İnsan Embriyolojisi*. (Çev.Ed: Dalçık H, Yıldırım M) s.262-282, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2008.
19. Eroschenko PV. *diFiore'nin Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle*. (Çev.Ed: Demir R) 12. Basım, s. 477, Palme Yayıncılık, 2013.
20. Ross HM, Pawlina JL. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. (Çev.Ed: Baykal B) 6. Basım, s.790-791, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
21. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*. 2. Basım, s. 336, İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2016.
22. Ross HM, Pawlina JL. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. (Çev.Ed: Baykal B) 6. Basım, s.788, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
23. Eroschenko PV. *diFiore'nin Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle*. (Çev.Ed: Demir R) 12. Basım, s. 479, Palme Yayıncılık, 2013.
24. Ovalle KW, Nahirney CP. *Netter Temel Histoloji*. (Çev.Ed: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P) s. 385-24, Güneş Tıp Kitabevleri, 2009.
25. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*. 2. Basım, s.344, İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2016.
26. Ross HM, Pawlina JL. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. (Çev.Ed: Baykal B) 6. Basım, s.789, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
27. Feldmana GJ, Mullinb JM, Ryan MP. Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev* 57:883-917, 2005.

28. Ross HM, Pawlina JL. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. (Çev.Ed: Baykal B) 6. Basım, s.792-796, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
29. Shetty G, Weng CC, Bolden-Tiller OU, Huhtaniemi I, Handelsman DJ, Meistrich ML. Effects of medroxyprogesterone and estradiol on the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. *Endocrinology* 145(10):4461-9, 2004.
30. Junqueira L.C. Carneiro J. Temel Histoloji. (Çev.Ed: Solakoğlu S, Erdoğan A, Mutlu HS) s.378-387, Nobel Tıp Kitapevi. 2009.
31. Kuşçu N, Özenci Ç. Spermatogonyal kök hücreler. s.33-36. Erkek Üreme Sağlığı. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
32. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2. Basım, s. 337-344, İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2016.
33. Ovalle KW, Nahirney CP. Netter Temel Histoloji. (Çev.Ed: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P) s.380-384, Güneş Tıp Kitabevleri, 2009.
34. Industrial Reproductive Toxicology Discussion Group (IRDG). Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) Group. Rat Sperm Morphological Assessment Guideline Document. Edition 1 October 2000.
35. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2. Basım, s. 346, İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2016.
36. Ross HM, Pawlina JL. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. (Çev.Ed: Baykal B) 6. Basım, s.789-790, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
37. Yeşilkaya E. Endokrin bozucular. *Güncel Pediatri Dergisi*. 6: 76-82, 2008.
38. Nimnod AC, Benson WH. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Crit Rev Toxicol* 26(3):335-64, 1996.
39. Ackermann GE, Schwaiger J, Negele RD, Fent K. Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Toxicol* 60(3-4):203-21, 2002.
40. Mao Z, Zheng XF, Zhang YQ, Tao XX, Li Y, Wang W. Occurrence and biodegradation of nonylphenol in the environment. *Int. J. Mol. Sci*. 13: 491-505, 2012.
41. Maruyama K, Yuan M, Otsuki A. Seasonal changes in ethylen oxide chain length of poly(oxyethylene)alkylphenol ether nonionic surfactants in three main rivers in Tokyo. *Environ. Sci. Technol* 34: 343-348, 2000.

42. Ahel M, Giger W, Koch M. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. 1. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res* 28:1131-1142, 1994.
43. Hao C, Croley TR, March RE, Koenig BG, Metcalfe CD. Mass spectrometric study of persistent acid metabolites of nonylphenol ethoxylate surfactants. *J Mass Spectrom* 35(7):818-30, 2000.
44. Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34(7):1033-49, 2008.
45. Aly HA, Domènech O, Banjar ZM. Effect of nonylphenol on male reproduction: analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1;261(2):134-41, 2012.
46. Ye XF, Yao YF, Wang LZ. [Study on reproductive toxicity in male embryo rats with the pregnancy SD rates exposed by nonylphenol]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 30(11):856-8, 2012.
47. Warhurst AM. An environmental assessment of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols. *Ph D Friends Earth* 1-15, 1995.
48. Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. P-nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect* 92: 167-173, 1991.
49. Hughes PJ, McLellan H, Lowes DA, Kahn SZ, Bilmen JG, Tovey SC, Godfrey RE, Michell RH, Kirk CJ, Michelangeli F. Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum Ca² pumps. *Biochem Biophys Res Commun* 277(3):568-74, 2000.
50. Ergün SS, Üstüner B, Alçay S, Sağırkaya H, Uğuz C. The effects of nonylphenol on gamete physiology in bovine. *Journal of Applied Biological Sciences* 2146-0108 8 (2), 32-38, 2014.
51. Ross HM, Pawlina JL. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. (Çev.Ed: Baykal B) 6. Basım, s.94-95, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
52. Güleş Ö, Eren Ü. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 19 (2) , 73-78, 2008.
53. Xu YR, Dong HS, Yang WX. Regulators in the apoptotic pathway during spermatogenesis: Killers or guards? *Gene*. 15;582(2):97-111, 2016.

54. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. (Çev.Ed: Demir R) s.90-91, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.
55. Del Puerto HL, Martins AS, Moro L, Milsted A, Alves F, Braz GF, Vasconcelos AC. Caspase-3/-8/-9, Bax and Bcl-2 expression in the cerebellum, lymph nodes and leukocytes of dogs naturally infected with canine distemper virus. *Genet Mol Res* 26;9(1):151-61, 2010.
56. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7(9):880-5, 2006.
57. Düzgün A, Alaçam H, Okuyucu A. Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *Deneyel ve Klinik Tıp Dergisi* 10.5835, 2011.
58. Hussain SG, Ramaiah KVA. Endoplasmic reticulum: stress, signalling and apoptosis. *Current Sci* 93:1684-96, 2007.
59. Seydel S, Aksoy K. Endoplazmik retikulum stresi ve apoptozis mekanizması. *Archives Medical Review Journal* s. 221-235, 2012.
60. Buck TM, Wright CM, Brodsky JL. The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 18(6):751-61, 2007.
61. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14(8):996-1007, 2009.
62. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14(1):20-8, 2004.
63. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110(10):1389-98, 2002.
64. Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* 15;67(8):3496-9, 2007.
65. Conn KJ, Gao WW, Ullman MD, McKeon-O'Malley C, Eisenhauer PB, Fine RE, Wells JM. Specific up-regulation of GADD153/CHOP in 1-methyl-4-phenyl-pyridinium-treated SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res* 68(6):755-60, 2002.
66. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:519-529.
67. Sasaya H, Yasuzumi K, Maruoka H, Fujita A, Kato Y, Waki T, Shimoke K, Ikeuchi T. Apoptosis-inducing activity of endocrine-disrupting chemicals in cultured PC12 cells. Article ID: 18970, 2012.

68. Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 26(8):504-10, 2001.
69. Schroder M, Kaufman RJ. Divergent roles of IRE1alpha and PERK in the unfolded protein response. *Curr Mol Med* 6(1):5-36, 2006.
70. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiological reviews* 86(4): 1133-49, 2006.
71. Naidoo N. ER and aging-protein folding and the ER stress response. *Ageing research reviews* 8(3): 150-59, 2009.
72. Sarvani C, Sireesh D, Ramkumar KM. Unraveling the role of ER stress inhibitors in the context of metabolic diseases. *Pharmacological research* 119: 412-421, 2017.
73. Liu CY, Schroder M, Kaufman RJ. Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275(32):24881-5, 2000.
74. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6(11):1028-42, 1999.
75. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 281(5381):1312-6, 1998.
76. Bao F, Liu D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptosis cell death and activates caspase-3. *Neuroscience* 116(1):59-70, 2003.
77. Kim PK, Mahidhara R, Seol DW. The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* 4(5):293-6, 2001.
78. Celik-Ozenci C, Tasatargil A, Tekcan M, Sati L, Gungor E, Isbir M, Demir R. Effects of abamectin exposure on male fertility in rats: Potential role of oxidative stress-mediated poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation. *Regul Toxicol Pharmacol* 61(3):310-7, 2011.
79. Burkle A. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺. *Febs J* 272(18),4576-89, 2005.
80. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays* 26(8):882-93, 2004.
81. Virag L, Szabo C. The Therapeutic Potential of Poly(ADPRibose) Polymerase Inhibitors. *Pharmacol Rev* 54,375–429, 2002.

82. Srivastava RM, Singh S, Dubey SK, Misra K, Khar A. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *International Immunopharmacology* 11(3),331-341, 2011.
83. Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci.* 30(2):85-94, 2009.
84. Jaruga E, Salvioli S, Dobrucki J, Chrul S, Bandorowicz-Pikula J, Sikora E, Franceschi C, Cossarizza A, Bartosz G. Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rats thymocytes. *FEBS Letters* 433(3):287-93, 1998.
85. Gautam SC, Xu YX, Pindolia KR, Janakiraman N, Chapman RA. Nonselective inhibition of proliferation of transformed and nontransformed cells by the anticancer agent curcumin (diferuloylmethane). *Biochemical Pharmacology* 55(8):1333-7, 1998.
86. Chan WH, Wu HY, Chang WH. Dosage effects of curcumin on cell death types in a human osteoblast cell line. *Food Che. Toxicol* 44(8):1362-71, 2006.
87. Sahebkar A. Molecular mechanism for curcumin benefits against ischemic injury. *American Society for Reproductive Medicine* 94(5), 2010.
88. Aggarwal B, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 595:1-75, 2007.
89. Pandya U, Saini MK, Jin GF, Awasthi S, Godley BF, Awasthi YC. Dietary curcumin prevents ocular toxicity of naphthalene in rats. *Toxicol Lett* 115(3):195-204, 2000.
90. Piper JT, Singhal SS, Salameh MS, Torman RT, Awasthi YC, Awasthi S. Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol* 30(4):445-56, 1998.
91. Atli O, Baysal M, Aydogan-Kilic G, Kilic V, Ucarcan S, Karaduman B, Ilgin S. Sertraline-induced reproductive toxicity in male rats: evaluation of possible underlying mechanisms. *Asian Journal of Andrology*, 19(6), 672, 2017.



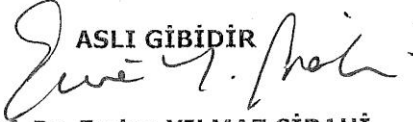
92. Adamkovicova M, Toman R, Martiniakova M, Omelka R, Babosova R, Krajcovicova V, Grosskopf B, Massanyi P. Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. *Reproductive Biology and Endocrinology* 14(1):42, 2016.
93. Mohamed HM, Mohamed MA. Effect of different doses of nandrolone decanoate on lipid peroxidation, DNA fragmentation, sperm abnormality and histopathology of testes of male Wister rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 67(1):1-11, 2015.
94. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1(1):2-25, 1970.
95. Kawaguchi M, Inoue K, Sakui N, Ito R, Izumi S, Makino T, Okanouchi N, Nakazawa H. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 799(1):119–25, 2004.
96. Coldham NG, Sivapathasundaram S, Dave M, Ashfield LA, Pottinger TG, Goodall C, Sauer MJ. Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Drug Metab Dispos* 26(4):347–54, 1998.
97. Meek ME, Boobis A, Cote I, Dellarco V, Fotakis G, Munn S, Seed J, Vickers C. New developments in the evolution and application of the WHO/IPCS framework on mode of action/species concordance analysis. *Journal of Applied Toxicology* 34(1):1-18, 2014.
98. Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. *Arch Toxicol* 76:545–551, 2002.
99. Yuan HX, Xu X, Sima YH, Xu SQ. Reproductive toxicity effects of 4-nonylphenol with known endocrine disrupting effects and induction of vitellogenin gene expression in silkworm, *Bombyx mori*. *Chemosphere* 93(2):263-8, 2013.

100. Giribabu N, Kumar KE, Rekha SS, Muniandy S, Salleh N. Chlorophytum borivilianum (Safed Musli) root extract prevents impairment in characteristics and elevation of oxidative stress in sperm of streptozotocin-induced adult male diabetic Wistar rats. *BMC Complement Altern Med* 14:291, 2014.
101. Perobelli JE, Alves TR, Toledo FC, Fernandez CD, Anselmo- Franci JA, Klinefelter GR, Kempinas Wde G. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. *Reprod Toxicol* 33(3):308-15, 2012.
102. Lee PC, Arnolt P, Nickels KC. Testicular abnormalities in male rats after lactational exposure to nonylphenols. *Endocrine* 11(1):61-8, 1999.
103. de Jager C, Bornman MS, van der Horst G. The effect of p-nonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. *Andrologia* 31(2):99-106, 1999.
104. Han XD, Tu ZG, Gong Y, Shen SN, Wang XY, Kang LN, Hou YY, Chen JX. The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reproductive Toxicology* 19(2):215-21, 2004.
105. Anselmi K, Stolz DB, Nalesnik M, Watkins SC, Kamath R, Gandhi CR. Gliotoxin causes apoptosis and necrosis of rat Kupffer cells in vitro and in vivo in the absence of oxidative stress: Exacerbation by caspase and serine protease inhibition. *J Hepatol* 47(1):103-13, 2007.
106. Urriola-Muñoz P, Lagos-Cabré R, Moreno RD. A mechanism of male germ cell apoptosis induced by bisphenol-A and nonylphenol involving ADAM17 and p38 MAPK activation. *PLoS One* 9(12):e113793, 2014.
107. Aydoğan M, Korkmaz A, Barlas N, Kolankaya D. Pro-oxidant effect of vitamin C coadministration with bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol on the reproductive tract of male rats. *Drug Chem Toxicol* 33(2):193–203, 2010.
108. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 38:96-109, 2010.
109. Sakkas D, Uner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, Campana A. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 4:11-9, 1998.
110. Karadeniz H, Caliskan A, Uguz C. Electrochemical monitoring of the interaction between 4-Nonylphenol and DNA by graphite and carbon nanotube modified graphite electrodes. *Analytical Sciences* 26(10):1065-9, 2010.

111. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differentiation* 11(4):372-80, 2004.
112. Kadowaki H, Nishitoh H, Ichijo H. Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 28(1-2):93-100, 2004.
113. Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxid Redox Sign* 11(9):2307-16, 2009.
114. Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G, Lee AS. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): Functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukar Gene* 4(1):1-18, 1994.
115. Zhang Y, Cao H, Yu Z, Peng HY, Zhang CJ. Curcumin inhibits endometriosis endometrial cells by reducing estradiol production. *Iran J Reprod Med* 11(5):415-22, 2013.
116. Singh S. From exotic spice to modern drug? *Cell* 130(5):765-8, 2007.
117. Naz RK. The Effect of Curcumin on Intracellular pH (pHi), Membrane Hyperpolarization and Sperm Motility. *J Reprod Infertil* 15(2):62-70, 2014.
118. Noorafshan A, Abdollahifar MA, Asadi-Golshan R, Rashidian-Rashidabadi A, Karbalay-Doust S. Curcumin and sertraline prevent the reduction of the number of neurons and glial cells and the volume of rats' medial prefrontal cortex induced by stress. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 74(1):44-53, 2014.
119. Mohamadpour M, Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Talaei-Khozani T, Aliabadi E. Protective effects of curcumin co-treatment in rats with establishing chronic variable stress on testis and reproductive hormones. *Int J Reprod Biomed (Yazd)* 15(7):447-452, 2017.
120. Salama AF, El-Bahr SM. Effect of Curcumin on Cadmium-Induced Oxidative Testicular Damage in Rats. *Journal of Medical Research Institute* Vol 28, No.2: pp.167-73, 2007.
121. Akpolat M, Topcu-Tarladacalisir Y, Kanter M. İyonizan radyasyonun neden olduğu ince bağırsak hasarına karşı curcumin ve C vitamininin koruyucu etkilerinin incelenmesi. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 6 (2):77-85, 2008.
122. Sharma P, Singh R. Protective role of curcumin on lindane induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 84(4):378–384, 2010.

8. EKLER

Ek 1: Türkçe Etik Kurul Onayı

	<p style="text-align: center;">T.C. BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu</p>	
<p>TOPLANTI TARİHİ : 08.02.2018 TOPLANTI NO : 2018/02</p>		
<p>4- Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2018-06-08/02 Protokol no'lu "4-Nonilfenol Maruziyetinin <i>Wistar Albino</i> Sıçanlarda Spermatogenez Üzerine Yapısal ve Fonksiyonel Etkileri : Curcumin'in Koruyucu Rolü" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,</p> <p>Oy birliği ile karar verildi.</p>		
<p> ASLI GİBİDİR Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHİ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkan Vekili</p>		
<p>-----</p> <p>B.E.Ü. HADYEK , 67600 Kozlu/ZONGULDAK, Tel:0 372 261 3135-3136-3260 Fax: 0 372 261 02 65</p>		

Ek 2: İngilizce Etik Kurul Onayı



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



Date of Meeting : February 8, 2018
Meeting No : 2018/02

- 4- Research Application Registered by 2018-06-08/02 and titled "Structural and Functional Effects of Exposure to 4-Nonylphenol on Spermatogenesis in *Wistar Albino* Rats: The Protective Role of Curcumin" has been approved by the Animal Experiments Local Ethical Committee

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

9. ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Zonguldak' ta doğdum. 2005 yılında Yeşiltepe İlköğretim Okulu'ndan, 2009 yılında Hasan Ali Yücel Lisesi'nden mezun olarak ilk ve orta öğrenimimi tamamladım. 2016 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldum. 2017 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. Halen aynı anabilim dalında çalışmalarımı sürdürmekteyim.

