

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

**SUPRAFİZYOLOJİK DOZDA KULLANILAN NANDROLON  
DECANOATE'İN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARINA KARŞI  
CURCUMİN'İN ETKİSİ**

**NURTEN GÜLERYÜZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

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

**ZONGULDAK**

**2019**

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

**SUPRAFİZYOLOJİK DOZDA KULLANILAN NANDROLON  
DECANOATE'İN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARINA KARŞI  
CURCUMİN'İN ETKİSİ**

**NURTEN GÜLERYÜZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

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

Bu Tez Çalışması Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2017-83155101-02)

**ZONGULDAK**

**2019**

**KABUL VE ONAY:**

“SUPRAFİZYOLOJİK DOZDA KULLANILAN NANDROLON DECANOATE’IN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARINA KARŞI CURCUMİN’İN ETKİSİ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.  
15.03.2019

**Başkan: Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ**

**Üye: Doç. Dr. Kanat GÜLLE**

**Üye: Dr. Öğr. Üyesi Habib KHOSHVAGHTİ**

**ONAY:**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

**TARİH:**

**Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK**  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

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

Çalışmanın gerçekleşmesinde maddi destek sağlayan Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve çalışanlarına çok teşekkür ederim. Yüksek lisansa başlamamda vesile olan değerli hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Emre TAŞKIN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bana her zaman yardımcı olan sevgili arkadaşım Çiğdem ÖZARSLAN'a ve sevgili arkadaşlarım Büşra ÇETİNKAYA, Nurten TAŞCI, Eren ERMİŞ, Serkan KARAÇETİN ve Refiye YAĞIZ'a teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de beni maddi ve manevi destekleriyle güçlü kılan kıymetli annem, babam ve kardeşime sonsuz şükranlarımı sunarım.

Nurten GÜLERYÜZ  
Mart 2019, ZONGULDAK

## ÖZET

**Nurten GÜLERYÜZ. Suprafizyolojik Dozda Kullanılan Nandrolon Decanoate' ın Oluşturduğu Testis Hasarına Karşı Curcumin'in Etkisi. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2019.**

Testosteronun sentetik türevi olan anabolik androjenik steroidler (AAS) sporcular tarafından, kas gücünü ve kütlesini arttırmak, vücut görünümünü biçimlendirmek gibi tıbbi amaçlar dışında kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan türevi Nandrolon Decanoate (ND)'dir. ND kullanımı, testiküler atrofi ve bozulmuş spermatogenezise yol açmaktadır. Spermanın kalitesi ve niceliğinin azalması ile infertiliteye neden olabileceği gösterilmiştir. AAS'lerin sebep olduğu fertilizasyon bozukluğu gibi çeşitli olumsuz klinik sonuçlar DNA hasarıyla ilişkilendirilmektedir. Nandrolon Decanoate inflamatuvar sitokinler, apoptotik markerlar ve DNA hasarının artırılması yoluyla sıçanlarda testis hasarını indüklemektedir. Curcuminin antioksidan, antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu pek çok çalışmada bildirilmiştir. Biz de ND'nin oluşturduğu testiküler hasara karşı curcuminin koruyucu etkisinin olabileceği hipotezini öne sürmekteyiz.

Çalışmamızda 40 adet *Wistar albino* sıçan, 4 gruba ayrıldı. 8 hafta boyunca Kontrol grubuna haftada bir defa fıstık yağı/benzil alkol karışımı ve her gün dimetilsülfoksit, ND grubuna 10 mg/kg/hafta dozda ND ve her gün DMSO, Curcumin grubuna haftada bir defa fıstık yağı/benzil alkol karışımı ve her gün 100 mg/kg dozda Curcumin, ND+Curcumin grubuna 10 mg/kg/hafta dozda ND ve her gün Curcumin verildi. Deney sonunda sakrifiye edilen tüm deneklerden alınan semen örneğinde sperm parametreleri (sperm konsantrasyonu, motilite, viabilite ve morfoloji) test edildi. Alınan testis örneklerinde ise histopatolojik bulguları belirlemek için Hematoksilen-Eozin (H-E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) ile boyamaları yapıldı. ND'nin testislerde, PARP-1, Kaspaz-3, Nf-κB ve TNF-α ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler immunohistokimyasal analiz ile incelendi. Tüm değerlendirmeler ışığında ND kullanımının testiste DNA hasarı ve apoptozu artırdığı, spermanın kalitesini azaltarak infertiliteye, doku hasarına ve inflamasyona sebep olduğu, curcuminin ise bu hasarı önlemede olumlu yönde etkili olduğu tespit edildi.

**Anahtar kelimeler:** Nandrolon Decanoate, Curcumin, PARP-1, Kaspaz-3, TNF-α, Nf-κB

## ABSTRACT

**Nurten GULERYUZ. The effects of Curcumin Against Testicular injury Constituted From Nandrolone Decanoate Being Used at a Supraphysiological Dosage. Enstitute of Health Science, Department of Histology and Embryology, Master of Science Thesis, Zonguldak, 2019.**

Anabolic androgenic steroids (AAS) are synthetic analogs of testosterone. Anabolic androgenic steroids are used by athletes for improving athletic ability, physical appearance and muscle mass for such as like aims which abused. The most commonly used AAS derivative is Nandrolone Decanoate (ND). ND use can causes testicular atrophy and impaired spermatogenesis. ND can cause infertility by reducing the quality and quantity of sperm. Several adverse negative clinical results, such as infertility caused by ND, have been associated with DNA damage. Through the release of inflammatory cytokines and the inducing apoptosis which lead to structural defect in DNA, ND has been seen to induce testicular damage. Curcumin has antioxidant and anti-inflammatory properties has been reported in many studies. This study was conducted to investigate the affects of curcumin in testicular damage caused by ND.

40 *Wistar albino* rats were divided into 4 groups: Control group received single weekly injections of peanut oil/benzyl alcohol mixture (90:10 v/v) and daily dimethyl sulfoxide (DMSO) oral gavage, ND group received 10 mg/kg/weekly ND and daily DMSO, Curcumin group received curcumin 100 mg/kg/day and single weekly peanut oil/benzyl alcohol mixture, ND+C group received 10 mg/kg/weekly ND and daily curcumin 100 mg/kg/day for 8 weeks. At the end of the study, all rats were sacrificed. The testes and epididymis were rapidly removed and weighed in addition all rats body weight were mainly detected for the duration of the study. We tested semen parameters. Histopathological examinations were performed on sections of testes after stained by Hematoxylin-Eosin and Periodic Acid Schiff (PAS). Cosentino score was tested in H-E stained preparations. The changes at the expression levels of PARP-1, Caspase-3, Nf- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  markers as inflammatory markers on analyzed immunohistochemically.

The result of our study showed usage of ND increases DNA damage and apoptosis in the testis, decreases the quality of sperm and causes infertility, tissue damage and inflammation. Curcumin has a positive effect on preventing this damage.

**Key Words:** Nandrolone Decanoate, Curcumin, PARP-1, Caspaz-3, TNF- $\alpha$ , Nf- $\kappa$ B

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL VE ONAY:.....	i
ÖNSÖZ .....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
TABLO DİZİNİ .....	x
ŞEKİL DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Testisin Gelişimi.....	3
2.2. Testisin Yapısı .....	4
2.2.1.Seminifer tübüller .....	5
2.2.2. İnterstisyum .....	13
2.3. Anabolik Androjenik Steroidler .....	13
2.3.1. Testosteron.....	14
2.3.2. Nandrolon Decanoate .....	17
2.4. Apoptozis.....	19
2.4.1. Apoptozis mekanizması.....	20
2.5. Kaspaz-3 .....	22
2.6. Tümör Nekroz Faktörü-Alfa (TNF- $\alpha$ ).....	23
2.7. Nükleer faktör-kappaB (NF- $\kappa$ B) Ailesi.....	25
2.8. PARP-1.....	27
2.9. Curcumin .....	28
2.9.1. Curcuminin kimyasal ve fiziksel özellikleri .....	29
2.9.2. Curcuminin moleküler etki basamakları.....	30
2.9.3. Curcuminin antioksidan ve anti-inflamatuar etki mekanizması .....	31
2.9.4. Antiapoptotik etki mekanizması ve tümör hücrelerinde apoptozis mekanizması .....	32
2.9.5. Curcuminin DNA hasarına karşı etkisi .....	33
2.9.6. Curcuminin sperm ve testosterona etkisi .....	33
2.9.7. Radikal süpürücü etkisi.....	34

3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	35
3.1. Deney Hayvanları.....	35
3.2. Kimyasallar .....	35
3.3. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü .....	36
3.4. Dokuların Alınması .....	36
3.5. Testis Ağırlıklarının Ölçümü.....	36
3.6. Sperm Değerlendirmesi .....	36
3.7. Histokimyasal İncelemeler .....	38
3.7.1. Dokuların hazırlanması.....	38
3.7.2. Boyaların hazırlanması .....	39
3.7.3. Kesitlerin alınması ve boyanması .....	40
3.7.4. Histolojik değerlendirme .....	41
3.7.5. Histopatolojik değerlendirme .....	42
3.8. İmmünohistokimyasal İncelemeler .....	42
3.9. İstatistiksel Analiz .....	44
4. BULGULAR.....	46
4.1. Vücut Ağırlığı.....	46
4.1.1. Deney öncesi vücut ağırlığı .....	46
4.1.2. Deney sonu vücut ağırlığı .....	47
4.1.4. Deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarının farkı .....	48
4.2. Testis ve Epididim Ağırlıkları .....	49
4.3. Sperm Değerlendirmesi .....	50
4.4. Histolojik Bulgular .....	54
4.4.1. Hematoksilen & Eozin (H-E) boyama.....	54
4.4.2. Periyodik Asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyama.....	57
4.5. Histopatolojik Değerlendirme .....	60
4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular .....	67
4.6.1. Tüm gruplarda Kaspaz-3 immünreaktivitesinin karşılaştırılması.....	68
4.6.2. Tüm gruplarda PARP-1 immünreaktivitesinin karşılaştırılması .....	70
4.6.3. Tüm gruplarda TNF- $\alpha$ immünreaktivitesinin karşılaştırılması.....	72
4.6.4. Tüm gruplarda NF- $\kappa$ B immünreaktivitesinin karşılaştırılması.....	74
4.6.5. Tüm gruplarda Negatif Kontrol boyama görüntüleri.....	76
4.6.6. Histolojik skor.....	77



5. TARTIŞMA .....	78
6. SONUÇLAR .....	84
7. KAYNAKLAR .....	86
8. EKLER.....	106
Ek 1: Türkçe Etik Kurul Onayı .....	106
Ek 2: İngilizce Etik Kurul Onayı.....	107
9. ÖZGEÇMİŞ .....	108



## SİMGELER VE KISALTMALAR

AAS	: Anabolik Androjenik Steroidler
ABP	: Androjen bağlayıcı protein
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
BM	: Bazal Membran
CAD	: Kaspaz aktive edici Dnaz
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DEHP	: di(2-ethylhexyl)phthalate
DHT	: Dihidrotestosteron
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FSH	: Folikül stimule edici hormon
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı faktör
GST	: Glutasyon-transferaz
HCl	: Hidrojen Klorür
H-E	: Hematoksilen- Eozin
HNSCC	: Head and Neck squamous cell carcinoma
HS	: Heat shock
JNK	: c-jun-N-terminal kinaz
kDA	: Kilodalton
LH	: Luteinleştirici Hormon
LHRH	: Lüteinize edici hormonu salıverici hormon
MCP	: Monosit kemoatraktan proteinin
NAD <sup>+</sup>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
ND	: Nandrolon Decaonate
Nf-κB	: Nükleer faktör kappa-B
NK	: Natural Killer
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
PARP-1	: Poli (ADP-riboz) polimeraz-1
PAS	: Periyodik asid Schiff
SRY	: Sex-determining region

STH : Spermatid hücresi  
TNF- $\alpha$  : Tumor Nekroz Faktörü-alfa  
TRADD : TNF reseptör assosiye ölüm domain



## TABLO DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1.</b> Doku takibi basamakları ve uygulama süresi.....	39
<b>Tablo 2.</b> Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama basamakları ve uygulama süreleri. ....	40
<b>Tablo 3.</b> PAS+Hematoksilen boyama basamakları ve uygulama süreleri. ....	41
<b>Tablo 4.</b> İmmünohistokimyasal boyama basamakları ve uygulama süresi. ....	44
<b>Tablo 5.</b> Gruplara göre deney öncesi vücut ağırlıkları .....	46
<b>Tablo 6.</b> Gruplara göre deney sonu vücut ağırlıkları.....	47
<b>Tablo 7.</b> Deney öncesi ve sonrası denek ağırlıklarının ortalama farkları.....	48
<b>Tablo 8.</b> Testis ve Epididim ağırlıkları .....	50
<b>Tablo 9.</b> Sperm değerlendirme sonuçları.....	52
<b>Tablo 10.</b> Kaspaz-3, PARP-1, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B immünoaktiviteler için histolojik skor değerleri. ....	77

## ŞEKİL DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 1. Testisin anatomik yapısı .....	7
Şekil 2. İnsanda bulunan olgun bir spermatazoon hücresi.....	10
Şekil 3. Sıçan sperm hücresi .....	11
Şekil 4. Erkek üreme fonksiyonuna ait hormonal düzeni gösteren şematik diyagram	12
Şekil 5. Testosteron sentezi .....	15
Şekil 6. Testosteron, Nandrolon Dekanoat ve nandrolon'un kimyasal yapısı .....	18
Şekil 7. Curcuminin kimyasal yapıları .....	29
Şekil 8. Curcuminin hücre sinyal yolları .....	30
Şekil 9. Canlılık testi eosin-nigrosin boyaması.....	38
Şekil 10. Deney öncesi deneklerin vücut ağırlıklarının karşılaştırılması. ....	46
Şekil 11. Deney sonunda deneklerin vücut ağırlıklarının karşılaştırılması. ....	47
Şekil 12. Deney başlangıcı ve deney sonrası denek vücut ağırlıklarının karşılaştırılması .....	49
Şekil 13. ND uygulanmış sıçanlarda görülen farklı sperm anomali tipleri.....	53
Şekil 14. Testis dokusuna ait Hematoksilen-Eozin boyama.....	56
Şekil 15. Testis dokusuna ait Periyodik Asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyaması.....	59
Şekil 16. Gruplara göre spermatozoa ve spermatid kaybı değerlendirmesi.....	61
Şekil 17. Germ hücre tabakası yokluğu değerlendirmesi .....	61
Şekil 18. Germ hücre tabakası dejenerasyonu değerlendirmesi .....	62
Şekil 19. Germ hücre tabakası düzensizliği değerlendirmesi .....	63
Şekil 20. Semifer tübül parçalanmasının değerlendirilmesi .....	63
Şekil 21. Miyoid hücre tabakası kalınlaşmasının değerlendirilmesi .....	65
Şekil 22. Leydig hücre proliferasyonu değerlendirilmesi.....	65
Şekil 23. İnterstisyel alanda ödem oluşumu değerlendirilmesi.....	66
Şekil 24. İnterstisyel alanda hemoraji oluşumunun değerlendirilmesi .....	67
Şekil 25. Testis dokusunda kaspaz-3 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi .....	69
Şekil 26. Testis dokusunda PARP-1 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi .....	71
Şekil 27. Testis dokusunda TNF- $\alpha$ ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi .....	73

<b>Şekil 28.</b> Testis dokusunda NF-κB ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi .....	75
<b>Şekil 29.</b> Tüm deney gruplarına ait negatif kontrol boyama görüntüleri.....	76



## 1. GİRİŞ

Testosteron, androjenik aktivite gösteren steroid yapılı bir molekül olarak, 1935 yılında izole edilip, karakterize olduktan sonra kimyasal olarak testosteronun birçok özelliklerine sahip olan sentetik türevleri sentezlenerek genel olarak “Anabolik Androjenik Steroidler” (AAS) olarak isimlendirilmiştir (1).

Uzun yıllardır sporcular, performanslarını arttırmak için bitkileri, doğal ya da sentetik ilaçları kullanmışlardır. Günümüzde AAS’ler kadın ve erkek profesyonel olmayan sporcular, vücut geliştiriciler, atletler tarafından kas gücünü ve kütlesini arttırmak, atletik performansı yükseltmek ve vücut görünümünü biçimlendirmek gibi tıbbi amaçları dışında, kötüye kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan AAS türevi Nandrolon Decanoate (ND)’dir (2, 3).

Vücuttaki hemen hemen tüm büyük dokular androjen reseptörlerine sahiptir, bu nedenle AAS istismarı neredeyse tüm vücut sistemlerini etkilemektedir (4). AAS’ler hipotalamik-hipofizer aksda gonadotropin salınmasını negatif feedback mekanizması yolu ile inhibe ederek bazı sublinik değişiklikleri indükleyebilmektedir. Bu değişiklikler luteinize edici hormon (LH) ve folikül stimule edici hormon (FSH)’ın yanı sıra testosteronun kan düzeylerinde düşmesine yol açmaktadırlar (5,6,7).

ND kullanımı, testiküler atrofi ve bozulmuş spermatogenezise ve steroidogeneze yol açmaktadır (8). Spermanın kalitesi ve niceliğinin azalmasına yol açarak infertiliteye neden olabileceği gösterilmiştir. ND’nin uzun süreli ve kontrolsüz kullanımı testiküler hacim ve seminifer tübül uzunluğunun azaltılması, germ ve Sertoli hücrelerinin parçalanması da dahil olmak üzere testiste çeşitli histopatolojik ve morfolojik anormalliklere neden olmaktadır (9,10). Bunların sebep olduğu fertilizasyon bozukluğu gibi çeşitli olumsuz klinik sonuçlar DNA hasarıyla ilişkilendirilmektedir (11).

Sonuç olarak Nandrolon Decanoate sperm parametrelerini olumsuz yönde etkilemektedir ve oksidatif stres, inflamatuvar sitokinler, matriks metalloproteinazlar, hücre adhezyon molekülleri, apoptotik belirteçler ve DNA hasarının artırılması yoluyla sıçanlarda testis hasarını indüklemektedir (12).

Curcumin, zerdeçal (*Curcuma Long*, Turmerik, Hint safranı) Çin ve Hindistan’da yaygın olarak yetiştirilen zencefil ailesinden sarı çiçekli, büyük yapraklı ve yumrulu çok yıllık bir bitkidir. Curcumin, bu bitkiden elde edilen sarı

renkli bir pigmenttir. Curcumin, vitamin E ve C kadar güçlü antioksidan özelliğe sahiptir. Curcuminin antioksidan, antibakteriyel ve antiinflamatuvar özelliğinin yanısıra, immunosupresif, antianjiyojenik, antiviral, antifungal, proapoptotik, kemoterapötik, kemopreventif, antidiyabetik, yara iyileşmesi gibi farmakolojik aktivitelerinin de olduğu bildirilmiştir. Halen pek çok bilimsel çalışmada tedavi edici bir ajan olarak kullanılmaktadır (13-16).

İnflamasyonu, hücre proliferasyonunu, bazı onkogenleri, tümör implantasyonunu ve karsinojenlerin biyotransformasyonunu, transkripsiyon faktörü Nf- $\kappa$ B ve COX2 enzimini baskıladığı, buna karşılık; glutatyon-transferaz (GST) enzimini aktive ettiği çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur (17). Curcumin anti-apoptotik protein Bcl-2'yi inhibe eder ve pro-apoptotik protein Bad'ın ekspresyonunu aşağı yönde düzenleyerek mitokondriyal transmembran potansiyelini artırır ve sitokrom c salınımına ve kaspaz kaskad aktivasyonuna karşı korumaktadır. Buna ek olarak curcumin, TNF- $\alpha$  aracılı apoptozun baskılanmasını sağlayarak, DNA hasarına karşı koruma sağlayabilmektedir (12).

Çalışmamızda Nandrolon Decanoate kullanımının testislerde meydana getirdiği hasarı ve bu hasarın infertilite ile ilişkisini ve günümüzde pek çok bilimsel çalışmada tedavi edici ajan olarak kullanılan curcuminin ND kullanımından kaynaklı testiküler hasardaki etkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda, erkek *Wistar albino* sıçanlara 8 hafta boyunca Nandrolon Decanoate ve curcumin verildi. Deney sonunda, denekler sakrifiye edildi. Sakrifikasyonun hemen ardından deneklerden semen örneği ve testis dokuları alındı. Curcuminin, ND'nin sebep olduğu testiküler hasarı ve olası infertiliteye etkisini, semen örneğinde sperm parametreleri (sperm konsantrasyonu, motilite, viabilite ve morfoloji) test edilerek, testis dokularında ise histolojik ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak incelemeler yapıldı. Bulgular literatür verileri ile karşılaştırılarak ortaya konulmaya çalışıldı.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Testisin Gelişimi

Embriyonun cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlenmiş olsa da, fenotipik cinsiyet gelişimin 7. haftasına kadar belirgin değildir. Gonadlar (testis, ovaryum) başlangıçta, sölom epitelinin proliferasyonu ve altında bulunan mezenşimin yoğunlaşması ile gonadal kabartı olarak ifade edilen bir çift longitudinal kabartı şeklinde oluşur (18).

Epiblasttan köken alan primordial germ hücreleri primitif çizgiye doğru göç ederler. Primordial germ hücreleri (primitif gonositler) 3. haftanın sonuna gelmiş bir embriyoda yolk kesesi duvarında, allantoise yakın, endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. 4. haftada primordiyal germ hücreleri ameboid hareketler ile son barsağın dorsal mezenteri boyunca ilerleyerek 5. haftanın başlarında primitif gonadlara ulaşır, 6. haftada genital kabarıklığa yayılır. Bu hücreler genital kabarıklığa ulaşamadıkları takdirde gonadlar gelişemez. Primordiyal germ hücreleri, gonadların testis veya ovaryuma farklılaşmalarında indüktif etkiye sahiptir. 6. hafta sırasında primordial germ hücreleri primitif gonadlara ulaştıklarında genital yarıktaki epitel hücreleri proliferasyon olarak mezoblasta gömülür ve burada primitif seks kordonlarını oluştururlar. Bu kordonlar, yüzey epiteline bağlıdır. Bu evrede gonad, farklılaşmamış gonad olarak bilinir ve ayırım yapılamaz. Eğer embriyo genetik olarak erkek ise primordial germ hücreleri XY cinsiyet kromozomlarına sahiptir. Y kromozomunda bulunan testis belirleyici faktör kodlayan SRY geni etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları medüller kordon veya testis oluşturmak üzere, çoğalmaya devam ederek medullanın derinlerine doğru ilerlemektedir. Daha sonra bu kordonlar, rete testis tübüllerini oluşturacak olan ince hücre sıralarından oluşmuş bir ağ şeklinde bezin hilusuna doğru dağılırlar. Testis kordonları ile yüzey epiteli ilişkisi gelişimin ilerleyen safhalarında, yoğun fibröz bir bağ doku olan tunika albugineanın araya girmesiyle sona erer (18-20).

Dördüncü ayda, atnalı şeklini almış olan testis kordonlarının açık uçları rete testis ile devam etmektedir. Bu halde testis kordonları, bezin yüzey epitelinde gelişen Sertoli destek hücreleri ve primitif germ hücrelerinden oluşmaktadır.

Genital kabarıklığın mezenşiminden kökenlenen Leydig hücreleri testis kordonlarının arasında bulunur. Testis kordonlarının farklanmaya başlamasının hemen ardından gelişmeye başlarlar. Gelişimin 8. haftasında Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlarlar. Puberteye kadar şeklini korumuş olan testis kordonlarının pubertede lümenleri açılarak seminifer tübül halini alırlar. Seminifer tübüller kanalize olduktan sonra rete testis tübüleriyle birleşir ve sonra duktuli eferenteslere girerler. Bu eferent duktuslar mezonefrik sistemin geride kalmış boşaltım tübüllerini oluşturular. Bu kanallar, rete testis ile mezonefrik (Wolff) kanallarını birbirine bağlar (18-20).

Testisler, gelişimin 12. Haftasın da inguinal bölgeye ulaşır, inguinal kanaldan 28. haftada geçmekte ve skrotuma 33. haftada ulaşmaktadırlar. Mezonefroz gerilerken, gubernaculum denilen bir ligament, gonadın inferior kutbundan, karnın iki tarafına doğru iner. Bu inguinal bölge, internal ve eksternal oblik kaslar arasında sonlanmaktadır. Testis inguinal kanala inerken, gubernaculum'un ekstraabdominal kısmı skrotal şişkinliğe doğru büyür ve tabanına temas eder. Testisler inguinal kanaldan geçerek, doğumda skrotal bölgeye inmiş olurlar. Skrotumdaki testis, vajinal proses ile sarılır. Testisi saran bu peritoneal tabakaya tunica vaginalisin viseral tabakası, peritoneal kesenin diğer kısımlarına ise tunica vaginalisin parietal tabakası denir.

Testisler, periton ve vajinal prosesin dışından geçerler, skrotuma girdiklerinde, spermatik kord etrafında inguinal kanal kasılır. Zamanında doğmuş olan sağlıklı yeni doğanlarda her iki testis de skrotum içerisindedir. Doğumdan sonra ilk üç ay içerisinde, inmemiş olan testislerin çoğu skrotuma inerler, bu iniş fetal testis tarafından üretilmekte olan androjenler tarafından kontrol edilir. Ayrıca embriyonun boyutlarının büyümesi, fetal pelvis genişlemesi, karın içi organların büyümesi ve karın içi basınç artışı da testislerin skrotuma inişinde rol oynadığı düşünülür (18-20).

## **2.2. Testisin Yapısı**

Yetişkin testisleri vücut boşluğunun hemen dışında yer alan skrotum içerisinde bulunur. Her bir testis muskulofasiyal kesenin ucunda asılı bir biçimde skrotal ligamentlerle skrotuma bağlanmışlardır. Testis ve epididimis skrotal kese içerisinde vaza deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordon ile birlikte asılı bulunmaktadır (21). Bu anatomik yerleşimleri

spermatogenezin gerçekleşmesi için gereken optimum ısıda (34-35°C) kalmalarını sağlar (21,22). Her iki testis skrotal septum ile birbirlerinden ayrılmış, yanlardan basık oval şekillidirler (23-25). Yetişkin bir insanda testisler 4-5 cm uzunluğundadır ve 10-15 g ağırlığında iken sıçanlarda vücut ağırlığının %1'i kadardır.

Testisler dıştan içe doğru üç tunika ile çevrelenmiştir. Bunlar, en dışta seröz bir zar olan tunika vaginalis, testisi çevreleyen sıkı bağ dokusu yapısındaki bir kapsül olan tunika albuginea ve kan damarları içeren gevşek bağ dokusu yapısındaki tunika vaskülozadır. Testis kapsülden uzanmış olan bağ dokusu yapısındaki septumlar aracılığı ile yaklaşık olarak 250 lobüle ayrılır. Tunika albuginea testisin posteriyor yüzeyi boyunca kalınlaşarak içeriye doğru mediastinum testis ifadesini alır. Testise giriş ve çıkışta, genital boşaltım kanalları, kan ve lenf damarları, bu mediastinumdan geçer (26,27).

Her lobül seminifer tübüllerden ve Leydig (interstisyel) hücrelerini içeren bağ dokusu yapısındaki stromadan meydana gelir. Lobülün içindeki seminifer tübüller halka şeklini alır ve uzun olması sebebi ile kıvrımlı hale gelerek kendi üzerine katlanır. Halkanın iki ucu U şeklinde testis mediastinumuna yakındır ve buradaki kısa, düz şekil almış bölümüne düz tübül (tubulus rektus) adı verilir. Düz tübül, anastomozlaşan kanallar sistemi olan mediastinum içindeki rete testise açılır (21,22).

### **2.2.1.Seminifer tübüller**

Seminifer tübüller 150 ila 250 (µm) çapında ve yaklaşık 50 cm uzunluktadır. Seminifer tübüller dıştan bazal membran ile çevrelenmiş, birkaç hücre tabakasından oluşan germinal epitelden meydana gelmektedirler. Bu germinal epitel dıştan bazal lamina, kollajen lifler ve tübülün kasılmasını sağlayan miyoid hücrelerden oluşan membrana propria (peritübüler doku) denilen fibröz bir doku ile sarıdır. Miyoid hücreler, ritmik kasılma hareketi ile seminifer tübülün çapını değiştirebilir ve hareketsiz spermilerin tübülden rete testise doğru ilerlemelerini sağlarlar. Böylece spermatozoaların tübül içindeki hareketinden sorumludurlar (28).

Germinal epiteli oluşturan hücreler çok katlı şekilde yerleşim gösterir ve iki temel hücre popülasyonundan oluşur. Bunlar Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerdir (22,29,30).

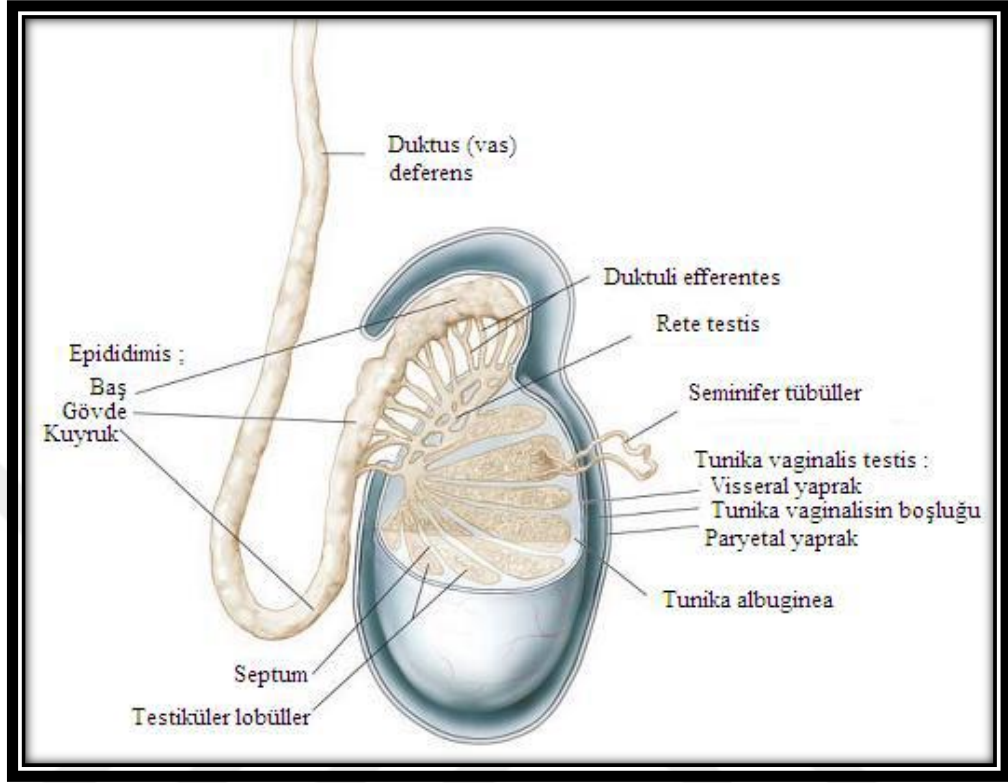
### 2.2.1.1. Sertoli hücresi

Sertoli Hücreleri diğer bir adıyla destek hücreleri, puberteye kadar germinal epitelin ana hücre tipi iken puberteden sonra seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin %10 unu oluşturur. Puberteden sonra çoğalmaları durur. Bu hücreler spermatogenik hücreleri çevreleyen ve aralarındaki boşluğu dolduran yaygın apikal ve lateral uzantıları bulunan, bazal membrandan lümene kadar uzanmış prizmatik şekilli hücrelerdir. Sitoplazmaları organelden oldukça zengindir. Çok sayıda granülsüz (düz) endoplazmik retikulum, az sayıda granüllü endoplazmik retikulum içermesinin yanı sıra iyi gelişmiş golgi kompleksi, çok sayıda lipid damlacığı, mitokondri, lizozom, lipofuksin pigmenti, glikojen granülleri ve zengin bir hücre iskeletine (mikrotübül, aktin, vimentin) sahiptir. İnsanlarda sertoli hücre sitoplazmalarında inklüzyondan sorumlu özel Charcot-Böttcher cisimcikleri bulunur. Bu yapıların işlevleri ve kimyasal içerikleri tam olarak bilinmemekle birlikte, son yapılan çalışmalarda lipoprotein reseptör (CLA-1) proteinlerinin birikimi gözlenmiş ve bu durum, Charcot-Böttcher cisimciklerinin lipid taşınımında ve lipidlerin Sertoli hücreleri tarafından kullanımında fonksiyonu olabileceği düşünülmektedir (22,31-35).

Sertoli hücreleri yan yüzey (bazolateral) kısımlarından birbirleri ile zonula okludens (sıkı bağlantı) bağlantı kompleksleri oluştururlar. Bu bağlantılar germinal epiteli bazal ve adluminal kompartmanlara ayırarak gelişmekte olan spermatogenik hücreleri otoimmün reaksiyonlardan koruyan kan-testis bariyerinin oluşmasını sağlar (22,29).

Sertoli hücreleri spermatogenik hücrelerin desteklenmesi, korunması ve beslenmesinden sorumludur. Spermiyogenez sonucunda ortaya çıkan atık cisimlerin fagosite edilmesini sağlar. Sertoli hücrelerinin diğer bir görevi ise sekresyondur. Sertoli hücreleri, devamlı olarak genital kanallara doğru akararak spermin taşınmasını sağlayan, protein ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılar. Folikül stimule edici hormon (FSH) uyarımı ile androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezlemeyerek spermatogenez için gereken tetosteronun yoğunlaşmasını sağlar. Sertoli hücreleri, aynı zamanda inhibin ve aktivin peptidlerini salgılayarak ön hipofiz ve hipotalamusdan salgılanan gonadotropin salgılatıcı faktör (GnRH) ve FSH salınımına negatif ve pozitif feedback (geri besleme) bir etki gösterilmesini sağlamaktadır. Sertoli hücreleri Anti-Müllerian hormon üretmektedir. Bu hormon, emrionik gelişim sürecindeki erkek fetüste Müller (paramezonefrik) kanalların gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir.

Testosteron hormonu ise Wolf (Mezonefrik) kanallardan köken alan yapıların gelişmesini desteklemektedir (36,37).



Şekil 1. Testisin anatomik yapısı (38).

### 2.2.1.2. Spermatogenik hücreler (Germ hücreleri)

Seminifer tübüllerde, lümen ile bazal lamina arasına yerleşmiş belirgin olmayan tabakalar halinde konumlanan, düzenli olarak çoğalan ve olgun sperme farklılaşan, ilerleyici gelişim sergileyen çeşitli evrelerdeki hücreleri ifade etmektedir. Bu hücreler embriyonel dönemde gonadal yolk kesesinden kaynaklanan ve gonadal kabartılarda kolonize olmuş primordial germ hücrelerinden gelişir. Bazal laminanın üzerinde konumlanan en immatür spermatogenik hücrelere spermatogonyum adı verilir. Bir spermatogonium hücresinin farklılaşp bir spermatozoon hücresi oluşuncaya kadar geçen sürece spermatogenez adı verilir. Puberteden hemen önce pitüiter gonadotropin seviyesinin artışı ile başlayıp yaşam boyunca devam eder (39,40).

### 2.2.1.3. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyal faz, spermatosit fazı (mayoz) ve spermatid fazı (spermiyogenez) olmak üzere üç fazda gerçekleşir. İnsanlarda spermatogenez yaklaşık 74 gün, spermilerin matürasyon süreci ise 14 gün sürdüğü bildirilmiştir. Ratlarda ise spermatogenez sürecinin 48-56 gün arasında olduğu bildirilmiştir. Spermatogenez tanımlayıcı olması açısından, üç farklı faza ayrılmıştır (39-41).

**Spermatogonyal Faz:** Bu fazda, spermatogonyal kök hücreler mitoz bölünme geçirerek adanmış spermatogonyum popülasyonunu oluşturur. Nükleuslarının görünümü, kromatin dağılımı gibi histolojik özelliklerine göre, Tip A koyu, Tip A açık ve Tip B spermatogonyum olmak üzere 3 tip spermatogonyum sınıflandırılmıştır.

Tip A koyu spermatogonyum, yoğun bazofilik, ince granüllü kromatinli, oval şekilli nükleusa sahiptir. Bu tip spermatogonyumların germinal epitelin kök hücreleri olduğu düşünülür. Düzensiz aralıklarla bölünme geçirerek ya bir çift kök hücre olarak kalan tip A koyu (*Type A dark*) spermatogonyum ya da bir çift tip A açık (*Type A pale*) spermatogonyum oluşturur.

Tip A açık spermatogonyum, açık renk boyanan ince granüllü kromatinli oval nükleusa sahiptir. Bu tip hücreler spermatozoon oluşturan farklılaşma sürecine yönlendirilmişlerdir. Ard arda mitoz bölünme geçirerek sayılarını artırırlar.

Tip B spermatogonyum, merkezi bir nükleus etrafında yoğunlaşmış kromatin içeren yuvarlak nükleusa sahiptir (42).

**Spermatosit Fazı (Mayoz):** Bu fazda, primer spermatositler mayoz bölünme ile kromozom sayısını ve DNA miktarlarını azaltırlar. Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmeleri sonucu primer spermatosit oluşur. Primer Spermatosit en büyük hacimlidir ve oluşumunun hemen ardından mayoz bölünme öncesi DNA larını iki katına çıkartırlar. Böylece primer spermatosit  $2n$  kromozom ve  $4d$  DNA içerir. Sekonder spermatositler hacim olarak daha küçüktürler ve kısa süre içerisinde ikinci mayoz bölünmeye uğramaları sonucu kesitlerde görülmeleri oldukça zordur. Mayoz I, kromozom sayısını ( $2n$ 'den  $1n$ 'ye) indirir ve DNA miktarını ise haploid ( $4d$ 'den  $2d$ 'ye) duruma getirir, böylece sekonder spermatosit meydana gelmiş olur. Sekonder spermatositler ( $1n$ ) kromozom taşımaktadırlar. Mayoz II'den önce DNA replikasyonu olmadığı için bu bölünmeden sonra oluşan spermatidler ( $1n$ ) kromozoma sahiptir.

Sekonder spermatositlerden ikinci mayoz bölünme sonrasında ( $1n$ ) kromozomlu ve ( $1d$ ) miktarında DNA'ya sahip iki haploid spermatid oluşur (42).

**Spermatid Fazı (Spermiyogenez):** Bu faz spermatidlerin olgun sperme farklılaşma evresini tanımlamaktadır. İkinci mayoz bölünme sonucu oluşan her spermatid hücresi ( $1d$ ) DNA ve ( $1n$ ) kromozom sayısı, 22 otozom artı bir X ya da Y kromozomu bulundurmaktadır. Bu haploid spermatidler olgun spermi oluşturan farklılaşma süreleri boyunca da haploiddirler. Sperm bir oositi fertilize ettiğinde (dölediğinde) diploid hale gelir. Spermiyogenez 4 evreden oluşur.

1. Golgi fazı, spermatidin golgi aygıtında karbonhidrattan zengin madde birikerek, küçük PAS (+) boyanan proakrozomal vezikülalar oluşur. Proteinden zengin proakrozomal granüller birleşerek, nüklear bir zarf olan akrozomal veziküle komşu, membranla sınırlanmış tek bir akrozomal vezikül oluşturmak üzere bir araya gelirler. Bu fazda akrozomal vezikülün hacmi genişler ve içeriği artar. Akrozomal vezikülün pozisyonu gelişen spermin ön kutbunu oluşturur. Sentriyoller spermatidin arka kutbuna yönelerek, arka kutupta sperm kuyruğunun aksonemi olan periferik 9+2 mikrotübül (iki merkezi ve dokuz periferik mikrotübül çifti) yapısının oluşumunu başlatır.

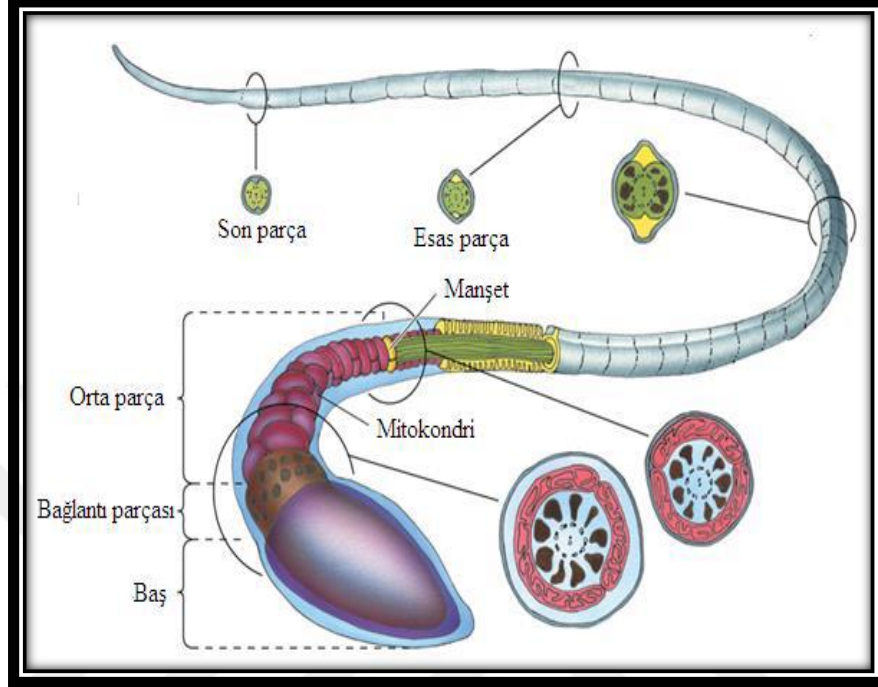
2. Kep fazı, akrozomal vezikül nükleusun ön kısmı üzerinde yayılır ve bu şekildeki yapıya akrozomal kep adı verilmektedir. Spermatid nükleusu yoğunlaşır.

3. Akrozom fazı, mikrotübüller bir araya gelerek nükleusun her iki yanında silindirik bir kılıf olan manşeti oluştururlar. Flagellum gelişimini başlatan sentriyoller nükleusun arka yüzeyine taşınarak nükleusa tutunur ve modifiye olarak spermin bağlantı parçasını oluşturur. Nükleusa tutunan sentriyoller dokuz kalın fibril oluşturarak aksonem mikrotübüllerinin periferinde yoğun fiberler olarak kuyruğun içine uzanırlar. Bunlar nükleusu flagellum ile birleştirerek bağlantı parçasını oluşturmuş olurlar (42).

Plazma membranı posteriyore hareket ederken manşet kaybolur ve flagelluma doğru akan mitokondriler spirali oluşturmak üzere aksonem etrafında toplanırlar. Bu spermin orta parçasını oluşturur. Orta parçanın distalinde çok sayıda bağlantı kuşağı içeren fibröz kılıf neredeyse flagellumun ucuna kadar uzanır. Fibröz kılıfın distalinde kalan bu kısa bölüm kuyruğun son parçasıdır.

Olgunlaşma (maturasyon) fazı, flagellanın etrafındaki rezidüel cisimcik olarak adlandırılan fazla sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Nükleus tamamen uzar ve homojen kitle halini alır. Gelişmekte olan gametler ile

karakterize olan interselüler köprüler rezidüel cisimlerde kalarak, spermatidlerin birbirlerinden ayrılmasını ve Sertoli hüresinden salıverilmesini sağlar. Bu ayrılmaya spermiyasyon adı verilir. Olgun bir insan sperm hücresi 60µm uzunluğundadır (42).



Şekil 2. İnsanda bulunan olgun bir spermatazoon hücresi (43).

Baş ve kuyruk kısımlarından oluşur. Baş kısmı, yassı ve sivridir. 4.5-5 µm uzunluğunda, 1 µm kalınlıkta ve 3 µm genişliğindedir. Nükleusun 2/3'lük ön kısmını saran akrozomal kep hidrolitik enzimler içerir. Bu enzimler oositi çevreleyen korona radyata ve zona pellusida'ya spermatazoon girişini sağlamak için döllenme esnasında salıverilir. Kuyruk ise bağlantı parçası, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört kısımdan meydana gelir. Kısa olan bağlantı parçası sentriyolleri ve kaba fiber yapılarının başlangıcını içerir. Orta parça, yaklaşık 7 µm uzunluğunda olup, kalın fiberlerin ve aksonemal kompleksin etrafında dairesel şekilde sarılmış olan mitokondriyonları içerir. Bu mitokondriyonlar sperm için enerji sağlayarak sperm hareketinden sorumludurlar. Esas parça, yaklaşık 40 µm uzunluğundadır ve kuyruğun en uzun parçasıdır. Kalın fiberlerin ve aksonemal kompleksin dışındaki fibröz kılıfı içermektedir. Son parça yaklaşık 5 µm uzunluğundadır ve fibröz kılıfın erken sonlanması ile yalnızca aksonemal kopleksi içermektedir (44-46).



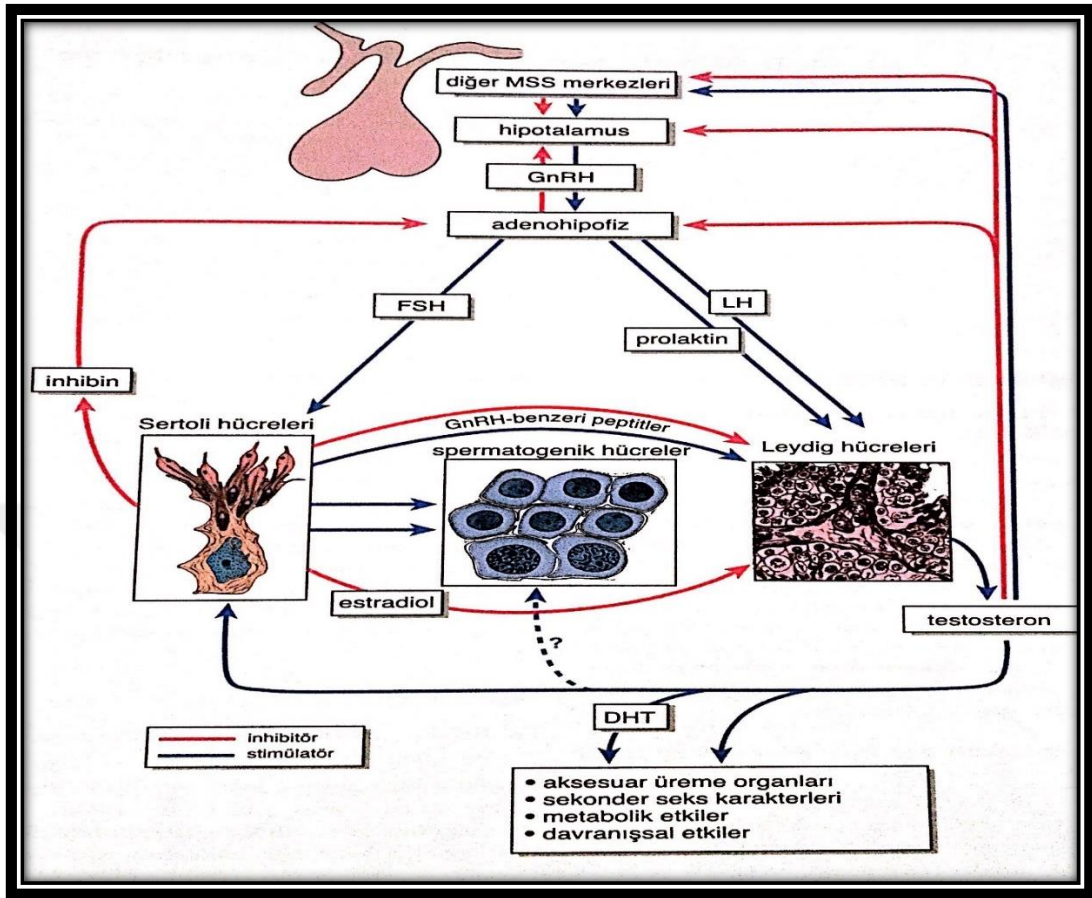
Sağlıklı seksüel olgunluğa erişmiş bir erkekte günde yaklaşık 30 milyon kadar sperm üretimi gerçekleşmektedir. Yetişkin bir insanda sperm değerlendirilmesi yapıldığında, sperm konsantrasyonunun 15 milyon/ml'den, motilitesinin (hareketlilik) ise %50'den daha fazla olması gerekmektedir. Motilite yüzdesi ileri hızlı ve ileri yavaş spermelerin toplamının yüzdeler olarak ifadesidir (47).



**Şekil 3.** Sıçan sperm hücresi (x40).

Sıçan sperm hücresi insan sperm hücresinden morfolojik olarak farklılık gösterir. Çengel şeklinde bir baş yapısı ve daha uzun bir kuyruğa sahiptir (Şekil 3). Sıçanlarda spermatogenez 45 günlükken başlar fakat optimum sperm üretimi 75 günlükken (2- 2,5 aylık) gerçekleşmektedir. Ortalama 200-300 milyon kadar sperm üretimi gerçekleştiği görülmüştür (48-50).

#### 2.2.1.4. Spermatogonezin uyarımında hormonal faktörler



Şekil 4. Erkek üreme fonksiyonuna ait hormonal düzeni gösteren şematik diyagram (51).

Ekzokrin ve endokrin fonksiyonlara sahip olan testislerin ekzokrin fonksiyonu, seminifer tübüllerde meydana gelen olgun spermatozoon hücrelerinin oluşumudur. Endokrin fonksiyonu ise Leydig hücrelerinin gerçekleştirdiği testosteron üretimidir.

Spermatogonezin düzenlenmesi hipofiz bezinin ön lobundan salgılanan Folikül stimüle edici hormon (FSH) ve Lüteinizan hormon (LH) ile sağlanır. LH Leydig hücrelerini uyararak testosteron üretiminin başlatılmasını sağlar. LH salınımı hipofizden negatif geri besleme ile düzenlenmektedir. FSH Sertoli hücrelerini uyarır. Sertoli hücreleri FSH uyarımı ile adenilat siklazı ve sonuçta siklik adenosin monofosfat (cAMP) artışı sağlar. Bu sayede androjen bağlayıcı protein (ABP) testosteronu bağlar ve spermatogenez için gereken testosteronun seminifer tübül içinde yoğunlaşmasını sağlar. Testosteron spermatogonezin uyarılmasını sağlar. Sertoli hücrelerinden salınan endokrin bir madde olan inhibin, FSH salınımını

inhibe eden geri besleme döngüsünde görevlidir. Spermatogenez östrojen veya progesteron ile inhibe edilmektedir (37, 52-55).

### **2.2.2. İnterstisyum**

Seminifer tübüllerin arasında yer alan interstisyel bağ dokuyu ifade eder. Çok sayıda kan damarı, lenf damarları ve sinir liflerini içeren gevşek bir bağ doku yapısındadır. Bu dokuda bağ dokusunun olağan hücrelerinden olan fibroblast, mast hücresi, makrofaj gibi hücrelerin yanısıra testesteron üretiminden sorumlu Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) bulunmaktadır. Bağ dokusu içinde yer yer gruplar halinde ya da tek tek görülen Leydig hücreleri, yuvarlak veya poligonal şekilli, yuvarlak nükleuslu, eozinofilik hücrelerdir ve tipik olarak lipid damlacıkları içerirler. Bu hücreler lipofuksin pigmenti ve çubuk şekilli sitoplazmik kristaller olan Reinke kristallerini sıklıkla içerirler. Steroid sentezleyen diğer hücreler gibi granülsüz endoplazmik retikuluma sahiptirler. Leydig hücreleri erken fetal dönemde farklılaşarak testosteron sağlar. Testosteron salgısı embriyonik gelişim, cinsel olgunluk ve üreme gibi fonksiyonlarda rol oynar. Embriyoda, testosteron ve diğer androjen salınımı erkek fetusta gonadların normal gelişmesini sağlar. Pubertede, testosteron salınımı sperm üretiminin başlatılmasını, aksesuar cinsiyet bezlerinin salgısını ve sekonder seks karakterlerinin gelişimini sağlar. Yetişkinlerde, testosteron salgısı spermatogenezin, sekonder seks karakterlerinin, genital boşaltım kanallarının ve aksesuar cinsiyet bezlerinin devamlılığı için gerekli olmaktadır (28,31).

### **2.3. Anabolik Androjenik Steroidler**

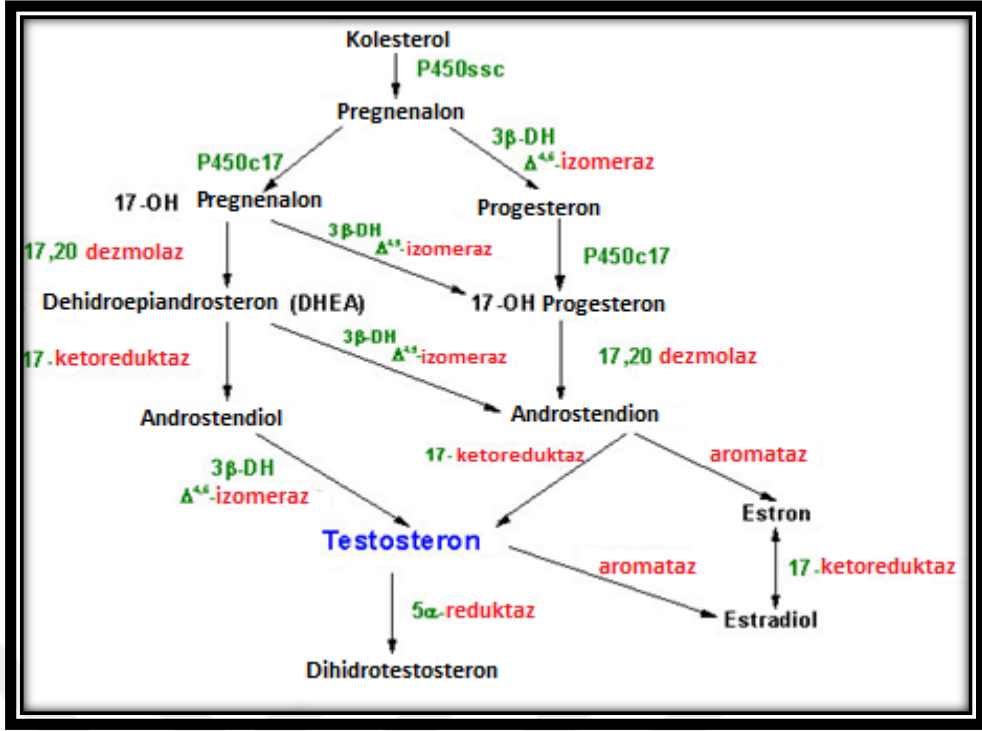
Testosteron, androjenik aktivite gösteren steroid yapılı bir molekül olarak, 1935 yılında izole edilip, karakterize olduktan sonra kimyasal olarak testosteronun birçok özelliklerine sahip olan sentetik türevleri sentezlenerek genel olarak “Anabolik Androjenik Steroidler” (AAS) olarak isimlendirilmiştir (1).

Uzun yıllardır sporcular, performanslarını arttırmak için bitkileri, doğal ya da sentetik ilaçları kullanmışlardır. AAS’lerin egzersizle birlikte alındığında kas kitlesi ve kuvvetini artırıcı etkileri ortaya çıktıktan sonra vücut geliştiriciler, atletler ve profesyonel sporcular tarafından suprafizyolojik dozlarda kullanımı yaygınlaşmıştır. Daha sonra Dünya Doping Ajansı (WADA) tarafından olimpiyatlar

ve ciddi spor müsabakaları da dahil olmak üzere profesyonel sporculara doping adı altında AAS'lerin kullanımı yasaklanmıştır. Halen kullanımı yaygın şekilde devam eden AAS'leri kadın ve erkek profesyonel olmayan sporcular, vücut geliştiriciler tarafından tercih edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde AAS kullanıcısı olan yaklaşık üç milyon kişi tespit edilmiş ve bu sayının giderek arttığı bildirilmiştir (1,2,56-58).

### **2.3.1. Testosteron**

Testisteki Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteron en önemli androjendir. Neredeyse tamamı testis tarafından üretilirken %5'ten daha az bir dilimi adrenal bezler tarafından üretilir. Testosteron, Leydig hücrelerinin mitokondrilerinde enzimatik reaksiyonlar sonucu tüm steroidal hormonların ön maddesi olan bir kolesterol türevi pregnolondan üretilmektedir. Sağlıklı bir erkekte günde ortalama 2.1– 11.0 mg arası testosteron sentezi gerçekleşir ve plazma düzeyi 300 – 1000 ng/dl arasında olmaktadır (1). Üretimi hipotalamo-hipofizer aks tarafından gerçekleştirilir. Üretiminde lüteinizan hormon (LH) etkilidir. Hipotalamus, lüteinizan hormon releasing hormon (LHRH) olarak isimlendirilen küçük polipeptid bir hormon salgılayarak stimule ettiği hipofiz bezinden LH salgılanır.



Şekil 5. Testosteron sentezi (59).

LH, Leydig hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak protein kinaz üzerinden bir etkiyle kolesterolün pregnenolona dönüşümü gerçekleşir ve androjen sentezi stimüle edilmiş olur. Leydig hücrelerinde üretilen testosteron difüzyon yolu ile kana geçmektedir. Üretilen testosteronun %98'i kana transport proteinlerden, seks hormon bağlayıcı protein albumin ve globuline bağlı olarak bulunurken %2'si serbest halde bulunur. Serbest bulunan testosteron aromataz ve reduksiyona uğrayarak östradiol ve 5  $\alpha$ - dihidrottestosterona (DHT) dönüşmektedir. Testosteron, aynı formda, cilt ve prostatta 5  $\alpha$ - dihidrottestosterona dönüşerek, lipid metabolizması, beyin ve vasküler yapılarda E<sub>2</sub>'ye dönüşerek etki göstermektedir. Testosteron DHT olarak karaciğerde oksidasyon, redüksiyon ve hidroksilasyona uğrayarak metabolize olur. Bunun sonucunda 17- ketosteroidler ve sülfatlı inaktif metabolitler (androsteron, epitestosteron, epiandrosteron ve etiokolanolon gibi) ortaya çıkar. Bunlar suda çözünebilen moleküllerdir ve idrar yolu ile vücuttan uzaklaştırılırlar (60,61).

Testosteron hormonu sekonder seks karakterlerinin gelişiminde, spermatogenezde ve libidoda önemli bir role sahiptir. Bunlar testosteronun androjenik etkisini oluşturur. Androjenik etkilerinin yanında protein sentezini sağlamak ve protein yıkımını azaltmak gibi anabolik etkileri de bulunmaktadır.

Anabolizan etki ile protein sentezi, kas hacminde artış gibi büyümenin tetiklenmesi gerçekleşir (60,61).

AAS'ler anabolik ve androjenik etkilerinin birbirlerinden farklı olmasıyla çeşitli seçeneklerde tercih edilirler. Testosteron temel AAS olduğundan dolayı anabolik: androjenik etki oranı 1 olarak kabul edilir ve tüm steroidlerin anabolik veya androjenik etkileri orana göre belirlenmektedir. AAS'lerin bazıları androjen reseptörüne zayıf şekilde bağlanır ve zayıf androjenik etki oluşturur fakat güçlü anabolik etkiye sahiptirler. Bazıları ise tam aksi şekilde androjen reseptörüne güçlü bir şekilde bağlanır güçlü androjenik etki oluşturur fakat zayıf anabolik aktiviteye sahiptirler.

Sentetik AAS'lerin androjenik özelliği zayıf, anabolik özelliği güçlü olan türevleri üretilmiş olsa da uzun süreli ve suprafizyolojik dozlardaki kullanımları sonucu androjenik etki meydana gelmektedir (62).

AAS'ler anabolik: androjenik etkileri bakımından üç gruba ayrılırlar;

**Testosteron benzeri etki gösterenler:** Androjenik etkileri çok güçlüdür. Büyük kas gücü kazanımlarına izin verirler. Bu AAS'lar genellikle testosteronun kendisine benzer şekilde 1: 1'e yakın bir anabolik: androjenik etki oranı gösterirler. Yüksek aromatisasyon potansiyelleri olduğundan östradiole dönüşür ve ödem yapıcı özelliğe sahiptirler. Jinekomastiye sebep olurlar. Bunlar, Testosteron cypionate, Testosteron undekanoat gibi testosteron esterleri, metiltestosteron, boldenon ve diğerlerini içerir.

**Dihidrotestosteron (DHT) benzeri etki gösterenler:** Yüksek derecede androjeniktir. Bu AAS'lar bir 5DHT molekülüne benzedikleri için östrojene aromatize edilemezler ve ayrıca düşük bir su ve tuz tutma özelliğine de sahiptirler. Bu AASler stanozolol ve oxandrolone içerir.

**Nandrolon benzeri etki gösterenler:** Yüksek anabolik, düşük androjenik etki gösterirler. Bu gruptaki AAS'lar, hipotalamik aksı inhibe eden progesteron benzeri aktiviteye sahiptirler (63).

Son yıllarda testosteron ve AAS kullanımında artışlar görülmektedir. Bunun sebebi androjen yetmezliği, çoğu vücut geliştiricilerin ve ağır spor dallarıyla uğraşan sporcuların performanslarını artırmak istemeleri sonucunda ortaya çıkmıştır. Profesyonel ya da amatör sporcular, vücut geliştiriciler bu molekülleri normal fizyolojik ihtiyaçlarının (testisler tarafından üretilen 40 – 50 mg/hafta) 50 – 100 katı kadar fazla suprafizyolojik dozlarda (600 – 5000 mg/hafta) almaktadırlar (64,65).

Çok sayıda AAS'yi kombine şekilde almanın önüne geçmek için daha uzun süreli ve suprafizyolojik dozlarda kullanılan nandrolon kullanılmaktadır. 4-12 haftalık dönemler şeklinde kullanılırlar. AAS türevleri yapılarındaki ester gruplarının farklılıkları sebebi ile intramuskuler ve oral yolla alındıklarında etkilidirler.

AAS'lerin erkek üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkileri pek çok çalışmada gösterilmiştir. Özellikle, yapılan bir çalışmada, prostat ve testis kanserinin yanı sıra infertilite de dahil olmak üzere, AAS'nin ürogenital sistemdeki organlara olumsuz etkileri bildirilmiştir (66,67).

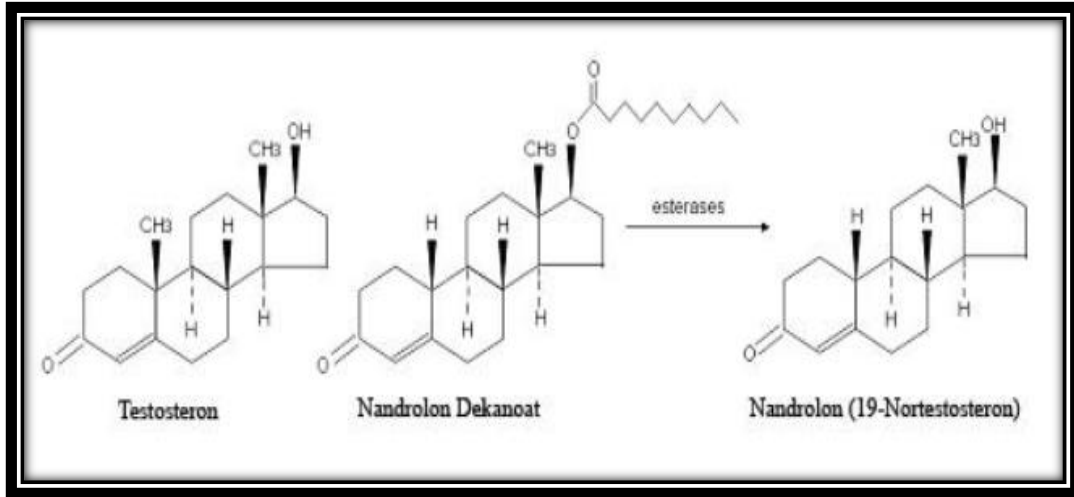
Hipotalamik-hipofizer eksende gonadotropin salınımını negatif feedback mekanizması ile inhibe ederek, LH ve FSH düzeylerinde düşüşe yol açarak endojen testosteron ve östrodiol düzeylerinde azalmaya sebep olurlar. Böylece testislerde atrofi ve spermatogenezde bozulmalara yol açabilir (68).

İntratestiküler testosteron seviyesinde görülen azalmaya bağlı olarak spermatogenezis yavaşlar ve bir süre sonra durur. Buna bağlı olarak sperm morfolojisi ve motilitesinde bozulma, şiddetli oligozoospermi, azoospermi ve hatta testis atrofisi oluşabilmektedir (69,70).

### **2.3.2. Nandrolon Decanoate**

Nandrolon (19-nortestosteron), testosterona yapısal ve fonksiyonel olarak yakın olan, ancak testosterondan 10 kat daha fazla anabolik etkiye sahip olan anabolik-androjenik bir steroidtir (71).

Nandrolon doğal olarak, fare böbreğinde, at ve domuz testislerinde, maymun plasentasında ve domuz foliküler sıvısında bulunmuştur ve ayrıca ticari olarak Nandrolon Dekanoate (ND) olarak adlandırılan dekanat esterli bir formda kimyasal olarak sentezlenmektedir (72,73).



**Şekil 6.** Testosteron, Nandrolon Dekanoat ve Nandrolon'un kimyasal yapısı (74).

Nandrolon Dekanoate (ND), Nandrolon ile Dekanoik asitin bir konjugasyonudur. ND'nin bu yapısı, intramüsküler (kas içi) ve intraperitoneal (deri içi) enjeksiyonlara uygun olmasını sağlamıştır. ND enjeksiyonu sonrasında, bir esteraz aracılığı ile Nandrolon'a hidrolize olur. İnsanlarda intramüsküler enjeksiyondan sonra yaklaşık 6 günlük yarılanma süresine sahiptir. Etki süresi yaklaşık olarak 3 haftadır (75).

Molekül ağırlığı 428.65 g/mol'dür. Suda çözünmez fakat eter, etanol, aseton, kloroform ve yağlarda kolaylıkla çözünebilmektedir. Kaslarda depo edilen formundan ester formuna salınımı için gereken yarılanma süresi ratlarda 4–5 gün, insanlarda ise 6–8 gündür (76).

ND, sıklıkla HIV ile ilişkili kas kaybı, kronik böbrek yetmezliği ile indüklenen anemi ve yaşlı osteoporotik kadınlarda kemik mineral yoğunluğu gibi birkaç klinik durumun tedavisi için kullanılmaktadır (77). ND'nin bu yararlı etkilerine rağmen ND'nin erkek ve dişi üreme sistemlerinde zararlı etkileri de dahil olmak üzere ND'nin uygulanması ile birlikte istenmeyen fizyolojik ve psikolojik sonuçlar oluşmuştur. Özellikle ND'nin erkeklerde uygulanması sıklıkla bozulmuş spermatogenez ile sonuçlanarak infertiliteye sebep olmuştur (9). Yüksek dozda kullanılan ND'nin testiküler ve epididimal ağırlıklar, sperm sayısı ve sperm motilitesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca testiküler atrofi ve anormal morfolojiler ile sonuçlanmıştır (8-10,78).



Deneysel bir hayvan modeli çalışmasında yüksek dozda nandrolon kullanımı sonucunda intratestiküler apoptozis hızının arttığı ve egzersiz ile apoptozisin amplifiye olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanısıra aynı çalışmada semen kalitesinin bozulduğu bildirilmiştir (79). Floresan in situ hibridizasyon yöntemiyle spermlerin ultrastrüktürel yapıları incelenmiş olan bir çalışmada AAS kullanan olguların spermlerinin XY, 1. ve 9. kromozomlarında disomilerin varlığı gözlemlenmiş ve AAS kullanımının mayotik bölünme sırasında genetik hasara neden olduğu bildirilmiştir (80).

## 2.4. Apoptozis

Programlanmış hücre ölümü apoptoz yolu ile de gerçekleşmektedir. Tüm canlılarda olduğu gibi hücrelerin de belli bir yaşam süreleri vardır. Her hücrenin yaşam süresi, tipine göre değişkenlik göstermektedir. Apoptozisin aksine doku hasarı nedeniyle gerçekleşen hücre ölümü nekrozis denen farklı morfolojik değişiklikler göstermektedirler. Bu süreçten geçen hücreler çevre hücrelere zarar verebilir ve sıklıkla da inflamasyon gibi sonuçlar doğurabilmektedir. Hücrenin yaşam süresini doldurması ve nekrozis gibi nedenler dışındaki hücre ölümleri programlanmış hücre ölümü olan apoptozis ile gerçekleşmektedir. Apoptozis genel olarak hücrelerin kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı şekilde, protein, RNA sentezine ve enerjiye gereksinim duyan, özellikle organizmada homeostazisi koruyan bir olaydır.

Apoptozise uğrayan hücre küçülür, yoğunlaşır ve sonra da parçalanır; bu esnada zara bağlı küçük apoptotik cisimleri serbest bırakırlar ve bunlar diğer hücreler tarafından fagosite edilmektedir. Apoptoz sırasında nükleuslar yoğunlaşır ve DNA parçalanmaktadır. Önemli olan hücre içindeki bileşenlerin çevre hücrelerde zararlı etkiler oluşturabilecekleri hücreler arası ortama salınmamalarıdır (81,82). Hücrenin içi gen aktivasyonu ya da çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır (83). Apoptoz önceden hazır olan hücrelerde primer olarak başlatılabilir ya da bir uyarıcı aracılığıyla sekonder olarak gelişebilmektedir. Apoptozu tetikleyen hücre dışı uyaranlar; ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS – FAS ligand aracılı apoptoz, TNF aracılı apoptoz), büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, glukokortikoidler, sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (radyasyon, UV, iskemi, steroid tedavisi, çeşitli ilaçlar ve antijenler)'dir (84).

Otoimmün hastalıkların gelişmesinde rolü olduğu bilinmekte olan Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler (HIV; gp120 proteini, influenza virüsü; TNF reseptörü vasıtasıyla, adenovirüs; hücrenin genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptoza götürmektedirler (83).

Apoptozu tetikleyen hücre içi uyarılar; DNA hasarı, sitokinler, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları, hipoksi, hücre içinde kalsiyum seviyesi artışı ve pH azalışıdır.

Apoptoz süreci, DNA hasarına karşı genlerin yanıtı, hücre membranı vasıtasıyla ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı) ve proteolitik enzimin (granzim) hücreye doğrudan girişi olmak üzere üç farklı şekilde gelişebilmektedir (85). Apoptozis süreci içerisinde belli başlı üç anahtar bileşen bulunmaktadır. Kaspazlar, Bcl-2 ailesi proteinleri ve Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) proteini, bu bileşenleri oluşturmaktadır. Bunların biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, DNA fragmentasyonu. Çekirdek zarı kırılması, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi şeklindeki morfolojik değişikliklerden oluşmaktadır (86).

#### **2.4.1. Apoptozis mekanizması**

Apoptozis, instrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik yol olmak üzere iki yol üzerinden meydana gelmektedir.

##### Instrinsik Yol

Apoptozis hücre içi sinyaller ile uyarıldıktan sonra proapoptotik proteinlerden BID, antiapoptotik protein olan Bcl-2'nin inaktif olmasını, Bax ve Bak'ın ise aktifleşmesini sağlar. Aktif hale gelen Bax ve Bak mitokondri membranında por oluşumunu indükleyerek ve membran potansiyelini değiştirir. Mitokondri membranında sitokrom-c, EndoG (endonükleaz-G), SMAC (Second mitokondria derived activator of caspase), AIF (Apoptoz indükleyici faktör) ve kalsiyum salınımını uyarmaktadır. Oksidatif fosforilasyon için sitokrom-c elektron taşıyır. SMAC, AIF'nin inhibe olmasını sağlar ve apoptozis hızlandırılır. AIF ise Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 aktivasyonunu bloke eder. AIF nükleusa transloke olarak parçalara ayırır. EndoG DNA yapısının parçalanmasını sağlar. Mitokondri membranından salınan sitokrom-c, Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör) ve

ATP katılımıyla sitozolde Apoptozom adlı bir kompleks meydana gelmektedir (87,88,89).

Apoptozom Kaspaz-9'u aktif hale getirir. Kaspaz-9, Prokaspaz-3'ü aktif hale getirir. Aktif kaspaz-3 ise ICAD (inaktif kaspaz aktive edici Dnaz)'ı inaktif hale getirerek CAD (kaspaz aktive edici Dnaz)'ı serbestler. Serbestleşen CAD ise nükleus kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın alt brimlere ayrılarak fragmente olmasına sebep olur (88,89,90).

### Ekstrinsik Yol

Hücre yüzeyinde bulunan Fas, TNFR, DR5 gibi ölüm reseptörlerine, FasL, TNF- $\alpha$ , TRAIL gibi ölüm sinyallerinin bağlanası ile reseptörler trimerik bir yapı halini alır. Bu yapıdaki reseptör; adaptör moleküller ve prokaspazlar ile birleşerek DISC (Death inducing signaling coplex) isimli yapıyı meydana getirmektedir. Bu birleşim sonrası inaktif haldeki Prokaspaz-8, aktif Kaspaz-8'e dönüşür. Aktif Kaspaz-8 doğrudan ya da dolaylı şekilde kaspaz-3'ü aktive eder. Doğrudan ya da dolaylı şekilde aktif hale gelen Kaspaz-3 CAD aktivasyonu ile DNA'nın fragmente olmasını sağlamaktadır (88,91,92).

Ekstrinsik yollardan bir diğeri ise sfingolipid yoludur. Sfingomyelin, hücre membranının yapı taşlarından birisidir. Radyasyon, kemoterapi ve ölüm reseptörleri vasıtasıyla aktif hale gelen sfingomyelinaz, sfingomyelini seramid'e dönüştürmektedir. Seramid ise seramidaz ile sfingozine dönüşürerek, BID yapımını artırır ve apoptozu tetikler. Ayrıca Granzim-Perforin adlı diğeri bir yol ise patojenle enfekte olan hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkilidir. Birer serin proteaz olan perforinler ve Granzim B, sitotoksik T lenfositler ve Natural Killer (NK) hücrelerinin sitoplazmik salgı granülleri içerisinde bulunmaktadırlar. Sitotoksik T lenfositler hedef hücreye bağlanarak perforinler salınımı gerçekleşir ve perforinler hedef hücrede dairesel bir por meydana getirirler. Bu oluşan por hücre içine kalsiyum girişini artırarak, vezikülden Granzim B'nin serbestlenmesini sağlamaktadır. Granzim B ise kaspaz aktivasyonunu gerçekleştirerek DNA'nın fragmentasyonu sonucu apoptoza neden olmaktadır (93).

## 2.5. Kaspaz-3

Gerek ölüm reseptörleri yolu ile gerekse de mitokondriyal apoptoz yolunda rol almaktadırlar. Kaspaz ailesi, apoptozisin başlatılması ve uygulanmasında önemli göreve sahiptirler (94). Hücrede inaktif halde bulunurlar fakat proteolitik olarak birbirlerini aktiveleştirmektedirler. İlk keşfedilen kaspaz *C. Elegans*'in ced-3'ü olup memelilerde ICE (interleukin-1beta dönüştürücü enzim) ile denk olup sonrasında Kaspaz-1 olarak ifade edilmiştir. Tüm kaspazlar benzer aminoasit dağılımına sahip olduklarından, substrat spesifikliğı ve yapısal olarak benzer özellikler göstermektedirler. Tüm kaspazlar inaktif formları olan proenzimler halinde sentezlenirler (95). Kaspazlar 3 kısımdan oluşurlar. Bunlar; NH - terminal kısım, yaklaşık 20 kDa ağırlıkta geniş alt ünite ve 10 kDa ağırlıkta küçük alt ünite. Proteolitik süreç sırasında aktivasyona uğrayan bu geniş ve küçük alt üniteler birleşerek heterodimer meydana getirir. NH-terminal kısmı aktivasyonun düzenlenmesinde önemli role sahiptir. NH-terminal ile kaspaz konsensüs bölgeleri, kaspazların inaktif halden aktif hale geçebilmeleri için gereken bölgeleri oluşturular. Sitozolda konumlanmış olan kaspazlar, proteazlardır ve tetrapeptit motiflerini tanıyarak aspartat rezidüsünün karboksil ucundan peptit bağına kırma özgülüğüne sahiptirler (96). Günümüzde 14 farklı Kaspaz izofarmu keşfedilmiştir. 100 farklı hedef proteini keserek apoptozise neden olmaktadır. 3 tipde kaspaz bulur. Bunlar, başlatıcı kaspazlar; (Kaspaz 2,8,9,10), efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7) ve inflamatuvar kaspazlardır (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14) (87,88,91).

Tüm kaspaz ailesinde olduğu gibi sistein molekülü taşıyan aktif bir merkeze sahiptir. Kaspaz-3, yaygın olarak kullanılsa da CPP32 ve Apopain isimleriyle de ifade edilmektedir. Kaspaz-3, başlatıcı kaspazlar olarak ifade edilen Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 tarafından aktive edilmektedir. Hücrede aktif hale geldikten sonra hedef proteinlerini spesifik bölgelerinden kesmektedir. Örneğin Poli (ADP-riboz) polimeraz- 1 (PARP-1) enziminin Kaspaz-3 tarafından kesilmesidir (97,98).

Kaspaz-3 aktif hale geldikten sonra kesim işlemi tek bir spesifik noktada, farklı yollarla direkt ya da indirekt etki ile gerçekleşmektedir. Örneğin, endonükleaz CAD inhibitörü ICAD'ın Kaspaz-3 tarafından kesilerek aktivasyona uğraması ve kesilmiş olan parça aktif kısım olarak ortama salınmaktadır. Kaspaz-3'ün aktif hale gelerek hedef proteinlerdeki spesifik bölgelerde kesim işlemini gerçekleştirmesi ile morfolojik değişiklikler yapması apoptozis oluşumu için önemlidir.

Aktif Kaspaz-3'ün kesim yaptığı bazı substrat moleküllerine; Kaspaz-6, Kaspaz-7, Kaspaz-9, PARP, ICAD SREB, DNA-PK, Topoizomeraz 1, Calpastatin, MDM 2, B-Katenin, Laminler, Numa, FAK, ve p21 örnek olarak verilebilir. Başlatıcı ve sonlandırıcı kaspazların fonksiyonlarının birbirinden farklı olduğu bilinmektedir. Kaspaz-3 kısa pro-domain içeren kaspazlardandır. Pro-domaini kısa olan diğer kaspazlar gibi başlatıcı kaspazlar tarafından meydana getirilen proteolizis sonunda aktif hale gelirler. Ölüm-reseptör kompleksi (DRC)'ne Kaspaz-8 bağlanması ile prokaspaz-3 kesilir ve aktif Kaspaz-3 oluşumu gerçekleşir. Fakat Kaspaz-8, Kaspaz-3'ü keserken aynı zamanda BID ve Bcl-2/Bax ailesinden olan molekülleri de keserek apoptozu indükleyici etki oluşturabilmektedir (97-99).

## **2.6. Tümör Nekroz Faktörü-Alfa (TNF- $\alpha$ )**

Carswell ve arkadaşları tarafından 1975 yılında tavşan ve farelerde *Basillus Calmette Guerin* (BCG) aracılığıyla retiküloendotelial sistemin uyarılması ile lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu sonrası dolaşıma salınan bir protein olan Tümör Nekroz Faktör (TNF)'ü bulmuşlardır (100). TNF, polipeptid yapılı tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve glikoprotein yapılı tümör nekrozis faktör-beta (TNF- $\beta$ ) olmak üzere benzer biyolojik özelliklerdeki iki yapısal formu bulunmaktadır. TNF- $\alpha$  heterodimeri, monositler, fibroblastlar, T ve B lenfositler, endotel hücrelerinden veya makrofajlardan salınırken, lenfotoksin olarak da isimlendirilen TNF- $\beta$  ise genellikle aktive olmuş T hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerden salınmaktadır. TNF- $\alpha$ , makrofajlar ve T lenfositler tarafından meydana gelen pek çok immün ve inflamatuvar yanıtta rol oynayan bir sitokindir (101). Kaşektin olarak isimlendirilen TNF- $\alpha$  hücre içinde N terminali olan tip II transmembranöz proteindir. Başlangıçta inaktif halde plazma membranında bulunan, 26 kDa molekül ağırlığına sahip TNF- $\alpha$  proformu, hücre dışı domaini TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE, ADAM-17) ile kesilerek 17 kDa molekül ağırlığında matur solubl formu meydana gelmektedir (102,103).

TNF insanlarda 6. kromozom kısa kolunda, farelerde ise 17. kromozomda sınıf-1 ve sınıf-2 MHC gen bölgeleri arasına lokalize olarak bulunmaktadır. TNF- $\alpha$  proformu 233 aminoasitten oluşurken aktif olan matur formu ise 157 aminoasitten meydana gelmektedir (104). TNFR1 ve TNFR2 olmak üzere iki çeşit TNF reseptörü bulunmaktadır. Bu reseptörlerin neredeyse tüm hücre tiplerinde var olduğu bildirilmiştir (105,106).

TNFR1 eritrositler hariç her tip hücrede bulunurlar ve ligandı solubl TNF- $\alpha$ 'dır. TNFR2 ise hematopoetik hücrelerde sentezlenir ve ligandı ise membrana bağlı TNF- $\alpha$ 'dır. TNF reseptörlerinin ekspresyonu normal ya da hastalıklı dokularda ve farklı hücre tiplerinde değişiklik gösterebilmektedir (107,108).

TNF- $\alpha$ 'nın TNFR1 ve TNFR2'ye bağlanma afinitesi farklıdır. Bağlandıktan sonra ise aktive edilen hücre içi sinyal yolları birbirinden farklı olmaktadır. Uyarılan TNFR1'in hücre içi domaini, TNF reseptör assosiyasyon ölüm domain (TRADD) proteinine bağlanarak ya Fas assosiyasyon ölüm domain (FADD) proteini aracılığıyla apoptozis indüklenmesini sağlar ya da TNF reseptör assosiyasyon faktör 2 (TRAF-2) ile proinflamatuvar yolağı uyararak NF- $\kappa$ B aktivasyonu oluşur. TNFR2, TRADD/FADD yolağını aktive edememektedir. Etkisini sadece TRAF2 aracılığı ile göstermektedir. Sonuç olarak hücrede TNF- $\alpha$  aracılı uyarılma ile ortaya çıkan sonuçlar bu iki reseptörün birbiri ile iletişimine bağlı olarak belirlenir (109).

İnsan kaynaklı TNF- $\alpha$  ilk kez 1985 yılında klonlanmıştır. Sonrasında antiTNF- $\alpha$  antikoru ve TNF reseptörleri üretilerek pek çok inflamatuvar hastalıkta tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. TNF- $\alpha$  doğal ve edinilmiş immünitede, anjiogenezin oluşmasında, adezyon moleküllerinin artışında, lenfosit aktivasyonunda, hücre proliferasyonunda ve apoptoziste rol oynayan proinflamatuvar özelliklere sahip bir sitokindir. Çalışmalar sonucunda TNF- $\alpha$ 'nın inflamatuvar olaylarda önemli rol aldığı, enfeksiyöz ajan varlığında ya da doku hasarında ilk 8 saat içinde TNF artışı gözlenerek, bu artış hasarın 24. saatine gelindiğinde en üst seviyelere ulaştığı ve devam eden uyarın varlığında ise paralel olarak salınımının devam ettiği bildirilmiştir (107,110).

TNF- $\alpha$  sinyal iletim yolları oldukça karmaşıktır ve bu yolaktaki en önemli transkripsiyon faktörü NF- $\kappa$ B aracılığı ile düzenlenmektedir. NF- $\kappa$ B aracılı sinyal yolunda yaklaşık 300 kadar molekülün varlığı bildirilmiştir (111).

Endotelial hücreler ve lökositler inflamasyon regülasyonu ile aktivitelerine bağlı olarak proinflamatuvar veya antiinflamatuvar sitokinler üretirler. TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinler akut ve kronik inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde önemli rollerinin olduğu bildirilmiştir (112).

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 ve , IL-1 beta gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarır, MCP-1, MIP-2, RANTES, IP-10 ve MIP-1 $\alpha$  kemokinlerin artışını sağlar ve endotel adezyon moleküllerinden endotelial lökosit adezyon molekülü (ELAM)-1, intrasellüler adezyon molekülü (ICAM)-1, E-selektin için güçlü bir aktivatördür.

TNF reseptörleri pek çok hücre ve dokuda sentezlense de, TNF- $\alpha$ 'ya ait çoğu proinflamatuvar etki, vasküler endotel üzerinden endotel-lökosit etkileşimi ile gerçekleşmektedir.

Sonuçta TNF- $\alpha$  antijenden bağımsız olarak pek çok farklı lökosit grubunu harekete geçirir ve TNF- $\alpha$ 'nın bu tip fonksiyonları, inflamatuvar reaksiyonlarla ilişkili olayların başlatılmasından ve sürdürülmesinden sorumludur (113-115).

## **2.7. Nükleer Faktör-KappaB (NF- $\kappa$ B) Ailesi**

Nükleer faktör kappa-B (NF- $\kappa$ B) sitoplazmada inaktif halde bulunan indüklenebilir, hücre içi ve dışı uyarılara (oksidatif stres, bakteriler, virüsler, büyüme faktörleri, kemoterapötik ajanlar, çeşitli ilaçlar, fiziksel ve fizyolojik uyarılar) yanıt olarak eyleme geçerek aktif hale geldiğinde nükleus içinde ihtiva eden ve birçok genin ekspresyonunda, inflamatuvar genlerin üretiminden sorumlu olan redoks-duyarlı transkripsiyon faktörüdür. Büyüme, inflamasyon, yaralanma veya enfeksiyonlarda vücudun tepkisi olarak ifade edilen bir proteindir.

NF- $\kappa$ B, 1986 yılında yapılan çalışmalar neticesinde Baltimore ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. İlk olarak farelerde B lenfositlere özgü immunoglobulin K hafif zincir (light chain) geninin ekspresyonunu düzenleyen, 10 baz çifti uzunluğundaki bir DNA bölgesine bağlanmış transkripsiyon faktörü olarak bilinen NF- $\kappa$ B, zamanla pek çok organizmada ve hücre tipinde mevcut olan, birden fazla gen ifadesinin düzenlenmesinde büyük öneme sahip regülatör bir protein olduğu tespit edilmiştir (116,117).

Yapılan çalışmalar, tümörlerde NF- $\kappa$ B'nin tamamen veya sürekli baskılanmasının hücre çoğalmasını önlediği, hücre döngüsünü engellediği ve apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (118-120).

NF- $\kappa$ B ailesinin üyesi olan beş protein bulunmuştur. Bunlar NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B (p52/p100), RelA (p65), RelB, c-Rel'dir. NF- $\kappa$ B ailesi, nükleer translokasyondan sorumlu olan korunmuş bir Rel-homoloji alanı (RHD) içerirler. RHD, proteinlerin amino uçlarında olup yaklaşık 300 aminoasitlik bir bölgeyi ifade eder. RHD, DNA bağlama, NF- $\kappa$ B'nin intraselüler inhibitörü olan I $\kappa$ B ile etkileşimi, protein dimerizasyonu gibi görevlere sahip olduğundan dolayı DNA'ya bağlanma, inhibitöre bağlanma, dimerizasyon sağlayan ve nükleer lokalizasyon sinyal (NLS) gibi korunmuş diziler içeren bölgelere sahiptir (121-123).

Rel-A, RelB ve c-Rel proteinleri; C-terminal bölgelerinde transaktif domaini içermektedirler. Bu domain NF- $\kappa$ B aracılı gen transaktivasyonundabüyük öneme sahiptir. p50 ve p52'nin 17 prekürsör molekülünün (p105 ve p100) C terminal bölgesi I $\kappa$ B ailesi üyelerinde de bulunmaktadır. I $\kappa$ B ailesi üyeleri I $\kappa$ Ba, I $\kappa$ Bb, I $\kappa$ BE, Bcl-3'dür (124).

NF- $\kappa$ B ailesinin tüm alt birimleri, diğer NF- $\kappa$ B ailesinin proteinleriyle birlikte, kendilerinin transkripsiyonel olarak aktif ve baskılayıcı formlarını oluşturan homodimerler ve/veya heterodimerleri oluştururlar. NF- $\kappa$ B, genom üzerinde bağlanma bölgesi kB (promotör ve enhancer bölgelerinin içeren) bazı özel DNA dizilerine dimerik formda bağlanarak bir çok genlerin ekspresyonunu düzenler. NF- $\kappa$ B aktivasyonu aracılığı ile inflamasyon, proliferasyon, invazyon, proliferasyon, anjiyogenez ve metastaz oluşumuyla ilgili genleri düzenler (125,126).

NF- $\kappa$ B'nin aktivasyon yolu;

NF- $\kappa$ B dimerleri hücre sitoplazmasında I $\kappa$ B olarak ifade edilen inhibitör proteine bağlı, inaktif halde bulunmaktadır (127). I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B'nin uyarı düzenleyici proteinleridir. I $\kappa$ B'lerin fosforilasyonu ile I $\kappa$ B'ler ubiquitinasyona uğrayarak proteolitik yol ile yıkılırlar. Böylece NF- $\kappa$ B aktive olur ve I $\kappa$ B'ye bağlı halde bulunan NF- $\kappa$ B nükleer translokasyona uğrar. Aktif hale gelen NF- $\kappa$ B nükleusta transkripsiyonu başlatır. Bu yüzden NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonundaki önemli basamak I $\kappa$ B'lerin fosforile olmasıdır ve sonunda I $\kappa$ B kinaz (IKK) kompleksi meydana gelir. NF- $\kappa$ B'nin sitokin bağlı olarak aktive olmasında IKK'nin rolü bulunmamaktadır; IKK proinflamatuvar uyarılar aracılığıyla NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonunda rol almaktadır. Ökaryotik hücrelerde, transkripsiyon faktörü olarak görev yapan NF- $\kappa$ B, inflamatuvar ve immün yanıtların ana düzenleyicisidir. Proliferasyon, inflamasyon, hücre büyümesi ve farklılaşması, lenfosit aktivasyonu, hücre sağkalımı, apoptoz ve nekroz gibi hücrel olaylarda ve immün yanıtın oluşturulmasında rol oynar (127,128).

Organ sisteminde pek çok önemli hastalıkların patofizyolojisinde etkin rol alır. NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu esnasında oluşan bir hata, hücreyi ölüme götüren apoptozisi ve nekrozisi tetikler. NF- $\kappa$ B aracılı olaylar, doğal ve edinsel immün yanıtları ilgilendiren 200'den fazla genin aktivasyonuna veya baskılanmasına sebep olmaktadır. NF- $\kappa$ B; immunreseptörler, sitokinler, hücre adezyon molekülleri, büyüme faktörleri ve bazı akut faz proteinlerini sentezleyen genlerin ekspresyonundan sorumludur. NF- $\kappa$ B, pek çok ajanla ve koaktivatörlerle birlikte tüm hücre tiplerinde aktifleşebilir. Bunlara sitokinlerden IL-2, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,



kemokinlerden IL-8 gibi, koloni stimüle edici faktörlerden G-CSF ve GM-CSF gibi ve bazı interferonlar örnek olarak verilebilmektedir.

NF- $\kappa$ B'nin uygunsuz aktivasyonu; otoimmün hastalılar, artrit, astım, akciğer fibrozisi, aterosklerozis ve AIDS gibi bazı inflamatuvar hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. NF- $\kappa$ B aktivasyonu, tümör hücrelerinin proliferasyonunu, anjiogenezi, invazyonu ve metastazı yönettiği gösterilmiştir (129-131).

## 2.8. PARP-1

PARP ailesi DNA hasarında, DNA onarımı ve stabilitesinin korunması için önemli göreve sahiptir. PARP ailesinin prototip enzimi Poly (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1) dir. Özellikle ciddi DNA hasarında ortaya çıkan PARP-1 aktivasyonu hücredeki substratı olan NAD'ın hücredeki miktarının tükenmesine sebep olur. Bu yüzden NAD'ın tekrar sentezlenmesi için hücrede ATP kaybı yaşanır. Hücrenin yüksek enerji kaybetmesi ise hücrenin ölümüne yol açmaktadır (132). Poli (ADP-riboz) polimeraz aktivitesine sahip 18 farklı PARP homoloğu bulunmaktadır. PARP homologları arasında en çok PARP-1 araştırılmaktadır. Poli ADP-ribozilasyonun %90'ı PARP-1 tarafından gerçekleştirilmektedir. PARP-1 DNA onarımının dışında genomik stabilitenin korunması, genotoksik strese dirençlilik, hücre içinde aşırı NAD<sup>+</sup> tüketimi sonucunda nekrotik hücre ölümü ve patolojik durumlardaki rolü, transkripsiyonel düzenlenme, telomer uzunluğunun düzenlenmesi, sentrozomal fonksiyon, nükleer proteozomal fonksiyonun düzenlenmesi, protein degradasyonunun düzenlenmesi ve endozomal vezikül alışverişinin düzenlenmesi gibi fizyolojik görevlere sahiptir (133).

Poli (ADP-ribozilasyon) reaksiyonu DNA hasarı, hücre ölümüne ve inflamasyona karşı meydana gelen hücresel bir yanıttır. PARP ailesine ait 16 dan fazla enzim farklı DNA onarım yollarında bu reaksiyonu gerçekleştirmek suretiyle fonksiyon göstermektedir (134).

PARP pek çok dokuda farklı düzeylerde bulunabilmektedir. Özellikle testis, timus ve dalakta mRNA'sının yüksek düzeyde varlığı bildirilmiştir (135). PARP-1 Proteininin Genel Yapısı ve Mekanizmasına bakacak olursak, yüksek derecede korunmuş nükleer bir protein olan PARP-1, yapısında 3 domain içermektedir. Bu domainler N Terminal ucunda bulunan 42 kDa'luk DNA bağlayıcı domain,

C terminal ucunda 55 kDa'luk kataletik domain ve bu iki terminal ucun ortasında 16 kDa'luk otomodifikasyon domaini bulunmaktadır (133).

N terminal uçta bulunan DNA bağlayıcı domain DNA kırıklarına karşı afinite göstermektedir. Yapısında iki çinko parmak bulunmaktadır. Bunlardan ilki DNA'nın hem tek hem de çift zincir kırıklarına bağlanabiliyorken, ikinci olanı ise sadece tek zincir kırıklarında bağlanabilmektedir (136). PARP-1'in otomodifikasyon domeini içinde bulunan BRCA-1 geni glutamat redidülerince zengin bir yapıya sahiptir. Bu rezidüler poli (ADP-ribozilasyon) reaksiyonunun gerçekleştiği ana yerdir.

C terminal uçta bulunan 55 kDA uzunluğundaki katalitik domain ise NAD<sup>+</sup> moleküllerinin bağlanma, ADP ribozil transferi ve dallanma reaksiyonları için gereken redizüleri içermektedir. DNA hasarını indükleyen uyarılara karşı en hızlı yanıtı vermektedir. DNA hasarı olmadığı durumlarda poli (ADP-ribozilasyon) nadiren gerçekleşirken DNA hasarının arttığı durumlarda PARP aktivitesi de paralellik gösterir ve artışa uğrar. Böylece hücrelerde bazal seviyede eksprese edilen PARP-1, DNA zincir kırıkları ile aktive olarak ekspresyon artışı gerçekleşir (133,136).

## 2.9. Curcumin

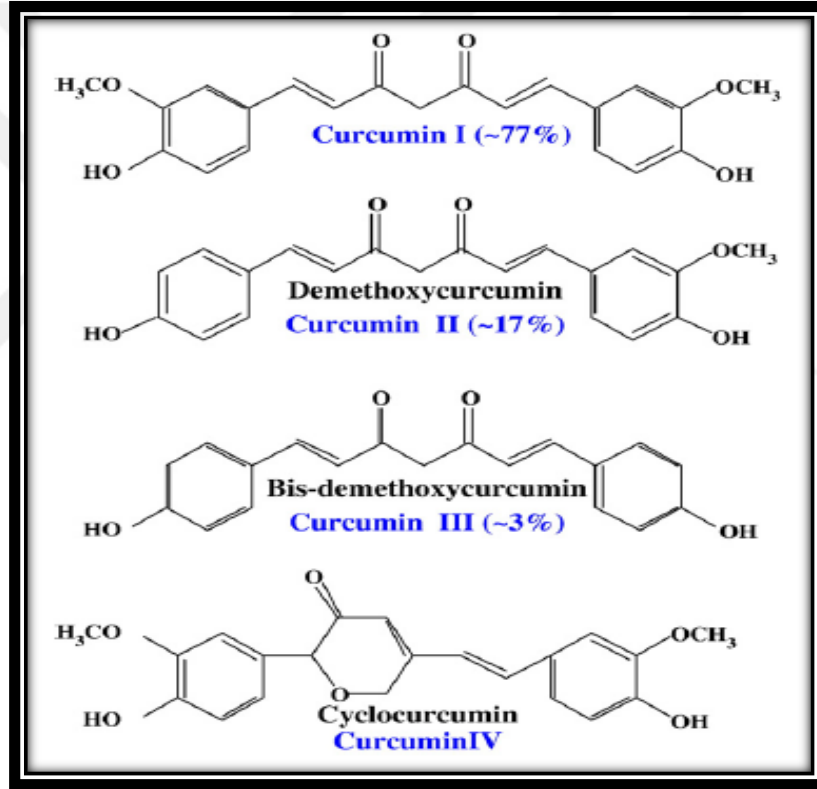
Zerdeçal (*Curcuma Longa*, Turmerik, Hint safranı, safran kökü, Terra Merita, Yo-Kin) Çin, Pakistan ve Hindistan'da yaygın olarak yetiştirilen Zingiberaceae familyasından sarıçiçekli, büyük yapraklı ve yumru lu çok yıllık otsu bir bitkidir. Curcumin, zerdeçal yumrularından elde edilen sarı renkli bir pigmente sahiptir. Zerdeçalın en aktif bileşeni olan curcuminler, bitkinin %2 ila %5'ini oluşturur. Curcumin turuncu-sarı renkli olup hidrofobik bir polifenoldür. Toz halinde ya da parmak şeklinde bulunur. Yemeklerde baharat olarak kullanılmaktadır (13,137,138).

Gıda ve kozmetik gibi alanların yanısıra Ayurveda'da (Hint Tıp Sistemi) çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılmıştır (139). Curcumin, vitamin E ve C kadar güçlü antioksidan özelliğe sahiptir. Curcuminin antioksidan, antibakteriyel ve antiinflamatuvar özelliğinin yanısıra, immunosupresif, antianjiyojenik, antiviral, antifungal, proapoptotik, kemoterapötik, kemopreventif, antidiyabetik, yara

iyileşmesi gibi farmakolojik aktivitelerinin de olduğu bildirilmiştir. Halen pek çok bilimsel çalışmada tedavi edici bir ajan olarak kullanılmaktadır (13,14).

### 2.9.1. Curcuminin kimyasal ve fiziksel özellikleri

Curcumin, zerdeçalden ilk olarak Vogel ve Pelletier tarafından 1815 yılında saf olmayan bir formda izole edilmiş olup, 1910 yılında kimyasal olarak kullanılmaya başlanan curcuminin moleküler yapısı [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] Milobedzka tarafından belirlenmiştir. 1913 yılında ise Lampe tarafından sentezi gerçekleştirilmiştir (14).



Şekil 7. Curcuminin kimyasal yapıları (140).

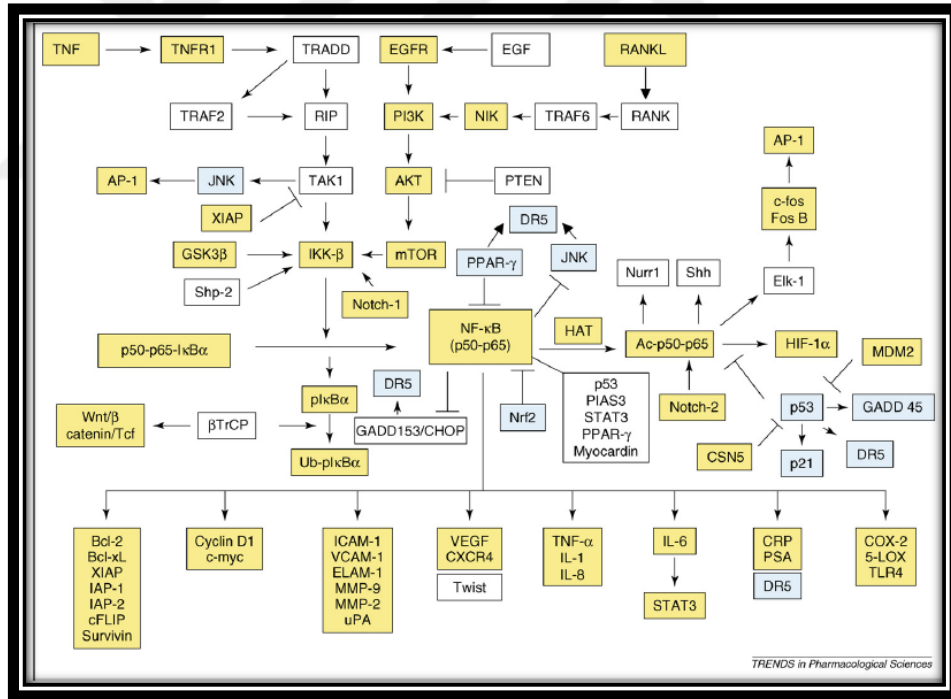
Curcumin (diferuloilmetan), demethoksicurcumin (p-hidroksikinnamoilferuloil-metan), bis-demethoksicurcumin (pp'-dihidroksi-dikinnamoilmetan) ve siklocurcumin olmak üzere 4 farklı curcuminoid vardır. Zerdeçalın yaklaşık %77'si curcumin (I), %17'si dimetoksicurcumin (II), %3'ü bisdemetoksicurcumin (III) ve cyclocurcumininden oluşur (140).

Curcuminin hidroksil grupları antioksidan özelliği gösterirken metoksi grupları ise antiinflamatuvar ve antiproliferatif özelliklerini açığa çıkartır (14,141).

Curcumin, hidrofobik özelliğinden dolayı suda çözünmez fakat DMSO, etanol, metanol, kloroform ve asetik asit gibi organik yapıları çözücülerde iyi çözünmektedir. Curcumin pH 7'nin üzerindeki bazik değerlerde enol formu baskınken, pH 7 ve altındaki değerlerde yani asidik ve nötral pH'da iken keto formu baskındır. Curcuminin pH'sı nötral ve asidik değerlerde iyi bir H atom donörüken, pH'ın bazik olduğu değerlerde ise elektron donörü gibi davranmaktadır. Bu özellik fenolik antioksidanların bağlanması için önemli bir mekanizmadır (142,143).

Bazik pH'a karşı dayanıksız olan curcumin, pH'ın bazik olduğu değerlerde sarı renkten kırmızıya dönüşür. Curcuminin erime noktası 183 °C'dir. Moleküler formülü C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>, moleküler ağırlığı ise 368.385 g/mol'dür (14,141,144,145).

## 2.9.2. Curcuminin moleküler etki basamakları



**Şekil 8.** Curcuminin hücre sinyal yolları. Curcumin tarafından upregüle olan moleküller mavi kutu, downregüle olanlar sarı kutu ve etiketlenmeyenler ise beyaz kutu içerisinde belirtilmiştir (14).

Yapılan çalışmalar sonucunda curcuminin çeşitli moleküler hedefleri modüle ederek farmakolojik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Bu hedefler, transkripsiyon faktörleri (NF- $\kappa$ B, p53, CHOP, SP-1, AP-1, STAT, Notch-1), büyüme faktörleri (VEGF, EGF, FGF vb), büyüme faktörü reseptörleri (EGFR, HER-2), inflamatuvar sitokinler (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  vb), protein kinazlar (MAPK, JAK, IRAK vb), kemokin ve kemokin reseptörler (CXCL1, CXCL2, CXCL4), çeşitli enzimler (COX-2, LOX, MMPler), invazyon ve anjiyogenez belirteçleri (MMP-9, VEGF, uPA), adezyon molekülleri (ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1), apoptoz ilişkili proteinler (Bcl-2, kaspazlar, Fas), glutatyon, albümin, amiloid protein, DNAPolimeraz gibi molekülleri içermektedir. Ayrıca Curcumin, çinko, demir, bakır ve manganez gibi bazı metal iyonlarına afinite göstermektedir (14,146).

### **2.9.3. Curcumin'in antioksidan ve anti-inflamatuvar etki mekanizması**

Özellikle dimetile edilmiş olan curcumin türevleri lipid peroksidasyonuna karşı daha güçlü bir etkiye sahiptirler. Dimetile edilmiş curcuminler ve doğal curcuminler ile yapılan çalışmalar sonucunda en güçlü biyolojik etkiye sahip Curcumin III'ün antitümör ve antioksidan özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Curcuminin doğal olarak eldesinin ekonomik olmadığından, doğal curcumine benzer yapıda olan sentetik Curcumin III'ün kullanımı yaygındır.

Doğal curcuminlerin tümü güçlü hidroksil radikal temizleyici ve süperoksit radikal tutucu özelliğe sahiptirler. Bu nedenle curcuminler antioksidan ve kemopreventif özellik gösterirler (147,148,149).

Curcuminin en önemli yıkım ürünleri ferulik asit ve vanilindir. Bunlar iyi bilinen antioksidanlardır. Ferulik asitin hidroksil ve peroksil radikal oksidasyonuna karşı antioksidan koruma sergilediği gösterilmiştir (150,151).

Proinflamatuvar sitokin olan TNF- $\alpha$ 'nın sinyalizasyonunu ve ekspresyonunu bloke eder. Çeşitli karsinojenlere, büyüme faktörlerine ve inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak aktive edilen transkripsiyon faktörü NF- $\kappa$ B'nin baskılanmasıyla curcuminin antiinflamatuvar etkileri ortaya çıkar (152). Bunun yanı sıra bu mekanizmaya, proinflamatuvar enzimler olan COX-2, iNOS ve 5-LOX gibi enzimlerinin oluşumunun engellenmesi ve curcuminin ortaya çıkan enzimlere bağlanarak aktivitelerinin baskılanmasının da aracılık ettiği tespit edilmiştir (153,154).

Curcumin NF- $\kappa$ B aktivasyonunun sebep olduğu proliferasyonu inhibe ederek, prostat kanseri, multipl miyelom, mantel hücre lenfoması, mesane kanseri, melanom, pankreatik kanser, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinoması (HNSCC), yumurtalık kanseri, glioblastoma ve akciğer kanseri gibi hastalıkların tedavisi için yardımcı bir ajan olabilmektedir (145).

Curcuminin, inflamatuvar sitokinler (IL-6 vb.) ve büyüme faktörleri tarafından indüklenen STAT3'ün aktivasyonunu azaltmasıyla antiinflamatuvar etki göstermektedir (155,156).

Multipl miyelomda ve HNSCC'de aktif STAT3'ün baskılanması curcuminin antiproliferatif etkileriyle ilişkilendirilmiştir. Curcuminin hem antiproliferatif hem de antiinflamatuvar aktivitelerinin, prooksidan mekanizmaları aracılığıyla oluştuğu gösterilmiştir (157-159). Curcumin tedavisinin beyaz adipoz dokuda makrofaj infiltrasyonunu anlamlı derecede azalttığı, adipoz dokuda adiponektin yapımını artırdığı hepatik NF $\kappa$ B aktivitesini, hepatomegaliyi ve hepatik inflamasyon belirteçlerini azalttığı gösterilmiştir.

Curcumin aynı zamanda inflamatuvar etkinin oluşmasından sorumlu sitokinlerin (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ ), monosit kemoatraktan proteinin (MCP), migrasyon inhibitör proteinin (MIP), hücre yüzeyinde bulunan adhezyon moleküllerinin ve protein kinazların oluşumunu baskılayarak antiinflamatuvar etki oluşturmaktadır (160).

#### **2.9.4. Antiapoptotik etki mekanizması ve tümör hücrelerinde apoptozis mekanizması**

Yapılan bir çalışmada, sıçan testislerinde kadmiyumla indüklenmiş apoptozisi, curcumin uygulaması sonrasında anti-apoptotik etki gösterdiği ve kadmiyum toksisitesine karşı testisi koruduğu gözlemlenmiştir (161). Curcumin, apoptozis ile ilişkili olan Fas-Fas-L genlerinin ekspresyonunu inhibe etmektedir (162). Curcumin tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen TrxR ile etkileşir ve bunu NADPH oksidaza dönüştürür, böylece tümör hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretiminin artmasına neden olur (163). Ayrıca, glutatyon seviyeleri tümör hücrelerinde normal hücrelerden daha düşüktür, bu sayede tümör hücrelerinin curcumine duyarlılığı artar (164). Çoğu tümör hücresi, yapısal olarak aktif NF- $\kappa$ B eksprese ederek sağ kalımlarını idame ettirirler (165). Curcumin, NF- $\kappa$ B ile regüle edilmiş gen

ürünlerinin baskılanmasıyla tümör hücrelerinin sağ kalımını ve proliferasyonunu önleyebilir. Çalışmaların çoğunda curcumin tümör hücreleri üzerinde selektif bir etki göstermesine rağmen, AP-1 inhibisyonu ile insan epidermal keratinositlerinin apoptoza maruz kaldığı gösterilmiştir (166).

Curcumin tümör hücrelerine karşı güçlü bir kemosensitif ve radyosensitiftir. Curcumin, kemoterapötik ajanlara ve alfa radyasyona duyarlı tümör hücrelerinde NF- $\kappa$ B ve NF- $\kappa$ B ile regüle edilmiş gen ürünlerini baskılamıştır (167). Curcuminin tümör hücrelerinde apoptozis aktivasyonu, poli (ADP-Riboz) polimeraz (PARP) bölünmesi ve Kaspaz-3 aktivasyonu, Kaspaz-9 aktivasyonu, sitokrom c serbestlenmesi, Bcl-2 etkileşim domaini (BID) bölünmesi, Kaspaz-8 ardışık aktivasyonu ile gerçekleşir. Bu şekilde apoptozisin mitokondriyal yolu belirlenmiştir (168,169).

Belli hücrelerde curcuminin apoptotik etkisi c-jun-N-terminal kinazın (JNK) aktivasyonu ile bağlantılıdır. Curcumin ayrıca tümör kaynaklı T hücresi apoptozisini önler (170,171).

#### **2.9.5. Curcuminin DNA hasarına karşı etkisi**

Curcumin  $\beta$  pozisyonunda bağlı 2 keton grubu içerdiğinden dolayı bir  $\beta$ -diketon bileşiktir. Curcumin fenolik yapıya sahip olması ve  $\beta$  diketon türevi sayesinde ayrıca COX-1 ve COX-2 inhibitörü olarak, mikrozomal lipid peroksidasyonunu ve oksidatif DNA hasarını ve inhibe edici görev yapmaktadır (172-174).

#### **2.9.6. Curcuminin sperm ve testosterona etkisi**

Yapılan bir çalışmada curcuminin sperm konsantrasyonuna, motilitesine, fonksiyonuna, dölleme yeteneğine ve kapasitasyon/akrozom reaksiyonuna ilişkin etkilerinin olduğu fakat bu etkilerin doz-bağımlı olduğu bildirilmiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki curcuminin fertilitateye olumsuz yönde etkilerinin bulunduğu ve toksik dozun altında olan konsantrasyonlarda ise tam tersi etki gösterdiği belirtilmiştir (175). Toksik sınırı aşmadan kullanılan curcuminin, testiküler dokularda koruyucu etkisinin bulunduğu ve testosteron üretiminde görevli olan enzimlerin sentezini artırarak testosteron düzeyinin artışı sağladığı bildirilmiştir (176,177).

### **2.9.7. Radikal süpürücü etkisi**

Curcumin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> başta olmak üzere süperoksit anyonlarının, hidroksil radikalleri ve nitrojen dioksit radikalleri gibi pek çok serbest radikalın atılımını kolaylaştırır ve oksidatif stresi azaltmaktadır. Ayrıca deney hayvanları kullanılan bir çalışmada lipit peroksidasyonu, lipit degradasyonunu ve sitozilini inhibe ederek dokuyu koruduğu bildirilmiştir (13,178,179).





### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan gereç ve yöntemler aşağıda açıklanmıştır.

#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, 3,5 - 4 aylık, ağırlıkları 250-350 g arasında değişen 40 adet erkek *Wistar albino* sıçan kullanıldı. Tüm denekler, deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşulları ( $22\pm 1$  °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle beslendi. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip erkek deneklerden, vücut ağırlıkları birbirine yakın olanlar aynı grupta olacak şekilde; Kontrol, Nandrolon Decanoate (ND), Curcumin, Nandrolon Decanoate+Curcumin deney grubu olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu.

**I. Grup (n=10):** 8 Hafta boyunca, haftada bir defa intramüsküler enjeksiyon (im) ile fıstık yağı/benzil alkol karışımı (90:10 v/v) ve gavaj yolu ile her gün dimetilsülfoksit (DMSO- Curcuminin çözücüsü) verilen, **Kontrol grubu.**

**II. Grup (n=10):** 8 Hafta boyunca, haftada bir defa gluteal kasa im enjeksiyon ile 10 mg/kg dozda Nandrolon Decanoate ve gavaj yolu ile her gün DMSO verilen **Nandrolon Decanoate** grubu.

**III. Grup (n=10):** 8 Hafta boyunca haftada bir defa gluteal kasa im enjeksiyon ile fıstık yağı/benzil alkol karışımı (90:10 v/v) ve her gün gavaj yolu ile DMSO içinde çözülen 100 mg/kg dozda curcumin verilen, **Curcumin grubu.**

**IV. Grup (n=10):** 8 Hafta boyunca, haftada bir defa gluteal kasa im enjeksiyon ile 10 mg/kg dozda Nandrolon Decanoate ve her gün gavaj yolu ile DMSO içinde çözülen 100 mg/kg dozda curcumin verilen, **Nandrolon Decanoate + Curcumin grubu.**

#### 3.2. Kimyasallar

Nandrolon Decanoate olarak, BVS Labs Decanoate 200 (2000mg) ürünü kullanıldı. Curcumin olarak, Sigma firmasına ait C1386 Curcuma longa (Turmeric)

powder adlı ürünü kullanıldı ve -20 °C'lik buzdolabında saklandı. Dimetil Sülfoksit (DMSO), sigma firmasına ait 276855- 250ml DMSO ürünü kullanıldı.

### **3.3. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü**

Deney başından itibaren hayvanların vücut ağırlıkları uygulanacak madde dozlarını belirlemek üzere günlük olarak tartıldı. Deney sonunda vücut ağırlıkları tartılarak her bir denek için vücut ağırlığı (g) hesaplanarak kaydedildi.

### **3.4. Dokuların Alınması**

Denekler 8. Haftanın sonunda vücut ağırlıkları ölçülüp kaydedildikten sonra intraperitoneal (i.p.) yoldan 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/Türkiye), 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye) verilerek anestezi altında deneklerin karın bölgesi açılarak testisler ve epididimler çıkarıldı.

### **3.5. Testis Ağırlıklarının Ölçümü**

Çevre dokularından iyice temizlenen testislerin her biri Ohaus (Adventurer Pro AV264C) marka hassas terazi ile tartıldı. Testis ağırlıkları her sıçan için ayrı ayrı sağ ve sol olmak üzere tartılarak kaydedildikten sonra, sağ testisler %10'luk formaldehit çözeltisine ve sol testisler -80 °C'lik dondurucuya konuldu.

### **3.6. Sperm Değerlendirmesi**

Sperm değerlendirme için, erişkin her bir denegin sağ epididimleri kullanıldı. Epididimisin kauda kısmı alt ve üst uçlarından kesilerek yaklaşık 1cm büyüklüğünde çıkartıldı. Ağırlıkları tartıldıktan sonra sağ epididimlere bistüri ucuyla çizikler atılarak, içerisinde 1ml SF bulunan eppendorflara konuldu. 37 °C'lik su banyosunda 30 dk inkübe edildi. Bu şekilde hazırlanan örneklerde sperm konsantrasyonu, motilitesi, morfolojisi ve viabilitesi değerlendirildi.

Sperm konsantrasyonu ve motilite değerlendirmeleri; makler çemberinin (Makler Counting Chamber, Sefi Medikal, Haifa, İsrail) lamı üzerine 10 µl örnek damlatılarak Olympus BX-51 marka ışık mikroskopuyla yapıldı. Makler çemberi

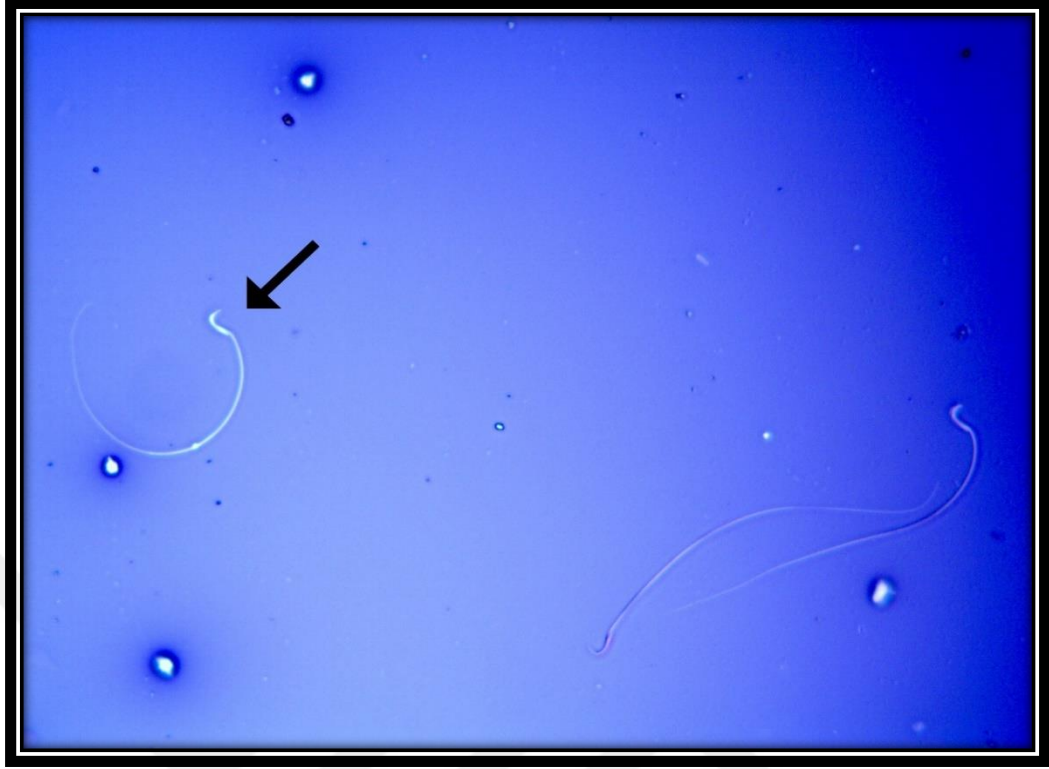
üzerinde rastgele 10 kareye denk gelen spermler, X200 büyütmede sayıldı. Elde edilen sonuç 1 milyon ile çarpılarak, mililitredeki sperm sayısı milyon cinsinden hesaplandı. Ayrıca sperm motilitesinin tayini için, 100 karedeki spermlerden hareketli ve hareketsiz olanlar ayrı ayrı sayılarak, yüzde oranları hesaplandı.

Sperm morfoloji değerlendirilmesi için, elde edilen örneklerden lam üzerine 20 µl damlatıldı, yayılarak kurutuldu. Her denek için bu şekilde hazırlanan lamlar Spermac Stain boya seti (Box 152. Wellington, 7654, South Africa) ile boyandı. Boyama protokolü; spermlerin temiz bir lam üzerine yayılıp, 10 dk kurutulmasının ardından, 15dk fiksatörde bekletildikten sonra distile su ile yıkanarak elde edilen lamların sırasıyla stain A, B ve C ile 90 ar saniye muamele edilmesi şeklinde uygulandı. Elde edilen preparatlar üzerinde, Olympus BX-51 ışık mikroskobunda X400 büyütmede morfoloji tayini yapıldı. Her denek için 100 sperm sayıldı ve bunlar morfolojik açıdan normal veya anormal (baş, boyun ve kuyruk defektli) olarak sınıflandırıldı. Normal sperm yüzdesi hesaplandı. Değerlendirmeler esnasında farklı morfolojiye sahip spermler fotoğraflandırıldı. Literatür bilgisine göre değerlendirildi (180-182).

Sperm canlılık testi için, eosin-nigrosin boyama yöntemi uygulandı. Bu boyama tekniği, cansız hücrelerin eozini alıp kırmızıya boyanmaları prensibine dayanır. Nigrosin ise, arka planı siyah yaparak değerlendirmeyi kolaylaştırır. Her denek için, VitalScreen sperm vitalite testi (VitalScreen, FertiPro, Belgium) prosedürüne uygun olarak preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlar, Olympus BX-51 ışık mikroskobunda, X400 büyütmede kurutulmadan hızlıca değerlendirildi. Sperm başları kırmızı (koyu pembe) boyanan spermler cansız, boyanmayanlar ise canlı sperm olarak belirlendi. Her denek için 100 sperm sayıldı ve canlılık oranı hesaplandı.

#### Boyama protokolü:

Test tüpü içerisinde, 50 µl sperm ve 2 damla Eosin Y karıştırıldı ve 10 dk bekletildi, karışıma 3 damla nigrosin eklenerek tekrar 10 dk bekletildi. Karışımdan 20 µl alınarak bir lam üzerine yayıldı, kurumadan mikroskop altında değerlendirilmesi yapıldı.



**Şekil 9.** Canlılık testi eosin-nigrosin boyaması. Ok işareti ile gösterilen renksiz sperm hücresi canlı, pembe olarak görülen diğer sperm hücreleri ise cansızdır (x20).

### **3.7. Histokimyasal İncelemeler**

#### **3.7.1. Dokuların hazırlanması**

Işık mikroskopik incelemeler için, her deneğin sağ testis dokusu %10'luk formaldehit çözeltisi içine alındıktan sonra enjektör ucu ile testislerin kapsüllerine delikler açıldı. Fiksatif içerisindeki testis dokuları sertleştikten sonra testisler enine olacak şekilde önce ortadan iki eşit parçaya ve daha sonra bu parçalar da yeniden ikiye bölünerek kasetlere alındı ve etiketlendi. Dokular %10'luk formaldehit fiksatifi içinde 2 gün boyunca bekletildi ve daha sonra rutin doku takibi işlemi uygulanarak her denek için parafin bloklar hazırlandı. Her testisten dört blok elde edildi. Parafin bloklar hazırlamak için kullanılan doku takip yönteminin basamakları Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Doku takibi basamakları ve uygulama süresi

Kimyasal Madde	Uygulama Süresi
%10'luk formaldehit çözeltisi	2 gün
Akan Su	1 gece
% 70 Alkol	1 gün
% 90 Alkol	1 saat
% 90 Alkol	1 saat
% 96 Alkol	1 saat
% 96 Alkol	1 saat
% 100 Alkol	1 saat
% 100 Alkol	1 saat
Ksilen I	7 dk
Ksilen II	7 dk
Sıvı Parafin	1 gün
Bloklama	

%10' luk formaldehit ile tespit edilen testis dokuları rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafin bloklar haline getirildi.

### 3.7.2. Boyaların hazırlanması

#### Periyodik Asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyasının hazırlanışı

Boyamada kullanılacak çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı.

1) Schiff Hazırlanışı: Boyamadan bir gün önce hazırlandı.

100 cc Distile su kaynatılıp, içerisine 1g bazik fuksin eklenerek solüsyon 60°C' ye kadar soğutuldu. Bu esnada devamlı karıştırıldı. Süzgeç kağıdı ile süzdürüldü. Süzmeden sonra solüsyonun içine 6g  $K_2S_2O_5$  ilave edildi ve iyice çözünmesi sağlandı. (Vişne çürüğü renginde bir solüsyon oluşmaktadır.) Karışıma yavaş yavaş 1N HCl (60cc) ilave edildi. Karışımı sıkıca kapalı bir şekilde 24 saat boyunca +4°C'de buzdolabında muhafaza edip ertesi gün 200 mg aktif kömür ilave edildi. Daha sonra süzgeç kağıdı ile stok schiff solüsyonu şişesi içine süzdürüldü. Süzme esnasında akan sıvının rengi açık sarı (şeffaf) göründe olmalıdır.

2) Yıkama Solüsyonu Hazırlanışı:

10 g  $K_2S_2O_5$ , 100 ml Distile suda çözüldü.

3) Periyodik Asitin Hazırlanışı:

1 g Periyodik Asit, 100cc Distile su içinde çözüldü.

### 3.7.3. Kesitlerin alınması ve boyanması

Her bloktan 5µm kalınlığında seri kesitler alınarak ışık mikroskopunda inceleme için testisin histolojik yapı özelliklerini ortaya koyacak Hematoksilen-Eozin (H-E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS)+Hematoksilen (H) ile boyandı. Boyama işlemi basamakları ve uygulama süreleri Tablo 2 ve Tablo 3' de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama basamakları ve uygulama süreleri.

Kimyasal Madde	Uygulama Süresi
<b>Ksilen I</b>	15 dk
<b>Ksilen II</b>	15 dk
<b>Ksilen III</b>	15 dk
<b>% 100 Alkol</b>	1 dk
<b>% 96 Alkol</b>	3 dk
<b>% 90 Alkol</b>	5 dk
<b>% 70 Alkol</b>	5 dk
<b>Durgun su</b>	5 dk
<b>Hematoksilen (Mayer'in Hematoksilen'i (Bio-optica, 0506002/L))</b>	12 dk
<b>Asit Alkol</b>	Batır- çıkar
<b>Akan su (Morartma)</b>	30 dk
<b>Eozin</b>	5 dk
<b>% 70 Alkol</b>	Batır- çıkar
<b>% 90 Alkol</b>	Batır- çıkar
<b>% 96 Alkol</b>	Batır- çıkar
<b>% 100 Alkol I</b>	10 dk
<b>% 100 Alkol II</b>	10 dk
<b>Ksilen I</b>	15 dk
<b>Ksilen II</b>	15 dk
<b>Ksilen III</b>	15 dk
<b>Lamların Kapatılması (Entellan, MERK)</b>	

**Tablo 3.** PAS+Hematoksilen boyama basamakları ve uygulama süreleri.

Kimyasal Madde	Uygulama Süresi
<b>Ksilen I</b>	<b>15 dk</b>
<b>Ksilen II</b>	15 dk
% 100 Alkol	1 dk
% 96 Alkol	2 dk
% 90 Alkol	3 dk
% 70 Alkol	5 dk
Durgun su	3 dk
Periyodik Asit Solüsyonu	15 dk
Akan su	10 dk
Distile su (3 kez)	Çalkalama
Schiff Solüsyonu (karanlık ortamda)	20 dk
Yıkama Solüsyonu I	5 dk
Yıkama Solüsyonu II	5 dk
Yıkama Solüsyonu III	5 dk
Akan su	5 dk
Hematoksilen	8 dk
Akan su (Morartma)	20 dk
% 70 Alkol	2-3 kez çalkalama
% 90 Alkol	2-3 kez çalkalama
% 96 Alkol	3 dk
% 100 Alkol I	10 dk
% 100 Alkol II	10 dk
<b>Ksilen I</b>	15 dk
<b>Ksilen II</b>	15 dk
<b>Lamların Kapatılması (Entellan, MERK)</b>	

#### 3.7.4. Histolojik değerlendirme

Histolojik değerlendirmesi için H-E ve PAS+H ile boyanan kesitlerin histolojik değerlendirmesi için Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus Corp.Tokyo, Japonya) kullanıldı. Tüm deneklere ait preparatlar bu mikroskopta incelenerek, fotoğrafları çekildi.

### 3.7.5. Histopatolojik değerlendirme

Çalışmada oluşturulan tüm deney gruplarındaki sıçanlar için hazırlanan testis dokusuna ait preparatlarda 10 adet seminifer tübülü ve interstisyel alanı kosentino skorlamasına göre değerlendirdik. Bu skorlamada;

#### Seminifer tübül için

- Spermatozoa ve spermatid kaybı
- Germ hücre tabakası yokluğu
- Germ hücre tabakası dejenerasyonu
- Germ hücre tabakası düzensizleşmesi
- Tübülün parçalanması
- Myoid hücre tabakası kalınlaşması
- Parçalanmış tübüllerde Leydig hücre reaksiyonu

#### İnterstisyum için

- Leydig hücre proliferasyonu
- Ödem
- Hemoraji
- Granüloma
- Fibrozis

gibi parametreler 0-4 arası sayısal değerlerde puanlayarak histopatolojik değerlendirme yapılmaktadır. Çalışmamızda granüloma ve fibrozis görüldüği için bu parametreleri kullanmadan skorlamamızı gerçekleştirdik (183).

### 3.8. İmmünohistokimyasal İncelemeler

DNA hasarının göstergesi olarak testis dokusunda DNA onarıcı bir enzim olan PARP-1, apoptoz belirteci olarak Kaspaz-3, inflamatuvar belirteçlerden Nf-κB ve TNF-α ekspresyon düzeylerindeki değişimler immünohistokimyasal yöntem ile gösterildi. İmmünohistokimyasal boyamalar için parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler, pozitif şarjlı lamlara alındı. Deparafinizasyon işleminin için ilk önce 58°C' etüvde 1 gece bekletildi ve akabinde 15'er dakikalık üç ksilen



banyosundan geçirildi. Hidratasyon için, 5'er dakika süre ile %100, 96%, 90%, 70%' lik alkol serilerinden geçirilen kesitler, distile suya alındı. Daha sonra fosfat tamponu solüsyonu (PBS; pH 7.6) ile (2x5 dk) yıkandı. Hücre membranlarını parçalamak için, PBS içerisinde Triton X maddesi kullanılarak oluşturulan solüsyon içinde 5 dk bekletildi. PBS ile (2x5 dk) yıkandı. Daha sonra çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, distile su ve PBS' den geçirildi. Nemli kabine alınan kesitler endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla % 3'lük hidrojen peroksit ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Distile sudan geçirilen kesitler PBS ile yıkandı. Spesifik olmayan antikor bağlanmalarını engellemek üzere kesitlere %1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) uygulandı. Daha sonra kesitler nemli kabin içinde primer antikor (Rabbit polyclonal IgG PARP-1 (Kat. No. Ab6079, Abcam, USA), Caspase-3 Antibody (#9662S CELLSIGNAL), NF-κB p65 (D14E12) XP® Rabbit mAb 8242S CELLSIGNAL, Anti-TNF alpha antibody (ab6671) ABCAM) ile 1 saat inkübe edildi. Ardından PBS de (2X5 dk) yıkandı. Nemli kabine yerleştirilen kesitler 30 dk sekonder antikor (Dako Biotinylated Link, K0609) ile muamele edildi. Bu işlemin hemen ardından PBS'le (2X5 dk) yıkayıp streptavidin (Streptavidin HRP, Dako, K0609) damlatılıp 10 dakika inkübe edildi. Bu uygulamadan sonra da PBS ile (2X5 dk) yıkama yapıldı. Nemli kabindeki kesitlere kromojen damlatıldı [3',3'-diaminobenzidine (DAB), Vector, SK-4100]. Mikroskop başında boyanma kontrolü sağlandıktan sonra, kromojen reaksiyonunu kesmek için kesitler distile suya alındı. Yıkamanın ardından 1dk Mayer'in Hematoksilen'i (Bio-optica, 0506002/L) ile zıt boyama yapıldı. Akarsuda 5 dk yıkanan kesitler entellan kullanılarak (Merk) lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda semikantitatif olarak histolojik skorlama (H-skor) yapılarak değerlendirildi.

**Tablo 4.** İmmünohistokimyasal boyama basamakları ve uygulama süresi.

Kimyasal Madde	Uygulama Süresi
<b>Ksilen I</b>	<b>15 dk</b>
<b>Ksilen II</b>	15 dk
<b>Ksilen III</b>	15 dk
<b>% 100 Alkol</b>	5 dk
<b>% 96 Alkol</b>	5 dk
<b>% 90 Alkol</b>	5 dk
<b>% 70 Alkol</b>	5 dk
<b>Distile su</b>	5 dk
<b>Triton X solüsyonu</b>	5 dk
<b>Yıkama (2 kez)</b>	5'er dk
<b>Hidrofobik kalem ile kesitlerin etrafı çevrilir</b>	
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	10 dk
<b>Yıkama (2 kez)</b>	5'er dk
<b>Ultra V Block</b>	10 dk
<b>Primer Antikor</b>	1 saat
<b>Yıkama (2 kez)</b>	5'er dk
<b>Sekonder Antikor</b>	30 dk
<b>Yıkama (2 kez)</b>	5'er dk
<b>Streptavidin</b>	10 dk
<b>Yıkama (2 kez)</b>	5'er dk
<b>DAB ile muamele</b>	Kendi belirlediğimiz süre
<b>Hematoksilen</b>	1 dk
<b>Distile su (3 kez)</b>	3 dk
<b>%70,%90,%96,%100 Alkol</b>	5'er dk
<b>Ksilen I, Ksilen II, Ksilen III</b>	15'er dk
<b>Lamların kapatılması (Entellan, MERK)</b>	

### 3.9. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi GraphPad Prism 5.03 paket programında yapıldı. Deney öncesi vücut ağırlığı, deney sonu vücut ağırlığı, sağ testis ağırlığı, sol testis ağırlığı, sperm değerlendirmesi, immünohistokimyasal analiz sonuçları, histopatolojik skorlama kosentino testi sonucu ortaya çıkan değerlerin indeksi ortalama  $\pm$  standart sapma olarak hesaplandı. Deneklere ait verilerin öncelikle normal dağılıp dağılmadıkları ve varyanslarının homojenliği test edildi. Dört grubun

karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılmıştır. Alt grupların ikişerli karşılaştırması için ise Dunn testi kullanılarak yapılmıştır ve tüm değerlendirmeler için istatistik anlamlılık değeri  $p<0.05$  olarak kabul edilmiştir. Deney öncesi vücut ağırlıkları ile deney sonu vücut ağırlıkları kıyaslanırken normal dağılan verilerde Paired t Test, normal dağılıma göstermeyen verilerde Wilcoxon Rank Test ile test edilmiştir. İstatistik anlamlılık değeri  $p<0,05$  olarak kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Vücut Ağırlığı

#### 4.1.1. Deney öncesi vücut ağırlığı

Deneyin başlangıcında ve deney sonunda ölçülen denek ağırlıklarına ilişkin bulgular Tablo 5’te verilmiştir.

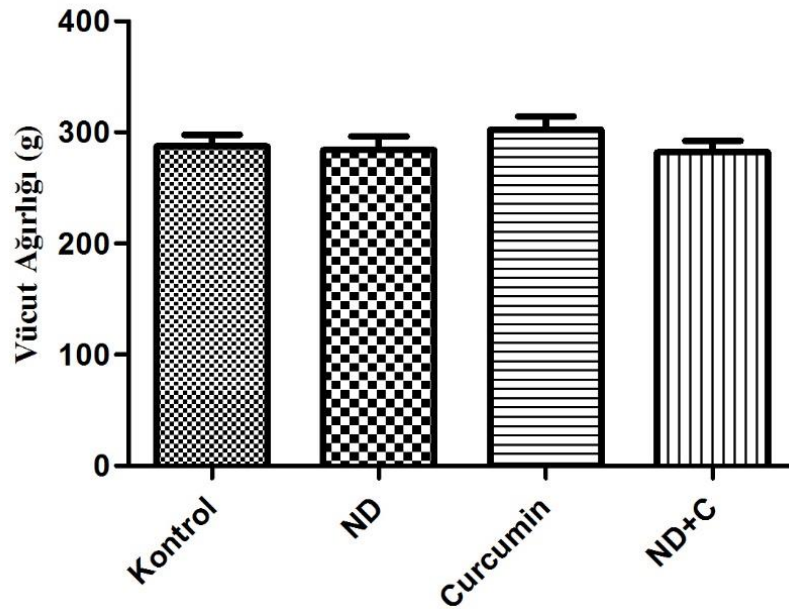
Deneklerin ilk ağırlıklarının istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda gruplar arasında önemli bir fark saptanmamıştır ( $p=0.584$ )(Şekil 10).

**Tablo 5.** Gruplara göre deney öncesi vücut ağırlıkları (g).

	Kontrol Grubu n=7	ND Grubu n=7	Curcumin Grubu n=7	ND+C Grubu n=7	p değeri (NS)
Vücut Ağırlıkları (g)	281.0 (257.0-338.0)	295.0 (232.0-315.0)	306.0 (250.0-344.0)	280.0 (255.0-320.0)	0.5844

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur.

$p=0.584$  olduğundan istatistiksel (NS= Not Significant) (Anlamlı değil).



**Şekil 10.** Deney öncesi deneklerin vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.

#### 4.1.2. Deney sonu vücut ağırlığı

Deney sonunda deneklerin vücut ağırlıkları ölçüldü ve gruplar arası karşılaştırma yapıldı. Kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında istatistiksel olarak bir anlamlılık görülmedi. ND grubu ile Curcumin grubu karşılaştırıldığında, ND grubu anlamlı bir düşüş gösterdi ( $p<0.05^{**}$ ). Curcumin ile ND+C grubu karşılaştırıldığında deneklerin ağırlıkları arasında anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlendi ( $p<0.05^{*}$ )(Tablo 6 ve Şekil 11).

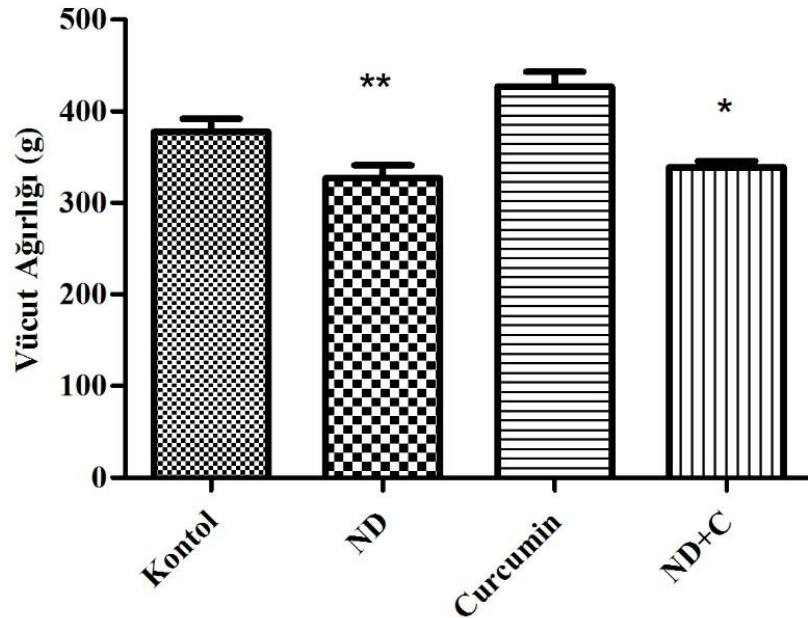
**Tablo 6.** Gruplara göre deney sonu vücut ağırlıkları (g).

	Kontrol Grubu n=7	ND Grubu n=7	Curcumin Grubu n=7	ND+C Grubu n=7	p değeri
Vücut Ağırlıkları (g)	389.0 (316.0-417.0)	336.0 <sup>**</sup> (259.0-373.0)	415.0 (355.0-483.0)	350.0 <sup>*</sup> (320.0-391.0)	0.0028

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur.

\* $p<0.05$  Curcumin ile karşılaştırıldığında

\*\* $p<0.05$  Curcumin ile karşılaştırıldığında



**Şekil 11.** Deney sonunda deneklerin vücut ağırlıklarının (g) karşılaştırılması.

#### 4.1.3. Deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarının farkı

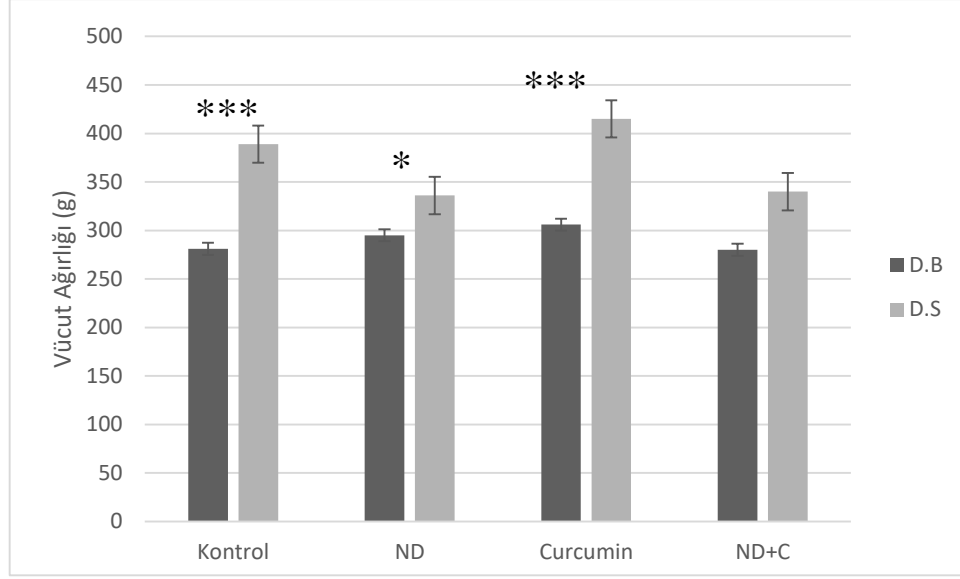
Deney öncesi ve deney sonrası sıçanların vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında sıçanların vücut ağırlıklarında artış görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlemlendi (Tablo 7 ve Şekil 12). Kontrol grubunda deney öncesi ve deney sonundaki vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında deneklerin vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış görüldü ( $p=0.0003^{***}$ ). Curcumin grubu deney öncesi ve deney sonundaki vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında deneklerin vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış görüldü ( $p < 0.0001^{***}$ ). Curcumin grubundaki sıçanlar ortalama olarak en fazla kilo artışına sahip oldu. ND grubunda deney öncesi ve deney sonundaki vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında deneklerin vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış görüldü fakat diğer gruplara göre ortalama olarak en az kilo artışına sahip oldu ( $p=0.0434^*$ ). ND+C grubu deney öncesi ve deney sonundaki vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında deneklerin vücut ağırlıklarında ND grubundan sonraki en az kilo artışına sahip olan grup olarak tespit edildi ( $p=0.0220^*$ ).

**Tablo 7.** Deney öncesi ve sonrası denek ağırlıklarının ortalama farkları (g).

Gruplar	Ortalama Farkları (g)	p değeri
<b>Kontrol</b>	+108	0.0003***
<b>ND Grubu</b>	+41	0.0434*
<b>Curcumin Grubu</b>	+109	< 0.0001***
<b>ND+C Grubu</b>	+60	0.0220*

\* $p < 0.05$  Kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\*\* $p < 0.05$  ND ile karşılaştırıldığında



**Şekil 12.** Deneş başlangıcı ve deneş sonrası denek vücut ağırlıklarının karşılaştırılması. **D.B:** deneş başlangıcında, **D.S:** deneş sonunda deneklerin vücut ağırlıkları.

#### 4.2. Testis ve Epididim Ağırlıkları

Deneklerin sağ testis, sol testis, sağ epididim ve sol epididim ağırlıklarına ilişkin bulgular Tablo 8’de verilmiştir. Deneklerin sağ testis ağırlıkları gruplara göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdi ( $p=0.0007$ ). Kontrol grubu en yüksek sağ testis ağırlığına sahipken, en düşük sağ testis ağırlığı ND grubu ve ND+C grubunda görüldü ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında curcumin grubu deneklerin daha düşük sağ testis ağırlığına sahip olduğu görüldü ( $p<0.05$ ).

Deneklerin sol testis ağırlıkları gruplara göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdi ( $p=0.0024$ ). En yüksek sol testis ağırlığı Curcumin grubunda görülürken, en düşük testis ağırlığı ise ND grubunda görüldü ( $p<0.05$ ). ND+C grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında daha yüksek testis ağırlığına sahip olduğu görüldü ( $p<0.05$ ).

Deneklerin sağ epididim ağırlıkları gruplara göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdi ( $p=0.0366$ ). Ortalama olarak en yüksek sağ epididim ağırlığı, kontrol grubunda görülürken en düşük sağ epididim ağırlıkları ND grubunda görüldü ( $p<0.05$ ). ND+C grubundaki ortalama sağ epididim ağırlıkları Curcumin grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü.

Deneklerin sol epididim ağırlıkları gruplara göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı ( $p=0.2003$ )(NS).

**Tablo 8.** Testis ve Epididim ağırlıkları (g).

	<b>Kontrol Grubu n=7</b>	<b>ND Grubu n=7</b>	<b>Curcumin Grubu n=7</b>	<b>ND+C Grubu n=7</b>	<b>p Değeri</b>
<b>Sağ Testis</b>	1.730±0.1754	1.340±0.09105 <sup>a</sup>	1.640±0.1730 <sup>b</sup>	1.350±0.1032 <sup>a,d</sup>	0.0007
<b>Sol Testis</b>	1.670±0.1622	1.290±0.1045 <sup>a</sup>	1.690±0.1846	1.320±0.1020 <sup>a</sup>	0.0024
<b>Sağ Epididim</b>	0.4100±0.07925	0.3200±0.02498 <sup>a</sup>	0.3600±0.02340	0.3700±0.06440	0.0366
<b>Sol epididim</b>	0.3700±0.05469	0.3400±0.01604	0.3500±0.03237	0.3500±0.0500	0.2003 (NS)

Değerler Ortalama ± Standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> $p<0.05$  Kontrol ile karşılaştırıldığında

<sup>b</sup> $p<0.05$  ND ile karşılaştırıldığında

<sup>d</sup> $p<0.05$  Curcumin ile karşılaştırıldığında

### 4.3. Sperm Değerlendirmesi

Deneklerin sperm değerlendirmesine ait sperm konsantrasyonu (milyon/ml), sperm canlılığı (%), anomali oranı (%), sperm motilitesi (%) gibi parametrelerin saptanan ortalama değerleri Tablo 9’da verilmiştir. Bulgular deney grupları arasında kıyaslanarak istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

#### Sperm konsantrasyonu (milyon/ml) değerlendirilmesi

Sperm sayımı yapılan deney grupları arasında en yüksek sperm konsantrasyonuna sahip olan grup kontrol grubu olarak tespit edildi ( $p<0.0001$ ). En az sperm konsantrasyonu ise ND grubunda görüldü ( $*p<0.01$ ). ND+C grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında, ND+C grubunun sperm konsantrasyonu kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görüldü ( $*p<0.01$ ). Curcumin grubu ND grubu ile kıyaslandığında, Curcumin grubunun ND grubuna göre daha yüksek sperm konsantrasyonuna sahip olduğu görüldü ( $**p<0.01$ ).



### Sperm vitalite (canlılık) (%) değerlendirmesi

Sperm canlılığı test edildi ve gruplar arasında kıyaslandığında anlamlı bir farklılık görüldü ( $p=0.0019$ ). En yüksek canlılık orasına sahip olan grup ND+C grubu ile Curcumin grubu olarak tespit edildi ( $^b p<0.05$ ). Kontrol grubu ile ND grubu kıyaslandığında, ND grubunun daha düşük canlılık oranına sahip olduğu ( $*p<0.01$ ) ve ND grubunun gruplar arasında en düşük canlılık oranına sahip olduğu tespit edildi.

### Sperm motilite (hareketlilik) (%) değerlendirmesi

Sperm motilitesi test edildi ve hareketli sperm oranı gruplar arasında kıyaslanarak istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ( $p=0.0038$ ). En yüksek hareketli sperm oranı Curcumin grubunda görülürken en düşük hareketli sperme sahip grup ND grubu olarak tespit edildi ( $^b p<0.05$ ). ND+C grubu ile Curcumin grubu kıyaslandığında, ND+C grubunun daha düşük hareketli sperm oranına sahip olduğu görüldü. Kontrol grubu ile ND+C grubu kıyaslandığında kontrol grubunun daha düşük oranda sperm hareketliliğine sahip olduğu tespit edildi ( $^a p<0.05$ ).

### Normal ve anormal sperm (%) değerlendirmesi

Her bir denek için yapılmış olan preparatlarda 100 hücre morfolojik olarak değerlendirildi. Normal ve anormal morfolojiye sahip olan sperm hücrelerinin normal sperm yüzde oranları elde edildi ve anormal olan spermler fotoğraflandı. Fotoğraflanmış olan anormal spermler Şekil 13'de gösterilmiştir. Normal sperm yüzde oranları gruplar arasında kıyaslandı ve istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu ( $p=0.0005$ ). En yüksek normal sperm yüzdesine sahip olan grup kontrol grubu olarak gözlendi. En düşük normal sperm yüzdesine sahip olan grup ise ND grubu olarak görüldü ( $^a p<0.05$ ). ND+C grubu ile Curcumin grubu ND grubuna göre daha yüksek dercede normal sperm yüzdesine sahip oldukları görüldü ( $^b p<0.05$ ).

**Tablo 9.** Sperm değerlendirmesi sonuçları.

	<b>Kontrol Grubu n=7</b>	<b>ND Grubu n=7</b>	<b>Curcumin Grubu n=7</b>	<b>ND+C Grubu n=7</b>	<b>p Değeri</b>
<b>Sperm Sayımı (milyon/ml)</b>	178.0±6.651	86.00±3.606*	170.0±4.756**	118.0±12.28*	< 0.0001
<b>Canlı sperm (%)</b>	77.05±8.173	55.60±13.67 <sup>a</sup>	80.12±10.43 <sup>b</sup>	80.61±12.61 <sup>b</sup>	0.0019
<b>Hareketli sperm (%)</b>	76.92±7.938	40.00±14.81 <sup>a</sup>	80.00±8.970 <sup>b</sup>	77.77±12.89 <sup>b</sup>	0.0038
<b>Normal Sperm (%)</b>	70.00±9.981	22.00±6.866 <sup>a</sup>	58.00±13.37 <sup>b</sup>	65.00±13.37 <sup>b</sup>	0.0005

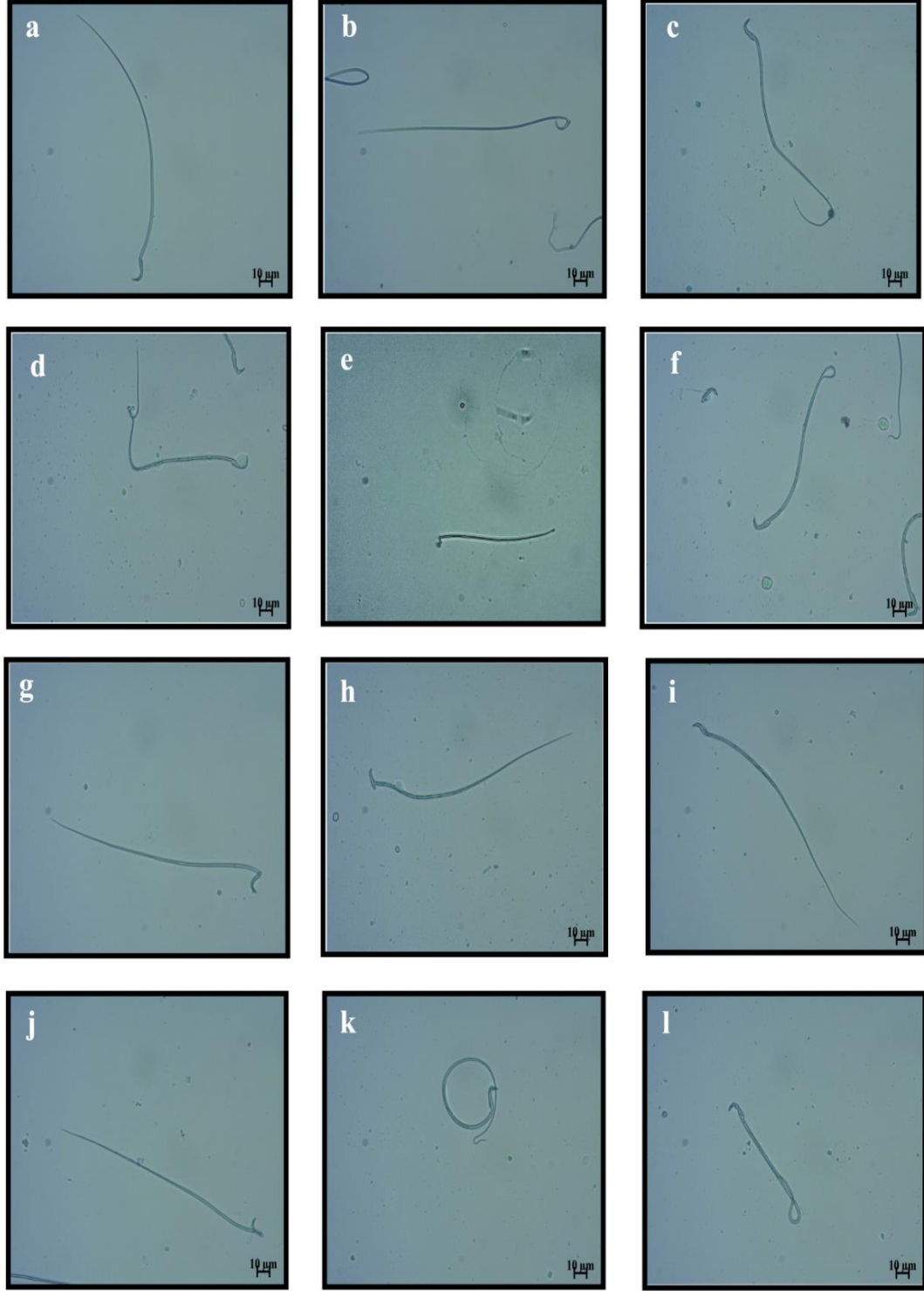
Değerler Ortalama ± Standart sapma olarak verilmiştir.

\*p<0.05 Kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\*p<0.05 ND ile karşılaştırıldığında

<sup>a</sup>p<0.05 Kontrol ile karşılaştırıldığında

<sup>b</sup>p<0.05 ND ile karşılaştırıldığında



**Şekil 13.** ND uygulanmış sıçanlarda görülen farklı sperm anomali tipleri. (a) Normal sperm; (b), (g), (j) kıvrık boyun; (c) kıvrık kuyruk ve kuyrukta sitoplazmik damlacık; (d) dolanmış kuyruk; (e) şekilsiz (amorfe) baş; (f) küçük baş ve ilmek kuyruk; (h) muz-şekilli baş; (i) amorf baş; (k) kıvrılmış kuyruk; (l) dolanmış kuyruk

## 4.4. Histolojik Bulgular

### 4.4.1. Hematoksilen & Eozin (H-E) boyama

Çalışmada oluşturulan tüm deney gruplarındaki sıçan testis dokuları ışık mikroskobu ile değerlendirmek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyanmıştır. Tüm gruplara ait H-E görüntüleri Şekil 14’de gösterilmiştir.

#### Kontrol Grubu

Kontrol grubundaki sıçan testis dokuları ışık mikroskobunda incelendiğinde spermatogenezin farklı aşamalarındaki seminifer tübüllerin organizasyonu ve seminifer tübüller arasındaki interstisyel bağ doku da oldukça düzgün ve olağan yapıda olduğu görüldü. İnterstisyel alandaki kan damarları etrafında yerleşik, oval ya da yuvarlak şekilli, gevşek kromatinli nükleusa sahip, Leydig hücreleri ve bağ doku hücreleri gözlemlendi. Bazal membranın düzgün kontürlü yapıda olduğu görüldü. Bazal membrana lokalize miyoid hücreler tunika propriyanın ortasında dokuya paralel konumda uzanan koyu boyanmış iğ şeklindeki nükleusları ile ayırd edildi. Seminifer tübüller içerisindeki germinal epitelde bulunan spermatogenik hücrelerin normal döngüsünde seyrettiği ve germinal epitelde herhangi bir dejenerasyon olmadığı gözlemlendi (Şekil 14. A ,B,C).

#### ND Grubu

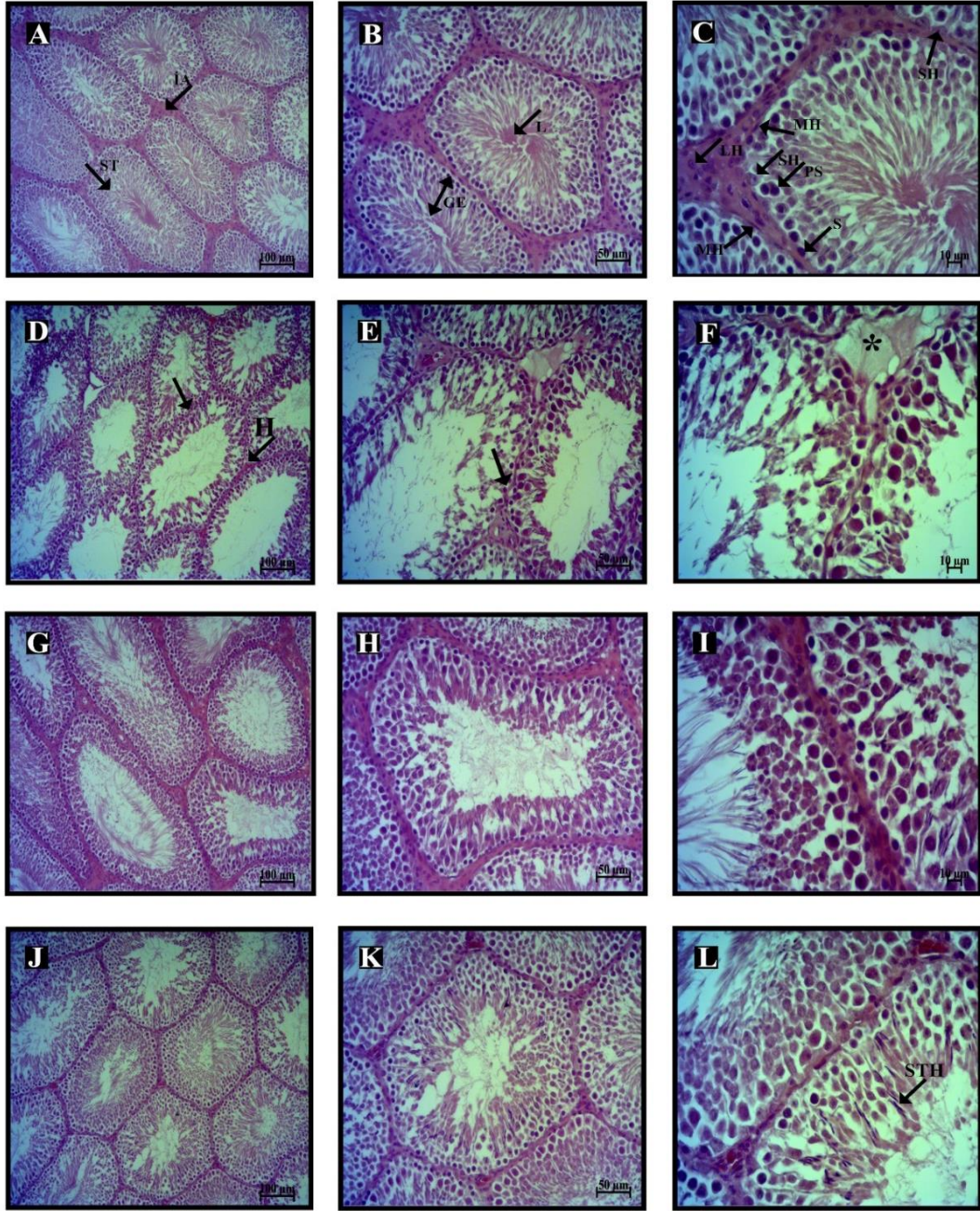
ND uygulanan gruptaki sıçanların testis dokuları incelendiğinde kontrol grubunun aksine seminifer tübül organizasyonunda düzensizlik görüldü. İnterstisyel alandaki kan damarı endotellerinde dejenerasyon olduğu ve bundan dolayı interstisyel alanda kan hücreleri görüldü. İnterstisyel alanda peritübüler hyalinizasyon, ödem ve hemoraji gözlemlendi. İnterstisyel alanda kayıplar, Leydig hücrelerinde bazı bölgelerde azalma, bazı bölgelerde ise daha fazla sayıda proliferasyon olmuş Leydig hücrelerine rastlandı. Bazal membran yapısının düzensizleşerek seminifer tübülden ayrıldığı (ondülasyon) ve yer yer incelik yok olduğu görüldü. Germinal epitelde bulunan spermatogenik hücrelerde kayıp ve düzensizlik görüldü. Germinal epitelde düşük seviyede vaküolizasyon gözlemlendi (Şekil 14. D, E, F).

### Curcumin Grubu

Curcumin tedavili gruptaki sıçanların testis dokuları incelendiğinde kontrol grubuna benzer yapıda olduğu tespit edildi. Seminifer tübül organizasyonunun ve interstisyel alanın düzgün yapıda olduğu gözlemlendi. Interstisyel alandaki Leydig hücrelerinin proliferasyon ve gruplar halinde olduğu gözlemlendi. Bazal membran yapısı düzgün ve normal kontöre sahip olduğu görüldü. Germinal epitelde bulunan spermatogenik hücrelerin normal döngüsünde seyrettiği gözlemlendi (Şekil 14. G, H, I).

### ND+C Grubu

ND uygulanan ve Curcumin ile tedavi edilen gruptaki sıçanların testis dokuları incelendiğinde, ND grubunda görülen seminifer tübül organizasyonunda ve interstisyel alandaki düzensizlikler görülmedi. Fakat interstisyel alanda az miktarda kan hücresine rastlandı. Bazal membran yapısının ND grubuna göre daha düzgün ve normal yapısında olduğu tespit edildi. Spermatogenik seri hücrelerinin düzenli ve normal döngülerinde seyrettiği görüldü (Şekil 14. J, K, L).



**Şekil 14.** Testis dokusuna ait Hematoksilen-Eozin boyaması. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrol x40, (D) ND x10, (E) ND x20, (F) ND x 40, (G) Curcumin x10, (H) Curcumin x20, (I) Curcumin x40, (J) ND+C x10, (K) ND+C x20, (L) ND+C x40. (ST) seminifer tübül, (IA) interstisyel alan, (GE) germinal epitel, (L) seminifer tübül lümeni, (LH) Leydig hücresi, (MH) miyoid hücre, (S) spermatogonyum hücresi, (SH) Sertoli hücresi, (PS) primer spermatozit, (H) Hemoraji, (STH) Spermtid, (oklar) bazal lamina ondülasyonu, (\*) ödem ifade etmektedir.

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

Çalışmada oluşturulan tüm deney gruplarındaki sıçan testis dokuları ışık mikroskobu ile değerlendirmek ve bazal membran ile spermatidlerin görünümünü artırmak amacıyla periyodik Asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) ile boyanmıştır. Tüm gruplara ait (PAS+H) görüntüleri Şekil 13'de gösterilmiştir.

##### Kontrol Grubu

Kontrol grubundaki sıçanların testis dokusu incelendiğinde seminifer tübüllerin etrafını çevreleyen bazal membran yapısı ve spermatid başları glikoproteinik yapıda olduğu için kuvvetli PAS pozitif reaksiyon vererek mor-menekşe renginde boyanmıştır. Bazal membran yapısı oldukça düzenli ve normal yapıda görüldü. Yan yana konumlanmış iki seminifer tübüle ait bazal membranlarının ayrımı yapılabilir. Nükleusun üzerine oturmuş kep şeklinde PAS pozitif reaksiyon veren akrozom yapısıyla erken spermatidler ve lümene uzanan iplikli kuyrukları, koyu uzun baş yapıları ile spermatozoalara dönüşecek olan geç spermatidler gözlemlendi (Şekil 15. A ,B,C).

##### ND Grubu

ND uygulanan grubundaki sıçanların testis dokusu incelendiğinde seminifer tübüllerin etrafını çevreleyen bazal membranda düzensizlik, yer yer kayıplar ve ondülasyon olduğu gözlemlendi. Yan yana konumlanmış iki seminifer tübüle ait bazal membran yapıları düzgün ayırd edilemedi. İnterstisyel alanda Leydig hücreleri ve bağ doku hücrelerinde kayıplar olduğu gözlemlendi. Lümene yakın konumda erken spermatidler ve geç spermatidler gözlemlendi (Şekil 15. D, E, F).

##### Curcumin Grubu

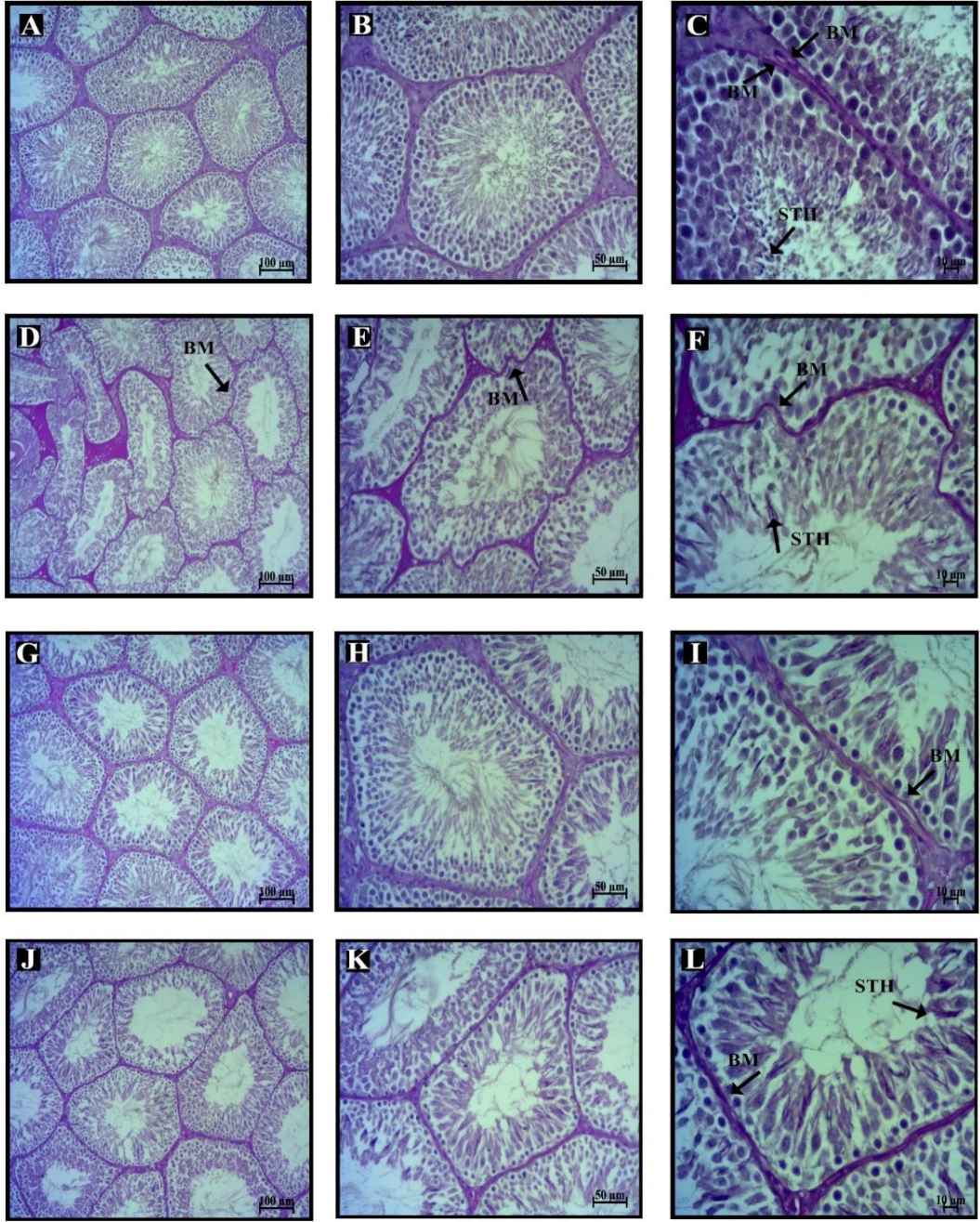
Curcumin tedavi grubundaki sıçanların testis dokusu incelendiğinde kontrol grubuna benzer bir yapı gözlemlendi. Seminifer tübüllerin etrafını çevreleyen bazal membran oldukça düzenli ve normal yapıda görüldü. Yan yana konumlanmış iki seminifer tübüle ait bazal membranlarının ayrımı yapılabilir. Lümene yakın konumda erken spermatidler ve geç spermatidler gözlemlendi (Şekil 15. G, H, I).

### ND+C Grubu

ND uygulanan ve Curcumin ile tedavi edilen grubundaki sıçanların testis dokusu incelendiğinde ND grubundaki bazal membran düzensizliklerinin yüksek derecede azaldığı, ondüle yapının ise normal bir morfolojiye kavuştuğu görüldü. Diğer gruplarda da görüldüğü gibi lümene yakın konumda erken spermatidler ve geç spermatidler gözlemlendi (Şekil 15. J, K, L).







**Şekil 15.** Testis dokusuna ait Periyodik Asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyaması. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrol x40, (D) ND x10, (E) ND x20, (F) ND x 40, (G) Curcumin x10, (H) Curcumin x20, (I) Curcumin x40, (J) ND+C x10, (K) ND+C x20, (L) ND+C x40. (BM) bazal membran, (STH) spermatid hücresi.

#### 4.5. Histopatolojik Değerlendirme

Çalışmada oluşturulan tüm deney gruplarındaki sıçanlar için hazırlanan testis dokusuna ait preparatlarda 10 adet seminifer tübülü ve interstisyel alanı kosentino skorlamasına göre değerlendirdik.

##### Seminifer tübül değerlendirmesi için;

- Spermatozoa ve spermatid kaybı,
- Germ hücre tabakası yokluğu,
- Germ hücre tabakası dejenerasyonu,
- Germ hücre tabakası düzensizleşmesi,
- Tübülün parçalanması,
- Miyoid hücre tabakası kalınlaşması,

##### İnterstisyel alan değerlendirmesi için;

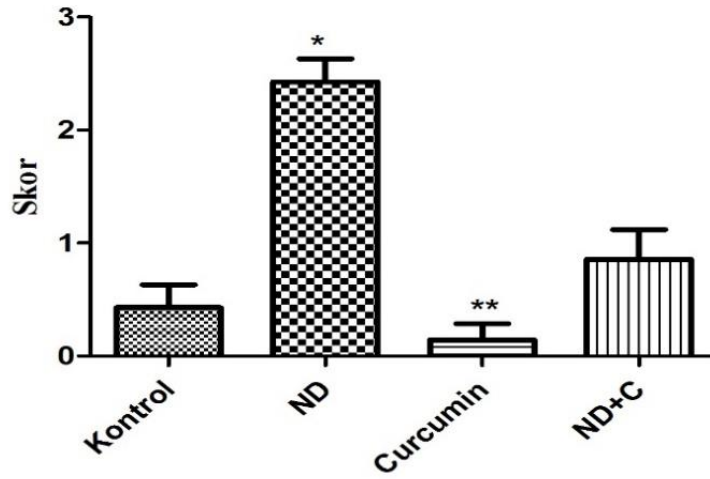
- Leydig hücre proliferasyonu,
- Ödem,
- Hemoraji

gibi parametreleri 0-4 arası sayısal değerlerde puan verilerek skorlandı ve istatistiksel olarak anlamlılıkları test edildi.

Spermatozoa ve spermatid kaybı tüm deneklerde değerlendirildi. Gruplar arasında kıyaslama yapıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu ( $p=0.0003$ ). En yüksek kayıp ND grubunda ( $*p<0.05$ ) görülürken, en düşük kayıp ise Curcumin grubunda görüldü ( $**p<0.05$ ). Curcumin grubu Kontrol grubuna göre daha az kayıp verirken, ND+C grubu ise ND grubuna göre daha düşük seviyede spermatozoa ve spermatid kaybına uğramış olduğu tespit edildi (Şekil 16)( $p<0.05$ ).

Germ hücre tabakası yokluğu tüm deneklerde değerlendirildi. Gruplara göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu ( $p<0.0001$ ). En yüksek ND grubunda ( $*p<0.05$ ) görülürken, en düşük Curcumin grubunda görüldü ( $**p<0.05$ ). Kontrol grubu ve Curcumin grupları arasında bir anlamlılık bulunmadı ( $p=ns$ ). ND ve ND+C grupları kıyaslandığında, ND+C grubu ND grubuna göre daha düşük seviyede germ hücre tabakası yokluğuna sahip olduğu tespit edildi (Şekil 17)( $*p<0.05$ ).

### Spermatozoa ve spermatid kaybı

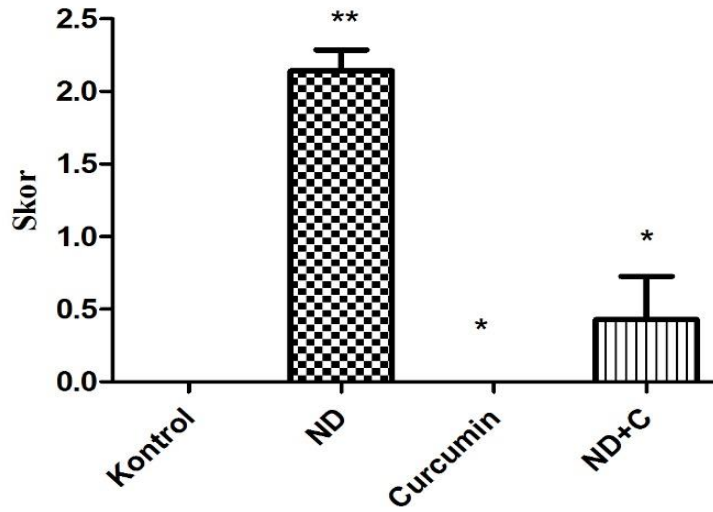


Şekil 16. Gruplara göre spermatozoa ve spermatid kaybı değerlendirilmesi.

\*  $p < 0.05$  Kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\* $p < 0.05$  ND ile karşılaştırıldığında

### Germ hücre tabakası yokluğu



Şekil 17. Germ hücre tabakası yokluğu değerlendirilmesi

\* $p < 0.05$  ND ile karşılaştırıldığında

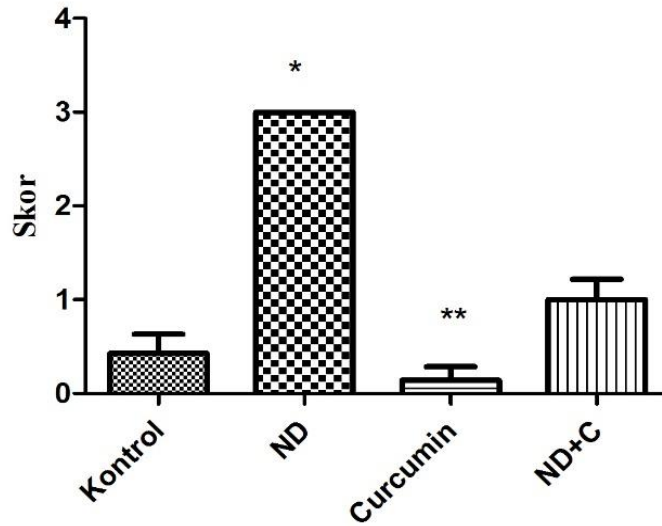
\*\* $p < 0.05$  Kontrol ile karşılaştırıldığında

Germ hücre tabakası dejenerasyonu tüm deneklerde değerlendirildi. Gruplara göre kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görüldü ( $p=0.0001$ ). En yüksek seviyede dejenerasyon ND grubunda görülürken, en düşük

Curcumin grubunda gözlemlendi (\*\*p<0.05). ND grubu ile ND+C grubu kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=ns). Kontrol grubu ile Curcumin grubu kıyaslandığında yine istatistiksel anlamda bir farklılık bulunamadı (p=ns). Kontrol grubu ile ND grubu kıyaslandığında ND grubunda daha yüksek seviyede dejenerasyon görüldü (\*p< 0.05). ND grubu ile Curcumin grubu kıyaslandığında Curcumin grubundaki dejenerasyon seviyesinin çok daha düşük olduğu tespit edildi (Şekil 18) (\*\*p< 0.05).

Germ hücre tabakası düzensizleşmesi tüm deneklerde değerlendirildi. Gruplara göre kıyaslama yapıldı ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görüldü (p < 0.0001). Kontrol grubu ile ND grubu kıyaslandığında, düzensizliğin ND grubunda en yüksek seviyede olduğu görüldü (\*\*p<0.05). Kontrol ile Curcumin grubu kıyaslandığında, istatistiksel bir anlamlılık bulunamadı (p=ns). Kontrol grubu ile ND+C grubu kıyaslandığında yine istatistiksel bir anlamlılık bulunamadı (p=ns). ND grubu ile ND+C grubu kıyaslandığında, ND+C grubunda düzensizlik daha düşük bir seviyede görüldü (Şekil 19) (\*\*p<0.05).

#### Germ hücre tabakası dejenerasyonu

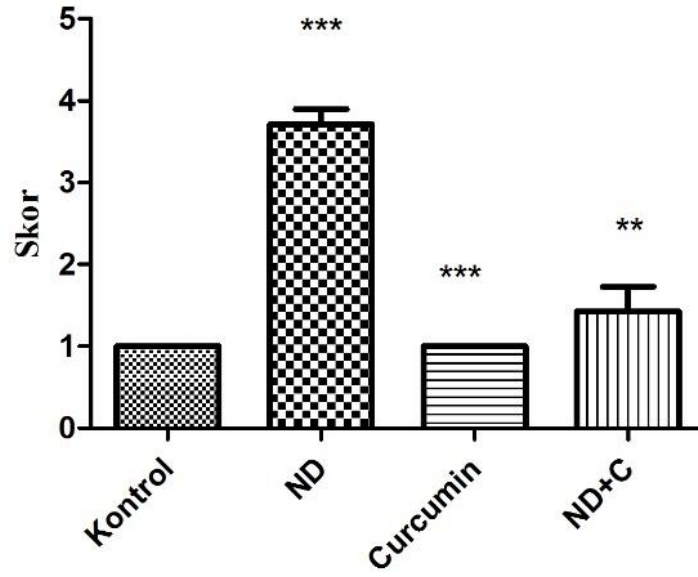


**Şekil 18.** Germ hücre tabakası dejenerasyonu değerlendirmesi.

\*p< 0.05 Kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\*p< 0.05 ND ile karşılaştırıldığında

### Germ hücre tabakası düzensizleşmesi



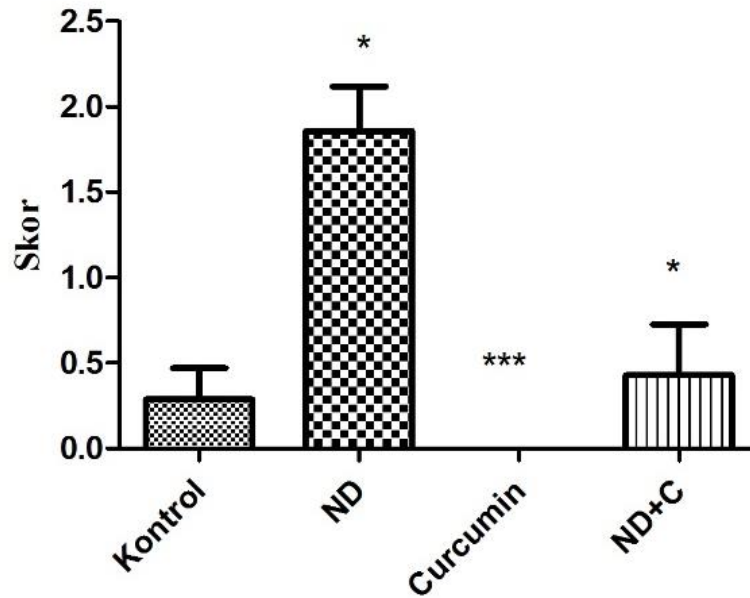
**Şekil 19.** Germ hücre tabakası düzensizliği değerlendirilmesi.

\*\*\*p < 0.05 Kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\*\*p < 0.05 ND ile karşılaştırıldığında

\*\*p < 0.05 ND ile karşılaştırıldığında

### Tübülün parçalanması



**Şekil 20.** Seminifer tübül parçalanmasının değerlendirilmesi.

\* p<0.05 Kontrol ile karşılaştırıldığında

\*p<0.05 ND ile karşılaştırıldığında

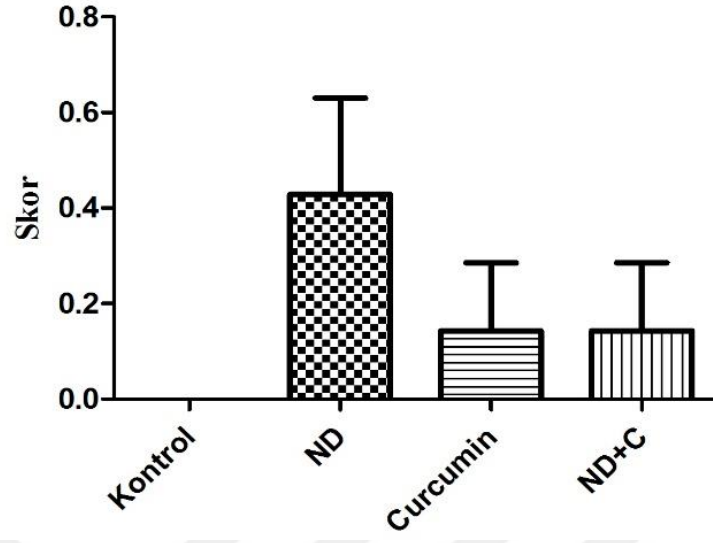
\*\*\*p<0.05 ND ile karşılaştırıldığında

Seminifer tübül yapısı parçalanması tüm deneklerde değerlendirildi. Gruplar arası kıyaslama yapıldı ve istatistiksel anlamda farklılıklar görüldü ( $p= 0.0006$ ). En yüksek seviyede tübül parçalanması ND grubunda görülürken en düşük seviyede ise Curcumin grubunda görüldü. Kontrol grubu ND grubu ile kıyaslandığında kontrol grubu ND grubuna göre anlamlı derecede düşük bir seviyede gözlendi ( $*p<0.05$ ). ND grubu ile Curcumin grubu kıyaslandığında, tübül parçalanması Curcumin grubunda anlamlı derecede düşük bir seviyede olduğu görüldü ( $***p<0.05$ ). ND ile ND+C grubu kıyaslandığında, ND+C grubu ND grubuna göre düşük seviyede olduğu gözlendi ( $*p<0.05$ ). Kontrol grubu ile ND+C ve Curcumin grupları kıyaslandığında, Kontrol grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=ns$ ). Curcumin grubu ve ND+C grubu arasında da istatistiksel bir anlamlılık bulunamadı (Şekil 20)( $p=ns$ ).

Miyoid hücre tabakası kalınlaşması tüm deneklerde değerlendirildi. Gruplar arasında kıyaslama yapıldı ve istatistiksel bir anlamlılık bulunamadı (Şekil 21)( $p=0.2158$ )(NS).

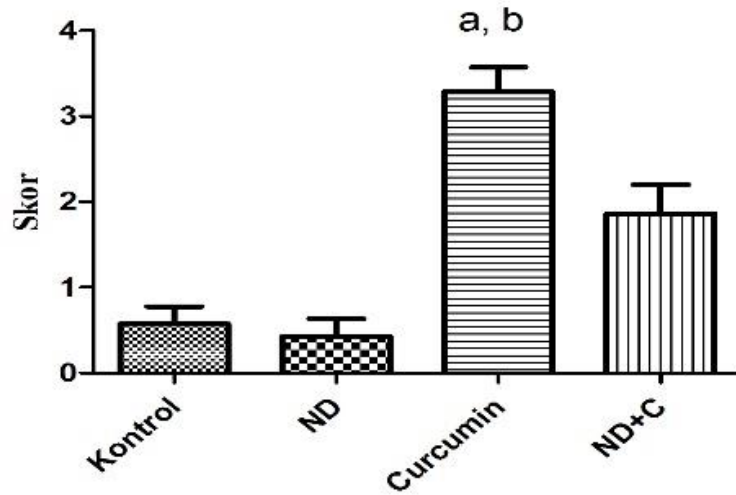
Leydig hücre proliferasyonu tüm deneklerde değerlendirildi. Gruplar arasında kıyaslama yapıldı ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu ( $p=0.0002$ ). Kontrol ve ND grupları kıyaslandığında anlamlılık bulunamadı ( $p=ns$ ). Kontrol grubu ile Curcumin grubu kıyaslandığında Curcumin grubu anlamlı derecede yüksek seviyede görüldü ( $^ap<0.05$ ). ND ile Curcumin grubu kıyaslandığında Curcumin grubunun Leydig hücre proliferasyonu ND grubuna göre yüksek seviyede olduğu gözlendi ( $^bp<0.05$ ). Diğer gruplar birbirleri arasında kıyaslandığında istatistiksel bir anlamlılık bulunamadı (Şekil 22)( $p=ns$ ).

### Miyoid hücre tabakası kalınlaşması



**Şekil 21.** Miyoid hücre tabakası kalınlaşmasının değerlendirilmesi. Gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p=ns).

### Leydig hücre proliferasyonu

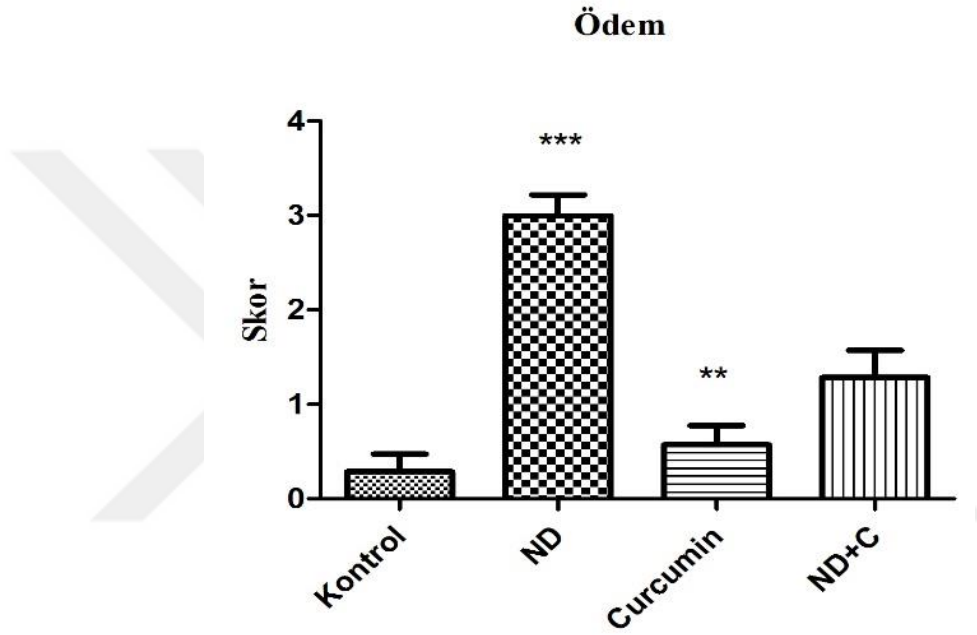


**Şekil 22.** Leydig hücre proliferasyonu değerlendirilmesi.

<sup>a</sup> p<0.05 Kontrol ile karşılaştırıldığında

<sup>b</sup> p<0.05 ND ile karşılaştırıldığında

Tüm deneklerde interstisyel alandaki ödem oluşumu değerlendirildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu ( $p=0.0002$ ). ND grubunda, Kontrol grubuna göre daha yüksek seviye ödem oluşumu gözlemlendi (\*\*\*)  $p<0.05$ ). ND grubu ile Curcumin grubu kıyaslandığında Curcumin grubunda anlamlı derecede daha düşük seviyede ödem oluşumu gözlemlendi (\*\* $p<0.05$ ). Diğer gruplar birbirleri arasında kıyaslandığında istatistiksel bir anlamlılık bulunamadı (Şekil 23)( $p=ns$ ).

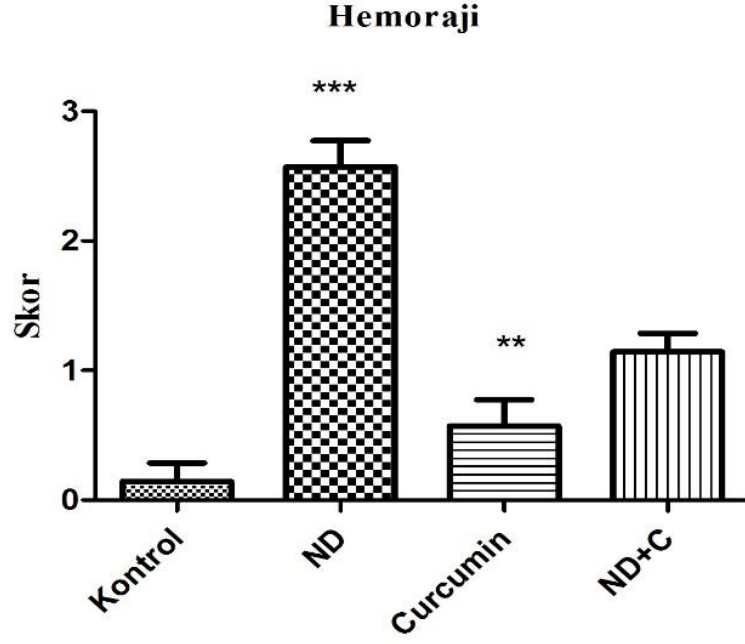


**Şekil 23.** İnterstisyel alanda ödem oluşumu değerlendirmesi.

\*\*\*  $p<0.05$  Kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\* $p<0.05$  ND ile karşılaştırıldığında.





**Şekil 24.** İnterstisyel alanda hemoraji oluşumunun değerlendirilmesi

\*\*\* $p < 0.05$  Kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\* $p < 0.05$  ND ile karşılaştırıldığında

Tüm denekler için interstisyel alandaki hemoraji oluşumu değerlendirildi ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu gözlemlendi ( $p < 0.0001$ ). Kontrol grubu ile ND grubu kıyaslandığında interstisyel hemoraji oluşumu ND grubunda anlamlı derecede yüksek seviyede görüldü (\*\* $p < 0.05$ ). ND grubu ile Curcumin grubu kıyaslandığında Curcumin grubunda anlamlı şekilde düşük seviyede ödem oluştuğu görüldü (\*\* $p < 0.05$ ). Diğer gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunamadı (Şekil 24)( $p = ns$ ).

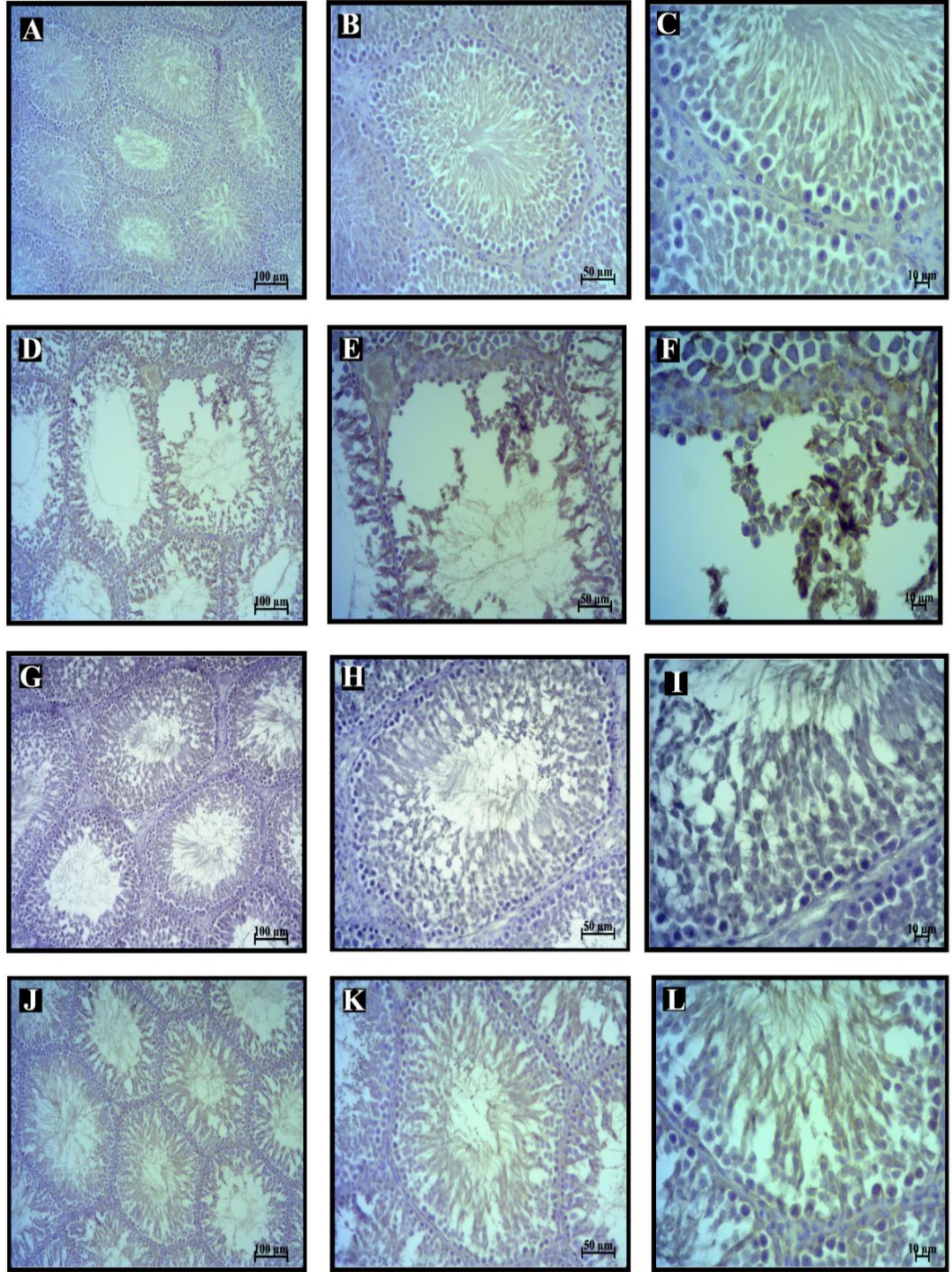
#### 4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular

Tüm deneklerin testis dokularında immünohistokimyasal yöntem ile Kaspaz-3, PARP-1, TNF- $\alpha$  ve NF- $\kappa$ B ekspresyonları değerlendirildi. Zayıf, orta ve şiddetli olmak üzere 3 farklı boyanma derecesindeki ifadelerini değerlendirdik. Morfolojik bulgularımızı, semikantitatif bir yöntem olan histolojik skorlama (H-skor) ile sayısal verilere dönüştürerek, tüm çalışma grupları arasında istatistiksel olarak farklılıklarını test ettik. H-skor yöntemi; boyanmış preparat üzerinde 10 farklı alanda 100 adet hücrede, Kaspaz-3, PARP-1, TNF- $\alpha$  ve NF- $\kappa$ B'nin immünoreaktivite

derecelerini değerlendirerek gerçekleştirildi (zayıf:1, orta:2, şiddetli:3). Normal keçi immünoglobulin-G serumu kullanarak sıçan testislerine ait doku kesitleri negatif kontrol olarak boyandı (şekil 29).

#### **4.6.1. Tüm gruplarda Kaspaz-3 immünreaktivitesinin karşılaştırılması**

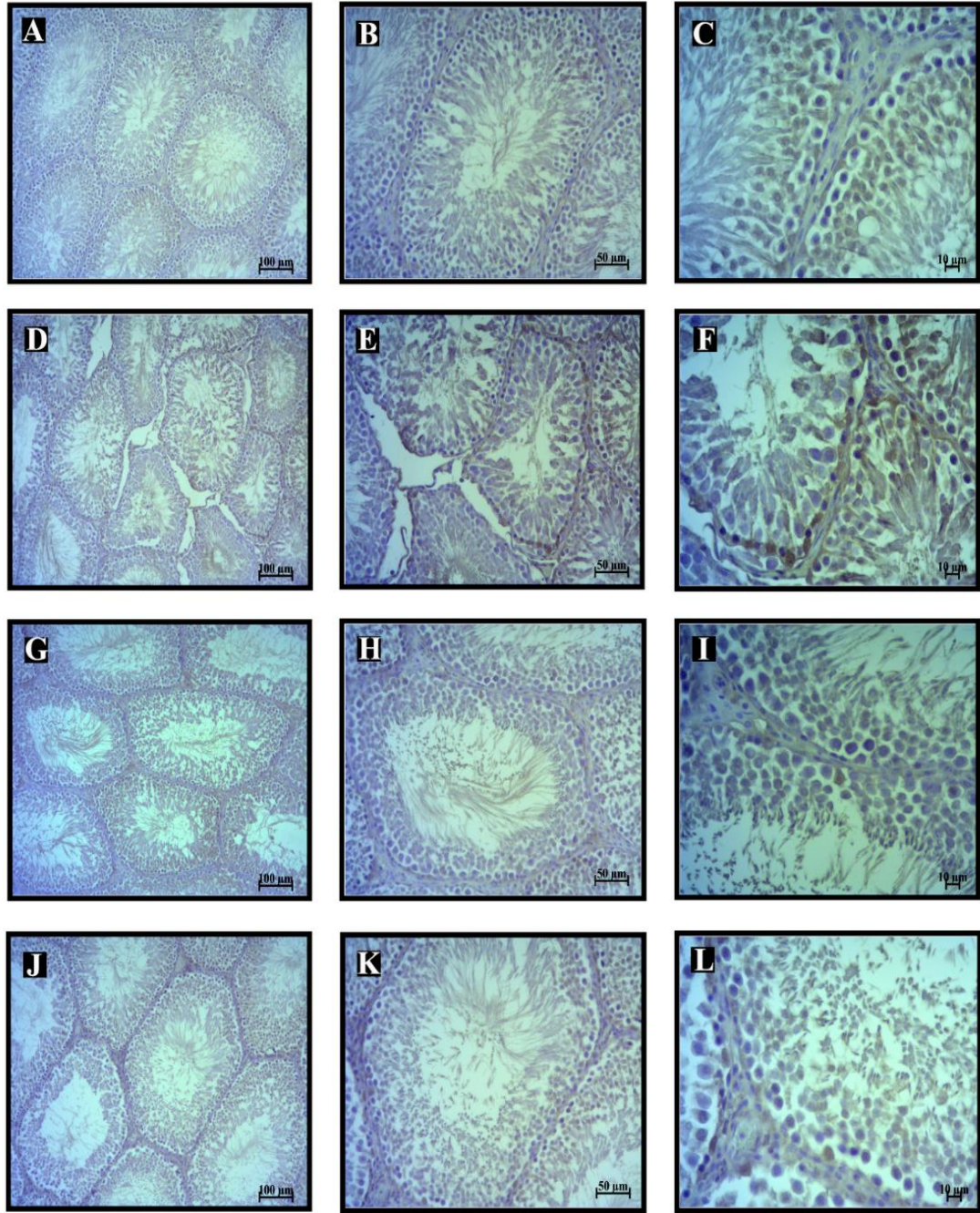
Tüm deneklerin testis dokusunda, immünohistokimyasal yöntem ile kaspaz-3 ekspresyonu, interstisyum ve seminifer tübüllerde değerlendirildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu ( $p < 0.001$ ). Grupların ikili kıyaslamalarında, Kontrol ile Curcumin grubu, kontrol ile ND+C grubu, Curcumin ile ND+C grubu arasında H-skorun istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edildi ( $p = ns$ ). ND uygulanan grup ile diğer gruplar karşılaştırıldığında ND grubunda anlamlı düzeyde ekspresyon artışı olduğu gözlendi (şekil 25, Tablo 10)( $p < 0.05$ ).



**Şekil 25.** Testis dokusunda Kaspaz-3 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrol x40, (D) ND x10, (E) ND x20, (F) ND x 40, (G) Curcumin x10, (H) Curcumin x20, (I) Curcumin x40, (J) ND+C x10, (K) ND+C x20, (L) ND+C x40.

#### 4.6.2. Tüm gruplarda PARP-1 immünreaktivitesinin karşılaştırılması

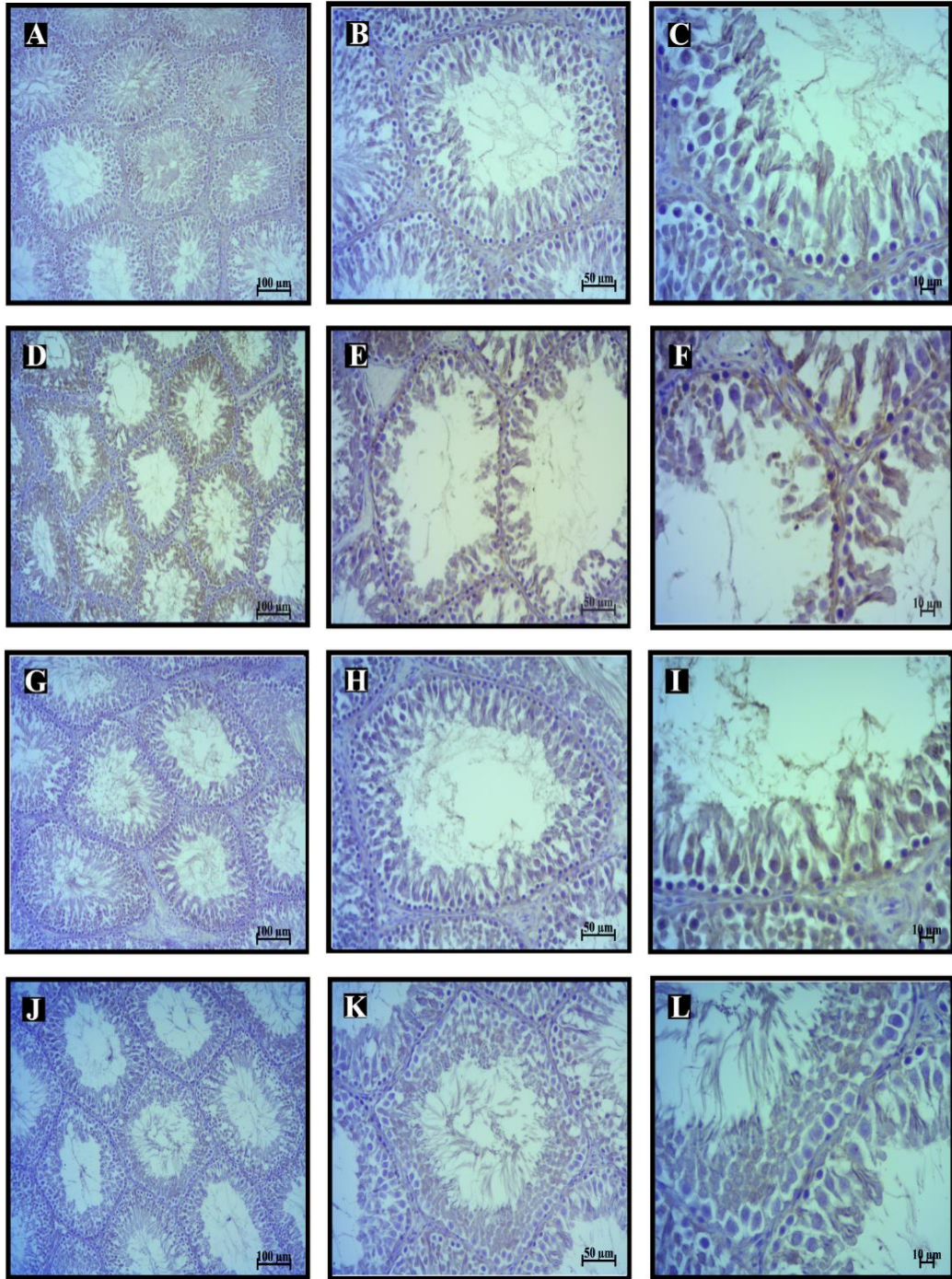
Tüm deneklerin testis dokusunda, immünohistokimyasal yöntem ile PARP-1 ekspresyonu, interstisyum ve seminifer tübüllerde değerlendirildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu ( $p<0.001$ ). Grupların ikili kıyaslamalarında, Kontrol ile Curcumin grubu, kontrol ile ND+C grubu, Curcumin ile ND+C grubu arasında H-skorun istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edildi ( $p=ns$ ). ND uygulanan grup ile diğer gruplar karşılaştırıldığında ND grubunda anlamlı düzeyde ekspresyon artışı olduğu gözlemlendi. Özellikle Sertoli hücrelerinde ekspresyon artışı olduğu görüldü. (Şekil 26, Tablo 10)( $p<0.05$ ).



**Şekil 26.** Testis dokusunda PARP-1 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrol x40, (D) ND x10, (E) ND x20, (F) ND x 40, (G) Curcumin x10, (H) Curcumin x20, (I) Curcumin x40, (J) ND+C x10, (K) ND+C x20, (L) ND+C x40.

#### 4.6.3. Tüm gruplarda TNF- $\alpha$ immünreaktivitesinin karşılaştırılması

Tüm deneklerin testis dokusunda, immünohistokimyasal yöntem ile TNF- $\alpha$  ekspresyonu, interstisyum ve seminifer tübüllerde değerlendirildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu ( $p < 0.001$ ). Grupların ikili kıyaslamalarında, kontrol ile Curcumin grubu, ND ile ND+C grubu, Curcumin ile ND+C grubu arasında H-skorun istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edildi ( $p = ns$ ). Kontrol ile ND+C grubu kıyaslandığında ND+C grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ekspresyon artış olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ). ND grubu ile Kontrol grubu, ND ile ND+C grubu karşılaştırıldığında ND grubunda anlamlı düzeyde ekspresyon artışı olduğu gözlemlendi (Şekil 27, Tablo 10) ( $p < 0.05$ ).

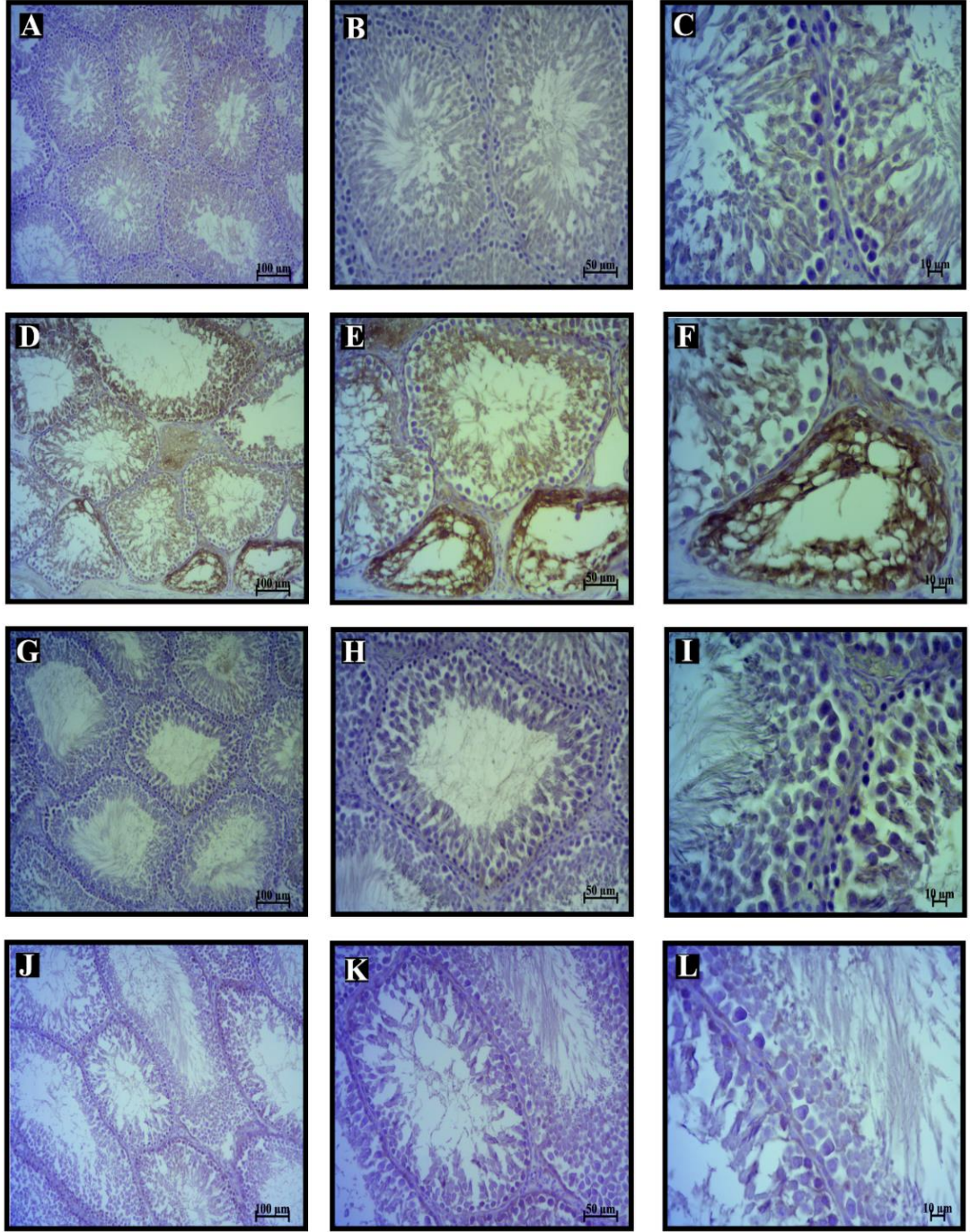


**Şekil 27.** Testis dokusunda TNF- $\alpha$  ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrol x40, (D) ND x10, (E) ND x20, (F) ND x 40, (G) Curcumin x10, (H) Curcumin x20, (I) Curcumin x40, (J) ND+C x10, (K) ND+C x20, (L) ND+C x40.

#### 4.6.4. Tüm gruplarda NF-κB immünreaktivitesinin karşılaştırılması

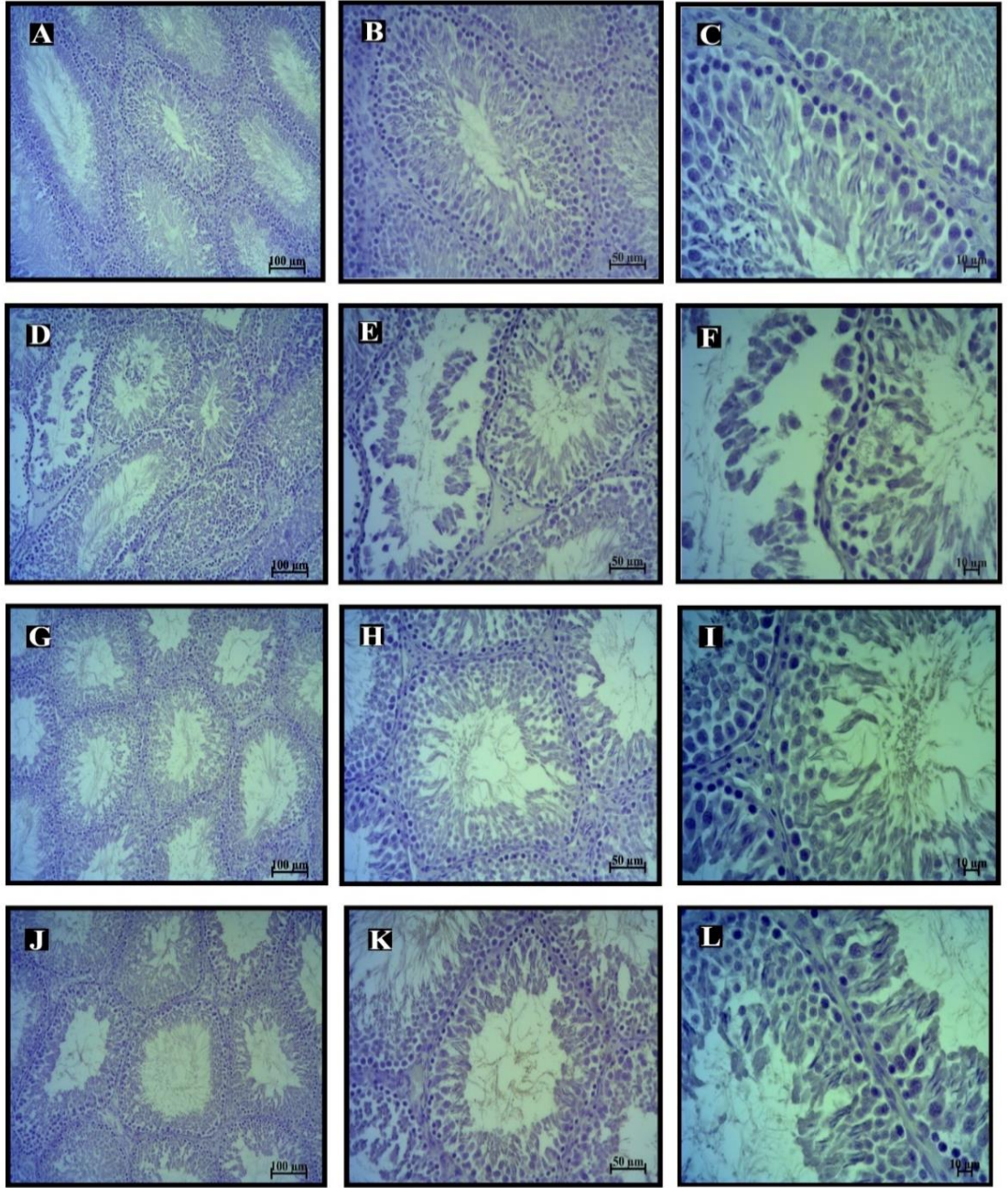
Tüm deneklerin testis dokusunda, immünohistokimyasal yöntem ile NF-κB ekspresyonu, interstisyum ve seminifer tübüllerde değerlendirildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu ( $p < 0.001$ ). Grupların ikili kıyaslamalarında, Kontrol ile Curcumin grubu, kontrol ile ND+C grubu, ND ile ND+C grubu arasında H-skorun istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edildi ( $p = ns$ ). Kontrol ile ND grubu kıyaslandığında ND grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ekspresyon artış olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ). ND grubu ile Curcumin grubu kıyaslandığında ND grubunda anlamlı düzeyde ekspresyon artışı olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ). Curcumin ile ND+C grubu karşılaştırıldığında ND+C grubunda anlamlı düzeyde ekspresyon artışı olduğu gözlemlendi (Şekil 28, Tablo 10) ( $p < 0.05$ ).





**Şekil 28.** Testis dokusunda NF- $\kappa$ B ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrol x40, (D) ND x10, (E) ND x20, (F) ND x 40, (G) Curcumin x10, (H) Curcumin x20, (I) Curcumin x40, (J) ND+C x10, (K) ND+C x20, (L) ND+C x40.

#### 4.6.5. Tüm gruplarda negatif Kontrol boyama görüntüleri



**Şekil 29.** Tüm deney gruplarına ait negatif kontrol boyama görüntüleri. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrol x40, (D) ND x10, (E) ND x20, (F) ND x 40, (G) Curcumin x10, (H) Curcumin x20, (I) Curcumin x40, (J) ND+C x10, (K) ND+C x20, (L) ND+C x40.

#### 4.6.6. Histolojik skor

**Tablo 10.** Kaspaz-3, PARP-1, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B immünoaktiviteler için histolojik skor değerleri.

Antikor	Kontrol Grubu n=7	ND Grubu n=7	Curcumin Grubu n=7	ND+C Grubu n=7	p Değeri
<b>Kaspaz-3</b>	100.0 $\pm$ 7.493	265.0 $\pm$ 9.805*	96.00 $\pm$ 7.244**	125.0 $\pm$ 10.52	< 0.0001
<b>PARP-1</b>	118.0 $\pm$ 8.295	218.0 $\pm$ 7.410*	118.0 $\pm$ 5.593**	165.0 $\pm$ 7.868	< 0.0001
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	108.0 $\pm$ 3.867	256.0 $\pm$ 4.030*	114.0 $\pm$ 3.359**	122.0 $\pm$ 4.577*	< 0.0001
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	136.0 $\pm$ 3.958	243.0 $\pm$ 10.46*	128.0 $\pm$ 6.336**	143.0 $\pm$ 4.830***	< 0.0001

Değerler Ortalama  $\pm$  Standart sapma olarak verilmiştir.

\*p < 0.05 Kontrol ile karşılaştırıldığında

\*\*p < 0.05 ND ile karşılaştırıldığında

\*\*\*p < 0.05 Curcumin ile karşılaştırıldığında

## 5. TARTIŞMA

Uzun yıllardır sporcular, performanslarını arttırmak için bitkileri, doğal ya da sentetik ilaçları kullanmışlardır. AAS'lerin egzersizle birlikte alındığında kas kitlesi ve kuvvetini artırıcı etkileri ortaya çıktıktan sonra vücut geliştiriciler, atletler ve profesyonel sporcular tarafından suprafizyolojik dozarda kullanımı yaygınlaşmıştır (1,2).

Son yıllarda testosteron ve AAS kullanımında artışlar görülmektedir. Bunun sebebi androjen yetmezliği, çoğu vücut geliştiricilerin ve ağır spor dallarıyla uğraşan sporcuların performanslarını arttırmak istemeleri sonucunda ortaya çıkmıştır (65).

AAS'lerin kontrolsüz kullanımları sonucunda vücutta pek çok dokuda patolojik bulgulara sebep olduğu özellikle ürogenital sistemdeki organlara, infertilite de dahil olmak üzere olumsuz etkileri bildirilmiştir (66,67).

Çalışmamızda anabolik androjenik steroid olan Nandrolon Decanoate'nin suprafizyolojik dozda ve 8 haftalık kullanımı sonucunda testis dokusuna verdiği hasarı ve fertiliteye olan etkisini doku düzeyinde ve sperm parametreleri üzerinden değerlendirerek tespit etmeyi ayrıca Curcumin maddesinin tedavi edici rolünü tespit etmeyi amaçladık.

Tedavinin dozu ve süresine göre ND uygulanması, serum testosteron seviyesinin düşmesine ve vücut ağırlığında azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (39, 184).

Noorafshan ve ark. yaptıkları çalışmada ND'nin uzun süreli ve kontrolsüz kullanımı testiküler hacim ve seminer tübül uzunluğunun azaltılması da dahil olmak üzere testiste çeşitli histopatolojik ve morfolojik anormalliklere neden olmuştur.

Takahashi ve ark., *Wistar* albino cinsi ratlar ile yaptıkları 7 haftalık çalışmada ND'nin düşük ve yüksek dozlarda kullanılması sonucunda ratların böbrek, kalp, akciğer, testis, prostat gibi organlarındaki ağırlık değişimlerini değerlendirmişlerdir. Deney sonunda ND'nin yüksek dozunda testis ağırlıklarında anlamlı düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda da yüksek dozda uygulanan ND, testis ve epididimal ağırlıklar, sperm sayısı ve sperm motilitesinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (9,10,69,78).

Biz de çalışmamızda ND uygulanan grupta vücut ağırlıkları, testiküler ve epididimal ağırlıklarda diğer denek grupları ile kıyaslama yaparak anlamlı azalmalar olduğunu gözlemledik (Tablo 8).

Ahmed ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada 190-200 g ağırlığında *Wistar albino* cinsi ratları kontrol, ND, Taurin, ND+Taurin olmak üzere 4 gruba ayırmışlar. ND grubuna 8 hafta boyunca 10 mg/kg/hafta dozda ND uygulanmış, taurin grubuna ise günde 100 mg/kg taurin verilmiş. Çalışmada ND'nin sperm parametreleri üzerine etkisi araştırılmış ve ND kullanımının sperm konsantrasyonunda, motilitesinde ve viabilitesinde düşüşe sebep olduğu gözlenmiş. Ayrıca anormal sperm morfolojisinin ND grubunda arttığını gözlemlemişlerdir (12).

Mesbah ve arkadaşları ND kullanımının özellikle sperm başı anomalisi olmak üzere sperm morfolojisinde bozukluklara yol açtığını bildirmiştir. Başka çalışmalarda da yüksek dozda kullanılan ND'nin, sperm kalitesini düşürerek infertiliteye sebep olabileceği gösterilmiştir (8,9,10,39,185).

Biz de çalışmamızda sperm parametrelerini değerlendirdik ve elde ettiğimiz sonuçlar neticesinde, suprafizyolojik doz ND kullanımı sonrasında sperm sayısında, motilitesinde ve canlılığında anlamlı düzeyde azalmalar olduğunu tespit ettik (Tablo 9).

AAS'lerin kötüye kullanımının erkek fertilitesindeki düşüş ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bildirilmiştir (1).

Nandrolon Decanoate uygulaması sonrası testis dokusu histolojik olarak incelendiğinde, sıklıkla bozulmuş spermatogenezis, Leydig hücre sayısında azalma (39) ve tükenme (186), seminifer tübüllerin içindeki bazal tabakadan germ ve Sertoli hücrelerinin ayrılması (9), seminifer tübül lümeninde agregasyon (79), deforme olmuş seminifer tübül yapısı ve arasındaki interstisyel dokuların belirgin şekilde azalması (12), seminifer tübüllerde fokal disorganizasyon, interstisyel ödem ve hemoraji gibi bulguların oluştuğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ND uygulanan grubun testis dokusunu incelediğimizde, interstisyel alanda kayıp, peritübüler hyalinizasyon, ödem ve hemoraji gözlemledik. İnterstisyel alanda bazı bölgelerde Leydig hücre kaybı görülürken bazı bölgelerde ise normalden daha fazla Leydig hücresine rastladık. Germinal epitelde bulunan spermatogenik hücrelerde kayıp ve düzensizlik olduğunu gözlemledik. Fakat seminifer tübüllerin içindeki bazal tabakadan germ ve Sertoli hücresi ayrılması gözlenmedi. Germinal epitelde yüksek seviyede olmasa da vaküolizasyon görüldü (Şekil 12).

Mesbah ve arkadaşlarının 14 hafta boyunca yapmış olduğu çalışmada Sprague-dawley cinsi ratlarda 3 mg/kg/hafta ve 10 mg/kg/hafta olmak üzere iki farklı dozda ND uygulaması gerçekleştirmiş ve testis dokusu üzerine etkileri

değerlendirilmiştir. Bazal membranın kalınlaştığı intertisyel alandaki hücrelerin dejenere olduğu, ve seminifer tübül çapının azaldığı bildirilmiştir. Bu bulguların aksine bizim çalışmamızda PAS+ reaksiyon vermiş olan bazal membran yapısının düzensizleşerek seminifer tübülden ayrıldığı (ondülasyon) ve yer yer inceliyor yok olduğu gözlemlendi (Şekil 13)(185).

Sperm hücrelerinde artan DNA hasarı ve düşük sperm kalitesinin döllenme oranları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (187,188). İnfertilite gibi çeşitli olumsuz klinik belirtilerin sperm hücrelerindeki DNA hasarından kaynaklandığı bildirilmiştir (11). AAS'nin kötüye kullanımı ile oluşan infertilite probleminin sebepleri arasında sperm hücrenin nükleusunda meydana gelen DNA hasarının olduğu bildirilmiştir (189).

Biz de bu bilgiler ışığında DNA hasarını tespit etmek amacıyla PARP-1 DNA tamir enziminin immünoaktivitesini değerlendirdik ve doku düzeyinde yapmış olduğumuz immünohistokimyasal boyama sonucunda ND grubu ile diğer denek grupları kıyaslandığında, ND grubunda PARP-1 immünopozitif hücre sayılarında artışı saptadık Özellikle Sertoli hücrelerinde ekspresyon artışı olduğunu gözlemledik. ND'nin Sertoli hücrelerinde DNA hasarına sebep olduğu görüldü. (Şekil 24).

Shokri ve ark. 8 hafta boyunca yapmış oldukları çalışmada *Wistar albino* cinsi ratlarda 10 mg/kg/hafta dozda ND uygulaması yaparak testis dokusunda apoptoz meydana gelip gelmediğini tespit etmek amacıyla TUNEL ve aktif kaspaz-3 boyamaları yapmış. Sonucunda ND grubu kontrol grubuna göre kıyaslandığında ND grubunda germ hücrelerinde immünopozitif hücre sayısında artış olduğunu bildirmişlerdir (190).

Biz de kendi çalışmamızda immünohistokimyasal boyama ile kaspaz-3 immünoaktivitesini değerlendirdik. ND grubu diğer denek grupları ile kıyaslandığında kaspaz-3 immünopozitif hücre sayısında anlamlı artış olduğunu tespit ettik.

Hücre kültürü çalışmasında, Nandrolon Decanoate'nin TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-4 üretimini artırdığı ve IL-6 mRNA'nın ekspresyonunu baskıladığı bildirilmiştir (191,192).

Hughes ve arkadaşları, yapmış oldukları in vitro çalışmada suprafizyolojik dozda kullanılan Nandrolon Decanoate'nin inflamatuvar sitokin, interlökin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) ve tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) üretimini artırdığını bildirmişlerdir (193).

Çalışmamızda doku düzeyinde TNF- $\alpha$ 'nın ekspresyon düzeyini tespit etmek amacıyla immünohistokimyasal yöntem ile immünopozitif reaksiyon veren hücreleri h-skor yöntemiyle değerlendirdik ve denek gruplarını istatistiksel olarak birbirleriyle kıyasladık. Kıyaslama sonucunda ND uygulanmış grupta TNF- $\alpha$  ekspresyon düzeyinde anlamlı yönde bir artış olduğunu tespit ettik.

Ratlarda yapılan bir çalışmada AAS uygulaması sonrasında karaciğer hepatositlerinde dejeneratif lezyonlara ve inflamasyona sebep olduğu bildirilmiştir (194-196).

Ayrıca gen düzeyinde yapılan çalışmada androjenlerin hem genomik olmayan hem de genomik sinyalleme yoluyla inflamatuvar ve apoptoz yollarının önemli bir düzenleyicisi olan NF- $\kappa$ B'yi aktive ettiğine dair bulgular gösterilmiştir (197).

Son zamanlarda Curcuminin antioksidan, antibakteriyel ve antiinflamatuvar özelliğinin yanısıra, immunosupresif, antianjiyojenik, antiviral, antifungal, proapoptotik, kemoterapötik, kemopreventif, antidiyabetik, yara iyileşmesi gibi farmakolojik özelliklere sahip olması pek çok araştırmacının tedavi amaçlı bir ajan olarak kullanımını artırmıştır (13,14,198).

Salama ve arkadaşlarının 2 ay boyunca yapmış olduğu çalışmada albino cinsi ratları Kontrol, Curcumin, Kadmiyum, Kadmiyum+Curcumin olmak üzere 4 gruba ayırmışlardır. Curcumin grubu günlük 15 mg/kg dozunda curcumin verilirken, Kadmiyum grubuna 25 mg/L Kadmiyum verilmiştir. Çalışmada Kadmiyum ve curcuminin sperm parametreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Oluşturulan denek grupları arasında curcuminin, sperm sayısını ve motilitesini artırdığı, sperm anomalilerini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca yapılan testosteron ölçümünde en yüksek seviye curcumin grubunda görülmüştür ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar görülmüştür (199).

Akpolat ve ark. yapmış oldukları 18 günlük çalışmada radyasyonun neden olduğu ince bağırsak hasarına karşı curcuminin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Deney süresince 100 mg/kg curcumin intragastrik yoldan uygulanmıştır. Deneyin 10, ve 14. günlerinde radyasyon uygulanmıştır. Elde edilen bulgularda ileum dokusuna ait villuslarda kısalma, epitel altı boşluklar ve piknotik çekirdekli hücreler gözlemlenmiştir. Curcumin tedavisi ile ileumda oluşan hasarın kısmen önlendiği bildirilmiştir (200).

Lin ve arkadaşlarının 8 haftalık fareler ile yapmış oldukları çalışmada, kontrol grubu, ısı stresi (HS) alan grup, HS+  $\beta$ -karoten grubu, HS+Curcumin grubu, ve HS+  $\beta$ -karoten+Curcumin grubu olmak üzere 5 grup oluşturulmuştur. 14 günlük deney boyunca

hergün 10 mg/kg dozda  $\beta$ -karoten, 20 mg/kg dozda curcumin intragastrik yolla verilmiş ve her gün entübasyon gerçekleştirilmiştir. Deneyin 7. gününde deneklerin skrotum bölgesi 43°C'lik su banyosunda 15 dakika tutulmuştur. Deney sonunda, 14. günde denekler sakrifiye edilmiştir. HS uygulanan deneklerde ısı kaynaklı infertilite meydana gelmiştir. Curcumin ve  $\beta$ -karoten oluşan infertiliteye karşı tedavi edici etki göstermiştir. Özellikle HS+  $\beta$ -karoten+Curcumin grubunda istatistiksel olarak daha anlamlı bir iyileşme gösterilmiştir (201).

Glombik ve arkadaşlarının 12-36 haftalık farelerle yapmış oldukları çalışmada, denekler kontrol, curcumin, DEHP ve DEHP+Curcumin olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. 30 g/fare dozda DEHP ve 5mg/fare dozda curcumin 21 günlük deney boyunca oral yolla verilmiştir. DEHP testiste seminifer tübüllerde dejenerasyona, oksidatif hasara ve apoptozis artışına sebep olmuştur. İn vivo olarak değerlendirilen sperm parametreleri sonucunda DEHP'nin sperm motilitesini azalttığı ve curcuminin ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde sperm motilitesini artırdığı tespit edilmiştir. DEHP'nin testislerde neden olduğu oksidatif hasara karşı curcuminin koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (202).

İlbey ve ark. yapmış oldukları çalışmada sisplatin ile oluşan testis hasarında curcuminin koruyucu etkisi incelenmiştir. Kontrol, Sisplatin, Curcumin ve Sisplatin+Curcumin grubu olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur. Sisplatin grubuna 1. gün tek doz 7 mg/kg sisplatin uygulanması yapılmış. Curcumin grubuna deney süresince her gün 200 mg/kg dozunda curcumin uygulanmıştır. Curcuminin spermatogenezi koruduğu, Sisplatin+Curcumin grubunun ise morfolojik olarak Kontrol grubundaki testis özelliklerine benzer olduğu gözlenmiştir. Sisplatin grubunda, interstisyel alanda hyalinizasyon ve perivasküler fibrozis gözlenirken, Kontrol ve Sisplatin+Curcumin grubunda gözlenmemiştir. Sisplatin grubunda seminifer tübül çapı, germ hücre tabakası sayısı, ve testosteron düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Bu bulguların Sisplatin+Curcumin grubunda anlamlı derecede artmış olduğu gözlenmiştir.

Curcuminin, testiküler hasarın onarılmasında ve spermatogenik hücrelerin korunmasında rol aldığı, testosteron seviyesini olumlu yönde etkilerek infertilitenin tedavisinde fayda sağlayabileceği bildirilmiştir (199,203).

Günümüzde bozulan spermatogenezi düzeltebilecek tedavi yaklaşımları ön plana çıkmış olup deneysel çalışmalarla çeşitli ajanların etkileri incelenmektedir. Çalışmamızda Nandrolon Decanoate uygulaması ile testiste meydana gelen DNA hasarı, apoptoz ve inflamasyona bağlı gelişen infertilite



zerinde spermatogenezi indükleyen bir ajan olan curcuminin tedavi edici yönde olumlu etkisinin olabileceği morfolojik, morfometrik, immünohistokimyasal olarak belirlendi ve hasarın derecesi semikantitatif olarak gösterildi.

## 6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, Nandrolon Decanoate'nin sıçan testisi üzerinde nasıl toksik etki oluşturduğunu ve curcuminin ise bu toksik etkiye karşı koruyucu bir yanıt oluşturup oluşturmadığı, ışık mikroskopik düzey ve sperm parametreleri incelenerek aşağıdaki sonuçlar elde edildi;

1. Denek ağırlıkları, deney başlangıcında ve sonunda tartıldı. Deney başlangıcında gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmezken deney sonundaki denek ağırlıklarında ND grubunda anlamlı bir düşüş olduğu tespit edildi. Testis ve epididim ağırlıkları değerlendirildiğinde yine ND grubunda istatistiksel olarak anlamlı yönde azalma olduğu görüldü.

2. Testis ve epididim ağırlıkları değerlendirildiğinde ND grubunda anlamlı yönde azalma tespit edildi.

3. Sperm parametreleri değerlendirildiğinde, ND grubuna ait örneklerde diğer gruplara kıyasla sperm konsantrasyonunda, sperm motilitesi ve viabilitesinde anlamlı yönde azalmalar gözlemlendi. ND grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı oranda sperm anomali artışı olduğu tespit edildi.

4. Histopatolojik bulgularda ND grubunda interstisyel alanda kayıplar, ödem, hemoraji ve hyalinizasyon gözlemlendi. Ayrıca interstisyel alanda Leydig hücre sayısında bazı bölgelerde azalma görülürken bazı bölgelerde proliferasyon olmuş Leydig hücreleri gözlemlendi. Seminifer tübül organizasyonunda düzensizlikler görüldü. PAS pozitif boyanma sonrası bazal laminada ondülasyon ve yer yer bazal membran kaybı gözlemlendi. ND+curcumin gruplarında ise ND grubunda görülen hasarın azaldığı gözlemlendi. Curcuminin testis hasarına olumlu yönde etkisinin olduğu görüldü.

5. Testis dokusunda yapılan immünohistokimyasal incelemeler sonrasında özellikle ND grubunda kaspaz-3, PARP-1, TNF- $\alpha$  ve Nf- $\kappa$ B ekspresyonlarında anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. ND grubunda özellikle Sertoli hücrelerinde PARP-1 ekspresyonu artışı ile ND kullanımının Sertoli hücrelerinde DNA hasarına sebep olduğu tespit edildi.

Literatürde Curcuminin Nandrolon Decanoate'nin sebep olduğu testiküler hasara ve sperm parametreleri üzerine etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamız literatürdeki boşluğu dolduracak şekilde katkı sağlayacaktır. Herhangi bir toksik etkisi olmayan curcumin ajanının

infertiliteye karşı tedavi edici olarak kullanımının kliniğe önemli bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR

1. De Souza GL, Hallak J. Anabolic Steroids and Male Infertility: A Comprehensive Review. *BJU International* 108(11):1860-5, 2011.
2. Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicology letters*. 158(3):167-75, 2005.
3. Aslan SH, Aslan RO. Sporcularda Anabolik Steroidlerin Kötüye Kullanımı ve Ruhsal Belirtiler. *Spor ve Tıp Dergisi*. 6, 3-4, 1998.
4. Karila T, Hovatta O, Seppala T. Concomitant abuse of anabolic androgenic steroids and human chorionic gonadotrophin impairs spermatogenesis in power athletes. *Int J Sports Med* 25:257-263, 2004.
5. Pope, H.G., Brower, K.J. Anabolic-androgenic steroid abuse. Sadock BJ, VA Sadock (eds.): *Kaplan and Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry*'de yedinci baskı, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. s. 1085-1098, 2000.
6. Feinberg MJ, Lumia AR, McGinnis MY. The effect of anabolic-androgenic steroids on sexual behavior and reproductive tissues in male rats. *Physiol Behav*. 62:23-30, 1997.
7. Lucia A, Chicharro JL, Perez M, Serratoso L, Bandres F, Legido JC. Reproductive function in male endurance athletes: sperm analysis and hormonal profile. *J Appl Physiol* 81:2627-36, 1996.
8. Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Ardekani FM. High doses of nandrolone decanoate reduces volume of testis and length of seminiferous tubules in rats. *APMIS* 113:122-5, 2005.
9. Takahashi M, Tatsugi Y, Kohno T. Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. *Endocr J* 51:425-34, 2004.

10. Karbalay-Doust S, Noorafshan A, Ardekani FM, Mirkhani H. The reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male rats. *Asian J Androl* 9(2):235-9, 2007.
11. Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 14:727–733, 2007.
12. Ahmed, M. A. E. Amelioration of nandrolone decanoate-induced testicular and sperm toxicity in rats by taurine: Effects on steroidogenesis, redox and inflammatory cascades, and intrinsic apoptotic pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 282(3), 285–296, 2015.
13. Maheshwari, R. K., Singh, A.K., Gaddipati, J., Srimal, R. C. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sciences*, 2081-7, March 2006.
14. 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.
15. 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* 30:445-56, 1998.
16. Akpolat M, Tarladaçalışır YT, Uz YH, Metin MS, Kızılay G. Kanser tedavisinde curcuminin yeri. *Yeni Tıp Dergisi* 27:142-147, 2010.
17. Gartner LP, Hiatt JL. *Renkli Histoloji Atlası*. (Çev.Ed: Dağdeviren A, Müftüoğlu S, Karabay G) 4. Basım, s.1-2, 369-390, Güneş Tıp Kitapevleri. Ankara, 2009.
18. Sadler TW. *Langman's Medical Embriyology*. Eleventh Edition, s.246–263, 2005.
19. Junqueira, L.C., Carneiro, J. *Temel Histoloji Atlas Kitap*. (Çev.Ed: Aytakin Y, Solakoğlu S) 10. Baskım, s.135 Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2009.

20. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönler ile İnsan Embriyolojisi. (Çev.Ed: Dalçık H, Yıldırım M) s.262-282, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2008.
21. Ross HM, Pawlina JL. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. (Çev.Ed: Baykal B) 6. Basım, s.784-785, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
22. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. (Çev.Ed: Demir R) s.531-64, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.
23. Moore KL, Dalley A. F. Clinically Oriented Anatomy. 5. Edition, pp. 260, Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
24. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. Cilt 1, 4. Basım, s.322-337, Güneş Kitabevi, Ankara, 2006.
25. Yücel AH. Erkek Genital Sistemi. Sistemik Anatomi (Editör: Gövsa F) s.547-564, Güven Kitabevi, İzmir, 2008.
26. Odar V. Anatomi. Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti, Ankara, 1986.
27. Çöven N. Prenatal ve postnatal dönemdeki ratlarda testisin histogenezisi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar. Doktora Tezi. Elazığ, 1994.
28. Abraham L. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Üreme Sistemi (Çev.Ed: Demir R) s. 531-564, Palme yayıncılık, Ankara 2006.
29. Ross HM, Pawlina JL. Histology: a text and atlas. (Çev.Ed: Baykal B) Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. 6. Basım, s.788, Palme Yayıncılık, Ankara. 2014.
30. Kerr JB. Atlas of Functional Histology. 2nd ed. pp.339-358. Mosby, London, 2000.
31. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2. Basım, s.335-349, İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2016.
32. Mescher AL. Junqueira's Temel Histoloji. (Çev.Ed: Solakoğlu S) s.429-448, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2015.
33. Ash JF, Morton DA, Scott SA. Histology. McGraw-Hill, s.252-261, 2013.

34. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji ve Atlas. (Çev.Ed: Solakoğlu S, Aytekin Y) s. 418-434, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2009.
35. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji. (Çev.Ed: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P) s.379-391, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, 2009.
36. Janqueira LC, Carneiro J. Basic histology. 10th ed. pp.431-448, McGraw-Hill Co, 2003.
37. Ross MH, Pawlina W. Histology A Text And Atlas. Lippincott Williams & Wilkins. 5th Edition, pp.728-748, Philadelphia, 2006.
38. Sternberg, S.S. Histology for Pathologist. Lippincott-Raven, pp. 266, New York, 1997.
39. Kolasa A, Marchlewicz M, Wenda-Rózewicka L, Wiszniewska B. Morphology of the testis and the epididymis in rats with dihydrotestosterone (DHT) deficiency. Roczn. Akad. Med. Białymst. 49, 117–119, 2004.
40. Clermont Y. Kinetics spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev 52(1):198-236, 1972.
41. 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.
42. Ross HM, Pawlina JL. Histology: a text and atlas. Çeviren: Baykal B. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. 6. Basım, s.789-796, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
43. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology, 2nd Edition pp.375, 2003.
44. Bloom W, Fawcett DW. A textbook of Histology. Chapman&Hall, London, 1994.
45. Sternberg SS. Histology for Pathologist. Lippincott-Raven, pp.203, New York, 1997.

46. Ross HM, Pawlina JL. Histology: a Text and Atlas. (Çev.Ed: Baykal B) Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. 6. Basım, s.796-797, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
47. Günalp İ. Fertilité and Sterilité. Modern Üroloji. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, s.1013-1043, Ankara, 1975.
48. Maeda K, Ohkura S, Tsukamura H. Physiology of the Reproduction. Ed: Krinke GJ, The laboratory rat (Handbook of experimental animals) London: Academic Press, pp.148-149, London, 2000.
49. Slott VL, Suarez JD, Perreault SD. Rat sperm motility analysis: methodologic considerations. *Reprod Toxicol* 5(5), 449-58, 1991.
50. Wier PJ, Rumberger D. Isolation of rat sperm from the vas deferens for sperm motion analysis. *Reproductive Toxicology* 9(3), 327-330, 1995.
51. Ross HM, Pawlina JL. Histology: a text and atlas. Çeviren: Baykal B. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. 6. Basım, s.804, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
52. Janqueira LC, Carneiro J. Basic histology. 10<sup>th</sup>, pp.431-448, ed. McGraw-Hill Co, 2003.
53. Habert R, Veniard B, Brignaschi P, Gangnerau MN, Picon R. Absence of development of late steroidogenic lesions in rat testis during the end of fetal life. *Arch Androl*, 22, pp.41-48, 1989.
54. Levallet J, Pakarinen P, Huhtaniemi IT. Follicle-stimulating hormone ligand and receptor mutations, and gonadal dysfunction. *Archives of Medical Research*, 30(6), pp.486-494, 1999.
55. Berne RM, Levy MN. Fizyoloji. 5. Basım, s.942-943, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, 2008.
56. Fronczak CM, Kim ED, Barqawi AB. The insults of illicit drug use on male fertility. *Journal of andrology* 33(4):515-28, 2012.



57. Moss JL, Crosnoe LE, Kim ED. Effect of rejuvenation hormones on spermatogenesis. *Fertility and sterility* 99(7):1814-20, 2013.
58. Parr MK, Flenker U, Schanzer W. Sports-related issues and biochemistry of natural and synthetic anabolic substances. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 39(1):45-57, 2010.
59. Tsai SJ and Chen W. Identification of de novo androgenesis in the scalp of men with androgenetic alopecia. *Journal of Investigative Dermatology*. 126:2332-2335, 2006.
60. Kicman AT. Pharmacology of anabolic steroids. *British journal of pharmacology*. 154(3):502-21, 2008.
61. Sjoqvist F, Garle M, Rane A. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. *Lancet*. 371(9627):1872-82, 2008.
62. Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clinical therapeutics* 23(9):1355-90, 2001.
63. Yesalis CE, Bahrke MS. Anabolic-Androgenic Steroids. *Sports Medicine*, 19(5), 326–340, 1995.
64. Nigro N, Christ-Crain M. Testosterone treatment in the aging male: myth or reality? *Swiss medical weekly*. 142:w13539, 2012.
65. Parrott AC, Choi PY, Davies M. Anabolic steroid use by amateur athletes: effects upon psychological mood states. *The Journal of sports medicine and physical fitness*. 34(3):292-8, 1994.
66. Skeldon SC, Goldenberg SL. Urological complications of illicit drug use. *Nat Rev Urol* 11, 169–177, 2014.
67. Bonetti A, Tirelli F, Catapano A, Dazzi D, Dei Cas A, Solito F, Magnati G. Side Effects of Anabolic Androgenic Steroids Abuse. *International Journal of Sports Medicine*, 29(08), 679–687, 2008.

68. Schanzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clinical Chemistry*. 42(7):1001-1020, 1996.
69. Dohle GR, Smit M, Weber RF. Androgens and male fertility. *World journal of urology*. 21(5):341-5, 2003.
70. Gazvani MR, Buckett W, Luckas MJ, Aird IA, Hipkin LJ, Lewis-Jones DI. Conservative management of azoospermia following steroid abuse. *Human reproduction (Oxford, England)*. 12(8):1706-8, 1997.
71. Bergink EW, Janseen PSL, Turpijn EW, Vander Vies J. Comparison of the receptor-binding properties of nandrolone and testosterone under *in vitro* and *in vivo* conditions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 22:831-6, 1985.
72. Schwarzenberger F, Toole GS, Christie HL, Raeside JI. Plasma levels of several androgens and estrogens from birth to puberty in male domestic pigs. *Acta Endocrinol (Copenh)* 128:173-7, 1993.
73. Min T, Lee K-H. Effects of nandrolone decanoate on expression of steroidogenic enzymes in the rat testis. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(5), 658–671, 2018.
74. Kindlundh AMS, Lindblom J, Bergström L, Wikberg JES, Nyberg F. The anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate affects the density of dopamine receptors in the male rat brain. *Eu J Neurosci*. 13:291-296, 2001.
75. Van der Vies J. Pharmacokinetics of anabolic steroids. *Wien Med Wochenschr*. 143(14-15):366-368, 1993.
76. Evans NA. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *Am J Sports Med*. 32:534, 2004.
77. Busardò FP, Frati P, Sanzo MD, et al. The impact of nandrolone decanoate on the central nervous system. *Curr Neuropharmacol* 13:122-31, 2015.
78. Jarow JP, Lipshultz LI. Anabolic steroid-induced hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Sports Med* 18:429–31, 1990.

79. Shokri S, Aitken RJ, Abdolvahhabi M, Abolhasani F, Ghasemi FM, Kashani I, et al. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 106(4):324-30, 2010.
80. Moretti E, Collodel G, La Marca A, Piomboni P, Scapigliati G, Baccetti B. Structural sperm and aneuploidies studies in a case of spermatogenesis recovery after the use of androgenic anabolic steroids. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 24(5):195-8, 2007.
81. Plati J, Bucur O, Khosravi FR. Apoptotic Cell Signaling in Cancer Progression and Therapy, *Integrative Biology*. 3, 279-296, 2011.
82. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P. *Molecular Cell Biology*. 6. Basım, s.936-944, Palme Yayıncılık, 2011.
83. Erdoğan B B. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, 4:165-174, 2003.
84. Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C. Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> -ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 29(3):237-242, 2004.
85. Roshal M, Zhu Y, Planelles V. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis*, 6:103–116, 2001.
86. Staley K, Blaschke A J, Chun J. Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death and Differentiation*, 4:66-75, 1997.
87. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 26:390-7, 2001.
88. Adams JM, Cory S. Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends. Biochem Sci* 26:61-6, 2001.
89. Smaili S. Hsu Y et al. Mitochondria in Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis. *J. Bioener and Biomem*. 32(1):35-46, 2000.

90. Palmer AM, Greengrass PM, Cavalla D. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News & Perspectives*, Vol. 13, No.6, 378-384, 2000.
91. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E. et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 52(6):821-831, 2004.
92. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal* 15:983-92, 2003.
93. Ross MH, Pawlina W. *Histology a Text and Atlas*. 6th edition p.93-97, Wolters Kluwer, Lippincott Williams&Wilkins, London, 2011.
94. Mishra S, Vinayak M. Role of Ellagic Acid in Regulation of Apoptosis By Modulating Novel and Atypical PKC in Lymphoma Bearing Mice, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(281), 2-8, 2015.
95. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6:1028-1042, 1999.
96. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science*; 281:5381, 1312-17, 1998.
97. Kim PK, Mahidara R, Seolo W. The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat*. 5:293-6, 2001.
98. Yang JN, Liu CX. Caspases promoted DADA6 induced apoptosis in human Leukemia HL-60 cells. *Acta Pharmacol Sin*. 23(5):461-6, 2002.
99. Yıldırım A, Bardakçı F ve ark. *Moleküler Biyoloji. Apoptozis*. 2. Baskı, s.425-470, Nobel Yayın Dağıtım, 2010
100. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:3666-70, 1975.
101. Tracy KJ, Cerami A. TNF, A pleiotropic cytokin and therapeutic target. *Annu Rev Med* 45:491-503, 1994.

102. Beutler B, Cerami A. The biology of cachecton / TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunology* 7:625-655, 1989.
103. Carrieri PB. The role of cytokines in the pathogenesis of MS. *Int MS Journal* (2):53-59, 1994.
104. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci* 1:94(7):3195-9, 1997.
105. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. (W.B. Saunders) Third Edition, pp.250-77, Philadelphia, 1997.
106. Babu KS. Role of tumor necrosis factor alpha in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am.* 24(4):583-97, 2004.
107. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology* 214, 149-60, 2008.
108. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG ve Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacology Therapeutics*, 117, 244-79, 2008.
109. Popa C, Netea MG, Van Riel PL, Van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research* 48, 751-62, 2007.
110. Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS, Palladino MA ve Goeddel DV. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *The Proceedings of the National Academy of Science* 82, 6060-4, 1995.
111. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G et al. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NFkappa B signal transduction pathway. *Nature Cell Biology* 6, 97-105, 2004.
112. Lee DCW, Lau ASY. Effects of *Panax ginseng* on Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Mediated Inflammation: A Mini-Review. *Molecules.* 16:2802-16, 2016.

113. Lundberg IE. The role of cytokines, chemokines, and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Current Rheumatology Reports* 2, 216-24, 2000.
114. John C, Davis Jr, Desiree Van Der Heijde, Jurgen Braun. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis *Arthritis & Rheumatism*. 48:3230–3236, 2003.
115. Braun Jür, Bollow M, Neure L, Seipelt E, Seyrekbasan F, Herbst H, Sieper J. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis & Rheumatism*, 38(4), 499–505, 1995.
116. Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: Last pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle? *Curr Biol* 8, 19-22, 1998.
117. Blank V., Kourilsky P. ve Israël A. NF- $\kappa$ B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends in biochemical sciences* 17, 135-140, 1992.
118. Bharti AC, Aggarwal B.B. Nuclearfactor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy, *Biochem Pharmacol*, 64, 883-888, 2002.
119. Shishodia S, Aggarwal B.B. Nuclear Factor-kB: a friendor a foe in cancer? *Biochem Pharmacol*:68, 1071-1080, 2004.
120. Sriram N, Kalayarasan S, Sudhandiran G. Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis through Nrf2–Keap1 signaling. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 22(3), 221–236, 2009.
121. Davis M, Faustman D.L. A role for transcription factor NF-B in autoimmunity: possible interactions of genes, sex, and the immune response. *Adv Physiol Educ* 30, 152–158, 2006.
122. Baldwin Jr A S. The NF-kappaB and I kappa B proteins: new discoveries and insight. *Annual Rev. Immunol.*, 14:643–683, 1996.

123. Kopp EB, Ghosh S. NF-kappa B and Rel proteins in innate immunity. *Adv. Immunol.* 58, 1–27, 1995.
124. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:49-62, 2007.
125. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NFκB signaling. *Cell Research*, 21, 103-115, 2011.
126. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18, 2195-224, 2004.
127. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-κB and REL proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 16:225-260, 1998.
128. Richmond A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol* 2, 664-74, 2002.
129. Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor-κB - A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases, *The New England Journal of Medicine* 336, 1066-1071, 1997.
130. Ueda Y, Richmond A. NF-κB activation in melanoma. *Pigment Cell Res* 19, 112–124, 2006.
131. Gilmore T, Gapuzan ME, Kalaitzidis D, Starczynowski D. Rel/NF-κB/IκB signal transduction in the generation and treatment of human cancer. *Cancer Letters*, 181, 1-9, 2002
132. 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.
133. Burkle A. Poly (ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD+. *Febs J* 272(18):4576-89, 2005.

134. Schreiber V, Ame JC, Dolle P. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with 78PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* 277(25):23028-36, 2002.
135. Li Y, Oh HJ, Lau YF. The poly (ADP-ribose) polymerase 1 interacts with Sry and modulates its biological functions. *Mol Cell Endocrinol* 257-258:35-46, 2006.
136. 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.
137. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee R. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Current science*, 87(1), 44-53, 2004.
138. Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(2), 97-111, 2004.
139. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies, *Anticancer Research* 23:363-398, 2003.
140. Srivastava RM, Singh S, Dubey SK, Misra K, Khar A. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *International Immunopharmacology*, 11(3), 331–341, 2011.
141. Aggarwal B, Sundaram C, Malani C, Ichikawa NH. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol.* 595:1-75, 2007.
142. Pan K, Luo Y, Gan Y, Baek SJ, Zhong Q. pH-driven encapsulation of curcumin in self-assembled casein nanoparticles for enhanced dispersibility and bioactivity. *Soft Matter*, 10(35), 6820, 2014.
143. Araujo CC, Leon LL. Biological activities of curcuma longa, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96 (5), 723-8, 2001.



144. Menon, V.P. and Sudheer A.R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 595:103-125, 2007.
145. Goel A, Ajaikumar BK, Aggarwal BB. Curcumin as “Curcumin”: From kitchen to clinic, *Biochemical Pharmacology*, 75:787-809, 2008.
146. Shishodia S. Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. *Biofactors* 39(1):37-55, 2013.
147. Shishodia S, Singh T, Chaturvedi MM. Modulation of transcription factors by curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 595, 127-48, 2007.
148. Aggarwal BB, Kumar A, Aggarwal MS, Shishodia S. Curcumin Derived from Turmeric: a Spice for All Seasons. *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, 349-78, 2007.
149. Jagetia, GC. Radioprotection and radiosensitization by curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 595, 301-20, 2007.
150. Kanski J. et al. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure–activity studies. *J. Nutr. Biochem.* 13, 273–281, 2002.
151. Shen L, Ji HF. The pharmacology of curcumin: is it the degradation products? *Trends Mol Med.* 18:138-144, 2012.
152. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J. Biol. Chem.* 270, 24995–25000, 1995.
153. Hong J, Bose M, Ju J, Ryu JH, Chen X, Sang S, Lee MJ, Yang CS. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A (2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis* 25(9):1671-1679, 2004.
154. Prasad NS, Raghavendra R, Lokesh BR, Naidu KA. Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 70(6):521-528, 2004.

155. Bharti, AC et al. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J. Immunol.* 171, 3863–871, 2003.
156. Aggarwal BB et al. Targeting signal-transducer-andactivator- of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1091, 151–169, 2006.
157. Chakravarti N. et al. Targeting constitutive and interleukin-6-inducible signal transducers and activators of transcription 3 pathway in head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin (diferuloylmethane). *Int. J. Cancer* 119, 1268–1275, 2006.
158. Bharti AC. et al. Nuclear factor-kB and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood* 103, 3175–3184, 2004.
159. Sandur SK. et al. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radic. Biol. Med.* 43, 568–580, 2007.
160. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev.* 14(2):141-153, 2009.
161. Ozturk G, Akbulut KG, Güney G, Acuna-Castroviejo D. Agerelated changes in the rat brain mitochondrial antioxidative enzyme ratios: Modulation by melatonin. *Experimental Gerontology*, 47(9), 706-711, 2012.
162. Sahebkar A. Molecular mechanism for curcumin benefits against ischemic injury. *American Society for Reproductive Medicine*, 94(5), 2010.
163. Fang J. et al. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity. *J. Biol. Chem.* 280, 25284–25290, 2005.

164. Syng-Ai, C. et al. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Mol. Cancer Ther.* 3, 1101–1108, 2004.
165. Shishodia, S. et al. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF- $\kappa$ B activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem. Pharmacol.* 70, 700–713, 2005.
166. Balasubramanian S, Eckert RL. Curcumin suppresses AP1 transcription factor-dependent differentiation and activates apoptosis in human epidermal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 6707–6715, 2007.
167. Garg AK et al. Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1630–1647, 2005.
168. Jana NR. et al. Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 11680–11685, 2004.
169. Anto RJ et al. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis* 23, 143–150, 2002.
170. Collett GP, Campbell FC. Curcumin induces c-jun Nterminal kinase-dependent apoptosis in HCT116 human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 25, 2183–2189, 2004.
171. Bhattacharyya S. et al. Curcumin prevents tumor-induced T cell apoptosis through Stat-5a-mediated Bcl-2 induction. *J. Biol. Chem.* 282, 15954–15964, 2007.
172. Pandya U, Saini MK, Jin GF, Awasthi S, Godley BF, Awasthi YC. Dietary curcumin prevents ocular toxicity of naphthalene in rats. *Toxicology Letters*, 115: 195-204, 2000.
173. Ramsewak RS, Dewitt DL, Nair MG. Cytotoxicity, antioxidant and antiinflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine*, 7, 303–308, 2000.

174. Iqbal M, Okazaki Y, Okada S. In vitro curcumin modulates ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced peroxidation of microsomal membrane lipids and DNA damage. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 1, 151–160, 2003.
175. Naz RK. Can curcumin provide an ideal contraceptive? *Molecular Reproduction & Development*, 78(2), 116-23, 2011.
176. Abarikwu SO, Akiri OF, Durojaiye MA, Alabi AF. Combined administration of curcumin and gallic acid inhibits gallic acid-induced suppression of steroidogenesis, sperm output, antioxidant defenses and inflammatory responsive genes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 49-60, 2014.
177. Aktas C, Kanter M, Erboğa M, Oztürk S. Anti-apoptotic effects of curcumin on cadmium-induced apoptosis in rat testes. *Toxicology and Industrial Health*, 28(2), 122-30, 2012.
178. Galano A. Role of the reacting free radicals on the antioxidant mechanism of curcumin. *Chemical Physics*, 363, 13-23, 2009.
179. Reddy AC, Lokesh BR. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 137, 1-8, 1994.
180. Adamkovicova M, Toman R, Martiniakova M, Omelka R, Babosova R, Krajcovicova V, Massanyi P. Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1), 2016.
181. Atli O, Baysal M, Aydoğan-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.
182. Mohamed HM, Mohamed MA-H. Effect of different doses of nandrolone decanoate on lipid peroxidation, DNA fragmentation, sperm abnormality and histopathology of testes of male Wistar rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(1), 1–11, 2015.

183. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett ATK. Histological Changes Occurring in the Contralateral Testes of Prepubertal Rats Subjected to Various Durations of Unilateral Spermatic Cord Torsion. *The Journal of Urology*, 133(5), 906–911, 1985.
184. Clerico A, Ferdeghini M, Palombo C, Leoncini R, Del Chicca MG, Sardano G et al. Effect of anabolic treatment on the serum levels of gonadotropins, testosterone, prolactin, thyroid hormones and myoglobin of male athletes under physical training. *J Nucl Med Allied Sci* 25:79–88, 1981.
185. Mesbah SF, Shokri S, Karbalay-Doust S, Mirkhani H. The Effect of nandrolonedecanoate on the body, testis and epididymis weight and semen parameters in adult male rats. *Iran J Med Sci* 32(2), 2007.
186. Svechnikov K, Izzo G, Landreh L, Weisser J, Söder O. Endocrine disruptors and Leydig cell function. *J Biomed Biotechnol* 2010: Article ID 684504, 2010.
187. Hurt GS, Howards SS, Turner TT. Repair of experimental varicoceles in the rat. Long-term effects on testicular blood flow and temperature and cauda epididymidal sperm concentration and motility. *J Androl* 7:271–276, 1986.
188. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 13:11–19, 1998.
189. Said S, Funahashi H, Niwa K. DNA stability and thioldisulphide status of rat sperm nuclei during epididymal maturation and penetration of oocytes. *Zygote* 7:249–254, 1999.
190. Shokri S, Aitken RJ, Abdolvahabi M, Abolhasani F, Ghasemi FM, Kashani I, Barbarestani M. Exercise and Supraphysiological Dose of Nandrolone Decanoate Increase Apoptosis in Spermatogenic Cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 106(4), 324–330, 2009.
191. Thompson RW, McClung JM, Baltgalvis KA, Davis JM, Carson JA., Modulation of overload-induced inflammation by aging and anabolic steroid administration. *Experimental Gerontology* 41:1136-1148, 2006.

192. Marshall-Gradisnik S, Green R, Brenu E, Weatherby R. Anabolic androgenic steroids effects on the immune system: a review. *Open Life Sciences*, 4(1), 2009.
193. Hughes TK, Fulep E, Juelich T, Smith EM, Stanton GJ. Modulation of immune responses by anabolic androgenic steroids, *Int. J. Immunopharmacol.*, 17, 857-863, 1995.
194. Boada LD, Zumbado M, Torres S, López A, Díaz-Chico BN, Cabrera JJ, Luzardo OP. Evaluation of acute and chronic hepatotoxic effects exerted by anabolic-androgenic steroid stanozolol in adult male rats. *Arch. Toxicol.*, 73(8-9), 465- 472, 1999.
195. Welder AA, Robertson JW, Melchert RB. Toxic effects of anabolic-androgenic steroids in primary rat hepatic cell cultures. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 33(4), 187-195, 1995.
196. Neri M, Bello S, Bonsignore A, Cantatore S, Riezzo I, Turillazzi E, Fineschi V. Anabolic Androgenic Steroids Abuse and Liver Toxicity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(5), 430–437, 2011.
197. McGrath KCY, Li XH, Gaus K, Williams P, Celermajer DS et al. Androgens Rapidly Activate Nuclear Factor-Kappa B via Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signalling in Human Vascular Endothelial Cells. *J Steroids Hormon Sci* S2:005. doi: 10.4172/2157-7536.S2-005, 2012.
198. Tarladaçalışır YT, Uygun M, Akpolat M, Uz YH. E ve C vitaminlerinin cisplatin hepatotoksitesini önlemedeki etkilerinin histolojik olarak incelenmesi. *Trakya Ün v Tıp Fak Derg* 22(3):124-31, 2005.
199. 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.
200. Akpolat M, Topcu-Tarladaçalışır 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.

201. Lin C, Choi YS, Park SG, Gwon LW, Lee JG, Yon J-M, Nam S-Y. Enhanced Protective Effects of Combined Treatment with  $\beta$ -Carotene and Curcumin against Hyperthermic Spermatogenic Disorders in Mice. *BioMed Research International*, 1–8, 2016.



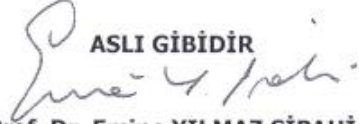
202. Glombik K, Basta-Kaim A, Sikora-Polaczek M, Kubera M, Starowicz G, Styrna J. Curcumin influences semen quality parameters and reverses the di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)-induced testicular damage in mice. *Pharmacological Reports*, 66(5), 782–787, 2014.

203. Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A, Somay A. Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: Mitogenactivated protein kinase and nuclear factor kappa B signaling pathways. *Hum Reprod* 24, 1717–25, 2009.



## 8. EKLER

### Ek 1: Türkçe Etik Kurul Onayı

	<p>T.C. <b>BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ</b> <b>Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu</b></p>	
<p><b>TOPLANTI TARİHİ</b> : 05.10.2017 <b>TOPLANTI NO</b> : 2017/06</p>		
<p>3- Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2017-20-05/10 Protokol no'lu "Suprafizyolojik Dozda Kullanılan Nandrolon Decanoate'in Oluşturduğu Testis Hasarına Karşı Curcumin'in Etkisi" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,</p> <p>Oy birliği ile karar verildi.</p>		
<p> <b>ASLI GİBİDİR</b> <b>Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHİ</b> <b>Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkan Vekili</b></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** : October 5, 2017  
**Meeting No** : 2017/06

- 3- Research Application Registered by 2017-20-05/10 and titled "The Effects of Curcumin Against Testicular Injury Constituted from Nandrolone Decanoate Being Used at a Supraphysiological Dosage" has been approved by the Animal Experiments Local Ethical Committee

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

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Karabük'te doğdum. 2004 yılında Özel Safran İlköğretim Okulu'ndan, 2008 yılında Safranbolu Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nden mezun olarak ilk ve orta öğrenimimi Karabük'te tamamladım. 2013 yılında İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden mezun oldum. 2015 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. Halen bu bölümde çalışmalarına devam etmekteyim.

