

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KRONİK ALKOLİK SIÇANLARDA OLUŞAN TESTİS
HASARI ÜZERİNE CHRYSİN'İN KORUYUCU
ETKİSİNİN HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE BAĞIŞ

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Cengiz BAYÇU

EKİM-2013

KABUL VE ONAY SAYFASI

Merve BAĞIŞ'ın Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak hazırladığı "Kronik Alkolik Sıçanlarda Oluşan Testis Hasarı Üzerine Chrysin'in Koruyucu Etkisinin Histolojik olarak İncelenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih

30.10.2013

Üye : Prof. Dr. Cengiz BAYÇU

Üye : Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK

Üye : Prof. Dr. Hilmi ÖZDEN

Üye : Prof. Dr. Başar SIRMAGÜL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01.11.2013 tarih ve 975/1-4527 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada etanolün sıçan testis dokusu üzerinde oluşturduğu hasarlar biyokimyasal ve histolojik düzeyde incelenmiştir. Testis dokusunda etanol toksisitesine bağlı oluşan hasarlara karşı chrysin'nin koruyucu özellikleri değerlendirildi.

Çalışmamızda 200-300 gr ağırlığındaki 35 erişkin Sprague-Dawley erkek sıçan 5 gruba ayrıldı (n=7). Gruplara 30 gün her gün aynı saatte oral yolla mısır yağı (1ml), etanol (%40'lık 3g/kg), chrysin (50mg/kg) ve ethanol+chrysin (%40'lık 3 mg/kg etanol ve mısır yağında çözdürülen 50mg/kg chrysin) verildi. Deney sonunda histolojik incelemenin yanı sıra testis doku örneklerinde MDA ve GSH düzeyleri, SOD ve CAT enzim aktivitesi; serumda ise testesteron seviyeleri ölçüldü.

Deney sonunda vücut ağırlıkları kontrole oranla diğer gruplarda anlamlı olmayan bir düşüş göstermiştir. Testis indeksi etanol kullanımıyla önemli ölçüde küçülmüştür. Etanol grubunda, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin tübül lümenine döküldüğü, germ hücre serisinin azaldığı, spermatogenetik hücreler arasındaki dizilimde bozukluk, interstisyel alanda genişleme ve ödem oluştuğu, spermatogenik hücrelerde vakuol oluştuğu gözlemlendi. Chrysin uygulamasıyla etanol grubunda oluşan hasarlarda belirgin bir düzelme görüldü. GSH düzeyleri etanol grubunda diğer gruplara oranla anlamlı olarak azaldı. CAT ve SOD enzim aktiviteleri etanol grubunda kontrole oranla anlamlı bir şekilde azalırken; chrysin CAT enzim aktivitesini anlamlı bir şekilde arttırmış, düşen SOD enzim aktivitesinde ise etkili olmamıştır. MDA düzeyleri kontrole kıyasla etanol grubunda belirgin oranda artmış, chrysin uygulamasıyla kontrole yaklaşmıştır. Testosteron seviyesinin chrysin+etanol ve chrysin gruplarında arttığı, kontrol ve etanol gruplarında ise azaldığı görülmüştür.

Sonuç olarak, kuvvetli bir antioksidan olan Chrysin'nin özellikle testis dokularını alkol gibi bazı toksik maddelere karşı koruyabildiği ve serumda testesteron seviyelerinde önemli artış sağladığı saptandı. Bu nedenle chrysin'nin alkole bağlı infertilite çalışmalarında kullanılabilirliğini artırıcı çalışmaların yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: etanol, chrysin, testis, sıçan, testosteron, MDA

ABSTRACT

In this study, biochemical and histological damage of ethanol are formed on rat testis tissue was investigated. Chrysin testicular tissue protective properties against damage caused by ethanol toxicity were evaluated.

In our study, 35 adult male Sprague - Dawley male rats weeing 200-300 g were divided into 5 groups (n = 7). Groups at the same time every day, 30-day oral administration of corn oil (1 ml) , ethanol (40% 3g/kg) , chrysin (50mg/kg) and ethanol + chrysin (40% of 3 mg / kg ethanol, corn oil, thawed chrysin 50mg/kg) was given. Histological examination of testicular tissue samples at the end of the experiment, as well as the levels of MDA and GSH, SOD and CAT enzyme activity in the serum testosterone levels were measured.

In the body weight control showed a non significant decrease compared to the other groups. The use of ethanol significantly decreased testicular index. Ethanol group, completed the maturation of germinal cells flows into the lumen of the tubules, germ cell line decreased sequence of spermatogenic cells disorder, interstitial edema occurred in the opening and, of germ cells was observed in the vacuole. Chrysin application of the ethanol group showed a significant improvement in damage. GSH levels were significantly decreased in the ethanol group compared to other groups. CAT and SOD enzyme activity compared to the control group significantly decreased ethanol; chrysin CAT enzyme activity increased significantly, falling SOD enzyme activity was not effective. MDA levels were significantly increased in the ethanol group compared to the control,

application control, approached chrysin. Chrysin + ethanol and increases the level of testosterone in groups, the control and ethanol groups has decreased.

As a result, a strong antioxidant, especially testicular tissue Chrysin can protect against toxic substances, such as alcohol and serum levels of testosterone think it provides a significant increase. Therefore, to increase the availability of chrysin studies are needed to study alcohol-related infertility.

Keywords: ethanol, chrysin , testis , rat , testosterone, MDA

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Testisin Embriyolojik Gelişimi.....	3
2.2. Testisin Anatomisi.....	4
2.3. Testis Histolojisi.....	6
2.3.1. İnterstisyel Doku.....	6
2.3.2. Seminifer Tübüller.....	6
2.3.2.1. Sertoli hücreleri.....	7
2.3.2.2. Sertoli Hücrelerinin Fonksiyonları.....	8
2.3.2.3. Spermatogonyumlar.....	8
2.3.2.4. Spermatozitler.....	9
2.3.2.5. Spermiyogenez.....	10
2.4. Etanol.....	10
2.4.1. Alkolün Üreme Sistemine Etkisi.....	12
2.5. Serbest Radikaller.....	13
2.5.1. Serbest Radikallerin Yapıları ve Kaynakları.....	13
2.5.2. Serbest Radikallerin Etkileri.....	14
2.6. Antioksidanlar.....	14

2.6.1. Doğal Antioksidanlar	15
2.6.1.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri	15
2.6.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	15
2.6.1.1.2. Katalaz (CAT).....	15
2.6.1.1.3. Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon Peroksidaz	15
2.7. Flavonoidler.....	15
2.7.1. Chrysin	16
2.7.1.1. Chrysin'nin Etki Alanları	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	17
3.1. Hipotez	17
3.2. Araştırma Tipi.....	17
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklem Büyüklüğü	17
3.4. Deney Grupları	17
3.5. Değerlendirme Yöntemi.....	19
3.5.1. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü.....	19
3.5.2. Bouin Tespitinin Hazırlanışı.....	19
3.5.3. Dokuların Alınması.....	19
3.6. Testis Ağırlıklarının Ölçümü.....	20
3.6.1. Testis Ağırlık İndeksi Hesaplaması	20
3.7. Histolojik İnceleme İçin Testis Dokularının Hazırlanması.....	20
3.7.1. Periyodik Asit-Schiff+Hematoksilin boyasının hazırlanışı.....	21
3.7.2. Kesitlerin Alınması ve Boyanması	22
3.8. Biyokimyasal Analizler.....	24
3.8.1. Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması	24
3.8.2. Süperoksit dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	24
3.8.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Ölçümü	24
3.8.4. Redükte Glutasyon (GSH) Miktarının Ölçümü	24
3.8.5. Malondialdehit Miktarının Ölçümü	25
3.8.6. Protein Düzeylerinin Analizi	25
3.8.7. Testosteron Miktarının Ölçümü.....	25
3.9. Histolojik Değerlendirme	25
3.9.1. Seminifer tübül çapları (STÇ).....	25

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	26
5. BULGULAR	27
5.1. Deney Sonu Vücut Ağırlığı Farkı.....	27
5.2. Toplam Testis Ağırlığı	28
5.3. Testis Ağırlık İndeksi.....	29
5.4. Testis Tübül Çapı Ölçümü	31
5.5. Biyokimyasal Bulgular.....	32
5.5.1. Grupların GSH Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	32
5.5.2. Grupların CAT Enzim Aktivite Düzeylerinin Karşılaştırılması	33
5.5.3. Grupların SOD Enzim Aktivite Düzeylerinin Karşılaştırılması	34
5.5.4. Grupların MDA Düzeylerinin Karşılaştırılması	35
5.5.5. Grupların Testosteron Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	36
5.6. Histolojik Bulgular.....	38
5.6.1. Kontrol Grubu Işık Mikroskopik Bulguları.....	39
5.6.2. Etanol Grubu Işık Mikroskopik Bulguları.....	39
5.6.3. Mısır Yağı Grubu Işık Mikroskopik Bulguları	40
5.6.4. Chrysin Grubu Işık Mikroskopik Bulguları.....	40
5.6.5. Chrysin+Etanol Grubu Işık Mikroskopik Bulguları.....	41
6. TARTIŞMA	42
6.1. Sıçanların Deney Sonu Vücut Ağırlığı Farkı, Testis Ağırlığı ve Testis İndeksi .43	
6.2. Biyokimyasal Verilerinin Karşılaştırılması.....	43
6.3. Testosteron Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	46
6.4. Histolojik Verilerinin Karşılaştırılması.....	47
6.5. Seminifer Tübül Çapı.....	49
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	51
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Deney grupları ve hayvanlara uygulanan maddeler	18
Tablo 2. Doku takip yöntemine ait süreler.	21
Tablo 3. HE boyama yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri.....	22
Tablo 4. PAS+H boyama yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri.	23
Tablo 5. Gruplara göre deney sonu vücut ağırlığı farkları.....	27
Tablo 6. Sıçanların gruplarına göre toplam testis ağırlıkları	28
Tablo 7. Sıçanların gruplarına göre testis ağırlık indeksleri.	30
Tablo 8. Testis indekslerine göre grupların ikili karşılaştırma sonuçları.....	30
Tablo 9. Sıçanların gruplarına göre tübül değerleri.....	31
Tablo 10. Sıçan testis dokusunda GSH seviyesindeki değişimler.....	33
Tablo 11. Sıçan testis dokusunda CAT seviyesindeki değişimler.....	34
Tablo 12. Sıçan testis dokusunda SOD seviyesindeki değişimler.....	35
Tablo 13. Sıçan testis dokusunda MDA seviyesindeki değişimler	36
Tablo 14. Sıçan testis dokusunda Testosteron seviyesindeki değişimler	37

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Sıçanların vücut ağırlık farklarının deney gruplarına göre karşılaştırması.....	28
Şekil 2. Sıçanların toplam testis ağırlığının deney gruplarına göre karşılaştırması.....	29
Şekil 3. Sıçanların testis ağırlık indeksi deney gruplarına göre karşılaştırması.....	31
Şekil 4.Sıçanların tübül çaplarının deney gruplarına göre karşılaştırması.....	32
Şekil 5. Deney sonucunda gruplar arası GSH seviyelerinin karşılaştırılması.....	33
Şekil 6. Deney sonucunda gruplar arası CAT seviyelerinin karşılaştırılması.....	34
Şekil 7. Deney sonucunda gruplar arası SOD seviyelerinin karşılaştırılması.....	35
Şekil 8. Deney sonucunda gruplar arası MDA seviyelerinin karşılaştırılması.....	36
Şekil 9. Deney sonucunda gruplar arası Testosteron seviyelerinin karşılaştırılması.....	37
Şekil 10. Kontrol grubu (HE, H+PAS).....	39
Şekil 11. Etanol grubu (HE, H+PAS).....	39
Şekil 12. Mısır Yağı (HE, H+PAS).....	40
Şekil 13. Chrysin grubu (HE, H+PAS).....	40
Şekil 14. Etanol+Chrysin (HE, H+PAS).....	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CAT	: Katalaz
CH	: Chrysin
EtOH	: Etanol
g	: Gram
GSH	: Redükte glutatyon
GnRH	: Gonodotropin relasing hormon
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksid
H-E	: Hematoksilen-eozin
kg	: Kilogram
LH	: Luteinizan hormon
i.p	: İntra peritonel
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µm	: Micrometre
NBT	: Nitroblue tetrazoliumu
Nm	: Nanometre
PAS	: Periyodik asit schiff
ROS	: Reaktif oksijen radikalleri
SOD	: Süper oksid dismutaz
TA	: Testis ağırlığı
TBARS	: Tiyobarbiturat reaktifi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Testisler, cinsiyet karakterleri gelişimi ile yardımcı üreme bezleri fonksiyonu için gerekli bir hormon olan testosteronu ve üreme için çok önemli olan spermatozoonları üretmektedirler (85). Bu organ dışarıdan verilen veya alınan toksik maddelerden kolaylıkla etkilenmektedir. Testis için toksik olan maddelerin başında alkol gelmektedir (26,31).

Alkolün insan ve hayvanlarda üreme hücrelerinde hasara neden olduğu bilinmektedir. Alkol testise toksik etki yaparak sperm sayısında düşüş ve hareketliliğinde azalmaya neden olurken kronik alkolik olan erkeklerde ise, testis atrofisi, yardımcı üreme organlarında fonksiyon bozukluğu, spermatogenezde düzensizlikler, spermin kapasitasyon aktivitesine olumsuz etkileyerek spermatozoonların dölleme yeteneğini azaltması ve Sertoli hücrelerinde de hasara neden olarak infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (26,31,46,85,90). Ayrıca alkol hipotalamus-hipofiz-gonadal eksenini bozarak testosteron ve dihidrotestosteron seviyesini de olumsuz etkilemektedir (28,52). Erkeklerde infertiliteye neden olan faktörlerden birisi de oksidatif stres ve oksidatif stres sonucunda serbest radikaller meydana gelir. (21). Serbest radikaller süperoksit, hidroksil, lipid peoksit ve nitrik oksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahip bileşiklerdir (20). Serbest radikal/antioksidan dengesinin, serbest radikaller lehine kayması sonucu oksidatif stres meydana gelir (30). Artan oksidatif stres, DNA, protein ve lipid gibi makromoleküllerde oksidatif hasara yol açmaktadır. Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aştıklarında öncelikle hücre membranlarını etkilerler. Lipidler ise membranda en çok hasara uğrayan kimyasal yapılardır. Membranda bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) yöntemiyle ölçümü yapılabilen malondialdehit (MDA) bileşikleri oluşur. Oluşan MDA, membran lipidlerini çapraz bağlayarak polimerize eder. Polimerizasyon sonucu iyon transportu ve enzim aktivitelerinde bozulma gibi membran özelliklerini etkileyen değişiklikler meydana gelir (87). Serbest radikaller, oksidatif

strese neden olduklarından, çoğu antioksidanlar oksidatif strese bağılı olarak ortaya çıkan doku ve organ hasarlarını engellerler (66).

Oksidatif strese karşı çeşitli antioksidanlar kullanılmaktadır. Antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu, proteinlerin çapraz bağlanmalarını ve DNA mutasyonunu önleyen bileşiklerdir. Ksenobiyotiklere ve toksik radikal reaksiyonlara karşı hücreleri koruyan antioksidanlar; flavonoidler, glutatyon, glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksid dismutaz, tioredoksin redüktaz olarak sıralanabilirler. Flavonoidler antioksidan etkilerinden dolayı kapsamlı bir şekilde önem kazanmışlardır. Çalışmalarda çok sık kullanılan flavonoidler: chrysin, genisteindir, luteolindir.

Chrysin bir flavonid olup aynı zamanda bir antioksidan, antikanserojen, antiestrogenik ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir (19,55). Dişi ve erkekte cinsiyet hormonlarının sentezinde aromataz enzimi rol almaktadır. Aromataz enzimi (p450 sitokrom) testosteronu östradiole dönüştüren bir ajandır. Aromataz enziminin bloke edilmesi testosteron seviyesinde bir artışa neden olmaktadır. Chrysin de bir aromataz enzimi inhibitörüdür ve kullanılması durumunda testosteron düzeyini ve sperm kalitesini arttırmaktadır (33).Chrysin'nin etanol toksisitesine karşı karaciğer, böbrek vs. organlarda koruyucu etkisi saptanmış, ayrıca sıçanlarda sperm kalitesini arttırdığı ve testosteron düzeyini arttırdığı bulunmuştur (19). Fakat etanole bağılı testis hasarına karşı koruyucu etkisi konusunda literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışma testiste etanol etkisiyle oluşan dejeneratif etkilerin chrysin sayesinde düzelebileceği fikrinden hareketle planlandı ve gerçekleştirildi. Etanolün sıçan testislerinde oluşturduğu dejeneratif etkiler ve chrysin' in etanol toksisitesine karşı koruyucu etkilerinin olup olmadığı ışık mikroskobu ve biyokimyasal düzeyde araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testisin Embriyolojik Gelişimi

Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti, X kromozomuna sahip ovum'un X veya Y kromozomunu taşıyan sperm ile fertilizasyonuna bağlı olsada erkek ve dişi morfolojik karakteristik özellikleri embriyonun 7. haftasına kadar gelişmeye başlamaz (56). Gonadlar başlangıçta bir çift uzunlamasına, sölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş genital veya gonadal sırtlar halinde belirirler. Gelişimin 6.haftasına kadar bu gonadal sırtlar içinde germ hücreleri yoktur. Primordiyal germ hücreleri, gelişimin erken evrelerinde yolk kesesi duvarında endoderm hücreleri arasında ve allantoise yakın bir yerde belirirler. Amibik hareketlerle son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerler, 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6. haftada genital kıvrımlara tamamen yerleşirler. Böylece henüz farklılaşmamış fötal gonad gebeliğin 6. haftasında ortaya çıkmış olur (56,70).

7.haftadan önce gonodların görünümü her iki cinstede benzer olduğundan "farklanmamış gonadlar" olarak isimlendirilirler. Erkek fenotipinin gelişimi için bir Y kromozomu gereklidir. Testis belirleyici faktör (TBF) için gerekli olan SRY geninin, Y kromozomunun kısa kolundaki cinsiyet belirleyici bölgeye yerleştiği belirlenmiştir. Y kromozomu tarafından düzenlenen, testis belirleyici faktör (TBF), testiküler farklılaşmayı sağlamaktadır. Bu faktörün etkisi altında, gonodal kordonlar, seminiferöz kordonlara (seminiferöz tübül primordiyumlarına) farklılaşırlar (56).

Testis belirleyici faktör, gonodal kordonları uyararak, onların farklanmamış gonadın medullasının derinliklerine doğru uzamasını sağlar, kordonlar burada dallanarak anastomoz yaparlar ve rete testisi oluştururlar. Gelişimin daha ileri evrelerinde tunika albuginea adlı yoğun fibröz bir bağ dokusunun araya girmesi ile testis kordonlarının yüzey epiteliyle olan ilişkileri sona erer. Kordonlar puberteye kadar kapalıdır. Puberteden sonra lümen oluşur ve seminifer tübüller belirir. Seminiferöz

tübül duvarında iki tip hücre bulunur. Bunlar Sertoli hücreleri ve spermatogonia hücreleridir. Sertoli hücreleri tarafından salgılanan müllerian inhibe edici madde paramezonefrik (müllerian) kanalların gerilemesini sağlamaktadır (56,70). Seminifer tübüller kanalize olur olmaz rete testis tübüleriyle birleşir ve duktuli efferentes ile devam ederler. Duktus deferens olarak bilinen bu kanallar, rete testis ile wolf kanallarını birbirine bağlar (70).

Leydig hücreleri, 8-18. haftalar arasında interstisyel dokudaki mezenkimal hücrelerin hızlı değişimi sonucu ortaya çıkar. Gebeliğin ortasına gelindiğinde, testisin %50'sini bu hücreler oluştururken doğuma doğru sayıları giderek azalır (63). Gestasyonun 8.haftasında, Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlarlar. Testosteron üretimi insan koryonik gonadotropik hormonu (hCG) tarafından stimüle edilir, testosteron, erkeklerde mezonefrik kanallardan erkek genital kanalların oluşumunu uyarır. 8. haftada, fetal testisler tarafından üretilen testosteron etkisiyle, her bir mezonefrik kanalın proksimal kısımları kıvrıntılı bir hal alır ve epididimis oluşur (56).

İkinci ayın sonunda testis ve mezonefroz karın arka duvarına ürogenital mezenterle bağlıdır. Mezonefroz dejenere olduktan sonra bu bağlar gonadın mezenteri haline gelir. Mezonefrozun dejenere olması ile birlikte, abdomenin her iki tarafında, gubernakulum adı verilen bir ligament, gonadların inferior kutuplarından aşağı doğru uzanır. Müller inhibe edici faktör testislerin inguinal halkalara doğru hareketini sağlamaktadır. Testislerin inguinal kanallardan skrotuma inişi, genellikle 26.haftada başlar ve 2-3 gün devam eder. Testis skrotuma inerken beraberinde kendileri ile ilişkili olan kan ve lenf damarları, otonom sinirler ve Tunika vaginalis adı verilen bir periton kıvrımında beraberinde skrotuma taşır (80). Yeni doğanların %97 den fazlasında her iki testiste skrotum içerisinde bulunur (56,70).

2.2. Testisin Anatomisi

Erişkin bir erkeğin testisi 4x3.5x3 cm boyutlarındadır. Testisler ovoid şekilli gonadlardır. Her birinin hacmi 30 ml kadardır. Testisin anterolateral 2/3 bölümü serbest

iken, posterolateral yüzü epididimis, bağ dokusu ve damarlarla örtülüdür (77). Testis parankimi dıştan içe doğru, en dışta tunika vaginalis, ortada tunika albuginea ve en içte tunika vaskulosa olmak üzere 3 tabakadan oluşan bir kapsül ile sarılıdır. Tunika vaginalis visseral ve parietal olmak üzere 2 tabakadan oluşur. Visseral tabaka testisin ön yüzünde ve her iki yanında bulunur. Parietal tabaka ise testisin alt kısmından üst kısmına doğru uzanır. Bu iki tabaka arasında potansiyel bir boşluk vardır. Bu boşlukta az miktarda seröz sıvı bulunur (13,74). Bunların da dışında sırasıyla; “fascia spermatica interna”, “musculus cremaster”, “fascia spermatica externa”, tunika dartos ve cilt yer alır (49).

Tunika albuginea kalın, sert fibröz bir tabaka olup testis içeriğini sarar. Tunika albugineanın yapısında, esas olarak kollajen doku içine dağılmış çok sayıda, dallanmış, düz kas hücreleri vardır ve bu lifler otonomik innervasyon sonrasında kasılarak oluşan sperm hücrelerinin efferent duktuslara doğru hareket etmesinde yardımcı olur(6). Tunika albugineanın iç yüzünden çıkan fibröz septalar testisi yaklaşık 250 adet, piramit biçimli lobüllere ayırır. Herbir lobülün içinde bir ile dört arasında değişen sayıda kıvrımlı seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller ise rete testis diye isimlendirilen kanal ağına açılırlar(49). Rete testis, testiküler sıvı ve spermatazoanın epididimin baş kısmına aktarılmasında rol oynayan, 6-12 efferent kanalın birleşmesi ile oluşur(6). Tunika albuginea testisin arkasında kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur(49).

Tunika vaskulosa, tunica albugineanın hemen altında yer alır. Testisin septumlarının iç yüzünü örttüğü için testis kompartmanları etrafında uzanmaktadır. Testis kapsül aracılığıyla septalarla 250-300 kompartmana bölünür. Her bir septum ayrı bir seminifer tübül ve en az bir sentrifugal arter içerir. Her bir septum, interstisyel doku ve gelişmekte olan germ hücreleri içeren seminifer tübüllerini bulundurur. İnterstisyel doku sinir, kan ve lenfatik damarlar ile birlikte Leydig hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlardan meydana gelir. Seminifer tübüller her iki ucu da sıklıkla rete testiste sonlanan “V” şeklinde tübüller olarak uzanırlar(6).

2.3. Testis Histolojisi

2.3.1. İnterstisyel Doku

Testis dokusunun %25-30'unu oluşturur. İntertübüler bölgede Leydig hücreleri, kan damarları, lenfatikler, sinirler, makrofajlar ve mast hücreleri bulunur. Leydig hücreleri ergenlikte ortaya çıkarlar. Bunlar, santral konumlu, tek,yuvarlak bir çekirdeğe sahip, görevi testosteron üretimi olan hücrelerdir. Testosteron, kolesterolden sentezlenen, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonudur. Testosteron salgılanması lüteinizan hormon kontrolündedir. Plazmada testosteronun %65'i androjen bağlayıcı protein olarak adlandırılan bir beta globuline, %33'ü ise albumine bağlı olarak bulunur (46).

Spermatogenez; hipofizden salgılanan folikül stimulan hormon ile lüteinizan hormonun testis üzerindeki etkileriyle ilişkilidir. Lüteinizan hormon, Leydig hücrelerine olan etkisiyle normal spermatogenik hücrelerin gelişimi için gerekli testosteron yapımını uyarır. Folikül stimulan hormon ise Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklazı ve sonuçta siklik adenozin monofosfat artışını uyarır. Böylece androjen bağlayıcı protein sentezi ve salgısı artar. Androjen bağlayıcı protein testosteronu bağlayarak seminifer tübül lümenine taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır, östrojen ya da progesteronla inhibe edilir (28,46).

2.3.2. Seminifer Tübüller

İnsanda kama şeklinde yaklaşık 250 adet lobül oluşur. Lobüller içinde seminifer tübüller bulunur(59). Her lobülde 1-4 seminifer tübül bulunur. Her bir seminifer tübül karmaşık bir yapıda olup çok katlı epitel ile döşelidir ve çapları yaklaşık 150-250µm, boyları ise 30-70 cm'dir. Tübüller kıvrıntılı bir yapıya sahiptir, uçlara doğru lümeni daralarak düz tübüller olarak ya da tubuli rekti olarak adlandırılan kısa segmentler halinde devam eden şekilde uzanır. Bu düz tübüller seminifer tübülleri rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlar(42). Rete testis,

seminifer epitelyumun ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır (44). Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 adet duktuli eferentes ile epididiminin baş kısmına bağlanır (42).

Seminifer tübül iki belirgin hücre popülasyonu içeren özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli merkezi bir lümeden oluşur:

1-somatik Sertoli hücreleri

2-spermatogenik hücreler (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler) (44).

Seminifer tübülleri ayrı bir bağ dokusu, kasılabilir yassı miyoid hücrelerinden oluşan bir tabaka ve bir bazal membran çevreler. Miyoid hücreler hareketsiz spermleri rete testise iletirken ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludur. Spermler epididimal kanaldan geçtikten sonra ileri hareketlilik özelliği kazanırlar (44,59).

2.3.2.1. Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelyumunda baskın hücre tipi olmasına rağmen puberteden sonra, seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Seminifer hücreler bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzanan prizmatik hücrelerdir. Tübüller arası boşluk ve seminifer tübül lümeni arasında köprü hücreler olarak görev yaparlar.

Sertoli hücrelerinin çekirdekleri oluklu ve heterokromatin özellik göstermektedir aynı zamanda geniş bir çekirdekçik içerir. Sertoli hücreleri komşu Sertoli hücreleri ile bazolateral bölgelerden birbirine okludens bağlantıları ile bağlıdır. Bazolateral okuludens bağlantıları:

1) Seminifer epitelyumu bir bazal ve bir adluminal kompartmana böler

2) Gelişmekte olan spermatositleri ve spermatidleri otoimmün reaksiyondan koruyan kan-testis bariyeri olarak adlandırılan elemanları belirler (59).

2.3.2.2. Sertoli Hücrelerinin Fonksiyonları

- Gelişmekte olan spermatogenik hücreleri beslemek, korumak ve desteklemek,
- Spermiyogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan rezidual (artık) cisimcikleri fagosite etmek,
- Olgun spermatidlerin aktin-aracılı kasılmalarla, spermiyasyon adı verilen bir süreç, seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak,
- Seminifer tübül lümenine protein ve iyondan zengin bir sıvı salgılamak.

Sertoli hücreleri folikül stimüle edici hormon (FSH) uyarımına cevap verirler. FSH androjen-bağlayıcı protein (ABP) sentezini ve sekresyonunu düzenler. ABP testosteron ve dihidrotestosteron androjenlerine yüksek bağlanma afinitesinde olan bir salgısal proteindir.

Sertoli hücreleri inhibin ve aktivin alt ünitelerini salgırlar. İnhibin FSH üzerine negatif feedback gösterirken, aktivin ise FSH salınımı üzerine pozitif feedback bir etki gösterir.

Sertoli hücreleri puberteden sonra post mitotiktir. Erişkin testisinde mitotik hücre bölünmesi gözlenmez (44,59).

2.3.2.3. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar bazal kompartmanda bazal lamina ile direkt ilişkide olan diploid spermatogenetik hücrelerdir. Spermatogonyumlar Sertoli hücreleri arasındaki tıkaçıcı bağlantıların altında yer alırlar ve bu nedenle kan- testis bariyerinin dışında yer alırlar.

Spermatogonyumlar spermatogonyal kök hücreden köken alırlar ve pubertede başlayan mitotik hücre bölünmeleri geçirirler.

İki temel morfolojik spermatogonyal hücre tipi vardır;

- Tip A spermatogonyum (insan testisinde A koyu ve A açık spermatogonyumlar olarak gözlenir).
- Tip B spermatogonyum.

Spermatogonyal kök hücrelerin erkek fertilitesinde önemli etkileri vardır. Bu hücreler kısmen sesiz hücrelerdir ve bu nedenle kanser terapisine ve radyasyona dirençlidirler. Mitotik olarak bölünen spermatogonyumlar, mayotik bölünen spermatisitler ve farklılaşmakta olan spermatidler kanser terapisine ve radyasyona duyarlıdır. Radyoterapi veya antikanser kemoterapisinin sonlandırılmasından sonra, spermatogonyal kök hücreleri spermatogenik süreci yeniden oluşturabilirler (44).

2.3.2.4. Spermatisitler

B tipi spermatogonyumlar primer spermatisitlere farklılaşan öncül hücrelerdir. Primer spermatisitler 46 (44+XY) ve 4N DNA içerir. Oluşan bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu bölünmenin profazı yaklaşık 22 gün sürdüğünden, kesitlerde görülen spermatisitlerin çoğu bu aşamada izlenecektir. Primer spermatisitler spermatogenik serinin en büyük hücreleridir ve çekirdeklerinde, sarmalanma sürecinin değişik aşamalarındaki kromozomların bulunması ile tanınırlar (42,44).

Birinci mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatisitler olarak adlandırılan ve yalnızca 23 kromozom içeren daha küçük hücreler oluşur. Testis kesitlerinde sekonder spermatisitlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda çok kısa süre kalan ve çabucak ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir. Sekonder spermatisitlerin bölünmesi 23 kromozom içeren iki hücrenin, spermatidlerin oluşmasıyla sonuçlanır. Spermatisitler sertoli hücreleri arasındaki tıkalı bağlantıların hemen üzerinde, seminifer tübülün adluminal kompartmanında (lümene yakın kısımda) yer alırlar. Bu yüzden, mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içinde gerçekleşir (42,44).

2.3.2.5. Spermiyogenez

Spermiyogenez spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoona dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermiyogenez, akrozom oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, kamçı gelişmesini ve sitoplazmanın büyük bir bölümünün kaybolmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Bu süreçten sonra spermatidler, küçük boyutları, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nukleusları ile ayırt edilebilirler. Seminifer tübülde lümen yakınında yerleşmişlerdir (59).

2.4. Etanol

Alkol, doymuş karbon atomlarına bağlı hidroksil gruplarından oluşan bir organik bileşiktir (40,58). Alkollü içeceklerde bulunan etil alkoldür (etanol) ve kimyasal formülü C_2H_6O olup $EtOH$ ya da C_2H_5OH olarak da ifade edilmektedir. Molekül ağırlığı 46,06844 g/mol, görünüşü renksiz, sıvı yoğunluğu 0.789 g/cm³, erime noktası -114,3 0°C, kaynama noktası 78,4 0°C, asidite (pKa) 15,9'dur (48). Alınan alkol mide-barsak sistemindeki (ağız, özefagus, mide, ince bağırsak) mukoza epitellerinden kolayca emilir. % 90'ı ince bağırsakların üst kısmından emilir. Etanol suda kolay çözünebildiği için hızla kan dolaşımına katılarak tüm dokulara yayılır ve özellikle de su oranı yüksek dokulara daha kolay ulaşır (40,58).

Yağda çözünürlüğü de orta derecede olduğundan hücre zarlarını etkiler. En üst kan alkol düzeyine ortalama 45-60 dakikada ulaşır ve midenin boş olması emilimi hızlandırır. Alkolün % 90-98'i karaciğerde oksidasyon yoluyla metabolize edilir. Alkol dehidrogenaz (ADH), mikrozomal etanol okside edici sistem ve katalaz tarafından asetaldehide oksitlenmektedir (40,58). Geri kalan % 2-10'luk kısım böbrekler, akciğerler ve ter yoluyla değişmeden atılmakta olup, bir saatte 10-34 mg/dl (ortalama 15 mg/dl) etanol metabolize edilebilir (14). Uzun süre alkol kullanan kişilerde enzim sistemlerindeki yoğunluk ve duyarlılık artışı nedeniyle metabolizma daha hızlı olup bir

sonraki basamakta asetaldehid, yine karaciğer hücresi sitozol ve mitokondrilerindeki ADH ile asetik asite, oradan da karbondioksit ve suya dönüştürülür (14).

Bu süreç hızlıdır ve asetaldehid birikimini engellemekte olup koruyucu bir basamaktır. Çünkü asetaldehid toksik bir maddedir, yüksek düzeydeki asetaldehid histamin salınımına yol açar ve kan basıncı düşmesine, bulantı ve kusmaya yol açar. Alkolün metabolizması sırasında NAD/NADH oranındaki değişiklikler bedende fizyolojik düzeneklerin işleyişini bozmaktadır (14);

- Sitrik asit (Krebs) döngüsü baskılanarak karaciğerde yağ asitleri oksidasyonu azalır, hiperlipemi gelişir ve karaciğer yağlanması ile sonuçlanır (14).
- Laktat/pürivat oranı artar, hiperlaktikasidemi gelişir; laktik asidoza ikincil olarak hiperürisemi ortaya çıkar ve ürik asidin idrarla atılımı azalır (14).
- Hepatik glukoneogenezis baskılanarak hepatik glikojen depoları azalır ve kan şekeri düşer. Akut alımda ise glikojen depolarından glikoza dönüşüm sonucu kan şekeri yükselir (14).
- Serum lipoproteinleri ve trigliseridlerde artış olur (14).

Alkol (etanol) basit bir moleküldür ve vücuttaki bütün sıvı kompartımanlarına basit difüzyonla hızla yayılır, alımından kısa bir süre sonrada etkilerini göstermeye başlar (22). Alkol alımı vücutta oldukça toksik iki ayrı madde oluşumu ile sonuçlanmaktadır; asetaldehit ve lipid peroksidasyon sonucu malondialdehid (MDA) (58). Her iki maddenin de çok belirgin bir serbest radikal hasarı ile sonuçlandığı iyi bilinmektedir (3,58).

Etanol, akut alkolizmde, asıl etkilerini merkezi sinir sistemi üzerine yapar ve alkol alımı devam etmediğinde gerileyen hepatik ve gastrik değişiklikleri başlatabilir. Kronik alkolizmde, özellikle karaciğer ve mide olmak üzere, vücudun tüm organ ve dokularında morfolojik değişiklikler oluşur. Özellikle karaciğerde siroz, midede ülser, beyinde serebellar atrofi ve dejenerasyon, gözde optik nöropati, kalpte kardiomyopati,

iskelet kasında miyopati, pankreasta akut veya kronik pankreatit görülmektedir. Ayrıca kronik ağır etanol alan sıçanlarda, platelet agregasyonu azalmıştır (81).

Etil alkol, demir gibi farklı kimyasal maddelerin de serbest radikal miktarının artmasına neden olduğu bildirilmektedir (92).

2.4.1. Alkolün Üreme Sistemine Etkisi

Etanol hipofiz-gonad yolunun fonksiyonuna zarar verir. Kronik etanol uygulanan sıçanlarda serum testosteron ve testiküler testosteron seviyelerinin azaldığı, seminal vezikül ağırlıklarının azaldığı, serum FSH, LH seviyelerinin azaldığı, hipofizer/serum FSH/LH oranının arttığı görülmüştür. Serum testosteron seviyelerinin azalması direk olarak testiküler steroidogenezin azalması veya testiküler luteinizan hormon reseptörlerinin tükenmesi ve gonadotropin cevapsızlığına bağlı olabilir. Kronik etanol maruziyetinin hipotalamik GnRH sekresyonunu etkilemiş olabileceği öne sürülmüştür (72).

Kanda testosteron düzeyinin azalması seks dürtüsünü azaltır ve impotens gelişmesine yol açar. Kronik alkolizmlilerde hastalarda impotens insidensi % 50 kadar yüksek olabilir. Alkoliklerde sperma sıvısında spermatozoidlerin sayısı azalır. Erkek alkoliklerin % 70-80'inin libido azalması, impotens ve kısırlıktan şikâyet ettikleri bildirilmiştir. Ayrıca jinekomasti ve kıllanmanın azalması gibi feminizasyon belirtileri ortaya çıkar. Artmış kan alkol konsantrasyonu ejakülasyon zamanını uzatır. Leydig hücrelerine alkolün direkt toksik etkileri ile bazı kronik alkoliklerde testiküler atrofi gelişir ve fertilité azalır (48). Etanol testiste kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümünü indükleyerek, hücre proliferasyonunu azaltır ve spermatogenez baskılar. Survival kinazların (pAkt ve pErk1/2) aktivasyonu hücre büyümesinde ve apoptozisin baskılanmasında önemlidir. Etanol survival kinazların aktivasyonunu azaltarak sıçan testisinde hücre ölümünü indükler, spermatogonia ve spermatozoidlerin her ikisinde apoptotik hücre sayısını artırır (45).

2.5. Serbest Radikaller

2.5.1. Serbest Radikallerin Yapıları ve Kaynakları

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron taşıyan elektrik yüklü veya yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir. Çok reaktiftirler ve çevrelerindeki atom veya moleküllerle etkileşime girerek onlardan elektron almaya çalışırlar. Serbest radikaller organizmada hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de iyonlaştırıcı radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasalların etkisi sonucunda ortaya çıkarlar. Diğer moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen türleri (ROS)" de denilmektedir (8).

Serbest radikaller hücrenin tüm fraksiyonlarında, membrana bağlı veya serbest halde bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlarla da oluşur. Hücre içi serbest radikal oluşum mekanizmaları arasında; mitokondriyal elektron taşıma sistemi reaksiyonları, endoplazmik retikulumdaki karma fonksiyonlu oksidaz sistemi; sitoplazmada ksantin oksidaz, dopamin β -hidroksilaz, D-amino asit oksidaz, urat-oksidadz gibi enzimler; hücre zarında NADPH oksidaz, prostoglandin sentetaz ve lipoksijenaz enzimleri, peroksizomlarda ve lizozomlarda yer alan çeşitli metabolik reaksiyonlar yer almaktadır.

Serbest radikaller doğru yerde doğru zamanda ve doğru miktarlarda üretildikleri zaman yararlıdırlar. Fakat besinlerle yeterli antioksidanların alınmaması sonucu antioksidan savunmanın yetersiz kalışı, aktivite ve çevresel faktörlere bağlı olarak serbest radikallerin aşırı üretimi sonucu dengenin bozulması oksidatif strese yol açar. Hücrelerin yapısal bütünlüklerini koruyabilmeleri için antioksidanlar ve ROS gibi serbest radikaller arasındaki dengenin korunması esastır. Denge serbest radikaller yönüne kayacak olursa DNA, lipidler ve proteinler gibi biyolojik yapılar hasara uğrar (67).

2.5.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aştıklarında öncelikle hücre membranlarını etkilerler. Lipidler ise membranda en çok hasara uğrayan kimyasal yapılardır. Membranda bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) yöntemiyle ölçümü yapılabilen malondialdehit (MDA) bileşikleri oluşur. Oluşan MDA, membran lipidlerini çapraz bağlayarak polimerize eder. Polimerizasyon sonucu iyon transportu ve enzim aktivitelerinde bozulma gibi membran özelliklerini etkileyen değişiklikler meydana gelir (87).

2.6. Antioksidanlar

ROS'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar 'antioksidan savunma sistemleri' olarak bilinirler.

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferrin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (67).

2.6.1. Doğal Antioksidanlar

2.6.1.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri

2.6.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, endojen olarak oluşturulan süperoksit radikallerinin toksik etkilerinden hücreleri koruyan bir grup metallo enzimdir. SOD süperoksitin hidrojen perokside dönüşümünü katalizler ve oksiradikallere karşı primer koruyucudur (2).

2.6.1.1.2. Katalaz (CAT)

CAT, oksidatif hasara karşı çok hassas olan ve kısa sürede aktivitesini kaybedebilen bir antioksidan enzimdir. Düşük hızlarda hidrojen peroksidin olduğu durumlarda veya ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı bulunduğu peroksidatif, hidrojen peroksid oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırmaktadır (2).

2.6.1.1.3. Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon Peroksidaz

GSH; DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücre fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır. İndirgenmiş glutasyon (GSH), içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur (9).

2.7. Flavonoidler

Flavonoidlerin antioksidan, antiviral, antiproliferatif, anti-inflamasyon ve anti kanserojen etkilere sahip oldukları bilinmektedir (92,94). Yapılan çalışmalar sonucu flavonoidlerin genellikle bitkilerde bulunduğu ve insanlar tarafından sentezlenemedikleri ve koroner kalp hastalıkları ile kanser gibi hastalıkların

engellenmesinde de rol oynadıkları için flavonoidlere olan ilgi son yıllarda artmıştır. Bugüne kadar belirlenen flavonoid sayısının 8000'in üzerinde olduğu belirtilmiştir (15,36,62,76).

2.7.1. Chrysin

Son yıllarda; üzerinde çok sayıda araştırma yapılan flavonoidlerden biri de Chrysin dir. G.F. Jaubert tarafından 1926 yılında, propoliste bulunan çeşitli flavonoidlerden birisi olarak izole edilmiştir (60). Yapılan araştırmalar sonucu CH'nin, çarkıfelek veya mavi tutku çiçeği adıyla bilinen, *Passiflora caerulea*'da bulunan bir flavonoid olduğu tespit edilmiştir (53,86). *Passiflora caerulea* bitkisi dışında; tükettiğimiz besinlerden, maydanoz, kekik, dolma biber, kereviz, bal ve propoliste de, Chrysin bulunmaktadır (50). Chrysin; Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry) tarafından 5,7dihydroxy-2-phenyl-4-chromenone olarak isimlendirilmiş olup $C_{15}H_{10}O_4$ olarak formüle edilmiştir (37,38).

2.7.1.1. Chrysin'nin Etki Alanları

Chrysin'nin serbest radikal düzeyini azaltarak ve kanserojen maddeleri etkisiz hale getirerek toksik etki ve kanser oluşumunu engellemeye katkıda bulunabileceği düşünülmüş ve yapılan çalışmalarla desteklenmiştir.

Büyük bir çoğunluğu hayvanlar üzerinde yapılan bu çalışmalar sonucunda; Chrysin'nin, antikarsinogenik (47,89), antioksidan (19,65), anti-inflamatuvar (18), antiviral (23) olduğu düşünülmektedir. Dişi ve erkekte cinsiyet hormonlarının sentezinde aromataz enzimi rol almaktadır. Aromataz enzimi (p450 sitokrom) testosteronu östradiole dönüştüren bir ajandır (54). Aromataz enziminin bloke edilmesi testostere seviyesinde bir artışa neden olmaktadır. Chrysin de bir aromataz enzimi inhibitörüdür (41) ve kullanılması durumunda testosteron düzeyini ve sperm kalitesini arttırdığı bildirilmiştir (33).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hipotez

Kronik alkolik sıçanlarda oluşan testis hasarı üzerine chrysin' in koruyucu etkisinin histolojik olarak incelenmesi.

3.2. Araştırma Tipi

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulunun 322/2013 no'lu kararı ile onaylanmış deneysel hayvan çalışmasıdır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklem Büyüklüğü

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinde (TICAM) üretilen ortalama 200-300 gr ağırlığında 35 adet erişkin Spraque dawley türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar, 30 gün süreyle 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamın sağlandığı ve sürekli havalandırılan $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik odalarda tutuldular. Deneysel süresi boyunca ad libitum beslendiler. 30. günde sıçanlar dekapite edilerek, testis dokuları alındı. Sağ testis histolojik olarak değerlendirildi, sol testis ise tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), redükte glutatyon (GSH), süperoksitdismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve total protein analizleri yapılmak üzere kullanıldı.

3.4. Deneysel Grupları

Çalışmamızda kullanılan 35 adet sıçan 5 gruba ayrılmış olup her grupta 7 tane denek bulunmaktadır.

Tablo 1. Deney grupları ve hayvanlara uygulanan maddeler

Grup No	Sıçan sayısı	Etanol (g/kg)	Chrysin (mg/kg)	Mısır yağı(ml)	Uygulama süresi
I	7	0	0	0	Haftada her gün / 30 gün
II	7	3	0	0	Haftada her gün / 30 gün
III	7	0	0	1	Haftada her gün / 30 gün
IV	7	0	50	0	Haftada her gün / 30 gün
V	7	3	50	0	Haftada her gün / 30 gün

Kontrol grubu: Bu grupta bulunan 7 adet sıçana deney süresince hiçbir şey uygulanmadı

Etanol: Bu gruba etanol uygulandı (**%96 ± 2 saf etil alkol necm kimya, Türkiye**). 3g/kg dozunda, 30 gün boyunca hergün oral olarak izotonik solüsyon ile seyreltilen %40 'lık etanol verildi. Etanol miktarı her sıçanın grubuna ve kendi ağırlığına göre ayarlandı.

Mısır yağı: Bu gruba mısır yağı uygulandı. 1 ml dozunda, 30 gün boyunca hergün olmak üzere oral olarak mısır yağı verildi.

Chrysin gurubu (CH): Bu gruba mısır yağı içerisinde çözülmüş CH uygulandı (**Chrysin %97, Sigma-Aldrich C80105, Germany**) (19). 50 mg/kg dozunda (19), 30 gün boyunca hergün olmak üzere oral olarak CH verildi. CH nin miktarı her sıçanın grubuna ve kendi ağırlığına göre ayarlandı.

Etanol + Chrysin Gurubu (EtOH+CH): Bu gruba CH ve EtOH birlikte uygulandı. 50 mg/kg dozunda, 30 gün boyunca hergün olmak üzere oral olarak mısır yağında çözülmüş CH verildi. 3g/kg dozunda, 30 gün boyunca hergün olmak üzere oral olarak EtOH uygulandı. Chrysin, etanol uygulanmasından 1 saat önce gruptaki hayvanlara verildi. Etanol ve Chrysin nin miktarı her sıçanın grubuna ve kendi ağırlığına göre ayarlandı.

3.5. Değerlendirme Yöntemi

3.5.1. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü

Deneye başlarken ve deney süresinin sonunda sıçanların vücut ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Her hayvanın deney süresinde gösterdiği ağırlık değişimi belirlendi ve deney sonu vücut ağırlığı farkı olarak adlandırıldı.

3.5.2. Bouin Tespitinin Hazırlanışı

Dokuların tespitinde kullanılacak bouin solüsyonu aşığıdaki şekilde hazırlandı;

Doymus Pikrik Asit çözeltisi	75 ml
Formaldehit (%37)	25 ml
Glasiyal Asetik Asit	5 ml

Molekül ağırlığı kadar tartılan pikrik asit (12,2 g) 1000 ml distile su içinde eritilerek iyice çözdürüldü. Dipte tortu kalmamasına özen gösterilerek gerekli miktarda pikrik asit kullanıldı. Gözle görülemeyen tortuları uzaklaştırmak için solüsyon kullanmadan önce süzüldü. Bouin tespitini hazırlamak için önce doymus pikrik asit çözeltisi formaldehit ile iyice karıştırıldı, sonra üzerine yavaşça glasiyal asetik asit eklenerek tekrar karıştırıldı (11,43).

3.5.3. Dokuların Alınması

Tüm hayvanlar deneyin sonunda tartıldı ve derin eter anestezi altındayken servikal dislokasyonla öldürüldü. Hızlı bir şekilde hayvanların karın bölgesi açılarak testisleri çıkarıldı.

3.6. Testis Ağırlıklarının Ölçümü

Çevre dokularından iyice temizlenen testislerin her biri **Shimadzu (Libror AEX-200G)** marka hassas terazide titizlikle tartıldı. Testis ağırlıkları her sıçan için sağ ve sol olmak üzere ayrı ayrı kayıt altına alındıktan sonra, sağ testisler bouin tespitine alındı (69, 72). Sol testisler ise biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere ayrıldı.

3.6.1. Testis Ağırlık İndeksi Hesaplaması

Deneyin son günü ölçülen vücut ağırlığı ile aynı hayvana ait sağ ve sol testis ağırlığı toplamı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak her bir hayvan için TA_ değerleri belirlendi (72);

$$TA_ : [(sağ+sol testis ağırlıkları toplamı)/vücut ağırlığı] \times 100$$

3.7. Histolojik İnceleme İçin Testis Dokularının Hazırlanması

Testislerin üzerine tespit sıvısı döküldükten sonra her iki ucunda jilet ile hafif birer kesik oluşturuldu. Sonra testislerin uzun eksenlerine dik olacak şekilde 21G enjektör ucu ile testislerin kapsüllerine karşılıklı bir kaç delik açıldı. Bu işlemlerden sonra daha iyi tespit olması için dokular Bouin tespitinde 24 saat bekletildi. Testisler enine olacak şekilde önce ortadan iki eşit parçaya ve daha sonra bu parçalar da yeniden ikiye bölündü ve kasetlere alındı. Bu şekilde kasetlenen dokular etiketlenerek kodlandı ve olağan doku takibi sürecine alınarak her hayvana ait parafin blokları hazırlandı (11,43,69). Parafin bloklar hazırlamak için uyguladığımız doku takip yönteminin basamakları ve uygulama süreleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Doku takip yöntemine ait süreler (her basamağa ait zaman birimi aksi belirtilmediği durumda saat olarak anlaşılmalıdır).

Kimyasal	Uygulama Süresi
Bouin Tespiti	48 saat
%50 Alkol Yıkama	
%70 Alkol	1 saat
%80 Alkol	1 saat
%90 Alkol	1 saat
%96 I Alkol	1 saat
%96 II Alkol	1 saat
%100 Alkol	10 dakika
Ksilol I	20 dakika
Ksilol II	20 dakika
Parafin + Ksilol	15 dakika
Parafin I	30 dakika
Parafin II	1 saat
Parafin III	1 saat
Bloklama	

3.7.1. Periyodik Asit-Schiff+Hematoksin boyasının hazırlanışı

Kesitlerin boyanmasında kullanılacak boya solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı (32);

A. Periyodik asit	1 g
Distile su	200 ml
B. Schiff çözeltisi *	
Bazik fuksin	1 g
Distile su	200 ml
C. Potasyum Metabisülfid($K_2S_2O_5$)	2 g
D. Hidroklorik asit (HCl)	2 ml
E. Aktif kömür	2 g

*Schiff çözeltisi boyama yapılmadan 1 gün önce hazırlanmıştır.

Periyodik asit distile suda çözdürüldü ve kaynatıldı. Kaynatılan solüsyona bazik fuksin ilave edilerek karıştırıldı ve 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 2 g K₂S₂O₅ eklenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığına geldiğinde 2ml HCl eklenip karıştırıldı. 2 g aktif kömür eklenip yeniden karıştırıldıktan sonra karanlık ortamda oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Solüsyon süzülerek kullanıldı (11,43,69).

3.7.2. Kesitlerin Alınması ve Boyanması

Her bloktan 15-30 µm trim aralığı ile 4-5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Her lam üzerinde 2 kesit olacak şekilde ve kesitin alınma sırasına göre lamlar numaralandı. Her bloktan alınan 4-5µm kalınlığındaki seri kesitlerden oluşan 3 adet lam (6 kesit) ışık mikroskopunda inceleme için HE ve PAS+H yöntemi ile boyandı (11, 43). Boyama yöntemlerinin basamakları ve uygulama süreleri Tablo 3 ve Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 3. HE boyama yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri

Kimyasal madde	Uygulama süresi(dk)
Ksilol I	20 dakika
Ksilol II	20 dakika
%96'lik alkol I	5 dakika
%96'lik alkol II	5 dakika
%90'lik alkol	5 dakika
%80'lik alkol	5 dakika
%70'lik alkol	5 dakika
Distile su	5 dakika
Hematoksilin	2 dakika
Yıkama (akar suda)	5 dakika
Eozin	5 dakika
%70'lik alkol	3 dakika
%80'lik alkol	3 dakika
%90'lik alkol	3 dakika
%96'lik alkol I	3 dakika

Tablo 3. (devam) HE boyama yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri

%96'lik alkol II	3 dakika
Ksilol I	20 dakika
Ksilol II	20 dakika

Tablo 4. PAS+H boyama yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri.

Kimyasal madde	Uygulama süresi(dk)
Ksilol I	20
Ksilol II	20
%96 Alkol I	5
%96 Alkol II	5
%90 Alkol	5
%80 Alkol	5
%70 Alkol	5
Distile su	1
Periyodik asit	5
Distile su	1
Schiff boyası	15
Çeşme suyu	2
Hematoksin	1,5
Çeşme suyu	2
%70 Alkol	2
%80 Alkol	2
%90 Alkol	2
%96 I Alkol	2
%96 II Alkol	2
Ksilol I	10
Ksilol II	10
Lamların kapatılması	

3.8. Biyokimyasal Analizler

3.8.1. Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması

Derin dondurucuda muhafaza edilen testis dokuları çalışma günü çıkarılarak tartıldı. %10'luk homojenat oluşacak şekilde fosfat tamponu ilave edilerek buz içinde 1-2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize edildi (Wise-Tise, Germany). Doku homojenatları 5000 rpm'de, +4 derecede, 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

3.8.2. Süperoksit dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Ölçümü

SOD enzim aktivitesi ölçümü; ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle üretilen $O_2^{\cdot-}$ 'nin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgeyerek renkli formazon oluşturma esasına dayanan Sun ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (78).

3.8.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Ölçümü

Katalaz aktivitesi Aebi'nin yöntemine göre; 240 nm'de absorbansı H_2O_2 ile 0.500'e ayarlanmış pH 7 deki 50 mM fosfat tamponuna, numune eklenmesiyle 240 nm dalga boyunda absorbansdaki düşüşün 1 dk süreyle kayıt edilmesi esasına dayanarak yapıldı (1).

3.8.4. Redükte Glutasyon (GSH) Miktarının Ölçümü

GSH analizi, Ellman'ın tarif ettiği yöntemine göre yapıldı. Analiz tüpünde bulunan glutasyonun 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı-yeşilimsi renk vermesi ve oluşan bu rengin ışık şiddetinin 410 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunarak redükte glutasyon miktarının tayin edilmesi şeklinde ölçüldü (27).

3.8.5. Malondialdehit Miktarının Ölçümü

Uchiyama ve arkadaşlarının yöntemine göre; MDA'nın 95 °C'de tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli ürünün N-butanol fazından ekstrakte edilen süpernatanın spektrofotometre ile 535 ve 520 nm de ölçülmesiyle belirlendi (83).

3.8.6. Protein Düzeylerinin Analizi

Doku protein tayini Modifiye Lowry yöntemi ile analiz edildi (51, 61).

3.8.7. Testosteron Miktarının Ölçümü

Testosteron miktarına immünoturbidometrik yöntem ile Cobas e-601 (Roche) cihazı kullanılarak bakıldı.

3.9. Histolojik Değerlendirme

PAS+H ve HE yöntemi ile boyanan kesitler histopatolojik değerlendirme için DP 70 dijital kamera ekli Olympus mikroskobunda (**Olympus Corp. Tokyo, Japonya**) yeterli incelemeler yapıldıktan sonra fotoğraflar çekildi ve gruplar arasındaki farklılıklar dikkatle incelendi.

3.9.1. Seminifer tübül çapları (STÇ)

Testisteki hasarın bir diğer göstergesi olarak da STÇ kullanıldı. 20X objektif ve oküler bir mikrometre ile her grup için 12 adet yuvarlak seminifer tübül çapı ölçülerek ortalama seminifer tübül çapları hesaplandı (16).

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin normal dağılışa uygunluğu tek örnek Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. Tüm veriler normal dağılış gösterdi. Deney sonu vücut ağırlığı farkı, toplam testis ağırlığı, testis ağırlık indeksi, testis tübül çapı ölçümü, GSH, MDA, CAT, SOD ve ve testosteron değişkenleri arasında farklılığı tanımlamak için normal dağılış gösteren gruplarda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc Tukey HSD testi kullanıldı. Normal dağılış göstermeyen değişkenlerde ise Kruskal Wallis H testi ve anlamlı çıkan grupları ikili karşılaştırmak için Mann Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama ve standart hata olarak verildi. Anlamlılık seviyesi en az $P<0.05$ olarak kabul edildi. Tüm analizler yazılım paket programı SPSS/PC (Version15.0; SPSS, Chicago, II, USA) kullanılarak yapıldı.

5. BULGULAR

Bulgularımız, deney sonu vücut ağırlığı farkı, toplam testis ağırlığı, testis ağırlık indeksi, biyokimyasal ve histopatolojik bulguları olmak üzere 5 alt başlıkta değerlendirildi.

5.1. Deney Sonu Vücut Ağırlığı Farkı

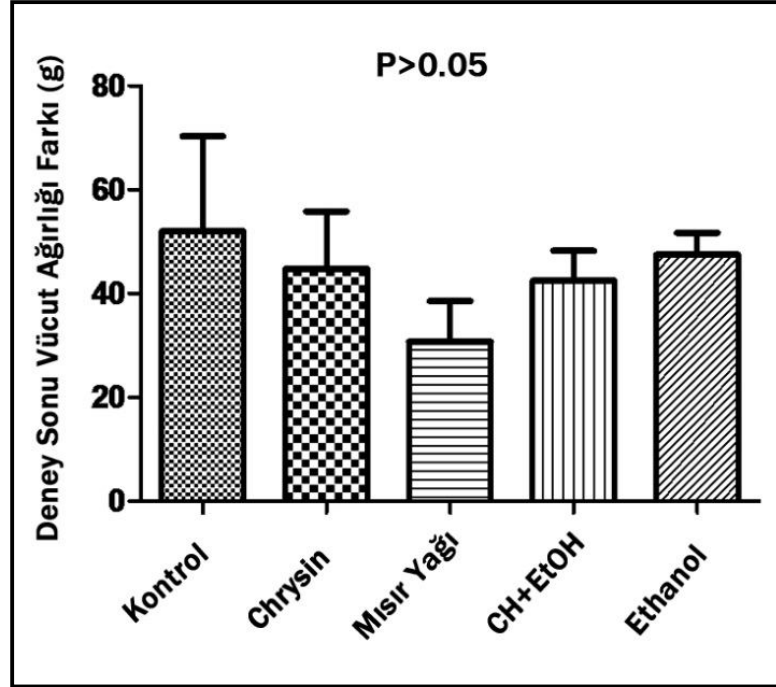
Gruplara göre deney sonu vücut ağırlığına ait sonuçlar Tablo 5 ve Şekil 1’de verilmiştir. deney sonu vücut ağırlığı farkı karşılaştırıldığında chrysin, ethanol, CH+EtOH ve mısır yağ kullanımı, kontrol grubuna göre vücut ağırlığı farkında düşüş olmuştur ancak bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır ($P>0.05$).

Tablo 5. Gruplara göre deney sonu vücut ağırlığı farkları
(g, \pm SEM:Ortalama \pm Standart hata).

Gruplar	Ort \pm SH
Kontrol	52.00 \pm 18.31
Chrysin	44.75 \pm 11.09
Mısır Yağı	30.75 \pm 7.81
CH+EtOH	42.50 \pm 5.74
Etanol	47.50 \pm 4.17
Sig	Ös

Ös : $P>0.05$

Şekil 1. Sıçanların vücut ağırlık farklarının deney gruplarına göre karşılaştırması
(g, Ortalama ± Standart hata).



5.2. Toplam Testis Ağırlığı

Gruplara göre toplam testis ağırlıklarına ilişkin bulgular Tablo 6 ve Şekil 2’te gösterilmiştir. Toplam testis ağırlıkları açısından yapılan istatistiksel karşılaştırmaya (Kruskal-Wallis) göre gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanılmamıştır ($P>0.05$).

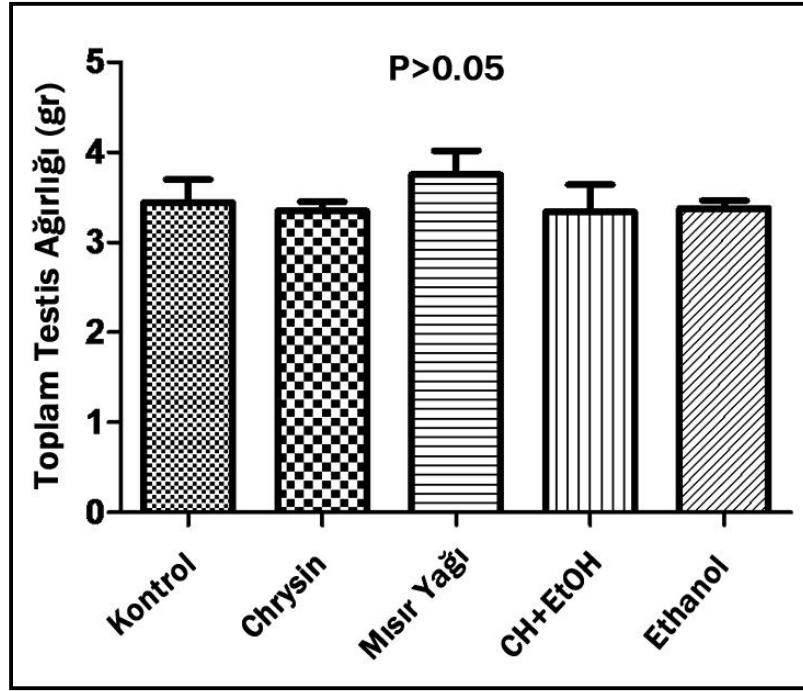
Tablo 6. Sıçanların gruplarına göre toplam testis ağırlıkları
(g, ±SEM:Ortalama ± Standart hata)

Gruplar	Ort±SH
Kontrol	3.44±0.26
Chrysin	3.35±0.10
Mısır Yağı	3.75±0.27
CH+EtOH	3.34±0.30
Etanol	3.38±0.09
Sig	Ös

Ös : $P>0.05$

Mısır yağ kullanımı kontrol grubuna göre sıçanlarda testis ağırlığını artırmıştır. CH+EtOH, chrysin ve etanol kullanımı kontrol grubuna göre testis ağırlığını düşürmüştür. Ancak bu artış ve düşüşler anlamlı olarak bulunmamıştır ($P>0.05$).

Şekil 2. Sıçanların toplam testis ağırlığının deney gruplarına göre karşılaştırması
(g, Ortalama \pm Standart hata).



5.3. Testis Ağırlık İndeksi

Gruplara göre testis ağırlık indekslerine ait bulgular Tablo 7 ve Sekil 4'te gösterilmiştir. Testis ağırlık indeksleri açısından yapılan istatistiksel karşılaştırmaya göre (Kruskal-Wallis) gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($P<0.05$).

Tablo 7. Sıçanların gruplarına göre testis ağırlık indeksleri
($g \pm SEM$:Ortalama \pm Standart hata).

Gruplar	Ort\pmSH
Kontrol	12.73 \pm 6.69
Chrysin	8.79 \pm 1.87
Mısır Yağı	15.02 \pm 3.83
CH+EtOH	8.43 \pm 1.48
Etanol	1.20 \pm 0.04
Sig	*

*: P>0.05

Tablo 7’de önemli çıkan grupları belirlemek için ikili karşılaştırma sonuçları (Mann Whitney U testi) Tablo 8’de verilmiştir.

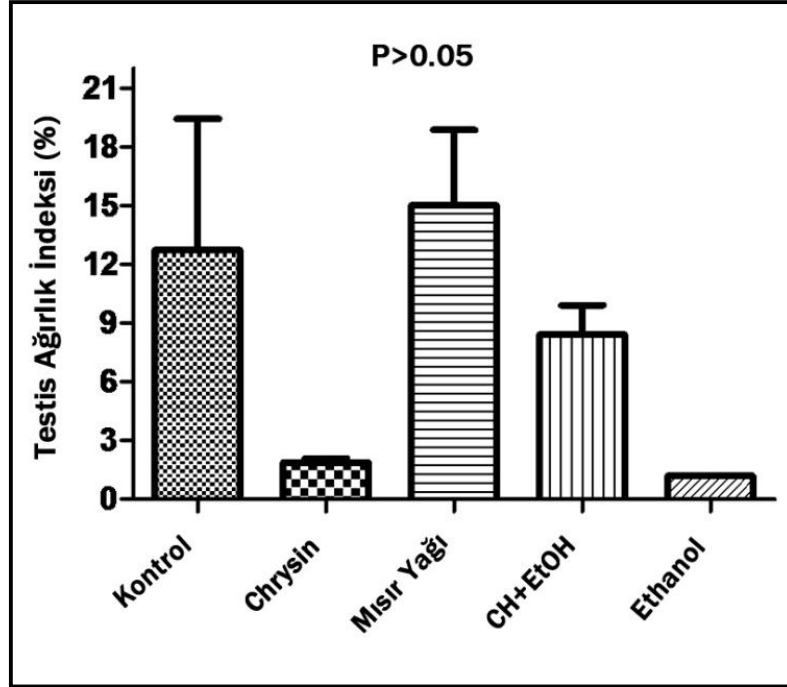
Tablo 8. Testis indekslerine göre grupların ikili karşılaştırma sonuçları

İkili karşılaştırma	P	İkili karşılaştırma	P
1-2	0.885	2-4	1.000
1-3	0.486	2-5	0.029
1-4	0.886	3-4	0.200
1-5	0.029	3-5	0.029
2-3	0.343	4-5	0.029

1: Kontrol; 2: Chrysin;3: Mısır yağ; 4: CH+ EtOH; 5: Etanol grubu

Testis indekslerine göre grupların ikili karşılaştırma sonuçları Tablo 8’de verilmiştir. Kontrol, chrysin, mısır yağı ve CH+EtOH gruplarının etanol grubu ile ikili karşılaştırma sonucunda testis indeks değerleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (P<0.05). Bu sonuçlara göre etanol kullanımı testis indeksini önemli ölçüde küçültmüştür.

Şekil 3. Sıçanların testis ağırlık indeksi deney gruplarına göre karşılaştırması (g,Ortalama ± Standart hata).



5.4. Testis Tübül Çapı Ölçümü

Gruplara göre tübül değerlerine ait bulgular Tablo 9 ve Sekil 5’de gösterilmiştir. Tübül değerleri bakımından (ANOVA) gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

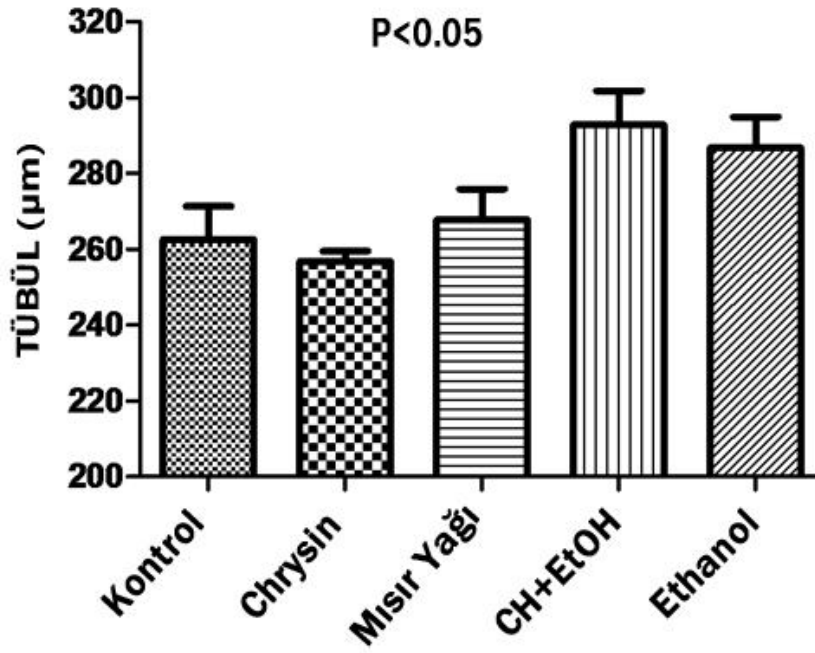
Tablo 9. Sıçanların gruplarına göre Tübül değerleri (Ortalama± Standart hata).

Grup	Ort±SH
Kontrol	262.69 ^{ab} ±8.61
Chrysin	256.85 ^b ±2.68
mısır yağ	267.86 ^{ab} ±8.07
CH+EtOH	292.81 ^a ±8.99
EtOH	286.86 ^{ab} ±8.09
Sig	*

*:P<0.05; Aynı sütundaki harfler grup farklılığını göstermektedir.

CH+ET grubunun tübül değeri Chrysin grubundan anlamlı bir Şekilde daha yüksek çıkmıştır. Diğer gruplar ise her iki kategoride yer almıŐlardır.

Şekil 4. Sıĉanların tübül çaplarının deney gruplarına göre karşılaştırması
(Ortalama \pm Standart hata).



5.5. Biyokimyasal Bulgular

5.5.1. Grupların GSH Düzeylerinin Karşılaştırılması

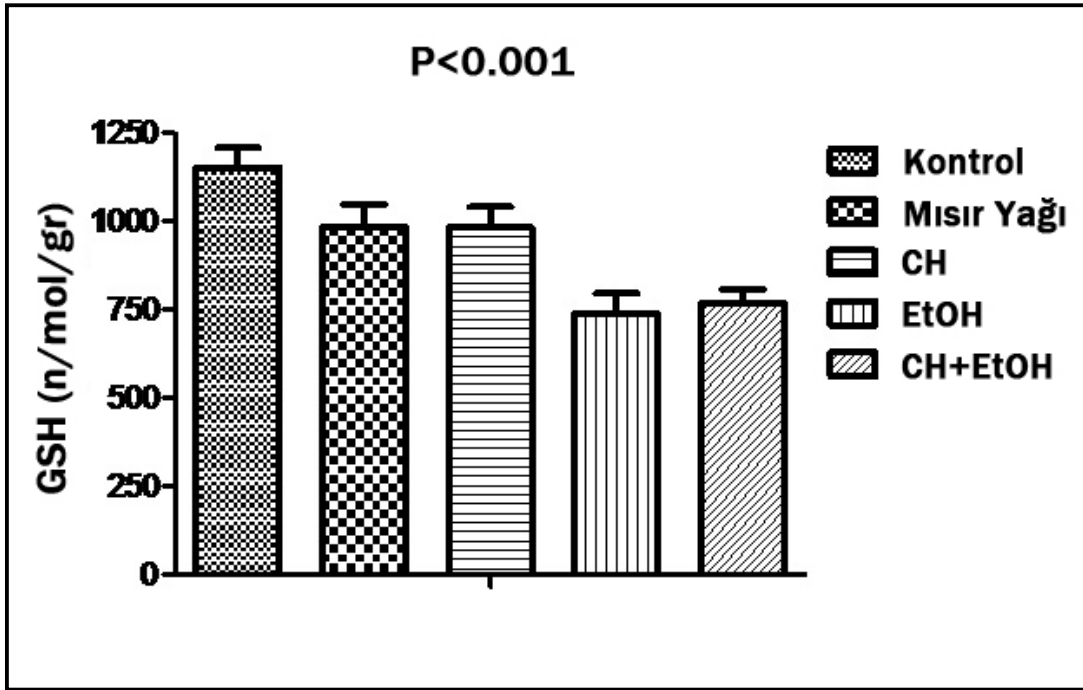
GSH düzeylerinin karşılaştırılmasına ait sonuçlar Tablo 10 ve Şekil 5’da verilmiştir. Kontrol, mısır yağı ve chrysin gruplarında GSH seviyesi etanol grubuna göre anlamlı Şekilde yüksek çıkmıştır ($P < 0.001$). CH+EtOH kullanımını ise çok az bir farklılığa neden olmuştur.

Tablo 10. Sıçan testis dokusunda GSH seviyesindeki değişimler
(Ortalama±Standart hata)

GRUPLAR	GSH
I.GRUP/KONTROL	1150,6a ±57,1
II.GRUP/MISIR YAĞI	982,9ab ±64,5
III.GRUP/CHRYSİN	981,7ab ±58,6
IV.GRUP/EtOH	739,0c ±56,2
V.GRUP/CH+EtOH	769,7bc ±38,4
Sig	***

***:P<0.001; abc: aynı sütundaki farklılığı göstermektedir.

Şekil 5. Deney sonucunda gruplar arası GSH seviyelerinin karşılaştırılması



5.5.2. Grupların CAT Enzim Aktivite Düzeylerinin Karşılaştırılması

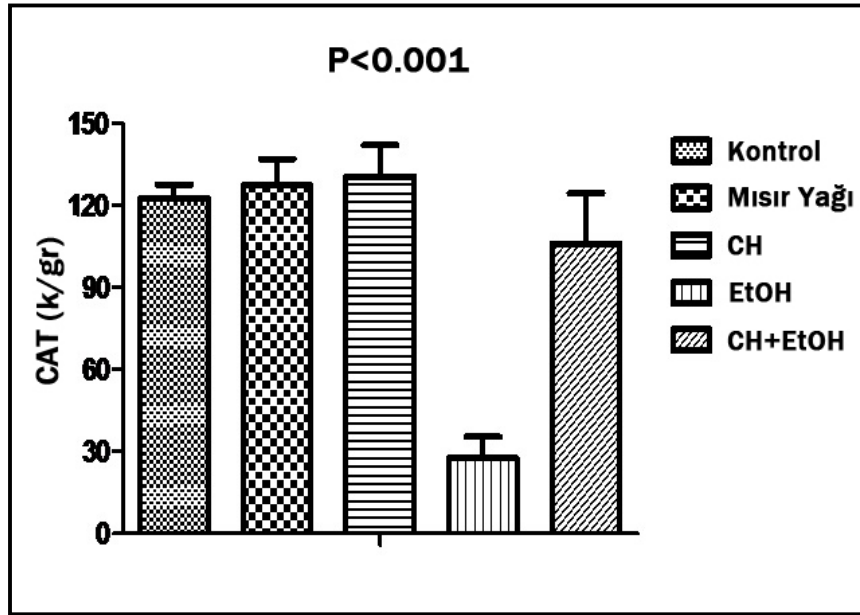
CAT Enzim Aktivite Düzeylerinin Karşılaştırılması Tablo 11 ve Şekil 6'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre. Kontrol, mısır yağı, CH ve CH+ EtOH grubunun CAT değerleri etanol CAT değerine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (P<0.001). CH ile EtOH birlikte kullanımı CAT değerini anlamlı bir şekilde arttırmıştır.

Tablo 11. Sıçan testis dokusunda CAT seviyesindeki değişimler
(Ortalama±Standart hata)

GRUPLAR	CAT
I.GRUP/KONTROL	122,7a ±5,0
II.GRUP/MISIR YAĞI	127,5a ±9,6
III.GRUP/CHRYSİN	130,7a ±11,3
IV.GRUP/EtOH	27,7b ±7,7
V.GRUP/CH+EtOH	106,0a ±18,5
Sig	***

***:P<0.001; ab: aynı sütundaki farklılığı göstermektedir.

Şekil 6. Deney sonucunda gruplar arası CAT seviyelerinin karşılaştırılması



5.5.3. Grupların SOD Enzim Aktivite Düzeylerinin Karşılaştırılması

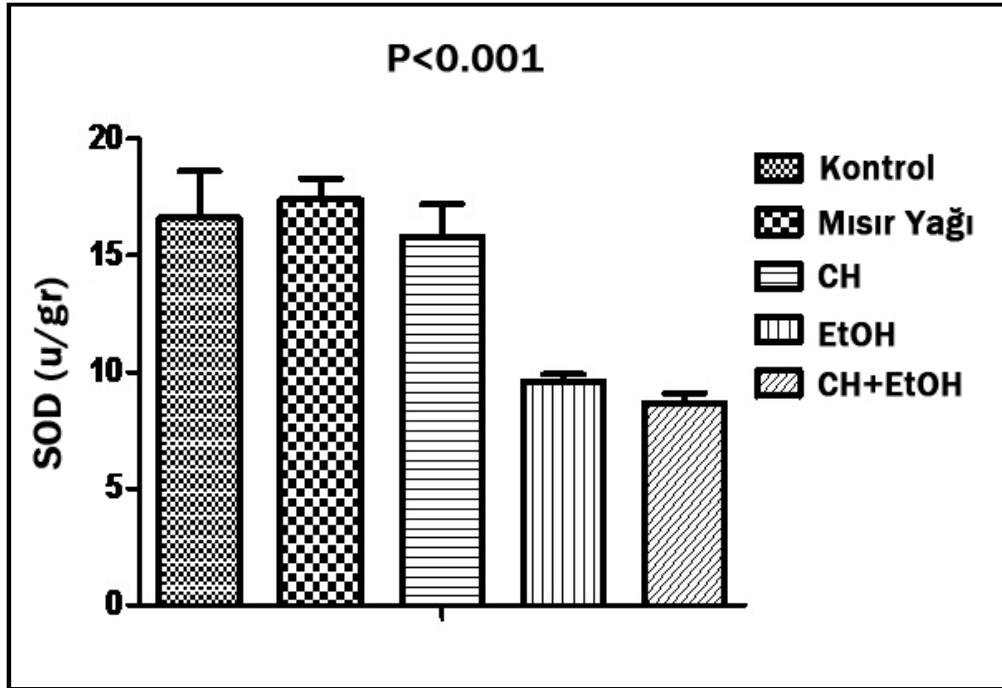
SOD Enzim Aktivite Düzeylerinin Karşılaştırılması ait bulgular Tablo 12 ve Şekil 6'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre mısır yağ, kontrol ve CH değerlerinin SOD değerleri EtOH ve CH+EtOH grubundan anlamlı bir şekilde yüksek çıkmıştır (P<0.001). CAT'tan farklı olarak CH ile EtOH birlikte kullanıldığı durumlarda SOD değerini etkilemediği saptanmıştır.

Tablo 12. Sıçan testis dokusunda SOD seviyesindeki değişimler
(Ortalama±Standart hata)

GRUPLAR	SOD
I.GRUP/KONTROL	16,6a ±2,0
II.GRUP/MISIR YAĞI	17,4a ±0,9
III.GRUP/CHRYSİN	15,8a ±1,4
IV.GRUP/EtOH	9,6b ±0,3
V.GRUP/CH+EtOH	8,7b ±0,4
Sig	***

***:P<0.001; abc: aynı sütundaki farklılığı göstermektedir.

Şekil 7. Deney sonucunda gruplar arası SOD seviyelerinin karşılaştırılması



5.5.4. Grupların MDA Düzeylerinin Karşılaştırılması

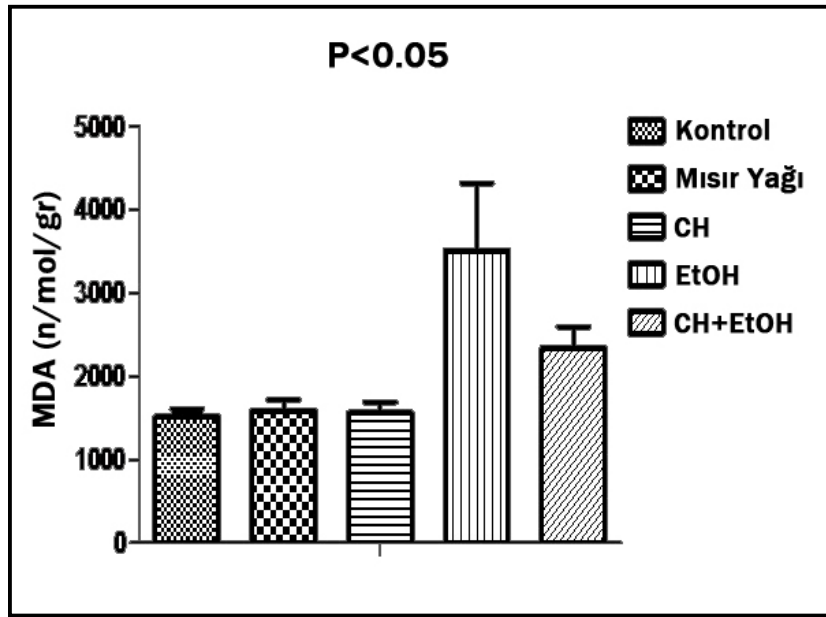
MDA düzeylerinin karşılaştırılmasına ait sonuçlar Tablo 13 ve Şekil 7’de verilmiştir. MDA değerleri bakımından kontrol grubu en düşük, EtOH grubu ise en yüksek MDA değerine sahiptir (P<0.05). EtOH ile CH’ın birlikte kullanımı MDA değerini düşürmüştür.

Tablo 13. Sıçan testis dokusunda MDA seviyesindeki değişimler
(Ortalama±Standart hata)

GRUPLAR	MDA
I.GRUP/KONTROL	1516,7b ±87,7
II.GRUP/MISIR YAĞI	1591,3ab ±124,3
III.GRUP/CHRYŞİN	1559,4ab ±128,7
IV.GRUP/EtOH	3515,6a ±798,9
V.GRUP/CH+EtOH	2342,2ab ±251,1
Sig	*

*:P<0.05;ab: aynı sütundaki farklılığı göstermektedir.

Şekil 8. Deney sonucunda gruplar arası MDA seviyelerinin karşılaştırılması



5.5.5. Grupların Testosteron Seviyelerinin Karşılaştırılması

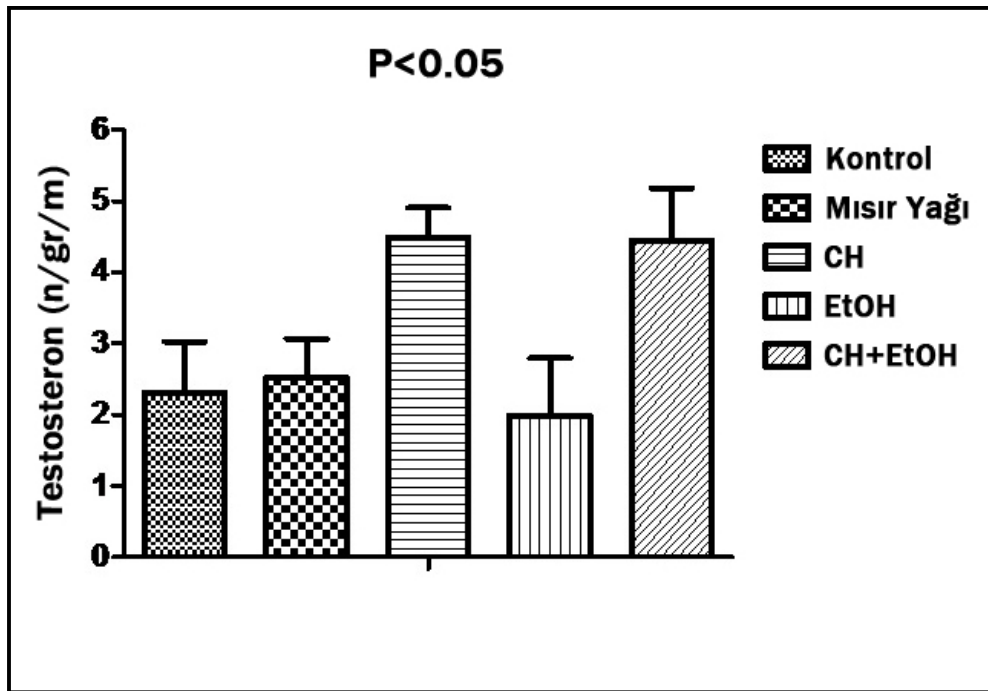
Sıçan testis dokusunda Testosteron seviyesindeki değişimler Tablo 14 ve Şekil 8’da verilmiştir. Bu sonuçlara göre testosteron seviyesini CH+EtOH ve CH gruplarında arttığı, kontrol ve etanol gruplarında ise azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre EtOH’ den ziyade CH’in testosteron seviyesini önemli bir şekilde etkilediği saptanmıştır (P<0.05).

Tablo 14. Sıçan testis dokusunda Testosteron seviyesindeki değişimler
(Ortalama±Standart hata)

GRUPLAR	TESTOSTERON (ng/ml)
I.GRUP/KONTROL	2,31b±0,72
II.GRUP/MISIR YAĞI	2,53ab±0,54
III.GRUP/Chrysin	4,49a±0,42
IV.GRUP/EtOH	1,99b±0,81
V.GRUP/CH+EtOH	4,44a±0,74
Sig	*

*:P<0.05;ab: aynı sütundaki farklılığı göstermektedir.

Şekil 9. Deney sonucunda gruplar arası Testosteron seviyelerinin karşılaştırılması



5.6. Histolojik Bulgular

Kontrol grubundaki sıçanların testisleri incelendiğinde seminifer tübüller ve bunların aralarında interstisyel bağ dokusu normal yapıda görüldü. İnterstisyel dokudaki Leydig hücreleri, seminifer tübülü saran peritübüler dokudaki miyoid hücreler, seminifer epiteli oluşturan Sertoli hücreleri, spermatogonium, spermatositler ve spermatidler normal yapıda izlenmektedir.

Yalnızca etanol uygulanan grupta, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerde tübül lümenine dökülme, germ hücre serisinde azalma, spermatogenetik hücreler arasındaki dizilimde meydana gelen bozukluk, interstisyel alanda açılma ve ödem oluşumu, spermatogenik hücrelerde vakuol oluşumu gözlenmiştir.

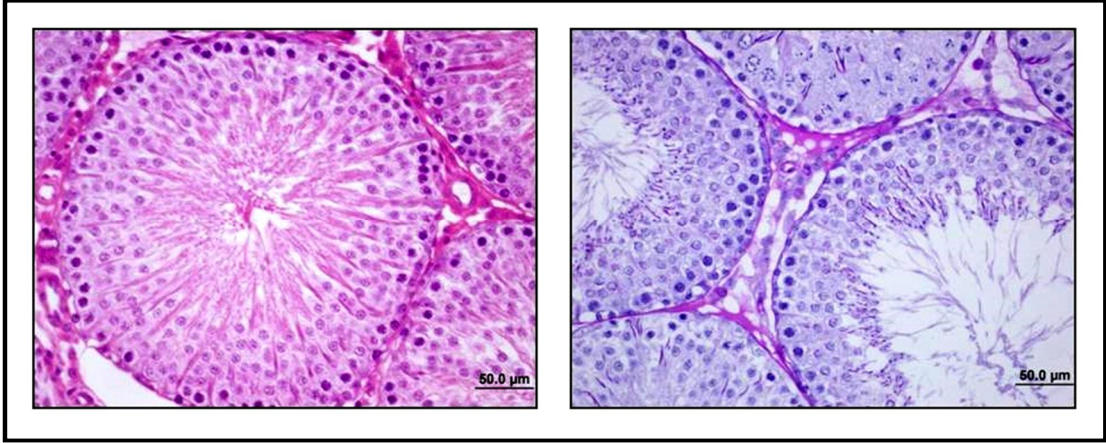
Mısır yağı verilen gruptaki hayvanların testislerindeki seminifer tübüller ve interstisyel alan kontrol grubuna eşdeğerdir.

Yalnızca chrysin uygulanan gruptaki hayvanların testislerindeki seminifer tübüller ve interstisyel alan mısır yağında da olduğu gibi kontrol grubuna benzerlik göstermektedir.

Chrysin+Etanol uygulanan gruptaki hayvanların testislerindeki seminifer tübüllerinde etanol grubuna göre belirgin bir şekilde düzelleme meydana gelmiştir. Minimal düzeyde ödem ve hücre dejenerasyonu görülmektedir. Çok nadir gözükken hücresel bozuklukların yanında kontrol grubuna benzerlik gösterir.

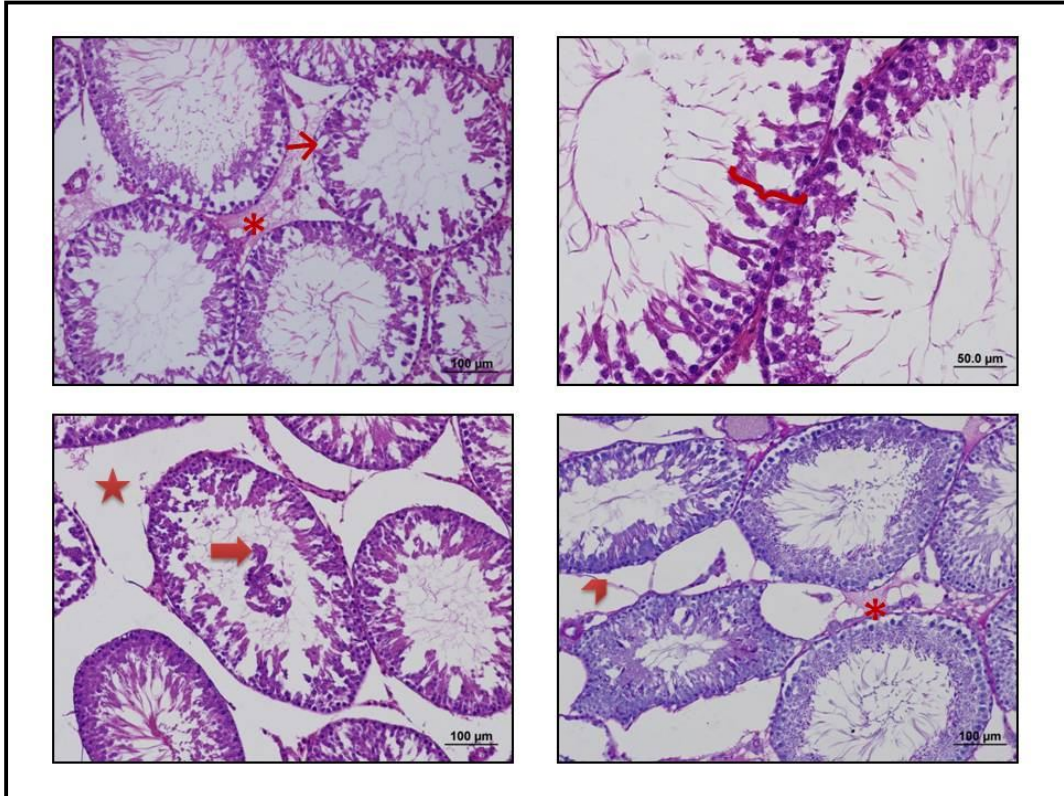
5.6.1. Kontrol Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

Şekil 10. Kontrol grubu (HE, H+PAS): Seminifer tübüller ve interstisyel alan normal yapıda görülmektedir. (50µm).



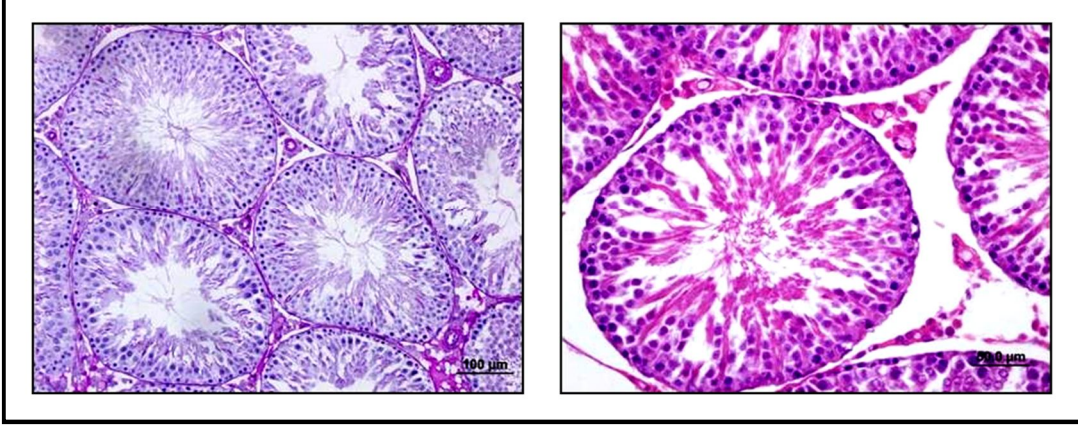
5.6.2. Etanol Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

Şekil 11. Etanol grubu (HE, H+PAS): 3 g/kg Etanol verilmiş sıçan testislerinin ışık mikroskopik görüntüsü. Vakuolizasyon (➔), ödem (*), germ hücre serisinde azalma (⚡), olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin lümene dökülmesi (➔) interstisyel alanda açılma (★), bazal membranda ayrılma (▶). (50-100µm).



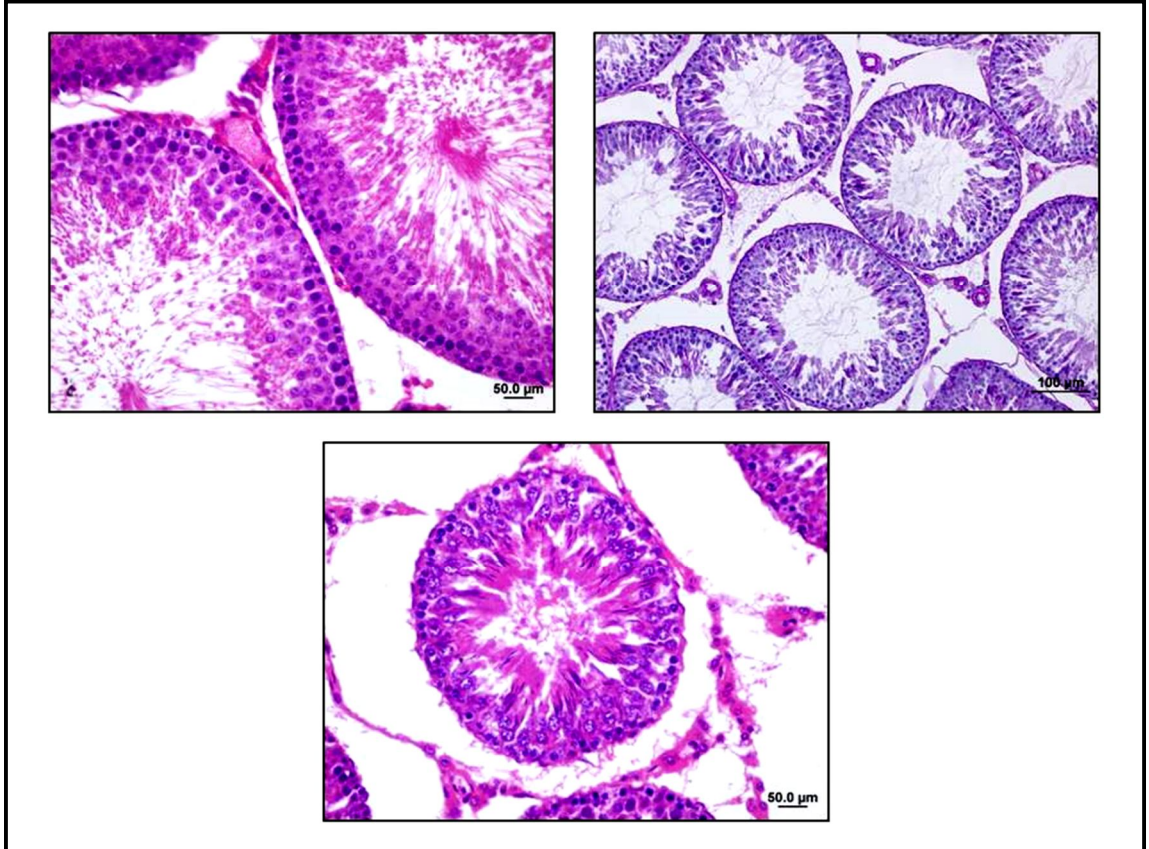
5.6.3. Mısır Yağı Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

Şekil 12. Mısır Yağı (HE, H+PAS): 1ml mısır yağı verilmiş sıçan testisinin ışık mikroskopik görüntüsü. Semifer tübül ve interstisyel alan kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir. (50-100µm).



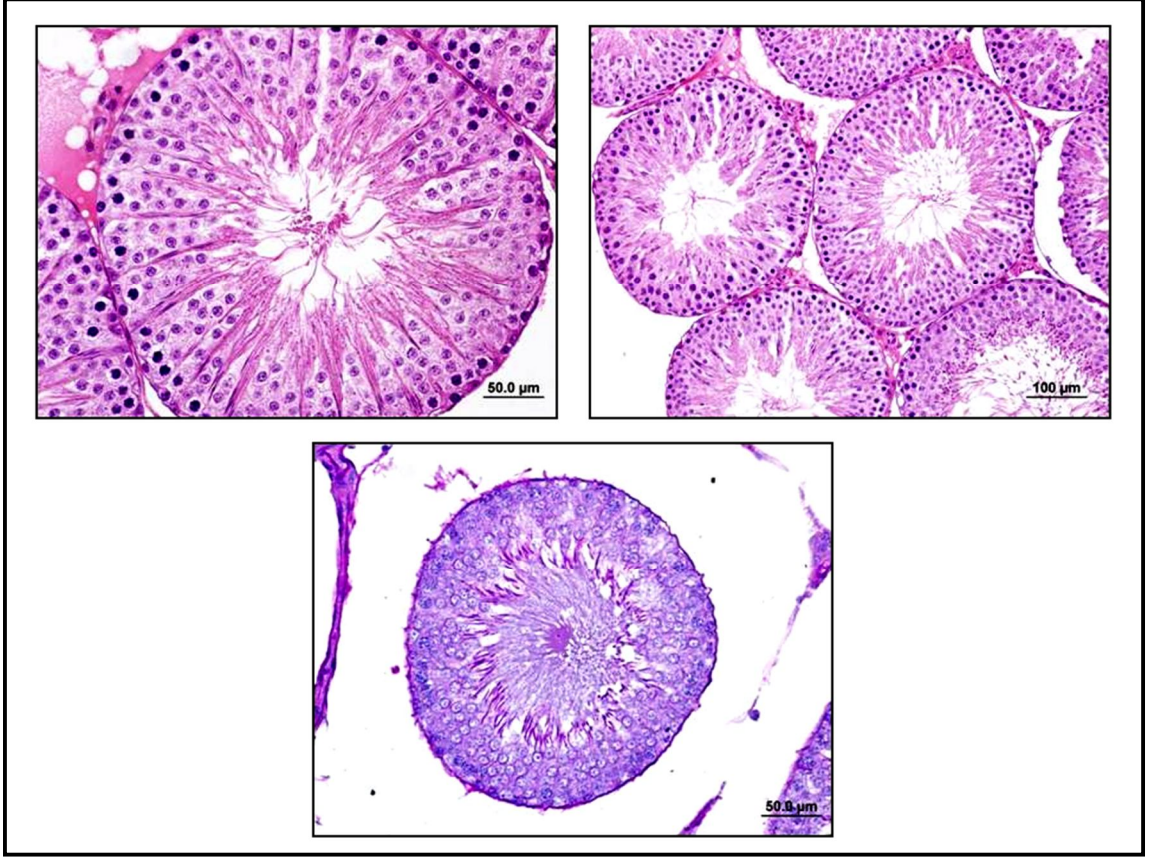
5.6.4. Chrysin Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

Şekil 13. Chrysin grubu (HE, H+PAS): 50mg/kg chrysin verilmiş sıçan testisinin ışık mikroskopik görüntüsü. Semifer tübül ve interstisyel alan kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir. (50-100µm).



5.6.5. Chrysin+Etanol Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

Şekil 14. Etanol+Chrysin (HE, H+PAS): 3g/kg Etanol ve 50mg/kg Chrysin verilmiş sıçan testisinin ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül ve interstisyel alan kontrol grubuna yakın olup, minimal düzeyde ödem gözlenmiştir. (50-100µm).



6. TARTIŞMA

Günümüzde keyif verici ve sakinleştirici olarak kullanılan alkolün tüketiminde; stresli şehir hayatı, yoğun mesailer ve psikolojik sebeplere bağlı olarak artış görülmektedir. Bu nedenle alkol birçok araştırma projesine konu olmuş, alkolün canlı organizma üzerine yaptığı hasarlar ve bu hasarlara karşı olası koruyucu maddeler araştırılmıştır (88).

Ülkemizde de alkol tüketimi hızla artmakta olup literatürde 15 yaş ve üzeri kişilerde kişi başına düşen alkol miktarının % 0,2 litre olarak arttığı belirtilmiştir (57).

Ethanol' ün, akut alkolizmde asıl etkilerini merkezi sinir sistemi, karaciğer ve midede göstermesinin yanı sıra vücudun tüm organ ve dokularında morfolojik değişikliklere neden olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (88, 25). Ethanol' ün canlı doku ve organlarında oluşturduğu bütün bu hasarların alkol metabolizması sonucunda açığa çıkan serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasardan kaynaklandığı bilinmektedir (7, 38,80, 90).

Ethanol' ün hipofiz-gonad yolunun fonksiyonuna zarar vererek üreme sistemi üzerinde de toksik etki yaptığı tespit edilmiştir (28, 52).

Bu çalışma ile sıçanlarda deneysel olarak uygulanan ethanolün testis dokusu üzerinde oluşturduğu hasarlar biyokimyasal ve histolojik düzeyde incelenmiştir. Testis dokusunda ethanol toksitesine bağlı meydana gelen hasarlara karşı kuvvetli bir flavonoid olan Chrysin kullanılmıştır.

6.1. Sıçanların Deney Sonu Vücut Ağırlığı Farkı, Testis Ağırlığı ve Testis İndeksi

Sıçanların deney sonu vücut ağırlığı ve testis ağırlığı Chrysin, Etanol, CH+EtOH ve mısır yağı grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Etanol grubunun testis ağırlık indeksi kontrol ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük çıkmıştır. Gruplar arası toplam testis ağırlıkları karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Bu sonuçlar daha önce yapılan araştırmalar ile paralellik göstermektedir (19). Ancak Phil ve Arkadaşlarının 2006 yılında yapmış oldukları bir çalışmada 10 gün boyunca sıçanlara intra peritoneal (i.p) olarak etanol verilmiş ancak etanol verilen erkek sıçanlarda testis ağırlığında ve testis dokularında önemli bir patolojik değişiklik olmadığını tespit etmişler ve bu 10 günlük sürenin yetersiz olduğunu belirtmişler. Ancak testis dokularında ağırlık kaybı olmamasına rağmen germ hücrelerinde apoptotik hücre tespit ettiklerini bildirmişlerdir (64). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile bizim çalışmamız da elde ettiğimiz sonuçlar benzerlik göstermektedir. Ancak biz çalışmamızda kontrol ve deney gruplarındaki sıçanların testis dokularındaki germ hücrelerine apoptotik bakımından bakmadık. Sonuç olarak insan ve hayvanlarda kullanılan benzeri kimyasallar erkek üreme sistemini olumsuz olarak etkiler. Ancak bu etkiler testis dokularında her zaman ağırlık kaybına neden olmayabilir ve esas olan germ hücrelerinin apoptosize maruz kalıp kalmaması sonucu testislerde meydana gelebilecek atrofi ve bunun sonucunda meydana gelen infertilite önemlidir (90).

6.2. Biyokimyasal Verilerinin Karşılaştırılması

Oksidatif stres; metabolik prosesler sonucunda açığa çıkan serbest radikallerin miktarının artmasına bağlı olarak antioksidan sistemlerin yetersiz kalması ile oluşur (35,75). Dokularda alkol kaynaklı meydana gelen hasarların, alkol metabolizması sonucunda açığa çıkan serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasardan kaynaklandığı bilinmektedir (80,91). Etanol kullanımının oksidatif stresi arttırdığı ve bu stresin artımı sonucunda da testis dokusundaki germ hücrelerinin ölümüne neden olduğunu bildirilmiştir (68). Dokularda oluşan süperoksit radikali (O^{2-}), SOD enzimi tarafından hemen H_2O_2 ve oksijene dönüştürülür (32). Diğer antioksidan enzimler olan

CAT ve GSH-PX H_2O_2 'nin suya ve oksijene dönüşümünü sağlar. Hücrelerde temel strateji SOD, CAT, GSH-PX, kullanılarak $O^{\cdot -}$ ve H_2O_2 'i detoksifiye etmek ve daha toksik ürünlerin oluşumunu önlemektir (12). Bu nedenle çalışmamızda etanol kaynaklı serbest radikallerin testis dokusunda oluşturacağı oksidatif hasarı net olarak ortaya koyabilmek adına lipid peroksidasyonunun göstergelerinden biri olan MDA düzeylerini, antioksidan mekanizmalardan enzimatik olmayan GSH düzeyleri ile SOD ve CAT enzim aktivitelerini inceledik.

Glutasyon (γ -glutamilsistein glisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı, tripeptit yapısında önemli bir antioksidandır. DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücre fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır. İndirgenmiş glutasyon (GSH), içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur. Glutasyon peroksidaz isimli enzimin kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksiti katabolize eder (9, 24)

Ortama artan serbest radikallerin detoksifikasyonu, glutasyonun indirgenmiş formu olan GSH ve oksitlenmiş dimer formu GSSG'ye dönüşümü ile sağlanmaktadır (9). Oksidatif stres sürecinde, GSH düzeyi azalırken, GSSG'nin arttığı; bu durumda biriken H_2O_2 ve organik hidroperoksitler glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve katalaz etkisiyle ortadan kaldırılır. Bu bileşiklerin aktif bir şekilde hücre dışına çıkarılması GSH tükenmesine yol açmaktadır (32) Verilerimiz incelendiğinde de etanolun sıçan testis dokusunda GSH düzeyini anlamlı ölçüde azalttığı görülmüştür. GSH düzeyi azalırken artan oksidatif hasar sürecinde ortaya çıkan serbest radikalleri süpürücü görev yapan CAT enzim aktivitesi de azalmıştır. Etanol kaynaklı akut oksidatif strese, CAT'ın enzim düzeyinin anlamlı ölçüde azalmasının etanol kaynaklı serbest radikallerden kaynaklandığı düşüncesindeyiz. Literatürdeki benzer çalışmalarda da oksidatif hasar reaksiyonlarında CAT enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür (2,75).

Beyindeki antioksidan kapasitenin az olması nedeniyle oksidatif strese karşı savunmada hücreler arası major antioksidan olan GSH'nin önemi büyüktür (82). Antibiyotiklerin, glutatyonun sülfhidril gruplarına bağlanarak antioksidan savunma mekanizmasındaki etkinliğini azalttığı bildirilmiş olup bizim çalışmamızla da örtüşmektedir (73).

SOD, endojen olarak oluşturulan süperoksit radikallerinin toksik etkilerinden hücreleri koruyan bir grup metalloenzimdir. SOD, süperoksitin hidrojen perokside dönüşümünü katalizler ve oksiradikallere karşı primer koruyucudur (2). Daha önce yapılmış olan çalışmalarda akut patolojilerde oluşan aşırı serbest radikal üretimine karşılık bu artışı dengelemek üzere antioksidan enzimlerden olan SOD düzeylerinde artış meydana geldiği ifade edilmiştir (2). Çalışmamız subkronik olarak sürdüğünden, devam eden toksisiteye bağlı olarak SOD miktarının azaldığı ve buna bağlı olarak düşük SOD düzeylerinin tespit edildiğini düşünmekteyiz.

Etanol grubunda CAT ve SOD enzim aktiviteleri ile GSH düzeylerinin anlamlı ölçüde azalması oksidatif hasarın varlığını açıkça ortaya koymaktadır. Bu veriler literatürle de desteklenmektedir (75,32,2).

Etanol kaynaklı oksidatif hasara karşı CH kullandığımız gruplar incelendiğinde; kontrole göre belirgin oranda azalan CAT enzim aktivitesi CH uygulaması ile kontrole yaklaşacak şekilde artmıştır bu artış istatistiksel olarak anlamlı olup CH oksidatif hasara karşı koruyucu etkinliğini ortaya koyan çalışmalarla örtüşmektedir (91.72.). Etanolün toksik etkilerine karşı CAT enzim aktivitesini kontrol lehine çeviren CH, etanolün GSH düzeyi ve SOD enzim aktivitesinde oluşturduğu azalma üzerinde etkili olamamıştır.

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit oksidatif stresin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan önemli markırlardandır. Genel kanaat, oluşan oksidatif stresin neden olduğu lipid peroksidasyonu sonucu MDA düzeylerinin artacağı yönündedir ve literatürde bu yaklaşımı destekleyen çok sayıda çalışmaya

rastlamak mümkündür (17,39). Etanolün doymamış yağ asitleri üzerine etki ederek lipid peroksidasyonunun ilerlemesine neden olduğu daha önce yapılmış olan çalışmalar ile net olarak ortaya konulmuştur (2,10,80,88). Bizim verilerimiz de MDA düzeyi açısından incelendiğinde anlamlı şekilde artan MDA seviyesi oluşan hasarı açıkça ortaya koymaktadır. CH uygulaması ise etanol ile artan MDA seviyesini kontrol grubu lehinde azaltmıştır. Bu azalış anlamlı bulunmamıştır.

Bütün antioksidan sistemler incelendiğinde etanol uygulaması ile azalan CAT, SOD enzim aktivitesi ve GSH düzeyi, MDA seviyesindeki belirgin artış testis dokusundaki etanol kaynaklı oksidatif hasarı açıkça göstermekte olup bu veriler literatür ile uygunluk göstermektedir (2,17,39,75). Koruyucu olarak kullanılan CH azalan enzim aktivitelerini ve GSH düzeyini kontrol lehinde arttırmış olup bunlardan sadece CAT enzim aktivitesindeki artış anlamlı bulunmuştur. Ayrıca etanol uygulanan grupta belirgin oranda artan MDA seviyesini kontrol grubuna yaklaşıcaak düzeyde azaltmıştır.

6.3. Testosteron Seviyelerinin Karşılaştırılması

Daha önce yapılmış olan bir çalışmada kronik etanol uygulanan sıçanlarda serum testosteron ve testiküler testosteron seviyelerinde, seminal vezikül ağırlıklarında, serum FSH, LH seviyelerinde azalmaya, hipofizer/serum FSH/LH oranında ise artışa neden olduğu gözlenmiştir (72). Serum testosteron seviyelerinin azalması direk olarak testiküler steroidogenezin azalması veya testiküler luteinizan hormon reseptörlerinin tükenmesi ve gonadotropin cevapsızlığına bağlı olabildiği düşünülmüş olup kronik etanol maruziyetinin hipotalamik GnRH sekresyonunu etkilemiş olabileceği öne sürülmüştür (72).

Bizim çalışmamızda da etanol uygulaması testosteron değerlerini anlamlı oranda düşürmüştür. Koruyuculuğunu araştırdığımız CH' ise tek kullanıldığında testosteron düzeyini anlamlı bir şekilde diğer gruplara göre arttırmıştır. Etanol uygulaması ile eş zamanlı CH verilen grupta ise testosteron değerini düşürmüştür ancak CH+EtOH kullanımı sonucunda testosteron anlamlı bir şekilde etanol grubuna göre arttırmıştır.

Alkol hipotalamus-hipofiz-gonodal eksenini bozarak testosteron ve dihidrotestosteron seviyesini de olumsuz etkilemektedir (28,52). Dişi ve erkekte cinsiyet hormonlarının sentezinde aromataz enzimi rol almaktadır. Aromataz enzimi testosteronu östradiole dönüştüren bir ajandır. Aromataz enziminin bloke edilmesi testostere seviyesinde bir artışa neden olmaktadır (33). Chrysin de bir aromataz enzimi inhibitörü olduğu için CH kullanılan deney gruplarındaki sıçanların serumlarında testostere seviyesi anlamlı oranda artış göstermiştir. Bu sonuç daha önce yapılan araştırma sonuçları ile benzerlik göstermektedir(19).

6.4. Histolojik Verilerinin Karşılaştırılması

Literatür incelendiğinde deneysel olarak yapılmış daha önceki araştırmalarda, etanolün testislerin mikroskobik yapısında değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir (43).

Alkol bazı kemiricilerin Leydig hücreleri çaplarında küçülmeye, Leydig hücrelerinde, uzamış ve kupa-şekilli mitokondri ve psödotopod şeklindeki sitoplazmik çıkıntılarda artışa neden olmuştur. Alkol verilenlerin Leydig hücrelerinin daha küçük ve bunların daha az sitoplazma, daha büyük mitokondri ve daha az düz endoplazmik retikulumu sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte başka bir araştırmada, Leydig hücrelerinin nükleus, mitokondri ve endoplazmik retikulumu tarafından işgal edilen fraksiyonel volümünün etanolden etkilenmediği bildirilmiştir(81). Bizim çalışmamızda, etanol grubunda Leydig hücrelerinde ışık mikroskobun herhangi bir bozukluk gözlenmedi fakat biyokimyasal düzeyde bakıldığında tetosteron seviyesinde anlamlı şekilde düşüş izlendi. Biz bu düşüşü etanolün Leydig hücrelerine vermiş olduğu hasardan dolayı olabileceğini düşünmekteyiz. Elektron mikroskobu düzeyinde yapılan bir çalışmada meydana gelen hasarın gözlenebileceğini düşünmekteyiz. Etanol + chrysin grubunda Leydig hücrelerinde herhangi bir hasar izlenmedi. Yapılan biyokimyasal analiz sonucu testosteron seviyesinde anlamlı şekilde artış izlendi.

Kontrol grubundaki sıçanların testis dokuları incelendiğinde; seminifer tübüller ve bunların aralarındaki interstisyel bağ dokusunun normal yapıda görüldüğü, interstisyel dokudaki Leydig hücrelerinin, seminifer tübülü saran peritübüler dokudaki miyoid hücrelerinin, seminifer epiteli oluşturan Sertoli hücrelerinin, spermatogonium, spermatisitler ve spermatidlerin normal yapıda olduğu görülmüştür. Buna karşın etanol uygulanan grupta, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin tübül lümenine döküldükleri ve buna ek olarak germ hücre serisinde ise azalma olduğu saptanmıştır. Spermatogenetik hücreler arasındaki dizilimlerde de bozuklukların olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bütün bu histolojik veriler incelendiğinde etanol uygulamasının testis dokusunda toksik bir etkiye neden olduğu saptanmış olup bu sonuç daha önce yapılan araştırmalar ile paralellik göstermektedir (43,66). Etanolün testis dokusunda oluşturduğu bütün bu hasarlara alkol metabolizması sonucu açığa çıkan metabolitlerden kaynaklı serbest radikallerin neden olduğu kanaatindeyiz. Bu nedenle oluşan bu toksisiteye karşı kuvvetli bir flavonoid olan CH'ni kullandık.

Flavonoidler, bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan yararlı biyokimyasal ve antioksidan etkileri olan bileşikler olup en iyi tanımlanmış flavonoidlerden biri de CH'dir (50,53). CH'nin bu kuvvetli antioksidan özelliğinden dolayı etanol kaynaklı oksidatif hasara bağlı olarak meydana gelen testis doku hasarını önleyebileceğini düşündük. Etanolün testisler üzerinde oluşturabileceği hasarlara karşı CH'nin koruyucu etkisini araştırdık.

Yaptığımız mikroskopik incelemelerde; etanolün toksik etkilerine karşı koruyucu olarak CH kullanılan grupta; sıçan testis dokularında seminifer tübüllerinde etanol grubuna göre belirgin bir şekilde düzelme meydana geldiği görüldü. Minimal düzeyde ödem ve hücre dejenerasyonu gözlemlendi. Çok nadir olarak gözükken hücresel bozuklukların yanında kontrol grubuna benzerlik göstermekteydi. Bütün bu veriler incelendiğinde etanolün sıçan testis dokusunda toksik bir etkiye yol açtığı CH'in etanol kaynaklı bu hasarı kontrol grubu lehine çevirdiği açıkça ortaya konulmuştur.

6.5. Seminifer Tübül Çapı

Van ve ark. insanlarda kronik alkol alımının testis seminer túbül çapında daralma ve germ hücrelerinde kayıp meydana geldiğini ortaya koymuşlardır (84). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise kronik alkol alımı sonucunda testis seminifer túbül çapında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır fakat germ hücrelerinde kayıp gözlenmiştir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda alkole bağlı oluşan testis hasarına karşı CH'nin testisi koruyucu etkisinin olup olmadığına bakıldı. Biyokimyasal ve histolojik olarak sıçanlar üzerinde gerçekleştirdiğimiz bu çalışma neticesinde etanolün testislerde antioksidan savunma sistemini zayıflattığı ve dokuda oksidatif hasara sebep olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, etanol uygulaması sonucu testis dokusunun histolojik yapısının bozulduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar ışığında;

- 1) Günümüzde tüm dünyada yaygın olarak kullanılan ve düşük dozda bile ciddi hasarı olan etanolün kullanılmasının erkek üreme sistemi üzerinde özellikle testis dokularında hasara neden olduğu tespit edildi.
- 2) Kuvvetli bir antioksidan olan CH'nin erkek üreme sistemini özellikle testis dokularını alkol gibi bazı toksik maddelere karşı koruyabildiği ve serumda testosteron seviyelerinde önemli artış olduğu bundan dolayı CH'nin alkole bağlı infertilite çalışmalarında kullanılabilirliğini artırıcı çalışmalar yapılmalıdır.
- 3) CH'nin dozu ve süresi IVF çalışmalarında meydana gelen oksidatif stresi minimize etmek için kullanılabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- 1) Aebi, H., 1974, Catalase. In Bergmeyer Hu (ed). Methods of Enzymatic Analysis. New York and London; Academic Pres, 673-677 p.
- 2) Akdoğan, M., Akkuş, S., Akkuş, F., Koyu, A., 1998, Romatoid Artrit ve Osteoporozlu Hastalarda Eritrosit Süperoksit Dismutaz, Glutatyon Peroksidaz ve Katalaz Enzim Düzeyleri. *Van Tıp Derg*, 5, 2.
- 3) Akyüz, O., 2007, Sıçanlarda akut prenatal etanol uygulamasına bağlı olarak optik sinirde gelişen postnatal teratojenik değişiklikler üzerine eksojen melatonin verilmesinin etkilerinin değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı.
- 4) Amanpreet, S., Pattipati, S., Shrinivas K., 2003 Reversal of aging and chronic ethanol –induced cognitive dysfunction by quercetin a bioflavonoid. *Free Radical research*, 37, (11),1245 -1252.
- 5) Anonim., 1998, Spectrophotometric Determination of total Protein-Biüret Method A New Approach Founded by the National Science Foundation. *Dorey and Draves University of Central Arkansas, Department of Chemistry Conway, AR 72035 Update :5/98.*
- 6) Arda, E., 2012, Testis iskemi reperfüzyonunda vitamin E ve koenzim Q10'un koruyucu rolü. Uzmanlık Tezi , Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı.
- 7) Armutçu F., Gürel A., Söğüt S., Aksu N., Ünalacak M., 2004. Alkol alışkanlığı olanlarda eritrosit oksidan ve antioksidan parametre düzeyleri, *Fırat Tıp Dergisi*, 9(2): 50-53,.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 8) Aruoma, O., Kaur, H., Halliwell, B., 1991, Oxygen free radicals and human diseases. J R Soc Health. 111(5):172-7 p. Review 1.
- 9) Aslan, R., 2007, Nonilfenol toksikasyonuna maruz bırakılan ratlarda taurinin malondialdehit, glutatyon, süperoksit dismutaz ve nitrik oksit üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi.
- 10) Azzi A., Davies K. J. A., Kelly F., 2004 Free radical biology- terminology and critical thinking. FEBS Letters 558 3-6,.
- 11) Bancroft, J.D., Gamble, M., 2002, Theory and Histological Techniques, 5Th Edition, 436 p.
- 12) Beyer, C.E., Steketee, J.D., Saphier, D. 1999, Antioxidant properties of melatonin – an emergingmystery. Biochem Pharmacol, 15, 1265–1272.
- 13) Brooks, JD., 2002, Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Jr, Wein AJ (Eds): Campbell’s Urology. 8th ed. Philadephia: WB saunders, 41-80 p.
- 14) Bulasıcı hastalıklar ve uyusturucu ile savas klübü. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 1997; 30: 1-15, 309-312.
- 15) Buslig, B.S., Manthey, J.A., 2002, Flavonoids in cell function. Kluwer Academic Press, New York.
- 16) Cankorkmaz, L., Köylüoğlu, G., Özer, H., Yıldız, E., Sümer , Z., Özdemir, Ö., 2009, Deneysel tek taraflı testis torsiyonundaki karşı testis hasarında apoptozisin rolü ve karnitinin koruyucu etkisi. Ulus Travma Acil Cerrahi Dergisi, 15(6): 529-534.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 17) Claeson, K., Aberg, F., Karlberg, B., 2000, Free malondialdehyde determination in rat brain tissue by capillary zone electrophoresis: evaluation of two protein removal procedures. *Journal of Chromatography B*, 740, 87–92.
- 18) Cho, H., Yun, CW., Park, WK., Kong, JY., Kim, KS., Park, Y., Lee, S., Kim, BK., 2004, Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacology Research*, 49(1), 37-43 p.
- 19) Ciftci, O., Ozdemir, İ., Aydın, M., Beytur, A., 2012, Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia*, 44(3),181-186p.
- 20) Cochran, CG., 1991, Cellular injury by oxidants. *Am. J. Med* 92: 235-305 p.
- 21) Cooke,MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J., 2003, Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17: 1195-1214 p.
- 22) Coskun, T., 2005, Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 48, 69-84.
- 23) Critchfield, JW., Butera, ST., Folks, TM., 1996, Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Research Human Retroviruses*, 12, 39–46 p.
- 24) Doğan, Z., 2012, Gebe ratlarda siprofloksasin kullanımının fetal beyin gelişimi ve morfolojik yapı üzerine etkilerinin araştırılması; Quercetin'in olası koruyucu rolünün belirlenmesi. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 25) Emre, S., Yılmaz, Z., Oztürk, F., Emre, MH., 2009. Propolis prevents the effects of chronic alcohol intake on ocular tissues. 42(3):147-51.
- 26) Eid N, Ito Y, Otsuki Y., . 2012 Feb, Enhanced mitophagy in Sertoli cells of ethanol-treated rats: morphological evidence and clinical relevance. J Mol Histol, 43(1):71-80.
- 27) Elman, G.L., 1979, Tissue sulphhydryl groups. Arch Biochem Biophys, 95, 351–358 p.
- 28) El-Sokkary GH., 2001 Apr, Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration on the testis of adult male rat. Neuro Endocrinol Lett.,22(2):93-9.
- 29) Esterbauer, H., Cheeseman, KH., 1990, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Enzymology, Volume 186, 407-421 p.
- 30) Evans, MD., Cooke MS., 2004, Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. BioEssays 26: 533-542 p.
- 31) Ezzatabadipour, M., Azizollahi, S., Sarvazad, A., Mirkahnouj, Z., Mahdinia, Z., Nematollahi-Mahani, SN., 2012 Oct, .Effects of concurrent chronic administration of alcohol and nicotine on rat sperm parameters. Andrologia, 44(5):330-6.
- 32) Fadillioğlu, E., Erdoğan, H., Polat, A., Emre, H. 2002, Renal antioksidant status in rats with hypertension induced by N sup omega Nitro-L-Arginine Methyl Ester. Kidney Blood Pres Res. 25, 211–216.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 33) Gambelunghe, C., Rossi, R., Sommovilla, M., Ferranti, C., Rossi, R., Ciculi, C., Gizzi, S., Micheletti A., Rufini S., 2003, Effects of chrysin on urinary testosterone levels in human males. *J Med Food* 6:387–390.
- 34) Gill J., 2000, The Effects Of Moderate Alcohol Consumption On Female Hormone Levels And Reproductive Function . *Alcohol & Alcoholism*, 35(5): 417-423.
- 35) Hücre- II. Oksidan Stres ve Hücre Hasarı. 1993, Tıpta Temel Bilimler Kolu Kurs notları, Sonbahar Okulu – Kızılcahamam.
- 36) Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., Katan, M.B., 1996, Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 57(1), 43-46.
- 37) <http://en.wikipedia.org/wiki/Chrysin>”, (2013-31-5).
- 38) <http://mobilereagents.com/examplePages/47/47131.html>”, (2013-31-5).
- 39) Ilhan, N., Halifeoglu, I., Ozercan, H.I., Ilhan, N., 2001, Tissue malondialdehyde and adenosine triphosphatase level after experimental liver ischaemia-reperfusion damage. *Cell Biochem Funct*, 19, 207–212.
- 40) Ishii, H., Kurose, I., Kato, S., 1997, Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J Gastroenterol Hepatol*, 12: 272-282.
- 41) Jeong, HJ., Shin, YG., Kim, IH., and Pezzuto, JM., 1999, Inhibition of aromatase activity by flavonoids. *Arch Pharm Res (NY)* 22, 309–312.
- 42) Junqueira, L.C., Carneiro, J., Temel Histoloji, 2009, (Çev: Solakoğlu, S., Aytekin, Y.) Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 43) Karaarslan, F.J. 2009, Erişkin erkek sıçanlarda etan dimetan sülfonat ile oluşturulan testis hasarı üzerine sodyum selenitin etkisi. Yüksek Lisans Tezi , Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı.
- 44) Kierszenbaum, A.L., 2006, Histoloji ve hücre biyolojisi, (Çev.: Demir R.), Palme yayıncılık, Ankara, 459-467 s.
- 45) Koh P., 2007, Ethanol exposure supresses survival kinases activation in adult rat testes. J. Vet. Med. Sci.;69:21-24.
- 46) Koh, PO., Kim, MO., 2006 Oct, Ethanol exposure decreases cell proliferation and increases apoptosis in rat testes. J Vet Med Sci., 68(10):1013-7.
- 47) Knowles, LM., Zigrossi, DA., Tauber, RA., Hightower, C., Milner, JA., 2000, Flavonoids suppress androgen-independant human prostate tumor proliferation. Nutrition Cancer, 38-1, 116-122p.
- 48) Kubat, H., 2007, Kronik alkol alan farelerde rho/rho-kinaz yolağının İncelenmesi. Uzmanlık Tezi , Mersin Üniveristesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı .
- 49) Kuran, O., 1983, Sistematik Anatomi. İstanbul: Filiz Kitabevi, 512-4.
- 50) Lakhanpal, P., Rai, DK., (2007), Quercetin: a versatile flavonoid. Internet Journal of Medical Update, 2(2), 22-37.
- 51) Lowry, OH., rosenbrough NJ, Farr Al. And Randall RJ., 1951, Protein measurement with pholin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

52) Martinez FE, Martinez M, Padovani CR, Bustos-Obregón E., 2000 Apr, Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). J Submicrosc Cytol Pathol.,32(2):175-84.(“17”)

53) Medina, JH., Paladini, AC., Wolfman, C., Levi de Stein, M., Calvo, D., Diaz, LE., Pena, C., (1990), Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. Biochemical Pharmacology, 40(10), 2227-31.

54) Meinhardt U and Mullis PE., (2002), The essential role of the aromatase/P450arom. Semin Reprod Med 20, 277–284.

55) Mir Tahir and Sarwat Sultana., 2011, Chrysin Modulates Ethanol Metabolism in Wistar Rats: A Promising Role against Organ Toxicities. Alcohol and Alcoholism Vol. 46, No. 4, pp. 383–392.

56) Moore, K.L. ve Persaud, T.V.N., Klinik yönleriyle insan embriyolojisi, 2009, (Çev: Dalçık,H., Yıldırım, M.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

57) Non-Medical Determinants of Health Alcohol consumption
http://stats.oecd.org/index.aspx?DataSetCode=HEALTH_STAT Erişim
tarihi:06/08/2013.

58) Nordmann R., 1994, Alcohol and antioxidant systems. Alcohol Alcohol, 29: 513-522.

59) Ovalle, W.K., Nahirney, P.C., Netter temel histoloji, 2009, (Çev: Müftüoğlu, S.,Kaymaz, F., Atilla, P.), Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 60) Pastor, AM., Martín, GV., Estruch, GFB., (2006), Evaluación Citogenética Del Efecto Radioprotector Del Extracto Etanólico De Propóleos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- 61) Peterson GL., 1977, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Wich is more generally applicable. *Anal. Bioche.*, 83:346-356 p.
- 62) Peterson, J., Dwyer, J., (1998), Flavonoids, dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18 (12), 1995-2018.
- 63) Petorak İ., 1986 *Medikal Embriyoloji*. İstanbul: Beta Basım Dağıtım A.Ş, 220-3.
- 64) Phil-Ok, KOH., Myeong-Ok, KIM., 2006, Ethanol exposure decreases cell proliferation and increases apoptosis in rat testes. *J.Vet.Med.Sci* 68(10): 1013-1017.
- 65) Pushpavalli, G., Kalaiarasi, P., Veeramani, C., Pugalendi, KV., (2010), Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D-galactosamine induced hepatitis in rats. *Europe Journal Pharmacology*, 10, 631(1-3), 36-41p.
- 66) Rauha, J.P., Tammela, P., Summanen, J., Vuorela, P., Kahkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Kujala, T., Pihlaja, K., Törnquist, K. and Vuorela, H., (1999), Action of some plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds on calcium fluxes in clonal rat pituitary GH cells. *Pharm. Pharmacol. Lett* 9: 66-69 p.
- 67) Ray, G., Batra, S., Shukla, N.K., Deo, S., Raina, V., Ashok, S., Husain, S.A., 2000, Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 59, 163–170.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 68) Rosenbulum, E., Gavaler, J.S. and Van Thiel, D.H., 1985, Lipid peroxidation: a mechanism for ethanol-associated testicular injury in rats. *Endocrinology* 116. 311-318.
- 69) Russell, L.D., Etlin, A.R., Hikim, A.P.S. at Clegg E.D., 1990, Histological and histopatological evaluation of the testis, Cache River Press, St. Louis, 286 p.
- 70) Sadler, T.W., 2005, *Langman Medikal Embriyoloji* 9. baskı, 292- 293 p.
- 71) Sahinturk, V., Guclu, C. at Baycu, C., 2007, Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats, *Asian J. Androl.*, 9, 1, 117–124 p.
- 72) Salonen I, Huhtaniemi I., 1990, Effects of chronic ethanol diet on pituitarytesticular function of the rat. *Biology of reproduction*,;42:55-62.
- 73) Sanchez, A.R. Almedia, A. Medina, J.M. (2002). Oxidative stress in preterm rat brain is due to mitochondrial dysfunction. *Pediatric Res*, 51, 34–39.
- 74) Schlegel PN, Hardy MH., 2002, Male reproductive physiology. In Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Jr, Wein AJ (Eds): *Campbell's Urology*. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1437-76 p.
- 75) Singh, A., Naidu, P.S., Kulkarni, S.K. 2003, Reversal of aging and chronic ethanol –induced cognitive dysfunction by quercetin a bioflavonoid. *Free Radical Res*, 37, 1245 -1252.
- 76) Sivam, G., (2002), Analysis of Flavonoids. In *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, Edited by W.J. Hurst, CRC Press, LLC, Boca Raton, 34p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 77) Snell RS.,1986, Clinical anatomy. 3rd ed. Boston: Brown and Company, 168-75.
- 78) Sun Y., Oberley L.W., Li, Y., 1988 , A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Che, 34, 497-500 p.
- 79) Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y., 1988 , A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Che, 34, 497-500 p.
- 80) Şentürk H.,2004 Serbest Radikal Hasarın Hepato–Biliyer Sistem Hastalıklarındaki Rolü. Kocatepe Tıp Dergisi, 5 Ek sayı 1-8.
- 81) Tığdaş, G., 2006, Etanolün fare testisi üzerine olan toksisitesine karşı askorbik asitin koruyucu etkisinin mikroskopik olarak değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi , Karadeniz Teknik Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı.
- 82) Turunç, S. E. (2007). *Kainik Asit Aracılı Eksitotoksisitede Hücresel Redoks Düzeylerive C-FOSmRNA Ekspresyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir
- 83) Uchiyama, M. Mihara M., 1978, Determination of MDA precursor in tissue by TBA test. *Anal Biochem*, 36, 271-278 p.
- 84) VanThiel, D.H. Gavler, J.S. Eagon, P.K., Chiao, Y.B., Cobb C.F. and Lester, R., 1980 Alcohol and sexual function. *Pharmacol. Biochem. Behav* 13. 125-129.
- 85) Van Thiel DH, Gavalier JS, Lester R, Goodman MD., 1975 Aug, Alcohol-induced testicular atrophy. Anexperimental model for hypogonadism occurring in chronic alcoholic men. *Gastroenterology*, 69(2):326-32.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 86) Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A., Dajas, F., Medina, JH., (1994), Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. *Pharmacology Biochemichal Behaviour*, 47(1),1-4.
- 87) Wu D, Cederbaum A.I., 2003, Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research and Health*. Washington 27(4), 277-84 p.
- 88) Yılmaz Z., 2006, Öğrenme ve hafızanın şekillendiği beyin bölgelerinde alkolün oluşturduğu hasarlarda propolisin etkileri. Yüksek Lisans Tezi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı.
- 89) Zheng, X., Meng, WD., Xu, YY., Cao, JG., Qing, FL., (2003), Synthesis and Anticancer Effect of Chrysin Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, 881–884p.
- 90) Zhu Q, Meisinger J, Emanuele NV, Emanuele MA, LaPaglia N, Van Thiel DH., 2000 Oct, Ethanol exposure enhances apoptosis within the testes. *Alcohol Clin Exp Res.*, 24(10):15506.
- 91) Zima, T., Lenka, F., Metsek, O., Janebova, M., Crkovska, J., Malbohan, I., Stipek, S., Mikulikova, Popov, P., 2001 Oxidative stres, metabolism of ethanol and Alcohol-related diseases. *Jiomed Sci*; 8:59-70.
- 92) Zloch, Z. and Sidlova, A., 1977, Relationship between The Biological Action of Flavonoids and The Function of Vitamin C in The Organism, *Cesk Gastroenterol Vyz* 31, 340-343.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

93) Zloch, Z. and Ginter, E., 1979, Effects of Flavonoids on Vitamin C Activity of Disoascorbic Acid. *Physiol Bohemoslov*, 28, 519-524.

94) Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE., 1999, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (1/2) 202-226 p.

ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Merve BAĞIŞ
2. **Doğum Tarihi:** 29.08.1989
3. **Uyruğu:** T.C
4. **Tel:** 0538-4621568
5. **Email:** merve-bagis@hotmail.com
6. **Öğrenim Durumu:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl	Notu
Lisans	Biyoloji	Dumlupınar Fen-Ede Fak.	2011	3,01/4
Y.Lisans	Histoloji veEmbriyoloji	Osmangazi Üniv. Tıp Fak.	01/11/2013	3,71/4

7. Yapmış olduğu stajlar:

- 06.06-09.2006, 10.06-09.2007, 11.06-09.2008, TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği Biyoteknoloji Enstitüsü (GMBE) Transgen Lab. Gönüllü Öğrenci.
- 02-06-09.2009: TÜBİTAK MAM GMBE Gönüllü stajyer Transgen lab ve Moleküler Genetik Labı.
- 03.06-07.2010: Acıbadem Hastanesi Tıbbi Genetik Lab. Gönüllü Stajyerlik.

8. Sertifikalar:

- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası 2011.
- Elektron Mikroskopu Kullanım Sertifikası 2013.

9. Bildiği Teknikler:

- Fare ve Sıçanlardan Embriyo Eldesi
- Farelere Embriyo Transferi
- Farlerde Vazektomize Ameliyatı
- Fare Embriyolarına Mikroenjeksiyon ile Gen Aktarımı
- In vitro Fare ve İnek Embriyo Kültürü

- Embriyoların Boyanması
- Embriyolarda cinsiyet tayini
- IVF ve ICSI inek ve fare oositi
- Rodent Kuyruk dokusundan DNA İzolasyonu
- PCR ile Transgenin Analizi
- Dokulardan Parafin Kesit
- Her türlü Dokudan Histolojik Doku Preparatları Hazırlama
- Dokularda İmmunohistokimyasal Analiz
- Sitogenetik Analiz
- Real time PCR

10. Katıldığı Ulusal Çalıştay ve Kurslar:

- Bağcılar Eğitim Araştırma Hastanesi Bilimsel Araştırmalarda Hayvan Denepleri Kursu. 10/06/2010
- Elektron Mikroskop Kursu 2013

11. Alınan Eğitimler:

- 2010: TÜBİTAK MAM GMBE Bioinformatik: Temel Dizi Analizi Uygulamalı Eğitimi

13. İş Tecrübesi:

- 01.10.2013- Devam ediyor : Acıbadem Eskişehir Hastanesi Tüp Bebek Merkezinde Embriyolog Olarak Çalışmakta.