

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

**SKROTAL RADYOTERAPİDE  
CURCUMİNİN PROFİLAKTİK KULLANIMI  
TESTİS DOKUSUNDA PARP-1 İMMÜNREAKTİVİTESİNİ  
VE SPERMATOGENEZİ NASIL ETKİLER?**

**BAYRAM KAMAT**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**YRD. DOÇ. DR. MERYEM AKPOLAT FERAH**

**ZONGULDAK  
2013**

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

**SKROTAL RADYOTERAPİDE  
CURCUMİNİN PROFİLAKTİK KULLANIMI  
TESTİS DOKUSUNDA PARP-1 İMMÜNREAKTİVİTESİNİ  
VE SPERMATOGENEZİ NASIL ETKİLER?**

**BAYRAM KAMAT**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**YRD. DOÇ. DR. MERYEM AKPOLAT FERAH**

Bu Tez Çalışması Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Tarafından  
Desteklenmiştir. (Proje No: 2012-42-00-03)

**ZONGULDAK  
2013**

## TEZ KABUL VE ONAY

“Skrotal Radyoterapide Curcuminin Profilaktik Kullanımı Testis Dokusunda PARP-1 İmmünreaktivitesini ve Spermatogenezi Nasıl Etkiler?” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

15.08.2013

**Başkan:** Yrd. Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH

**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Kanat GÜLLE

**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Bilgehan AÇIKGÖZ

**ONAY:** Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

**TARİH:**

**Doç. Dr. Gamze YURDAKAN**  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince beni yönlendiren, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH'a ve bilimsel katkıları ile desteğini esirgemeyen kıymetli hocam, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Kanat GÜLLE' ye,

Çalışmamda radyoterapi uygulamaları sırasındaki katkılarından dolayı, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Bekir Hakan Bakkal'a ve verilerimin istatistiksel analizi sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Fürüzan KÖKTÜRK'e,

Çalışmalarım esnasında bana destek olan sevgili arkadaşlarım İbrahim PALA, Dr. Fatma Zehra YÜCE, Dr. Mete KEÇECİ ve Dr. İnci TURAN'a,

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de benden desteklerini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bayram KAMAT

Ağustos,2013,ZONGULDAK

## ÖZET

**Bayram KAMAT. Skrotal Radyoterapide Curcuminin Profilaktik Kullanımı Testis Dokusunda PARP-1 İmmünreaktivitesini ve Spermatogenezi Nasıl Etkiler? Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2013.**

Fertilitede akut doz radyasyonun öldürücü etkileri iyi bilinmektedir. Kısa süreli radyasyona maruziyet germ hücrelerini öldürür ya da hasarlar. Son yıllarda radyoterapi, kanserli hastaların uzun süreli iyileşmesinde artışa yol açmıştır, ancak radyasyonun uzun dönem yan etkileri arasında, üreme sistemi üzerindeki hasarları göz ardı etmemek gerekmektedir. Bu güne kadar curcuminin antioksidan etkisi ile ilgili birçok makale yayınlanmıştır. Bu çalışma ile curcuminin X ışınlamayı takiben sıçan testisinde ortaya çıkacak germ hücre kaybını ve geç hücre hasarına bağlı ortaya çıkan morfolojik değişiklikleri azaltabileceği hipotezini ileri sürmekteyiz.

Çalışmamızda denekler, biri kontrol 3'ü deney grubu olmak üzere toplam 4 gruba ayrıldı. Radyasyon hasarı oluşturmak amacıyla kontrol ve curcumin grubu dışındaki deneklerin skrotal bölgelerine tek fraksiyonda 6 Gy X ışını uygulandı. İkinci ve dördüncü grup deneklere; ışınlamadan 1 hafta önce başlayarak, haftada 3 kez olmak üzere 7 hafta boyunca oral yoldan 100 mg/kg curcumin, birinci ve üçüncü grup deneklere ise aynı şekilde serum fizyolojik verildi. Işınlamadan 6 hafta sonra tüm denekler sakrifiye edildi ve alınan testis biyopsi materyalleri ışık mikroskopik gözlemler için işlemlendirildi.

Çalışmamızda, radyasyon maruziyetinin testislerde ciddi dejeneratif değişikliklere neden olduğu gözlemlendi. Seminifer tübüllerde spermatogenezin durduğu ve tübüllerin çoğunda germ hücre kaybına bağlı atrofi geliştiği saptandı. Curcumin uygulamasının ise radyasyona bağlı ortaya çıkan tüm bu hasarları önlemede etkisiz kaldığı tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** İyonize-radyasyon, Curcumin, PARP-1, Spermatogenez, Sıçan.

## ABSTRACT

**Bayram KAMAT. How the profilactic usage of curcumin affects the PARP-1 immunoreactivity and spermatogenesis in scrotal radiotherapy? Bulent Ecevit University, Enstitute of Health Science, Department of Histology and Embryology, Master of Science Thesis, Zonguldak, 2013.**

The lethal effects of acute doses of radiation on fertility are well known. Germ cells are killed or damaged within a short time of exposure to radiation. In recent years, radiotherapy of patients with cancer has led to an increased number of sustained remissions. However, among the long-term side effects of radiation, injury to the reproductive system is of particular concern. Many papers have been reported so far on the antioxidant effect of curcumin. The present study, we hypothesized that curcumin can minimize germ-cell depletion and morphological features of late cell damage in the rat testis following X-irradiation.

The animals were divided into 4 groups: the first group was the control and the other three were the experimental groups. 6 Gy X ray in a single fraction was applied into the scrotal areas of the subjects except the control and curcumin groups in order to form radiation damage. The rats in the second and forth groups were given curcumin (a dose of 100 mg/kg body weight) orally three times a week during a seven-week period, beginning the week before radiation therapy. The rats in the first and third groups received serum physiologic in the same way. Testis biopsy samples from the all groups were taken on the 7th week. All samples were processed and observed at the light microscopic levels.

In the present study, radiation exposure caused severe degenerative changes in testes. Spermatogenesis had arrested in seminiferous tubules and the majority of the tubules were found to be atrophic, absent of germ cells. It was identified that curcumin hadn't been effective in the prevention of all damages caused by radiation.

**Keywords:** Ionizing-radiation, Curcumin, PARP-1, Spermatogenesis, Rat.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
TABLolar DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Radyasyon .....	4
2.1.1. İyonlaştırıcı Radyasyon .....	4
2.2. Testis Histolojisi.....	6
2.2.1. Spermatogenez.....	6
2.3. Radyasyonun Testis ve Spermatogenez Üzerindeki Etkileri.....	7
2.4. PARP-1.....	8
2.4.1. PARP-1 Proteininin Genel Yapısı ve Mekanizması.....	9
2.4.2. PARP-1 ve Spermatogenez İlişkisi.....	10
2.5. Erkek İnfertilitesinde Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidan Savunma Sistemleri.....	11
2.6. Curcumin .....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	15
3.1. Deney Hayvanı .....	15
3.2. Radyasyon Uygulaması.....	15
3.3. Deney Grupları .....	15
3.4. Histopatolojik ve Histomorfometrik Analizler.....	16
3.5. Johnsen Skoru ile Spermatogenezin Değerlendirilmesi.....	16
3.6. İmmünohistokimyasal Analiz.....	17
3.7. İstatistiksel Analiz .....	18
4. BULGULAR.....	19
4.1. Kontrol ve Curcumin Grubuna Ait Genel Morfolojik Bulgular.....	19
4.2. Radyasyon ve Radyasyon+Curcumin Grubuna Ait Genel Morfolojik Bulgular ..	22
4.3. Tüm Grupların Işık Mikroskobik Bulgularının Karşılaştırılması.....	25

4.4. Kontrol ve Deney Gruplarında PARP-1 İmmünreaktivitesinin Değerlendirilmesi .....	26
4.5. Tüm Gruplarda PARP-1 İmmünreaktivitesinin Karşılaştırılması .....	27
4.6. Tüm Gruplara Ait Negatif Kontrol Görüntüleri .....	28
4.7. Kontrol ve Deney Gruplarında Spermatogenezin Johnsen Skoru ile Değerlendirilmesi .....	29
4.8. Seminifer Tübüllerin Morfometrik Olarak Değerlendirilmesi .....	30
4.9. Deneklerin Total Vücut Ağırlığında ve Testis Ağırlığında Meydana Gelen Değişiklikler .....	31
5. TARTIŞMA .....	32
6. SONUÇ .....	41
7. KAYNAKLAR .....	42
8. ÖZGEÇMİŞ .....	49
9. EKLER .....	50
9.1. Türkçe Etik Kurul Onayı .....	50
9.2. İngilizce Etik Kurul Onayı .....	51



## SİMGELER VE KISALTMALAR

- B.E.Ü: Bülent Ecevit Üniversitesi  
BM: Biyolojik moleküller  
CAT: Katalaz  
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole  
DNA: Deoksiribonükleik asit  
GPx: Glutasyon peroksidaz  
Gy: Gray  
H<sup>+</sup>: Hidrojen  
H<sub>2</sub>O: Su  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit  
H-E: Hematoksilen-Eozin  
kg: Kilogram  
mg: Miligram  
MDA: Malondialdehit  
MTZ: Metronidazol  
NAD<sup>+</sup>: Nikotinamid adenin dinükleotid  
OH<sup>-</sup>: Hidroksil  
PAR: Poli ADP Riboz  
PARP: Poli ADP Riboz Polimeraz  
PARP-1: Poli ADP Riboz Polimeraz-1  
PARP-2: Poli ADP Riboz Polimeraz-2  
PAS: Periyodik asid Schiff  
PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi  
ROS: Reaktif oksijen türlerinin  
RT: Radyoterapi  
SOD: Süperoksit dismutaz  
SRY: Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesi  
STZ: Streptozotocin  
UV: Ultra viole  
γ: Gamma  
µm: Mikrometre

## TABLULAR DİZİNİ

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1. Johnsen skoru kriterleri.....	17
2. PARP-1 immünoreaktivitesi için histolojik skor değerleri.....	26
3. Tüm gruplara ait, Johnsen skoru analizleri.....	29
4. Seminifer tübül çapı ve seminifer epitel yüksekliğinin gruplara göre değişimi.....	30
5. Deney süresince total vücut ağırlığında ve testis ağırlığında gözlenen değişiklikler..	31

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1. PARP-1 proteininin genel yapısı.....	10
2: Curcuminin moleküler yapısı.....	13
3. Kontrol grubuna ait normal morfolojik yapıdaki testis kesit görüntüsü.....	20
4. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki seminifer tübüllerin görüntüsü.....	20
5. Curcumin grubuna ait normal morfolojik yapıdaki testis kesit görüntüsü.....	21
6. Curcumin grubuna ait seminifer tübül enine kesit görüntüsü.....	21
7. Radyasyon grubuna ait testis dokusu enine kesit görüntüsü.....	23
8. Radyasyon grubuna ait testis dokusu enine kesit görüntüsü.....	23
9. Radyasyon+Curcumin grubuna ait testis dokusu enine kesit görüntüsü.....	24
10. Radyasyon+Curcumin grubuna ait testis dokusu enine kesit görüntüsü.....	24
11. Testis seminifer tübüllerine ait H-E, Masson ve PAS boya ile boyanmış kesit görüntüleri.....	25
12. Testis seminifer tübüllerinde PARP-1 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi.....	27
13. Kontrol ve deney gruplarına ait negatif kontrol görüntüleri.....	28

## 1. GİRİŞ

Radyasyon yaşamın doğal bir parçasıdır. İnsanoğlu varoluşundan bu yana sürekli olarak radyasyonla iç içe yaşamak zorunda kalmıştır. Dünyanın oluşumuyla birlikte tabiatta yerini alan çok uzun ömürlü radyoaktif elementler yaşadığımız çevrede normal ve kaçınılmaz olarak kabul edilen doğal bir radyasyon düzeyi oluşturmaktadır (1).

Radyasyonlar genellikle doğal ve yapay olmak üzere iki grupta değerlendirilir. Doğal radyasyonlar Dünya'nın kendi yapısından, Atmosfer ve Güneşin yer aldığı uzaydan gelen radyasyonlardır. İnsan yapımı araç, gereç ve sistemler aracılığıyla elde edilen radyasyon üreten kaynaklar ise yapay kaynaklar olarak tanımlanmaktadır (2). Radyasyon, madde içinde soğurulan ya da transfer edilen enerjidir. İnsanlar doğal radyasyonla sürekli etkileşim içinde olmuşlar, gelişen teknoloji ile de yapay radyasyon hayatın ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Sağlık alanında radyasyondan faydalanılarak tanı ve tedavilerde kullanılmak üzere birçok cihaz üretilmiştir. Bu gelişmeler ile birlikte, tanısal inceleme ve tedavi sırasında alınan radyasyon dozları miktarının insan sağlığı üzerindeki etkileri gündeme gelmiştir. Radyasyon, insan bedenini oluşturan tüm hücrelerle etkileşime girerek onların doğal yapılarında değişikliklere neden olmaktadır. Radyasyon, hücreyi oluşturan tüm temel elemanlarda hasara neden olur ve miktarı ne olursa olsun, insan Deoksiribonükleik asit (DNA)'sına zarar verebilir (3). İyonize radyasyon ile DNA kırıkları oluşur. Bunlar tek ve çift zincirli kırıklardır ve hücrenin direkt olarak ölmesine ya da apoptozise gitmesine neden olur ve DNA sentezini inhibe eder (4).

Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan radyasyon, radyoterapi adı altında bir tedavi yöntemi olmakla birlikte, tümöral dokuya seçici olmadığından tümör komşuluğundaki sağlıklı dokulara da hasar vermekte, akut ve geç dönemde oluşan yan etkileri yaşam kalitesini etkilemektedir. Dokularda oksidatif stres kromozomal hasarlar ve apoptozis gibi etkiler oluşturmaktadır (5).

Radyasyon somatik ve genetik etkiler yapar, somatik etkiler uygulandığı andan itibaren kendini gösterir fakat genetik etkiler gelecek nesillerde kendini göstermektedir (2).

Radyasyon tedavi amaçlı olarak kanserli vakalarda cerrahi operasyona ek olarak kullanılmaktadır. Gençlerde yaygın olarak görünen testis kanseri tedavisi de bu şekilde yürütülmektedir. Testis kanserinin radyoterapiyle tedavisi bir takım kalıcı negatif

etkilere yol açar. Çünkü radyasyonun en ağır şekilde etkilediği hücreler testislerde bulunan spermatogonyum gibi farklılaşmamış hücrelerdir. Testis kanseri tedavisinde de germ hücreleri radyoterapiden etkilenir ve bu tedavinin sonucunda ciddi bir problem olan kalıcı veya geçici infertilite ortaya çıkar. Kalıcı infertilite sadece spermatogonyumların yok olmasıyla değil farklılaşma özelliğini (spermatogenez) kaybetmesiyle de oluşabilir (6).

Spermatogenez; seminifer tübüllerin duvarında bulunan spermatogonyum hücrelerinin çoğalıp olgunlaşması ve spermatozoalara farklılaşması gibi kompleks bir organizasyondur. Spermatogonyumlar radyasyona karşı çok hassastır. 0,1 Gy radyasyonla dahi karşılaşınca hücresel tahribat meydana gelir (7).

Testis kanseri tedavisinden önce ergin hastalarda gerektiği durumlarda kullanılmak amacıyla sperm alınıp dondurulabilir; fakat, ergenlik çağına gelmemiş hastalarda bu durum mümkün değildir (8). Bu yüzden testis kanseri tedavisi sırasında oldukça hassas olunmalı ve alternatif tedaviler geliştirilmeye çalışılmalıdır.

Her bireyin isteyeceği gibi testis kanseriyle mücadele eden ergenliğe erişmemiş hastaların da ileride sağlıklı insanlar gibi bir aile kurmak ve çocuk sahibi olmak istemeleri muhtemeldir. Bu isteklerin gerçekleştirilmesi için tedavi sırasında radyasyonun yol açtığı oksidatif stresten etkilenen sağlıklı üreme hücrelerinin üzerindeki negatif etkilerin en aza indirilmesi gerekmektedir. Son yıllarda alternatif tıbbın da ilerlemesiyle birlikte antioksidanların radyasyonun etkilerini azaltması üzerine yapılan çalışmaların sayısı da artmıştır.

Radyasyonun zararlı etkilerine karşı korunmada, kimyasalların kullanımına II. Dünya Savaşı'ndan sonra başlanmıştır. Radyoterapi esnasında normal doku korunmasının kanser hücrelerinin tahribatı kadar önemli olduğunun gösterilmesiyle, korunma araştırmaları üzerine odaklanmış çalışmalar yapılmıştır (9).

Antioksidan özellik gösteren proflaktik maddelerden biride curcumindir. Curcumin; Çin ve Hindistan'da yaygın olarak yetiştirilen, Zingiberaceae familyasına ait, sarıçiçekli ve büyük yapraklı *Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından elde edilir. Aktive olmuş makrofajlardan salınan nitrik oksit, hidrojen peroksit, süperoksit radikallerini süpüren etkili bir antioksidandır. Serbest radikalleri tutma özelliğinden dolayı DNA'yı oksidatif hasardan korur. Curcuminin radyasyona karşı koruyucu etkisi yüksek antioksidan özelliğinden kaynaklanır (9, 10).

Radyasyon uygulanan dokuda ortaya çıkan DNA kırıklarının tamir mekanizması moleküler düzeyde incelendiğinde, Poli ADP Riboz Polimeraz (PARP) ailesi proteinleri

karşımıza çıkmaktadır. Poli ADP Riboz Polimeraz-1 (PARP-1) proteinlere poli ADP-riboz (PAR) grupları ekleyerek bu proteinlerin fonksiyonlarını düzenler, bu proteinler ise DNA ya bağlanır. PARP ailesinin birçok üyesi olsa da, hücrel poli ADP-ribozilasyonun %90'ı PARP-1 tarafından gerçekleştirilmektedir. PARP-1, nükleusta bol miktarda bulunan, DNA zincir kırıkları oluştuğu takdirde aktive olan ve fonksiyonel olarak DNA tamiriyle ilişkili olan bir enzimdir (11).

Çalışmamızda skrotal radyoterapiye karşı curcuminin koruyucu etkisini test etmek amacı ile histopatolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak spermatogenez ve PARP-1 ekspresyonu arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Radyasyon

Radyasyon doğal ve yapay olmak üzere iki grupta değerlendirilir. Doğal radyasyon Dünya'nın kendi yapısından, yani atmosferde, uzayda, yeryüzünde sularda, karada ve havada bulunan radyoaktif elementlerden yayılan ışınlar olarak tanımlanmaktadır. İnsan yapımı araç, gereç ve sistemler aracılığıyla elde edilen radyasyon üreten kaynaklar ise yapay radyasyon kaynakları olarak tanımlanmaktadır. Radyasyonlar kendi aralarında iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyonlar olmak üzere iki grupta incelenmektedir (2).

- a. İyonlaştırıcı radyasyon: Röntgen (X- ışını), alfa parçacıkları, beta parçacıkları, gama ışınları, kozmik ışınlar ve nötronlardır.
- b. İyonlaştırıcı olmayan radyasyon: Ultraviyole, kızılötesi, radyo dalgaları, mikrodalgalar şeklinde sınıflandırılır.

#### 2.1.1. İyonlaştırıcı Radyasyon

Madde ile etkileştiğinde elektrik yüklü parçacıklar veya iyonlar oluşturan X-ışınları ile radyoaktif maddelerden yayılan alfa, beta, gama ışınları gibi radyasyonlar iyonlaştırıcı radyasyon olarak tanımlanır (2).

Atomlardan ve moleküllerden elektron koparılmasına iyonlaşma denir. Elektromanyetik dalgalar enerji yüklü fotonlardan oluşur ve bunlar çarptıkları cisimlerden elektron kopararak iyonlaşmaya yol açabilirler. Yüksek frekanslı ve dolayısıyla yüksek enerjili olan X ışınları ve gama ışınları iyonlaştırıcı radyasyonlardır (12).

İyonize radyasyonların canlılarda biyolojik bir etkiye yol açabilmesi için sahip oldukları enerjinin, canlıyı oluşturan hücre ve dokular tarafından absorbe edilmesi ve dokularda dağılması gerekir. İyonlaştırıcı radyasyonların canlıda oluşturduğu etkileri üç basamakta sıralamak mümkündür (13).

İyonize radyasyon enerjisinin canlı dokuya transferi sonucunda, dokuyu oluşturan atom ve moleküllerde meydana gelen iyonlaşma ve uyarılma, radyasyon etkisinin ilk kademesi olan fiziksel kademeyi oluşturur. Bunu izleyen kimyasal kademedeki, hasar görmüş atom ve moleküller diğer hücresel yapılar ile reaksiyona girerek serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Organizmada radyasyonun

etkisi ile oluşan bu tür moleküler değişiklikler, son kademe olan biyolojik kademeyi başlatır. Bu kademedeki çeşitli hasarlara yol açan enzimatik reaksiyonlar meydana gelir. İyonize radyasyon, hücre içi moleküllerde ve daha önemlisi genetik materyal olan kromozomlarda hasarlar oluşturur. Mutasyon olarak bilinen bu genetik hasarlar hücre tarafından tamir edilemez ise, hücreyi ölüme götüren süreci başlatan metabolik değişiklikler meydana gelir. Bu etki nedeniyle, iyonize radyasyonlar sürekli hücre çoğalması ile kendini gösteren kanser hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır(13).

İyonize radyasyonun iki farklı şekilde etki mekanizması vardır. Bunlar doğrudan etkileme ve dolaylı etkilemedir. Doğrudan etkileme iyonlaştırıcı radyasyonun DNA ile doğrudan etkileşmesi sonucunda ortaya çıkan DNA hasarıdır. Dolaylı etkilenme ise su moleküllerinin iyonizasyonu sonucunda oluşan serbest radikallerin hücre molekülleri ile etkileşimi nedeniyle ortaya çıkan hasardır (14).

Doğrudan etkide hasar, biyolojik sistemdeki anahtar moleküllerin atomlarının iyonizasyonunun bir sonucudur. Radyasyon etki ettiği molekülün inaktivasyonuna neden olabileceği gibi fonksiyonel olarak değiştirip mutasyonuna da neden olabilir. Dolaylı etkide ise moleküllerde toksik etki oluşturan oldukça reaktif serbest radikaller ortaya çıkar. Biyolojik sistemlerdeki temel molekül su olduğu için su genellikle radikal formasyonu ve çoğalma için ortam oluşturur. Su molekülü enerjiyi absorbe edince, değerlik kabuğunda paylaşılmamış elektron olan iki serbest radikale ayrışır. Bu radikaller hidrojen ( $H^+$ ) ve hidroksil ( $OH^-$ ) dir. Bu reaktif serbest radikaller diğer moleküllerle etkileşerek iyon çifti veya radikal oluştururlar (15).

Radyasyonun insan sağlığı için getirebileceği zararlar radyasyon teknolojisinin ilk bulunduğu yıllardan beri bilinmektedir. Radyasyon, çok yüksek dozlarda ani ölümlere neden olabilmektedir. Hiroşima ve Nagazaki 'ye atılan atom bombalarına maruz kalan insanlar hala radyasyonun negatif izlerini taşımaktadırlar. Çernobil kazasından sonra Beyaz Rusya ve Ukrayna topraklarında yaşayan insanlar arasında yapılan incelemelerde başta tiroit kanseri olmak üzere birçok kanser türü insidansında yükselmeler görülmüştür. Aynı şekilde hidrojen bombası denemesi sırasında gama radyasyonuna ve radyoaktif iyodun değişik dozlarına maruz kalan şahıslarda iyi huylu tümörlere ve daha sonra da karsinoma vakalarına rastlanmıştır (16).



## 2.2. Testis Histolojisi

Testisler skrotum içinde ayrı bölümlere yerleşmiş oval şekilli organlardır. Testis yaklaşık 1 mm kalınlığında beyaz elastik fibromuskuler yapıdaki tunika albugnea ile sarıdır. Bu kapsül sıkı düzenli bağ dokusundan meydana gelmiş fibröz bir membrandır. Tunika albugneanın derin kısmında tunika vaskulosa kan damarlarından zengin ve daha gevşek bir yapı gösterir. Tunika albuginea arka kenarda, parankim içine sokulan kesidi üçgen şekilli bir kalınlaşma yapar. Bu yapı mediastinum testistir. Tunika albuginea dokusu mediastinum testis bölümünde kalınlaşır ve testisi 250 kadar lobili testise böler. Her lobülde 1 ila 4 adet, kıvrımlı yapıda, ana işlevi sperm üretimi olan seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller birkaç hücre tabakası kalınlığında epitelle döşelidir. Bu epitelin bazal hücreleri Sertoli hücreleri ve spermatogonium hücrelerinden oluşmaktadır (17).

Sertoli hücreleri spermatozoaların desteklenmesinde ve olgunlaşmasında çok önemli rol oynar. Ayrıca spermatogenetik artık ürünlerini fagosite eder ve kurduğu sıkı balantılarla kan- testis bariyerini oluşturur. Gem hücreleri ise proliferatif hücrelerdir ve spermatogenezden sorumludur. Testis kesidi mikroskop altında incelendiği takdirde değişik evrelerdeki germ hücreleri görülebilir. (18).

Seminifer tübüllerin arasındaki gevşek bağ dokusu fibrosit, histeosit, mastosit ve Leydig hücreleri gibi birçok hücre bulunur. Bunlardan Leydig hücreleri eozinofilik hücrelerdir ve testesteron salgırlar (19).

### 2.2.1. Spermatogenez

Spermatogenez spermatozoon üretim sürecidir. Süreç ilkel bir üreme hücresi olan spermatogonyum ile başlar. Cinsel olgunluk çağında spermatogonyum hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşur (20). Seminifer tübül bazal laminasına en yakın öncü germ hücreleri olan spermatogoniumlar birincil spermatositlere olgunlaşırlar. Bu işlem adölesan çağında başlar. Birincil spermatositlerin mayoz bölünmesi, içerdikleri kromozom sayısını azaltır. Bu iki basamaklı işlem sırasında önce ikincil spermatositlere, daha sonra ise 23 kromozom taşıyan spermatidlere bölünür. Spermatidlerin olgunlaşmasıyla spermatozoalar (sperm) oluşur. Tek bir spermatogonyumun bölünmesi ve olgunlaşması sırasında oluşan yavrular, geç spermatid dönemine kadar stoplazmik köprülerle birbirine bağlı olarak kalırlar. Bu durum her bir germ hücresi klonunun eş zamanlı olarak

farklılaşmasını sağlar. İnsanlarda bu düzenli spermatogenez işlemiyle öncü bir germ hücresinden olgun bir sperm oluşması ortalama 64 gün (21), sıçanlarda ise bu süreç 5 haftada gerçekleşir (5).

### **2.3. Radyasyonun Testis ve Spermatogenez Üzerindeki Etkileri**

İnsanlar dahil pek çok türde testisler, antikanser ajanlar ve radyasyon gibi sperm hücrelerini tüketen çeşitli gonadotoksinlere karşı çok hassastırlar (22). Etkin bir teratojen olan radyasyon hızla çoğalan hücreler üzerinde öldürücü etkiye sahiptir (23). Radyoterapi esnasında bir defada uygulanan 3.5- 6 Gy'lik dozun, uzun süreli ve hatta geri dönüşümsüz azospermiye yol açtığı gösterilmiştir (14). Hastaların çoğu, üreme dönemleri boyunca ve öncesinde radyoterapi aldıkları ve bazı kanser tipleri için kür sayısı fazla olduğundan, bu tedaviler nedeniyle meydana gelen sterilite oldukça önemlidir (24).

Testis tümörlerinin %60'nı oluşturan, özellikle genç erkeklerde sık görülen, direkt testislerin ışınlandığı kanser tipi olan, seminomların tedavisinde karşılaşılan infertilite olgusu oldukça ciddi bir sorun teşkil etmektedir (25).

İyonize radyasyonun, yetişkin sıçanlarda da spermatogenez serisindeki hücrelerin hasarına ve apoptozisine neden olduğu (26, 27), özellikle embriyonik dönemde alınan radyasyonun sıçanlarda gonositler üzerine etki ederek infertiliteye sebep olduğu gösterilmiştir (16). Yapılan diğer deneysel çalışmalarda da radyasyonun spermatogenez koloninin büyümesine, sperm sayısının ve testis ağırlığının değişmesine direk etki gösterdiği tespit edilmiştir (28).

Histolojik çalışmalarda ise ışınlamadan sonra testiste germinal hücre deskuamasyonu ve vakuolizasyonu ile birlikte çok çekirdekli dev hücrelerin ortaya çıktığı bildirilmiş olup, aynı zamanda ışınlamanın testisler atrofik de yol açtığı gösterilmiştir (29, 30).

Uygulanan radyasyon dozuna ve süresine göre spermatogenez serisindeki hücrelerin geri dönüşümünün olduğu, uzun süreli ve yüksek doz radyasyona maruz kalan sıçanlarda ise spermatogenez serisindeki hücrelerde geri dönüşümün çok uzun zamanda olabileceği ya da geri dönüşümün olmadığı bildirilmiştir. Radyasyonun testisteki spermatogenez hücrelere bir diğer etkisi de spermatogenez serisindeki hücrelerde, hücre ölümünü tetikleyerek haploid, diploid ve tetraploid hücre oranlarını değiştirmesidir. Bu uygulamalardan en çok spermatogenez serisindeki proliferasyon olan

hücreler ve spermatidler etkilenmektedir. Radyasyon uygulamaları sonucu haploid (spermatid ve spermatozoa) hücre sayısının düştüğü gösterilmiştir (28).

Germ hücrelerinin aksine, erişkinlerde çoğalmayan Leydig ve Sertoli hücreleri radyasyona karşı dirençli hücreler olup, çoğu sitotoksik terapi sonrasında hayatta kalır. Ancak bu hücreler fonksiyonel hasara uğrayabilirler (31, 32). Radyasyon ile oluşturulan hasar modellerinde, spermatogenik serideki hücrelerin etkilenmesinin yanı sıra Sertoli hücreleri tarafından oluşturulan kan-testis bariyerinin yapısında da bozulmalar olabileceği ileri sürülmüştür. Radyasyon uygulamalarının kan-testis bariyerindeki proteinler üzerine olan etkilerini araştıran çalışmalarda mevcuttur. Radyasyon uygulanmış sıçanlarda kan-testis bariyerinde yer alan zonula okludens 1 (ZO-1) ve okludin gibi proteinlerin azalması sonucu kan-testis bariyerinin bozulduğu bildirilmiştir. Kan testis bariyerinin bozulmasının da spermatogenik serideki hücreler üzerine etki ettiği vurgulanmıştır (33).

Gonadların almış olduğu radyasyon dozu genetik hasar yönünden oldukça önemlidir. Doz ne kadar küçük olursa olsun radyasyonun insanlarda genetik bozukluğa yol açabileceği kabul edilmektedir (25).

#### **2.4. PARP-1**

DNA hasarında DNA tamirinin ve stabilitesinin korunmasında rol oynayan PARP ailesi, Chambon, Wiel ve Mandel 'in 40 yıl önceki araştırmaları sırasında keşfedilmiştir. PARP ailesinin prototip enzimi Poly(ADP-riboz)polimeraz-1 (PARP-1) dir (34).

Özellikle DNA hasarında ortaya çıkan PARP-1 DNA nın tamirini gerçekleştirirken, yüksek miktardaki DNA hasarlarında, hasardan dolayı PARP-1 aktivasyonu tetiklenerek PARP-1 in hücredeki subsüratı olan NAD'ın hücrede tükenmesine neden olur. Bu olay gerçekleştiğinden dolayı NAD'ın tekrardan sentezlenmesi için ATP kaybı yaşanır, hücrenin enerji kaybından dolayı ise hücrenin ölümüne sebep olur (35).

Poli(ADP)riboz polimeraz aktivitesi bulunan 18 farklı PARP homologu bulunmasına rağmen en çok PARP-1 araştırılmaktadır ve poli(ADP)ribozilasyon mekanizmasının %90'ının PARP-1 tarafından yürütüldüğü bilinmektedir. PARP-1'in DNA onarımından başka diğer fonksiyonları arasında genotoksik strese dirençlilik,

genomik kararlılığın düzenlenmesi, transkripsiyonel düzenlenme, nükleer proteozomal fonksiyonun düzenlenmesi, yaşlanma gibi çok sayıda fizyolojik olay sayılabilir (36).

Poli(ADP-riboz)ilasyon reaksiyonu oksidatif hasar sonucu oluşan DNA hasarı, enflamasyon ve hücre ölümüne karşı oluşturulan hücreyel bir yanıttır. PARP ailesine ait 16 dan fazla enzim farklı DNA tamir yolaklarında bu reaksiyonu gerçekleştirmek üzere fonksiyon gösterir.

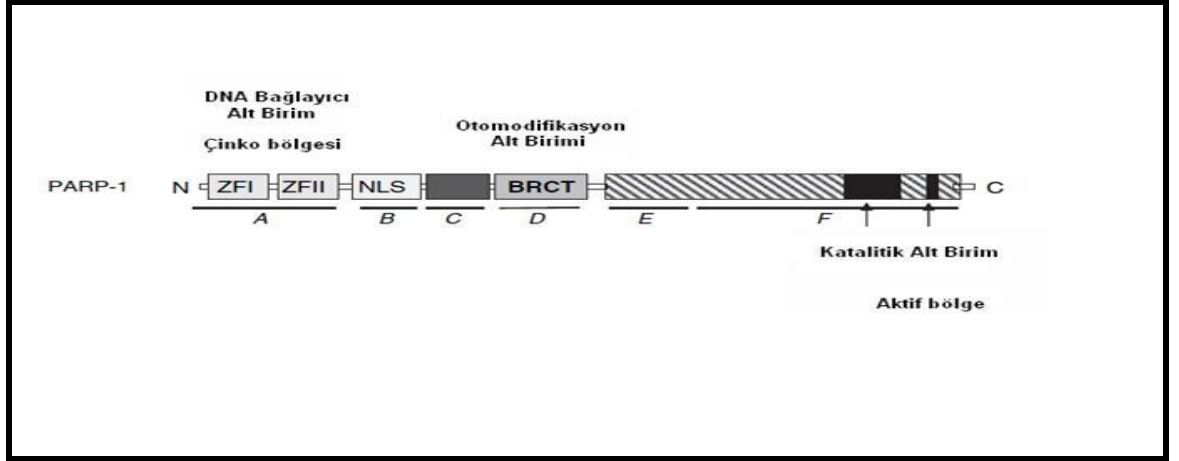
Ayrıca yapılan incelemelerde PARP-1 ve PARP-2 genleri silinmiş olan farelerin canlı olmadıkları görülmüştür. Gastrulasyonun başlangıcında ölürlere, bu durum poli ADP-ribozilasyon mekanizmasının embriyonik gelişimde oldukça kritik bir rolü olduğunu göstermektedir. Ancak, PARP-1 ve PARP-2 nin DNA da ve proteinlerde tanımlanmaya başlanan spesifik rolleri olabileceğini de düşündürmektedir (37).

Bürkle'nin araştırmalarından vardığı sonuçlara göre Poli ADP ribozilasyonun fonksiyonlarını sayacak olursak; DNA tamiri ve genomik stabilitenin korunması, transkripsiyonun düzenlenmesi, hücre içi aşırı NAD<sup>+</sup> tüketimi sonucunda nekrotik hücre ölümü ve patolojik durumlardaki rolü, sentromer fonksiyonlarının düzenlenmesi, telomer uzunluğunun düzenlenmesi, protein degradasyonunun düzenlenmesi, sentrozomal fonksiyon, endozomal vezikül alışverişinin düzenlenmesi başlıkları altında özetlenebilir (36).

PARP birçok dokuda farklı düzeyde bulunmaktadır. Özellikle testis, dalak ve timusta mRNA sınıfının yüksek düzeydeki varlığı bildirilmiştir. Li ve ark. çalışmalarında ise ilginç bir şekilde PARP-1'in fetal gonadlarda cinsiyet belirlenmesi sırasında Sertoli hücrelerinin nükleuslarında buldukları ve Cinsiyet Belirleyici Bölge Y (SRY) geninin aktivitesini düzenlemek gibi farklı bir görevi olduğu kaydedilmiştir (38).

#### **2.4.1. PARP-1 Proteininin Genel Yapısı ve Mekanizması**

Yüksek oranda korunmuş nükleer bir protein olan PARP-1'in yapısında A'dan F'ye modül olarak ayrılabilen 3 domeyn taşımaktadır (Şekil 1). Bu domeynler N Terminal ucunda bulunan 42 kDa'luk DNA bağlayıcı domeyn, C terminal ucunda bulunan 55 kDa'luk kataletik domeyn ve bu yapının merkezinde iki terminal ucun ortasında bulunan 16 kDa'luk otomodifikasyon domeynidir (36).



**Şekil 1.** PARP-1 proteininin genel yapı (36).

DNA bağlayıcı domeyn DNA kırıklarına afinite gösterir. Yapısında iki çinko parmak bulunur. İlki DNA tek ve çift zincir kırıklarına bağlanabilirken, ikincisi sadece tek zincir kırıklarında gerekli olur, çift zincir kırıklarında ihtiyaç dahilinde değildir (39).

Parp-1 in BRCA1 gibi bir genide içinde bulunduran otomodifikasyon domeyni glutamat rezidülerince zengin yapıdadır. Rezidüler poli ADP ribozilasyonun gerçekleştiği esas yerlerdir (36).

C terminal katalitik domeyni ise NAD<sup>+</sup> bağlama ADP ribozil transferi ve dallanma reaksiyonları için gerekli olan rezidüleri ihtiva etmektedir ve 55 kDa'lık dur. İyonize radyasyon, alkilleyici ajanlar, oksidanlar gibi DNA hasarını indükleyen ajanlara en hızlı yanıtı verir. DNA hasarı olmadığında poli ADP ribozilasyona çok nadir gerçekleşir fakat DNA hasarı 100 katına çıkarsa PARP aktiviteside artar. Bu durumda poli ADP ribozun ortalama %90'ı PARP-1 tarafından sentezlenir. Hücrelerde bazal düzeyde eksprese edilmekte olan PARP-1 DNA zincir kırıklarıyla aktive olarak ekspresyonu artmaktadır (36, 39).

#### **2.4.2. PARP-1 ve Spermatogenez İlişkisi**

Spermatogenezde PARP-1 etkin bir rol oynar. Spermatogenez sırasında birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasında DNA kırıkları meydana gelir. Ayrıca farklılaşan spermatidlerde kromatinin paketlenmesi sırasında DNA kırıkları ortaya çıkmaktadır. Oluşan bu kırıklar genetik farklılıkların doğru bir şekilde gerçekleşmesi için tamir edilmektedir. Dolayısı ile insan germ hücresi farklılaşmasında PARP-1 hayati bir rol oynamaktadır (40). Bu sonuçlarla PARP-1 in genomik bütünlükde de çok önemli bir

koruyucu görevi olduğunu ve mayoz bölünme sırasında DNA tamir enzimlerinin aktif rol oynadığını söyleyebiliriz.

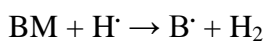
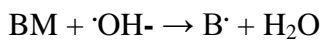
Herhangi bir ekzojenden kaynaklı DNA hasarının varlığında poli(ADP-ribozil)asyonun önemli fonksiyonların var olduğu bildirilmiştir. Spermatogenez süresince, spermatid farklılaşması, kromatin yoğunluğu histonlardan proteinlere geçişte bir kayma ile yani histon-protamin değişimi ile karakterizedir. Spermatogenezde Poli(ADP-riboz) oluşumu spermiyogenezin 11. ve 14. aşamalarında spermatidlerde DNA zincir kırıklarından dolayı oldukça yüksektir. Yapılan gözlemler özellikle uzayan spermatidlerdeki PARP-1 oranının yüksekliğini desteklemektedir (36). Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda PARP-1 geni spermatozoa da kapalıdır. Son yıllarda PARP-1 enziminin insan spermatogenesis indeksi kesin lokalizasyonu gösterilmiştir. İnsan erkek germ hücrelerinin farklılanmasında anahtar rol oynadığı belirtilmiştir (39).

## **2.5. Erkek İnfertilitesinde Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidan Savunma Sistemleri**

Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir. Serbest radikaller sadece doğal sebepler nedeniyle değil radyasyon gibi dış etkilere de dolayı da oluşurlar (41).

Canlılar % 70-90 oranında H<sub>2</sub>O içerdiğinden, ışınlandıklarında radyasyon enerjisi büyük oranda H<sub>2</sub>O moleküllerine iyonlaşır ya da molekülleri uyarır. İyonlaşma ile pozitif yüklü bir iyon ve hızlı bir serbest elektron oluşur. Bu olayı izleyen çeşitli sekonder reaksiyonlar ile farklı serbest radikaller oluşur. H<sub>2</sub>O'nun radyolizi ile oluşan OH gibi yüksek kimyasal reaktiviteye sahip serbest radikaller oluşur, organik biyolojik moleküller (BM) ile reaksiyona girerek, bunları da radikaller haline dönüştürebilirler.

Bu reaksiyonlar sonunda canlıya özgü yeni tür biyoradikaller (B-) oluşur ve DNA ile oluşturdukları bağlar ile hedef molekül olan DNA'nın bütünlüğünü bozarlar.



Bu reaksiyonların tümü, ilk kademede H<sub>2</sub>O ortamında oluşan serbest radikallerin aracılığıyla nedeniyle radyasyonun indirekt etkisi olarak adlandırılır. Kanser tedavisinde eksternal radyoterapi (RT) için kullanılan X,  $\gamma$  ve elektron ışınları gibi düşük lineer

enerji transferi yapan radyasyonların etkisi daha çok indirekt yolla,  $\alpha$  partikülleri gibi ağır partiküllerin etkisi ise yüksek lineer enerji transferli ışınlar olmaları nedeniyle, daha çok direkt yolla meydana gelir. Bu nedenle ağır parçacıklar ortamdaki O<sub>2</sub> konsantrasyonundan bağımsız olarak etkisini gösterir. Biyolojik hasarlar açısından, ister direkt ister indirekt yoldan olsun DNA hasarı en önemli hasar modelidir. Klinikte kullanılan radyasyonla oluşan hasarların büyük ölçüde indirekt yoldan olduğu kabul edilmektedir. İndirekt hasar belirtildiği üzere serbest radikaller aracılığıyla oluşur (31).

Serbest radikaller hücrelerimizdeki DNA, proteinler ve lipitlere saldırarak zarar verir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirlerse, hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücrede artış ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etki 'oksidatif stres' olarak adlandırılır (32, 42). Testislerde gözlenen radyasyona bağlı hasarların patofizyolojisinde, oksidatif stresin rolünü gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (42).

Spermatozoa tarafından reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, sperm kapasitasyonunun regülasyonu, akrozom reaksiyonunun kolaylaştırılması, sperm-oosit etkileşimi ve sinyal transdüksiyon mekanizmalarında önemli bir mediyatör olarak hizmet eden, normal fizyolojik bir süreçtir (43). Aynı zamanda serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (41). Oksidatif stres saldırısı sadece sperm plazma membranının akıcılığını etkilemez, ayrıca sperm nükleusu ve mitokondrisinde taşınan DNA'nın bütünlüğünü de etkiler (44, 45). DNA fragmantasyon oranının infertil erkeklerin ejakülatında arttığı gösterilmiştir (46). Spermatogenik olaylardaki değişiklikler, ejakülatta olgunlaşmamış anormal spermlerin atılmasına neden olmaktadır. Olgunlaşmamış sperm ise, aşırı ROS üretimine ve dolayısıyla DNA hasarına yol açmaktadır (47). Spermdeki DNA hasarının nedenini açıklamak için üç farklı teori ortaya atılmıştır. İlk olarak, hasar, spermiyogenezin geç spermatid aşamasında DNA'nın hatalı paketlenmesinin bir sonucu olabilir. Alternatif olarak DNA fregmantasyonu, serbest radikal aracılı hasardan kaynaklanabilir. Son olarak nükleer hasar apoptozisten dolayı ortaya çıkabilir (47, 48). Sperm DNA'sı normalde oksidatif

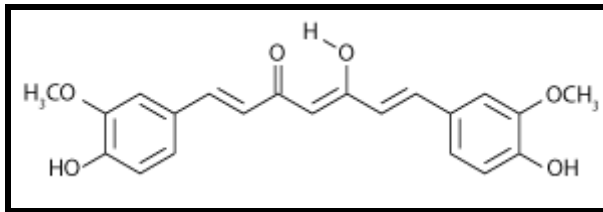
stresten iki faktör aracılığı ile korunmaktadır. Biri seminal plazmada bulunan antioksidanlar, diğeri ise DNA'nın sıkıca paketlenmiş yapısıdır (46).

Memeli hücrelerinde oksidan ürünlere karşı korunma bazı prensipler içinde gerçekleşmektedir. Oksidanların organizmadaki düzeylerini arttırıcı etkenlerin ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi ve bunlardan uzak durulması ilk yapılması gereken girişim olmalıdır. İkinci girişim ise ROS'larla tetiklenen biyokimyasal reaksiyonları bir ya da birkaç basamağında kırmaktır. Üçüncü mücadele yolu ise, oluşan mediyatörlerle aktive olan inflamatuvar hücrelerin lezyon yerine hücumunu ve orada aşırı birikimini önlemektir. Oksidan moleküllerle mücadelede üzerinde durulacak esas girişim ise belirli düzeyi aşmış oksidanlara direkt olarak etki edip onları inaktif hale getiren antioksidanlardır. İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GPx) enzimleridir. SOD'un yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx'de ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, haptoglobin, seruloplasmin, albumin, bilirubin,  $\beta$ -karoten ve  $\alpha$ -1 antitripsin sorumludur (49).

## 2.6. Curcumin

Zerdeçal (*Curcuma Longa*) , Hindistan ve Çin'de yaygın olarak bulunan Zingiberaceae ailesine ait bir bitkidir. Hindistan'da yüzyıllardır yaygın olarak baharat ve ilaç olarak kullanılmaktadır. Zerdeçal içinde doğal sarı bir pigment olan curcumin, bitkinin yumrularından elde edilir. Zerdeçal baharatının en aktif bileşeni, %2-5'ini oluşturan curcumindir.

Kaynağı *Curcuma longa* olan curcumin (E,E)-1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene 3,5,dionediferuloxylmethane kimyasal yapısında bir moleküldür (Şekil 2) (50, 51).



Şekil 2. Curcuminin moleküler yapısı (50).



Curcumin suda çözünmez, hücre membranının hidrofobik ceplerinde lokalize olur. Curcumin moleküler özellikleri nedeniyle hücrelere hızlıca penetre olmakta, plazma membranından kolayca geçerek sitozole girmektedir. Sitoplazmada biriken Curcumin çekirdeğe girmez. Lipofilik özelliklerinden dolayı plazma membranı, endoplazmik retikulum ve çekirdek kılıfı gibi membranöz yapıların içinde yoğunlaşmaktadır (52).

Hint tıbbında bir tonik ve kan temizleyici olarak kullanıma girmiş olan zerdeçal, çeşitli hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Anti-inflamatuvar ve anti-mikrobiyal ajan olarak kullanımı bilinmektedir (9). Yapılan çalışmalarda curcuminin yarayı tedavi etmede de etkili olduğu gösterilmiştir. İlave olarak curcuminin makrofaj, nötrofil ve fibroblast hücrelerinden bol miktarda difüze olduğu gözlenmiştir (53).

Günlük hayatta, çok sayıda karsinojenik kimyasallarla ve diğer karsinojenik uyarıcılarla (UV ışınları, X ışınları, virüsler, asbest v.b.) sıkça karşılaşmaktadır. Curcuminin, laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarında bu maddelere karşı profektik etki gösterdiği ve karsinogenezde inhibitör rolü oynadığı bildirilmiştir (9).

Radyasyonun zararlı etkilerine karşı korunmada, kimyasalların kullanımına II. Dünya Savaşından sonra başlanmıştır. Radyoterapi esnasında normal doku korunmasının kanser hücrelerinin tahribatı kadar önemli olduğunun anlaşılmasıyla, korunma araştırmaları üzerine odaklanmış çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, çok sayıda kimyasal bileşikler ve analogları radyoprotektif etkileri açısından araştırılmıştır. Ancak hastaların diğer ilaçlardan daha iyi bir şekilde doğal besinsel ajanları tolere edebilmelerine rağmen, bugüne kadar insanlar tarafından kullanılan besinsel ajanlar, potansiyel radyoprotektör etkileri için hak ettikleri önemi görememişlerdir. Curcuminin radyoprotektif etkisinden birden fazla mekanizma sorumludur. Radyasyon aracılı serbest radikalleri süpürme ve ışınlanmış sistemlerde curcumin ile hücresel antioksidanların yükseltilmesi bu aktiviteden sorumlu temel mekanizmalar olarak düşünülmektedir (9). Curcuminin reaktif oksijen radikallerini süpürücü etkisi mevcuttur. Yapılan çalışmalarda curcuminin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve antioksidan özellikler gösterdiği gözlenmiştir (51).

Curcuminin koruyucu etkisini göstermek amacıyla halen pek çok araştırma yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda curcuminin anti-inflamatuvar, anti-tümör, anti-oksidan, anti-iskemik, anti-artrit, anti-mutajenik ve anti-bakteriel etkileri olduğu buna karşın toksik etkisi olmadığı da belirtilmiştir (54, 55, 56).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanı

Çalışmamızda Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, 2,5-3 aylık, ağırlıkları 200-300 g arasında değişen 40 adet erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip erkek deneklerden, vücut ağırlıkları birbirine yakın olanlar aynı grupta olacak şekilde; biri kontrol 3'ü deney grubu olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Tüm denekler, deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşulları ( $22\pm 1$  °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle beslendi.

#### 3.2. Radyasyon Uygulaması

Radyasyon hasarı oluşturmak amacıyla Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, kontrol grubu ve curcumin grubu hariç diğer gruplardaki her bir denek, intraperitoneal (i.p.) yoldan 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/Türkiye), 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye) ile anestezi sağlandıktan sonra supin (sırt üstü) pozisyonunda sabitlendi. Linear akseleratör cihazı kullanılarak, iki testisi içeren skrotal bölge 5x5 cm ebadında bir alan şeklinde simüle edildi. Doz hesaplamaları yapılarak skrotal bölgeye tek fraksiyonda 6 Gy X ışını uygulandı. Radyasyon hasarını azaltmak amacı ile IV. grup deneklere; ışınlamadan 1 hafta önce başlayarak, haftada 3 kez olmak üzere, toplam 7 hafta boyunca oral yoldan 100 mg/kg curcumin verildi.

#### 3.3. Deney Grupları

**I. Grup (n=10):** Işınlanmayan ve haftada 3 kez olmak üzere, toplam 7 hafta boyunca oral yoldan plasebo çesme suyu uygulanan kontrol grubu.

**II. Grup (n=10):** Işınlanmayan ve haftada 3 kez olmak üzere, toplam 7 hafta boyunca oral yoldan 100 mg/kg curcumin uygulanan curcumin grubu.

**III. Grup (n=10):** Testisleri 6 Gy X ışını alan ve ışınlamadan 1 hafta önce başlayarak haftada 3 kez olmak üzere toplam 7 hafta boyunca oral yoldan plasebo çesme suyu uygulanan radyasyon grubu.

**IV. Grup (n=10):** Testisleri 6 Gy X ışını alan ve ışınlamadan 1 hafta önce başlayarak haftada 3 kez olmak üzere toplam 7 hafta boyunca oral yoldan 100 mg/kg curcumin uygulanan radyasyon + curcumin grubu.

Işınlamadan 6 hafta sonra, ketamin-xylazin anestezisi altında tüm denekler sakrifiye edildi. Deney süresi boyunca ağırlık takibi yapılan deneklerin, deney sonunda testis ağırlıkları da ölçülerek, her bir grup için ortalama testis ağırlığı (g)/100 g vücut ağırlığı hesaplandı.

### **3.4. Histopatolojik ve Histomorfometrik Analizler**

Işık mikroskopik incelemeler için, her deneğin testis dokusu B. E. Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Işık Mikroskopi Laboratuvar'ında formol fiksatöründe fikse edilip, parafin inklüzyonu yapılarak bloklandı. Bu bloklardan alınacak 5µm kalınlığındaki kesitlere, testisin histolojik yapı özelliklerini ortaya koyacak Hematoksilen-Eozin (H-E), Periodik asit-Schiff (PAS) ve Masson boyaları uygulandı. Işık mikroskopunda bulguların fotoğrafları çekildi.

Testislerde seminifer tübül çapı ve seminifer epitel yüksekliği ölçüldü. Ölçümler, her denek için 3 testis kesitinde ve her kesitten yuvarlak veya yuvarlağa yakın 10 tübülün enine kesiti üzerinde toplam 30 tübül değerlendirilerek yapıldı (57).

### **3.5. Johnsen Skoru ile Spermatogenezin Değerlendirilmesi**

Testiste seminifer tübül duvarında spermatogenezin değerlendirilmesi Johnsen kriterlerine göre yapıldı (Tablo 1). Bu puanlama sistemine göre incelenecek olan seminifer tübül kesitlerine verilecek puanların toplamı, sayılan tübül sayısına bölünerek ortalama puan hesaplandı (58).

**Tablo 1.** Johnsen skoru kriterleri (58).

<b>Johnsen Skoru</b>	<b>Johnsen Kriterleri</b>
10	Germ epiteli çok tabakalı, açık santral lümen, çok miktarda spermatozoa.
09	Germ epiteli çok tabakalı ancak disorganize, lümendeki epitel hücreleri spermatozoalarla karışmış.
08	Germ epiteli çok tabakalı, lümeninde 10'dan daha az spermatozoa.
07	Çok miktarda spermatid, ancak hiç spermatozoa yok.
06	Hiç spermatozoon yok, spermatid sayısı 10'dan daha az.
05	Bir kaç tane spermatosit, spermatid veya spermatozoa yok.
04	Spermatozoa ve spermatid hiç yok, spermatosit sayısı 5'den az.
03	Sadece bir kaç spermatogonyum.
02	Bir kaç Sertoli hücresi, germ hücresi hiç yok.
01	Seminifer tübülde hiç hücre yok.

### **3.6. İmmünohistokimyasal Analiz**

Radyasyona bağlı ortaya çıkan DNA hasarının göstergesi olarak testis dokusunda DNA onarıcı bir enzim olan PARP-1 ekspresyonu immünohistokimyasal yöntem ile gösterildi.

İmmünohistokimyasal boyamalar için parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler, polilizin kaplı lamlara alındı. Deparafinizasyon işlemi için etüve alınan kesitler bu işlemin akabinde 15'er dakikalık iki ksilol banyosundan geçirildi. Hidratasyon için, 5'er dakika süre ile %100, 96%, 90%, 70%' lik alkol serilerinden geçirilen kesitler, distile suya alındı. Daha sonra fosfat tamponu solüsyonu (PBS; pH 7.6) ile (3X5 dk) yıkandı. Antijenik bağlanma bölgelerinin açığa çıkarılması amacı ile kesitler sitrat tamponuna (pH: 6.0) alındı ve mikrodalga fırında 5 dakika kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, distile su ve PBS' den geçirildi. Nemli kabine alınan kesitler endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla % 3'lük hidrojen peroksit ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Distile sudan geçirilen kesitler PBS ile yıkandı. Spesifik olmayan antikor bağlanmalarını

bloklamak üzere kesitlere %1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) uygulandı. Daha sonra kesitler nemli kabin içinde 1/100 oranında dilüe edilmiş primer antikor (Rabbit polyclonal IgG PARP-1, Kat. No. Ab6079, Abcam, USA) ile 1 saat inkübe edildi. Ardından PBS de (3X5 dk) yıkandı. Nemli kabine yerleştirilen kesitler 30 dk sekonder antikor (Dako Biotinylated Link, K0609) ile muamele edildi. Bu işlemin hemen ardından PBS'le (3X5 dk) yıkayıp streptavidin (Streptavidin HRP, Dako, K0609) damlatılıp 10 dakika inkübe edildi. Bu uygulamadan sonra da PBS ile (3X5 dk) yıkama yapıldı. Nemli kabindeki kesitlere kromojen damlatıldı [3',3-diaminobenzidine (DAB), Vector, SK-4100]. Mikroskop başında boyanma kontrolü sağlandıktan sonra (3 dk), kromojen reaksiyonunu kesmek için kesitler distile suya alındı. Yıkamanın ardından 30 sn Mayer'in Hematoksilen'i (Bio-optica, 0506002/L) ile zıt boyama yapıldı. Akarsuda 5 dk yıkanan kesitler balsam kullanılarak (Merk) lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda semikantitatif olarak histolojik skorlama (H-skor) yapılarak değerlendirildi.

### **3.7. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel değerlendirme SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler Medyan (Q1-Q3) olarak ifade edildi. Dört grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis varyans analizinde alt grupların ikişerli karşılaştırılması ise Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Tekrarlı ölçümlerin değerlendirilmesinde ise Friedman testinden faydalanıldı. Alt grupların ikişerli karşılaştırılması Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon testi ile yapıldı. Sonuçlar % 95 güven aralığında değerlendirildi ve  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Kontrol ve deney gruplarından alınan testis biyopsilerinde, parenkim ve stromal yapılar, morfolojik, immünohistokimyasal, morfometrik ve histopatolojik skorlama yöntemleri kullanılarak ışık mikroskopik düzeyde kıyaslanarak incelendi.

### 4.1. Kontrol ve Curcumin Grubuna Ait Genel Morfolojik Bulgular

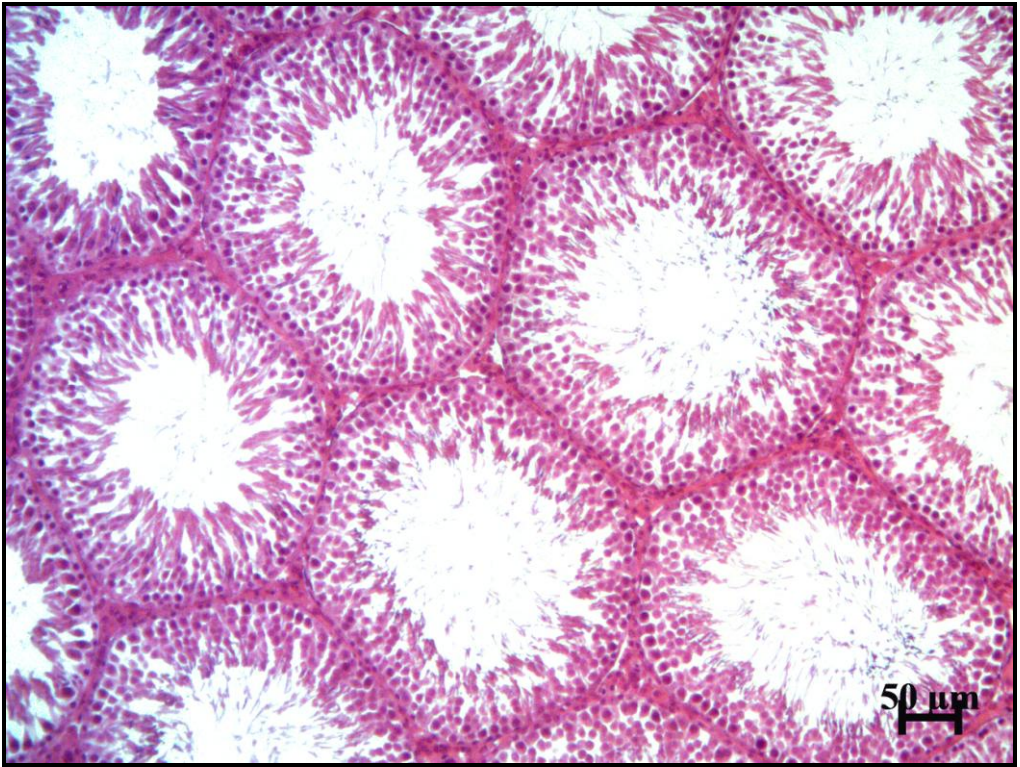
Kontrol ve Curcumin grubu deneklere ait, testis seminifer tübüllerinin ışık mikroskopik incelemesinde, çok sıralı bir epitel tabakası ile döşeli olduğu gözlemlendi. Seminifer tübül epitelinin, spermatogenetik hücre serileri ile Sertoli hücrelerinden oluştuğu görüldü. Sertoli hücreleri soluk boyanan, karakteristik nükleus şekilleri (piramit, armut, üçgen veya oval) ile ayırd edilmekteydi. Bazal lamina üzerine oturan Sertoli hücrelerinin lateral katlantıları arasına yerleşik çok sayıda normal morfolojide, spermatogenetik seri hücreleri bulunmakta idi. Oval biçimli nükleusa sahip spermatogonyumlar bazal laminaya yakın olarak izlendi. Primer spermatositler, spermatogonyumların hemen üzerinde, 4n DNA'ya sahip olmaları nedeniyle daha büyük hacimli nükleusları ile ayırd edildiler. Gelişme evrelerine bağlı olarak sekonder spermatosit ve spermatidlerin daha üst sıralarda yer aldığı görüldü. Bunlar; nükleusun üzerine oturmuş kep şeklinde PAS pozitif akrozom yapısıyla erken spermatidler ile lümeneye uzanan iplik tarzında kuyrukları ve koyu uzun başlarıyla spermatozoalara dönüşecek olan geç spermatidler şeklinde ayırt edildi (Şekil 11-c, f). Pek çok seminifer tübül lümeninde spermatozoalara rastlandı (Şekil 3, 4, 5, 6).

Seminifer tübül epitelinin en dıştan tunika propriya ile sarıldığı görüldü. Miyoid hücreler, tunika propriyanın ortasında, bu dokuya paralel uzanan koyu boyanmış iğ şeklindeki uzun nükleusları ile ayırd edildi (Şekil 11-b, e).

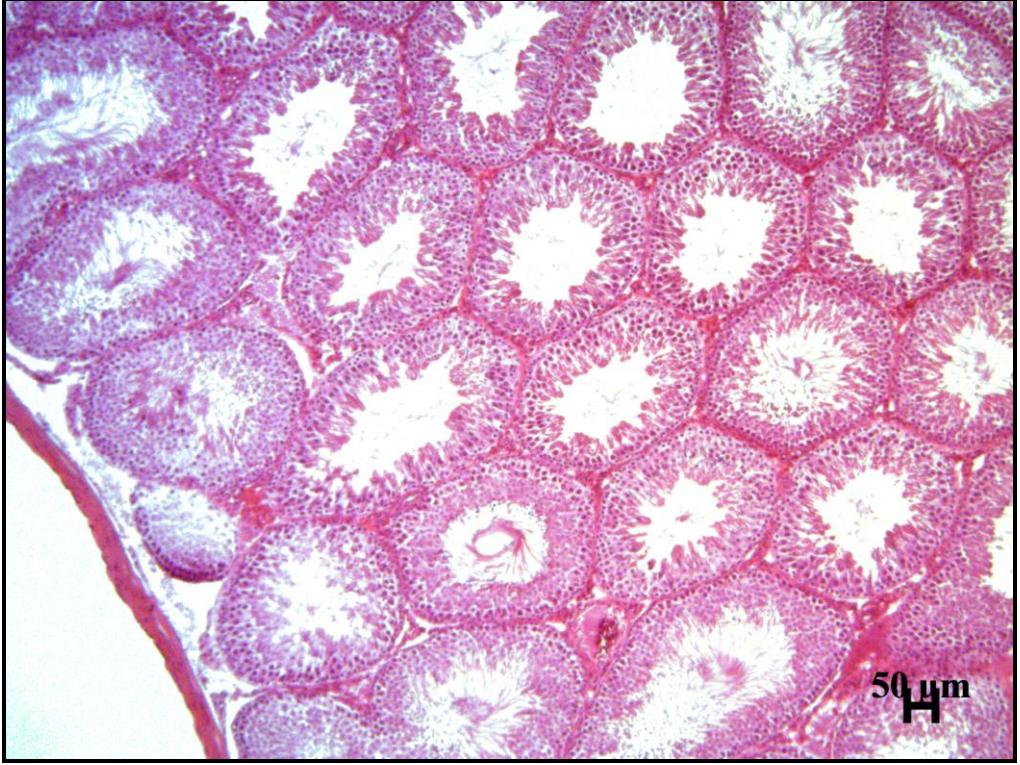
Seminifer tübüller arasındaki interstisyel dokuda; kan damarları etrafında yerleşik, gevşek kromatinli nükleusa sahip, oval ya da yuvarlak şekilli, Leydig hücreleri ile lenf kapillerleri ve bağ doku hücreleri gözlemlendi (Şekil 11-b, e).



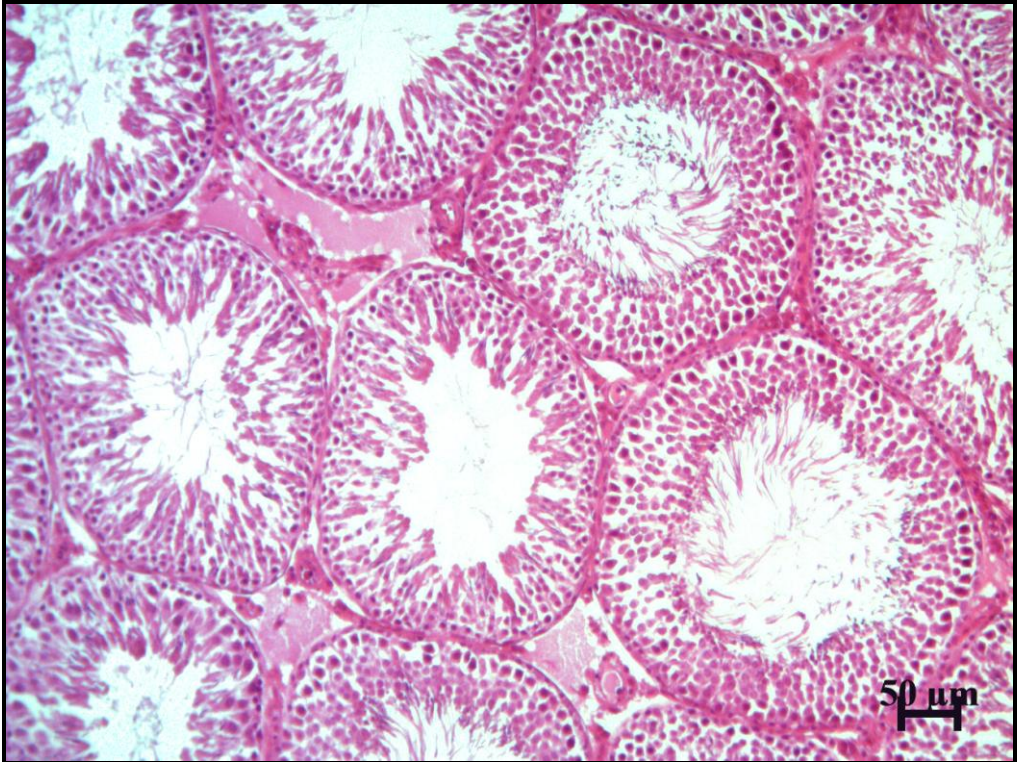
**Şekil 3.** Kontrol grubuna ait normal morfolojik yapıdaki testis kesit görüntüsü. Spermatogenezin farklı aşamalarında, düzgün kontürdeki seminifer tübüller ve düzenli yerleşimli spermatogenetik seri hücreleri izlenmekte. Tübüller arasındaki, interstisyel bağ dokusu normal yapı özellikleri göstermekte. H-E.



**Şekil 4.** Kontrol grubuna ait normal dağılım gösteren germinal hücrelerin yer aldığı, düzenli sınırlara sahip seminifer tübüller ile aralarındaki interstisyel bağ dokusu izlenmekte. H-E.



**Şekil 5.** Curcumin grubuna ait normal morfolojik yapıdaki testis kesit görüntüsü. Spermatogenezin farklı aşamalarındaki seminifer tübüller izlenmekte. H-E.



**Şekil 6.** Curcumin grubuna ait seminifer tübül enine kesitlerinde; lümenleri spermatozoalar ile dolu gözlenen seminifer tübüller dikkat çekmekte. H-E.



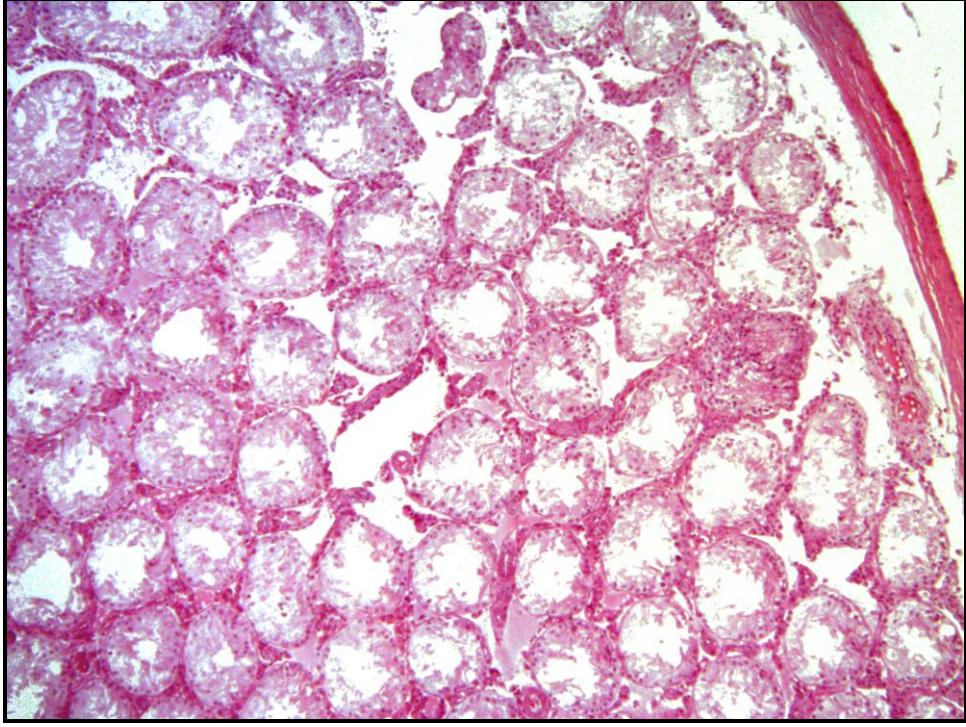
#### 4.2. Radyasyon ve Radyasyon+Curcumin Grubuna Ait Genel Morfolojik Bulgular

İyonize radyasyonun, 6 Gy X ışını uygulamasıyla 6 hafta sonra sıçan testis seminifer tübüleri ve interstisyum üzerine olan etkileri değerlendirildi.

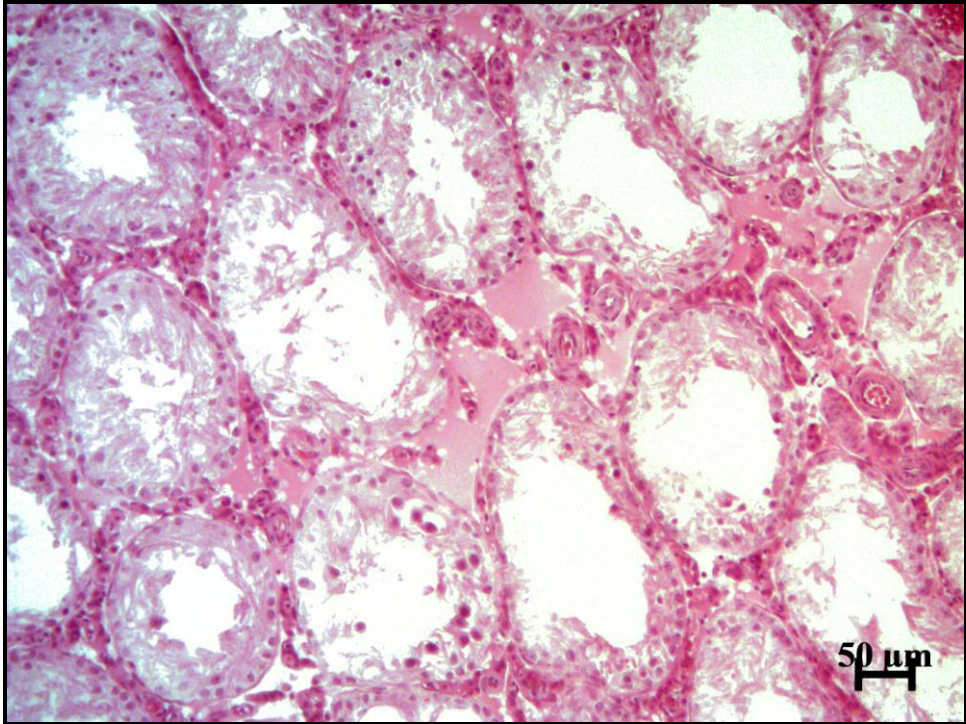
Işınlamaya bağlı olarak ortaya çıkan hasar, ışık mikroskopik incelemede tübül çaplarında küçülme ve tübüler dejenerasyondaki artış ile açıkça gözlenmekte idi. Tübüler vakuolizasyonun sayısı ve vakuollerin büyüklüğü oldukça fazlaydı. Ayrıca, tübüllerde yer yer çok nükleuslu dev hücrelere rastlandı. Tübülerde germ hücrelerinin çoğunun ortadan kaybolduğu, sadece birkaç spermatogonyum ile çok sayıda Sertoli hücresi içerdikleri görüldü. Sertoli hücrelerinin nükleus şekillerinin düzensizleştiği ve zaman zaman bazal membrandan uzakta, tübül lümenine doğru yerleştikleri dikkati çekti. Tübüllerin bir kısmının şeklinin bozulduğu, bazı tübüllerin ise büzüşmeleri sonucu etraflarındaki interstisyel dokudan ayrıldığı saptandı. Tübüllerin etrafındaki bazal laminadaki kalınlaşmanın şiddeti PAS pozitifitedeki artış ile tespit edildi (Şekil 11-i). İnterstisyel sahada gözlenen hücre yoğunluğunda ve vaskülarizasyonda artış ile peritübüler hyalinizasyonun şiddeti dikkat çekici boyutta idi (Şekil 7, 8).

Curcumin tedavisinin, 6 Gy X ışını uygulamasıyla 6 hafta sonra seminifer tübül epiteline ve interstisyumda oluşturulan hasarları önlemedeki etkisi değerlendirildi.

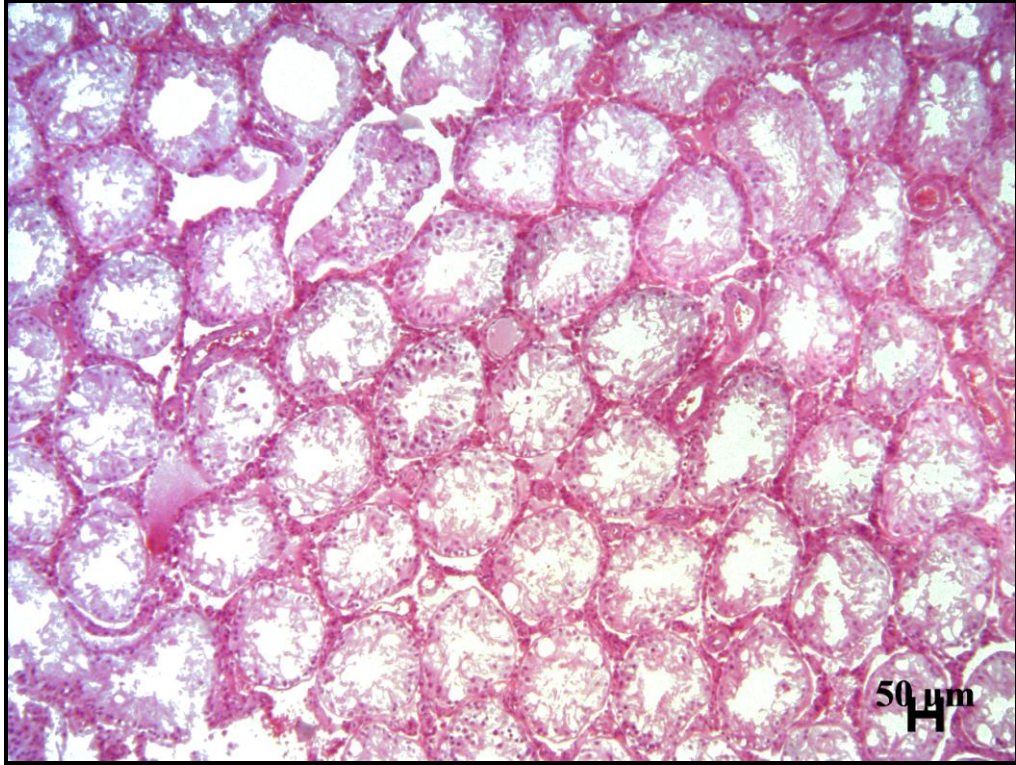
Işınlamadan 6 hafta sonra curcumin tedavili grubun ışık mikroskopik incelemelerinde ilk göze çarpan seminifer tübüllerde germinal hücre yoğunluğunda az da olsa bir artış olduğu idi. Seminifer tübüllerin büyük bir kısmı Sertoli hücreleri ve çok az sayıda hayatta kalan spermatogonyumları içermekteydi. Sadece bazı tübüllerde hafif bir yenilenme belirtilerinin olduğu gözlemlendi. Bu tübüller, içerdikleri spermatogonyum ve spermatozoid kolonileri ile fark edildi. Tübüllerin çoğu büzüşme sonucu interstisyumdan ayrılmış olarak izlendi. (Şekil 9, 10). Dejeneratif ve rejeneratif tübüllerin kalınlaşmış bazal lamina ile çevrili oldukları, kuvvetli PAS pozitif görünümleri ile dikkat çekti (Şekil 11-1). İnterstisyel sahada yoğunluk ve vaskülarizasyon artışı bu grupta da gözlemlendi (Şekil 11-k).



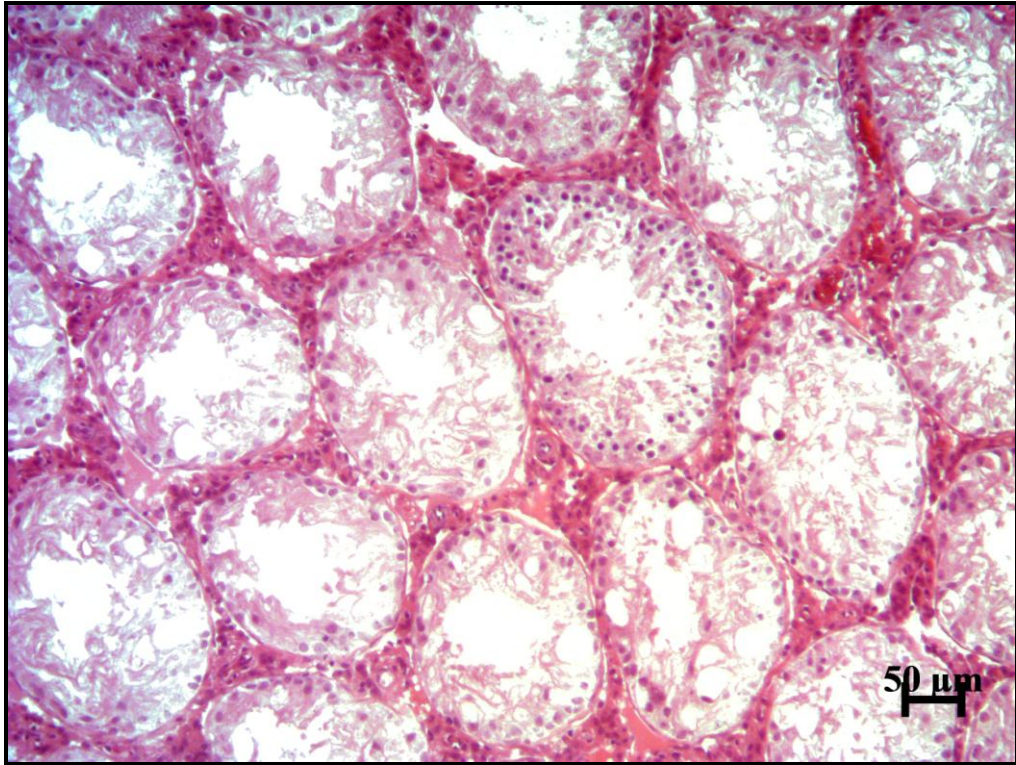
**Şekil 7.** Radyasyon grubuna ait testis dokusu enine kesitinde; seminifer tübüleri döşeyen germinal epitelde ciddi hücre kaybı olduğu, ilaveten interstisyumda selülaritede ve vaskülarizasyonda artışa peritübüler hyalinizasyonun da eşlik ettiği görülmekte. H-E.



**Şekil 8.** Radyasyon grubuna ait testis dokusu enine kesitinde; germinal epitelde vakuolizasyon, çok belirgin hücre kaybı, interstisyumda hücre yoğunluğunda ve vaskülarizasyonda artış ile peritübüler hyalinizasyon dikkati çekmekte. H-E.

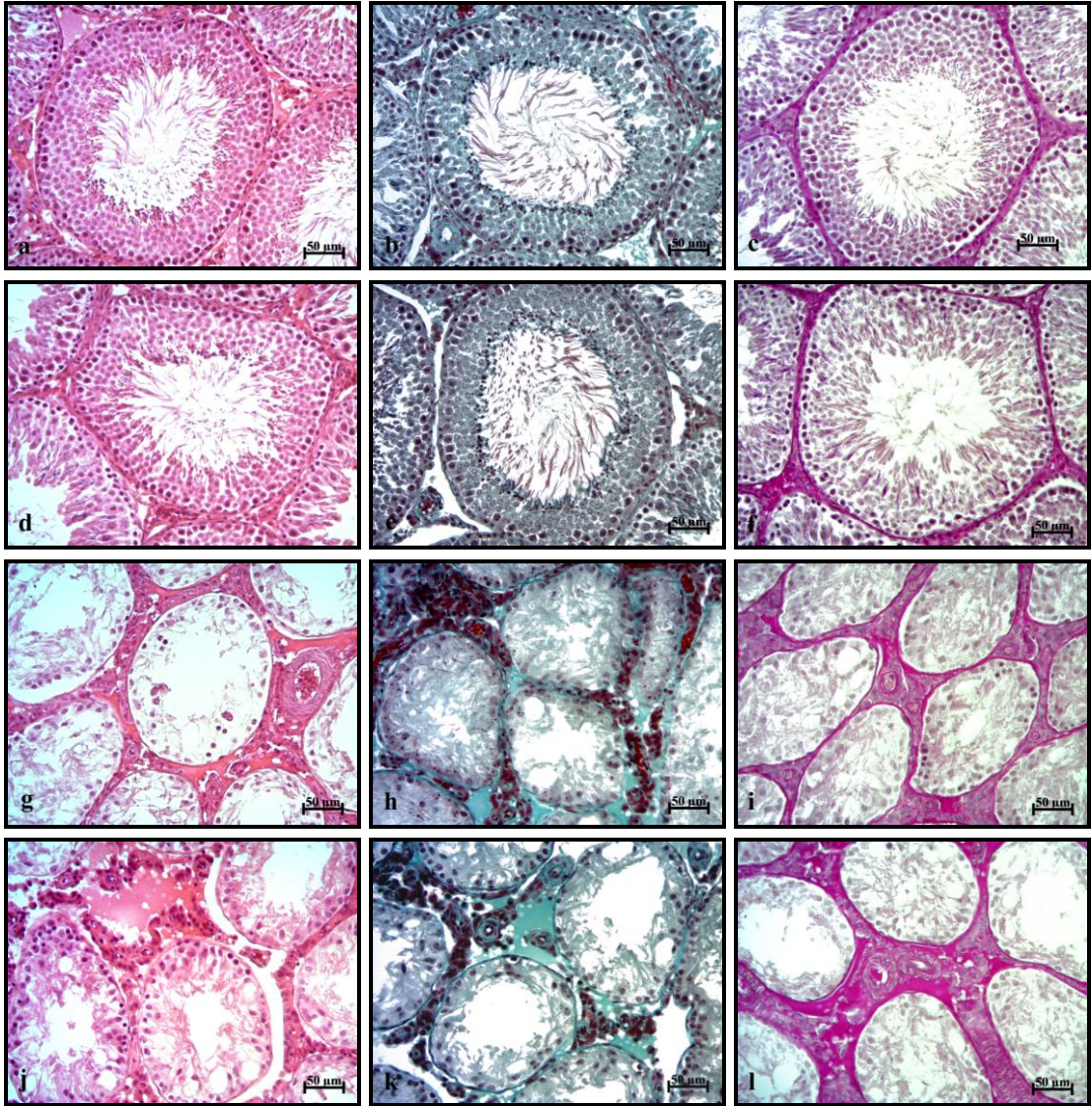


**Şekil 9.** Radyasyon+Curcumin grubuna ait testis dokusu enine kesitinde; tübüllerin çoğunda belirgin hücre kaybı olsa da bazı tübüllerde dikkati çeken hüresel yoğunluk, yenilenen tübüllere işaret etmektedir. H-E.



**Şekil 10.** Radyasyon+Curcumin grubuna ait testis dokusu enine kesitinde; tübüler dejenerasyon, yenilenen tübüller ve interstisyumda hücre yoğunluğunda ve vaskülarizasyonda artış dikkati çekmekte. H-E.

### 4.3. Tüm Grupların Işık Mikroskopik Bulgularının Karşılaştırılması



**Şekil 11.** Testis seminifer tübüllerine ait H-E (a, d, g, j), Masson (b, e, h, k) ve PAS (c, f, i, l) boyaları ile boyanmış preparatlardan elde edilen mikrograflar. (a-c) Kontrol grubuna ait sıçan testisi; çok katlı kübik epitel görünümünde, lümeni spermatozoalar ile dolu normal morfolojide, seminifer tübül ve etrafındaki interstisyum izlenmekte. (d-f) Curcumin grubuna ait sıçan testisi; normal morfolojik yapı özellikleri segileyen seminifer tübül ve interstisyum görülmekte. (g-i) Radyasyon grubuna ait sıçan testisi (ışınlamadan sonraki 6. hafta); seminifer tübül çaplarında ve seminifer epitel yüksekliğinde ciddi azalma, germinal epitelde vakuolizasyon, çok belirgin hücre kaybı, tübüllerde sadece birkaç spermatogonyum ile çok sayıda Sertoli hücrelerinin varlığı, tübüllerin etrafındaki bazal laminada kalınlaşma, interstisyel sahada hücre yoğunluğunda ve vaskülarizasyonda artış ile peritübüler hyalinizasyonun şiddeti dikkat çekici boyutta izlenmekte. (j-l) Radyasyon+Curcumin grubuna ait sıçan testisi (ışınlamadan sonraki 6. hafta); seminifer tübüllerin çoğunda Sertoli hücreleriyle birlikte az sayıda hayatta kalan spermatogonyumlar görülse de yer yer bazı tübüllerde artan hücre sayıları ile dikkati çeken hafif yenilenme belirtilerinin olduğu seminifer tübüller dikkati çekmekte. Tübüler bazal lamina kalınlaşması, interstisyumda hücre yoğunluğunda ve vaskülarizasyonda artış ile peritübüler hyalinizasyon bu grupta da izlenmekte. Bar: 50 µm.

#### 4.4. Kontrol ve Deney Gruplarında PARP-1 İmmünreaktivitesinin Değerlendirilmesi

Tüm deneklerin testis dokusunda, immünohistokimyasal yöntem ile PARP-1 ekspresyonu değerlendirildiğinde; özellikle seminifer tübüllerde yer alan spermatogenetik seri hücrelerinde farklı boyanma şiddetlerinde (zayıf-orta-kuvvetli) PARP-1'in ifade edildiğini gözlemledik. İnterstisyumda ise PARP-1 ekspresyonuna neredeyse hiç rastlamadık (Şekil. 12). Normal tavşan İmmünglobulin-G serumu ile muamele edilmiş sıçan testis kesitleri de negative kontrol olarak boyandı (Şekil. 13).

Morfolojik bulgularımızı, histolojik skorlama (H-skor) yöntemi ile semikantitatif verilere dönüştürerek, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup olmadığını analiz ettik. Histolojik skorlamayı, tübüllerde yer alan rast gele belirlenen 100 spermatogonyumun PARP-1 immünoreaktivite şiddetini değerlendirerek gerçekleştirdik (zayıf:1, orta:2, kuvvetli:3). Radyasyona karşı çok duyarlı hücreler olmaları nedeniyle, histolojik skorlamada yalnızca spermatogonyumları değerlendirdik. İkili kıyaslamalarda, Kontrol ve Curcumin grubu arasında, Radyasyon ve Radyasyon+Curcumin grubu arasında H-skorun anlamlı bir farklılık göstermediğini tespit ettik. Radyasyon uygulanan gruplar ile diğer gruplar kıyaslandığında, radyasyona bağlı olarak H-skorun anlamlı ( $p<0.001$ ) düzeyde artmış olduğunu gözlemledik. (Tablo 2).

**Tablo 2.** PARP-1 immünoreaktivitesi için histolojik skor değerleri.

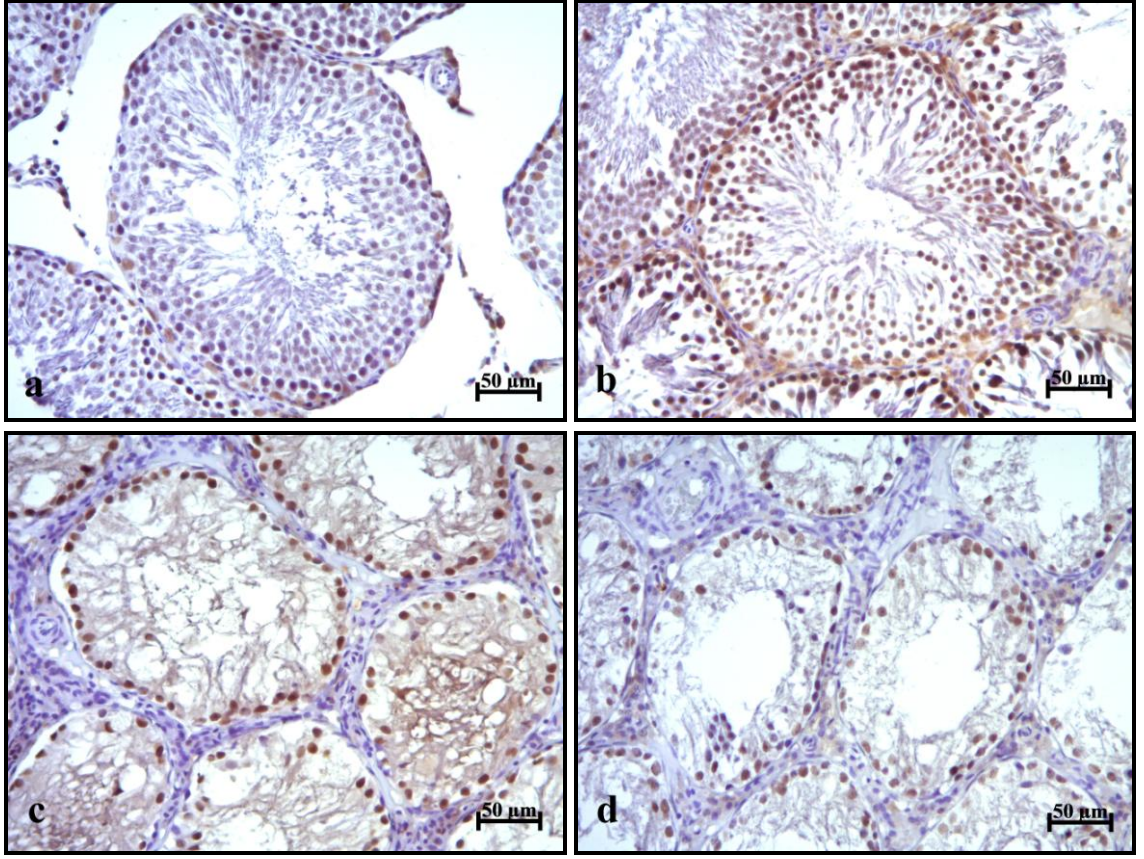
	<b>Kontrol</b> n=6	<b>Curcumin</b> n=6	<b>Radyasyon</b> n=6	<b>Radyasyon+Curcumin</b> n=6
<b>PARP-1 için H-Skor</b>	254.50 (243.75-262.75)	263.50 (259.25-268.50)	285.50 (276.75-292.00) <sup>a</sup>	279.00 (276.50-281.75) <sup>a</sup>

Veriler ortanca (25-75 persantil) olarak sunulmuştur.

$p<0.05$  olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

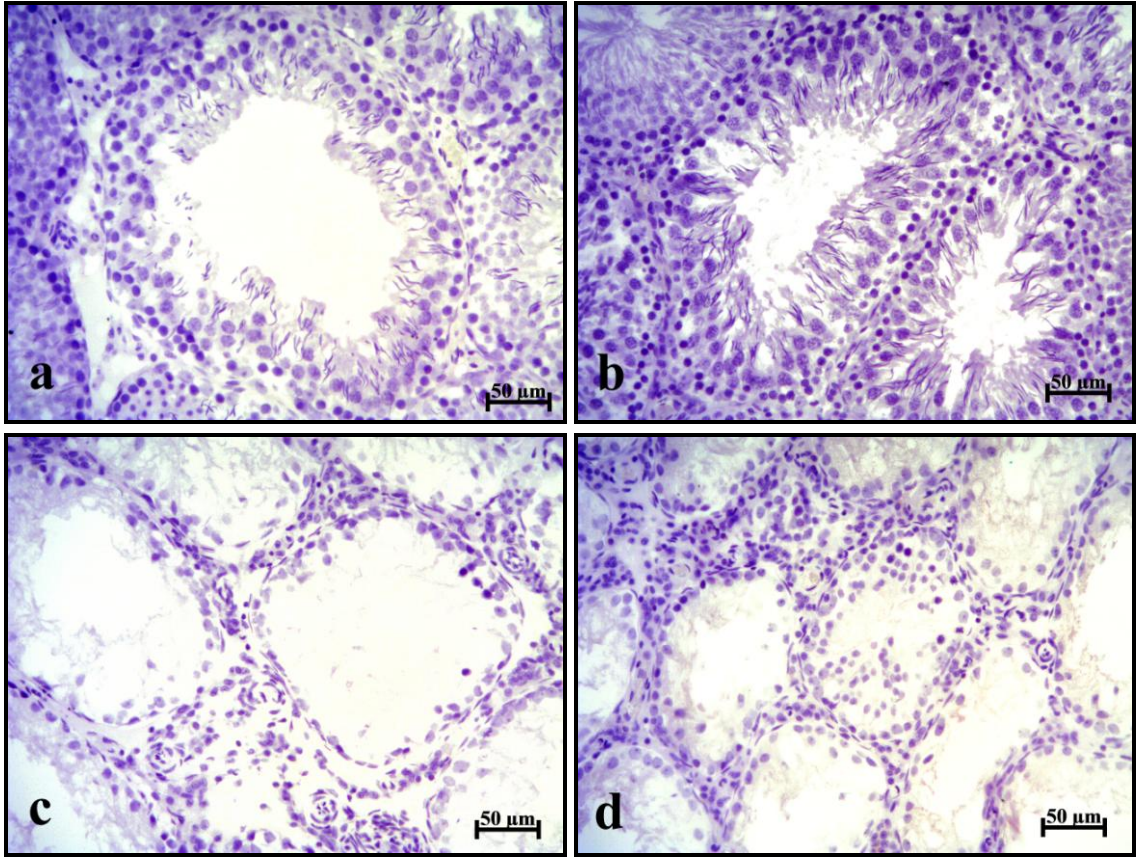
<sup>a</sup> $p<0.001$  Kontrol ve Curcumin grubu ile kıyaslandığında.

#### 4.5. Tüm Gruplarda PARP-1 İmmünreaktivitesinin Karşılaştırılması



**Şekil 12.** Testis seminifer tübüllerinde PARP-1 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ifadesi. (a) Kontrol grubu. (b) Curcumin grubu. (c) Radyasyon grubu. (d) Radyasyon+Curcumin grubu. Bar: 50 µm.

#### 4.6. Tüm Gruplara Ait Negatif Kontrol Görüntüleri



**Şekil 13.** Kontrol ve deney gruplarına ait negatif kontrol görüntüleri. Normal tavşan Immünglobulin-G serumu ile muamele edilmiş sıçan testis kesitleri izlenmekte. (a) Kontrol grubu. (b) Curcumin grubu. (c) Radyasyon grubu. (d) Radyasyon+Curcumin grubu. Bar: 50 µm.

#### 4.7. Kontrol ve Deney Gruplarında Spermatogenezin Johnsen Skoru ile Değerlendirilmesi

Testiste radyasyona bağlı olarak, seminifer tübül duvarında spermatogenezde meydana gelen değişiklikleri ve curcuminin profilaktik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilecek muhtemel iyileşmeyi değerlendirmek için H-E ile boyanmış testis preparatları üzerinde, Johnsen kriterlerine göre semikantitatif olarak bir skorlama yaptık. İstatistiksel analizler neticesinde, ikili kıyaslamalarda, Kontrol ve Curcumin grubu arasında, Radyasyon ve Radyasyon+Curcumin grubu arasında Johnsen skorunun anlamlı bir farklılık göstermediğini tespit ettik. Radyasyon uygulanan gruplar ile diğer gruplar kıyaslandığında, radyasyona bağlı olarak Johnsen skorunun anlamlı düzeyde ( $p<0.001$ ) azalmış olduğunu gözlemledik. (Tablo 3).

**Tablo 3.** Tüm gruplara ait, Johnsen skor analizleri.

	Kontrol n=10	Curcumin n=9	Radyasyon n=9	Radyasyon+Curcumin n=9
<b>Johnsen Skoru</b>	9.8 (9.70-9.83)	9.8 (9.65-9.90)	4.9 (4.80-5.15) <sup>a</sup>	5.1(5.00-5.15) <sup>a</sup>

Veriler ortanca (25-75 persantil) olarak sunulmuştur.

$p<0.05$  olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

<sup>a</sup> $p<0.001$  Kontrol ve Curcumin grubu ile kıyaslandığında.



#### 4.8. Seminifer Tübüllerin Morfometrik Olarak Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda seminifer tübül çapları ve seminifer epitel yükseklikleri ölçülerek, istatistiksel olarak analiz edildiğinde; radyasyona bağlı olarak seminifer tübül çaplarının çok çarpıcı bir şekilde azaldığını, yine epitelin de çok ciddi düzeyde incelendiğini tespit ettik. İkili kıyaslamalarda hem epitel yüksekliği, hem de seminifer tübül çapı açısından, Kontrol ve Curcumin grubu arasında, Radyasyon ve Radyasyon+Curcumin grubu arasında anlamlı bir farklılık olmadığını gözlemledik. Radyasyon uygulanan gruplar ile diğer gruplar kıyaslandığında, radyasyona bağlı olarak seminifer epitel yüksekliğinde ve çapında anlamlı düzeyde ( $p<0.001$ ) azalma olduğunu saptadık. (Tablo 4).

**Tablo 4.** Seminifer tübül çapı ve seminifer epitel yüksekliğinin gruplara göre değişimi.

	<b>Kontrol</b> <b>n=10</b>	<b>Curcumin</b> <b>n=9</b>	<b>Radyasyon</b> <b>n=9</b>	<b>Radyasyon+Curcumin</b> <b>n=9</b>
<b>Seminifer tübül çapı (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	314.05 (300.2-317.6)	317.60 (303.0-324.2)	192.40 (181.8-209.8) <sup>a</sup>	194.80 (180.1-215.6) <sup>a</sup>
<b>Seminifer epitel yüksekliği (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	77.25 (70.7-82.6)	78.00 (72.9-83.3)	55.80 (49.7-59.6) <sup>b</sup>	55.20 (52.7-63.5) <sup>b</sup>

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur.

$p<0.05$  olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

<sup>a</sup> $p<0.001$  Kontrol ve Curcumin grubu ile kıyaslandığında.

<sup>b</sup> $p<0.001$  Kontrol ve Curcumin grubu ile kıyaslandığında.

#### 4.9. Deneklerin Total Vücut Ağırlığında ve Testis Ağırlığında Meydana Gelen Değişiklikler

Deneyin başlangıcında, radyasyon uygulamasından 24 saat sonra ve sakrifikasyondan hemen önce tartılan deneklerin ağırlıkları istatistiksel olarak analiz edildiğinde, tüm gruplarda kendi içinde 3 farklı zaman diliminde ölçülen ağırlıkların anlamlı düzeyde farklılık gösterdiğini saptadık ( $p<0.001$ ). İkili kıyaslamalarda kontrol ve curcumin grubunun, radyasyon ile de radyasyon+curcumin grubunun ağırlıklarının benzer olduğunu tespit ettik. Skrotal uygulanan radyasyona bağlı olarak deneklerin total ağırlığında herhangi bir azalma olmadığı, buna keza, genç erişkin olan deneklerin 7 haftalık deney süresi boyunca ağırlıklarında meydana gelen doğal artıştan dolayı, grup içi ağırlık değişikliklerinde anlamlı artış olduğunu tespit ettik (Tablo 5).

Skrotal ışınlamaya bağlı olarak radyasyon ve radyasyon+curcumin gruplarında, testis ağırlıklarında kontrol ve curcumin gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde ( $p<0.001$ ) bir azalma olduğunu tespit ettik (Tablo 5).

**Tablo 5.** Deney süresince total vücut ağırlığında ve testis ağırlığında gözlenen değişiklikler.

	Kontrol n=10	Curcumin n=9	Radyasyon n=9	Radyasyon+Curcumin n=9
<b>Başlangıç denek ağırlığı</b>	271.50 (250-281)	273.00 (258-294)	290.00 (275-298)	296.00 (285-300)
<b>Işınlama sonrası denek ağırlığı (1. Gün)</b>	298.50 (265-310)	295.00 (285-322)	307.00 (300-330)	313.00 (296-322)
<b>Sakrifikasyon denek ağırlığı</b>	363.50 (349-385)	367.00 (348-384)	386.00 (336-411) <sup>a</sup>	377.00 (355-405) <sup>a</sup>
<b>Testis ağırlığı (gr)/100gr vücut ağırlığı</b>	0.366 (0.315-0.414)	0.394 (0.357-0.426)	0.135 (0.115-0.149) <sup>a</sup>	0.133 (0.101-0.143) <sup>a</sup>

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur.

$p<0.05$  olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

<sup>a</sup> $p<0.001$  Kontrol ve Curcumin grubu ile kıyaslandığında.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda 6 Gy X ışını radyasyon gruplarına tek seferde skrotal olarak uygulanmış olup, ışınlamadan 6 hafta sonra, deneklerden elde edilen testis dokusu örneklerinde, öncelikle genel morfoloji değerlendirilmiş, ardından radyasyona bağlı seminifer tübüllerdeki hasar; hem histomorfometrik ölçümler ile hem de Johnsen skoru ile semikantitatif olarak analiz edilmiştir. Radyasyonun direkt etki ile oluşturduğu DNA hasarı ve indirekt serbest radikaller üzerinden meydana getirdiği hücresel hasarda PARP-1 immünoreaktivitesindeki değişiklikler immünohistokimyasal yöntemle değerlendirilmiştir. Ayrıca bu süreçte ışınlamadan 1 hafta önce profilaktik olarak uygulanmaya başlayan curcuminin (100 mg/kg) etkinliği de araştırılmıştır.

Tanı ve tedavide sıkça kullanılan iyonize radyasyonun, üreme sistemi sağlığı üzerindeki etkileri uzun yıllardır bilinmektedir (59, 60). Radyasyon, infertilite konusunda ısı ve kimyasal maddelerle beraber en çok çalışılan toksik ajanlardan bir tanesidir. Hücre yenilenmesi hızlı olan dokuların radyasyona duyarlılıkları yüksektir. Bu nedenle mitotik aktivitesi yüksek olan germ hücreleri büyük oranda radyasyona duyarlıdır. Yapılan birçok çalışmada spermatogenetik seri hücrelerinin en küçük radyasyon dozlarına bile çok büyük hassasiyet gösterdiği belirtilmiştir (4, 33, 61, 62).

Radyoterapi testis kanseri tedavisinde özellikle evre I seminomlarda başarısı %100'lere varan bir tedavi alternatifi olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan bir epidemiyolojik çalışmada testis tümörlü hasta sayısının 1973-1998 tarihleri arasında % 44 arttığı ve bunların içinde de en fazla artan hastalık grubunun % 64 ile seminomlar olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle testis tümörlü, hastalarda radyoterapi uygulamalarının daha da artacağı öngörülmüştür (62).

Radyasyonun insandaki spermatogenetik siklusa oluşturduğu negatif etkiler çeşitli deney modellerinde gösterilmiştir. Radyoterapi görece erişkin testis kanserli hastalarda infertilite oluşumuna karşı radyoterapi öncesi sperm dondurma gibi farklı işlemler uygulanmaktadır (8, 63). Fakat hasta indeksi sadece erişkin hastalardan değil puberteye ulaşmamış erkeklerden de oluşmaktadır. Kanser tedavisinden sonra hastaların çocuk sahibi olması için radyasyonun üreme sağlığına olan zararına karşı koruyucu tekniklerin geliştirilmesi zaruri bir ihtiyaçtır.

Radyoterapi kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir tedavi yöntemi olmakla birlikte tümöral dokuya seçici olmadığından tümör komşuluğundaki sağlıklı dokulara da hasar vermekte, akut ve geç dönemde oluşan yan etkiler yaşam kalitesini

etkilemektedir. Sağ kalım sürelerinin giderek uzadığı kanser hastalarında ortaya çıkan bu yan etkileri önlemek için radyoprotektif ajanlar geliştirilmiştir. Kromozomal mutajen olan radyasyonun fertilité üzerindeki etkileri bilinmektedir. Bu nedenle radyoterapi uygulanan ve uzun süre yaşayan genç erkek hastalarda üreme sisteminde oluşan yan etkiler ayrı bir önem taşımaktadır (5).

Skrotal radyoterapi uygulanan erkek hastalarda normal spermatogenezin bozulduğu, kalıcı veya uygulanan doz oranına göre kısa yada uzun süreli infertilite olduğu belirtilmiştir (64). Bu bağlamda, infertilite çok büyük bir klinik problemdir. İnsanlara medikal ve psikolojik etkileri vardır. İstatistiklere göre Amerika'da ki çiftlerin %15 i infertildir ve bunların da %15 inin nedeni oksidatif strestir. Bundan dolayı son yıllarda oksidatif stres ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (65).

Kanserin İyonizan radyasyon ile tedavisinde terapötik kazancı arttırmanın bir yolu, antitümöral etkinliği değiştirmeksizin normal dokuları radyasyon hasarından koruyan hücre koruyucu ajanların kullanılmasıdır (5).

Tedavi sonrası erkek infertilitesinin etimolojisinde oksidatif stresin önemi kanıtlandıktan sonra, serbest radikal süpürücü antioksidanların koruyucu etkisini araştırmaya yönelik çok sayıda çalışma modeli oluşturulmuştur (4, 5, 64, 66, 67).

Bizde çalışmamızda Curcumin ve Radyasyon+curcumin gruplarındaki deneklere, iyi bir antioksidan, antikanser, normal hücrelere selektif radyoprotektör bir ajan olan curcumini ışınlamadan 1 hafta önce başlayarak, toplamda 7 hafta boyunca, gün aşırı oral olarak 100mg/kg dozda profilaktik olarak uyguladık ve curcuminin radyasyona bağlı ortaya çıkan histopatolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal değişiklikleri nasıl etkilediğini araştırdık.

*Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından elde edilen curcumin hücre koruyucu ajanlar içerisinde major fenolik yapıda bir birleşiktir (68). Curcumin anti-inflamatuar, antioksidan, yara iyileştirici, antikanser, antimikrobiyal aktivite gibi geniş bir farmakolojik kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir (56, 69).

Son yıllarda curcumin ile yapılan radyoterapi çalışmalarında curcuminin serbest radikalleri süpürücü ve protektif özellikleri değerlendirilmiş ve bu tür tedavi modellerinde pozitif etkiye sahip iyi bir antioksidan olduğu gözlenmiştir (54, 67, 70, 71).

Yaptığımız literatür incelemelerinde, curcuminin skrotal uygulanan iyonize radyasyona karşı radyoprotektif etkisinde PARP-1 immünoreaktivitesinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda skrotal bölgeye uygulanan 6

Gy'lik iyonize radyasyonun, sıçan testislerinde çeşitli morfolojik hasarlara neden olduğu görülmüştür. Işınlamadan 6 hafta sonra, bu hasarlar ışık mikroskopik düzeyde incelendiğinde; seminifer tübüllerde germinal hücre tüketimi, spermatogenezin durması, bazal lamina kalınlaşması, tübüllerde çok sayıda vakuolizasyon, tunika albugineada kalınlaşma, seminifer tübül epitelinde sadece Sertoli hücreleri ve tek tük rezerv spermatogonyumlara rastlanması ve pek çok atrofik tübül olması şeklinde sıralanabilir. Bizim bulgularımız direkt skrotal veya pelvik alan ışınlanan çalışmalarda gözlenen histolojik hasarlar ile uygunluk göstermektedir.

Testis farklı cinste veya farklı evrelerdeki farklılaşan hücrelerden oluşur. Bu hücrelerin hepsi radyasyona karşı farklı hassasiyetler gösterir. Radyasyon sonrası seminifer tübüllerin bir kısmında atrofi gözlenir. Atrofik tübül sadece Sertoli hücrelerinden oluşabileceği gibi nadiren germ hücreleri ve Sertoli hücreleri veya çok az sayıda hücresele bağlantıları olmayan germ hücreleri ve Sertoli hücrelerinden de oluşabilir. Işınlama sonrası radyasyon spermatogonyumların farklılaşmasını bozar ve spermatogenezini baskılar. Bu yüzden sadece tübüllerde görülen tek germ hücresinin rezerv spermatogonyum A olduğu bildirilmiştir (29, 60).

Çalışmamızda radyasyon alan grupların her ikisinde de atrofik tübüller gözlenmiştir. Çalışmamız tek zamanlı bir çalışma olduğundan, farklı zaman dilimlerinde zamana bağlı değişimleri saptamamız mümkün olmamıştır, ancak farklı zaman dilimlerinde spermatogenezin değerlendirildiği çalışmalarda da atrofik tübül morfolojisinin zamana ve ışının şiddetine göre değişiklik gösterdiği pek çok çalışmada ortaya konmuştur. Atrofinin aktif olarak bölünen germ hücrelerinin serbest radikallerin hasarlı etkisine maruz kalması sonucu oluştuğuna inanılmaktadır. Meistrich ve ark. (72), yaptıkları bir çalışmada sıçanlara 3,5 Gy skrotal radyoterapi uygulamışlardır. 10 hafta sonra sakrifiye edilen deneklerin ışık mikroskobu altındaki testis incelemelerinde çoğu seminifer tübülde sadece Sertoli hücrelerinin kaldığı, kimi tübüllerde ise Sertoli ve tip A spermatogonyumların hayatta kaldığını görmüşlerdir. Testis ağırlıklarında ve çaplarında düşüşler gözlendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca testislere uygulanan 1-3 Gy gibi küçük dozlardaki radyasyonun bile farklılaşan spermatogonyumları tahrip ettiği bunun sonucunda ise, spermatogenetik hücrelerde ileri düzeyde bir azalmanın ortaya çıktığını bildirmiştir. Kök spermatogonyumların ise çok daha fazla radyoresistans olduğunu belirtmişlerdir. İnsanlara uygulanan 2 Gy radyasyonun bile 50 haftaya kadar ya da daha fazla sürebilecek bir azospermiye neden olabileceği ileri sürülmüştür. Bunun nedeninin ise germ hücrelerin haraplanmasına ve farklılaşma özelliklerini geçici süre kaybetmesi

olarak bildirmişlerdir (72). Bizim çalışmamızda da Meistrich'in çalışmasına paralel olarak seminifer tübüllerde sadece Sertoli hücreleri ve çok az sayıda kök spermatogonyumlara rastlanmıştır. Spermatogenizi değerlendirdiğimiz Johnsen skorlaması sonuçlarının istatistiksel analizleri de radyasyona bağlı olarak germinal epitelde meydana gelen hücre kaybının çok ciddi boyutta olduğunu açık bir şekilde ortaya koymuştur. Kontrol ve Curcumin grubu deneklerimizde tespit edilen Johnsen skoru değerlerini, Radyasyon ve Radyasyon+curcumin grupları ile kıyasladığımızda, radyasyona bağlı olarak skorlarda anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır.

Andrieu ve ark. (73), yaptıkları bir çalışmada wistar albino erkek sıçanların testislerine 6 Gy lokal radyasyon uygulanmıştır. 3 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edilmiş ve testisler incelenmek üzere çıkarılmıştır. Radyasyon grubunda testis ağırlığının belirgin şekilde düştüğü gözlenmiştir. Işık mikroskopik incelemelerde radyasyon alan deneklerin testis çapında ve seminifer tübül epitelinin yüksekliğinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca seminifer tübüllerde yapılan hücre sayımı neticesinde kontrol grubundaki spermatogonyum ve primer spermatosit sayılarının radyasyon grubunda anlamlı bir düşüş gösterdiğini bildirmiştir. Bu çalışmanın verileri ile bizim verilerimiz büyük oranda paralellik göstermekle birlikte, seminifer tübüllerde tespit edilen hücre sayılarının yüksekliği sakrifikasyon zamanının çalışmamızın sakrifikasyon zamanından 3 hafta erken olmasından dolayı ve maturasyon-tüketim sürecinin zamana bağlı olarak gerçekleşmesindedir (73). Radyasyon uygulandıktan sonra germ hücrelerinden geriye kök hücreler, spermatositler ve spermatidler hayatta kalır. Spermatosit ve spermatidler de maturasyon ile tükenir. Normalde mitotik aktivitesi olmayan kök hücreler, hücre tüketimine takiben çoğalmaya ve seminifer epitelini tekrardan oluşturmaya başlar (72, 74).

Hussein ve ark. (30), radyasyonun üreme sistemi üzerindeki ciddi hasarlayıcı etkisini wistar albino sıçanlara tüm vücut 8 Gy radyasyon uyguladıkları çalışmalarında ortaya koymuşlardır. Radyoterapiden 48 saat sonra denekleri sakrifiye ettiklerinde, spermatogenetik seri hücrelerinin hasarlandığını, özellikle spermatositler ve spermatidlerin azaldığını, spermatozoaların da tamamen tükendiğini gözlemlemişlerdir. Seminifer tübüllerin çoğunda spermatogenetik seri hücrelerin düzensiz nükleuslara sahip olduğu ve sitoplazmalarında asitofilik vakaollerin bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Sertoli ve Leydig hücrelerinin sayılarında ciddi azalma ile birlikte testis ağırlıkları ve seminifer epitel yükseklikleride de anlamlı bir şekilde düşüş yaşandığını tespit etmişlerdir (30). Sharma ve ark. (75), yaptıkları bir çalışmada Swiss albino

farelere 7,5 Gy gama radyasyonu uygulamışlar ve testisleri histopatolojik olarak incelemişlerdir. İlk olarak, radyasyon alan deneklerin seminifer tübül çaplarında anlamlı bir azalış olduğunu tespit etmişlerdir. Farelerin testislerinin ışık mikroskopisinde; tahrip olmuş tübüller, epitelde pul pul dökülmeler, tübüller arası ödem, nükleus parçalanmaları, piknotik çekirdekler, nekrotik hücreler ve degranuler sitoplazmalar gözlemlenmiştir. Yine bu çalışmalarında infertilitenin önemli bir tıbbi ve sosyal sorun olduğunu, fitokimyasal ajanların radyasyondan koruyucu etkilerini kullanarak testiküler germ hücrelerini radyasyondan korumanın mümkün olabileceğini ileri sürmüşlerdir (75). Çalışmamızda da literatürdeki verilere uyumlu olarak radyasyon alan gruplardaki deneklerin testis ağırlıklarında, seminifer tübül çaplarında ve germinal epitel yüksekliklerinde, Kontrol ve curcumin gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir.

Rowley ve ark. (76), yaptıkları bir çalışmada testislere tek doz radyoterapi uygulaması sonrasında, germ hücre düzeyinde ortaya çıkan değişikliklerin çok belirgin olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada; immatür hücreler olan spermatogonyumların 0,1 Gy dozda dahi etkilenme gösterdiği, spermatozoid ve spermatozoaların ise uygulanan daha yüksek dozlardan etkilenmedikleri ileri sürülmüştür (76). Yine bu çalışmada; 1 Gy den az doz uygulandığında radyoterapi öncesi spermiyogram değerlerine 9–18 ayda ulaşıldığı, 2-3 Gy radyoterapi uygulandığında, bu sürenin 30 ayı bulduğu, 4-6 Gy arasındaki dozlarda ise bu sürenin 6 yıla kadar uzayabildiği, 6 Gy'in üstündeki ışınlamalarda ise azosperminin kalıcı olacağı ileri sürülmüştür (76).

Curcuminin antioksidan ve radyoprotektör özelliklerinin araştırıldığı pek çok deneysel model kurgulanmış ve pek çok çalışma yapılmıştır. İnano ve ark. yaptıkları bir çalışmada; sıçanlara 1,5 Gy ve 2,6 Gy'lik radyasyona uygulamışlar ve 11-23 günler arası %1'lik curcuminli diyetle sıçanları beslemişlerdir. Çalışmanın sonucunda curcuminin, radyasyonun oluşturduğu meme tümörüne karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (54).

Jagetia ve ark. curcumin ile ilgili yaptıkları bir çalışmalarında, radyasyonun etkisinden kaynaklı yara iyileşmelerinin gecikmesine karşın curcuminin etkisini araştırmışlardır. Denekleri tüm vücut 2, 4, 6, 8 Gy radyasyona maruz bırakmışlar, Curcumin gruplarına radyasyondan önce 100 mg/kg curcumin uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda radyasyon kaynaklı yara iyileşmesindeki gecikmenin önüne geçildiğini bildirmişlerdir (70).

Kanter ve ark. (67) yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise, streptozotocin (STZ) ile indüklenen diyabet nedeniyle oluşan oksidatif testis hasarına karşı curcuminin koruyucu ve antioksidan etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada curcumin tedavili gruptaki deneklere STZ enjeksiyonundan 3 gün önce başlayarak 8 hafta süresince günde bir defa 100 mg/kg curcumin oral olarak uygulanmıştır. Deneyin sonunda sıçanlar sakrifiye edilmiş ve histopatolojik incelemeler sonucunda diabet grublarında; spermatogonyum, spermatosit ve spermatidlerde vakoulizasyonlar ve belirgin morfolojik bozukluklar gözlenmiştir. Ayrıca yine diyabetli gruplarda tübüllerde atrofi ve spermatogenetik arrest izlenmiştir. Curcumin tedavili grupta seminifer tübüllerdeki hücre sayılarının diyabetik gruba göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Curcumin STZ ile oluşan diyabetli sıçanlarda apoptotik hücre ölümü ve testiküler hasarı iyileştirmiştir. Vücut ağırlıkları ve testis ortalama ağırlıklarının istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturduğu da belirtilmiştir. Diyabetik sıçanlarda antioksidan enzim düzeyleri azalmış, MDA seviyeleri artmıştır. Curcumin tedavisi ile ise tüm bu değişimler tersine dönmüştür (67).

Sharaf ve ark. (55), çalışmalarında albino sıçanların testislerine 3 gün ardı ardına yarım saat boyunca 900 joule lük ultraviyole C ışını uygulamışlardır ve curcuminin farklı dozlardaki koruyuculuğunu araştırmışlardır. 4 ayrı gruba 3 gün ardı ardına ultraviyole C ışını verdikten sonra tedaviye başlamışlardır. Gruptan ilk olanı kontrol olarak tutulmuştur. Diğer 3 gruba ise sırasıyla 5 mg/kg, 25 mg/kg ve 50 mg/kg curcumin 4 hafta boyunca uygulanmıştır. Deneyin sonunda hayvanlar sakrifiye edilmiş ve yapılan histopatolojik incelemeler neticesinde 5mg/kg curcumin tedavili ultraviyole verilen grupta birçok seminifer tübül normal olarak saptanmıştır. Bununla birlikte bazı bölümlerindeki intersitisyel bağ doku alanlarında vakouller ve kimi Sertoli hücreleri arasında açıklıklar görülmüştür. Genel görüntüsü kontrol grubuna benzeyen seminifer tübüller bu grupta izlenmiştir. Buna karşın; 25 mg/kg ve 50 mg/kg curcumin tedavili sıçanlarda; spermatogenetik seri hücreleri arasındaki boşlukların daha fazla olduğu, spermatositlerin normal morfolojik görünümünden yoksun olduğu ve spermatogenetik hücrelerde tükenmeler olduğu gözlenmiştir. 50 mg/kg curcumin tedavili grupta bunlara ilave olarak, bazal laminada kalınlaşmalar ile spermatogenetik seri hücrelerde pul pul dökülmeler ve karmaşık yerleşimli seri hücreler gözlenmiştir. Bu çalışmada 5 mg/kg curcumin dozunun ultraviyole ışınlarına karşı iyi koruma sağladığı, buna karşın yüksek dozlarda uygulanan curcuminin düşük doz kadar iyi koruyucu etki göstermediği bildirilmiştir (55). Noorafshan ve ark. (69), çalışmasında metronidazolün (MTZ) seminifer epitel üzerine toksik etkisine karşı curcuminin koruyucu etkinliği araştırılmış



olup, testis ağırlıkları, testis volümleri, total epitelyal volüm, spermatoisitler ve spermatitlerin sayısında kontrol grubuna kıyasla MTZ grubunda önemli derecede azalış olduğu tespit edilmiştir. Curcuminin; gerek yüksek doz gerekse terapötik doz uygulanan MTZ gruplarında spermatoisitleri koruduğu gösterilmiştir. Tüm guruplarda Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlarda kayda değer bir etki gözlenmediği de vurgulanmıştır. Terapötik dozda MTZ ve curcumin tedavisi uygulanan guruplardaki testis ağırlıkları, testis volümleri, total epitelyal volüm, spermatoisitler ve spermatitlerin sayısı üzerine curcumin koruyucu etkisi gösterilmiş olup, aynı etki yüksek doz MTZ uygulanmış olan tedavili grupta gözlenmemiştir (69). Buradan curcumin gibi kullanılan koruyucu-iyileştirici ajanların dozu kadar, toksik ajanın dozunun da hasarın engellenmesinde ya da onarılmasında ne kadar önemli olduğu sonucuna varılabilir.

Testislere lindane adlı bir pestisit aracılığı ile oksidatif stres oluşturulan bir başka çalışmada curcuminin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Lindane lipofilik yapısından dolayı testislerde ve epididimde biriken ve sonucunda oksidatif stres oluşturan bir maddedir. Sıçanlara 14 ve 28 gün boyunca 30 mg/kg lindane uygulanıp tedavili guruplara 100 mg/kg curcumin verilen çalışmada, tedavisiz guruplarda testis ve epididim ağırlıklarında büyük düşüşler gözlenmiştir. Curcumin tedavili guruplarda bu düşüşün daha az olduğu tespit edilmiştir. Yine tedavisiz guruplarda sperm başı, sperm motilitesi ve sperm kuyruklarında morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Curcumin uygulanan guruplarda ise bu değişikliklerin minimal düzeyde ortaya çıktığı belirtilmiştir (76).

Akpolat ve ark. (71), yapmış oldukları çalışmada radyasyonun neden olduğu ince bağırsak hasarına karşı curcuminin koruyucu etkisi incelenmiş olup, 18 günlük deney periyodunda 100 mg/kg curcumin intragastrik yoldan uygulanmıştır. Deneyin 10 ve 14. günlerinde radyasyon uygulanacak olan guruplara abdominal olarak 5 Gy gama ışını verilmiştir. Yapılan incelemelerde ileum dokusunun villuslarında kısalma, epitel altında boşluklar ve piknotik çekirdekli hücreler gözlenmiş olup, curcumin tedavisi ile bu hasarın kısmen önlenmiş olduğu bildirilmiştir (71).

Bu çalışmalara ilave olarak, Devi ve ark. (56), yaptıkları bir çalışmalarında curcuminin mutojen bir ajan olan kromiyum verilen farelerin sperm karakteristiğinde de koruyucu etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Kontrol ve curcumin guruplarında % 3 oranında anormal morfolojide sperm gözlenirken bu oranın kromiyum alan grupta % 9 a çıktığı görülmüştür. Kromiyumla birlikte curcumin tedavisi uygulanan grupta ise anormal sperm oranının % 5,8 e kadar düşmüş olduğu, curcuminin belirgin bir koruma sağladığı belirtilmiştir (56). Çalışmamızda uyguladığımız 100 mg/kg curcumin dozu

çeşitli radyasyon çalışmalarından yararlanılarak seçilmiş olup, skrotal radyoterapide uyguladığımız dozda curcuminin istatistiksel olarak anlamlı bir koruma sağlamadığı tespit edilmiştir. Gerek morfometrik ölçümlerle birlikte testis ağırlıklarında, gerekse spermatogenezi değerlendirdiğimiz Johnsen skorlamasında radyasyon grubuna kıyasla kısmen olumlu veriler elde edilmiş olsa da, fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmamıştır.

Çalışmamızda son yıllarda yoğun bir şekilde çalışılan, erkek infertilitesinin etiyojisinde önemli bir rol oynayan, oksidatif strese karşı oluşan PARP-1 immünoreaktivite de değerlendirilmiştir.

Son yıllarda PARP-1 enziminin insan spermatogenezis indeksi kesin lokalizasyonu gösterilmiştir. İnsan erkek germ hücrelerinin farklılanmasında anahtar rol oynadığı belirtilmiştir. Yüksek volümdeki PARP ve onun homologlarının testis germ hücrelerinde biriktiği ve spermatogenezde DNA bütünlüğünün korunmasında kilit rol oynadığı gösterilmiştir (39). PARP oksidatif stres ile indüklenmiş erkek üreme rahatsızlıklarında yüksek aktivite gösterir. İnsan germ hücrelerindeki PARP-1 çalışmaları son yıllarda önem kazanmıştır. PARP üzerindeki çalışmalar çoğunlukla kemirgenler üzerinde yapılmıştır ve bu çalışmaların çoğunda PARP in spermatogonyum ve pakiten nükleuslu spermatositlerde lokalize olduğu bildirilmiştir (77). Bizde immünohistokimyasal yöntemle deney gruplarımızda PARP-1 ekspresyonunu H-skorlama ile değerlendirirken, spermatogonyumlardaki lokalizasyonu ve boyanma şiddetlerini göz önünde bulundurduk. İkili kıyaslamalarda, Kontrol ve Curcumin grubu arasında, Radyasyon ve Radyasyon+Curcumin grubu arasında H-skorun anlamlı bir farklılık göstermediğini saptadık. Radyasyon uygulanan gruplar ile diğer gruplar kıyaslandığında, radyasyona bağlı olarak H-skorun anlamlı ( $p<0.001$ ) düzeyde artmış olduğu gözlemledik. Bu bulguların radyasyona bağlı meydana gelen direkt DNA ve indirekt hücrel hasarının şiddetini açıkça ortaya koyduğunu düşünmekteyiz. Spermatogoniumların PARP-1 enzim aktivitesinin yüksek olmasının DNA yapısının korunmasında oldukça önemli olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (78). Curcuminin profilaktik kullanımı da PARP-1 immünoreaktivitesi açısından tedavisiz gruba kıyasla anlamlı bir fark yaratmamıştır. Radyasyon+curcumin grubunda yer alan deneklerimizin gerek genel morfolojik bulguları gerekse histomorfometrik ve histopatolojik bulguları, kullandığımız dozda beklenen koruma ve iyileşmenin ortaya çıkmadığını gözler önüne sermektedir.

Oksidan-antioksidan dengenin bozulmasına yol açan çeşitli deneysel modellemelerde de PARP-1 immünoreaktivitesinin ortaya çıkan serbest radikaller nedeniyle artış gösterdiği ispatlanmıştır. Tekcan ve ark. (79), varikoselle indükledikleri testis hasarında PARP-1 immünoreaktivitesinin oksidatif stresle ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Ve bu deney modelinde PARP yolaklarını incelemişlerdir. İmmün boyamalarda varikoselli sıçanlarda seminifer tübüllerdeki PARP ve PARP-1 in spermatogonyum ve primer spermatositlerdeki lokasyonunda sham ve kontrol grubuna göre güçlü boyanma olduğu göstermişlerdir. semikantitatif analiz için PARP-1 ve PAR aktivasyonu western blotlarda gösterilmiştir. Western blotlama yöntemi kullanarak varikoselli sıçanlarda yüksek PARP aktivitesi olduğu kanıtlanmış olup PARP bandı yanında apoptotik bantlara da rastlanmıştır (79).

Maymon ve ark. (80), çalışmalarında PARP ve PARP-1 aktivasyonunun ağırlıklı olarak germ hücrelerinde olduğunu ve testislerdeki somatik hücrelerde lokalize olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar farklı spermatogenez evrelerinde PARP'ın rolünü incelemişler ve PARP ekspresyonunun uzayan spermatidlerde belirgin olarak görülmesinin, PARP'ın kromatin modellenmesi ve spermatid nükleer yoğunluğu ile ilişkisi olabileceğini belirtmişlerdir (80). Eğer radyoterapi sırasında germ hücrelerinde radyasyonun tahrip edici etkisini önleme yeteneğine sahip hücre koruyucu etkili bir ajan kullanılabilirse, radyasyonun azospermi ve infertilite gibi üreme sağlığı üzerindeki etkileri önlenebilir ve radyoterapi alan genç erkek hastaların yaşam kalitesi üzerinde olumlu bir etki sağlanabilir. Bu bağlamda koruyucu olabileceğini düşündüğümüz, ancak kullandığımız dozda etkin bir koruma ve iyileşme sağlayamayan, antioksidan özellikleri iyi bilinen curcuminin yeni planlanacak doz kontrollü çalışmalarda radyoprotektif etkin dozunun araştırılmasına ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ

Radyoterapinin sağlıklı dokular üzerinde oluşturduğu hasarlardan korunmak için çeşitli radyoprotektör ajanlar kullanılarak yapılan çalışmalar yoğun bir şekilde sürdürölmektedir. Radyoterapi esnasında testiste gözlenen ve infertiliteye neden olan normal hücre hasarını önlemede, curcuminin etkisini morfolojik, morfometrik ve immünohistokimyasal açıdan incelemek amacı ile planladığımız çalışmada, bu ajanın deneklerimizde radyasyon ile oluşturulan testiküler hasarı önlemede beklenen düzeyde etki gösteremediğini tespit ettik. Curcuminin, antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve radyoprotektif etkilerinin ortaya konduğu pek çok klinik ve subklinik çalışma olmasına rağmen, uyguladığımız iyonize radyasyon dozunda, meydana gelen hücre ve genel anlamda doku hasarını önlemede seçmiş olduğumuz dozun optimum terapötik doz olmadığını saptadık. Morfometrik ölçümler ile radyasyonun seminifer tübül çapı ve seminifer epitel genişliğinde meydana getirdiği anlamlı derecedeki azalmanın da, curcumin ile önlenemediğini tespit ettik.

Sonuç olarak, istatistiksel bir anlamlılık oluşturmasa da curcumin tedavisi uygulanan deneklerin testis kesitlerinde, bazı tübüllerde yenilenme görülmesi dolayısıyla, yeni planlanacak doz kontrollü deneysel bir modelde, curcuminin optimum terapötik dozunun saptanmasının kliniğe katkı sağlayabileceği kanaatine vardık.

## 7. KAYNAKLAR

1. Coşkun Ö. İyonize radyasyonun biyolojik etkileri. SDU Technical Sciences Vocational School 1(2):13-17, 2011.
2. Daşdağ S. Ionizing radiations and cancer. Dicle Med J 37(2):177-185, 2010
3. Eker L, Acar AO, Demirkan N. Hastaların radyasyon üzerindeki bilgi düzeyleri. MYO-OS 2010- Ulusal Meslek Yüksekokulları Öğrenci Sempozyumu, Düzce, 21-22 Ekim 2010.
4. Take G, Erdogan D, Helvacioğlu F, Göktas G, Ozbey G, Uluoğlu C, Yücel B, Güney Y, Hicsonmez A, Ozkan S. Effect of melatonin and time of administration on irradiation induced damage to rat testes. Braz J Med Biol Res 42:621-628, 2009.
5. Karakoyun Ö, Aras A, Tuğan D, Hekimgil M, Yalman D, Esassolak M, Haydaroğlu A. The relationship between radiation-induced apoptosis in rat germ cells and amifosine. T Klin J Med Sci 24:142-146, 2004.
6. Zhang Z, Shao S, Meistrich ML. The radiation induced block in spermatogonial differentiation is due to damage to the somatic environment, not the germ cells. J. Cell. Physiol 211(1):149-158, 2007.
7. Oakberg EF. Sensitivity and time of degeneration of spermatogenic cells irradiated in various stages of maturation in the mouse. Rad Res 2:369-391, 1955.
8. Aslam I, Fishel S, Moore H, Dowell K, Thornton S. Fertility preservation of boys undergoing anti-cancer therapy: a review of the existing situation and prospects for the future. Hum Reprod 15(10):2154-2159, 2000.
9. Akpolat M, Topçu Tarladaçalışır Y, Uz YH, Sapmaz Metin M, Kızılay G. Kanser tedavisinde curcuminin yeri. Yeni Tıp Dergisi 27:142-147, 2010.
10. Kanter M, Topçu Tarladaçalışır Y, Akpolat M, Mercantepe T. Gamma radyasyona bağlı oluşan jejunum mukoza hasarına karşı curcumin ve amifostinin koruyucu etkilerinin incelenmesi. Tıp Araştırmaları Dergisi 6(3):128-135, 2008.
11. Schreiber V, Ame JC, Dolle P. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with 78PARP-1 and XRCC1. J Biol Chem 277(25):23028-36, 2002.
12. Tübitak-Bilten (2011). Elektromanyetik dalgalar ve insan sağlığı sıkça sorulan sorular ve yanıtları. Erişim Adresi: <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/sandik/gsm.pdf>

13. Sharma P, Singh R. Protective role of curcumin. Ed: Actor QA, Issues In Radiation Biology And Toxicology Research. 2011 Edition, pp:224, Scholarly editions, Atalanta, USA, 2011.
14. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (2009). Radyasyon insan ve çevre. Erişim Adresi: [http://www.taek.gov.tr/belgelerformlar/funcdownload/53/chk,25c84cd71354928fc14bcf44065773e3/no\\_html,1/](http://www.taek.gov.tr/belgelerformlar/funcdownload/53/chk,25c84cd71354928fc14bcf44065773e3/no_html,1/)
15. Vuran N. Toksikoloji. Ankara Eczacılık Fakültesi Yayınları, pp.190-256, Ankara, 1996.
16. Conard RA. Late radiation effects in Marshal Islanders exposed to fallout 28 years ago. Ed: Boice JD, Fraumemi F, Radiation carcinogenesis. pp. 57-70, Raven Press, New York, USA, 1984.
17. Kerr JB. Atlas of Functional Histology. 2nd ed. pp.339-358. Mosby, London, 2000.
18. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönler ile İnsan Embriyolojisi. (Çev.Ed. Dalçık H, Yıldırım M), s.262-282, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2008.
19. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji(Çev.Ed. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P), s.377-396, Güneş Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2009.
20. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. (Çev.Ed. Aytekin Y, Solakoğlu S), s.431-441, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2006.
21. Ganong WF. Ganon'un Tibbi Fizyolojisi (Çev. Ed: Türk Fizyolojik Birliği), s.523-524, Barış Kitapevi, İstanbul, 1996.
22. Shetty G, Weng CC, Bolden-Tiller OU, Huhtaniemi I, Handelsman DJ, Meistrich ML. Effects of medroxyprogesterone and estradiol on the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. *Endocrinology* 145(10):4461-9, 2004.
23. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. (Çev.Ed. Başaklar C), s.154, Palme Yayıncılık, Ankara, 2005.
24. Meistrich ML, Wilson G, Huhtaniemi I. Hormonal treatment after cytotoxic therapy stimulates recovery of spermatogenesis. *Cancer Res* 59(15):3557-60, 1999.
25. Türkkani A. Gamma ışınlamasının testis seminifer tübülüsleri üzerindeki etkisinin ışık mikroskobu düzeyinde incelenmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2001.
26. Allan DJ, Gobe GC, Harmon BV. Sertoli cell death by apoptosis in the immature rat testis following x-irradiation. *Scanning Microsc* 2(1):503-12, 1988.
27. Hacker U, Schumann J, Göhde W, Müller K.: Mammalian spermatogenesis as a biologic dosimeter for radiation. *Acta Radiol Oncol* 20(4):279-82, 1981.

28. Brinkworth MH, Handelsnen DJ. Radiation Cancer therapies. Ed:Nieschlag E, Behre HM. Andrology male reproductive health anddysfunction. Second Edition. pp.257-258, Springer ,Heidelberg, Germany, 2001.
29. Shetty G, Wilson G, Hardy MP, Niu E, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Inhibition of recovery of spermatogenesis in irradiated rats by different androgens. *Endocrinology* 143(9): 3385-96, 2002.
30. Hussein MR, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait A, Adly MA, Abdelraheem MH. Morphological evaluation of the radioprotective effects of melatonin against x-ray-induced early and acute testis damage in Albino rats: animal model. *Int J Exp Path* 87(3):237-50, 2006.
31. Özalpan A. Temel Radyobiyoloji. 1. Basım. İstanbul: Haliç Üniversitesi Yayınları, 2001:1-218.
32. Shetty G, Meistrich ML. Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *J Natl Cancer Inst Monogr* 34:36-9, 2005.
33. Erkanli Senturk G, Ersoy Canillioglu Y, Umay C, Demiralp-Eksioglu E, Ercan F. Distribution of Zonula Occludens-1 and Occludin and alterations of testicular morphology after in utero radiation and postnatal hyperthermia in rats. *Int. J. Exp. Path* 93(66):438-449, 2012.
34. Chambon P, Weill JD, Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 11:39-43, 1963.
35. Wang XG, Wang Z, Tong WM, Shen Y. PARP-1 Val762Ala Polymorphism reduces enzymatic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351(1):122-126, 2007.
36. Burkle A. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD<sup>+</sup>. *Febs J* 272(18):4576-89, 2005.
37. Schreiber V, Ame JC, Dolle P. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with 78PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* 277(25):23028-36, 2002.
38. Li Y, Oh HJ, Lau YF. The poly(ADP-ribose) polymerase 1 interacts with Sry and modulates its biological functions. *Mol Cell Endocrinol* 257-258:35-46, 2006.
39. Celik-Ozenci C, Tasatargil A, Tekcan M, Sati L, Gungor E, Isbir M, Demir R. Effects of abamectin exposure on male fertility in rats: potential role of oxidative stress-

mediated poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation. *Regul Toxicol Pharmacol.* 61(3):310-7, 2011.

40. Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Jacobson EL, Jacobson MK. Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. *Int J Biochem Cell Biol* 37(5):920-926, 2005.

41. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 31 (2):51-56, 2006.

42. Robbins MEC, Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation late normal tissue injury: a review. *Int J Radiat Biol* 80(4):251-9, 2004.

43. Koksall IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl* 5(2):95-9, 2003.

44. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79(4):829-43, 2003.

45. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 250(1-2):66-9, 2006.

46. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol* 43(11):963-74, 2005.

47. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 19(1):129-38, 2004.

48. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 9(4):331-45, 2003.

49. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 3-4:92-95, 1997.

50. Amani AR, Somchit MN, Konting MMB, Kok LY, Vitamin E and curcumin intervention on lipid-peroxidation and antioxidant defense system. *J Am Sci* 6:3, 2010.

51. Aggarwal B, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: The Indian Solid Gold. *Adv Exp Med Biol* 595:1-75, 2007.

52. Jaruga E, Salvioli S, Dobrucki J, Chrul S, Bandorowicz-Pikuła J, Sikora E, Franceschi C, Cossarizza A, Bartosz G. Apoptosis-like reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. *FEBS Lett* 433(3):287-93, 1998.



53. Sidhu GS, Singh AK, Thaloor D, Banaudha KK, Patnaik GK, Srimal RC, Maheshwari RK. Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound Repair Regen* 6 (2):167-177, 1998.
54. Inano H, Onoda M, Inafuku N, Kubota M, Kamada Y, Osawa T, Kobayashi H, Wakabayashi K. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* 21(10):1835-41, 2000.
55. Sharaf HA, Morsy FA, Shaffie NM, El-Shennawy ATM. Histological and histochemical study on the protective effect of curcumin on ultraviolet irradiation induced testicular damage in albino rats. *J Cytol Histol* 3:6, 2012.
56. Devi KR, Mosheraju M, Reddy KD. Curcumin prevents chromium induced sperm characteristics in mice. *IOSR Journal of Pharmacy* 2(2):312-316, 2012.
57. Rooij DG, Kant HJ, Dol R, Wagemaker G, van Buul PP, van Duijn-Goedhart A, de Jong FH, Broerse JJ. Long term effects of irradiation before adulthood on reproductive function in the male Rhesus monkey. *Biol Reprod* 66(2):486-94, 2002.
58. Johnsen SG. Testicular biopsy score count- a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results of 335 hypogonadal males. *Hormones* 1(1):2-25, 1970.
59. Makinta MJ, Brinders JM, Smith KA. Radiation exposure exerts its adverse effects on sperm maturation through estrogen-induced hypothalamohypophyseal axis inhibition in rats. *African Zoology* 40(2):243-251, 2005.
60. Kangasniemi M, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Failure of spermatogenesis to recover despite the presence of A spermatogonia in the irradiated LBNF1 rat. *Biol Reprod* 54(6):1200-8, 1996.
61. Oakberg EF. Sensitivity and time of degeneration of spermatogenic cells irradiated in various stages of maturation in the mouse. *Rad Res* 2(4):369-391, 1955.
62. Akbal C, Tanıdır Y, Turkeri L. Testis kanseri ve infertilite. *Üroonkoloji Bülteni* 4:8-11, 2006.
63. Ojala M, Suomalainen L, Pentikäinen MO, Kovanen P, Tenhunen M, Erkkilä K, Toppari J, Dunkel L. Protection from radiation-induced male germ cell loss by Sphingosine-1-Phosphate. *Biol Reprod* 70(3):759-767, 2003.
64. Schally AV, Paz-Bouza JJ, Schlosser JV, Karashima T, Debeljuk L, Gandle B, Sampson M. Protective effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone against x-radiation-induced testicular damage in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(3):851-855, 1987.

65. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress and male infertility. *Indian J Med Res* 129(4):357-67, 2009.
66. Kandemir FM, Benzer F, Yildirim NC, Ozdemir N. Compensatory effects of curcumin on cisplatin-induced toxicity in rabbit testis. *J Med Plant Res* 5(3):456-46, 2011.
67. Kanter M, Aktas C, Erboğa M. Curcumin attenuates testicular damage, apoptotic germ cell death, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 56:1-8, 2012.
68. Sebastiaa N, Montorob A, Montoroa A, Almonacidb M, Villaescusab JI, C. Jose, Suchc E, Sillac MA, Sorianoa JM, Assessment in vitro of radioprotective efficacy of curcumin and resveratrol. *Radiat Meas* 46(9):962-966, 2011.
69. Noorafshan A, Karbalay Doust S, Valizadeh A, Aliabadi E, Mirkhani H. Ameliorative effects of curcumin on the seminiferous epithelium in metronidazole-treated mice: a stereological study. *Toxicol Pathol* 38(3):366-71, 2010.
70. Jagetia GC, Rajanikant GK. Role of curcumin, a naturally occurring phenolic compound of turmeric in accelerating the repair of excision wound, in mice whole-body exposed to various doses of gamma-radiation. *J Surg Res* 120(1):127-38, 2004.
71. Akpolat M, Topcu-Tarladacalisir Y, Kanter M. İyonizan radyasyonun neden olduğu ince bağırsak hasarına karşı curcumin ve C vitamininin koruyucu etkilerinin incelenmesi. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 6 (2):77-85, 2008.
72. Meistrich ML, Kangasniemi M. Hormone treatment after irradiation stimulates recovery of rat spermatogenesis from surviving spermatogonia. *J Androl* 18(1):80-7, 1997.
73. Nalca Andrieu M, Kurtman MC, Hicsonmez A, Özbilgin K, Eser E, Erdemli E. In vivo study to evaluate the protective effects of amifostine on radiation-induced damage of testis tissue. *Oncology* 69(1):44-51, 2005.
74. Peltola V, Parvinen M, Huhtaniemi I, Kulmala J, Ahotupa M. Comparison of effects of 0.5 and 3.0 Gy X-irradiation on lipid peroxidation and antioxidant enzyme function in rat testis and liver. *J Androl.* 14(4):267-74, 1993.
75. Sharma P, Singh R. Protective role of curcumin on lindane induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 84(4):378–384, 2010.
76. Rowley MJ, Leach DR, Warner GA, Heller CG. Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis. *Radiat Res* 59(3): 665-678, 1974.





77. Di Meglio S, Denegri M, Vallefucio S, Tramontano F, Scovassi AI, Quesada P. Poly(ADPR) polymerase-1 and poly(ADPR) glycohydrolase level and distribution in differentiating rat germinal cells. *Mol Cell Biochem* 248(1-2):85-91, 2003.
78. Tramontano F, Di Meglio S, Quesada P. Co-localization of poly(ADPR)polymerase 1 (PARP-1) poly(ADPR) polymerase 2 (PARP-2) and related proteins in rat testis nuclear matrix defined by chemical cross-linking. *J Cell Biochem* 94(1):58-66, 2005.
79. Tekcan M, Koksall IT, Tasatargil A, Kutlu O, Gungor E, Celik-Ozenci C. Potential role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of experimental left varicocele. *J Androl* 33(1):122-32, 2012.
80. Maymon BB, Cohen-Armon M, Yavetz H, Yogev L, Lifschitz-Mercer B, Kleiman SE, Botchan A, Hauser R, Paz G. Role of poly(ADP ribosyl)ation during human spermatogenesis. *Fertil Steril* 86(5):1402-7, 2006.

## **8. ÖZGEÇMİŞ**

1986 yılında Çatalca' da doğdum. 1997 yılında Gazipaşa İlkokulu'ndan, 2000 yılında Adnan Menderes İlköğretim Okulu'ndan ve 2004 yılında Vefa Poyraz (Y.D.A.) Lisesi'nden mezun olarak ilk ve orta öğrenimimi İstanbul'da tamamladım. 2010 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldum. 2011 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. Halen aynı anabilim dalında çalışmalarımı sürdürmekteyim.

## 9. EKLER

### 9.1. Türkçe Etik Kurul Onayı

	 T.C. <b>Zonguldak Karaelmas Üniversitesi</b> <b>Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu</b>	
<b>TOPLANTI TARİHİ</b> : 28/03/2012 <b>TOPLANTI NO</b> : 2012/03		
<p>3- ZKÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Meryem AKPOLAT MOSHIRIAN FARAHI'nin 2012-17-28/03 Protokol no'lu "Skrotal Radyoterapide Curcuminin Profilaktik Kullanımı Testis Dokusunda PARP-1 İmmünreaktivitesini ve Spermato genezi Nasıl Etkiler?" konulu başvurusunun Etik Kurul ilkelerine uygun olduğuna,</p> <p>Oy birliği ile karar verildi.</p>		
<b>ASLI GİBİDİR</b>  <b>Prof. Dr. Z. Nur BANOĞLU</b> <b>Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı</b>		
----- Z.K.Ü. HADYEK , 67600 Kozlu/ZONGULDAK, Tel:0 372 261 3135-3136-3139 Fax: 0 372 261 02 64		

## 9.2. İngilizce Etik Kurul Onayı



20

T.C.

**Zonguldak Karaelmas University  
Animal Experiments Local Ethical  
Committee**



**Date of Meeting :** 28 March 2012  
**Meeting No :** 2012/03

**3-** Research Application Registered by 2012-17-28/03 and titled "How the prophylactic usage of curcumin affects the PARP-1 immunoreactivity and spermatogenesis in scrotal radiotherapy?" has been approved by the Animal Experiments Local Ethical Committee

**Prof. Dr. Z. Nur BANOĞLU**  
**Animal Experiments Local Ethical Committee Director**