

KRONİK SUDAN KAÇINMA STRESİ İLE TESTİS DOKUSUNDA OLUŞTURULAN HASARI ÜZERİNE FULVİK ASİDİN TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Fulvic'in Terapötik Etkisinin Araştırılması Su İle Oluşturulan Testis Hasarına Asit Kaçınma Stresi (WAS)

Cansu BAĞÇIVAN¹, İbrahim SÖĞÜT², Canan HÜRDAĞ², Esra ÇİKLER-DÜLGER¹

ÖZET

Amaç: Çalışma, toksik olmayan bir ajan olan; antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özelliklere sahip fulvik asit (FA)'ın kronik sudan kaçınma stresinin (KS) testis dokusunda oluşturduğu hasara karşı tedavi edici etkisinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 18 adet Sprague-Dawley erişkin erkek sıçan 3 eşit gruba ayrıldı: Kontrol (K), Kronik Stres (KS) ve Kronik Stres+Fulvik Asit (KS+FA). Testis dokusundan elde edilen histolojik kesitler Hematoksilin&Eozin (H&E) ve Toluidin mavisi (TM) ile boyandı; zonula okludens-1 (ZO-1), β-aktin ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) immünohistokimya işlemleri yapıldı. Biyokimyasal olarak dokulardaki total antioksidan seviyesi (TAS), total oksidan seviyesi (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: KS grubunda hasarlı seminifer tübüller, tunika albuginea komşuluğunda artmış mast hücre aktivitesi, tübül içerisinde artmış iNOS aktivitesi ve azalmış β-aktin ve ZO-1 aktivitesi gözlemlendi. Bu grupta ayrıca TOS ve OSİ düzeylerinin arttığı; TAS, SOD, KAT ve GPx düzeylerinin azaldığı görüldü. KS+FA grubunda, fulvik asit kullanımıyla bu bulgularda iyileşme olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Bu bulgulara dayanarak fulvik asitin kronik stresin oluşturduğu testis hasarına karşı tedavi edici bir ajan olarak kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan; İnfertilite; Fulvik asit; Sudan kaçınma stresi; Oksidatif stres

ÖZET Amaç: Bu

çalışmanın amacı, antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özelliklere sahip toksik olmayan bir ajan olan fulvik asidin, sudan kaçınma stresi (WAS) ile oluşturulan testis hasarı üzerindeki terapötik etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntemler: 18 adet Sprague-Dawley erkek erişkin rat, Kontrol (K), Sudan Kaçınma Stresi (WAS) ve Sudan Kaçınma Stresi+Fulvik Asit (WAS+FA) olmak üzere 3 deney grubuna ayrıldı. Testislerden alınan histolojik kesitler Hematoxylin&Eosin (H&E) ve Toluidine Blue (TB) ve zonula okludens-1 (ZO-1) ile boyanarak β-aktin ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) immünohistokimya işlemleri yapıldı. Total antioksidan durum (TAS), total oksidant durum (TOS), oksidatif stres (OSİ), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri biyokimyasal olarak değerlendirildi.

Bulgular: WAS grubunda seminifer tübüllerde hasar, tunika albuginea altında mast hücre aktivitesinde artış, seminifer tübüllerde iNOS aktivitesinde artış ve β-aktin ve ZO-1 aktivitesinde azalma gözlemlendi. Yine aynı grupta TOS ve OSİ düzeylerinde artış, TAS, SOD, CAT ve GPx düzeylerinde azalma gözlemlendi. Fulvik asit replasmanı ile KS+FA grubu sonuçlarında iyileşme gözlemlendi.

Sonuç: Bu bulgulara dayanarak kronik stresin neden olduğu testis hasarına karşı fulvik asidin terapötik bir ajan olarak kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan; Kısırlık; Fulvik asit; Sudan kaçınma stresi; Oksidatif stres.

¹ İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

² İstanbul Bilim Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

Cansu BAĞÇIVAN, Yüksek Biyolog İbrahim SÖĞÜT, Dr. Öğr. Üyesi Canan HÜRDAĞ Prof. Dr.
Esra ÇİKLER-DÜLGER, Dr. Öğr. Üyesi

İletişim:
Yüksek Biyolog Cansu BAĞÇIVAN
Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Büyükdere Cad. No: 120, 34394 Esentepe
Şişli İSTANBUL
Tel: 05078293846
e-posta:
cansu_39@hotmail.com

Geliş tarihi/Received: 07.05.2018
Kabul tarihi/Kabul tarihi: 07.08.2018
DOI: 10.16919/bozoktip.421473

Bozok Tıp Derg 2018;8(4):60-8
Bozok Med J 2018;8(4):60-8

GİRİŞ Stres, organizmanın iç ve dış stres oluş turucu faktörlere karşı verdiği bir yanıtıdır. Stres faktörü, uzun süreli veya tekrarlayıcı olduğunda kronik bir hal alarak homeostazın bozulmasına yol açar (1). Kronik stres koş ullarında, dokulardaki reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi artarak dokularda oksidatif stres oluş umuna neden olur. ROS'ların yüksek miktarlarının yaş lanma, infertilite, kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde rol oynadıkları bilinmektedir (2). ROS'ların çok düşük miktarları erkek üreme sisteminde spermatozoa olgunlaş ması; sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon gibi pek çok önemli olayın düzenlenmesinde olumlu rol oynarken; kronik stres koş ullarında olduğu gibi yüksek konsantrasyondaki ROS'lar ise toksik etkilerinden dolayı, sperm kalitesini ve buna bağlı olarak fonksiyonlarını olumsuz yönde etkiler.

Memeli testisleri, spermatositogenez ve spermiyogenez olaylarının gerçekleş tiği seminifer tübüller ve bunların çevresindeki peritübüler ara dokudan meydana gelir. Seminifer tübüller içerisinde çeş itli geliş me ve farklılaş ma evrelerindeki germ hücreleri ile sertoli destek hücreleri yer alır. Seminifer epitel, komş u sertoli hücrelerinin bazolateral yüzleri arasında yer alan kan-testis bariyeri sayesinde bazal ve adlüminal alanlara ayrılır. Esas olarak hücre zarı ve hücre iskeleti elemanlarını birbirine bağlayan ZO-1, okludin ve kludinler gibi sıkı bağlantı proteinlerinden oluş an kan testis bariyeri, spermatositogenez ve spermiyogenezin adlüminal alanda, ara dokudan izole olarak, tamamen steril bir şekilde gerçekleş mesini sağlar (4-5).

Hipertermi, inflamasyon, radyasyon, toksik ajanlar ve günlük stres testis dokusunda oksidatif strese neden olan majör faktörlerdir. Kronik stres gibi dokulardaki ROS miktarını artırıcı faktörler, testislerde sertoli hücrelerinin yapısal proteinlerine zarar verir ve kan testis bariyerinin dinamiklerini bozarlar (6). Vücuttaki en sıkı kan-doku bariyerlerinden biri olan kan-testis bariyerinin geçirgenliğinin bozulması adlüminal alan içerisinde geliş imlerinin farklı evrelerindeki germ hücrelerinin apoptozunu uyararak spermatogenez sürecini olumsuz yönde etkiler. Spermatogenezin

bozulmasının en dramatik sonucu ise erkek infertilitesidir (7).

Normal koş ullarda organizma, oksidatif stres ile baş a çıkabilmek için genellikle hücre içi antioksidan sistemlerini aktive eder. Ancak kronik stres gibi koş ullarda dokulardaki oksidatif stresin yüksek olması ve mevcut antioksidan düzeylerinin bu artış karş ısında yetersiz kalması hücresel lipid, protein ve DNA'nın zarar görmesine yol açar (8). Hücre içi antioksidan sistemleri yetersiz kaldığında organizmanın oksidatif stres ile baş a çıkabilmesi için tercih edilebilen yollardan biri antioksidan ajan replasmanıdır (9). Öüm sonrasında mikroskobik organizmalar yararlı maddelerin ayrış tırılmasını sağ larken diğer yandan birçok yararlı madde de aç ığa çıkar. Bu maddelerden biri toprakta bulunan humik maddedir. Humik maddeler suda ç özünebilir özelliklerine göre: humik asit, fulvik asit ve hümik asit olarak sınıflandırılır (10). Humik asitten tüm pH değerlerinde suda ç özünebilir fraksiyonu olan fulvik asit bağ ırsaklardan kolayca emilerek birkaç saat içerisinde vücutta elimine olur (11). Fulvik asit, yapısındaki aktif karbon ve yüksek oksijen molekülü içeriğinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Fulvik asit, antioksidan etkisini, reaktif oksijen türlerinin bağ landığı bölgelere bağ lanarak gösterir. Yapılan çalış malarda fulvik asitin özellikle SOD'a etki ederek antioksidan moleküllerin seviyesini yükselttiği bildirilmiştir tir (12).

Bu çalış manın amacı, deneysel olarak hayvanlar üzerinde yaş amsal stresi taklit eden kronik sudan kaç ınma stresinin testis dokusunda oluş turması beklenen oksidatif hasar üzerine fulvik asitin iyileş tirici etkisi olup olmadığının araştır ılmasıdır. Bu çalış ma, kronik stresin yol aç tığı testis hasarı üzerine fulvik asitin tedavi edici etkisinin araştır ıldığı literatürde bilinen ilk çalış madır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları Deneylerde 250-300 gr ağırlığındaki eriş kin Sprague-Dawley erkek sıç anlar kullanıldı. Denekler, deney süresince standart kafeslerde, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde, sabit 22 °C ve %55 nemli ortamda barındırıldılar, standart pellet yem ve musluk suyu ile (ad libitum) beslendiler. Denekler, İstanbul

Medipol Üniversitesi MEDİ TAM'dan alındı ve deneysel çalışmaları aynı kurumda 24/02/2016 tarihli 2016/28 numaralı etik kurulu onayı ile gerçekleştirildi.

Fulvik Asitin Hazırlanması Fulvik asit, IHSS (Uluslararası Humik Madde Derneği) tarafından "Pahokee Turba Fulvik Asit Standard" olarak temin edildi. Deneylerde distile su ile 150 mg/kg oranında hazırlanan homojen karışım kullanıldı.

Stres Protokolü Denekler birbirini takip eden 10 gün boyunca günde 1 saat olmak üzere 50 cm x 50 cm x 50 cm ebatlarındaki ılık suyla dolu pleksiglas havuzların merkezindeki 6 cm x 8 cm ebatlarındaki platformun üzerine bırakıldılar. Havuzlar platformun 1 cm altına gelecek kadar ılık su ile dolduruldu. Stres protokolü her gün sabah 08:00-09:00 saatleri arasında uygulandı. Deneylere başlanmadan 1 hafta önce tüm denekler aynı araştırmacı tarafından dokunularak deney koşullarına ve araştırmacıya alıştırdılar (handling).

Deney Protokolü Deneylerde kullanılan toplam 18 adet sıçan her bir grupta eşit sayıda denek olacak şekilde 3 gruba ayrıldılar: (1) Kontrol (K) (n=6): Herhangi bir işlem uygulanmayan grup, (2) Kronik Stres (KS) (n=6): 10 gün boyunca sudan kaçınma stresi uygulanan grup, (3) Kronik Stres+Fulvik Asit (KS+FA) (n=6): 10 gün boyunca sudan kaçınma stresi ve ardından 10 mg/kg fulvik asit (i.p.) uygulanan grup. Deneylerin 10. gününde tüm gruplardaki denekler, izofluran (Aerrane Isofluran Volatil) anestezi ile sedasyonun ardından sakrifiye edildiler. Deneklerin testisleri histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için Bouin solüsyona alındı. Biyokimyasal analiz için ayrılan testisler, sıvı azotta dondurulduktan sonra analizleri yapılana kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Histolojik Yöntem Bouin solüsyonunda fikse olan testisler yükselen alkol serilerinde (%70, %90, %96, %100) dehidrate edildikten sonra ksilen ile şeffaflaştırıldılar. Parafin blok haline getirilen dokulardan genel histolojik değerlendirme için H&E ve mast hücre morfolojisi değerlendirmesi için TM boyamaları; immünohistokimyasal analiz için ise ZO-1 (Thermo Fischer Scientific), β -aktin (Thermo Fischer Scientific), iNOS (Thermo Fischer Scientific)

işaretlemeleri yapılmak üzere 5 μ m kalınlığında kesitler alındı (Thermo Scientific HM 340E).

Histolojik Boyama Yöntemi Kesitler 1 gece boyunca etüvde bekletilip ksilende deparafinize edildikten sonra, azalan alkol serileri (%100, %96, %90, %70) ve distile su aşamalarından geçirilerek boyandı. H&E (Biooptica) ile boyanan kesitler X100, X400 büyütme ve TM (Biooptica) ile boyanan kesitler X1000 büyütmede Olympus BX53 ışık mikroskobu ile incelenip fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal Yöntem Kesitler distile sudan %3'lük hidrojen peroksit ile alınıp sitrat tamponu (pH 6.0) (Sigma C-2488) içinde Decloaking chamberda (Bicare Medical DC2008) 40 dakika tutuldular. Protein blokaj (Super Block ScyTek Laboratories LOT:37960) işleminin ardından iNOS işaretleme yapılacak kesitler iNOS primer antikorunda (1:200) (Thermo Fischer Scientific, Tavşan Poliklonal Antikor, LOT: QD213201) +4 'de 24 saat boyunca; ZO-1 işaretleme yapılacak kesitler ZO-1 primer antikorunda (1:100) (Thermo Fischer Scientific, Tavşan Poliklonal Antikor, LOT: QD215365) oda sıcaklığında 1 saat boyunca ve β -aktin işaretleme yapılacak kesitler β -aktin primer antikorunda (1:100) (Thermo Fischer Scientific, Tavşan Poliklonal Antikor, LOT: RC2179435) +4 'de 2 saat boyunca inkübe edildiler. Tüm kesitler, anti-polivalent biyotin (ScyTek Laboratories LOT: 41865) sekonder antikor ile 20 dakikalık inkübasyonun ardından 3,3' diaminobenzidine (DAB) kromojen (ScyTek Laboratories LOT: 36702) ile renklendirildiler. Harris hematoksilen ile 2 dakika zıt boyama yapılarak preparasyon işlemi tamamlandı. İmmünohistokimyasal reaksiyonlar, Olympus BX53 ışık mikroskobunda incelenerek fotoğraflandı. Negatif kontrol kesitlerine primer antikor ile inkübasyon aşaması uygulanmamıştır.

Biyokimyasal Protokol Testis örnekleri tartılarak Ultra Turrax T10 (IKA, Wilmington, NC, ABD) ile homojenize edildi. TAS, TOS ve OSİ seviyelerinin inceleneceği örnekler, 0.15 N potasyum klorür (KCl) solüsyonunda; SOD, KAT, GPx seviyelerinin inceleneceği örnekler PBS solüsyonunda homojenize edildi. Testis dokusunda TAS, TOS ve OSİ seviyeleri Rel Assay Diagnostics kitleri (Gaziantep, Türkiye) ve SOD, KAT ve GPx seviyeleri ise

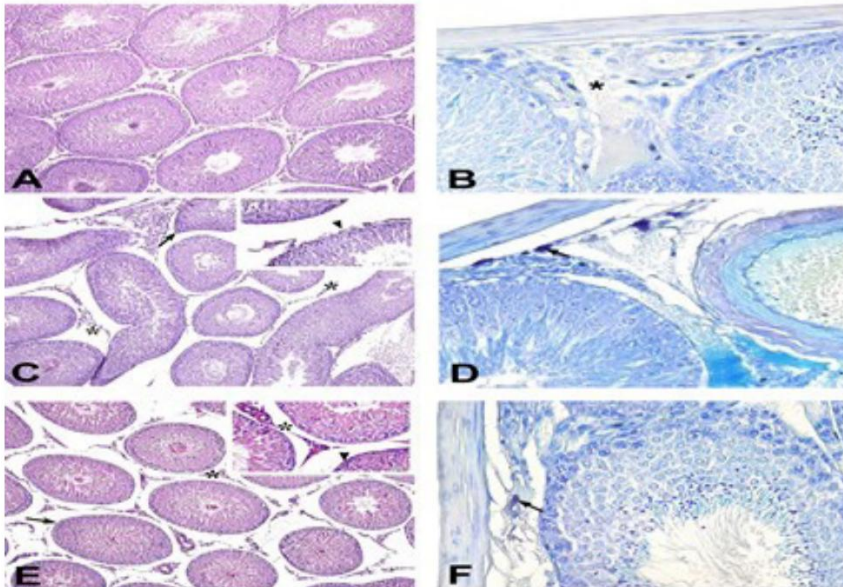
ELISA kitleri (Bioassay teknolojisi laboratuvarı, Şangay, Çin) ile tespit edildi.

İstatistik Değerlendirme GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software Inc.) programı kullanıldı. Bulgular için ortalama \pm standart hata (SE) ve $*p<0,05$ değeri anlamlı kabul edildi. Normal dağılıma uygunluk gösteren veriler için tek yönlü ANOVA testi uygulandı.

BULGULAR

Histolojik Bulgular K grubuna ait H&E ile boyanmış testis örneklerinde, seminifer tübüller ve interstisyel alanın normal yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 1A); TM ile boyanan örneklerde mast hücrelerine rastlanmadı (Şekil 1B). KS grubuna ait örneklerin H&E ile boyanan preparatlarında seminifer tübül yapısının bozulduğu, seminifer tübüllerin bazal membranlarında hasar oluştuğu ve interstisyel alanda açılmalara eşlik eden morfolojik bozulmalar gözlemlendi (Şekil 1C); TM ile boyanan preparatlarda tunika albuginea altındaki peritübüler alanlarında mast hücrelerinin sayıca arttığı ve bu hücrelerden bazılarının degranüle oldukları görüldü (Şekil 1D). KS+FA grubuna ait örneklerin H&E ile boyanan preparatlarında sağlıklı seminifer tübüllerin arasında az miktarda hasarlı seminifer tübüllerin olduğu görüldü. Bazal membranlarda düzelme ve interstisyel alanlardaki açılmaların azaldığı gözlemlendi (Şekil 1E); TM ile boyanan preparatlarda tunika albuginea altındaki peritübüler alanlarda az sayıda granüle mast hücrelerinin yer aldığı gözlemlendi (Şekil 1F).

İmmünohistokimyasal Bulgular K grubunda, spermatogenik seri hücrelerinde ve interstisyel alanda az miktarda iNOS ekspresyonu görüldü (Şekil 2A); spermatogenik seri hücreleri arasında ZO-1 pozitif alanların varlığı gözlemlendi (Şekil 3A) ve spermatogonyum ve spermatositlerde yoğun β -aktin pozitif reaksiyon gözlemlendi (Şekil 4A). KS grubunda, interstisyel alandaki endotel hücrelerinde ve seminifer tübüllerin bütünlüğü bozulmuş kısımlarında bulunan spermatogenik seri hücrelerinde iNOS ekspresyonunun arttığı gözlemlendi (Şekil 2B); KS grubunda germinal hücre kayıplarının olduğu bölgelerde ZO-1 pozitif alanların, zayıflayarak azaldığı; bazı bölgelerde ise hiç görülmediği saptandı (Şekil 3B) ve seminifer tübüllerde ayrılma olan bölgelerde β -aktin immün reaksiyonu izlenmezken bazal membran düzeninin bozulduğu kısımlarda β -aktin ile pozitif reaksiyon veren miyoeptilyal hücreler dikkat çekti (Şekil 4B). KS+FA grubunda, hasarlı endotel hücrelerinde ve bazı spermatogenik seri hücrelerinde iNOS işaretleme olduğu, ancak preparatın genelinde iNOS ekspresyonunun azaldığı görüldü (Şekil 2C); KS+FA grubundaki örneklerde yeniden kurulan kan-testis bariyerinde ZO-1 pozitif alanların ve boyanma şiddetinin arttığı görüldü (Şekil 3C) ve bazal laminada kopma olan bölgelerde β -aktin reaksiyon izlenmemiş olup preparatın genelinde yoğun β -aktin pozitif reaksiyon gözlemlendi (Şekil 4C). Negatif kontrol gruplarında herhangi bir immün reaksiyona rastlanmadı (Şekil 2,3 ve 4D).



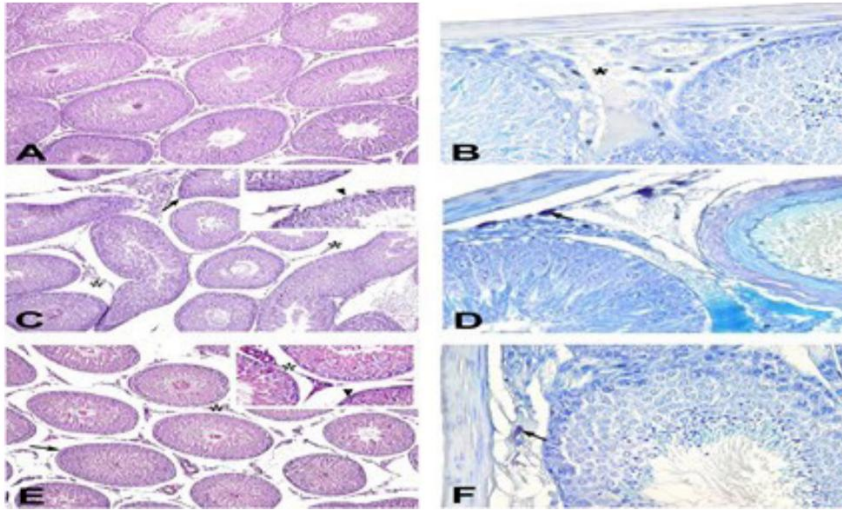
Şekil 1: K grubunda düzenli yerleşmiş seminifer tübüller ve sağlıklı interstisyel alan (A) ve tunika albuginea komşuluğunda mast hücrelerinden fakir interstisyel alan (*), (B); KS grubunda bozulmuş seminifer tübül morfolojisi (), bütünlüğünü kaybetmiş bazal membran (küçük resim,) ve açılmış, hasarlı interstisyel alan (*), (C) ve tunika albuginea komşuluğundaki interstisyel alanda artmış mast hücreleri (), (D); KS+FA grubunda düzenli tübül yapısı (), kesintisiz bazal membran (küçük resim,) ve açılmaların azaldığı, sağlam interstisyel alan (*), (E) ve interstisyel alanda az sayıda mast hücre (), (F).

Resim 1A, C ve E: H&E boyanması, büyütme: X100; Resim 1B, D ve F: TM boyanması, büyütme: X1000.

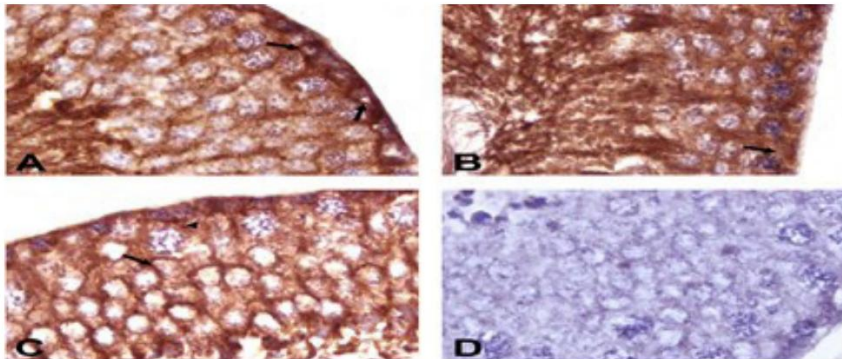
Tablo 1: Biyokimyasal verilerin karşılaştırılması

Parametreler	K Grubu	KS Grubu	KS+FA Grubu	p Değeri
SOD (ng/dL)	0,9266±0,1609	0,7442±0,0703	1,246±0,09182 a	a: KS grubuna göre
KAT (ng/dL)	11,05±1,204	10,22±1,113	15,48±1,519 bir	a: KS grubuna göre
GPx (ng/dL)				
	8,001±1,019	6,252±0,6227	10,83±0,7841 b	b: KS grubuna göre
Ş arttır				
(µmol H2O2 eq/L)	4,687±0,4268	6,907±0,9466	4,038±0,2881 a	a: KS grubuna göre
O				
(mmol Trolox eq/L)	3,977±0,3281	3,558±0,1422	5,03±0,4308 bir	a: KS grubuna göre
OSI (keyfi birim)	0,126±0,019	0,194±0,028	0,08±0,007 b	b: KS grubuna göre

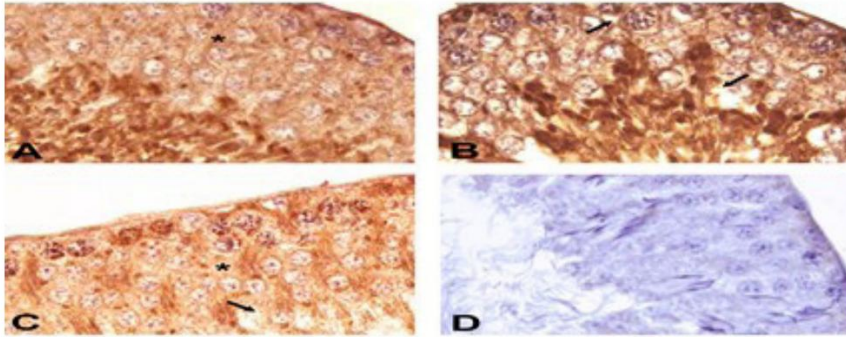
a: *p<0,05, b: **p<0,01



Ş ekil 2: (A) K grubunda düşük şiddetli iNOS immün iş aretlenmesi; (B) KS grubunda interstiyel alandaki endotel hücrelerinde () ve spermatogenik seri hücrelerinde iNOS pozitif () alanlar; (C) KS+FA grubunda interstiyel alanda () ve spermatogenik seri hücrelerinde () sayıca azalmış iNOS pozitif alanlar; (D) K grubundan hazırlanan (-) kontrol kesiti. (iNOS immünohistokimyası, büyütme: X400).



Ş ekil 3: (A) K grubunda kan-testis bariyerinde ZO-1 immün iş aretlenmesi (); (B) KS grubunda ZO-1 immün reaksiyonunun azaldığı hücreler arası alanlar (); (C) KS+FA grubunda görülen sağlam hücreler arası bağlantılarda artmış ZO-1 immün pozitif iş aretlenme () ve hasarın devam ettiği alanlarda zayıf ZO-1 immün iş aretlenmesi (); (D) K grubundan hazırlanan (-) kontrol kesiti. (ZO-1 immünohistokimyası, büyütme: X1000).



Ş ekil 4: (A) K grubunda yaygın β-aktin immün iş aretlenmesi (*); (B) KS grubunda hasarlı bölgelerde β-aktin kaybı (↑) ve sağ lam bölgelerde yaygın β-aktin pozitif iş aretlenmeler (*) ve hasarın devam ettiği bölgelerde azalmış β-aktin immün reaksiyonunda kayıplar (↓); (D) K grubundan hazırlanan (-) kontrol kesiti. (β-aktin immunohistokimyası, büyütme: X1000).

Biyokimyasal Bulgular Siç an testis örneklerinde K, KS ve KS+FA grupları arasındaki biyokimyasal parametrelerin değ iş imi incelendiğinde KS+FA grubuna ait dokuların SOD, KAT, ve TAS düzeylerinin K grubuna ve GPx düzeylerinin ise KS grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulundu. KS+FA grubuna ait TOS düzeyleri K grubuna ve OSI düzeylerinin KS grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüş tür (Tablo 1).

TARTIŞ MA

İnfertilite, dünya genelinde çiftlerin yaş adığı önemli cinsel sorunların baş ında yer almaktadır. erkekte kaynaqlanan nedeni açıklanamayan infertilitenin etiyojisinde, çağımızın önemli sorunu stresin rol oynadığı düşünölmektedir (13).

Çalışmamızda, yaşamsal stresin deneysel modeli olarak kabul gören fizyolojik ve psikolojik bir stres çeşidi olan sudan kaçınma stresi kullanılmıştır. Sudan kaçınma stresinin, karaciğer, mide, deri, mesane gibi birçok organda hasara neden olduğu bildirilmiştir (14-16). Çikler ve arkadaşları günde 2 saat uygulanan 5 günlük sudan kaçınma stresinin siçan mesanesindeki ürotelyal hücreler arasında açıklmalara yol açtığını ve bağ dokuda mast hücre sayısı ve aktivasyonunda artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (17). Bu çalışmada genel doku morfolojisini incelemek üzere H&E boyaması yapılan örneklerin KS grubunda seminifer tübüllerin bazal membranlarında ayrılmalar, tübül iç erisinde komşu sertoli hücreleri arasındaki kan-testis bariyerinin birçok bölgesinde kopmalar ve germinal hücre kayıpları gözlenmiştir. Yazawa ve arkadaşlarının yapmış oldukları immobilizasyon stresi çalışmasında deneyden 24 saat sonra stres grubundaki deneklerin testis ağırlıklarının kontrol grubundakilere göre azaldığı ve

nedeninin stres grubunda görülen hücresel kayıplar olduğu bildirilmiştir (18).

Komşu sertoli hücreleri arasındaki lateral yüzey bağlantıları ile kurulan kan-testis bariyeri, vücuttaki en sıkı kan-organ bariyerlerinden biridir. Kan-testis bariyerinin bütünlüğünü koruması, spermatogenezin seminifer tübüller iç erisinde, interstisyel alandaki endotel hücreleri aracılığıyla gelebilecek kimyasal moleküllerden ve otoimmün reaksiyonlardan korunmasını sağlar (4-5). Sertoli hücrelerinin gelişiminin belirlenmesinde ve kan-testis bariyerinin oluş turulmasında aktin önemli rol oynar. Aktin, hücre iskeleti elemanlarından mikrofilamentlerin ana bileş enidir. Kas olmayan hücrelerde bulunan aktin izoformlarından biri β-aktindir ve genellikle hücrenin periferine yakın yerleş imli, hücreye geliş eklini veren üç boyutlu bir ağ geliş ekinde dağılım gösterir. Sertoli hücrelerindeki aktin halkası ve onunla ilişkili ZO-1 ilişkisinin zarar görmesi, kan-testis bariyerinin yapı ve fonksiyonunu bozarak spermatogenez sürecine olumsuz etki eder (19). Çalışmamızda H&E boyaması yapılan kesitlerde gözlenen morfolojik bozulmalar ve hücre kayıplarının hücre iskeleti ile olan ilişkisinin incelenmesi için kesitlere uygulanan β-aktin immunohistokimyası sonuçlarına göre KS grubunda β-aktin ekspresyonunun azaldığı görülmüş tür. Kan-testis bariyerinin bozulduğu bazal bölgelerde ve adlüminal alana yakın bölgelerde, germinal hücre kaybına bağlı olarak, β-aktin iş aretlenmesi ortadan kalkmış tür. Kan-testis bariyerinin devamlılığını sürdürdüğu bölgelerde ise β-aktin immünpozitif alanlar görülmüş ancak immünitinin geliş iddetinin K grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular kronik stresin kan-testis bariyerine zarar verdiği yönündeki bulgularımızla desteklenmektedir. Özellikle adlüminal

alana doğru hücre iskeletindeki bozulmalara paralel olarak hücreler arası alanların açılması spermiyogenez sürecinin de olumsuz etkilenebileceğini ve seminifer tübül olgunlaşmamış spermilerin oluşumunu engellediğini bildirmişlerdir. Ayrıca, β-halkalarının bozulmasına bağlı olarak ZO-1 proteininde de azalma olduğunu bildirmişlerdir (20). Bizim çalışmamızın ZO-1 immünohistokimyası sonuçlarına göre K grubunda kan testis bariyeri sınırında düzenli bir yerleşim gösteren ZO-1 ekspresyonunun KS grubunda azaldığı veya hiç olmadığı anlaşılmıştır. TM ile boyanan kesitlerden elde edilen bulgularımıza göre, kronik stres özellikle tunika albugineanın hemen altında kalan bağ dokusunda mast hücre sayısı ve aktivitesinde artışa neden olmuş tür.

Mast hücreleri salgıladıkları TNF-α, interleükinler, heparin ve histamin gibi medyatörler aracılığıyla kan damarlarında endotel geçirgenliğini artıran, böylelikle bağ dokuya inflamatuvar hücre göçünü kolaylaştıran hücrelerdir. Kan-testis bariyerinin zarar görmesi ve peritübüler alanda inflamatuvar hücrelerin bulunması tübül içerisinde ROS'ların artmasına neden olarak spermatogenez tehlikeye sokar (21-22).

Uzun süreli veya tekrarlayan kronik stres, ROS üretimini artırarak veya mevcut antioksidanların seviyesini azaltarak dokularda oksidatif strese sebep olur.

Seminifer tübüller içerisindeki ROS miktarının artışına paralel olarak tübüllerdeki iNOS ekspresyonu da artar (23). Bizim çalışmamızda kronik stres uygulanan deneklerin testis dokusundaki mast hücre sayısının ve aktivasyonunun artmasına paralel olarak kan testis bariyerinin de bozulmuş olması ve dokudaki iNOS ekspresyonunun artmış olması bu bilgiyi desteklemektedir.

Metabolik reaksiyonlar sırasında ROS ortaya çıkmaktadır. Stres koşulları, ROS artışına sebep olur.

Bunun sonucu olarak hücresel moleküllerde (lipid, protein, nükleotid gibi) hasar görülmektedir. Oksidatif stres pro-oksidanlar ile anti-oksidanlar arasındaki denge durumun bozulmasıdır. Bu dengenin bozulması hücresel hasara ve ROS üretiminde artışa sebep olur. Vücutumuzda bu dengesiz koşulları ortadan kaldırmak için enzimatik (SOD, KAT, GPX) ve enzimatik olmayan (glutatyon, tiyol gibi) savunma

mekanizmaları geliştirmiş tür (24). Çalışmamızda KS koşullarında enzimatik antioksidan (SOD, KAT ve GPX) seviyeleri azalmıştır. Bununla bağlantılı olarak total antioksidan seviyeleri de azalmıştır. Bunun aksine KS grubundaki testislerde, TOS ve OSI seviyeleri artmıştır. Bizim sonuçlarımıza paralel olarak Ak ve arkadaşları sudan kaçınma stresi sonucunda lipid peroksidaz göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyelerinde artma, enzimatik olmayan antioksidanlardan glutatyon seviyesinde azalma bulmuşlardır (25). Bunlara ek olarak, oksidatif stresin hipertansiyon, diyabet ve infertilite gibi pek çok hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir (26).

Yapılan birçok çalışmada infertil erkeklerin %25-40'ının semen örneklerinde yüksek oranda ROS'a rastlanmıştır (21, 27). Biyolojik sistemlerde oksidan-antioksidan dengesinin bozulmasının getirdiği olumsuz sonuçları ortadan kaldırmak veya azaltmak için baş vurulan yöntemlerden biri dışarıdan antioksidan takviyesi yapılmasıdır. Antioksidanlar, vücutta oluşan ROS kaynaklı kimyasal tepkimelere etki ederek, açığa çıkan moleküllerin hücreye zarar vermesini engellerler (28). Fulvik asit, toprakta bitkilerin ayrışması sonucu oluşan humustan elde edilen düşük molekül ağırlıklı, kimyasal bir moleküldür. Humik maddenin tüm pH değerlerinde suda çözünebilen fraksiyonu olduğu bilinen fulvik asitin humustan elde edilen moleküller

arasında hormon, oksijen, vitamin ve mineraller açısından en zengin molekül olduğu bildirilmiştir (29).

Oksijen içeriği açısından çok zengin olan fulvik asit, antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilere sahiptir. Chen ve ark. fulvik asitin deneysel stres sonucu uyarılmış nötrofillerden salınan oksidanların üretimini azalttığını göstermiştir (30). Crooked ve arkadaşları, otoimmün hastalığa sahip insanlarda yaptıkları çalışmada fulvik asidin kan damarlarındaki endotel hücrelerin aralarındaki adhezyon moleküllerini etkileyip sabit kalmalarını sağlayarak antiinflamatuvar etki gösterdiğini bildirmişlerdir (31). Bu nedenle çalışmamızda kronik sudan kaçınma stresinin testis seminifer tübüllerinde oluştuğu oksidatif hasar, germ hücre kayıpları ile ara dokuda meydana gelen inflamasyonun geri döndürülmesi amacıyla terapötik bir ajan olarak fulvik asit kullanılmıştır.

H&E ile boyanan kesitlerde, KS grubunda izlenen hücre kayıplarının KS+FA grubunda azaldığı, morfolojik olarak

tübül bütünlüğünün sağlandığı görülmüş tür. Fulvik asit etkisiyle bütünlüğünü koruyan tübüller incelendiğinde düzenli bir bazal membran yapısı, germinal epitelde kalınlaşma ve sertoli-germ hücre ilişkilerinde K grubundakilere benzer şekilde düzgün morfoloji oluştuğu saptanmıştır. Morfolojik iyileşme β-aktin immunohistokimyası uygulanan KS+FA kesitlerinde incelendiğinde β-aktin pozitif hücrelerin sayısının ve immünite şiddetinin arttığı saptanmıştır. Germ hücre sırasının kalınlaşması ve tübül morfolojisinin genel olarak sağlıklı dokuya benzer görünümde olması kan-testis bariyerinin yeniden kurulduğunu düşündürmüştür. β-aktin hücre iskeleti ile yakından ilişkili ZO-1 proteini açısından KS+FA grubu incelendiğinde ise ZO-1 pozitifliğin β-aktin immunohistokimyası yapılan kesitlerdekine paralel şekilde korunduğu görülmüştür. Bu bulgular fulvik asitin hücre iskeletinde meydana gelen bozulmayı engelleyerek kan-testis bariyerinin bütünlüğünü koruduğunu ve buna bağlı olarak adlüminal alan içerisinde kalan germ hücrelerindeki kaybın engellendiğini göstermektedir.

Bizim çalışmamızda KS+FA grubuna ait toluidin mavisi ile boyanan kesitler incelendiğinde ara dokudaki mast hücre sayısının azaldığı, varlığını sürdüren mast hücrelerinin de granüle hücreler olduğu yani mast hücre aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Aynı deney grubunda seminifer tübüller içerisindeki iNOS ekspresyonunun da azalmış olması tübül lümenindeki ROS miktarının azalmış olabileceğini ve bunun sonucu olarak oksidatif stres oranının düşmüş olabileceğini düşündürmektedir. Fulvik asit yapısında içerdiği aktif karbon ve bol miktardaki oksijen molekülü nedeniyle güçlü antioksidan özelliği taşır. Bu özelliği sayesinde fulvik asit etkisini, dokuda oluşan serbest radikalleri nötralize ederek gosterir (32). Dokularda ölçülen biyokimyasal oksidatif stres belirteçleri incelendiğinde, histokimyasal ve immunohistokimyasal bulgularımızı destekler şekilde, KS grubunda azalan SOD, KAT, GPx seviyelerinin KS+FA grubunda arttığı görülmüştür. KS+FA grubuna ait dokulardaki TOS düzeyi azalırken TAS ve OSİ düzeyi artmıştır.

Çalışmamızın sonucunda kronik sudan kaçınma stresinin testis dokusunun antioksidan savunma sistemini zayıflattığı ve dokuda hem histolojik hem de

biyokimyasal hasara neden olduğu tespit edilmiştir. Dışarıdan alınan güçlü bir antioksidan olan fulvik asit desteği ile dokudaki antioksidan-oksidan dengesi kurularak oksidatif stresin olumsuz etkilerinin engellendiği görülmüştür. Buna göre fulvik asitin psikolojik strese bağlı infertilite durumlarında stres kaynaklı testiküler hasarın azaltılmasında destekleyici bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR 1.

- Chrousos GP. Stres ve stres sisteminin bozuklukları. *Nat Rev Endokrinol.* 2009;5(7):374-81.
- Droge W. Hücre fonksiyonunun fizyolojik kontrolünde serbest radikaller. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
- Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioksidan süperoksit dismutaz - bir inceleme: işlevi, testisteki düzenlenmesi ve erkek doğurganlığındaki etkileri. *Endokrinol.* 2009;51(1):1-11.
- Cheng CY, Mruk DD. Kan-testis bariyeri ve bunun erkek kontrasepsiyonu üzerindeki etkileri. *Pharmacol Rev.* 2012;64(1):16-64.
- Mital P, Hinton BT, Dufour JM. Kan-testis ve kan-epididymis bariyerleri, sıkı bağlantılarından daha fazlasıdır. *Biyolojik Üreme* 2011;84(5):851-8.
- Toufexis D, Rivarola MA, Lara H, Viau V. Stres ve üreme eksenini. *J Nöroendokrinol.* 2014;26(9):573-86.
- Hatier R, Grignon G. Rahim içi yaşam ve doğum sonrası dönemdeki seminifer tübüllerindeki Sertoli hücrelerinin ultrastrüktürel değişimi. *Anat Embriyo (Berl).* 1980;160(1):11-27.
- Zadak Z, Hyspler R, Ticha A, Hronek M, Fikrova P, Rathouska J, et al. Klinik koşullarda antioksidanlar ve vitaminler. *Fizyolojik Res.* 2009;58:13-7.
- Nicolson GL. Mitokondriyal Disfonksiyon ve Kronik Hastalık: Doğal Takviyelerle Tedavi. *Integr Med (Encinitas).* 2014;13(4):35-43.
- Wang W, Yang H, Wang X, Jiang J, Zhu W. Fulvik asit ve hümik asidin içme suyunda alüminyum türleşmesi üzerindeki etkileri. *J Environ Sci (Çin).* 2010;22(2):211-7.
- Junek R, Morrow R, Schoenherr J, Schubert R, Kallmeyer R, Phull S, et al. Hümik asitlerin, farklılaşmış U937 hücrelerinden LPS ile indüklenen TNF-alfa salınımı üzerindeki iki modlu etkisi. *Bitki ilacı.* 2009;16(5):470-6.
- Dong L, Cordova-Kreylos AL, Yang J, Yuan H, Scow KM. Hümik asitler, üretilen toprak amonyak oksitleyicileri ve olası nitrifikasyon üzerindeki etkilerini tamponlar. *Toprak Biol Biyokim.* 2009;41(8):1612-21.
- Repokari L, Punamaki RL, Unkila-Kallio L, Vilksa S, Poikkeus P, Sinkkonen J, et al. Kısırlık tedavisi ve evlilik ilişkileri: başarıyla tedavi edilen ART çiftleri ve onların kontrolleri arasında 1 yıllık prospektif bir çalışma. *Uğultu* 2007;22(5):1481-91.
- Çetinel S, Ercan F, Cikler E, Contuk G, Şener G. Mesanenin sudan kaçınma stresine bağlı dejenerasyonunda melatoninin koruyucu etkisi. *J Urol.* 2005;173(1):267-70.
- Zeybek A, Ercan F, Çetinel S, Cikler E, Sağlam B, Şener G. Sulu sarımsak ekstraktının koruyucu etkileri, sudan kaçınmayı azaltmada

mide, ileum ve karaciğerin stres kaynaklı dejenerasyonu: morfolojik ve biyokimyasal çalışma. Dig Dis Sci. 2007;52(11):2984-92.

16. Cikler E, Ersoy Y, Çetinel S, Ercan F. Lökotrien d4 reseptör antagonisti montelukast, sudan kaçınma stresinin neden olduğu dermiste mast hücre degranülasyonunu inhibe eder. Açıkta Histokimya. 2009;111(2):112-8.

17. Cikler E, Ercan F, Çetinel S, Contuk G, Şener G. Melatoninin sudan kaçınma stresine bağlı dermiste mast hücre degranülasyonuna karşı koruyucu etkileri. Açıkta Histokimya. 2005;106(6):467-75.

[PMC ücretsiz makale] [PubMed] 18. Yazawa H, Sasagawa I, Ishigooka M, Nakada T. Sıçanlarda immobilizasyon stresinin testiküler germ hücre apoptozisi üzerindeki etkisi. Uğultu 1999;14(7):1806-1

19. Musch MW, Walsh-Reitz MM, Chang EB. Oksidan kaynaklı bariyer bozulmasında ZO-1, oklüdin ve aktin rolleri. Am J Physiol Gastro bağırsak Karaciğer Physiol. 2006;290(2):222-31.

20. Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Alfa katenin ve aktin filamentlerine doğrudan bağlanması yoluyla ZO-1'in kaderin bazlı hücre yapışmasına katılımı. J Hücre Biol. 1997;138(1):181-92.

21. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z ve diğerleri. Oksidatif stresin insan spermatozoasının fonksiyonel yeterliliği ve genomik bütünlüğü üzerindeki geçici etkisi. Biyolojik Üreme 1998;59(5):1037-46.

22. Lee NP, Cheng CY. Nitrik oksit ve siklik nükleotitler: bağlantı dinamikleri ve spermatogenezdeki rolleri. Adv Exp Med Biol. 2008;636:172-85.

23. Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. Nitrik oksit sentazın izoformları. Özellikler, hücresel dağılım ve ifade kontrolü. Biochem Eczacılık. 1995;50(9):1321-32.

24. Söğüt İ, Kanbak G. Etanol ve Aspirin Maruziyetinin Sıçan Beyni Sinaptozomlarında Neden Olduğu Peroksidatif Hasarda Betainin İn Vitro Koruyucu Etkisi. Erciyes Med J. 2016;38(4):144-8.

25. Ak E, Cikler-Dülger E, Sehirli AO, Tetik S, Pisiriciler R, Sener G, Çetinel S. Sudan kaçınma stresi uygulanmış erkek sıçan mesanesinde oksitosin etkisi: Işık ve elektron mikroskopik inceleme. Marmara Pharmaceutical Journal. 2005;19:19-26.

26. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Erkek kısırlığının tedavisinde antioksidanların rolü. Int J Urol. 2009;16(5):449-57.

27. Oluk JM. Doku hasarının biyobelirteçleri olarak lipid peroksidasyonu ve antioksidanlar. Klinik Kimya 1995;41(12 Nokta 2):1819-28.

28. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalaycı O. Oksidatif stres ve antioksidan savunma. Dünya Alerji Organı J. 2012;5(1):9-19.

29. Sabi R, Vrey P, van Rensburg CEJ. Karbohidrat türevli Fulvik asit (CHD-FA), Karagenanın neden olduğu iltihabi önler ve yara iyileşmesini artırır: farelerde etkinlik ve Toksikite çalışması. İlaç Geliştirme Arş. 2012;73(1):18-23.

30. Chen CH, Liu JJ, Lu FJ, Yang ML, Lee Y, Huang TS. Hümkik asidin nötrofillerin yapışkanlığı üzerindeki etkisi. Tromb Res. 2002;108(1):67-76.

31. Crockard AD, Thompson JM, McBride SJ, Edgar JD, McNeill TA, Bell AL. Enflamatuar aktivasyon belirteçleri: enflamatuar eklem hastalığı olan hastalardan alınan sinoviyal sıvı nötrofilleri üzerinde CR1 ve CR3 kompleman reseptörlerinin yukarı regülasyonu. Clin Immunol İmmunopatolü. 1992;65(2):135-42.

[PubMed] 32. Rodriguez NC, Urrutia EC, Gertrudis BH, Chaverri JP, Mejia GB. Fulvik asidin antioksidan aktivitesi: Canlı maddeden türetilen biyoaktif bir bileşik. Gıda, Tarım ve Çevre Dergisi. 2011;9(3):123-7.