

Obez Sıçanlarda Selenyum ve N-Asetil Sistein'in Fertilitate/İnfertilite ve Karaciğer Üzerine Etkisi

Effect of Selenium and N-Acetyl Cysteine on Fertility/ Infertility and Liver in Obese Rats

Gizem BAŞARAN¹, Alpaslan GÖKÇİMEN¹, Nazlı CAN², Uygur KABAOĞLU³

¹Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Aydın
²Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Muğla
³Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji AD, Hayvan Biyoteknolojisi BD, Bilecik

Öz

Modern yaşamın getirileri ile beraber değişen beslenme alışkanlıkları ve fiziksel aktivite azlığı, obezitenin dünya genelinde bir halk sağlığı sorunu haline gelmesine neden olmaktadır. Obez bireylerde çeşitli metabolik veya sistemik hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda obeziteye bağlı olarak gelişen karaciğer yağlanması ve fertilitate kaybı üzerine selenyum ve N-asetil sistein tedavisinin etkilerini ortaya koymak amaçlanmaktadır. Bu doğrultuda histokimyasal ve immünohistokimyasal tekniklerin yanı sıra serum biyokimya analizleri, oksidatif stres parametreleri ve sperm parametreleri tayinleri yapılmıştır. Selenyum ve N-asetil sisteinin, obezitenin karaciğer ve testis üzerinde oluşturduğu hasarı hem yapısal hem de biyokimyasal düzeyde azalttığını tespit ettik. Ulusal ve uluslararası literatürde ilk kez bu ajanlar kullanılarak obez sıçanlar üzerindeki tedavi edici etkileri gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fertilitate, Karaciğer, N-Asetil Sistein, Obezite, Selenyum

Abstract

Changing dietary habits and lack of physical activity, which are the returns of modern life, cause obesity to become a public health problem worldwide. Various metabolic and systemic diseases develop in obese individuals. The aim of this study was to evaluate the effects of selenium and N-acetylcysteine treatment on obesity-related liver adiposity and loss of fertility. For this purpose, histochemical and immunohistochemical techniques, as well as serum biochemistry analyzes, oxidative stress parameters and sperm parameters were determined. We found that selenium and N-acetylcysteine reduce the damage caused by obesity on both liver and testis both structurally and biochemically. In the national and international literature, the therapeutic effects on obese rats were first demonstrated using these agents.

Keywords: Fertility, Liver, N-Acetylcysteine, Obesity, Selenium

Giriş

Gelişmiş toplumların değişen sosyo-kültürel ve sosyo-ekonomik yaşam tarzının yol açtığı beslenme bozukluğu ciddi bir şekilde insanların sağlığını tehdit etmektedir. Yüksek yağ içeren, lifsiz, karbonhidratça zengin gıdaların tüketimi obezite prevelansında artışa neden olmaktadır.

Obezite karaciğerde yaygın olarak non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)'na sebep olmaktadır (1,2). Karaciğer yağlanması ile artan serum trigliseritleri leydig hücrelerinin apoptoza giderek sayıca azalmalarına neden olmaktadır. Bu durum da testosteron seviyesindeki azalmaların bir diğer nedenidir (3). Obez erkeklerde semen parametrelerindeki bozukluk oranı normal erkek bireylerle karşılaştırıldığında artmıştır. Sperm yapısı bozulmuş, motilitesi ve sayısı azalmıştır. BKİ'nin artmasıyla sperm DNA'sında kırılmalar artmaktadır

(4). Yağ dokusunun artmış olması adipoz doku kaynaklı hormonların salınmasına, aromatisasyon aktivitesinin artmasına ve bunun sonucunda östrojen seviyesi artarken FSH, LH ve testosteron seviyeleri düşmesine neden olmaktadır. Düşük testosteron seviyesi nedeniyle spermatogenezis bozulmaktadır. Bu değişimler sonucu erkek infertilitesi gelişmektedir (5). Ayrıca obez erkeklerde glutatyon mekanizmasında bozulmalar olduğu bildirilmiştir (6). Seminal plazmada katalaz, glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi çeşitli antioksidan enzimler bulunur. Antioksidan mekanizmasındaki bozukluk reaktif oksijen türlerinin seminal plazmada artmasına neden olmakta ve erkek infertilitesinde önemli bir rol oynamaktadır. N-asetil sistein mukolitik ve antikanserijenik bir ilaçtır. Karaciğer hastalıklarında antioksidan ve antitoksik özellik gösterir. Testis morfolojisi üzerinde faydalı, sperm sayı ve hareketliliği, semen hacmi ve akışkanlığı üzerinde artırıcı etkileri olduğu gösterilmiştir (7-9). Selenyum ise hayati bir eser elementtir. Testis morfolojisi, spermatogenezis ve testosteron biyosentezi için gereklidir. Sperm konsantrasyonunu, morfolojisini ve motilitesini önemli ölçüde etkiler (10,11).

Çalışmamızda selenyum ve N-asetil sistein tedavisinin, obezitenin karaciğer ve fertilitate üzerine olan olumsuz etkilerinin giderilmesindeki rolü araştırılmıştır.

| | ORCID No |
|-------------------|---------------------|
| Gizem BAŞARAN | 0000-0002-1769-8850 |
| Alpaslan GÖKÇİMEN | 0000-0000-1234-5678 |
| Nazlı CAN | 0000-0003-2023-8246 |
| Uygur KABAOĞLU | 0000-0002-6602-8570 |

Başvuru Tarihi / Received: 23.04.2020
Kabul Tarihi / Accepted : 21.07.2020

Adres / Correspondence : Nazlı CAN
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Muğla
e-posta / e-mail : nkaragozcan@gmail.com

Gereç ve Yöntem

Hayvanların Temini ve Bakımı: Çalışmamızda Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 64583101/2017/003 sayılı izni ile 10 haftalık Sprague- Dawley cinsi albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, T.C. Gıda ve Tarım Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nden alınan izin ile Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deney süresince hayvanların bakımı, Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deney süresince sıçanlar 12;12 aydınlık/ karanlık ışıklandırması olan, ısı (21±1 °C) ve nemi (%45-65) olarak ayarlanmış odalardaki kafeslerde yaşatıldı. Deney başlangıcından bir hafta süreyle hayvanların ortam koşullarına adaptasyonu sağlandı. Sıçanlar polikarbon şeffaf kafeslerde gruba göre normal yem ya da yüksek yağ içerikli diyet (high fat diet/ HFD) için hazırlanmış sıçan yemi ve çeşme suyu ad libitum verildi.

Grupların oluşturulması: Çalışmamızda, Li ve ark. (2016)'a göre 24 hafta boyunca HFD uygulayarak obezitenin oluşmasını sağladıktan sonra seçtiğimiz ajanları (Se ve NAC) sperm perioduna uygun olarak 48 gün boyunca uyguladık ve 12 gün epididimal depo süresinin ardından, toplamda 32. haftada sıçanların ketamin ksilazin anestezisi altında sakrifikasyon işlemini gerçekleştirdik. İlk 24 hafta boyunca normal kontrol (NK) ve obez kontrol (OK) olmak üzere oluşturulan iki grup ilaç uygulaması ile birlikte n=6 olacak şekilde 8 temel gruba ayrıldı. Gruplandırma detayları Tablo1 ve Tablo2' de gösterilmiştir.

Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal (IHC) Teknikler: Parafine gömülü dokulardan, mikrotomda (Leica RM 2135) 5 µm kalınlığında kesildi. Su banyosunda açılan kesitler lizinin lamlara alındı. Bir gece etüvde (Nüve, EN055) 56°C'de bekletildi. Rutin hematoksilin- eozin (H&E), PAS ve Gomori Trikrom boyamaları uygulandı. IHC için testis leydig hücresi yüzeyinde bulunan glikoprotein yapıları G proteini ilişkili LH reseptörü (LHR) hedeflendi. İmmünohistokimyasal boyama ile gerçekleştirilen analizlerde, hücre içerisinde var olan makromoleküllerin ilk olarak işaretlenmesi ve akabinde boyama işlemleri ile görünür hale getirilerek incelenmesi esas alınmaktadır.

Aşağıda belirtilen üç temel unsur işaretlemenin ana prensibidir.

1. Primer bir antikorun özel bir antijene bağlanması
2. Antikor ve antijen kompleksinin özel bir konjugasyon enzimi yardımı ile diğer ikincil bir antikorla bağlanması
3. Substrat ve kromojen varlığında eklenmiş olan enzimin, antikor ile antijenin bağlanma bölgesinde renkli (kahverengi) bir görüntü vermesi ve ışık mikroskobu altında histopatolojik inceleme

yapılması esasına bağlı kalınarak LHR/CGR (Bioss, BS0984R) poliklonal antikor, Histostain-Plus IHC Kit (Thermo-Fisher, 858943) ve kromojen olarak DAB kiti (İnvitrogen/Novex- 002020) protokollerine bağlı kalınarak immunohistokimyasal boyama gerçekleştirildi.

Yapılan ışık mikroskobisi çalışmaları Olympus BX53 model mikroskop ve XC10 model kameralı görüntüleme sistemi kullanılarak görüntüledi. "Olympus StreamMotion Görüntü Analiz Yazılımı" kullanılarak ilgili yapıların ölçümleri yapıldı.

H-skorlaması: Her bir çalışma grubunda bulunan testis örnekleri için yapılan LHR/CGR antikoruna ile immünohistokimyasal değerlendirme için, her bir gruba ait deneklerden elde edilen dokulardan Deney gruplarındaki her bir hayvan için ayrı ayrı 10 preparatta 10 ayrı alan değerlendirilerek LHR/CGR antikoruna açısından hem pozitif hem de negatif hücreler olmak üzere tüm hücreler sayılmış ve yüzdeleri alınmıştır. Pozitif boyanan hücrelerin ise boyanma yoğunluğu 'H-score yöntemi' kriterlerine göre, zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli (+++) olacak şekilde 3 kategoride değerlendirilmiştir Her örnek için; zayıf (+) pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi hesaplandı ve çıkan sonuç 1 ile çarpılarak bir değer elde edildi. Daha sonra orta (++) pozitiflikte boyanan hücrelerin yüzdesi hesaplandı ve bu sonucun 2 ile çarpılması ile de bir değer elde edildi. Kuvvetli (+++) pozitiflikte boyanan hücreler için de bu hücrelerin yüzdesi hesaplanmış ve sonuç 3 ile çarpılarak üçüncü bir değer elde edilmiş oldu. Daha sonra elde edilen bu 3 değer toplandı ve her hasta için bir "H-skor değeri" elde edildi. Her bir hasta için H-score değerinin hesaplanmasında aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır:

$$H\text{-score} = 1 \times [\text{zayıf (+) pozitiflikte boyanan hücrelerin \% si}] + 2 \times [\text{orta (++) pozitiflikte boyanan hücrelerin \% si}] + 3 \times [\text{kuvvetli (+++) pozitiflikte boyanan hücrelerin \% si}]$$

Johnsen Skorlaması: Deney gruplarındaki her bir hayvan için ayrı ayrı 20 adet tübül değerlendirilerek her bir tübüle Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması yapıldı. Skorlama kriterleri Tablo 3'te verilmiştir.

Biyokimyasal Analizler: Her bir sıçanın kalbinden alınan 5 ml hacimdeki kan numuneleri biyokimya tüplerine aktarıldı. Ayrıca alınan kanlardan glukometre (Lifechek compact, TD-4283, TaiDoc Teknoloji Şirketi, Yeni Taipei, Taiwan) ile kan glukozu tayini yapıldı. Santrifüjde (Nüve, NF 1200R) 4000 rpmde 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Trigliserid, total kolesterol, HDL, LDL, testosteron, estradiol, LH, FSH, AST ve ALT analizleri Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Oksidatif Stres Parametrelerinin Tayinleri: Oksidatif stres hasar analizlerinin yapılabilmesi için karaciğer ve testis dokularının öncelikle homojenizasyonu ardından da total protein analizi

Tablo1. Beslenme tablosu (n=6)

| Grup No | Grup Adı | Beslenme | Süre |
|-------------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| I. Grup | Normal Kontrol +Serum Fizyolojik | Ad-libitum normal yem ve su | 24 Hafta + 60 Gün |
| II. Grup | Obez Kontrol +Serum Fizyolojik | Ad-libitum HFD yem ve su | 24 Hafta + 60 Gün |
| III. Grup | Normal + N- asetil sistein | Ad-libitum normal yem ve su | 24 Hafta + 60 Gün |
| IV. Grup | Normal + Se | Ad-libitum normal yem ve su | 24 Hafta + 60 Gün |
| V. Grup | Normal + N- asetil sistein + Se | Ad-libitum normal yem ve su | 24 Hafta + 60 Gün |
| VI. Grup | Obez + N- asetil sistein | Ad-libitum HFD yem ve su | 24 Hafta + 60 Gün |
| VII. Grup | Obez + Se | Ad-libitum HFD yem ve su | 24 Hafta + 60 Gün |
| VIII. Grup | Obez+ N- asetil sistein +Se | Ad-libitum HFD yem ve su | 24 Hafta + 60 Gün |

Tablo2. Selenyum ve N-asetilsistein uygulama tablosu (n=6)

| Grup No | Grup Ad | Doz | Veriliş Yolu | Süre |
|-------------------|---------------------------------------|--|---------------------------|--------|
| I. Grup | Normal Kontrol +Serum Fizyolojik | 1 ml/kg Haftada iki kez | Periton içi enjeksiyon | 48 Gün |
| II. Grup | Obez Kontrol +Serum Fizyolojik | 1 ml/kg Haftada iki kez | Periton içi enjeksiyon | 48 Gün |
| III. Grup | Normal + N- asetil sistein | NAC: 0.6 mg/kg Haftada iki kez | Periton içi enjeksiyon | 48 Gün |
| IV. Grup | Normal + Se | Se: 0.5 mg/kg Haftada iki kez | Periton içi enjeksiyon | 48 Gün |
| V. Grup | Normal + N- asetil sistein + Se | Se: 0.5 mg/kg NAC: 0.6 mg/kg Haftada iki kez | Periton içi enjeksiyon | 48 Gün |
| VI. Grup | Obez + N- asetil sistein | NAC: 0.6 mg/kg Haftada iki kez | Periton içi enjeksiyon | 48 Gün |
| VII. Grup | Obez + Se | Se: 0.5 mg/kg Haftada iki kez | Periton içi enjeksiyon | 48 Gün |
| VIII. Grup | Obez + N- asetil sistein +Se | Se: 0.5 mg/kg NAC: 0.6 mg/kg Haftada iki kez | Periton içi enjeksiyon | 48 Gün |

Tablo3. Johnsen testiküler biyopsi skor tablosu

| Skor | Histolojik bulgular |
|------|---|
| 10 | Birçok spermatozoa bulunan tam bir spermatogenezis |
| 9 | Birçok spermatozoa var, germinal epitel bozuk ve lümen Obliter |
| 8 | Yalnız birkaç spermatozoa var (<5-10) |
| 7 | Spermatozoa yok, birçok spermatid var |
| 6 | Spermatozoa yok, yalnızca birkaç spermatid var (<5-10) |
| 5 | Spermatozoa/spermatid yok, çok sayıda spermatosit var |
| 4 | Yalnızca birkaç spermatosit var (<5), spermatid / spermatozoa yok |
| 3 | Germ hücresi olarak yalnız spermatogonia mevcut spermatid / spermatozoa yok |
| 2 | Tübüller içerisinde germ hücresi yok, Sertoli hücreleri mevcut |
| 1 | Tübüller içerisinde hücre yok |

yapıldı. CAT, MDA, GSH ve GPx analizleri uygulandı. Total protein miktarının belirlenmesi, çalışılacak proteinlerin veriminin, saflığının ve aktivitesinin belirlenmesi için şarttır. Total protein analizi Bradford (1976) yöntemine göre yapıldı. Standart grafiği oluşturmak için, Bradford reaktifinin en hassas çalıştığı siğir serum albümini

(BSA) 2 mg/ml konsantrasyonunda hazırlandı ve çalışma grafiği oluşturuldu.

- *Katalaz enzim aktivitesi tayini:* Dokularda meydana gelen ve oksidatif stres sürecinde artan H₂O₂ moleküllerini O₂ ve H₂O'ya detoksifiye eden önemli bir antioksidan enzimdir. Katalaz aktivitesi Aebi (1984) yöntemi kullanılarak tayin edildi.

- *Lipid peroksidasyonu için Malondialdehit (MDA) tayini:* Hücredeki poliansatüre yağ asitlerinin otooksidasyonu ve enzimatik degradesyonları sonucu oluşan MDA molekülleri lipid peroksidasyonunun belirteçleridir. Dokulardan MDA tayini Heath ve Packer (1968) yöntemine göre yapıldı (12).

- *GSH Tayini:* Dokulardan GSH tayini Beutler ve ark (1963)'na göre yapıldı (13).

- *GPx Tayini:* GPx enzim aktivitesinin ölçümü Wendel (1980)'e göre yapılmıştır.

Sperm Parametreleri Tayini: Her bir hayvanın kauda epididimisi 37°C'ye ayarlanmış hot plate üzerinde disekte edilerek, epididimis içeriği PBS içerisine alındı. 300µl sperm süspansiyonundan alınarak makler sayım diskinde WHO kriterleri gözetilerek motilite değerlendirilmesi yapıldı.

Sperm Morfolojisi Tayini: Sperm morfolojisi tayini için Spermac Stain boya kiti kullanıldı. Kite göre; akrozom koyu yeşil, çekirdek kırmızı, ekvatoryal bölge açık yeşil, boyun ve kuyruk kısmı yeşil olarak boyanmıştır.

İstatistiksel Analiz: İstatistiksel analizler için GraphPad Prism (versiyon 7.04, GraphPad Software Inc., San Diego, ABD) ve SPSS (versiyon 22.0, SPSS Inc. Chicago, Ill, USA) programları kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar için One Way ANOVA testi uygulandı. Post-hoc testlerde Sidak ve Tukey metodları tercih edildi.

Bulgular

Vücut Ağırlığı Değişimleri: Obezitenin oluşturulması ile 24. haftanın sonunda NK ve OK grupları NK- NN- NS- NNS ile OK- ON- OS- ONS olmak üzere toplam 8 gruba ayrılmıştır (Grafik 1A). Obez gruplar NK grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ileri derece anlamlı bir ağırlık farkı gösterdi ($p=0.0001$). Ancak birbirleri ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğuna dair kanıtı rastlanmadı ($p>0.05$) (Grafik 1B).

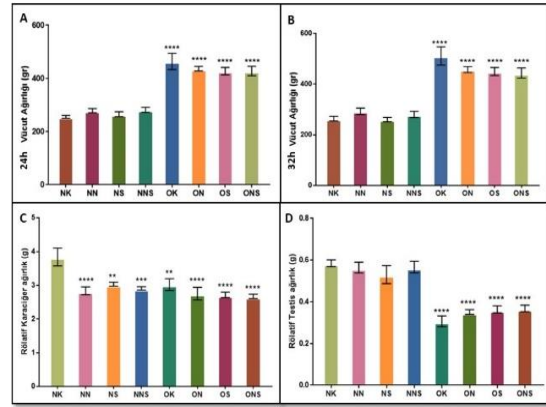
Obezitenin ölçümü insanlar için kullanılan Beden-Kitle-İndeksi (BMİ)'ne benzer şekilde olan Lee indeksine göre yapıldı (Lee,1929). 3 ve üzeri değere sahip sıçanlar obez olarak kabul edildi. Lee indeksi ölçüm verileri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Lee indeksi ölçüm verileri

| Grup | Lee indeksi |
|------|-------------|
| NK | 2.874562819 |
| OK | 3.216357251 |

Karaciğer ve Testis Ağırlık Değerleri: Her bir hayvan için rölatif karaciğer ve testis ağırlıkları Anjum ve Reddy (2014)'e göre hesaplandı. Karaciğer ağırlığı için; tüm gruplar NK grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu görüldü ($p=0.0001$) (Grafik 1C). Testis ağırlığı için; NN, NS ve NNS grupları NK grubu ile karşılaştırıldığında yapılan istatistiksel

analizler sonucu anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$). OK, ON, OS ve ONS grupları NK grubu ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu görüldü ($p=0.0001$) (Grafik 1D).

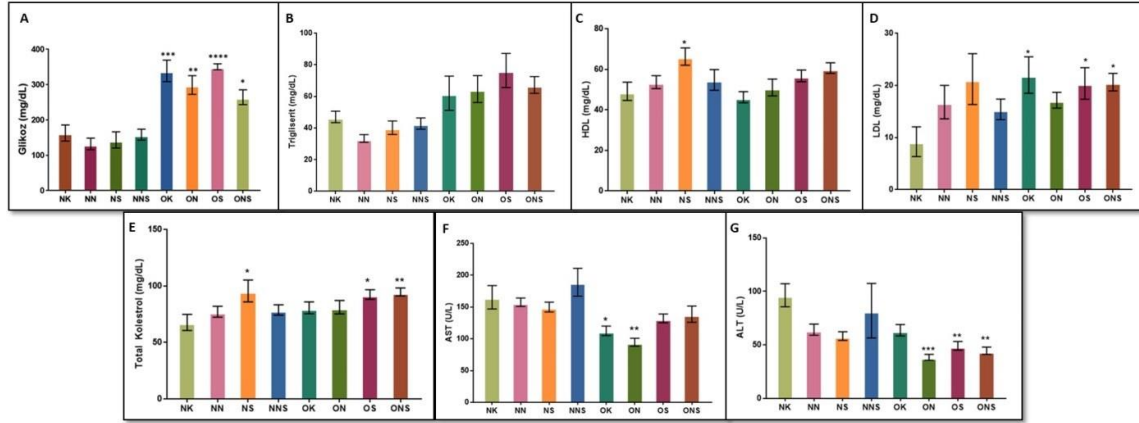


Grafik 1. A) 24 haftanın sonundaki vücut ağırlığı grafiği. B) 32. hafta vücut ağırlıkları grafiği. C) Gruplara göre ortalama rölatif karaciğer ağırlıkları grafiği. D) Gruplara göre ortalama rölatif testis ağırlıkları grafiği.

Biyokimyasal Değişimler: Kan glukozu değerleri incelendiğinde NK grubu ile obez gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulundu (Grafik 2A). Obez grupların trigliserit değerleri normal gruplardan daha yüksek olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Grafik 2B). HDL değerleri için; NK grubu ile karşılaştırıldığında sadece NS grubunda anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.05$). Diğer gruplar ile NK grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğuna dair kanıtı rastlanmadı ($p>0.05$) (Grafik 2C). LDL değerleri için; NK grubu ile karşılaştırma yapıldığında OK, OS ve ONS gruplarında anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.05$). Diğer gruplar ile NK grubu arasında anlamlı istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğuna dair kanıtı rastlanmadı ($p>0.05$) (Grafik 2D). Total kolesterol değerlerini hesapladığımızda NK ile karşılaştırıldıklarında NS- OS-ONS gruplarında anlamlı derecede artış gözlemlendi (Grafik 2E.) ALT değerleri için NK grubu ile karşılaştırıldığında sadece ON, OS ve ONS gruplarında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlendi ($p<0.01$) (Grafik 2F). AST değerleri için NK grubu ile karşılaştırıldığında sadece OK ve ON gruplarında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlendi (Grafik 2G).

LH, FSH, Estradiol ve Testosteron ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmediği için paylaşılmamıştır. Ancak; IHC tekniği uygulanmış testis kesitleri, Testosteron seviyelerinin obezite ile düştüğüne ve uygulanan tedaviler sonrası artış gösterdiğine morfolojik bir kanıt olarak sunulabilir (Resim 3).

Oksidatif Stres Parametrelerindeki Değişimler: Karaciğer ve testisteki oksidatif stresi belirlemek adına yapılan katalaz enzimi (CAT), malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz enzimi değerleri ve standart sapmaları Tablo 5 ve Tablo 6'da gösterilmiştir.



Grafik 2. A) Kan glikozu ölçüm grafiği. B) Trigliserit ölçüm grafiği. C) HDL ölçüm grafiği. D) LDL ölçüm grafiği. E) Total kolesterol ölçüm grafiği. F) AST ölçüm grafiği. G) ALT ölçüm grafiği.

Tablo 5: Karaciğer oksidatif stres parametreleri

| Gruplar | CAT (U/mg) | GSH (U/mg) | GPx (U/mg) | MDA (M) |
|---------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| NK | 0.175±0.089 | 20.141±0.010 | 2.064±0.150 | 9.378±0.954 |
| NN | 0.170±0.123 | 25.393±0.024 | 1.214±0.460 | 14.131±2.538 |
| NS | 0.188±0.024 | 37.653±0.030 | 2.174±0.815 | 10.359±1.016 |
| NNS | 0.068±0.027 | 35.462±0.041 | 3.513±0.927 | 13.64±1.463 |
| OK | 0.044±0.032 | 6.692±0.022 | 1.019±0.491 | 16.43±6.931 |
| ON | 0.069±0.034 | 5.933±0.061 | 2.083±0.854 | 13.304±5.439 |
| OS | 0.066±0.024 | 7.284±0.058 | 0.882±0.677 | 18.187±6.941 |
| ONS | 0.029±0.021 | 12.84±0.033 | 1.996±0.835 | 15.242±3.559 |

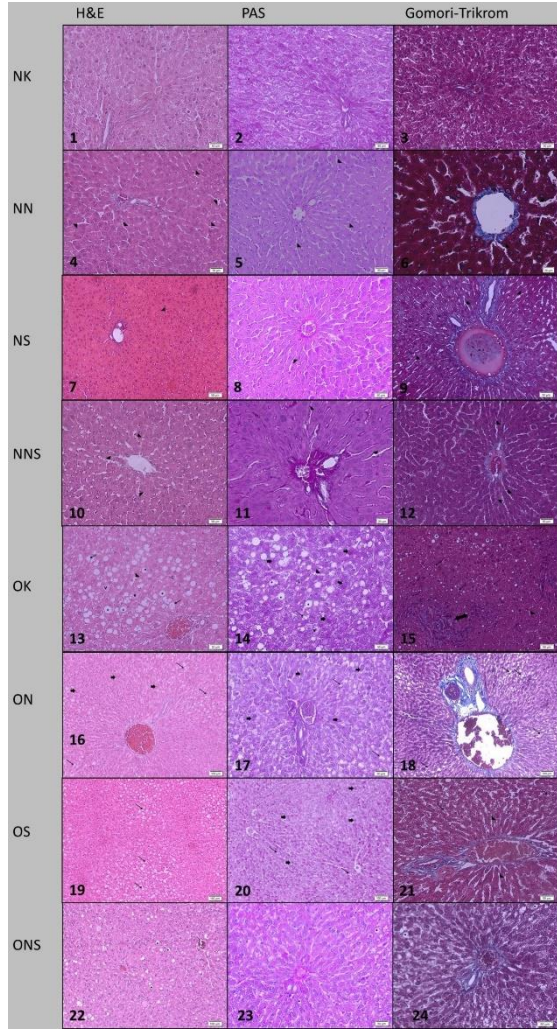
Tablo 6. Testis oksidatif stres parametreleri

| Gruplar | CAT (U/mg) | GSH (U/mg) | GPX (U/mg) | MDA (M) |
|---------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| NK | 0.018±0.007 | 22.543±0.027 | 0.655±0.427 | 5.038±1.133 |
| NN | 0.018±0.003 | 20.749±0.009 | 0.846±0.203 | 4.082±1.129 |
| NS | 0.022±0.005 | 25.523±0.008 | 1.22±0.151 | 6.536±1.478 |
| NNS | 0.022±0.009 | 17.832±0.008 | 1.377±0.507 | 5.141±1.198 |
| OK | 0.016±0.006 | 19.089±0.006 | 0.542±0.141 | 7.492±1.422 |
| ON | 0.016±0.005 | 14.559±0.010 | 0.741±0.196 | 3.462±0.466 |
| OS | 0.026±0.006 | 31.987±0.010 | 1.749±0.625 | 6.329±0.675 |
| ONS | 0.019±0.008 | 26.123±0.006 | 1.399±0.647 | 3.229±0.916 |

Karaciğer Dokusuna Ait Histokimyasal Bulgular: Yapılan ışık mikroskopisi incelemelerinde NK grubuna ait sıçan karaciğer kesitlerinde normal histolojik yapı gözlemlendi. Santral venler ve portal alanlar çevresinde düzgün dizilmiş remak kordonları ve normal yapıdaki sinüzoidler bulunmaktaydı. NN grubunda hafif derecede sinüzoidal dilatasyonun haricinde karaciğerin normal histolojik yapısı gözlemlendi. NS grubuna ait karaciğer dokularında hafif derecede sinüzoidal dilatasyonun haricinde karaciğerin normal histolojik yapısı gözlemlendi. NNS grubunda hafif derecede sinüzoidal dilatasyonun haricinde karaciğerin normal histolojik yapısı gözlemlendi. OK grubuna ait karaciğer dokularında obezitenin oluşması sebebiyle karaciğer yağlanması 3 derecede değerlendirildi. Normal kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; karaciğerlerde (yüksek yoğunlukta yağlanma

derecesi) olan 3+ yağlanma, mononükleer hücre infiltrasyonu, sinüzoidal dilatasyon, hepatosit sitoplazması içerisinde vakuoller dejenerasyon, organ genelinde geniş çaplı unilokuler yağ damlacıklarına ek olarak yer yer multilokuler yağ damlacıkları, hiperkromatik çekirdekler gözlemlendi. ON grubuna ait karaciğer dokularında, karaciğer asinüsünün zonl'inde yoğun olarak yağlanma gözlemlendi ve (orta dereceli yağlanma) 2+ yoğunlukta olduğu tespit edildi. OS grubuna ait karaciğer dokularında, obez kontrol grubunda gözlenen sitoplazmik vakuoller dejenerasyon yerini granüler dejenerasyona bırakmış. Sinüzoidal dilatasyonun hala devam ettiği görüldü. Yağlanma 2+ olarak tespit edildi. ONS grubuna ait karaciğer dokularında ise; yağlanma şiddeti bazı kesitlerde (düşük dereceli yağlanma) 1+ bazı kesitlerde ise 2+ olarak tespit edildi. Obezitenin oluşturulmuş olduğu diğer 3 grup

ile kıyaslandığında yağ veziküllerinin sayısı daha az olarak tespit edildi. Gruplara ait ışık mikroskopisi görüntüleri Resim 1’ de verilmiştir.



Resim 1. Karaciğerlerin histolojik analizi. 1, 2 ve 3) NK grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x200; PAS x200; Gomori-Trikrom x200). 4, 5 ve 6) NN grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x200; PAS x200; Gomori-Trikrom x400). 7, 8 ve 9) NS grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x200; PAS x200; Gomori-Trikrom x200). 10, 11 ve 12) NNS grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x200; PAS x400; Gomori-Trikrom x200). 13, 14 ve 15) OK grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x200; PAS x200; Gomori-Trikrom x200). 16,17 ve 18) ON grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x100; PAS x200; Gomori-Trikrom x100). 19,20 ve 21) OS grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x100; PAS x100; Gomori-Trikrom x200). 22, 23 ve 24) ONS grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x100; PAS x200; Gomori-Trikrom x200). Yıldız: Uniloküler yağ damlacıkları; Ok: Multiloküler yağ damlacıkları; Ok Başı: Sinüzoidal dilatasyon; İç Boş Ok Başı: Hiperkromatik çekirdek; V: Vakuoler dejenerasyon; Blok Ok: Granüler dejenerasyon. Çift Başlı Blok Ok: Mononükleer hücre infiltrasyonu.

Testis Dokularına Ait Histokimyasal Bulgular: NK grubuna ait testis dokularında, yapılan ışık mikroskopisi incelemelerinde normal kontrol grubuna ait sıçan testis dokularında herhangi bir hasar veya yapısal bozukluk gözlenmedi. Seminifer tübüller düzgün morfolojide olup spermatogenik seri

hücrelerinin sıralı varlığı açıkça aşağıda görülmektedir. Seminifer tübül bazal laminalarında ondülasyon, epitel içerisinde vakuolizasyon görülmüdü. İnterstiyel bağ doku ve kan damarları normal yapıdaydı. NN, NS ve NNS grubuna ait sıçan testis dokularının ışık mikroskopisi incelemelerinde, normal kontrol grubuna benzer bir yapı gözlemlendi ve herhangi bir hasar veya yapısal bozukluk tespit edilmedi. Yapılan ışık mikroskopisi incelemelerinde OK grubuna ait sıçan testis dokularında, bazı seminifer tübüller dejenere morfolojide olup spermatogenik seri hücrelerinin sıralı varlığının bozulduğu, uygulanan boyamalarda net bir şekilde tespit edildi. Seminifer tübül bazal laminalarında ondülasyon, seminifer tübül lümenine epitel hücre döküntüsü ve interstiyel alanda yağ vezikülleri ile kan damarlarında konjesyon saptandı. ON grubuna ait sıçan testis dokuları obez kontrol grubuna kıyaslandığında, dejenere tübüller daha az sayıdaydı. Tübül epiteli düzgün sıralı olup bazı tübüllerde vakuolizasyon görüldü. Seminifer tübül bazal laminalarında ondülasyon ve interstiyel alandaki kan damarlarında konjesyon görülmüdü. OS ve ONS gruplarına ait sıçan testis dokuları obez kontrol grubuna kıyaslandığında, dejenere tübüller daha az sayıdaydı. Tübül epiteli düzgün sıralı olup nadir vakuolizasyon görüldü. Seminifer tübül bazal laminalarında ondülasyon ve interstiyel alandaki kan damarlarında konjesyon görülmüdü. Gruplara ait ışık mikroskopisi görüntüleri Resim 2’ de verilmiştir.

Testis Dokusu İmmünohistokimyasal Bulgular: LHR/CGR aprimer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirmesi sonrası elde edilen ortalama, standart sapma maksimum ve minimum değerler Tablo 7’de ve Grafik 3’te verilmiştir. İmmünohistokimyasal boyamalar sonucu elde edilen histolojik resimler Resim 3’de verilmiştir.

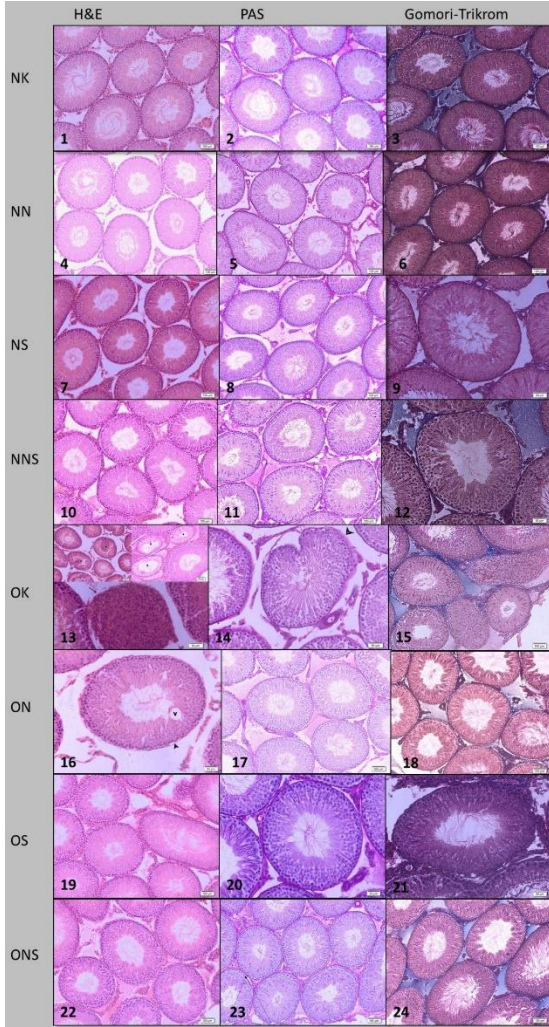
Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması Bulguları: Her bir gruba ait örneklerde yapılan Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması sonuçlarına göre elde edilen veriler Grafik 4’te verilmiştir.

Sperm Morfolojik Bulguları: Spermac stein boyama kiti kullanılarak hazırlanan yayma preparatlardan elde edilen histolojik görüntüler Resim 4’te verilmiştir.

Sperm Parametreleri: Sperm morfolojileri Kruger ve ark (1986)’na göre yapıldı (14). Sperm motilite değerlendirmesi Tablo 8’de ve Kruger morfoloji bulguları Tablo 9’da verilmiştir.

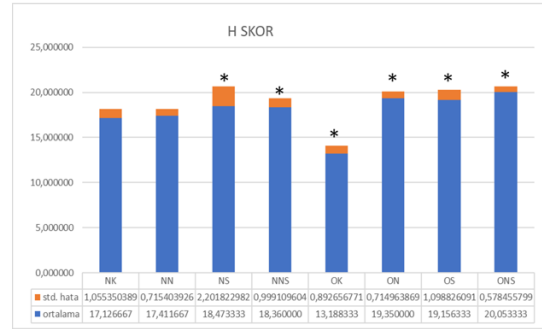
Tartışma

Obezite vücutta kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, gastrointestinal sistem, genitoüriner sistem gibi çok geniş bir etki alanına sahiptir. Obezite ve sebep olduğu hastalıklar dünya çapında araştırmacıların ilgi duyduğu bir alan olmuştur (15,16). Deney hayvanları üzerinde obezite modeli oluşturmak amacıyla; yüksek yağlı diyet

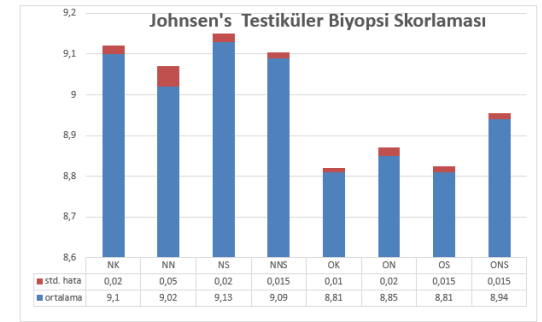


Resim 2. Testis histolojik analizi. 1, 2 ve 3) NK grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x100; PAS x100; Gomori-Trikrom x100). 4, 5 ve 6) NN grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x100; PAS x100; Gomori-Trikrom x100). 7, 8 ve 9) NS grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x100; PAS x100; Gomori-Trikrom x200). 10, 11 ve 12) NNS grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x100; PAS x200; Gomori-Trikrom x200). 13, 14 ve 15) OK grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x100; PAS x200; Gomori-Trikrom x100). 16,17 ve 18) ON grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x200; PAS x100; Gomori-Trikrom x100). 19,20 ve 21) OS grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x100; PAS x200; Gomori-Trikrom x200). 22, 23 ve 24) ONS grubuna ait karaciğer kesitinin görünümü (sırasıyla H&E x100; PAS x100; Gomori-Trikrom x100). Yıldız: Dejenere Tübül Epiteli; Ok: Dejenere Tübül; Ok başı: Bazal lamina öndülasyonu; V: Vakuolizasyon.

(HFD), yüksek sükrözlu diyet (HSD), yüksek fruktozlu diyet (HFD) gibi çeşitli diyet modelleri uygulanmaktadır. Ayrıca yüksek yağlı diyetin; yüksek yağlı- yüksek fruktozlu diyet (HFHFD/HFD), yüksek yağlı- yüksek sükrözlu diyet (HFHSD) yüksek yağlı yüksek glukozlu diyet (HFHGD) ve bunların trans yağlı modifikasyonları da obezite oluşturmak için uygulanmaktadır (17-20).



Grafik 3. LHR/CGR primer antikorunu kullanarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirilmesi. *OK grubu ile NS (p=0.40), NNS (p=0.47), ON (p=0.009), OS (p=0.013), ONS (p=0.03) grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık



Grafik 4. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması Bulguları

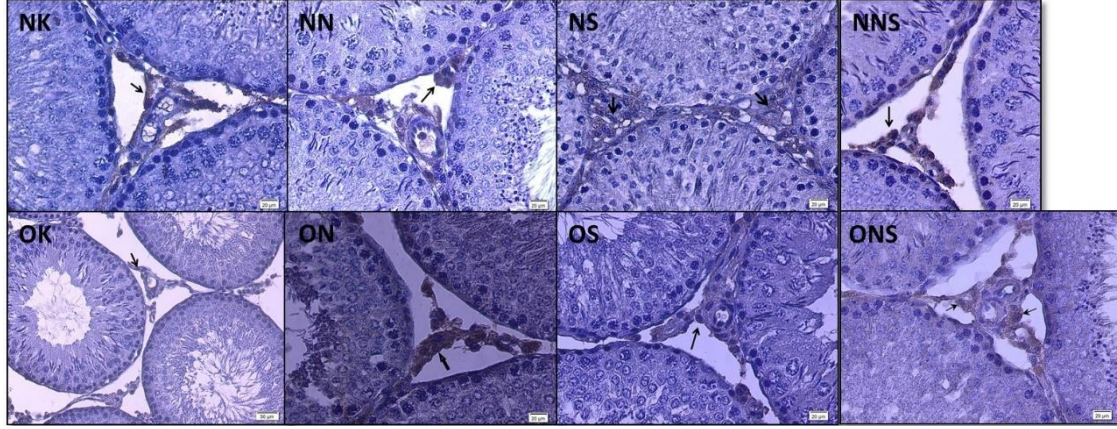
Tablo 7. LHR/CGR primer antikorunu kullanarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirilmesi (n=6)

| Antikor (LHR/CGR) | Ortalama± SS (Min.-Max.) |
|-------------------|------------------------------|
| NK | 17.126667±2.58 (12.11-19.10) |
| NN | 17.411667±1.75 (14.50-19.24) |
| NS | 18.473333±5.39 (12.40-27.00) |
| NNS | 18.360000±2.44 (15.21-21.11) |
| OK | 13.188333±2.18 (10.78-17.29) |
| ON | 19.350000±1.75 (17.51-22.11) |
| OS | 19.156333±2.69 (16.78-24.00) |
| ONS | 20.053333±1.41 (18.75-22.40) |

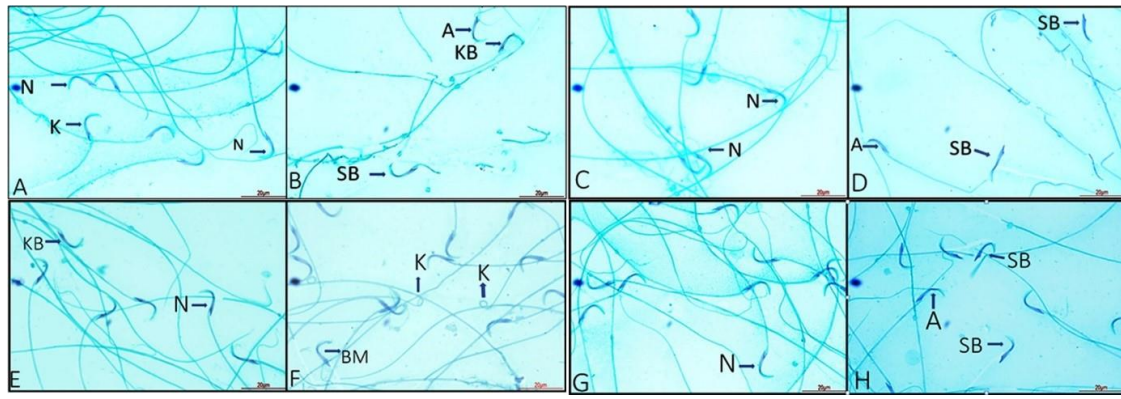
Çeşitli birçok obezite çalışmasında Sprague-Dawley cinsi albino sıçan tercih edilmiştir (1,16,21,22). Ancak Miranda ve ark (2018) yapmış oldukları çalışmada HFD ile indüklenmiş obeziteye yatkınlık açısından, Wistar cinsi albino sıçanlar ile Sprague-Dawley cinsi albino sıçanları karşılaştırmışlar. Sonuç olarak metabolik ve moleküler yönleriyle gerek yağ birikimi gerekse genetik açıdan Wistar cinsi sıçanların obezite çalışmalarına daha uygun olduğunu bulmuşlar.

Diyet modelinin dışında genetiği değiştirilmiş model organizma tercihleri de obezite çalışmalarında karşımıza çıkmaktadır. ob/ob ve db/db fareler; Zucker sıçan olarak da bilinen fa/fa sıçanlar çokça tercih edilmektedir (23-25).

Çalışmamızda erişkin obezitesinin etkilerini hedeflediğimiz için üreme kabiliyetini teorik olarak kazanmış Sprague-Dawley cinsi 100 günlük erkek ratlar kullandık. Obezite ile karakterize olan insan



Resim 3. LHR/CGR primer antikorunu kullanarak yapılan boyama sonrası elde edilen histolojik görüntüler immün pozitif boyanan Leydig hücreleri ok ile gösterilmiştir.



Resim 4. Krugere göre sperm stain boyama morfoloji sonuçları: N: Normal; A: Amorf Baş; KB: Küçük Baş; BM: Boyun Mibple; K: Kuyruk; SB: Serbest Baş.

Tablo 8. Spermiyogram bulguları: *grup 2 ile grup 3 arasında ml sperm sayısında anlamlı farklılık ($p<0.05$), ** grup 2 ile grup 3 arasında Total sperm sayısında anlamlı farklılık ($p<0.05$), *** kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki total motil sperm sayısı arasındaki anlamlı farklılık ($p<0.05$) gözlemlendi. + grup 1 ile grup 8 arasında ileri hızlı sperm yüzdesi arasındaki anlamlı farklılık ($p<0.05$), ++ kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki yavaş ileri sperm yüzdeleri arasındaki anlamlı farklılık ($p<0.05$), +++ grup 1 ile grup 5 arasında yerinde hareketli sperm yüzdesi arasındaki anlamlı farklılık ($p<0.05$) tespit edildi.

| Grup | mL Sperm | Total Sperm | Total Hareket % | +4% | +3% | +2 % | +1 % |
|------|--------------|---------------|-----------------|--------|----------|-------|-----------|
| NK | 34400000.00 | 68800000.00 | 60.00*** | 14.80+ | 45.20 ++ | 6.60 | 33.40 +++ |
| NN | 44428571.43* | 88857142.86** | 55.71 | 12.86 | 42.86 | 7.14 | 37.14 |
| NS | 11200000.00* | 22400000.00** | 18.00*** | 1.40 | 16.60 ++ | 11.00 | 71.00 |
| NNS | 27400000.00 | 54800000.00 | 34.00 | 4.00 | 30.00 | 16.00 | 50.00 |
| OK | 21400000.00 | 42800000.00 | 19.00*** | 4.00 | 15.00x | 7.80 | 75.20 +++ |
| ON | 30625000.00 | 61250000.00 | 48.75 | 14.00 | 34.75 | 9.63 | 41.63 |
| OS | 26000000.00 | 52000000.00 | 22.50*** | 2.40 | 20.10 ++ | 9.00 | 58.50 |
| ONS | 23875000.00 | 47750000.00 | 19.38*** | 0.63+ | 18.75++ | 13.13 | 55.00 |

Tablo 9. Kruger'e göre morfoloji bulguları

| Grup | Normal | Amorf baş | Büyük baş | Küçük baş | Uzun baş | Çift baş | Boyun mibple | Kuyruk | Sitoplazmik droplet | Serbest baş |
|------|--------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|--------------|--------|---------------------|-------------|
| NK | 12.40* | 33.60 | 7.00 | 2.00 | 3.00 | 2.00 | 21.00 | 9.00 | 5.00 | 6.00 |
| NN | 10.14 | 26.14 | 6.71 | 6.43 | 0.00 | 5.71 | 22.86 | 16.29 | 5.71 | 0.00 |
| NS | 1.80* | 35.00 | 5.00 | 4.20 | 0.00 | 3.80 | 26.20 | 10.00 | 10.00 | 2.00 |
| NNS | 7.20 | 36.00 | 4.60 | 5.20 | 0.00 | 4.00 | 23.00 | 8.80 | 5.00 | 6.00 |
| OK | 1.20* | 46.60 | 7.60 | 2.80 | 0.00 | 5.00 | 17.80 | 12.00 | 3.00 | 3.00 |
| ON | 4.50 | 34.25 | 1.88 | 0.63 | 0.00 | 8.75 | 30.75 | 11.00 | 7.00 | 1.25 |
| OS | 2.60* | 29.00 | 4.30 | 3.00 | 1.00 | 3.20 | 31.10 | 7.40 | 1.70 | 4.70 |
| ONS | 2.63* | 39.00 | 2.50 | 1.25 | 0.00 | 5.00 | 25.13 | 12.50 | 7.75 | 3.75 |

hastalıkları (hiperlipidemi, insülin direnci vb) fenotipini oluşturması sebebiyle yüksek yağlı diyet (HFD) tercih ettik. Se ve NAC'ın obeziteye etkisini incelemek için her bir deney hayvanının vücut, karaciğer ve testis ağırlıkları ölçüldü. Bu organların ışık mikroskopisi incelemeleri, oksidatif stres analizleri ve serum biyokimya parametre analizleri gerçekleştirildi. Ek olarak obezitenin ve uygulanan ajanların fertilité üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla sperm parametre analizleri yapıldı. Literatürü incelediğimizde HFD uygulanmış sıçanlarda hem vücut ağırlıklarının hem de karaciğer ağırlıklarının normal diyetle beslenenlere göre arttığını görmekteyiz (1,16,21,26). Rölatif karaciğer ağırlığı bulgularımız, Yao ve ark (2015)'nin yaptıkları çalışma ile uygunluk göstermektedir. Testis ağırlıkları incelendiğinde gruplar arası bir farklılık olmaması Tufek ve ark (2015)'nin yaptıkları çalışma ile uyumlu değildi. Ancak Punhagui ve ark (2018) ile Vendramini ve ark (2014)'nin bulgularıyla rölatif ağırlık değerlerimiz uyumludur. Seminifer tübüllerde epitel hasarını incelediğimizde, dejenere tübüllerin, lümene spermatogenik seri hücre döküntüsünün, bazal lamina ondülasyonunun ve kan damarı konjesyonunun en yoğun görüldüğü grup OK grubuydu. Normal grupların yapısı incelendiğinde ise herhangi bir hasar bulgusu gözlenmemişti. Obez tedavi gruplarını incelediğimizde ise dejenere tübül sayısının çok azaldığını gözlemlemiştik ve bazı tübüllerde vakuoller tespit etmiştik. Bu iki hasarın haricinde tedavi grubu testisleri sağlıklı bir görünümdeydi. Obezite üzerine yapılan birçok çalışma bulgularımızı destekler niteliktedir. Obezitenin seminifer tübül üzerindeki etkileri; tübül dejenerasyonu, spermatogenik seri hücre sayısında azalma, vakuolizasyon, bazal lamina ondülasyonları, ödem, sertoli ve leydig hücrelerinin sayıca azalması, sertoli hücresi ile spermatogenik hücreler arası adezyonun azalması ve bunu sonucunda lümene spermatogenik hücrelerin dökülmesi olarak sıralanabilir (27-31). Yan ve ark (2015)'nin belirttiği gibi obezite, leydig ve sertoli hücre apoptozunun normale göre artmasına sebep olmaktadır. Bu artan apoptozis tübül yapısını bozmakta ve sperm üretiminin azalmasına neden olmaktadır (31). Ayrıca obezite ile birlikte artan leptin seviyesi erkeklerde androjen eksikliğine sebep olmaktadır. Leptinin endokrin veya parakrin dolaşımı, HPG aksı üzerinden ya da doğrudan leydig hücrelerini etkileyerek testosteronu azaltmakta ayrıca insülin direnci ile metabolik sendroma yol açmaktadır (28,31). Hamza ve AL- Harbi (2014)'nin yapmış oldukları çalışmada, monosodyum glutamat (MSG) ile oluşturdukları testis hasarına karşı selenyum ve vitamin E'nin koruyucu etkisini incelemişler. Normal selenyum grubunda, sperm oluşumuna kadar düzgün sıralı spermatogenik hücre katmanları ile kaplı tübül yapısı gözlemlemişler. MSG+Se uygulanmış grupta ise MSG'li grubun aksine makul

miktarda sperm ve spermatogenik hücrelerin sıralandığı düzgün bir tübül yapısı gözlenmiş. Bu araştırmacılar, selenyumun antioksidan enzimlerin aktivitesini artırıcı özelliğinden dolayı hasara karşı koruyucu olarak çalıştığını belirtmişler (32). Bu çalışmayı göz önüne alırsak Se uyguladığımız gruplardaki düzelmenin literatüre uygun olduğunu söyleyebiliriz. Asadpour ve ark (2013)'nin yapmış oldukları çalışmada, kurşun asetat uygulamasına karşılık NAC, vitE ve sarımsak ekstraktının koruyucu etkisini incelemişler. NAC'ın kurşun asetatın oluşturduğu testiküler hasara karşı iyi bir koruyucu olmadığını saptamışlar. Ancak epididimal sperm sayısını kontrole yakın bir değere artırdığını bulmuşlar. NAC'ın antioksidan özelliğinin testiküler hasardan çok, sperm parametreleri üzerinde etkili olduğunu belirtmişler (33). İmmünohistokimyasal boyama için hedeflediğimiz LH reseptörünün varlığını OK grubu haricinde tüm gruplarda orta dereceli olarak saptadık. OK grubunda gözlenen hafif dereceli boyanmanın sebebinin Yan ve ark (2015)'nin çalışmalarında belirttikleri üzere leydig hücre sayısının azalması olduğu kanaatindeyiz (32). Leydig hücrelerindeki bu azalma, Lu ve ark (2003)'na göre obezite ile artan serbest yağ asitlerinin leydig hücre sağ kalımını baskılaması ve apoptoza zorlaması nedeniyle meydana gelmektedir (30). Çalışmamızın karaciğer histolojisi üzerine etkilerini incelediğimizde, NK grubu beklediği üzere sağlıklı bir görünümdeydi. NN-NS-NNS gruplarında ise hafif dereceli sinüzoidal dilatasyon mevcuttu. Amraoui ve ark (2018)'nin yaptıkları çalışmada bisfenola-A ile indüklenmiş oksidatif strese karşı nötral antioksidanlar olan selenyum ve vit E'yi birlikte uygulanarak düzenleyici etkileri incelenmiş. Sadece antioksidan verdikleri grupta hafif dereceli enflamatuar hücre infiltrasyonu gözlenmiş (21). Obez gruplar incelendiğinde OK grubunda mononükleer hücre infiltrasyonu, 3+ yağlanma, sinüzoidal dilatasyon, yoğun miktarda uniloküler yağ damlacıkları ve vakuolar dejenerasyon gözlemlemiştik. ON- OS gruplarında 2+ yağlanma, granüler dejenerasyon ve multiloküler yağ damlacıklarını tespit etmiştik. ONS grubunda ise bazı karaciğerlerde 1+ bazı karaciğerlerde ise 2+ olmak üzere farklı derecelerde yağlanmaya ek olarak az sayıda ancak uniloküler yapıdaki yağ damlacıklarını gözlemlemiştik. Gomori- trikrom boyaması ile tüm gruplarda herhangi bir bağ dokusu artışı gözlemlemedik. Li ve ark (2016), Yao ve ark (2015), Niu ve ark'nin (2015), yaptıkları çalışmalarda obezite ile birlikte karaciğerde lipit vezikülleri, inflamasyon, antioksidan enzimlerin azalması gibi bulguları bizim çalışmamızla örtüşmektedir (1,25,34). Obezitede alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması sonucu, karaciğere gelen lipit miktarı karaciğerden sekrete edilen lipit miktarından fazladır. Karaciğerdeki lipit dengesinin bu şekilde bozulması, de novo lipogenez ve insülin direnci sonucu lipolizisin baskılanması sebepleriyle

karaciğer yağlanması meydana gelmektedir. Karaciğer steatozisi lipotoksositeye, pro-enflamatuar sitokinlerin salınımına, bunlarda karaciğerde apoptoz, nekroz, oksidatif hasar ve enflamasyona sebep olmaktadır (27,32,33). Ozkol ve ark (2016)'nın yaptıkları çalışmada EtOH ile oluşturdukları karaciğer hasarında vit E, Se ve NAC'ın koruyucu etkisini incelemişler. EtOH'ın oluşturduğu hücrel hasarda en büyük rolün oksidatif strese ait olduğunu ve bunun yanında çeşitli serum enzimlerinin artıp, antioksidan moleküller ve enzimlerin azaldığını tespit etmişler. Kullandıkları antioksidan moleküller sayesinde, EtOH'ın karaciğerde oluşturduğu hipopik dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu gibi histopatolojik bulgulara ek olarak diğer biyokimyasal parametreleri de iyileştirdiklerini ifade etmişler (35). Kim ve ark (2012)'nin OLETF sıçan modeli kullanarak yaptıkları obezite çalışmasında, Se tedavisinin karaciğer yağlanmasını baskıladığı hem genetik hem de histolojik yöntemlerle gösterilmiş. Se'nin glukoz ve yağ metabolizması üzerindeki etkilerinin adiponektini artırması, yağ asitlerinin β -oksidasyonunda görev alan genleri aktive etmesi ve antioksidan özelliği ile oksidatif hasarı azaltması olduğunu belirtmişlerdir (35). Uzun ve ark (2009)'nın yaptıkları NAFLD çalışmasında NAC'ın karaciğer rejenerasyonu üzerine olan etkilerini incelemişler. NAC hem bir antioksidan özellikli bir madde hem de GSH prekürsörü olması sebebiyle karaciğer rejenerasyonunu artırdığını tespit etmişler (36). Obezite ile birlikte artan enerji alımı kaynaklı artan adipozite, enflamasyon ve oksidatif stres insülin direncine sebep olmaktadır. İnsülin direnci ile kanda artan insülin hormonu adipoz dokuda lipolizi baskılamaktadır. Ayrıca karaciğere glukoz girişinin düzenlenmesini ve glikojenolizi bozarak glukoz metabolizmasını bozmaktadır. İnsülin direnciyle glikojenoliz ve ardından da glukoneogenizin baskılanamaz ve sonuçta serum glukoz seviyesinin artışı ortaya çıkar. Ayrıca karaciğerde yeniden esterleşme ve de novo lipogenezi artırarak, karaciğerin lipit birikimini indüklemektedir. Ek olarak artan bu lipit sentezi serum lipit değerlerindeki artışın nedenidir (37). Serum lipitlerinin artması ile birlikte TG, TC, LDL artarken HDL azalmaktadır (21,34) Çalışmamızda obez gruplarda normallere göre; serum glukoz, TG, TC ve LDL değerlerinin yüksek; HDL değerlerinin ise düşük olması literatür ile uyumludur (14,25). Se ve NAC uyguladığımız gruplardaki değişiklikler ise daha önce bahsettiğimiz gibi bu moleküllerin antioksidan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Serum MDA değerlerini incelediğimizde, karaciğerde OS grubunda; testiste OK grubunda diğer gruplara göre yüksek MDA seviyesi tespit etmiştik. Oksidatif stres biyobelirteci olan MDA'daki bu artış oksidatif hasarın göstergesidir (21). Yapılan çeşitli çalışmalarda Se uygulamasının MDA değerlerini

düşürücü etkisi olduğunu belirtilmektedir ancak yaptığımız çalışmada OS grubu karaciğerlerinde OK grubundan daha yüksek MDA değerine sahip olması, Se'nin çalışmamızda etkisiz kaldığı olarak yorumlanabilir. ON ve ONS gruplarında ise NAC'ın MDA üzerindeki indirgeyici etkisi sayesinde değerlerin düşmüş olduğunu görmekteyiz. Testis MDA değerleri literatür ile uyumluluk göstermektedir (34). GPX değerlerimizi incelediğimizde OK grubunda azalma olması literatür ile uyumludur (21). Karaciğer NNS ve ONS gruplarında ve testis NS-NNS ile OS-ONS gruplarındaki GPX artışı ise NAC ve Se'un GPX oluşumunda rol oynamaları olduğunu düşünmekteyiz. GSH değerlerimizi incelediğimizde tedavi gruplarında kontrollere göre artış gözlenmiştir. Hem normallerde hem de obezlerdeki bu değişim Se ve /veya NAC'ın antioksidan molekül olan GSH'ın yapımında rol almalarından kaynaklıdır. Moreno-Fernandez ve ark (2018)'nin yaptıkları çalışmada obezite oluşturdukları grupların karaciğer GSH değerlerini normal grup sıçanların karaciğer GSH değerleri ile kıyasladıklarında daha yüksek olduğunu gözlemlemişler (33). Obezite ile birlikte artan oksidatif strese karşı hücrel yanıt sayesinde GSH değerlerinin arttığını ifade etmişler. Ayrıca bulgularımızı incelediğimizde karaciğer hasar belirteci olan MDA değerlerinin obez gruplarda en az ON grubunda olduğunu görmüştük. GSH değerlerinin de ON grubunda azalmasının sebebi olarak bu gruptaki hasarın diğer gruplara göre daha hızlı tedavi edildiği şeklinde yorumlayabiliriz. Testis değerleri için de yine benzer bir durum söz konusudur. CAT enzimi aktivite değerlerimizi incelediğimizde, NNS grubu değerleri NK grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük çıkmıştı. Tüm obez grupların değerleri de NK grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü. Hem normal hem de obez gruplardaki, Se veya NAC uyguladığımız gruplarda da kendi kontrollerinden belirgin bir şekilde farklı bir değere sahip olmadıkları görülmekteydi. Bu durumda, Se ve NAC'ın hem ayrı ayrı hem de birlikte uygulamalarının CAT enzim aktivitesinin güçlendirilmesinde etkili olmadıklarını söyleyebiliriz. Ozkol ve ark (2016)'nın yaptıkları çalışmada da belirttikleri üzere CAT enzimi hidrojen peroksit detoksifikasyonundan sorumludur. Se ve NAC uyguladıkları gruplarda, bu ajanların CAT değerlerini bizdeki gibi, bir miktar artırdığını ancak NK grubundan yine de belirgin olarak düşük olduğunu gözlemlemişler (21). Bunun nedeninin CAT'ın, EtOH toksifikasyonu sonucu artan ROS'ları temizlemekte olmasından kaynaklı olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda karaciğer hasar belirteci olarak görev alan ve rutinde de bakılan AST ve ALT enzim değerleri, bir diğer karaciğer hasar belirteci olan MDA değerlerinden oldukça farklı çıkmıştır. Bunun sebebinin, AST ve ALT ölçümleri esnasında cihaz kaynaklı bir hatadan

dolayı olduğunu düşünmekteyiz. Aynı şekilde serum LH ve FSH değerlerinin cihaz tarafından belirlenememesi sebebiyle bu hormonlar hakkında da herhangi bir değerlendirme yapamıyoruz. Fan ve ark (2015) belirttiği gibi obezite sonucu artan aromataz enzim aktivitesinden sonucu testosteron (T) seviyesi düşer (38). Aromatizasyon sonucu T, E2'ye dönüştürülür. Jallouli ve ark (2016)'nın yapmış oldukları çalışmada, NAC uygulamasının testosteron artışına sebebiyet verdiğini gözlemlemişler (39). Araştırmacılar NAC'ın testosteron artırıcı etkisinin sebebini hem doğrudan hücre membranından geçip bir antioksidan gibi çalışmasına hem de GSH prekürsörü olmasına bağlamışlardır. Liu ve ark (2017)'nin yaptıkları çalışmada farklı dozlarda uygulanan selenyumun üreme performansına etkisine bakmışlar. 0,8 mg/kg/gün olarak iki hafta boyunca Se uyguladıkları grupta kontrole oranla testosteron seviyesinde artış gözlemlemişler (18). Testosteron seviyesindeki bu artışın Se'nin GPX'i artırmasından kaynaklı olduğunu belirtmişlerdir. Bizim de testiküler GPX seviyesi incelendiğinde, tüm Se uygulanmış gruplarda yüksek olduğu görülmektedir. Sperm parametrelerini WHO 2010 kriterlerine göre incelediğimizde, NS grubunda beklenenden daha az sayıda sperm bulmuştuk. NK grubu ile karşılaştırdığımızda OK grubunda sperm sayı ve motilite değerlerinin düşük olduğunu gözlemlemiştik. Se uygulamasının hızı olumlu yönde etkileyerek hızı artırmasını beklemiştik ancak literatüre baktığımızda Se toksikasyonunda oluşmaya başlayan bir durum ile karşılaşmaktayız (40). Kullandığımız doz literatürde toksik doz olmasa da uzun süreli kullanmamız sebebiyle spermelerde toksikasyona sebep olmuş olabilir. Obez grup morfolojik verileri incelendiğinde OK'ya göre daha iyi morfolojide oldukları ancak NK grubuna göre ise anlamlı derecede düşük oldukları bulunmuştu. Gruplarda amorf başa sahip sperm sayısının çok fazla olduğunu görüyoruz.

Sonuç olarak, obezite ile birlikte glukoz ve yağ metabolizmasının bozulması karaciğerlerde yağlanmaya ve serum lipit değerlerinde artışına ve yağ dokusundan bol miktarda adipositokin salgılanmasına sebep olmaktadır. Bu oluşan oksidatif stres tüm organizmayı etkilediği gibi testis dokusu ve beraberinde sperm üretimini de etkilemektedir. Bu etkileşim ile testosteron hormon seviyesi azalmakta fertilitite kaybı meydana gelmektedir.

Etik Kurul Onayı: Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 64583101/2017/003 sayılı yazısı ile onay alınmıştır.

Kaynaklar

1. Li M, Ye T, Wang X-X ve ark. Effect of octreotide on hepatic steatosis in diet-induced obesity in rats. PLoS ONE.2016;11(3):E0152085.

2. Huh JH, Kim KJ, Kim SU ve ark. Obesity is more closely related with hepatic steatosis and fibrosis measured by transient elastography than metabolic health status. Metabol Clin Exper. 2017;66:23-31.

3. Li S, Meng F, Liao X ve ark. Therapeutic role of ursolic acid on ameliorating hepatic steatosis and improving metabolic disorders in high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease rats. PLoS ONE. 2014;9(1):e86724.

4. Erdemir F. Obezite ve erkek infertilitesi. J Clin Analytical Med. 2013;4(1):76-82.

5. Özgür B, Eroğlu M. Obezite ve infertilite. Androloji Bült. 2012;254-7.

6. Özata M, Yılmaz İ, Mergen M, Öktenli Ç, Aydın A. Erkek hipoçinkonemi. Turk J Endocrinol Metab. 2003;2:47-51.

7. Ersoy O, Köseoğlu H. Karaciğer hastalıklarının N-asetil sistein kullanımı. Güncel Gastroenterol. 2014;18(1):119-24.

8. Akşit H, Akşit D, Bildik A ve ark. Deneysel karaciğer intoksikasyonunda N-asetil sistein'in glutatyon metabolizması ve lipid peroksidasyonuna etkileri. Ankara Univ Vet Fak Derg. 2015;62:1-5.

9. Ciftci H, Verit A, Savas M, Yeni E, Erel O. Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status. Urology. 2009;74(1):73-6.

10. Nazıroğlu M, Çay M. Protective role of intraperitoneally administered vitamin E and selenium on the antioxidative defense mechanisms in rats with diabetes induced by streptozotocin. Biol Trace Elem Res. 2001;79:149-59.

11. Dkhal MA, Zrieq R, Quraish SA ve ark. Moneim selenium nanoparticles attenuate oxidative stress and testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Molecules. 2016;21:1517.

12. Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys. 1968;125(1):180-98.

13. Beutler E, Dubon O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med. 1963;61:882-8.

14. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS ve ark. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril. 1986;46(6):1118-23.

15. Huang H, Yan Z, Chen Y ve ark. A social contagious model of the obesity epidemic. Scientific Reports. 2016;6:37961.

16. Sayin FK, Buyukbas S, Basarali MK ve ark. Effects of silybum marianum extract on high-fat diet induced metabolic disorders in rats. Pol J Food Nutr Sci. 2016;66(1):43-50.

17. Moreno-Fernández S, Garcés-Rimón M, Vera G ve ark. High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. Nutrients. 2018;10(10):1502.

18. Liu F, Wang X, Shi H ve ark. Polymannuronic acid ameliorated obesity and inflammation associated with a high-fat and high-sucrose diet by modulating the gut microbiome in a murine model. Br J Nutr. 2017;117(9):1332-42.

19. Amri Z, Ghorbel A, Turki M ve ark. Effect of pomegranate extracts on brain antioxidant markers and cholinesterase activity in high fat-high fructose diet induced obesity in rat model. BMC Complement Altern Med. 2017;17(1):339.

20. Van Herck MA, Vonghia L, Francque SM. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease-a starter's guide. Nutrients. 2017;9(10):1072.

21. Yao X, Lin Z, Jiang C ve ark. Cyclocarya paliurus prevents high fat diet induced hyperlipidemia and obesity in Sprague-Dawley rats. Can J Physiol Pharmacol. 2015;93(8):677-86.

22. Gurung S, Agbaga M-P, Myers DA. Cognitive differences between Sprague-Dawley rats selectively bred for sensitivity or resistance to diet induced obesity. Behav Brain Res. 2016;311:122-30.

23. Ahmad A, Ali T, Kim MW ve ark. Adiponectin homolog novel osmotin protects obesity/diabetes-induced NAFLD by upregulating Adipors/Ppara signaling in Ob/Ob and Db/Db transgenic mouse models. Metabolism. 2019;90:31-43.

24. Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: Rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. Hepatology. 2001;34(1):13-8.

25. Niu S, Wang L, He M ve ark. Exendin-4 regulates redox homeostasis in rats fed with high-fat diet. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2015;47(6):397-403.
26. Punhagui APF, Teixeira GR, de Freitas MC ve ark. Intermittent resistance exercise and obesity, considered separately or combined, impair spermatid parameters in adult male Wistar rats. *Int J Exp Pathol*. 2018;99(2):95-102.
27. Li B, Zhang C, Zhan YT. Nonalcoholic fatty liver disease cirrhosis: A review of its epidemiology, risk factors, clinical presentation, diagnosis, management, and prognosis. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018;2018:2784537
28. Miao XL, Gao GM, Jiang L ve ark. Asiatic acid attenuates high-fat diet induced impaired spermatogenesis. *Exp Ther Med*. 2018;15(3):2397-403.
29. Vendramini V, Cedenho AP, Miraglia SM ve ark. Reproductive function of the male obese Zucker rats: Alteration in sperm production and sperm DNA damage. *Reprod Sci*. 2014;21(2):221-9.
30. Lu ZH, Mu YM, Wang BA ve ark. Saturated free fatty acids, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis by stimulation of ceramide generation in rat testicular leydig cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303(4):1002-7.
31. Yan WJ, Mu Y, Yu N ve ark. Protective effects of Metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(7):1097-104.
32. Hamza RZ, Al-Harbi MS. Monosodium glutamate induced testicular toxicity and the possible ameliorative role of vitamin E or selenium in male rats. *Toxicol Rep*. 2014;1:1037-45.
33. Amraoui W, Adjabi N, Bououza F ve ark. Modulatory role of selenium and vitamin E, natural antioxidants, against Bisphenol A-induced oxidative stress in Wistar Albinos rats. *Toxicol Res*. 2018;34(3):231-9.
34. Asadpour R, Shahbazfar AA, Kianfard D ve ark. Comparison of the protective effects of garlic (*Allium sativum* L) extract, vitamin E and N acetyl cystein on testis structure and sperm quality in rats treated with lead acetate. *Rev Med Vet (Toulouse)*. 2013;164(1):27-33.
35. Ozkol H, Bulut G, Balahoroğlu R ve ark. Protective effects of selenium, N acetylcysteine and vitamin E against acute ethanol intoxication in rats. *Biol Trace Elem Res*. 2017;175(1):177-85.
36. Uzun MA, Koksall N, Kadioglu H ve ark. Effects of N-acetylcysteine on regeneration following partial hepatectomy in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Surg Today*. 2009;39(7):592-7.
37. Titchenell PM, Lazar MA, Birnbaum MJ. Unraveling the regulation of hepatic metabolism by insulin. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28(7):497-505.
38. Fan Y, Liu Y, Xue K ve ark. Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0120775.
39. Jallouli M, El Bini Dhouib I, Dhouib H ve ark. Disruption of steroidogenesis after dimethoate exposure and efficacy of N-acetylcysteine in rats: an old drug with new approaches. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016;23(8):7975-84.
40. Dokras A, Playford M, Kris-Etherton PM ve ark. Impact of hormonal contraception and weight loss on high-density lipoprotein cholesterol efflux and lipoprotein particles in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017;86(5):739-46.