

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

Investigation on the Therapeutic Effect of the Fulvic Acid upon the Testicular Damage Occurred by the Water Avoidance Stress (WAS)

Cansu BAHÇIVAN¹, İbrahim SÖĞÜT², Canan HÜRDAĞ¹, Esra ÇIKLER-DÜLGER¹

ÖZET

Amaç: Çalışma, toksik olmayan bir ajan olan; antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özelliklere sahip fulvik asit (FA)'in 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 indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) immünohistokimya işaretlemeleri 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 kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

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

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is investigation on the therapeutic effects of a non-toxic agent that has antioxidant, antiapoptotic and anti-inflammatory properties fulvic acid upon the testicular damage occurred by water avoidance stress (WAS).

Material and Methods: 18 Sprague-Dawley male adult rats were distributed into 3 experimental groups: Control (C), Water Avoidance Stress (WAS) and Water Avoidance Stress+Fulvic Acid (WAS+FA). The histological sections obtained from the testes has been stained with the Hematoxylin&Eosin (H&E) and Toluidine Blue (TB) and zonula occludens-1 (ZO-1), and β-actin and inducible nitric oxide sentase (iNOS) immunochemistry labelling has been made to. Total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), oxidative stress (OSI), catalase (CAT), glutatyon peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) levels has been evaluated biochemically.

Results: In WAS group it was observed that damage of the seminiferous tubules, increased mast cell activity beneath the tunica albuginea, increased iNOS activity and decreased β-aktin and ZO-1 activity in the seminiferous tubules. It was also observed increased TOS and OSI levels and decreased TAS, SOD, CAT and GPx levels in the same group. Healing was observed in the results of KS+FA group with fulvic acid replacement.

Conclusion: Based on these findings, it has been concluded that fulvic acid may use as a therapeutic agent against testicular damage caused by chronic stress.

Keywords: Antioxidant; Infertility; Fulvic acid; Water avoidance stress; Oxidative stress.

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

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

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

İletişim:

Yüksek Biyolog Cansu BAHÇIVAN
Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Büyükdere Cad. No: 120, 34394

Esentepe Şişli/İSTANBUL

Tel: 05078293846

e-mail:

cansu_39_@hotmail.com

Geliş tarihi/Received: 07.05.2018

Kabul tarihi/Accepted:07.08.2018

DOI: 10.16919/bozoktip.421473

Bozok Tıp Derg 2018;8(4):60-8

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

Bu çalışma İstanbul Bilim Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (İBAPKO Karar No: 2016-01-16) tarafından desteklenmiştir.

GİRİŞ

Stres, organizmanın iç ve dış stres oluşturuca faktörlere karşı verdiği bir yanıttır. Stres faktörü, uzun süreli veya tekrarlayıcı olduğunda kronik bir hal alarak homeostazın bozulmasına yol açar (1). Kronik stres koşullarında, dokulardaki reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi artarak dokularda oksidatif stres oluşumuna neden olur. ROS'ların yüksek miktarlarının yaşlanma, infertilite, kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde rol oynadıkları bilinmektedir (2). ROS'ların çok düşük miktarları erkek üreme sisteminde spermatozoa olgunlaşması; sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon gibi pek çok önemli olayın düzenlenmesinde olumlu rol oynarken; kronik stres koşullarında olduğu gibi yüksek konsantrasyondaki ROS'lar ise toksik etkilerinden dolayı, sperm kalitesini ve buna bağlı olarak fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyerek infertilite patogenezinde yer alırlar (3).

Memeli testisleri, spermatositogenez ve spermiyogenez olaylarının gerçekleştiği seminifer tübüller ve bunların çevresindeki peritübüler ara dokudan meydana gelir. Seminifer tübüller içerisinde çeşitli gelişme ve farklılaşma evrelerindeki germ hücreleri ile sertoli destek hücreleri yer alır. Seminifer epitel, komşu 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 oluşan kan-testis bariyeri, spermatositogenez ve spermiyogenezin adlüminal alanda, ara dokudan izole olarak, tamamen steril bir şekilde gerçekleşmesini 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 dinamizmini bozarlar (6). Vücuttaki en sıkı kan-doku bariyerlerinden biri olan kan-testis bariyerinin geçirgenliğinin bozulması adlüminal alan içerisinde gelişimlerinin farklı evrelerindeki germ hücrelerinin apoptozunu uyararak spermatogenez sürecini olumsuz yönde etkiler. Spermatogenezin

bozulmasının en dramatik sonucu ise erkek infertilitesidir (7).

Normal koşullarda organizma, oksidatif stres ile başa çıkabilmek için genellikle hücre içi antioksidan sistemlerini aktive eder. Ancak kronik stres gibi koşullarda dokulardaki oksidatif stresin yüksek olması ve mevcut antioksidan düzeylerinin bu artış karşısında yetersiz kalması hücresel lipid, protein ve DNA'nın zarar görmesine yol açar (8). Hücre içi antioksidan sistemleri yetersiz kaldığında organizmanın oksidatif stres ile başa çıkabilmesi için tercih edilebilen yollardan biri antioksidan ajan replasmanıdır (9).

Ölüm sonrasında mikroskopik organizmalar yararlı maddelerin ayrıştırılmasını sağlarken diğer yandan birçok yararlı madde de açığa çıkar. Bu maddelerden biri toprakta bulunan humik maddedir. Humik maddeler suda çözünme özelliklerine göre: humik asit, fulvik asit ve humin olarak sınıflandırılabilirler (10). Humik maddenin tüm pH değerlerinde suda çözünebilir fraksiyonu olan fulvik asit bağırsaklardan 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 bağlandığı bölgelere bağlanarak gösterir. Yapılan çalışmalarda fulvik asitin özellikle SOD'a etki ederek antioksidan moleküllerin seviyesini yükselttiği bildirilmiştir (12).

Bu çalışmanın amacı, deneysel olarak hayvanlar üzerinde yaşamsal stresi taklit eden kronik sudan kaçınma stresinin testis dokusunda oluşturması beklenen oksidatif hasar üzerine fulvik asitin iyileştirici etkisi olup olmadığının araştırılmasıdır. Bu çalışma, kronik stresin yol açtığı testis hasarı üzerine fulvik asitin tedavi edici etkisinin araştırıldığı literatürde bilinen ilk çalışmadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları Deneylerde 250-300 gr ağırlığındaki erişkin Sprague-Dawley erkek sıçanlar 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 MEDİTAM'dan alındı ve deneysel çalışmalar 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 alıştırdı (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 boyandılar. H&E (Biooptica) ile boyanan kesitler X100, X400 büyütme ve TM (Biooptica) ile boyanan kesitler X1000 büyütmede Olympus BX53 ışık mikroskobu ile incelenip fotoğraflandılar.

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 işaretlemesi yapılacak kesitler iNOS primer antikorunda (1:200) (Thermo Fischer Scientific, Tavşan Poliklonal Antikor, LOT: QD213201) +4 \square 'de 24 saat boyunca; ZO-1 işaretlemesi yapılacak kesitler ZO-1 primer antikorunda (1:100) (Thermo Fischer Scientific, Tavşan Poliklonal Antikor, LOT: QD215365) oda sıcaklığında 1 saat boyunca ve β -aktin işaretlemesi yapılacak kesitler β -aktin primer antikorunda (1:100) (Thermo Fischer Scientific, Tavşan Poliklonal Antikor, LOT: RC2179435) +4 \square '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 fotoğraflandılar. 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

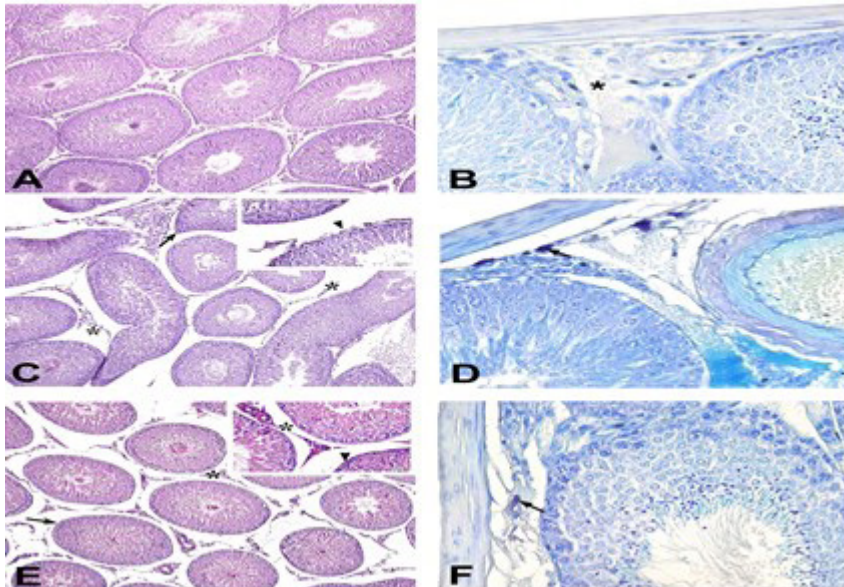
ELISA kitleri (Bioassay teknolojisi laboratuvarı, Şangay, Çin) ile tespit edildi.

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 spermatozoidlerde 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 miyoepitelyal hücreler dikkat çekti (Şekil 4B). KS+FA grubunda, hasarlı endotel hücrelerinde ve bazı spermatogenik seri hücrelerinde iNOS işaretlenmesi 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).



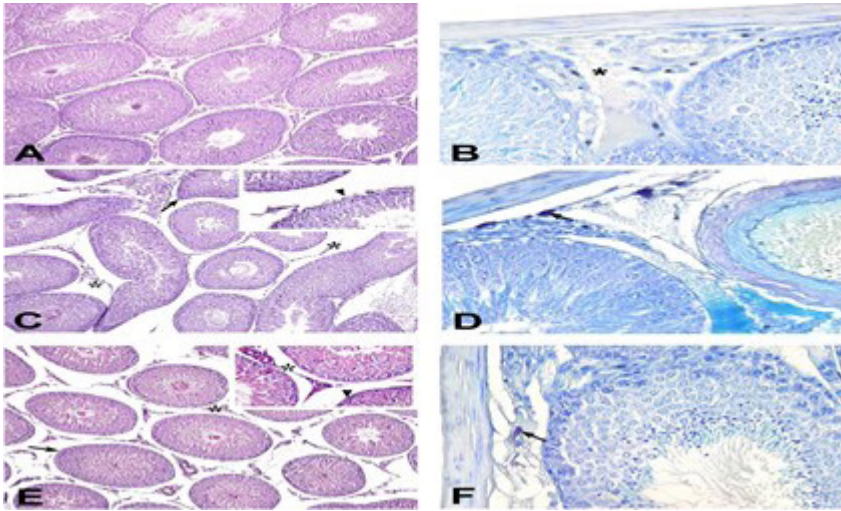
Şekil 1: K grubunda düzenli yerleşmiş seminifer tübüller ve sağlıklı interstisyel alan (A) ve tunika albuginea komşuluğunda mast hücrelerinden fakir interstisyel alan (*), (B); KS grubunda bozulmuş seminifer tübül morfolojisi (→), bütünlüğünü kaybetmiş bazal membran (küçük resim, ▲) ve açılmış, hasarlı 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 hücreleri (→), (F).

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

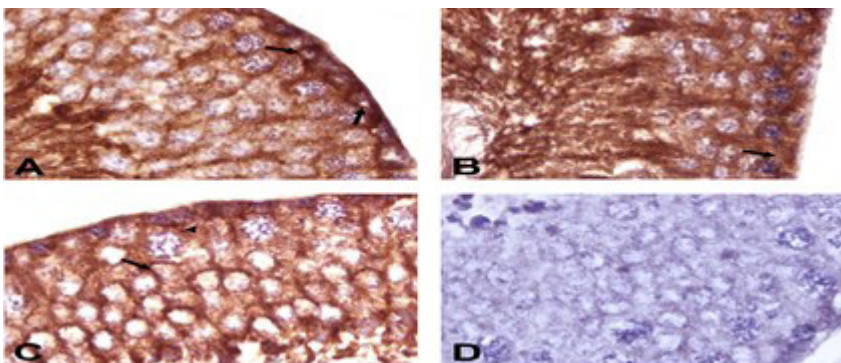
Tablo 1: Biyokimyasal verilerin karşılaştırılması

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 a	a: KS grubuna göre
GPx (ng/dL)				
	8.001±1.019	6.252±0.6227	10.83±0.7841 b	b: KS grubuna göre
TOS				
(µmol H2O2 eq/L)	4.687±0.4268	6.907±0.9466	4.038±0.2881 a	a: KS grubuna göre
TAS				
(mmol Trolox eq/L)	3.977±0.3281	3.558±0.1422	5.03±0.4308 a	a: KS grubuna göre
OSI (arbitrary unit)	0.126±0.019	0.194±0.028	0.08±0.007 b	b: KS grubuna göre

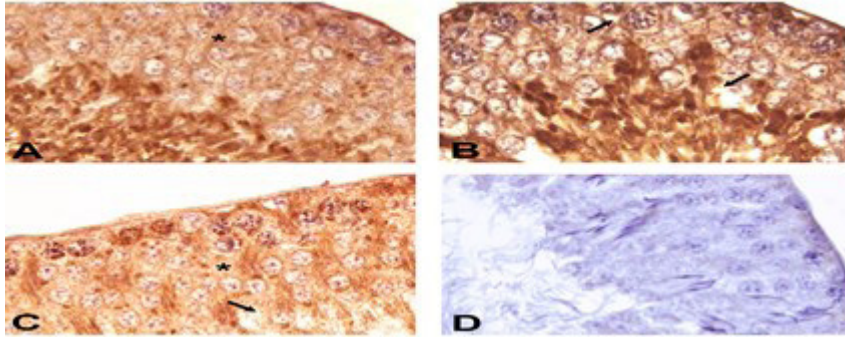
a: *p<0.05, b: **p<0.01



Şekil 2: (A) K grubunda düşük şiddetli iNOS immün işaretlenmesi; (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, büyüme: X400).



Şekil 3: (A) K grubunda, kan-testis bariyerinde ZO-1 immün işaretlenmesi (→); (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 işaretlenme (→) ve hasarın devam ettiği alanlarda zayıf ZO-1 immün işaretlenmesi (▲); (D) K grubundan hazırlanan (-) kontrol kesiti. (ZO-1 immünohistokimyası, büyüme: X1000).



Şekil 4: (A) K grubunda yaygın β -aktin immün işaretlenmesi (*); (B) KS grubunda hasarlı bölgelerde β -aktin immün reaksiyonunda kayıplar (→); (C) KS+FA grubunda sağlam bölgelerde yaygın β -aktin pozitif işaretlenmeler (*) ve hasarın devam ettiği bölgelerde azalmış β -aktin immün reaksiyonunda kayıplar (→); (D) K grubundan hazırlanan (-) kontrol kesiti. (β -aktin immunohistokimyası, büyütme: X1000).

Biyokimyasal Bulgular Sıçan testis örneklerinde K, KS ve KS+FA grupları arasındaki biyokimyasal parametrelerin değişimi 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 görülmüştür (Tablo 1).

TARTIŞMA

İnfertilite, dünya genelinde çiftlerin yaşadığı önemli cinsel sorunların başında yer almaktadır. Yarı erkekten kaynaklanan nedeni açıklanamayan infertilitenin etiolojisinde, çağımızın önemli sorunu stresin rol oynadığı düşünülmektedir (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 sıçan mesanesindeki ürotelyal hücreler arasında açılmalara 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 içerisinde 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 bu azalmanın

nedeninin stres grubunda görülen hüresel 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 içerisinde, interstisyel alandaki endotel hücreleri aracılığıyla gelebilecek kimyasal moleküllerden ve otoimmün reaksiyonlardan korunmasını sağlar (4-5). Sertoli hücrelerinin şeklinin belirlenmesinde ve kan-testis bariyerinin oluşturulmasında aktin önemli rol oynar. Aktin, hücre iskeleti elemanlarından mikrofilamentlerin ana bileşenidir. Kas olmayan hücrelerde bulunan aktin izoformlarından biri β -aktindir ve genellikle hücrenin periferine yakın yerleşimli, hücreye şeklini veren üç boyutlu bir ağ şeklinde 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 immünohistokimyası sonuçlarına göre KS grubunda β -aktin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Kan-testis bariyerinin bozulduğu bazal bölgelerde ve adlüminal alana yakın bölgelerde, germinal hücre kaybına bağlı olarak, β -aktin işaretlemesi ortadan kalkmıştır. Kan-testis bariyerinin devamlılığını sürdürdüğü bölgelerde ise β -aktin immünpozitif alanlar görülmüş ancak immünitinin şiddetinin K grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular kronik stresin kan-testis bariyerine zarar verdiği yönündeki bulgularımızı desteklemektedir. Özellikle adlüminal

alana doğru hücre iskeletindeki bozulmalara paralel olarak hücreler arası alanların açılması spermiyogenez sürecinin de olumsuz etkilenebileceğini ve seminifer tübül lümenine olgunlaşmamış spermlerin salınabileceğini düşündürmektedir. Itoh ve arkadaşları hücre kültüründe, β -aktin 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 olmuştur. Mast hücreleri salgıladıkları TNF- α , interlökinler, 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 spermatogenezi 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, hücrel moleküllerde (lipid, protein, nükleotid gibi) hasar görülmektedir. Oksidatif stres pro-oksidanlar ile anti-oksidanlar arasındaki denge durumun bozulmasıdır. Bu dengenin bozulması hücrel hasara ve ROS üretiminde artışa sebep olur. Vücudumuzda bu dengesiz koşulları ortadan kaldırmak için enzimatik (SOD, KAT, GPx) ve enzimatik olmayan (glutatyon, tiyol gibi) savunma

mekanizmaları geliştirmiştir (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 başvurulan yöntemlerden biri dışarıdan antioksidan takviyesi yapılmasıdır. Antioksidanlar, vücutta oluşan ROS kaynaklı kimyasal tepkimelere etki ederek, açığa çıkan moleküllerin hücrel bileşenlere 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 çözünebilir 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 oluşturduğu 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 görülmüştür. 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 olduğu saptanmıştır. Morfolojik iyileşme β -aktin imünohistokimyası 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 imünohistokimyası 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 gösterir (32). Dokularda ölçülen biyokimyasal oksidatif stres belirteçleri incelendiğinde, histokimyasal ve imünohistokimyasal 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. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(7):374-81.
2. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
3. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* 2002;65(4):305-11.
4. Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev.* 2012;64(1):16-64.
5. Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod.* 2011;84(5):851-8.
6. Toufexis D, Rivarola MA, Lara H, Viau V. Stress and the reproductive axis. *J Neuroendocrinol.* 2014;26(9):573-86.
7. Hatier R, Grignon G. Ultrastructural study of Sertoli cells in rat seminiferous tubules during intrauterine life and the postnatal period. *Anat Embryol (Berl).* 1980;160(1):11-27.
8. Zadak Z, Hyspler R, Ticha A, Hronek M, Fikrova P, Rathouska J, et al. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiol Res.* 2009;58:13-7.
9. Nicolson GL. Mitochondrial Dysfunction and Chronic Disease: Treatment With Natural Supplements. *Integr Med (Encinitas).* 2014;13(4):35-43.
10. Wang W, Yang H, Wang X, Jiang J, Zhu W. Effects of fulvic acid and humic acid on aluminum speciation in drinking water. *J Environ Sci (China).* 2010;22(2):211-7.
11. Junek R, Morrow R, Schoenherr JI, Schubert R, Kallmeyer R, Phull S, et al. Bimodal effect of humic acids on the LPS-induced TNF-alpha release from differentiated U937 cells. *Phytomedicine.* 2009;16(5):470-6.
12. Dong L, Cordova-Kreylos AL, Yang J, Yuan H, Scow KM. Humic acids buffer the effects of urea on soil ammonia oxidizers and potential nitrification. *Soil Biol Biochem.* 2009;41(8):1612-21.
13. Repokari L, Punamaki RL, Unkila-Kallio L, Vilska S, Poikkeus P, Sinkkonen J, et al. Infertility treatment and marital relationships: a 1-year prospective study among successfully treated ART couples and their controls. *Hum Reprod.* 2007;22(5):1481-91.
14. Cetinel S, Ercan F, Cikler E, Contuk G, Sener G. Protective effect of melatonin on water avoidance stress induced degeneration of the bladder. *J Urol.* 2005;173(1):267-70.
15. Zeybek A, Ercan F, Cetinel S, Cikler E, Saglam B, Sener G. Protective effects of aqueous garlic extract in reducing water avoidance

stress-induced degeneration of the stomach, ileum, and liver: morphological and biochemical study. *Dig Dis Sci.* 2007;52(11):2984-92.

16. Cikler E, Ersoy Y, Cetinel S, Ercan F. The leukotriene d4 receptor antagonist, montelukast, inhibits mast cell degranulation in the dermis induced by water avoidance stress. *Acta Histochem.* 2009;111(2):112-8.
17. Cikler E, Ercan F, Cetinel S, Contuk G, Sener G. The protective effects of melatonin against water avoidance stress-induced mast cell degranulation in dermis. *Acta Histochem.* 2005;106(6):467-75.
18. Yazawa H, Sasagawa I, Ishigooka M, Nakada T. Effect of immobilization stress on testicular germ cell apoptosis in rats. *Hum Reprod.* 1999;14(7):1806-10.
19. Musch MW, Walsh-Reitz MM, Chang EB. Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290(2):222-31.
20. Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol.* 1997;138(1):181-92.
21. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1998;59(5):1037-46.
22. Lee NP, Cheng CY. Nitric oxide and cyclic nucleotides: their roles in junction dynamics and spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2008;636:172-85.
23. Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expression control. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(9):1321-32.
24. Sogut I, Kanbak G. In Vitro Protective Effect of Betaine on Peroxidative Injury Caused By Ethanol and Aspirin Exposure on Rat Brain Synaptosomes. *Erciyes Med J.* 2016;38(4):144-8.
25. Ak E, Cikler-Dülger E, Sehirli AO, Tetik S, Pisiriciler R, Sener G, Cetinel S. Sudan kaçınma stresi uygulanmış erkek sıçan mesanesinde oksitinin etkisi: Işık ve elektron mikroskopik inceleme. *Marmara Pharmaceutical Journal.* 2005;19:19-26.
26. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol.* 2009;16(5):449-57.
27. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41(12 Pt 2):1819-28.
28. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
29. Sabi R, Vrey P, van Rensburg CEJ. Carbohydrate-derived Fulvic acid (CHD-FA) inhibits Carrageenan-induced inflammation and enhances wound healing: efficacy and Toxicity study in rats. *Drug Develop Res.* 2012;73(1):18-23.
30. Chen CH, Liu JJ, Lu FJ, Yang ML, Lee Y, Huang TS. The effect of humic acid on the adhesibility of neutrophils. *Thromb Res.* 2002;108(1):67-76.
31. Crockard AD, Thompson JM, McBride SJ, Edgar JD, McNeill TA, Bell AL. Markers of inflammatory activation: upregulation of complement receptors CR1 and CR3 on synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992;65(2):135-42.

32. Rodriguez NC, Urrutia EC, Gertrudis BH, Chaverri JP, Mejia GB. Antioxidant activity of fulvic acid: A living matter-derived bioactive compound. *Journal of Food, Agriculture & Environment.* 2011;9(3):123-7.