

APILARNİLİN'İN ERKEK SIÇANLARDA LİPOPOLİSAKKARİTE (LPS) BAĞLI TESTİS TOKSİSİTESİNE KARŞI KORUYUCU ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

Determination of the Protective Role of Apilarnil Against Testicular Toxicity Due to Lipopolysaccharide (LPS) in Male Rats

Züleyha DOĞANYIĞIT¹(0000-0002-6980-3384), Sibel SİLİCİ²(0000-0003-2810-2917), Emin KAYMAK¹(0000-0002-3818-2693), Aslı OKAN¹(0000-0001-8152-7338), Ali Tuğrul AKIN³(0000-0002-1408-8571), Dilek PANDIR⁴(0000-0001-5954-0632)

ÖZET

Lipopolisakkarit (LPS) tarafından oluşturulan endotokseminin patofizyolojik mekanizmalarının anlaşılmasında ve tedavisinde pek çok strateji geliştirilmesine rağmen, hala yoğun bakım ünitelerinin büyük bir problemi- dir. Bu çalışmada, endotoksik şok üzerine Apilarnil'in koruyucu bir etkisi olup olmadığının, testis dokusunda histopatolojik değerlendirme ve DNA yapısındaki değişimler ortaya konularak belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma için 64 adet Sprague-Dawley cinsi yetişkin erkek sıçan rastgele seçilerek 8 eşit gruba ayrılmıştır. Testis dokusunda rutin hematoksilen eozin boyaması ile histopatolojik değerlendirme yapılmış, komet testi ile DNA yapısındaki değişiklikler, 6. saatin sonunda kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Histolojik değerlendirme sonucunda artan dozlarda apilarnil uygulanan gruplardan alınan testislere ait kesitlerde kontrol grubu ile benzer şekilde histolojik yapı gösterdiği gözlenirken, LPS ve artan dozlarda apilarnil uygulanan gruplara ait testis dokusunda artan dozla birlikte lümendeki sperm miktarının arttığı görülmektedir. Buna ek olarak, LPS grubu ile karşılaştırıldığında bu gruplara ait seminifer tübüllerdeki hücreler arası bağlantı yerlerinde daha az ayrılmaların olduğu görülmektedir. DNA yapısındaki değişimler değerlendirildiğinde; LPS uygulanan grupta kuyruk DNA yüzdesinde, kuyruk uzunluğunda ve kuyruk momentinde istatistiksel olarak artışa neden olmuştur. LPS+Apilarnil'in verilmesi DNA hasarında azalmaya neden olmuştur. Apilarnil'in artan dozları DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğunda istatistiksel olarak azalmaya neden olmuştur. Sonuç olarak, apilarnil artan dozlarda uygulanmasının, LPS'nin neden olduğu testiküler hasarı azalttığını ve bu etkinin de apilarnil'in anti- oksidan kapasitesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: LPS; Apilarnil; DNA; komet analizi

ABSTRACT

Although many strategies have been developed in the understanding and treatment of the pathophysiological mechanisms of endotoxemia by lipopolysaccharide (LPS), it is still a major problem of intensive care units. In this study, we aimed to determine whether apilarnil has a protective effect on endotoxic shock by revealing histopathological evaluation and changes in DNA structure in testes tissue. For study, 64 Sprague-Dawley type adult male rats were randomly assigned to 8 equal groups. Histopathological evaluation was performed by routine hematoxylin eosin staining in testis tissue and changes in DNA structure were compared with the control group at the end of the 6th hour. As a result of histological evaluation, it was observed that sections of testis taken from increasing groups of apilarnil groups showed similar histological structure with the control group, and the amount of sperm in the lumen increased with increasing dose of testis tissue belonging to groups treated with apilarnil. In addition, there is less separation in the intercellular junction sites in the seminiferous tubules of these groups compared to the LPS group. When the changes in DNA structure were evaluated, LPS caused a statistically significant increase in tail DNA percentage, tail length and tail moment in the applied group. The administration of LPS+Apilarnil caused a decrease in DNA damage. Increased doses of apilarnil resulted in a statistically significant reduction in DNA percentage and tail length. In conclusion, we think that apilarnil application of the increased doses decreases testicular damage caused by LPS and this effect is due to apilarnil antioxidant capacity.

Keywords: LPS; Apilarnil; DNA; comet assay

¹Yozgat Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, 66100 Divanliyolu/Yozgat, TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 38100 Kayseri, TÜRKİYE

³Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 38100 Kayseri, TÜRKİYE

⁴Bozok Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 66100 Erdoğlan Akdağ Yerleşkesi/Yozgat, TÜRKİYE

Züleyha DOĞANYIĞIT, Dr.
Sibel SİLİCİ, Prof. Dr.
Emin KAYMAK, Araş. Gör.
Aslı OKAN, Araş. Gör.
Ali Tuğrul AKIN, Araş. Gör.
Dilek PANDIR, Prof. Dr.

İletişim:

Dr. Züleyha DOĞANYIĞIT
Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji Anabilimdalı
Tel: +90 354 212 62 01/3614
e-mail:
zuleyha.doganyigit@gmail.com

Geliş tarihi/Received: 20.04.2019
Kabul tarihi/Accepted: 15.05.2019
DOI: 10.16919/bozoktip.556145

Bozok Tıp Derg 2019;9(2):146-154
Bozok Med J 2019;9(2):146-154

GİRİŞ

Testiste Leydig hücreleri, Sertoli hücreleri, spermatojenik hücreler ve makrofajlar gibi pek çok hücre bulunmaktadır [1]. Sistemik veya lokal enfeksiyon ve kronik inflamasyon, testis spermatogenezini bozabilir [2]. Mikrobiyal enfeksiyonlar, lokalize veya sistemik olarak, geçişli veya kalıcı olabilen erkek kısırlığına yol açabilir. Bununla birlikte, bu tür enfeksiyonların erkek üreme sistemini olumsuz etkilediği bilinmekle birlikte kesin mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır [3, 4]. Sistemik olduğu kadar lokalize olan mikrobiyal enfeksiyonlar da geçici veya kalıcı olabilen erkek kısırlığına neden olabilir [5]. LPS, Gram negatif bakterilerde hücre duvarlarının toksik bir bileşenidir ve iyi bilinen bir bakteriyel enfeksiyon modeli oluşturmak için yaygın olarak kullanılır [6, 7]. Enfeksiyonla ilişkili iltihaplanma, testis steroidojenezini engellemek ve spermatogenezini bozmak için bakteriyel LPS uygulanmasıyla in vivo olarak çalışmalar yapılmaktadır [7, 8]. Aslında birçok çalışma LPS'nin sitokinler de dahil olmak üzere enflamatuar aracı ekspresyonu için sinyal başlattığını göstermiştir [9]. İnsanlar enfeksiyon, gastrointestinal rahatsızlık ve alkol alımıyla sürekli düşük LPS seviyelerine maruz kalırlar [10]. Yüksek dozlarda, LPS septik şoka neden olur, ancak düşük dozlarda iyi tanımlanmış bir enflamatuar duruma da yol açar [11].

ROS, iltihaplanma dahil birçok patolojinin merkezindedir, enfeksiyon, alkol toksisitesi ve kriptomidizm [12] ve çeşitli patolojik durumlarda testis hasarına aracılık ettiği bilinmektedir [13, 14]. Erkek üreme sistemini etkileyen bir diğer önemli faktör oksidatif strestir [11]. Germ hücreleri serbest radikal üreten fagositik Sertoli hücreleri ile yakın ilişkilerinden dolayı oksidatif strese karşı oldukça hassastır [15]. Ayrıca, germ hücrelerinin plazma zarındaki alışılmadık derecede yüksek çoklu doymamış yağ asiti konsantrasyonu onları serbest radikal oksidasyonuna karşı savunmasız hale getirir [16]. Reaktif oksijen/azot türlerinin (ROS/RNS) aracılık ettiği oksidatif stres, LPS'nin patogenezinde rol oynar [7]. LPS, nitrik oksit ve prostaglandin oluşumunu hızlandırır. Lipid peroksidlerde artış, sıçan testisinin hücre organellerinin işlevsel bütünlüğünde bozulmaya neden olabilir [2]. Önceki çalışmalar LPS kaynaklı oksidatif stresin Sertoli hücrelerinin işlev bozukluğuna dahil olan olası biyokimyasal mekanizmalardan biri olarak kabul edildi-

ğini göstermiştir [11]. Normal fizyolojik koşullar altında, testis subselüler kompartmanlarında serbest radikaller üretilir. Bununla birlikte, Sertoli hücrelerindeki bu denge, prooksidant-antioksidan dengesi bozan ve Sertoli hücre fonksiyon bozukluğuna yol açan LPS gibi kimyasallar tarafından kolayca bozulabilir [2].

Sertoli hücreleri önemli testis hücreleridir ve spermatogenezde çok önemli bir rol oynarlar ve ayrıca seminifer tübüllerde önemli enfeksiyon savunma hücreleridir. Mikrop hücrelerini otoantijenlerden ve istilacı patojenlerden korurlar [17, 18]. Sertoli hücre-germ hücre ilişkisinin sitotoksik ajanlar, hastalık veya kültür koşulları (örneğin, aşılama oksidatif stres) ile bozulması genellikle spermatogenezini engeller [18].

Apilarnil biyolojik yönden aktif olan birçok bileşiği içeriğinde bulunduran bir arı üründür. Bu çalışma, LPS'nin erkek sıçanların testis dokusundaki histolojik değişikliklerle birlikte testis hücre DNA'sı üzerindeki etkilerini ve LPS kaynaklı testiküler toksisiteyi iyileştirmede apilarnilin rolünü araştırmayı amaçlamaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasallar

Apilarnil, Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesinde üretilmiştir. Çalışma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulundan onay alınarak gerçekleştirilmiştir (Etik kurul onay no: 18/063). Hayvanlar, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nde barındırılmış, kafesler içinde tutulan sıçanların günün normal düzeninde 21 OC ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlanmıştır. Deney sonrasında elde edilen testis dokuları için deneysel çalışmalar Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim dalı ve Biyoloji Bölümü laboratuvarında yapılmıştır. Lipopolisakarit (Escherichia coli LPS, serotip O127: B8; Sigma Aldrich) tarafından sağlanmıştır. Sıçanlara uygulanacak LPS ve apilarnilin dozları literatüre uygun olarak seçilmiştir [19-21]. Sıçanlarda apilarnilin biyolojik aktiviteleri ile ilgili araştırma sayısı sınırlı olduğundan bu çalışma aynı zamanda faydalı doz belirleme çalışması olacaktır ve doz aralığı geniş tutulmuştur. Bununla birlikte doz

aralığı diğer hayvan gruplarında yapılan çalışmalarda önerilen dozları da içine alacak şekilde ayarlanmıştır [20, 21].

Hayvanlar ve deney protokolleri

Çalışma için 64 adet *Sprague-Dawley* cinsi yetişkin erkek sıçan rastgele olmak üzere 8 eşit gruba ayrılmıştır. Grup 1: (kontrol grubu): Sadece serum fizyolojik (SF) (% 0,9 NaCl) 1 ml i.p. yolla uygulanan grup, Grup 2: LPS :30 mg/kg/bw doz 1 ml intraperitoneal olarak uygulanacak grup [19] Grup 3: 2 mg/kg apilarnil 1 ml oral gavaj yoluyla uygulanan grup (10 gün boyunca her gün), Grup 4: 4 mg/kg apilarnil 1 ml oral gavaj yoluyla uygulanacak grup (10 gün boyunca her gün), Grup 5: 8 mg/kg apilarnil 1 ml oral gavaj yoluyla uygulanan grup (10 gün boyunca her gün), Grup 6: 2 mg/kg apilarnil 1 ml oral gavaj yoluyla uygulandıktan 60 dak. sonra LPS (30 mg/kg/bw) grup, Grup 7: 4 mg/kg apilarnil 1 ml oral gavaj yoluyla uygulandıktan 60 dak. sonra LPS (30 mg/kg/bw) grup, Grup 8: 8 mg/kg apilarnil 1 ml oral gavaj yoluyla uygulandıktan 60 dak. sonra LPS (30mg/kg/bw) grup (n:8). Altı saatlik uygulamadan sonra, ketamin ksilazin anestezisi altında sıçanlar sakrifiye edildi. Testis dokusunun bir kısmı histolojik değerlendirme için formaldehit solüsyonu içerisine, bir kısmı da fluoresans mikroskobu (Komet Testi) incelemeleri için alındı.

Komet testi ile DNA yapısının değerlendirilmesi

Dokular, bir neşter ile 1 g ince dilimler halinde bölünmüştür. 5 ml soğuk fosfat tamponu behere aktarıldı ve +4°C'de 16.000 rpm'de 3 dakika boyunca homojenize edildi. +4°C'de 2000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Slaytlar, ince bir agaroz jeli (%0,5) (normal melting point agarose (NMA), Sigma-A9539, USA) ile kaplandı ve hücrelerin daha iyi tutulması için gece boyunca donduruldu (+4 ° C). Süpernatant, hücre süspansiyonu olarak kullanıldı. Hücre süspansiyonu, 100 ml düşük erime noktalı agaroz (low melting point agarose (LMPA), SigmaA9414, USA) (Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonunda %0,8) ile karıştırıldı. Bu karışımın 100 ul'si lamelle kapatıldı, böylece kaplanmış lamların üzerine hava kabarcıkları olmadan yayıldı. Hücre süspansiyonu, donma amacıyla buzdolabında 20 dakika bekletildi. Lamel daha sonra slaytlardan dikkatlice ayrıldı. Kaplanan slaytlar, 2-9 dakika boyunca lizis tamponuna yerleştirildi. (pH:

8,4, %2,5 SDS, 0.045M TBE). Buradan çıkan slaytlar 2 dakikalık bir elektroforez çözeltisine yerleştirildi. 25 V'da 4 dk süreyle elektroforeze tutuldu. Lamlar, çıkarılan lamlar nötralizasyonu sağlamak amacıyla soğuk metonele alındı ve 2-5 dk bekletildi ardından 20 µg/ml etidyum bromid çözeltisi ile boyandı. Boyama işleminden sonra preparatlar floresan mikroskop (BS 200 Prop, floresanlı) altında incelendi ve 40x büyütme ile görüntüleri elde edildi. Görüntü analiz sistemi için BAB Görüntüleme ve Analiz programı kullanılarak değerlendirmeler yapıldı [22].

Histolojik Değerlendirme

Alınan testisler Formaldehit içine konduktan sonra dokunun büyüklüğüne paralel olacak şekilde 2 gün fikse edildi. Fiksasyon sonrası bir gece akar suda bekletildi. Ardından rutin histolojik doku takip metodu ile testisler parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan 5µm kalınlığında kesitler histokimyasal boyama için normal lam üzerine alındı. Alınan örnekler deparafinize edildikten sonra histokimyasal olarak Hematoksilin Eozin ile boyandı. Histokimyasal olarak dokular Olympus BX53 marka ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

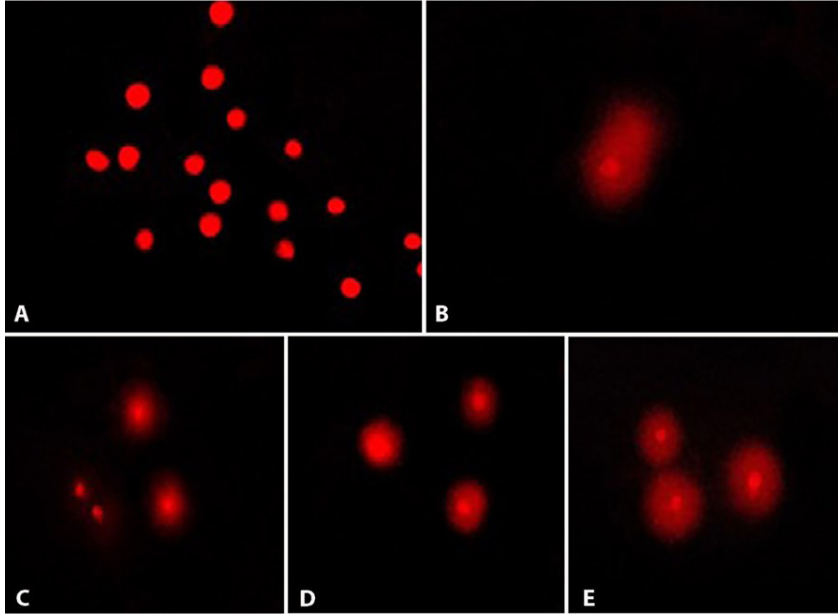
Veri analizi

Bu çalışmada kullanılan istatistiksel veriler, SPSS 11.0 (SPSS Inc, USA) paket programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testi ile değerlendirildi. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Komet Analizi

Sadece apilarnil uygulanan sıçanların testis hücrelerinin DNA kuyruk yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti 6 saat sonra kontrol grubu ile karşılaştırıldı. 2, 4 ve 8 mg/kg bw Apilarnil uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak değişiklik olmamıştır. (Şekil 1 ve Tablo 1).



Şekil 1. LPS ve artan dozlarda apilarnil uygulanan sıçanların testis hücrelerinde DNA hasarı. (A) Kontrol ve apilarnil-uygulanan grup, (B) LPS-uygulanan grup, (C) LPS+2 mg/kg apilarnil-uygulanan grup, (D) LPS+4 mg/kg apilarnil-uygulanan grup, (E) LPS+8 mg/kg apilarnil-uygulanan grup.

Tablo 1. Farklı kimyasallara maruz bırakılan testis hücrelerinin Kuyruk DNA%, Kuyruk Uzunluğu ve Kuyruk momenti değerleri

	Kuyruk DNA%	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk momen
	Ortalama±SD	Ortalama±SD	Ortalama±SD
Kontrol	55.75 ±2.65 ^a	35.25±8.22 ^a	19.65±0.21 ^a
2 mg/kg apilarnil	55.24±3.45 ^a	33.20±2.65 ^a	18.33±0.09 ^a
4 mg/kg apilarnil	57.23±6.24 ^a	30.12±3.02 ^a	17.23±0.18 ^a
8 mg/kg apilarnil	56.11±2.02 ^a	31.22±3.42 ^a	17.51 ±0.06 ^a
LPS	102.17±11.23 ^b	65.05±11.35 ^b	66.46±1.27 ^b
LPS+2 mg/kg apilarnil	85.12±3.22 ^c	38.12±5.22 ^c	31.81±0.16 ^c
LPS+4 mg/kg apilarnil	92.2±22.01 ^c	45.13±3.20 ^c	32.35±0.7 ^c
LPS+8 mg/kg apilarnil	69.22±3.25 ^d	39.11±3.42 ^d	27.07±0.11 ^d

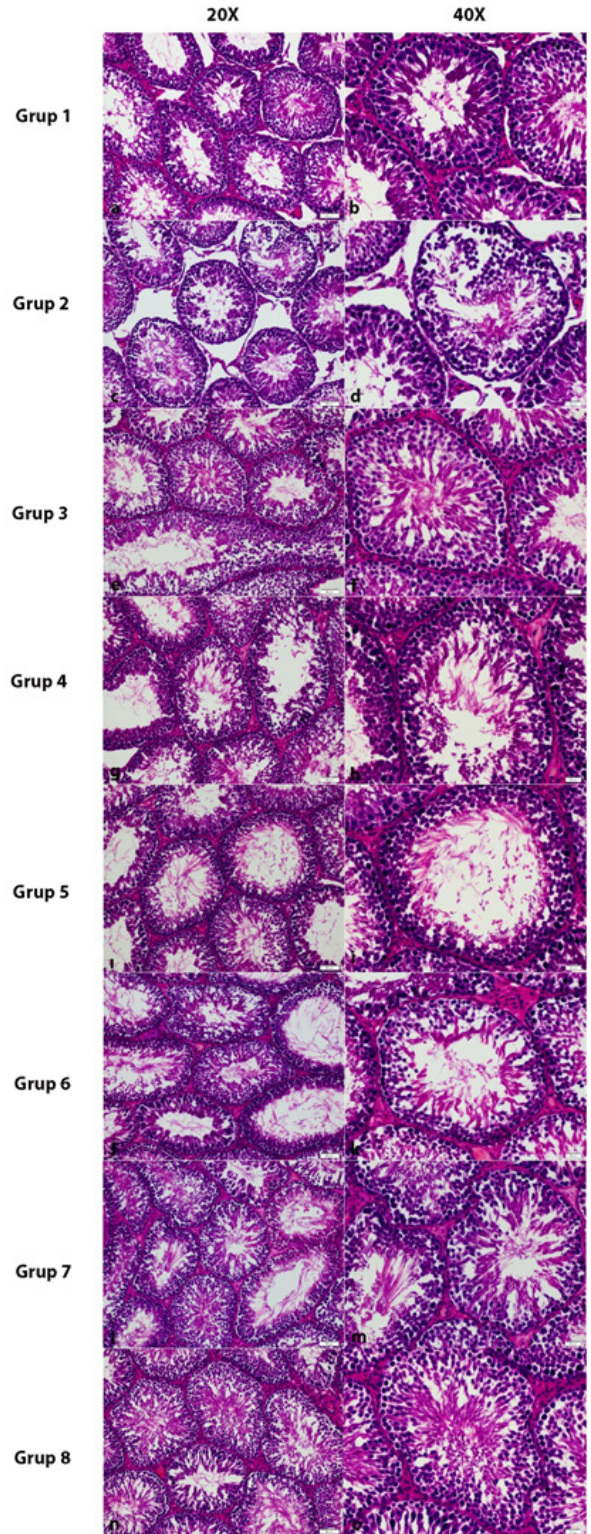
Üst simgeler, kontrol ve uygulama gruplarına ait testis dokusundaki komet yöntemine ait parametreler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

LPS+Apilarnil (2, 4 ve 8 mg/kg bw) uygulanan grup, DNA hasarı için LPS uygulanan grupla karşılaştırılmıştır. LPS uygulanan grupta; DNA kuyruk yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti seviyesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. LPS + 2 mg/kg, LPS + 4 mg/kg, LPS + 8 mg/kg Apilarnil uygulanan grup LPS-uygulanan grupla karşılaştırıldığında DNA kuyruk yüzdesinde, kuyruk uzunluğunda ve kuyruk momentinde azalma sağlamıştır (Şekil 1 ve Tablo 1).

Histokimyasal Bulgular

Formaldehit solüsyonu ile tespit edilen ve parafin doku takibi sonrası testis örneklerinden alınan kesitlerin hematoksilin eozin ile boyanarak ışık mikroskop altında değerlendirilmesinde (Şekil 2);

Normal bir yapı gösteren kontrol grubuna (Grup 1) ait testis dokusunda (a,b); sıkı bağ doku karakterinde tunika albuginea, kapsülden içerilere uzanan septalar ile ayrılmış testis lobülleri içerisinde yer alan seminifer tübüller ve interstisyel alanlarda kan ve lenf damarından zengin gevşek bağ doku yapısı ve Leydig hücreleri normal görülmektedir. Seminifer tübüllerde bazal membran üzerine oturmuş koyu ve açık spermatogonyumlar, primer spermatositler ve tübüllerin merkezine doğru yuvarlak ve uzayan spermatidler görülmektedir. LPS grubuna (Grup 2) ait testislerde (c,d); çoğu seminifer tübülde dejenerasyon, spermatogenik hücre serisinde bozulmalar ve hücreler arası bağlantı yerlerinde ayrılmalar görülmektedir. Bazı seminifer tübüllerde bazal ve adluminal kompartmanlarda ayrılmanın olduğu görülmektedir. Artan dozlarda apilarnil uygulanan gruplardan alınan testislere ait kesitlerin (Grup 3,4 ve 5) kontrol grubu ile benzer şekilde histolojik yapı gösterdiği görülmektedir. LPS ve artan dozlarda apilarnil uygulanan gruplara ait testis dokusunda artan dozla birlikte lümendeki sperm miktarının arttığı görülmektedir. Buna ek olarak, LPS grubu ile karşılaştırıldığında bu gruplara ait seminifer tübüllerdeki hücreler arası bağlantı yerlerinde daha az ayrılmaların olduğu görülmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Kontrol (Grup 1), LPS (Grup 2), apilarnil uygulanan gruplar (Grup 3,4 ve 5), LPS ve artan dozlarda apilarnil uygulanan (Grup 6,7 ve 8) sıçanların testis dokularından alınan kesit görüntüleri, 20X büyütme bar = 50µm, 40X büyütme bar = 20Xm, H&E.

TARTIŞMA

Sepsis patofizyolojisinde yer alan önemli olayların başında yangı ve koagülasyonun başlaması gelir [23]. Yangı ve koagülasyon olayları bir kez başladığında birbirleri ile etkileşerek konakçının sepsise karşı olan yanıtını güçlendirirler; örneğin, yangının gelişmesine neden olan mediyatörler, dolaşımda bulunan monositlerin, doku makrofajlarının, nötrofillerin ve endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan doku faktörünün ekspresyonunu indükleyerek koagülasyon olayını artırabilmektedirler [24, 25]. Yangının başlaması ile birlikte sitokinler, kemokinler, adhezyon molekülleri, reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi mediyatörlerin aşırı ve kontrolsüz bir biçimde oluşumunun artması sepsisin patofizyolojisine katkıda bulunmaktadır [26].

Endotoksin gram negatif bakterilerin hücre duvarının bir parçasını oluşturur ve canlı dokuya girdikten sonra akut bir yangı başlatılmasından sorumludur [27]. Gram negatif bakteri hücre duvarı; içte peptidoglikan tabaka, dışta lipopolisakkaridler, proteinler ve fosfolipitlerden oluşur. Lipopolisakkarid tabakada bulunan endotoksin molekülü, hücre membranında kaldığı sürece inaktiftir. Hücrenin hızlı büyümesi veya hücre yıkımı sırasında açığa çıkan endotoksin sepsis/endotoksemide olaylar dizisini başlatan anahtar moleküldür [28]. Bu çalışmada, E. coli'nin O55: B5 serotipi LPS olarak kullanılmış ve 30 mg/kg b.w. LPS + 2 mg/kg apilarnil, LPS + 4 mg/kg apilarnil ve LPS + 8 mg/kg Apilarnil uygulanarak histolojik yapı ve DNA yapısı, altı saat sonunda sıçan testisinde değerlendirilmiştir.

Hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit anyon ve/veya hidroksil radikal (OH.) gibi reaktif oksijen türleri (ROS), iltihaplanma, enfeksiyon, alkol toksisitesi ve kriptorşidizm de dahil olmak üzere bir dizi patolojide etkindir ve çeşitli durumlarda testis hasarına aracılık ettiği bilinmektedir [29]. Reaktif maddeler çok güçlü oksidanlardır ve solunum sırasında herhangi bir canlı hücrede fizyolojik olarak üretilirler [29]. Yağlara, proteinlere ve DNA'ya zarar verebilirler. Oksidatif stres ayrıca, kusurlu sperm oluşumu, fonksiyonu, sperm sayısı profili ve erkek kısırlığının etiyolojisinde de önemli bir role sahiptir [30]. Üreme hücreleri, yakın ilişkilerinden dolayı oksidatif strese karşı oldukça hassastır. Sıçan testis Sertoli hücrelerinde yapılan

önceki çalışmalar LPS uygulanmasından sonra H₂O₂ üretiminde artış olduğunu göstermiştir [2]. Reddy ve arkadaşlarının [5] yaptığı çalışmada, sıçanlarda LPS'nin indüklediği sistemik enflamasyonun, muhtemelen test edilmiş lipid peroksit jenerasyonlarının ve bozulmuş antioksidan savunmalarının bir sonucu olarak testiste ROS oluşumu ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Aly ve arkadaşları da [11] yaptıkları başka bir çalışma ile LPS kaynaklı oksidatif stresin testiküler mitokondride fonksiyonel hasarlara yol açtığını göstermiş ve bu hasarın Likopen ön uygulaması ile belirgin bir normalleşme sağladığını ortaya koymuşlardır. LPS'nin testis toksisitesine neden olduğu kesin mekanizma açıklığa kavuşturulmalıdır, ancak önceki çalışmalarda oksidatif stresin erkek üreme yetmezliğini anlamada önemli bir faktör olduğunu öne sürmektedir [5]. Aly ve arkadaşları yaptıkları bir çalışma ile LPS kaynaklı oksidatif stresin Sertoli hücrelerinin bozulmuş işlevinde rol oynayan olası biyokimyasal mekanizmalardan biri olarak kabul edildiğini göstermiştir [31]. Sadasivam ve arkadaşları da [32] LPS maruziyetinin, beyin ve testiste ROS seviyelerinde görülen artış ile kanıtlandığı gibi belirgin bir oksidatif etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bütün bu çalışmaların sonuçları bozulmuş steroidojenez ve spermatogenezden sorumlu olabileceğine işaret etmektedir. Yerel / sistemik patojen enfeksiyonlarıyla ilişkili erkek kısırlığından da benzer mekanizmalar sorumlu olabilir [32].

Mohamed ve arkadaşları [33] da, Arı poleni ve hurma polenin streptozotosinin neden olduğu diyabetik Wistar sıçanlarda glisemik durum ve erkek cinsel işlev bozuklukları üzerindeki iyileştirici etkileri ile ilgili çalışmada Streptozotosin (STZ)'nin neden olduğu diyabet, bozulmuş testis ve pankreas histolojik mimarisi ve bütünlüğüne paralel olarak kan glukoz seviyelerini ve testiküler nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) seviyelerini anlamlı şekilde arttırdığını göstermiştir. Yapılan çalışma diyabetik sıçan testislerinde ortaya çıkan olumsuz tablonun, arı poleni ve / veya hurma poleni süspansiyonlarının oral olarak verilmesiyle belirgin şekilde düzeldiğini ve testis anormalliklerinde belirgin bir onarım olduğunu ortaya koymuştur.

Erkek üreme fonksiyonu için bazal reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşturulması esastır, oysa yüksek

ROS seviyeleri düşük kaliteli sperm ve erkek kısırlığına bağlanabilir. İçinde hasara neden olduğu bilinen antioksidanların sayısı artmaktadır ve bu aktiviteye sahip olabilecek doğal ürünleri araştırmak ilgi çekici olacaktır. Sonuçlar, daha yüksek sperm üretimi ve epididim başlangıç segmentinin daha yüksek epitel yüksekliği olduğunu ve tedavi edilen hayvanlarda oksidatif stresin indüklenmediğini göstermiştir [34]. Rizk ve arkadaşları [35] propolis ekstraktının Doxorubisin (Dox) kaynaklı testiküler yaralanma üzerindeki koruyucu etkisini araştırmayı amaçladıkları çalışmanın sonucunda Propolis özünün, testisleri antikanser potansiyelini azaltmadan Dox kaynaklı toksisiteden koruyabildiğini göstermiştir. Gulhan [36], L-NAME'nin neden olduğu hipertansif sıçanlarda propolis ve polen ile regülasyonun üreme fonksiyonu, iltihaplanmanın baskılanması ve toplam oksidatif durumun azaltılması, tedavi edilen sıçanlarda toplam antioksidan savunma mekanizmalarının artırılması ile ilgili olduğu sonucuna varmıştır. Collodel ve arkadaşları [37], bakteri lipopolisakkarit (LPS) uygulamasını takiben çikolata ve propolis ile zenginleştirilmiş diyetlerin tavşan spermatogenezi, sperm motilitesi ve ultrastrüktür üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmanın sonucunda, çikolata ve propolis bakımından zengin bir diyet, LPS uygulamasının ardından tavşanlarının spermatogenetik süreci üzerinde koruyucu bir etki göstermiştir.

Apilarnil konusunda çalışmalarda ise; Bolatovna ve ark. [38] 9 ve 10 günlük erkek kuluçkayı toplayarak homojenize etmiş ve 70 oC alkolde stabilize etmişlerdir. Kimyasal analiz neticesinde eşey hormonlarını içeren çok sayıda aktif bileşik tespit edilmiştir. Genç domuzlara parenteral enjeksiyonunun seminal salgı bezleri ağırlığını %20,1-21.9, epididimisi %21,8-25.8 artırırken domuzların seksüel disfonksiyon parametrelerini %83,3 oranında iyileştirmiştir. Ayrıca kalitatif ve kantitatif semen üretkenliğini iyileştirmiş; ejakülat hacmi %54,3; germ hücre yoğunluğu %27,1 ve yaşama oranı %51,2 ve mobilitesi %14,2 iyileşmiştir. Hasar görmüş spermatozoa akrozomları 2.1 kez azalmış fertilitite %76,4 artmıştır [38]. Meda ve ark. [39] tarafından, apilarnil (erkek larva özütü) in Güney Afrika'da (Burkina Faso) gastrointestinal hastalıklar, solunum yolu hastalıkları, vertigo, oftalmik hastalıklar, diş ağrısı, kas yorgunluğu,

yara, yanık ve sırt ağrıları ve cilt temizleyici bir ajan olarak kullanımının yanında özellikle erkek kısırlığında başarıyla kullanıldığı bildirilmektedir [39]. Altan ve ark. [20]'nin yaptığı çalışmada, erkek ve dişi civcivlere (28-55 günlük) prepubertal periyot boyunca düşük ve yüksek dozda (2.5 g/bireyler, 7.5 g/ bireyler) apilarnil verilmiş gelişme performansı, testiküler ağırlık, sekonder eşey karakterleri, kan lipidleri ve testosteron seviyesi analiz edilmiştir [20]. Apilarnil uygulaması erkek ve dişi civcivlerde gelişme performansı üzerine pozitif bir etki göstermemiştir. Buna karşın, biyokimyasal açıdan kan glikozu ve kolesterolü düşürmüştür. Çalışmada; testiküler ağırlık ve testosteron seviyesindeki artışın erken aşamalarda eşeysel olgunlaşmayı stimüle ettiği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, ikincil eşeysel karakterlerdeki stimülasyon dişilerde gözlenmemiştir. Benzer şekilde; Yücel ve ark. [40]'nin 21 günlük erkek tavuklarda yaptığı araştırmada da erkek arı larvasının androjenik etki gösterdiği belirlenmiştir [40]. Yaptığımız çalışmada da LPS ile oluşturulan endotoksik şok modeli üzerine artan dozlarda apilarnilin hem histolojik hem de DNA düzeyinde iyileştirici etkileri olduğu gözlenmiştir. Ancak apilarnil ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalar sınırlı olup halen başlangıç aşamasındadır.

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve dokulardaki serbest radikaller, DNA gibi biyolojik olarak önemli materyallere zarar verebilir. Serbest radikaller, diş atom orbitallerinde bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektron içeren yüksek enerjili, kararsız bileşiklerdir. Eşleşmemiş elektron serbest radikallere karşı büyük bir reaktivite verir [41]. Bu serbest radikaller DNA ile reaksiyona girebilir ve şeker parçalarından hidrojen atomlarının kaybına veya eklenmesine neden olabilir. Özellikle, pirimidin C4-C5 çift bağı hidroksil radikalının saldırılarına karşı çok hassastır. ROS kaynaklı DNA hasarı; pürin, pirimidin veya deoksiriboz modifikasyonları ve DNA çapraz bağlanma sonucunda tek veya çift sarmallı DNA hasarına neden olur [42]. Bu çalışmada, DNA kuyruk yüzdesinde, kuyruk uzunluğunda ve kuyruk momentinde, LPS uygulanan gruptaki sıçanların DNA hasarı oranının daha yüksek olduğu, artan dozlarda LPS+Apilarnil uygulanan grup LPS uygulanan gruba göre testis dokusunda koruyucu etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, LPS' ye maruz bırakılan sıçanların testis dokularında hem histopatolojik olarak hem de DNA'da yapısal değişiklikler gözlenmiştir. Ancak, apılarnilin artan dozları, LPS'nin neden olduğu testis doku hasarını, toksisitesini ve testiküler dokularda oksidatif stresi azaltarak DNA üzerinde hasarı azaltmıştır. Bu sonucun apılarnilin antioksidan özelliğinden kaynaklığını düşünmekteyiz. Endotoksin kaynaklı testis disfonksiyonu mekanizmalarının anlaşılması, enfeksiyonla ilgili erkek kısırlığına ışık tutabilir. Bu nedenle bu konuda daha fazla bilimsel çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Elhija MA, Potashnik H, Lunenfeld E, Potashnik G, Schlatt S, Nieschlag E, et al. Testicular interleukin-6 response to systemic inflammation. *Eur Cytokine Netw.* 2005;16(2):167-72. PubMed PMID: 15941689.
2. Aly HA, Lightfoot DA, El-Shemy HA. Modulatory role of lipoic acid on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in adult rat Sertoli cells in vitro. *Chem Biol Interact.* 2009;182(2-3):112-8. doi: 10.1016/j.cbi.2009.08.013. PubMed PMID: 19699728.
3. Akinci E, Bodur H, Erbay CC, Deveer M. Brucella abortus epididymo-orchitis relapsing in the opposite testis 3 months after antibiotic therapy and development of aspermia. *Int J Infect Dis.* 2003;7(4):290-1. PubMed PMID: 14656423.
4. Pacey AA, Eley A. Chlamydia trachomatis and male fertility. *Hum Fertil (Camb).* 2004;7(4):271-6. doi: 10.1080/14647270400016373. PubMed PMID: 15621892.
5. Reddy MM, Mahipal SV, Subhashini J, Reddy MC, Roy KR, Reddy GV, et al. Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. *Reprod Toxicol.* 2006;22(3):493-500. doi: 10.1016/j.reprotox.2006.03.003. PubMed PMID: 16644180.
6. Metukuri MR, Reddy CM, Reddy PR, Reddanna P. Bacterial LPS-mediated acute inflammation-induced spermatogenic failure in rats: role of stress response proteins and mitochondrial dysfunction. *Inflammation.* 2010;33(4):235-43. doi: 10.1007/s10753-009-9177-4. PubMed PMID: 20087639.
7. Nishio K, Horie M, Akazawa Y, Shichiri M, Iwahashi H, Hagihara Y, et al. Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. *Redox Biol.* 2013;1:97-103. doi: 10.1016/j.redox.2012.10.002. PubMed PMID: 24024142; PubMed Central PMCID: PMC3757666.
8. Kajihara T, Okagaki R, Ishihara O. LPS-induced transient testicular dysfunction accompanied by apoptosis of testicular germ cells in mice. *Med Mol Morphol.* 2006;39(4):203-8. doi: 10.1007/s00795-006-0334-7. PubMed PMID: 17187183.
9. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol.* 2011;31(5):379-446. PubMed PMID: 22142165.
10. Wang H, Yang LL, Hu YF, Wang BW, Huang YY, Zhang C, et al. Maternal LPS exposure during pregnancy impairs testicular development, steroidogenesis and spermatogenesis in male offspring. *PLoS One.* 2014;9(9):e106786. doi: 10.1371/journal.pone.0106786. PubMed PMID: 25255222; PubMed Central PMCID: PMC4177809.
11. Aly HA, El-Beshbishy HA, Banjar ZM. Mitochondrial dysfunction induced impairment of spermatogenesis in LPS-treated rats: modulatory role of lycopene. *Eur J Pharmacol.* 2012;677(1-3):31-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.12.027. PubMed PMID: 22222822.
12. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 2000;153(1-3):83-104. PubMed PMID: 11090949.
13. Selvakumar E, Prahalathan C, Mythili Y, Varalakshmi P. Protective effect of DL-alpha-lipoic acid in cyclophosphamide induced oxidative injury in rat testis. *Reprod Toxicol.* 2004;19(2):163-7. doi: 10.1016/j.reprotox.2004.06.015. PubMed PMID: 15501381.
14. Jacobson CF, Miller MG. Species difference in 1,3-dinitrobenzene testicular toxicity: in vitro correlation with glutathione status. *Reprod Toxicol.* 1998;12(1):49-56. PubMed PMID: 9431572.
15. Bauche F, Fouchard MH, Jegou B. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett.* 1994;349(3):392-6. PubMed PMID: 8050602.
16. Beckman J.K., Coniglio J.G. A comparative study of the lipid composition of isolated rat Sertoli and germinal cells. *Lipids.* 1979;14(3):262-7. PubMed PMID: 449628.
17. Abarikwu SO. Anti-inflammatory effects of kolaviron modulate the expressions of inflammatory marker genes, inhibit transcription factors ERK1/2, p-JNK, NF-kappaB, and activate Akt expressions in the 93RS2 Sertoli cell lines. *Mol Cell Biochem.* 2015;401(1-2):197-208. doi: 10.1007/s11010-014-2307-9. PubMed PMID: 25542212.
18. Jin M, Lou J, Yu H, Miao M, Wang G, Ai H, et al. Exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin promotes inflammation in mouse testes: The critical role of Klotho in Sertoli cells. *Toxicol Lett.* 2018;295:134-43. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.06.001. PubMed PMID: 29885354.
19. Doganyigit Z, Kup FO, Silici S, Deniz K, Yakan B, Atayoglu T. Protective effects of propolis on female rats' histopathological, biochemical and genotoxic changes during LPS induced endotoxemia. *Phytomedicine.* 2013;20(7):632-9. doi: 10.1016/j.phymed.2013.01.010. PubMed PMID: 23453303.
20. Altan O, Yucel B, Acikgoz Z, Seremet C, Kosoglu M, Turgan N, et al. Apilarnil reduces fear and advances sexual development in male broilers but has no effect on growth. *Br Poult Sci.* 2013;54(3):355-61. doi: 10.1080/00071668.2013.791382. PubMed PMID: 23796118.
21. Andritoiu CV, Ochiuz L, Andritoiu V, Popa M. Effect of apitherapy formulations against carbon tetrachloride-induced toxicity in Wistar rats after three weeks of treatment. *Molecules.* 2014;19(9):13374-91. doi: 10.3390/molecules190913374. PubMed PMID: 25178061; PubMed Central PMCID: PMC4270670.
22. Pandir D. Protective effect of lycopene on furan-induced oxidative stress and DNA damage in diabetic and non-diabetic rats' blood. *Curr Nutr Food Sci* in press. 2019.
23. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and mul-

- multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101(10):3765-77. doi: 10.1182/blood-2002-06-1887. PubMed PMID: 12543869.
24. Osterud B, Flaegstad T. Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavourable prognosis. *Thromb Haemost*. 1983;49(1):5-7. PubMed PMID: 6845273.
25. Jansen PM, Eisele B, de Jong IW, Chang A, Delvos U, Taylor FB, Jr., et al. Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock. *J Immunol*. 1998;160(1):475-84. PubMed PMID: 9552006.
26. Liu SF, Malik AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(4):L622-L45. doi: 10.1152/ajplung.00477.2005. PubMed PMID: 16531564.
27. Lohuis JA, Verheijden JH, Burvenich C, van Miert AS. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. 1. Changes in body temperature and reticulo-rumen motility, and the effect of repeated administration. *Vet Q*. 1988;10(2):109-16. doi: 10.1080/01652176.1988.9694157. PubMed PMID: 3046114.
28. Fisgin NT. Sepsis. *OMÜ Tıp Dergisi*. 2004;21(2):100-9.
29. Henkel R. The impact of oxidants on sperm function. *Andrologia*. 2005;37(6):205-6. doi: 10.1111/j.1439-0272.2005.00699.x. PubMed PMID: 16336248.
30. Acharya UR, Mishra M, Patro J, Panda MK. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reprod Toxicol*. 2008;25(1):84-8. doi: 10.1016/j.reprotox.2007.10.004. PubMed PMID: 18065194.
31. Aly HA, Lightfoot DA, El-Shemy HA. Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in adult rat Sertoli cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 2010;24(4):1266-72.
32. Sadasivam M, Ramatchandirin B, Ayyanar A, Prahalathan C. Bacterial lipopolysaccharide differently modulates steroidogenic enzymes gene expressions in the brain and testis in rats. *Neurosci Res*. 2014;83:81-8. doi: 10.1016/j.neures.2014.02.011. PubMed PMID: 24594480.
33. Mohamed NA, Ahmed OM, Hozayen WG, Ahmed MA. Ameliorative effects of bee pollen and date palm pollen on the glycemic state and male sexual dysfunctions in streptozotocin-Induced diabetic wistar rats. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:9-18. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.117. PubMed PMID: 29080463.
34. Capucho C, Sette R, de Souza Predes F, de Castro Monteiro J, Pigoso AA, Barbieri R, et al. Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(11):3956-62. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.027. PubMed PMID: 22951362.
35. Rizk SM, Zaki HF, Mina MA. Propolis attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 2014;67:176-86. doi: 10.1016/j.fct.2014.02.031. PubMed PMID: 24593989.
36. Gulhan MF. Therapeutic potentials of propolis and pollen on biochemical changes in reproductive function of L-NAME induced hypertensive male rats. *Clin Exp Hypertens*. 2019;41(3):292-8. doi: 10.1080/10641963.2018.1506470. PubMed PMID: 30118326.
37. Collodel G, Moretti E, Del Vecchio MT, Biagi M, Cardinali R, Mazzi L, et al. Effect of chocolate and Propolfenol on rabbit spermatogenesis and sperm quality following bacterial lipopolysaccharide treatment. *Syst Biol Reprod Med*. 2014;60(4):217-26. doi: 10.3109/19396368.2014.911392. PubMed PMID: 24785944.
38. Bolatovna KS, Rustenov A, Eleqalieva N, Omirzak T, Akhanov UK. Improving reproductive qualities of pigs using the drone brood homogenate. *Biol Med (Aligarh)*. 2015;7(2):BM-091-15.
39. Meda A, Lamien CE, Millogo J, Romito M, Nacoulma OG. Therapeutic uses of honey and honeybee larvae in central Burkina Faso. *J Ethnopharmacol*. 2004;95(1):103-7. doi: 10.1016/j.jep.2004.06.016. PubMed PMID: 15374614.
40. Yucel B., Açıkgoz Z., Bayraktar H., Seremet C. The effects of apilarnil (drone bee larvae) administration on growth performance and secondary sex characteristics of male broilers. *J Anim Vet Adv*. 2011;10(17):2263-6.
41. İlce F, Gök G, Pandir D. Acute effects of lipopolysaccharide (LPS) in kidney of rats and preventive role of vitamin E and sodium selenite. *Hum Exp Toxicol*. 2019;38(5):547-60. doi: 10.1177/0960327118817106. PubMed PMID: 30630368.
42. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1-40. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009. PubMed PMID: 16430879.