



Ratlarda Karbon Tetraklorür Kaynaklı Testis Hasarı Üzerine Krisinin Etkileri: Biyokimyasal, Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Tuba PARLAK AK^{1a}, Mine YAMAN^{2b}, Pınar TATLI SEVEN^{3c}, Burcu GÜL^{4d}, Seda İFLAZOĞLU
MUTLU^{5e}, Aslıhan SUR ARSLAN^{6f}, İsmail SEVEN^{7g}

1. Munzur Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Tunceli, TÜRKİYE.

2. Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, TÜRKİYE.

3. Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ, TÜRKİYE.

4. Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Elazığ, TÜRKİYE.

5. Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ, TÜRKİYE.

6. Balıkesir Üniversitesi, Kepsut Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, Balıkesir, TÜRKİYE.

7. Fırat Üniversitesi, Sivrice Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Elazığ, TÜRKİYE.

ORCID: 0000-0002-8318-7995^a, 0000-0001-9427-9150^b, 0000-0002-0067-4190^c, 0000-0002-9122-8953^d, 0000-0002-6835-2171^e, 0000-0002-3692-5510^f, 0000-0001-9489-8074^g

| Geliş Tarihi/Received | Kabul Tarihi/Accepted | Yayın Tarihi/Published |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 23.08.2021 | 29.11.2021 | 30.12.2021 |

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Parlak Ak T, Yaman M, Tatlı Seven P, Gül B, İflazoğlu Mutlu S, Sur Arslan A, Seven İ: Ratlarda Karbon Tetraklorür Kaynaklı Testis Hasarı Üzerine Krisinin Etkileri: Biyokimyasal, Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Değerlendirme. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 16(3): 320-329, 2021. DOI: 10.17094/ataunivbd.985666

Öz: Bu çalışmanın amacı, ratlarda karbon tetraklorür (CCl₄) ile indüklenen testis hasarı üzerine krisinin etkisini değerlendirmektir. Yirmi dört adet erkek Sprague-Dawley rat; kontrol grubu, Krisin grubu, CCl₄ grubu ve Krisin+CCl₄ grubu olmak üzere dört gruba ayrıldı. Krisin (100 mg/kg/vücut ağırlığı/gün) ve CCl₄ (mısır yağı (1:1) içerisinde 0.5 ml/kg/vücut ağırlığı/gün) gavaj yoluyla 14 gün boyunca uygulandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CCl₄ grubunda; malondialdehit (MDA) düzeyinin arttığı, redükte glutatyon (GSH) düzeyi ile süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktivitelerinin ise azaldığı belirlendi. Bu grupta ayrıca birçok testiküler lezyonun indüklendiği, Johnsen's Ortalama Testiküler Biyopsi Skoru (JMTBS)'nin azaldığı, kaspaz-3 immünoreaktivitesinin ise arttığı belirlendi. CCl₄ grubu ile karşılaştırıldığında, Krisin+CCl₄ grubunda; GSH düzeyi ile SOD ve KAT aktivitelerinin arttığı, MDA düzeyinin ise azaldığı tespit edildi. Bu grupta ayrıca testiküler lezyonların hafiflediği, JMTBS'nun arttığı ve kaspaz-3 immünoreaktivitesinin ise azaldığı gözlemlendi. Sonuç olarak; krisinin sahip olduğu antioksidan ve anti-apoptotik özellikler neticesinde, CCl₄ kaynaklı testis toksisitesinin tedavisinde faydalı etkiler gösterebileceği kanaatine varılmıştır.

Anhtar Kelimeler: Apoptozis, Karbon tetraklorür, Krisin, Oksidatif stres, Testis.

Effects of Chrysin on Carbon Tetrachloride-Induced Testicular Damage in Rats: Biochemical, Histopathological and Immunohistochemical Evaluation

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effect of chrysin on testicular damage induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats. Twenty-four male Sprague-Dawley rats were divided into four groups as the control group, Chrysin group, CCl₄ group, and Chrysin+CCl₄ group. Chrysin (100 mg/kg/body weight/day) and CCl₄ (0.5 ml/kg/body weight/day in corn oil (1:1)) were administered by gavage for 14 days. Compared to the control group, it was determined that malondialdehyde (MDA) level increased, reduced glutathione (GSH) level, and superoxide dismutase (SOD) and catalase (KAT) activities decreased in the CCl₄ group. It was also determined that many testicular lesions were induced, Johnsen's Mean Testicular Biopsy Score (JMTBS) decreased, and caspase-3 immunoreactivity increased in this group. Compared to the CCl₄ group, it was determined that GSH level and SOD and CAT activities increased, MDA level decreased in the Chrysin+CCl₄ group. It was also observed that testicular lesions were alleviated, JMTBS increased, and caspase-3 immunoreactivity was decreased in this group. As a result, it was concluded that chrysin might have beneficial effects in the treatment of CCl₄-induced testicular toxicity as a result of its antioxidant and anti-apoptotic properties.

Keywords: Apoptosis, Carbon tetrachloride, Chrysin, Oxidative stress, Testis.

[✉]Tuba Parlak Ak

Munzur Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Tunceli, TÜRKİYE.
e-posta: tubaparlakak@munzur.edu.tr



GİRİŞ

R enksiz, uçucu ve çok kararlı toksik bir çözücü madde olan karbon tetraklorür (CCl_4) (1) kuru temizleme maddesi, yangın söndürme sıvısı ve tahıl fumigantı olmak üzere endüstride birçok farklı kullanım alanına sahiptir (2). CCl_4 , toksik emisyon yoluyla hava, su ve toprağa doğru çevreye salındıktan sonra insanlarda ve hayvanlarda herhangi bir maruziyet yolu tarafından hızlıca absorbe edilebilmektedir. CCl_4 , absorpsiyonu takiben özellikle yüksek lipid içeriğine sahip dokular arasında yaygın bir şekilde dağılırarak, maruz kalma konsantrasyonuna veya doza bağlı olarak <1-6 saatte pik konsantrasyonuna ulaşmaktadır (3). CCl_4 , başlıca karaciğer (4), böbrek (5), testis (6) ve beyin (7) olmak üzere birçok farklı organda, serbest radikallerin neden olduğu hasarları gözlemlemek için in vivo ve/veya in vitro çalışma modeli olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Laboratuvar hayvanlarının deneysel CCl_4 maruziyeti sonucunda özellikle erkek üreme sisteminde oksidatif toksisite yoluyla ciddi yapısal ve fonksiyonel üreme bozukluklarının meydana geldiği bildirilmektedir (8).

Krisin (5,7-dihidroksiflavon), geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan ve birçok bitki özü, bal ve propoliste bulunan doğal flavonoidlerden biridir (9). Yapısındaki hidroksil grupları sayesinde serbest radikaller üzerinde eliminasyon etkisine sahip olan krisin, güçlü antioksidan özelliği ile bilinmektedir (10). Krisinin ayrıca anti-inflamatuar, antikanser, anti-diyabetik ve anti-apoptotik olmak üzere çeşitli biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip olduğu da bilinmektedir (11). Yararlı etkilerinin altında yatan mekanizmalar tam olarak tanımlanmasa da (12), krisinin erkek üreme sistemi üzerinde faydalı etkileri olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (13). Krisinin CCl_4 'ün neden olduğu testis hasarına karşı faydalı etkileri olup olmadığına dair herhangi bir çalışma bilgisi bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışma, bazı biyokimyasal, histolojik ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak krisinin

CCl_4 'ün neden olduğu testis hasarı üzerindeki faydalı etkilerini araştırmak için yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvanlar ve Çalışma Düzeni

Bu çalışmada 6-8 haftalık, 280-300 g ağırlığında, 24 adet yetişkin erkek Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi ve çalışma süresince buradaki standart laboratuvar koşullarında barındırıldı. Ratlara, yem ve su *ad libitum* olarak sağlandı. Ratlar üzerinde uygulanan tüm prosedürler, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış etik kurul izni (Protokol No: 03.05.2021/1986) ile gerçekleştirildi. Ratlar, her grupta 6 adet olacak şekilde toplam dört gruba ayrıldı. Kontrol grubuna mısır yağı gavaj yoluyla 14 gün boyunca günlük uygulandı. Krisin grubuna; 100 mg/kg/vücut ağırlığı/gün dozunda krisin (100 g, Molekula Ltd., Wimborne Dorset, İngiltere) gavaj yoluyla 14 gün boyunca uygulandı. CCl_4 grubuna; mısır yağı (1:1) içerisinde 0.5 ml/kg/vücut ağırlığı/gün dozunda CCl_4 (% 99.9, Panreac Quimica, Barcelona, İspanya) gavaj yoluyla 14 gün boyunca uygulandı. Krisin+ CCl_4 grubuna ise; krisin ve ayrıca CCl_4 gavaj yoluyla 14 gün boyunca günlük uygulandı. Krisin (13) ve CCl_4 'ün (14) uygulama dozu ve süreleri daha önceki çalışmalardan uyarlandı.

Numunelerin Alınması

Son uygulamadan 24 saat sonra, ratlar servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi edildi. Testis dokuları hızlıca alınarak histolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için tespit solüsyonuna bırakıldı. Dokular ayrıca biyokimyasal analizler yapılınca kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Biyokimyasal Analizler

Dokuların malondialdehit (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) düzeyleri ile süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) gibi antioksidan enzim

aktiviteleri belirlendi. Dokular, %1.15 KCl ile 1:10 oranında homojenize edildikten sonra lipid peroksidasyon (LPO) düzeyleri 532 nm'de tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin (TBARS) konsantrasyonlarına göre spektrofotometrik olarak ölçüldü (15). Üretilen MDA seviyesi, bir LPO indeksi olarak kullanıldı ve MDA değerleri nmol/ml homojenat olarak ifade edildi. GSH düzeyleri, 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (16). Dokulardaki protein içeriği standart olarak sığır serum albümini ile belirlendi (17) ve GSH değerleri nmol/mg protein olarak ifade edildi. SOD aktiviteleri, nitro blue tetrazolyum üreten ksantin oksidazın indirgenmesine dayanan yöntemle göre 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (18) ve SOD değerleri yüzde inhibisyon/mg protein olarak ifade edildi. KAT aktiviteleri, 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (19) ve KAT değerleri k/g protein olarak ifade edildi.

Histolojik, Histomorfometrik ve İmmunohistokimyasal İncelemeler

Dokular, Bouin solüsyonunda 48 saat süreyle tespit edildikten sonra rutin aşamalardan geçirilerek 5 µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Hematoksil-eozin (HE) ile boyanan kesitler ışık mikroskobu (Olympus BX-51; Olympus Optical Co., Ltd.) altında incelendi. Johnsen's Ortalama Testiküler Biyopsi Skoru (JMTBS) spermatogenezisi kategorize etmek için kullanıldı (20). Her kesitten 25 seminifer tübül değerlendirildi ve her tübüle Johnsen kriterlerine göre 1 (çok zayıf) ile 10 (mükemmel) arasında puan verildi (Tablo 1).

Tablo 1. Johnsen's ortalama testiküler biyopsi skoru (JMTBS).

Table 1. Johnsen's mean testicular biopsy score (JMTBS).

| Puan | Açıklama |
|------|---|
| 1 | Hücre yok |
| 2 | Germ hücresi olmaksızın Sertoli hücreleri |
| 3 | Sadece spermatogonia |
| 4 | Sadece birkaç spermatozoid |
| 5 | Birçok spermatozoid |
| 6 | Sadece birkaç erken spermatid |

| | |
|----|---|
| 7 | Farklılaşma olmaksızın birçok erken spermatid |
| 8 | Birkaç geç spermatid |
| 9 | Birçok geç spermatid |
| 10 | Tam spermatogenez |

Avidin-Biotin-Peroksidaz kompleksi (ABC) prosedürüne göre immünohistokimya (İHK) boyama yöntemi uygulandı (21). Bu yöntemde, primer antikor olarak rabbit poliklonal aktif kaspaz-3 antikorunu (Caspase-3 antibody, Katalog no: #RB-1197-B, dilüsyon oranı 1/50; Thermo Fisher Scientific Co., ABD) kullanıldı. Diğer aşamalar için kullanılan İHK kiti (IHC kit, Katalog no: TP-015-HD, UltraVision Detection System, Anti-Polivalent, HRP/DAB, Thermo Fisher Scientific Co., ABD) ile üretici firma talimatlarına göre boyama yapıldı. Boyama, 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromojen ile tamamlandı ve Mayer's hematoksilen ile zıt boyandı. Kesitler yarı kantitatif olarak değerlendirildi ve boya yoğunluk durumlarına göre -: boyanma yok, +: zayıf boyanma, ++: orta boyanma, +++: güçlü boyanma şeklinde derecelendirildi (21).

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel veriler IBM SPSS/PC (Sürüm 21.0, IBM Co., North Castle, New York, ABD) yazılım programı kullanılarak analiz edildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak verildi. Biyokimyasal veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile analiz edildi ve çoklu karşılaştırmalar için post hoc Tukey testi uygulandı. Histolojik veriler, parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi ve Mann-Whitney U testi uygulandı. P<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

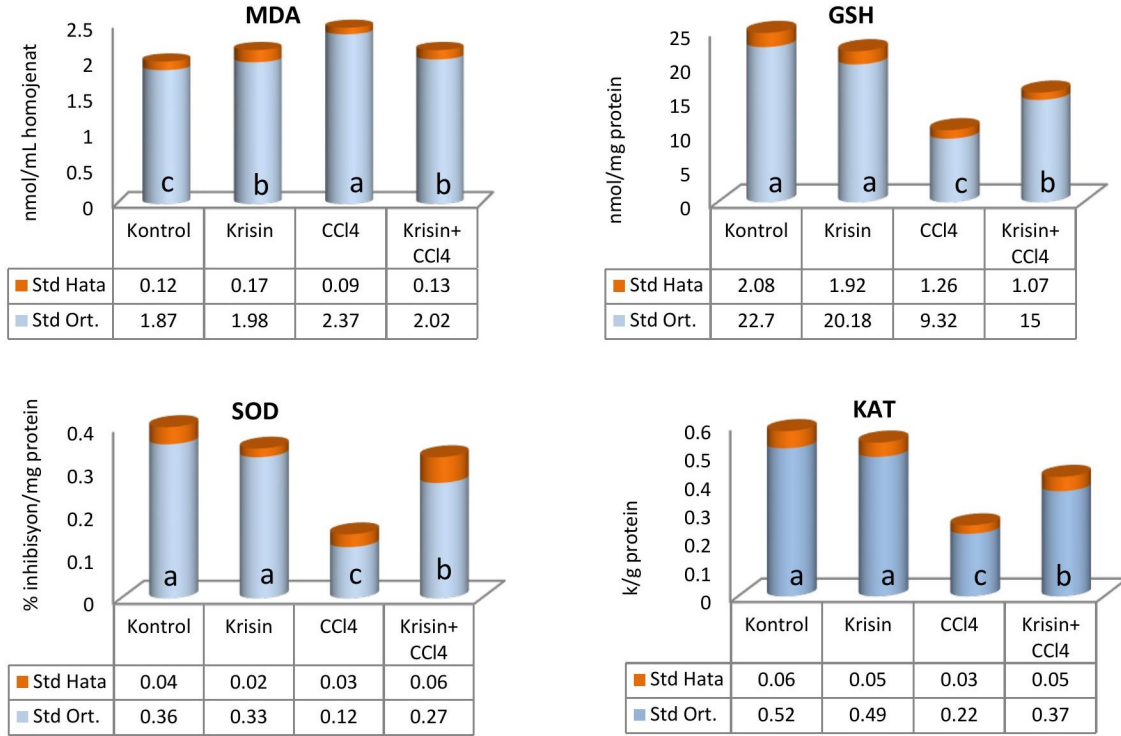
BULGULAR

Oksidatif Stres Göstergeleri

Kontrol grubu ile krisin grubu karşılaştırıldığında, MDA ve GSH düzeyleri ile SOD ve KAT aktiviteleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edildi (Şekil 1, P>0.05). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CCl₄ grubunun MDA düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı

derecede yüksek olduğu belirlendi. Ancak Krisin+CCl₄ grubunun MDA düzeyinin CCl₄ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptandı (Şekil 1, P<0.001). Bunun yanı sıra, CCl₄ grubunun GSH düzeyi ile SOD ve KAT aktivitelerinin

kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu; Krisin+CCl₄ grubunun GSH düzeyi ile SOD ve KAT aktivitelerinin ise CCl₄ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (Şekil 1, P<0.001).



Şekil 1. Tüm grupların oksidatif stres parametre bulguları. Tüm grupların MDA (nmol ml⁻¹ homojenat) ve GSH (nmol mg⁻¹ protein) seviyeleri, SOD (% inhibisyon mg⁻¹ protein) ve KAT (k mg⁻¹ protein) aktiviteleri (Değer ± SH. n = 6). ^{a,b,c}: Sütunlarda farklı üst simgelere sahip ortalama değerler önemli ölçüde farklılık gösterir, ***: P<0.001. SH: Standart hata, MDA: Malondialdehit, GSH: Redükte glutatyon, SOD: Süperoksit dismutaz, KAT: Katalaz.

Figure 1. Oxidative stress parameter findings of all groups. MDA (nmol ml⁻¹ homogenate) and GSH (nmol mg⁻¹ protein) levels, SOD (% inhibition mg⁻¹ protein) and CAT (k mg⁻¹ protein) activities of all groups (Value ± SE. n=6). ^{a,b,c}: Mean values with different superscripts on columns differ significantly, ***: P<0.001. SE: Standard error, MDA: Malondialdehyde, GSH: Reduced glutathione, SOD: Superoxide dismutase, KAT: Catalase.

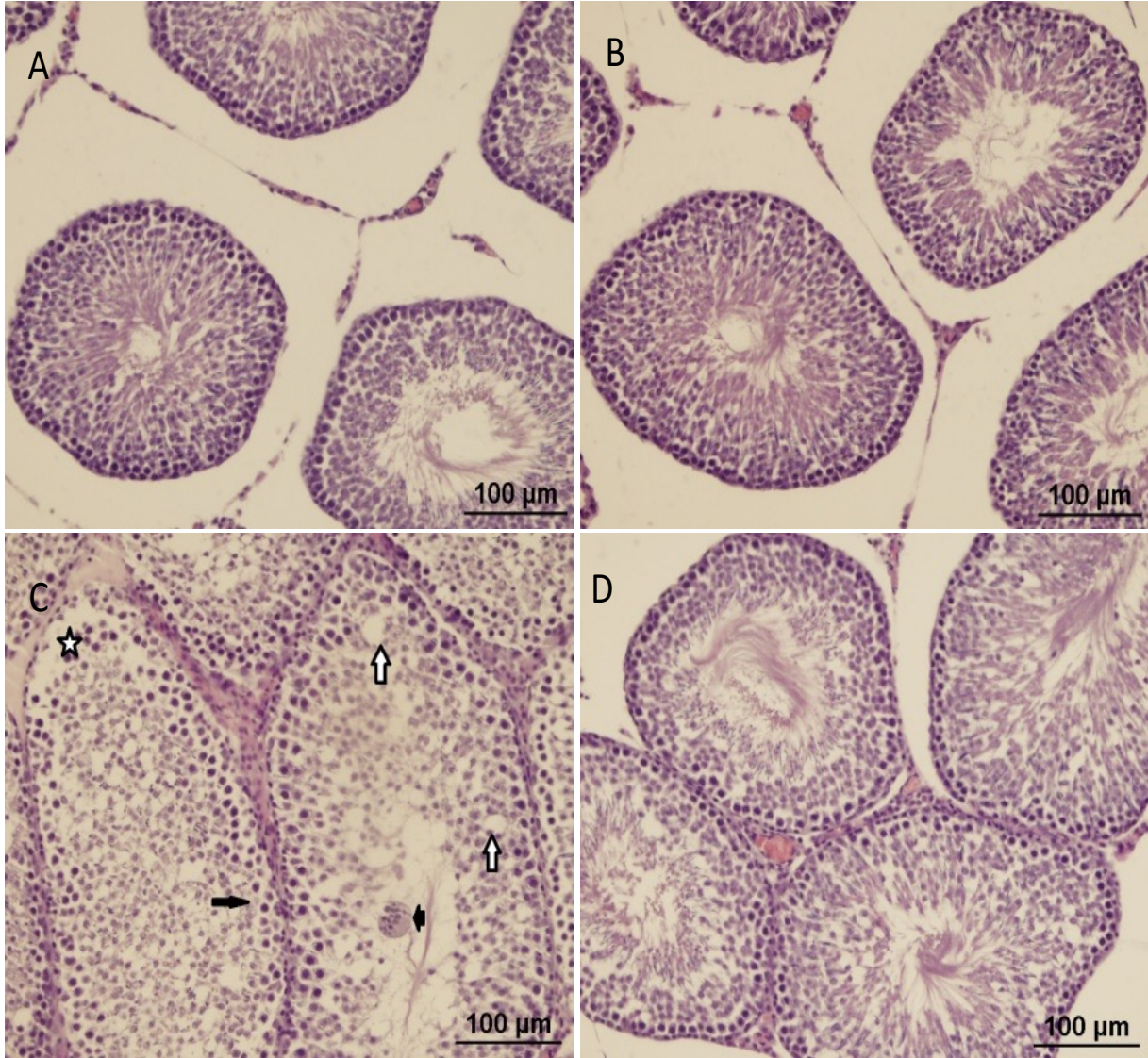
Histolojik, Histomorfometrik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları

Kontrol (Şekil 2A) ve krisin gruplarında (Şekil 2B); testis dokusu normal görünüme sahipti. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CCl₄ grubunda; germinal hücrelerde dejenerasyon, nekroz, disorganizasyon, deskuamasyon ve kayıp, seminifer tübüllerde atrofi, çok çekirdekli sinsityal hücre oluşumu, spermatojenik ve maturasyon arresti ve interstisyel bölgede ödem ve damar konjesyonu gibi testiküler lezyonlar gözlemlendi (Şekil 2C). CCl₄ grubu ile karşılaştırıldığında,

Krisin+CCl₄ grubunda; testiküler lezyonların hafiflediği ve histomimaride iyileşmelerin olduğu tespit edildi (Şekil 2D). JMTBS değerleri bakımından kontrol grubu ile krisin grubu karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edildi (Şekil 3, P>0.05). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CCl₄ grubunun JMTBS değerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi. Ancak Krisin+CCl₄ grubunun JMTBS değerinin CCl₄ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Şekil 3,

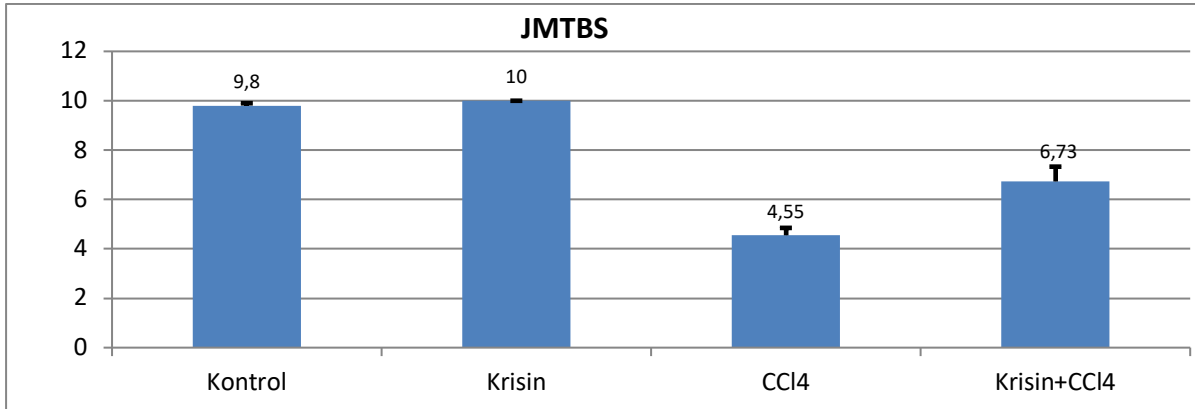
$P < 0.05$). Kontrol (Şekil 4A) ve krisin gruplarında (Şekil 4B); kaspaz-3 immünreaktivitesi bakımından pozitiflik gözlenmedi. Fakat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CCl_4 grubunda; kaspaz-3 immünreaktivitesi bakımından güçlü yoğunlukta pozitiflik tespit edildi (Şekil 4C). CCl_4 grubu ile

karşılaştırıldığında, Krisin+ CCl_4 grubunda ise; kaspaz-3 immünreaktivitesi bakımından orta yoğunlukta pozitiflik gözlendi (Şekil 4D). Tüm grupların immünohistokimyasal boyama yoğunluğu Tablo 2'de gösterildi (Tablo 2).



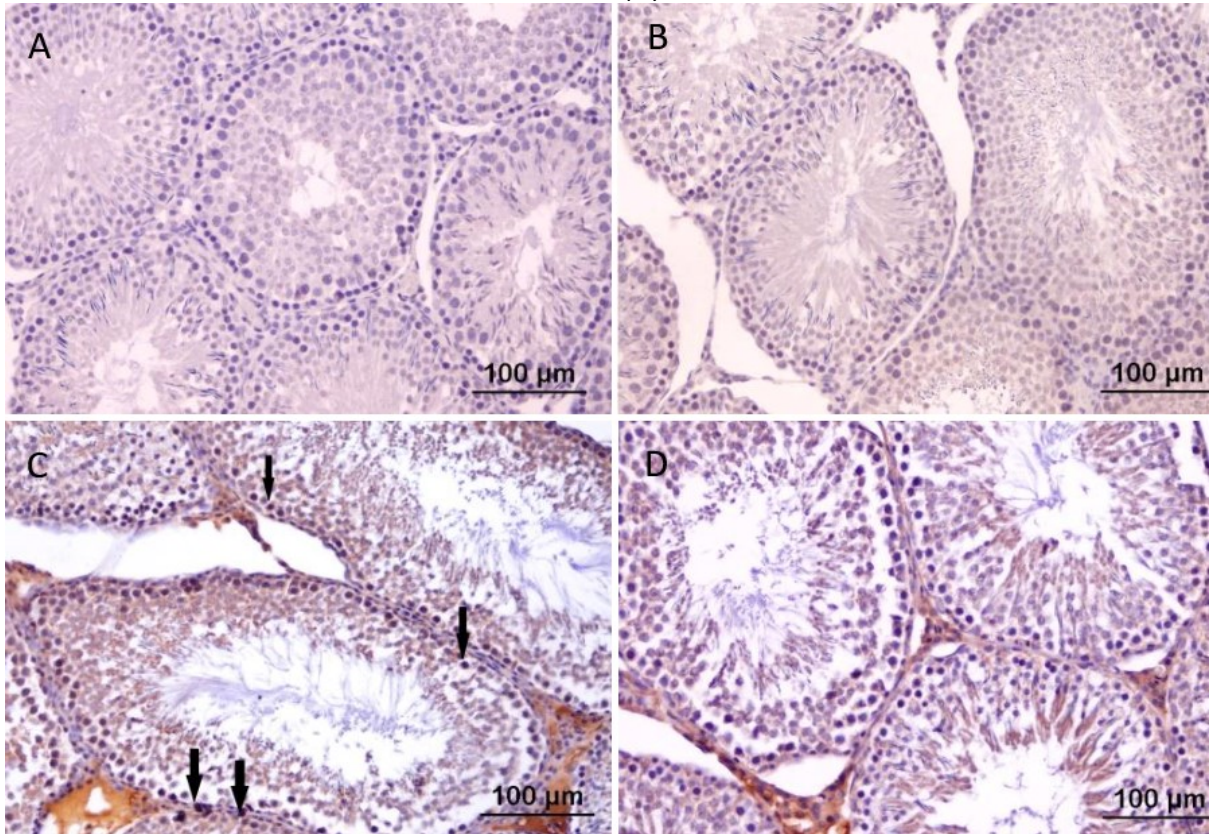
Şekil 2. Tüm grupların histolojik değerlendirme bulguları. **A**-Kontrol grubu ve **B**-Krisin grubu; normal testis histolojisi (H&E). **C**- CCl_4 grubu; germinal hücrelerde dejenerasyon (beyaz oklar), disorganizasyon (siyah ok) ve kayıp (yıldız), çok çekirdekli sinsityal hücreler (ok başı) (H&E). **D**-Krisin + CCl_4 grubu; hafif testis lezyonlarının yanı sıra histomimaride restoratif görünüm (H&E), CCl_4 : Karbon tetraklorür, H&E: Hematoksiyen ve Eozin.

Figure 2. Histological evaluation findings of all groups. **A**-Control group and **B**-Chrysin group; normal testis histology (H&E). **C**- CCl_4 group; degeneration (white arrows), disorganisation (black arrow), and loss (star) in germinal cells, multinuclear syncytial cells (arrowhead) (H&E). **D**-Chrysin + CCl_4 group; restorative appearance as well as mild testicular lesions in histoarchitecture (H&E), CCl_4 : Carbon tetrachloride, H&E: Hematoxylin and Eosin.



Şekil 3. Tüm grupların histomorfometrik değerlendirme bulguları. Tüm grupların JMTBS'nun aritmetik ortalamalarının dağılımı (Değer \pm SH, n=6). ^{a,b,c}: Sütunlarda farklı üst simgelere sahip ortalama değerler önemli ölçüde farklılık gösterir, *: P<0.05. SH: Standart hata, JMTBS: Johnsen's Ortalama Testiküler Biyopsi Skoru.

Figure 3. Histomorphometric evaluation findings of all groups. Distribution of arithmetic mean of JMTBS of all groups (Value \pm SE, n=6). ^{a,b,c}: Mean values with different superscripts on columns differ significantly, *: P<0.05. SE: Standard error, JMTBS: Johnsen's Mean Testicular Biopsy Score.



Şekil 4. Tüm grupların immünohistokimyasal değerlendirme bulguları. A-Kontrol grubu ve B-Krisin grubu; kaspaz-3 immünoreaktivitesi yok (İHK, Mayer'in hematoksilin zıt boyaması). C-CCl₄ grubu; güçlü kaspaz-3 immünoreaktivitesi (oklar) (İHK, Mayer'in hematoksilin zıt boyaması). D-Krisin + CCl₄ grubu; orta derecede kaspaz-3 immünoreaktivitesi (İHK, Mayer'in hematoksilin zıt boyaması), CCl₄: Karbon tetraklorür, İHK: İmmünohistokimya.

Figure 4. Immunohistochemical evaluation findings of all groups. **A**-Control group and **B**-Chrysin group; no caspase-3 immunoreactivity (IHC, Mayer's hematoxylin counterstain). **C**-CCl₄ group; strong caspase-3 immunoreactivity (arrows) (IHC, Mayer's hematoxylin counterstain). **D**-Chrysin + CCl₄ group; moderate caspase-3 immunoreactivity (IHC, Mayer's hematoxylin counterstain), CCl₄: Carbon tetrachloride, IHC: Immunohistochemistry.

Tablo 2. Tüm grupların immünohistokimyasal boyama yoğunluğu.

Table 2. Immunohistochemical staining intensity of all groups.

| Gruplar | Kontrol | Krisin | CCl ₄ | Krisin+CCl ₄ |
|----------|---------|--------|------------------|-------------------------|
| Kaspaz-3 | - | - | +++ | ++ |

Skorlama; -: boyanma yok, +: zayıf boyanma, ++: orta boyanma, +++: güçlü boyanma olarak belirlendi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Endüstriyel bir kimyasal olan CCl₄, testis toksisitesini indükleyen mutlak bir hepatotoksin olarak bilinmektedir (22). CCl₄ toksisitesinin temeli ise, sitokrom P450 (CYP) sistemi tarafından gerçekleştirilen biyo-transformasyonuna dayanmaktadır. CYP genleri, karaciğer dokularında yüksek seviyelerde ekspresye edildiğinden CCl₄'ün karaciğer üzerindeki güçlü toksik etkileri bu yolla açıklanmaktadır. Bununla birlikte, steroidojenik ve steroidojenik olmayan CYP enzimleri dahil olmak üzere üreme dokularında CYP ekspresyonunun önemi hakkında artan kanıtlar da CCl₄'ün reproduktif toksisite oluşturma potansiyelini desteklemektedir. CCl₄'ün sitokrom oksidaz enzim kompleksi aracılığıyla dekompozisyonu sonucu oluşan triklorometil (CCl₃) ve triklorometil peroksil (CCl₃O₂) radikalleri; sitoplazmik membran fosfolipitlerinde lipit peroksidasyonuna (LPO) sebep olmakta ve testiküler dokularda oksidatif stresi indüklemek üzere antioksidan enzimlerin aktivitelerini azaltmaktadır (1,23).

Birçok çalışma, deneysel CCl₄ maruziyetinin testis dokusunda LPO biyobelirteci olan MDA düzeyini arttırdığını, güçlü bir hücresele antioksidan olan glutatyon peroksidaz (GPX) düzeyi ile birincil antioksidatif savunmayı temsil eden SOD ve KAT aktivitelerini ise azalttığını öne sürmüştür (24-26). Benzer şekilde çalışma sonuçlarımız; ratlara 14 gün boyunca 0.5 ml/kg CCl₄ uygulamasının, testis dokusunda MDA'nın artmasına; GSH, SOD ve KAT'ın ise azalmasına neden olduğunu göstermiştir. Bitkisel ürünler ve onların aktif bileşenleri olarak bilinen bitki sekonder metabolitlerinin, doku ve organları ROS'un saldırılarından koruduğu ve oksidatif stres

oluşumunu engellediği bilinmektedir (27). Flavanoid aktif bileşenini içeren feverfew bitki ekstresinin, rat testisinde CCl₄ kaynaklı oksidatif travmayı hafifleterek MDA içeriğini azalttığı; GPX ve SOD gibi antioksidan enzim aktivitelerini ise arttırdığı tespit edilmiştir (28). Flavonoid, tanen ve fenol gibi bazı fotoaktif bileşenleri içerdiği bilinen *Pleurotus tuber-regium* mantar türünün diyetle alınımının, CCl₄ kaynaklı üreme ve testis hasarını iyileştirdiği bildirilmiştir (24). Çalışmada, ratlarda doza bağımlı olarak *P. tuber-regium* uygulamasının, testiste MDA'nın azalmasını; peroksidaz, GSH, SOD ve KAT'ın ise artmasını sağladığı ifade edilmiştir. Doğal flavanoidlerden bir diğeri olan krisin ile ilgili çalışmalar; 7 gün boyunca 50 mg/kg krisin uygulamasının, rat testisinde kolistin (10) ve doksorubisin (29) kaynaklı oksidatif stresi azaltarak MDA seviyesini düşürdüğünü; GSH seviyesi ile SOD ve KAT aktivitelerini ise yükselttiğini öne sürmüştür. Flavonoidler yapıları gereği LPO'nu bloke edebildikleri için reaktif oksijen türlerine (ROS) bağlanabilmekte, metal iyonlarını şelatlayabilmekte ve bu sayede antioksidan özellik gösterebilmektedirler (30). Paralel olarak, çalışmamızda ratlara 14 gün boyunca 100 mg/kg krisin uygulamasının, CCl₄ kaynaklı oksidatif hasara karşı faydalı etkiler sergilediği ve testis dokusunda MDA'nın azalmasına; GSH, SOD ve KAT'ın ise artmasına yol açtığı tespit edilmiştir.

Akut veya kronik CCl₄ uygulamasının erkek laboratuvar hayvanlarında oksidatif toksisite yoluyla üreme sisteminde çeşitli morfolojik değişikliklere ve dolayısıyla bazı yapısal hasarlara neden olduğu bildirilmiştir (14). Zira, CCl₄ metabolitlerinin, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFAs) ile reaksiyona girerek lipidler ve proteinlerle kovalent eklentiler oluşturduğu ve dolayısıyla lipid peroksit oluşumu ve hücre zarlarının yıkımı ile testis hasarına yol açtığı belirtilmiştir (31). CCl₄ uygulamasını takiben artan LPO seviyesinin ve azalan antioksidan aktivitenin, testiste çeşitli derecelerde histopatolojik hasarlara neden olabileceği ifade edilmiştir (14). Ratlara 7 gün boyunca 0.5 ml/kg CCl₄'ün uygulandığı bir çalışmada,

seminifer tübül duvarındaki spermatojenik hücrelerde bazı dejeneratif değişiklikler ile birlikte hücresel kayıpların, yoğun tübüler hasarın ve hatta bazı tübüllerde atrofinin gözlemlendiği bildirilmiştir. İnterstisyel alanda ise ayrılmalar ve ödem ile damar konjesyonunun varlığı ifade edilmiştir (32). Wistar ratlara intraperitoneal yolla 14. gün 1 ml/kg CCl₄'ün uygulandığı bir başka çalışmada ise, seminifer tübül epitelinde şekil düzensizliği, hücrelerin ayrılması ve vakuolizasyon gibi dejeneratif değişikliklerin yanı sıra seminifer tübüllerin dış çapında ve germinal epitel kalınlığında azalmanın bulunduğu rapor edilmiştir (25). 10 hafta boyunca, haftalık 0.25 ml/kg CCl₄'ün Wistar ratlara uygulandığı birkaç çalışmada ise; germinal hücrelerde nekroz, dejenerasyon, deskuamasyon, disorganizasyon ve azalma, seminifer tübüllerde atrofi, bazal membranda kalınlaşma, interstisyel ödem ve konjesyon, çok çekirdekli sınırsız hücre oluşumu, spermatojenik arrest ve düşük JMTBS gibi histopatolojik değişikliklerin gözlemlendiği belirtilmiştir. Çalışmacılar ayrıca apoptotik hücre indeksinde bir artışın var olduğunu da ortaya koymuşlardır (2,14,33). Benzer şekilde, çalışmamızda CCl₄ uygulamasının birçok testiküler lezyonu indüklediği, JMTBS'nu azalttığı ve kaspaz-3 immünoaktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir.

Apoptoz, testiste fizyolojik olarak yeterli sayıda germ hücrelerini korumak için ortaya çıkan, fakat patolojik olarak arttığında spermatogenezin bozulmasına neden olabilen bir hücre ölüm şeklidir (28,33). Oksidatif stresin genellikle hücre apoptozunu başlatarak kaspaz-3 aktivasyonu ile sonuçlanan kaspaz yolunu aktive ettiği bilinmektedir (34). Memeli hücrelerinde apoptozun bir belirteci olarak bilinen kaspaz-3, sitokrom c salınımı sonucu aktifleşerek diğer kaspaz enzimlerini aktive edip apoptotik kaskadı başlatmakta ve DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır (11). CCl₄ kaynaklı testiküler toksisitede de, aşırı serbest radikal üretiminin aracılık ettiği DNA hasarı ve artmış germ hücre apoptozu rapor edilmiştir (2,26,33).

Flavonoidlerin, ROS üretiminde yer alan enzimleri inhibe etmelerinin yanı sıra membran

lipidlerini oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı korudukları bilinmektedir (35). Ratlara uygulanan *Jurinea dolomiaea* kök ekstresinin, içerdiği aktif flavanoid bileşenler sayesinde, CCl₄ kaynaklı histopatolojik değişiklikleri iyileştirdiği ve hatta klasik testis histolojisine yakınlaştırdığı ifade edilmiştir (36). Bu durum, flavanoidlerin doğrudan veya dolaylı olarak oksidatif hasarı iyileştirebilme yetenekleri ile ilişkilendirilmiştir. Diyet biyoflavonoidlerden biri olan kuersetinin ise, antioksidatif etkisine bağlı olarak ratlarda CCl₄'ün neden olduğu testiküler histopatolojik lezyonları ve apoptozu hafiflettiği ortaya konmuştur (14). 3 hafta boyunca 50 mg/kg krisin uygulamasının, ratlarda nitrofurazon kaynaklı testiküler toksisiteye karşı koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir (37). Çalışmada, doğal flavanoid kaynağı olan krisinin; testis hasarını azalttığı, spermatogenezis siklusunu restore ettiği ve kaspaz-3 aktivitesini inhibe ettiği öne sürülmüştür. Paralel olarak, çalışmamızda krisin uygulamasının, CCl₄ kaynaklı birçok testiküler lezyonu hafiflettiği, JMTBS'nu arttırdığı ve kaspaz-3 immünoaktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. Krisin gibi flavanoidler, CYP aktivitesi/ekspresyonu üzerinde inhibitör etki oluşturabilmelerinin (14) yanı sıra serbest radikal süpürme kabiliyetlerinden kaynaklı olarak anti-apoptotik etki gösterebilmektedirler (37).

Sonuç olarak, çalışmamızda krisinin, antioksidan ve diğer biyolojik etkileri yoluyla, ratlarda CCl₄'ün neden olduğu testiküler toksisiteyi azalttığı gözlemlenmiştir. Doğal ve güçlü bir flavonoid olan krisinin, erkek üreme sisteminde CCl₄'ün neden olduğu hasar için potansiyel bir tedavi olabileceği düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Rahmouni F., Daoud S., Rebai T., 2019. Teucrium polium attenuates carbon tetrachloride-induced toxicity in the male reproductive system of rats. *Andrologia*, 51, e13182.

2. Yüce A., Türk G., Çeribaşı S., Güvenç M., Çiftçi M., Sönmez M., Özer Kaya Ş., Çay M., Aksakal M., 2013. Effectiveness of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark oil in the prevention of carbon tetrachloride-induced damages on male reproductive system. *Andrologia*, 46, 263-272.
3. EPA, IRIS, 2010. Toxicological review of carbon tetrachloride (External Review Draft). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/635/R-08/005A.
4. Elgawish RAR., Rahman HGA., Abdelrazek HMA., 2015. Green tea extract attenuates CCl₄-induced hepatic injury in male hamsters via inhibition of lipid peroxidation and p53-mediated apoptosis. *Toxicol Rep*, 2, 1149-1156.
5. Safhi MM., 2018. Nephroprotective effect of zingerone against CCl₄-induced renal toxicity in Swiss albino mice: Molecular mechanism. *Oxid Med Cell Longev*, 2474831, 1-8.
6. Abdel Moneim AE., 2016. Prevention of carbon tetrachloride (CCl₄)-induced toxicity in testes of rats treated with *Physalis peruviana* L. fruit. *Toxicol Ind Health*, 32, 1064-1073.
7. Ritesh KR., Suganya A., Dileepkumar HV., Rajashekar Y., Shivanandappa T., 2015. A single acute hepatotoxic dose of CCl₄ causes oxidative stress in the rat brain. *Toxicol Rep*, 2, 891-895.
8. Abdou HS., Salah SH., Hoda FB., 2012. Effect of pomegranate pretreatment on genotoxicity and hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in male rats. *J Med Plant Res*, 6, 3370-3380.
9. Küçükler S., Benzer F., Yıldırım S., Gür C., Kandemir FM., Bengü AS., Ayna A., Çağlayan C., Dörtbudak MB., 2021. Protective effects of chrysin against oxidative stress and inflammation induced by lead acetate in rat kidneys: a biochemical and histopathological approach. *Biol Trace Elem Res*, 199, 1501-1514.
10. Aksu EH., Kandemir FM., Küçükler S., Mahamadu A., 2018. Improvement in colistin-induced reproductive damage, apoptosis and autophagy in testes via reducing oxidative stress by chrysin. *J Biochem Mol Toxicol*, 32, 11, e22201.
11. Eldutar E., Kandemir FM., Küçükler S., Çağlayan C., 2017. Restorative effects of chrysin pretreatment on oxidant-antioxidant status, inflammatory cytokine production, and apoptotic and autophagic markers in acute paracetamol-induced hepatotoxicity in rats: An experimental and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol*, 31, e21960.
12. Del Fabbro L., Jesse CR., de Gomes MG., Borges Filho C., Donato F., Souza LC., Goes AR., Furian AF., Boeira SP., 2019. The flavonoid chrysin protects against zearalenone induced reproductive toxicity in male mice. *Toxicol*, 165, 13-21.
13. Çiftçi O., Özdemir İ., Aydın M., Beytur A., 2012. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia*, 44, 181-186.
14. Sönmez M., Türk G., Çeribaşı S., Çiftçi M., Yüce A., Güvenç M., Özer Kaya Ş., Çay M., Aksakal M., 2014. Quercetin attenuates carbon tetrachloride-induced testicular damage in rats. *Andrologia*, 46, 848-858.
15. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95, 351-358.
16. Ellman GL., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82, 70-77.
17. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
18. Sun Y., Oberley LW., Li Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34, 497-500.
19. Aebi H., 1984. Catalase in vitro methods in enzymology. In: Willam BJ, editor. *Methods in Enzymology*. New York, NY, USA: Academic Press, pp. 121-126.
20. Johnsen SG., 1970. Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1, 2-25.

21. Seven İ., Tatlı Seven P., Gül Baykalır B., Parlak Ak T., Özer Kaya Ş., Yaman M., 2020. Bee glue (propolis) improves reproductive organs, sperm quality and histological changes and antioxidant parameters of testis tissues in rats exposed to excess copper. *Andrologia*, 52, e13540.
22. Ojo OA., Ojo AB., Ajiboye B., Fadaka A., Imiere OB., Adeyonu O., Olayid I., 2016. Protective influence of *Ficus asperifolia* Miq leaf extract on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced testicular toxicity in rats. *J Appl Pharm Sci*, 6, 6, 37-41.
23. Sahreen S., Khan MR., Khan RA., 2013. Ameliorating effect of various fractions of *Rumex hastatus* roots against hepato- and testicular toxicity caused by CCl₄. *Oxid Med Cell Longev*, 325406.
24. Okolo KO., Orisakwe OE., Siminialay IM., 2017. *Pleurotus tuber-regium* mushrooms in the diet of rats ameliorates reproductive and testicular injury caused by carbon tetrachloride. *Clin Phytoscience*, 3, 14-24.
25. Mazani M., Ojarudi M., Banaei S., Salimnejad R., Latifi M., Azizi H., Rezagholizadeh L., 2020. The protective effect of cinnamon and ginger hydro-alcoholic extract on carbon tetrachloride-induced testicular damage in rats. *Andrologia*, 52, e13651.
26. Keshtmand Z., Akbaribazm M., Bagheri Y., Oliaei R., 2021. The ameliorative effects of *Lactobacillus coagulans* and *Lactobacillus casei* probiotics on CCl₄-induced testicular toxicity based on biochemical, histological and molecular analyses in rat. *Andrologia*, 53, e13908.
27. Joshi D., Mittal DK., Shukla S., Srivastav SK., Dixit VA., 2017. *Curcuma longa* Linn. extract and curcumin protect CYP 2E1 enzymatic activity against mercuric chloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress: A protective approach. *Exp Toxicol Pathol*, 69, 6, 373-382.
28. Mazani M., Banaei S., Rezagholizadeh L., 2020. Feverfew attenuates carbon tetrachloride-induced testicular damage in rats. *J Herbmед Pharmacol*, 9, 42-47.
29. Belhan S., Özkaraca M., Özdek U., Kömüroğlu, AU., 2020. Protective role of chrysin on doxorubicin-induced oxidative stress and DNA damage in rat testes. *Andrologia*, 52, 9, e13747.
30. Mladenovic JM., Paunovic MG., Matic MM., Knezevic VS., Ognjanovic Bl., Stajin AS., Saicic ZS., 2014. Copper-induced changes of lipid peroxidation and hemato-biochemical parameters in rat blood: Protective role of flavonoids. *Arch Biol Sci*, 66, 1271-1279.
31. Szymonik-Lesiuk S., Czechowska G., Stryjecka-Zimmer M., Slomka M., Madro A., Celinski K., Wielosz M., 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 10, 309-315.
32. Emek H., Dönmez DB., Bayçu C., Musmul A., 2017. Erişkin erkek sıçanlarda karbon tetraklorür ile oluşturulan testis hasarı üzerine kuersetinin etkisi. *Osmangazi Tıp Derg*, 39, 65-73.
33. Türk G., Çeribaşı S., Sönmez M., Çiftçi M., Yüce A., Güvenç M., Özer Kaya Ş., Çay M., Aksakal M., 2016. Ameliorating effect of pomegranate juice consumption on carbon tetrachloride-induced sperm damages, lipid peroxidation, and testicular apoptosis. *Toxicol Ind Health*, 32, 126-137.
34. Hassan MH., Ghobara M., Abd-Allah GM., 2014. Modulator effects of meloxicam against doxorubicin-induced nephrotoxicity in mice. *J Biochem Mol Toxicol*, 28, 337-346.
35. Kumar S., Pandey AK., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci World J*, 162750.
36. Shah NA., Khan MR., 2017. Increase of glutathione, testosterone and antioxidant effects of *Jurenia dolomiaea* on CCl₄ induced testicular toxicity in rat. *BMC Complement Altern Med*, 17, 206.
37. El-Sisi AE., El-Sayad ME., Abdelsalam NM., 2017. Protective effects of mirtazapine and chrysin on experimentally induced testicular damage in rats. *Biomed Pharmacother*, 95, 1059-1066.