

Orijinal Araştırma

Radyasyona Maruz Kalan Ratlarda Ellajik Asidin Testis Dokusundaki Etkisinin İncelenmesi

The Examination of Effect of Ellagic Acid on Testicular Tissues of Rats Exposed to Radiation

K. Esin Tasdemir¹, Nalan Kaya¹, Elif Erdem Guzel², Gonca Ozan Kocamuftuoglu³,
F. Osman Yilmaz¹, I. Enver Ozan¹

¹Firat University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology, Elazığ, Turkey

²Mardin Artuklu University School of Health, Department of Nursing, Mardin, Turkey

³Firat University Faculty of Veterinary Department of Biochemistry, Elazığ, Turkey

Özet

Amaç: Radyasyon nedenli erkek infertilitesinin patogenezinde oksidatif stres rol oynar. Ellajik asit; antioksidan özelliğe sahip polifenolik bir bileşiktir. Çalışmada radyasyona maruz kalan ratlarda ellajik asidin testis dokusundaki etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Gereç-Yöntem: Çalışmada 8 haftalık 30 adet Spraque-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar beş gruba ayrıldı (n:6): grup I (kontrol), grup II (radyasyon), grup III (radyasyon+ellajik asit), grup IV (ellajik asit), grup V (mısırözü yağı). Radyasyon ve radyasyon+ellajik asit gruplarındaki ratlar, çalışmanın ilk gününde, tek doz 8 Gy'lik radyasyona maruz bırakıldılar. Radyasyon+ellajik asit ve ellajik asit gruplarındaki ratlara çalışmanın ikinci gününden itibaren 7 hafta boyunca mısırözü yağında çözdürülmüş 12 mg/kg dozunda ellajik asit gün aşırı oral gavajla verildi. Deney süresi sonunda tüm ratlar dekapite edildi. Testis dokuları çıkarıldı. Histokimyasal boyamalar ile TUNEL yöntemi uygulandı. Biyokimyasal analizler yapıldı.

Bulgular: Histolojik değerlendirmelerde radyasyon grubuna ait kesitlerde seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon, vasküler konjesyon, atrofik tübüller, interstisyel alanda ödem ve bazı tübüllerin lümenlerine dökülmüş immatür hücreler tespit edildi. Radyasyon+ellajik asit grubuna ait kesitler, radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında ise belirgin iyileşmeler gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon grubunda TUNEL pozitif hücre sayısında artış tespit edilirken, radyasyon+ellajik asit grubunda herhangi bir artış izlenmedi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında radyasyon grubunda malondialdehit (MDA) düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığı, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ise azaldığı; radyasyon+ellajik asit grubunda ise MDA seviyesinin azaldığı, SOD aktivitesinin ise arttığı tespit edildi.

Sonuç: Belirtilen dozda radyasyon uygulamasının testis dokusuna hasar verdiği tespit edildi. Ellajik asit uygulamasının ise; antioksidan özelliği sayesinde radyasyonun oluşturduğu olumsuz etkileri belirgin biçimde azalttığı gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Radyasyon, Ellajik Asit, Testis, Histoloji, İmmünohistokimya.

Abstract

Aim: Oxidative stress plays a role in the pathogenesis of radiation induced male infertility. Ellagic acid; is a polyphenolic compound with antioxidant properties. The aim of the study is to investigate the effect of allygic acid on testicular tissue in exposed rats.

Material-Method: In the study, 30 male Spraque-Dawley rats were used for 8 weeks. The rats were divided into five groups (n: 6): group I (control), group II (radiation), group III (radiation + ellagic acid), group IV (ellagic acid), group V (corn oil). The rats in radiation group and radiation + ellajic acid group were exposed to a single dose of 8 Gy of radiation on the first day of study. The rats in radiation + ellajic acid group and ellajic acid group were given 12 mg / kg ellagic acid dissolved in corn oil for 7 weeks by oral gavage from the second day of study. At the end of the experiment period, all rats were decapitated. Testicular tissue removed. TUNEL method was applied with histochemical staining. Biochemical analyzes were performed.

Results: In the histological evaluations, degeneration of seminiferous tubular germinal epithelium, vascular congestion, atrophic tubules, interstitial area, edema and immature cells spilled in the lumens of some tubules were detected in sections of radiation group. Significant improvements were observed in radiation + ellajic acid group compared to radiation group. When compared with control group, an increase in TUNEL positive cell number was detected in radiation group, but no increase in radiation + ellajic acid group was observed. Compared to control group, malondialdehyde (MDA) levels significantly increased, superoxide dismutase (SOD) activity decreased in radiation group; whereas in radiation + ellajic acid group, MDA level decreased and SOD activity increased.

Conclusion: It has been determined that the radiation dose at the indicated dose damages the testicular tissue. Ellajic acid application; it has been observed that the antioxidant property significantly reduces the adverse effects of radiation.

Keywords: Radiation, Ellagic Acid, Testis, Histology, Immunohistochemistry.

Giriş

Radyasyon, yüksek hızdaki partiküllerin ve elektromanyetik dalgaların enerjisi olarak bilinir (1). İyonize radyasyon ve iyonize olmayan radyasyon şekilde tanımlanır (2). Testisler, antikanser ajanlar ve radyasyon gibi gonadotoksinlere karşı oldukça hassastırlar (3). Testislerde oluşan hasarlar ve onarım dereceleri, maruz kalınan radyasyonun dozuna bağlıdır. Düşük dozlarda onarım olsa da, yüksek dozlarda hasarın geri dönüşü mümkün olmamaktadır (1).

Ellajik asit (EA) (2,3,7,8-tetrahydroxy [1]-benzopyranol [5,4,3-cde] benzopyran-5,10-dione) başta kırmızı meyveler olmak üzere çeşitli bitki türlerinde bulunan fenolik bir lakton bileşiğidir (4). Nar, çilek, ahududu, kızılçik ve üzüm gibi meyvelerde EA konsantrasyonu oldukça yüksektir (5). EA, fonksiyonel dört tane hidroksil ve iki tane lakton grubu içerir. Bu sayede serbest radikalleri ortadan kaldırma kapasitesi olan güçlü bir antioksidandır (6).

Çalışmada, radyasyon maruziyetinin testisler üzerine olan olası etkilerinin ortaya konulması ve buna karşı güçlü bir antioksidan olan ellajik asitin muhtemel koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem

Çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 06.05.2015 tarihli 2015/08 toplantı sayılı ve 94 nolu kararı ile etik yönden uygun bulunarak başlatıldı. Çalışmada 180-200 gr ağırlığında 8 haftalık Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar, 21±1 °C ortam sıcaklığında, 12 saat (07:00-19:00) aydınlık, 12 saat (19:00-07:00) karanlık fotoperiyodunda barındırıldı. Ratlar grup I (kontrol), grup II (radyasyon), grup III (radyasyon + ellajik asit), grup IV (ellajik asit), grup V (mısırözü yağı) olmak üzere rastgele 5 gruba ayrıldı (n:6). Kontrol grubundaki ratlara deney süresi boyunca herhangi bir işlem uygulanmadı. Radyasyon ve radyasyon+ellajik asit gruplarındaki ratlar, çalışmanın ilk gününde, tek doz 8 Gy'lik radyasyona maruz bırakıldılar. Radyasyon uygulaması yapılacak ratlar eter anestezisi altında 30x20 ebatlarında hazırlanan karton mukavva üzerine yerleştirildi. Hastane ortamında deneyimli personeller tarafından ratların skrotal bölgesi hedef alınacak şekilde ışınlama uygulandı. Radyasyon+ellajik asit ve ellajik asit gruplarındaki ratlara çalışmanın ikinci gününden itibaren 7 hafta boyunca gün aşırı oral gavaj yoluyla mısırözü yağında

çözdürülmüş 12 mg/kg dozunda ellajik asit (A15722 Lot: 10176718, Ellagic acid hydrate, Alfa Aesar, Germany) uygulandı (7, 8). Mısırözü yağı grubundaki ratlara ise çözücü olarak kullanılan mısırözü yağının dokuda herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığının kontrolü amacıyla ellajik asiti çözmede kullanılan ile eşit miktarda mısırözü yağı deney süresi boyunca oral gavaj yoluyla gün aşırı uygulandı. 7 haftalık deney süresi sonunda tüm gruplardaki ratlar ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) anestezisi altında dekapite edildi. Testis dokuları çıkarılarak rutin histolojik değerlendirmeler ve biyokimyasal analizler yapıldı.

Histokimyasal Analizler

Testis dokuları Bouin's solüsyonunda yaklaşık 8 saat boyunca tespit edildikten sonra sırasıyla %50'lik, %60'lık ve %70'lik etil alkol solüsyonlarında yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Dehidratasyondan sonra ksilolde parlatılıp parafine (P3558-1kg Sigma- Aldrich Paraplast Embedding Media, U.S.A) gömüldü. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığındaki kesitler rodajlı ve polilizinli lamlara alındı. Hazırlanan testis dokusu preparatlarına Hematoksilin-Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi için TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling) boyaması uygulandı. Ayrıca testis dokusunda biyokimyasal olarak MDA düzeyi ile SOD aktivitesi ölçüldü.

Tüm istatistiksel analizler SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programında yapıldı. Normal dağılım gösteren çoklu grupların aralarındaki farklılıkları test etmek için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) uygulandı. İkili karşılaştırmalar için ise post-hoc Tukey testi kullanıldı.

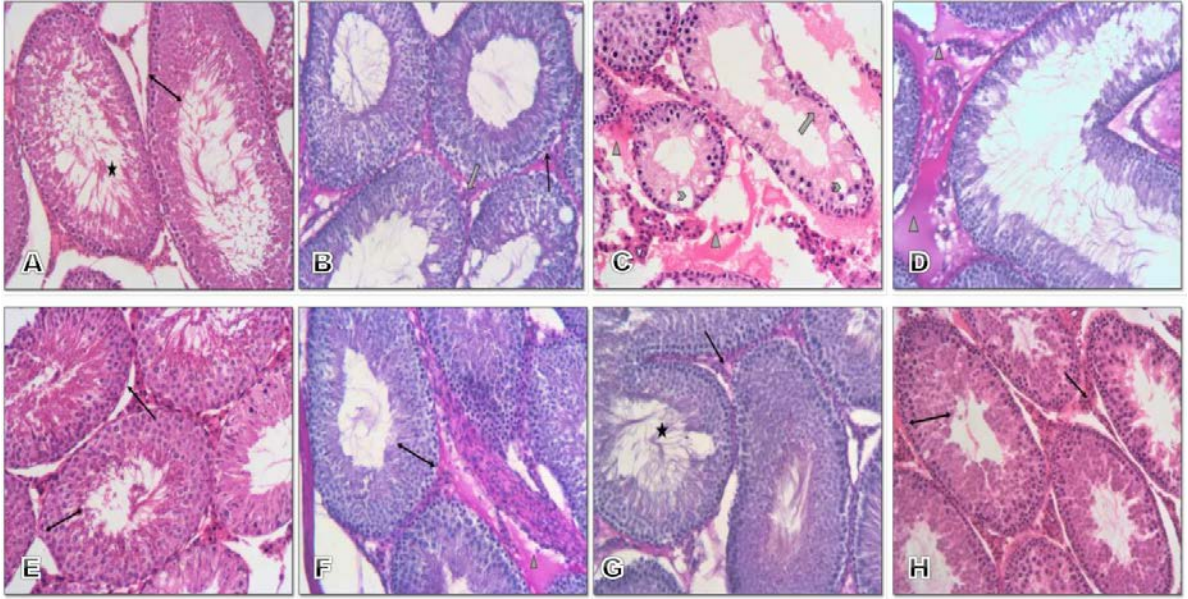
Bulgular

Kontrol grubuna ait ratların testis dokuları incelendiğinde seminifer tübüllerin germinal epiteli ile bazal membranları ve interstisyel alan normal yapıda izlendi (Şekil 1A, 1B).

Radyasyon grubuna ait kesitlerde seminifer tübül germinal epitelinde önemli derecede vakualizasyon, vasküler konjesyon, atrofik tübüller ve interstisyel alanda ödem tespit edildi (Şekil 1C, 1D). Ellajik asit grubu (Şekil 1G) ve mısırözü yağı grubuna (Şekil 1H) ait

kesitlerdeki bulgular ise kontrol grubuna benzerdi. Radyasyon + ellajik asit grubunda ise radyasyon grubunda gözlenen histopatolojik bulgularda belirgin iyileşme izlendi (Şekil

1E,1F). Tüm gruplardaki ratlara ait kesitler incelenerek bir histoskor tablosu oluşturuldu (Tablo 1).



Şekil 1- A: Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli (\leftrightarrow) ve normal spermatogenez (\star). H&E x 200. **B:** Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül bazal membranı (\rightarrow) ve interstisyel alan (\Rightarrow) PAS x200. **C:** Radyasyon grubu. Seminifer tübül germinal epitelinde vakualizasyon (\blacktriangleright), seminifer tübül germinal epiteli kalınlığında azalma (\Rightarrow) ve interstisyel alanda ödem (Δ). H&E x200. **D:** Radyasyon grubu. İnterstisyel alanda ödem (Δ) PAS x200. **E:** Radyasyon + EA grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli (\leftrightarrow), ve normal görünümlü seminifer tübül bazal membranı (\rightarrow). H&E x200. **F:** Radyasyon + EA grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli (\leftrightarrow) ve interstisyel alanda azalmış ödem (Δ) PAS x200. **G:** EA grubu. Normal görünümlü interstisyel alan (\rightarrow) ve normal spermatogenez (\star). PAS x200. **H:** Mısırrözü yağı grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli (\leftrightarrow) ve normal görünümlü interstisyel alan (\rightarrow) H&E x200.

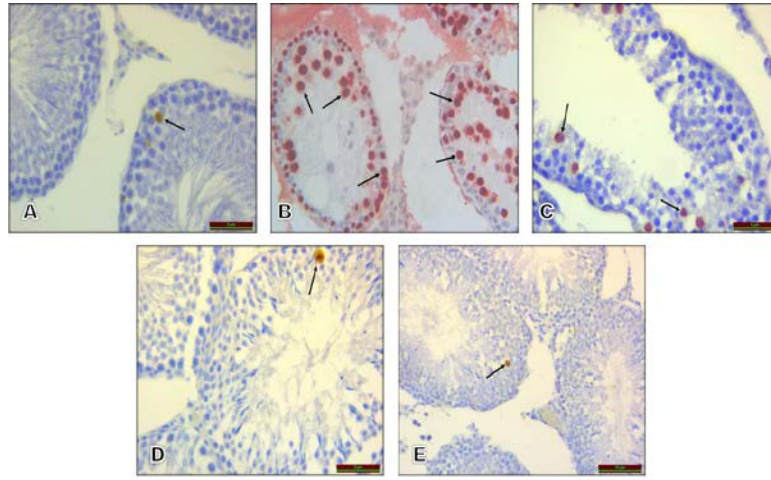
Tablo 1. Histolojik değerlendirmelere ait histoskor ve apoptotik indeks tablosu.

Gruplar	Konjesyon	Seminifer tübül dejenerasyonu	Atrofik tübül	İnterstisyel ödem	Apoptotik İndeks (%)
Kontrol	0,66±0,51 ^b	0,66±0,51 ^b	0,50±0,83 ^b	1,00±0,63 ^b	1.83 ± 0.75
Radyasyon	3,16±0,40 ^a	3,66±0,51 ^a	2,16±0,75 ^a	3,66±0,51 ^a	21.5 ± 2.94 ^a
Radyasyon+ellajik asit	1,33±0,51 ^b	0,83±0,75 ^b	1,00±0,63 ^b	1,83±0,75 ^b	10.33 ± 1.63 ^{ab}
Ellajik asit	0,83±0,40 ^b	1,16±0,75 ^b	0,50±0,54 ^b	1,33±0,51 ^b	2.16 ± 0.40 ^a
Mısırrözü yağı	1,00±0,63 ^b	0,66±0,51 ^b	0,66±0,51 ^b	1,33±0,51 ^b	2.66 ± 1.63 ^b

Değerler; ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, b:Radyasyon grubuna göre karşılaştırıldığında (p<0.05).

TUNEL pozitifliği; kontrol grubu ve radyasyon+ellajik asit grubunda benzerdi (Şekil 2A; 2C). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon grubunda anlamlı bir artış vardı (Şekil 2B). Apoptotik indeks tablo 1'de verilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon

grubunda MDA düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığı, SOD aktivitesinin ise anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi (p<0.001). Radyasyon+ellajik asit grubunda ise radyasyon grubuna kıyasla MDA düzeylerinde anlamlı azalma, SOD aktivitesinde ise artış saptandı (p<0.001) (Tablo 2).



Şekil 2A. Kontrol grubu. TUNEL pozitif hücre (→). x 400. **B:** Radyasyon grubu. TUNEL pozitif hücre (→). x400. **C :** Radyasyon + EA grubu. Az sayıda TUNEL pozitif hücre (→). x400. **D:** EA grubu. Az sayıda TUNEL pozitif hücre (→). X400. **E:** Mısırzüğü yağı grubu. Az sayıda TUNEL pozitif hücre (→). x400

Tablo 2. Grupların testis dokusu MDA düzeyi ve SOD aktivitesi tablosu.

GRUPLAR	MDA (nmol/g doku)	SOD (ü/g protein)
Kontrol	6,7 ^b	159,8 ^b
Radyasyon	13,8 ^a	136,4 ^a
Radyasyon+ellajik asit	10,2 ^{ab}	153,1 ^b
Ellajik asit	7,05 ^b	166,3 ^b
Mısırzüğü yağı	7,2 ^b	159,03 ^b
p değeri	p < 0.001	p < 0.001

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, b: Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında (p < 0.001).

Tartışma

Radyasyon maruziyeti dokularda biyolojik bir risk faktörü oluşturur. Bu riskin ortadan kaldırılması için, radyasyonun biyolojik etkilerinin öğrenilmesi ve bu etkilerden korunulması gereklidir (1). Yapılan bir çalışmada skrotal bölgeye uygulanan 10, 25 ve 63 Gy'lik radyasyon ışınlamasından sonra seminifer tübüllerde dev hücrelerin varlığına rastlanmıştır (9). Bansal ve ark. 10 Gy dozunda radyasyon ışınlamasından sonra 2. ve 4. haftalarda gözlenen çok çekirdekli dev hücrelerin, spermatidlerin kümelenmesinden dolayı ortaya çıktığını bildirmişlerdir (9, 10). Taş M. ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, 2 Gy dozunda uygulanan radyasyonun rat genital organ ağırlığı, spermatolojik özellikler ve histolojik parametreler üzerinde birtakım olumsuz değişiklikler meydana getirdiği tespit edilmiştir (11). Bu çalışmada da, literatür ile uyumlu olarak radyasyon grubundaki ratların testis dokusunda; seminifer tübül germinal epitelinde vakualizasyon, vasküler konjesyon ve interstisyel alanda ödem tespit edildi. Çelik Ö.K. ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 2 Gy radyasyon verilmesinden 10 hafta sonra bile yoğun apoptotik yanıtlar gözlenmiştir (12). Çalışmada

da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, radyasyon grubundaki TUNEL pozitif hücrelerin sayısında anlamlı bir artış vardı. Radyasyon+ellajik asit grubunda ise, TUNEL pozitif hücre sayısının kontrol grubu ile benzer olduğu belirlendi. Çeribaşı ve ark. yapmış olduğu diğer bir çalışmada siklofosfamid (CP) uygulamasının MDA, GSH düzeyleri ve CAT ve SOD aktiviteleri ile testiküler histopatolojik değişimleri üzerine tedavi olarak kullanılan EA ve likopenin etkileri araştırılmıştır. Uygulanan CP'in sperm plazma MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa, SOD aktivitesinde azalmaya bunun yanı sıra seminifer tübül çaplarında azalmaya, germinal hücre tabakasında kalınlaşmaya ve testiküler dokuda dejenerasyon, nekroz, immatur germ hücreleri ve atrofi gibi bozukluklara neden olduğu gözlenmiştir (13). Bu çalışmada da 8 Gy'lik dozda uygulanan radyasyonun MDA düzeylerini artırıp SOD aktivitesini azaltarak oksidatif stres yoluyla testis dokusundaki histopatolojik bulgulara ve apoptotik hücre sayısında artışa neden olduğu belirlendi. Radyasyon+ellajik asit grubunda ise radyasyon grubuna kıyasla SOD aktivitesinin arttığı, MDA düzeyinin ise azaldığı tespit edildi (p<0.05).

Sonuç

Çalışmanın bulguları birlikte değerlendirildiğinde radyasyon maruziyetinin rat testis dokusunda oksidatif hasara yol açarak infertilite gibi ciddi üreme problemlerine yol açabileceği görüldü. Güçlü antioksidatif özelliği bilinen ve beslenmede yaygın olarak tüketilen, özellikle kırmızı meyvelerin yapısında bulunan ellajik asitin ise radyasyon hasarına karşı ciddi anlamda koruyucu bir etkisi olduğu tespit edildi.

Kaynaklar

1. Özalpan A. Temel Radyobioloji. 1.Basım. Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul. 2001; 1-218.
2. Parlar Ş, Alev E. "Radyasyon Güvenliği El Kitabı" Trakya 2009.
3. Shetty G, Weng CC, Bolden-Tiller OU, et al. Effects of medroxyprogesterone and estradiol on the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. Endocrinol 2004; 145: 4461-9.
4. Malini P, Kanchana G, Rajadurai M. Antidiabetic efficacy of ellagic acid in streptozotocin induced diabetes mellitus in albino wistar rats. Asian J Pharm Clin Res 2011; 4: 127-8.
5. Marwan AG, Nagel CW. Characterization of cranberry benzoates and their antimicrobial properties. J Food Sci 1986; 51: 1069-70.
6. Venkatesan P, Rao MN. Structure-activity relationships for the inhibition of lipid peroxidation and the scavenging of free radicals by synthetic symmetrical curcumin analogues. J Pharm Pharmacol 2000; 52: 1123-8.
7. Take G, Erdogan D, Helvacioğlu F, et al. Effect of melatonin and time of administration on

- irradiation-induced damage to rat testes. Braz J Med Biol Res 2009;42(7): 621-8.
8. Kaya N, Ozan G, Dabak DO, et al. Antioxidant effects of ellagic acid on testicular tissue of rats exposed to tobacco smoke. J Turgut Ozal Med Cent 2017; 24(4): 381-6.
9. Ban Y, Komatsu T, Kemi M, et al. Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats. Exp Anim 1995; 44(4): 315-22.
10. Bansal MR, Kaul A, Tewari M, et al. Spermatogenesis and epididymal sperm after scrotal gamma irradiation in adult rats. Reprod Toxicol 1990; 4: 321-4.
11. Taş M, Cirit U, Ozkan O, et al. Protective Role of Vitamin C on Sperm Characteristics and Testicular Damage in Rats Exposed to Radiation. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2014; 20(1): 59-64.
12. Çelik Ö, Aras A, Tuğan D, ve ark. Sıçan Germ Hücrelerinde Radyasyona Bağlı Apoptoz Ve Amifostin İle İlişkisi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2004; 24 (2): 142-6.
13. Çeribaşı A, Türk G, Sönmez M, et al. Toxic Effect of Cyclophosphamide on Sperm Morphology, Testicular Histology and Blood Oxidant/Antioxidant Balance, and Protective Roles of Lycopene and Ellagic Acid. BCPT 2010; 107: 730-6.

Sorumlu Yazar:

Nalan KAYA

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, ELAZIG, TÜRKİYE
E-mail: nalankaya@firat.edu.tr