

Erişkin Erkek Sıçanlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine Kuersetinin Etkisi **Effect of Quercetin on CCl₄ Induced Testicular Injury in Adult Male Rats**

¹Hatice Emek, ¹Dilek Burukoğlu Dönmez, ¹Cengiz Bayçu, ²Ahmet Musmul

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

Özet: Karbon tetraklorür (CCl₄), endüstride soğutucu floroklorokarbonların üretiminde kullanılan organik bir bileşiktir. CCl₄ testiküler hücrelere hasar vererek erkek üreme fonksiyonlarını olumsuz yönde etkiler. Kuersetin, antioksidan özellikleri iyi bilinen bir flavonoiddir. Bu çalışmada CCl₄ uygulanmış erkek sıçanların testisleri üzerinde CCl₄'ün oluşturduğu hasarda kuersetinin etkisini incelemeyi amaçladık. Bu çalışmada toplam 28 adet erişkin Sprague-Dawley türü erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları; Kontrol grubu, CCl₄ grubu, kuersetin, CCl₄ + kuersetin grubu olmak üzere toplam 4 gruba ayrıldı. Bu deney hayvanlarından; kontrol grubuna 7 gün boyunca günde bir kez belirlenen dozda zeytinyağı, CCl₄ grubuna 7 gün boyunca günde bir 0.5 ml/kg CCl₄, kuersetin grubuna 7 gün boyunca günde bir tek dozda 20 mg/kg kuersetin, CCl₄ + kuersetin grubuna ise 7 gün boyunca günde bir kez 0.5 ml/kg CCl₄ ve 7 gün boyunca günde bir 20 mg/kg kuersetin intraperitoneal yolla uygulandı. Deney hayvanları deney süresi sonunda anestezik madde ile uyutuldu ve testis dokusu örnekleri Bouin çözümü içerisinde alındı. Örnekler rutin histolojik işlemlerin ardından bloklandı. Her bir blokta 3 µm kesit alınarak Hematoksilin-Eozin ve Periyodik Asit-Schiff + Hematoksilin boyalarıyla boyandı ve mikroskopik incelemeleri yapıldı. Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre, kontrol grubundaki sıçanların testislerinde normal histolojik yapı, CCl₄ uygulanmış sıçanların testislerinde yoğun spermatogenetik hücre hasarı, CCl₄ + kuersetin verilen grupta ise azalmış hücre hasarı gözlemlendi. CCl₄'ün erkek sıçanların testisleri üzerinde toksisiteye yol açtığı, kuersetinin ise CCl₄'ün testislerde oluşturduğu bu hasarı azalttığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: karbon tetraklorür, kuersetin, sıçan, testis

Emek H. Dönmez Burukoğlu D. Bayçu C, Musmul A. (2017). *Erişkin erkek sıçanlarda karbon tetraklorür ile oluşturulan testis hasarı üzerine kuersetinin etkisi*, *Osmangazi Tıp Dergisi* 2017, 39(65-73): Doi:

Abstract: Carbon tetrachloride (CCl₄), the industry refrigerant is an organic compound used in the production of chlorofluorocarbon. Damage to testicular cells by CCl₄ adversely affect male reproductive functions. Quercetin is a flavonoid antioxidant properties are well known. In this study, the testes of male rats on applied CCl₄ damage caused by CCl₄ aimed to investigate the effect of quercetin. In this study, a total of 28 adult male Sprague Dawley rats were used. Laboratory animals; Control group, CCl₄ group, quercetin group, including CCl₄ + quercetin group was divided into 4 groups. This experimental animals; control group for 7 days, once daily determined dose of olive oil, CCl₄ group daily for 7 days of a 0.5 ml/kg CCl₄, quercetin group daily for 7 days in a single dose of 20 mg/kg of quercetin, CCl₄ + quercetin group for 7 days once a day 0.5 ml/kg daily for 7 days CCl₄ 20 mg/kg were injected with quercetin. Experimental animals were anesthetized with anesthetic agent at the end of test period, and testis tissue samples taken up in Bouin solution. After the staining process was blocked. 3 mm sections taken from each block hematoxylin and eosin and periodic acid-Schiff + were stained with hematoxylin and microscopic examinations were performed. According to the findings obtained from the study, the normal histological structure of the testis of rats in the control group, intense spermatogenic cells in the testes of rats by CCl₄ injury, CCl₄ + quercetin decreased cell damage was observed in the group. As a result, the testes of male rats on CCl₄-induced toxicity, quercetin is formed in the testes of CCl₄ was found to reduce this damage.

Keywords: carbon tetrachlorid, quercetin, rat, testes

Emek H. Dönmez Burukoğlu D. Bayçu C, Musmul A. (2017). *Effect of quercetin on CCl₄ induced testicular injury in adult male rats*, *Osmangazi Journal of Medicine* 2017, 39 (65-73): Doi:

1. Giriş

Karbon tetraklorür (CCl₄), tetraklor metan gibi birçok şekilde de isimlendirilen organik bir bileşiktir. CCl₄, günümüzde endüstride soğutucu floroklorokarbonların üretiminde dolayısıyla, klima ve soğuk hava deposu makinalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. CCl₄, yüksek oranda toksik bir madde olarak insan ve hayvanlarda potansiyel kanserojenik bir etkiye sahiptir. CCl₄'ün başta karaciğer olmak üzere böbrek, testis, kalp, akciğer, beyin ve diğer dokularda da toksik etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (1). CCl₄'ün, sperm motilitesi ve konsantrasyonunda azalmaya sebep olurken, anormal sperm sayısında da artış meydana getirdiği görülmüştür. Germinal hücrelerde dejenerasyon, interstisyel alanda ise ödem ve konjesyona sebep olmaktadır (2). CCl₄ spermatogenik seri hücrelerinde hasar, bazal membran ayrılması, seminifer tübül atrofi, interstisyel alanda genişleme ve sperm sayısında azalma meydana getirmektedir (3). Bu sonuçlara göre, CCl₄ testis dokusunda ciddi histopatolojik hasarlara neden olmaktadır.

Kuersetin, glikozidik bağlarla fenolik gruplara bir ya da daha fazla şeker grubunun bağlanmasıyla oluşan glikozitler ya da aglikonlar şeklinde bitkinin temel olarak yapraklarında ve diğer bölümlerinde meydana gelir. Günümüzde çeşitli bitki çaylarının içerisinde bulunan kuersetin; biyokimya, gıda kimyası, boya kimyası, tıp kimyası, boya endüstrisi ve kozmetik alanlarında kullanılmaktadır. Genellikle birçok bitkinin kök, gövde ve çiçeklerinde farklı flavonoidlerle birlikte bulunur (4). Kuersetin, antioksidan özellikleri olan bir bitki pigmentidir. Bu pigment, LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterolün okside olmasını önleyebilir ve hücrelerin kansere dönüşmesini geciktirebilir. Kuersetin, serbest radikalleri yakalama özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidandır (5). Bu bilgiler ışığında bu çalışmanın amacı; erkek sıçanlara verilen CCl₄ etken maddesinin, testisler üzerinde oluşturduğu hasarın tespit edilmesi ve bu süre boyunca verilen kuersetinin bu hasar üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırılmasıdır.

2. Gereç ve Yöntem

Histolojik işlemler: Çalışmamızda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 342/2013 sayılı kararıyla etik onayı alınmış 250±300 gram ağırlığında 28 adet erişkin Sprague-Dawley ırkı erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları, her bir grupta 7 adet sıçan olacak şekilde Kontrol, Karbon tetraklorür, Kuersetin ve Karbon tetraklorür+Kuersetin grubu olarak 4 gruba ayrıldı. Bu deney hayvanlarından; kontrol grubuna 7 gün boyunca günde bir kez belirlenen dozda zeytinyağı, CCl₄ grubuna 7 gün boyunca günde bir 0.5ml/kg CCl₄, kuersetin grubuna 7 gün boyunca günde bir tek dozda 20mg/kg kuersetin, CCl₄+kuersetin grubuna ise 7 gün boyunca günde bir kez 0.5ml/kg CCl₄ ve 7 gün boyunca günde bir 20mg/kg kuersetin intraperitoneal yolla uygulandı. Deney hayvanları deney süresi sonunda anestezik madde ile uyutuldu ve testis dokusu örnekleri Bouin solüsyonu içerisinde alındı. Örnekler rutin histolojik işlemlerin ardından bloklandı. Her bir blokta 3µm kesit alınarak Hematoksilen-Eozin ve Periyodik Asit-Schiff + Hematoksilen boyalarıyla boyandı ve mikroskopik incelemeleri yapıldı.

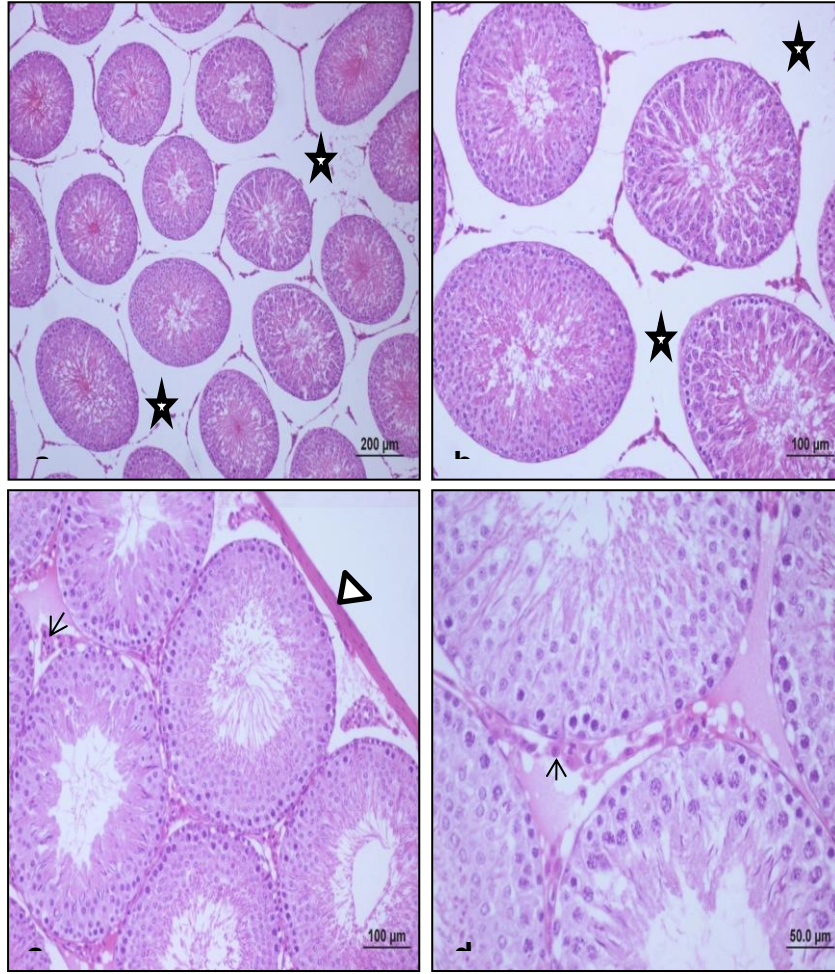
İstatistiksel analiz: Tüm veri analizleri SPSS 21.0 paket programları ile yapıldı. Sürekli nicel veriler; n, ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Bağımlı ve bağımsız gruplarda oluşan ve normal dağılım gösteren sürekli veriler, Paired Samples T Test ve One Way Anova testleri ile analiz edildi. P<0.05 olasılık değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

3. Bulgular

Histolojik bulgular: Işık mikroskopik olarak kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçan testislerinin genel görünümü saptamak için Hematoksilen-Eozin (H-E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS)+Hematoksilen (H) boyası uygulanmıştır.

Işık mikroskopik değerlendirilmelerde;

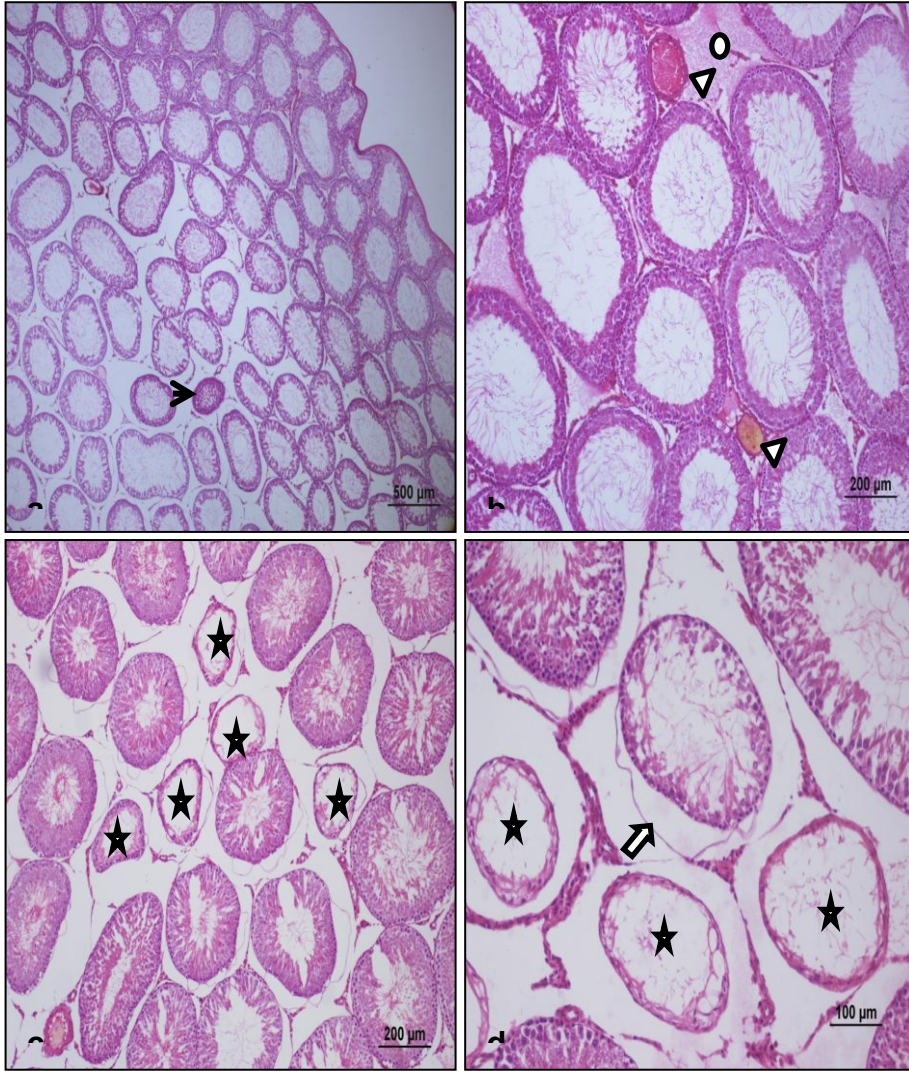
Kontrol grubu: Seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücre serileri ve Sertoli hücreleri ile tübüllerde devam eden spermatogenez normal yapıda görüldü. İnterstisyel alan ve Leydig hücreleri normal yapıda gözlemlendi. Ayrıca bazal membran ve tunika albuginea yapısı normal gözlemlendi (Şekil 1a-d).



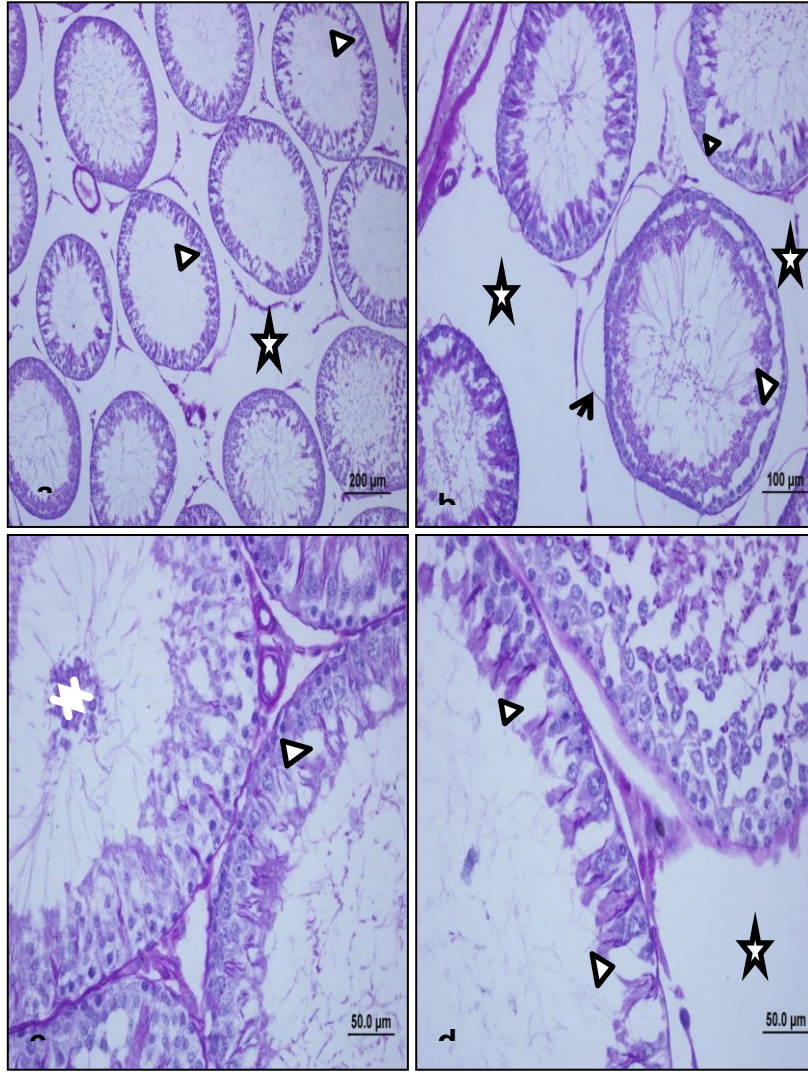
Resim 1. Kontrol grubu. Normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri; spermatogonyum (s), primer spermatosit (ps), spermatid hücreleri (rs-st) ve tübüllerde devam eden spermatogenez görülmekte. Normal görünümlü interstisyel alan (*) ve Leydig hücreleri (→) izlenmekte. Ayrıca normal yapıdaki tunika albuginea (▶) yapısı görülmekte (bar:200µm, bar:100µm, bar:50.0µm, HE, a-d)

CCl₄ grubu: Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler ve hücresel kayıplar ile birlikte yoğun tübüller hasar ve bazı tübüllerde atrofi görüldü (Şekil 2a-d, Şekil 3a-d). İnterstisyel alanda ise ayrılmalar ve ödem ile damar

kongesyonu dikkat çekti (Şekil 2b, Şekil 3a,b,d). Ayrıca tübül duvarından ayrılmış bazal membran yapısı gözlemlendi (Şekil 2d, Şekil 3b). PAS+H ile boyanan örneklerde lümeninde tübül duvarından koparak ayrılmış hücre kümeleri görüldü (Şekil 3c).



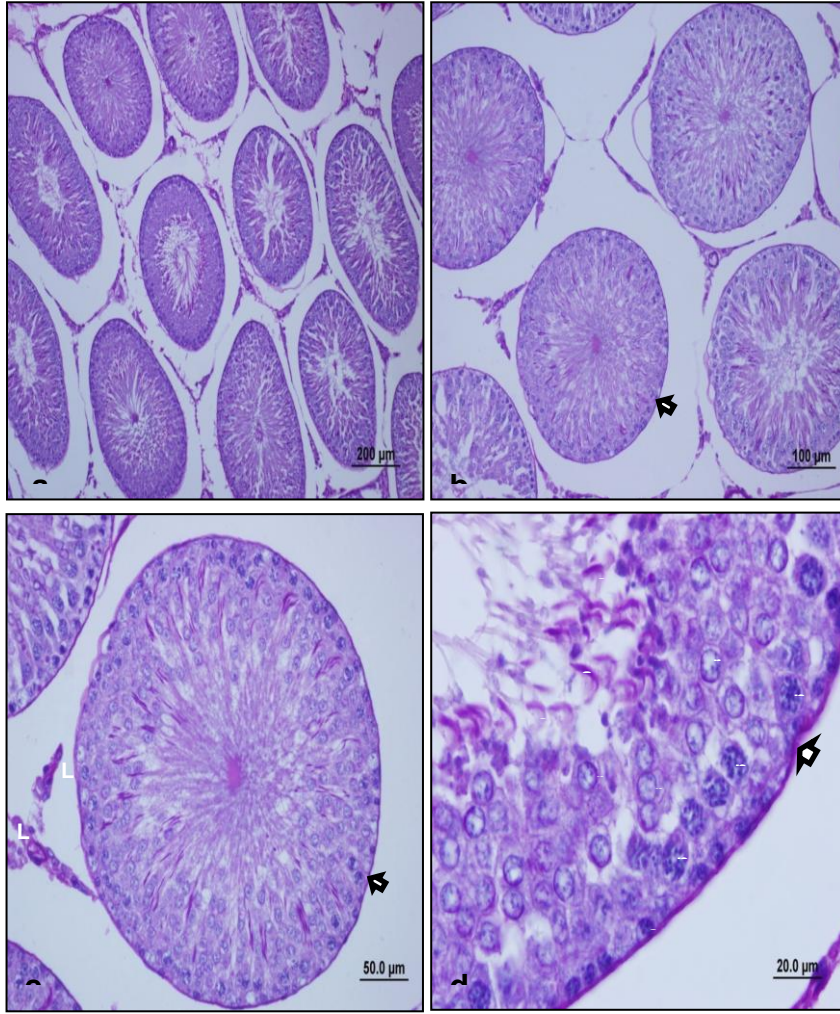
Resim 2. Karbon tetraklorür (CCl_4) grubu: Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler ve hücresel kayıplar ile birlikte yoğun tübüller hasar (*) ve bazı tübüllerde atrofi (→) görülmekte. İnterstisyel alanda ise ayrılmalar ve ödem (●) ile damar kongesyonu (▶) dikkat çekmekte. Ayrıca tübül duvarından ayrılmış bazal membran yapısı (kalın ok) görülmekte (bar:500µm, bar:200µm bar:100µm, HE)(a-d).



Resim 3. Karbon tetraklorür (CCl_4) grubu: Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler ve hücresel kayıplar (▶) ile birlikte yoğun tübüler hasar görülmekte. İnterstisyel alanda ise ayrılmalar (*) dikkat çekmekte. Ayrıca tübül duvarından ayrılmış PAS pozitif bazal membran yapısı (→) ve lümeninde hücre kümeleri (çift yönlü ok) görülmekte (bar:200µm, bar:100µm, bar:50.0µm, PAS+HE)(a-d).

Kuersetin Grubu: Normale yakın yapıdaki seminifer tübülde spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler, bazal membran, interstisyel

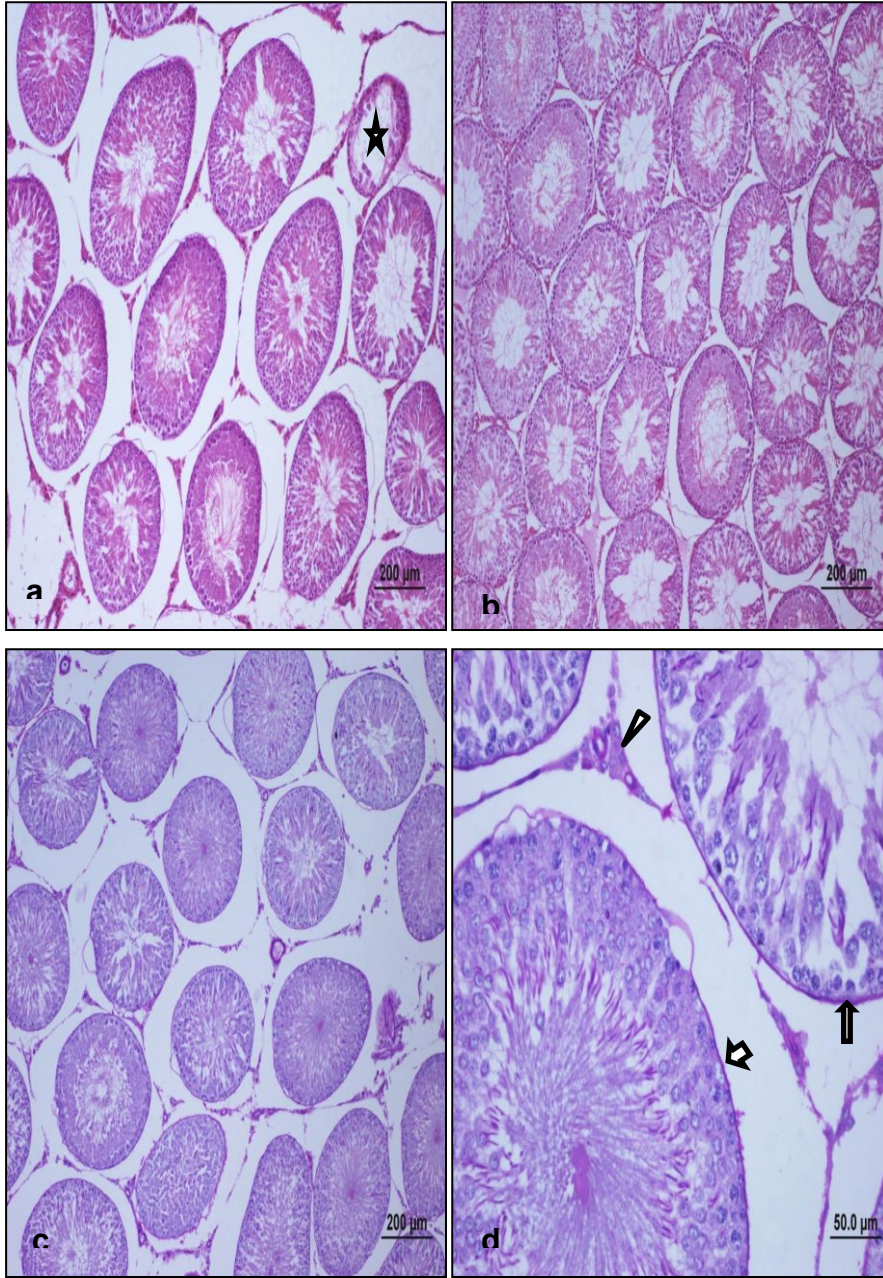
alanda Leydig hücreleri, makrofajlar ve damar yapılarının kontrol grubuna benzer yapı gösterdiği gözlemlendi. Spermatogenezin normal devam ettiği görüldü (Şekil 4a-d).



Resim 4. Kuersetin (QE) grubu: Normale yakın yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri; spermatogonyum (s), primer spermatozoid (ps), spermatozoid hücreleri (rs-st) ile tübüllerde devam eden spermatogenez görülmekte. Normale yakın görünümlü interstisyel alan ve Leydig hücreleri (L) izlenmekte. Ayrıca normal yapıdaki PAS pozitif bazal membran yapısı (→) görülmektedir (bar:200µm, bar:100µm, bar:50.0µm, bar:20.0µm, PAS+HE, a-d).

CCL₄+Kuersetin Grubu: Bazı tübüllerde hasar devam etse de genellikle azalmış tübül hasar ve normale yakın yapıdaki seminifer tübüller ile devam eden spermatogenez izlendi (Şekil 5a-b). İnterstisyel alanda ise azalmış ödem ve

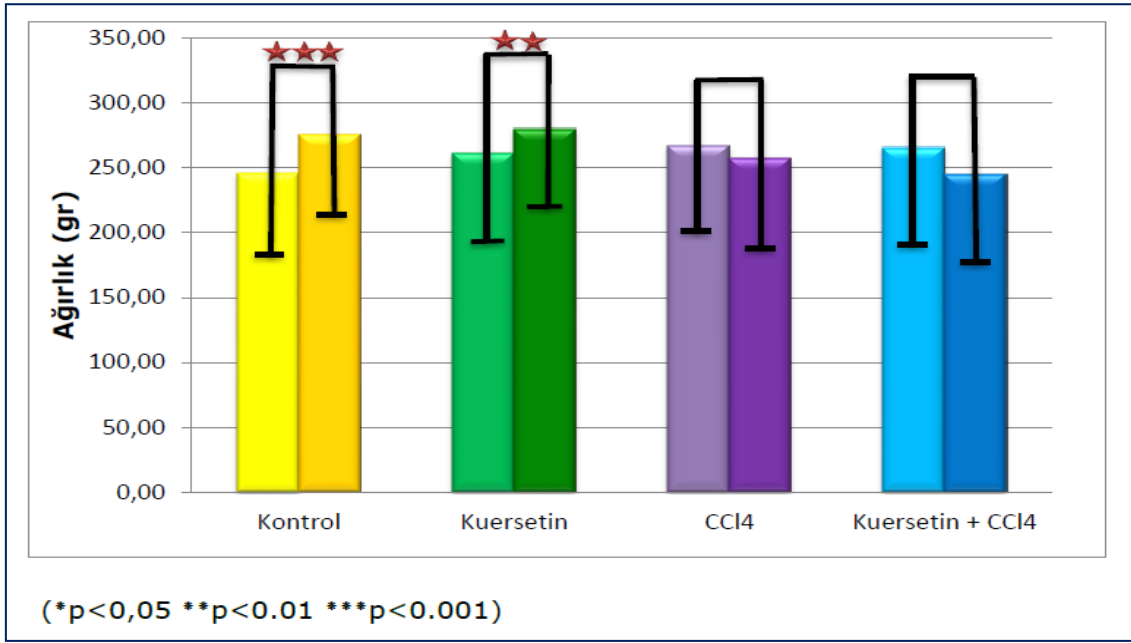
normale yakın görünümlü Leydig hücreleri gözlemlendi. Ayrıca normale yakın yapıdaki PAS pozitif bazal membran yapısı görüldü (Şekil 5c-d).



Resim 5. Karbon tetraklorür (CCl_4)+kuersetin (QE) grubu: Bazı tübüllerde hasar devam etse de (*) genellikle azalmış tübüler hasar ve normale yakın yapıdaki seminifer tübüller ile devam eden spermatogenez izlenmekte. İnterstisyel alanda ise azalmış ödem ve normale yakın görünümlü Leydig hücreleri (►) gözlenmekte. Ayrıca normale yakın yapıdaki PAS pozitif bazal membran yapısı (→) görülmekte (bar:200µm, bar:50.0µm, HE,a,b, PAS+HE,c-d).

İstatistiksel bulgular: Gruplar arası deney öncesi ağırlık ile deney sonrası ağırlık kıyaslandığında kontrol grubu ve kuersetin grubunda önemli düzeyde bir farklılık görülmüştür (kontrol grubu $p < 0,001^{***}$,

kuersetin grubu $p = 0,007^{**}$) CCl_4 ve CCl_4 +kuersetin grubu deney öncesi ve deney sonrası ağırlıkları kıyaslandığında vücut ağırlığında azalma olmuştur fakat anlamlı değildir (Grafik 1).



Grafik 1. Deney öncesi deney sonrası ağırlık kıyaslaması.

4.Tartışma

CCl₄, tipik bir toksik ajandır ve toksik etkisi serbest radikal üretimi ile olmaktadır (6). Bu maddenin, dokularda hasar oluşturma mekanizması, CCl₄'ün sitokrom P450 enzimi aracılığıyla oldukça toksik triklorometil (CCl₃) ve triklorometil peroksil (CCl₃O₂) serbest radikallerine dönüşümü sonrası başlayan lipid peroksidasyonu ile ortaya çıkan oksidatif hasar olarak açıklanmıştır (7). Vücutta, fizyolojik ortamda veya herhangi bir patolojik olay sonucunda oluşan serbest radikaller ile bunların koruyucusu olan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine kayması oksidatif stresi gösterir. Organizma, oksidatif hasara karşı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistem ve moleküllerle korunur. CCl₄'ün başta karaciğer olmak üzere böbrek, testis, kalp, akciğer, beyin ve diğer dokularda da toksik etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (7). Deneysel olarak gerçekleştirilmiş daha önceki çalışmalarda, CCl₄ maruziyetinin testislerde oksidatif doku hasarına ve lipid peroksidasyonuna yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca, daha önce yapılmış olan benzer çalışmalarda, CCl₄ toksisitesine bağlı olarak testis dokusunda histopatolojik değişikliklerin de meydana geldiği ortaya konmuştur (8). Bizim çalışmamızda bu çalışmalara paralel olarak CCl₄'e maruz kalan testiste histopatolojik hasarlar gözlenmiştir. CCl₄ uygulamasının erkek deney hayvanlarında oksidatif toksisite ile üreme

sisteminde, morfolojik, yapısal ve fonksiyonel hasara yol açtığı bildirilmiştir (2,3,9,10).

Kuersetin, süperoksit ve hidroksil radikallerini temizlemekte, lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir ve lipid peroksil radikallerini azaltmaktadır. Birçok araştırmacı, kuersetin antioksidan aktivitesi sayesinde erkek üreme işlev bozukluğu üzerinde iyileştirme etkisi olduğunu bildirmiştir. Buna ek olarak, kuersetin lipid peroksidasyonu antioksidan enzim aktivitesinin artırılması ve azaltılması ile CCl₄'ün neden olduğu karaciğer fibrozu üzerine yararlı bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (2,11-15). Sunulan bu çalışmada CCl₄ ve kuersetin birlikte çalışılmış ve etkileri araştırılmıştır. CCl₄ uygulanan sıçanların testislerinde ciddi hücresel hasar gözlenmekle birlikte CCl₄ ile beraber kuersetin uygulamasının bu hasarı azalttığı görülmüştür.

5.Sonuç

CCl₄, testis üzerinde oldukça toksik etki göstermektedir. Bazal membranda kalınlaşma, seminifer tübüllerde vakuolizasyon, spermatogenik hücrelerde yoğun hasar, spermatogonyumlarda kromatin yoğunlaşmasına bağlı piknotik çekirdek, interstisyel alanda ödem oluşumu ve damarlarda konjesyon ve dilatasyona neden olarak spermatogenezi olumsuz yönde etkilemektedir. 7 gün boyunca günde bir 0.5mg/kg CCl₄ ile 20mg/kg kuersetin verilen grupta, testis ağırlığı ve vücut ağırlığında herhangi bir azalma gözlenmemiştir. 7 gün

boyunca günde bir 0.5mg/kg CCl₄ ile 20mg/kg kuersetin verilen grupta kuersetin, CCl₄'ün testis üzerinde oluşturduğu hasarı azaltmaktadır. Kuersetin'in, CCl₄'ün toksitesini nasıl önlediğinin ortaya

konmasında ileri enzimatik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal düzeyde yapılacak araştırmalar bu konuda ek bilgiler ve kanıtlar sağlayabilir.

Kaynaklar

1. Tirkey, N., Pikhwal, S., Kuhad, A., & Chopra, K. (2005). Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. *BMC pharmacology*, 5(1), 1-8.
2. Türk, G., Çeribaşı, S., Sönmez, M., Çiftçi, M., Yüce, A., Güvenç, M., ... & Aksakal, M. (2016). Ameliorating effect of pomegranate juice consumption on carbon tetrachloride-induced sperm damages, lipid peroxidation, and testicular apoptosis. *Toxicology and industrial health*, 32(1), 126-137.
3. Khan, M. R., Ahmed, D. (2009). Protective effects of *Digera muricata* (L.) Mart. on testis against oxidative stress of carbon tetrachloride in rat. *Food Chem Toxicol.* (2009) Jun;47(6):1393-9.
4. Ergüzel, E. T. (2006). quercetin (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroksiflavon)'in Bakır (II) ve Çinko (II) Komplekslerin Kararlılık Sabitlerinin Tayini. Yüksek Lisans. İstanbul: Marmara Üniversitesi.
5. Cengiz, E. (2011). Kayısı (*Prunus armeniaca* L.) ve Kayısı Çekirdeğinde Kuersetinin HPLC-MS İle Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa
6. Sanzgiri, U. Y., Srivatsan, V., Muralidhara, S., Dallas, C. E., & Bruckner, J. V. (1997). Uptake, distribution, and elimination of carbon tetrachloride in rat tissues following inhalation and ingestion exposures. *Toxicology and applied pharmacology*, 143(1), 120-129.
7. Kukner, A., Tore, F., Firat, T., Terzi, E. H., Oner, H., Balaban, Y. H., & Ozogul, C. (2009). The preventive effect of low molecular weight heparin on CCl₄-induced necrosis and apoptosis in rat liver. *Annals of hepatology*, 9(4), 445-454.
8. Gülçen, B., Karaca, Ö., Kuş, M. A., Çolakoğlu, S., Ögetürk, M., Kuş, İ. (2012). Deneysel Karbon Tetraklorür Zehirlenmesinde Akciğer Doku Hasarı ve Melatonin Hormonunun Koruyucu Rolü: Işık Mikroskopik ve Biyokimyasal Bir Çalışma. *Düzce Tıp Dergisi* 2012; 14(3): 37-42
9. Horn, M. M., Ramos, A. R., Winkelmann, L., Matte, U. S., Goldani, H. A., & Silveira, T. R. (2006). Seminiferous epithelium of rats with food restriction and carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *International braz j urol*, 32(1), 94-99.
10. Manjrekar, A. P., Jisha, V., Bag, P. P., Adhikary, B., Pai, M. M., Hegde, A., & Nandini, M. (2008). Effect of *Phyllanthus niruri* Linn. treatment on liver, kidney and testis in CCl₄ induced hepatotoxic rats. *Indian journal of experimental biology*, 46(7), 514.
11. Abarikwu, S. O., Pant, A. B., & Farombi, E. O. (2012). The protective effects of quercetin on the cytotoxicity of atrazine on rat Sertoli-germ cell co-culture. *International journal of andrology*, 35(4), 590-600.
12. Ben Abdallah, F., Fetoui, H., Zribi, N., Fakhfakh, F., & Keskes, L. (2013). Quercetin attenuates lambda cyhalothrin-induced reproductive toxicity in male rats. *Environmental toxicology*, 28(12), 673-680.
13. Kanter, M., Meral, I., Dede, S., Cemek, M., Ozbek, H., Uygan, I., & Gunduz, H. (2003). Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl₄-treated rats. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50(5), 264-268.
14. Khaki, A., Fathiazad, F., Nouri, M., Khaki, A., Maleki, N. A., Khamnei, H. J., & Ahmadi, P. (2010). Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytotherapy Research*, 24(9), 1285-1291.
15. Zhang, D., Yasuda, T., Yu, Y., Zheng, P., Kawabata, T., Ma, Y., & Okada, S. (1996). Ginseng extract scavenges hydroxyl radical and protects unsaturated fatty acids from decomposition caused by iron-mediated lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(1), 145-150.