

## ***Gentamisin'le Testis Hasarı Oluşturulan sıçanlarda C Vitamininin Koruyucu Etkisi*** ***Protective Effect of Vitamin C from Gentamicin Induced Testicular Damage in Rats.***

<sup>1</sup>M.Özge Artıran,<sup>1</sup>Dilek Burukoğlu Dönmez, <sup>1</sup>Cengiz Bayçu, <sup>2</sup>Hülya Yılmaz

<sup>1</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

<sup>2</sup> Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

**Öz:** Aminoglikozidler, günümüzde klinik uygulamalarda sık olarak kullanılmaktadır. Gentamisin, gram (-) bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan aminoglikozid türevi bir antibiyotiktir. Aminoglikozid kullanımının kısıtlayıcı en önemli özelliği toksisitesidir. Gentamisin testiste yapısal ve sitotoksik değişiklikler ortaya çıkarmaktadır. Hücre ve dokular, oluşan bu toksik etkilerden C vitamini gibi antioksidanlarla korunabilirler. Çalışmamızda gentamisinin sıçan testisleri üzerindeki toksik etkisi üzerine C vitaminin rolünü araştırmayı amaçladık. Bu çalışmada, 28 adet Spraque-Dawley türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar her grupta 7 erişkin erkek sıçan olacak şekilde kontrol, 5 mg/kg gentamisin, 5 mg/kg gentamisin + 200 mg/kg C vitamini ve 200 mg/kg C vitamini verilen grup olmak üzere dört gruba ayrıldı. Deney süresi sonunda sıçanlar anestezik madde ile uyutularak testis dokusu örnekleri alındı, vücut ve testis ağırlıkları ölçüldü ve karşılaştırmalar yapıldı. Sol testisler doku takip işlemi için Bouin çözeltisi içerisine, sağ testisler ise %10'luk nötral formalin içerisine alındı ve rutin histolojik işlemlerden sonra bloklandı. Elde edilen parafin bloklardan 3 µm kalınlığında seri kesitler alındı ve kesitler Hematoksilin-Eozin (H-E) ve Periyodik Asit-Schiff + Hematoksilin (PAS + H) ile boyandı. Tüm kesitlerin DP 70 dijital kamera eklentili Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus Corp. Tokyo, Japan) ile görüntülemesi yapıldı ve fotoğraflandı. Çalışma sonunda elde edilen bulgulara göre vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında önemli fark gözlemlendi. Mikroskopik incelemelerde, gentamisinin testislerde önemli hasara yol açtığı ve bu hasarın gentamisin + C vitamini verilen gruplarda azaldığı gözlemlendi. Elde edilen bulgularla, gentamisinin testislerde meydana getirdiği toksik etkinin C vitamini verilmesiyle önlenilebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: gentamisin, C vitamini, sıçan, testis.

Artıran M.Ö., Burukoğlu D. D., Bayçu C., Yılmaz H. (2017) Gentamisin'le testis hasarı oluşturulan sıçanlarda C vitamininin koruyucu etkisi. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 39(2): 32-39. DOI: 10.20515/otd.308132.

**Abstract:** Aminoglycosides are commonly used in clinical practice today. Gentamicin, gram (-) used in the treatment of bacterial infection is an antibiotic of the aminoglycoside derivatives. The most important feature is the restriction of the use of aminoglycoside toxicity. Gentamicin in testes reveal the structural and cytotoxic changes. Cells and tissue can be protected from gentamicin toxicity from antioxidants such as vitamin C. Material and methods: In this study we aimed to investigate the role of vitamin C in the protection of rat testes from gentamicin toxicity. In our study 28 Sprague-Dawley rats were used in four groups of 7. Rats in each group of 7 male rats were controlled to 5 mg / kg of gentamicin, 5 mg / kg gentamicin + 200 mg / kg of vitamin C and 200 mg / kg of vitamin C. After the experiment, the body weight and testicles were measured and comparisons were made. For follow-up is left testes tissue taken up in Bouin solution, while the right testis was taken up in 10% buffered formalin for routine histological processing then tissue preparation. After the staining process was blocked. 3 µm sections taken from each block hematoxylin and eosin and periodic acid-Schiff + were stained with hematoxylin and microscopic examinations were performed. Significant differences between groups in terms of body weight were observed. Microscopic examination revealed gentamicin caused significant damage to the testes and this damage decreased in the group treated with gentamicin + Vitamin C. From the resulting findings it can be concluded that gentamicin toxicity in the rat testes can be prevented by the administration of vitamin C. Keywords: gentamicin, vitamin C, Rat, testis

Artıran M.Ö., Burukoğlu D. D., Bayçu C., Yılmaz H. (2017) Protective effect of vitamin C from gentamicin induced testicular damage in rats. *Osmangazi Journal of Medicine*, 39 (2):32-39. DOI: 10.20515/otd.308132.

## 1. Giriş

Gentamisin, genellikle hayatı tehdit edici gram-negatif bakterilerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde en sık kullanılan aminoglikozid bir antibiyotiktir (1,2). Özellikle gram negatif bakterilere karşı geniş bakterisid spektruma sahip olması, beta-laktamlara dirençli mikroorganizmalara karşı etkinliği ve maliyetinin düşük olması nedeni ile kullanım alanı oldukça geniştir (3). İlk olarak 1940'lı yıllarda keşfedildikten sonra bakteriyal enfeksiyonlar özellikle de tüberkülozun tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Gelişmekte olan ülkelerde, tüberküloz prevalansının yüksek olduğu ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (4). Gentamisin ototoksik ve nefrotoksik olduğu iyi bilinmektedir. Gentamisin özellikle deney hayvanlarının testisinde yapısal değişikliklere neden olur epitelde dökülme, germ hücrelerinde dejenerasyon, seminifer tübüllerde atrofik değişiklikler, intersitiyel alanda boşluklar ve son olarak sperm üretiminde azalmaya neden olmaktadır (5). Oksidatif hasara ve nekroza neden olduğu bilinmektedir. Gentamisine maruz kalan sıçanlarda testosteron seviyesinin düştüğü gözlenmiştir (6).

C vitamini, suda çözünen bir vitamin olup, yapı olarak da altı karbonlu bir laktondur. C vitamini bazı memelilerde karaciğerde glukozdan sentezlenirken, kuş ve sürüngenlerde böbrekte sentezlenir. İnsanlar ise askorbik asitin biyosentez yolağında terminal enzim olan, L-gulonolakton oksidaz enzimi eksik olduğundan, askorbik asiti sentezleyemezler ve bu nedenle C vitaminini dışarıdan almak zorundadırlar (7). C vitamini çok hızlı elektron transferiyle reaktif oksijen türlerini temizler ve böylelikle lipid peroksidasyonunu inhibe eder ve sitotoksik serbest radikalleri ortadan kaldırır (8). C vitamini antioksidan özelliğini üreme sistemi üzerinde de göstermektedir. C vitamininin, insan spermindeki DNA'lara serbest radikallerin zarar vermesini engellediği gösterilmiştir (9).

Gentamisin ve C vitamininin bu özelliklerinden yola çıkarak çalışmamızda Gentamisin hasarına uğramış sıçan testis dokusunda, C vitamininin koruyucu bir etkisi olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

## 2. Gereç ve Yöntemler

*Histolojik işlemler:* Çalışmamızda ESOGÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 27.03.2013 tarihli ve 331 sayılı kararıyla etik onayı alınmış 250±300 gram ağırlığında 28 adet erişkin Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları, her bir grupta 7 deney hayvanı olacak şekilde Kontrol, Gentamisin, C vitamini ve Gentamisin + C vitamini grubu olarak 4 gruba ayrıldı.

1) *Kontrol Grubu:* Bu grubu oluşturan deney hayvanlarına, 14 gün boyunca günde 1 kez sıçanların vücut ağırlıklarına göre hacmi hesaplanarak belirlenen dozda distile su i.p olarak verilmiştir.

2) *Gentamisin Grubu:* Bu gruba 14 gün boyunca 5mg/kg gentamisin intraperitoneal yolla uygulanmıştır (Gentamisin olarak, İ.E. Ulugay firmasının Genta 40 mg 1 ampul adlı ürünü kullanılmıştır) (10).

3) *C vitamini grubu:* Bu gruba 14 gün boyunca tek doz 200mg/kg C vitamini intraperitoneal yolla uygulanmıştır (C vitamini olarak riedel-de haen firmasına ait 25 mg L(+)-Ascorbic acid puriss adlı ürünü kullanılmıştır) (11).

4) *Gentamisin + C vitamini grubu:* Bu gruba 14 gün boyunca her gün tek doz 5mg/kg gentamisin ve 14 gün boyunca her gün tek doz 200mg/kg C vitamini intraperitoneal yolla uygulanmıştır.

Deney başından itibaren hayvanların vücut ağırlıkları uygulanacak madde dozlarını belirlemek üzere günlük olarak tartıldı. Hayvanlar 14.günde ketamin (Ketalar 90mg/kg)+ksilazin (Alfazyne 10mg/kg) i.p. verilerek anestezi edildi ve servikal dislokasyon ile öldürüldü. Deney hayvanlarından alınan testis örnekleri Bouin solüsyonu içerisinde fikse edildi. Rutin işlemlerden geçirilen örnekler parafin blok haline getirildi. Her bir parafin bloktan her bir deney hayvanını temsil eden 3µm'luk kalınlıkta 3 farklı kesit alındı ve bu kesitler H-E ve PAS boyama yöntemleri kullanılarak tüm kesitlerin DP 70 dijital kamera eklentili Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus Corp. Tokyo, Japan) ile görüntülemesi yapıldı ve fotoğraflandı. Kesitler incelenirken interstisyel alanlar ve seminifer tübüller ayrı

ayrı olarak değerlendirildi. Hazırlanan preparatlarda, bazal membran, spermatogenez seri hücreleri, Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri, bağ dokusunda yer alan hücre, lif, damar yapıları incelendi. Elde edilen histolojik bulgular, istatistiksel bulgular ile karşılaştırıldı.

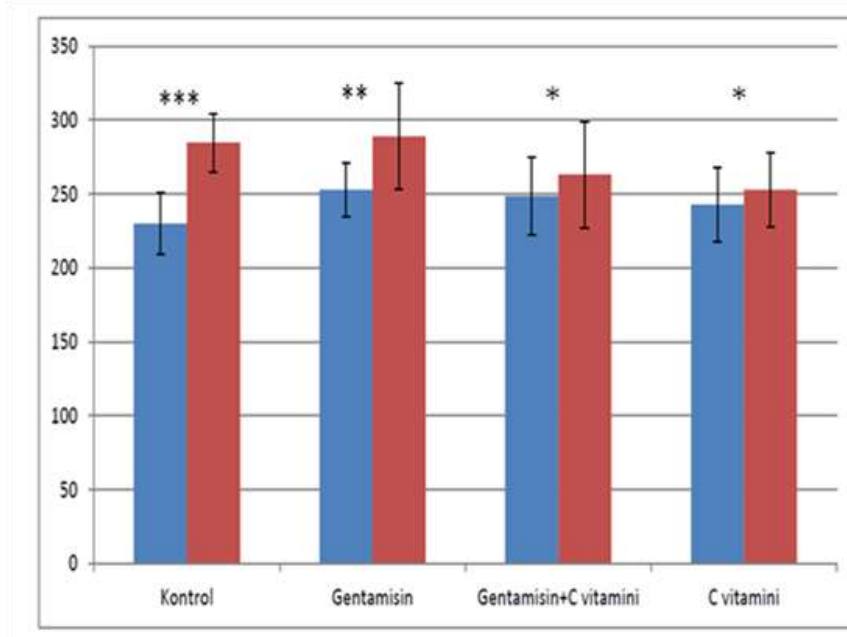
#### İstatistik Analiz

Bu çalışmada sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma (ss) olarak gösterildi. Tek yönlü varyans analizi ve Eşleştirilmiş t testi uygulandı. SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago,

IL, USA) kullanıldı. İstatistiksel önemlilik düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

#### 3.Bulgular

Vücut ağırlıkları analizi: Gruplar arasında ilk vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık ( $P > 0,05$ ) gözlenmemiştir. Ancak gruplar arasında son vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında Gentamisin ve Gentamisin+C vitamini ( $P < 0.01$ ) arasında ve Gentamisin ve C Vitamini ( $P < 0.05$ ) grupları arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (Grafik 1).



**Grafik 1.** Sıçanların deney öncesi ve sonrası vücut ağırlığı farkları (birinci grafik değerleri ilk vücut ağırlığını, ikinci grafik değerleri son vücut ağırlığını belirtmektedir) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Tablo 1.**

*Deney öncesi ve Sonrası Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması*

Gruplar	İlk vücut ağırlıkları ortalama $\pm$ ss	Son vücut ağırlıkları ortalama $\pm$ ss	p
Kontrol	230 $\pm$ 20.82	284.57 $\pm$ 19.53	<0.001
Gentamisin	252.85 $\pm$ 17.99	289 $\pm$ 35.74	<0.01
Gentamisin+C vitamini	248.57 $\pm$ 26.09	263 $\pm$ 35.83	>0.05
C vitamini	242.85 $\pm$ 24.97	252.85 $\pm$ 25.06	>0.05

#### Histolojik Bulgular

##### 1- Kontrol grubu

Bazal lamina yapısı, seminifer tübül yapıları ve interstisyel alan normal yapıda gözlemlendi. Düzgün bir spermatogenezin olduğu tübül duvarı, Sertoli hücreleri, çok belirgin spermatogonyumları ve spermatogenez seri hücrelerini içeriyordu (Şekil 1a-d). PAS + H

ile boyadığımız kontrol grubu testis örneklerinde PAS pozitif boyanmış bazal membran yapısı ve tunika albuginea normal yapıda gözlemlendi (Şekil 1d).

##### 2- C vitamini grubu

Seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatid hücreleri

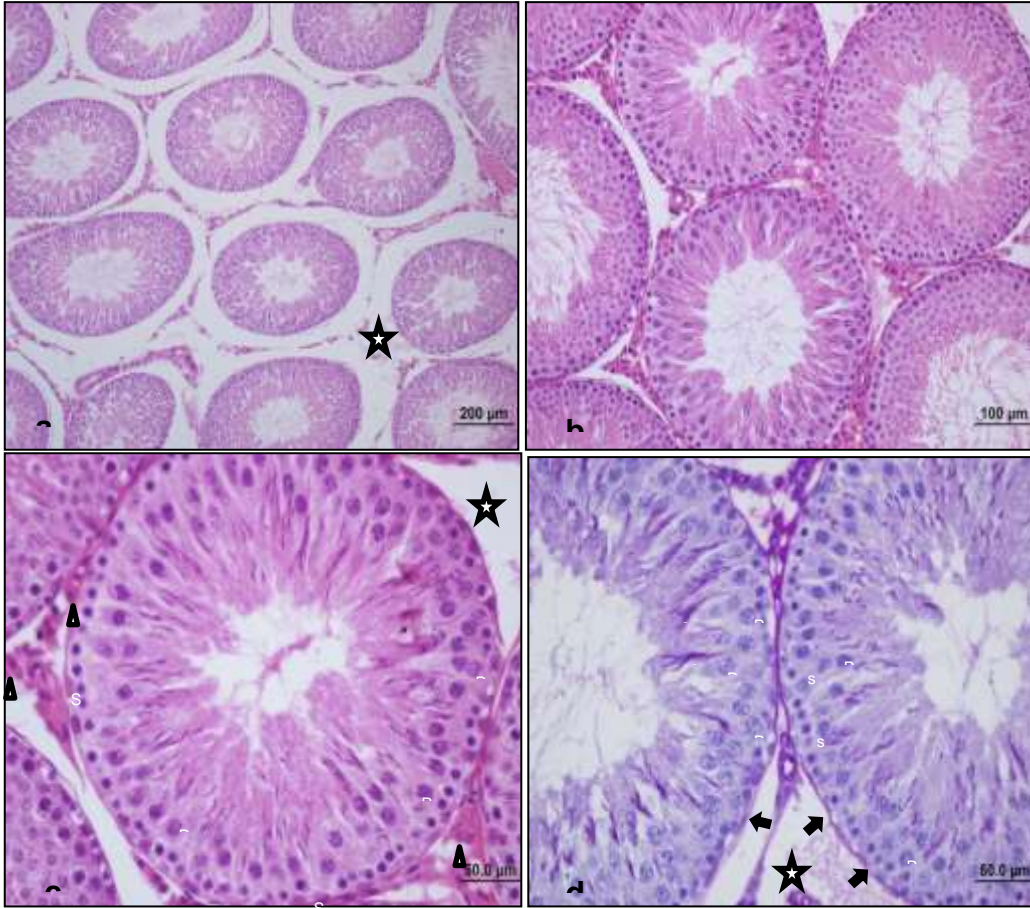
normale yakın görüldü ayrıca bazal membran, interstisyel alanda Leydig hücreleri ve damar yapılarının kontrol grubuna benzer yapı gösterdiği gözlemlendi (Şekil 2 a-d).

### 3- Gentamisin grubu

Seminifer tübül epitelinde dökülme, vakuoller, epitelde boşluklar nükleer piknoz ve birkaç tübülde atrofik değişiklikler görüldü. Ayrıca seminifer tübül duvarındaki hücrelerde dejeneratif değişiklikler ve hücresel kayıplar gözlemlendi (Şekil 3a-d, Şekil 4a-d) İnterstisyel alanda genişleme ve damarlarda konjesyona rastlandı (Şekil 4a-d).

### 4- Gentamisin+C vitamini grubu

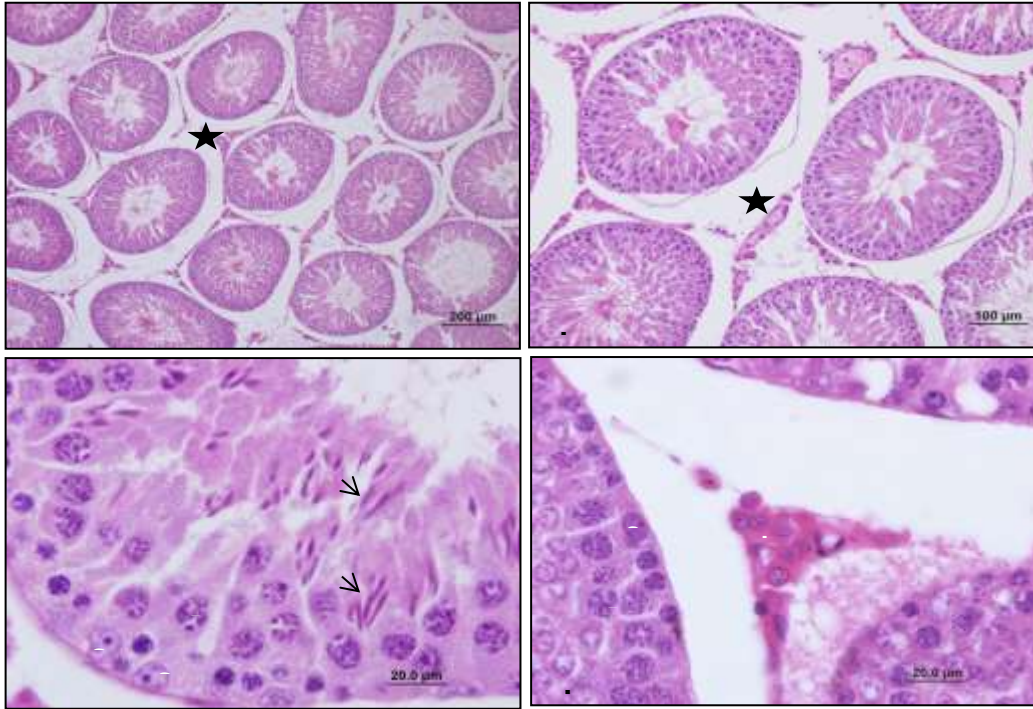
Birkaç tübülde hasar gözlene de korunmuş spermatogonik hücreler ile spermatogenezin devam ettiği gözlemlendi (Şekil 5a-d). İnterstisyel alanda ise azalmış ödem ve normale yakın görünümlü Leydig hücreleri gözlemlendi (Şekil 5a-d). Ayrıca bütünlüğünü koruyan normale yakın yapıdaki PAS pozitif bazal membran yapısı gözlemlendi (Şekil 5b,d). Gentamisin verilen grupta damarlarda konjesyon ve interstisyel alanda ödem gözlenmekteydi ancak Gentamisinle birlikte C vitamini verilen grupta konjesyon ve ödemin dikkate değer şekilde azaldığı gözlemlendi.



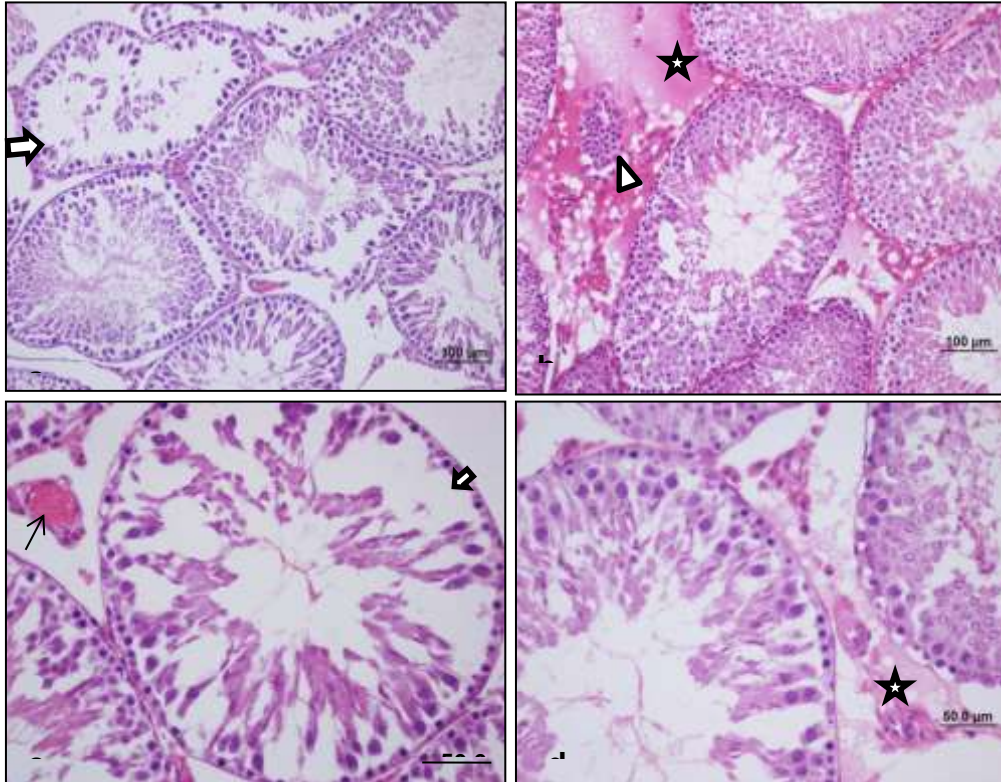
**Şekil 1: Kontrol grubu:** Normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogonik hücre serileri; spermatogonyum (s), primer spermatosit (ps), spermatid hücreleri (st) ve tübüllerde devam eden spermatogenez görülmekte. Normal görünümlü interstisyel alan (\*) ve Leydig hücreleri (▶) izlenmekte. Ayrıca normal yapıdaki PAS pozitif bazal membran yapısı (→) görülmekte (bar:200µm, bar:100µm, bar:50.0µm, HE, a-c, PAS+HE, d).





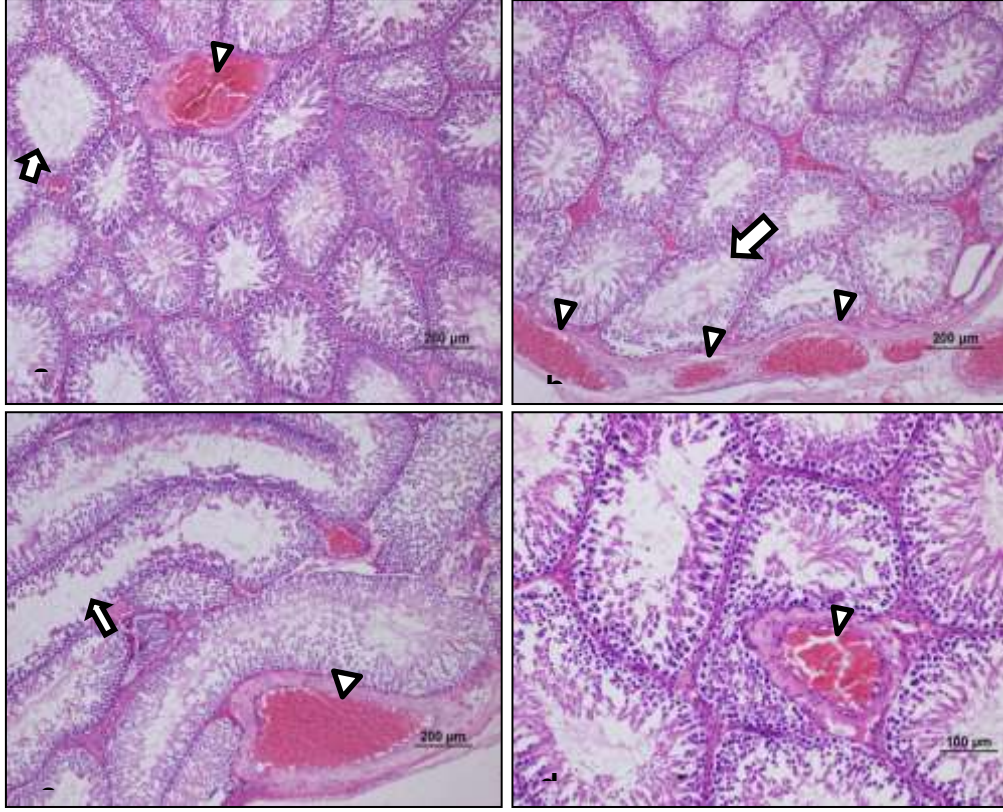


**Şekil 2: C vitamini grubu:** Normale yakın yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri; Sertoli hücresi (Se), spermatogonyum (s), primer spermatosit (Ps), spermatid hücreleri (→) ve tübüllerde devam eden spermatogenez görülmekte. Normal görünümlü interstisyel alan (\*) ve Leydig hücreleri (L) izlenmekte (bar: 200µm, bar: 100µm, bar: 20.0µm, HE, a-d).

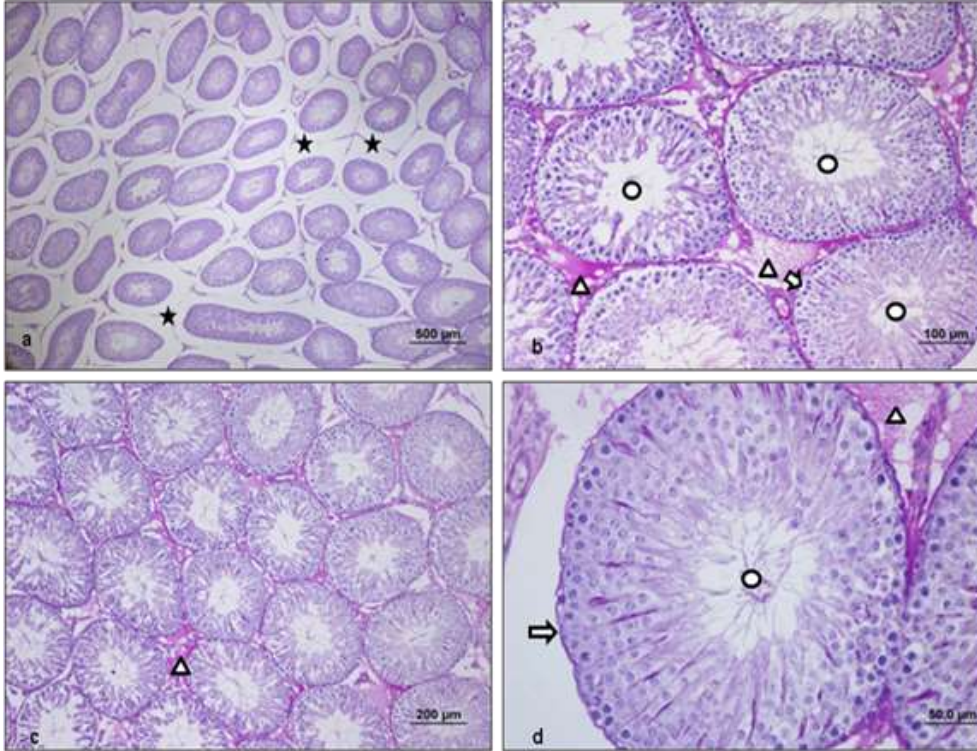


**Şekil 3: Gentamisin grubu:** Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler ve hücresel kayıplar (kalın ok) ile birlikte incelmış tübül duvarı ve bazı tübüllerde atrofi görülmekte (▶). İnterstisyel alanda ise damar kongesyonu (→) ve ödem (\*) dikkat çekmekte (bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE)(a-d).





**Şekil 4: Gentamisin grubu:** Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler ve hüresel kayıplar (→) ile birlikte incelmış tübül duvarı görülmekte. İnterstisyel alanda ise yoğun damar kongestyonu (▶) dikkat çekmekte (bar: 200µm, bar: 100µm, HE)(a-d).



**Şekil 5: Gentamisin grubu+C vitamini grubu:** Bazı tübüllerde hasar devam etse de genellikle azalmış hasar ve normale yakın yapıdaki seminifer tübüller (●) ile devam eden spermatogenez izlenmekte. İnterstisyel alanda azalmış ayrılmalar (\*) ve ödem (▶) dikkat çekmekte. Ayrıca bütünlüğünü koruyan normale yakın yapıdaki PAS pozitif bazal membran yapısı (→) izlenmekte (bar: 500µm, bar: 100µm, bar: 200µm, bar: 50.0µm, PAS+HE, a-d).

#### 4. Tartışma

Gentamisin, geniş spektrumlu aminoglikozid bir antibiyotiktir ve mikrobiyal patojenlere özellikle gram negatif bakterilere etkilidir. Birçok çalışma göstermiştir ki gentamisin serbest radikal oluşumu ile lipid peroksidasyonunu artırarak testiste oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif hasar, yüksek lipid peroksidasyonu ve membran özelliklerinin değişmesi daha sonraki aşamalarda germ hücrelerinin ölümü ve sperm sayısında azalmaya yol açmaktadır (6). Nouri M. ve arkadaşları sıçanlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, 24 gün boyunca günlük i.p. olarak 5mg/kg gentamisin vermiş ve bu çalışmada elde edilen histolojik bulgular; spermatogenik hücrelerde nekroz ve dejenerasyon ile spermatid, spermatozoonlarda azalma görmüşlerdir (6). Bu araştırmanın bulguları bizim çalışmamızla benzer özellikler göstermiştir. Gentamisinin oksidatif hasara ve nekroza neden olduğu belirlenmiştir. Gentamisine maruz kalan sıçanlarda testosteron seviyesinin düştüğü de gözlenmiştir. Askorbik asit gibi antioksidanların semendeki spermatozoayı koruduğu araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (12). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre, gentamisinin testisler üzerinde hasara sebep olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın bulguları ile benzer bulgular taşıyan; Narayana K.'nın testisler üzerinde yaptığı çalışmada, altı gruba ayırdıkları sıçanlardan 2 gruba su diğer 2 gruba 3 mg/kg gentamisin, diğer 2 gruba da 5 mg/kg gentamisin 10 gün boyunca intraperitoneal yolla uygulanmıştır. İlaç enjeksiyonu yapmadan önce suyla çözmüşlerdir (5 mg/ml). 10 gün gentamisin verilmesinden sonra vücut ağırlığında önemli bir değişiklik olmamış ancak 5 mg/kg gentamisin verilmesinden sonra çok az değişiklik olmuştur. Gentamisin serbest radikal, lipid peroksidasyonu artışına ve antioksidan seviyesinde düşmeye neden olmuştur. Gentamisin testiste yapısal değişikliklere neden olmuş; epitelde dökülme, germ hücrelerinde dejenerasyon, seminifer tübüllerde atrofik değişiklikler, intersitiyel alanda boşluklar ve son olarak sperm üretiminde azalmaya neden olmuştur (5). Yaptığımız çalışmada da gentamisin grubunda benzer histopatolojik değişiklikler görülmüştür.

C vitamini, insanlar ve pek çok hayvan türü için dışarıdan alımı zorunlu olan bir besin maddesidir. Canlılar kendilerini radikal oksijen türevlerinin neden olduğu oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimatik ve E vitamini, C vitamini, taurin, glutatyon gibi non enzimatik antioksidan sistemleri kullanarak korumaktadırlar. C vitamini, vücutta glutatyona bağlanarak güçlü bir biçimde redüktan ajan olarak işlev görür ve antioksidan etkisiyle birlikte organizmayı fazlalaşan reaktif oksijen türlerinin ya da serbest radikallerin neden olduğu oksidatif strese karşı korur.

C vitamini, bağışıklık hücrelerinde yoğun bir biçimde bulunur ve bir enflamasyon varlığında bu hücrelerde hızlı bir biçimde tüketilir. C vitaminin bağışıklık sistemindeki rolü ve etkileri tam olarak açığa kavuşmamış olsa da, lenfosit proliferasyonunda, iltihabi hücrelerin hedef dokulara adezyonunda, sitokin üretiminde ve fagositoz etkinliğinde rol oynadığına dair teoriler öne sürülmektedir (13).

#### 5. Sonuç

Deney süreci sonunda yapılan istatistiksel ve histolojik analizlere göre;

1. Gentamisin 14 gün boyunca her gün 5mg/kg verildiğinde vücut ağırlığında artışa neden olmuştur.
2. Gentamisin, testis üzerinde oldukça toksik etki göstermiştir. Spermatogenik hücrelerde yoğun hasar ve hücresel dökülmelere neden olarak spermatogenezi olumsuz yönde etkilemiştir. Bazal laminada kalınlaşmaya, tübüllerde yoğun hasara ve atrofiye neden olmuştur. İntersitiyel alanda genişleme ve damarlarda konjesyona neden olmuştur. İnterstisyel dokuda bulunan Leydig hücreleri üzerinde ise önemli bir değişikliğe yol açmamıştır.
3. 14 gün boyunca her gün 200 mg/kg verilen C vitamini testis ağırlığında ve vücut ağırlığında istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe yol açmamıştır.
4. 14 gün boyunca her gün gentamisinle birlikte verilen C vitamini, gentamisinin testis üzerinde oluşturduğu hasarı azaltmıştır.



Bu çalışma; testis üzerinde gentamisin önemli oranda hasara neden olduğu ve bu hasarda antioksidan ajanların gentamisin neden olduğu zarara karşı koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada antioksidan etkinliği bilinen C vitamininin uygulanmasıyla gentamisin neden olduğu hasar azaltılmıştır. C vit'in

gentamisin toksitesini nasıl önlediğinin ortaya konmasında ileri enzimatik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal düzeyde yapılacak araştırmalar bu konuda ek bilgiler ve kanıtlar sağlayabilir. Bununla birlikte gözlenen bu olumlu etkinin klinik ve geniş katımlı çalışmalarda değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

#### KAYNAKLAR

1. Ali, B. H. (1995). Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol*;26(7):1477-87.
2. Mostafa, B. E., Tawfik, S., Hefnawi, N. G., Hassan, M. A., & Ismail, F. A. (2007). The role of deferoxamine in the prevention of gentamicin ototoxicity: a histological and audiological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 127(3): 234-9.
3. Maldonado, P. D., Barrera, D., Rivero, I., Mata, R., Medina-Campos, O. N., Hernández-Pando R. & Pedraza-Chaverri, J. (2003). Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med.* 35(3):317-24.
4. Schacht, J. (1993). Biochemical basis of aminoglycoside ototoxicity, *Otolaryngol. Clin. North Am.*, 26: 845-856.
5. Narayana, K. (2008). An aminoglycoside antibiotic gentamycin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats, *The Journal of Toxicological Sciences* Vol. 33, No. 1, February P 85-96.
6. Nouri, M., Khaki, A., Azar, F. F., & Rashidi, M. R. (2009). The Protective Effects of Carrot Seed Extract on Spermatogenesis and Cauda Epididymal Sperm Reserves in Gentamicin Treated Rats, *Yakhteh Medical Journal*, Vol 11, No 3, Autumn Pages: 327-333.
7. Nishikimi M. (1994). Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonolactone oxidase, the enzyme for Lascorbic acid biosynthesis missing in man. *Journal of Biological Chemistry*; 269: 13685-13688.
8. Halliwell, B., Wasil, M., & Grootveld M. (1987). Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. *FEBS Lett*; 213:15-17.
9. Champe P. C., Harvey R. A. (1997). *Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti.*
10. Khaki, A., Novin, M.G. , Khaki, A.A., Fathiazad, F., Khaberi, M., Hossinchi, J., Sehizadeh, R. (2009). Ultra structural study of gentamicin and ofloxacin effect on testis tissue in rats: Light and transmission electron microscopy, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol., 3(4). pp. 105-109, April.
11. Ural, M., Özgüner, M., Şenal, D., Sütçü, R., & Delibaş, N. (2005). Siklosporin A'nın sıçanlarda oluşturduğu nefrotoksisiteye vitamin C ile vitamin E'nin verapamilin etkilerinin ışık mikroskopunda değerlendirilmesi, *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, 12(4)/ 28-35
12. Zahedi, A., Fathiazad, F., Khaki, A., & Ahmadnejad, B. (2012). Protective Effect of Ginger on Gentamicin-Induced Apoptosis in Testis of Rats, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2(2), 197-200.
13. Preedy, V. R., Watson, R. R., & Sherma, Z. (2010). *Dietary Components and Immune Function* Humana Press, Nutrition and Health,52: pp. 36.