

## Deneysel Araştırma

# Sıçan Testis Dokusunda Kadmiyum ile Oluşturulan Hasar Üzerine Etil Pirüvatın Etkilerinin Araştırılması

Ayça LEKESİZCAN, Mehmet Fatih SÖNMEZ<sup>a</sup>

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada kadmiyum ile testis dokusunda oluşturulan apoptozis ve hasar üzerine etil pirüvatın koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı.  
**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada 32 adet ergin erkek Wistar albino türü sıçanlar kullanıldı. Denekler rastgele 4 gruba ayrıldı. Grup I; (n=8) kontrol grubu, Grup II; (n=8) 2,5 mg/kg intraperitoneal (i.p) kadmiyum uygulanan grup, Grup III; (n=8) 2,5 mg/kg kadmiyum + 100 mg/kg (i.p) etil pirüvat uygulanan grup ve Grup IV; (n=8) 100 mg/kg (ip) etil pirüvat uygulanarak oluşturuldu. Yirmi dört saat aryla iki doz etil pirüvat uygulandı. İkinci uygulamasından bir saat sonra 2 ve 3. gruplara kadmiyum uygulandı ve uygulamadan 24 saat sonra denekler dekapite edilerek testis dokuları alındı.  
**Bulgular:** Kadmiyum uygulanan grupta germinalepitelde düzensizlik, epitel hücreleri arasında vakuol oluşumu ve yer yer nekrotik tübüller gözlemlendi. Kadmiyum uygulanan grupta seminifer tübül çapları, Johnsen'intübül biyopsi skoru ve doku MDA düzeylerinin kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede azaldığı, apoptotik hücre sayısının ise anlamlı derecede arttığı belirlendi. Koruyucu amaçlı verilen etil pirüvatın sadece apoptotik hücre sayısında iyileşme sağladığı gözlemlendi.  
**Sonuç:** Sonuç olarak kadmiyum uygulamasının testis dokusunda çok ciddi histopatolojik değişiklikler oluşturmakta olduğu ve koruyucu amaçlı verilen etil pirüvatın bu hasarda etkili bir şekilde iyileştirici etkisinin olmadığı sadece apoptotik hücre sayısında iyileşme sağladığı gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Kadmiyum, etil pirüvat, testis, sıçan.

### ABSTRACT

#### A Research on Effects of Ethyl Pyruvate on Rat Testicular Tissues which Was Damaged with Cadmium

**Objective:** The present study aimed to evaluate the protective effect of Ethyl Pyruvate on cadmium induced testicular apoptosis and toxicity in rats.  
**Material and Method:** In this study 32 adult male Wistar albino rats were used. Rats are separated into four random groups. Group 1; (n=8) control group, Group 2; (n=8) 2.5 mg/kg intraperitoneal (ip) cadmium administered rats, Group 3; (n=8) 2.5 mg/kg ip cadmium + 100 mg/kg ethyl pyruvate administered rats, Group 4; (n=8) 100 mg/kg ethyl pyruvate administered rats. Two doses of the ethyl pyruvate were administered in a 24 hours interval. Cadmium was applied 1 hour after administration of ethyl pyruvate to the groups 2 and 3 and all the subjects are killed by decapitation 24 hour after and their testis tissues were collected.  
**Results:** Germinal epithelium irregularities, epithelial cell loss in lumen, formation of the vacuoles between epithelial cells and necrotic tubules were observed in the cadmium applied group. The diameters of seminiferous tubules, tubular biopsy score of Johnsen and tissue MDA levels significantly decreased and apoptotic cell numbers significantly increased compared to control group. It was observed that ethyl pyruvate has only shown improvement in the number of apoptotic cells.  
**Conclusion:** As a result application of cadmium create very serious changes on testicular tissue and the ethyl pyruvate administration for protective purposes is not preventing this damage except improvement in the number of apoptotic cells.  
**Key Words:** Cadmium, ethyl pyruvate, testis, rat.

**K**admiyum (Cd) birçok insan aktivitesi ile çevremizde açığa çıkan bir metaldir (1). Doğada yayılma hızı yüksektir ve insan yaşamı için gerekli elementlerden biri değildir. Tarım sektöründe yaygın ve kontrolsüz sentetik gübre kullanımı ve bunun yanı sıra seracılıkla üretilen sebze ve meyvelerin, Cd ile kirlenmiş topraklarda yetişen tahılların, sanayi ve diğer atıklarla kirlenen sularda beslenen su ürünlerinin, Cd ile kirlenmiş içme sularının, memeli hayvanların karaciğer, böbrek gibi iç organlarının tüketimi, hava kirliliği, kahve, çay, kömür yakılması, yüksek sigara

bağımlılığı oranı ve buna bağlı yüksek oranda pasif içicilik göz önüne alındığında insan sağlığı hem gıdalarla hem de solunum yoluyla büyük ölçüde Cdtoksitesisi tehdidi altındadır (2,3).

Cd'nin erkek üreme sistemi üzerine ciddi toksik etkileri bulunmaktadır. Cd, spermatogenez indeksinde azalmaya neden olurken sperm miktarını ve hareketliliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Cd, Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı kompleksini bozarak spermatogenez seriyeye ait hücrelerde hasara neden olur ve spermatogenez olumsuz etkiler.

<sup>a</sup>Yazışma Adresi: Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye  
Tel: 0 352 207 66 66  
Geliş Tarihi/Received: 09.04.2015

e-mail: drmfatihsonmez@hotmail.com  
Kabul Tarihi/Accepted: 30.04.2015

Kadmiyum,germ hücrelerinde apoptoz ve nekroza sebep olmaktadır. Kadmiyumun sebep olduğu testiküler nekroz sonucu, kalıcı infertilite ortaya çıkabilmektedir. Testis dokusundaki kadmiyum seviyesi arttıkça, seminifer tübüllerdeki apoptoz oranı artmakta ve semen parametrelerindeki düzelme azalmaktadır (4-7).

Ağır metaller gibi birçok stres oluşturuca faktörler organizmada oksidatif strese neden olarak superoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroksil (OH<sup>-</sup>), nitrik oksit (NO) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi serbest oksijen radikallerinin (SOR) açığa çıkmasına neden olurlar (4). SOR, özellikle membran lipidlerind eperoksidasyona, antioksidan savunma sisteminin bozulmasına, proinfla matuarsitokinlerin sentezine bağlı yangının ortaya çıkışına, protein yapı bozukluklarına, nükleik asitlerin oksidasyonuna ve DNA tamir mekanizmasının olumsuz yönde etkilenmesine neden olur. Cd, SOR türlerinin üretimine doğrudan olmasa da dolaylı olarak katkıda bulunan çok kuvvetli toksik bir metaldir (4).

Piruvat ve etanolden sentezlenen etil pirüvat, kalsiyum ve potasyum ile etkileşim içinde, Ringer'in etil piruvat solüsyonunda (REPS) stabildir (8). Kalsiyum ve potasyum içeren dengeli solüsyonda stabil olmasının yanında aynı zamanda toksik değildir (9). Etil pirüvatın endojenmetabolitlere yakın benzerliği, hayvanlarda güvenli profilleri göz önüne alındığında insanlara zararlı olması muhtemel değildir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) genel olarak güvenli bileşikler listesindedir (10). Etil pirüvat,antioksidan ve antiinflamatuvar etkilere sahiptir (11). Bu çalışmanın amacı, testislerdeki kadmiyumun oluşturduğu hasar üzerine intraperitoneal uygulanan etil pirüvatın koruyucu etkisinin olup olmadığının ışık mikroskopik olarak belirlenmesidir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen 250-300 gr ağırlığında ergin erkek Wistar albino türü sıçanlar kullanıldı. Kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde 21 °C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında bakım odalarında izin verilen ölçüde standart besin ve su ile yetiştirildi. Deney grupları ve her bir grupta kaç deneğin kullanılacağı power analizi yapılarak belirlenmiştir. Denekler rastgele 4 gruba ayrıldı; Grup I (n=8); kontrol grubu, Grup II (n=8); 2,5 mg/kg Cd (ip), Grup III (n=8); 2,5 mg/kg Cd + 100 mg/kg etil pirüvat (ip), Grup IV (n=8); 100 mg/kg etil pirüvat (ip) uygulanarak oluşturuldu.

Etil pirüvat solüsyonu 100mg/kg olacak şekilde deneklere 24 saat arayla iki doz i.p. olarak verildi. Cd, grup II ve grup III'deki deneklere 2,5 mg/kg olacak şekilde, 2. etil pirüvat uygulamasından 1 saat sonra ip. Olarak uygulandı. Cd uygulanmasından 24 saat sonra

tüm denekler ketamin + xylazın anestezisi altında dekapite edilerek testis dokuları çıkarıldı. Tüm prosedürler etik kurallara uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Dekapite edilen sıçanlardan alınan testislerin bir bölümü biyokimyasal analizler için kullanılırken diğer bölümleri %4'lük nötral formaldehit ile tespit edildi. Tespit solusyonunda 48 saat bekleyen testisler bir gece akan musluk suyunda bırakıldıktan sonra artan alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarıldı ve ksilol ile şeffaflandırıldıktan sonra parafine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan alınan 5-6 µm'lik kesitler polilizin kaplı lamlara yayıldı. Hazırlanan lamalar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler hematoksilin-eozin (H+E) ile boyanarak önce artan alkol serilerinden daha sonra ksilolden geçirilerek incelendi.

## Seminifer Tübül Çaplarının Ölçümü

Testisteki hasarın bir göstergesi olarak Seminifer Tübül Çaplarının (MSTD) ölçümü kullanıldı. Hematoksilin-Eozin ile boyalı kesitlerde, Olympus BX51 mikroskopundaki Analysis LS Reserach programı kullanılarak seminifer tübül çapları ölçüldü ve ortalama tübül çapları hesaplandı. Seminifer tübül çapı ölçümü, her gruptan rastgele seçilmiş 10 farklı preparattan 10 farklı alandaki tübül çapları 20'lik objektifteki farklı alanlardan ölçülerek yapıldı. İstatistiksel analizler için SPSS paket programı kullanıldı.

## Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

Bu skorlamaya göre, hasarlanmaya neden olan herhangi bir olay sonrasında, tübülün içindeki hücrelerin dağılımı belli bir sıra takip ederek progresif bir şekilde kaybolur. Tübüllerdeki bu hasarlanmanın derecesinin değerlendirilmesinde Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) kullanıldı (Tablo1).

Tablo 1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması.

Skor	Histolojik Bulgular	Skor	Histolojik Bulgular
1	Tübüler kesitte hiçbir hücre yoktur.	6	Az sayıda (5/ tübül) spermatid mevcuttur.
2	Sadece sertoli hücreleri vardır.	7	Farklanma işareti olmaksızın fazla sayıda spermatid vardır.
3	Germ hücreleri olarak sadece spermatogonyumlar vardır.	8	Olgun spermatozoa olmaksızın geç spermatidler mevcuttur.
4	Az sayıda (5/ tübül) spermatosit vardır.	9	Az sayıda (5/ tübül) spermatozoa vardır.
5	Fazla sayıda spermatosit mevcuttur.	10	Fazla sayıda spermatozoanın görüldüğü tam spermatogenez mevcuttur.

Histolojik incelemelerin sonuçları Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında iki uzman histolog tarafından değerlendirildi. Her gruptan rastgele seçilmiş 10 farklı preparattan 20'şer farklı tübül 20'lik objektifteki farklı alanlar incelenerek yapıldı. Her grup için ayrı ayrı 200 adet tübül değerlendirilerek ortalama JTBS hesaplandı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar için SPSS paket programı kullanıldı.

#### Apoptozis (TUNEL) Metodu

Parafin bloklardan alınan 4-5 µm'lik kesitler polilizin kaplı lamlara yayıldı. Hazırlanan lamalar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. PBS ile yıkama yapıldı. Oda sıcaklığında % 0.1'lik sodyum sitrat ve % 0.1'lik Triton X ile hazırlanan permabilizasyon solüsyonunda 1 saat boyunca inkübe edildi. İki kez beşer dakikaya PBS ile yıkandıktan sonra karanlıkta 37 °C de TUNEL reaksiyon karışımında (TdT enzim solüsyonu + labelling solüsyon) 1 saat boyunca inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra converter-AP ile 37 °C'de nemli ve karanlık ortamda 30 dak. muamele edildi. PBS ile iki defa beşer dakika yıkanan dokular FastRed solüsyonu ile inkübe edilerek apoptotik hücreler işaretlendi. Dokular gliserollü kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Negatif kontrolde pozitif kontrolle aynı hazırlandı ancak TUNEL reaksiyonunda TdT enzimi kullanılmadı.

Hazırlanan preparatlar 400X büyütmede ışık mikroskobu kullanılarak (Olympus BX51) incelendi. Enine kesilmiş testis dokularındaki immünoreaktif hücrelerin sayısı özel bir oküler yardımıyla her örneğin en az beş bölümden 5 alandan (1x1mm) gözlem yapılarak elde edildi.

#### Doku Malondialdehit (MDA) Tayini

Lipidperoksidasyon ölçüm metodu olan Ohkawa metodu uygulanarak yapıldı (12). Tiyobarbitirik asit ile 90-95°C'de reaksiyona giren malondialdehit, pembe renkli kromojen oluşturmaktadır. On beş dakika sonra hızla soğutulan numunelerin absorpsanları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Sonuçlar nmol/gr doku proteini olarak ifade edildi.

#### İstatistiksel Analiz

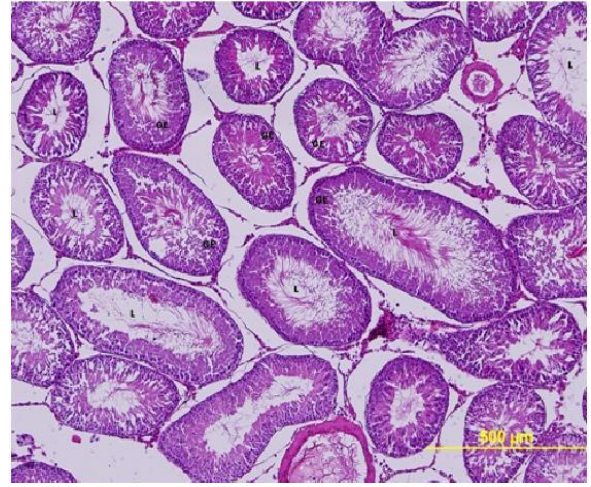
Tüm istatistiksel analizler SPSS yazılım programında yapıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak belirlendi. Apoptotik hücre sayısı, seminifer tübül çapları ve Johnsen'in tübül biyopsi skorları One-Way ANOVA yöntemiyle değerlendirildi. Post hoc analiz için Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık P<0.05 olarak tanımlandı.

## BULGULAR

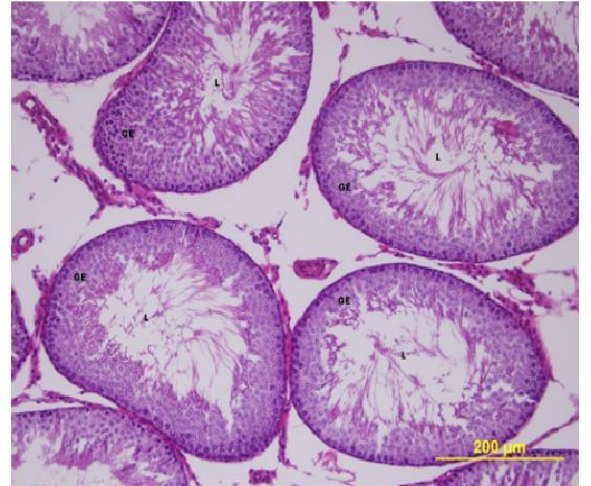
Deney sonrasında Cd grubuna ait testis dokularının makroskopik olarak mor renk aldığı saptandı. Diğer gruplarda herhangi bir değişikliğe rastlanmadı.

#### Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubuna ait testis dokusu kesitlerinde tunika albuginea, seminifer tübül kontürleri, seminifer tübüllerin germinal epiteli ve interstisyel alanda bulunan Leydig hücreleri normal yapıda gözlemlendi (Şekil 1). Sadece etil pirüvat uygulanan sıçanların testis dokularında da kontrol grubuna benzer histolojik bulgulara rastlandı (Şekil 2).



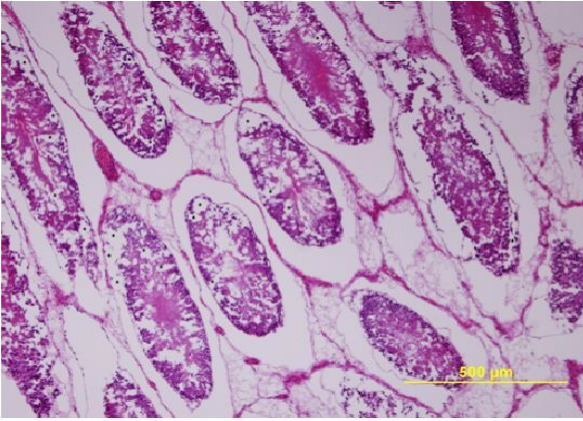
Şekil 1. Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusu. Seminifer tübüllerdeki germinal epiteli (GE) normal olarak gözlenmekte (H&E).



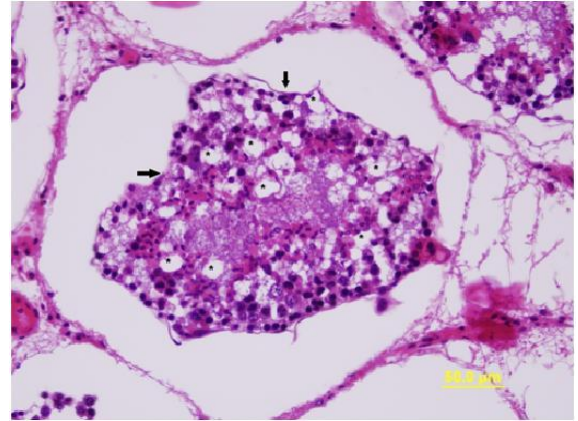
Şekil 2. Sadece etil pirüvat verilen gruba (Grup IV) ait testis dokusu. Seminifer tübüller normal olarak gözlenmekte. Germinal epiteli (GE), lümen (L) (H&E).

Sadece Cd uygulanan sıçanların testis dokularında germinal epitelde vakuol oluşumu (Şekil 3), bazı tübüllerde nekroz (Şekil 4), damarlarda konjesyon, hemoraji (Şekil 5), seminifer tübüllerin kontürlerinde ve germinal epitelinde düzensizlik gözlemlendi (Şekil 6).

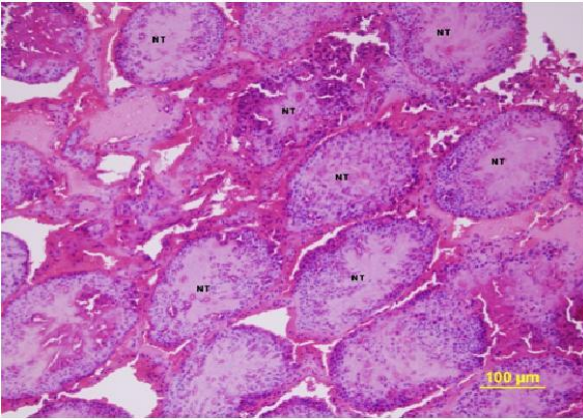




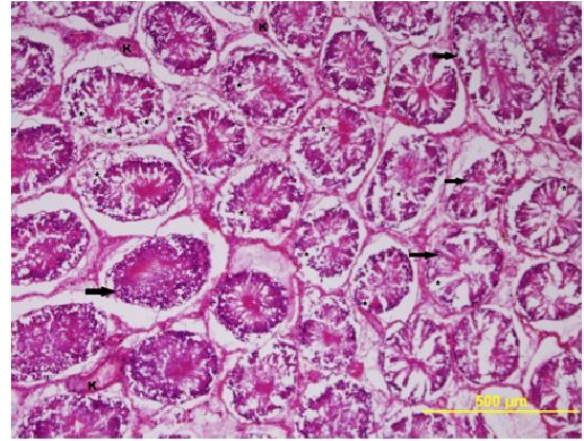
**Şekil 3.** Sadece kadmiyum uygulanan gruba (Grup II) ait testis dokusu. Seminifer tübül epitelinde hücreler arasında vakuol oluşumu görülmekte (\*) (H&E).



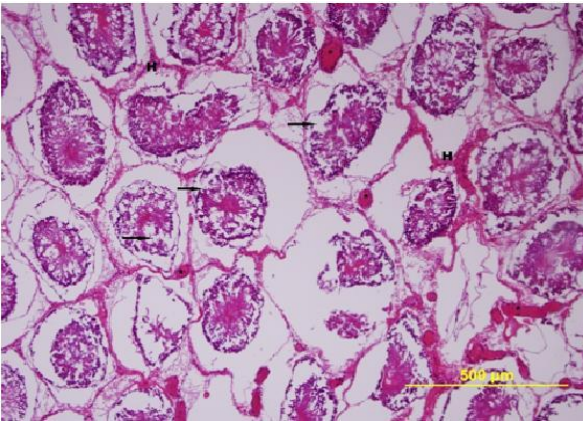
**Şekil 6.** Sadece kadmiyum uygulanan gruba (Grup II) ait testis dokusu. Seminifer tübül germinal epitelinde düzensizlik (ok) ve epitel hücreleri arasında vakuol oluşumu (\*) görülmekte (H&E).



**Şekil 4.** Sadece kadmiyum uygulanan gruba (Grup II) ait testis dokusu. Seminifer tübüllerde nekrotik görünüm (NT) (H&E).



**Şekil 7.** Kadmiyumla birlikte etil pirüvat uygulanan gruba (Grup III) ait testis dokusu. Damarlarda konjesyon (K), seminifer tübül germinal epitelinde düzensizlik (ok) ve epitel hücreleri arasında vakuol oluşumu (\*) görülmekte (H&E).



**Şekil 5.** Sadece kadmiyum uygulanan gruba (Grup II) ait testis dokusu. Damarlarda konjesyon (\*), hemoraji (H), seminifer tübül germinal epitelinde düzensizlik ve epitel hücreleri arasında vakuol oluşumu (ok) görülmekte (H&E).

Cd ile birlikte etil pirüvat uygulanan sıçanların testis dokuları da, sadece Cd uygulanan gruba benzer şekilde damarlarda konjesyon ve hemoraji, germinal epitelde vakuol oluşumu, seminifer tübüllerin kontürlerinde ve germinal epitelinde düzensizlik gözlemlendi (Şekil 7).

### Seminifer Tübül Çapları (MSTD) Ölçüm Sonuçları

MSTD açısından incelendiğinde, sadece Cd uygulanan gruptaki MSTD, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı. Cd ile birlikte etil pirüvat uygulanan grupta ise MSTD, sadece Cd uygulanan gruba benzer olduğu belirlendi (Tablo 2).

### Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) Sonuçları

JTBS sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. Seminifer tübüllerdeki germinal epitelin değerlendirildiği JTBS sonuçlarına göre kontrol ve sadece etil pirüvat alan gruplar birbirlerine yakın sonuçlar gösterdiler. Cd uygulanan grupta biyopsi skoru, kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış olarak belirlendi. Cd ile birlikte etil pirüvat verilen gruptaki biyopsi skoru, sadece kadmiyum uygulanan gruba göre sayısal olarak artmakla beraber bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi.



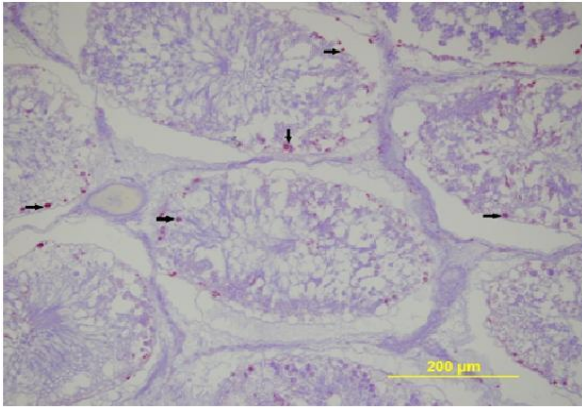
**Tablo 2.** Deneklere ait Ortalama Seminifer tübül çapı (MSTD), Johsen biyopsi skoru (JTBS), apoptotik indeks ve doku MDA sonuçları.

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
MSTD (µm)	342.58±2.21	267.11±1.76* (p=0.000)	268.27±2.19	312.50±1.91
JTBS	9.08±0.08	5.46±0.12* (p=0.000)	6.61±0.14	8.05±0.09
Apoptotik İndeks	1.62±0.27	18.94±1.62* (p=0.000)	4.46±0.66** (p=0.000)	6.04±1.11
MDA (nmol/gr protein)	211.75±33.56	130.01±5.61 (p=0.199)	207.14±26.32	240.57±39.20

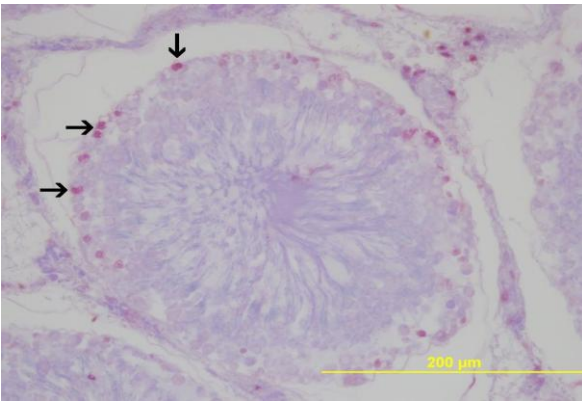
Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. \* Grup I ile karşılaştırıldığında p < 0.001, \*\* Grup II ile karşılaştırıldığında p < 0.001.

### TUNEL Değerlendirmesi

Apoptotik hücreler genellikle spermatogenetik seriye ait hücrelerde belirlendi (Şekil 8,9). Apoptotik hücre sayımı sonuçları tablo 2’de gösterilmiştir. Apoptotik hücre sayımı sonuçlarına göre Cd uygulanan gruptaki apoptotik hücre sayısı, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi. Koruyucu amaçlı verilen etil piruvatın apoptotik hücre sayısını, sadece Cd uygulanan gruba göre istatistiksel olarak azalttığı gözlemlendi.



**Şekil 8.** Sadece kadmiyum uygulanan gruba (Grup II) ait testis dokusu. Seminifer tübüllerdeki germinal epitelde apoptotik hücreler (ok).



**Şekil 9.** Kadmiyumla birlikte etil piruvat uygulanan gruba (Grup III) ait testis dokusu. Seminifer tübüllerdeki germinal epitelde apoptotik hücreler (ok).

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Önemli endüstriyel ve çevresel kirlenmelerden biri olan ve canlılar üzerindeki toksik etkileri bilinen Cd, maden cevherlerinden doğrudan doğruya üretilmeyen ağır metallere aittir (13). Kadmiyum, diğer ağır metaller gibi hem çevresel hem de mesleki maruziyetlerle insan sağlığını tehdit etmektedir.

Yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki, Cd’ye maruz kalmaya bağlı olarak organlardaki dağılımı ve buna bağlı olarak aktivasyon bölgeleri değişmektedir (14,15). Cd enjeksiyon yoluyla ya da içme suyuyla oral olarak alınmasıyla; testis, prostat, karaciğer, akciğer ve böbrek gibi organlarda şiddetli hasarlara sebep olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hasarların şiddeti, Cd’a maruz kalma süresine ve Cd’un dozuna göre değişmektedir (15-18).

Gouveia ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 1 mg/ml intraperitoneal kadmiyum uygulamasından 24 saat sonra testislerde şiddetli ödem, daha uzun süreli uygulamalarda ise atrofi, tübüllerde nekroz ve tübüller arası bağ dokusunda fibrozis meydana geldiği belirtilmiştir (19). Başka bir çalışmada 3.5 mg/kg kadmiyumun deri altına uygulanmasıyla testis dokusunda tunika albuginea kalınlaşma, interstisyel bağ dokusunda artış, tübüllerin çoğunda spermatogenik seriye ait olan hücrelerde önemli derecede azalma ve tübüllerin bazılarında ise hiyalin madde tespit edilmiştir. Ayrıca interstisyel bölgede normal yapıda Leydig hücresi gözlenmediği belirtilmiştir (20). Bir hafta boyunca deri altına yapılan kadmiyum uygulaması testis dokusunda damarlarda konjesyona, seminifer tübül epitelinde düzensizliğe neden olurken dört hafta boyunca deri altına uygulanan 1mg/kg kadmiyumun biyopsi skoru tübül çapı ve serum testosteron seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir. Hücrelerdeki aktin kaybı ve apoptosiz artışının testislerdeki kadmiyum doku konsantrasyonuna paralellik gösterdiği belirtilmiştir (21,22).

Bizim yaptığımız çalışmada sadece Cd uygulanan sıçanların testis dokularında germinal epitelde vakuol oluşumu, bazı tübüllerde nekroz, damarlarda konjesyon, hemoraji, seminifer tübüllerin kontürlerinde ve germinal epitelinde düzensizliğe rastlandı. Cd uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MSTD ve JTBS istatistiksel olarak anlamlı azalma ve apoptotik hücre sayısında anlamlı derecede artma gözlemlendi. Bizim elde ettiğimiz bu sonuçlar daha önce yapılan ve Cd’nin testis dokusunda oluşturduğu hasar ile paralellik göstermektedir.

Antioksidanlar, çeşitli hastalıkların oluşmasında tetikleyici rol oynayan “oksidatif stres” sonucu açığa çıkan serbest radikallerin üretilmesini engelleyerek canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelerdir. Vücutta bulunan antioksidan savunma mekanizmaları, serbest

radikalleri etkisiz hale getirmeye çalışır. Oksidatif stres kaynaklı rahatsızlığı bulunan hastalarda endojen kaynaklı antioksidanlar etkili olmadığından, oksidatif hasarı azaltabilmek için dışarıdan alınacak antioksidanlar kullanılmaktadır. Ürogenital sistem üzerine yapılan çalışmalarda antioksidan tedavi ile lipid peroksidasyonun azalması; fertilizasyon oranlarının gelişmesiyle paralellik göstermektedir (22).

Cd ile oluşan hasara oksidatif sistemin aracılık ettiği bilinmektedir. Bu nedenle antioksidan kullanılarak kadmiyum toksisitesinin azaltılmasına yönelik çok sayıda çalışma vardır. Wang ve ark. (23) yaptığı çalışmada düşük dozda Cd uygulanan (0.4 mg/kg) sıçanlarda karaciğer, böbrek ve epididimis ağırlıkları değişmezken sperm özelliklerinde bozulma ve testislerin endokrin fonksiyonlarında yetersizlik gözlenmiş, buna karşı antioksidan olarak theaflavin uygulamasının kadmiyum tarafından indüklenen oksidatif stresi önleyici etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Ren ve ark. (24) Cd kaynaklı olası spermatogenesis inhibisyonu ve sperm miktarındaki azlığa karşı uygulanan selenyumun koruyucu etkisinin testosteron seviyelerindeki artışa bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Diğer bir çalışmada selenyumun Cd'nin neden olduğu histopatolojik, oksidatif, endokrin ve apoptotik hasara karşı önleyici etkisi tespit edilmiştir (25). Ji ve ark. (26) yaptığı bir çalışmada Cd ile uyarılan oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresini azaltan melatoninin, testisteki kadmiyum kaynaklı germ hücrelerinin apoptozuna karşı önleyici etkisinin olduğu belirtilmiştir.

Pirüvatın etkili bir serbest radikal temizleyicisi olarak tanımlanmasından sonra, araştırmacılar bu maddeyi farklı birçok patolojik durumların tedavisinde kullanmanın yollarını aramaya başlamışlardır. Salahudden ve ark. (27) sıçanlar üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada sodyum pirüvat solüsyonunun böbrek yetmezliğini önlediğini göstermişlerdir. Diğer araştırmacılar pirüvat ile tedavi sonucunda hayvan

modellerinde miyokard, intestinal ve hepatikiskemiye takiben oluşan hasarının ve disfonksiyonunun düzeltilebildiğini göstermişlerdir (28-30). Ayrıca sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda galaktoz ve diyabetle oluşturulan kataraktlarda, inmelerde, hemorajik şok ve galaktoz, fruktoz veya oksidan maddelerce oluşturulan lens hasarlarında pirüvatlı solüsyonlar verilerek etkili sonuçlar almışlardır (31-37).

Payabvasha ve ark. (38) etil pirüvatın sistemik ve yüksek dozlarda (3, 4 ve 5. gruplara 2'şer doz 20, 50, 100 mg/kg) uygulanmasının testis torsiyonundaki malondialdehit ve apoptotik indeksleri düşürdüğünü ve buna bağlı olarak hücre ölümü hasarı azalttığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada 1 ay sonra etil pirüvatın antiapoptotik etkilerine bağlı olarak sperm sayısında ve hareketliliğinde iyileşme tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada Cd ile oluşturulan hasarı engellemek için etil pirüvat uygulandı. Cd ile birlikte etil pirüvat uygulanan sıçanların testis dokularındaki seminifer tübüllerin kısmen normal olduğu gözlemlendi. Ancak bununla birlikte bazı tübüllerde lümen epitel hücre dökülmesi, seminifer tübüllerin kontürlerinde düzensizlik ve epiteller arası vakuol oluşumu devam etmekteydi. Cd ile birlikte etil pirüvat verilen deneklerde apoptotik hücre sayısında ve doku MDA düzeyinde iyileşme gözlenirken, MSTD ve JTBS değerlerinde iyileşme gözlenmedi.

Sonuç olarak Cd birçok organı etkilediği gibi testis dokusunda da çok ciddi histopatolojik değişiklikler oluşturmaktadır. Bu hasarı engellemek için koruyucu amaçlı verilen etil pirüvatın testisteki histopatolojik hasarı kısmen iyileştirdiği belirlendi.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (EUBAP; TSY-11-3506) desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Leoni G, Bogliolo L, Deiana G, et al. Influence of cadmium exposure on in vitro ovine gamete dysfunction. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 371-377.
2. Tekelioğlu M. Özel Histoloji, İnce Yapı ve Gelişme, Erkek Üreme Sistemi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara 2002; 231-244.
3. Sab Dart ID. Committee Draft, Evidence on Developmental and Reproductive Toxicity of Cadmium. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section (RCHAS), 1996.
4. Rencüzoğulları N. Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Kadmiyum Toksikasyonu Üzerine Likopenin Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mku Sağlık Bil Estitüsü, 2006.
5. Schwitters B, Masquellier J. OPC in Practice: Bioflavanols and Their Application. Alfa Omega Rome, Italy 1993.
6. Damek M, Poprawa A, Kapustab SK. Histopathological Changes in the Liver, Kidneys, and Testes of Bank Voles Environmentally Exposed to Heavy Metal Emissions from the Steel Works and Zinc Smelter in Poland. *Environmental Research* 2004; 96: 72-8.
7. Hew KW, Heath GL, Jiwa AH, et al. Cadmium in Vivo Causes Disruption of Tight Junction-Associated Microfilaments in Rat Sertoli Cells. *Biol Reprod* 1993; 49: 840-9.
8. Chung Ky, Park JJ, Kim YS. The Role of High-Mobility Group Box-1 in Renal Ischemia and Reperfusion Injury And The Effect Of Ethyl Pyruvate. *Transplant Proc* 2008; 40: 2136-8.
9. Undurti N. Das, Is Pyruvate An Endogenous Anti-Inflammatory Molecule? *Nutrition* 2006; 22: 965-72.
10. Uchiyama T, Delude RL, Fink MP. Dose-Dependent Effects Of Ethyl Pyruvate In Mice Subjected to Mesenteric Ischemia and Reperfusion. *Intensive Care Med* 2003; 29: 2050-8.
11. Undurti N. Das Pyruvate Is An Endogenous Anti-Inflammatory And Anti-Oxidant Molecule. *Med Sci Monit* 2006; 12: 79-84.

12. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8.
13. Baldwin DR, Marshall WJ. Heavy Metal Poisoning and It's Laboratory Investigation. *Ann Clin Biochem.* 1999; 36: 267-300.
14. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Atsdr), Toxicological Profile For Cadmium, Draft for Public Comment Update). PublicHealth Service, Us Departmant of Health and Human Service, 1997.
15. Karataş S. Sıçanlarda Kadmiyum Klorürün (Kadmiyumcl2) Testis Dokusuna Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 1998.
16. Suzuki Y. Cadmium Metabolism and Toxicity in Rats After Long-Term Subcutaneous Administration. *J.Toxicol. Environ. Health* 1980; 6: 469-82.
17. Davison AG, Newman AJ, Taylor JD et al. Cadmium Fume Inhalation and Emphysema, *Lancet* 1988; 26: 663-7.
18. Gavett SH, Oberdorster G. Cadmium Chloride and Cadmium Metallotione in-Induced Pulmonary Injury and Recruitment of Polymorphonuclear Leukocytes. *Exp. Lung. Res* 1994; 20: 517-37.
19. Gouveia MA. The Testes in Cadmium Intoxication: Morphological and Vascular Aspects. *Andrologia* 1988; 20: 225-31.
20. Boscolo P, Sacchettoni-Logroscino G, Ranelletti FO, et al. Effects of Long Term Cadmium Exposure on the Testis of Rabbits, Ultrastructural Study. *Toxicoll Lett* 1985; 24: 145-9.
21. Aktas C, Kanter M, Erboğa M, Öztürk S. Anti-Apoptotic Effects of Curcumin on Cadmium-Induced Apoptosis In Rat Testes. *Toxicol Ind Health* 2012; 28: 122-30.
22. Marmar JL, Benoff S. The Safety of Ultrasonically Guided Testis Aspiration Biopsies and Efficacy of Useto Predict Varicoceleotomy Outcome. *Human Reproduction* 2005; 20: 2279-88.
23. Wang W, Sun Y, Liu J, et al. Protective Effect of the aflavins on Cadmium- Induced Testicular Toxicity in Male Rats. *Food And Chemical Toxicology* 2012; 50: 3243-50.
24. Ren XM, Wang G, Xu D, et al. The Protection of Selenium on Cadmium-Induced Inhibition of Spermatogenesis Via Activating Testosterone Synthesis In Mice. *Food Chem. Toxicol* 2012; 50: 3521-9.
25. Li JL, Gao R, Li S, et al. Testicular Toxicity Induced by Dietary Cadmium in Cocks And Ameliorative Effect by Selenium 2010; 23: 695-705.
26. Ji YL Wang H, Meng C, et al. Melatonin Alleviates Cadmium-Induced Cellular Stress And Germ Cell Apoptosis In Testes. *J. Pineal Res* 2012; 52: 71-9.
27. Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA. Hydrogen Peroxide Induced Renal Injury. A Protective Role for Pyruvate in Vitro and in Vivo. *J Clin Invest* 1991; 88: 1886-93.
28. Cicalese L, Lee K, Schraut W, Watkins S, Borle A, Stanko R. Pyruvate Prevents Ischemia Reperfusion Mucosal Injury of Rat Small Intestine. *Am J Surg* 1999; 171: 97-100.
29. Bunger R, Mallet RT, Hartman DA. Pyruvate Enhanced Phosphorylation Potential and Inotropism in Normoxic and Postischemic Isolated working Heart: Near-Complete Prevention of Reperfusion Contractile Failure. *Eur J Biochem* 1989; 180:221- 33.
30. Sileri P, Schena S, Morini S, et al. Pyruvate Inhibits Hepatic Ischemia- Reperfusion Injury In Rats. *Transplantation* 2001; 72: 27-30.
31. Lee JY, Kim YH, Koh JY. Protection by Pyruvate Against Transient Forebrain Ischemia in Rats. *J Neurosci* 2002; 21: 1-6.
32. Zhao W, Devamanoharan PS, Henein M, et al. Diabetes-Induced Biochemical Changes in Rat Lens: Attenuat Ion of Cataractogenesis By Pyruvate. *Diabetes Obes Metab* 2000; 2: 165-74.
33. Slovin PN, Huang CJ, Cade JR, et al. Sodium Pyruvate Is Better Than Sodium Chloride as a Resuscitat Ion Solution in a Rodent Model of Profound Hemorrhagic Shock. *Resuscitation* 2001; 50: 109-15.
34. Mongan PD, Capacchione J, Fontana JL, et al. Pyruvate Improves Cerebral Metabolism During Hemorrhagic Shock. *Am J Physiol* 2001; 281: 854-64.
35. Mongan PD, Fontana JL, Chen R, et al. Int Ravenous Pyruvate Prolongs Survival During Hemorrhagic Shock In Swine. *Am J Physiol* 1999; 277: 2253-63.
36. Varma SD, Devamanoharan PS, Rutzen AR, et al. Attenuation of Galactose-Induced Cataract by Pyruvate. *Free Rad Res* 1999; 30: 253-63.
37. Zhao W, Devamanoharan PS, Varma SD. Fructose Induced Deactivation of Ant Ioxidant Enzymes: Preventive Effect of Pyruvate. *Free Rad Res* 2000; 33: 23-30.
38. Payabvasha S, Kiუმehra S, Tavangarb SM, et al. Ethyl Pyruvate Reduces Germ Cell-Specific Apoptosis and Oxidative Stress in Rat Model of Testicular Torsion/Detorsion. *Journal Of Pediatric Surgery* 2008; 43: 705-12