

# Metotreksatın Neden Olduğu Testiküler Hasara Karşı Klorojenik Asidin Koruyucu Etkileri

## The Preventive Effects of Chlorogenic Acid Against to Testicular Damage Caused by Methotrexate

Dr. Nigar VARDI,<sup>a</sup>  
Dr. Hakan PARLAKPINAR,<sup>b</sup>  
Burhan ATEŞ,<sup>c</sup>  
Dr. Ali OTLU<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Histoloji-Embriyoloji AD,  
<sup>b</sup>Farmakoloji AD,  
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
<sup>c</sup>Kimya AD,  
İnönü Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi, Malatya

Geliş Tarihi/Received: 10.10.2008  
Kabul Tarihi/Accepted: 20.01.2009

*Bu çalışma, Malatya Valiliği Kayısı  
Araştırma Vakfı tarafından  
desteklenmiştir.*

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Nigar VARDI  
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Histoloji-Embriyoloji AD,  
Malatya,  
TÜRKİYE/TURKEY  
nvardi@inonu.edu.tr

**ÖZET Amaç:** Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yüksek proliferasyona sahip dokular üzerine akut toksik yan etkilere neden olduğu bilinmektedir. Gonadal hasar da yaygın olarak görülmesine rağmen, antikanser ilaçlarının bu yan etkisi diğer yan etkilere göre daha az araştırılmıştır. Bu çalışmada kanser tedavisinde kullanılan metotreksat (MTX)'in testis dokusunda oluşturduğu değişiklikler üzerine klorojenik asidin koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır. **Gereç ve Yöntemler:** Yirmidört adet Wistar soyu erkek sıçan, kontrol, klorojenik asit, MTX ve klorojenik asit + MTX (kombine) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Elde edilen doku örnekleri histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemler ile incelendi. Testiküler hasarın derecesini değerlendirmek için her gruptan yüz tübül, sağlam, atrofik, dejenerer ve germ hücreleri lümene dökülmüş tübüller olarak sınıflandırıldı. Kaspaz 3 immunoreaktivitesi boyanma şiddetine göre (+) zayıf, (++) orta ve (+++) şiddetli olarak değerlendirildi. **Bulgular:** MTX grubunda incelenen tübüllerden 43.5- 24.2'sinin germinatif epitelinin lümene döküldüğü, 27.5-30.2'sinin atrofik ve 1.0-2.0'inin ise dejeneratif olduğu tespit edildi. Kombine grupta ise etkilenen tübül sayısı istatistiksel olarak MTX grubuna göre düştü. Kaspaz 3 immun boyama yoğunluğu ve dağılımı MTX grubunda, kontrollere göre anlamlı bir artış gösterirken, kombine grupta azalmıştı. Biyokimyasal analizlerde MTX grubunda malondialdehit (MDA) yükselirken, katalaz, süperoksit düzmutaz ve glutatyon peroksidaz değerleri kontrollere göre azaldı. Kombine grupta ise MDA dışında diğer biyokimyasal parametreler kontrol grubuna benzerdi. **Sonuç:** Klorojenik asit gibi antioksidanların kemoterapinin neden olduğu yan etkilerin azaltılmasında faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Metotreksate; testis; apoptozis

**ABSTRACT Objective:** It has been known that the agents used in cancer treatment has acute toxic side effects on tissues with high proliferative activity. Although gonadal damage is widely seen, this side effect of anticancer agents has been studied less than other side effects. Therefore, this study was conducted to demonstrate whether methotrexate (MTX) caused testicular toxicity associated with the oxidative stress, and to investigate possible protective effect of chlorogenic acid against MTX-induced testicular damage. **Material and Methods:** Twenty four Wistar male rats were grouped into four as control, chlorogenic acid, MTX and chlorogenic acid+MTX (combined). The obtained tissue samples were examined via histological and biochemical methods. In each group 100 tubules were classified as intact, sloughing, atrophic or degenerated. Caspase 3 immunoreactivity was evaluated according to coloring magnitude as (+) weak, (++) mild and (+++) strong. **Results:** It was determined that in MTX group 43.5-24.2 of tubules were sloughing, 27.5-30.2 were atrophic and 1.0-2.0 were degenerated. In combined group, a affected tubule number was statistically smaller than MTX group. Coloring density and distribution of caspase 3 in MTX group was significantly greater. It was less in the combined group. Although malondialdehyde (MDA) increased in MTX group, catalase, superoxide dismutase and glutathion peroxidase values decreased compared to controls in biochemical analysis. In combined group, except MDA, the other parameters were similar to the control group. **Conclusion:** We suggest that an antioxidants like chlorogenic acid may be useful for decreasing the side effects of chemotherapy.

**Key Words:** Methotrexate; testis; apoptosis

**E**pidemiyolojik çalışmalar, sebze ve meyveden zengin beslenmenin sağlıklı bir hayat ve hastalıklara karşı direncin artırılmasında veya hafifletilmesinde önemli olduğunu göstermektedir.<sup>1</sup> Bu nedenle son yıllarda bir çok araştırmacı bu konu üzerinde çalışmaktadır.<sup>2-4</sup> Sebze ve meyvelerin bu koruyucu etkileri içerdikleri vitamin karotenoid, flavonoid ve fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Kayısı, elma, domates ve kahve tanesi ekstraktlarından elde edilen klorojenik asit (ChA) de fenolik bir bileşiktir.<sup>5,6</sup> Yapılan araştırmalarda klorojenik asidin; karsinostatik, antioksidan, antihipertansif ve glikoz/lipid metabolizmasını düzeltici etkileri olduğu bildirilmiştir.<sup>4,7,8</sup>

Bir folik asit antagonisti olan metotreksat (MTX); lösemi ve diğer malignitelerde sitotoksik bir ajan olarak, ve düşük dozlarda da psoriasis ve romatoid artrit gibi inflamasyon hastalıklarında yaygın olarak kullanılmaktadır.<sup>9,10</sup> MTX gibi antikanser ilaçlarının, hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi kanser hücreleri için selektif değildir. Bu nedenle yüksek proliferasyon oranına sahip olan kemik iliği, barsak mukozası ve saç folikülleri gibi sağlam dokular için de toksik olan bir ajandır. Antikanser ajanlar gonadları da etkiler. Ancak gonadlar hayati tehlike içeren semptomlar vermediğinden, diğer organlara göre daha az çalışılmıştır.<sup>11,12</sup>

Yapılan çalışmalar MTX'in, antioksidan enzim sisteminin etkinliğini azaltarak, hücreleri reaktif oksijen partiküllerine (ROP)'ne karşı hassas duruma getirip hasara neden olduğunu göstermektedir.<sup>13,14</sup> Oksidatif stres testis dokusunda ve germ hücrelerinde hasara yol açmaktadır.<sup>15</sup> Bundan dolayı antioksidanlar oksidatif strese karşı testis dokusunu korumaya yardım edebilir.

Bu çalışmanın amacı; MTX'in neden olduğu testiküler hasarda oksidatif stresin rolü ve bu hasara karşı ChA'in olası koruyucu etkilerini göstermektir.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Araştırma Merkezinden 24 adet (210-310gr ağırlığında) Wistar Albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar (21 ± 2 °C) sıcaklıkta ve %50-60

nem kontrollü odalarda 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortamda bırakıldı. Deneysel Ulusal Sağlık Enstitüsünün Hayvan Araştırma standartlarına uygun olarak gerçekleştirilmiş ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurul'dan onay almıştır (protokol numarası 2008/15). Hayvanlar rastgele her bir grupta altı hayvan olacak şekilde dört gruba ayrıldı.

**Grup 1 (Kontrol):** Sıçanlara MTX yerine eşdeğer hacimde serum fizyolojik intraperitoneal (i.p) enjeksiyon olarak verildi.

**Grup 2 (ChA):** Sıçanlara 24 gün boyunca günlük 100 mg/kg olacak şekilde i.p enjeksiyon olarak ChA verildi.

**Grup 3 (MTX):** Sıçanlara deneyin 21. gününde i.p enjeksiyon olarak tek doz 20mg/kg serum içinde çözülerek MTX uygulandı.

**Grup 4 (Klorojenik asit + MTX) (Kombine):** Sıçanlara ChA 24 gün boyunca verildi ve 21. günde MTX uygulandı.

Deneysel süresinin sonu olan 24. günde bütün sıçanlar servikal dislokasyonla öldürülerek testisleri alındı. Elde edilen doku örneklerinden bir kısmına, ışık mikroskopik incelemeler için parafin tekniği uygulandı. Diğer dokular; MDA, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz ölçümleri için -30 °C'de soğutucuya alındı.

Kesitlerden bir kısmı hematoksilin-eozin (H-E) ile boyandı. Diğer kesitler immunohistokimyasal boyama için polilizin kaplı lamalar üzerine alındı. Suya getirilip, sitrat buffer (pH 7/6) içine alındı ve mikrodalga fırında 20 dakika ısıtıldı. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra, kesitler fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Sonra kesitlere %0,3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı. Kesitler primer tavşan poliklonal kaspaz 3 antikor ile 30 dakika inkübe edildi (Lab Vision, USA). Sonra PBS ile yıkandı. Biotinlenmiş keçi anti-polivalent ve streptoavidin peroksidazla inkübe edildi. Boyanma 15 dakika kromojen+ substratta bekletilerek tamamlandı. Kesitler Leica DFC-280 ışık mikroskobu ile incelendi.

## HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Histolojik değişiklikler H-E ile boyanmış preparatlarda 100 tükül sayılarak belirlendi. Tüküller nor-

mal, dökülmüş, atrofiye ve seminifer tübül dejenerasyonunun derecesine bağlı olarak sınıflandırıldı. Kaspaz 3 boyanması istatistiksel olarak boyama yoğunluğuna göre; zayıf (+), orta (++) ve güçlü (+++) olarak sınıflandırıldı. Kaspaz 3 pozitif hücreler kahverengi renkte boyandı. Kaspaz 3 ile boyanan hücreler Leica Q Win Image Analiz sistemi (Leica Micros Imaging Solution Ltd, Cambridge, UK) kullanılarak sayıldı ve üç ayrı kategoriye göre sınıflandırıldı.

## BİYOKİMYASAL ANALİZLER

### Süperoksit Dizmutaz (SOD)

SOD enzimi Sun ve ark.nın modifiye ettiği metotla tayin edildi.<sup>16</sup> Bu metodun prensibi nitroblue tetrazolium (NBT)'ün süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantinoksidaz sistemi tarafından indirgenmesinin 560 nm'de takip edilmesi esasına dayanmaktadır. Bir ünite (U) SOD aktivitesi, NBT'nin indirgenmesini %50 inhibe eden SOD miktarını ifade etmektedir. Spesifik SOD aktivitesi ise ünite/miligram (U/mg) doku proteini olarak ifade edildi.

### Katalaz (CAT)

CAT aktivitesi, hidrojen peroksid'in ( $H_2O_2$ ) 37 °C'de yıkılması sonucu meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de takip edilmesi ile belirlendi.<sup>17</sup> Bir ünite(U) katalaz aktivitesi, 37 °C'de bir dakikada yıkılan  $H_2O_2$ 'in 1 mmol'ünü ifade etmektedir. Spesifik CAT aktivitesi ise ünite/miligram (U/mg) doku proteini olarak ifade edildi.

### Glutatyon Peroksidaz (GP-x )

GP-x aktivitesi Lawrance ve Burk metoduna göre çalışıldı.<sup>18</sup> GP-x aktivitesi, enzimin hidrojen peroksit'i substrat olarak kullandığı esnada bir eş reaksiyon olarak gerçekleşen glutatyon redüktazın NADPH'i NADP<sup>+</sup>'ye yükseltgenmesi sırasındaki meydana gelen absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplandı ve spesifik aktivite ünite/miligram (U/mg) doku proteini şeklinde verildi.

### Malondialdehit (MDA)

Dokulardaki MDA düzeyi Buege ve Aust yöntemine göre belirlendi.<sup>19</sup> Yöntemin esası tiyobarbutirik asit ile MDA'in 90-95°C'de reaksiyona girmesi sonucu

oluşan pembe renkli bileşiğin 532 nm'de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır. MDA sonuçları miligram proteindeki nmol MDA miktarı (nmol/mg) olarak ifade edildi.

## İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel değerlendirmelerde, Windows uyumlu SPSS 13.0 paket programı kullanıldı. Sonuçlar; ortanca IQR (Çeyreklikler Arası Genişlik) olarak ifade edildi. Ölçülebilir veriler (MDA, SOD, CAT ve GP-x) Shapiro Wilk Normallik Testi ile test edildi. Normal dağılım göstermediği saptandı. Bu nedenle gruplararası karşılaştırmalarda parametrik olmayan testlerden Kruskal-Wallis Varyans Analizi ve ikili karşılaştırmalarda Tukey testi kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### HİSTOLOJİK BULGULAR

Kontrol ve klorogenik asit gruplarında herhangi bir lezyon görülmedi (Resimle gösterilmedi). MTX grubunda, incelenen tübüllerden 43.5-24.2'sinin germinatif epitelinin lümenine döküldüğü, 27.5-30.2'sinin atrofik ve 1.0-2.0'inin ise dejeneratif olduğu tespit edildi (Resim 1).

Kombine grupta ise etkilenen tübül sayısı istatistiksel olarak MTX grubuna göre düşüktü ( $p < 0.05$ ) (Resim 2).

Kaspaz 3 immün boyanma yoğunluğu ve dağılımı, kontrollere göre, MTX grubunda (Resim 3) anlamlı bir artış gösterirken, kombine grupta, MTX grubuna göre azalmıştı ( $p < 0.05$ ) (Resim 4).

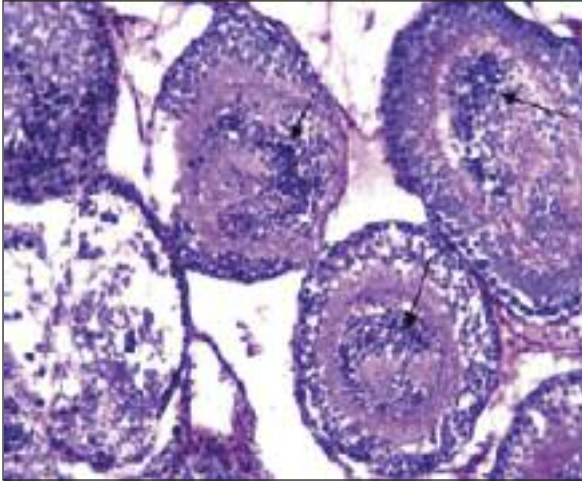
Grupların hiçbirinde Sertoli hücreleri kaspaz 3 ile boyanmadı. Histopatolojik analiz ve kaspaz 3 ile boyanma sonuçları Tablo 1 ve 2'de gösterildi.

### BİYOKİMYASAL BULGULAR

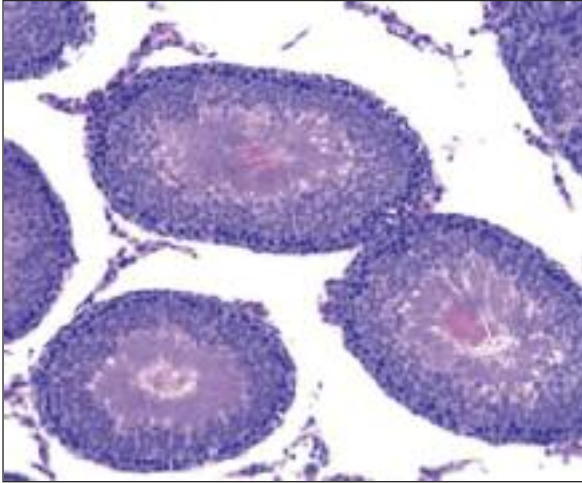
Biyokimyasal sonuçlar Tablo 3'te gösterilmiştir.

Biyokimyasal analizlerde MTX grubunda MDA seviyesi yükselirken, CAT, SOD ve GP-x değerleri kontrollere göre azaldı ( $p < 0.05$ ). Kombine grupta biyokimyasal parametreler MTX grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede farklıydı. MTX grubuna göre MDA düşerken, SOD, CAT ve GP-x enzim değerleri kontrollere benzerdi.





**RESİM 1:** MTX grubunda, atrofik ve germ hücreleri azalmış tübüller. Bazı tübüllerde lümen içerisine dökülmüş germ hücreleri izlenmekte (oklar) (HE, x66).



**RESİM 2:** Kombine grupta, seminifer tübüllerin görünümü (HE, x66).

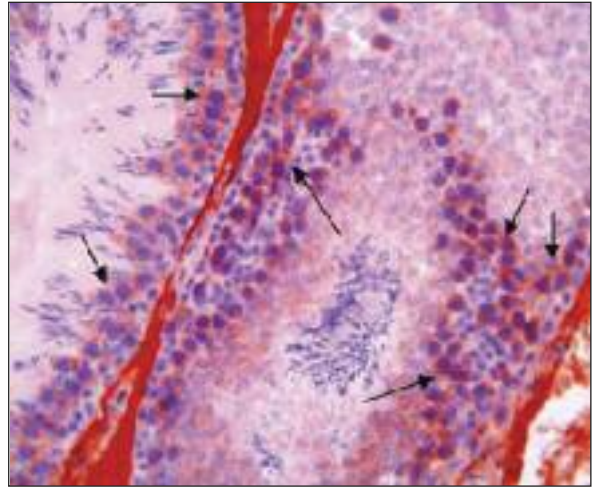
## TARTIŞMA

Kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik ilaçlar, hücre siklusunu etkileyip, DNA prekürsörlerinin sentezini inhibe etmektedir.<sup>10</sup> İlaçların hücreler üzerindeki sitotoksitesisi kanser hücreleri için selektif değildir.<sup>11</sup> Testiküler doku gibi yüksek mitotik aktiviteye sahip organlar da bu ilaçların hedefi haline gelmektedir.<sup>20</sup>

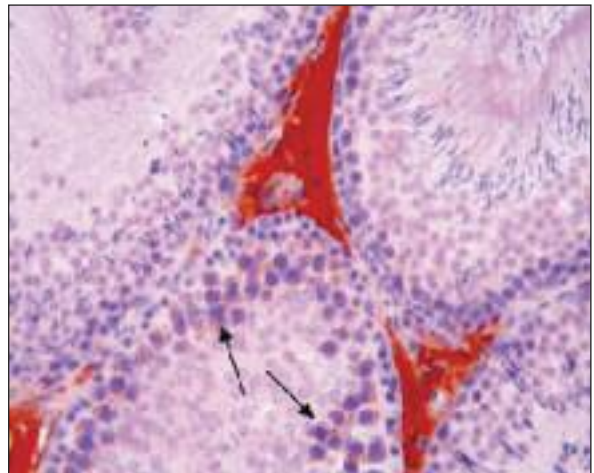
Erkek fertilitesi spermatogonyumların devamlı kendini yenilmesine ve spermatojenik hücrelere farklılaşmasına bağlı olduğundan, antikanser ilaçları testiküler dokuyu yapısal ve fonksiyonel ola-

rak etkilemektedir. Nitekim sisplatin ve adriamisin gibi kanser tedavisinde kullanılan ilaçların germ hücre kalınlığı ve seminifer tübül lümen çapında azalmaya, germ hücrelerinde dejenerasyon ve dökülmeye neden olduğu rapor edilmiştir.<sup>11,20</sup>

Bizde çalışmamızda, literatür bilgileriyle uyumlu olarak, MTX in seminifer tübüllerde atrofiye, germinal hücrelerin dökülmesine ve apoptoza yol açtığını gözlemledik. Sayım (2007); germinal epitel hücrelerin ayrılması ve lümeneye dökülmesinin, hücreler arasındaki bağlantıların bozulmasının bir göstergesi olduğunu bildirmiştir.<sup>21</sup>



**RESİM 3:** MTX grubunda yaygın ve belirgin kaspaz 3 boyanması. Oklar perinükleer bölgede ve sitoplazmadaki kaspaz 3 immunoreaktivitesini gösteriyor (x132).



**RESİM 4:** Kombine grupta, MTX grubuna göre daha seyrek olarak izlenen kaspaz 3 pozitif hücreler (oklar). Etrafındaki diğer tübüllerde kaspaz 3 reaktivitesi izlenmiyor (x132).

**TABLO 1:** Histopatolojik olarak testis seminifer tübüllerinin gruplar arası karşılaştırılması.

Parametreler	Kontrol	ChA	MTX	Kombine
	Ortanca-IQR	Ortanca-IQR	Ortanca-IQR	Ortanca-IQR
Normal	97.5-2.5	95.5-5.2	29.5 <sup>a</sup> -6.7	76.5 <sup>c</sup> -11.7
Dökülen	0.5-2.2	3.5-4.2	43.5 <sup>b</sup> -24.2	12.5 <sup>d</sup> -6.2
Atrofik	2.0-1.2	0.5-1.0	27.5-30.2	9.5 <sup>d</sup> -2.5
Dejenere			1.0-2.0	0.0-0.5

<sup>a</sup>Kontrol grubuna göre önemli derecede azalmış (p< 0.05).

<sup>b</sup>Kontrol grubuna göre önemli derecede artmış (p< 0.05).

<sup>c</sup>MTX grubuna göre önemli derecede artmış (p< 0.05).

<sup>d</sup>MTX grubuna göre önemli derecede azalmış (p< 0.05).

**TABLO 2:** Kaspaz 3 ile boyanan hücre sayısı (100 tübül) nın gruplar arası karşılaştırılması.

Kaspaz-3 boyanma yoğunluğu	Kontrol	ChA	MTX	Kombine
	Ortanca-IQR	Ortanca-IQR	Ortanca-IQR	Ortanca-IQR
Zayıf (+)	15.5-9.5	12.0-11.5	77.0 <sup>a</sup> -24.5	35.0 <sup>b</sup> -12.0
Orta (++)			82.0-26.7	26.5 <sup>b</sup> -10.7
Güçlü (+++)			127.5-48.7	17.5 <sup>b</sup> -5.7

<sup>a</sup>Kontrol grubuna göre önemli derecede artmış, p< 0.05.

<sup>b</sup>MTX grubuna göre önemli derecede azalmış, p< 0.05.

**TABLO 3:** MTX'in neden olduğu lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim parametrelerindeki değişiklikler üzerine ChA'in etkilerinin karşılaştırılması.

Parametreler	Kontrol	ChA	MTX	Kombine
	Ortanca-IQR	Ortanca-IQR	Ortanca-IQR	Ortanca-IQR
MDA (nmol/mg protein)	0.1-0.06	0.2-0.08	0.4 <sup>a</sup> -0.07	0.3 <sup>c</sup> -0.08
SOD (U/mg protein)	1.5-6.5	1.8-2.2	9.2 <sup>b</sup> -1.4	15.7 <sup>d,e</sup> -6.6
CAT (U/mg protein)	6.0-2.0	7.5 -2.1	3.4 <sup>b</sup> -0.5	6.2 <sup>d,e</sup> -2.7
GP-x (µmol/mg protein)	9.0-0.4	12.0-2.6	5.8 <sup>b</sup> -2.2	10.3 <sup>d,e</sup> -2.1

<sup>a</sup>Kontrol grubuna göre önemli derecede artmış, p< 0.05.

<sup>b</sup>Kontrol grubuna göre önemli derecede azalmış, p< 0.05.

<sup>c</sup>MTX grubuna göre önemli derecede azalmış, p< 0.05.

<sup>d</sup>MTX grubuna göre önemli derecede artmış, p< 0.05.

<sup>e</sup>Kontrol grubuna göre fark önemsiz, p> 0.05.

Toksik ajanlar, sertoli hücrelerinde intermediyer filaman, mikrotübül ve hücre adhezyon protein sentezini etkilemektedir. MTX'de bu şekilde hücrelerarası bağlantı komplekslerine zarar verip hücrelerin lümenine dökülmesine neden olmuş olabilir.

Çalışmamızda, testiküler dokudaki apoptotik hücreler kaspaz 3 aktivitesi kullanılarak belirlendi. Kaspazların apoptozis sürecinde proteolitik yıkılma kaskadını başlattığı ve böylece apoptotik olayların gelişiminde kritik bir rol oynadıkları bilinmektedir. Kaspaz ailesinin 14 üyesinden biri

olan kaspaz 3, apoptozisin erken basamaklarında aktive olan anahtar bir proteazdır.<sup>22</sup> Shinado ve ark., ile Amin ve ark. antikanser ilaçlarının testiküler germ hücrelerinde apoptozise neden olduğunu göstermiştir.<sup>23,24</sup> Bizde çalışmamızda MTX'in testiküler dokuda kaspaz 3 boyanma aktivitesini arttırdığını gözlemledik. Prahalthan ve ark. gibi birçok araştırmacı antikanser ilaçlarının neden olduğu sperm sayısındaki azalmanın spermatogenik hücrelerin apoptozisi sonucu ölümüne bağlı olduğunu rapor etmiştir.<sup>25</sup> Oksidatif stresin germ hücre-

lerinde apoptozisi arttırdığı bilindiğinden,<sup>26</sup> MTX bu yolla da apoptozise neden olmuş olabilir.

Biyokimyasal analizlerde; MTX testiküler dokuda MDA seviyesini yükseltirken, SOD, CAT ve GP-x aktivitesini düşürdü. MDA seviyesinde yükselme, oksijen radikalleri tarafından oluşturulan hücre membran hasarının önemli bir göstergesidir. Şener ve ark. 2006'da; ileum, karaciğer ve böbrek dokusunda MTX'le MDA seviyesinin yükseldiğini rapor etmiştir.<sup>10</sup> SOD, CAT ve GP-x'in oluşturduğu antioksidan enzim aktivitesindeki azalma, oksidatif stresin artması anlamına gelmektedir. Nitekim MTX, hücrelerde NADPH'ı azaltarak glutatyonun tükenmesine neden olmakta ve böylece hücrenin ROP'ne karşı zayıflatıp, oksidatif stresi artırmaktadır.<sup>10</sup>

Son yıllarda ROP'lerinin neden olduğu oksidatif hasara karşı doğal antioksidan maddelerin koruyucu etkileri ile ilgili çalışmalar önem kazanmaktadır.<sup>27,28</sup> ChA, kayısı, şeftali, kiraz, elma, üzüm gibi meyve ve kahve, yeşil çay gibi içeceklerde bulunan fenolik bir bileşiktir.<sup>29</sup> Kafeik asit ve quinic asidin esterleşmesi sonucu oluşan klorojenik asidin<sup>5,30</sup> invitro ve invivo ortamlarda antioksidan ve antikanserijenik etkileri gösterilmiştir.<sup>31</sup>

Bu çalışmada ChA'in, MTX toksitesine karşı seminifer tübülleri önemli derecede koruduğu gözlemlendi. Kono ve ark. ChA'in bu koruyucu etkisini; süperoksit, nitrik asit, organik serbest radikaller, alkoksil ve peroksil radikallerini etkili bir şekilde süpürmesine bağlamıştır.<sup>29</sup> ChA yalnız serbest radikallerin süpürülmesinde değil, aynı zamanda ağır metal iyonlarıyla şelasyon yapma özelliği ile de mükemmel antioksidatif etki gösterir.<sup>2,29,32</sup> Hidrojen peroksit; demir ve bakır gibi metallerin varlığında, lipid peroksidasyonunu tetikleyen hidroksil radikallerine dönüşür. ChA serbest radikal oluşumunda önemli rol oynayan demir, bakır, mangan, molibden gibi geçiş metalleri ile şelasyon yapıp serbest radikal oluşumunu engelleyerek, membran yapılarını lipid peroksidasyonundan korumuş olabilir.

Chlopckova ve ark. ChA'in fenolik asit grubundaki diğer fenollere göre anti-lipoperoksidatif etkisinin daha güçlü olduğunu göstermiştir.<sup>32</sup> Çünkü bu fenoller, lipid radikallerine hızlıca H<sup>+</sup> vererek, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırır. Üstelik reaksiyon sonucunda oluşan fenoksi radikali, yeni bir serbest radikal oluşturmaz. Bu yönüyle de ChA'in içinde bulunduğu fenolik antioksidanlar mükemmel H<sup>+</sup> ve e<sup>-</sup> vericileridir.<sup>33</sup>

Çalışmamızda MTX uygulamasından önce ChA verilmesi seminifer tübüllerdeki apoptozisi belirgin olarak azalttı. Huang ve ark., methylglyoxal ile muamele ettikleri Neuro-2A hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonu üzerine ChA'ın etkisini çalışmışlardır.<sup>34</sup> Methylglyoxal ile belirgin olarak yükselen kaspaz 3 aktivitesinde, ChA ilavesi ile önemli derecede azalma gözlenmiştir. ChA, kaspaz 3 protein ekspresyonunu da belirgin şekilde inhibe etmiştir.<sup>34</sup> Kim ve ark. ChA'in, serbest radikallerin neden olduğu hücre ölümüne karşı, azalan intrasellüler glutatyon seviyesini tamir ederek koruyucu etki gösterdiğini bildirmiştir.<sup>35</sup> Miccadei ve ark. da ChA in GSH kaybını önlediğini rapor etmiştir.<sup>36</sup> Çalışmamızda da ChA; SOD, CAT ve GP-X enzim aktivitelerinin kontroller seviyesinde korunmasını sağladı.

Bu çalışma MTX'in neden olduğu testiküler hasarda, oksidatif stres ve apoptotik hücre ölümünün önemli rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca ChA sıçanlarda, oksidatif testiküler hasar ve apoptotik hücre ölümüne karşı güçlü bir koruyucudur. Sonuç olarak; kanser tedavisinde kullanılan ilaçlarla birlikte, germ hücrelerini oksidatif strese ve apoptozise karşı koruyabilecek ChA gibi antioksidanların kullanımı, kemoterapiye bağlı infertiliteyi önleyebilir. Ancak yine de ChA'in etki mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara gerek bulunmaktadır.

### **Teşekkür**

*İstatistiksel değerlendirmelerdeki katkılarından dolayı Doç. Dr. Saim Yoloğlu'na teşekkür ederiz.*



## KAYNAKLAR

- Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG, Schmitz HH. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 2005;81(1 Suppl):298S-303S.
- Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, Terao J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* 2000;48(11):5496-500.
- Cho ES, Jang YJ, Hwang MK, Kang NJ, Lee KW, Lee HJ. Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals. *Mutat Res* 2009;661(1-2):18-24.
- Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J Nutr* 2008;138(12):2309-15.
- Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S, Mori H. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem Toxicol* 2000;38(5):467-71.
- Suzuki A, Yamamoto N, Jokura H, Yamamoto M, Fujii A, Tokimitsu I, et al. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2006;24(6):1065-73.
- Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Révész C, Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr* 2003;133(6):1853-9.
- Tao KS, Wang W, Wang L, Cao DY, Li YQ, Wu SX, et al. The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. *Med Hypotheses* 2008;71(5):730-6.
- Jahovic N, Sener G, Cevik H, Ersoy Y, Arbak S, Yeğen BC. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem Funct* 2004;22(3):169-78.
- Sener G, Ekşioğlu-Demiralp E, Cetiner M, Erkan F, Yeğen BC. Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol* 2006;542(1-3):170-8.
- Kim JC, Kim KH, Chung MK. Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reprod Toxicol* 1999;13(5):391-7.
- Saxena AK, Dhungel S, Bhattacharya S, Jha CB, Srivastava AK. Effect of chronic low dose of methotrexate on cellular proliferation during spermatogenesis in rats. *Arch Androl* 2004;50(1):33-5.
- Gao F, Tomitori H, Igarashi K, Horie T. Correlation between methotrexate-induced intestinal damage and decrease in polyamine content. *Life Sci* 2002;72(6):669-76.
- Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct* 1998;16(4):283-93.
- Ateşşahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Ceribaşı AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* 2006;21(1):42-7.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34(3):497-500.
- Luck H. Catalase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Acad.Press; 1963. p. 885-8.
- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71(4):952-8.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-10.
- Ateşşahin A, Sahna E, Türk G, Ceribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A, et al. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res* 2006;41(1):21-7.
- Sayim F. Histopathological effects of dimethoate on testes of rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 2007;78(6):479-84.
- Yang GS, Wang W, Wang YM, Chen ZD, Wang S, Fang JJ. Effect of cocaine on germ cell apoptosis in rats at different ages. *Asian J Androl* 2006;8(5):569-75.
- Shinoda K, Mitsumori K, Yasuhara K, Uneyama C, Onodera H, Hirose M, et al. Doxorubicin induces male germ cell apoptosis in rats. *Arch Toxicol* 1999;73(4-5):274-81.
- Amin A, Hamza AA, Kambal A, Daoud S. Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian J Androl* 2008;10(2):291-7.
- Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P. Protective effect of lipoic acid on adriamycin-induced testicular toxicity. *Clin Chim Acta* 2005;360(1-2):160-6.
- Eid NA, Shibata MA, Ito Y, Kusakabe K, Hammad H, Otsuki Y. Involvement of Fas system and active caspases in apoptotic signalling in testicular germ cells of ethanol-treated rats. *Int J Androl* 2002;25(3):159-67.
- Vardi N, Parlakpınar H, Ozturk F, Ates B, Gul M, Cetin A, et al. Potent protective effect of apricot and beta-carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 2008;46(9):3015-22.
- Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Otlu A. Antiapoptotic and antioxidant effects of beta-carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril* 2009;92(6):2028-33.
- Kono Y, Kobayashi K, Tagawa S, Adachi K, Ueda A, Sawa Y, et al. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim Biophys Acta* 1997;1335(3):335-42.
- Granado-Serrano AB, Martín MA, Izquierdo-Pulido M, Goya L, Bravo L, Ramos S. Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *J Agric Food Chem* 2007;55(5):2020-7.
- dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, de Souza GE. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull* 2006;29(11):2236-40.
- Chlopciková S, Psotová J, Míketová P, Soušek J, Lichnovský V, Šimánek V. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part II. caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. *Phytother Res* 2004;18(5):408-13.
- Çimen MBY. [Flavonoids and their antioxidant properties]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 1999;19(5):296-304.
- Huang SM, Chuang HC, Wu CH, Yen GC. Cytoprotective effects of phenolic acids on methylglyoxal-induced apoptosis in Neuro-2A cells. *Mol Nutr Food Res* 2008;52(8):940-9.
- Kim SS, Park RY, Jeon HJ, Kwon YS, Chun W. Neuroprotective effects of 3,5-dicaffeoylquinic acid on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Phytother Res* 2005;19(3):243-5.
- Miccadei S, Di Venere D, Cardinali A, Romano F, Durazzo A, Foddai MS, et al. Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. *Nutr Cancer* 2008;60(2):276-83.