T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

FURANIN TM4 SERTOLİ HÜCRELERİNDE OLUŞTURDUĞU TOKSİSİTEYE VİTAMİN C ve ÇİNKONUN ETKİSİ

Ziya DUMANOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Yasemin AYDIN

Haziran, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 17.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Yasemin AYDIN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Figen Esin KAYHANI
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Doç. Dr. Banu ORTA YILMAZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin ..... numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, ... numaralı ..... projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

ÖNSÖZ

Bu çalışma, furanın TM4 Sertoli hücrelerinde oluşturduğu toksisiteye vitamin c ve çinkonun etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle tez çalışmam boyunca bana yol gösterici ve sonsuz manevi desteği ve anlayışıyla her aşamasında değerli fikirleri, bilgileri ve deneyimleri ile bana destek olup ve her zaman yanımda olan çok sevdiğim değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Yasemin AYDIN'a ve Lisansüstü öğrenimim süresince üzerimde emeği geçen, çalışmamın her aşamasında değerli fikirleri, bilgileri ve deneyimleri ile bana destek olan çok değerli hocam Doç. Dr. Banu ORTA YILMAZ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın her aşamasında beni yalnız bırakmayan ve her türlü destekleriyle yanımda olan arkadaşlarım Biyolog Ertan ÇALMAZ, Biyolog Yasemin Ülkü DİKBASAN ve Biyolog Buse YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Bu tezi gerçekleştirebilmem için üç yıl boyunca bana destek veren, beni yalnız bırakmayan ve hayattaki en değerli varlığım ve her türlü fedakârlık ve anlayışı gösteren sevgili eşim NUR'a ve tüm aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2022 Ziya DUMANOĞLUİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **ix**
KISALTMA LİSTESİ ..... **x**
ÖZET ..... **xi**
SUMMARY ..... **xiii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **4**
2.1. SERTOLİ HÜCRESİ 4
2.2. FURAN 6
2.2.1. Furanın Genel Özellikleri 6
2.2.2. Gıdalardaki Furan İçeriği 7
2.2.3. Furanın Toksisitesi 8
2.3. VİTAMİN C 10
2.4. ÇİNKO 12
2.4.1. Çinkonun Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisi 13
2.5. OKSİDATİF HASAR 14
2.6. APOPTOZ 17
3. MALZEME VE YÖNTEM **20**
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ 20
3.2. SERTOLİ HÜCRELERİNİN PASAJLANMASI 21
3.3. FURAN, VİTAMİN C VE ÇİNKO'NUN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI 21
3.4. HÜCRE CANLILIK TESTİ (MTT) 22
3.5. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER 23
3.5.1. Membran Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi 23
3.5.2. Total Protein Ölçümü 24
3.5.3. Süperoksit dismütaz (SOD) enzim aktivitesi belirlenmesi 24
3.5.4. Katalaz (KAT) enzim aktivitesi belirlenmesi 24

3.5.5. Glutatyon Peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi belirlenmesi.....25
3.6. İKİLİ FLORESAN BOYAMA (PROPİDİUM İYODÜR/HOECHST) YÖNTEMİ İLE APOPTOZUN BELİRLENMESİ.....26
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....26
4. BULGULAR.....27
4.1. HÜCRE CANLILIĞI BULGULARI.....27
4.2. OKSİDATİF HASAR BULGULARI.....28
4.2.1. Total protein miktarı.....28
4.2.2. Lipid peroksidasyonu.....29
4.2.3. Katalaz enzim aktivitesi.....30
4.2.4. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi.....31
4.2.5. Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi.....32
4.3. APOPTOZ BULGULARI.....33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....38
KAYNAKLAR.....43
ÖZGEÇMİŞ.....48

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.2.1: Furanın kimyasal yapısı. 6

Şekil 2.3.1: Vitamin C'nin kimyasal yapısı (Mouhannad ve diğ., 2010). 10

Şekil 2.4.1: Çinkonun insan vücudunda dağılımı (To ve diğ., 2020). 12

Şekil 2.5.1: Oksidatif streste oksidan-antioksidan denge mekanizması. 15

Şekil 2.6.1: Apoptozun gerçekleşmesi için ektrinsik ve intrinsik yollar (Celepli ve diğ., 2020). 18

Şekil 3.1.1: Sertoli Hücrelerinin morfolojik görünümü. 20

Şekil 4.1.1: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücrelerinde % canlılık üzerine etkileri (*p<0,05; **p<0,01; *:kontrollere göre; #: furana göre). 27

Şekil 4.2.1: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücreleri üzerinde total protein miktarına etkileri (*p<0,05; *:kontrollere göre; #: furana göre). 28

Şekil 4.2.2: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücreleri üzerinde lipid peroksidasyonuna etkileri (*p<0,05; **p<0,05; ***p<0,05; *:kontrollere göre; #: furana göre; •: Fu+Zn grubuna göre). 29

Şekil 4.2.3: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücreleri üzerinde katalaz enzim aktivitesine etkileri (*p<0,05; **p<0,05; ***p<0,05; *:kontrollere göre; #: furana göre; •: Fu+Zn grubuna göre). 30

Şekil 4.2.4: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücreleri üzerinde süperoksit dismutaz enzim aktivitesine etkileri (*p<0,05; **p<0,05; ***p<0,05; *:kontrollere göre; #: furana göre; •: Fu+Zn grubuna göre). 31

Şekil 4.2.5: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücreleri üzerinde glutatyon peroksidaz enzim aktivitesine etkileri (*p<0,05; ***p<0,05; *:kontrollere göre; #: furana göre; •: Fu+Zn grubuna göre). 32

Şekil 4.3.1: Furanın Sertoli hücrelerinde 24 saat sonunda kontrol ve furan gruplarında canlı, apoptotik ve ölü hücre üzerindeki etkileri. (←: Canlı hücre,◀: Apoptotik hücre,▽: Ölü hücre) 34

Şekil 4.3.2: Furanın Sertoli hücrelerinde 24 saat sonunda çinko ve furan+çinko gruplarında canlı, apoptotik ve ölü hücre üzerindeki etkileri. (←: Canlı hücre,◀: Apoptotik hücre,▽: Ölü hücre) 35

Şekil 4.3.3: Furanın Sertoli hücrelerinde 24 saat sonunda vitamin C ve furan+Vitamin C gruplarında canlı, apoptotik ve ölü hücre üzerindeki etkileri. (←: Canlı hücre,◀: Apoptotik hücre,▽: Ölü hücre).....36

Şekil 4.3.4: Furanın Sertoli hücrelerinde 24 saat sonunda vitamin C+çinko ve furan+Vitamin C+çinko gruplarında canlı, apoptotik ve ölü hücre üzerindeki etkileri. (←: Canlı hücre,◀: Apoptotik hücre,▽: Ölü hücre) 37

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.2.1: Furanın bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri.....6

Tablo 3.3.1: Sertoli hücrelerine uygulanan furan, çinko ve vitamin C deney grupları 22

Tablo 4.3.1: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücrelerinde 24 saat sonunda canlı, apoptoz ve ölü hücre üzerine etkileri (*: kontrollere göre, #:furana göre, •: furan+çinko grubuna göre; *p<0,05, #p<0,05, •p<0,05).....33

KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
ABP	: Androjen bağlayıcı protein
ATCC	: Amerikan tip kültür koleksiyonu
BCA	: Bikinkoninik asit
BSA	: Sığır serum albumini
EFSA	: Avrupa gıda güvenliği otoritesi
FSH	: Folikül stimulan hormon
Fu	: Furan
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GSH	: Glutatyon
KAT	: Katalaz
LH	: Luteinizan hormon
MDA	: Malondialdehit
PSA	: Penisilin-streptomisin-amfoterin
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptörü
VitC	: Vitamin C
Zn	: Çinko

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FURANIN TM4 SERTOLİ HÜCRELERİNDE OLUŞTURDUĞU TOKSİSİTEYE VİTAMİN C ve ÇİNKONUN ETKİSİ

Ziya DUMANOĞLU

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Yasemin AYDIN

Furan ya da furfuran, gıda ürünlerinin ısıl işlem görmesi ve saklama teknikleri sırasında oluşan, renksiz, uçucu heterosiklik aromatik organik bir bileşiktir. Furan ayrıca endüstriyel olarak, reçineler, cilalar, pestisitler ve ilaçlar gibi bazı bileşiklerin üretilmesi sürecinde ara kimyasal olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, furanın (C_4H_4O) pişmiş veya kızartılmış tahıl ürünleri, kahve, bebek maması, meyve suları, kavanoz ve konserve yiyeceklerde, sebzeler ve et ürünleri, bisküviler, kızartılmış buğday unu ve ekmek kabuğunda önemli seviyelerde bulunduğunu ortaya koymuştur. Vücuda alınımı kaçılmaz olan furanın insan sağlını olumsuz etkilediği ve toksisiteye yol açtığı tespit edilmiştir. Furanın, deride, karaciğerde, böbrekte, bağışıklık sistemi, sinir sistemi ve yağ dokusun üzerinde potansiyel zararlı etkileri vardır. Endokrin sistemi bozan etkilerinin yanı sıra üreme sistemini de etkileyerek kısırlığa sebep olmaktadır. Buna rağmen furanın erkek üreme sistemi üzerindeki toksikolojik etkileri hakkında yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Yapılan *in vivo* çalışmalarda furana maruz kalan bireylerde testis ve seminal vesikül ağırlığının, LH ve testosteron seviyelerinin azaldığı ve testisteki hücrelerde dejenerasyon meydana geldiği

belirlenmiştir. Ayrıca testiküler ve epididimal sperm sayısının azalmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, furan ile yapılmış Sertoli hücrelerindeki hasarı belirleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, spermlerin beslenmesi ve spermatogenez sırasında desteklenmesi için çok önemli görevleri olan Sertoli hücrelerinin furandan nasıl etkilendiğini araştırılması elzem olmuştur.

Serbest radikaller, yiyecek bileşenleri veya organizmanın hücrelerinin bileşenleri ile hızlı oksidasyon reaksiyonlarına girerek hücreye ve organizmaya zarar verirler. Vitamin C, serbest radikallerin etkisinin en aza indirilmesinde katkıda bulunarak, hücreyi oksidatif hasardan korumaktadır. Çinko, insan vücudunda en yaygın bulunan ikinci eser elementtir ve vücutta depolanamadığı için diyetle düzenli olarak tüketilmesi gerekmektedir. Çinko vücutta ağır metallerin oluşturduğu toksik hasarı azaltmada görev yaptığı gibi, testosteron gibi steroid hormonların düzenleyicisi olarak görev yapar. Erken spermatogenez sırasında testiste toplanır ve germ hücrelerinin mayozunda önemli bir rol oynar. Yapılan birçok çalışma, diyette alınan çinkonun erkek üreme sisteminde sperm hareketliliğini arttırdığı, protein metabolizmasını ve nükleik asit sentezini arttırdığı göstermiştir.

Yapılan bu çalışmada, furan 3 mM konsantrasyonunda ve furana ilave olarak 50 µM vitamin C ve 50 µM çinko 24 saat süreyle TM4 Sertoli hücrelerine uygulanmıştır. Uygulamalar sonrasında Sertoli hücrelerinde hücre canlılığına, lipid peroksidasyon miktarına, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzim aktivitelerine ve apoptotik hücre oranlarına bakılmıştır. Bulgular furanın hücre canlılığını ve antioksidan enzim aktivitelerini azalttığını gösterirken, lipid peroksidasyonunu ve apopototik hücre oranlarını arttırdığını ortaya koymuştur. Furana ilave olarak vitamin C ve çinko uygulamaları furanın oluşturduğu bu hasarı vitamin C ve çinkonun birlikte uygulandığı koşullarda en aza indirdiği tespit edilmiştir. Bu bulgular furanın erkek üreme sisteminde önemli bir rol üstlenen TM4 Sertoli hücresi üzerinde oluşturduğu toksisite ve bu toksisiteye karşı antioksidan olan vitamin C ve çinkonun koruyucu rolü ortaya çıkarılmıştır.

Haziran 2022, 62. sayfa.

Anahtar kelimeler: Furan, vitamin C, çinko, Sertoli hücresi, apoptoz, oksidatif hasar

SUMMARY

M.Sc. THESIS

EFFECT of VITAMIN C and ZINC on FURAN INDUCED TOXICITY in TM4 SERTOLI CELLS

Ziya DUMANOĞLU

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Yasemin AYDIN

Furan or furfuran is a colorless, volatile heterocyclic aromatic organic compound formed during heat treatment and storage techniques of food products. Furan is also used industrially as an intermediate in the production of certain compounds such as resins, varnishes, pesticides, and drugs. Recent studies have revealed that furan (C_4H_4O) is found at significant levels in cooked or fried cereal products, coffee, baby food, fruit juices, jars and canned foods, vegetables and meat products, biscuits, toasted wheat flour and bread crust. It has been determined that furan, which is inevitably taken into the body, negatively affects human health and causes toxicity. Furan has potential harmful effects on the skin, liver, kidney, immune system, nervous system and adipose tissue. In addition to its effects that disrupt the endocrine system, it also affects the reproductive system and causes infertility. However, there are not enough studies on the toxicological effects of furan on the male reproductive system. In *in vivo* studies, it was determined that testicular and seminal vesicle weight, LH and testosterone levels decreased and degeneration occurred in testicular cells in individuals exposed to furan. It also causes a decrease in testicular and epididymal sperm count. However, there are no studies to determine the damage to Sertoli cells made with furan. For this reason, it is essential to investigate how Sertoli cells, which have a very important role in feeding the sperms and supporting them during spermatogenesis, are affected by furan.

Free radicals damage the cell and the organism by entering into rapid oxidation reactions with food components or components of the cells of the organism. Vitamin C contributes to minimizing the effect of free radicals and protects the cell from oxidative damage. Zinc is the second most common trace element in the human body, and since it cannot be stored in the body, it must be consumed regularly in the diet. Zinc acts as a regulator of steroid hormones such as testosterone, as well as reducing the toxic damage caused by heavy metals in the body. It collects in the testis during early spermatogenesis and plays an important role in meiosis of germ cells. Many studies have shown that dietary zinc increases sperm motility in the male reproductive system, increases protein metabolism and nucleic acid synthesis.

In this study, furan at a concentration of 3 mM and in addition to furan, 50 µM vitamin C and 50 µM zinc were applied to TM4 Sertoli cells for 24 hours. After the applications, cell viability, lipid peroxidation amount, antioxidant enzyme activities such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and apoptotic cell ratios were examined in Sertoli cells. Findings revealed that furan decreased cell viability and antioxidant enzyme activities, while increasing lipid peroxidation and apoptotic cell rates. In addition to furan, it has been determined that vitamin C and zinc applications minimize this damage caused by furan in conditions where vitamin C and zinc are applied together. These findings revealed the toxicity of furan on the TM4 Sertoli cell, which plays an important role in the male reproductive system, and the protective role of antioxidant vitamin C and zinc against this toxicity.

June 2022, 62. pages.

Keywords: Furan, vitamin C, zinc, Sertoli cell, apoptosis, oxidative damage

1. GİRİŞ

Furan, gıda ürünlerinin ısıl işlem görmesini de içeren işleme ve saklama teknikleri sırasında oluşan sıvı halde bulunan, renksiz ve uçucu bir bileşiktir. Aynı zamanda furanın kimyasal sanayide kullanımı da yaygındır. Kahve, bebek maması, meyve suları, kavanoz ve konserve yiyecekler gibi ısıl işlem görmüş gıda ürünlerinde yüksek miktarlarda bulunan furanın, vücuda alınımı kaçınılmazdır (Seok ve Lee, 2019). Yapılan çalışmalara göre furanın insan sağlığını olumsuz etkilediği ve toksisiteye yol açtığı tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından "olası insan kanserojeni (Grup 2B)" olarak sınıflandırılmıştır (Seok ve diğ., 2015). Bu nedenle furanın vücuttaki etkilerinin çalışılması son derece önemlidir. Furanın, yaygın kullanımı ve çeşitli uluslararası kuruluşların furan maruziyeti için limit belirleme çalışmalarına rağmen literatürde furan toksisitesi hakkında oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Furan hızlı bir şekilde ve yoğun olarak akciğer ve ince bağırsaktan emilerek, biyolojik membrandan geçip çeşitli organlara girebilir (Alizadeh ve diğ., 2018). Furan adipoz dokusunda, böbrek ve karaciğer dokusunda zararlı etkilere sebep olabilir. İnsan yağ dokusunda biriken dibenzofuranlardaki kritik değer aşılırsa su hücrelere girer, reaktif oksijen radikallerinin artmasına sebep olur. Bu radikaller de hücrelerde oksidatif stres meydana getirerek DNA ve proteinlerin yapılarında mutasyonlara, apoptoza, hücresel yapının bozulmasına ve hücresel membranlarda lipid peroksidasyonuna sebep olur (Seok ve diğ., 2015; Rehman ve diğ., 2020; Alizadeh ve diğ., 2018). Bu etkilere bir de erkek üreme sistemi yönünden bakılırsa; testislerde oksijen miktarının az olmasından dolayı oksidatif stres testis dokusunda fazladır. Çünkü testis fazla miktarda doymamış yağ asidi ve reaktif oksijen türleri oluşturma potansiyelindedir. Buna bağlı olarak da artan oksidatif stres spermatogenez ve steroidogenez için oldukça zararlı etkiler yaratabilir (Asadi ve diğ., 2017). Ayrıca yapılan çalışmalarda furanın, testiste epididimiste ve prostat bezinde bozukluklara neden olduğu, sperm sayısı ve morfolojisi üzerinde zararlı etkilere rastlandığı ve testiste apoptotik hücrelerin önemli derecede arttığı görülmüştür (Rehman ve diğ., 2019). Bu sonuçlar furan maruziyetinin erkek üreme sisteminin toksisitesini indüklediğini göstermektedir.

Suda çözünen zincir kırıcı bir antioksidan olan C vitaminin de bitkilerde ve hayvanlarda önemli bir mikro besin maddesi olduğu bilinmektedir (Kökoğlu ve Alturfan, 2010). Antioksidan etkisini enzimlerin aktivitesini artırarak gösterir. C vitamini serbest radikal oluşumunu azaltmaktadır ve antioksidan bileşikler oluşturan proteinlerin tiyollerini korumaktadır aynı zamanda hem plazmada hem de hücre içinde güçlü bir antioksidandır (Halliwell ve Whiteman, 1998). Yapılan araştırmalarda C vitaminin lipid peroksidasyonu inhibe ettiği, endoteliyal disfonksiyonu azalttığı ve lipoproteinlerde ve membranlarda E vitaminini yeniden oluşturduğu keşfedilmiştir (Evans, 2000). Bu sonuçlar C vitamininin erkek üreme sistemi, DNA metilasyonu, merkezi sinir sistemi üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Rizk ve diğ., 2020; Huff ve diğ., 2021).

Oksidatif stres, hücre ve dokuların oksidatif hasarına neden olan metabolik bir işlev bozukluğudur ve birçok kronik hastalığa sebep olmaktadır. Özellikle çinko (Zn), antioksidan özellikleri nedeniyle 300'den fazla enzim ve 2000 transkripsiyon faktörünün kofaktör görevini gördüğü için insan sağlığı için gerekli minerallerden biri olup vücutta depolanamayan eser elementtir (Bhowmik ve diğ., 2010). Yapılan araştırmalar anti-inflamatuar ajan olan çinkonun, hücre zarlarına yapısal stabilite sağladığı ve aynı zamanda gen ekspresyonunun düzenleyicisi olduğundan dolayı hücresel sinyalleşmenin önemli bir parçası olduğunu tespit etmiştir. Aynı zamanda bu element redoks aktif metali olarak belirli bağlanma bölgelerinde değiştirilebilir ve hücresel bölgeye özgü oksidatif hasarı hafifletebilmektedir (Yamaguchi ve diğ., 2009). Yapılan çalışmalarda çinkonun antioksidan etkisi sayesinde erkeklerde sperm kalitesini ve döllenme potansiyelini arttırdığı keşfedilmiştir. Bununla birlikte çinko hormon dengeleyici olarak da erkek üreme sisteminde testosteron gibi hormonlara yardımcı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan birçok çalışmada çinko eksikliğinin spermatogenezi engellediği, sperm anormalliklerine sebep olduğu ve serum testosteron konsantrasyonu üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır (Prasad, 2008; Colgar ve diğ., 2009; Boran ve Özkan, 2004).

Yapılan bu tez çalışmasında, TM4 Sertoli hücrelerinde furanın oluşturduğu toksisiteye vitamin C ve çinkonun etkisi araştırılmıştır. Tezin “Genel Kısımlar” başlığı altında TM4 Sertoli hücreleri, furan, vitamin C, çinko, oksidatif hasar ve apoptoz konuları detaylı olarak sunulmuştur.

Tez çalışmasının “Malzeme ve Yöntem” başlığı altında tez kapsamında yapılması planlanan yöntemler detaylandırılmıştır. Yapılan bu yöntemler sonucunda ulaşılan sonuçlar tezin “Bulgular” başlığı altında anlatılmıştır.

Tez çalışmasının “Tartışma ve Sonuç” başlığı altında ise, çalışma sonucunda ulaşılan veriler değerlendirilmiş olup, elde edilen sonuçlar güncel literatür ile karşılaştırılarak çalışma verilerinin özgünlüğü ve literatüre katkısı ortaya çıkarılmıştır.

Bu tez çalışmasında, furanın Sertoli hücrelerinde oluşturabileceği muhtemel toksisiteye karşı güçlü antioksidan özellikleri olduğu bilinen vitamin C ve çinkonun ayrı ayrı ve birlikte bu toksisitede üstleneceği olası koruyucu roller, hücre canlılığı, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzimler ve apoptozun ölçülerek açığa çıkarılması hedefiyle yapılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SERTOLİ HÜCRESİ

Adını keşfedicisi İtalyan Doktor Enrico Sertoli'den alan Sertoli hücreleri, erkek bireylerin gonadları olan testislerin seminifer tübüllerinde bulunmaktadır (Repord ve Griswold, 2018). Sertoli hücresi dışında seminifer tübüllerde spermatogenik hücreler bulunmaktadır. Sertoli hücreleri, spermatogenik hücrelerle bağlantı kurarak onların beslenmesi ve korunmasında görev yapmaktadır. Bu görevlerini gerçekleştirebilmek için Sertoli hücreleri, ökromatik olan bir nukleus, çok sayıda belirgin nukleouluslar, fazla sayıda ve iyi gelişmiş düz yüzlü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi, çok sayıda lizozomlar ve mitokondriler bulundurmasının yanı sıra, aktin filamentler, mikrotübüller ve özellikle vimentin ara filamentlerinden oluşan dayanıklı bir hücre iskeletine sahiptir (Janqueira ve Carneiro, 2006).

Sertoli hücreleri, sahip oldukları özelleşmiş bağlantı kompleksleri sayesinde hem birbirleriyle hem de diğer spermatogenik hücrelerle iletişim halindedir (Wiebe ve diğ., 2000; Meng ve diğ., 2005). Sertoli hücreleri okludens bağlantılar ile birbirlerine sıkıca tutunarak seminifer epitelin adlüminal ve bazal kompartımana ayrılmasını sağlar. Sertoli-Sertoli arasındaki bu sıkı bağlantılar, spermatogenik hücrelerin kandan gelen zararlı ürünlere karşı korunmasında görevli olan kan-testis bariyerini oluşturur (Eroschenco, 2001). Gelişmekte olan spermlerin immün sistem ile doğrudan ilişki kurmasını engelleyen kan-testis bariyeri, bu spermlerde bulunan zar antijenlerinin kana ve bağışıklık sistemine geçmesini engeller. Böylece erkek bireyin kendi spermine karşı oto-immün cevap oluşturmasının önüne geçerek bu nedenle oluşabilecek olan kısırlığı önler (Eroschenco, 2001; Itoh ve diğ., 2005).

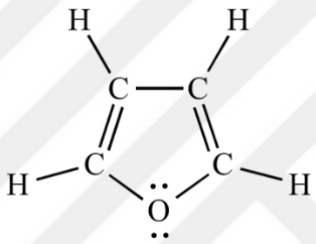
Sertoli hücreleri, testiste spermatogenezin uygun şekilde sürdürülmesinde ve düzenlenmesinde oldukça önemli olan bir hücredir. Gelişmekte olan spermatogenik hücrelere destek, koruma ve besin sağlayan Sertoli hücreleri, spermatogenez sonunda oluşan atık ürünler ve apoptoza giden hücrelerin fagosite edilmesinden sorumludur. Bunun yanı sıra olgunlaşan spermlerin lümene daha kolay atılmasını sağlamak için gereken protein ve iyonca zengin testiküler sıvıyı salgılar. Sertoli hücrelerinin bir diğer fonksiyonu ise folikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron salınımını uyaran androjen bağlayıcı proteini (ABP) sentezlemektir. ABP, testosteron ve dihidrotestosteron androjenlerine yüksek afinite gösteren ve spermatogonyumların çoğalma sürecini başlatan salgısal bir proteindir. Sertoli hücreleri, Anti-Müllerian hormonu üreterek

erkek fetüsün Müller kanal gelişimini durdurur. Ayrıca aktivin ve inhibin peptidlerini salarak, hipofiz bezinden FSH'nın sentez ve salınımını düzenler. İnhibin FSH salınımını inhibe edici bir özellik gösterirken, aktivin ise FSH salınımı arttırmaktadır. Sertoli hücrelerinin fonksiyonu insülin, progesteron, vitamin E, vitamin A, epidermal büyüme faktörü gibi etkenlere göre değişim gösterebilir. Bunların dışında testosteron, östradiol ve dihidrotestosteron gibi steroidler de Sertoli fonksiyonunu etkilemektedir (Hansson ve diğ., 1974; Dalgaard ve diğ., 2002; Meng ve diğ., 2005; Janqueira ve Carneiro, 2006; Young ve diğ., 2006).

2.2. FURAN

2.2.1. Furanın Genel Özellikleri

Furan, gıda ürünlerinin 150°C ile 200°C arasındaki ışıl işlemi uygulamaları sırasında oluşan lipofilik bir kirleticidir (Mogol ve Gökmen, 2016). Bu ısıl işlemler konserve, pişirme, kavurma, fırınlama ve sterilizasyonu içermektedir. Furanın kokusu bulunmadığı için furan ve birçok furan türevi gıdalarda bulunabilir (Seok ve Lee, 2019). Furan, moleküler ağırlığı 68 g/mol olan ve 31°C kaynama noktasına sahip olması nedeniyle yüksek uçuculuk özelliği gösteren, lipofilik, renksiz ve sıvı organik bir bileşiktir (Şekil 2.2.1) (Seok ve diğ., 2015). Furanın bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri tablo 2.2.1.1'de verilmiştir.



Şekil 2.2.1: Furanın kimyasal yapısı.

Tablo 2.2.1: Furanın bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri.

Atomik Ağırlık	68,07
Molekül Formülü	C_4H_4O
Yoğunluk	936 g/L
Renk	Renksiz
Fiziksel Durumu	Sıvı
Erime Noktası	-85,6°C
Kaynama Noktası	31,36 ºC, 760 mmHg'da 32 ºC, 758 mmHg'da
Molar hacmi	68,07 g/mol
Çözünürlük	Alkol ve eterde serbestçe çözünür; suda çözünürlük: 25ºC'de %1'dir.
Buhar basıncı	20ºC'de 658 mmHg 20ºC'de 600 mmHg

Yapılan araştırmalar, furan oluşumunda birçok yol olduğunu göstermektedir. Bu yolların en başında şekerlerin (glikoz, fruktoz, laktoz gibi), askorbik asit veya doymamış yağ asitlerinin furana dönüşümünü kapsar. Karbonhidratların termal bozulması ve yeniden düzenlenmesi, gıda işleme ve pişirme sırasında enzimatik olmayan (Maillard) esmerleşme reaksiyonlarında görülür (Maga ve diğ., 1979). Bunun dışında, çoklu doymamış yağ asitleri, karotenoidler ve amino asitler de furan oluşumunda öncü olarak görülmektedir (Becalski ve Seaman, 2005; Yaylayan, 2006). Özellikle askorbik asitin yüksek sıcaklıklarda işlem görmesi sırasında furan üretimi açısından yüksek potansiyele sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA), 2004; Seok ve diğ., 2015; Mariotti ve diğ., 2013).

2.2.2. Gıdalardaki Furan İçeriği

Bilim adamları, furanı bir dizi ısıl işlem görmüş gıda ürününde ilk kez tanımladığından beri, ısıl işleme tabi tutulan bir çok gıda kategorilerinden çok sayıda numune dünya çapında analiz edilmiştir. Bu analizlerden elde edilen sonuçlar, gıdadaki furan içeriğinin belirlenmesinde önemli raporları oluşturmuştur. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından rapor edilen çeşitli gıda kategorilerinde furan içeren besinler şu şekilde verilmiştir. Kavrulmuş kahve, hazır kahve, bebek maması, hazır çorbalar, tahıl ürünleri, süt ürünleri, meyve suları, konserve sebzeler, pişmiş ve konserve etler, bira ve buğday ekmekleri de dahil olmak üzere birçok gıdada furan mevcut olduğu bildirilmiştir (EFSA, 2009; Dünya Sağlık Örgütü, 2009; US FDA 2004). Ayrıca kavanoz ve konserve gıdalarla yapılan analizler sonucu, ısıl işlem uygulanan fabrikasyon gıda ürünlerinin depolanması ve ambalajlanması sırasında da furan oluşumunun meydana geldiği görülmüştür (Reinhard ve diğ., 2004). Hava alması ve buhar çıkışı engellenen konserve ve kavanozlu gıda ürünlerinde nispeten daha fazla miktarda furan mevcut olduğu bilinmektedir (US FDA, 2004).

İnsanların furan maruziyeti, gıda tüketim verilerine ve çeşitli gıda maddelerindeki furan içeriğine dayalı olarak tahmin edilmiştir. Avrupa'da, yetişkinlerin gıdalarda furana tahmini ortalama maruziyeti, farklı üye ülkelerde 0.34 ile 1.23 µg/kg vücut ağırlığı/gün arasında değişmekte olup, ortalama değer olarak 0.78 µg/kg vücut ağırlığı/gün bulunmuştur (EFSA, 2009). 3-12 aylık bebekler için bu değer 0,27 ile 1,01 µg/kg vücut ağırlığı/gün arasında değişmektedir. Yapılan bir araştırmada, bebek besinlerindeki ortalama furan oranı 0,23-1,77 µg/kg vücut ağırlığı/gün olarak bulunmuştur (Minorczyk ve diğ., 2011). Günlük diyette sıkça tüketilen gıdalara ek olarak birçok farklı alanda da furan maruziyetinden bahsetmek

mümkündür. Gıda ürünlerinde bulunmasının yanı sıra kimyasal imalat sanayisinde sentetik ara madde olarak furan kullanılmaktadır. Ayrıca böcek ilaçlarının, stabilizatörlerin, farmasötik ve plastik ürünlerin üretiminde de kullanılır (Elmore ve diğ., 1991; NTP, 2001). Ayrıca yulaf kabuğu ve mısır koçanı gibi pentoz içeren tarımsal yan ürünlerin duman, yüzey suyu, asit hidrolizatları, endüstriyel atık suları ve buhar damıtıklarında furana rastlanmıştır. Bunun dışında, furanın tütün dumanının ana bileşenlerinden biri olduğu da bilinmektedir (Smith ve diğ., 2000; Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, 2004).

2.2.3. Furanın Toksisitesi

Gıdaların ışıl işlem uygulamaları sonrasında çeşitli maddelerin oluştuğu bilgisine sahip olunduktan sonra, açığa çıkan bu moleküller üzerinde yapılan çalışmalar hızlanmıştır. Isıl işlem sonucu gıdalarda doğal yollardan oluşan furan üzerine yapılan ilk çalışmalar sonucunda furanın kemirgenler için karsinojenik olduğu bulunmuştur (NPT, 1993). Bu çalışmalardan sonra, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (1995) furanın "insanlar için olası karsinojenik" (Grup 2B) olduğunu tespit etmiştir (Zuckerman, 1995). Sıçanlarda ve farelerde furan kaynaklı toksisitenin ana hedef organı doza bağımlı olarak karaciğerdir (NPT, 1993). Maruziyet sonrası vücuda giren furan hızlı ve yoğun bir şekilde ince bağırsaktan ve akciğerden emilmektedir (Egle ve Gochberg, 1979; Burka ve diğ., 1991). Düşük polariteye sahip olması sebebiyle biyolojik membranlardan kolayca geçerek organ ve dokulara rahatlıkla ulaşabilir. Furan bir kere vücuda girdiğinde çeşitli mekanizmalarla detoksifikasyona uğrar. Bu süreçlerden biri sitokrom P-450 enzimleriyle (özellikle CYP2E1) furan halkası açılarak karbondioksit ve cis-2-büten-1,4-dialdehid olarak bilinen sitotoksik bir metabolite hızlıca metabolize edilir (Burka ve diğ., 1991; Byrns ve diğ., 2002). Bu furan metaboliti, hücre çoğalmasını ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun ayrışmasını indüklemesinin yanı sıra hedef hücrelerde DNA ile reaksiyona girerek, furan kaynaklı tümörlerde önemli bir rol oynamaktadır (NTP, 1993; Kellert ve diğ., 2008). Bunların dışında, hücrelerde ksenobiyotik reseptörü olarak bilinen arilhidrokarbon reseptörü ile etkileşime giren furan, hem metabolik hem de hücresel etkilere sebep olmaktadır.

Furanın özellikle yağ dokusunda birikimi, reaktif oksijen türlerinin üretiminde bir artış meydana gelir. Hücrelerde fazla miktarda ROS oluşumu, protein ve DNA'da mutasyonlara, membranlarda lipid peroksidasyonuna, apoptoza ve hücresel yapılarda hasara neden olur (Peterson ve diğ., 2016). Daha önce yapılan çalışmalar, furana maruziyetinin hepatotoksisite, karsinojenisite, akciğer, böbrek ve ovaryum hasarı gibi geniş bir toksisite aralığında

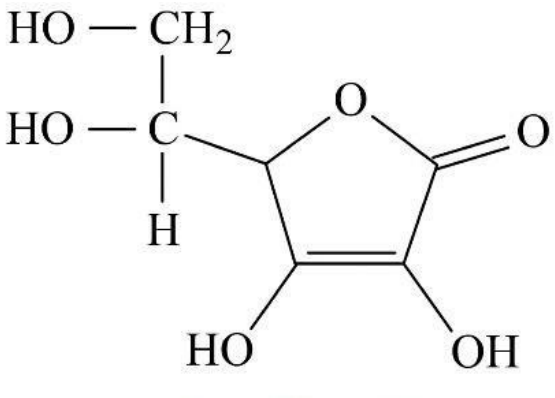
sonuçlandığını göstermiştir. Furanla karsinojen olduğu tespit edildikten sonra, lenfoma hücrelerinde mutasyon oluşturduğu, kromozom aberasyonlarına sebep olduğu bildirilmiştir. Furan ya da furanın mikrosomal metaboliti cis-2-butene-1,4-dial'ın hedef hücrelerde DNA'yla reaksiyona girerek furan kaynaklı tümör oluşumunda önemli bir rol oynaması olasıdır. Bununla birlikte furan, hepatik mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun ayrışmasına yol açan ATP kaybına neden olur ve böylelikle hücre ölümünde rol oynayan sitotoksik enzimlerin aktivasyonunu sağlar. Önceki çalışmalardaki bulgulara dayanarak furan genotoksik bir bileşik olarak kabul edilir (Kellert ve diğ.,2008).

Bunların yanı sıra, elde edilen sonuçlar furan maruziyetinin erkek üreme sistemi toksisitesini indüklediğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda furanın, folikül stimüle edici hormon, lüteinizan hormon ve testosteron gibi erkek üreme sisteminde görevli olan hormon seviyelerinin de azaldığı gözlemlenmiştir (Kara ve diğ., 2016). Furan erkek üreme sisteminde, prostat bezi, epididimis ve testiste yapısal bozukluklara yol açtığı; testis dokusunda apoptozu indükleyerek hücre sayılarının azalmasına neden olduğu ve testosteron seviyelerinde düşüşe sebep olduğu ortaya konmuştur (Karacaoğlu ve diğ., 2010; Rehman ve diğ., 2019; El-Hakim ve diğ., 2018). Furanın erkek üreme sisteminde hücresel düzeyde Leydig hücrelerinin apoptoza götürdüğü; Sertoli hücrelerinde vakuolleşmeyi arttırdığı; spermlerin karaktetistik özelliklerinin bozulduğu ve sperm üretiminin azaldığı bulunmuştur (Karacaoğlu ve diğ., 2010; Owumi ve diğ., 2020).

2.3. VİTAMİN C

Vitaminler, besinlerin içerisinde yer almaları nedeniyle doğal yollarla vücudumuza alınan, pek çok fizyolojik süreçte rol oynayan organik moleküllerdir. B, E ve C vitamini gibi doğal vitaminlerin yanı sıra, vitamin benzeri biyomoleküller olarak sınıflanan karnitin, koenzim Q10, lipoik asit gibi moleküller, karotenoidler ve flavonoidler gibi polifenoller günümüzde meyve ve sebzelerin faydalı bileşenleri olarak kabul edilmektedir (Kökoğlu ve Alturfan, 2010). Vitaminlerin vücutta eksiklikleri ciddi belirtilere neden olurken küçük miktarları bile bu etkilerin tersine çevrilmesinde etkilidir. Besinler içerisinde bulunan vitaminlerin yaşamsal önemi büyüktür ve bütün vitaminler besinler aracılığıyla sağlanabilmesine rağmen tüm vitaminler tek bir besinle sağlanamamaktadır. Bazı vitaminler insanlarda ince bağırsakta sentezlenirken, vitamin C gibi bazı vitaminlerin ekzojen alımı zorunludur. Hayati önem taşıyan bu moleküllerin eksiklikleri durumunda yerine konulması doğal yollarla besinlerle olabileceği gibi sentetik üretilen tabletlerle de sağlanabilir (Rietjens ve diğ., 2002).

İnsanlar için hayati öneme sahip vitaminlerden biri olan vitamin C ilk kez 1919 yılında keşfedilmiş, 1933 yılına kadar devam eden çalışmalar sonucunda lahana özsuyundan kristalik preparatı elde edilmiştir. İlerleyen yıllarda iskorbüt hastalığını önleyen asit olmasından dolayı askorbik asit adını almıştır (Szent-Györgi, 1928; Zilva, 1932). Vitamin C'nin kimyasal yapısı şekil 2.3.1'de verilmiştir.



Şekil 2.3.1: Vitamin C'nin kimyasal yapısı (Mouhannad ve diğ., 2010).

Suda çözünen zincir kırıcı bir antioksidan olan C vitaminin de bitkilerde ve hayvanlarda önemli bir mikro besin maddesi olduğu bilinmektedir. Antioksidan olarak görev gören C vitamini,

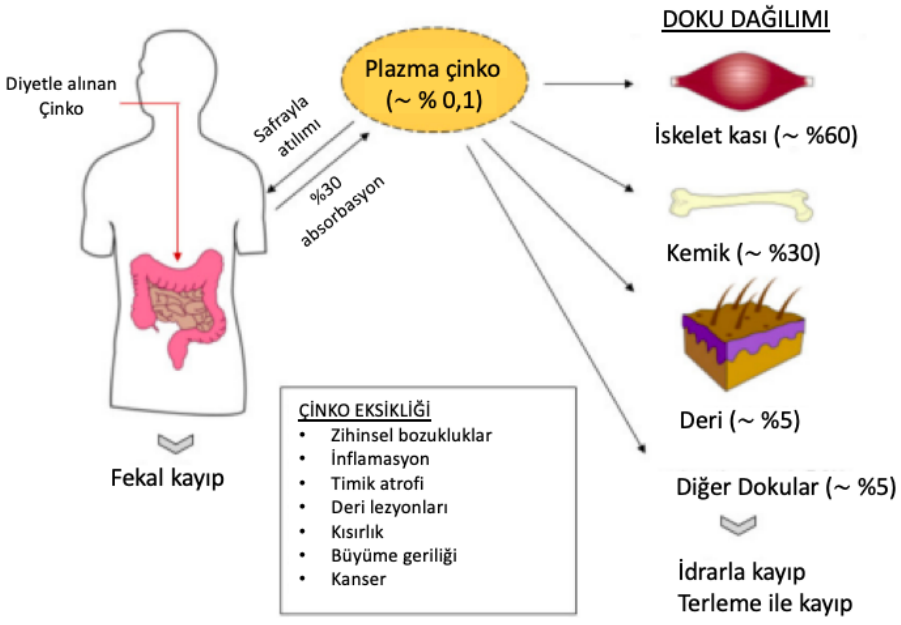
enzimlerin aktivitesini artırarak çeşitli enzimatik reaksiyonlar için kritik bir kofaktördür. Vitamin C serbest radikal oluşumunu azaltmaktadır ve antioksidan bileşikler oluşturan proteinlerin tiyollerini korumaktadır aynı zamanda hem plazmada hem de hücre içinde güçlü bir antioksidandır (Halliwell ve Whiteman, 1998).

Vitamin C'nin olumlu faydalarının alınan C vitamini miktarı ile arttığı düşünülmektedir. C vitamini, hastalık direncini artıran ve oksidatif stres direncini iyileştiren güçlü bir antioksidan takviyesidir. Meyve ve sebzelerden alınan vitamin C'nin en iyi kaynakları, turunçgillere ait meyveler, domates, yeşil ceviz, kuşburnu, lahana, yeşil biber ve tüm yeşil yapraklı sebzelerdir. Meyve ve sebzelerin aksine hayvansal gıda ürünleri vitamin C yönünden yetersizdir (McDowell, 1989). Antioksidan role sahip vitamin C'nin, gözlemsel epidemiyolojik araştırmalara göre uygun miktarlarda tüketildiğinde kalp hastalıklarını ve kanseri önlediği düşünülmektedir. Aynı zamanda, insan miyeloid lösemi hücre dizilerinde hücre ölümü, nüklear parçalanma ve DNA bölünmesini indüklediği gösterilmiştir, bunların tümü, yüksek konsantrasyonlarda vitamin C'nin birçok tümör hücre dizisinde apoptozu indükleme yeteneği ile tutarlıdır (Sakagami ve diğ., 2000).

Vitamin C, testiste bulunan ve testisleri oksidatif hasardan koruduğu bilinen bir antioksidandır. Testislerde vitamin C'nin etkin konsantrasyonlarda bulunması spermatogenezin de desteklenmesine katkı sağlamaktadır (Nayanatara ve diğ., 2008). Testislerde bulunması glutatyona bağlı bir dehidroaskorbat redüzktaz tarafından kontrol edilir ve bu enzim sayesinde vitamin C testislerde indirgenmiş durumda tutulur. Vitamin C'nin testislerde pek çok fonksiyonu bulunmaktadır. Sperm hareketliliğini arttırması, semen kalitesini iyileştirmesi ve infertilitenin önlenmesine katkı sağlaması vitamin C'nin erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerinin birkaçıdır (Rekha ve diğ., 2009).

2.4. ÇİNKO

Çinko, büyüme, proteinlerin ve nükleik asitlerin üretimi, yaraların iyileşmesi, üreme organlarının gelişimi ve prostat bezinin çalışması için gerekli olan bir eser elementtir (Bhowmik ve diğ., 2010). Periyodik tabloda iki toksik metal olan kadmiyum ve cıva ile birlikte IIB grubunda yer alan çinkonun, insanlar için nispeten toksik olmadığı kabul edilir. Çinko, insan vücudunda yaygın bulunan ve birçok biyolojik aktivite için anahtar roller almaktadır. İnsan vücudu 2-3 g çinko içerir ve yaklaşık %90'ı kas ve kemikte bulunur. Çinkonun geri kalan %10'luk kısmı karaciğer, böbrek, deri, akciğer, beyin, kalp, pankreas, prostat ve gastrointestinal sistemde bulunmaktadır (Şekil 2.4.1) (Plum ve diğ., 2010). Çinko, biyolojik sistemlerde, proteine bağlı ve iyonik formlarda bulunur ve proteinlerin işlevine ve yapısına aracılık etmede ve fizyolojik dengenin korunmasında önemli roller oynar (Yamaguchi ve diğ., 2009). Hücresel düzeyde çinkonun %30-40'ı çekirdekte, %50'si sitozolde ve geri kalan kısmı hücresel membranlarla ilişkili olarak bulunur (Vallee ve Falchuk, 1993).



Şekil 2.4.1: Çinkonun insan vücudunda dağılımı (To ve diğ., 2020).

2.4.1. Çinkonun Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisi

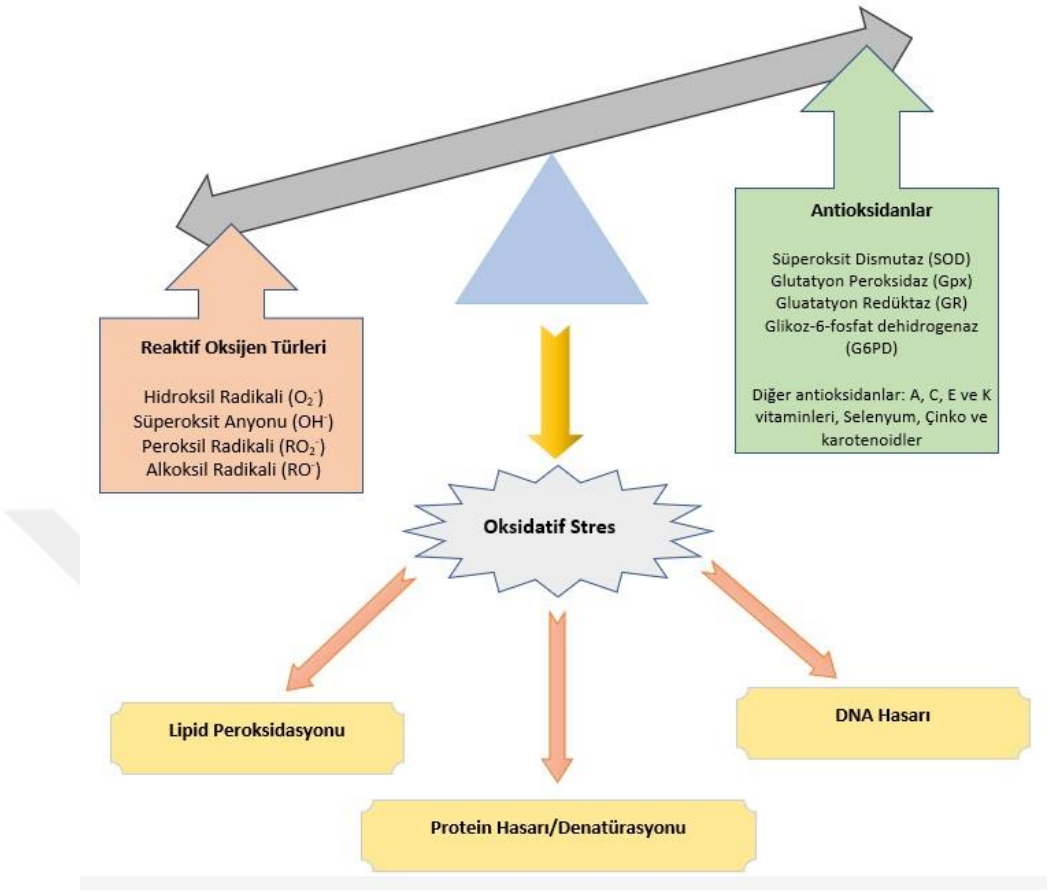
Omurgalılarda çinko, karaciğer ve böbrektekilerle kıyaslandığında testislerde yüksek seviyelerde biriktiği bulunmuştur (Bedwal ve Bahuguna, 1994). İnsanlarla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, Crohn hastalığı gibi çinko eksikliğine bağlı oluşan hastalıklarda anormal spermlerin oluştuğu ve spermatogenezin inhibe edildiğini rapor edilmiştir (Prasad, 2008). Bu sonuçlar çinkonun erkek üreme sistemi için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Çinko, erken spermatogenez sırasında testislerde birikerek germ hücrelerinde mayozu ve spermatogonyal üremeyi düzenleyerek, aynı zamanda testiste Sertoli hücrelerinin bütünlüğünü sağlar (Colgar ve diğ., 2009). Spermatogenez sürecindeki olumlu etkilerine karşın epididimiste sperm hareketliliğini azalttığı bulunmuştur (Henkel, 2005). Bunların yanı sıra, çinko uygulamalarının ağır metaller, florür ve ısı gibi streslerin neden olduğu testis hasarını hafifletebileceğine dair bazı raporlar vardır (Boran ve Özkan 2004).

2.5. OKSİDATİF HASAR

Dış yörüngelerinde en az bir eşlenmemiş elektron ihtiva eden moleküller serbest radikal olarak adlandırılmaktadır. Radikaller, yapılarında bulunan eşlenmemiş elektronlarından dolayı oldukça kararsız bir yapıya sahiptir (Diplock, 1998). Yörüngelerindeki eşlenmemiş elektron yanına diğer bir bileşiğin elektronunu çekme eğilimi gösterdiğinden, serbest radikaller son derece reaktif bileşikler olarak tanımlanırlar (Sahoo ve diğ., 2000). Serbest radikaller, araşidonik asit metabolizması, otooksidasyon reaksiyonları, mitokondrial elektron taşıma sistemi gibi normal metabolik süreçlerde bir yan ürün olarak oluşurken; sigara dumanı, hava kirliliği, metal iyonları, UV ışınları ve çeşitli kimyasalların maruziyeti radikal oluşumunun eksojen etkenlerinin başında gelmektedir (Reilly ve diğ., 1991; Karabulut, 2016).

Atomik yapısındaki iki eşlenmemiş elektron sebebiyle oldukça kararsız bir özellik gösteren oksijen atomu, diğer serbest radikallerle çok hızlı bir şekilde reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerini oluşturur (Karabulut, 2016). Yüksek reaktif özelliklerinden dolayı DNA, protein, lipit ve nükleotit koenzimleri gibi hücresel bileşenlerle hızlıca reaksiyona girerek bileşiklerin yapılarının bozulmasına sebep olur (Diplock, 1998). Bu nedenle de oksijen atomu, biyolojik sistemlerdeki en büyük radikal kaynağı olarak bilinir. Hücrede en fazla bulunan reaktif oksidan türevleri, süperoksit anyonu (O_2•−), hidroksil (•OH), nitrik oksit (NO•) ve peroksil radikali (ROO•) gibi oksijen radikalleri ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijen ($_1O_2$) gibi radikal olmayan oksijen türevleridir (Koç, 2007).

Hücrede biriken reaktif oksijen türlerinin yüksek konsantrasyonlara ulaşması ile antioksidan seviyesinin yetersiz kalması, hücredeki oksidatif dengenin bozulmasıyla sonuçlanır. Oksidanlar ve antioksidanlar arasında ortaya çıkan dengesizlik durumu oksidatif hasar ya da oksidatif stres olarak adlandırılır (Şekil 2.5.1). Oksidatif strese bağlı olarak oluşumu artan radikaller ve lipit peroksidasyonu hücresel hasara sebep olur (Tabakoğlu ve diğ., 2013). Reaktif oksijen türlerinden biri olan hidroksil radikalinin hücre memranında bulunan yağ asidinin yan zincirine bağlanması ile gerçekleşen lipit peroksidasyonu membran yapısına zarar verir. Buna ek olarak, lipit peroksidasyonu hücre membranının işlevsiz hale gelmesine ve akışkan özelliğinin bozulmasına geri dönüşümsüz olarak sebep olur (Naghii, 2002; Davies ve Goldberg, 1987). Serbest radikaller protein yapılarında fragmantasyona ve çapraz bağlanmalara neden olarak proteinin yanlış katlanmasına, böylece fonksiyonunu yerine getirememesine ya da enzimin aktive olamamasına yol açar (Akkuş,1995).



Şekil 2.5.1: Oksidatif streste oksidan-antioksidan denge mekanizması.

Organizma, çevresel ya da fizyolojik etmenler sebepli ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin yol açtığı yıkıcı etkileri yok etme yeteneğine sahip molekülleri içeren antioksidan savunma sistemine sahiptir. Antioksidan sistem eksojen ve endojen kaynaklı olmak üzere iki ana başlık altında toplanır (Özcan ve diğ., 2015). Eksojen kaynaklı antioksidanların, oksidatif stresin baskılanmasında ve reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda endojen kaynaklı antioksidan molekülleri desteklediği gösterilmiştir. Çinko ve selenyum gibi eser metaller, vitamin C, vitamin E, karotenoidler, flavonoidler, omega-3 yağ asitleri eksojen kaynaklı antioksidanlara örnek verilebilir (Gupta ve diğ., 2014). Endojen kaynaklı antioksidanlardan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz ve glutatyon redüktaz enzimleri enzimatik antioksidan sınıfındadır. SOD oldukça reaktif özellik gösteren süperoksit radikalinin moleküler oksijen ve H_2O_2'ye dönüşümünü katalizler (Zhang ve diğ., 2007). H_2O_2 ise KAT enzimi tarafından su ve moleküler oksijene dönüştürülür (MatÉs

ve diğ., 1999). GPx enzimi, redükte glutatyonun (GSH) oksidasyonunu katalizleyerek H_2O_2'in uzaklaştırılmasını sağlamakla birlikte hidroperoksit seviyesini de azaltır (Usta, 2013). Glutatyon redüktaz enzimi, NADPH'dan elde ettiği enerjiyi kullanarak okside glutatyonu antioksidan sistem elemanlarından biri olan GSH'ye tekrardan indirger (Kabel, 2014; Nicotera ve Orrenius, 1986). Hücre içi taşıyıcı ve bağlayıcı olarak görev alan glutayon S-transferaz, sisteinin sülfür atomu üzerinden çeşitli elektrofillere glutatyonu aktarırken detoksifikasyon işlevini de gerçekleştirir (Sherratt, 2002; Nicotera ve Orrenius, 1986). Glutatyon, melatonin, koenzim Q10, bilirubin ve ürik asit, endojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidanlara örnek verilebilir (Noori, 2012).

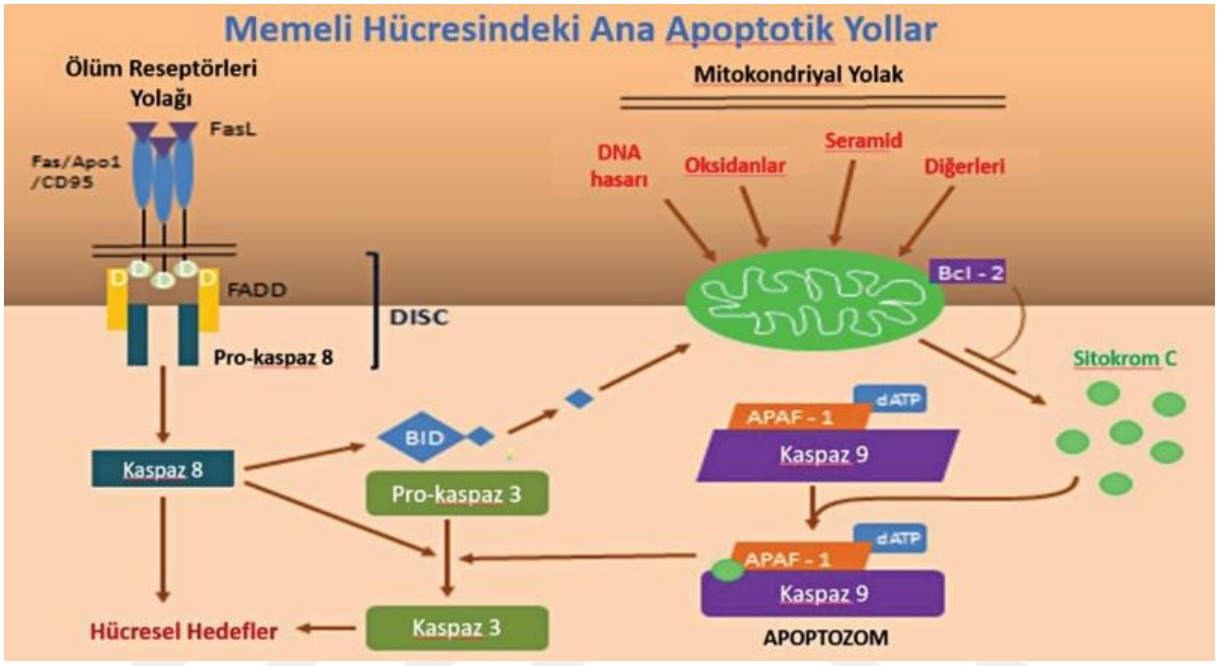
2.6. APOPTOZ

Apoptoz, zaman içinde yaşlanan, biyolojik sistemler içindeki görevi sonlanan, işlevlerini yerine getiremeyen veya çeşitli nedenlerden ötürü hasar gören hücrelerin çeşitli iç ve dış sinyaller aracılığıyla uyarılarak ortadan kaldırıldığı programlı hücre ölümüdür. Apoptoz ilk olarak Vogt tarafından 1842'de normal gelişim gösteren hücrelerin ölümü olarak tanımlanmıştır. 1972'de ise Kerr, Wyllie ve Currie gibi araştırmacılar apoptoz terimini ilk kez kullanmaya başlamış ve canlı dokulardaki hücrelerin azalmasında görevli bir hücre ölüm tipi olarak tanımlamışlardır (Kerr ve diğ., 1972). Hücrelerin hayatta kalıp kalmayacağını belirleyen apoptoz, embriyogenez ve gelişme süreçleri, yıkım ve onarım işlemleri, organ ve dokulardaki hücre sayısının belli bir sayıda kontrol altında tutulması ve hücre homeostazının sürdürülebilmesi için oldukça önemlidir (Cummings ve diğ., 1997; Cohen, 1993).

Hücre kaderinin belirlendiği apoptoz sürecinde çeşitli genetik kontroller altında gerçekleşen birkaç farklı mekanizma bulunmaktadır (Green ve diğ., 2015). Buna göre, ekstrinsik veya ölüm reseptör yolağı ile intrinsik veya mitokondriyal yolak apoptozun en temel iki mekanizmasını oluşturur (Şekil 2.6.1) (Bhosale ve diğ., 2020). Bunun dışında, T lenfositlerinde ve natural killer hücrelerinin granüllerinde bulunan granzim A denilen bir serin proteaz kaspaz bağımsız hücre ölümünü içeren başka bir yolak daha bulunmaktadır. Bu üç yolak göz önüne alındığında apoptoz mekanizmaları ilk aşamada kaspaz-3'ün etkinleşmesiyle başlayan kaspaz kaskadın aktif hale geçmesi yoluyla DNA parçalanması, hücre iskeletinin ve nükleus proteinlerinin yıkılması ve proteinlerin çapraz bağlanması gibi hücresel değişimlere sebep olmaktadır. Sonraki aşamada ise apoptotik cisim oluşumu meydana gelerek hücrenin fagositozu gerçekleşir (Martinvalet ve diğ., 2005; Elmore, 2007).

Farklı uyaranlar ile kontrol edilen apoptoz mekanizmasının ekstrinsik yolak üzerinden gerçekleştiği durumlarda Fas ve tümor nekroz faktör (TNF) reseptörlerinin uyarılması, TNF, insülin benzeri büyüme faktörü, koloni uyarıcı faktör ve nöron büyüme faktörü gibi bileşenlerin ortamda azalması birer uyarı görevi görür. Bunlara ek olarak glukokortikoidler, ilaçlar, çeşitli antijenler ve radyasyon gibi etkenler de ekstrinsik yolağın uyarılmasında etkili olmaktadır (Erdoğan, 2003; Akşit ve Bildik, 2008). Zar reseptörü görevindeki tümor nekroz faktör reseptörü (TNFR) ailesi ve bu reseptör ailesinde bulunan Fas ve TNFR1 reseptörleri ekstrinsik yolak aracılığıyla apoptozun başlamasında oldukça önemlidir (Lavrik ve diğ., 2005). Fas ve TNFR1 reseptörleri hücre dışındaki bağlanma bölgeleri sayesinde ilk uyarıyı alarak sitoplazmik

tarafta bulunan bağlanma bölgeleri aracılığıyla hücre sitoplazmasındaki adaptör proteinlere bağlanırlar. Adaptör proteinlerin ise prokaspaz-8 ile birleşerek ölüm başlatıcı sinyal kompleksini oluşturur (Lavrik ve diğ., 2005; Elmore, 2007).



Şekil 2.6.1: Apoptozun gerçekleşmesi için ektrinsik ve intrinsik yollar (Celepli ve diğ., 2020).

İntrinsik yolağın sinyal iletimi özellikle mitokondri üzerinden olmaktadır. Endojen ve ekzojen kaynaklar sebebiyle hücre içinde artış gösteren reaktif oksijen türleri, hücre içi kalsiyum artışı, TNF, DNA hasarı sonrası p53'ün aktive olması, sitokinler ve hormon eksikliği gibi uyarıcı durumlar intrinsik yolağın aktifleşmesinde görevlidir (Elmore, 2007; Akşit ve Bildik, 2008; Redza-Dutordoir ve diğ., 2016). Buna göre, gelen uyarı sonrası mitokondride başlayan iyon akışıyla birlikte mitokondri proteinlerinden biri olan sitokrom *c* ve apoptozu uyaran faktör sitozole geçer. Burada sitokrom *c*, apoptotik proteaz aktive edici faktör ile bağlanarak apoptozomu oluşturur (Orrenius ve diğ., 2015). Oluşan bu kompleks ATP varlığında pro-kaspaz-9'u keserek aktif kaspaz-9'a dönüştürür. Aktive olan kaspaz-9, efektör özellikte olan kaspaz-3'ün aktivasyonunu gerçekleştirerek hücreinin apoptoza girmesini sağlar (Igney ve Krammer, 2002).

Apoptoz mekanizmasını kontrol eden birçok gen ve protein bulunmaktadır. Bunlardan biri olan ve özellikle hücre içindeki ROS artışı sonrası aktifleşen p53, pro-apoptotik ve anti-apoptotik

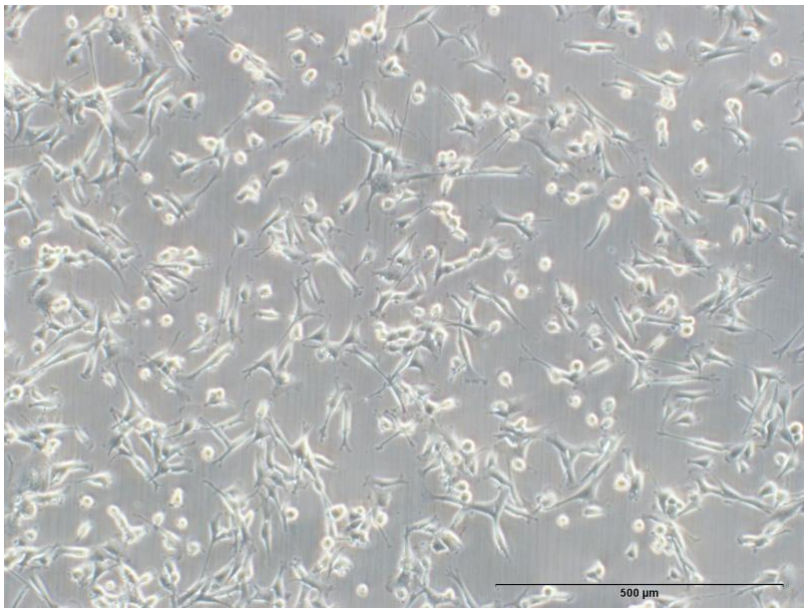
özellik gösteren genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır (Dashzeveg ve diğ., 2015). Bcl-2 ve Bcl-X_L gibi anti-apoptotik proteinler apoptozun aktivasyonunu başlatan sitokrom *c*'nin mitokondriden salınmasını ve buna bağlı devam eden sinyal akışını engellemekle görevlidir (Goldstein ve ark., 2000). Bax ve bad gibi pro-apoptotik proteinler ise Bcl-2/Bcl-X_L etkinliğini engelleyerek apoptoza öncülük edecek proteinlerin mitokondri zarından akışına izin verir (Lotem ve Sachs, 1995).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Yapılan bu tez çalışmasında, deney grupları Furan, Vitamin C, Çinko, Furan + Vitamin C, Furan + Çinko, Vitamin C + Çinko ve Furan + Vitamin C + Çinko olarak belirlenmiştir. Buna göre, seçilen konsantrasyonlarda hazırlanan furan, çinko ve vitamin C'nin tek başına ve yukarıda belirtilen kombinasyonlar ile 24 saat boyunca Sertoli hücrelerine uygulandı. Madde maruziyeti sonrasında hücre canlılığı, sitotoksisite, lipit peroksidasyonu, total protein tayini ve enzimatik antioksidanlarda meydana gelen değişimler spektrofotometrik olarak ölçülürken; apoptotik/ölü hücre oranı ise floresan işaretleme yöntemi olan Propidium/Hoechst yöntemi ile araştırıldı.

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ

Bu çalışmada, hücre kültürü deneylerinde kullanılan TM4 hücre soyu, 11-13 günlük farelerin testislerinden izole edilen Sertoli hücrelerinden elde edilmiş olup, tümorogenik olmayan bir hücre soyudur. Bu hücre soyu laboratuvarımıza ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center'dan alınmış olup, haftada bir-iki kez düzenli pasajları yapılarak yetiştirilmektedir. Sertoli hücreleri, 50:50 DMEM/F12 medyumunda, %5 At Serumu, %2,5 Fötal Sığır Serumu, %1 Penisilin-Streptomisin-Amfoterin (PSA) ilave edilmiş flasklarda %5 CO_2 ve %95 hava içeren nemli ortamda, 37^{o}C'de inkübe edilerek çoğaltılmaktadır (Şekil 3.1.1).



Şekil 3.1.1: Sertoli Hücrelerinin morfolojik görünümü.

3.2. SERTOLİ HÜCRELERİNİN PASAJLANMASI

Yapılan deneylerde kullanılan Sertoli hücreleri, yetiştirildikleri kültür kaplarının yüzeyini %70 oranında kapladığında haftada bir-iki kez düzenli olarak pasajları yapılarak yetiştirilmiştir. Bu işlemde, hücreler ilk olarak PBS ile yıkanır. Ardından flaska tripsin eklenerek 3 dakika boyunca 37^{o}C'de inkübe edilir. Süre bitiminde flasktan toplanan hücreler santrifüj tüpüne aktarılarak 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilir ve hücreler çöktürülür. Süpernatant atılarak, hücre peletine uygun kültür medyumu eklenir ve nazikçe pipetaj yapılır. Ardından yapılacak olan her deney için gerekli sayıda hücre Thoma lamı kullanılarak sayılır ve deney için gerekli miktardaki hücre kültür kaplarına ekilir.

3.3. FURAN, VİTAMİN C VE ÇİNKO'NUN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

Furanın TM4 Sertoli hücre soyuna uygulanan konsantrasyonu belirlenirken, öncelikle %100 etanolde çözülerek furan stok solüsyonu oluşturulmuştur. Daha sonra stok solüsyonundan içerisinde %0,1 etanol olacak şekilde sulandırma yoluyla 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 3000, 6000 µM'lik furan konsantrasyonları hücrelere 24 saat süreyle uygulanmıştır. Hücre canlılık oranını %80'e düşüren 3000 µM'lik furan konsantrasyonu diğer deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Kontrol grubuna ise %0,1 etanol içeren medyum uygulanmıştır.

Çinko ve vitamin C'nin uygulanacak konsantrasyonu çeşitli hücre soyları ile yapılan *in vitro* çalışmalarda ortalama antioksidan konsantrasyonu 50 µM olarak belirlenmiştir (Orta ve Erkan, 2014; Gürbay, 2012). Medyum içerisinde çözülen çinko ve vitamin C her deney öncesinde taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan furan, vitamin C ve çinko solüsyonları 0,22 µm milipor filtreden geçirilerek steril edilmiş ve Sertoli hücrelerine uygulanmıştır. Deney grupları tablo 3.3.1'de gösterilen şekilde belirlenmiştir.

Tablo 3.3.1: Sertoli hücrelerine uygulanan furan, çinko ve vitamin C deney grupları

Deney Grubu	Seçilen Konsantrasyon
Kontrol	%0,1 Etanol içeren medyum
Furan	3 mM
Vitamin C	50 µM
Çinko	50 µM
Furan + Vitamin C	3 mM + 50 µM
Furan + Çinko	3 mM + 50 µM
Vitamin C + Çinko	50 µM + 50 µM
Furan + Vitamin C + Çinko	3 mM + 50 µM + 50 µM

3.4. HÜCRE CANLILIK TESTI (MTT)

Uygun koşullarda çoğalan TM4 Sertoli hücrelerinin, tek başına ve birlikte hazırlanan furan, vitamin C ve çinko konsantrasyonlarına maruz bırakılmasına bağlı olarak hücre canlılığında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için MTT hücre canlılığı testi yapılmıştır. Buna göre, flask yüzeyinde yeterince çoğaldığı gözlemlenen Sertoli hücreleri Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırıldı. Elde edilen hücreler, kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde 96 kuyulu kültür kaplarına ekilerek bir gece boyunca 37°C'de ve %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün %0,1 etanol içeren medyumda hazırlanan Furan, Vitamin C, Çinko, Furan + Vitamin C, Furan + Çinko, Vitamin C + Çinko ve Furan + Vitamin C + Çinko konsantrasyonları hücrelere uygulanarak 24 saat süresince inkübe edildi. Maruziyet süresinin bitiminde her kuyuya 10 µl MTT I solüsyonu eklenerek 4 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. MTT I solüsyonundaki tetrazolyum tuzu sadece canlı hücrelerde formazan kristallerine indirgenmektedir. Bu kristallerin çözülmesi için her kuyucuğa 100 µl MTT II solüsyonu (SDS) eklendi ve bir gece boyunca inkübe edildi. Deney süresinin bitmesiyle birlikte 540 nm dalga boyundaki spektrofotometrede hücrelerin optik yoğunlukları ölçüldü. Furan, Vitamin C ve Çinko konsantrasyonlarına maruz bırakılmayan kontrol grubu hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiş ve diğer deney gruplarının hücre canlılığı kontrole göre yüzde cinsinden hesaplanmıştır. Bu test her biri üç tekrarlı olacak şekilde üç bağımsız deney olarak tasarlanmıştır (Mossman, 1983).

3.5. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesi için Sertoli hücreleri (5×10^5) 6 kuyulu kültür kaplarına ekildi. Hücrelerin kuyulara tutunmasının ardından, furan, çinko ve C vitamini tek veya kombine edilerek belirlenen konsantrasyonlarda 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. Maruziyet süresinin sonunda, hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldı. Daha sonra, soğuk Tris tamponuna (Tris-HCl, pH:7.2) aktarılan hücrelerin ultrasonikatör ile membranlarının parçalanması sağlanarak hücre içerikleri açığa çıkarıldı. Parçalanmış hücrelerden oluşan süspansiyon 14,000g'de soğutmalı santrifüjde (Nüve) santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar total protein miktarı, lipit peroksidasyonu, katalaz (KAT), süperoksit dismütaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivite analizlerinde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

3.5.1. Membran Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Lipit peroksidasyonu, Heath ve Packer'ın (1968) yöntemine göre malondialdehit (MDA) miktar tayini yoluyla belirlendi. Yöntemin prensibi, hücrelerdeki poliansatüre yağ asidi peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile sıcak ve asidik pH'lı ortamda gerçekleşen reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli bileşiğin miktarının spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanmaktadır.

Lipit peroksidasyonu tayini için, hücre süspansiyonunun lizis tamponu içerisinde sonike edilmesinden sonra santrifüjlenmesi ile elde edilen süpernatant örneklerinden 100 µL deney tüplerine alındı. Kör tüpüne ise süpernatant örneği yerine 100 µL Tris-HCl (0.15 M, pH:7.2) tamponu konuldu. Ardından, deney tüplerine %20 trikloroasetik asit içinde çözülen %0.05 tiobarbitürik asit karışımından 1 mL eklendi ve tüpler iyice çalkalandı. Çalkalanan tüpler, 1 saat boyunca kaynar suyun içinde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, reaksiyonu durdurmak için tüpler oda ısısında soğumaya bırakıldı. Deney karışımları 10000 g'de 5 dk santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantların absorbans değerleri 532 nm dalga boyunda köre karşı okundu.

$$TBARS\ (nmol/ml)\ = \frac{toplam\ hacim \times örnek\ absorbansı \times 10^6 \times sulandırma\ katsayısı}{\varepsilon mM \times örnek\ hacmi \times ışık\ yolu}$$

εmM (TBARS'ın molar ekstinksiyon katsayısı) = $1.56x10^5 M^{-1}\ cm^{-1}$

3.5.2. Total Protein Ölçümü

Total protein içeren süpernatantın elde edilmesinin ardından, örneklerin protein konsantrasyonları bikinkoninik asit (BCA) tahlili ile belirlenir. BCA tahlili için Smart BCA Protein Assay Kit kullanılmıştır. Bu testin prensibi bir bakır iyonunun iki BCA molekülüne bağlanması sonucu oluşan mor renkli reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak tespit edilmesi ve böylece protein miktarının belirlenmesine dayanır. Oluşan bu mor renkli reaksiyon ürünü 562 nm'de artan protein miktarı ile doğrusal olarak güçlü bir absorbans verir. Sığır serum albümin (BSA) stok solüsyonunun distile su ile seyreltilmesiyle 20-2000 µg/mL arasında bilinen farklı konsantrasyonlar ile standart aralığı oluşturulur. Hazırlanan standartlarla karşılaştırılarak örnekteki bilinmeyen protein konsantrasyonu hesaplanır.

3.5.3. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi belirlenmesi

Total SOD enzim aktivitesi, Marklund ve Marklund (1974)'un yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Deney prensibi, SOD enziminin pyrogallol otooksidasyonunu alkalin pH'da inhibe etmesi esasına dayanır. Bir birim SOD aktivitesi, pyrogallol otooksidasyonunu %50 oranında düşürmek için gereken enzim miktarı olarak tanımlanır.

İlk olarak, deney tüplerine hazırlanan deney solüsyonlarından 4 mL Tris-HCl tamponu (pH 8.2), 0.05 mL pyrogallol (2 mM) ve 0,05 ml hücre ekstresi eklendi. Kör tüpüne ise 0,05 ml pyrogallol çözeltisi ile 1,45 ml Tris tamponu konuldu. Ardından, deney solüsyonunun değişen absorbansı 3 dakika süre boyunca 30 saniye aralıklarla toplamda yedi zaman noktasında 420 nm'de spektrofotometrede okundu.

$$\Delta A\ (\text{örneğin absorbans değişimi}) = \frac{A_{son} - A_{ilk}}{T_{son} - T_{ilk}}$$

$$\Delta B\ (\text{körün absorbans değişimi}) = \frac{B_{son} - B_{ilk}}{T_{son} - T_{ilk}}$$

$$SOD'un\ \%50\ inhibisyon\ miktarı = \frac{(\Delta A - \Delta B)\ x\ 100}{\Delta A\ x\ 50}$$

3.5.4. Katalaz (KAT) enzim aktivitesi belirlenmesi

Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi, Sinha (1972)'nın yöntemine göre yapıldı. Antioksidanlardan katalaz enzimi, oldukça kararlı bir reaktif oksijen türü olması sebebiyle hücrede hasara sebep olan hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene ayrışmasını katalizler.

Bu yöntemin prensibi, asetik asitte bulunan dikromatın H_2O_2 varlığında ısıtılması sonucu kromik asetata indirgenmesine ve dikromat asetik asitin H_2O_2 ile meydana getirdiği koyu mavi mor rengin ısı ile açık yeşile dönüşümüne dayanır.

0.4 mL H_2O_2 (0.2 M), 0.5 mL sodyum fosfat tamponundan (0.01M) oluşan reaksiyon karışımına 0.1 mL hücre ekstraktı eklendi ve deney tüpleri hafifçe çalkalandı. Ardından, 100 ml ultra saf suda çözünmüş 5 gr potasyum dikromata yavaşça 300 ml glasiyel asetik asit ilave edilerek hazırlanan dikromat asetik asit belirtecinden deney tüplerine 2 ml eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra, tüpler kaynar su içinde10 dakika boyunca inkübe edildikten sonra soğumaya bırakıldı. Soğuyan tüplerdeki deney karışımları, 570 nm'de köre karşı okundu.

$$T\ddot{u}ketilen\ H2O2\ = \frac{\text{Örnek absorbansı} \times \text{sulandırma katsayısı} \times \text{toplam hacim}}{\varepsilon mM \times ışık\ yolu \times \ddot{o}rnek\ hacmi}$$

εmM (H_2O_2'nin molar ekstinksiyon katsayısı) = 1.88 x $10^4 M^{-1}$ cm^{-1}

3.5.5. Glutatyon Peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi belirlenmesi

GPx enzimi, redükte glutatyon varlığında okside glutatyon ve su oluşturan H2O2'nin ayrışma tepkimesini katalize eder. GPx enzim seviyesinin tayininde, substrat olarak H_2O_2'nin kullanıldığı Hafeman (1974)'nın yöntemi uygulanmıştır. Öncelikle, deney tüplerine 0.4 mM EDTA içeren 0.5 mL sodyum fosfat tamponu (0.4 M), 0.25 mL sodyum azid (10 mM), 0.5 mL redükte GSH (2 mL), 0.6 mL distile su ve 0.15 ml hücre ekstraktı eklendi ve tüpler 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Ardından, deney tüplerine 0.5 mL H_2O_2 (1.25 mM) eklenerek 37°C'de 3 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, deney tüplerine 1 mL %10 TCA eklenerek reaksiyon durduruldu ve karışım santrifüjlendi. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatanta 4 mL sodyum fosfat solüsyonu (0.4 M) ile 40 mg 5,5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)'in 100 ml %1'lik sodyum sitrat içinde çözünmesiyle hazırlanan DTNB belirtecinden 1 ml eklendi. Deney karışımlarının absorbans değerleri 412 nm'de köre karşı okundu.

$$T\ddot{u}ketilen\ glutatyon = \frac{\ddot{o}rnek\ absorbansı \times toplam\ hacim \times sulandırma\ katsayısı}{\varepsilon mM \times \ddot{o}rnek\ hacmi \times ışık\ yolu}$$

εmM (DTNB'nin molar ekstinksiyon katsayısı) = 13600 M^{-1} cm^{-1}

3.6. İKİLİ FLORESAN BOYAMA (PROPİDİUM İYODÜR/HOECHST) YÖNTEMİ İLE APOPTOZUN BELİRLENMESİ

Apoptozun belirlenmesinde, apoptotik hücrelerin işaretlenmesi için Hoechst 33342 (Ho342), ölü hücrelerin işaretlenmesi için ise Propidium iyodür (PI) boyaları kullanılarak, eş zamanlı ikili floresan boyama işaretleme yöntemi kullanıldı. Buna göre, 24 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılarak bir gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün, % 0,1 etanol içeren medyumda hazırlanan Furan, Vitamin C, Çinko, Furan + Vitamin C, Furan + Çinko, Vitamin C + Çinko ve Furan + Vitamin C + Çinko konsantrasyonları hücrelere uygulanarak 24 saat boyunca tekrar inkübe edildi. Maruziyet süresinin bitiminde hücreler ilk olarak PBS solüsyonuyla yıkandı. Ardından 1 mg/ml Propidium İyodür, 1 mg/ml Hoechst 33342 ve 1M PBS (pH 7.4) ile hazırlanan deney karışımı her bir kuyuya 0,2 ml olacak şekilde eklenerek 37°C'de 15-30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sırasında deney karışımında bulunan Ho342 floresan boyası apoptotik hücreleri mavi renkte işaretlerken, PI floresan boyası ise ölü hücreleri kırmızı renkte işaretler (Vermes ve diğ., 1995: Watkins ve diğ., 1996; Zhang ve Kiechle, 1997; Sara ve diğ., 2003; Sara ve diğ., 2003; Siddighi ve diğ., 2004). Bu süre sonunda hücreler tekrar PBS ile çalkalandı ve floresan mikroskop altında incelendi. Olympus IX71 floresan ataçmanlı ters mikroskopta UVB filtre ile incelenerek Olympus DP72 video kamerada eşit aralıklarla seri olarak fotoğraflandı. Floresan ışıma gösteren hücreler her bir grup için ayrı ayrı sayılarak ortalama yüzde değerleri hesaplandı. Her bir grup için üç farklı deneyde toplam 12 kuyuda 10-15 alan ve her bir kuyu için 1000 hücre taranarak canlı, apoptotik ve ölü hücreler sayıldı. Her grup için canlı, apoptotik ve ölü hücrelerin tüm hücrelere oranı yüzdelik değerler olarak hesaplandı.

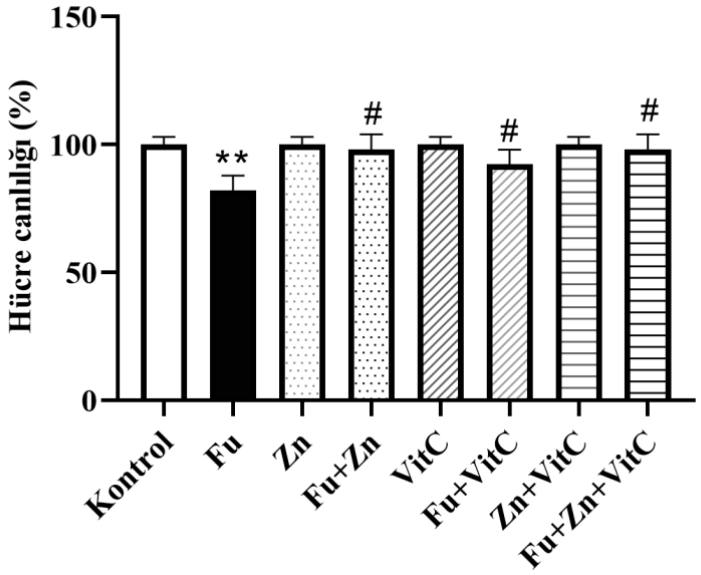
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Furan, vitamin C ve çinkonun belirlenen konsantrasyonlarda tek veya kombine edilerek uygulanmasına bağlı olarak hücre canlılığı, hücre sitotoksisitesi, total protein miktarı, malondialdehit miktarı, katalaz enzimi, süperoksit dismutaz enzimi, glutatyon peroksit enzimi seviyelerinin değişen verilerinin istatistik değerlendirilmesinde Graphpad Prism 9.0 programı (GraphPad Prism Software, San Diego, California, USA) kullanıldı. Elde edilen veriler, Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile tek yönlü ANOVA testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi ve ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Sonuçlar, $p<0,001$, $p<0,01$, $p<0,05$ anlamlılık seviyeleri referans alınarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. HÜCRE CANLILIĞI BULGULARI

Furanın, çinko ve vitamin C ile ayrı ayrı ve birlikte TM4 Sertoli hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucu hücre canlılık oranları üzerindeki etkisi MTT kiti kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen canlılık oranları (%) şekil 4.1.1.'de sunulmuştur. 24 saat sonunda kontrol ve furan grubu MTT değerleri bakımından kıyaslandığında kontrol gruplarına göre furanın tek başına uygulandığı grupta anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0,01$). Furan grubu ve furana ilave olarak uygulanan çinko ve/veya vitamin C gurubu ile MTT değerleri bakımından karşılaştırıldığında, furan grubuna göre Fu+Zn, Fu+VitC ve Fu+Zn+VitC gruplarında anlamlı bir fark artış görülmektedir ($p<0,05$). Fu+Zn ve Fu+VitC grupları kendi aralarında kıyaslandığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Hücre canlılığına ait bu veriler incelendiğinde furanın Sertoli hücre canlılığı üzerinde etkilerini iyileştirmede Zn ve VitC'nin benzer rolleri olduğu ve furan sitotoksisitesinde iyi birer antioksidan olarak kullanılabilecekleri saptanmıştır.

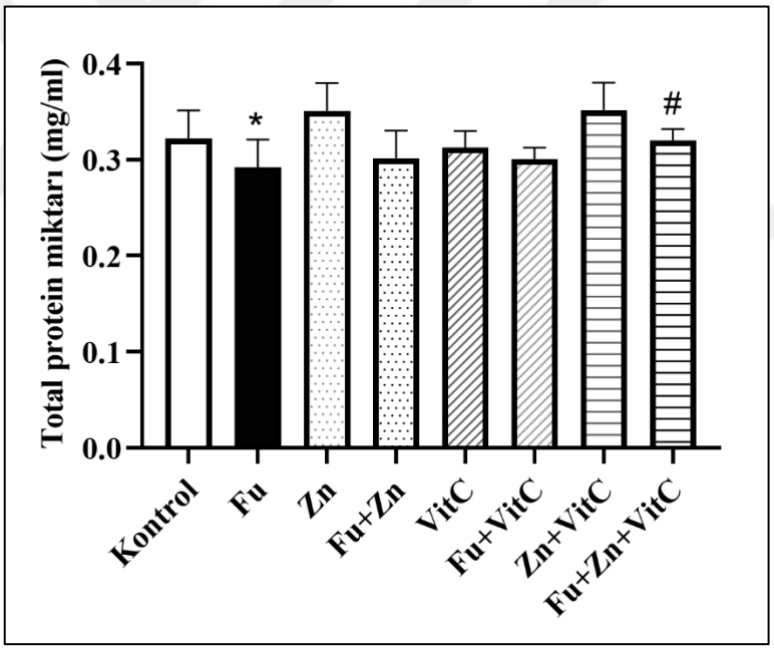


Şekil 4.1.1: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücrelerinde % canlılık üzerine etkileri (*$p<0,05$; **$p<0,01$; *:kontrollere göre; #: furana göre).

4.2. OKSİDATİF HASAR BULGULARI

4.2.1. Total protein miktarı

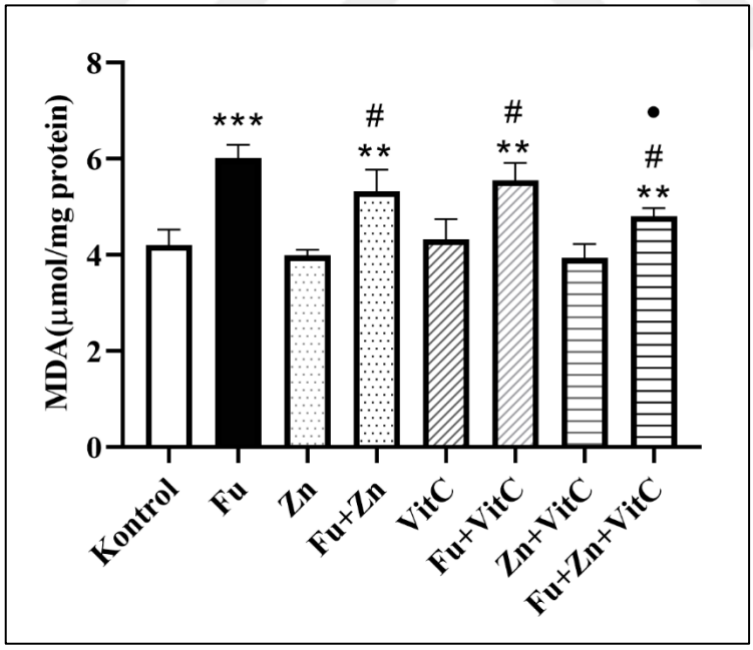
TM4 Sertoli hücrelerinin deney süresi olan 24 saat süreyle furan, vitamin C ve çinko uygulaması sonunda BCA yöntemi kullanılarak elde edilen total protein miktarları şekil 4.2.1.1'de verilmiştir. Deney süresi sonunda kontrol grupları ve furan uygulanan gruplarla total protein miktarı bakımından karşılaştırıldığında yalnız furanın tek başına uygulandığı grupta anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). Furan grubu ve furana ilave olarak verilen çinko ve vitamin C gruplarıyla karşılaştırıldığında total protein miktarı bakımından anlamlı bir farklılık görülmezken, furan ve Fu+Zn+VitC grubu arasında anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4.2.1: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücreleri üzerinde total protein miktarına etkileri (*$p<0,05$; *:kontrollere göre; #: furana göre).

4.2.2. Lipid peroksidasyonu

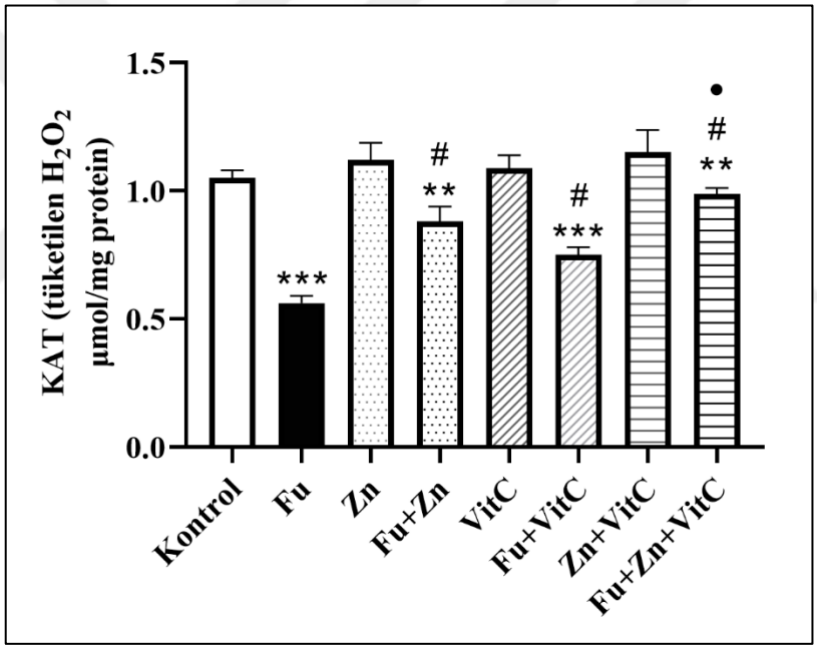
TM4 Sertoli hücrelerine furan, vitamin C ve çinkonun 24 saat süreyle uygulanması sonucu ELISA yöntemi kullanılarak hesaplanan malondialdehit miktarları şekil 4.2.2.1'de sunulmuştur. Deney sonunda kontrol grupları ve furan uygulanan gruplar malondialdehit miktarları bakımından kıyaslandığında furan uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre lipid peroksidasyon seviyelerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0,01$, $p<0,001$). Furan grubu ve furana ek olarak uygulanan çinko ve/veya vitamin C gruplarıyla malondialdehit miktarı bakımından karşılaştırıldığında tüm antioksidan uygulanan gruplarda anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,05$). Fu+Zn grubu ile Fu+Zn+VitC grubu malondialdehit miktarları bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma görülmektedir ($p<0,05$). Elde edilen verilen Sertoli hücrelerinde furana bağlı oluşan lipid peroksidasyonunda çinko ve vitamin C'nin birlikte kullanımının lipid peroksidasyonunu baskılamada ayrı ayrı kullanımlarına göre daha etkin olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.2.2: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücreleri üzerinde lipid peroksidasyonuna etkileri (*$p<0,05$; **$p<0,05$; ***$p<0,05$; *:kontrollere göre; #: furana göre; •: Fu+Zn grubuna göre).

4.2.3. Katalaz enzim aktivitesi

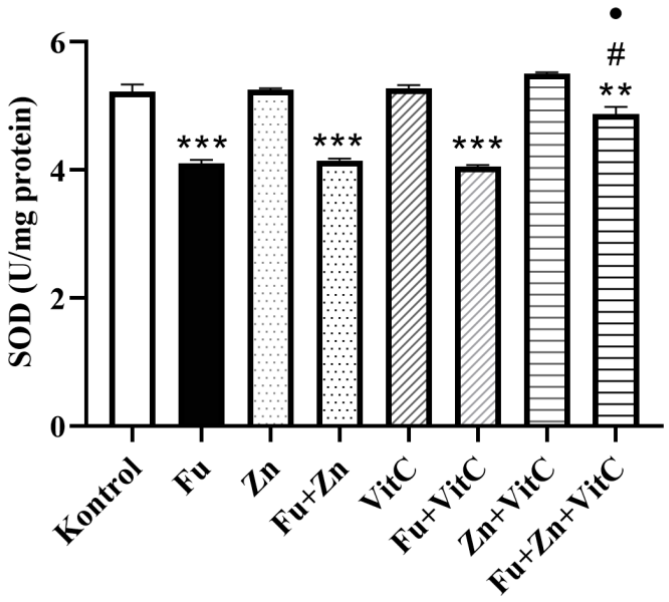
Katalaz enzim aktivitesi, spektrofometrik yöntem kullanılarak TM4 Sertoli hücrelerinde 24 saat deney süresi sonunda furan, vitamin C ve çinko uygulanan gruplarında tüketilen H_2O_2 düzeyine bağlı olarak hesaplanmış ve sonuçlar şekil 4.2.3.1'de sunulmuştur. Deney süresi sonunda kontrol grupları ve furan uygulanan gruplar katalaz enzim miktarı bakımından kıyaslandığında kontrol gruplarına göre tüm furan uygulanan gruplarda anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0,01$, $p<0,001$). Furan grubu furana ilave olarak verilen çinko ve/veya vitamin C gruplarıyla katalaz enzim miktarı bakımından kıyaslandığında yine tüm deney gruplarında anlamlı bir yükselme gözlenmiştir ($p<0,05$). Fu+Zn, Fu+VitC ve Fu+Zn+VitC grupları birbirleriyle kıyaslandığında katalaz enzim miktarının en yüksek olduğu grubun Fu+Zn+VitC olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4.2.3: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücreleri üzerinde katalaz enzim aktivitesine etkileri (*p<0,05; **p<0,05; ***p<0,05; *:kontrollere göre; #: furana göre; •: Fu+Zn grubuna göre).

4.2.4. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi

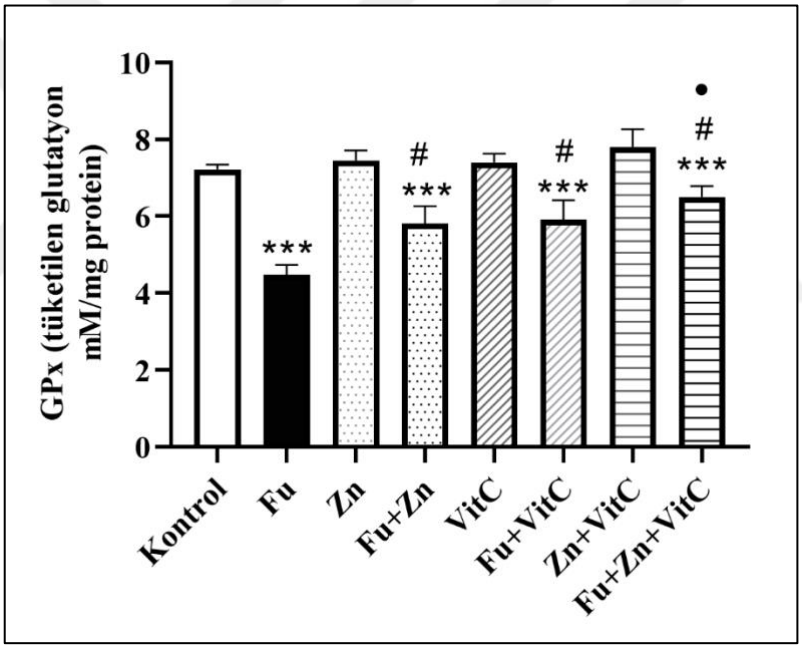
Spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan SOD enzimi miktarının TM4 Sertoli hücrelerinde 24 saat sonunda furan, vitamin C ve çinko gruplarındaki değişimi şekil 4.2.4.1'de sunulmuştur. Kontrol grupları ve furan grupları SOD enzim düzeyleri açısından kıyaslandığında kontrol grubuna göre tüm konsantrasyonlarda anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0,01$, $p<0,001$). Furan grubu ve furana ek olarak antioksidan uygulanan gruplar SOD enzim miktarı bakımından karşılaştırıldığında Fu+Zn ve Fu+VitC gruplarında anlamlı bir fark bulunmazken, Fu+Zn+VitC grubunda anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$).



Şekil 4.2.4: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücreleri üzerinde süperoksit dismutaz enzim aktivitesine etkileri (*$p<0,05$; **$p<0,05$; ***$p<0,05$; *:kontrollere göre; #: furana göre; •: Fu+Zn grubuna göre).

4.2.5. Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi

TM4 Sertoli hücrelerinin 24 saat deney süresi sonunda furan, vitamin C ve çinko uygulanan gruplarda tüketilen glutatyon miktarına göre değerlendirilen GPx enzimi miktarı şekil 4.2.5.1'de sunulmuştur. Deney süresi sonunda kontrol grupları ve furan grupları GPx enzimi miktarı açısından kıyaslandığında kontrol gruplarına göre tüm furan gruplarında anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0,001$). Yalnız furan uygulanan grup ile furana ilave olarak çinko ve/veya vitamin C uygulanan gruplar GPx enzim miktarı yönünden karşılaştırıldığında bahsedilen tüm gruplarda anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$). Fu+Zn grubu ile Fu+Zn+VitC grubu GPx enzim miktarı bakımından karşılaştırıldığında çinko ve vitamin C'nin birlikte uygulamasının anlamı bir artışa neden olduğu görülmektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.2.5: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücreleri üzerinde glutatyon peroksidaz enzim aktivitesine etkileri (*$p<0,05$; ***$p<0,05$; *:kontrollere göre; #: furana göre; •: Fu+Zn grubuna göre).

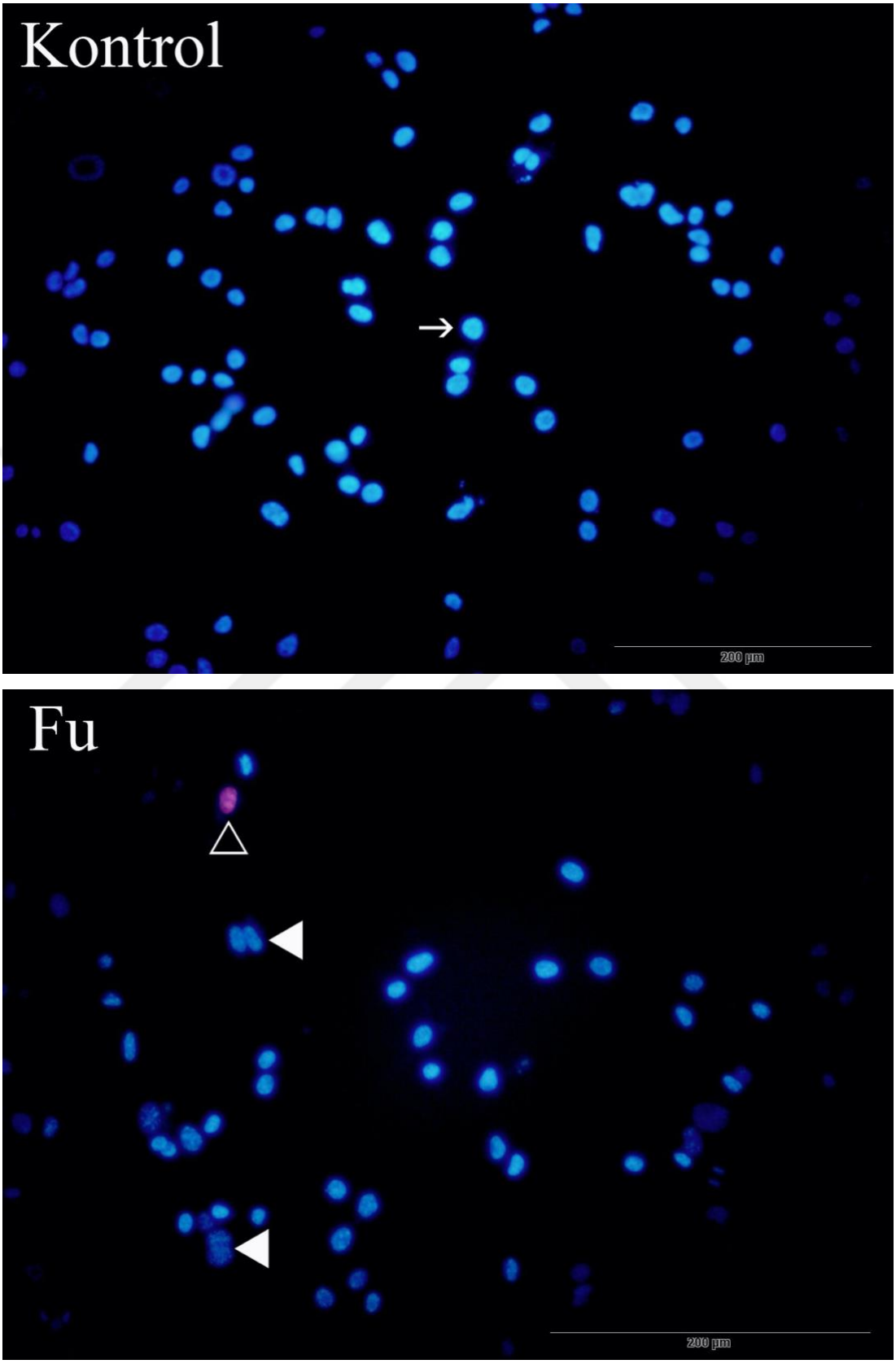
4.3. APOPTOZ BULGULARI

TM4 Sertoli hücrelerinde furan, çinko ve vitamin C ile oluşturulan deney gruplarında floresan boyama yöntemi kullanılarak belirlenen canlı, apoptotik ve ölü hücrelerin yüzde cinsinden değerleri tablo 4.3.1'de ve kontrol ve deney gruplarına ait fotoğraflar ise şekil 4.3.1-4.'de sunulmuştur. 24 saat deney süresi sonunda floresan boyama sonuçlarından elde edilen verilere göre, deney gruplarında gözlemlenen morfolojik değişiklikler aşağıdaki kriterlere göre sınıflandırılmıştır: i) canlı hücreler; oldukça kompakt nükleuslu parlak mavi renkli görünümlü ii) apoptotik hücreler; nüklear olarak yoğunlaşmış ve kromatin fragmentasyonuna sahip mat mavi veya mor renkli görünümlü iii) ölü hücreler; kromatin fragmentasyonu göstermeyen kırmızı renkli görünümlü.

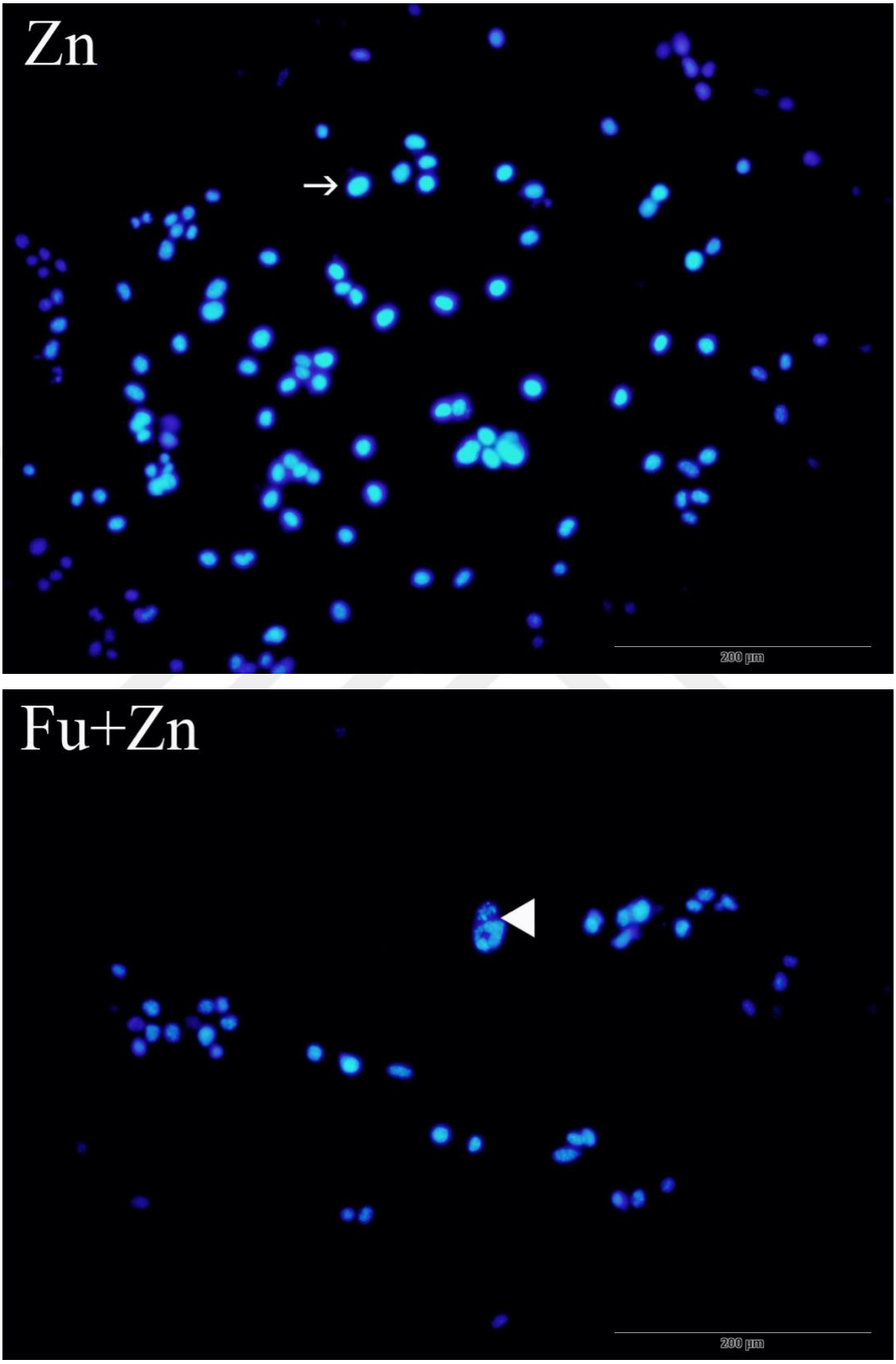
Deney süresi sonunda kontrol grupları ve furan grupları apoptoz oranları yönünden kıyaslandığında kontrol gruplarına göre tüm furan gruplarında anlamlı bir yükselme, ölü hücre oranlarında ise yalnız furan ve Fu+VitC uygulanan gruplarda anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,01$, $p<0,001$). Yalnız furan uygulanan grup ile furana ilave olarak çinko ve/veya vitamin C uygulanan gruplar apoptoz oranları bakımından karşılaştırıldığında Fu+Zn, Fu+VitC ve Fu+Zn+VitC gruplarında anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.3.1: Furan, vitamin C ve çinkonun TM4 Sertoli hücrelerinde 24 saat sonunda canlı, apoptoz ve ölü hücre üzerine etkileri (*: kontrollere göre, #:furana göre, •: furan+çinko grubuna göre; *$p<0,05$, #$p<0,05$, •$p<0,05$).

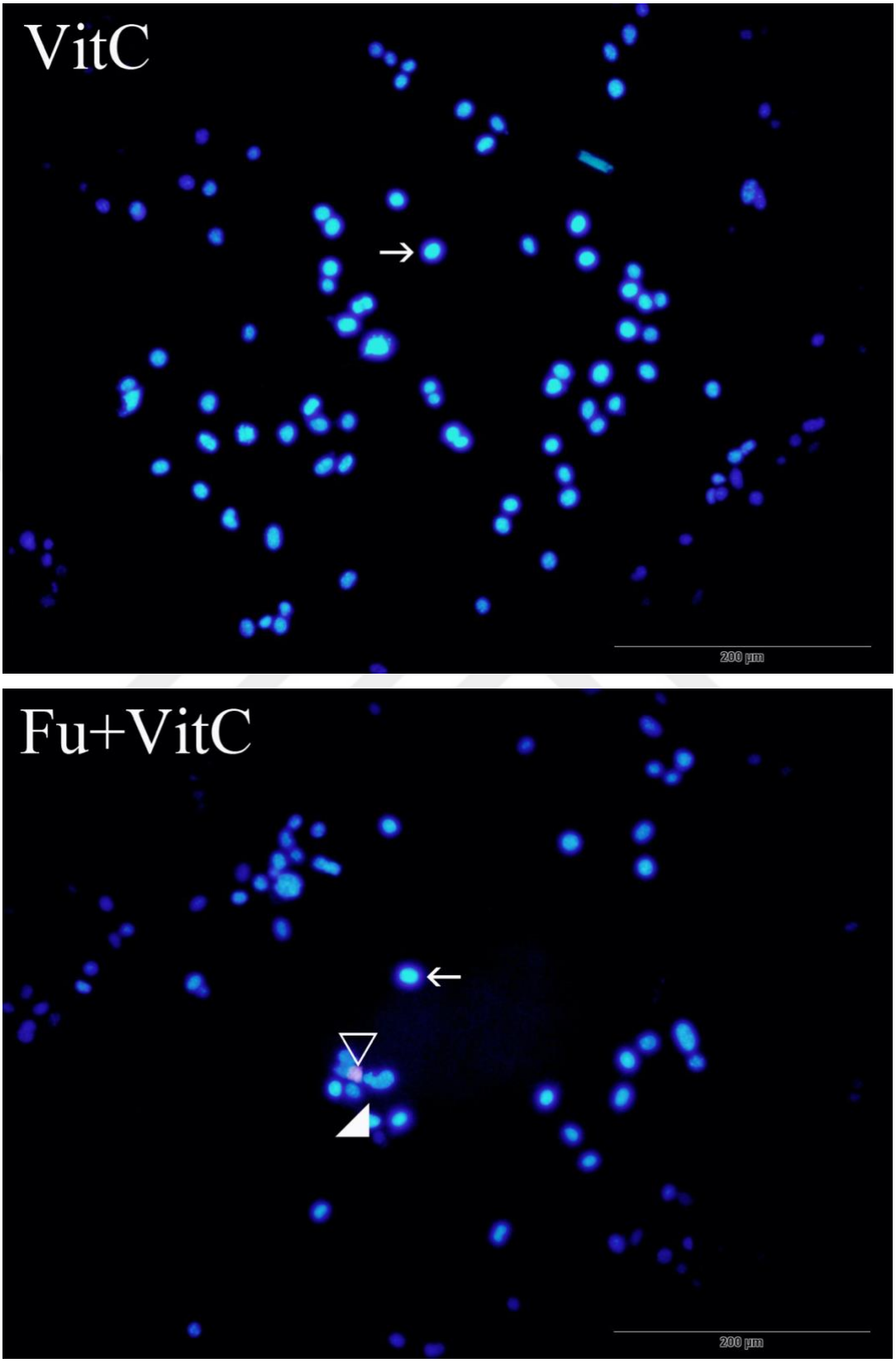
Gruplar	Canlı hücre	Apoptotik hücre	Ölü hücre
Kontrol	98,1±0,9	0,9±0,0	1,0±0,1
Fu	81,5±0,5**	16,2±0,3***	2,3±0,2**
Zn	99,5±0,8	0,4±0,0	0,1±0,0
Fu+Zn	96,3±0,3$^{\#}$	3,3±0,1**$^{\#}$	0,4±0,0$^{\#}$
VitC	98,3±1,1	0,8±0,0	0,9±0,1
Fu+VitC	91,4±0,6$^{\#}$	6,4±0,5**$^{\#}$	2,2±0,1**
Zn+VitC	99,8±1,2	0,1±0,0	0,1±0,0
Fu+Zn+VitC	96,7±0,8$^{\#}$	3,2±0,2**$^{\#}$	0,1±0,0$^{\#}$



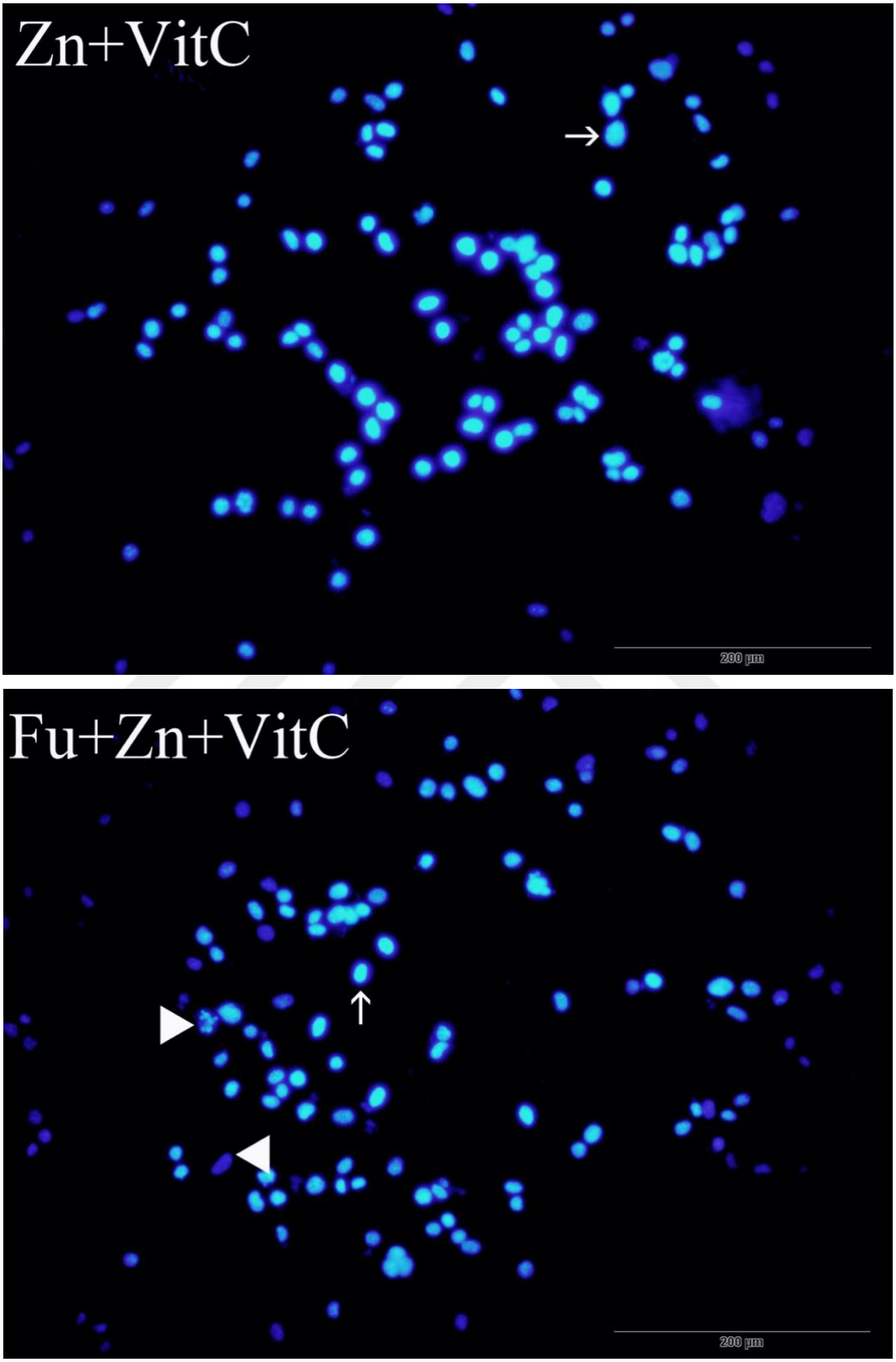
Şekil 4.3.1: Furanın Sertoli hücrelerinde 24 saat sonunda kontrol ve furan gruplarında canlı, apoptotik ve ölü hücre üzerindeki etkileri. (←: Canlı hücre,◀: Apoptotik hücre,▽: Ölü hücre)



Şekil 4.3.2: Furanın Sertoli hücrelerinde 24 saat sonunda çinko ve furan+çinko gruplarında canlı, apoptotik ve ölü hücre üzerindeki etkileri. (←: Canlı hücre,◀: Apoptotik hücre,▽: Ölü hücre)



Şekil 4.3.3: Furanın Sertoli hücrelerinde 24 saat sonunda vitamin C ve furan+Vitamin C gruplarında canlı, apoptotik ve ölü hücre üzerindeki etkileri. (←: Canlı hücre,◀: Apoptotik hücre,▽: Ölü hücre)



Şekil 4.3.4: Furanın Sertoli hücrelerinde 24 saat sonunda vitamin C+çinko ve furan+Vitamin C+çinko gruplarında canlı, apoptotik ve ölü hücre üzerindeki etkileri. (←: Canlı hücre,◀: Apoptotik hücre,▽: Ölü hücre)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğal gıda bileşenlerinin termal bozulması yoluyla ışıl işlem görmüş gıdalarda oluşan furanın insan sağlığı için zararlı olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (Knutsen ve diğ., 2017; Moro ve diğ., 2012; Mariotti ve diğ., 2013). Furanın çeşitli organlarda toksisiteye sebep olduğu bilinmesine rağmen, erkek üreme sistemindeki hasarın detaylı olarak anlaşılmasını sağlayacak hücre düzeyinde yapılmış çalışmalar oldukça azdır (Wang ve diğ., 2014; Alam ve diğ., 2017; Kaya ve diğ., 2019; Baş ve Pandır, 2016; Awad ve diğ., 2018; Barros ve diğ., 2019; Yuan ve diğ., 2019). Literatürde furanın erkek üreme sisteminde meydana getirdiği hasar az sayıda *in vivo* çalışma ile ortaya konulmuş olup, furanın testiste Sertoli hücrelerindeki etkilerini gösteren *in vitro* çalışma bulunmamaktadır (Kara ve diğ., 2016; Abd El-Hakim ve diğ., 2018; Rehman ve diğ., 2019). Bunun yanı sıra, furanın Sertoli hücrelerinde oluşturduğu hasara çinko ve vitamin C'nin ayrı ayrı ve birlikte iyileştirici etkilerinin olup olmadığı gösteren çalışma bulunmamaktadır.

Furan maruziyetinin karaciğer, böbrek, ovaryum ve testis gibi pek çok dokuda hasara neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2014; Awad ve diğ., 2019; Karacaoğlu ve diğ., 2010; Uçar ve Pandır, 2017). Furanın hücresel düzeyde hücre canlılığı ve sayısı üzerine yapılan oldukça sınırlı sayıda bulunmaktadır (Barros ve diğ., 2019; Karacaoğlu ve diğ., 2010). Barros ve diğerlerinin 2019 yılında B16F10 melanoma hücreleriyle yaptıkları bir *in vitro* çalışmada beş farklı furan türevi 48 saat süreyle uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre furan türevlerinin hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur (Barros ve diğ., 2019). Yapılan bir *in vivo* çalışmada yetişkin sıçanlara 90 gün süreyle 2, 4 ve 8 mg/kg/gün dozlarında furan uygulanmış ve histolojik incelemeler sonucunda Leydig ve Sertoli hücre sayısında azalma olduğu bulunmuştur (Karacaoğlu ve diğ., 2010). Yukarıda bahsedilen sınırlı sayıda çalışmalarda, furan uygulanması sonucunda hücre canlılığında anlamlı azalmalar görülmesi Sertoli hücreleri ile yapılan bu *in vitro* çalışmada 3 mM furanın benzer şekilde hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı sonucu ile örtüşmektedir. Buna ek olarak, çalışmamızda furana antioksidan olarak uygulanan çinko ve vitamin C'nin hücre canlılığında anlamlı bir artışa neden oldukları gözlenmiştir. Elde edilen bu veriler, furan toksisitesinde çinko ve vitamin C'nin birlikte kullanımının hücre canlılığı üzerinde iyileştirici bir rol oynayabileceğini ortaya koymuştur.

Hücrelerde ROS oluşumu, protein ve DNA'da mutasyonlara, membranlarda lipid peroksidasyonuna, apoptoza ve hücresel yapılarda hasara neden olur (Peterson ve diğ., 2016). Özellikle erkek üreme sisteminin ana elemanı olan ve zayıf vaskülaritesi sebebiyle oksijen miktarı düşük testis dokusunda oksidatif stres daha fazladır. Ayrıca testislerdeki oksidatif stresin spermatogenez ve steroidogenez için zararlı olduğu bilinmektedir. Testislerdeki düşük oksijen seviyesine rağmen, büyük miktarlarda doymamış yağ asitleri ve ROS üreten sistemler içerdiği için oksidatif strese duyarlıdır. Hücre membranı lipidlerinde bulunan doymamış yağ asitleri ile ROS'lar arasında gerçekleşen zincirleme bir reaksiyon sonucu oluşan bir süreç olan lipid peroksidasyonu, stress koşulları altında hücre membran yapısını bozarak, işlevsel bozukluklara neden olmaktadır (Albalawi ve diğ., 2017).

Birçok *in vivo* çalışma, furanın lipid peroksidasyonu üzerindeki etkilerini araştırmıştır (Karacaoğlu ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2014; El-Hakim ve diğ., 2018). Kara ve diğ. (2016) yaptıkları bir çalışmada, furanın testis üzerindeki toksisitesini ve likopenin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Bu çalımada furanın 40 mg/kg dozu 28 gün süreyle Wistar albino sıçanlara uygulanmıştır. Bu uygulamalar sonucunda, testisler çıkarılarak MDA düzeyleri ölçülmüştür. Elde edilen verilere göre furanın MDA düzeylerini testis dokusunda anlamlı olarak azalttığı, likopenin ise koruyucu bir etki gösterdiği bulunmuştur. 2018 yılında yapılan bir çalışmada, 28 gün süreyle 16 mg/kg/gün furan tek başına ve furana ek olarak 300 mg/kg/gün *Spirulina platensis* bitkisi ekstratı verilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, furan uygulanan grupta MDA miktarı anlamlı olarak artarken; *Spirulina platensis* uygulanan grupta, MDA miktarının anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (El-Hakim ve diğ., 2018). yapılan başka bir çalışmada, yetişken sıçan testislerinde furanın oksidatif stress üzerindeki etkisi ve sarımsak yağının furan toksisitesindeki iyileştirici rolü araştırılmıştır. Furan 90 gün boyunca haftada 5 gün süreyle 4 mg/kg/gün ve sarımsak yağı ise 80 mg/kg/gün dozlarında sıçanlara verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre furan uygulamasının MDA düzeylerini arttırdığı görülürken, sarımsak yağının bu toksisiteyi baskıladığı saptanmıştır (El Akabawy ve El-Sherif, 2016). Alam ve diğ. (2017) yaptıkları bir çalışmada, erkek sıçanlara 30 gün boyunca 16 mg/kg/ gün furan ve 50 mg/kg/gün kuersetin uygulanmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular sonucunda, furanın MDA düzeyini arttırdığı gözlemlenirken, kuersetinin lipid peroksidasyonunu düşürdüğü böylece oksidatif hasara karşı antioksidan etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada, yukarıda bahsedilen *in vivo* çalışmalar benzer olarak, furanın Sertoli hücrelerinde lipid peroksidasyonunu analamlı olarak arttırdığı bulunmuştur. Literatürde furan toksisitesinde iyileştirici rolleri tespit edilen likopen, *spirulina platensis* ekstratı, sarımsak yağı ve kuersetin gibi çinko ve vitamin C'ninde ayrı ayrı ve birlikte lipid peroksidasyonunda iyileştirici rolleri olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan (glutatyon gibi) antioksidanlar, normal koşullar altında hücre içi redoks dengesini korumak için hücre savunma sistemi tarafından kullanılır (He ve diğ., 2017). Biyolojik sistemlerde oksidatif stres sonrası hücrelerde katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon gibi hücre içi enzim seviyeleri artarak antioksidan savunma sistemi devreye girmektedir (Peltola ve diğ., 1992).Yapılan çalışmalar furanın antioksidan savunma sistemini baskıladığı göstermektedir (Wang ve diğ., 2014; baş ve Pandır, 2016; El Akabawy ve El-Sherif, 2016; Rehman ve diğ., 2019). Yapılan bir çalışmaya göre, furan (40 mg/kg body weight) maruziyeti sonrası izole edilen sıçan akciğerlerinde KAT, SOD, GPx ve GST gibi enzim aktivitelerinin azaldığı belirlenmiştir (Baş ve Pandır, 2016). Kara ve diğ., (2016) yaptıkları bir çalışmaya göre, 28 gün süreyle 40 mg/kg dozunda furana maruz bırakılan Wistar albino sıçanların testislerindeki SOD, KAT, GPx ve GST aktivitelerinin azaldığı, furana ek olarak likopen uygulanması sonucunda ise antioksidan enzim düzeylerinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. 2016 yılında yapılan 90 günlük bir *in vivo* çalışmada, haftada beş gün oral olarak 4 mg/kg/gün dozunda furan uygulamasının sıçanlarda GSH, SOD ve KAT gibi testiküler antioksidanların enzimatik aktivitesini önemli ölçüde azalttığı, furana ek olarak uygulanan sarımsak yağının ise bu etkileri tersine çevirdiği gösterilmiştir (El-Akabawy ve El-Sherif, 2016). Erkek sıçanlarla yapılan *in vivo* ve *in vitro* bir çalışmaya göre oral yolla 28 gün boyunca furana (0, 5, 10, 20 ve 40 mg kg-1 bw d-1) maruz bırakılan deney grubundaki sıçanların testis dokusundaki SOD aktivitesinin azaldığı gözlemlenirken; sadece yüksek dozlardaki furanın KAT enzim aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir. Sıçanların testis dokusuna uygulanan farklı furan konsantrasyonlarının (1, 100, 500 ve 1000 µg/µL-1) ise KAT enzim aktivitesini düşürdüğü gözlemlenirken, furan uygulanan hiçbir deney grubunda kontrol grubuna kıyasla SOD enzim aktivitesinde anlamlı bir düşüş gözlemlenmemiştir (Rehman ve diğ., 2019).

Yapılan bu tez çalışmasına göre, furanın Sertoli hücrelerinde SOD, KAT, GPx enzim aktivitelerini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur. Antioksidan olarak verilen çinko ve vitamin

C'nin furanın oluşturduğu bu hasarda etkileri incelendiğinde, sarımsak yağı ve likopen gibi tek başlarına güçlü antioksidan özelliklerinin olmadığı ancak birlikte uygulandıklarında antioksidan enzimlerin etkilerini güçlendirdikleri sonucuna varılmıştır.

Apoptoz, hücre homeostazını ve enerjiye bağlı biyokimyasal yolları içeren, programlı hücre ölümü olarak bilinen karmaşık bir süreçtir. (Jin ve El Deiry, 2005). Hücrelerde apoptoz, çevresel kirleticiler ve hormon bozucu kimyasallar gibi ajanlara maruz kalmanın bir sonucu olarak meydana gelen oksidatif stresten kaynaklanır. Oksidatif stres, mitokondriyal membrana zarar vererek apoptoza yol açmaktadır (Gou ve Xu, 2021). Yapılan bir çok çalışma, furanın farklı apoptotik mekanizmaları kullanarak etki gösterdiğini rapor etmiştir (Chen ve diğ., 2010; Zhang ve diğ., 2015; El-Hakim ve diğ., 2018). Furan (16 mg/kg bwt/ gün,30 gün) ile yapılan bir çalışmada, maruziyet sonucu yetişkin erkek sıçan testislerinde furan indüklü apoptotik değişimler olduğu belirlenmiştir (El-Hakim ve diğ., 2018). Wistar sıçanları ile yapılan bir çalışmada, 28 gün boyunca furana (8 mg/kg) maruz bırakılan gruplarda apoptoz ile ilgili genler olan kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin indüklendiği gösterilmiştir (Owumi ve diğ., 2020). Başka bir çalışmada, 90 gün boyunca oral yolla 2, 4 ve 8 mg/kg/gün dozlarında furana maruz bırakılan sıçanların testislerinde apoptotik hücre sayısının önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir (Karacaoğlu ve diğ., 2010). Yapılan bir çalışmada, Erkek F344/N sıçanlar 28 gün boyunca 0.1 ve 2 mg/kg dozlarında furana maruz bırakılmışlardır. Furanın DNA hasarı, apoptoz ve hücre döngüsü kontrolü ile ilgili gen anlatımları üzerindeki etkisinin değerlendirildiği çalışma sonucunda, hücre siklusu ve apoptoz ile ilişkili genlerin aşırı eksprese edildiği belirlenmiştir. Ayrıca 2 mg / kg furan dozunda apoptozla ilişkili genlerin farklılaşmış ekspresyonunun daha fazla olduğu gösterilmiştir (Chen ve diğ., 2010). Furan türevleri olan dibenzil ve difenil aminofosfonat bileşiklerinin, HT29 ve HCT116 kanser hücre soylarında oluşturduğu sitotoksik etkilerin araştırıldığı bir çalışmada, uygulanan furan türevlerinin bu hücre soyları üzerinde apoptoz ve nekroza yol açtığı gösterilmiştir (Lewkowski ve diğ., 2018). İnsan lösemi Jurkat hücreleriyle yapılan bir çalışmada, kükürt içeren furan aromasının hücre canlılığı ve apoptoz üzerine etkilerine bakılarak artan ROS seviyesi ve apoptoz arasındaki ilişkinin açığa çıkarılması amaçlanmıştır. Yapılan bu çalışmaya göre, sülfit içeren furan türevlerinin DNA fragmantasyonu, apoptoz ve kaspaz-3 aktivasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2015).

TM4 Sertoli hücreleri ile yapılan bu tez çalışmasının sonuçlarına göre, furanın Sertoli hücrelerinde apoptotik hücre oranını arttırarak hücreleri apoptoza götürdüğü, bu konuyla ilgili yukarıda verilen *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla paralellik göstermektedir. Yapılan bu tez çalışması, literatür incelendiğinde furanın oluşturduğu apoptozun önlenmesinde çeşitli antioksidan moleküllerin kullanılması ile ilgili yapılan ilk çalışmadır. Yaptığımız bu çalışmanın sonuçlarına göre, vitamin C, çinko ve her ikisinin birlikte uygulamaları furanın yol açtığı apoptozu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda furanın hücre canlılığını azalttığı, toksisite belirteçlerinden olan lipid peroksidasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Furanın ayrıca hücre içi antioksidan savunma sisteminde görevli enzimler olan KAT, SOD ve GPx'in aktivitesini azaltarak Sertoli hücrelerinde oksidatif hasara neden olduğu saptanmıştır. Bunların yanı sıra, furanın Sertoli hücrelerinde apoptozu teşvik ettiği ortaya konulmuştur. Furana ilave olarak ayrı ayrı ve birlikte vitamin C ve çinko uygulanması hücre canlılığını, lipid peroksidasyonu, KAT ve GPX gibi antioksidan enzimler ve apoptoz üzerinde iyileştirici etki gösterdiğini açığa çıkarmıştır. SOD enzim aktivitesine bakıldığında furanın oluşturduğu hasara karşı sadece vitamin C ve çinkonun birlikte uygulandığı gruplarda iyileştirici olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, furan toksisitesine karşın vitamin C ve çinkonun birlikte uygulandığı durumlarda, daha etkili olarak furanın oluşturduğu hasarı iyileştirdiği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar bize, günlük rutin yaşantımızda yeme içme alışkanlıklarımız nedeniyle kaçamadığımız furan gibi moleküllerden korunmak için vitamin C ve çinko gibi antioksidanları içeren besinlerin veya takviye gıdaların birlikte alınmasının hasarın en aza indirgenmesinde önemli yer tuttuğunu ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

Akkuş, T., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, *Konya mimoza yayınları*, 1-80.

Akşit, H. ve Bildik, A., 2008, Apoptozis, *Yyü veterinerlik fakültesi dergisi*, 19 (1), 55-63.

Alizadeh, M., Barati, M., Saleh-Ghadimi, S., Roshanravan, N., Zeinalian, R., Jabbari, M., 2018, Industrial furan and its biological effects on the body systems. *Journal of food biochemistry*, *42* (5), e12597.

Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A., Rafieian-Kopaei, M., 2017, The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: a review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, *11* (5), IE01.

Bedwal, R.S. and Bahuguna, A., 1994, Zinc, copper, and selenium in reproduction, *Cellular & molecular life science*, 50, 624–640.

Bhosale, P.B., Ha, S.E., Vetrivel, P., Kim, H.H., Kim, J.A., Park, K.I., Kim, G.S., 2020, Flavonoid-induced apoptotic cell death in human cancer cells and its mechanisms, *Journal of biomedical and translational research*, 21 (2), 50-58.

Bhowmik, D., Chiranjib, K., Kumar, S., 2010, A potential medicinal importance of zinc in human health and chronic, *International journal of pharmaceutics*, 1 (1), 05-11.

Boran, C., Ozkan, K.U., 2004, The effect of zinc therapy on damaged testis in prepubertal rats, *Pediatric surgery international*, 20, 444–448.

Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., Karagin, P.H., 2020, Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi, *Ankara: Türkiye bilimsel ve teknik araştırma kurumu*.

Cohen, J.J., 1993, Apoptosis: The physiological pathway of cell death, *Hospital practise*, 15, 35-43.

Cummings, M.C., Winterford, C.M., Walker, N.I., 1997, Apoptosis, *The american journal of surgical pathology*, 21, 88-101.

Dashzeveg, N. and Yoshida, K., 2015, Cell death decision by p53 via control of the mitochondrial membrane, *Cancer letters*, 367, 108–112.

Davies, K. and Goldberg, A., 1987, Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes, *Journal of biological chemistry*, 262, 8220-8226.

Diplock, A., 1998, Healty lifestyles nutrition and physical activity, *Antioxidant nutrients*, ILSI Europe concise monograph series, 59 p, Belgium.

EFSA, 2009, Results on themonitoring of furan levels in food, *EFSA scientific report*, 304, 1–23.

Elmore, S., 2007, Apoptosis: A review of programmed cell death, *Toxicologic pathology*, 35, 495–516.

Erdoğan, B.B., 2003, Apoptozis mekanizmaları: Tümör gelişiminde FASFASL bağımlı apoptozis, *Akciğer arşivi*, 4, 165-174.

Evans, W. J., 2000 Vitamin E, vitamin C, and exercise. *The American journal of clinical nutrition*, *72* (2), 647S-652S.

Fallah, A., Mohammad-Hasani, A., Colagar, A.H., 2018, Zinc is an essential element for male fertility: a review of Zn roles in men's health, germination, sperm quality, and fertilization, *Journal of reproduction & infertility*, 19 (2), 69.

FDA, U.S., 2004, Exploratory data on furan in food.

Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., Green, D.R., 2000, The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant, *Nature cell biology*, 2, 156-162.

Green, D.R., Llambi, F., 2015, Cell death signaling, *Cold spring harbor perspectives in biology* 7, A006080.

Guo, M. and Xu, J., 2021. PI3K/Akt/mTOR signal pathway in endocrine disrupting chemicals-induced apoptosis and autophagy of thyroid follicular cells. (*Zhonghua lao Dong wei Sheng zhi ye Bing za zhi) Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, 39 (9), 717-720.

Gupta, R.K., Patel, A.K., Shah, N., Chaudhary, A.K., Jha, U.K., Yadav, U.C., Gupta, P.K., Pakuwal, U., 2014, Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer, *Asian pacific journal of cancer prevention*, 15, 4405-4409.

Halliwell B. and Whiteman M., 1998, Measurement of peroxynitrite scavengers, *Methods in enzymology*, 301, 333–342.

Henkel, R., Maass, G., Schuppe, H.C., Jung, A., Schubert, J., Schill, W.B., 2005, Molecular aspects of declining sperm motility in older men, *Fertility and sterility*, 84 (5), 1430-1437.

Huff, T. C., Sant, D. W., Camarena, V., Van Booven, D., Andrade, N. S., Mustafi, S., Wang, G., 2021, Vitamin C regulates Schwann cell myelination by promoting DNA demethylation of pro-myelinating genes. *Journal of neurochemistry*, *157* (6), 1759-1773.

Igney, F.H. and Krammer, P.H., 2002, Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, *Nature reviews cancer*, *2*, 277-288.

Kabel, A.M., 2014, Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition, *World journal of nutrition and health*, 2 (3), 35-38

Karabulut, H. ve Gülay, M.Ş., 2016, Serbest radikaller, *Mehmet akif ersoy üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü dergisi*, 4 (1).

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer*, 26 (4), 239-257.

Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., 2017, Risks for public health related to the presence of furan and methylfurans in food, *EFSA journal*, 15 (10), p.e05005.

Koç, M., 2007, *Ratlarda indometazin ile oluşturulan gastrik hasara karşı askorbik asitin gastroprotektif etkilerinin ve bu etkilerin antioksidant sistem ile ilişkisinin belirlenmesi*, Tez (Yüksek lisans), Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Kökoğlu, E. ve Alturfan, A.A., 2010, *Vitaminler ve vitamin benzeri biyomoleküller*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 978-975-420-737-8.

Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P.H., 2005, Death receptor signaling, *Journal of cell science*, 15, 265-7.

Lotem, J. and Sachs, L., 1995, Regulation of bcl-2, bcl-X~L and bax in the control of apoptosis by hematopoietic cytokines and dexamethasone, *Cell growth and differentiation-publication american association for cancer research*, 6 (6), 647-654.

Maga, J.A. and Katz, I., 1979, Furans in foods, *Critical reviews in food science & nutrition*, 11 (4), 355-400.

Mariotti, M.S., Granby, K., Rozowski, J., Pedreschi, F., 2013, Furan: a critical heat induced dietary contaminant, *Food & function*, 4 (7), 1001-1015.

Martinvalet, D., Zhu, P., Lieberman, J., 2005, Granzyme A induces caspase in dependent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis, *Immunity*, 22, 355–70.

Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., De Castro, I.N., 1999, Antioxidant enzymes and human diseases, *Clinical biochemistry*, 32 (8), 595-603.

McDowell, L.R., 1989, *Vitamins in animal nutrition*, Animal Feeding and Nutrition, In: Cunha T.J. (ed.), Academic Press, SanDiago.

Minorczyk, M., Starski, A., Jedra, M., Gawarska, H., Sawilska-Rautenstrauch, D., 2011, Studies on the occurrence of furan in food for infants by gas chromatography with mass spectrometry method, *Roczniki panstwowego zakladu higieny*, 62 (3), 283-288.

Mogol, B.A., and Gökmen, V., 2016, Thermal process contaminants: Acrylamide, chloropropanols and furan, *Current opinion in food science*, 7, 86–92.

Moro, S., Chipman, J.K., Wegener, J.W., Hamberger, C., Dekant, W., Mally, A., 2012, Furan in heat-treated foods: Formation, exposure, toxicity, and aspects of risk assessment, *Molecular nutrition & food research*, 56 (8), 1197-1211.

Mouhannad, A.L., Baqir, S.J., Aowda, S.A., Hussein, F.A., Alasedi, M.K., 2010, Determination of vitamin c (ascorbic acid) concentration in some of commercial products, by redox titration, *Journal of babylon university/pure and applied science*, 3 (18), 1-4.

Naghii, M.R., 2002, Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants, *Military medicine*, 167 (7), 573-575.

National Toxicology Program, 1993, Toxicology and carcinogenesis studies of furan (CAS No. 110-00-9) in F344 rats and B6C3F1 mice (gavage studies), *National toxicology program technical report series*, 402, 1-286.

Nayanatara, A.K., Vinodini, N.A., Damodar, G., Ahemed, B., Ramaswamy, C.R., Shabarinath, M., Bhat, M.R., 2008, Role of ascorbic acid in monosodium glutamate mediated effect on testicular weight, sperm morphology and sperm count, in rat testis, *Journal of chinese clinical medicine*, 3 (1), 1-5.

Nicotera, P. and Orrenius, S., 1986, Role of thiols in protection against biological reactive intermediates, *Advances in experimental medicine and biology*, 197, 41–51.

Noori, S., 2012, An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system, *Open access scientific reports*, 1 (8), 1-9

Orrenius, S., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., 2015, Calcium and mitochondria in the regulation of cell death, *Biochemical and biophysical research communications*, 460, 72–81

Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z., 2015, Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA, *Journal of clinical and experimental ınvestigations*, 6 (3), 331-336.

Prasad, A.S., 2008, Zinc deficiency, *British medical journal*, 326, 409–410.

Redza-Dutordoir, M. and Averill-Bates, D.A., 2016, Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species, *Biochimica et biophysica acta (bba)-molecular cell research*, 1863 (12), 2977-2992.

Rehman, H., Jahan, S., Ullah, I., Winberg, S., 2019, Toxicological effects of furan on the reproductive system of male rats: An “in vitro” and “in vivo"-based endocrinological and spermatogonial study. *Chemosphere*, *230*, 327-336.

Rehman, H., Jahan, S., Ullah, I., Thörnqvist, P. O., Jabbar, M., Shoaib, M., John, N., 2020, Effects of endocrine disruptor furan on reproductive physiology of Sprague Dawley rats: an F1 Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study (EOGRTS). *Human & experimental toxicology*, *39* (8), 1079-1094.

Reilly, P.M., Schiller, H.J., Bulkley, G.B., 1991, Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites, *The american journal of surgery*, 161, 488-503

Rekha, D.K., Nayanatara, A.K., Ramaswamy, S.R., Sheila, R.P., Ramesh Bhat, M., Venkappa, S.M., 2009, Infertility in male wistar rats induced by cadmium chloride: role of ascorbid acid, *Journal of chinese clinical medicine*, 4 (11), 616-621.

Rietjens, I.M., Boersma, M.G., de Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H., van Zanden, J.J., Woude, H.V.D., Alink, G.M., Koeman, J.H., 2002, The pro-oxidant

chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environmental toxicology and pharmacology*, 11 (3-4), 321-333.

Rizk, N. I., Rizk, M. S., Mohamed, A. S., Naguib, Y. M., 2020,. Attenuation of sleep deprivation dependent deterioration in male fertility parameters by vitamin C. *Reproductive biology and endocrinology*, *18* (1), 1-13.

Sahoo, A., Samanta, L., Chainy, G.B.N., 2000, Mediation of oxidative stress in HCH-induced neurotoxicity in rat, *Archives of environmental contamination and toxicology*, 39 (1), 7-12.

Sakagami, H., Satoh, K., Hakeda, Y., Kumegawa, M., 2000, Apoptosis-inducing activity of vitamin C and vitamin K, *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 46 (1), 129-143.

Seok, Y. and Lee, K., 2019, Analysis of furan in semi-solid and paste type foods, *Food science and biotechnology*, 29, 293–301.

Seok, Y.J., Her, J.Y., Kim, Y.G., Kim, M.Y., Jeong, S.Y., Kim, M.K., Lee, K.G., 2015, Furan in thermally processed foods-a review, *Toxicological research*, 31 (3), 241-253.

Sherratt, P.J. and Hayes, J.D., 2002, *Glutathione S-transferases*, Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics, In: Ioannides C. (ed.), Chapter 9, John Wiley and Sons Ltd, UK, ISBN: 0-471-894-66-4, 319-352.

Szent-Gyorgi, A., 1928, Observations on the function of the peroxidase systems, *Biochemical journal*, 22, 1387-1409.

Tabakoğlu, E. ve Durgut, R., 2013, Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri, *AVKAE dergisi*, 3 (1), 69-75.

To, P.K., Do, M.H., Cho, J.H., Jung, C., 2020, Growth modulatory role of zinc in prostate cancer and application to cancer therapeutics, *International journal of molecular sciences*, 21 (8), 2991.

Usta, B. and Yılmaz-Ersan, L., 2013, Antioxidant enzymes of milk and their biological effects, *Ziraat fakültesi dergisi*, Uludağ Üniversitesi, 27 (2), 123-130

Vallee, B.L. and Falchuk, K.H., 1993, The biochemical basis of zinc physiology, *Physiological reviews*, 73, 79-118.

Zhang, Y., LI, W., Chı, H.S., Chen, J., Denbesten, P.K., 2007, JNK/c-Jun signaling pathway mediates the fluoride-induced down-regulation of MMP-20 in vitro, *Matrix biology*, 26, 633-641.

Zilva, S.S., 1932, Hexuronic acid as the antiscorbutic factor, *Nature*, 129, 690.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ziya DUMANOĞLU
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokunun.
Uyruğu	☑ T.C. ☑ Diğer: Suriye
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Damascus Üniversitesi
Fakülte	Fen Bilimleri
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	19.05.2017

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Zooloji

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler