

## Kronik Flor Toksikasyonu Oluşturulan Farelerde Testis Dokusundaki Oksidatif Hasar Üzerine Panax ginseng'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Ali KARADENİZ \*  Nejdet ŞİMŞEK \*\* Feride KOÇ \*\*\* Harun ALP \*\*\*\*

- \* Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum - TÜRKİYE  
\*\* Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzurum - TÜRKİYE  
\*\*\* Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Erzurum - TÜRKİYE  
\*\*\*\* Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara-TÜRKİYE

Yayın Kodu (Article Code): 2008/23-A

### Özet

Bu araştırma kronik flor zehirlenmesinin fare testis dokusundaki zararlı etkilerine karşı Panax ginseng'in (PG) koruyucu özelliklerinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada toplam 40 adet yetişkin erkek Swiss albino fare her grupta 10 adet olacak şekilde rastgele 4 eşit gruba ayrıldı. Bu gruplar; kontrol (grup K, normal içme suyu), flor (grup F, 40 mg F/lt/gün flor), flor + Panax ginseng (grup F+PG, 40 mg F/lt/gün flor + 100 mg/kg/gün PG) ve Panax ginseng (grup PG, 100 mg/kg/gün PG) olarak ayrıldı. Otuz gün süren deney süresinin sonunda fareler servikal dislokasyonla öldürüldü. Testis dokusu malondialdehit (MDA) düzeyi, glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri araştırıldı. Aynı zamanda testis dokusunda meydana gelen histolojik değişiklikler incelendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grup F'deki farelerin testis dokusundaki MDA düzeylerinin arttığı, GSH, GSHPx ve SOD aktivitelerinin azaldığı ( $P<0.05$ ), tubulus seminiferus kontortus duvarındaki hücre bütünlüğünün bozulduğu ve epididimal kanal lümeninde spermatozoon yoğunluğunun azaldığı da tespit edildi. Florun etkisini azaltmak için uygulanan PG'in GSH, GSHPx ve SOD aktivitelerindeki azalmayı ve MDA düzeyindeki artışı önemli oranda engellediği saptandı ( $P<0.05$ ). Ayrıca, florun neden olduğu dejeneratif değişiklikler ve spermatozoon yoğunluğundaki azalmalar PG uygulaması ile düzeldiği belirlendi. Sonuç olarak, farelerin testis dokusunda florun lipit peroksidasyonu artırarak spermatogenezisi etkileyebileceği, PG uygulaması ile bu hasarın azaltılabileceği tespit edildi.

**Anahtar sözcükler:** Flor, Panax ginseng, Lipit peroksidasyon, Antioksidan aktivite, Testis, Fare

## The Investigation of Protective Effects of the Panax ginseng on Oxidative Damage Induced by Chronic Fluoride Toxicity in Mice Testis Tissue

### Summary

The aim of this study was to investigate the effects of Panax ginseng (PG) on antioxidant activity in testis tissue of healthy mice. In the study, totally 40 adult male Swiss albino mice were randomly divided into 4 equal groups; each group containing 10 mice. These groups were divided as control (group K, only drinking water), fluoride (group F, 40 mg F/lt/day fluoride), fluoride + Panax ginseng (group F+PG, 40 mg F/lt/day fluoride +100 mg/kg/day PG) and Panax ginseng (group PG, 100 mg/kg/day PG). At the end of the experimental period (30 days), the mice were sacrificed by cervical dislocation. Lipid peroxidation (malondialdehyde, MDA), the activities of glutathione (GSH), glutathione-peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) activities were investigated in testis tissues. Also were examined histological changes occurred in testes tissue. In fluoride treated mice were observed significant increases in MDA levels and marked decreases in GSH, GSH-Px and SOD activities ( $p<0.05$ ), and was determined damage of cell integrity in wall of tubuli seminiferous contorti and decrease to density of spermatozoon in epididymal lumen in compared to the control group. Panax ginseng treatment was significantly blocked the increases of MDA level and the decreases of GSH, GSH-Px and SOD activities ( $P<0.05$ ). Also, the degenerative changes and the decreases of spermatozoon density induced by fluoride administration were ameliorated with PG treatments. As a result, fluoride may affect spermatogenesis by enhancing lipid peroxidation, and this injury can be decreased with PG treatment.

**Keywords:** Fluoride, Panax ginseng, Lipid peroxidation, Antioxidant activity, Testis, Mouse

 İletişim (Correspondence)

 +90 442 631 41 93

 karadenizali@gmail.com

## GİRİŞ

Flor vücut için gerekli temel elementlerden bir tanesi olup başlıca kemik ve dişlerde depolanmaktadır. Günlük olarak besinlerle ve içme sularıyla vücuda alınan bu elementin miktarı güvenlik eşiğini aşacak olursa florozis olarak bilinen kronik flor zehirlenmesi oluşmaktadır<sup>1</sup>. Akut flor zehirlenmesinde başlıca mide, bağırsak, akciğer, kalp, beyin ve sinir sisteminde görülen hasara ilaveten<sup>2</sup>, kronik flor zehirlenmesinde de özellikle iskelet sistemi, böbrek, tiroit bezi, diş ve testislerdeki bozukluklar dikkat çekmektedir<sup>2,3</sup>. Flor toksikasyonlarına bağlı olarak aşırı miktarda serbest oksijen türlerinin üretilmesi hücrelerde oksidasyon artışına, antioksidan savunma sisteminde azalmaya ve sonuçta DNA hasarına yol açmaktadır<sup>4,5</sup>. Örneğin Shanthakumari ve ark.<sup>6</sup>, 25 ppm/gün dozunda 16 hafta boyunca içme suyu ile flor uygulanan ratlarda antioksidanlardan olan glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSHPx) süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitelerinin azaldığını, lipid peroksidasyonunu ise arttığını tespit etmişlerdir.

Reproduktif fonksiyonlar üzerine florun etkisiyle ilgili çalışmalar oldukça az olmakla birlikte insanlar ve deneme hayvanlarında özellikle doğum oranında azalmaya, düşük doğum ağırlıklı yavrulara<sup>7,8</sup>, üreme fonksiyonlarında düzensizliklere, fertilitenin azalmasına, sperm kalitesinde ve sayısında azalmaya da neden olduğu bildirilmektedir<sup>8,9</sup>.

Flor ile ilgili yapılan son çalışmalarda yine serbest oksijen türlerinin karaciğer, böbrek, beyin ve testislerde hücresel hasara neden oldukları bildirilmektedir<sup>5,10,11</sup>. Florun neden olduğu bu organ hasarlarının engellenmesi için antioksidan etkilerinden faydalanmak amacıyla vitamin C<sup>10</sup>, amarant yağı<sup>11</sup> ile selenyum, bakır ve magnezyum<sup>12</sup> gibi minerallerle çalışmalar yapılmıştır. Uzun yıllardır Asya'da sağlıklı ve uzun yaşam amacıyla kullanılan bir bitki olan Panax ginseng (PG) günümüzde kanser önleyici, karaciğer, böbrek ve kalp koruyucu, antidiyabetik ve immunstimulator etkilerinden faydalanmak amacıyla oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>13-15</sup>. Ayrıca, PG ile yapılan pek çok çalışma, serbest radikalleri engelleyici ve güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu da bildirilmektedir<sup>15-17</sup>.

Pestisidler, insektisitler, diş sağlığını güçlendiriciler, diş macunları, ağız temizleyici solüsyonlar, aşırı miktarda flor içeren sularla hazırlanmış içecekler ve gıdalar florun vücutta birikerek toksikasyona sebep olduğu kaynaklardandır<sup>7</sup>. Günümüzde birçok kimyasal maddenin zararlı etkilerinden korunmak için antioksidanlardan zengin gıdaların tüketilmesi önerilmektedir. Bu çalışmada da, florun testis dokusunda meydana getirdiği oksidatif hasarın engellenmesinde PG'in koruyucu etkisinin histometrik ve biyokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Hayvanlar, Bakım ve Besleme

Çalışmada ortalama 25-30 gr ağırlığında olan 40 adet, sağlıklı, erişkin, erkek Swiss albino ırkı fare kullanıldı. Fareler denemelere başlamadan 7 gün önce her biri 5'er hayvan içeren kafeslere ayrılarak grupların günlük ortalama yem ve su tüketimleri belirlendi. Hayvanların laboratuvar şartlarında 12 saat aydınlık/karanlık periyodunda ve oda sıcaklığında (21±3°C) barınmaları sağlandı. Çalışmada kullanılan hayvanlar ve uygulanacak deneyler Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı.

### Çalışma Prosedürü

Çalışmada Akdoğan ve ark.<sup>18</sup>'nin bildirdikleri metoda uygun olarak 5 gr F/lt flor (sodyum florür olarak) iyonu içeren stok solüsyon hazırlanarak +4°C'de muhafaza edildi ve her hafta yenilendi. Bu stok solüsyon 1:125 oranında dilüe edilerek 40 mg F/lt/gün konsantrasyonunda flor içeren içme suları günlük olarak verildi. Fareler her grupta 10 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (grup K) herhangi bir uygulama yapılmaksızın normal içme suyu, flor grubuna (grup F) 40 mg F/lt/gün flor, flor + Panax ginseng grubuna (grup F+PG) 40 mg F/lt/gün flor + 100 mg/kg/gün PG ve Panax ginseng grubuna (grup PG) ise 100 mg/kg/gün PG içme suyuna katılarak 30 gün süreyle verildi. Çalışmada kullanılan florun derişimi Shayia ve ark.<sup>5</sup>, Panax ginseng ise Song ve ark.<sup>11</sup> nın yaptıkları çalışmalardan uyarlanmıştır. Çalışmada kullanılan sodyum florür (NaF) Merck (Kat. No. 6441), Panax ginseng (C.A. Meyer) Sağlık ve Güzellik Merkezi (Ankara)'nden alınmıştır.

Deneme süresinin sonunda farelere eter anestezi uygulanarak servikal dislokasyonla öldürüldü ve testislerden birisi biyokimyasal, diğeri ise histolojik değerlendirmeler için alındı. Biyokimyasal analizler için alınan testis örnekleri serum fizyolojikle yıkandıktan sonra analiz edilinceye kadar  $-20^{\circ}\text{C}$  de muhafaza edildi.

### Biyokimyasal analizler

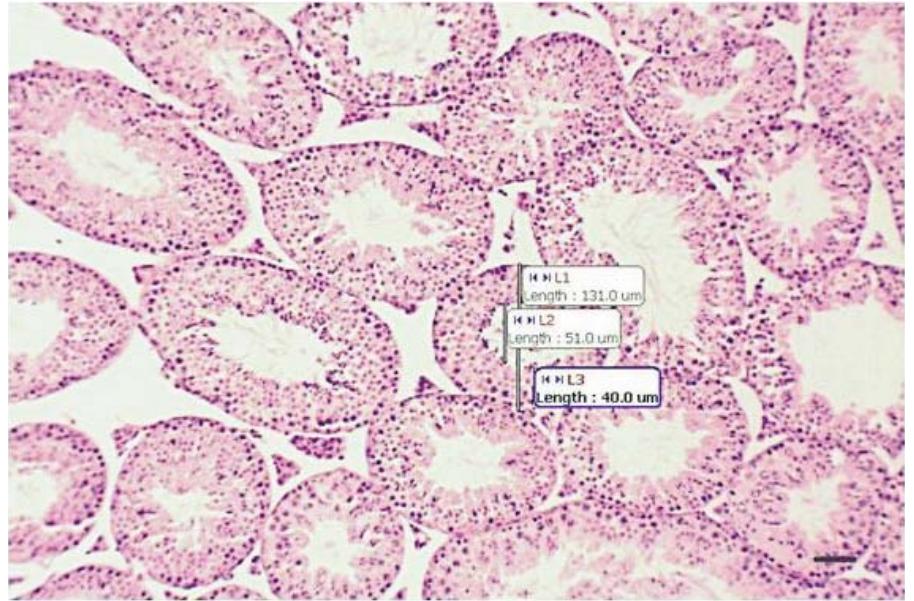
Biyokimyasal analizler için elde edilen testis dokusundan bir parça alınarak izotonik sodyum klorür ile sulandırıldı ve homojenizatör (OMNI TH International homogenizer, Warrenton, VA, USA) kullanılarak homojenize edildi. Testis

modifiye edilen Mallory'nin Triple boyaması uygulandı<sup>23</sup>. Elde edilen preparatlar ışık mikroskop altında incelendi. Değerlendirmede tubulus seminiferus kontortus (TSK), kaput epididimis, korpus epididimis ve kauda epididimis kanallarındaki hücre bütünlüğü ve lümenlerindeki spermatozoon yoğunluğu dikkate alındı. TSK ve epididimal kanalların çapları, epitel yükseklikleri ve luminal çaplarının yarı-kantitatif ölçümü amacıyla her bir hayvandan alınan kesitler (10'luk objektif altında rastgele 15 adet yuvarlak TSK ve epididimal kanallar) Motic Images Plus 2.0 ML (Motic China Group CO. LTD. Copyright 2001-2004) analiz programı aracılığıyla  $\mu\text{m}$  olarak ölçüldü (Şekil 1).

**Şekil 1.** Motic Images Plus 2.0 ML analiz programı aracılığıyla tubulus çapı, epitel yüksekliği ve lümen çapının  $\mu\text{m}$  olarak ölçümü. L1: Tubulus çapı, L2: Lümen çapı, L3: Epitel yüksekliği. Triple boyama. X Bar: 44

**Fig 1.** The measures ( $\mu\text{m}$ ) of the tubules diameter, epithelium height and lumen diameter by Motic Images Plus 2.0 ML analysis programme.

L1: Tubules diameter, L2: Lumen diameter, L3: Epithelium height. Triple stain. X Bar: 44



dokusundaki malondialdehit (MDA) düzeyi Ohkawa ve ark.<sup>19</sup>'nın tanımladığı spektrofotometrik yöntemle göre belirlenerek elde edilen sonuçlar nmol/g olarak ifade edildi. Glutasyon düzeyleri Anderson<sup>20</sup>'un belirttiği şekilde  $\mu\text{mol/g}$  olarak, GSH-Px aktivitesi Habig ve Jakoby<sup>21</sup>, SOD aktivitesi ise Sun ve ark.<sup>22</sup>'nin bildirdikleri şekilde spektrofotometre ile belirlenerek U/g olarak ifade edildi.

### Histolojik inceleme

Histolojik değerlendirmeler için alınan testis dokusu Bouin tespit solusyonunda 18 saat tespit edildikten sonra dereceli alkoller ve ksilolden geçirilerek paraplastla bloklandı. Dokulardan alınan 5  $\mu\text{m}$  kalınlığındaki kesitlere organın genel yapısını belirlemek için Crossman tarafından

### İstatistiksel Analiz

Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. İstatistiksel analizler SPSS 15.0 paket programıyla yapıldı. Gruplar arasındaki farklılığı ortaya koymak amacıyla Varyans analizi ve Duncan testleri yapıldı.

### BULGULAR

#### Biyokimyasal bulgular

Sunulan bu araştırmada kronik flor toksikasyonunun neden olduğu testis dokusundaki biyokimyasal ve histolojik değişikliklerin PG uygulamasıyla engellenebileceği tespit edildi. Gruplara ait biyokimyasal veriler *Tablo 1*'de



görülmektedir. Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki MDA seviyeleri karşılaştırıldığında sadece PG verilen grupta önemli bir değişiklik görülmezken, grup F ve grup F+PG'de bu seviyenin önemli oranda arttığı saptandı ( $P<0.05$ ). Gruplar arasındaki antioksidan düzeyleri karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre grup F'deki GSH ve GSH-Px aktivitelerinin azaldığı, diğer deney gruplarında ise bu değerlerde önemli bir değişikliğin olmadığı tespit edildi ( $P<0.05$ ). Bununla birlikte, grup F ile grup F+PG karşılaştırıldığında, F+PG grubunda GSH, GSH-Px ve SOD düzeylerinin artmış olduğu da görüldü.

**Tablo 1.** Farelerin testis dokusundaki MDA konsantrasyonu ile GSH, GSHPx ve SOD aktivite düzeyleri ( $n=10$ )

**Table 1.** The concentration of MDA and the levels of GSH, GSHPx and SOD activities in testis tissue of mice ( $n=10$ )

| Parametre    | Gruplar                   |                           |                           |                           |
|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|              | K                         | F                         | F + PG                    | PG                        |
| MDA (nmol/g) | 70.40±5.00 <sup>c</sup>   | 180±7.50 <sup>a</sup>     | 100±10.20 <sup>b</sup>    | 65.80±8.20 <sup>c</sup>   |
| GSH (µmol/g) | 25.50±2.20 <sup>a</sup>   | 13.35±4.50 <sup>c</sup>   | 22.50±3.80 <sup>ab</sup>  | 27.30±3.50 <sup>a</sup>   |
| GSHPx (U/g)  | 10.45±2.50 <sup>a</sup>   | 6.45±1.30 <sup>c</sup>    | 9.25±1.80 <sup>ab</sup>   | 11.80±2.70 <sup>a</sup>   |
| SOD (U/g)    | 202.55±10.70 <sup>a</sup> | 150.20±15.30 <sup>c</sup> | 185.50±10.20 <sup>b</sup> | 210.50±12.50 <sup>a</sup> |

**a,b,c** Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel önemi göstermektedir ( $P<0.05$ ). MDA: Malondialdehit, GSH: Glutatyon, GSH-Px: Glutatyon-peroksidaz, SOD: Süper Oksit Dismutaz

## Histolojik bulgular

Kontrol grubu ve deneme gruplarına ait TSK, kaput epididimis, korpus epididimis, ve kauda epididimis'in yarı-kantitatif ölçüm sonuçları *Tablo 2*'de gösterilmiştir.

Kontrol grubu farelerin testisinde TSK duvarını ökromatik çekirdekli sertoli hücreleri ve spermatogenetik hücrelerin farklı formlarının (spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermiumlar) oluşturduğu görüldü (*Şekil 2*). Yarı-kantitatif ölçümlerde kontrol grubunun TSK çapı 132.86 µm, TSK epitel yükseklikleri 34.52 µm, TSK lümen çapı ise 70.46 µm olduğu belirlendi (*Tablo 2*).

Deneme gruplarından flor uygulanan grup F'deki ratların testislerinde özellikle tunika albugineya komşu bazı TSK'ların duvarında spermatogonyumlarla birlikte diğer spermatogenetik hücre bütünlüklerinin bozulduğu (*Şekil 2*), TSK çaplarının kontrol grubuna göre az da olsa

daraldığı (127.95 µm) tespit edildi. Ayrıca, kaput epididimisteki duktuli eferentis testis lümeninde nadiren spermatozoon bulunduğu, kanal çaplarının (81.93 µm), epitel yüksekliğinin (22.28 µm) ve luminal çapın (37.37 µm) kontrol grubuna göre (sırasıyla, 70.23 µm, 18.03 µm, 34.16 µm) daha fazla olduğu da gözlemlendi (*Tablo 2*,  $P<0.05$ ). Korpus ve kauda epididimisi oluşturan kanal çaplarının, luminal çapların ve spermatozoon yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığı belirlenirken (*Tablo 2*, *Şekil 3* ve *Şekil 4*,  $P<0.05$ ), duktus epididimisin başlangıç, orta ve son bölümünde epitel yüksekliğinin kontrol grubundan

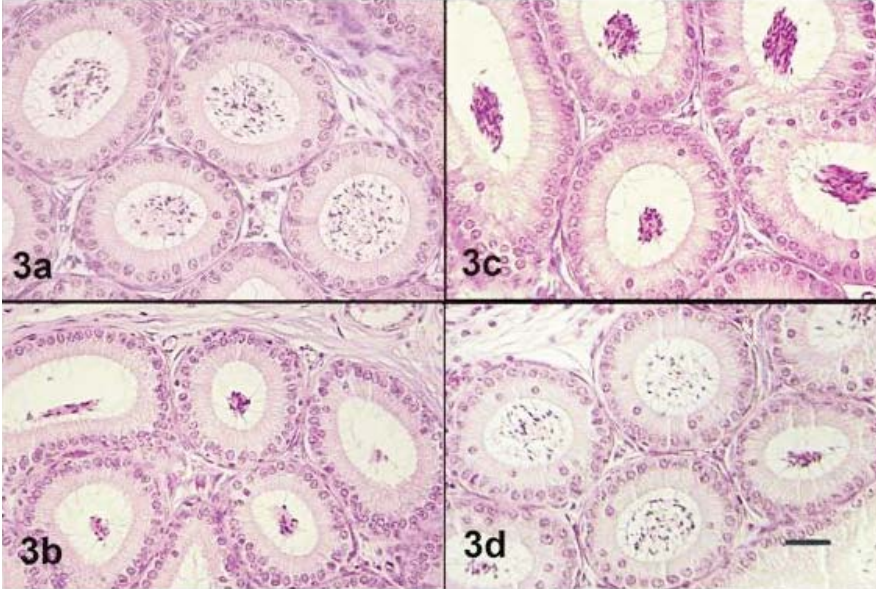
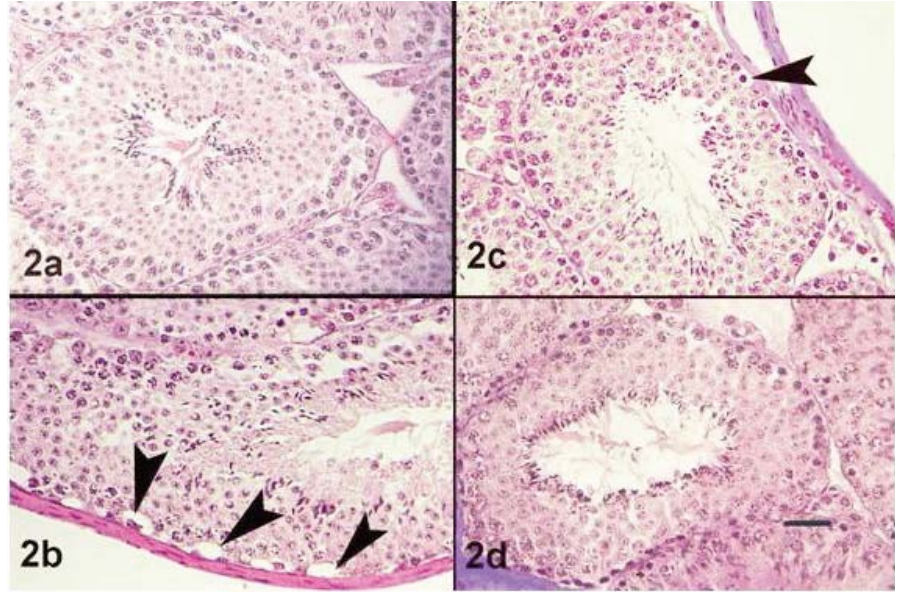
daha fazla olduğu da gözlemlendi (*Tablo 2*,  $P<0.05$ ).

Flor ile beraber PG uygulanan F+PG grubundaki ratların testislerinde TSK duvarındaki hücrelerin kontrol grubuna benzediği (*Şekil 2*), epididimal kanallardaki spermatozoon yoğunluğunun ise sadece flor verilen gruba göre daha fazla olduğu tespit edildi (*Şekil 3* ve *Şekil 4*). Bu grubun yarı-kantitatif ölçümlerinde TSK çapları, epitel yüksekliği ve luminal çapların flor grubuna göre daha fazla olduğu, kaput epididimis çapı fazla değişmezken, korpus ve kauda epididimis çapının arttığı belirlendi (*Tablo 2*,  $P<0.05$ ). Bu kanallarda epitel yüksekliğinin azalıp luminal çapın artışıyla birlikte daha fazla spermatozoon içerdiği de gözlemlendi.

Sadece PG uygulanan grupta ise TSK ve kaput epididimis kanal çapının kontrol grubuna göre önemli bir fark içermediği, ancak korpus ve kauda epididimis kanal çaplarının kontrol grubuna göre daha fazla olduğu tespit edildi (*Tablo 2*,  $P<0.05$ ).

**Şekil 2.** Kontrol ve deneme gruplarına ait tubulus seminiferus kontortuslar. 2a: Kontrol grubu, 2b: Flor grubu, 2c: Flor + Panax ginseng grubu, 2d: Panax ginseng grubu. Degeneratif hücreler (ok başları). Triple boyama. X Bar: 29

**Fig 2.** Tubules seminiferous contortus in control and experimental groups. 2a: Control group, 2b: Fluoride group, 2c: Fluoride + Panax ginseng group, 2d: Panax ginseng group. Degenerative cells (arrow heads). Triple stain. X Bar: 29

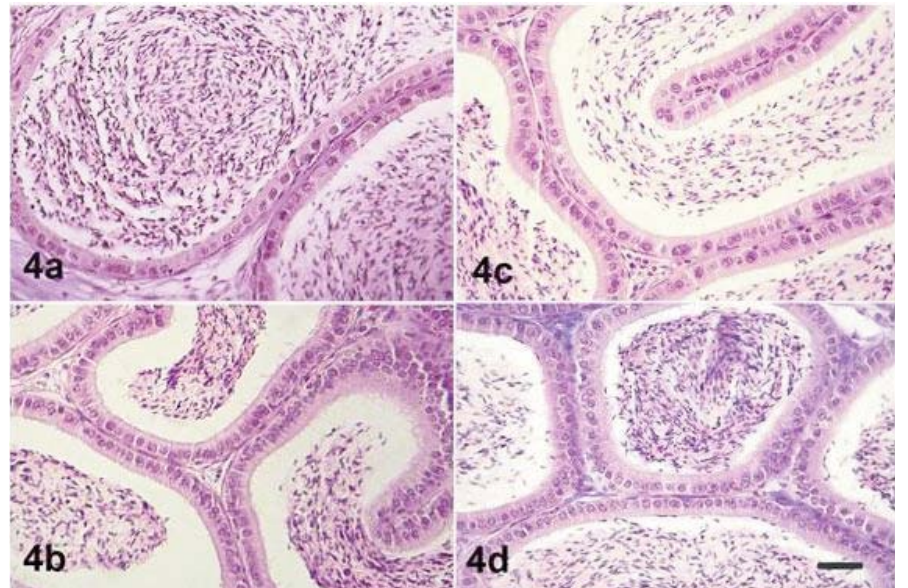


**Şekil 3.** Kontrol ve deneme gruplarına ait kaput epididimisler. 3a: Kontrol grubu, 3b: Flor grubu, 3c: Flor + Panax ginseng grubu, 3d: Panax ginseng grubu. Triple boyama. X Bar: 27

**Fig 3.** Caput epididymis in control and experimental groups. 3a: Control group, 3b: Fluoride group, 3c: Fluoride +Panax ginseng group, 3d: Panax ginseng group.

**Şekil 4.** Kontrol ve deneme gruplarına ait kauda epididimisler. 4a: Kontrol grubu, 4b: Flor grubu, 4c: Flor + Panax ginseng grubu, 4d: Panax ginseng grubu. Triple boyama. X Bar: 27

**Fig 4.** Cauda epididymis in control and experimental groups. 4a: Control group, 4b: Fluoride group, 4c: Fluoride +Panax ginseng group, 4d: Panax ginseng group. Triple stain. X Bar: 27





**Tablo 2.** Kontrol ve deney gruplarında tubulus seminiferus kontortus ve epididimis kanallarının çapları, epitel yükseklikleri ve lumen çaplarının yarı-kantitatif ölçümü ( $\mu\text{m}$ ) ( $n=10$ )**Table 2.** The semi-quantitative measurements of diameters, epithelium heights and luminal diameters of tubulus seminiferus contortus and epididymal ducts in control and experimental groups ( $\mu\text{m}$ ) ( $n=10$ )

| Dokular ve Bölümleri          |     | Gruplar                   |                          |                          |                          |
|-------------------------------|-----|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                               |     | K                         | F                        | F + PG                   | PG                       |
| Tubulus Seminiferus Kontortus | TÇ  | 132.86±2.99 <sup>bc</sup> | 127.95±2.37 <sup>c</sup> | 152.32±2.87 <sup>a</sup> | 136.04±2.22 <sup>b</sup> |
|                               | TEY | 34.52±1.85 <sup>ab</sup>  | 31.2±2.16 <sup>b</sup>   | 37.82±3.23 <sup>a</sup>  | 40.99±1.08 <sup>a</sup>  |
|                               | TLÇ | 70.46±2.91 <sup>a</sup>   | 58.90±1.18 <sup>b</sup>  | 76.68±2.28 <sup>a</sup>  | 54.06±2.71 <sup>b</sup>  |
| Epididimis Kaput              | TÇ  | 70.23±0.87 <sup>b</sup>   | 81.93±1.00 <sup>a</sup>  | 83.28±1.59 <sup>a</sup>  | 67.97±1.28 <sup>b</sup>  |
|                               | TEY | 18.03±2.34 <sup>b</sup>   | 22.28±1.25 <sup>a</sup>  | 18.36±2.84 <sup>b</sup>  | 15.48±3.27 <sup>b</sup>  |
|                               | TLÇ | 34.16±1.17 <sup>b</sup>   | 37.37±0.84 <sup>b</sup>  | 46.56±1.92 <sup>a</sup>  | 37.00±1.57 <sup>b</sup>  |
| Epididimis Korpus             | TÇ  | 88.44±2.13 <sup>b</sup>   | 70.50±1.47 <sup>d</sup>  | 99.30±1.96 <sup>a</sup>  | 78.08±1.56 <sup>c</sup>  |
|                               | TEY | 15.61±1.21 <sup>a</sup>   | 18.33±3.85 <sup>b</sup>  | 15.20±1.57 <sup>a</sup>  | 15.18±1.77 <sup>a</sup>  |
|                               | TLÇ | 51.22±1.44 <sup>b</sup>   | 39.84±1.48 <sup>c</sup>  | 54.25±4.06 <sup>b</sup>  | 62.90±1.92 <sup>a</sup>  |
| Epididimis Kauda              | TÇ  | 111.46±3.14 <sup>a</sup>  | 84.33±2.64 <sup>d</sup>  | 91.19±2.31 <sup>c</sup>  | 99.74±0.91 <sup>b</sup>  |
|                               | TEY | 14.92±2.45 <sup>ab</sup>  | 15.71±1.98 <sup>a</sup>  | 14.63±3.28 <sup>ab</sup> | 13.60±2.13 <sup>b</sup>  |
|                               | TLÇ | 81.62±1.53 <sup>a</sup>   | 52.90±2.59 <sup>d</sup>  | 61.92±1.71 <sup>c</sup>  | 72.54±1.03 <sup>b</sup>  |

<sup>a,b,c,d</sup> Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel önemi göstermektedir ( $P<0.05$ ). **Grup K:** kontrol grubu, **Grup F:** 40 mg F<sup>-</sup>/lt/gün flor, **Grup F+PG:** 40 mg F<sup>-</sup>/lt/gün flor + 100 mg/kg/gün Panax ginseng, **Grup PG:** 100 mg/kg/gün Panax ginseng, **TÇ:** tubulus çapı, **TEY:** tubulus epitel yüksekliği, **TLÇ:** tubulus lumen çapı (Yarı-kantitatif ölçümler 10'luk objektif altında Motoc Images Plus 2.0 ML analiz programı ile  $\mu\text{m}$  olarak yapılmıştır)

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Florun karaciğer, böbrek, beyin ve testis gibi pek çok dokuda hücre hasara neden olduğu bildirilmektedir<sup>5</sup>. Florozisin organlar üzerinde meydana getirdiği bu hasarlarda özellikle hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve süperoksit ( $\text{O}_2^-$ ) başta olmak üzere pek çok serbest oksijen türleri<sup>24</sup> ve lipid peroksidasyonu etkili olmaktadır<sup>25</sup>. Shivarajashankara ve ark.<sup>26</sup> endemik florozisli bölgelerdeki 3-10 yaş arası çocukların kan plazması ile deneysel kronik florozis oluşturdukları ratların beyin<sup>27</sup> ve karaciğer<sup>28</sup> dokularındaki MDA düzeylerini kontrol grubuna göre önemli oranda yüksek tespit etmişlerdir. Kumari ve Rao<sup>29</sup> da yine kronik floroziste alyuvarlarda lipid peroksidasyon düzeyinin arttığını bildirmişlerdir. Floroziste şekillenen testiküler hasarın mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte aşırı miktarda oluşan serbest oksijen türlerinin testis dokusunda oksidatif hasara neden olabileceği bildirilmektedir<sup>30</sup>. Bu çalışmada da lipid peroksidasyon belirteci olan MDA, kontrol grubuna göre flor grubunda oldukça yüksek bulunmuştur. Bu durum florun testis dokusunda serbest oksijen türlerinin artmasına neden olduğuna işaret etmektedir.

Serbest radikaller hücre yapısında bulunan lipid, protein, karbonhidratlar ve hatta DNA'ya etki ederek hücre yapısının bozulmasına neden olurlar. Serbest oksijen türlerinin hücre içerisinde fazla miktarda oluşması durumunda hücreler kendine ait antioksidan enzimleri (GSH, GSHPx ve SOD) kullanarak savunma mekanizması oluştururlar<sup>4</sup>. Hücre metabolizmasının ve bütünlüğünün sağlanması için GSH'ya<sup>31</sup>, mitokondri ve sitosolde oluşan lipid peroksidasyonun engellemesi için Mn-SOD ve Cu, Zn-SOD'a<sup>32</sup>, hücre membranında meydana gelen zincirleme lipid peroksidasyonunun sonlandırılması için ise GSHPx'e ihtiyaç vardır<sup>33</sup>. Flor toksikasyonu oluşturulan ratların beyin dokusunda GST, SOD ve CAT düzeylerinin azaldığı<sup>34</sup>, yine endemik florozisli bölgelerde yaşayan insanların kan plazmasında ise SOD ve GSHPx gibi antioksidan enzim aktivitelerinin düşük olduğu bildirilmektedir<sup>35</sup>. Çalışmamızda, flor uygulanan farelerin testis dokusu GSH, SOD ve GSHPx düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli oranda düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar florun meydana getirdiği oksidatif hasarın engellenmesi için testis dokusunda bulunan GSH, SOD ve GSHPx gibi antioksidan kaynakları kullanılarak tüketildiklerine işaret etmektedir. Benzer şekilde Sarkar ve ark.<sup>36</sup> flor uygulanan ratların testis doku-

sunda GSH, SOD ve GSHPx düzeylerini düşük olarak bildirmektedir.

Sodyum florid (NaF) testis ve epididimis dokusu üzerine germinatif epitelde parçalanma, seminifer tüpçük (TSK)'lerde vakuolizasyon, spermatozoon yoğunluğunda azalma, epididimal kanalda spermatozoon yokluğu ya da azlığı, stereosilyumlarda kayıplara neden olan toksik bir maddedir <sup>37</sup>. Sodyum florid verilen ratlarda TSK çapında ya da histolojik yapısında önemli bir farklılığın olmadığı, spermatogenezin etkilenmediği bildirilse de <sup>9</sup>, endemik florozis görülen bölgelerde pubertanın geciktiği, testosteron seviyesinin azaldığı <sup>38</sup>, sperm sayısında ve motilitesinde azalmaya, kuyruk ve akrozom anormalliklerinin artmasına neden olduğu bildirilmektedir <sup>9</sup>. Çalışmamızdaki bulgular Sprando ve ark.<sup>9</sup>'nın bulgularına benzer olsa da kontrol grubuna göre grup F'de, TSK'un TLÇ'da azalmanın olduğu, TSK duvarındaki spermatogonyumlarda hücre bütünlüğünün kaybolduğu, piknotik çekirdekli ve vakuolize germinatif epitel hücrelerinin bulunduğu saptanmıştır. Aynı grupta, TLÇ'nin azalmasına paralel olarak özellikle, korpus ve kauda epididimis TÇ, TEY, TLÇ'nin azalması (P<0.05) ve epididimal kanalların lumeninde spermatozoon yoğunluğunun kontrol grubuna göre oldukça az görülmesi gibi bulgular florun spermatogenezisi yavaşlattığını ya da engellendiğini göstermiştir.

Panax ginseng'in yapısında bulunan fenolik asitler, flavonidler ve saponinlerin antioksidan aktivite göstermesinde etkili olduğuna inanılmaktadır <sup>39</sup>. Oksidatif stresle ilişkili birçok hasarın engellenmesinde ve tedavisinde PG'in önemli katkılarının olduğu testis <sup>40</sup>, kalp <sup>41</sup>, böbrek <sup>17</sup>, karaciğer <sup>42</sup> ve beyin <sup>43</sup> dokuları üzerine yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Bizim çalışmamızda da sadece flor uygulanan gruba göre F+PG uygulanan grupta testis dokusundaki MDA'nın azaldığı, GSH, SOD ve GSHPx düzeyinin ise önemli oranda arttığı görüldü. Panax ginseng'in antioksidan etkilerinin yanı sıra hücre proliferasyonunun artırılmasında <sup>43</sup>, kanser vakalarında <sup>13</sup>, testiküler düzensizliklerde, erektil sorunların giderilmesinde, seksual isteğin artırılmasında da kullanıldığı bildirilmektedir <sup>44</sup>. Florun oksidatif etkisi sonucu testiste ortaya çıkan hasarın PG'in anti-oksidatif etkisiyle azaldığı yapılan histolojik kesitlerle de belirlenmiştir. Grup F ile F+PG grubunun histometrik ölçümleri karşılaştırıldığında F+PG grubunda

TSK'daki TÇ, TEY ve TLÇ'nin, epididimiste ise özellikle korpus ve kauda TÇ'lerinin artmış olduğu tespit edilmiştir (P<0.05). Ayrıca, PG uygulaması epididimal kanalların lümenlerinde spermatozoon yoğunluğunun arttığı da gözlemlenmiştir. Diğer yandan, grup PG ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise epididimal kanallarda spermatozoon yoğunluğunun artmış olduğu, özellikle epididimisteki korpus ve kauda TÇ'nin azaldığı, diğer ölçümlerde ise önemli bir istatistiksel farklılığın olmadığı tespit edildi. Bu bulgulara göre sağlıklı farelerde PG uygulamanın TSK ve epididimisin histolojik yapısı üzerine pek fazla etki etmediği de saptanmış oldu.

Sonuç olarak, farelerde deneysel florozisin neden olduğu testis dokusundaki histolojik değişiklikler artan lipit peroksidasyonunun bir sonucu olarak meydana gelmiş olabilir. Bu etkileri azaltmak için kullanılan PG'in lipit peroksidasyonu yani MDA'yı baskılayarak, oksidatif etkileri ise GSH, SOD ve GSHPx'i artırarak hücresel zararları azaltabileceği ve spermatogenezisi düzenleyebileceği tespit edildi.

#### KAYNAKLAR

1. **Blood DC, Radostits OM, Henderson JA:** Fluorine poisoning. In: Veterinary Medicine, 6th ed., London, England, 1983.
2. **Kaya S, Akar F:** Metaller ve diğer inorganik ve radyoaktif maddeler. In, Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A (Eds): Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan Yayınevi, Yayın No: 35, Ankara.1998.
3. **Whitford GM:** Acute and chronic fluoride toxicity. *J Dental Res*, 71, 1249–1254, 1992.
4. **Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE:** Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med*, 119, 598–620, 1992
5. **Shayia RM, Raza H, Kidwai AM:** Fluoride and lipid peroxidation: A comparative study in different rat tissues. *Bull Environ Contam Toxicol*, 37, 70–76, 1986.
6. **Shanthakumari D, Srinivasalu S, Subramanian S:** Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology*, 204, 219–228, 2004.
7. **Chinoy NJ, Sequeira E:** Fluoride induced biochemical changes in reproductive organs of male mice. *Fluoride*, 22, 78–85, 1989.
8. **Freni SC:** Exposure to high fluoride concentration in drinking water is associated with decreased birth rates. *J Toxicol Environ Health*, 42, 109–112, 1994.
9. **Sprando RL, Collins TFX, Black T, Olejnik N, Rorie J:** Testing the potential of sodium fluoride to affect spermatogenesis: A morphometric study. *Food Chem. Toxicol*, 36, 1117–1124, 1998.
10. **Verma RJ, Sherlin DM:** Vitamin C ameliorates fluoride-

- induced embryotoxicity in pregnant rats. *Hum Exp Toxicol*, 20 (12): 619–623, 2001.
11. **Konyk UV, Hzhohots'kyi MP, Koval'chuk SM:** Metabolic effect of amaranth oil and impulse hypoxic training under chronic fluoride intoxication and small doses of ionizing radiation. *Fiziol Zh*, 48 (6): 80–85, 2002.
  12. **Han BO, Soon-Seek Y, Pei-Fu W, Hong-Ryul H, Li-Cheng L:** Role of selenium in alteration of erythrocyte parameters in bovine fluorosis. *Asian Australas J Anim Sci*, 19, 865–871, 2006.
  13. **Yun TK, Lee YS, Lee YH, Kim SI, Yun HY:** Anticarcinogenic effect of Panax ginseng C.A. Meyer and identification of active compounds. *J Korean Med Sci*, 16 Suppl: S6–S18, 2001.
  14. **Song JY, Akhalaia M, Platonov A, Kim HD, Jung IS, Han YS, Yun YS:** Effects of polysaccharide ginsan from Panax ginseng on liver function. *Arch Pharm Res*, 27(5): 531–538, 2004.
  15. **Sung J, Han KH, Zo JH, Park HJ, Kim CH, Oh BH:** Effects of red ginseng upon vascular endothelial function in patients with essential hypertension. *Am J Chin Med*, 28, 205–216, 2000.
  16. **Zhang YG, Liu TP:** Protective effects of total saponins of Panax ginseng on ischemia-reperfusion injury in rat brains. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 8, 7–12, 1994.
  17. **Karadeniz A, Yildirim A, Simsek N, Turhan H, Kalkan Y, Celebi F:** Effect of Panax ginseng on gentamicin sulphate-induced kidney toxicity in rats. *Revue Méd. Vét*, 159 (4): 211–216, 2008.
  18. **Akdogan M, Eraslan G, Gultekin F, Sahindokuyucu F, Essiz D:** Effects of fluoride on lipid peroxidation in rabbits. *Fluoride*, 237, 185–189, 2004.
  19. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K:** Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95, 351–358, 1979.
  20. **Anderson ME:** Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*, 113, 548–555, 1985.
  21. **Habig HW, Jakoby WB:** Assay for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol*, 77, 398–405, 1981.
  22. **Sun Y, Oberley LW, Li Y:** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34, 497–500, 1988.
  23. **Bancroft JD, Cook HC:** Manual of Histological Techniques. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1984.
  24. **Ghosh D, Das Sarkar S, Maiti R, Jana D, Das UB:** Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod Toxicol*, 16, 385–390, 2002.
  25. **Reddy GB, Khandare AL, Reddy PY, Rao GS, Balakrishna N, Srivalli I:** Antioxidant defense system and lipid peroxidation in patients with skeletal fluorosis and in fluoride-intoxicated rabbits. *Toxicol Sci*, 72 (2): 363–368, 2003.
  26. **Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, Bhat PG, Rao SH:** Brain lipid peroxidation and antioxidant systems of young rats in chronic fluoride intoxication. *Fluoride*, 35, 197–203, 2002.
  27. **Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, Bhat PG, Rao SH:** Lipid peroxidation and antioxidant systems in the blood of young rats subjected to chronic fluoride toxicity. *Indian J Exp Biol*, 41 (8): 857–860, 2003.
  28. **Shivashankara AR, Shivarajashankara YM, Bhat PG, Rao SH:** Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in liver of rats in chronic fluoride toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol*, 68 (4): 612–616, 2002.
  29. **Kumari DS, Rao PR:** Red cell membrane alterations in human chronic fluoride toxicity. *Biochem Int*, 23 (4): 639–648, 1991.
  30. **Krasovskii GN, Vasukovich LY, Chariev OG:** Experimental study of biological effects of lead and fluoride on spermatogenesis. sodium fluoride to affect spermatogenesis in the rat. *Environ Health Perspect*. 30, 47–51, 1979.
  31. **Naik SR:** Antioxidants and their role in biological functions: an overview. *Indian Drugs*, 40, 501–516, 2003.
  32. **Marklund S, Marklund G:** Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 47, 469–474, 1974.
  33. **Meister A:** New aspects of glutathione biochemistry and transport selective alterations of glutathione metabolism. *Nutr Rev*, 42, 397–400, 1984.
  34. **Vani ML, Reddy KP:** Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice. *Fluoride*, 33 (1): 17–26, 2000.
  35. **Li J, Cao S:** Recent studies on endemic fluorosis in China. *Fluoride*, 27, 125–128, 1994.
  36. **Sarkar SD, Maiti R, Ghosh D:** Management of fluoride induced testicular disorders by calcium and vitamin-E co-administration in the albino rat. *Reprod Toxicol*, 22 (4): 606–612, 2006.
  37. **Chinoy NJ, Shukla S, Swalimbe A, Ahmedabad SB:** Fluoride toxicity on rat testis and cauda epididymal tissue components and its reversal. *Fluoride*, 30, 41–50, 1997.
  38. **Wang YN, Xiao KQ, Liu JL, Dallner G, Guan ZZ:** Effect of long term fluoride exposure on lipid composition in rat liver. *Toxicology*, 146 (2-3): 161–169, 2000.
  39. **Park SN, Choi SW, Boo YC, Kim CK, Lee TY:** Effects of flavonoids of ginseng leaves on erythrocyte membranes against singlet oxygen caused damage. *Korean J Gin Sci*, 14, 191–199, 1990.
  40. **Khalil WK, Ahmed KA, Park MH, Kim YT, Park HH, Abdel-Wahhab MA:** The inhibitory effects of garlic and Panax ginseng extract standardized with ginsenoside Rg3 on the genotoxicity, biochemical, and histological changes induced by ethylenediaminetetraacetic acid in male rats. *Arch Toxicol*, 82 (3): 183–195, 2008.
  41. **Liu L, Shi R, Shi Q, Cheng Y, Huo Y:** Protective effect of saponins from Panax notoginseng against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Planta Med*, 74 (3): 203–209, 2008.
  42. **Karadeniz A, Cemek M, Simsek N:** The effects of Panax ginseng and Spirulina platensis on hepatotoxicity induced by cadmium in rats. *Ecotoxicol Environ Saf*, 72, 231–235, 2009.
  43. **Kim S, Nah SY, Rhim H:** Neuroprotective effects of ginseng saponins against L-type Ca<sup>2+</sup> channel-mediated cell death in rat cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, 365 (3): 399–405, 2008.
  44. **Hong B, Ji YH, Hong JH, Nam KY, Ahn TY:** A double-blind crossover study evaluating the efficacy of korean red ginseng in patients with erectile dysfunction: A preliminary report. *J Urol*, 168, 2070–2073, 2002.