



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.  
2017; 31 (1): 11 - 18  
http://www.fusabil.org

### Trikloretilen Uygulanan Ratsların Over ve Uterus Dokularına Benfotiamin'in Etkileri

Selçuk KAPLAN<sup>1</sup>  
Nalan KAYA<sup>2</sup>  
Tuncay KULOĞLU<sup>2</sup>  
Gökhan ARTAŞ<sup>3</sup>  
Alpaslan AKYOL<sup>4</sup>  
Mehmet ŞİMŞEK<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Malatya Eğitim Araştırma Hastanesi,  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği,  
Malatya, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Fırat Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Patoloji Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>4</sup>Fırat Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>5</sup>Adıyaman Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı,  
Adıyaman, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 24.04.2017  
Kabul Tarihi : 05.06.2017

#### Yazışma Adresi Correspondence

Selçuk KAPLAN  
Malatya Eğitim Araştırma Hastanesi,  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği,  
Malatya - TÜRKİYE

kaplan\_2384@hotmail.com

**Amaç:** Trikloretilen (TCE)'e yaygın kullanımından dolayı çevresel kirlenici olarak yoğun şekilde maruz kalınmaktadır. Birçok çalışmada biyolojik dokular üzerine toksik etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmada TCE uygulanan sıçanların over ve uterus dokularına benfotiamin'in etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada, 24 adet 8-10 haftalık Wistar albino cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Kontrol grubuna deney süresi olan 3 hafta boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. Benfotiamin grubuna Benfotiamin 70 mg/kg/gün, TCE grubuna 1000 mg/kg/gün TCE, TCE+Benfotiamin grubuna ise 1000 mg/kg/gün TCE ile birlikte 70 mg/kg/gün Benfotiamin oral olarak verildi. Deney süresi sonunda tüm gruplardaki sıçanlar anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların over ve uterus dokuları hızla çıkarılıp uygun fixatiflerle tespit edilip ardından histolojik takip serilerinden geçirilip parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan doku kesitlerine Masson-Trikrom boyası yapılarak gruplar arası histopatolojik farklılıklar incelendi. Ayrıca bu kesitlere TUNEL tekniği uygulanarak apoptotik hücreler tespit edildi. Bununla birlikte over ve uterus dokularında Malondialdehid (MDA) seviyelerine bakılacağından dokular çalışma gününe kadar -80 °C'de saklandı.

**Bulgular:** Over dokusunda TCE grubunda MDA düzeyleri, apoptotik hücreler ve histopatolojik değişikliklerde belirgin olarak artış izlendi. TCE grubuyla kıyaslandığında ise TCE + Benfotiamin grubunda bu değişikliklerde azalmalar gözlemlendi. Uterus dokusunda ise TCE grubunda MDA düzeyleri azalmış gözlenirken, TCE + Benfotiamin grubunda MDA düzeylerinde belirgin artış izlendi. Apoptotik hücreler için yapılan değerlendirmede gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

**Sonuç:** TCE'nin over dokusunda MDA, apoptotik hücreler ve histopatolojik değişiklikleri arttırdığı, Benfotiamin ise bu değişikliklerde azalmalar yaptığı, uterus dokusunda ise TCE'nin sınırlı bazı değişiklikler yaptığı, gelecekte daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Trikloretilen, Over, Uterus, Benfotiamin

#### The Effects of Benfotiamine on Ovarian and Uterine Tissues of Trichloroethylene Administered Rats

**Objective:** Trichloroethylene (TCE) has a widespread use and exposed intensely as an environmental pollutant. Many studies have shown its toxic effects on biological tissues. The aim of this study is investigate the effects of benfotiamin on ovarian and uterine tissues of rats exposed to TCE.

**Materials and Methods:** In this study, 24 female 8-10 weeks old Wistar-Albino rats were used. Nothing was given to control group. TCE was given 1000mg/kg/day/po to TCE group, 1000mg/kg/day/po.TCE and 70 mg/kg/day/po benfotiamin were applied to TCE+benfotiamin group and 70mg/kg/day/po benfotiamin was given to benfotiamin group. After the experimental period rats were decapitated under anesthesia. Tissues were embedded into paraffin blocks for histologic evaluation. The sections were stained with Masson Trichrome and histopathologic changes were examined. TUNEL technic was applied to sections and apoptotic cells were established. Ovarian and uterine tissues were preserved at -80°C for malondialdehyde (MDA) levels.

**Results:** Ovarian tissues in TCE groups showed significant increase at MDA levels, apoptotic cells and histopathologic changes. Compared with TCE group the changes showed decrease in TCE+benfotiamin group. At uterine tissues, MDA levels showed decrease in TCE group, and significant increase in TCE+benfotiamin group. There was no significant difference in apoptotic cells between groups. Histopathologically, inflammatory cells increased in TCE group's uterine tissue, TCE+benfotiamin group didn't show any changes.

**Conclusion:** TCE enhances MDA, apoptotic cells and histopathologic changes in ovarian tissue and treatment with-benfotiamin reduces these changes. TCE has made limited changes in uterus and more extensive studies are needed to designate other effects.

**Key Words:** Trichloroethylene, Uterus, Ovary, Benfotiamin

#### Giriş

Trikloretilen (TCE) esas olarak metal parçalarının indirgenmesinde kullanılan klorinli hidrokarbondur. Yağ, parafin, resin, kauçuk, selüloz esterleri, boya ve cilalar için kullanılmakta olan genel bir çözücüdür. Kısmen suda çözünebilen kısmen de

uçucu olan TCE'ye yaygın kullanımından dolayı çevresel kirlenici olarak yoğun bir şekilde maruz kalınmaktadır (1). Hava ve yeraltı sularının yaygın bir kirlenici olduğundan insan sağlığı üzerindeki birçok farklı yan etkileri çalışmalara konu olmaktadır. TCE; kemiricilerde karsinogen olarak bilinmekte ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Enstitüsü (IARC) tarafından da insanlar için olası bir kanserojen olarak kabul edilmektedir (2, 3). Trikloretillen'in karaciğer, böbrek, testis ve over dokuları üzerine toksik etkileri yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (4-7).

Trikloretillen'in de içinde olduğu klorlu çözücülere maruziyet ile azalmış semen konsantrasyonu, sperm motilitesi ve anormal spermin artan yüzdeleri arasındaki ilişkiyi son epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir (8, 9). Paternal TCE maruziyeti spontan düşüklerin riskinde artış, azalan implantasyon oranı, azalan fertilizasyon ve geç gebelik ile ilişkilendirilmiştir (10-12). TCE gibi çevresel toksik maddelerin biyoaktivasyonu veya metabolizma tarafından rat overlerinde bulunması, in vivo TCE maruziyetinden sonra rat oosit döllenebilmesini azaltmada önemli bir role sahip olabilir ve dişi gametleri üzerine toksik maddelerin etkisi için bir model olabilir (1).

Bu çalışmada, TCE uygulanan sıçanların over ve uterus dokularına benfotiaminin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışma 03.12.2014 tarihli ve 2014/24 sayılı ve 222 nolu Fırat Üniversitesi etik kurul kararı ile onay alındıktan sonra gerçekleştirildi. Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (FÜDAM) temin edilen, vajinal smear yapılarak östrus fazında olan 24 adet düzenli sıklusa sahip, ağırlıkları 200-220 g arasında değişen 8-10 haftalık Wistar Albino cinsi dişi sıçanlar her grupta 6 hayvan olacak şekilde 4 eşit gruba ayrıldı. Hayvanlar FÜDAM hayvan laboratuvarında buldukları ortamın sıcaklığı 22-25°C arasında sabit tutularak 12 saat ışık (07:00-19:00) ve 12 saat (19:00-07:00) karanlıkta takip edildi. Sıçanlar özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi ve her gün altları temizlendi. Tüm hayvanlara aynı standart sıçan yemi verilerek add libitum su ve yiyecek alımları sağlandı.

Grup I (Kontrol grubu); Deney süresi olan 3 hafta boyunca herhangi bir ilaç verilmedi.

Grup II (Benfotiamin grubu); Deney süresi olan 3 hafta boyunca Benfotiamin 70 mg/kg/gün dozunda oral olarak verildi.

Grup III (TCE grubu); Deney süresi olan 3 hafta boyunca oral yolla Trikloretillen (TCE) 1000 mg/kg/gün olarak verildi.

Grup IV (TCE+Benfotiamin grubu); Deney süresi olan 3 hafta boyunca oral yolla TCE 1000 mg/kg/gün uygulanması ile birlikte Benfotiamin 70 mg/kg/gün verildi.

Deney süresi sonunda tüm gruplardaki sıçanlar ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) intraperitoneal (i.p) uygulanarak anestezi altında dekapite edildi.

Dekapitasyonun ardından sıçanların over ve uterus dokuları hızla çıkarılıp uygun fiksatiflerle tespit edilip ardından histolojik takip serilerinden geçirilip parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan 4-6 µm kalınlığındaki doku kesitlerine Masson-Trikrom boyası yapılarak gruplar arası histopatolojik farklılıklar ve TUNEL tekniği uygulanarak apoptotik hücreler tespit edildi. Bununla birlikte over ve uterus dokularında spektrofotometrik olarak Malondialdehid seviyelerine bakılacağından dokular çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.

**Malondialdehid (MDA) Çalışması:** Dokular homojenize edildikten sonra Homojenat santrifüj edildi ve süpernatant kısımdan 1 mL başka bir tüpe alındı. Alınan 1 mL örnek üzerine 1 mL %10 'luk TCA ve %0.6 TBA ilave edildi. Ardından distile su ve 0.5 ml %4 HCl eklendikten sonra hazırlanan karışım 90-95°C de 120 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüpler oda sıcaklığında soğutuldu ve üzerine 3 mL bütanol ilave edilip vortekslendi. Süpernatanttaki kırmızı-pembe renk spekro kuvetine pipet yardımıyla alınır ve bütanole karşı 532 nm de okundu.

**TUNEL Metodu:** Parafin bloklardan 4-6 m kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApoTag Plus Peroxidase InSitu Apoptosis Detection Kit (Chemicon catno: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskobunda (Leica DM500) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmeye rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin toplam (normal+apoptotik hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplandı.

**Histolojik Çalışma:** Her gruptan alınan over ve uterus dokuları, % 10'luk formaldehit tespit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildikten sonra musluk suyu altında yıkamaya alındı. Musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular daha sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirildi. Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan 4-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere Masson Trikrom boyası ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskobunda incelenip fotoğraflandı. Değişiklikler, histopatolojik durumlarına göre; yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirildi. Her bir sıçan için skorlama yapıldı ve her grup için ortalama değerler saptandı.

**İstatistiksel Analiz:** Elde edilen veriler ortalama ± standart sapma olarak belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve posthoc tukey testi ile yapıldı. P<0.05 değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

**MDA Bulgular:** Over dokusunda MDA düzeyleri; kontrol ve benfotiamin gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında TCE grubunda MDA düzeyleri anlamlı olarak artmış bulundu ( $P<0.05$ ). TCE grubuyla kıyaslandığında ise TCE + Benfotiamin grubunda MDA düzeyleri anlamlı olarak azalmış izlendi ( $P<0.05$ ).

Uterus dokusunda MDA düzeyleri; kontrol ve Benfotiamin gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında TCE grubunda MDA düzeyleri anlamlı olarak azalmış bulundu ( $P<0.05$ ). TCE grubuyla kıyaslandığında ise TCE + Benfotiamin grubunda MDA düzeyleri anlamlı olarak artmış izlendi ( $P<0.05$ ) (Tablo 1).

**TUNEL Bulgular:** Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği tüm gruplarda over dokusunda lüteal hücrelerde (kırmızı ok) ve uterus dokusunda stromal hücrelerde (kırmızı ok) gözlemlendi.

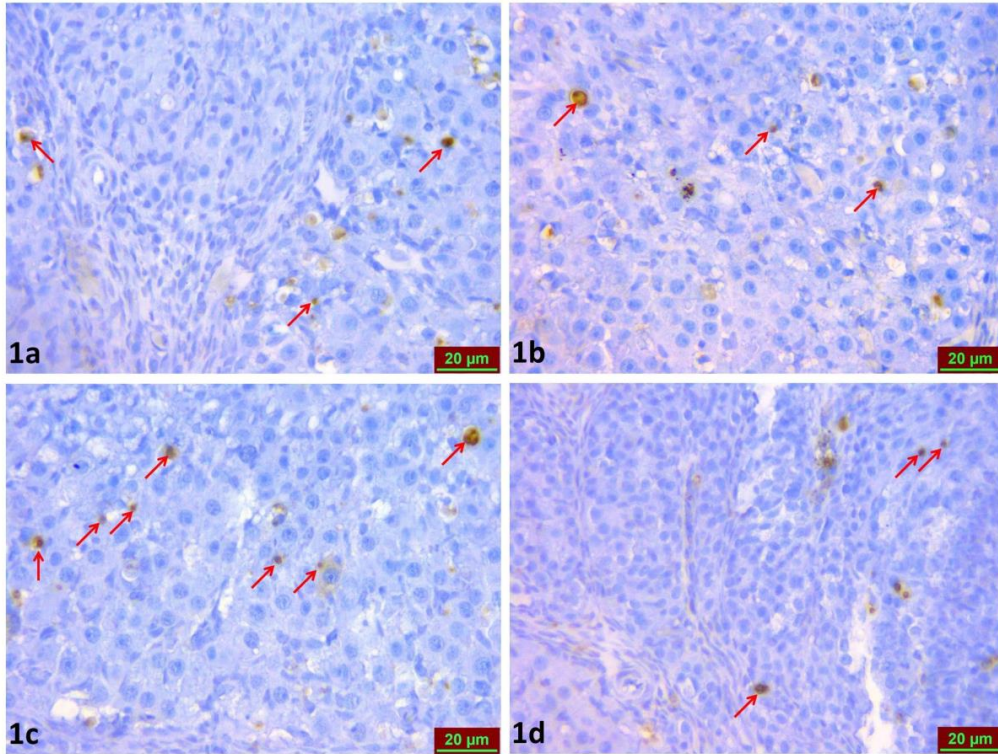
Over dokusunda TUNEL pozitifliği, kontrol (Şekil 1a) ve Benfotiamin (Şekil 1b) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında TCE (Şekil 1c) grubunda TUNEL pozitifliği anlamlı olarak artmış bulundu ( $P<0.05$ ). TCE grubuyla kıyaslandığında ise TCE + Benfotiamin grubunda (Şekil 1d) ise TUNEL pozitifliği anlamlı olarak azalmış izlendi ( $P<0.05$ ).

Uterus dokusunda TUNEL pozitifliğinde; kontrol (Şekil 2a) Benfotiamin (Şekil 2b), TCE (Şekil 2c) ve TCE + Benfotiamin (Şekil 2d) grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Tablo 2).

**Histolojik Bulgular:** Over dokusunun Masson's trichrome ile boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; Kontrol (Şekil 3a, b) ve Benfotiamin (Şekil 3c, d) gruplarına ait over dokuları normal görünümdeydi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; TCE grubunda (Şekil 3e, f), korpus luteumda belirgin olarak azalmış angiogenez (kırmızı ok), germinal epitelde dejenerasyon (siyah ok), over follikül rezervinde azalma ve folliküllerde dejenerasyon (follikül hücre kaybı + folliküler sıvı artışı) (kırmızı ok) gözlemlendi. TCE grubu ile kıyaslandığında TCE + Benfotiamin grubunda (Şekil 3g, h) ise korpus luteum angiogenezinde ve over rezervinde anlamlı bir farklılık izlenmedi fakat folliküllerde dejenerasyon ve germinal epitelde belirgin bir iyileşme olduğu gözlemlendi (Tablo 3).

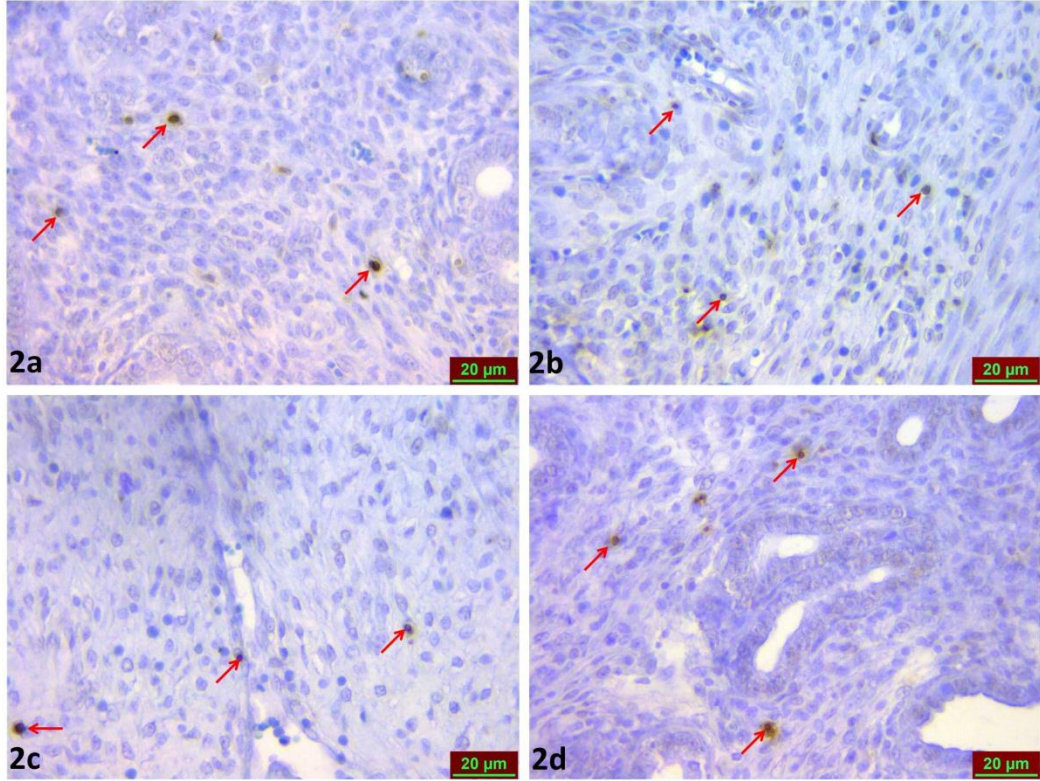
Uterus dokusunun Masson's trichrome ile boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; Kontrol (Şekil 4a) ve Benfotiamin (Şekil 4b) gruplarına ait uterus dokuları normal görünümdeydi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; TCE grubunda (Şekil 4c) epitel ve fibrozis açısından bir fark gözlemlenmezken inflamatuvar hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi. TCE grubu ile kıyaslandığında ise TCE + Benfotiamin grubunda (Şekil 4d) inflamatuvar hücrelerde herhangi bir değişiklik gözlemlenmedi (Tablo 4).

DPPH yöntemiyle incelendiğinde  $IC_{50}$  değeri  $1.333\pm 0.0026$  mg/mL olarak bulunmuştur. Standart olarak aktivite tayini çalışmaları sonuçları incelendiğinde ekstrenin  $IC_{50}$  değeri  $331.131$  µg/mL olarak bulunmuştur.

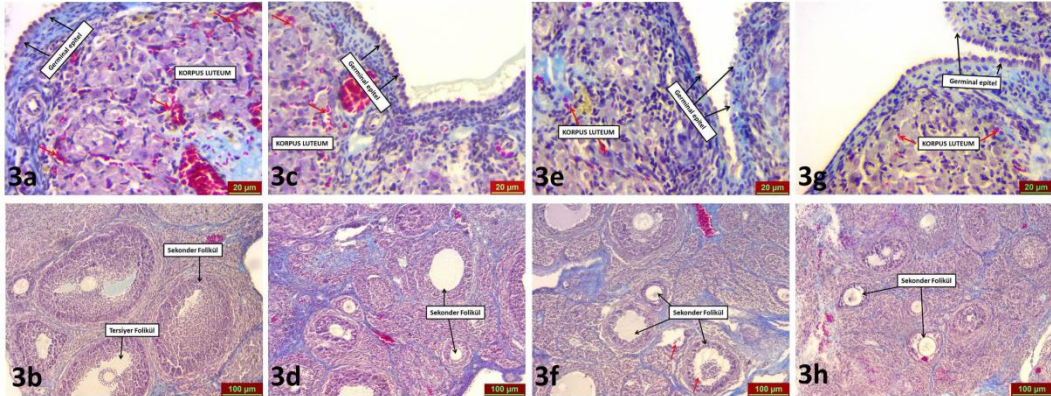


**Şekil 1.** (a) Kontrol grubu over dokusu TUNEL pozitif hücreler. (b). Benfotiamin grubu over dokusu TUNEL pozitif hücreler. (c). TCE grubu over dokusu TUNEL pozitif hücreler. (d). TCE+ Benfotiamin grubu over dokusu TUNEL pozitif hücreler

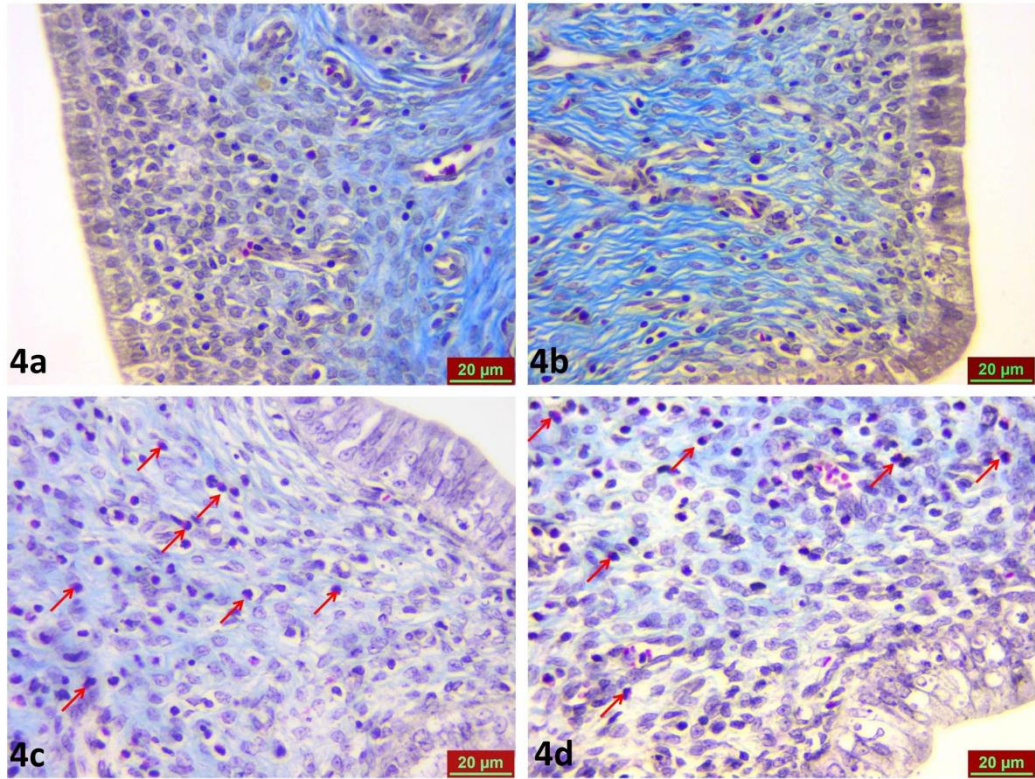




**Şekil 2.** (a). Kontrol grubu uterus dokusu TUNEL pozitif hücreler. (b). Benfotiamin grubu uterus dokusu TUNEL pozitif hücreler. (c).TCE grubu uterus dokusu TUNEL pozitif hücreler. (d). TCE+ Benfotiamin grubu uterus dokusu TUNEL pozitif hücreler



**Şekil 3.** (a). Kontrol grubuna ait normal görünümlü over dokusu. (b). Kontrol grubuna ait normal görünümlü over dokusu. (c).Benfotiamin grubuna ait normal görünümlü over dokusu. (d). Benfotiamin grubuna ait normal görünümlü over dokusu. (e). TCE grubuna ait over dokusu. (f). TCE grubuna ait over dokusu. (g). TCE+ Benfotiamin grubuna ait over dokusu. (h). TCE+ Benfotiamin grubuna ait over dokusu



**Şekil 4.** (a). Kontrol grubuna ait normal görünümlü uterus dokusu. (b). Benfotiamin grubuna ait normal görünümlü uterus dokusu. (c).TCE grubuna ait uterus dokusu. (d). TCE+ Benfotiamin grubuna ait uterus dokusu

**Tablo 1.** Doku MDA değerleri

Grup	MDA (nmol/g protein)	
	Over	Uterus
Kontrol	141.42± 24.10	779.77±89.39
Benfotiamin	165.02± 6.39	838.11±74.29
TCE	361.08± 41.09 <sup>a</sup>	323.23±38.43 <sup>a</sup>
TCE + Benfotiamin	207.64±3.33 <sup>b</sup>	490.96±34.81 <sup>ab</sup>

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> TCE grubuna göre karşılaştırıldığında, (P<0.05).

**Tablo 2.** Apoptotik indeks (%)

Grup	Apoptotik indeks (%)	
	Over	Uterus
Kontrol	6.5±0.83	3.16±0.98
Benfotiamin	6.16±1.47	2.83±1.94
TCE	12.17±1.72 <sup>a</sup>	4.2±0.83
TCE + Benfotiamin	5.66±1.96 <sup>b</sup>	3.66±1.63

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> TCE grubuna göre karşılaştırıldığında, (P<0.05).

**Tablo 3.** Over dokusu histoskor ve rezervi

	Korpus luteum	Germinal epitelde	Foliküller	Over rezervi
Kontrol	2.33±0.51	0.16±0.40	0.0±0.0	57.66 ± 4.08
Benfotiamin	2.16±0.75	0.33±0.51	0.0±0.0	53.16 ± 6.21
TCE	1.33±0.51 <sup>a</sup>	1.33±0.51 <sup>a</sup>	1.66±0.81 <sup>a</sup>	35.50 ±6.25 <sup>a</sup>
TCE + Benfotiamin	1.50±0.83	0.50±0.54 <sup>b</sup>	0.33±0.51 <sup>b</sup>	35.33 ± 5.00 <sup>a</sup>

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> TCE grubuna göre karşılaştırıldığında, (P<0.05).

**Tablo 4.** Uterus Dokusu Histoskor

	İnflamatuvar hücre artışı	Epitelde dejenerasyon	Fibrozis
Kontrol	0.33±0.51	0.16±0.40	0.33±0.51
Benfotiamin	0.50±0.54	0.33±0.51	0.16±0.40
TCE	2.83±0.40 <sup>a</sup>	0.33±0.51	0.33±0.51
TCE + Benfotiamin	2.50±0.83 <sup>a</sup>	0.16±0.40	0.33±0.51

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> TCE grubuna göre karşılaştırıldığında, (P<0.05).

## Tartışma

Mesleki ve çevresel kaynaklı olarak her yıl 3 milyonun üzerinde bireyin TCE'ye maruz kaldığı tahmin edilmektedir (13). Normal şartlarda doğada bulunmayan Trikloretillen atık ürün şeklinde zararlı, çevresel bir toksin olarak ortaya çıkmaktadır. TCE'nin yarı ömrü konsantrasyonuna bağlı olarak yer altı sularında 10.7 ay ile 4.5 yıl arasında değişmektedir ve parçalanma oranı TCE 'nin fiziksel durumuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir (8). Solunum, dermal ve sindirim yolu ile absorbe edilen TCE'nin çoğu trikloroetanol ve trikloroasetik asite metabolize edilir ve böbreklerden üriner yolla itrah edilir. Yarılanma ömrü yaklaşık dört gündür (14). Trikloretillen biyolojik membranlardan uçuculuk ve lipofilitate nedeni ile hemen absorbe edilirken TCE akciğerlerden veya gastrointestinal sistemde daha hızlı ve büyük oranda emilimi meydana gelmektedir. TCE absorbe olduktan sonra akciğerler, karaciğer, böbrekler ve sinir sistemi gibi hedef organlara dağılır (15). Ayrıca yapılan çalışmalarda TCE nin erkek üreme sistemi üzerine fertilizasyonu azalttığı sperm proteinlerinde oksidasyona neden olduğu ve fertilizasyon kabiliyetini azalttığı bildirilmiştir (5, 16).

Dişilerde yüksek seviyede TCE'ye maruziyetinden sonra in vivo olarak döllenmesini geçici olarak engelleyebileceğini yapılan çalışmalar göstermiştir. TCE gibi çevresel toksik maddelerin biyoaktivasyonu veya metabolizma tarafından rat overlerinde bulunması, TCE maruziyetinden sonra rat oosit döllenmesini azaltmada ve dışı gametleri üzerine toksik maddelerin etkisi için bir model olabilir (1). Dişi ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda inhalasyon ve oral yolla verilen TCE'nin oosit fertilizasyonu azalttığı gösterilmiştir (1, 17). Ayrıca TCE uygulanan ratların over dokularında yapılan deneysel çalışmalarda artmış CYP2E1 (Sitokrom P450 2E1) aktivitesi saptanmış ve bundan dolayı ovaryan TCE

metabolizmasının oksidatif CYP enzimi aracılığı yolu ile oluşabileceği ileri sürülmüştür (18). Farklı doku ve organlarda TCE'nin oksidatif strese bağlı hasar oluşumunu indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (19-22).

Bu çalışma da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TCE grubunda over dokusunda MDA ve apoptotik hücre sayısının anlamlı olarak artışı ile birlikte korpus luteumda belirgin olarak azalmış angiogenez, germinal epitelde dejenerasyon, over follikül rezervinde azalma ve folliküllerde dejenerasyon gözlenmiştir. Tedavi olarak benfotiamin verilen grupta ise MDA ve apoptotik hücre sayısında anlamlı olarak azalma ile birlikte over rezervinde anlamlı bir farklılık izlenmedi fakat folliküllerde dejenerasyon ve germinal epitelde belirgin bir iyileşme olduğu gözlemlendi. Çalışmadaki over dokusunda TCE grubunda artan MDA değerleri TCE'nin oksidatif hasarı arttırdığını ve benfotiaminin antioksidan özellik gösterdiğini ve bu şekilde apoptozis ve histopatolojik değişiklikleri düzelttiği söylenebilir.

Sitokrom p450 2E1, TCE'nin oksidatif metabolizmasından sorumlu temel enzim'dir (15, 23). Parrish ve ark. (24) TCE nin karaciğerde, Siddiqi ve ark. (25) ise TCE'nin böbrekte apoptozis ve oksidatif stresi arttırdığını belirtmişlerdir. Lash ve ark. (16) TCE metabolizmasının oksidatif yolları etkilediğini göstermişlerdir. Gurbuz ve ark. (26) 2013 yılında yaptıkları çalışmalarında TCE nin MDA değerlerini arttırdığını göstermişlerdir.

Lipit peroksidasyonun en önemli göstergesi malondialdehittir. Dokularda lipid peroksidasyon oluşumuna bağlı olarak artan MDA, hücre zarı bütünlüğünün bozulmasına, geçirgenliğin artmasına, ATP kaybına, DNA hasarına ve hücre ölümleri ile



sonuçlanan fizyolojik, metabolik ve fonksiyonel bozukluklara yol açabilmektedir (27, 28).

Hücrede çevresel oksidan ajanların etkisini kendi üzerine çeken redükte glutatyon (GSH), antioksidan gibi davranarak hücrenin fonksiyonel proteinlerini okside olmaktan korur. Bu arada glutatyonun kendisi oksitlenir (GSSG). Bu okside glutatyonun fonksiyonunu yapabilmesi için NADPH ile tekrar redükte hale gelmesi ile mümkündür. Pentoz fosfat yolu NADPH için önemli bir kaynaktır ve tiamin de bu yolu aktive edici olduğundan dolayı bir antioksidan olarak kabul edilmiştir (29-31).

Benfotiamin transketolaz aktivitesinde artışa neden olarak pentoz fosfat yolunu aktive eder. Bu yolağın aktive olmasıyla vasküler hasara oluşumuna neden sayılan heksosamin yolağı, hücre içi AGE oluşum yolu ve DAG/Protein kinaz C yollarının etkilerinin azalmasına sebebiyet verir (32).

Çalışmamızda uterus dokusunda gruplar arasında TUNEL pozitifliğinde fark gözlenmedi. Uterus dokusunda MDA düzeyleri; Kontrol grubuyla kıyaslandığında TCE grubunda MDA düzeyleri anlamlı olarak azalmış bulundu. TCE grubuyla kıyaslandığında ise TCE + Benfotiamin grubunda MDA düzeyleri anlamlı olarak artmış izlendi. Histopatolojik olarak Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; TCE grubunda epitel ve fibrozis açısından bir fark gözlenmezken inflamatuvar hücrelerde istatistiksel olarak

anlamlı bir artış izlendi. TCE grubu ile kıyaslandığında ise TCE + Benfotiamin grubunda inflamatuvar hücrelerde herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Uterus dokusundaki TCE grubunda MDA değerlerindeki azalmalar dikkat çekici olup over dokusu değerleriyle zıtlık göstermekteydi. Fakat yapılan bazı çalışmalarda MDA değerinin azaldığı da gösterilmiştir (33, 34). Uterus dokusundaki MDA değerindeki azalma ile TCE + benfotiamin grubundaki MDA seviyesinin TCE ye göre artışı benfotiaminin endojen antioksidanları baskıladığı şeklinde açıklanabilir. Benfotiamin; B<sub>1</sub> vitamininin yağda eriyen formu olup Reaktif oksijen türleri üzerinde benfotiaminin inhibe edici etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (35, 36). Hücrede çevresel oksidan ajanların etkisini azaltan redükte GSH, antioksidan gibi davranarak hücrenin fonksiyonel proteinlerini okside olmaktan koruduğu için benfotiamin antioksidan olarak kabul edilmektedir (29).

Sonuç olarak, deneysel TCE uygulanmasının over dokusunda MDA ve apoptotik hücreleri arttırdığı, histopatolojik değişiklikler yaptığı, tedavi olarak verilen benfotiaminin MDA ve apoptotik hücreleri azalttığı, uterus dokusunda ise TCE grubunda MDA değerinde azalma olup apoptozisde değişik yapmadığı, gelecekte farklı deneysel TCE süreleriyle yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

## Kaynaklar

1. Wu KL, Berger T. Trikloretlen metabolism in the rat ovary reduces oocyte fertilizability. *Chem. Biol Interact.* 2007; 17: 20-30.
2. Cunli H, Liping J, Chengyan G. Possible involvement of oxidative stres in Trikloretlen induced genotoxicity in human HepG2 Cells. *Mutat Res* 2008; 652: 88-94.
3. Bradford BU, Lock EF, Kosyk O. Interstrain differences in the liver effects of Trikloretlen in a mutistrain panel of inbred mice. *Toxicol Sci* 2011; 120: 206-217.
4. Sano Y, Nakashima H, Yoshioka N, et al. Trikloretlen liver toxicity in mouse and rat: Microarray analysis reveals species differences in gene expression. *Arch Toxicol* 2009; 83: 835-849.
5. DuTeaux SB, Berger T, Hess RA, Sartini BL, Miller MG. Male reproductive toxicity of Trikloretlen: Sperm protein oxidation and decreased fertilizing ability. *Biol Reprod* 2004; 70: 1518-1526.
6. US Environmental Protection Agency. Health Assessment Document for Trikloretlen. Final Report. EPA/600/8-82/006F. Environmental Protection Agency. Washington DC: Office of Health and Environmental Assessment, 1985.
7. Karami S, Lan Q, Rothman N, et al. Occupational Trikloretlen exposure and kidney cancer risk: A meta-analysis. *Occup Environ Med* 2012; 69: 858-867.
8. Howard PH, Boethling RS, Jarvis WF, Michalenko EM. Handbook of Environmental Degradation Rates. Lewis Publishers; Chelsea, 1991.
9. ATSDR, ToxFAQs for Trikloretlen, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2003.
10. Tielemans E, Burdorf A, te Velde ER, et al. Occupationally related exposures and reduced semen quality: A case-control study. *Fertil Steril* 1999; 71: 690-696.
11. Taskinen H, Anttila A, Lindbohm ML, Sallmen M, Hemminki K. Spontaneous abortions and congenital malformations among the wives of men occupationally exposed to organic solvents. *Scand J Work Environ Health* 1989; 15: 345-352.
12. Sallmen M, Lindbohm ML, Anttila A, et al. Time to pregnancy among the wives of men exposed to organic solvents. *Occup Environ Med* 1998; 55: 24-30.
13. ATSDR. Toxicological profile for Trikloretlen. US. Dept of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 1997.
14. Jung HG, Kim HH, Song BG, Kim EJ. Trikloretlen hypersensitivity syndrome: A disease of fatal outcome. *Yonsei Med J* 2012; 53: 231-235.
15. Lash LH, Fisher JW, Lipscomb JC, Parker JC. Metabolism of Trikloretlen. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 177-200.
16. Xu H, Tanphaichitr N, Forkert PG, et al. Exposure to Trikloretlen and its metabolites causes impairment of sperm fertilizing ability in mice. *Toxicol Sci* 2004; 82: 590-597.
17. Berger T, Horner CM. In vivo exposure of female rats to toxicants may affect oocyte quality. *Reprod. Toxicol* 2003; 17: 273-281.

18. Reinke LA, Moyer MJ. p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab. Dispos* 1985; 13: 548-552.
19. Atkinson A, Meeks RG, Roy D. Increased oxidative stress in the liver of mice treated with Trikloretillen. *Biochem Mol Biol Int* 1993; 31: 297-304.
20. Gharib OA, Gharib MA. Kombucha tea ameliorates Trikloretillen induced hepatic damage in rats via inhibition of oxidative stress and free radical induction. *Egypt J Sci Applic* 2008; 21: 481-498.
21. Gharib OA. Effects of Kombucha on oxidative stress induced nephrotoxicity in rats. *Chin Med* 2009; 4: 23.
22. Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM. Silymarin Modulates Cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39: 656-661.
23. Miller RE, Guengerich FP. Oxidation of Trikloretillen by liver microsomal cytochrome P-450: Evidence for chlorine migration in a transition state not involving Trikloretillen oxide. *Biochemistry* 1982; 21: 1090-1097.
24. Parrish JM, Austin DK, Stevens DH, Kinder RJ. Haloacetate-induced oxidative damage to DNA in the liver of male B6C3F1 mice. *Toxicology* 1996; 110: 103-111.
25. Siddiqi A, Nafees S, Rashid S, Sultana S, Saidullah B. Hesperidin ameliorates trichloroethylene-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress and apoptosis in wistar rats. *Mol Cell Biochem.* 2015; 406: 9-20.
26. Gurbuz N, Coskun ZK, Omeroglu S, Bayraktar AC, Ciraci Z. Antioxidative and therapeutic effects of spirulina on trichloroethylene induced cutaneous irritation balb/c mice. *Bratisl Lek Listy* 2013; 114: 192-198.
27. Tarin JJ, Brings J, Cano A. Serbest radikalleri antioksidanlar ve infertilite ile klinik ilişkiler. *Human Reproduction* 1998; 13: 2371-2376.
28. Günel E, Çađlayan F, Çađlayan O, et al. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 1536-1539.
29. Pomeroy F, Molinar Min A, La Selva M, et al. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. *Acta Diabetol* 2001; 38: 135-138.
30. Bakker SJ, Heine RJ, Gans RO. Thiamine may indirectly act as an antioxidant. *Diabetologia* 1997; 40: 741-742.
31. Hsu GM, Chow BF. Effect of thiamine deficiency on glutathione contents of erythrocytes and tissues in rat. *Proc Soc Exp Bio Med* 1960; 104: 178-180.
32. Hammes HP, Du X, Edelstein D. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 2003; 9: 294-299.
33. Li JY, Gu X, Zhang WH, Jia S, Zhou Y. GdCl<sub>3</sub> abates hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting apoptosis in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 518-523.
34. Güneş TÜ, Badak Mİ, Kurtođlu T, ve ark. Rat Alt Ekstremitte İskemi/Reperfüzyon Modelinde İskemik Önkoşullama ve Ard koşullamanın Erken Dönem Etkileri. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2011; 12: 21-27.
35. Gadau S, Emanuelli C, Linthout SV, et al. Benfotiamine accelerate the healing of ischaemic diabetic limbs in mice through protein kinase B/Akt-mediated potentiation of angiogenesis and inhibition of apoptosis. *Diabetologia* 2006; 49: 405-420.
36. Marchetti V, Menghinni R, Rizza S. Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FOXO signaling. *Diabetes* 2006; 55: 2231-2237.