



Investigation of the effects of curcumin, vitamin E and their combination in cisplatin-induced testicular apoptosis using immunohistochemical technique

Sisplatin ile indüklenen testiküler apopitoziste kurkumin, E-vitamini ve birlikte kombinasyonunun etkilerinin immünohistokimyasal olarak araştırılması

Fikret Gevrek¹ , Fikret Erdemir²

Cite this article as: Gevrek F, Erdemir F. Investigation of the effects of curcumin, Vit-E and their combination in cisplatin-induced testicular apoptosis using immunohistochemical technique. Turk J Urol 2018; 44(1): 16-23.

ABSTRACT

Objective: Cisplatin is an effective antineoplastic agent used in cancer therapy. However, the use of cisplatin is restricted due to its toxic side effects. Alleviation of its side effects which restricts cisplatin use is highly important. We aimed to investigate the effects of curcumin, vitamin E and their combination in cisplatin induced testicular apoptosis.

Material and methods: Thirty-five Wistar albino male adult rats, weighing 300-350 g were divided randomly into five groups including seven rats in each as control, cisplatin, curcumin, vitamin E, and curcumin + vitamin E. On the posttest 5th day, rats were sacrificed, and their testes were removed. 4-5 µm sections from formalin fixed paraffin embedded testis tissues were stained both hematoxylin-eosin to analyze histologically and immunohistochemically to determine the expression of the apoptotic pathway proteins (Bax, Cas-3, Bcl-2).

Results: Increased histological damage with cisplatin administration was reduced in treatment, especially in combination therapy. Cas-3 and Bax protein immunostaining intensities H-scores were significantly increased but Bcl-2 was slightly decreased in the cisplatin group compared to the control. In all treatment groups Bax, Cas-3 decreased compared to cisplatin group however Bcl-2 decreased in the curcumin and vitamin E groups. Bax/Bcl-2 was the highest in the cisplatin, and decreased in all treatment groups in favor of control.

Conclusion: Cas-3 expression increased by cisplatin administration suggests that cisplatin causes apoptosis of germ cells. According to the present findings, cisplatin mainly caused testicular apoptosis through the Cas-3 and Bax apoptotic protein pathways. Cisplatin-induced testicular apoptosis can be prevented by administration of curcumin, vitamin E, and combination therapy.

Keywords: Apoptozis; cisplatin; curcumin; immunohistochemistry; testis; vitamin E.

ÖZ

Amaç: Sisplatin kanser tedavisinde kullanılan etkili bir antineoplastik ajandır. Ancak toksik yan etkilerinden dolayı kullanımı kısıtlanmaktadır. Sisplatin kullanımının kısıtlanmasına neden olan toksik etkilerinin hafifletilmesi önem arz etmektedir. Çalışmanın amacı; sisplatin kaynaklı testiküler apopitozise karşı kurkumin ve E vitamininin etkilerini araştırmaktır.

Gereç ve yöntemler: Çalışmada toplam 35 adet 300-350 g ağırlıkta sağlıklı yetişkin Wistar cinsi albino erkek sıçanlar her grupta yedişerli olacak şekilde rastgele; kontrol, sisplatin, kurkumin, E vitamini ve kurkumin + E vitamini birlikte kombinasyonu olmak üzere beş gruba ayrıldılar. Deney sonu beşinci günde sıçanlar sakrifiye edilerek testisleri çıkarıldı. Formalinde tespit edilip parafine gömülen testislerden 4-5 µm kalınlıkta alınan kesitlerde hematoksilin eozin boyama yapılarak genel histolojik değerlendirme, immünohistokimyasal boyamalar yapılarak apopitozis yolak proteinlerin (Bax, Cas-3, Bcl-2) immünohistokimyasal analizleri yapıldı.

Bulgular: Sisplatin verilmesi ile artmış olan histolojik hasar tedavi gruplarında özellikle kombinasyon tedavisinde azalmıştı. Cas-3 ve Bax protein immün boyanma şiddetlerinin H-skorlarının sisplatin grubunda kontrole göre belirgin şekilde artmış olduğu, Bcl-2'nin ise bir miktar azaldığı tespit edildi. Tedavi gruplarının tümünde sisplatin grubuna göre Bax, Cas-3 immün ekspresyonları azalmıştı. Ancak Bcl-2, kurkumin ve E-vitamin gruplarında azalmıştı. Bax/Bcl-2 oranları sisplatin grubunda en yüksekti, tedavi gruplarında kontrol lehinde belirgin olarak azalmıştı.

Sonuç: Sisplatin grubunda artmış Cas-3 ekspresyonu sisplatinin germ hücrelerinin apopitozisine neden olduğunu göstermektedir. Mevcut bulgulara göre sisplatin daha çok Cas-3 ve Bax apoptotik protein yolakları üzerinden testiküler apopitozise neden olmuştur. Sisplatin kaynaklı testiküler apopitozisin kurkumin, E vitamini ve birlikte kombinasyonunun uygulanmasıyla engellenebileceğini söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis; sisplatin; kurkumin; immünohistokimya; testis; E vitamini.

ORCID IDs of the authors:
F.G. 0000-0002-3722-2542;
F.E. 0000-0002-3744-1681.

¹Department of Histology and Embryology, Gaziosmanpaşa University, Tokat, Turkey

²Department of Urology, Gaziosmanpaşa University, Tokat, Turkey

Submitted:
02.10.2017

Accepted:
08.11.2017

Available Online Date:
08.01.2018

Correspondence:
Fikret Gevrek
E-mail:
fikretg05@hotmail.com

©Copyright 2018 by Turkish Association of Urology

Available online at
www.turkishjournalofurology.com

Giriş

Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) testis, ovaryum, mide, akciğer, lenfoma, osteo sarkoma, baş, boyun, mesane, prostat ve serviks tümörleri gibi pek çok kanserin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılan etkili antineoplastik bir ajandır.^[1,2] Bununla birlikte ototoksiste, nefrotoksiste, myelotoksiste, gastrointestinal toksiste ile nörolojik, hematolojik ve reproduktif sistem üzerindeki istenmeyen ciddi yan etkileri sisplatinin klinik kullanımını kısıtlamaktadır.^[3,4] Üreme sisteminin sisplatin toksisitesinde reaktif oksijen radikalleri (ROS) ve oksidatif stresi (OS) işaret eden çok sayıda çalışma bulunmaktadır.^[4]

Oksijen canlıların yaşamı için vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı olarak bilinen son derece reaktif olan ara ürünler oluşturur. Besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümü esnasında ortaya çıkan reaktif moleküller serbest radikaller olarak isimlendirilmektedir. Bu reaktif oksijen metabolitleri lipit, protein, DNA, mitokondri, endoplazmik retikulum gibi hücre bileşenlerine zarar vererek hücrel hasarlara neden olurlar. Memeli dokuları serbest radikal oluşumunu kontrolde tutmak ve zararlı etkilerine karşı koymak için süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), katalaz (CAT), glutatyon (GSH) gibi endojen enzim sistemleri ve enzimatik olmayan sistemlerden oluşan doğuştan gelen bir antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptirler.^[5,6] Bazı stres durumlarında canlılarda prooksidan ve antioksidan dengesinin bozulması sonucunda OS ortaya çıkar. OS makromoleküler ve hücrel hasarlara neden olup organizmanın ölümü ile sonuçlanan ciddi sonuçlara neden olabilirler.^[5] Sisplatin tedavisinin germ hücrelerinin apoptozisinde belirgin artışa, histopatolojik hasarlara neden olduğu; SOD, GPX, CAT, GSH gibi biyokimyasal antioksidan enzim düzeylerinin ise azalmasına yol açtığı sıçan testislerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.^[3,4,7]

Sisplatinin kanser tedavisinde tek başına veya diğer ajanlarla kombinasyon halinde kullanımı oldukça yaygındır.^[8,9] Özellikle testiküler malignesideki umut verici sonuçlara rağmen testislerin uzun süreli disfonksiyonu sisplatinin yaygın olumsuz yan etkilerinden biridir.^[10] Ayrıca, sisplatinin testisler üzerindeki yan etkileri çok sayıda hayvan deneyleri ile de gösterilmiştir. Bu olumsuz yan etkiler özellikle spermatogenezin bozulmasına bağlı sperm üretiminde azalma, testiküler hacim ve ağırlık kaybı ve germ hücre apoptozisi olarak rapor edilmiştir.^[7]

Anti kanser tedavisinde sisplatin toksisitesinin hafifletilmesi büyük önem arz etmekte olup sisplatin toksisitesinin moleküler ve hücrel mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Sisplatinin apoptozisi indüklemesi ROS'un aşırı üretimini içeren birçok yolak üzerinden olabilir. Mevcut kanıtlar ROS üretiminde ve endojen antioksidan moleküllerin ekspresyonundaki artışların sisplatinin toksisitesini destekleyen veriler olması yönündedir.^[11-14] OS sonucunda öncelikli olarak apoptozis kaynaklı hücre kaybı gerçekleşmektedir.^[15]

Sisplatin reaktif oksijen türlerini üretebilir ve normal dokudaki antioksidan enzimleri inhibe edebilir. Reaktif oksijen partikülleri akümülyasyonunun sisplatin toksisitesine aracılık ettiğine dair bulgular mevcuttur. Bu sebeple anti-tümöral etkinliği değiştirmeksizin sisplatinin oluşturduğu hasarı azaltmak için birçok koruyucu ajan sisplatin ile birlikte kullanılmaktadır.^[16]

Sisplatin kaynaklı testiküler hasara karşı koruma, esas olarak hücrenin kendi iç kaynaklarını artırarak hücre hayatta kalma mekanizmalarının güçlendirilmesine dayanır. Yapılan bazı çalışmalarda antioksidan maddelerin sisplatin kaynaklı toksiste üzerine koruyucu etkinliğinin olduğu gösterilmiştir.^[14,7]

Kurkumin Zerdeçal (hint safranı) bitkisinin köklerinden izole edilmiş olan bir polifenoldür. Kurkuminin antioksidan, anti-serbest radikal, anti-inflamatuar, antineoplastik ve antifungal etkilerinin olduğu bildirilmektedir. Kurkuminin etkileri büyüme faktörleri, kinazlar, transkripsiyon faktörler, enflamatuar sitokinler, apoptozis ilişkili proteinler, adezyon molekülleri, hücre proliferasyonu ile ilişkili enzimleri içeren çok sayıda moleküler hedefler ile olan etkileşimlerine bağlıdır. Kurkuminin insanlar için bilinen toksik bir etkisi bulunmamaktadır.^[14,17,18]

E-vitamini, antioksidan aktivitesi en yüksek olduğu bilinen α -tokoferoldür. α -tokoferol lipofilik özelliğinden dolayı membran spesifik antioksidan olup membrandan zengin hücre kısımlarında bulunur. Antikanser, kardiyoprotektif, nöroprotektif, antidiyabetik, osteoprotektif, immünomodülatör, gastroprotektif etkilere sahiptir. Çok güçlü bir antioksidan olarak, fosfolipitlerin yapısındaki doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Lipit peroksil radikalini ortadan kaldırarak, lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sona erdirir. Bundan dolayı zincir kırıcı antioksidan olarak ta bilinmektedir. E-vitamini vücuttaki majör lipit solübl antioksidan olup lipit peroksidasyonunu engelleyerek membran bütünlüğünün sürdürülmesini sağlar.^[19]

Sisplatin tedavisi alan kanserli hastalarda serum antioksidan konsantrasyonları düşmektedir. Sisplatin kemoterapi siklusları C-vitamini, E-vitamini, seruloplazmin ve ürik asitin dolaşım düzeylerindeki düşüşle ilişkilidir.^[14,20] Bu nedenlerle mevcut çalışmada kurkumin, E-vitamini ve her ikisinin birlikte kombinasyonu sisplatin uygulanan sıçanlara bir antioksidan desteği olarak verilmiştir.

Bu çalışmada kurkumin ve E-vitamininin ayrı ayrı ve birlikte kombinasyonlarının sisplatin indüklü testiküler apoptozisi intrinsik biyokimyasal ve antioksidan içeriklerinden dolayı engelleyebileceği hipotezi ileri sürüldü. Mevcut çalışmanın amacı deneysel olarak sisplatin uygulanarak apoptozisin indüklendiği sıçanların testislerinde kurkumin, E-vitamini ve kurkumin + E-vitamini kombinasyonunun antiapoptotik etkilerini apoptotik (Bax, Cas-3) ve antiapoptotik proteinlerin (Bcl-2) ekspresyonlarının immünohistokimyasal analizler ile değerlendirilmesidir.

Gereç ve yöntemler

Deney hayvanları

Bu çalışma için Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onayı (2016 HADYEK-21) alındı. Çalışma toplam 35 adet yaklaşık 3 aylık ve 300-350 g ağırlıklarda Wistar albino cinsi sağlıklı erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar her grupta yedi adet olacak şekilde rastgele kontrol, deney ve üç farklı tedavi gruplarından oluşan beş gruba ayrıldı. Bu gruplar aşağıda belirtildiği gibidir.

Birinci grup: Serum fizyoloji (SF) verilen kontrol grubu.

İkinci grup: Sisplatin verilen deney grubu.

Üçüncü grup: Sisplatin + Kurkumin tedavi grubu.

Dördüncü grup: Sisplatin + E-vitamini tedavi grubu.

Beşinci grup: Sisplatin + Kurkumin + E-vitamini tedavi grubu.

Tüm gruplardaki sıçanlar ortalama 22°C'de, %50-60 nisbi nemde 12 saatlik gece gündüz siklusunda, su ve besine istedikleri zaman ulaşabilecekleri şekilde standart plastik kafeslerde talaş yataкта barındırıldılar.

Deney prosedürü

Deneyin başladığı ilk günde kontrol hariç sıçanlara intra peritoneal olarak sisplatin (16 mg/kg, ip) literatürde belirtildiği üzere tek doz olarak verildi.^[14,21] Aynı gün her bir tedavi grubuna sırası ile Kurkumin, E-vitamini ve bunların birlikte kombinasyonları da verildi. Kurkumin intra peritoneal olarak 200 mg/kg olarak her gün aynı saatte ve beş gün boyunca verildi. E-vitamini de yine aynı şekilde ilk gün 50 mg/kg tek dozda verildi. Kurkumin + E-vitamini kombinasyonu tek başlarına verildikleri doz, yöntem ve sürelerde 5 gün boyunca uygulandı. Kontrol grubuna ise başlangıçta 16 mL/kg serum fizyolojik intraperitoneal olarak verildi. Deneyin beşinci gününde sıçanlar derin anestezi altında sakrifiye edilerek testisleri çıkarıldı. Rutin histolojik doku takibi sonrasında testisler parafine blokladı. Parafin bloklanan testislerden alınan doku kesitleri hematoksilen eozin ve immünohistokimyasal boyama protokolüne göre boyandıktan sonra mikroskopik olarak analiz edildiler. Sıçanları anestezik hale getirmek için ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı.

Histolojik işlemler

Testisler çıkarılır çıkarılmaz %4'lük tamponlu nötral formalin solüsyonu içerisine alınıp 48 saat fikse edildikten sonra rutin histolojik doku takibi işlemlerine tabi tutularak parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardaki dokular rotari mikrotom (LeicaRM2135, Germany) ile 4-5 um kalınlıkta kesilip hematoksilen eozin boyama için normal rodajlı frozen lamlara, immünohistokimyasal boyamalar için ise Poliy-L-Lisine lamlar üzerine yerleştirildi.

Hematoksilen eozin boyanan her gruptan her bir hayvana ait ardışık ortalama 8 testis dokusu kesiti ışık mikroskobu altında genel olarak kabaca histopatolojik olarak değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal analizler

Testis kesitlerinde apoptozis yolak proteinlerin (Bax, Bcl2, Acas3) immünohistokimyasal ekspresyonlarını belirlemek için kesitlerde indirekt immünohistokimya protokolü uygulandı. Araştırma ışık mikroskobu altında immün boyanma şiddetleri değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar immün boyanma şiddeti semî kantitatif ifadesi olan H-skora dönüştürüldü ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı. İmmünohistokimyasal boyama protokolü kısaca aşağıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Adhesivli lamlara alınan kesitler 60°C etüve gece boyu bırakılıp ertesi gün üç ayrı ksilen serilerinde 5'er dakika bekletilerek deparafinize edildiler. %100'lükten %70'liğe inen alkol serilerinden geçirildikten sonra 5 dak distile suda rehidrate edildi. Sitrik asit solüsyonu içinde 5 dak iki değişim 360 watt mikrodalga uygulaması ile antijen retrieval işlemi yapıldı. Ani soğumadan sonra 10 dak distile suda bekletildi. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) solüsyonunda 10 dak bekletildikten sonra 3x5 dak fosfat buffer solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Kesitlerin çevresi hidrofobik pappen kalem ile çevrelendikten sonra non-immün bloklayıcı serumu damlatılarak nemli karanlık ortamda 15 dak inkübe edildi. Bloklayıcı ajanının yıkanmadan uzaklaştırılmasından sonra kesitler üzerine Cas-3, Bax, Bcl-2 (1:50, Santa Cruz) primer antikolar damlatıldı. Nemli kapalı bir kutu içinde ±4°C buzdolabında karanlık ortamda gece boyu bekletildi. Ertesi gün kesitler PBS de 3x5 dak yıkandı. Kesitler üzerine biyotinli sekonder antikor damlatılarak kaplı nemli kutu içinde karanlık ortamda 30 dak oda ısısında inkübe edildi. PBS ile 3x5 dak yıkama sonrası kesitlere 3-amino 9-etil karbozol (AEC) kromojen damlatılıp 5-10 dak içinde reaksiyon oluştuktan sonra PBS içine alınarak reaksiyon sonlandırıldı. 3x5 kez PBS uygulama sonrası kesitler distile suya alındı, hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. distile suda yıkandıktan sonra fazla su uzaklaştırılarak su bazlı kapama solüsyonu damlatılarak lamel ile kapatıldı. Negatif kontrol amacıyla primer antikor yerine birkaç kesitte PBS damlatıldı ve bu kesitlerde immün reaksiyon gözlemlenmedi.

İmmünohistokimyasal boyanan kesitler immün reaktif hücreleri tespit etmek için bir ışık mikroskobunda 40x büyütmede görüntülendi. Cas-3, Bax, Bcl2 ekspresyon düzeylerini saptamak amacıyla antijen antikor reaksiyon temelli boyanma şiddeti skorlama skalası kullanıldı. Skorlamada kullanılan kriterler Tablo 1'de detaylı olarak verilmiştir. Her bir protein açısından beş kesitte rastgele beş farklı alanda hücrelerin immün boyanma reaksiyon şiddetlerine göre ayrı ayrı kategorik sayımları yapıldı. Elde edilen sonuçlar $[\Sigma Pi(i+1)]$ formülü ile H-skor değerlerine dönüştürüldü. Bu formülde; i: boyanma yoğunluğu skorunu, Pi: boyanan hücrelerin yüzdesini göstermektedir.

Kurkumin ekstraktı solüsyonunun hazırlanması

Kurkumin suda çözünmeyen katı toz halde bir molekül olduğundan öncelikli olarak solüsyon haline getirdik. Bunun için daha önceki bir yayınímızda anlatıldığı şekilde işlemlerden geçirdik.^[22]

Özetle 2,5 g kurkumin tozu (Sigma-Aldrich) ardışık dimetil sülfoksit (DMSO) ve etanol içinde oda ısısında manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldü. Önce DMSO kurkumin çözeltisi 10 dakika 5000 rpm’de santrifüj edildi. DMSO uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan pellet 96’lık alkolle karıştırıldı ve işlem tekrar edildi. Etanolün uzaklaştırılmasından sonra pellet 25 mL steril salin solüsyonunda dilue edildi. 2,5 g/25 mL stok kurkumin solüsyonu hazırlandı. Kurkumin sıçanların kilolarına uygun dozlarda kolayca intraperitoneal olarak verilebilecek hale getirilmiş oldu.

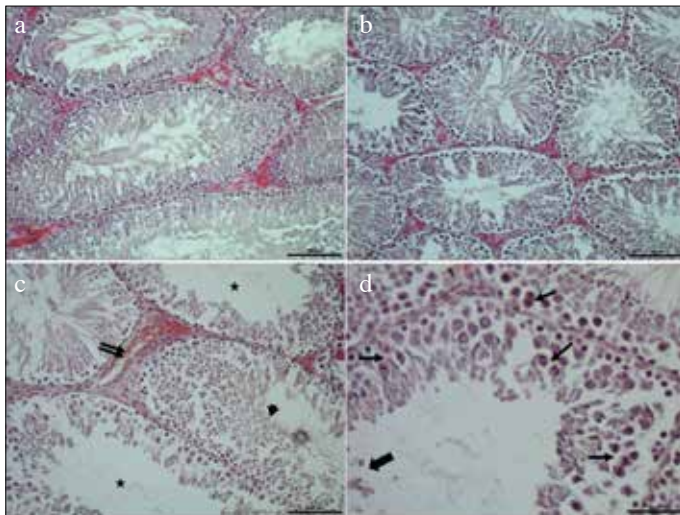
İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel analizler Statistical Package for the Social Science (IBM SPSS Statistics; Armonk, NY, ABD) for Windows, version 20 istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sürekli değişkenler arasındaki normal dağılım uyumu değeri

lendirmek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart eror mean (SEM) olarak ifade edildi. Cas-3, Bax ve Bcl-2 proteinlerin immün boyanma şiddetleri H-skorları ağırlıklı grup ortalama değerinin karşılaştırılması One-way ANOVA sonrası tukey HSD, Bax ve Bcl-2 oranlarının karşılaştırılması ise Least Significant Differences (LSD) testi ile yapıldı. P değerinin 0,05’ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Sisplatin uygulamasının ve sisplatin etkilerinin azaltılması için verilen kurkumin, E-vitamini ve bunların birlikte kombinasyonlarının testis dokusu histolojisindeki etkilerine yönelik hematoksilen eozin boyalı preparatlarda testiküler dokunun genel mikroskopik görünümü Şekil 1’de görülmektedir. Genel histopatolojik değerlendirmede kontrol grubunda testiküler doku seminifer tübüllerin morfolojisi, intersitisyel alanlar ve germinal epitel bakımından normal histolojik görünümündeydi (Şekil 1a). Bununla birlikte sisplatin verilen grubun testis dokusunda; germinal hücrelerde olgunlaşma gerilemesi, spermatogenik seri germ hücreleri bölünmelerinin duraksaması, germ hücrelerinin tübül lümenine döküntüsü, intersitisyel alanda genişleme ve vasküler hemoraji, germinal epitel bütünlüğünün yer yer bozulmuş olması gibi bazı dejeneratif anormallikler görüldü (Şekil 1c, d). Sisplatinin testis dokusuna olan zararlı etkisinin hafifletilmesi amacıyla tedavi uygulanan gruplarda özellikle de kurkumin E-vitamini uygulanan grupta bu hasarların hafiflemiş oldukları gözlemlendi (Şekil 1b).



Şekil 1. a-d. Seminifer tübüller, intersitisyel doku ve seminifer epitelin normal histolojik görünümde olduğu kontrol grubu (a). Doku hasarının azalmış olduğu kurkumin ve E-vitamini kombine tedavi grubuna ait testis dokusu histolojik görüntüsü (b). Germinal hücrelerde olgunlaşma eksikliği (ok başı), intersitisyel dilatasyon ve vasküler hemoraji (çift ok), içi boş ya da çok az sperm içeren tübüller (yıldız) (c); tübül içine germinal epitel hücresi dökülmesi (kalın ok), germ epitel düzensizliği, germ hücre bölünmesi durması (ince oklar) gibi histolojik hasarların görüldüğü (d) sisplatin grubu temsili histolojik görüntüleri (Bar: a, b, c 50 μ m; d, 100 μ m. HE)

Tablo 1. Cas-3, Bax, Bcl-2 proteinlerinin immün reaktivitesinin (boyanma şiddetlerini) derecelendirilmesinde kullanılan kriterler

Skor	İmmün reaktivite
0+	Negatif boyanma
1+	Zayıf şiddette boyanma
2+	Orta derece şiddette boyanma
3+	Şiddetli boyanma

İmmünohistokimyasal analizler sonucunda tespit edilen her bir apoptozis proteinine ait ortalama H-skor değerleri Tablo 2’de ve her gruptan her bir apoptozis protein ekspresyonuna ait temsili immünohistokimyasal boyamaların mikroskopik görüntüleri Şekil 2’de gösterilmiştir.

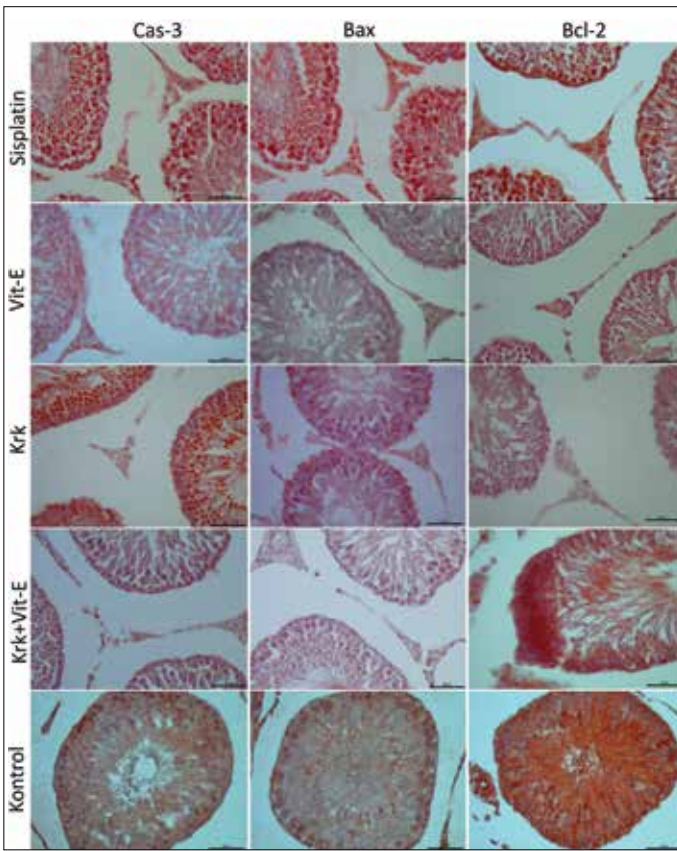
Bax proteinin immünohistokimyasal ekspresyonunun mikroskopik analizlerde immün boyanma şiddetinin kontrole göre sisplatin grubunda belirgin olarak artmış olduğu gözlemlendi. Tüm tedavi gruplarında ise Bax proteinin immün boyanma şiddetlerinin kontrol lehinde azalmış oldukları tespit edildi. Bax proteinin immün boyanma şiddetleri H-skor değerlerinin de sisplatin grubunda en yüksek olup istatistiksel olarak kontrol grubundan anlamlı olarak farklıydı ($p<0,001$). Tedavi gruplarının ağırlıklı ortalama H-skor değerlerinin istatistiksel karşılaştırılmasında ise tüm gruplar hem kendi aralarında hem de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak benzerdiler ($p>0,05$), sisplatin grubundan ise anlamlı olarak farklı oldukları saptandı ($p<0,001$).

Diğer bir apoptotik protein olan Cas-3 immünohistokimyasal ekspresyonunun mikroskopik analizlerinde immün boyanma yoğunluğunun yine sisplatin verilen grupta belirgin yükselmiş olduğu tespit edildi. Aynı şekilde tedavi uygulanan tüm grup-

Tablo 2. Apoptotik ve antiapoptotik yolak proteinlerin immün boyanma şiddeti skorları

	KONTROL	KRK+Vit-E	KRK	Vit-E	SİSP
Bax	8,42±2,59 ^a	10,81±1,24 ^a	17,74±2,86 ^a	24,16±4,01 ^a	116,97±9,65 ^b
Bcl-2	117,53±11,39 ^a	81,22±4,98 ^{ab}	45,33±7,12 ^b	49,86±4,38 ^b	108,35±29,29 ^{ab}
Acas-3	7,83±1,66 ^a	11,45±1,82 ^a	13,72±1,69 ^a	23,17±3,84 ^a	120,15±7,98 ^b

Değerler üzerindeki harfler her satırdaki parametre açısında gruplar arasındaki benzerlik (aynı harf) ve farklılıkları (farklı harf) ifade etmektedir.
KRK: kurkumin; Vit-E: E vitamini; SİSP: sisplatin. ±:SEM



Şekil 2. Cas-3, Bax, Bcl-2 proteinlerin immünohistokimyasal ekspresyonlarının her gruptan temsili mikroskopik görüntüleri (Krk: kurkumin, Bar=50 µm). Genel olarak Cas-3 ve Bax ekspresyonunun sisplatine yüksek, kontrolde düşük, tedavi gruplarında ise her ikisi arası değerde olup kontrole yaklaşmış olduğu görülmektedir. Bcl-2 ekspresyonunda ise tersi bir durum söz konusudur. Ancak sisplatin grubunda çok fazla olmasa da artış görülmektedir.

larda immün boyanma şiddetleri kontrol lehinde azalmıştı. Bu sonuçlarla uyumlu olacak şekilde H-skor değeri en yüksek sisplatin verilen gruptaydı ve istatistiksel olarak kontrol ve tedavi gruplarında anlamlı olarak farklıydı ($p<0,001$). Tedavi gruplarının H-skor değerleri, istatistiksel olarak hem kendi aralarında hem de kontrol grubu ile benzer ($p>0,05$) ancak sisplatin grubundan farklı idiler ($p<0,001$). Her iki apoptotik protein immünohistokimyasal ekspresyonlarının özellikle de kurkumin

+ E-vitamini kombinasyonu grubunda kontrol grubuna daha yakın olduğu dikkati çekmektedir.

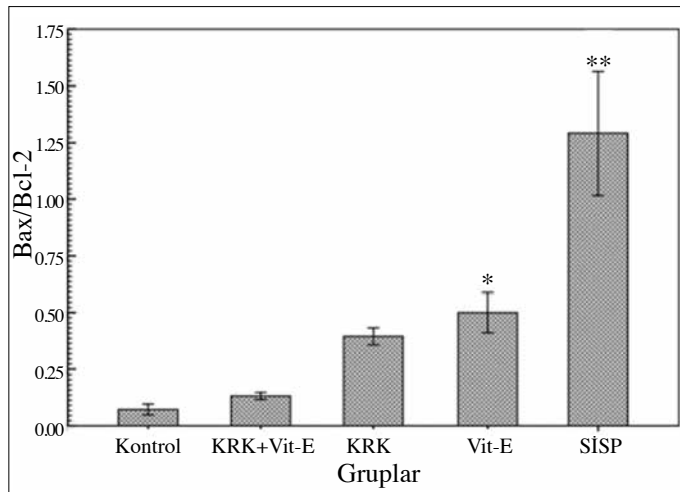
Antiapoptotik protein Bcl-2 immünohistokimyasal ekspresyonu analizlerinde immün boyanma yoğunluğunun en yüksek kontrol grubunda olduğu gözlemlendi. Sisplatin verilen grupta Bcl-2 ekspresyonunun kontrol grubu ile benzer şekilde yükselmiş olması dikkat çekiciydi. Kurkumin ve E-vitamini kombinasyonu verilen tedavi grubunda bu proteinin immün boyanma yoğunluğu kontrol grubu lehinde yükselmişti. Diğer tedavi uygulanan gruplarda ise immün boyanma reaksiyon şiddetleri zayıftı. Bu bulgular ile paralel olarak sisplatin, kontrol ve kurkumin + E-vitamini kombinasyon tedavi grupların H-skorları ortalama değerlerinin istatistiksel olarak benzer oldukları hesap edildi ($p>0,05$). Kurkumin ve E-vitamini grupları sisplatin ile benzer ($p>0,05$), kontrolden ise farklı idiler (sırasıyla $p=0,24$, $p=0,37$).

Bax/Bcl-2 H-skor değerleri oranları beklendiği gibi en yüksek sisplatin en düşük kontrol grubundaydı. Sisplatin grubu istatistiksel olarak diğer gruplardan belirgin olarak farklıydı ($p<0,001$). Tüm tedavi grupların Bax/Bcl-2 oranı istatistiksel olarak kontrol grubu ile benzer sisplatin grubundan ise farklıydı ($p>0,05$). Ancak, sadece E-vitamini grubu hem kontrolden hem de sisplatin grubundan anlamlı olarak farklıydı (sırasıyla $p=0,35$ $p=0,001$) (Şekil 3).

Tartışma

Tüm dünyada kanser insidansında belirgin bir artış olduğu bilinmektedir. Ülkemizde de toplam kanser insidansı T.C. Sağlık Bakanlığı'nın kanser istatistikleri verilerine göre 2015 yılı itibarı ile yüzbinde 210,2 (erkeklerde yüzbinde 24,6; kadınlarda yüzbinde 173,6) olarak açıklanmıştır. Kanser tedavisinde radyoterapi, cerrahi girişim ve kemoterapi uygulaması gibi seçenekler yer almaktadır. Kanser kemoterapik tedavisinde taksanlar, 5-floraurasil (5FU), bleomisin, etoposid ve sisplatin yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kemoterapik ajanların kullanımı sonrası bulantı, kusma, lökopeni, saç dökülmesi, diyare, nefrotoksisite ve karaciğer hasarı gibi pek çok olumsuz yan etkiler sık olarak görülmektedir. Bu akut etkilerine karşın özellikle son 2-3 dekat içinde kanser tedavisinin ve tanı olanaklarının artması ile 5 ve 10 yıllık sağ kalımla kür cevabı artmıştır. Başlangıçta hasta ve hekim



Şekil 3. Her bir gruptaki Bax ve Bcl-2 proteinlerin H-skor değerlerinin oranları

*p=0,35 kontrol göre p=0,001 sisplatine göre, **p<0,001 kontrol ve tedavi gruplarına göre. KRK: kurkumin; Vit-E: E vitamini; SISP: sisplatin

için birinci öncelik hayatta kalmaktı ve diğer vücut işlevleri daha geri planda kalmaktaydı. Buna göre üreme işlevleri daha az düşünülüyordu. Ancak kür cevaplarının artmasıyla üreme fonksiyonları tedavi sonrası giderek daha ön plana çıkmaya başlamıştır. Kemoterapi sonrası süre ve doza bağlı olarak spermatogenezin geri dönüşlü ve geri dönüşümlü olamayan şekilde bozulabileceği bilinmektedir. Testislerin etkilenme derecelerine göre spermatogenez ikinci yıla kadar geri dönebilmektedir. Spermatogenezin bozulmasının en aza indirilmesi oldukça önemlidir.

Sisplatin farklı tip kanserlerin tedavisinde kullanılan oldukça etkili kemoterapik ilaçlardan biridir. Bununla birlikte çok sayıdaki toksik yan etkilerinden dolayı klinik olarak kullanımı sınırlıdır.^[11] Özellikle erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri intersitisyel Leydig hücrelerini, seminifer tübül epiteli, Sertoli ve özellikle de germ hücrelerini hedef alarak reproduktif sistem toksisitesine neden olmaktadır.^[23] Bu nedenle sisplatin yan etkilerinin önlenmesi önemlidir ve klinik kullanımda sisplatinin yan etkilerinin nasıl önlenebileceği hala önemli araştırma konularındandır. Bu çalışmada sisplatin kaynaklı testiküler apoptozisin Cas-3 ve Bax apoptotik protein yolları üzerinden gerçekleştiğini bununla birlikte kurkumin, E-vitamini gibi antioksidan moleküllerin ayrı ayrı verildiklerinde ve özellikle de birlikte kombinasyonlarının verilmesi sonucunda toksik etkileri engelleyerek hücre ölümlerini azalttığı immünohistokimyasal olarak tespit edilmiştir.

Normal metabolizma sonucu veya daha çok iskemik durumlar, radyasyon, inflamasyon, yaşlanma, kimyasal maddeler, ilaçlar ve elektromanyetik alanlara maruz kalma gibi durumlar sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri OS'e neden olurlar. OS, lipid ve protein yapıların çift bağ içeren grupları ile DNA'daki

bazların çift bağlarına saldırır. Sonuçta hücre içi lipid, protein ve DNA gibi makro moleküller hasarlanarak hücre zedelenmesine bağlı apoptozis meydana gelir.^[24]

Testisler yüksek oranda poliansatüre zar lipidlerini ihtiva ettiklerinden OS'in ana hedef organlarındanındır.^[3] Bu nedenle testisler sisplatin gibi pek çok sayıdaki oksidatif ajanlardan yüksek oranda etkilenirler. Ancak diğer bir taraftan testisler zayıf damarsal desteklerinden dolayı düşük oksijen basınçlarına sahip oldukları için bir dereceye kadar oksidatif hasardan az da olsa bir miktar kendi kendilerini koruyabilirler. Buda testislere bir dereceye kadar OS'e karşı belli bir düzeyde de olsa bir dayanıklılık kazandırır.^[25]

Testis dokusu ve spermatogenez radyoterapi, varikozel, kemoterapi, torsiyon, enfeksiyonlar ve sigara içimi gibi pek çok faktöre bağlı olarak oksidatif hasar oluşması sonrası etkilenmektedir. Sisplatinin testis dokusunda hasar oluşturduğu çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. Çalışmamızda da kontrol grubuna göre sisplatin verilen grupta testislerde histolojik hasarlar tespit edilmiş ve Şekil 1'de gösterilmiştir.

Bu mevcut çalışma kurkumin ve E-vitaminin tek ya da birlikte kullanımlarının Wistar cinsi erkek sıçanların sisplatin kaynaklı testiküler apoptozisine karşı koruyucu antiapoptotik etkiye sahip olabileceğine işaret etmektedir. Bu durum testiküler dokuda sisplatinin apoptotik hücrelerin göstergesi olan caspas-3 ekspresyonları artışının bu antioksidan moleküllerin verilmesi ile hem Cas-3 hem de Bax ekspresyonunun azalmış olması ayrıca antiapoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonunun yükselmiş olmasının immünohistokimyasal olarak tespit edilmesi ile gösterildi (Şekil 2). Ayrıca hematoksilen eozin boyalı testis dokusu kesitlerinin genel histolojik görüntü analizleri sonuçlarımız da bunu destekler niteliktedir (Şekil 1).

Endojen antioksidanların azalmış ekspresyonu sisplatin tedavisinin oksidatif hasarı artırmasıyla da ilişkili olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada sisplatinin kohlear dokularda DNA hasarlarına ve serbest radikallerin fazla miktarda oluşumuna da yol açabileceği gösterilmiştir.^[13]

Apoptoz normal büyüme ve gelişme altında veya radyasyon ve toksinlere maruz kalmaya veya iskemiye verilen yanıtın bir parçası olarak ortaya çıkabilen kontrollü bir hücre ölümü şeklindedir. Apoptozis, sisplatin kaynaklı toksisitenin başlıca sonucu olabileceği de ileri sürülmüştür. Bu durum mevcut çalışmanın sonuçları ile de uyumlu bulunmuştur. Bununla bağlantılı olarak Freitas ve ark.^[21] da çalışmamızda da tespit edildiği gibi 16 mg/kg sisplatin uygulamasının üç gün sonrasında apoptozise neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bu yüzden bu deneysel çalışmada sıçanlara aynı dozda sisplatin uygulaması yapılmıştır.

Kurkumin bazı kemoterapi ilaçlarının yan etkilerini sınırlayabilecek anti-inflamatuar, antioksidan ve anti-kanser aktivitesine

sahip çok yönlü bir moleküldür. Kurkumin aracılı hücreSEL korumanın mekanizması tam olarak açık değildir. Bazı tespitler kurkuminin bir serbest radikal kovucusu gibi aktivite gösterebildiğine, diğer bazı çalışmalar ise tümör hücresinde serbest radikal oluşumunu teşvik ederek kanserli hücrelerin apoptozuna neden olduğunu ileri sürmektedirler.^[26,27]

Kurkuminin organizma tarafından çok iyi tolere edildiği kabul edilmektedir. Kurkumin ile tedavi edilen hayvanlarda hiçbir hepatotoksitesi tespit edilmemiştir. Üstelik sisplatinin de dahil olduğu diğer ilaçların sebep olduğu hepatotoksiteyi hafiflettiği de bildirilmiştir.^[18] Bununla birlikte mevcut bilgiler, sisplatin ile tedavi edilen hastalarda mitokondriyal disfonksiyonun hem hepatotoksisteye ve hem de nefrotoksisteye katkı sağladığını yönündedir.^[17,18]

E-vitamini tokoferol, tocotrienol, serbest radikal süpürücüleri içerir ve sisplatin nefrotoksistesi ile endotel hücresi toksistesi sınırladığı bildirilmiştir.^[19,20] E-vitamini ayrıca doymamış fosfolipit membranı oluşturan yağ asitleri yapısını serbest radikallerin hasarından koruyucu aktivite gösterir ve lipid peroksidasyonu reaksiyonlarının potansiyel bir inhibitörüdür.^[20,28]

Salehi ve ark.^[17] kurkuminin deksametazon ile kombinasyonu uygulamasının dokuların korunmasını sağladığını bildirmişlerdir. Fetoni ve ark.^[18] kurkuminin hem oksijenaz-1 enzim ekspresyonunu güçlendirerek sisplatin ototoksistesi hafiflettiğini in vivo olarak göstermişlerdir. Kalkanis ve ark.^[27] da E-vitamini desteğinin sisplatin kaynaklı toksiteyi azalttığını ratlarda göstermişlerdir. Başka bir çalışmada da intratimpanik E-vitamini deksametazon desteğinin bizim sonuçlarımız ile de desteklendiği gibi sisplatin tedavisinin yan etkilerinin hafifletilmesinde oldukça etkili olduğu rapor edilmiştir.^[20]

Bir diğer çalışmada, sisplatine maruz bırakılmış nöral hücre kültürüne kurkuminin sitotoksite etkisi ve bu hücrelerde sisplatinin indüklediği genotoksisteye karşı kurkuminin farklı dozlardaki antigenotoksite etkinliği araştırılmış. Kurkuminin üç farklı konsantrasyonunda önemli ölçüde sisplatin tarafından uyarılan mikronükleus sıklığını azalttığı gözlenmiştir. Bu nöronal model antioksidan ilaçlar (kurkumin) ile kemoterapi ilaçlarının kanser tedavisinde neden olduğu genotoksik etkilerin azaltılması açısından birlikte kullanılabileceğini göstermiştir.^[29]

Bir başka çalışmada sisplatinin neden olduğu ototoksistede E, B, C vitaminleri ve L-karnitinin etkileri araştırılmış. Sonuçta özellikle E-vitamini başta olmak üzere diğer vitaminlerin ve L-karnitinin sisplatin kaynaklı ototoksiteyi azalttığı gözlemlenmiştir.^[30]

Sisplatine bağlı ototoksistede kurkumin ve E-vitaminin koruyucu etkilerini araştırdığımız önceki çalışmamızda bu çalışma sonucunda da olduğu gibi bu antioksidan moleküllerin sisplatin verilmesine bağlı olarak artmış olan hücre apoptozisini azalttığını tespit ettik.^[14,21]

Bu literatür bilgilerine dayanarak kurkumin ve E-vitamininin sisplatin kaynaklı testiküler toksite sonucu artan hücre ölümle-rini antioksidan, serbest radikal süpürücü ve benzeri özellikleri nedeniyle engelleyebileceğini söyleyebiliriz. Bundan dolayı bu antioksidan moleküller hem ayrı ayrı hem de birlikte kombinasyon olarak verilerek sisplatinin testiküler toksistesi üzerine etkisi apoptozis yolak proteinlerin immünohistokimyasal analizleri ile değerlendirildi.

Elde ettiğimiz sonuçlar sisplatinin testiküler hücrelerde apoptozis yolak proteinlerinden apoptotik Cas-3 ve Bax immün ekspresyonlarını upregüle, antiapoptotik protein Bcl-2 immün ekspresyonunu downregüle ederek testiküler apoptozise neden olduğunu göstermektedir. Ancak Bcl-2 downregülasyonu beklenen kadar düşük değildi. Bunun nedeninin sisplatin toksistesi-ne karşı hücrelerin kendi iç dinamiklerini devreye sokarak Bcl-2 ekspresyonunu yükseltmek suretiyle hayatta kalmaya çalışıyor olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir. E-vitamini ve kurkumin verilmesinin ise sisplatin kaynaklı apoptozise karşı apoptotik proteinlerin (Cas-3, Bax) ekspresyonu artışı ve Bcl-2 antiapoptotik protein ekspresyonunu artırarak koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu durum Bax ve Bcl-2 oranlarının tedavi gruplarında özellikle bu iki maddenin birlikte verilmesinde azalmış olması ile ortaya konmuştur. Özetle mevcut sonuçlarımız, kurkumin ve E-vitamininin uygulanmasının, sisplatin tedavisi sırasında testis germ hücrelerinin korunması için yararlı yardımcı bir terapi olabileceğini göstermektedir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Gaziosmanpaşa University School of Medicine.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - F.G.; Design - F.G.; Supervision - F.G., F.E.; Resources - F.G., F.E.; Materials - F.G.; Data Collection and/or Processing - F.G.; Analysis and/or Interpretation - F.G.; Literature Search - F.G., F.E.; Writing Manuscript - F.G.; Critical Review - F.E., F.G.; Other - F.G., F.E.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - F.G.; Tasarım - F.G.; Denetleme - F.G., F.E.; Kaynaklar - F.G., F.E.; Malzemeler - F.G.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - F.G.; Analiz ve/veya Yorum - F.G.; Literatür Taraması - F.G., F.E.; Yazıyı Yazan - F.G.; Eleştirel İnceleme - F.E., F.G.; Diğer - F.G., F.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Kaynaklar

1. Lirdi LC, Stumpp T, Sasso-Cerri E, Miraglia SM. Amifostine protective effect on cisplatin-treated rat testis. *Anat Rec (Hoboken)* 2008;291:797-808. [\[CrossRef\]](#)
2. Roldan-Fidalgo A, Martin Saldana S, Trinidad A, Olmedilla-Alonso B, Rodriguez-Valiente A, Garcia-Berrocal JR, et al. In vitro and in vivo effects of lutein against cisplatin-induced ototoxicity. *Exp Toxicol Pathol* 2016;68:197-204. [\[CrossRef\]](#)
3. Beytur A, Ciftci O, Oguz F, Oguzturk H, Yilmaz F. Montelukast attenuates side effects of cisplatin including testicular, spermatological, and hormonal damage in male rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012;69:207-13. [\[CrossRef\]](#)
4. Kaya K, Ciftci O, Cetin A, Dogan H, Basak N. Hesperidin protects testicular and spermatological damages induced by cisplatin in rats. *Andrologia* 2015;47:793-800. [\[CrossRef\]](#)
5. Gonsette RE. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci* 2008;274:48-53. [\[CrossRef\]](#)
6. Martinez Y, Li X, Liu G, Bin P, Yan W, Mas D, et al. The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids* 2017;19:1-8. [\[CrossRef\]](#)
7. Anand H, Misro MM, Sharma SB, Prakash S. Protective effects of Eugenia jambolana extract versus N-acetyl cysteine against cisplatin-induced damage in rat testis. *Andrologia* 2015;47:194-208. [\[CrossRef\]](#)
8. Pectasides D, Pectasides E, Papaxoinis G, Skondra M, Gerostathou M, Karageorgopoulou S, et al. Testicular function in poor-risk nonseminomatous germ cell tumors treated with methotrexate, paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin combination chemotherapy. *J Androl* 2009;30:280-6. [\[CrossRef\]](#)
9. Takeshita H, Chiba K, Kitayama S, Moriyama S, Omura R, Noro A. Triplet chemotherapy with paclitaxel, gemcitabine, and cisplatin as second-line therapy for advanced urothelial carcinoma. *Mod Chemother* 2013;2:1. [\[CrossRef\]](#)
10. Colpi GM, Contalbi GF, Nerva F, Sagone P, Piediferro G. Testicular function following chemo-radiotherapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;113(Suppl 1):S2-6. [\[CrossRef\]](#)
11. Yumusakhuylyu AC, Yazici M, Sari M, Binnetoglu A, Kosemihal E, Akdas F, et al. Protective role of resveratrol against cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012;76:404-8. [\[CrossRef\]](#)
12. Bilmez ZEB, Aydin S, Sanli A, Altintoprak N, Demir MG, Erdogan BA, et al. Oxytocin as a protective agent in cisplatin-induced ototoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;77:875-9. [\[CrossRef\]](#)
13. Sagit M, Korkmaz F, Akcadag A, Somdas MA. Protective effect of thymoquinone against cisplatin-induced ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013;270:2231-7. [\[CrossRef\]](#)
14. Soyaliç H, Gevrek F, Koç S, Avcu M, Metin M, Aladağ İ. Intraperitoneal curcumin and vitamin E combination for the treatment of cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2016;89:173-8. [\[CrossRef\]](#)
15. Strich R. Programmed Cell Death Initiation and Execution in Budding Yeast. *Genetics* 2015;200:1003-14. [\[CrossRef\]](#)
16. Yildirim NC, Kandemir FM, Benzer F. Beneficial effects of grape seed extract against cisplatin-induced testicular damage in rabbits. *Dig J Nanomat Biostruct* 2011;6:155-9.
17. Salehi P, Akinpelu OV, Waissbluth S, Peleva E, Meehan B, Rak J, et al. Attenuation of cisplatin ototoxicity by otoprotective effects of nanoencapsulated curcumin and dexamethasone in a guinea pig model. *Otol Neurotol* 2014;35:1131-9. [\[CrossRef\]](#)
18. Fetoni AR, Eramo SLM, Paciello F, Rolesi R, Podda MV, Troiani D, et al. Curcuma Longa (Curcumin) Decreases In Vivo Cisplatin-Induced Ototoxicity Through Heme Oxygenase-1 Induction. *Otol Neurotol* 2014;35:E169-E77. [\[CrossRef\]](#)
19. Aggarwal BB, Sundaram C, Prasad S, Kannappan R. Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: its potential against cancer and other chronic diseases. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1613-31. [\[CrossRef\]](#)
20. Paksoy M, Aydurhan E, Sanli A, Eken M, Aydin S, Oktay ZA. The protective effects of intratympanic dexamethasone and vitamin E on cisplatin-induced ototoxicity are demonstrated in rats. *Med Oncol* 2011;28:615-21. [\[CrossRef\]](#)
21. De Freitas MR, Figueiredo AA, Brito GA, Leitao RF, Carvalho Junior JV, Gomes Junior RM, et al. The role of apoptosis in cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Braz J Otorhinolaryngol* 2009;75:745-52. [\[CrossRef\]](#)
22. Soyaliç H, Gevrek F, Karaman S. Curcumin Protects Against Acoustic Trauma in the Rat Cochlea. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2017;99:100-6. [\[CrossRef\]](#)
23. Boekelheide K. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;34:6-8. [\[CrossRef\]](#)
24. Yan LJ. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biol* 2014;2:165-9. [\[CrossRef\]](#)
25. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 2008;1:15-24. [\[CrossRef\]](#)
26. Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Sethi G, et al. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radic Biol Med* 2007;43:568-80. [\[CrossRef\]](#)
27. Kalkanis JG, Whitworth C, Rybak LP. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope* 2004;114:538-42. [\[CrossRef\]](#)
28. Villani V, Zucchella C, Cristalli G, Galie E, Bianco F, Giannarelli D, et al. Vitamin E neuroprotection against cisplatin ototoxicity: Preliminary results from a randomized, placebo-controlled trial. *Head Neck* 2016;38(Suppl 1):E2118-21. [\[CrossRef\]](#)
29. Mendonca LM, Dos Santos GC, Antonucci GA, Dos Santos AC, Bianchi Mde L, Antunes LM. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. *Mutat Res* 2009;675:29-34. [\[CrossRef\]](#)
30. Tokgoz SA, Vuralkan E, Sonbay ND, Caliskan M, Saka C, Besalti O, et al. Protective effects of vitamins E, B and C and L-carnitine in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity in rats. *J Laryngol Otol* 2012;126:464-9. [\[CrossRef\]](#)