

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILMIŞ SIÇANLARDA
RESVERATROLÜN TESTİS DOKUSUNDAKİ ANTİOKSİDAN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Haluk SÖYLEMEZ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Y. Murat UĞRAŞ**

MALATYA-2006

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILMIŞ SIÇANLARDA
RESVERATROLÜN TESTİS DOKUSUNDAKİ ANTİOKSİDAN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Haluk SÖYLEMEZ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Y. Murat UĞRAŞ**

İÇİNDEKİLER

I- GİRİŞ	1
II- GENEL BİLGİLER	3
1.Sigara	3
1.1Sigaranın Tarihçesi	3
1.2. Sigaranın içerdiği zararlı kimyasal maddeler	4
1.3.Sigaranın sağlık üzerindeki etkileri	6
1.4. Sigaranın üreme üzerindeki etkileri	6
1.5. Sigaranın oksidatif strese yol açma mekanizması	7
2.Testis	7
2.1.Testislerin Anatomisi	8
2.2. Testislerin Histolojisi	10
2.2.a. Tubulus Seminiferus Kontortus	10
2.2.b. Spermatojenik Hücreler ve Spermatojenesis	11
2.2.c. Sertoli Hücreleri	12
2.2.d. İntertisyel Doku	12
2.2.e. Leydig Hücreleri	13
3.Üreme Fizyolojisi	13
3.1.Spermatojenesisin Hormonal Düzenlenmesi	13
3.2.Spermin olgunlaşması, emisyon ve ejakülasyon	14
3.3. Semen İçeriği	14
4. Serbest Radikaller	15
4.1. Süperoksit Radikalleri ($O_2^- \cdot$)	15
4.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	16
4.3.Hidroksil Radikalleri ($OH\cdot$)	16
4.4.Nitrik Oksit (NO)	16
4.5. Peroksil Radikalleri ($LOO\cdot$)	16
5. Antioksidan Maddeler	16
5.1. Doğal (endojen) Antioksidanlar	17
5.1.a- Enzimler :	17
5.1.b-Enzim olmayanlar:	17
5.2. Eksojen Antioksidanlar:	17

5.3.Gıda Antioksidanları	18
6. Resveratrol	18
6.1. Resveratrolün vazodilatatör etkisi	19
6.2. Trombosit agregasyon inhibisyonu	20
6.3. Antiinflamatuvar aktivite	21
6.4. Resveratrolün antioksidan aktivitesi:	21
6.5. Resveratrolün testis üzerine etkilerini gösteren çalışmalar	22
III. GEREÇ VE YÖNTEM	24
1-Hayvanların Seçimi ve Hazırlığı	24
2-Deney Hazırlığı ve kullanılan gereçler	24
IV. BULGULAR	28
V. TARTIŞMA	35
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
VII. ÖZET	41
VIII. SUMMARY	43
IX. KAYNAKLAR	45

TABLO VE ŐEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1	Testis ve epididimis	9
Şekil-2	Testisin kolleteral arteriyal dolaşımı	9
Şekil-3	Erkek sıçan üreme organları	10
Şekil-4	Erişkin sıçan testisi	11
Şekil-5	İnsan testisi	11
Şekil-6	Resveratrolün kimyasal yapısı	18
Şekil-7	Sıçanların sigara dumanına maruz bırakıldığı düzenek	25
Şekil-8	Grup I seminifer túbül histolojik görünüm	32
Şekil-9	Grup II seminifer túbül histolojik görünüm	32
Şekil-10	Grup II seminifer túbül histolojik görünüm	33
Şekil-11	Grup III seminifer túbül histolojik görünüm	33
Şekil-12	Grup IV seminifer túbül histolojik görünüm	34
Tablo -1	Sigara dumanında bulunan bazı gaz ve partiküler faz komponentleri	5
Tablo -2	Sıçanların ağırlık takipleri	28
Tablo -3	Johnsen testiküler biopsi skoru karşılaştırması	31
Grafik -1	Testis MDA düzeyi	29
Grafik -2	Testis GSH düzeyi	29
Grafik -3	Testis NO düzeyi	30

KISALTMALAR DİZİNİ

SOD	Süperoksid Dismutaz
CAT	Katalaz
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
FSH	Folikül Stimülan Hormon
LH	Lüteinizan Hormon
hCG	İnsan Plasental Gonadotropini (Human Corionik Gonadotropin)
GnRH	Gonodotropin Serbestleştirici Hormon
ICSH	İnterstisyel Hücre Stimülan Hormon
PRL	Prolaktin
ABP	Andojen Bağlayıcı Protein
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
TNF	Tümör Nekrozu Faktörü
TxA2	Tromboksan A2
PGI2	Prostoglandin I2
DES	Dietilstilbesterol
MDA	Malondialdehid
BaP	Benzopiren

I-GİRİŞ

Sigara, içinde barındırdığı çeşitli toksik maddelerle organizmadaki bütün sistemleri olumsuz etkilemektedir. Hücre siklusu hızlı olan spermatozoanın sigara dumanında bulunan mutajenik ve karsinojenik maddelere karşı daha hassas olduğu gösterilmiştir (1). Ayrıca sigaranın testis dokusunda oksidatif strese yol açtığı kanıtlanmıştır (2). Oksidatif stres serbest radikallerin yol açtığı ve hücrelere fiziksel hasar veren bir süreçtir. Vücutta serbest radikaller oksidatif fosforilasyon, ürik asit metabolizması ve prostoglandin sentezi gibi biyokimyasal olaylar sonucu sürekli olarak oluşur (3). Oksidatif stres, hücrel antioksidan sistemi oluşturan süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve melatonin tarafından giderilir (4).

Testis kan damarları açısından zengin bir organdır. Bu nedenle sigarada bulunan ve kanla taşınan toksik maddelerin bu organda oksidan – antioksidan sistem arasındaki dengeyi dokuların aleyhine değiştirmesi olasıdır. Bu durumda artan serbest radikaller, testiste doku hasarına yol açar. Oksidatif stresin spermatozoa fonksiyonlarını bozduğu ve anormal spermatozoa üretimine yol açtığı bilinmektedir (5).

Resveratrol (3,4',5- trihidroxy-trans-stilbene) üzüm ve şarapta bulunan antioksidan ve antiproliferatif etkili doğal bir fitoaleksindir. Yayınlar resveratrolün; inflamatuvar olaylarda (6,7), aterosklerozda (8,9) ve karsinogenezde (10,11) düzenleyici rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca resveratrolün antioksidan (12,13), antisiklooksijenaz (10,14), lipid ve lipoprotein metabolizmasını düzenleyici etkinliği de (6,15) gösterilmiştir.

Resveratrolün radikal süpürücü etkisi ile DNA hasarını azalttığını gösteren çalışma mevcuttur (16). Resveratrolün sağlıklı sıçan testisinde spermatozoa miktarını resveratrol verilmeyen gruba göre anlamlı miktarda arttırdığı gösterilmiştir (17). Testis torsiyonu yapılarak iskemi reperfüzyon oluşturulmuş sıçan testisinde de resveratrolün testiste oluşan oksidatif hasarı anlamlı olarak giderdiği ortaya konmuştur (12,18).

Sigaranın testis dokusunda oksidatif strese yol açtığı (2) bilinmesine rağmen, resveratrolün antioksidan etkinliğinin bu durumu nasıl değiştirdiğini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada sigara dumanına maruz bırakılmış sıçanlara resveratrol verilmesinin testis histolojisi ve biyokimyası üzerine olan etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

II-GENEL BİLGİLER

1. Sigara

1.1.Sigaranın Tarihçesi

Kristof Kolomb 1492 yılında Amerika kıtasını keşfi sonrası Avrupa'ya dönüşünde, daha önce bu kıtada bulunmayan tütün (*Nicotiana Tabacum*) tohumları ve yapraklarını beraberinde getirmiştir. 1556 yılında Fransa ilk defa tütünle tanıştı. Tütün içmeyi Avrupa' da popüler hale getiren Fransız Jean Nicot'un soyadına atfen 19. yüzyıl bilim adamları sigara dumanındaki kimyasal bir maddeye "nicotin" adını verdiler. İlk ticari tütün ekimi 1612 yılında Amerika Virginia'da yapıldı ve 10 yılda bu bölgenin en önemli ihraç maddesi haline geldi. Bilinen ilk tütün yasağı 1634 yılında Rus Çarı tarafından çıkarıldı. Bu dönemde ceza olarak tütün içenlerin burnu kesiliyordu. Tütün-kanser araştıran ilk çalışma 1761 yılında İngiliz doktor John Hill tarafından 'Cautions Against the Immoderate Use of Snuff' (Aşırı Enfiye Kullanımına Dikkat) başlığı ile yayınladı. 1800'lerin başında puro tüketimi arttı, tütün çiğneme ve pipo kullanımı ortaya çıktı. 1856 yılında Kırım Savaşı'nın ardından İngiliz ve Fransız askerleri, Türk tütününü Avrupa'ya götürdüler. 1881 yılında Amerika'da John Bonsack ilk sigara yapan makinenin patentini aldı. 1889 yılında Saint John Hastanesi sigaranın zararlarını ve gırtlak kanserine neden olduğunu anlatan bir kitap yayınladı. 1891 yılında Kanada'nın British Columbia Eyaletinde, 15 yaşından küçüklerin tütün içmesi yasaklandı. 1914 yılında Birinci Dünya Savaşının başlamasıyla, sigarayı yasaklama hareketi sekteye uğradı. Dahası tüm dünyada, cephedeki askerlere tütün yollama kampanyaları başladı. 1920'lerde dünyada sigara kullanımı en üst düzeye ulaştı ve bir yılda tüketilen sigara sayısı milyarları buldu. 1930 yılında Almanya Köln Üniversitesi bilim adamları sigara ve kanser arasındaki ilişkiyi istatistiksel olarak ortaya koydu.

1938 yılında Johns Hopkins Üniversitesi doktorlarından Raymond Pearl sigara içenlerin, sigara içmeyenlere göre daha genç yaşta öldüklerini bildirdi. Tüm bunlara rağmen 1943 yılına gelindiğinde dünyadaki yetişkin nüfusun %60-80'ini sigara içmekteydi (19).

Sigara günümüzde de önemli sağlık sorunlarından birisidir. Her bir dakikada 6 kişi sigara ve diğer tütün ürünlerinin kullanımının sonuçlarına bağlı olarak hayatını kaybetmektedir. 1990'larda yılda yaklaşık 3 milyon kişinin ölümünün sigaraya bağlı olarak geliştiği, bu sayının yükselmeye devam edeceği ve 2020 yılında 10 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir (20).

Günümüzde yaklaşık 1,1 milyar kişi sigara içmektedir ve bu insanların 800 milyonu gelişmekte olan ülkelerde yaşamaktadır. Ülkemizde ise sigara kullanım düzeyinin araştırıldığı yeterli bir çalışma yoktur. Ülke çapında temsil niteliği bulunan tek çalışma, 1988 yılında yapılan 'Sigara Alışkanlıkları ve Sigarayla Mücadele Kampanyası Kamuoyu Araştırması'dır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre ülkemizde sigara içme oranı tüm nüfusun % 43,6'sıdır (21).

1.2. Sigaranın içerdiği zararlı kimyasal maddeler

Sigara ve dumanında 4000'den fazla kimyasal madde bulunmaktadır. Bunlardan 43' ünün karsinojen olduğu bilinmektedir. Sigara dumanı gaz ve partiküler faz olarak iki fazda incelenir. Bu fazların içerdiği kimyasal maddelerden bazıları Tablo- 1 de gösterilmiştir (22).

Serbest radikaller ve nitrik oksid gaz faz içeriğinde yüksek konsantrasyonda bulunur. Gaz fazdaki radikaller kısa ömürlüdür. Bu fazdaki nitrik oksid oksidasyonla nitrojendiokside dönüşür. Nitrojendioksid organik yapılara karşı daha reaktiftir. Partiküler faz radikalleri suda eriyebilir ve oldukça bol miktarda nikotin ve nitrosamin içerir. Partiküler fazdaki bazı radikaller DNA'yı etkileyebilmektedir. Bu radikaller aracılığı ile dioksijenin redüksiyonu ile süperoksit (O⁻) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşur. Bu moleküllerin her ikisi de DNA harabiyetine sebep olur(23).

Nikotin, tütün bitkisinin yapraklarında bulunan sıvı, renksiz, uçucu, suda çözünebilir ve kuvvetli alkali (pKa=11) özelliği olan bir alkaloiddir. Kurutulmuş tütün

yaprağında % 0,5- 8 oranında bulunur. Tütün yaprağındaki alkaloidlerin % 95'ini oluşturur. Zaman içinde havanın etkisiyle kahverengi renk alır ve tütüne özgü koku kazanır. Yapraktaki nikotinin yüzdesi tütünün yetiştiği bölgeye ve tütünün türüne göre değişebilir. Nikotin santral sinir sistemine çok hızlı geçebilecek kadar lipofiliktir (24).

Gaz Faz	Partiküler Faz
Carbon Monoxide	Partiküler matter
Carbon Dioxide	Nicotine
Formaldehyde	Phenol
Acrolein	Catechol
Acetone	Aniline
Pyridine	2-toluidine
3-vinylpyridine	2-naphthylamine
Hydrogen cyanide	Benz(a)anthracene
Nitrogen oxides	Benzo(a)pyrene
Ammonia	Quoline
N-nitrosodimethylamine	N-nitrosornicotine
N-nitrosopyrolidine	N-nitrosodiethanolamine
	Nickel
	Polonium- 210

Tablo-1: Sigara dumanında bulunan bazı gaz ve partiküler faz komponentleri

Akciğer veya ağız yoluyla vücuda giren nikotinin % 5- 10' u değişmeden idrarla atılırken % 85-90'ı karaciğerde metabolize olur. Sonuçta nikotin oksid ve kotinin olarak bilinen iki ana metabolit ortaya çıkar. Sigara içenlerin kan nikotin düzeyleri sabah uyandıklarında yaklaşık 5 ng/ml kadardır. Kotininin yarılanma süresi 18-20 saattir. Bu nedenle günün değişik saatlerinde kan kotinin düzeyi pek değişmez ve 250 ng/ml olarak ölçülebilir. Kotinin bu özelliği ile sigara ve nikotin kullanımı için güvenilir bir göstergedir (25).

Nikotin hedef hücrelerdeki nikotinik reseptörleri aktive ederek etki gösterir. Bu reseptörlerin iletim mediyatörü asetilkolindir. Nikotinik reseptörlerin çeşitliliği, fonksiyonel farklılığı nedeniyle nikotinin fizyolojik ve farmakolojik etkileri çok çeşitlidir (24).

1.3.Sigaranın sağlık üzerindeki etkileri

Yapılan alışmalar sigara içenlerde ölüm oranının içmeyenlere göre daha yüksek olduğunu bildirmektedir. 35-70 yaşları arasında düzenli sigara kullanan insanlarda görülen ölümlerin yaklaşık yarısının nedeni sigaradır. Bu kişilerin sigara nedeniyle kaybettiği yaşam süresi yaklaşık 20-25 yıl olarak hesaplanmıştır. Sigara kullanımının yaygın olduğu toplumlarda 65 yaş öncesi görülen koroner kalp hastalığı ve serebrovasküler hastalık kaynaklı ölümlerin yarısı; akciğer kanseri nedenli ölümlerin %85-90'ı ve kronik obstruktif akciğer hastalığına bağlı ölümlerin %80'i sigara kaynaklıdır (26).

Sigaranın sorumlu olduğu bilinen bazı sağlık problemleri şunlardır;

Akciğer Kanseri, larinks kanseri, ağız boşluğu kanserleri, yemek borusu kanseri, idrar torbası kanseri, koroner kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık, aterosklerotik periferel vasküler hastalık, erken ölüm, kronik bronşit, amfizem, intrauterin gelişme geriliği ve düşük doğum ağırlıklı bebek (27).

Ayrıca sigaranın erkek cinsel sağlığı ve üreme sistemi üzerine de olumsuz etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.

1.4. Sigaranın reme üzerindeki etkileri

Epidemiyolojik alışmalar sigara içenlerde infertilite ve erektil disfonksiyon oranının yüksek olduğunu göstermiştir (28,29,30). Seksüel disfonksiyon mekanizmasının olası sebebi düşük serum testosteron düzeyidir. Bazı araştırmacılar sigara içenlerde serum testosteron düzeyinin içmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunu göstermiştir (28). Ancak bu griş desteklemeyen araştırma sonuçları da mevcuttur (31). Örneğin Yamamoto ve ark. sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada sigara dumanına maruz bırakılmış deneklerin serum testosteron, FSH ve LH düzeylerinin kontrol grubundan farklı olmadığını göstermiştir. Aynı çalışmada ayrıca hCG stimülasyonuna serum testosteron artışı cevabının sigara verilen grupta anlamlı olarak düşük kaldığı da gösterilmiştir. Yine bu çalışmada sigaraya maruz bırakılan grupta spermatozoa sayı ve motilitesinin düştüğü ve Leydig hücre sekretuar fonksiyonun bozulduğu gösterilmiştir (32). Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada 60 gün boyunca sigara dumanına maruz bırakılmış sıçanlarda serum testosteron düzeyinin kontrol grubuna göre düşük olduğu ve Leydig hücre dejenerasyonu olduğu

gösterilmiştir (33). Aynı şekilde sigara dumanına maruz bırakılan sıçanlarda epididimdeki spermatid maturasyonunun eksik kaldığı gösterilmiştir (32). Sigara dumanına paternal maruziyetin reproduktif potansiyeli ve spermatozoa fertilizasyon kapasitesini düşürdüğünü gösteren bir çalışma mevcuttur. Sıçanlar üzerinde yapılan bu çalışmada olası nedenler olarak spermatozoa motilitesinin yeterli olmaması, spermatozoal akrosin seviyesinin düşük olması ve azalmış zona pellucida penetrasyon kapasitesi gösterilmiştir (34).

İnsanlar üzerindeki çalışmalarda sigaranın Sertoli ve Leydig hücrelerinde sekretuar disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir (30). Bu çalışmada sigara içenlerin semen örneklerinde DNA anomalili spermatozoa oranının sigara içmeyenlere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu konudaki diğer çalışmalarda da sigaranın spermatozoa motilitesi ve morfolojisini olumsuz yönde etkilediği kanıtlanmıştır (29,30,35).

1.5. Sigaranın oksidatif strese yol açma mekanizması

Sigara, içinde barındırdığı çeşitli toksik maddelerle organizmadaki bütün sistemleri olumsuz yönde etkilemektedir. Dokularda serbest radikaller, oksidatif fosforilasyon, ürik asit metabolizması ve prostoglandin sentezi gibi biyokimyasal olaylar sonucu devamlı olarak üretilmektedir (3). Bu serbest radikallerin yol açtığı oksidatif stres, hücrel antioksidan sistem ile sürekli giderilerek fizyolojik bir denge durumu sağlanmaktadır (4). Serbest oksijen radikalleri ve antioksidan sistem arasındaki bu hassas denge serbest radikaller lehine çevrildiği zaman dokularda oksidatif stresten bahsedilir (3). Dokulardaki serbest radikalleri temizleyen enzimatik aktivitenin yükselmesi oksidatif stresin dokularda meydana getirdiği zararlı etkileri ortadan kaldırmaktadır(4). Testis zengin vasküler kaynağı nedeniyle kanla taşınan sigara kaynaklı toksinlere yoğun olarak maruz kalır. Bu durum hassas dengeyi serbest radikaller lehine bozarak testiste doku hasarına yol açar.

2. Testis

Erkek üreme sistemi, skrotum denen deri bir torba içindeki bir çift testis, testis içi ve dışındaki boşaltma yolları, penis ve yardımcı bezlerden oluşur. Testis üreme hücresi olan spermatozoonun üretildiği organdır. Testisin boşaltma yolları duktuli

efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryusla devam ederek prostatik üretraya açılır. Epididimden gelen spermatozoonlar veziküla seminalis, prostat ve bulboüretal bezlerden gelen salgılarla beraber ejakülat sıvısını oluşturarak penisten dışarı atılır.

Bunun yanı sıra testisin endokrin fonksiyonu da mevcuttur (36). Kan testosteron düzeyinin % 95-97'si testiste üretilir.

2.1.Testislerin Anatomisi

Testis 4-5 cm uzunluğunda, 3 cm genişliğinde yaklaşık 30 ml hacimli organdır (Şekil -1).

Epididim, testisin posterolateral yüzeyinde bulunan ve yaklaşık 5-6 metre uzunluğundaki tek bir tubuli kontortiden oluşan bir dokudur.

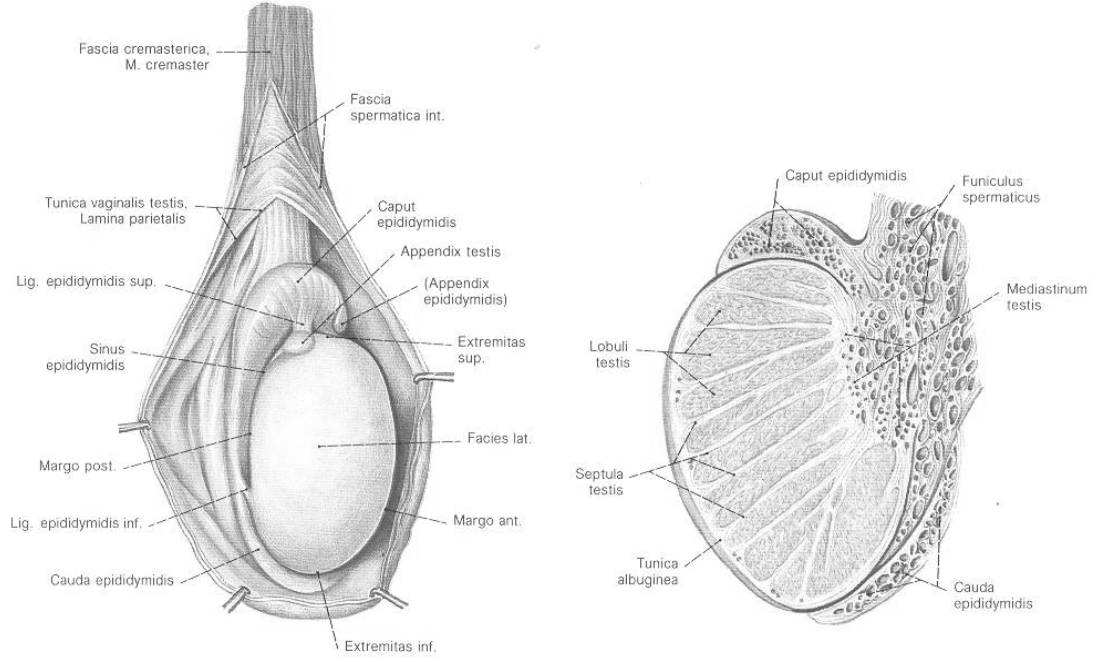
Epididimal içeriği üretraya taşıyan vas deferens, 30-35 cm uzunluğunda, müküler bir kanaldır.

Testiküler arterler, aortadan çıkar ve iç inguinal halkaya ulaşmak için retroperitoneal bölgede seyrederek. Testise girdiğinde internal arter, inferior testiküler arter ve epididimis başına giden kapital arter olmak üzere dallara ayrılır (Şekil-2). Testiküler venler, testiküler arterin çevresinde pampiniform pleksusu oluşturur (37).

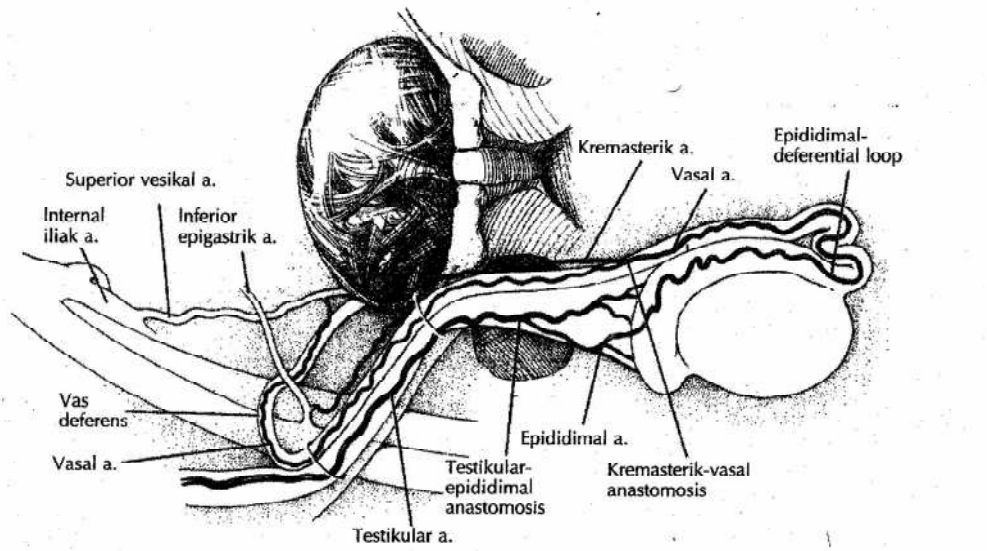
Testis ve epididim innervasyonu iki yolla olur. Bir kısım sinirler renal ve aortik pleksuslardan çıkar ve gonadal damarlarla birlikte seyrederek. Diğer gonadal afferent ve efferent sinirler ise vas deferens ile birlikte pelvik pleksustan çıkar. Genitofemoral sinirin genital dalları paryetal ve visseral tunika vajinalis ve skrotum duyarlılığını sağlar (37).

Sıçan ürogenital anatomisi insan ile benzer yapı ve organlardan oluşmaktadır. Sıçan sisteminin en önemli organı skrotal kese içine yerleşmiş testislerdir. Sıçan epididimi testisin ön yüzeyinde yumak şeklinde bulunan tüplü bir organdır. Epididimden itibaren devam eden tüp vas deferens adını alır ve üretraya açılır. Sıçan idrar torbasının her iki yanında bulunan kahverengi yumru şeklindeki bezler ise

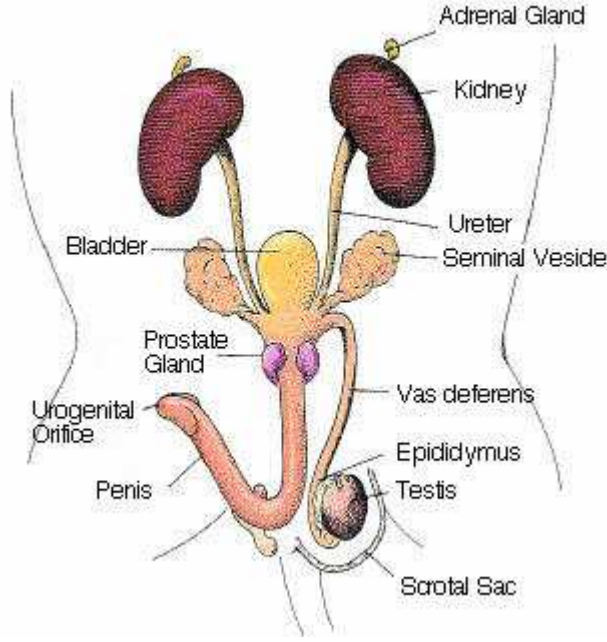
vezikula seminalis adını alır. İdrar torbasının altında üretrayı kısmen saran prostat ve vezikula seminalis semen olarak adlandırılan sıvının yapımında rol oynar (Şekil -3).



Şekil-1: Testis ve epididimis (38).



Şekil-2: Testisin kolleteral arteriyel dolaşımı(39).



Şekil -3: Erkek sıçan üreme organları (40).

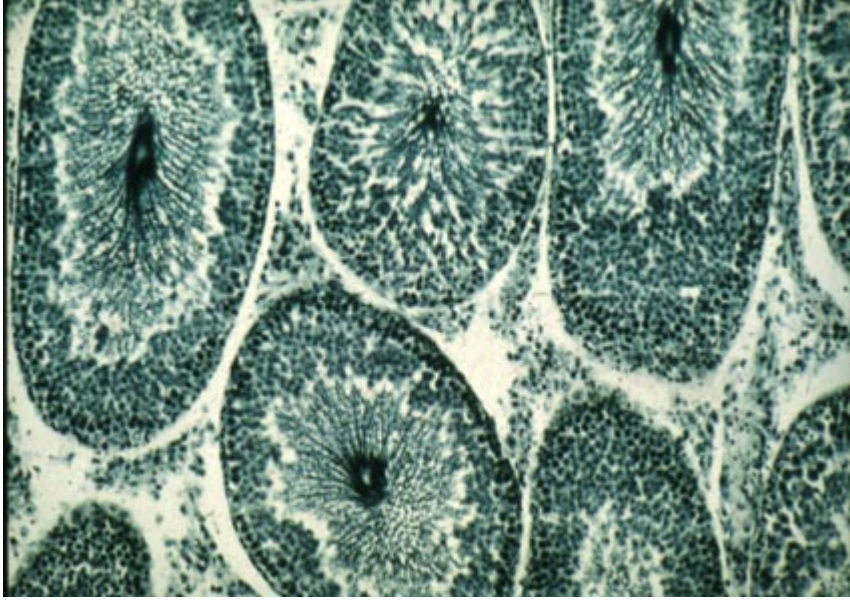
2.2. Testis Histolojisi

İnsan ve sıçan parankim dokusu birbirine benzer olup, septula testis denilen ince fibröz bölmelerle piramit şekilli lobüli testis'lere ayrılır (41). Testiküler septa içinde seyreden centripetal arterler rete testisten önce rekürren arterlere dallanır, rekürren arterler lobüllere penetre olur ve her lobül bu arterler vasıtasıyla kanlanır (42). Bu arterlerden 300 µm'luk aralıklarla segmental arterioller çıkar. Arteriollere ayrılan segmental arterler interstisyumda kapiller damarlara dönüşür. Bu damarlar kısmen Leydig hücreleri ile sarılmıştır. Lamina propriyada da kapiller damarlar mevcuttur.

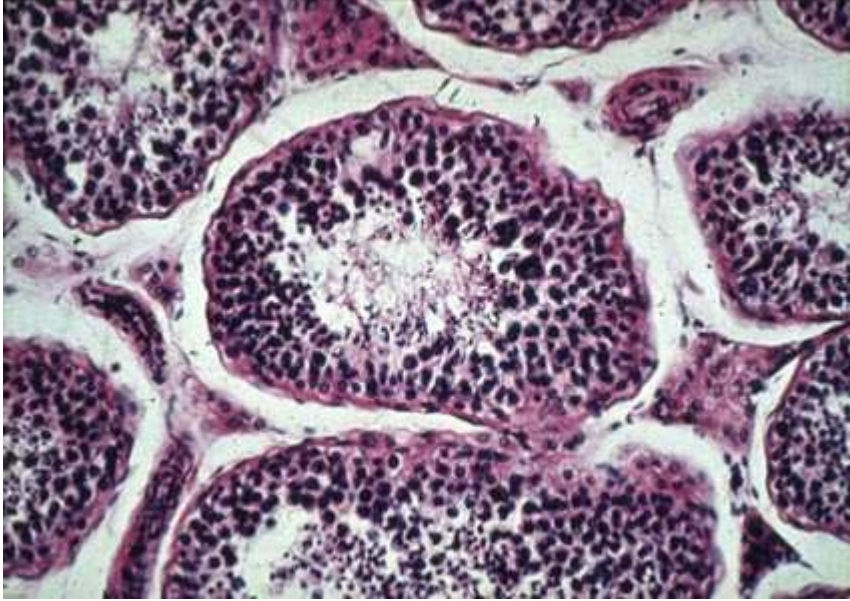
2.2.a. Tubulus Seminiferus Kontortus:

Her biri yaklaşık 150-250 µm çapında, 30-70 cm uzunluğunda, ikili-üçlü anastomozlar yapan, kıvrımlı tubuler yapılarıdır. İnsanda her bir testise toplam uzunlukları yaklaşık 250 m kadardır. Bu tubuler yapılar testisin % 92'sini oluşturur. Lamina propriya ile çevrili her tubul duvarı seminifer epitelyumu ile döşelidir. Seminifer epitelyumu oluşturan başlıca iki tip hücre vardır; Bunlar Sertoli hücreleri ve farklı gelişim aşamalarındaki spermatojenik seri hücreleridir (41).

İnsan ve sıçan germinal hücreleri tubulus seminiferous içinde katmanlar halinde bulunur ve birbirine benzerlik gösterir. İnsan ve sıçan testisinin seminifer tubulleri Şekil -4,5’de gösterilmiştir (43).



Şekil -4: Erişkin sıçan testisi (Iron Hemotoksilen)



Şekil -5: İnsan testisi (Hematoksilen – Eozin)

2.2.b. Spermatojenik Hücreler ve Spermatojeniz:

Diploid kromatin içeriğine sahip spermatogonyumların ileri derecede özelleşmiş haploid kromatinli spermatozoonlara dönüştüğü süreç spermatojeniz olarak adlandırılır. Spermatojenik hücreler seminifer tübüllerde bazal lamina ile lümen arasında yerleşik 4-8 tabaka halinde düzenlenmiş hücre serileri olup üç ana gelişim

aşaması gösterirler; 1- Spermatogoniyal faz; spermatogenez, 2- mayotik faz; mayozis, 3- spermatid faz; spermiyositogenez (44).

Puberteyle birlikte olgun spermatozoon üretimine başlanır ve bir testiste günlük yaklaşık 50-150 milyon spermatozoon üretilir (44). Olgun spermatozoon üretimi insanda 70 ± 4 günlük bir zamanda tamamlanır. Sıçanlardaki süreçte benzer şekilde gelişir, ancak yaklaşık 50 ± 4 gün sürer. Seminifer epitelyum siklusu; epitelyumda belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan maturasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. Bu evreler; sıçanda 14, fare ve maymunda 12, insanda 6 basamaklıdır (44). Prespermatogenik germ hücrelerinin spermatogonyumlara farklılaşması bazal lamina ile temaslarına bağlıdır (45).

Primer spermatosit serinin en büyük hücresi olup belirgin bir çekirdeğe sahiptir (44). Primer spermatositten birinci mayotik bölünmeyle oluşan sekonder spermatosit birkaç saatlik bir ömre sahip olduğu için kesitlerde nadiren görülür. Akrozomun oluşumu, flagellumun gelişimi, çekirdek şekil ve büyüklüğündeki değişiklikler, kromatinin yoğunlaşması ve artık stoplazmanın atılmasıyla karakterize olaylar sonucu olgun spermatozoon oyuşur. Morfolojik olgunlaşmalarını tamamlayan germ hücreleri seminifer tübül epitelyumundan lümeneye serbestleştirilir. Bu sürece spermiyasyon denir.

2.2.c. Sertoli Hücreleri:

Sertoli hücreleri bazal membran üzerine oturmuş seminifer epitelyum boyunca düzenli aralıklarla yerleşim gösteren, apikal ve yan yüzleri farklı kolumnar hücrelerdir. Tubulus yapısındaki hücrelerin yaklaşık % 10-15'ini oluşturur (41). Sertoli hücre sayısı ile günlük spermatozoa üretimi arasında doğru orantı vardır (46). Sertoli hücrelerinin toplam hacmi pubertal dönemde 2/3 oranında azalır (45).

2.2.d. İntertisyel Doku

Testisin seminifer tübülleri arasında kalan alan, gevşek bağ dokusu, kan, lenfatik damarlar ve sinirleri içerir. Erişkin erkeklerde testis interstisyel dokusunun %35'i bağ dokusu ve %12'si de Leydig hücrelerinden oluşur. Bağ dokusu içinde fibroblastlar, mast hücreleri, makrofajlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri ve lenfositler bulunur. Puberteyle beraber Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) interstisyel dokunun en önemli bileşeni haline gelir (44).

2.2.e. Leydig Hücreleri:

İnsan ve sıçan testis dokularında testosteron sekresyonundan sorumlu hücrelerdir. İntrauterin dönemde plasental kökenli gonadotropinlerin kan yoluyla fetal testise ulaşıp Leydig hücrelerini uarmasıyla testosteron sentezi başlar. Testosteron artışı embriyonik genital organların erkeğe farklılaşmasını sağlar (52).

3.Üreme Fizyolojisi

Spermatogenez seminifer tübüllerde oluşur. İnterstisyel dokudaki Leydig hücreleri ve androjenleri salgılar. Leydig hücrelerinden salgılanan androjenler bu fonksiyonun gerçekleşmesi için gereklidir. Testosteron sentezi yalnızca spermatozoa üretimi için değil, aynı zamanda sekonder seks karakterlerinin gelişimi ve normal cinsel işlev için de gereklidir. Leydig hücre fonksiyonunun düzenlenmesi ve spermatogenez sürecinin gerçekleşmesi için ön hipofizden salgılanan lüteinizan hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) kontrolü gereklidir. Ön hipofizin bu aktivitesi de hipotalamustan salgılanan gonodotropin serbestleştirici hormon (GnRH) ile düzenlenir. Hipotalamus kortikal ve subkortikal birçok merkezin etkisi altındadır. Bu hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini feedback mekanizması ile kontrol edilir (48).

3.1.Spermatogenezin Hormonal Düzenlenmesi:

Leydig hücreleri günde ortalama 7 mg testosteron üretebilir. Leydig hücrelerinden salınan testosteron, kan, lenfatik veya peritübüler dokuya geçerek buradan seminifer tübüllere ulaşır. Testis içindeki serbest testosteron düzeyinin kandaki düzeyden 200 kat fazla olması sonucu Seminiferöz epitelyumda spermatojenik hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve salınımı gerçekleşir.

Adenohipofizden LH salınımı serum testosteron düzeyi tarafından negatif feedback mekanizması ile kontrol edilir. Serum testosteron düzeyi düşüklüğünde, hipotalamustan LH spesifik GNRH ve adenohipofizden LH salgılanır.

Sertoli hücreleri tarafından erkek üreme fonksiyolarını düzenleyici üç madde salgılanır.

1- Androjen bağlayıcı protein (ABP): FSH etkisiyle salgılanan ve germ hücre büyümesi için gerekli olan bir proteindir.

- 2- İnhibin: Spesifik olarak hipofizden FSH salınımını inhibe eden bir proteindir.
- 3- LH releasing faktöre benzeyen bir madde(44).

3.2. Spermatozoanın olgunlaşması, emisyon ve ejakülasyon

Spermatozoa üretim yeri testis olmakla birlikte spermatozoanın olgunlaşması, depolanması ve taşınmasında asıl görev epididim tarafından gerçekleştirilir. Spermatozoanın epididimden geçiş zamanı yaklaşık 3.2 gün olup yaşla ve cinsel aktiviteyle değişiklik gösterir. Spermatozoa testiste iken hareket kabiliyeti ve ovumu dölleme yeteneği yoktur. Epididim başı ve gövdesindeki olgunlaşma evresi sırasında spermatozoa hareket ve pentrasyon yeteneği kazanır. İlk hareketler yüksek frekans, düşük amplitüdle karakterizedir. Fertilizasyon yeteneği kuyrukta tamamlanır. Epididim aynı zamanda spermatozoa için depo görevi görür ve bu deponun % 50 den fazlası kuyruktadır. Kuyrukta depolanan bu spermatozoalar vas deferense girer.

Spermatozoa erkek üreme sistemi dışına emisyon ve ejakülasyonla atılır. Seminal vezikül ve prostattan gelen salgılarla birlikte spermatozoanın posterior üretrada depolanmasına emisyon denir.

Bundan sonra eksternal sfinkter gevşer, mesane boynu kasları kasılır ve perineal ve bülboüretal kasların ritmik kontraksiyonlarıyla semen üretraya atılır. Somatik kontrol altında gerçekleşen sürece ejakülasyon adı verilir.

3.3. Semen İçeriği:

Semenin % 5 kadarını spermatozoalar oluşturur. Bunun dışında seminal vezikül, prostat ve üretral bezlerin semen içeriğine katkısı sözkonusudur.

Seminal vezikül katkısı içinde fruktoz, prostaglandinler, fosforilkolin ve koagüle edici maddeler bulunur. Prostat seminal sıvıya çinko, fosfolipidler, spermin ve fosfataz katar.

Ejakülatın birinci bölümü spermatozoa açısından zengin, destek sıvıları açısından düşük içerikli yapıdadır. Semen ilk kısmı spermatozoa ve prostat

salgılarının çoğunu, ikinci kısmı ise esas olarak seminal vezikül salgıları ve az miktarda spermatozoa içerir.

Normalde fertilizasyon fallop tüpleri içinde oluşur. Menstrüel siklusun ortasında servikal mukus daha bol, ince ve kıvamsız yapıdadır. Bu değişiklikler spermatozoanın asidik vajinal ortamdan hızla uzaklaşarak uterus içine girmesini sağlar. Döllenmenin olması için spermatozoanın kadın üreme sistemi içinde bazı fizyolojik değişikliklere (kapasitasyon) uğraması gerekir. Ovum spermatozoon ile etkileşime girerek yeni flagellar hareketlerin (hiperaktif motilite) oluşumunu, litik enzimlerin salınımını ve akrozom reaksiyonunu tetikler. Bu değişiklikler sonucunda spermatozoa farklı tabakaları penetre ederek oosite ulaşabilir ve ooplazm ile bütünleşebilir (49).

4. Serbest Radikaller

Serbest radikaller atomlarının son yörüngesinde çiftlenmemiş elektron bulunan, kararsız ve reaktif moleküllerdir. Organik veya inorganik yapılu olup etkileşime girdiği molekülün yapısal özelliklerini değiştiren aktiviteye sahiptir (50). Serbest radikaller rutin biyokimyasal süreçlerin yanı sıra hipoksi, iskemi-reperfüzyon, ksenobiyotikler (sigara dumanı, asbest, ozon vb.) ile de oluşur. Nötrofil ve fagosit fonksiyonlarının bir bölümü olarak serbest radikal sentez edildiği de gösterilmiştir. Hücre ve hücreler arası sıvıda oksijen ve nitrojenler bir dizi spontan ve enzimatik reaksiyonla serbest radikal haline dönüşürler (51). Serbest radikaller 3 şekilde ortaya çıkar; 1- Kovalent bağlı bir molekülün homolitik bölünmesi. Bu durumda ortaya çıkan her bir parçada ortak elektronlardan biri bulunur. 2- Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. 3- Bir moleküle elektron eklenmesi (52).

Bilinen bazı serbest radikal çeşitleri şunlardır:

4.1. Süperoksit Radikalleri ($O_2^- \cdot$)

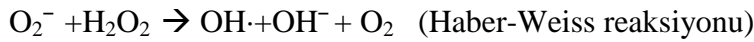
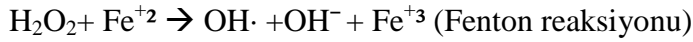
Oksijenin tek bir elektron alarak redükte duruma geçmesiyle oluşur. Bu reaksiyon $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ şeklinde gösterilir. Serbest radikal olmasına rağmen kendi başına doku hasarı oluşturmaz. Diğer serbest radikaller için kaynak görevi görür. İskemi – reperfüzyon durumunda hidrojen peroksit ve hidroksil radikali için kaynak teşkil eder. Ayrıca Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikale ve NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit radikale dönüşmesi söz konusudur.

4.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Oksijen molekülünün 2 elektronla redükte hale geçmesi ile meydana gelir ve $O_2 + 2e^- \rightarrow H_2O_2$ şeklinde ifade edilir. Okside edici özelliği bulunmasına karşın aşırı reaktif değildir. Membranlardan kolayca geçebilir ve uzun ömürlü bir oksidandır. H₂O₂ ağırlıklı olarak katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından parçalanarak detoksifiye edilir.

4.3. Hidroksil Radikali (OH•)

Hidrojen peroksitin O_2^- , Fe^{+2} , Cu^+ iyonları varlığında parçalanmasıyla oluşur. Bu reaksiyon Fe^{+2} katalizörlüğünde meydana gelirse Fenton reaksiyonu olarak adlandırılır. O_2^- katalizörlüğünde olursa Haber-Weiss reaksiyonu adını alır.



Serbest radikaller içinde en sitotoksik ve en reaktif olanıdır. Yarı ömrü çok kısa olduğundan hücre dışına çıkmadan katalize edilir. Yine de üretildiği yerde ciddi hasar yapabilir.

4.4. Nitrik Oksit (NO)

NO kolaylıkla kimyasal reaksiyona giren, çok kısa yarı ömürlü, biyolojik membranlardan hızla geçebilen bir serbest radikaldir. İskemi durumunda süperoksitle reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^-$), nitrojen dioksit (NO_2) ve peroksinitroz asit ($ONOOH$) gibi sitotoksik radikallere dönüşür (53).

4.5. Peroksil Radikali (LOO•)

Peroksil radikali reaktif oksijen ve nitrojen radikallerinin başlattığı lipid peroksidasyonu sırasında ortaya çıkan bir üründür. Bu süreçte ayrıca membran lipidleri de yıkılmakta ve bu şekilde oksidatif süreç bir kısır döngü halini almaktadır (50).

5. Antioksidan Maddeler

Hücre ve hücreler arası sıvıda serbest radikalleri zararsız hale getirmeye çalışan savunma mekanizmaları vardır. Bu antioksidan mekanizmalar rutin biyokimyasal

olaylarda ortaya çıkan serbest radikalleri ortadan kaldırabilir. Daha önce sayılan çeşitli patolojik süreçler sonucu oksidan-antioksidan sistemin dengesi bozulabilir. Bu durumda antioksidan mekanizmalar tükenir (deplezyon). Sonuç olarak serbest radikal etkinliği artarak hücre zedelenmesi ve ölüm gelişebilir (51).

Vücutta meydana gelen ve genellikle oksijen kaynaklı serbest radikallerin başlattığı oksidatif hücre hasarı sürecine oksidatif stres denir. Meydana gelen serbest radikallerin toksisitesi ya direkt olarak radikal temizleyicilerle yada indirekt olarak antioksidanlarla antagonize edilir. Direkt radikal temizleyiciler, radikallerin başlattıkları zincirleme reaksiyonları ilk basamaklarda durdurarak radikallerin etkisinin artmasını önlerler. İndirekt radikal temizleyiciler ise radikal süpürücü etki ile reaksiyona girmeden daha zararsız moleküllere dönüştürerek veya diğer moleküllerden serbest radikal oluşmasını engelleyerek antioksidan etki yaparlar (54).

Bilinen antioksidanlardan bazıları şunlardır:

5.1. Doğal (endojen) Antioksidanlar

5.1.a- Enzim olanlar :

Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi

Süperoksid dismutaz

Katalaz

Glutasyon peroksidaz

Glutasyon-S-transferaz

Glutasyon redüktaz

5.1.b-Enzim olmayanlar:

I- Lipid fazda bulunanlar: Alfa tokoferol, Beta karoten

II- Sıvı fazda bulunanlar: askorbik asit, melatonin, urat, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, myoglobin, ferritin, hemoglobin, metionin, albumin, bilirubin, glutasyon.

5.2. Eksojen Antioksidanlar:

I-Ksantin oksidaz inhibitörleri: Tungsten, Allopurinol, Oksipurinol, Folik Asit, Pterin Aldehid, Soya fasülyesi kaynaklı inhibitörler.

II-NADPH oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestetikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvarlar, difenil iodonium, rekombinant süperoksid dismutaz, Trolox-C (E vitamini analogu).

III-Eksojen antioksidan aktiviteyi arttıran maddeler: Ebselen, Asetilsistein.

IV-Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları: Mannitol.

V- Demir döngüsünün inhibitörleri: Desferoksamin, Seruloplazmin, Nötrofil adezyon inhibitörleri.

VI- Sitokinler: TNF, Barbitüratlar , İnterlökin-1, Demir Şelatörleri.

5.3.Gıda Antioksidanları :

Bütile hidroksitoluen

Bütile hidroksiyanisol

Sodyum Benzoat

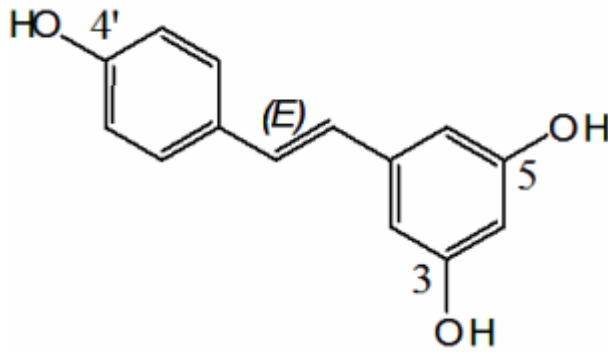
Etioksiquin

Propilgalat

Fe- Süperoksid dismutaz (55).

6. Resveratrol

5-[(E)-2-(4-hydroxyphenyl)-ethenyl]benzene-1,3-diol veya trans-3,5,4'-trihydroxystilbene olarak da adlandırılan bir moleküldür. Mol ağırlığı 228.25 g/mol olup kırmızı üzüm kabuğu, yerfıstığı, bazı bitkilerin sap ve köklerinde ve kırmızı şarapta bulunan resveratrol doğal bir polifenolik fitoaleksindir (Şekil -6). Kırmızı üzüm kabuğu ile birlikte fermentasyona uğratıldığı için kırmızı şarapta yaklaşık 5 g/l bulunmasına rağmen beyaz şarapta çok daha az miktarda bulunur. Bunun sebebi olarak beyaz şarap yapımında kabukların ayrılarak üzümün fermentasyona bırakılması gösterilir (56).



Şekil-6 Resveratrolün kimyasal yapısı

Ultraviyole spektral özelliklerine göre resveratrolün cis- ve trans- izomerleri bulunur. Trans – resveratrol ışıktan korunduğu sürece sabit kalır ve üzüm ekstirelerinde de bu formu bulunur (57).

Resveratrol ile ilgili ilk çalışmalar 1976 yılında Langcake ve Pryce adlı araştırmacılar tarafından yapılmıştır. Resveratrolün şarapta bulunduğunu ilk kez 1992 yılında Creasy ve Siemann adlı araştırmacılar göstermiştir. Literatürde Poligonum Cuspidatum ismiyle anılan ve Japonya’ da Kojoto olarak bilinen doğal ilacın köklerinde de resveratrol tespit edilmiştir. Yakın tarihte resveratrolün patojenlere karşı bir savunma mekanizması olarak bitkiler tarafından da sentezlendiği gösterilmiştir (58).

Üzümdeki resveratrolün oda sıcaklığı, mikrobiyal enfeksiyon, ultraviyole radyasyon, ozona maruziyet gibi çevresel koşullardan etkilendiği ve oranının değiştiği gösterilmiştir (59).

Resveratrolün emiliminin hızlı olduğu, dokulara kolay taşındığı ve büyük oranda idrar yolu ile atıldığı gösterilmiştir (60). Resveratrolün farklı dokularda farklı etkinliği vardır. Bu etkiler 4 ana başlık altında toplanabilir.

1. Vazodilatatör etki
2. Trombosit agregasyonu inhibisyonu
3. Antiinflamatuvar aktivite
4. Antioksidan aktivite

6.1. Resveratrolün vazodilatatör etkisi:

Bu etkinin mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Damar endotel hücrelerinden salınan NO’in damar düz kasında kasılma-gevşeme yanıtları üzerine etkisi olduğu bilinmektedir. Resveratrolün vazodilatatör etkisi nitrik oksit antagonizması yolu ile ortaya çıkıyor olabilir. Resveratrolün ve kırmızı şarabın potansiyel kardiyoprotektif özelliklerinin yanında, damar tonusunu düzenleme, endotel fonksiyonunu sürdürme gibi etkileri de tespit edilmiştir (58). Kırmızı şaraptaki polifenollerin endoteli sağlam aorta halkalarında oluşturduğu vazodilatatör etkiden, endotel hücrelerinin varlığı ve endotel hücrelerindeki Ca^{+2} düzeyinin artışının sorumlu olduğu belirtilmiştir. Üzümde bulunan ekstirenin endoteli sağlam olan sıçan aorta

halkalarında fenilefrin ile oluşturulan kasılma yanıtlarında anlamlı gevşeme cevabı oluşturduğu, endoteli çıkarılmış halkalarda ise etkisinin olmadığı gösterilmiştir (61). Bir başka çalışmada ise umbilikal ven endotel hücrelerinin 20 saat kırmızı şarabın alkolik olmayan ekstireleri ile inkübe edilmesi ile NO sentezinin 3 kat arttığını gösterilmiştir(62). Resveratrolün kimyasal yapısı ve biyolojik etkileri östrojene benzemesi onun fitoöstrojen olduğunu düşündürmüştü de bu etkilerin östrojen reseptör blokerleri ile geri döndürülemediği gösterilmiştir (63). Resveratrolün histamin ile oluşturulan kasılma yanıtlarını geri döndürdüğünü gösteren bir domuz çalışması mevcuttur. Potasyum kanal blokeri tetraetilamonyum ile inkübe edildikten sonra histaminle oluşturulan kasılma yanıtları aynı dokuda resveratrol ile inhibe edilmiştir. Sodyum florid ile oluşan kasılma doz bağımlı olarak inhibe olmuştur (64). Adenosin kendine özgü reseptörlere bağlanarak hücre içi protein kinazları aktive eden ve kalsiyum hareketlerini düzenleyen çok kısa yarılanma ömrüne sahip nükleotiddir. Egzersiz, doku hipoksisi, dipiridamol verilmesi adenosin nükleotidlerin hücrel alınımı artırmaktadır. İnfüzyon olarak verilen resveratrolün kan adenosin düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. İskemi öncesi verilen resveratrolün ise iskemi- reperfüzyon hasarını önlediği, bunu da adenosin salınımını artırarak yaptığı sıçan kalbinde gösterilmiştir (65).

6.2. Trombosit agregasyon inhibisyonu:

Trombositler damar endotelinde oluşan bir hasarda; kanın akışkanlığı değiştirmeksizin hızla hemostazı sağlamaya yarayan kan hücreleridir. Yaralanan damarda, hasarlı damarın subendotelyal alanlarına yapışırlar. Yaralanma yüzeyine yayılarak agregasyonu ve trombus oluşumu için yeni trombositlerin toplanmasına katkıda bulunur. Bu hasarlanan endotelin normal iyileşme sürecidir. Kanama-pıhtılaşma fonksiyonunun temel hücresi olan trombosit fonksiyonlarının yetersizliği kanamaya, fazlalığı ise tromboza yol açabilir. Trombosit aktivasyon ve agregasyonunun artışı tromboz ve ateroskleroz patogeneğinde önemli risk faktörleridir (66). Araşidonik asitden siklooksijenaz enzimi ile oluşan TxA2 trombositlerde agregasyonu tetikler, PGI2 ise inhibe eder. Endotel kaynaklı NO'de agregasyon ve adezyonu inhibe eder (67). Agregasyonu tetikleyen ajanların trombositlerde hücre içi Ca²⁺ arttırdıkları, inhibe edicilerin ise azalttıkları görülmüştür. Resveratrolün trans formu hücre içi kalsiyum miktarını düşürerek agregasyonu engeller (58). Resveratrolünün cis izomerinin daha fazla antiagregan olduğunu bildiren bir çalışma da mevcuttur (68).

6.3. Antiinflamatuvar aktivite

Resveratrolün bu aktivitesinin proteazlar, kompleman sistemi, bradikininler, NO, sitokinler, adezyon molekülleri ve prostaglandinler gibi inflamasyondan sorumlu tutulan maddelerin oluşumunu engelleyerek gösterdiği düşünülmektedir (6,7,58).

Trans-resveratrolün antioksidan ve antiinflamatuvar etkisinin, immün sistem hücrelerinde inflamatuvar sitokinleri düzenleyerek ortaya koyduğu bilinmektedir (58). İnvitro bir çalışmada trans-resveratrolün naturel killer hücrelerinin sitotoksitesini azalttığı, CD4 ve CD8 T henfositlerinde de sitokin üretimini düşürdüğü gösterilmiştir (69). Bir başka çalışmada resveratrolün hücrel toksisiteyi azalttığı, lenfosit proliferasyonunu baskıladığı, lenfosit kaynaklı interlökinlerin ve tümör nekroz faktörün (TNF- α) üretimini azalttığını gösterilmiştir (70). Bir başka çalışmada invitro olarak üretilen TNF- α , interlökin 1 β ve interlökin 6'nın resveratrol ile baskılandığı gösterilmiştir (71). Fare karaciğer perfüzyon modeli ve böbrek perfüzyon modelinde (60) resveratrolün tirozin kinaz aktivitesini inhibe ederek, permeabiliteyi azalttığı ve antiinflamatuvar etki gösterdiği düşünülmüştür.

6.4. Resveratrolün antioksidan aktivitesi:

Resveratrolün antioksidan özelliği ve peroksi radikal süpürücü etkisi ile kalbi koruduğu düşünülmektedir. İskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarı dokuda lipid peroksidasyonunu artırmakta ve peroksi radikaller oluşturmaktadır. Koroner oklüzyonla iskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarının oluşturulduğu bir çalışmada, resveratrol koroner perfüzatta lipid peroksidasyonu göstergesi kabul edilen Melondialdehit düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır (72). Peroksi radikal süpürücü olarak bilinen 'trolox' ile karşılaştırılan bir çalışmada resveratrolün bu açıdan daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Düşük dansiteli lipoprotein peroksidasyonlarının demir ve bakır iyonları ile artırıldığı bilinmektedir. Serbest radikal süpürücü etkinin araştırıldığı bir çalışmada resveratrolün demir ve bakır iyonları düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir (73). Resveratrolün bakır şelasyon kapasitesinin yüksek olduğu bilinmektedir. Cis izomerinin şelasyon kapasitesi trans izomerinin kapasitesinin yarısı kadardır. Bunun nedeni olarak OH gruplarının konumu gösterilmiştir. Resveratrolün bakır şelasyon kapasitesinin yüksekliği, antioksidan özelliği ve radikal süpürücü özelliği birbirleri ile uyumaktadır (74). Resveratrolün lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkisinin 'epicatecin', 'catechin' ve 'quercetin' gibi diğer fenollerden daha potent olduğu gösterilmiştir (75). Serbest

radikallerin DNA hasarı yaptığı bilinmektedir. Resveratrolün potent hidroksil radikal süpürücü etkisi ile DNA kırılmalarını azalttığı ortaya konmuştur (16). Düşük dansiteli lipoproteinlerin peroksidasyonunun resveratrol tarafından belirgin olarak azaltıldığı gösterilmiştir. Resveratrolün koroner damar hastalıklarına karşı koruyucu etkisinin anlaşılmasında düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu önleyici etkisinin bulunması, çok önemli bir dönüm noktası olmuştur. Bunun yanı sıra resveratrolün lipid peroksidasyonunu azalttığı fakat hidroksil radikal süpürücü etkisinin anlamlı olmadığı bildirilen çalışmalar da mevcuttur (64).

Resveratrolün sayılan etkilerinin yanında çeşitli hücreSEL ve moleküler etkileri de vardır. Çalışmalarda trans-resveratrol, dietilstilbesterol (DES) ve östradiolün yapısal benzerliklerinden ve resveratrolün fitoöstrojen olarak sınıflanmasını sağlayan östrojen yanıt sisteminini düzenlemesinden bahsedilmektedir (76,77). Östrojenler klasik olarak kadın hormonu olarak bilinir. Ancak östrojen sentezi, erkek üreme sisteminde androjen hormonları kontrolünde bir miktar gerçekleşmektedir. Östrojen; erkek üreme döngüsünde nöroendokrin feedback ile kontrol edilerek testisten ve androjenlerden lokal aromatisasyonla üretilir. Bu üretim testisin parakrin fonksiyonu dahilinde gerçekleşir (78). Bu bilgilere dayanılarak yapılmış bir çalışmada yapısal olarak östrojenlere benzeyen trans-resveratrolün yetişkin sıçanlarda spermatogenez ve testis üzerine tedavi edici etkisi araştırılmış ve oral resveratrol tedavisi ile sıçanlarda spermatozoa üretiminde artış görülmüş ve herhangi bir yan etkiye rastlanmamıştır (17).

6.5. Resveratrolün testis üzerine etkilerini gösteren çalışmalar:

Normal dokuda resveratrol etkisini araştıran bir çalışmada testislerin makroskopik görünüm ve ağırlık açısından farklılık göstermediği, ancak resveratrol verilen grupta seminifer grup dansitesinin ve spermatozoa sayısının daha yüksek bulunduğu gösterilmiştir (17). Aynı çalışmada anomalili spermatozoa oranının daha düşük, serum LH, FSH ve testosteron düzeylerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (17). Bu değişikliklerin nedeninin hipotalamus-hipofiz-gonad aksının resveratrol tarafından uyarılması olduğu bildirilmektedir (17).

Testiste torsiyonla gerçekleştirilen iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası resveratrol verilen sıçanlarda germ hücre apoptozisinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (12). Benzer bir çalışmada resveratrol verilen grupta torsiyon sonrası doku MDA

düzelelerinin anlamlı olarak düşük; GSH seviyesinin ise anlamlı olarak yüksek bulunduğu gösterilmiştir (18). Sigaradaki toksik maddelerden Benzopirenin kullanılarak DNA hasarı ve apopitozis oluşturulan testis modelinde resveratrol verilmesinin spermatozoa parametrelerindeki bozulmayı anlamlı miktarda azalttığı gösterilmiştir (79).

III-GEREÇ VE YÖNTEM

1-Hayvanların Seçimi ve Hazırlığı:

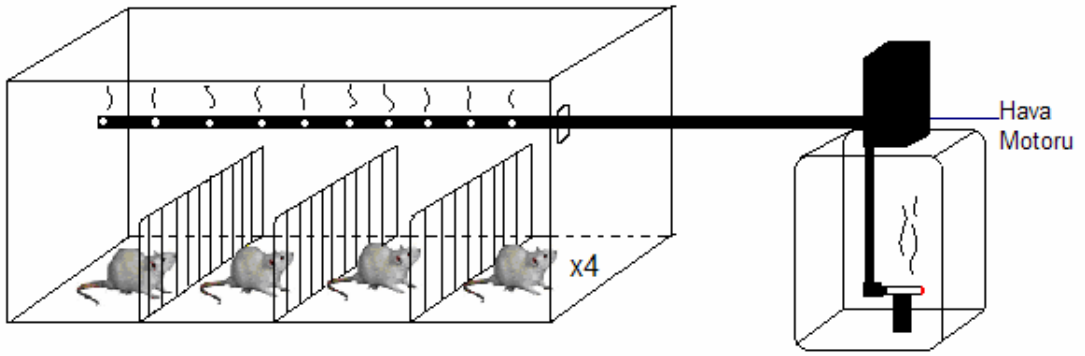
Çalışmada 40 adet Wistar albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi. Sıçanlar 6 aylık olup ağırlıkları ortalama $328,71 \pm 31,11$ gr olarak ölçüldü. Çalışma Şubat 2006 - Mart 2006 tarihleri arasında İnönü Üniversitesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün belirlediği hayvan deneyi kuralları çerçevesinde yürütüldü. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alınarak yapıldı. Hayvanlar Elazığ'dan nakledildikten sonra 7 gün süreyle yeni ortamlarına uyum süreci beklendi. Hayvanlar 40x60 cm'lik standart kafeslerde 4'erli gruplar halinde barındırıldı. Beslenmelerinde standart 8 mm'lik pellet yem ve günlük taze musluk suyu ile kullanıldı. Oda ışığı 12 saat aydınlık 12 saat karanlık, sıcaklık $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ ve nem oranı $\%50 \pm 10$ olacak şekilde ayarlandı.

2-Deney Hazırlığı ve kullanılan gereçler:

2.1- Hayvan grupları: Hayvanlar, uyum süreci tamamlanmasını takiben randomize olarak 8'erli 4 gruba ayrıldı. Her grup 4'erli 2 kafeste barındırıldı. Birinci gruba hiçbir ek işlem yapılmadı (Grup 1), ikinci grup sigara dumanına maruz bırakıldı (Grup 2), üçüncü gruba günlük intraperitoneal 10 mg/kg resveratrol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. USA) enjeksiyonu yapıldı (Grup 3), dördüncü gruba günlük olarak intraperitoneal 10 mg/kg resveratrol enjeksiyonu yapıldı ve sigara dumanına maruz bırakıldı (Grup 4).

2.2- Resveratrol: 3. ve 4. gruptaki sıçanlara 6 hafta boyunca her gün 10:00-10:30 saatleri arasında intraperitoneal resveratrol enjeksiyonu uygulandı.

2.3- Gaz odası: 75x50x50 cm lik bir cam odacık içerisine dört ayrı tel bölme yapılarak 2. ve 4. kafesteki sıçanlar bu bölmelere alındı. Her bölmeye 4 sıçan yerleştirildi. Duman jeneratörü olarak 20x10x10 cm ebadında, tavanında 2 cm²'lik bir çıkış deliği olan cam bir hazne kullanıldı. Tabanı açık olan bu haznenin içinde 1 sigara/1 saat (İyi kalite tütün; Parliament 100's Soft, Philip Morris, Türkiye) olmak üzere sigara dumanı üretildi. Bu duman, tavandaki açıklığa monte edilen bir hava pompası (Atman A, 9500-Hava motoru) aracılığı ile 50 cm uzunlukta ve 1 cm çaptaki plastik boruyla pompalanarak gaz odasına iletildi. Hortum cam odanın ön duvarına yapııştırılarak üzerine eşit aralıklı 1 cm çapında delikler açıldı. Dışarıdaki jeneratörün içinde yakılan sigaranın hem ucundan hem de filtresinden çıkan duman hava motoru yardımı ile gaz odasının içine pompalandı. Hayvanlar gaz odasında 6 saat boyunca 6 adet sigara dumanına maruz bırakıldı. Sıçanların kaldığı bölmeler her gün sırayla değiştirilerek sigara dumanına dengeli maruziyetleri sağlandı (Şekil- 7).



Şekil-7: Sıçanların sigara dumanına maruz bırakıldığı düzenek

Hayvanlar başlangıçta ve 2 haftada bir tartılarak ağırlıkları kaydedildi. 7. haftanın ilk günü hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Son ağırlıkları ölçüldü. Genital kabarıklık hizasında orta hat kesisi yapılarak testisleri dört sağ, dört sol olacak şekilde randomize olarak çıkarıldı. Epididimleri ayrılarak testislerin yaş ağırlıkları kaydedildi.

Biyokimyasal analiz için alınan testisin bir kısmı alüminyum folyo içinde -80 °C'de saklandı. Daha sonra bu dokular biyokimyasal analiz için buz aküleri üzerinde bistüri ile küçük parçalara ayrıldı, hassas terazide ağırlıkları ölçülerek kaydedildi ve cam tüplere kondu. Doku üzerine pH'sı 7,4 olan 2 ml 0,2 mM soğuk Tris-HCL tamponu eklendi. Cam tüplerdeki dokular içi kar ile doldurulmuş bir beher içinde homojenizatörde 16.000 devir/dk hızda iki dk süreyle homojenize edildi. Homojenat üzerine 4 mL daha tampon ilave edildi ve bir dakika süreyle tekrar homojenize edilerek toplam üç dakikaya tamamlandı. Homojenatların 1/3'ü 6°C de 45 dakika süreyle 3500 devir/dk hızla soğutmalı santrifüjde santrifüje edilerek süpernatant elde edildi. Bu süpernatantlardan GSH tayini yapıldı.

Dokuda Glutasyon peroksidaz aktivitesinin tayininde esas; ortamda bulunan GSH-Px enziminin kataliziyle H₂O₂'nin H₂O ve singlet oksijene çevrilmesi ve bunun da redükte GSH'ı okside GSH'a (GSSG⁻) çevirmesi prensibidir. GSSG⁻'nin oluşum hızı deney ortamındaki NADPH'ın NADP⁺'ye çevrilmesi ile 340 nm dalga boyundaki optik dansitede meydana gelen azalmanın takibiyle hesaplandı. Enzim ünitesi, birim zamanda okside olan NADPH'ın mikromol cinsinden miktarı olarak verildi (80).

Dokudaki NO üretimini tayin etmek için NO'e göre daha stabil olan nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) seviyeleri ölçüldü. Nitrat seviyeleri modifiye kadminium indirgenme testi ile saptandı. Nitrit seviyelerinin saptanması ise sulfanilamid ve naphthylethylene diamine (NDA) deazodidasyonu ile kararlı hale getirildikten sonra örnekler deproteinize edildi. Nitrat Bakır kaplı Kalsiyum ile glisine tampon içinde pH 9,7'ye indirgendü. 90 dakika sonra 545 nm dalga boyunda absorbans ölçülerek nmol/gwet doku olarak sonuçlar verildi (81).

MDA dokularda Uchiyama ve Mihara yöntemi kullanılarak değerlendirildi. 3 ml %1 fosforik asit ve 1 ml %0,6 tiobarbituric asit solusyonu 0,5 ml %10'luk doku homojenatına pipetle eklendi. Karışım kaynayan suda 45 dk süre ile ısıtıldı. Homojenat soğutulduktan sonra 4 ml n-butanol ile berraklaştırıldı. Absorbans 525 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü ve nmol/gwet olarak verildi (82).

Histopatolojik inceleme için çıkarılan testisler Bouin's solusyonunda tespit edilerek doku takip işlemlerinden geçirildikten sonra parafine gömüldü. Dokulardan

elde edilen 5-7 µm kalınlığındaki kesitlere histolojik değerlendirme yapmak için Hemotoksilen-Eozin boyaması uygulandı. Boyalı doku kesitleri Olympus BH2 geniş sahalı araştırma mikroskopuyla x400 büyütmede incelendi. Kesitlerde dıştan tunika albuginea ile sarılmış sıçan testis parankiması, seminifer tubuller ve intersisyel alanda Leydig hücreleri ve intersisyel bağ dokusu incelendi. Her kesitte 10 seminifer tubul değerlendirilerek, Johnsen kriterlerine göre 1'den 10'a kadar skorlandı.

İstatistiksel hesaplamalar SPSS 13.0 for Windows Release 13.0 (Copyright © SPSS Inc, 1989 – 2004, Chicago, III USA) yazılımı kullanılarak yapıldı. Tek rnekleme Kolmogorov – Smirnov testi ile parametrelerin normal dağılıma uyup uymadığı incelendi. Tüm gruplarda normal dağılım olması üzerine, grup içi değerlendirmeler One Way Anova testi ve gruplararası karşılaştırmalar ise Post Hock testlerden Least Significant Difference parametrik testi kullanılarak karşılaştırıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Değerler ortalama \pm standart sapma (ort \pm SS) olarak verildi.

IV- BULGULAR

Deney sonuna kadar bütün sıçanlar yaşatıldı. Sıçanların başlangıçtaki ağırlıkları ile deney süresi boyunca ölçülen ağırlıkları Tablo-2’de gösterilmiştir. Hayvanların başlangıç ağırlıkları açısından gruplar arasında fark yoktu ($p>0.05$). Takip eden ölçümlerde ağırlıkları açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

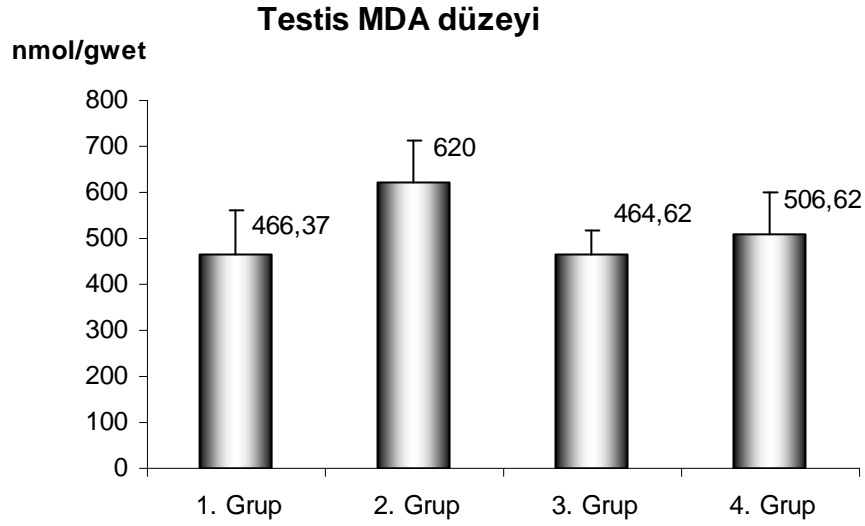
Çıkarılan testislerin yaş ağırlıklarının ortalaması; 1. grupta $1,46 \pm 0,19$ gr, 2. grupta $1,53 \pm 0,21$ gr, üçüncü grupta $1,46 \pm 0,10$ gr, dördüncü grupta ise $1,56 \pm 0,13$ gr olarak hesaplandı. Testisin yaş ağırlığı açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

	başlangıç	2. hafta	4. hafta	6. hafta
1 Grup	$330,62 \pm 36,79$	$346,5 \pm 37,79$	$341,5 \pm 35,45$	$343,12 \pm 40,83$
2.Grup	$319,87 \pm 30,85$	$344,25 \pm 28,08$	$337,87 \pm 32,93$	$346 \pm 35,90$
3 Grup	$347,37 \pm 29,89$	$343,62 \pm 26,03$	$346,25 \pm 20,71$	$340,87 \pm 37,01$
4.Grup	$317 \pm 20,98$	$331,62 \pm 24,96$	$333,62 \pm 27,00$	$343,12 \pm 20,61$

Tablo- 2: Sıçanların ağırlık takipleri (gr)

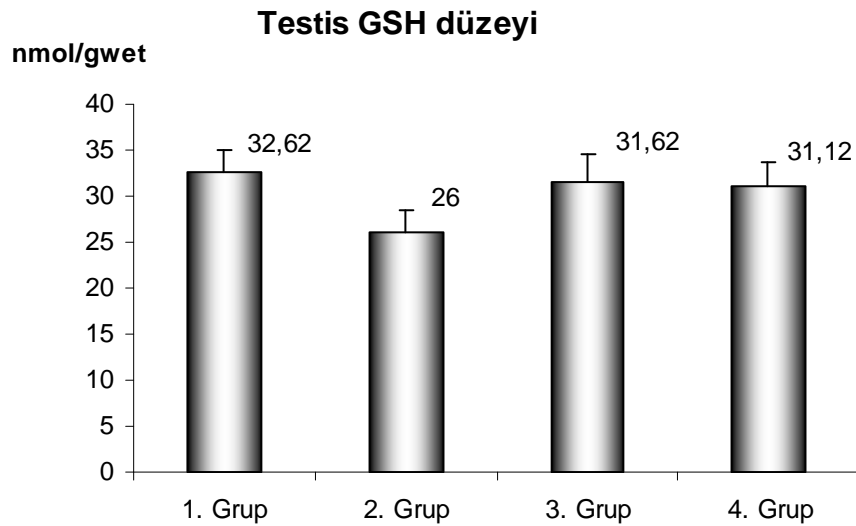
Dört grubun testis MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, 2. grup sıçanlarda istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.05$). MDA doku düzeyi

açısından kontrol grubu ve diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).
(Grafik-1)



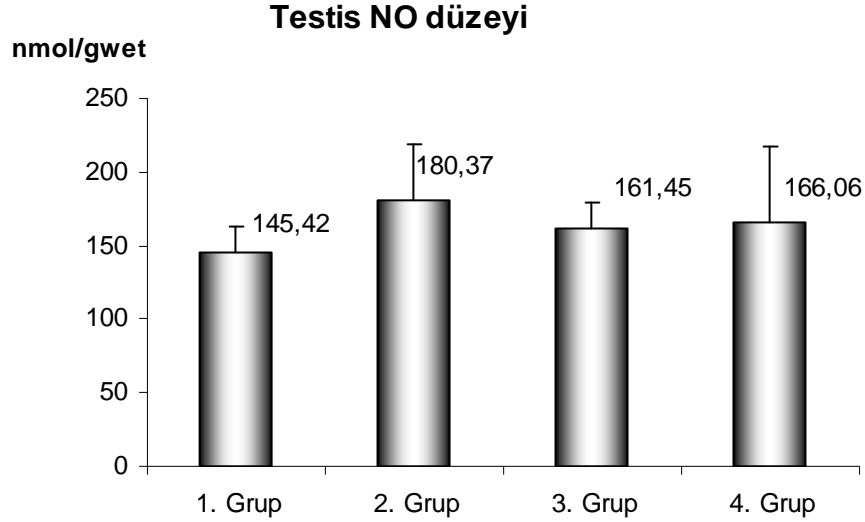
Grafik -1: Testis MDA düzeyi

Dört grubun testis GSH düzeyleri karşılaştırıldığında, 2. Grup sıçanlarda istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). GSH doku düzeyi açısından kontrol grubu ve diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). (Grafik -2)



Grafik -2: Testis GSH düzeyi

Dört grubun testis NO düzeyleri incelendiğinde, 2. grup sıçanlarda daha yüksek değerler saptanmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). (Grafik -3)



Grafik -3: Testis NO düzeyi

Testis dokusunun histolojik incelemesinde;

1. grupta testisler dıştan tunika albuginea ile sarılmıştır. Testis dokusunun parankimasını seminifer tubuller, intersisyel alanda Leydig hücreleri ve intersisyel bağ dokusu oluşturuyordu. İntersisyel bağ dokusu gevşek olup, kan ve lenf damarlarından zengindi. Buradaki kapiller etrafında toplanmış olan Leydig hücreleri düzensiz poligonal biçimli, eozinofilik sitoplazmalı, büyük eksantrik ve kromatinden fakir çekirdekli olarak gözlemlendi. Hücrelerde 1-2 çekirdekçik saptandı. Leydig hücreleri arasında yassı çekirdekli bağ dokusu hücreleri de izlenmekteydi. Seminifer tubuller geniş intersisyel doku içinde heterojen bir yapı göstermekteydi. Tübülleri çevreleyen myoid hücreler yassı ve uzun çekirdekleri ile ayırd ediliyordu. Seminifer tubullerin duvarında bazal membran üzerine oturmuş spermatogonyumlar, spermatozoidler ve spermatidler izlendi. Bunların arasında yer yer Sertoli hücreleri bulunmaktaydı. Tubullerin merkezinde gelişmiş ve gelişmekte olan spermiumlar mevcuttu. Bazı tubullerde ise spermatogonyumlar, spermatozoidler spermatidler ve Sertoli hücreleri izlenirken gelişmekte olan spermiuma rastlanmadı. İntersisyel dokuda makrofaj veya mast hücresi saptanmadı (Şekil- 8).

2. Grupta sıçan testis dokusunu dıştan saran tunika albugineada hafif kalınlaşma izlendi. İntersisyel alanda kontrol grubundaki gibi eozinofilik sitoplazmalı, büyük eksantrik ve kromatinden fakir çekirdekli, 1-2 çekirdekçikli normal histolojideki Leydig hücrelerine rastlandı. İntersisyel bağ dokusunda da hafif kalınlaşma izlendi. Seminifer tubul sınırları genellikle bozulduğu, ancak yer yer normal alanların da bulunduğu izlendi. Sınırları bozulmuş tubul epitelinde vakuolizasyon alanları mevcuttu. Bu tubullerde genelde germ hücre diziliminin bozulduğu ve spermiyogenezin duraksadığı gözlemlendi. Bazı tubullerin lumeninde immatur hücrelere rastlanırken bazı tübüllerde Sertoli hücrelerinde artış gözlemlendi (Şekil- 9,10).

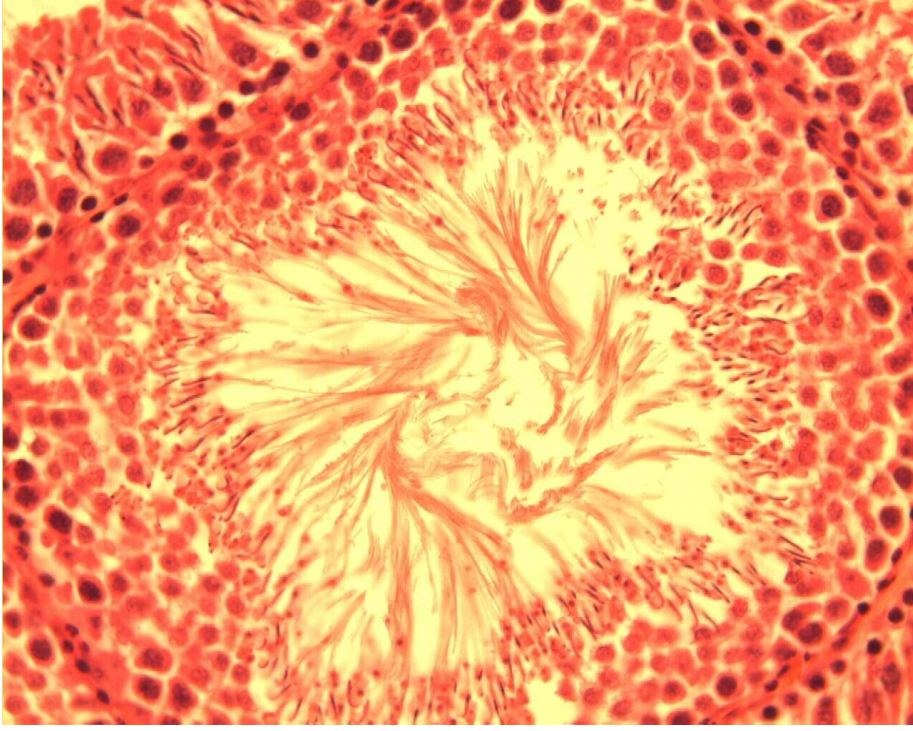
3. Grupta histolojik görünümün kontrol grubuyla benzerlik gösterdiği, tunika albugineanın normal kalınlıkta olduğu, seminifer tubul aralarını dolduran intersisyel bağ dokusunun kan ve lenf damarlarından zengin gevşek bağ dokusu olduğu gözlemlendi (Şekil- 11).

4. Grupta histolojik değişikliklerin kontrol grubuna benzer olduğu saptandı. Ancak bazı alanlarda sigara alan gruba benzer şekilde seminifer tubullerde germ hücre diziliminin bozulduğu gözlemlendi (Şekil- 12)

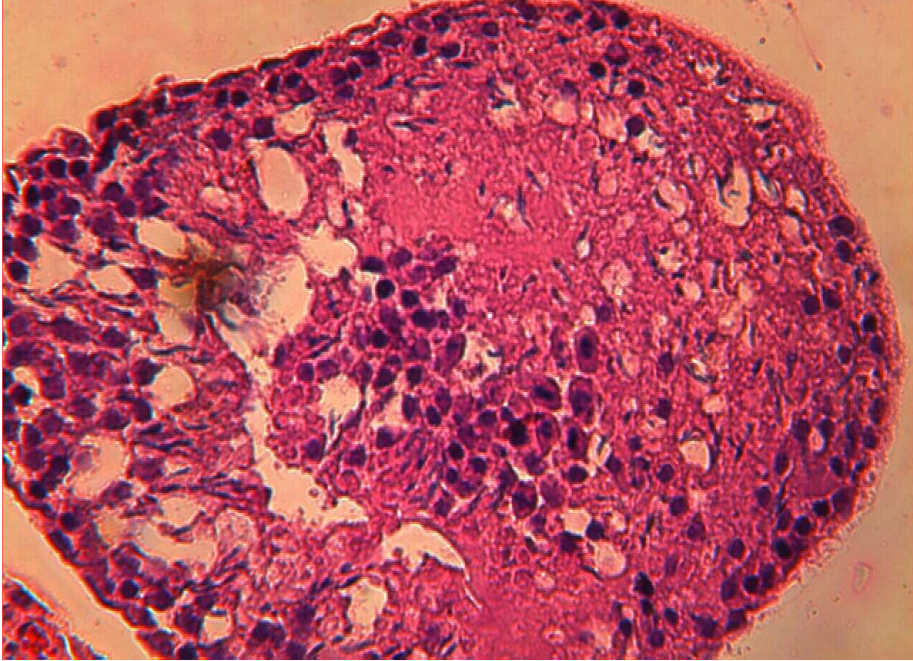
Her bir testis örneğinin histolojik kesitlerinde Johnsen skorlamasına göre saptanan değerler toplanarak bir sıçan için toplam Johnsen skoru saptandı. Toplam Johnsen skoru 2. grupta istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşüktü ($p < 0.05$). (Tablo- 3)

	Jn 6	Jn 7	Jn 8	Jn 9	Jn 10	Jn toplam
1 Grup	0	0,25 ± 0,46	0,62 ± 0,51	0,37 ± 0,51	8,75 ± 0,46	97,62 ± 1,40
2.Grup	0,5 ± 0,75	1,25 ± 1,03	1,62 ± 1,40	2,87 ± 1,24	3,5 ± 1,19	86,87* ± 4,38
3.Grup	0	0,12 ± 0,35	1 ± 0,75	2,12 ± 0,99	6,75 ± 1,03	95,5 ± 1,69
4 Grup	0	0	0,62 ± 0,51	2,25 ± 1,03	7,12 ± 0,83	96,5 ± 0,92

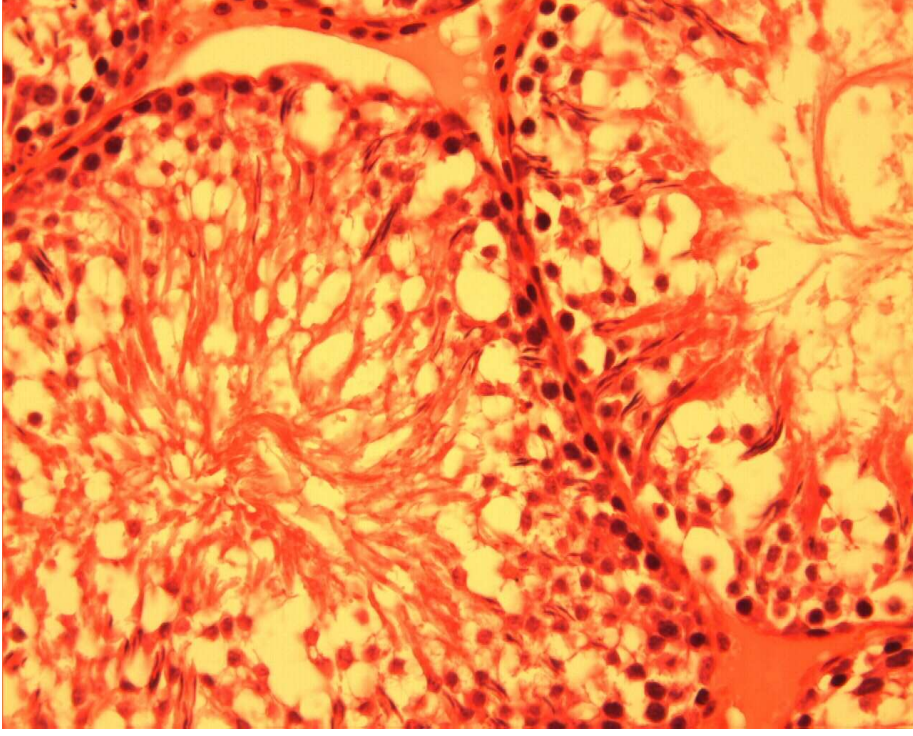
Tablo- 3: Johnsen testis biopsi skoru karşılaştırması



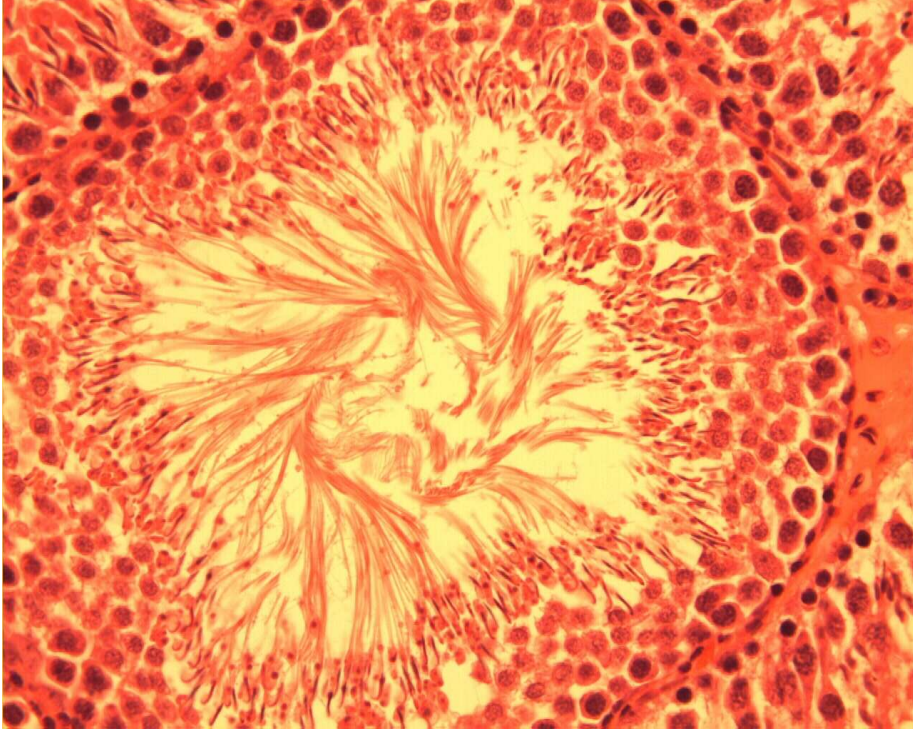
Şekil- 8: Normal histolojik görünümlü seminifer tübül x400 (Hematoksilen- Eozin)



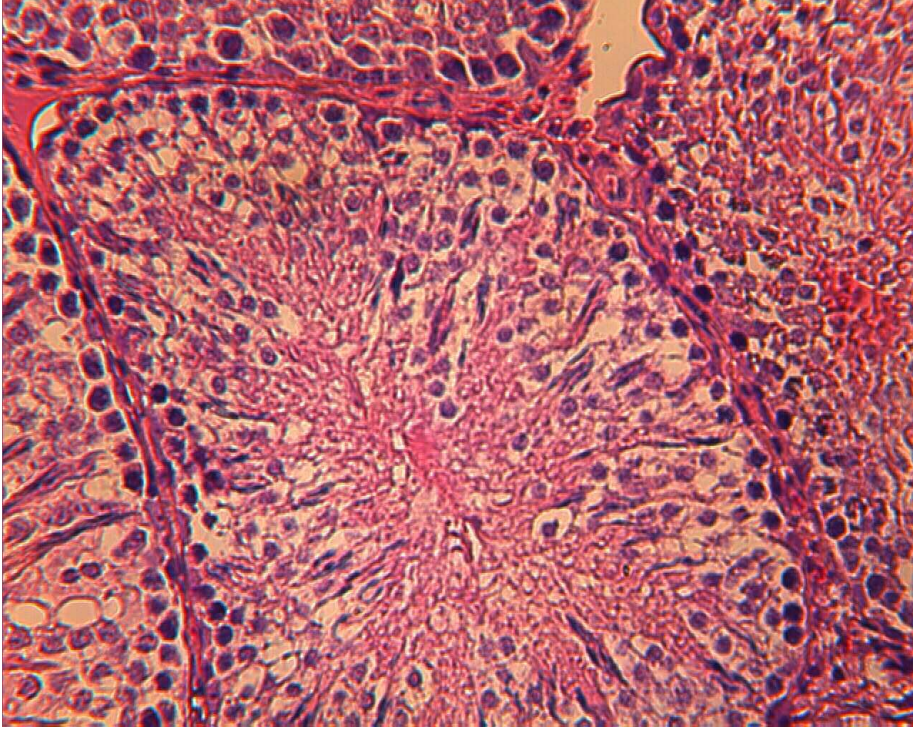
Şekil- 9: Sınırları bozulmuş seminifer tübül. Germ hücre dizilimi bozulmuş, spermiogenez duraksamış, atrofiye giden tübül x400 (Hematoksilen- Eozin)



Şekil- 10: Sınırları bozulmuş seminifer tübül. Germ hücre dizilimi bozulmuş, spermiogenez duraksamış görünüyor x400 (Hematoksilen- Eozin)



Şekil-11: Normal histolojik görünümlü seminifer tübül x400 (Hematoksilen- Eozin)



Şekil- 12: Az miktarda vakolizasyon dışında normal seminifer tübül x400 (Hematoksilen- Eozin)

V- TARTIŞMA

Sigara, günümüz toplumunun en önemli sağlık sorunlarından biridir. Günümüzde yaklaşık 1,1 milyar kişi sigara içmektedir ve bu insanların 800 milyonu gelişmekte olan ülkelerde yaşamaktadır. 2020 yılında sigaraya bağlı ölümlerin 10 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir (20). Sadece aktif kullanan insanlar değil, pasif içicilerin de sigara dumanının etkilerine maruz kaldığı düşünülürse sigaranın bu rakamlardan çok daha fazla sayıda insanı etkilediği gerçeği ortaya çıkmaktadır. Günümüz tıbbının üzerinde çalıştığı ve daha da çalışması gereken konulardan biri de bu kadar yaygın kullanılan bir maddenin içinde bulunan kimyasalların vücuttaki etkilerine karşı önlem alabilmektir.

Sigaranın erkek cinsel sağlığı ve üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (28,29,30). Bu etkilerin hormonal yapının değişmesine bağlı olduğunu iddia eden çalışmalar olduğu gibi (28), kaudal spermatozoa içeriğinde sayı ve motilitenin azaldığını ve Leydig hücre sekretuar fonksiyonunda bozulma olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (31,32).

Sigaranın vücuttaki olumsuz etkilerinin dokularda oluşturduğu oksidatif strese bağlı olduğu bilinmektedir. Oksidatif stres serbest radikallerin dokularda fiziksel hasara yol açtığı bir süreçtir. Bu hasar antioksidan maddelerle giderilmeye çalışılır (3,4). Serbest radikaller sigaraya bağlı olarak testiste de oksidatif strese sebep olur (2). Testiste sigara dışı nedenlerle oksidatif stres geliştiği ve oluşan serbest radikallerin antioksidanlarla giderildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (12,18). Aynı şekilde sigaraya bağlı olarak testiste oluşan oksidatif hasarın antioksidan bir madde olan kafeik

asit feniletal ester (CAPE) ile giderildiği de gösterilmiştir (2). Öte yandan kuvvetli bir antioksidan olan resveratrolün testiste iskemi-reperfüzyon ile oluşturulan oksidatif stres üzerinde olumlu etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur (12,18).

Bu çalışmada, sigara dumanına maruz bırakılan sıçanlarda testiste oksidatif stereze bağlı meydana gelen histolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile resveratrolün bunlar üzerine etkisini araştırdık. İnternet ortamında PubMed arama motoru ile “resveratrol AND smoke*”, “resveratrol AND oxidative stres*”, “resveratrol AND testis”, ve “testis AND smoke*” anahtar kelimeleri ile yaptığımız taramada İngilizce literatürde çalışmamıza benzer bir çalışma olmadığını gördük.

Bu çalışmada testiste oksidatif stres belirteçlerinden biri olarak doku MDA düzeyleri değerlendirildi. Çünkü; artmış MDA konsantrasyonu lipid peroksidasyonu ve doku hasarına işaret eder (82). Yaptığımız çalışmada doku MDA düzeyleri sigara verilen grupta anlamlı olarak yüksek ($p < 0,05$) olarak bulundu. Diğer grupların kontrol grubu ile aralarında anlamlı olarak fark bulunmadı ($p > 0,05$). Sigara dumanının etkilerinin diğer dokularda ve testiste araştırıldığı çalışmalarda doku MDA düzeylerinin uygun bir parametre olduğu gösterilmiştir (2,72). Dokularda oksidatif stres oluşturularak yapılan çalışmalarda da doku hasarının belirteci olarak MDA kullanıldığı gösterilmiştir (2,18,72). Aynı şekilde resveratrolün oksidatif stres üzerine olumlu etkisinin dokularda MDA düzeylerini azaltarak gösterdiği de bilinmektedir (18,72). Ancak sigara dumanına maruziyet ile birlikte resveratrol verilerek doku MDA düzeylerinin bakıldığı bir çalışma yoktur. Bu bilgilerden hareketle resveratrolün sigaranın oksidatif stres sonucu lipid peroksidasyonu ile oluşturduğu doku hasarını olumlu olarak etkilediğini ancak normal dokuda MDA düzeyleri üzerine etkisinin olmadığını göstermiştir.

Bir diğer biyokimyasal parametre olarak testis GSH düzeyleri incelendi. Çünkü; GSH süperoksit radikale karşı hücrel savunma sisteminin kilit bileşenidir. GSH konsantrasyonu ve hücrel GSH-GSGG⁻ turnover hızı oksidatif stresin bir göstergesidir. GSH seviyelerinin süperoksit radikali ile süperoksit kökenli diğer bileşenlerin yarattığı lipid peroksidasyon miktarı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (83). Doku GSH düzeyleri incelendiğinde sadece sigara verilen grupta diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük ($p < 0,05$) bulundu. Diğer grupların kontrol grubu ile

aralarında anlamlı olarak fark bulunmadı ($p > 0,05$). Literatürde gerek sigara dumanı gerekse diğer sebeplerle oksidatif stres oluşturulan çalışmalarda doku GSH düzeylerinin oksidatif sürecin takibi için iyi bir parametre olduğu gösterilmiştir (2,18). Resveratrolün antioksidan etkinliğini göstermek için yapılan çalışmalarda da doku GSH düzeylerinin resveratrol ile arttığı gösterilmiştir (18). Ancak sigara dumanına maruziyet ile birlikte resveratrol verilerek doku GSH düzeylerinin bakıldığı bir çalışma yoktur. Yaptığımız çalışmada sigara dumanına maruz kalan grupta GSH düzeylerinin düşmesi, oksidatif stres halinde dokuda GSH tüketiminin artması ile açıklanabilir. Sigara ve resveratrolün beraber verildiği grupta GSH seviyelerinin kontrol grubu ile aynı seviyede kalması resveratrolün oksidatif stresi azaltarak GSH tüketimini düşürmesine bağlı olduğu düşünülmüştür. Sadece resveratrol verilen grupta kontrol grubuna göre artış olmaması da bu düşünceyi desteklemektedir.

Oksidatif stres sürecinde NO seviyelerindeki artış çok hassas ve dinamik bir bulgudur. Bu çalışmada da oksidatif stresin ve resveratrolün etkilerini değerlendirmek için doku NO düzeyleri incelendi. Aslında NO, serbest radikal oluşumunda etkili bir maddedir ancak bunu kendi başına değil, diğer serbest radikallerin oluşumuna katkıda bulunarak dolaylı yoldan gerçekleştirmektedir. Nitrit oksit sentetaz (NOS) dokularda NO sentezinin gerçekleşmesine yol açan prooksidatif bir enzimdir. NOS'ın inhibisyonu NO düzeyini azaltarak serbest radikal oluşumunu engelleyebilir. Resveratrolün NOS aktivitesini inhibe ettiği yönünde çalışmalar mevcuttur (84). Resveratrolün oksidatif stres sonucu yükselen doku NO düzeylerini düşürdüğünü gösteren çalışmalar mevcuttur (13). Sigara dumanına maruz bırakılmış sıçanlarda da doku NO düzeylerinin yükseldiği ve antioksidan bir madde olan CAPE ile NO düzeylerinin düştüğü gösterilmiştir (2). Çalışmamızda dört grubun NO düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$). Bu çalışmada NO düzeylerinin birbirine oldukça yakın olup, aralarındaki küçük farkların da istatistiksel olarak anlamlı olmamasına sebep olarak sigaraya maruz kalma süresinin NO üzerinde daha belirleyici bir faktör olduğunu düşündürmektedir. Özyurt ve ark. yaptığı 60 gün gibi daha uzun süre sigaraya maruz bırakılmış sıçanlarda testis NO değerlerinin kontrol grubu ile yakın değerler olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir (2). Bu konuda ileri sürülecek diğer sebep ise çalışmamızda kullandığımız resveratrolün dozunun NO düzeylerini etkileyebilecek konsantrasyona ulaşmaması olabilir.

Doku örneklerinde MDA ve GSH düzeyleri anlamlı farklı iken NO düzeylerinin farklı olmamasının diğeri bir nedeni de lipid peroksidasyonundan sorumlu tek faktörün NO olmaması şeklinde düşünülebilir. Yani NO dışındaki sebepler de sigaranın etkilerinin ortaya çıkmasında rol almış olabilir.

Bu çalışmada histolojik parametrelerden Johnsen skoru kullanıldı. Çünkü; Johnsen skoru seminifer tübüllerde gerçekleşen spermatogenezin yeterliliğini ve olgun spermatozoa sayısını verir. Spermatogenez üzerine sigaranın olumsuz etkilerinin olduğu gösterilmiştir (2,32,34). Diğeri yöntemlerle oluşturulan oksidatif streste de spermatogenezin olumsuz etkilendiği ve semen spermatozoa sayısının düştüğü gösterilmiştir (12). Aynı çalışmada resveratrolün oksidatif stres sonucu germ hücrelerinde meydana gelen apoptozisi azalttığı kanıtlanmıştır. Antioksidanların oksidatif stres sonucu bozulan spermatogenez üzerine olumlu etkilerinden hareketle sigara ve resveratrolün testiste ortaya çıkaracağı etkilerin Johnsen kriterleri ile aydınlatılabileceğini düşündük.

Dört grubun testis seminifer tubulleri histolojik olarak incelendiğinde Johnsen skoru sadece sigara verilen grupta diğerilerinden anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,05$). Diğeri iki grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$). Bulgularımız ışığında sigara dumanına maruziyetin tubuler spermatozoa maturasyonunu bozduğu görüldü. Sigara dumanı ile birlikte resveratrol kullanılmasının spermatozoa maturasyonunu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benzer kaldığını gördük. Sigara alımıyla birlikte resveratrol verilmesinin sperm maturasyon süreci üzerindeki olumsuz etkiyi değiştireceğini düşünüyoruz. 90 gün boyunca 20 mg/kg/gün resveratrol verilen sıçanlarda tubuler dansitenin azaldığını ve semen sperm sayısını arttığını gösteren çalışma mevcuttur (17). Bizim yaptığımız çalışmada resveratrol verilen sıçanlarda sperm maturasyonunun kontrol grubu ile benzer olduğu görüldü. Bunun nedeni olarak çalışmamızda resveratrolün 6 hafta süreyle 10 mg/kg/gün dozunda verilmesi olarak açıklanabilir.

Bu konuda bizim çalışmamızdan daha uzun süreli olarak sigara dumanına maruz bırakılacak ve resveratrol dozunun artırılarak yapılacağı yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Yapılacak çalışmalarda histolojik incelemelerinde ultrastrüktürel seviyede elektron mikroskopu ile değerlendirilmesi bu konuda daha fazla bilgi verecektir.

Sonuç olarak; sigara dumanının, maruz kalan sıçan testisinde oksidatif strese yol açtığını, bu sürecin bir parçası olarak doku MDA düzeylerini arttırdığını, doku GSH düzeylerini azalttığını saptadık. Aynı şekilde, dumana maruziyetin toplam Johnsen skorunu düşürdüğünü gördük. Sigara dumanına maruziyet esnasında resveratrol verilmesinin doku MDA düzeyini düşürdüğünü, doku GSH düzeyini azalttığını, toplam Johnsen skorunu arttırdığını ve doku NO düzeylerine etkisiz olduğunu gözlemledik.

Çalışmamızda sigara içmenin veya pasif olarak sigara dumanına maruz kalmanın testis dokusunda oksidatif hasara yol açtığı, sperm maturasyonunu bozduğu ve muhtemelen fertilité üzerine olumsuz etkisi olacağı sonucuna vardık. Bunu engellemek için ideal olan şüphesiz ki sigara içmemek ve pasif olarak sigara dumanına maruz kalmaktan kaçınmaktır. Ancak bunun önüne geçilemiyorsa sigara dumanına maruziyet sonucunda testiste ortaya çıkan olumsuz etkilerin resveratrol ile değiştirilebileceğini düşünüyoruz.

VI-SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1- Resveratrol+sigara grubunun sadece sigara grubuna göre MDA seviyelerindeki düşüklük resveratrolün lipid peroksidasyonu üzerine olumlu etkilerini göstermektedir.
- 2- Sigara grubundaki GSH seviyesindeki anlamlı düşüklük ve resveratrol+sigara verilen gruptaki GSH seviyesindeki artış ise resveratrolün antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisini göstermektedir.
- 3- Testis dokusunda NO seviyeleri hiçbir grupta diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde fark göstermemiştir.
- 4- Hayvanların kilo takibinde anlamlı bir fark olmaması sigaranın çalışma süresi boyunca deneklerin normal yaşam koşullarını ve vital bulgularını önemli ölçüde etkilemediğini göstermiştir.
- 5- Işık mikroskobu ile histopatolojik olarak da sigara dumanına maruz kalan grupta spermatozoa maturasyonunun bozulduğu, resveratrol+sigara grubunda testisteki bu hasarın oluşmadığı gözlemlendi.
- 6- Çalışmamızda 6 hafta süreyle sigara dumanına maruz kalan sıçanlarda testis dokusunda oluşan biyokimyasal ve histolojik değişiklikler ve bu değişikliklerin resveratrol ile ne kadar değiştiğini inceledik. Biyokimyasal parametrelerden MDA ve GSH seviyelerindeki değişiklikler çalışmamızdaki temel düşüncemizi yansıtırken NO seviyesinde görülmeyen bu değişikliklerin ve histopatolojik değişikliklerin major düzeyde olmaması bu çalışmanın daha uzun süreli bir protokol hazırlanarak gerçekleştirilmesi ve histolojik incelemelerin de elektron mikroskopik olarak değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.

VII- ÖZET

SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILMIŞ SIÇANLARDA RESVERATROLÜN TESTİS DOKUSUNDAKİ ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Çalışmanın amacı sigaranın erkek üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya koymak ve bu olumsuz etkinin resveratrol ile ortadan kaldırılıp kaldırılmadığını incelemek.

Bunun için 32 tane erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar 4 gruba ayrılarak 6 hafta süren bir deney yapıldı. Birinci grup kontrol olarak belirlenerek, ikinci grup sadece sigara dumanına maruz bırakıldı. Üçüncü gruba sadece 10 mg/kg intraperitoneal resveratrol uygulandı. Son grup ise hem sigara dumanına maruz bırakıldı, hemde eşzamanlı 10 mg/kg intraperitoneal resveratrol uygulandı. Deney sonunda hayvanların tümü sakrifiye edilerek testisleri alındı. Yukarıda belirtilen etkilerin gösterilmesi için testis dokusunda biyokimyasal parametrelerden MDA, GSH, NO düzeylerine bakıldı, histopatolojik olarak da dokular ışık mikroskopunda incelendi.

Gruplar arasında hayvanların davranış şekillerinde ve tartı takibinde anlamlı bir fark görülmedi. Resveratrol+sigara grubunda sadece sigara grubuna göre MDA seviyelerinde düşüş gözlemlendi ve buda resveratrolün lipid peroksidasyonu üzerine etkisi olduğunu gösterdi. Sigara grubunda GSH seviyesinde anlamlı düşüş ve resveratrol+sigara verilen gruptaki GSH seviyesindeki artış ise resveratrolün antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisini gösterdi. NO seviyeleri hiçbir grupta diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklılık göstermedi. Işık mikroskopisi ile yapılan histolojik incelemede kriter olarak seminifer tübüllerdeki spermatogenezi

gösteren Johnsen skoru baz alındı ve sadece sigara verilen gruptaki toplam Johnsen skoru diğer gruplardan anlamlı olarak düşük bulundu.

Sonuç olarak; sigara dumanına maruz bırakılmış sıçanlarda testiste oksidatif stresin ortaya çıktığı ve resveratrolün direk veya dolaylı antioksidan etkileriyle bu hasarı önlemede etkili olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Sigara, resveratrol, testis

VIII-SUMMARY

EVALUATION OF ANTIOXIDANT EFFECT OF RESVERATROL ON TESTICULAR TISSUE IN RATS WHICH HAVE EXPOSED TO CIGARETTE SMOKE

The aim of this study was to investigate the negative effects of cigarette on male reproductive system and to evaluate if resveratrol could remove this negative effects or not.

32 male Wistar Albino rat were used in this study. Adult male rats were divided into four groups and the experiment have done during 6 weeks. Animals in Group I were used as control. Rats in Group II were exposed to cigarette smoke only and rats in In Group III were received daily intraperitoneal injections of resveratrol (10 mg/kg-d) only. Animals in Group IV were both exposed to cigarette smoke daily and received intraperitoneal injections of resveratrol (10 mg/kg-d). At the end of the experimental period the rats were sacrificed. Testes of all rats removed with standart method. To see the previously described effects MDA, GSH and NO levels were measured on testicular tissue and tissues were investigated on the light microscope.

Fallow-up of behaviour and weight of rats were no significant difference among of all groups. Rats in group IV MDA levels were lower than rats in group II. This was shown that resveratrol have effect on lipid peroxidation. GSH levels were significantly lower in group II than the other groups. The increase of GSH levels in group IV were shown that resveratrol have antioxidant and free radical scavenger effects. NO levels were no statisticly difference among all groups. The criteria of histolocigal evaluation

with light microscope was accepted as Johnsen score which shows spermatogenesis in seminiferous tubules . Only rats in group II total Johnsen score was significantly lower than the others.

These results suggest that oxidative stress have shown on rat's testes which were exposed to cigarette smoke and resveratrol has preventive effects on this damage with direct or indirect antioxidant activity.

Key words: Cigarette, resveratrol, testis

IX-KAYNAKLAR

- 1- Stillman RJ, Rosenberg MJ, Sachs BP. Smoking and reproduction. *Fertil Steril.* 1986;46:545-566.
- 2- Özyurt H, Pekmez H, Parlaktaş BS ve ark. Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian J Androl.* 2006;8(2):189-193
- 3- Elsayed NM, Bendich A. Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nutr Res* 2001;21:551–67.
- 4- Karla J, Chaudhary AK, Prasad K. Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. *Int J Exp Pathol* 1991;72:1–7.
- 5- Zalata AA, Ahmed AH, Allamaneni SSR, Comhaire FH, Agarwal A. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J Androl* 2004;6:313–8.
- 6- Kimura, Y, Okuda H, Arichi S. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 834: 275–278
- 7- Jang DS, Kang BS, Ryu SY, Chang IM, Min KR, and Kim Y. *Biochem. Pharmacol.* 1999;57:705–712
- 8- Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, and Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta.* 1995;235:207–219
- 9- Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, and Merillon JM. *Life Sci.* 1997; 61:2103–2110
- 10- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Menta RG, Moon RC, and Pezzuto JM. *Science.* 1997;275:218–220
- 11- Mgbonyebi OP, Russo J, and Russo IH. *Int. J. Oncol.* 1998;12:865–869
- 12- Ugral S, Usta U, Mizrak B. Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg.* 2005 Oct;15(5):333-6.
- 13- Vedat K, Cengiz A, Mehmet Y, Dincer O, Burak I, Gokhan S, Hale K, Aysun BK, Sezai Y, Cuneyt K, and Saim Y. Resveratrol, a Red Wine Constituent Polyphenol, Protects Gastric Tissue Against the Oxidative Stress in Cholestatic Rats. *Digestive Diseases and Sciences.* 2006;51(2):298–302
- 14- Maccarrone, M, Lorenzon T, Guerrieri P, and Finazzi Agro A. *Eur. J. Biochem.* 1999;265:27–34

- 15- Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, and Arichi S. *Chem. Pharm. Bull.* 1982;30:1766–1770
- 16- Nigdikar SV, Williams Nr, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Ntr.* Aug 1998;68(2):258-265
- 17- M Emilia J, Eulalia G-P, Thais M, Joan M, Joan E, Rodriguez G, Joana MP. trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *Nutrient Metab.* 2005;757-760
- 18- Uguralp S, Usta U, Baykarbulut A. Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg.* Apr 2005;15(2):114-9
- 19- <http://www.ntvmsnbc.com/news/271796.asp>
- 20- World Health Organization. *Tobacco or Health: A Global Status Report.* Geneva: World Health Organization 1997;10-18
- 21- Sigara Alışkanlıkları ve Sigarayla Mücadele Kampanyası Kamuoyu Araştırması raporu. PİAR: Ocak 1988.
- 22- Golding JF. *Respiratory Medicine*, 3rd rev. Ed. United Kingdom, 2003
- 23- Hastürk S. *Akciğer Kanseri.* İstanbul; 2000
- 24- Kayaalp O. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* 10nd rev. Hacettepe-Taş. 2002
- 25- Nikotin Ve Nikotin Sağlayan Ürünlerle İlgili Bazı Özellikler. *Sağlık İçin Sigara Alarmı* 1994;1:42
- 26- who.int/tobacco/about/en/
- 27- U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention. *Making Your Workplace Smokefree.* 1983
- 28- Anderson AN, Semczuk M, Tabor A. Prolactin and pituitary-gonadal function in cigarette smoking infertile patients. *Andrologia* 1984;16:391-396
- 29- Stillman RJ, Rosenberg MJ, Sachs BP. Smoking and reproduction. *Fertil Steril* 1986;46:545-566.
- 30- Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sikka S, Hellstrom W. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol* 1995;154:1030–1034.
- 31- Klaiber EL, Broverman DM. Dynamics of estradiol and testosterone and seminal fluid indexes in smokers and nonsmokers. *Fertil Steril* 1988;50:630-634
- 32- Yamamoto Y, Isoyama E, Sofikitis N, Miyagawa I. Effects of smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. *Urol Res.* 1998;26:45-48
- 33- Yardimci S, Atan A, Delibasi T, Sunguroglu K, Guven MC. Long term effects of cigarette-smoke exposure on plasma testosterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels in male rats. *British Journal of Urology.* 1997;79:66-69
- 34- Kapawa A, Giannakis D, Tsoukanelis K, Kanakas N, Baltogiannis D, Agapitos E, Loutradis D, Miyagawa L, Sofikitis N. Effects of paternal cigarette smoking on testicular function, sperm fertilizing capacity, embryonic development, and blastocyst capacity for implantation in rats. *Andrologia* 2004;36:57-68
- 35- Zavos P, Correa JR, Karagounis CS, Ahparaki A, Phoroglou C, Hicks CL, Zarmakoupis-Zavos PN. An electron microscopy study of the axonemal ultrastructure in human spermatozoa from male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril* 1998;69:430–434.
- 36- Atabekli- Erdemli E. *Erkek Üreme Sistemi. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme.* 2002;232-233
- 37- Campbell *Üroloji. Sekizinci Baskı, Güneş Kitabevi, Saunders* 2005;76-78
- 38- Urban & Schwarzenberg. *Sobotta İnsan Anatomisi Atlası., Münih 19. baskı Türkçe çevirisi, Beta Yayınevi, İstanbul 2. cilt: 224 – 231. 1998*

- 39- Hinman F Jr: Atlas of Urosurgical Anatomy. Philadelphia, WB Saunders. 1993; s497
- 40- http://www.biologycorner.com/bio3/rat_urogenital.html
- 41- Erkoçak A. Özel Histoloji. Ankara, Ankara Üniversitesi basımevi. 3. baskı.1980
- 42- Ergün S, Stingl J, Holstein AF. Segmental angioarchitecture of the testicular lobule in man. *Androl.* 1994;26:143-150
- 43- <http://www.keele.ac.uk/depts/ms/resources/anatomy/histologyimages/t232.html>
- 44- Ross MS, Romrell LJ. *Histologya Text and Atlas.* William &Wilkins. 2nd ed. 1989;603-646
- 45- Ichkowski KA, Sun EL, Gondod B. Morphometric study of the prepubertal rabbit testis: Germ cell number and seminiferous tubule dimensions. *The American Journal of Anatomy.* 1991;190:266-272
- 46- Berndtson WE, Thamson TL. Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in sprague-dawley rats. *Journal of Andrology.* 1990;11(5):429-435
- 47- Gözil R, Erdoğan D, Kadioğlu D, Aydoğan S. Testosteron Oluşturan Leydig Hücrelerinin Işık Mikroskop Düzeyinde Çeşitli Histokimyasal Yöntemlerle Değişik Sıçan Yaş Gruplarının Değerlendirilmesi. *G. Ü. Tıp Fak. Dergisi.* 1988;4(1):71-81
- 48- Smith Genel Üroloji, Simon & Schuster Comp., Nobel Tıp Kitabevleri, 14. baskı. 739. 1995
- 49- Smith Genel Üroloji, Simon & Schuster Comp., Nobel Tıp Kitabevleri, 14. baskı. 742-745. 1995
- 50- Murrant CL, Reid MB. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microscopy Research and Technique.* 2001;55:236-248
- 51- Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları Sağlık Dizisi.* 1995;5:28-42
- 52- Roggensack AM, Zhang Y, Davidge ST. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension* 1999;33:304-308
- 53- Mateo AO, Aleixandre MA. Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. *Pharmacological Research.* 2000;42(5):48-559
- 54- Cheeseman K, Slater T. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med. Bull.* 1993;49:481-493
- 55- Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri . *Mimoza Yayınları Sağlık Dizisi,* 1995;5:42-45
- 56- <http://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>
- 57- Das DK, Sato M, Ray PS, Maulik G, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A, Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1999;25:115-120
- 58- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM, Resveratrol: A Molecule Whose Time Has Come? And Gone? *Clins Biochem.* 1997;30:91-113
- 59- Hain R, Bieseler B, Kindl H, Schroder G, Stocker R. Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol, *Plant Mol. Biol.* 1990;15:325-335
- 60- Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP. Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis- resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *Int J Tissue React.* 1996;18:67-71
- 61- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Ricci T, Jantzen F, Coffey RG, Endothelium, dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *Cardiovasc. Pharmacol.* 1995;26:90-95

- 62- Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*. 2002; 106:1614-1617
- 63- Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br. J. Pharmacol*. 1997;120:1053-1058
- 64- Andriambeloson E, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 1999;33:248-254
- 65- Bradamante S, Piccinini F, Barenghi L, Bertelli AA, De Jonge R, Beemster P, De Jong JW. Does resveratrol induce pharmacological preconditioning? *Int J Tissue React*. 2000;22(1):1-4
- 66- Bertelli AA, Giovannini De Caterina RL. Antiplatelet activity. 1996
- 67- Yamaguchi M, Jie Z. Effect of polyphenols on calcium content and alkaline phosphatase activity in rat femoral tissues in vitro. *Biol. Pharm. Bull*. 2001;24:1437-1439
- 68- Mihara M, Uchiyama M. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin. Chem*. 1990;36:1440-1443
- 69- Falchetti R, Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M, Ravagnan G. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci* 2001;70:81-96.
- 70- Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC. Immunomodulatory activity of resveratrol: Suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol* 2001;2:1299-1308.
- 71- Jean-Francois M, Keguan C, Peter P, George S, Jerome RE del C, Pascal V. Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-, interleukin-1, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2005;69:151-154
- 72- Li-Man H, Ming-Jai S, Wing-Keung C, Chin-Wei C, Wan-Fen C, & Jan-Kan Chen. The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *British Journal of Pharmacology* 2002;135:1627-1633
- 73- Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci*. 1997;61(21):2103-2110
- 74- Fulgenzi A, Bertelli AA, Magni E, Ferrero E, Ferrero ME. In vivo inhibition of TNF alpha-induced vascular permeability by resveratrol. *Transplant Proc*. 2001;33:2341-2343
- 75- Ferrero ME, Bertelli AA, Pellegatta F, Fulgenzi A, Corsi MM, Bertelli A. Ptoalexin resveratrol (3-4-5-Trihydroxystilbene) modulates granulocyte and monocyte endothelial adhesion. *Transplant Pro*. 1998;30:4191-4193
- 76- Bhat KPL, Kosmeder JW, & Pezzuto JM. Biological effects of resveratrol. *Antioxid. Redox Signal*. 2001;3:1041-1064.
- 77- Aziz MH, Kumar R, & Ahmad N. Cancer chemoprevention by resveratrol: in vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms. *Int. J. Oncol*. 2003;23:17-28.
- 78- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, & Lubahn DB. A role for estrogens in the male reproductive system. *Nature (Lond)* 1997;390:509-511
- 79- Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Han R, Savouret JF, Casper RF. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA

- damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol.* 2001 Sep-Oct;15(5):479-86.
- 80- Paglia DE, Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
- 81- Atalla SL, Toledo-Pareyra LH, MacKenzie GH, Cederna JP. Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation.* 1985;40:584-590.
- 82- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.
- 83- Meister A. Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids. *Biochem Soc Trans.* 1983;11:793-4.
- 84- Reiji H, Hajime O, Nilanjana M, Dipak K.D. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* H1988-H1995 2002;282