



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ERKEK SIÇANLARDA SİGARA DUMANI MARUZİYETİ
İLE OLUŞAN TESTİKULAR OKSİDATİF STRESE L-
NAME'NİN (N-NİTRO L-ARGİNİN METİL ESTER) VE
VİTAMİN E'NİN (A-TOKOFEROLÜN) ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yakup KARA

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üy. Fahrettin AKYÜZ

2018



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ERKEK SIÇANLARDA SİGARA DUMANI MARUZİYETİ
İLE OLUŞAN TESTİKULAR OKSİDATİF STRESE L-
NAME'NİN (N-NİTRO L-ARGİNİN METİL ESTER) VE
VİTAMİN E'NİN (A-TOKOFEROLÜN) ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yakup KARA

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üy. Fahrettin AKYÜZ**

PROJE NO: 2016-1344

KABUL VE ONAY SAYFASI

Yakup KARA'nın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Erkek sıçanlarda sigara dumanı maruziyeti ile oluşan testikular oksidatif strese L-NAME'nin (N-Nitro L-Arginin Metil Ester) ve Vitamin E'nin (α -tokoferolün) etkisinin incelenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih
10.05.2018

Üye : Dr. Öğr. Üy. Fahrettin AKYÜZ



Üye : Prof. Dr. Güngör KANBAK



Üye : Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
21.05/2018 tarih ve 1174/5776.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü



ÖZET

Sigara, içinde barındırdığı çeşitli toksik maddelerle organizmadaki bütün sistemleri olumsuz etkilemektedir. Sigara kullanımının testis hasarına, akciğer, larinks, orofarinks, böbrek, mesane ve meme kanserine neden olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Oksidatif stres serbest radikallerin yol açtığı ve hücrelere fiziksel hasar veren bir süreçtir. Oluşan bu oksidatif stres vücuttaki antioksidan sistemler tarafından kontrol edilmektedir.

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. N-Nitro L-Arginin Metil Ester (L-NAME)'nin oksidatif stres ürünlerinden Nitrik Oksitin sentezinde görevli Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ı inhibe ettiği çalışmalarda gösterilmiştir. E vitamininin (alfa-tokoferolün) de lipid peroksidasyonunu engellediği ve oksidatif stres üzerine etkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Bu çalışmada L-NAME ve alfa-tokoferolün sigara dumanı maruziyeti sonucu oluşan testikular oksidatif strese etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 45 Wistar cinsi erkek sıçan kullanılmıştır. Kontrol, sigara dumanı, sigara dumanı+E vitamini, sigara dumanı+L-NAME ve sigara dumanı+E vitamini+L-NAME olmak üzere beş grup oluşturulmuştur. Hayvanlardan doku ve kan örnekleri alındıktan sonra dokuda lipit peroksidasyon düzeyi belirteci olarak Malondialdehit (MDA), oksidatif stres parametrelerinden Nitrik Oksit (NO) ile Glutatyon (GSH) seviyeleri ve Katalaz (CAT) ile Miyeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri ölçülmüştür. Kan örneklerinden ise gonadal hormonlardan Folikül Uyarıcı Hormon (FSH), Lüteinleştirici Hormon (LH) ve testosteron hormonları ölçülmüştür.

Kontrol gruplarına kıyasla sigara gruplarında, oksidatif stres belirteçlerinden MDA, NO ve MPO seviyeleri ile gonadal hormonlardan LH seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış, GSH ile CAT ve testosteron seviyelerinde ise anlamlı düzeyde azalma bulundu ($p<0.05$). Tedavi gruplarının da sigara grupları ile karşılaştırılmasında anlamlı düzeyde iyileşmeler olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Histolojik incelemelerde de sigara dumanı maruziyeti ile oluşan hasarın tedavi gruplarında giderildiği saptanmıştır.

Çalışmamız sonucunda sigara dumanı maruziyeti sonrası testis dokusunda oluşan oksidatif hasarın ve hormonal düzensizliğin E vitamini ve L-NAME uygulaması ile düzeltilebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres, Sigara dumanı, testis hasarı, E vitamini (alfa-tokoferol), L-NAME

Summary

The various toxic substances contained in the tobacco affect all systems in the organism negatively. Studies reported that smoking causes testicular damage and lung, larynx, oropharynx, kidney, bladder, breast cancer. Oxidative stress is a process which make physical damage to cells caused by free radicals. This oxidative stress is controlled by the antioxidant systems in the organism.

Testis is an organ rich in blood vessels. For this reason, it is possible that the toxic substances in cigarettes and carried in blood may change the balance between oxidant and antioxidant system in this organism. Studies show that N ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) inhibited Nitric Oxide Synthase (NOS) which is involved in the synthesis of Nitric Oxide from oxidative stress products. Vitamin E (alpha-tocopherol) also inhibits lipid peroxidation and has been shown to be effective on oxidative stress in a variety of studies.

In this study, it was aimed to investigate the effect of L-NAME and vitamin E on testicular oxidative stress by consisting of cigarette smoke exposure.

45 Wistar male rats were used in the study. Five groups were formed: control, cigarette smoke, cigarette smoke + vitamin E, cigarette smoke + L-NAME and cigarette smoke + vitamin E + L-NAME. Malondialdehyde (MDA) as a marker of lipid peroxidation level, Nitric Oxide (NO) and Glutathione (GSH) levels and Catalase (CAT) and Myeloperoxidase (MPO) activities of oxidative stress parameters were measured in the tissue after tissue and blood samples were taken from animals. Follicle stimulating hormone (FSH), Luteinizing Hormone (LH) and testosterone hormones from the gonadal hormones were measured in the blood samples.

There was a statistically significant increase in the levels of LH in gonadal hormones and MDA, NO and MPO levels of the oxidative stress markers in the cigarette groups compared to the control groups, but a significant decrease was found in the levels of GSH, CAT and testosterone ($p < 0.05$). It was observed that the treatment groups were significantly improved when compared with the cigarette groups ($p < 0.05$). Histological examinations also revealed that the damage caused by cigarette smoke exposure was eliminated in treatment groups.

As a result of our study, we think that oxidative damage and hormonal irregularity in the testes tissue after cigarette smoke exposure can be corrected with vitamin E and L-NAME application.

Keywords: Oxidative stress, tobacco smoke, testicular damage, vitamin E (alpha-tocopherol), L-NAME

İçindekiler

ÖZET.....	iii
SUMMARY.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLO DİZİNİ.....	vii
GRAFİK DİZİNİ.....	viii
ŞEKİL DİZİNİ.....	ix
SİMGE VE KISALTAMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Oksidatif Stres.....	2
2.1.1. Serbest radikaller.....	4
2.1.2. Antioksidan savunma sistemleri.....	6
2.1.3. Lipit peroksidasyonu.....	8
2.1.4. Glutasyon.....	9
2.1.5. Katalaz.....	11
2.1.6. Miyeloperoksidaz.....	11
2.2. Sigara.....	11
2.2.1. Sigara dumanı.....	12
2.2.1.1. Katran fazı.....	13
2.2.1.2. Gaz fazı.....	13
2.2.2. Sigaranın oksidan-antioksidan dengeye etkisi.....	13
2.2.3. Sigaranın endokrin sisteme etkisi.....	13
2.3. Testis.....	14
2.3.1. Testisin anatomisi.....	14
2.3.2. Testisin histolojisi.....	15
2.3.2.1. Seminifer tübüller.....	15
2.3.2.2. Sertoli (destek) hücreleri.....	15
2.3.2.3. İntertisyel alan.....	16
2.4. E Vitamini.....	17
2.4.1. E vitamini ve serbest radikaller.....	19
2.4.2. Antioksidan bir madde "E vitamini".....	19
2.5. Nitrik Oksit.....	21
2.5.1. Nitrik oksit (NO)sentezi.....	22
2.5.2. Nitrik oksit sentaz (NOS).....	23
2.5.3. Nitrik oksit sentaz (NOS) ve L-NAME.....	25
2.5.4. Nitrik oksitin etki mekanizması.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
3.1. Gereç.....	27
3.1.1. Deney hayvanları.....	27
3.1.2. Doz ve deney grupları.....	27
3.1.3. Deney hayvanlarından örneklerin alınması.....	29
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar.....	29

3.2. Yöntemler.....	30
3.2.1. Serum Testosteron, Folikül uyarıcı Hormon (FSH) ve Lüteinleştirici Hormon (LH) düzeylerinin ölçümü.....	30
3.2.1.1. Testosteron düzeyinin ölçümü.....	30
3.2.1.2. Folikül uyarıcı Hormon (FSH) düzeyinin ölçümü.....	32
3.2.1.3. Lüteinleştirici Hormon (LH) düzeyinin ölçümü.....	33
3.2.2. Doku homojenatında yapılan analizler.....	34
3.2.2.1. Malondialdehit (MDA) düzeyinin ölçümü.....	34
3.2.2.2. Glutasyon (GSH) düzeyinin ölçümü.....	37
3.2.2.3. Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin ölçümü.....	39
3.2.2.4. Nitrik oksit (NO) düzeyinin ölçümü.....	41
3.2.2.5. Miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktivitesinin ölçümü.....	44
3.2.2.6. Protein düzeyinin ölçümü.....	46
3.2.3. Testis dokularının histolojik incelemesi.....	48
3.2.4. İstatistiksel analiz.....	48
4. BULGULAR.....	49
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
7. KAYNAK DİZİNİ.....	73
8. ÖZGEÇMİŞ.....	86

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1 Serbest radikallerin radikal olmayanlarla radikal oluşturmak için girdikleri reaksiyonlar.....	4
Tablo 2.2 Bazı serbest radikaller ve simgeleri.....	4
Tablo 2.3 Serbest radikal oluşturan mekanizmalar.....	5
Tablo 2.4 Etki yerlerine göre antioksidanlar.....	7
Tablo 2.5 Sigara dumanındaki gaz ve katran fazı bileşenlerinden bazıları.....	12
Tablo 2.6 Besin kaynaklarında E vitamini miktarı.....	18
Tablo 2.7 NOS izoformları arasındaki farklar.....	24
Tablo 3.1 Deney grupları.....	28
Tablo 3.2 Testosteron ELISA kit içeriği.....	31
Tablo 3.3 FSH ELISA kit içeriği.....	32
Tablo 3.4 LH ELISA Kit içeriği.....	33
Tablo 3.5 MDA ölçümü deney prosedürü.....	36
Tablo 3.6 GSH ölçümü deney prosedürü.....	38
Tablo 3.7 CAT enzim aktivitesi ölçümü deney prosedürü.....	40
Tablo 3.8 NO ölçümü deney prosedürü.....	43
Tablo 3.9 MPO enzim aktivitesi ölçümü deney prosedürü.....	45
Tablo 3.10 Protein ölçümü deney prosedürü.....	47
Tablo 4.1 Serum Testosteron düzeyleri (ng/mL).....	49
Tablo 4.2 Serum FSH düzeyleri (ng/mL).....	50
Tablo 4.3 Serum LH düzeyleri (mIU/mL).....	51
Tablo 4.4 Doku MDA düzeyleri (nmol/mg protein).....	52
Tablo 4.5 Doku GSH düzeyleri (µmol/mg protein).....	53
Tablo 4.6 Doku CAT enzim aktiviteleri (U/mg protein).....	54
Tablo 4.7 Doku NO düzeyleri (µmol/mg protein).....	55
Tablo 4.8 Doku MPO enzim aktiviteleri (U/mg protein).....	56

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 3.1 MDA standart kalibrasyon grafiği.....	37
Grafik 3.2 GSH standart kalibrasyon grafiği.....	39
Grafik 3.3 NO standart kalibrasyon grafiği.....	44
Grafik 3.4 BSA standart kalibrasyon grafiği.....	47
Grafik 4.1 Serum Testosteron düzeyleri (ng/mL).....	49
Grafik 4.2 Serum FSH düzeyleri (ng/mL).....	50
Grafik 4.3 Serum LH düzeyleri (mIU/mL).....	51
Grafik 4.4 Doku MDA düzeyleri (nmol/mg protein).....	52
Grafik 4.5 Doku GSH düzeyleri (μmol/mg protein).....	53
Grafik 4.6 Doku CAT enzim aktiviteleri (U/mg protein).....	54
Grafik 4.7 Doku NO düzeyleri (μmol/mg protein).....	55
Grafik 4.8 Doku MPO enzim aktiviteleri (U/mg protein).....	56

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1 Serbest radikal toksisitesi.....	9
Şekil 2.2 Glutasyon yapısı.....	10
Şekil 2.3 Glutasyonun antioksidan aktivitesi.....	10
Şekil 2.4 Katalaz katalizörlüğündeki reaksiyon.....	11
Şekil 2.5 MPO katalizörlüğündeki reaksiyon.....	11
Şekil 2.6 Gonadal hormonlar.....	17
Şekil 2.7 Tokoferoller.....	18
Şekil 2.8 Antioksidanların etkileşimleri.....	20
Şekil 2.9 Nitrik oksit sentezi.....	22
Şekil 2.10 Yapısal NOS dimer şeması.....	24
Şekil 2.11 N-nitro-L-arginin-metil ester (L-NAME).....	25
Şekil 3.1 TBA ile MDA arasındaki tepkime.....	35
Şekil 3.2 Griess reaksiyonu.....	41
Şekil 4.1 Kontrol grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü.....	57
Şekil 4.2 Sigara dumanı grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü.....	58
Şekil 4.3 Sigara dumanı + E vitamini grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü.....	59
Şekil 4.4 Sigara dumanı + L-NAME grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü.....	60
Şekil 4.5 Sigara dumanı + E vitamini + L-NAME grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü.....	61

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Absorbans
ABP	Androjen bağlayıcı protein
ADP	Adenozin difosfat
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
ATP	Adenozin trifosfat
BH ₄	Tetrahidrobiyopterin
BSA	Bovin serum albümin
Ca ⁺² / CAM	Kalsiyum/Kalmodulin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CAT	Katalaz
CBrCl ₃	Bromo trikloro metan
CCl ₄	Karbon tetra klorür
cGC	Siklik guanilat siklaz
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
cNOS	Yapısal nitrik oksit sentaz
DF	Dilüsyon faktörü
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DTNB	5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
EDRF	Endotel kaynaklı gevşetici faktör
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzim bağlı imminosorbent analiz
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
ESOGÜ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FMN	Flavin mononükleotid
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GC	Guanilat siklaz
GMP	Guanozin monofosfat
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HADYEK	Hayvan deneyleri yerel etik kurulu
HETAB	Hekzadesil trimetil amonyum bromid
HOCl	Hipoklorik asit
i.p.	İntraperitonal
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
K	Kontrol
LH	Lüteinleştirici hormon
LNAA	N-amino-L-arginin
L-NAME	N-Nitro L-Arginin Metil Ester
L-NIO	N-iminoetil-I-ornitin

LNMA	N-metil-L-arginin
L-NMMA	N-monometil-L-arginin
MDA	Malondialdehit
MPO	Miyeloperoksidaz
NADP	Nikotinamid difosfat
NADPH	Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
S	Sigara dumanı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
S-E	Sigara dumanı+E vitamini
S-E-L	Sigara dumanı+E vitamini+L-NAME
S-L	Sigara dumanı+L-NAME
SOD	Süperoksit Dismutaz
SPSS	Sosyal bilimler için istatistiki paket
t	Reaksiyon süresi
TBA	Tiyobarbitürik asit
TICAM	Tıbbi bilimler deneysel araştırma ve uygulama merkezi
TMB	Tetrametil benzidin
UV	Ultra viyole
Ve	Örnek hacmi
Vt	Toplam hacim
WHO	Dünya sağlık örgütü
ϵ	Ekstinksiyon katsayısı

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Sigara içimi ve çiğneme şeklindeki tütün kullanımı çok eski yıllardan beri olan bir alışkanlıktır. Sigara, içinde barındırdığı çeşitli toksik maddelerle organizmadaki bütün sistemleri olumsuz etkilemektedir. Sigara içenler nikotin, kadmiyum, kurşun ve civa gibi birçok kimyasal bileşiğe maruz kalırlar. Sigaranın, santral ve periferik sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve endokrin sistem üzerine toksik etkileri bilinir. Ayrıca, sigara kullanımının testis hasarına, akciğer, larinks, orofarinks, böbrek, mesane, meme kanserine neden olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Pekmez vd., 2003). Hücre siklusu hızlı olan spermatozoanın sigara dumanında bulunan mutajenik ve karsinojenik maddelere karşı daha hassas olduğu gösterilmiştir (Wallach, Stillman, Rosenberg & Sachs, 1986).

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 (Söylemez vd., 2011).

Oluşan bu oksidatif stres vücuttaki antioksidan sistemler tarafından kontrol edilmektedir. Testis kan damarları açısından zengin bir organ olduğu için sigarada bulunan toksik maddeler bu organda oksidan-antioksidan sistem arasındaki dengeyi bozması olasıdır. Bu sebepten artan serbest radikaller, testiste doku hasarına yol açar. Oksidatif stresin spermatozoa fonksiyonlarını bozduğu ve anormal spermatozoa üretimine yol açtığı bilinmektedir (Zalata, Ahmed, Allamaneni, Comhaire, & Agarwal, 2004).

Endokrin bozucu maddeler; sağlıklı bir organizmada veya onun gelecekteki neslinde endokrin sistemin çalışmasını değiştirerek, sağlık sorunlarına neden olan dışardan alınan madde veya madde karışımlarıdır (Stoker, Parks, Gray & Cooper, 2000). Endokrin bozucu maddeleri, Dünya sağlık örgütü (WHO) "Sağlıklı bir canlıda veya sonraki nesillerinde olumsuz etkiye sebep olan, endokrin sistemin işlevini değiştiren dış kaynaklı maddeler veya bileşiklerdir." olarak tanımlamaktadır (WHO, 2013).

Bu maddeler, hormonların üretim, salınım, bağlanma, taşınma, aktivite, yıkım ve vücuttan atılımları üzerine etki etmektedirler. Klinikte ortaya çıkan bulgular, tüm etkilerin toplamına göre değerlendirilmektedir (Teilmann, Juul, Skakkebæk & Toppari, 2002).

Sigarada bulunan nikotin, kotinin ve tiyosiyanat endokrin sistemde etkili olan sigara bileşenleridir. Yapılan çalışmalarda sigaranın, testislerin

gelişmesi ve fonksiyonları üzerine birçok zararlı etkisi tespit edilmiştir. Bunlar arasında leyding hücrelerinden testosteron hormonunda azalma olduğu gözlenmiştir (Liu vd., 2010).

Sigara; nitrik oksit, hidrokarbonlar, aldehidler, fenollar, kinon ve semikinon radikalleri gibi pek çok kimyasal maddeyi bünyesinde barındırmakta ve bu kimyasal maddeler direkt ya da indirekt olarak oksijen kaynaklı serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır.

Serbest radikallerin protein, nükleik asit ve diğer hücresel unsurlara verdiği hasarın oldukça önemli bir yaşam riski oluşturduğu günümüzde bilinmektedir. Lipit peroksidasyonunun da serbest radikallerden kaynaklanan bir mekanizma ile başladığını ve "pozitif feed back" ile serbest radikallerin artışına sebep olan bir döngü oluşturduğunu çalışmalar göstermektedir. Serbest radikallerin tahrip edici bu özelliklerinin ortaya koyduğu genel tablo organizma için oksidatif stres oluşturmaktadır. Oksidatif stresle mücadelede ise antioksidanların rolü çok önemli bulunmuştur. Serbest radikaller yaşam riski oluştururken antioksidanlar yaşam kaynağı olarak görülmüşlerdir (Dündar, 2000).

Nitrik oksit sentezini katalizleyen nitrik oksit sentaz tanımlanıp L-arjininden nitrik oksit sentez yolu aydınlatılmaya çalışılmış, bu sırada L-arjinin analoglarının bu yolu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar neticesinde tespit edilen L-arjinin analoglarından biri olan L-NAME'nin hem yapısal hem de indüklenebilen nitrik oksit sentaz izoformlarını inhibe ettiği görülmüştür (Tekin, Akyüz & Temel, 2011).

E vitamini, kimyasal yapı itibarı ile bir tokol olup antisterilite vitamin olarak da bilinir. E vitamini yağda çözünen önemli bir antioksidandır ve özellikle hücre zarları ve lipoproteinlerde önemli antioksidan işlevler görmektedir. Tokollerin (tokoferol ve tokotrienol) farklı bileşikleri E vitamini aktivitesi gösterir. En aktifi alfa-tokoferoldür. E vitamini sinir sisteminin, kasların, hipofiz ve sürrenaller gibi endokrin bezlerin ve üreme organlarının fonksiyonları için önemlidir. E vitamini, biyolojik bir antioksidandır.

Çalışmamızın amacı sigara dumanı maruziyeti sonucu oluşan testikular oksidatif strese ve bozulan endokrin sisteme L-NAME ve E vitamininin etkisini aydınlatmaktır. Sigara kullanımı sonucu oluşan fertilitede meydana gelebilecek bozukluklar için tedavi oluşturulmasına destek sağlamaktır.

2- GENEL BİLGİLER

2.1 – Oksidatif Stres

Oksidatif stres, serbest radikal üretimiyle antioksidan savunma arasındaki dengenin bozulması sonucunda hücrel hasarla sonuçlanan bir durum olarak tanımlanır (Jenkins, 2000). Normal fizyolojik koşullarda, hücreler oluşan serbest radikallerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Hava kirliliği, yanmış gıdalar, kimyasal maddelerle etkileşimler ve sigara dumanı gibi serbest radikal kaynakları hücrelerdeki radikal oluşumunu hızlandırarak oksidan-antioksidan dengeyi bozmaktadır (Aslan, Şekeroğlu, Gültekin & Bayiroğlu, 1997; Thomas, 1995).

Serbest radikalleri ve reaktif özellik gösteren maddeleri oluşturan ana kaynaklar oksidan veya prooksidan olarak tanımlanır. Radikallerin hücre homeostazını bozmasını engelleyen maddeler ise antioksidanlardır. Vücudumuzda fizyolojik aktivite sonucu serbest radikaller sürekli olarak üretilmekte, bu radikalleri de antioksidan sistem kontrol altında tutmaktadır. Çok hassas olan oksidan-antioksidan dengenin özellikle oksidanlar lehine kayması membran lipitleri, proteinler ve Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) gibi önemli yapılarda bozulmalara ve patolojik olayların başlamasına neden olur (Dündar & Aslan, 1999).

Oksidan-antioksidan dengesinin bozulmasında başlıca endojen kaynak mitokondrial oksijen hareketleridir. Aşırı oksijene maruz kalınması, litik enzim (hidrolazlar, proteazlar, lipazlar, fosfatazlar vs.) aktivitelerindeki artışlar, kimyasal çevre kirliliğinin olduğu ortamlarda yaşama, yoğun stres ve sigara gibi durumlar antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalmasına ve oksidan-antioksidan dengenin oksidanlar lehine kaymasına neden olmaktadır (Dündar & Aslan, 1999).

Oksidan-antioksidan dengenin oksidanlar lehine kayması sonucu zincirleme bir takım reaksiyonlardan bahsedilir. Bu zincirleme reaksiyonlarla serbest radikaller serbest olmayan radikallerle yeni radikaller oluştururlar (Tablo 2.1)(Halliwell, Murcia, Chirico & Aruoma, 1995).

Tablo 2.1 Serbest radikallerin radikal olmayanlarla radikal oluşturmak için girdikleri reaksiyonlar (Dündar & Aslan, 1999)

Reaksiyon Tipi	Genel Gösterim	Örnek
Eklenme	$x + y \longrightarrow [x-y]$	DNA guaninine OH eklenmesiyle 8-hidroksiguanin radikali oluşması
İndirgeme (radikalın elektron vermesi)	$x + y \longrightarrow y^- + x^+$	Paraquat radikalının O_2^- 'ni süperoksit radikaline indirgemesi
Yükseltgeme (radikalın elektron alması)	$x + y \longrightarrow x^- + y^+$	$O_2^- + H^+ \longrightarrow$ askorbat + H_2O_2 askorbik asitin gösterimindeki gibi yükseltgenmesi
Yükseltgenme (radikalın H atomu alması)	$x + y-H \longrightarrow x-H + y$	Lipid peroksil radikali ile α -tokoferolün reaksiyonu $\alpha TH + LOO \longrightarrow LOOH + \alpha T$

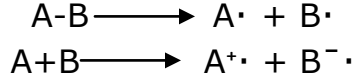
2.1.1– Serbest radikaller

Dış orbitalinde çiftleşmemiş elektron taşıyan halojenler, alkali metal iyonları oksijenin indirgeme ara ürünü olan süperoksit, hidrojenperoksit, hidroksil gibi kısa ömürlü ve reaktif olan yapılar serbest radikal olarak tanımlanır (Aslan, Şekeroğlu & Bayiroğlu, 1995; Yu, 1994). Bazı serbest radikallerin simgeleri ve isimleri tablo 2.2 de verilmiştir.

Tablo 2.2 Bazı serbest radikaller ve simgeleri

Radikal	Simge	Tanımlama
Hidrojen	$H\cdot$	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	$O_2\cdot^-$	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	$OH\cdot$	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikal
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O_2^-	Yarılanma ömrü hızlı, güçlü oksidatif oksijen formu
Perhidroksi radikal	$HO_2\cdot$	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO^-	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCl_3	CCl_4 metabolizması ürünü karaciğerde üretilen bir radikal
Thyl radikali	$RS\cdot$	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	$RO\cdot$	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen oksit	NO	L- arjinin amino asitinden in vivo üretilir.
Nitrojen dioksit	NO_2	NO 'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir.

Serbest radikallerin oluşmasında iki ana mekanizmadan bahsedilir ki bunlar, hemolitik bağ ayrılması ve elektronun moleküller arası transferidir (Thomas, 1995).



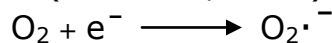
Oluşan serbest radikallerdeki eşleşmemiş elektronlardan dolayı, fazla elektronu başka atomlarla paylaşmaya kadar bu radikaller reaktiftir. Bu yüzden serbest radikaller diğer moleküllerle reaksiyona girme eğilimindedirler. Ancak iki serbest radikalın reaksiyonu ile nötr türler oluşur (Aslan vd., 1995).

Serbest radikallerin oluşmasında bahsedilen hemolitik bağ ayrılması ve elektronun moleküller arası transferi mekanizmalarının özelleşmesiyle şu mekanizmalar ortaya atılmıştır (Tablo 2.3).

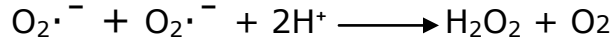
Tablo 2.3 Serbest radikal oluşturan mekanizmalar (Koca & Karadeniz, 2003; Halliwell & Gutteridge, 1990)

Otooksidasyon	Atmosferik oksijen tarafından katalizlenen serbest radikal zincir reaksiyonudur.
Geçiş Metal İyonlarının Etkisi	Demir ve bakır gibi geçiş metal iyonları canlı sistemlerde serbest radikal oluşturan güçlü birer oksidatif katalisttir.
Fotooksidasyon	Fotokimyasal iz yolları, oksidasyonlarda başlatıcı olarak rol oynayan peroksitlerin oluşumunda anahtar role sahiptir. Işığın bir molekül tarafından absorpsiyonu ile elektron transfer prosesi sonucu süperoksit anyonu üretilebilmektedir.
Enzimatik Oksidasyonlar	Vücutta lipoksijenaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, miyeloperoksidaz ve sitokrom P-450 gibi birçok enzimin aktivitesi sonucu olarak reaktif oksijen türleri üretilmektedir.
Halojenlenmiş Hidrokarbonlar	Kontamine içme sularında bulunan halojenlenmiş hidrokarbonlar ve hava kirleticileri olarak bilinen azot oksitler de serbest radikal meydana getirirler. Örneğin; Karbontetraklorür (CCl ₄), bromotriklorometan (CBrCl ₃)

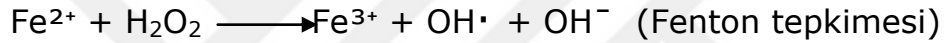
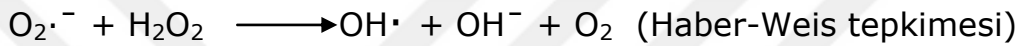
Oksijenin suya kadar indirgenmesi sürecinin ara basamaklarında reaktif metabolitler ortaya çıkar. Örneğin oksijen bir elektron alarak Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH)'e bağlı olarak süperoksit radikali oluşmasına sebep olur (Fridovich, 1978).



Süperoksit daha stabil metaboliti olan H₂O₂'e dönüşür (Fridovich, 1975).



Süperoksit bazı radikallerle ve geçiş metalleri ile kolay reaksiyona girer ve H₂O₂ ile (Haber-Weis tepkimesi) oldukça toksik olan hidroksil radikalini oluşturur (Haber & Weiss, 1934). Demir iyonları ile reaksiyon, ortalama hızından daha da hızlanır (Fenton tepkimesi) (Aslan, Şekeroğlu & Bayiroğlu, 1995).



Aerobik organizmalarda süperoksitle olan reaksiyonları engellemek için süperoksit dismutaz (SOD), hidrojen peroksidi ortamdan kaldırmak için katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri kullanılmaktadır (Ji, Stratman & Lardy, 1988; Lawrence & Burk, 1976).

2.1.2 – Antioksidan savunma sistemi

Serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonları engelleyen, serbest radikalleri tutma ve stabilize etme özelliği gösteren maddelere "antioksidan" adı verilir. Antioksidanlar mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Koca & Karadeniz, 2003; Elliott, 1999). Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerler ve daha zararlı formlar oluşmasını engelleyerek yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Birincil antioksidan olarak SOD, GSH-Px ve CAT gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. Bu enzimler serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücrel bileşenlere zarar vermesini engeller (Koca & Karadeniz, 2003; Diplock, 1998).

İkincil antioksidanlar ise; oksijen radikalini tutan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi bileşiklerdir (Koca & Karadeniz, 2003; Ou, Huang, Hampsch-Woodill, Flanagan & Deemer, 2002).

Antioksidan savunma sisteminde homeostazın korunmasının ana gücünü vitaminler oluşturmaktadır. Antioksidan özellik gösteren A, C, E, K

vitaminleri ve koenzim Q antioksidan savunma mekanizmalarından en az biri üzerinden oksidan-antioksidan dengesini korur (Dündar & Aslan, 1999).

Antioksidan savunma sistemi;

- ✓ Organizmadaki antioksidan enzimlerle enzimatik olmayan antioksidan kapasitenin arttırılması
- ✓ Serbest radikallerin antioksidanlar tarafından elimine edici özellikleri ile tutulması veya stabil hale getirilmesi
- ✓ Zincirleme reaksiyonları durdurarak serbest radikal üretiminin durdurulması
- ✓ Baskılayıcı özelliği ile reaksiyon hızını azaltılması
- ✓ Onarıcı etki ile lipit, protein ve DNA gibi yapılarda oluşan hasarları rejenere edilmesi
- ✓ Hücresel kinaz kayıplarını engelleyerek oksidasyon reaksiyonlarını durdurması

olmak üzere altı farklı mekanizma ile çalışır (Van Der Meulen, McArdle, Jackson & Faulkner, 1997; Packer, 1991; Evelson, Ordóñez, Llesuy & Boveris, 1997; Stratton & Liebler, 1997).

Antioksidan savunma sisteminin intraselüler, membransal ve ekstraselüler olarak da sınıflandırıldığı görülmektedir (Tablo 2.4) (McCord & Fridovich, 1969).

Tablo 2.4 Etki yerlerine göre antioksidanlar (Dündar & Aslan, 1999b)

İntraselüler antioksidanlar	SOD, GSH-Px, CAT ve sitokrom oksidaz gibi selüler antioksidan enzimlerce reaktif oksijen metabolitleri indirgenir.
Membransal antioksidanlar	Başta α - tokoferol olmak üzere, ubiquinal bileşikleri, β -karoten ve koenzim Q temel membran antioksidanlarıdır.
Ekstraselüler antioksidanlar	Transferrin, laktoferrin, albumin, seruloplazmin, bilirubin, ürik asit gibi proteinler ekstraselüler antioksidanlardır.

İntrasesüler antioksidanlar;

Süperoksit dismutaz: Süperoksidin giderilmesi reaksiyonlarında
Katalaz: H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarının giderilmesinde

Glutasyon peroksidaz: H_2O_2 'nin düşük konsantrasyonlarının giderilmesinde

Stokrom oksidaz: Oksijenin indirgenmesi basamaklarında reaktif tür oluşmasını önler (Aslan vd., 1995).

Membransal antioksidanlar;

Vitamin E: Membran lipidlerinde çözünerek peroksidasyon zincirini kırar
Koenzim Q: Mitokondriyal enerji metabolizmasında rol alır
 β -Karoten: Radikal türleri koparır, singlet oksijen oluşumunu inhibe eder (Gutteridge, 1995).

Ekstraselüler antioksidanlar;

Askorbik asit: Hidroksil radikal giderici ve tokoferolü indirgeyici antioksidan vitamin

Transferrin: Serbest demir iyonlarını bağlayarak fenton reaksiyonunu inhibe eder

Laktoferrin: Düşük pH'lı ortamlardaki demir iyonlarını bağlar

Haptoglobinler: Hemoglobin bağlayarak "hem" in salınmasını önler

Hemopeksin: Ortamdaki serbest hem proteinlerini bağlayarak oksidasyonu inhibe eder

Albumin: HOCL radikalini toplar, hem proteini ve bakır metal iyonlarını bağlar

Serüloplazmin: Süperoksit radikalini nötralize eder, bakır iyonlarını bağlar

Bilirubin: Peroksil radikali toplayıcısı

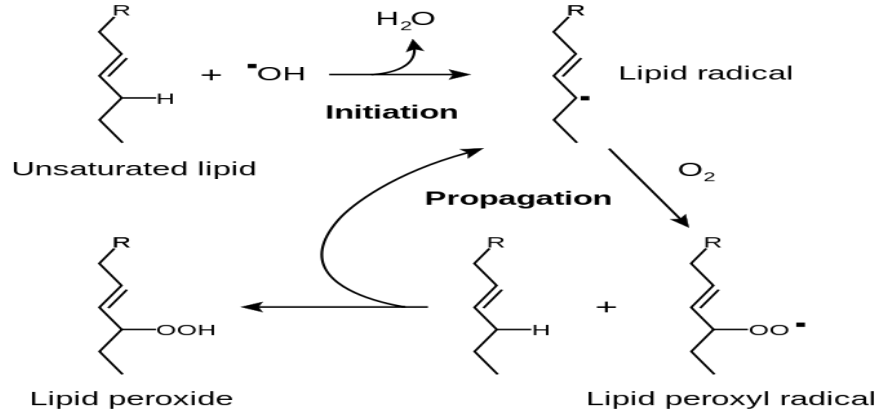
Mukus: Hidroksil radikali toplayıcısı

Ürik asit: Genelde metal bağlayıcı olarak çalışırken değişik radikalleri de toplar

Glikoz: Hidroksil radikali giderici antioksidan moleküldür (Gutteridge, 1995).

2.1.3 – Lipit Peroksidasyonu

Hücre zarındaki fosfolipitlerin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi ile oluşan lipit peroksidasyonu serbest oksijen gruplarının biyolojik sistemdeki en önemli etkilerindedir. Oksidanlar ve oksidatif stres nedeniyle fizyolojik durumlarda düşük seviyede olan lipit peroksidasyonu artmaktadır. Artan lipit peroksidasyonu hücrede fonksiyon kaybına neden olmaktadır. Lipit peroksidasyonu üç evrede gerçekleşir: başlangıç, ilerleme ve sonlanma (Şekil 2.1).

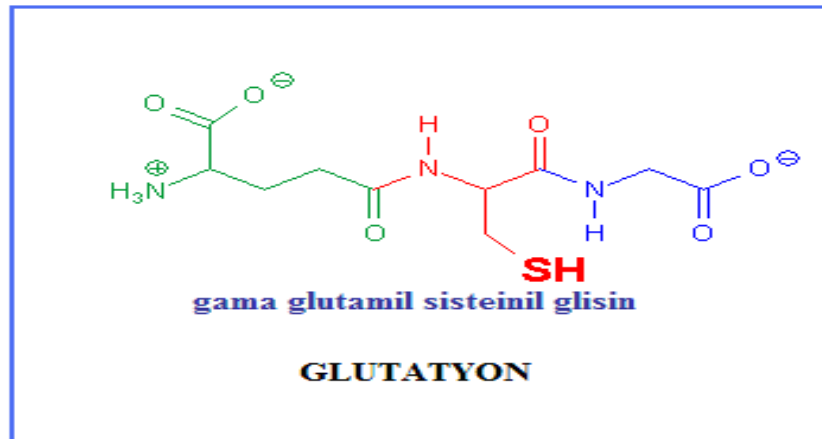


Şekil 2.1 Serbest radikal toksisitesi

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit radikalleri, aldehitler, ketonlar ve reaktif ürünler; 4-hidroksinonenal (4-HNE), MDA, akrolein gibi toksik maddeleri meydana getirir. Bu maddelerin miktarı peroksidasyonun şiddeti hakkında bilgi sağlamamıza yardımcı olur. Özellikle MDA üç veya daha fazla çift bağlı yağ asitlerinin yıkımı ile meydana geldiğinden lipit peroksidasyonu ile korelasyon göstermektedir (Ozcelik, E. 2012).

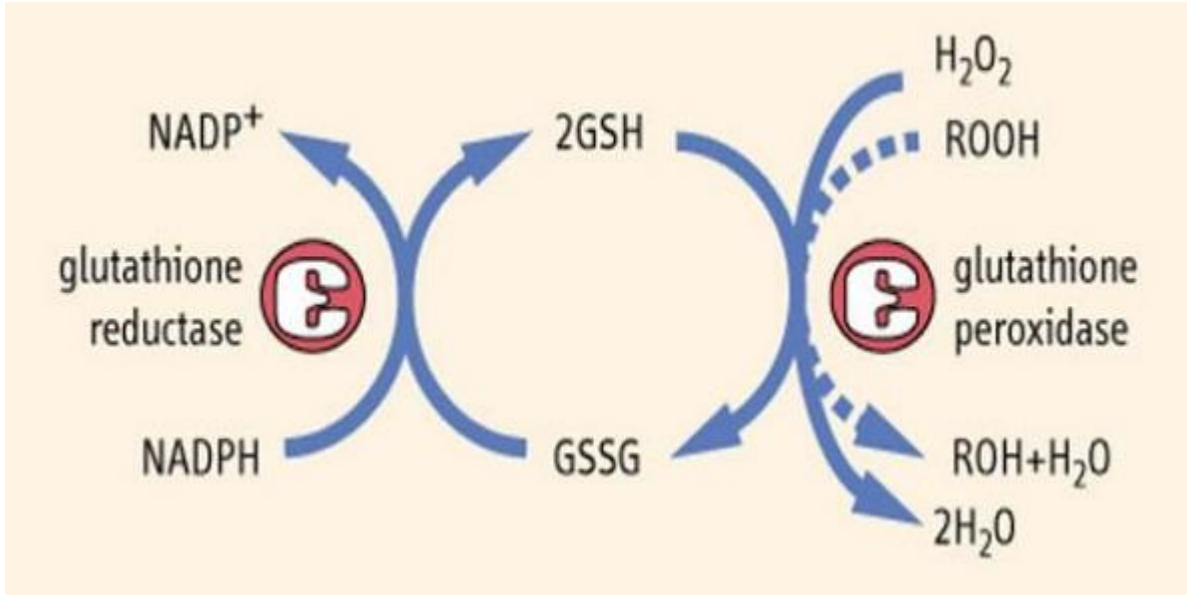
2.1.4 - Glutatyon

Genel anlamda karaciğerde sentezlenen glutatyon değişik miktarlarda beyin, böbrek, testis gibi çoğu dokuda da sentezlenmektedir. Serbest radikallerin ve reaktif türlerin detoksifikasyonunda önemli bir yeri olan glutatyon aynı zamanda kalsiyum homeoastazı ve protein ve DNA'nın sentezi gibi önemli mekanizmalarda da yer almaktadır.



Şekil 2.2 Glutatyon yapısı

Glutasyon (γ -glutamil sisteinil glisin), glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan ve antioksidan, antitoksin ve enzim kofaktörü olan bir tripeptiddir (Şekil 2.2). GSH-Px tarafından katalize edilen reaksiyonla, reaktif olan hidrojen peroksidin bozulmasını sağlar. Peroksitlerle ve serbest radikallerle etkileşerek hücreyi oksidatif stresten korur (Şekil 2.3). Güçlü bir indirgeyici olan glutasyon enzimlerin sülfidril gruplarını indirgeyerek etkisini gösterir. Antioksidan olarak glutasyon oksidanların temizlenmesi sırasında GSH-S transferaz için kofaktör olurken, gamaglutamil transpeptidaz için glutamini substrat olarak kullanır (Kidd, P. M. 1997; Townsend, D. M., Tew, K. D., & Tapiero, H. 2003; Ozcelik, E. 2012)



Şekil 2.3 Glutasyonun antioksidan aktivitesi

2.1.5 – Katalaz

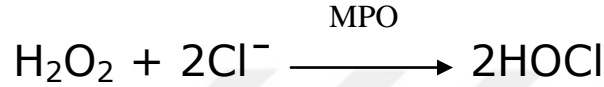
Her bir alt biriminde Hem grubu ile bir molekül NADPH bulunduran dört alt birimden oluşmuş ve peroksizomlarda lokalize olan antioksidan bir enzimdir (E.C.1.11.1.6). Eritrositler ile karaciğer hücrelerinde aktivitesi en fazladır. SOD enzim katalizörlüğünde oluşan hidrojen peroksidin, diğer reaktif türler arasında en fazla oksidatif harabiyete sebep olan hidroksil radikale dönüşmesini engeller. Ortamda yüksek miktarda hidrojen peroksid bulunduğunda katalaz, onu su ve moleküler oksijene parçalar (Şekil 2.4)(Cengiz, S. 2007).



Şekil 2.4 Katalaz katalizörlüğündeki reaksiyon

2.1.3 – Miyeloperoksidaz

Miyeloperoksidaz (EC 1.11.1.7), memeli nötrofil garnüllerinde yer alan bir enzimdir. Kristal yapısının X ışınları incelenmesi neticesinde iki alt birimden oluştuğu bulunmuştur. Fagositoz ile mikroorganizmaların yok edilmesinde görev alan MPO, Cl^- ve H_2O_2 arasındaki reaksiyonu katalize ederek oldukça reaktif olan hipoklorik asit (HOCl) oluşturur. Oluşan HOCl kuvvetli bir oksitleyicidir. MPO aktivitesinin artmasıyla H_2O_2 membrandan geçerek ya toksik etki yapar ya da hidroksil radikaline dönüşür (Klebanoff, 1999).



Şekil 2.5 MPO katalizörlüğündeki reaksiyon

2.2 – Sigara

Sigara, tütün bitkisinin yapraklarından elde edilen ve pek çok insan tarafından keyif verici özelliği olduğu düşünülen bir maddedir. Gelişmiş ülkeler de kamuoyu kampanyaları, reklam yasakları, vergilerin arttırılması ve tütün tüketiminin azaltılmasını amaçlayan politikalar sayesinde sigara kullanımında azalma olmasına rağmen, gelişmekte olan ülkeler de sigara tüketimi halen yüksektir. Dünyada sigara içme oranının büyük kısmı gelişmekte olan ülkelere aittir (World Health Organization, & Research for International Tobacco Control, 2008).

Tütün, Solanacea (patlıcangiller) familyası "Nicotiana" cinsinden yıllık bir bitkidir. Nicotiana cinsinde pek çok tür bulunmasına rağmen bunlardan Nicotiana tabacum ve Nicotiana rustica türlerinin yaprakları sigara ve puro gibi tütün mamüllerinin yapımında kullanılmaktadır (Karafakoğlu, 2004). Tütünü, Amerikadaki yerliler yıllarca kullanmış olmasına rağmen uygar dünya 1492 yılında Amerika'nın keşfiyle tanışmıştır. Jean Nikot tarafından Fransa da 1560 yılında yetiştirilmiş olup Jean in ismine itafen tütünde bulunan bir maddeye nicotin ismi verilmiştir. Solunum yoluyla alınması ve keyif verici özelliğinin olması ilgiyi üzerine toplamış bağımlılık yapmasıyla hızla yayılmıştır (Ataman, 2007).

2.2.1 – Sigara dumanı

Sigara dumanında 4000'den fazla kimyasal madde olduğu ve bunların bir kısmının karsinojen olduğu bilinmektedir. Sigara dumanı, gaz ve katran fazı olmak üzere iki fazda incelenir.

Gaz fazında serbest radikaller ve nitrik oksit yüksek oranda bulunurken bu fazdaki radikaller kısa ömürlüdür. Nitrik oksit oksidasyonla nitrojen diokside dönüşür ve nitrojen dioksit organik yapılara karşı daha reaktif bir maddedir. Katran fazı ise nikotin, nitrosamin, vs. içerir (Söylemez vd., 2011).

Sigara dumanındaki gaz ve katran fazı bileşenlerinden bazıları tablo 2.5 de verilmiştir (Söylemez vd., 2011).

Tablo 2.5 Sigara dumanındaki gaz ve katran fazı bileşenlerinden bazıları

Gaz Fazı	Katran Fazı
Karbon monoksit	Partiküler madde
Karbon dioksit	Nikotin
Formaldehit	Fenol
Akrolein	Katekol
Aseton	Anilin
Piridin	2-toluidin
3-vinilpiridin	2-naftilamin
Hidrojen siyanür	Benz (a) antrasen
Azot oksitler	Benzo(a)piren
Amonyak	kinolin
N-nitrosodimetilamin	N-nitrosornikotin
N-nitrosopirolidin	N-nitrosodietanolamin
	Nikel
	Polonyum- 210

İnhalasyonla veya ağız yoluyla alınan nikotinin %5-10' u idrarla atılırken %85-90'ı karaciğerde metabolize olur. Metabolize olmasıyla nikotin oksid ve kotinin olarak bilinen iki ana metabolitine dönüşür (Söylemez vd., 2011).

2.2.1.1 – Katran fazı

Sigara dumanındaki 0.1 µm'den büyük partiküllerin %99.9'unu tutan "standart glass-fiber" filtresinden geçtiğinde filtrede tutulan kısmı katran fazı olarak tanımlanır. Katran fazı, organik bileşikler ile kinon ve polisiklik aromatik hidrokarbon radikalleri gibi stabil radikaller de içerir. Katran fazındaki kinon/hidrokinon radikalleri oksijeni indirgeyerek $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve OH^- oluşumuna yol açarak toksisiteye neden olur (Sohn, Lim, Lim, Lee & Kim, 1993; Lapenna vd., 1995; Janoff, Pryor & Bengali, 1987).

2.2.1.2 – Gaz fazı

Standart glass-fiber filtrenin içinden geçebilen maddeler ise gaz fazını oluşturur. Sigara dumanında katran fazı bileşikleri stabil iken gaz fazı bileşikleri stabil değildir. Yanma sonucu yüksek konsantrasyonlarda karbon ve oksijen kaynaklı serbest radikaller oluşmaktadır. Buna ek olarak azot monoksitte serbest radikal oluşturan bir diğer önemli bileşendir. Azot monoksit daha reaktif olan azot diokside okside olur (Sohn vd., 1993; Bridges, Scott, McNeill, Pringle & Belch, 1992).

2.2.2 – Sigaranın oksidan-antioksidan dengeye etkisi

Sigarada bulunan toksik maddeler organizmadaki pek çok sistemi olumsuz etkilemektedir. Sigara ve dış kaynaklı serbest radikallere ek olarak, oksidatif fosforilasyon, ürik asit metabolizması ve prostoglandin sentezi gibi biyokimyasal olaylar sonucu da serbest radikal üretilmektedir. Bu serbest radikallerden kaynaklı oksidatif stres organizmanın antioksidan sistemi tarafından sürekli olarak giderilmektedir. Oksidan-antioksidan dengenin oksidanların lehine bozulması sonucu oksidatif hasar meydana gelir (Elsayed & Bendich, 2001).

2.2.3 – Sigaranın endokrin sisteme etkisi

Sigara içimine bağlı olarak ortaya çıkan endokrin sistemdeki değişiklikler sigarada bulunan nikotin, kotin ve tiyosiyanatla ilişkilendirilmektedir (Mero vd., 1998). Sigaranın endokrin sistem üzerinde, periferik etkinin yanı sıra gonadotropin salınımının değişmesiyle hipotalamik etkisinden de bahsedilmektedir (Nusbaum, Gordon, Nusbaum, McCarthy & Vasilakis, 2000). Serum testosteron seviyesindeki azalma seksual disfonksiyonla sonuçlanabilmektedir. Bazı çalışmalarda sigara içimine bağlı olarak testosteron seviyesinde içmeyenlere kıyasla azalma olduğu belirtilmiştir (Andersen, Semczuk & Tabor, 1984). Başka bir çalışmada da testosteron seviyesinde azalma ve leyding hücrelerinde hasar olduğu bulunmuştur (Yardimci, Atan, Delibasi, Sunguroglu & Güven, 1997). İnsanlar üzerinde yapılan başka çalışmalarda sertoli ve leydig hücrelerinde sekretuar disfonksiyon olduğu gözlenmiştir (Sofikitis vd., 1995).

Sigara, erkek üreme fonksiyonlarında olumsuz etkiler ortaya çıkarmaktadır. Sigara içenlerde içmeyenlere göre %13-17 oranında sperm konsantrasyonunun da azalma olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Terzioğlu, Yücel & Karatay, 2008).

2.3 – Testis

2.3.1 – Testisin anatomisi

Testis, funiculus spermaticus aracılığıyla skrotum içinde asılı durumda bulunan, yetişkin insanlarda yaklaşık 2,5 cm eninde, 20-30 g ağırlığında ve 4-5 cm uzunluğunda olan, erkek üreme hücrelerinin (sperm) üretildiği bir organdır (Kaya, 2014; Sancak, Cumhur & Vakfı, 2002). Skrotum kıvrımlı bir yapıya sahiptir ve iç yüzü septum skrotum ile iki bölüme ayrılır. Testisler bu bölümlerde bulunur. Organın üst ucu öne ve dışa, alt ucu ise arkaya ve içe doğru bakmaktadır. Testisler skrotum içinde bulunurken karın içi sıcaklığından 2-3°C daha düşük sıcaklıkta bulunurlar. Sıcaklık değişimine bağlı olarak skrotum gevşer veya kasılır. Gevşeme kasılma mekanizması tam olarak açığa kavuşturulamamış olmasının yanında sıcakta gevşeyip sarktığı soğukta ise büzülüp toplandığı bilinmektedir. Bu hareketler musculus cremaster ve musculus dartosun kasılmaları ile gerçekleşir (Kaya, 2014).

Testisler fetal hayatta iken karın boşluğu içinde, fascia transversalis ve periton arasında gelişir, fakat doğum öncesinde, canalis inguinalisten geçerek scrotum içindeki yerini alır (Kaya, 2014; Sancak vd., 2002; Arıncı & Elhan, 2006). Testis skrotum (deri ve tunika dartos), Fasia spermatica eksterna, Fasia kremasterika, Fasia spermatica interna, Tunika vaginalis testis tabakalarından oluşur.

2.3.2 – Testisin histolojisi

Testis, spermatozoon veya spermin sürekli üretilmesi, beslenmesi ve geçici olarak depolanması ile androjenlerin sentez ve salgılanmasından sorumludur.

Testisin etrafı yoğun bağ dokusundan oluşan tunika albuginea adlı kalın bir kapsül ile sarılmıştır. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşır ve mediastinum testisi oluşturur. Bu kısımdan fibröz uzantılar (septum) bezin içine girer ve bezi birbiriyle bağlantılı yaklaşık ikiyüzelli adet piramidal bölmeye ayırır. Her lopçukta gevşek bağ dokusu ile çevrelenmiş 1-4 adet seminifer tübül yer alır. Kan ve lenf damarı, sinirler ve Leydig hücreleri adı verilen interstisyel hücreler bu bağ dokusunda yer alır. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermleri üretirken, interstisyel hücreler (leyding) de testis androjenlerini (erkek üreme hormonları) salgılar (Kaya, 2014; Junqueira & Carneiro, 2009; Demir, 2006).

2.3.2.1 – Seminifer tübüller

Seminifer tübüller belirgin bazal lamina, fibröz bağ dokusu kılıfı ve karmaşık germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Fibröz bağ dokusuna

tunica propria denir. Seminifer tübüller arasındaki  boşluğu kan damarları, lenfatik kanallar veya sinüzoidler, makrofajlar ve androjenleri üreten leydig hücreleri doldurmuştur (Şekil 2.2) (Junqueira & Carneiro, 2009).

2.3.2.2 – Sertoli (destek) hücreleri

Sertoli hücreleri bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzanan prizmatik hücrelerdir. Hücrelerin tabanları bazal lamina üzerine, apikal uğları ise seminifer tübülün lümenine uzanır. Tübüller arası boşluk ile seminifer tübül lümeni arasında köprü görevi yaparlar (Kaya, 2014).

Sertoli hücresinin heterokromatin kitleleri ile ilişkili geniŐ bir çekirdekçiği olduğu için çekirdeği olukludur. Sitoplazmasında granüllü endoplazmik retikulum ve granülsüz endoplazmik retikulum, lizozomlar, mitokondriler, lipid damlacıkları, Golgi kompleksi ve zengin hücre iskeleti bulunur. Bazolateral bölgelerinden komŐu Sertoli hücreleri ile sıkı bağlantıları oluştururlar (Junqueira & Carneiro, 2009; Demir, 2006).

Spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek, sperm hücrelerini immünolojik saldırıdan korumak, seminifer tübülde Spermatojenez için gerekli olan testosteronunun yoęunlaŐmasını sağlayan androjen bağlayıcı proteini (ABP) salgılamak, testosteronu östradiol haline çevirmek,  n hipofizden FSH sentez ve salınmasını düzenleyen inhibin adlı peptidi ve aktivini salgılamak sertoli hücrelerinin iŐlevleri arasındadır (Gartner & Hiatt, 2006).

2.3.2.3 – İnterstisyel alan

İnterstisyum olarak adlandırılan tübüller arasındaki bağ dokusu testis kütlesinin %25-30'unu oluşturur. Burada çeşitli hücreler (leydig hücresi, fibroblast, makrofaj, mast hücresi, lenfosit), kılcal kan ve lenf damarları ile sınırlar bulunur. İnterstisyel alan androjen üretimi açısından önemidir (Junqueira & Carneiro, 2009).

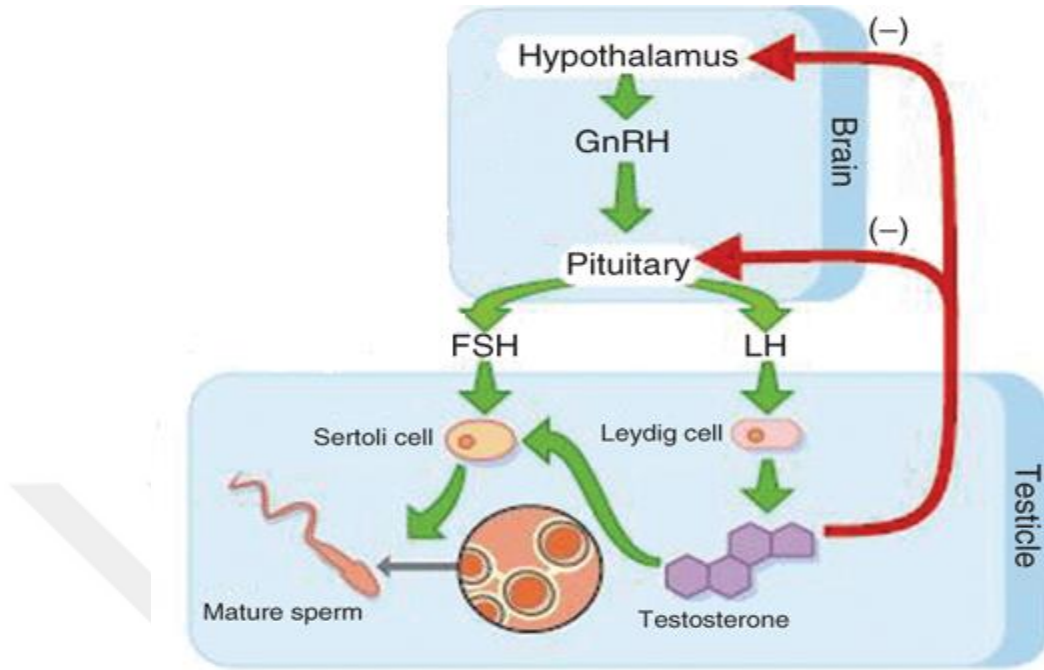
Testosteron hormonu leyding hücreleri tarafından üretilir ve salgılanır. İkinil cinsiyet karakterlerinin geliŐmesinden de leyding hücreleri sorumludur. Bu hücreler testosteron hormonu (testosteronun %95'i leyding hücrelerinde üretir, geri kalan %5'i surrenal kortekste üretilir)  zerinden Spermatojenezi devam ettirir. Leyding hücreleri tek tek veya gruplar halinde kılcal kan damarlarına komŐudurlar. Leydig hücreleri mezenkim kaynaklı stromadan geliŐen, iyi damarlanma gösteren bir iç salgı bezi meydana getirir. Testiste iç salgı iŐlevi bu hücreler tarafından yürütülmektedir. Leydig hücreleri doğum sonrası birkaç hafta dışında,  ocuk testisinde 10 yaŐına kadar bulunmaz. Ergenlik döneminde ise belirgin bir Şekilde artar (Kaya, 2014).

Spermleri rete testise ilerleten ritmik kasılma hareketlerinden sorumlu hücrelere miyoid hücreler denir. Bu hücreler spermleri duktus epididimise ulaştırır ve epididimisi geçtikten sonra spermler hareket etme özelliklerini kazanırlar (Demir, 2006).

Gonadal Hormonlar

Hipotalamustan salgılanan GnRH, ön hipofiz gonadotropinlerinden LH ve FSH salgılanmasını düzenler. Aynı zamanda in vitro yapılan çalışmalar GnRH olmaksızın düzensiz ve düşük miktarda salgılanan LH'nın, GnRH uyarılması ile düzenli ve yüksek miktarda salgılandığını göstermektedir. LH ve FSH üreme sisteminde önemli rolleri olan hormonlardır. Glikoprotein yapısında olan LH, alfa ve beta olmak üzere iki alt birimden oluşur. LH, hedef hücresi olan leyding hücrelerinden testosteron salgılanmasını uyarır. FSH da LH gibi glikoprotein yapıdadır ve iki alt birimden oluşur. FSH'nın görevi ise sertoli hücreleri ve Spermatojenez uymaktır. GnRH seviyesindeki küçük değişimlere LH eşlik ederken FSH o kadar hassas olarak işlik etmez. Bundan dolayı GnRH uyarılmasına FSH LH'dan daha geç cevap verir.

Spermatojenez de endokrin faktörlerin etkisi önemlidir. FSH ve LH testiküler hücreler üzerinden Spermatojenez etkiler. LH leyding hücreleri üzerine etki ederek testosteron yapımını stimüle eder. FSH ise sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını stimüle eder ve sonuçta siklik adozin monofosfat (cAMP)'nin artışına yol açarak androjen bağlayıcı proteinin sentez ve salgılanmasını sağlar (Şekil 2.5). Bu protein testosteronu bağlayarak seminifer tubüllerin lümenine taşır. Spermatojenez, östrojen ve progesteronlarla inhibe edilirken, testosteron ile uyarılır. Spermatozoonlar epididimise, sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilen steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş androjen bağlayıcı proteinler içeren testiküler sıvı içinde taşınırlar (Junqueira & Carneiro, 2009).



Şekil 2.6 Gonadal hormonlar

2.4 – E Vitamini

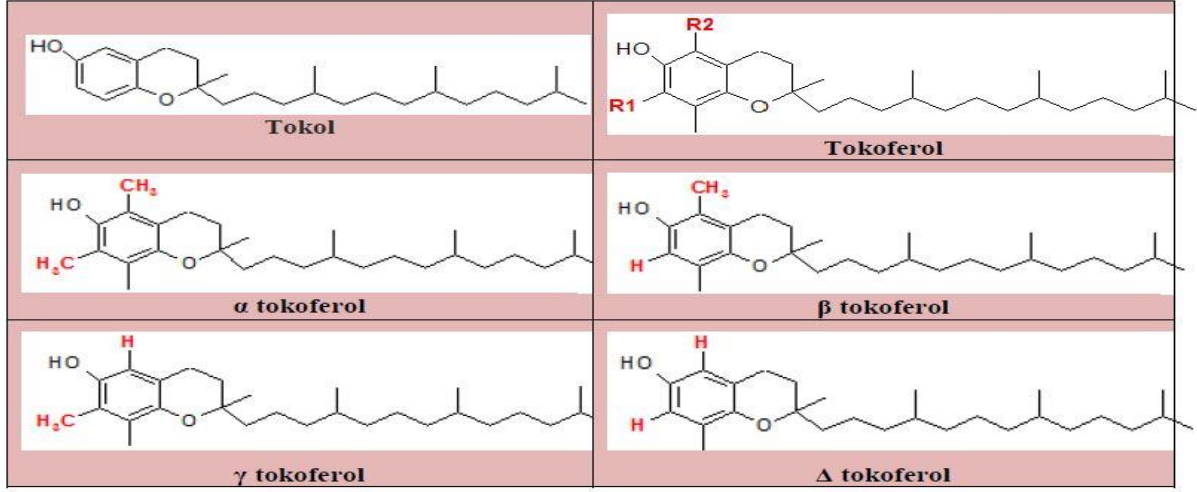
Vitaminler vücutta sentezlenemeyen ve organizmanın canlılığını sürdürmesi için gerekli olan, besinler ile alınan maddelerdir. Yağda çözünen bir vitamin olan E vitamini, vitaminler arasında önemli bir yere sahiptir. E vitamini vücutta birincil olarak yağ dokusunda depolanmakta, buna ek olarak karaciğer, kalp, testis ve uterus gibi organlarda da bulunmaktadır.

1925 yılında EVANS ve BISHOP adındaki bilim insanları farelerin üremeleri için bir maddeden bahsetmişlerdir. Bu madde D vitamininden sonra bulunduğu için alfabetik sıraya göre E vitamini olarak isimlendirilmiştir. 1936 yılında ise EVANS ve arkadaşları bu maddeye "tocopherol" ismini vermişlerdir. Laboratuvar çalışmaları sırasında E vitamini ile beslenmeyen farelerin doğum oranlarının düştüğü görülmüştür. Buradan yola çıkarak tocopherol ismi Yunanca tocos (doğum) ve pherin (ortaya çıkarmak) sözcüklerinden türetilmiştir (Machlin, 1991).

Daha sonraki çalışmalar ile E vitamininin sadece üreme değil aynı zamanda organizmanın devamlılığı ve hücresel boyuttaki hasarların onarılması gibi pek çok konuda önemli bir madde olduğu ortaya konulmuştur.

E vitamini diğer ismiyle tokoferoller bir grup maddeye verilen ortak isimdir. Bu maddeler kroman halkasına bağlı hidrokarbondan oluşurlar. Bu kroman halkasındaki benzen üzerinde proton veya metil gruplarının farklı

olmasına göre -alfa-, -beta-, -gama-, -delta- olarak isimlendirilirler (Şekil 2.3).



Şekil 2.7 Tokoferoller

Tokoferollerin en büyük özelliği optikçe aktif olmalarıdır. Optikçe aktiflik polarize ışığın düzlemde sağa veya sola çevrilmesini belirtir. Kroman halkasındaki proton ve metil gruplarının sayısına göre aktiviteleri değişmektedir. En yüksek aktiviteye sahip tokoferol üyesi alfa-tokoferoldür ve vücut tarafından da yüksek miktarda absorbe edilmektedir (Friedrich, 1987).

E vitamini bitkisel ve hayvansal kaynaklı özellikle fazla miktarda yağ içeren besinlerde bulunur. Soya fasulyesi, ayçiçeği çekirdeği, yerfıstığı, badem gibi besinler en zengin E vitamini kaynaklarıdır (Tablo 2.6) (Balcı, 1995).

Tablo 2.6 Besin kaynaklarında E vitamini miktarı

Besin	α -tokoferol (mg/100 g)	Besin	α -tokoferol (mg/100 g)	Besin	α -tokoferol (mg/100 g)
Zeytinyağı	12,0	Margarin	10,2	Domates	0,9
Ayçiçeği yağı	55,8	Tahıl	45,0	Havuç	0,6
Fındık	26,0	Fasulye	9,0	Keçi sütü	0,1
Yerfıstığı	9,0	Mısır	2,0		

2.4.1 -E vitamini ve serbest radikaller

Yağlı bitkiler E vitamini bakımından zengindir ve buradaki E vitamininin asıl görevi bitkilerdeki yağları oksidatif hasardan korumaktır. E vitamininin bu

özelliği insan vücudu için düşünöldüğünde, yağda çözünen bir vitamin olmasından dolayı incebağırsak tarafından kolayca absorbe edilerek tüm dokulara kolayca taşınır. Burada E vitamini hücrelerin çevresinde koruyucu bir tabaka oluşturur. Sağlıklı bir hücrede hücre zarı hücreye girip çıkan maddeler için bir denetim noktasıdır. Hücre zarında meydana gelebilecek hasar hücreye zararlı maddelerin girişinden hücre ölümüne kadar pek çok sonuç ortaya çıkarabilir. E vitamini yağda çözünen bir vitamin olduğu için hücre zarında bulunan biyomoleküllerin arasına girerek koruyucu bir katman oluşturur. Sanayi atıkları, ozon tabakasının hasar görmesi sonucu artan Ultra viyole (UV) ışınları, hava kirliliği ve sigara dumanı hücre zarında meydana gelen oksidatif hasarların temel nedenlerinden bazılarıdır. Bu etkenler sonucunda oluşın serbest radikallere bağlı hasarlar ileri seviye sonuçlar ortaya çıkarabilir (Balcı, 1995).

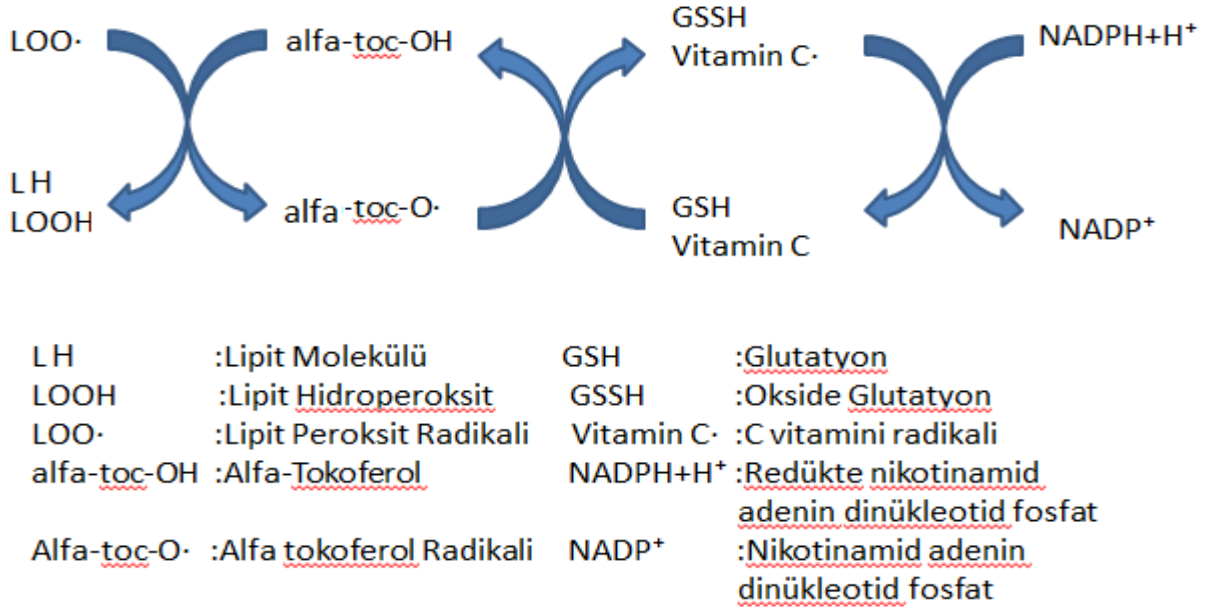
Antioksidan olan E vitamini, hücre zarında bulunan ve radikallerin ana hedefi olan doymamış yağ asitlerini koruyarak oksidatif hasarın önüne geçer. E vitamini bunlara ek olarak yapısında SH- grupları içeren enzimleri ve A vitamini gibi oksidasyona hassas maddeleri de korumaktadır. E vitamininin hücre zarını korumanın yanı sıra hücre zarını stabilize ederek zar geçirgenliğinde de önemli bir role sahiptir.

2.4.2 – Antioksidan bir madde “E vitamini”

Oksijen canlı yaşamında olmazsa olmaz bir yere sahiptir ve canlı organizmalarında yer aldığı gibi vücut fonksiyonlarının gerçekleşmesinde de önemli bir maddedir. Oksijen azlığında canlı ölümle karşı karşıya kaldığı gibi yüksek doz oksijen varlığı da canlılık için zararlıdır. Çünkü organizmada bulunan reaktif serbest radikallerin çoğunluğu oksijen kaynaklıdır. Bunlara örnek O_2^- , O_2^{2-} , OH^- verilebilir.

E vitamini yağda çözünen bir antioksidandır. E vitaminin doğadaki görevi bulunduğu yağlı bitkilerin dış etkenlere karşı bozulmasını engellemektir. Aynı şekilde vücutta da hücre zarının yapısında bulunan lipitleri veya lipit içeren molekülleri koruyarak reaktif serbest radikallerden hücreyi korumada görevlidir. UV, radyasyon gibi etkilerle oluşın serbest lipit radikalleri oksijenle reaksiyona girmesi sonucu reaktif lipitperoksit oluşur. Oluşın reaktif lipitperoksit radikali zincirleme reaksiyonla lipit ve lipoproteinleri hasara uğratar. E vitamini reaktif lipitperoksitle reaksiyona girerek daha stabil ve lipitlerle reaksiyona girmeyen tokoferol radikalleri ve lipit hidroperoksiti oluşturur. Oluşın tokoferol radikalleri yapısından dolayı reaktivitesi az olduğu için zincirleme reaksiyon durdurulmuş olur. Bu tokoferol radikali de ortamda bulunan C vitamini veya GSH-Px enzimi ile reaksiyona girerek rejenere olur. Burada oluşın C vitamini veya glutatyon

peroksidaz radikali de NADPH sistemi ile rejenere olur (Şekil 2.4) (Balcı, 1995).



Şekil 2.8 Antioksidanların etkileşimleri

E, C ve beta karoten (provitamin A) antioksidan özelliğe sahip olan vitaminlerdendir. C vitamini, E vitamininin antioksidan özelliğini artırıcı özellik gösterebilir (Schmidt, 1992; Niki, Noguchi, Tsuchihashi & Gotoh, 1995).

Sigaranın ve sigara dumanının da bulunan zararlı bileşenlerin insan sağlığını (aktif-pasif içici) olumsuz etkilediği bilinen bir gerçektir. Sigaranın yanı sıra endüstri ve enerji santralleri baca gazları, çöplerin yanmasından doğan gazlar, egzoz gazları ve evlerde kullanılan kömürlerden kaynaklı gazlar her geçen gün havayı daha fazla kirletmektedir. Bu gazların içerdiği zararlı maddeleri; kükürtdioksit, karbondioksit, karbonmonoksit, kuvvetli oksidasyon karaktere sahip ozon ve azot oksit içeren sis olarak sayabiliriz (Balcı, 1995).

2.5 – Nitrik Oksit

Furchgott ve Zawadzki, endotel hücrelerinden asetil kolin aracılığıyla bir maddenin salındığını ve bu maddenin düz kas hücrelerine geçerek vazodilatasyonda etkili olduğunu 1980 yılında açıklamışlardır. İlk başta bu madde için endotel kaynaklı gevsetici faktör (EDRF) adını vermişlerse de Furchgott 1987 yılında yaptığı çalışma ile bu maddenin NO olabileceğini öne sürmüştür. Palmer vd. ile Ignarro vd. tarafından aynı yıl yapılan çalışmalarda

ise bu maddenin NO olduğu kanıtlanmıştır (Güray, Samancı, Ovalı & Dağoğlu, 1997; Altug, Demiryürek & Kanzık, 1998).

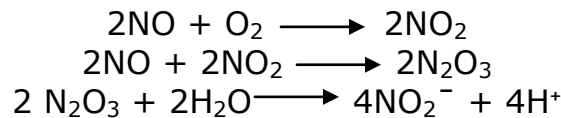
EDRF olarak bilinen maddenin aslında NO olduğunun kanıtlanmasıyla birlikte bu konu üzerinde ki çalışmalar da hız kazanmıştır. Fizyolojik ve patofizyolojik olarak araştırılması ve elde edilen zengin bilgiler ışığında NO 1992'de yılın molekülü seçilmiştir (Aladağ, Türköz & Özerol, 2000).

Atmosfer gazlarından biri olarak NO, soluduğumuz havanın yanı sıra egzoz gazında, kirli havalarda ve sigara dumanında da yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Canlı vücudunda endojen ve ekzojen kaynaklı uyarılarla salgılanan NO önemli bir yere sahiptir. NO salgılanmasını uyaran etkenler arasında asetilkolin, Adenozin Difosfat (ADP), Adenozin Trifosfat (ATP), anjiotensin II, noradrenalin, araşidonik asit, histamin, bradikinin, serotonin, endotelin, trombin, vazopressin sayılabilir. NO'in yarı ömrünün kısa olması ve saniyeler içinde inaktive olmasından dolayı etkisi lokalizedir. Bu etkilerinden bazıları vasodilatatör, venodilatatör, antiagregan, hücre koruyucu, nörotransmitter, nöromodülatör, immün modülatör olarak sayılabilir (Gürdal & Ademoğlu, 2005; Onat, Emerk & Sözmen, 2002).

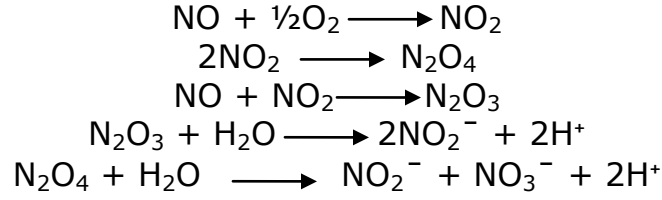
NO, hemen hemen her organ için fonksiyonel ve metabolik süreçlerin önemli bir biyolojik başlatıcısıdır. Bu gaz halindeki NO hücre içi Siklik Guanozin Monofosfat (cGMP) düzeylerini ve cGMP-bağımlı protein kinazı arttıran guanilat siklaz (GC)'i aktive ederek endotel fonksiyonu, nörotransmisyonu, bağışıklığı ve hücre ölümünü modüle eder. NO ve cGMP'nin yükselmesi birçok patofizyolojik süreçle ilişkilendirilmiştir (Lerner, 2015).

Lipofilik özellikteki NO, oksijensiz ortamda stabildir. Düşük derişimlerde oksijenli ortamlarda bile stabilitesini koruyabilmektedir. Önemli fizyolojik süreçlerde etkili olan NO'in düşük derişimleri toksik özellik göstermezken, gereğinden fazla olması sonucu, NO vücut için pozitif etki olmaktan çıkıp istenmeyen hasarların doğmasına neden olmaktadır (Güray, Samancı, Ovalı & Dağoğlu, 1997; Çekmen, Turgut, Türköz, Aygün & Gözükara, 2001).

Dokudaki yarı ömrü 10-60 saniye olan NO oluştuktan sonra oksijenle birleşerek, redoks reaksiyonlar ile çeşitli nitrojen oksitleri oluştururlar (Tunçtan & Abacıoğlu, 1998).

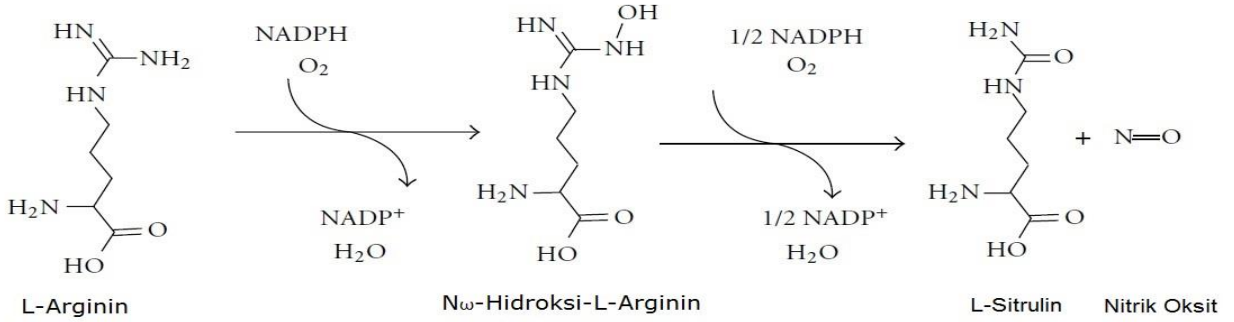


NO fizyolojik koşullarda anyonik ürünleri olan nitrite ve nitrate okside olur (Tunçtan & Abacıoğlu, 1998).



2.5.1 – NO sentezi

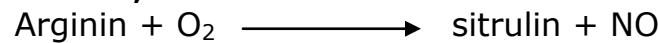
Düz kas, endotel hücresi ve birçok memeli hücresinde NO sentezi, L-Arginin aminoasidindeki guanido nitrojeninin nitrik oksit sentaz enziminin katalizörlüğünde oksitlenmesi sonucu gerçekleşir (Atallk & Dogan, 1997). Bu sentez de moleküler oksijen ile kofaktör olarak, redükte NADPH, flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidrobiyopterin (BH₄)'e gereksinim vardır (Şekil 2.5) (Muriel, 2000; Raccah, Fabreguettes, Azulay & Vague, 1996; Aladağ vd., 2000).



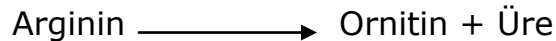
Şekil 2.9 Nitrik oksit sentezi

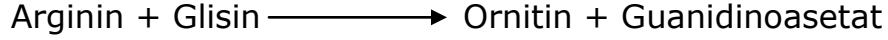
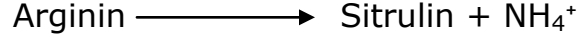
Substrat olarak Arginin kullanan enzimlerin başında nitrik oksit sentaz gelmektedir. Bunun yanı sıra arginaz, arginin:glisin aminotransferaz, arginin dekarboksilaz, arginin deiminaz gibi enzimler de substrat olarak arginin kullanmaktadır (Utagawa, 2004).

Nitrik oksit sentaz;



Arginaz;



Arginin:Glisin aminotransferaz;**Arginin dekarboksilaz;****Arginin deiminaz;****2.5.2 – Nitrik oksit sentaz (NOS)**

NO oluşum tepkimesini katalizleyen NOS'ın üç izoformu vardır. Bunlar; indüklenebilir NOS (iNOS), endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS)'dır. Literatürde eNOS ve nNOS'a beraber yapısal NOS (cNOS) da denilmektedir. Kalsiyuma bağımlı olan eNOS ve nNOS az miktarda sentezlenirken, makrofajlar, miyositler, düz kas hücreleri ve hepatositlerde bulunan iNOS belirli sitokinlerin uyarısıyla NO üretmektedir (Tablo 2.7) (Gürdal & Ademoğlu, 2005; Onat vd., 2002).

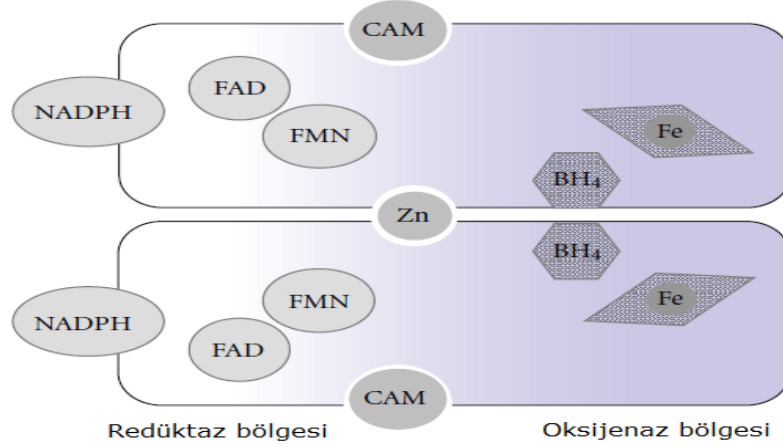
NOS izoenzimleri aynı substratı katalize ederler, prostetik gruplar ve koenzimleri bakımından ortak özellik gösterirler. cNOS'un aktivitesi kalsiyum/kalmodulin (Ca^{2+} /CAM) bağımlıdır. Kalmodulin iNOS izoformunun bir alt birimi olduğundan enzimin aktivitesi Ca^{2+} 'ya bağımlı değildir (Kılınç & Kılınç, 2003).

Tablo 2.7 NOS izoformları arasındaki farklar

Özellik	Yapısal NOS	İndüklenebilir NOS
Buldukları hücreler	Endotel, nöron	Makrofaj, kuffer hücresi, monosit, damar düz kası
Salgılanma miktarı	Az miktarda (pmol)	Çok miktarda (nmol)
Salgılanma süresi	Kısa süreli salgılanır.	Uzun süreli salgılanır.
Aktivasyonu	Kalsiyuma bağımlıdır.	Kalsiyumdan bağımsızdır.

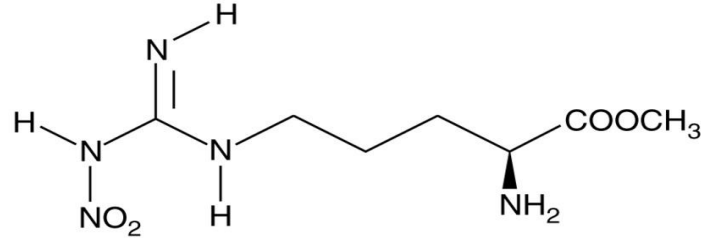
Yapısal NOS izoformlarının dimer şemasına baktığımızda her bir altbirim BH_4 ve oksijenaz alanının aktif yerine yakın bir şekilde hem içerir. Redüktaz bölgesi, NADPH bağlanma sahasının yanı sıra iki elektron aktarım kofaktörlerini (FAD ve FMN) barındırır. Arayüze bağlı olan çinko

dimerizasyona aracılık eder. Calmodulin (CAM) bağları aktiviteyi düzenler (Şekil 2.6). Yapısal NOS izoformları Ca^{2+} /CAM bağımlı olduklarından intrasesüer Ca^{2+} düzeyini yükselten agonistlerle aktive olurlar. Ca^{2+} 'nın yükselmesi calmodulinin NOS'a bağlanmasını uyarır ve NO sentezlenir (Lerner, 2015; Atallk & Dogan, 1997).



Şekil 2.10 Yapısal NOS dimer şeması

iNOS izoformu ise endotoksin ve sitokinlerle indüklenerek kısa sürede yüksek miktarda NO üreten Ca^{2+} 'dan bağımsız bir sistemdir. L-Argininden NO oluşumu L-NAME (Şekil 2.7) gibi L-Arginin türevi bileşiklerle kompetitif olarak inhibe edilir (Atallk & Dogan, 1997).



Şekil 2.11 N-nitro-L-arginin-metil ester (L-NAME)

2.5.3 – Nitrik oksit sentaz ve L-NAME

L-Argininden NO oluşum reaksiyonu üzerinde çalışmalar devam ederken L-Arginin analoglarının bu reaksiyonu inhibe ettiği görülmüştür. İlk NOS inhibitörü ise N-monometil-L-arjinindir (L-NMMA veya diğer adıyla LNMA; N-metil-L-arjinin). L-Argininin yapısına çeşitli gruplar eklenerek değişik NOS inhibitörleri geliştirilmiştir. Bunların başta gelenleri N-amino-L-arjinin (LNAA), L-NAME ve N-iminoetil-l-ornitin (L-NIO) sayılmaktadır. Bu analoglarından L-NIO sadece yapısal izoformlara etki ederken (eNOS, nNOS), L-NNA, L-NA, L-NMMA ve L-NAME tüm izoformlara etki etmektedir. L-NIO en

güçlü inhibisyon etkisine sahiptir ve bu geri dönüşümsüzdür (Moncada, Palmer & Higgs, 1991; Köse, 2006).

2.5.4 – Nitrik oksitin etki mekanizması

Yapısal NOS izoformları fizyolojik ortamda genellikle endojen ve ekzojen etkilere maruz kalmadan NO sentezinden sorumludur. Yapısal izoformlar ile üretilen NO, demir-sülfür merkezleri içeren enzimlerle, hem grubu içeren miyogloblin, hemogloblin ve siklik guanilat siklaz (sGC) enziminin hem prostetik grubuyla etkileşebilir. Hedef hücreye difüzyonla ulaşan NO, sGC enziminin hem prostetik grubuna bağlanarak aktivite göstermektedir. Aktive olan enzim ile cGMP üretimi artar böylece NO aracılığıyla hedef hücredeki mekanizmalar harekete geçirilmiş olur. cGMP düzeyinin artışı ile genellikle hücre içi kalsiyum konsantrasyonu düşer ve cGMP bağımlı protein kinazlar aktive olur. Bu sayede düz kasların gevşemesi, trombosit tutunması ve kümeleşmesi, polimorf çekirdekli lökosit kemotaksisini durdurucu etkiler oluşur. Fosfodiester aracılığıyla cGMP, guanozin monofosfat (GMP)'a dönüşür ve inaktif olur (Bruhwyler, Chleide, Liégeois & Carreer, 1994; Moncada vd., 1991; Cooke & Dzau, 1997).

Patolojik durumlarda ise NO sentezinden iNOS izoformu görevlidir. Aynı NO sentezlenmesine rağmen sentez süresi ve miktarı farklılık gösterir. Burada sentezlenen NO, solunum zincirinde ve nükleik asit zincirinde görev alan bazı enzimleri inhibe ederek hücrelerin ölümüne neden olur. Patolojik durumlarda NO hem demirine bağlanma (Oksido redüktazların, (NADP) ubikinonun, süksinat ubikinonun inhibisyonu), demir-sülfür merkezine bağlanma (cisakonitaz, ribonükleotid redüktaz inhibisyonu), ADP ribozilasyonunun inhibisyonu yapma ve radikallere bağlanma (süperoksit radikale bağlanıp peroksinitrit radikali oluşturma) şeklindeki bazı inhibisyonlarda etkilidir (Cooke & Dzau, 1997).

NO sentezinin arttığı durumlarda sentezi azaltmak yaşamsal olaylar açısından önem arz eder. NO miktarının azaltılması L-arjinin analoglarının (L-NAME, NARG, L-NMMA) substrat taklit edici özellik göstermesi ile sağlanır ve NO sentezini kompetatif inhibisyonla engellenir (Gürdal & Ademoğlu, 2005; Cooke & Dzau, 1997).

3- GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 – Gereç

3.1.1 – Deney hayvanları

Deneyde kullanılan hayvanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (TICAM) temin edildi. Deney hayvanları deney süresince 12;12 aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nemi (%45- 50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda barındırıldı. Deney sürecinde tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendi. Deneysel aşamada 250-300 gram ağırlığında 45 adet Wistar cinsi, erkek albino sıçan kullanıldı. Çalışma için gerekli etik kurul raporu ESOĞÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)'ndan alındı.

3.1.2 – Doz ve deney grupları

Sigara dumanının uygulanması

Deneyimizde sigara dumanı inhalasyon yoluyla hayvanlara deney süresince uygulandı. Sigara dumanı, 20x15x10 cm ebatındaki kafeste oluşturulduktan sonra saatte 500 Litre hava pompalayan bir motor ile sıçanların bulunduğu bölmeye bir boru vasıtasıyla aktarıldı. İlgili yönetmelikte 200-300 gr arası sıçanlar için minimum barınma kafesi ebatına istinaden deneyde kullanılacak olan kafes ebatı 60x40x20 cm olacak şekilde belirlendi. Kafesler kendi içinde dört bölmeye ayrıldı. Her uygulamada sigara dumanının aktarıldığı kafese 4 sıçan konuldu. Duman kafesine yandan, sıçan kafesine üstten havalandırma delikleri açıldı. Sıçanlara içirilecek sigara olarak Marlboro Red (Philip Morris) seçildi. Zifir: 10mg, nikotin:0.8mg, CO:10mg vs. olması ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2012 raporunda en fazla tüketilen sigara olması sebebiyle bu sigara tercih edilmiştir (Bilir, Özcebe, Ergüder & Mauer-Stender, 2012). Sigara dumanı oluşturulurken aktif ve pasif içiciler göz önüne alınarak katran ve gaz fazındaki bileşiklere tam maruziyet oluşması açısından sigaraların filitreleri çıkarılmıştır.

L-NAME'nin uygulanması

Deneyimizde L-NAME (Sigma) 50 mg/kg/BW dozda %0.9 izotonik NaCl'de çözülerek intraperitoneal (i.p.) olarak altı hafta boyunca her gün enjekte edildi (Yargıçoğlu vd., 2004).

Vitamin E uygulanması

Deneyimizde E Vitamini (Sigma) 200 mg/kg/BW dozda zeytinyağı içinde çözülerek i.p. olarak altı hafta boyunca her gün enjekte edildi (Kaya, 2014).

Deney grupları tablo 3.1 'deki şekilde oluşturuldu.

Tablo 3.1 Deney grupları

Gruplar	Grup İsimleri	Yapılan İşlemler	Hayvan Sayısı
Grup 1	Kontrol (K)	Üzerinde herhangi bir işlem yapılmadı.	9
Grup 2	Sigara Dumanı (S)	Bir sıçan için iki kalem sigara olacak şekilde yarım saatlik iki periyot halinde sigara dumanına maruz bırakıldı.	9
Grup 3	Sigara Dumanı + E Vitamini (S-E)	Bir sıçan için iki kalem sigara olacak şekilde yarım saatlik iki periyot halinde sigara dumanına maruz bırakıldı ve i.p. olarak 200 mg/kg/BW E vitamini (α - tokoferol) enjekte edildi.	9
Grup 4	Sigara Dumanı + L-NAME (S-L)	Bir sıçan için iki kalem sigara olacak şekilde yarım saatlik iki periyot halinde sigara dumanına maruz bırakıldı ve i.p. olarak 50 mg/kg/BW L-NAME enjekte edildi.	9
Grup 5	Sigara Dumanı + E Vitamini + L-NAME (S-E-L)	Bir sıçan için iki kalem sigara olacak şekilde yarım saatlik iki periyot halinde sigara dumanına maruz bırakıldı ve i.p. olarak 200 mg/kg/BW E vitamini (α - tokoferol) ve 50 mg/kg/BW L-NAME enjekte edildi.	9

3.1.3 – Deney hayvanlarından örneklerin alınması

Deney planına göre yapılan son enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlar anestezi maddeleriyle (ketamin ve ksilazin) uyutuldu ve eksanguinasyon (kanatma veya yüksek miktarda kan alma) yöntemiyle sakrifiye edildi. Sıçanların testisleri cerrahi yöntemlerle alındı. Alınan testis dokusu soğuk serumda (%9 NaCl) perfüze edildi; testisin birisi biyokimyasal parametrelerin ölçülmesinde (CAT, MDA, MPO, NO, GSH) kullanılırken, diğer testis dokusu histolojik incelemelerde kullanıldı. Histolojik inceleme için alınan testis örnekleri deney hayvanlarından alınır alınmaz otoliz olmaması için daha önceden hazırlanmış Bouin fiksatifine içine alındı. Hayvanlardan kardiyak yolla alınan kan örnekleri etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)'li tüplere konuldu ve 1200xg'de 10 dk santrifüj edildi. Serumda FSH, LH ve testosteron hormon düzeyleri ölçüldü.

3.1.4 – Kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar

Kimyasal maddeler

- CuSO₄ (Sigma)
- ZnSO₄ (Merck)
- NaOH (Merck)
- H₂SO₄ (Merck)
- KNO₃ (Merck)
- Na₂B₄O₇ (Merck)
- Glisin (Merck)
- Sülfanilamid (Alfa easer)
- Naftiletildiamin (Sigma)
- Kadmiyum granülleri (Fluka)
- Na-K Tartarat (Sigma)
- SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (Merck)
- TBA (Thiobarbitirik asit) (Sigma)
- Asetik Asit (Merck)
- KCl (Merck)
- Tris (Sigma)
- EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) (Merck)
- HCl (Sigma)
- H₂O₂ (Merck)
- K₂HPO₄ (Merck)
- KH₂PO₄ (Merck)
- HETAP (Hekzadesiltrimetilamonyum bromid) (Sigma)
- TMB (3,3'-5,5'-tetrametilbenzidin) (Sigma)
- Metafosforik asit (Merck)
- NaCl (Merck)

- Trisodyum sitrat (Merck)
- 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) (Sigma)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- Glutasyon (Sigma)
- E Vitamini (α -tokoferol)(Sigma)
- L-NAME (N-nitro-L-arjinin-metil ester) (Sigma)
- T (Testosterone) ELISA Kit (Elabscience)
- Rat FSH (Follicle Stimulating Hormone) ELISA Kit (Elabscience)
- Rat LH (Luteinizing Hormone) ELISA Kit (Elabscience)

Cihazlar

- Hassas terazi (Sartorius BP121S)
- pH Metre (HANNA pH211)
- Vorteks (WiseMix VM-10, WISD)
- Derin Dondurucu -80°C (Thermo, ULT 1386-5-V40)
- Su banyosu (Nüve BM402)
- Santrifüj (Nüve NF800)
- Soğutmalı santrifüj (Jouan MR22)
- Spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601)
- Shaker (WiseMax)
- Manyetik Karıştırıcı (Labinco Hotplate Magnetic Stirrer)
- Homojenizatör (Janke & Kunkel, Ultra-Turrax T25)
- Mikropleyt okuyucu (PerkinElmer2030 Multilabel reader, Victor X3)
- Mikropleyt yıkayıcı (BioTek ELx50)
- Plastik ve cam tüpler
- Buzdolabı
- Otomatik pipetler
- Enjektörler
- Operasyon takımı

3.2 – Yöntemler

3.2.1 – Serum testosteron, FSH ve LH düzeylerinin ölçümü

3.2.1.1 Testosteron düzeyinin ölçümü

Serumda testosteron düzeyleri ölçümü (Elabscience E-EL-0072) T(Testosteron) enzim bağlı immünosorbent analizi (ELISA) Kiti kullanılarak yapılmıştır. Bu ELISA kitinde yöntem olarak Yarışmalı-ELISA kullanılmaktadır. Kit içeriği tablo 3.2 de verilmiştir.

Kit içeriği

Tablo 3.2 Testosteron ELISA kit içeriği

Madde	Özellik	Depolama
Micro ELISA Plate (Sökülebilir)	8 kuyu X 12	4 °C
Referans Standart (6 tüp)	0.5 ml / tüp*	4 °C
Testosteron Antikor(Ab) belirteci	1 şişe / 6 ml	4 °C
HRP-etiketli Testosteron	1 şişe / 6 ml	4 °C
Konsantre yıkama tamponu (20X)	1 şişe / 15 ml	4 °C
Substrat belirteci A	1 şişe / 7 ml	4 °C
Substrat belirteci B	1 şişe / 7 ml	4 °C
Durdurma solüsyonu	1 şişe / 7 ml	4 °C
Plaka yapıştırıcı	5 parça	
Ürün belgesi	1 kopya	
Analiz sertifikası	1 kopya	

*: 0 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.4 ng/ml, 1.6 ng/ml, 5 ng/ml, 20 ng/ml standart konsantrasyonlarda

Ölçüm prosedürü

Tüm belirteçler ve örnekler kullanmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Pipetleme yapmadan önce tüm belirteçler usulca girdap yapılarak tamamen karıştırıldı ve köpüklenme olmasından kaçınıldı. Konsantre yıkama tamponu 1:20 oranında dilüe edildi.

- Pleytlerin önceden kaplanmış kapakları çıkarıldı. Blank kuyusu ayrıldı, herhangi bir madde eklenmedi. Her bir standart kuyusuna 50 µl uygun standartdan, diğer kuyulara da 50 µl örnekden eklendi.
- Blank kuyusu hariç tüm kuyulara hızlı bir şekilde 50 µl HRP-etiketli Testosterondan eklendi. Ayrıca tüm kuyulara 50 µl Testosteron Ab belirteci eklendi. Testosteron Ab belirteci ile HRP-etiketli Testosteron aynı anda eklenmelidir. 37 °C de 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında tüm kuyular 350 µl yıkama çözeltilisi ile üç defa aspire edildi.
- Substrat belirteci A ile substrat belirteci B 1:1 oranında karıştırıldı. Karışım çözeltilisinden 100 µl tüm kuyulara eklendi. 37 °C de 15 dakika inkübe edildi. Reaksiyon süresi renk değişimine bağlı olarak uzayabilir veya kısalabilir ancak 30 dakikayı geçmeyecektir.
- Durdurma solüsyonundan tüm kuyulara 50 µl eklendi. Hızlı bir şekilde sarıya renk değişimi oldu.
- 450 nm dalga boyunda tüm kuyuların ölçümü yapılarak sonuçlar ng/ml cinsinden verildi.

3.2.1.2 Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) düzeyinin ölçümü

Serumda FSH düzeyleri ölçümü (Elabscience E-EL-R0391) Rat FSH ELISA Kiti kullanılarak yapılmıştır. Bu ELISA kitinde yöntem olarak Sandwich-ELISA kullanılmaktadır. Kit içeriği tablo 3.3 de verilmiştir.

Kit içeriği

Tablo 3.3 FSH ELISA kit içeriği

Madde	Özellik	Depolama
Micro ELISA Plate (Sökülebilir)	8 kuyu X 12	4 °C/-20°C*
Referans Standart	2 şişe	4 °C/-20°C*
Referans Standart & Numune Dilüenti	1 şişe 20 ml	4 °C
Konsantre Biotinlenmiş Ab Belirteci	1 şişe 120 µl	4 °C/-20°C*
Biotinlenmiş Ab Belirteç Dilüenti	1 şişe 10 ml	4 °C
Konsantre HRP Konjugatı	1 şişe 120 µl	4 °C
HRP konjugat Dilüenti	1 şişe 10 ml	4 °C
Konsantre Yıkama Tamponu (25X)	1 şişe 30 ml	4 °C
Substrat Belirteci	1 şişe 10 ml	4 °C
Durdurma Solüsyonu	1 şişe 10 ml	4 °C
Plaka yapıştırıcı	5 parça	
Ürün belgesi	1 kopya	
Analiz sertifikası	1 kopya	
El kitabı	1 kopya	

*: Kit 30 gün içinde kullanılacaksa 4 °C de, daha uzun süre saklanacaksa -20°C de tutulmalıdır.

Ölçüm prosedürü

Tüm belirteçler ve örnekler kullanmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Analizden önce numuneler santrifüj edildi. Pipetleme yapmadan önce tüm belirteçler usulca girdap yapılarak tamamen karıştırıldı ve köpüklenme olmasından kaçınıldı. Konsantre yıkama tamponu 1:25 oranında, Konsantre Biotinlenmiş Ab belirteci 1:100 oranında, Konsantre HRP Konjugatı 1:100 oranında ve referans standardı farklı konsantrasyonlarda, kullanmadan 15 dk önce dilüe edildi.

- Blank kuyusuna Referans Standart & Numune Dilüentinden, standart kuyularına dilüe edilmiş standartlardan ve örnek kuyularına örneklerden 100 µl eklendi. 37 °C' de 90 dakika inkübe edildi.

- Yıkama işlemi yapılmaksızın aspire edildikten sonra hızlı bir şekilde her bir kuyuya 100 µl Biotinlenmiş Ab belirteci çalışma solüsyonundan eklendi. 37 °C' de 60 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında tüm kuyular 350 µl yıkama tamponu ile üç defa aspire edildi.
- Aspire işleminden sonra tüm kuyulara 100 µl HRP konjugatı çalışma solüsyonundan eklendi ve 37 °C' de 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında tüm kuyular 350 µl yıkama tamponu ile beş defa aspire edildi.
- Aspire işleminden sonra tüm kuyulara 90 µl Substrat Belirtecinden eklendi ve 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi.
- Tüm kuyulara 50 µl durdurma solüsyonundan eklendi ve hızlı bir şekilde sarıya renk değişimi oldu.
- 450 nm dalga boyunda tüm kuyuların ölçümü yapılarak sonuçlar ng/ml cinsinden verildi.

3.2.1.3 Lüteinleştirici Hormon (LH) düzeyinin ölçümü

Serumda LH düzeyleri ölçümü (E-EL-R0391, Elabscience) Rat LH ELISA Kiti kullanılarak yapılmıştır. Bu ELISA kitinde yöntem olarak Sandwich-ELISA kullanılmaktadır. Kit içeriği tablo 3.4 de verilmiştir.

Kit içeriği

Tablo 3.4 LH ELISA Kit içeriği

Madde	Özellik	Depolama
Micro ELISA Plate (Sökülebilir)	8 kuyu X 12	4 °C/-20°C*
Referans Standart	2 şişe	4 °C/-20°C*
Referans Standart & Numune Dilüenti	1 şişe 20 ml	4 °C
Konsantre Biotinlenmiş Ab Belirteci	1 şişe 120 µl	4 °C/-20°C*
Biotinlenmiş Ab Belirteç Dilüenti	1 şişe 10 ml	4 °C
Konsantre HRP Konjugatı	1 şişe 120 µl	4 °C
HRP konjugat Dilüenti	1 şişe 10 ml	4 °C
Konsantre Yıkama Tamponu (25X)	1 şişe 30 ml	4 °C
Substrat Belirteci	1 şişe 10 ml	4 °C
Durdurma Solüsyonu	1 şişe 10 ml	4 °C
Plaka yapıştırıcı	5 parça	
Analiz sertifikası	1 kopya	
El kitabı	1 kopya	

*: Kit 30 gün içinde kullanılacaksa 4 °C de, daha uzun süre saklanacaksa -20°C de tutulmalıdır.

Ölçüm prosedürü

Tüm belirteçler ve örnekler kullanmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Analizden önce numuneler santrifüj edildi. Pipetleme yapmadan önce tüm belirteçler usulca girdap yapılarak tamamen karıştırıldı ve köpüklenme olmasından kaçınıldı. Konsantre yıkama tamponu 1:25 oranında, Konsantre Biotinlenmiş Ab belirteci 1:100 oranında, Konsantre HRP Konjugatı 1:100 oranında ve referans standardı farklı konsantrasyonlarda, kullanmadan 15 dk önce dilüe edildi.

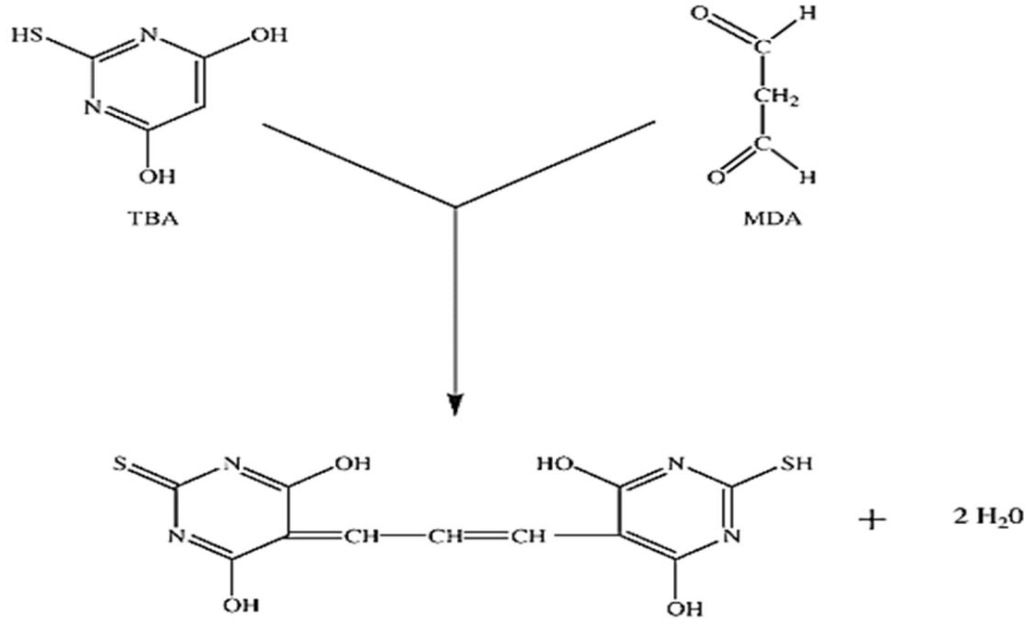
- Blank kuyusuna Referans Standart & Numune Dilüentinden, standart kuyularına dilüe edilmiş standartlardan ve örnek kuyularına örneklerden 100 µl eklendi. 37 °C' de 90 dakika inkübe edildi.
- Yıkama işlemi yapılmaksızın aspire edildikten sonra hızlı bir şekilde her bir kuyuya 100 µl Biotinlenmiş Ab belirteci çalışma solüsyonundan eklendi. 37 °C' de 60 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında tüm kuyular 350 µl yıkama çözeltisi ile üç defa aspire edildi.
- Aspire işleminden sonra tüm kuyulara 100 µl HRP konjugatı çalışma solüsyonundan eklendi ve 37 °C' de 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında tüm kuyular 350 µl yıkama tamponu ile beş defa aspire edildi.
- Aspire işleminden sonra tüm kuyulara 90 µl Substrat Belirtecinden eklendi ve 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi.
- Tüm kuyulara 50 µl durdurma solüsyonundan eklendi ve hızlı bir şekilde sarıya renk değişimi oldu.
- 450 nm dalga boyunda tüm kuyuların ölçümü yapılarak sonuçlar mIU/ml cinsinden verildi.

3.2.2 – Doku homojenatında yapılan analizler

3.2.2.1 – Malondialdehit (MDA) düzeyinin ölçümü

Biyolojik örneklerdeki lipit peroksidasyonunun kantitatif olarak belirlenmesi, lipit peroksidasyon son ürünü olan MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki renk tepkimesine dayanır (Şekil 3.1). Vücut sıvılarında veya hücrelerdeki lipit peroksidasyonu oksidatif stresin belirteci olarak değerlendirilmektedir.

Doku homojenatındaki MDA düzeyi Ohkawa vd. bildirdiği yöntemle göre ölçülmüştür (Ohkawa, Ohishi & Yagi, 1979).



Şekil 3.1 TBA ile MDA arasındaki tepkime

Çözeltiler

- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (%8.1): 8,1 gram SDS 100 ml distile suda çözülür.
- Asetat tamponu (%20, pH:3.5): 20 ml asetik asit 60 ml'ye seyreltilir. pH'sı konsantre NaOH ile 3,5'e ayarlandıktan sonra son hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
- KCl çözeltisi (%1.15): 1,15 gram KCl 100 ml distile suda çözülür.
- Tiyobarbitürik asit (TBA) (%0.8, pH:5.5-7): 0,8 gram TBA distile suda çözülür. NaOH ile pH'sı 5.5-7 arasında ayarlandıktan sonra son hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (Taze hazırlanmalıdır).

Homojenizasyon

Dokulardan 0,1 gram kesit tartıldı ve 1/10 oranında KCl çözeltisi ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C 1500xg'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmından ölçümler yapıldı.

Deney prosedürü

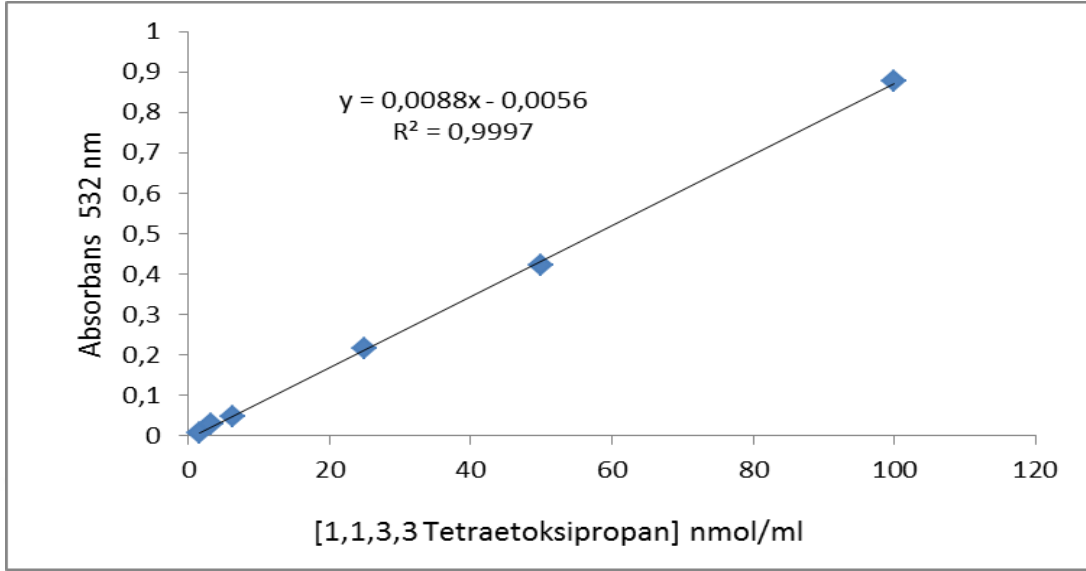
Tablo 3.5 de belirtilen çözeltiler ve ölçüm yapılacak örnekler için kapaklı tüpler hazırlandı.

Tablo 3.5 MDA ölçümü deney prosedürü

	Kör	Örnek	Standart
1.1.3.3.tetraetoksiopropan Standardı	-	-	0.2 ml
Süpernatant	-	0.2 ml	-
SDS	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Asetat Tamponu	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
TBA	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Distile Su	0.8 ml	0.6 ml	0.6 ml
95 °C de 60 dakika inkübasyona (pembe renk oluşumu) bırakılır.			
Musluk suyu ile soğutulduktan sonra 1500xg'de 10 dk santrifüj edilir.			
Süpernatant 532 nm dalga boyunda köre karşı okunur.			

MDA için standardizasyon

- Stok çözeltilerinin hazırlanması: 100 nmol/ml stok lipid peroksit standardı (1.1.3.3.tetraetoksiopropan) hazırlandı.
- Stok çözeltiden 1:2 oranında seri dilüsyonlar yapıldı ve konsantrasyonları bilinen bu standart çözeltilerin absorbansı belirtilen protokol izlenerek ölçüldü (Tablo 3.5).
- Konsantrasyonları bilinen standartlardan okunan absorbans değerleri ile Microsoft Office Excel'de standart kalibrasyon grafiği çizildi (Grafik 3.1).
- Örnek konsantrasyonları standart kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı.
- Aynı homojenattan protein konsantrasyonları ölçüldü ve MDA konsantrasyonları örnek total protein konsantrasyonlarına oranlandı. Doku MDA sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.



Grafik 3.1 MDA standart kalibrasyon grafiği

3.2.2.2 – Glutasyon (GSH) düzeyinin ölçümü

Dokuda alifatik tiyol bileşiklerinin hafif alkali ortamda 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asid (DTNB, Elman reaktifi) ile tepkimesi sonucu tiyol başına oluşan p-nitrofenol anyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır.

Doku homojenatındaki GSH düzeyi Beutler ve vd. bildirdiği yöntemeye göre ölçülmüştür (Srivastava & Beutler, 1968).

Çözeltiler

- Çöktürme çözeltisi: 1.67 gram metafosforik asit, 0.2 gram EDTA ve 30 gram NaCl bir miktar distile suda çözülür. Bu çözeltiler birleştirilip son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
- %1 Sodyum sitrat çözeltisi: 1 gram trisodyum sitrat tartılıp 100 ml distile suda çözülür. Belirtme reaktifinin hazırlanmasında kullanılır.
- Sekonder sodyum fosfat çözeltisi: 10.65 gram Na₂HPO₄ distile suda çözülür ve son hacim 250 ml'ye tamamlanır.
- Belirtme reaktifi: 0.8 gram DTNB önceden hazırlanmış olan %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülür ve son hacim 200 ml'ye tamamlanır. (Taze hazırlanmalıdır.)
- Fosfat tamponu (0.1 M, pH:7.4): 3.4 gram KH₂PO₄ tartılır ve 250 ml distile suda çözülür. 4.35 gram K₂HPO₄ tartılır ve 250 ml distile suda çözülür. K₂HPO₄ üzerine azar azar KH₂PO₄ eklenmesiyle pH'sı 7.4'e ayarlanır.

Homojenizasyon

Dokulardan 0.1 gram kesit tartıldı ve 1/10 oranında soğuk 0.1 M, pH:7.4 fosfat tamponu ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C 1500xg'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmından ölçümler yapıldı.

Deney prosedürü

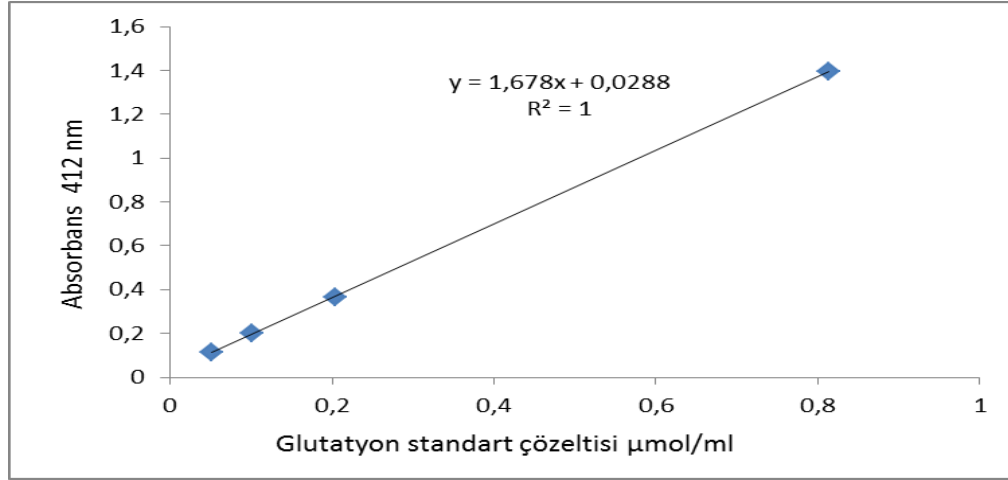
Hazırlanan çözeltiler ile tablo 3.6 da belirtildiği gibi ölçüm işlemi yapılır.

Tablo 3.6 GSH ölçümü deney prosedürü

	Kör	Örnek	Standart
Süpernatant	-	0.5 ml	-
Çöktürme Çözeltisi	-	0.75 ml	-
Karıştırıldıktan sonra 1500xg'de 15 dakika santrifüj edilir. Buradaki süpernatantdan devam edilir.			
Glutasyon standardı	-	-	0.5 ml
Süpernatant	-	0.5 ml	-
Distile Su	0.5 ml	-	-
Sekonder Sodyum Fosfat	2 ml	2 ml	2 ml
DTNB	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika beklenir ve 412 nm dalga boyunda köre karşı absorpsiyonu okunur.			

GSH için standardizasyon

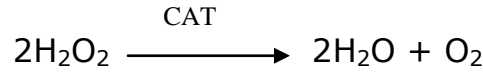
- Stok çözeltisinin hazırlanması: 100 mg glutasyon 100 ml distile suda çözüldü.
- Stok çözeltiden 1:2 oranında seri dilüsyonlar yapıldı ve konsantrasyonları bilinen bu standart çözeltilerin absorpsiyonu belirtilen protokol izlenerek ölçüldü (Tablo 3.6).
- Konsantrasyonları bilinen standartlardan okunan absorpsiyon değerleri ile Microsoft Office Excel'de standart kalibrasyon grafiği çizildi (Grafik 3.2).
- Örnek konsantrasyonları standart kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı.
- Aynı homojenattan protein konsantrasyonları ölçüldü ve GSH konsantrasyonları örnek total protein konsantrasyonlarına oranlandı. Doku GSH ölçüm sonuçları $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak verildi.



Grafik 3.2 GSH standart kalibrasyon grafiği

3.2.2.3 – Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin ölçümü

Katalaz hücre için zararlı olan H₂O₂'yi su ve oksijene parçalayan bir enzimdir. Loew tarafından 1901 yılında H₂O₂'yi parçalayan enzim olarak dünyaya tanıtılmıştır (Nicholls, 2012). H₂O₂'nin 240 nm dalga boyundaki absorpsiyonundaki azalmanın takip edilmesi ile ortamdaki CAT aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanır (Aebi, 1984).



Testis doku homojenatındaki CAT enzim aktivitesi Aebi tarafından bildirilen yöntemle göre ölçülmüştür (Aebi, 1984).

Çözeltiler

- Tris-EDTA-HCl çözeltisi: 12.1 gram tris ile 0.186 gram disodyum EDTA tartılarak 40 ml distile suda çözülür. 2 M'lık HCl ile pH'sı 8'e ayarlanır ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
- HCl (2M): 16.6 ml HCl içinde distile su bulunan balon jöjeye yavaş yavaş aktarılır ve son hacmi 100 ml'ye tamamlanır.
- H₂O₂ (10 mM): 172 µl H₂O₂ distile su ile 200 ml'ye seyreltilir.
- Fosfat tamponu (0.1 M, pH:7): 3.4 gram KH₂PO₄ tartılır ve 250 ml distile suda çözülür. 4.35 gram K₂HPO₄ tartılır ve 250 ml distile suda çözülür. K₂HPO₄ üzerine azar azar KH₂PO₄ eklenmesiyle pH'sı 7'ye ayarlanır.

Homojenizasyon

Testis dokularından 0.1 gram kesit tartıldı ve 1/10 oranında soğuk 0.1 M, pH:7 fosfat tamponu ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C 3500xg'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmından ölçümler yapıldı.

Deney prosedürü

Hazırlanan çözeltiler ile tablo 3.7 de belirtildiği gibi ölçüm işlemi yapılır.

Tablo 3.7 CAT enzim aktivitesi ölçümü deney prosedürü

	Kör	Örnek
Tris-EDTA-HCl	100 µl	100 µl
H ₂ O ₂	-	1800 µl
Distile Su	1900 µl	60 µl
37 °C de 10 dk inkübasyona bırakılır.		
Süpernatant	-	40 µl
240 nm dalga boyunda 5 dakika boyunca köre karşı absorbansı okunur. (Kinetik okuma yapılır.)		

- Süpernatant 1/40 oranında seyreltikten sonra kullanılır.
- H₂O₂, örnek tüplerini inkübasyona koymadan hemen önce tüplere konulmalıdır.
- İnkübasyon sonrası kuvarz tüpte hazır bulunan 40 µl süpernatant üzerine inkübe edilen solüsyon eklenir. Kesinlikle karıştırma veya çalkalama yapılmadan ölçüm yapılır.
- Ortamda H₂O₂ azalacağından absorbans değişiminde azalma olmalıdır.

CAT enzim aktivitesinin hesaplanması

CAT enzim aktivitesinin hesaplanmasında Lartillot ve vd. tarafından bildirilen formül kullanılmıştır (Lartillot, Kedziora & Athias, 1988; Nelson & Kiesow, 1972).

$$Akt = \frac{A.Vt.DF}{\epsilon.t.Ve}$$

A: Enzimatik aktiviteden kaynaklı absorbans değişimi

Vt: Toplam reaksiyon hacmi (µl)

DF: Dilüsyon faktörü

ε: H₂O₂'nin 240 nm'deki ekstinksiyon katsayısı (0.0394)(M⁻¹.cm⁻¹)

t: Reaksiyon süresi (dk)

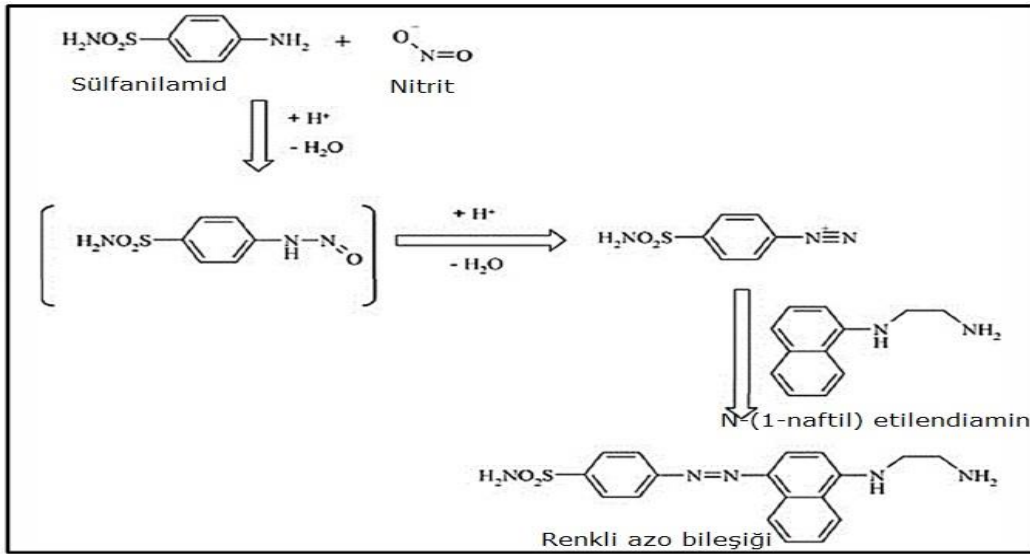
Ve: Örnek hacmi (µl)

CAT spesifik aktivitesi katalaz aktivitesinin, aynı homojenattan ölçülen örnek protein konsantrasyonuna oranlanmasıyla U/mg protein olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Katalaz spesifik aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{Katalaz aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

3.2.2.4 – Nitrik Oksit (NO) düzeyinin ölçümü

Çeşitli vücut sıvılarındaki ve doku homojenatlarındaki NO düzeylerinin belirlenmesi nitrik oksit oksidasyonunun son ürünleri olan nitrit ve nitratın ölçülmesi esasına dayanır. Örneklerdeki nitrit ve nitrat miktarı iki aşamalı olarak belirlenir. Öncelikle nitrat enzimatik dönüşümle veya kadmiyum granülleri ile nitrite indirgenmelidir. Asidik ortamda nitrit primer aromatik amin olan sülfanilamid ile diazotizasyona uğrar ve N-(1-naftil) etilendiamin ile mor renkli azo bileşiği oluşturur. Şekil 3.2’de gösterildiği gibi Griess reaksiyonu olarak da bilinen bu yolla nitrit miktarı hassas bir şekilde ölçülmüş olur (Dejam, Hunter, Schechter & Gladwin, 2004). Ölçüm hassasiyetine olumsuz etki yapabilecek olan proteinler için deproteinizasyon işlemi yapılır (Cortas & Wakid, 1990).



Şekil 3.2 Griess reaksiyonu

Testis doku homojenatındaki NO düzeyi Cortas vd. bildirdiği yöntemle göre ölçülmüştür (Cortas & Wakid, 1990).

Çözeltiler

- CuSO_4 (5 mM): 3.12 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılır ve bir miktar distile suda çözülür. Son hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.
- ZnSO_4 (75 mM): 5.39 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartılır ve bir miktar distile suda çözülür. Son hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.
- NaOH (55 mM): 0.44 gram NaOH tartılır ve bir miktar distile suda çözülür. Son hacmi 200 ml'ye distile su ile tamamlanır.
- H_2SO_4 (0.2 M): 1,647 ml derişik H_2SO_4 alınır ve içinde distile su bulunan balon jøjeye yavaş yavaş aktarılır. Son hacmi distile su ile 300 ml'ye tamamlanır.
- Glisin-NaOH tamponu (0.2 M, pH:9.7): 7.5 gram glisin tartılır ve bir miktar distile suda çözülür. 1 M NaOH ile pH'sı 9.7'ye ayarlanır. Son hacmi distile su ile 500 ml'ye tamamlanır (1 ay stabil).
- HCl (3 M): 61.588 ml derişik HCl alınır ve içinde distile su bulunan balon jøjeye yavaş yavaş aktarılır. Son hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.
- Sülfanilamid (58 mM): 2,5 gram sülfanilamid ısıtılmış 3 M'lık HCl içinde çözülür ve son hacmi 250 ml'ye tamamlanır. (Oda ısısında bir yıl stabil)
- N-(1-naftil) etilendiamin (0.77 M): 50 mg N-(1-naftil) etilendiamin tartılır ve bir miktar distile su içinde çözülür. Son hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlanır (0-8 °C de iki ay satbil).
- Fosfat tamponu (0.1 M, pH:7.4): 3.4 gram KH_2PO_4 tartılır ve 250 ml distile suda çözülür. 4.35 gram K_2HPO_4 tartılır ve 250 ml distile suda çözülür. K_2HPO_4 üzerine azar azar KH_2PO_4 eklenmesiyle pH'sı 7.4'e ayarlanır.

Homojenizasyon

Testis dokularından 0.1 gram kesit tartıldı ve 1/10 oranında soğuk 0.1 M, pH:7.4 fosfat tamponu ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C 1500xg'de 15 dk santrifüj edildi. Süparnetant kısmından ölçümler yapıldı.

Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu

0.2 M H_2SO_4 içinde tutulan kadmiyum granülleri distile su ile üç defa yıkandı. 2 dakika CuSO_4 içinde beklettikten sonra glisin-NaOH tamponu ile 3 defa yıkandı. Kadmiyum granülleri aktive edildikten 10 dakika içinde kullanılması gerekmektedir. Aksi takdirde granüllerin hava ile temas süresi arttıkça redüksiyon kapasiteleri azalmaktadır.

Deproteinizasyon

125 µl süpernatant üzerine 500 µl ZnSO₄ ve 625 µl NaOH eklendi. 10 dakika beklendikten sonra 3500xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve bu süpernatant üzerinden devam edildi.

Deney prosedürü

Hazırlanan çözeltiler ile tablo 3.8 de belirtildiği gibi ölçüm işlemi yapılır.

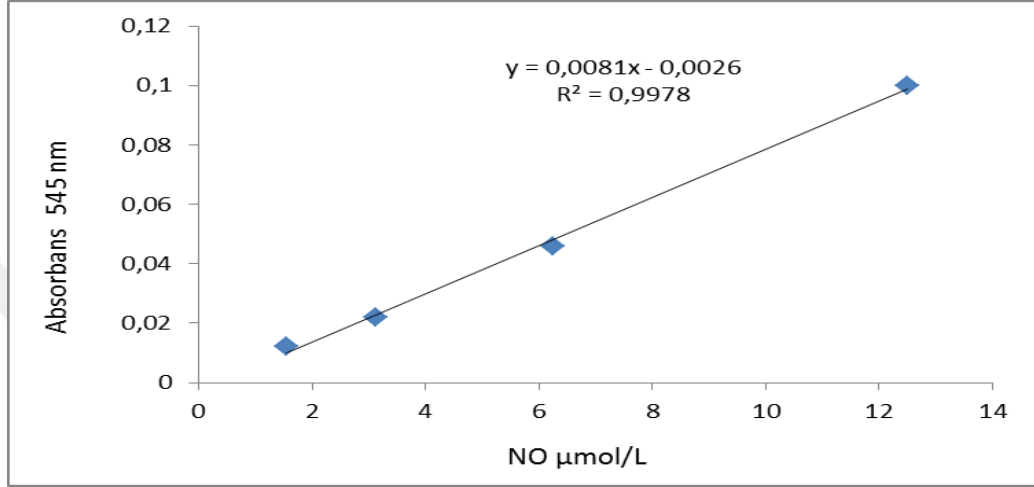
Tablo 3.8 NO ölçümü deney prosedürü

	Kör	Örnek
Süpernatant	-	250 µl
Glisin-NaOH tamponu	250 µl	250 µl
Distile Su	500 µl	500 µl
Kadmiyum granülleri	Eklenir	Eklenir
90 dakika inkübasyona bırakılır ve inkübasyon sonrası 500 µl alınıp devam edilir.		
Süpernatant	-	500 µl
Sülfanilamid	250 µl	250 µl
N-(1-naftil) etilendiamin	250 µl	250 µl
Distile Su	125 µl	125 µl
45-60 dakika inkübasyondan sonra 545 nm dalga boyunda köre karşı absorbansı okunur.		

NO için standardizasyon

- Stok çözeltinin hazırlanması: 100 mM'lık stok NaNO₂ çözeltisi kullanılacağı gün hazırlandı. Çözücü olarak 10 mM Na₂B₄O₇ çözeltisi kullanıldı (stok halinde iken 9 ay stabil ancak dilüe edildikten sonra üç gün stabil).
- Stok çözeltiden 1:2 oranında seri dilüsyonlar yapılarak farklı konsantrasyonlarda standart çözeltileri elde edildi.
- Standart tüplerine 625 µl NaOH, 500 µl ZnSO₄, 250 µl glisin-NaOH tamponu eklendi. Kadmiyumsuz ortamda 250 µl sülfanilamid ve 250 µl N-(1-naftil) etilendiamin eklendikten sonra farklı konsantrasyondaki standart çözeltilerden standart tüplerine 500 µl eklendi.
- Konsantrasyonları bilinen standartlardan 545 nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri ile Microsoft Office Excel'de standart kalibrasyon grafiği çizildi (Grafik 3.3).

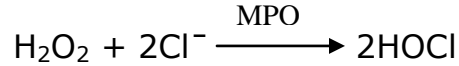
- Örnek konsantrasyonları standart kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı.
- Aynı homojenattan protein konsantrasyonları ölçüldü ve NO konsantrasyonları örnek total protein konsantrasyonlarına oranlandı. Doku NO ölçüm sonuçları $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein olarak verildi.



Grafik 3.3 NO standart kalibrasyon grafiği

3.2.2.5 – Miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktivitesinin ölçümü

Nötrofillerin sitozolik granüllerinden salınan MPO dokulardaki nötrofil aktivasyonunun göstergesi olarak kullanılmaktadır. Fagositoz ile mikroorganizmaların yok edilmesinde görev alan MPO, Cl^- ve H_2O_2 arasındaki reaksiyonu katalize ederek oldukça reaktif olan hipoklorik asit (HOCl) oluşturur. Oluşan HOCl kuvvetli bir oksitleyicidir. MPO aktivitesinin artmasıyla H_2O_2 membrandan geçerek ya toksik etki yapar ya da hidroksil radikale dönüşür (Klebanoff, 1999; Kocyigit, Erel & Gur, 2001).



Testis doku homojenatındaki MPO enzim aktivitesi Suzuki vd. tarafından bildirilen yöntemle göre ölçülmüştür (Suzuki, Ota, Sasagawa, Sakatani & Fujikura, 1983).

Çözeltiler

- Fosfat tamponu (160 mM, pH:5.4, %1 hekzadesil trimetil amonyum bromid (HETAB)): K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 'dan 160 mM'lık çözeltiler hazırlanır ve pH'sı 5.4'e ayarlanır. 1 gram HETAB 100 ml 160 mM fosfat tamponu içinde çözülür.

- Fosfat tamponu (50 mM, pH:6, 10 mM EDTA, %0.5 HETAB): K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 'dan 50 mM'lık çözeltiler hazırlanır ve pH'sı 6'ya ayarlanır. 100 ml fosfat tamponunda 10 mM EDTA çözeltisi hazırlanır. Son hacim 100 ml yapılmadan 0.5 gram HETAP tartılıp çözülür ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
- Fosfat tamponu (50 mM, pH: 7.4): K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 'dan 50 mM'lık çözeltiler hazırlanır ve pH'sı 7.4'e ayarlanır.
- Tetrametilbenzidin (TMB) (16 mM) (Substrat): 0.096 gram TMB 25 ml N-N-dimetil formamid'de çözülür (Taze hazırlanmalıdır).
- H_2O_2 (%0.06): 172 μ l %35'lik H_2O_2 'den alınır ve 100 ml'ye seyreltilir.

Homojenizasyon

Testis dokusundan 0.1 gram kesit alındı ve 1/10 oranında olacak şekilde soğuk fosfat tamponu (50 mM, pH:7.4) ile homojenize edildi. Homojenattan 1 ml alınarak 4500xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine 1 ml fosfat tamponu (50 mM pH:6) eklendi. Yeniden homojenize edildi.

Deney prosedürü

Hazırlanan çözeltiler ile tablo 3.9 da belirtildiği gibi ölçüm işlemi yapılır.

Tablo 3.9 MPO enzim aktivitesi ölçümü deney prosedürü

	Kör	Örnek
Fosfat Tamponu (pH:5.4)	1000 μ l	1000 μ l
TMB	200 μ l	200 μ l
Distile Su	700 μ l	660 μ l
Homojenat	-	40 μ l
37 °C de 2 dk inkübasyona bırakılır.		
H_2O_2	100 μ l	100 μ l
Kuvartz tüpe alındıktan sonra 655 nm dalga boyunda 3 dakika boyunca köre karşı absorpsiyon değişimi okunur.		

- H_2O_2 , ölçümden hemen önce eklenmelidir.

MPO enzim aktivitesinin hesaplanması

MPO enzim aktivitesinin hesaplanması aşağıdaki belirtildiği gibi yapıldı (Suzuki vd., 1983; Marquez & Dunford, 1997).

$$U/ml = \frac{\Delta A \times V_T \times DF}{e \times V_H \times \Delta t}$$

ΔA = Absorbans değişimi
 V_T = Kvet içerisindeki toplam hacim (ml)
DF= Dilüsyon faktörü
 ϵ = Ekstinksiyon katsayısı (3.9×10^4)($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
 V_H = Homojenat hacmi (ml)
 Δt = Reaksiyon süresi

Aynı homojenattan protein konsatrasyonları olld ve MPO aktiviteleri örnek protein konsatrasyonlarına oranlandı. Doku MPO aktivite sonuçları U/mg protein olarak verildi.

3.2.2.6 – Protein düzeyinin olm

Biret yöntemi: Alkali ortamda protein ve peptitlerdeki peptit bağı azotuyla Cu^{2+} iyonlarının reaksiyonu sonucu oluşan mavi-mor rengin 545 nm'deki absorpsiyonunun ollmesi esasına dayanır.

Testis doku homojenatındaki protein düzeyi Gornall vd. bildirdiği Biret yöntemine göre ollmştr (Gornall, Bardawill & David, 1949).

Çözeltiler

- Na-K Tartarat: 6 gram tartılır ve bir miktar distile suda çözülür.
- $CuSO_4$: 1.5 gram tartılır ve bir miktar distile suda çözülür.
- NaOH: 30 gram tartılır ve bir miktar distile suda çözülür.

Bu  çözelti karıştırılarak Biret reaktifi hazırlanır ve son hacim 1 litreye tamamlanır.

Deney prosedürü

Hazırlanan çözeltiler ile tablo 3.10 da belirtildiği gibi ölçüm işlemi yapılır.

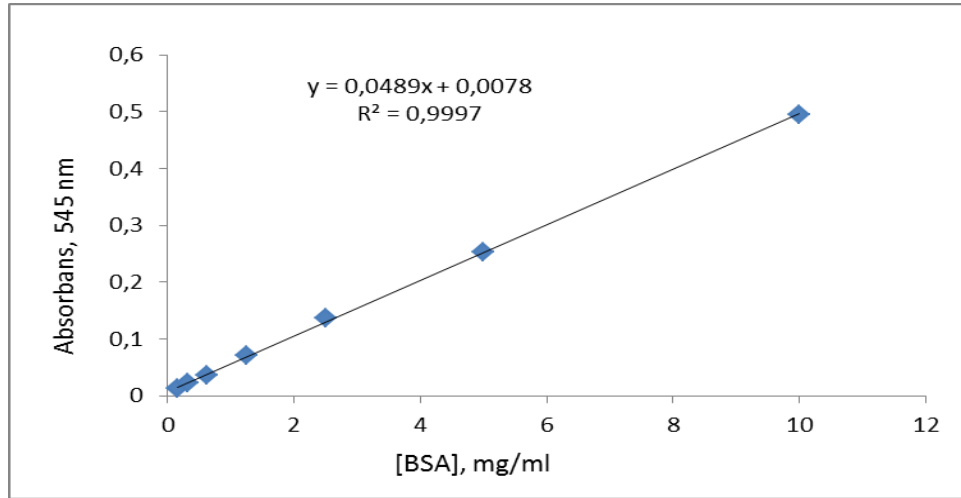
Tablo 3.10 Protein ölçümü deney prosedürü

	Kör	Örnek	Standart
Distile Su	50 µl	-	-
Büret	1250 µl	1250 µl	1250 µl
Homojenat	-	50 µl	-
BSA Standartı	-	-	50 µl

15 dk karanlıkta bekletildikten sonra 545 nm dalga boyunda köre karşı absorbansı okunur.

Protein için standardizasyon

- Bovin serum albümin (BSA) standartından 20 mg/ml stok standart çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltilerden 1:2 oranında seri dilüsyon yapılarak farklı konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı.
- Konsantrasyonları bilinen standartlardan 545 nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri ile Microsoft Office Excel'de standart kalibrasyon grafiği çizildi (Grafik 3.4).
- Testis dokusu protein konsantrasyonları standart kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı.



Grafik 3.4 BSA standart kalibrasyon grafiği

3.2.3 – Testis dokularının histolojik incelemesi

Kontrol, sigara dumanı, sigara dumanı+ E vitamini, sigara dumanı+ L-NAME ve sigara dumanı+E vitamini+L-NAME gruplarını oluşturan tüm sıçanlardan histopatolojik değerlendirmeler için testis örnekleri alındı. Alınan testis örnekleri Bouin fiksatifine konuldu. Bouin fiksatifinde 3 gün süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler daha sonra yıkama yapılmadan %70'lik alkole alındı ve doku parçaları sırasıyla kademeli olarak %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 1'er saat bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'şer dakika ksilolde bekletildi. Testis örnekleri şeffaflanmalarının ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutularak, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eozin ikili boyası kullanıldı. Hematoksilen-Eozin ikili boyası ile boyanan ve deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile 2 dakika ve Eozin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki ayrı ksilolde 30'ar dakika tutularak şeffaflandırıldı ve şeffaflanan dokular daha sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapılarak testis örneklerini içeren tüm preparatların Olympus DP-70 digital kamera ile fotoğrafları çekildi.

3.2.4 – İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalında yapıldı. Analiz için tek yönlü varyans analizi (Oneway ANOVA) testi ve gruplar arası farklılığın karşılaştırılması için POSTHOC testlerinden Tukey HSD testi kullanıldı. Sonuçlar \pm standart sapma olarak verildi. $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm veri analizleri IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Statistics 21 paket programları ile yapılmıştır.

4- BULGULAR

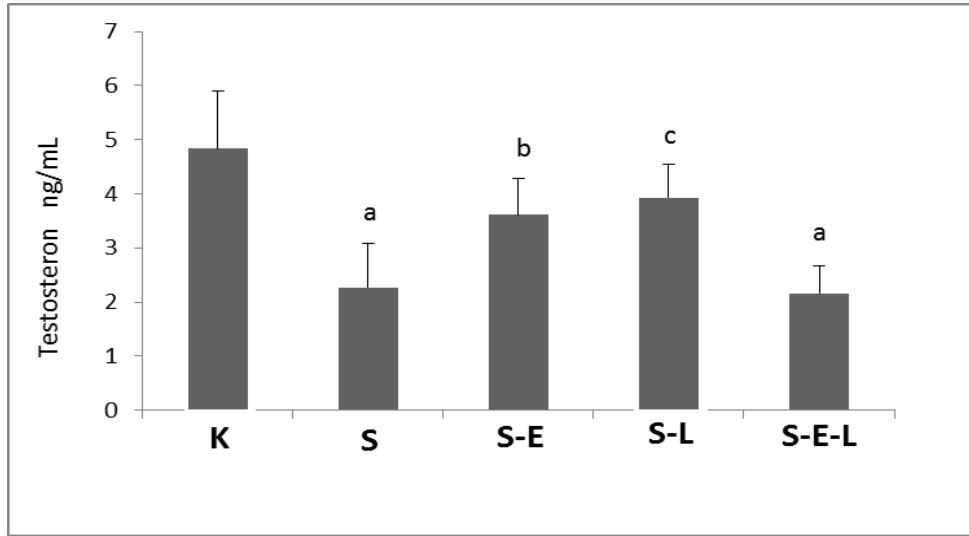
Çalışma kapsamında ölçülen parametrelerin istatistiki olarak değerlendirilmesi tablo ve grafiklerle açıklanmıştır.

4.1 – Serum Testosteron Bulguları

Serum Testosteron düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi tablo 4.1 ve grafik 4.1 de verilmiştir (ortalama \pm SD). S grubunda K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma bulundu ($p < 0.001$). S-E ve S-L tedavi gruplarında S grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselme gözlemlendi ($p < 0.05$, $p < 0.01$). S-E-L grubunda S grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunmazken, K grubuna kıyasla anlamlılığın devam ettiği gözlemlendi ($p < 0.001$).

Tablo 4.1 Serum Testosteron düzeyleri (ng/mL)

Grup	Kontrol	Sigara	Sigara + E vitamini	Sigara + L-NAME	Sigara + E vitamini + L-NAME
Veri	4.840 \pm 1.057	2.270 \pm 0.806	3.610 \pm 0.682	3.930 \pm 0.626	2.160 \pm 0.513



Grafik 4.1 Serum Testosteron düzeyleri (ng/mL)

a: Kontrol grubuna göre $p < 0.001$

b: Sigara grubuna göre $p < 0.05$

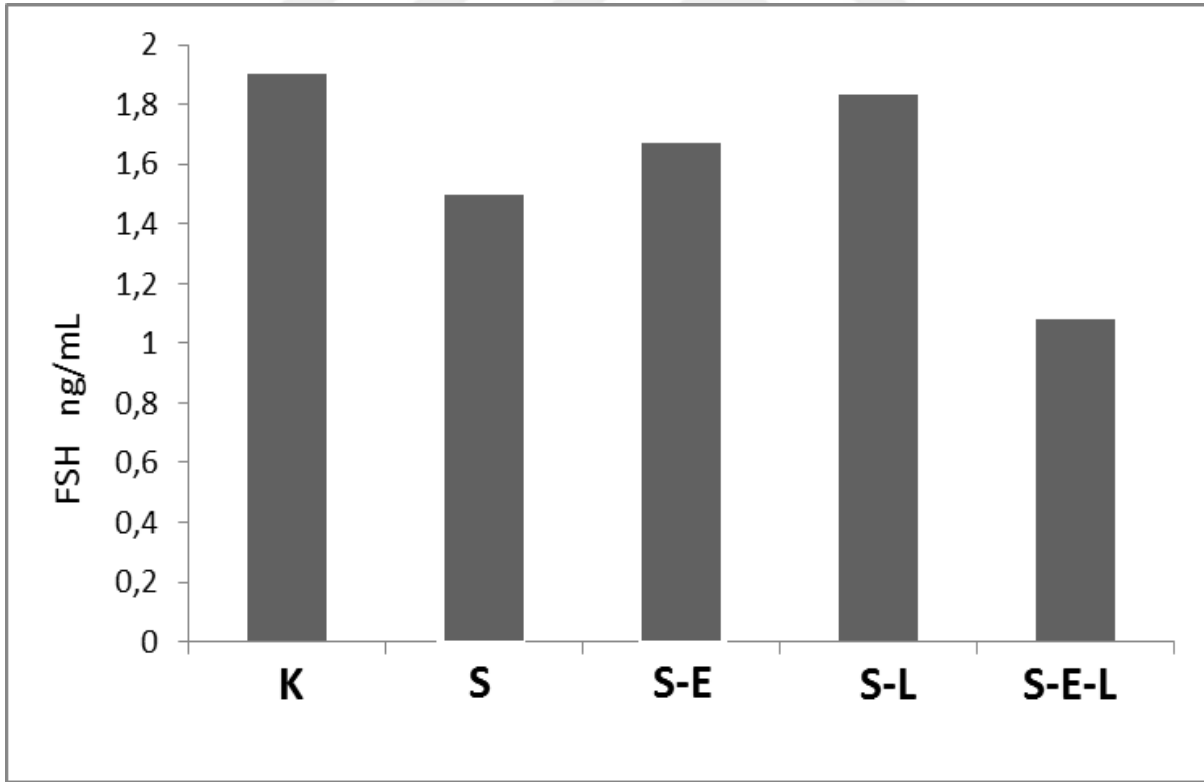
c: Sigara grubuna göre $p < 0.01$

4.2 – Serum FSH Bulguları

Serum FSH düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi tablo 4.2 ve grafik 4.2 de verilmiştir (ortalama \pm SD). Yapılan istatistiksel analiz sonrasında gruplar arasında anlamlı düzeyde fark olmadığı bulunmuştur.

Tablo 4.2 Serum FSH düzeyleri (ng/mL)

Grup	Kontrol	Sigara	Sigara + E vitamini	Sigara + L-NAME	Sigara + E vitamini + L-NAME
Veri	1.900 \pm 1.293	1.503 \pm 0.628	1.671 \pm 0.885	1.830 \pm 1.583	1.085 \pm 0.878



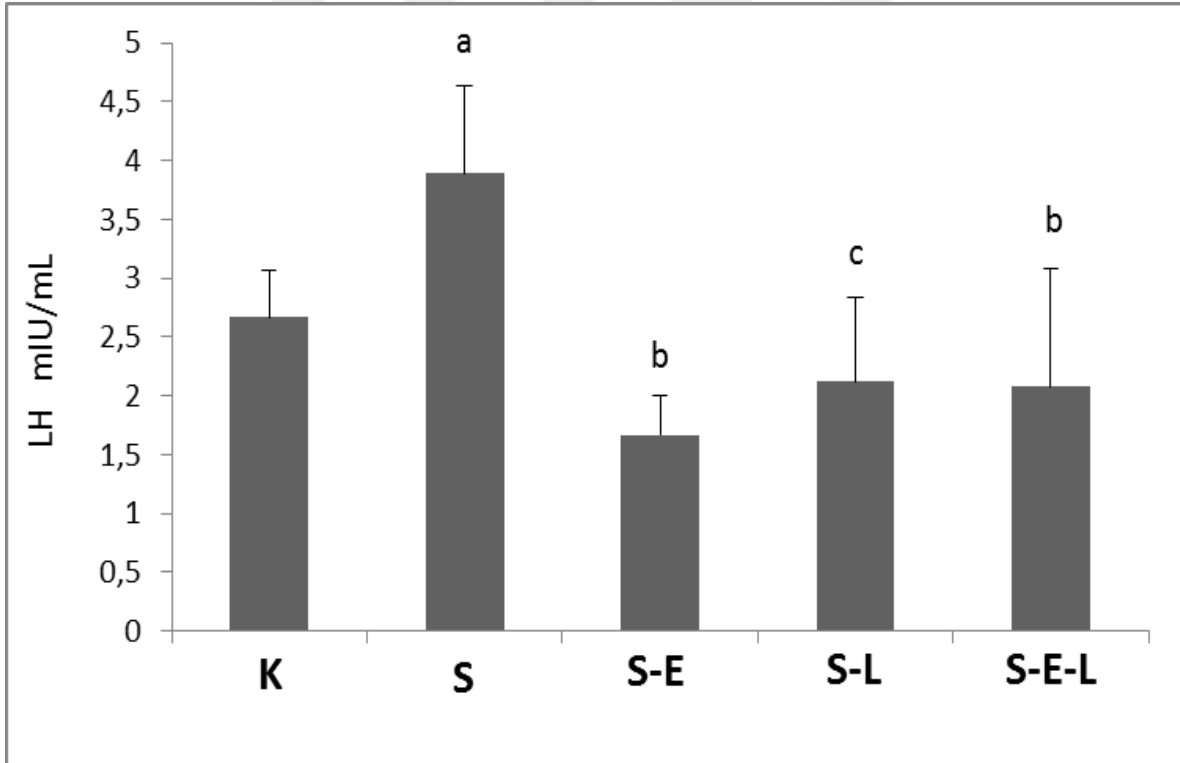
Grafik 4.2 Serum FSH düzeyleri (ng/mL)

4.3 – Serum LH Bulguları

Serum LH düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi tablo 4.3 ve grafik 4.3 de verilmiştir (ortalama \pm SD). S grubunda K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselme bulundu ($p < 0.01$). S-E, S-E-L ve S-L tedavi gruplarında S grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma bulundu ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.001$)

Tablo 4.3 Serum LH düzeyleri (mIU/mL)

Grup	Kontrol	Sigara	Sigara + E vitamini	Sigara + L-NAME	Sigara + E vitamini + L-NAME
Veri	2.670 \pm 0.398	3.890 \pm 0.748	1.660 \pm 0.328	2.120 \pm 0.724	2.060 \pm 1.008



Grafik 4.3 Serum LH düzeyleri (mIU/mL)

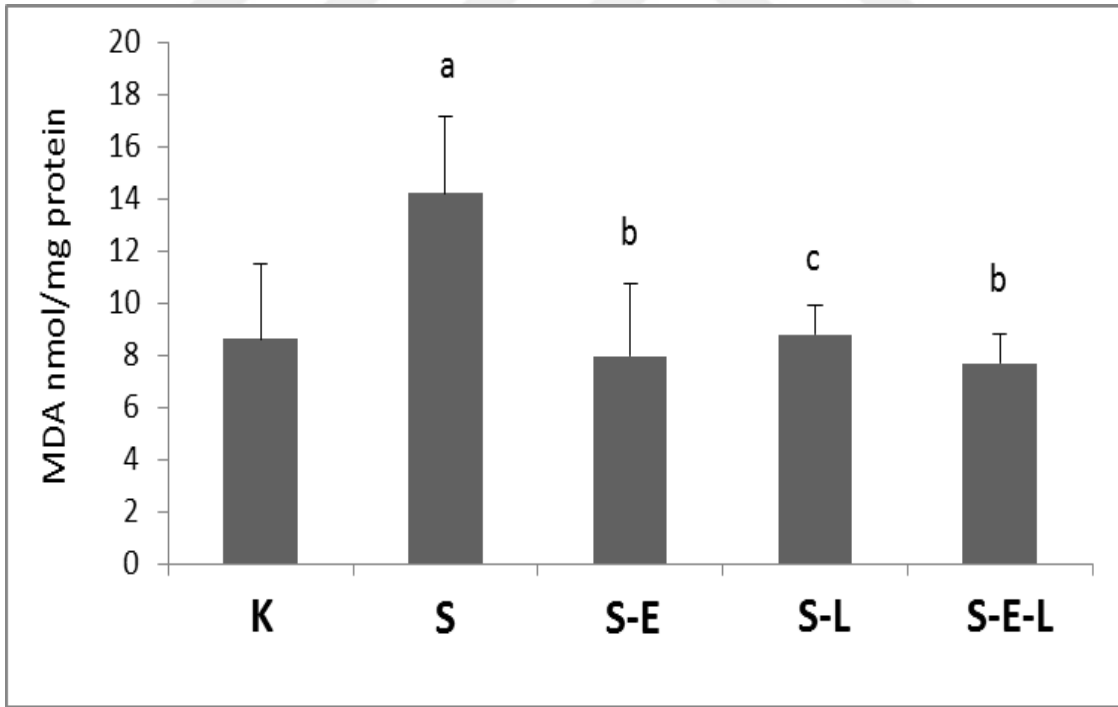
- a: Kontrol grubuna göre $p < 0.01$
- b: Sigara grubuna göre $p < 0.001$
- c: Sigara grubuna göre $p = 0.001$

4.4 – Testis Dokusu MDA Bulguları

Testis dokusu MDA düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi tablo 4.4 ve grafik 4.4 de verilmiştir (ortalama \pm SD). S grubunda K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselme bulundu ($p < 0.001$). S-E, S-E-L ve S-L tedavi gruplarında S grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu bulundu ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$).

Tablo 4.4 Doku MDA düzeyleri (nmol/mg protein)

Grup	Kontrol	Sigara	Sigara + E vitamini	Sigara + L-NAME	Sigara + E vitamini + L-NAME
Veri	8.63 \pm 2.85	14.2 \pm 2.96	7.95 \pm 2.78	8.79 \pm 1.11	7.67 \pm 1.12



Grafik 4.4 Doku MDA düzeyleri (nmol/mg protein)

a: Kontrol grubuna göre $p < 0.001$

b: Sigara grubuna göre $p < 0.001$

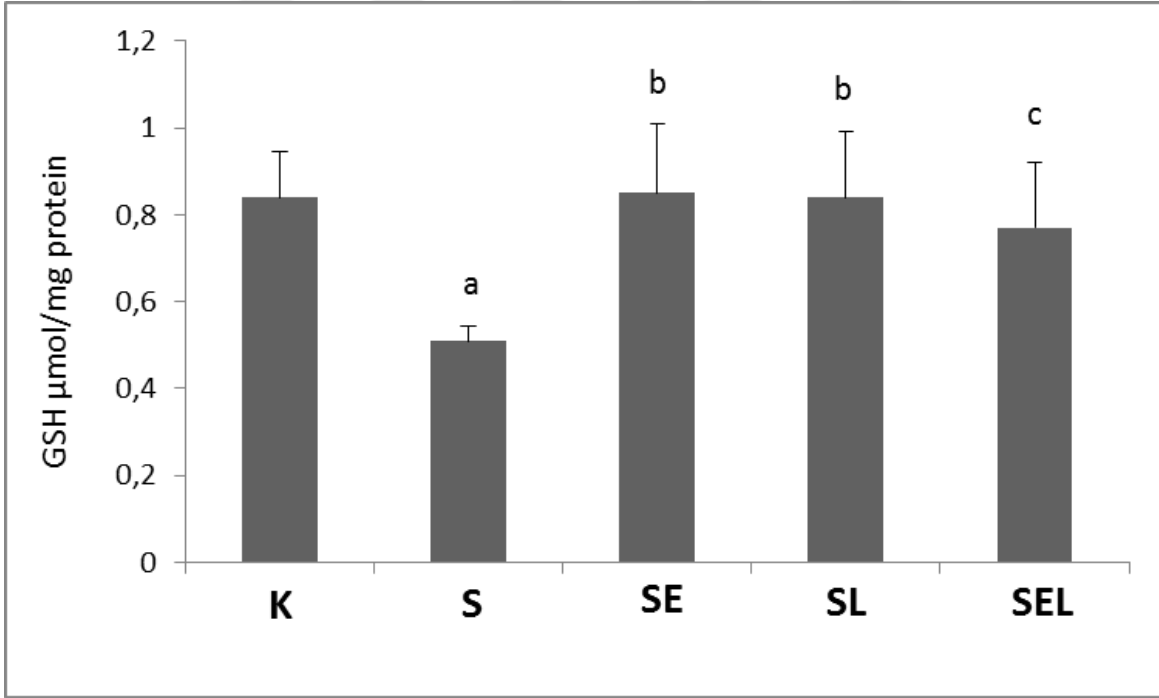
c: Sigara grubuna göre $p < 0.01$

4.5 – Testis Dokusu GSH Bulguları

Testis dokusu GSH düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi tablo 4.5 ve grafik 4.5 de verilmiştir (ortalama \pm SD). S grubunda K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma bulundu ($p < 0.01$). S-E, S-L ve S-E-L tedavi gruplarında S grubuna kıyasla anlamlı düzeldi yükselme bulundu ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$).

Tablo 4.5 Doku GSH düzeyleri ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)

Grup	Kontrol	Sigara	Sigara + E vitamini	Sigara + L-NAME	Sigara + E vitamini + L-NAME
Veri	0.770 ± 0.104	0.510 ± 0.034	0.850 ± 0.160	0.840 ± 0.151	0.770 ± 0.151



Grafik 4.5 Doku GSH düzeyleri ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)

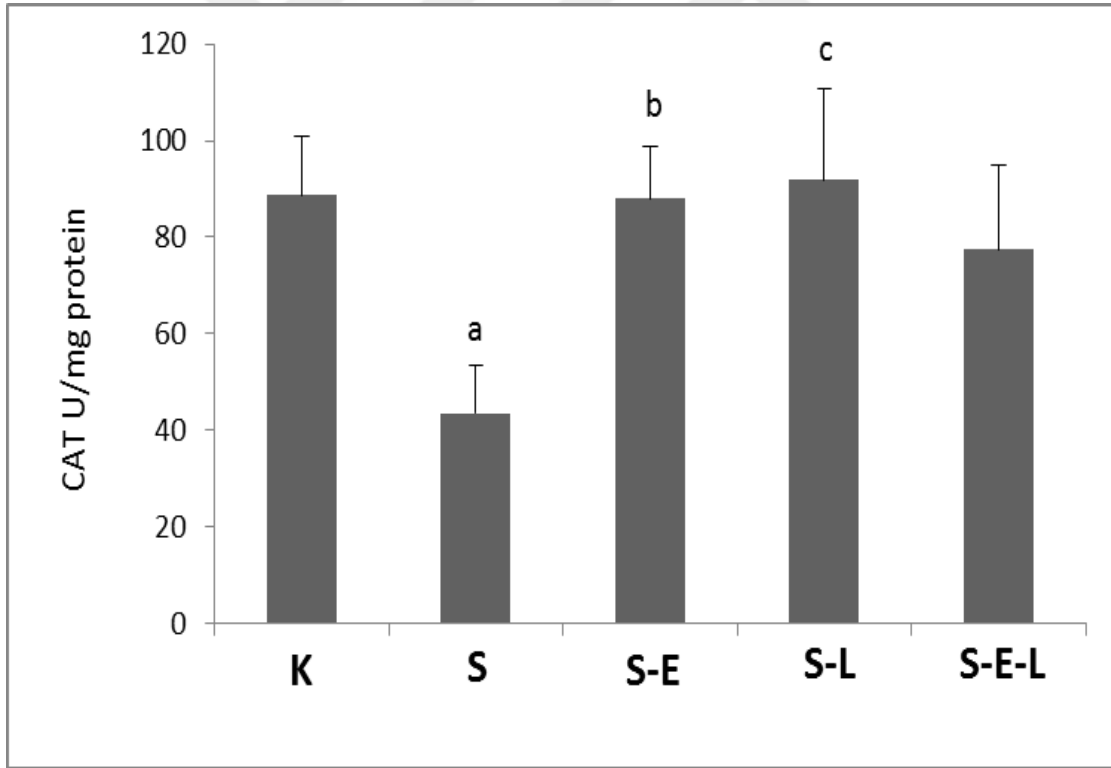
- a: Kontrol grubuna göre $p < 0.01$
- b: Sigara grubuna göre $p < 0.001$
- c: Sigara grubuna göre $p < 0.01$

4.6 – Testis Dokusu CAT Bulguları

Testis dokusu CAT enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi tablo 4.6 ve grafik 4.6 de verilmiştir (ortalama \pm SD). S grubunda K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma bulundu ($p < 0.05$). S-E ve S-L tedavi gruplarında S grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yükselme bulundu ($p < 0.05$, $p < 0.01$).

Tablo 4.6 Doku CAT enzim aktiviteleri (U/mg protein)

Grup	Kontrol	Sigara	Sigara + E vitamini	Sigara + L-NAME	Sigara + E vitamini + L-NAME
Veri	81.536 \pm 12.404	43.569 \pm 9.702	82.295 \pm 10.641	91.761 \pm 18.829	77.416 \pm 17.395



Grafik 4.6 Doku CAT enzim aktiviteleri (U/mg protein)

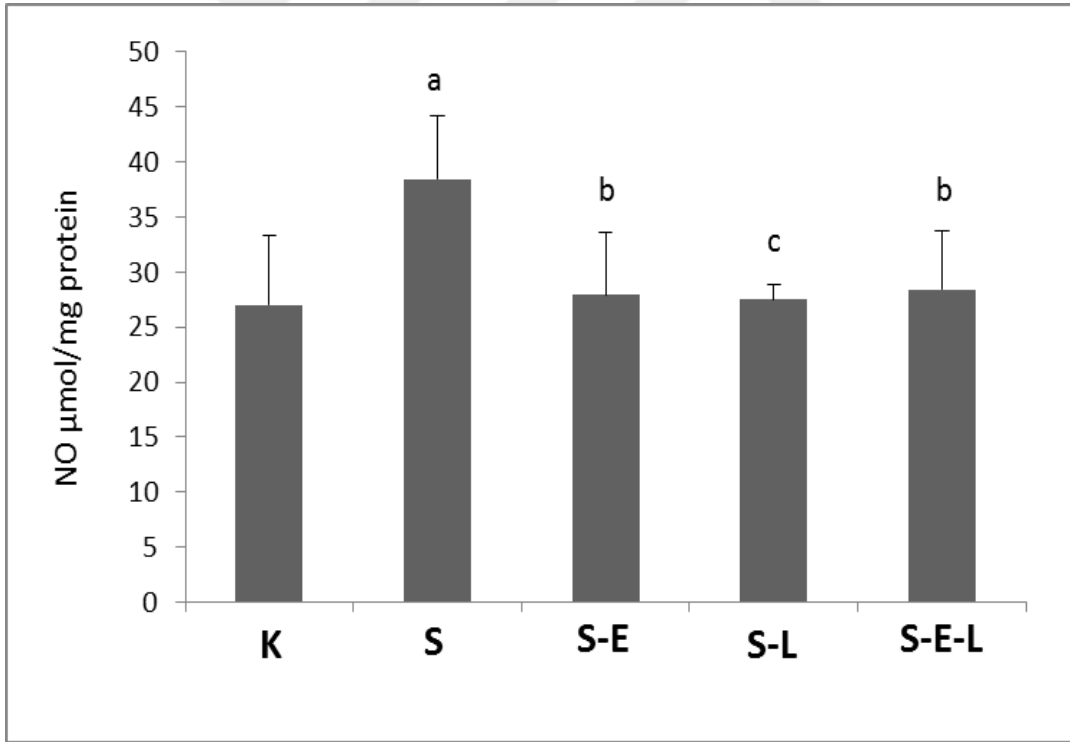
- a: Kontrol grubuna göre $p < 0.05$
- b: Sigara grubuna göre $p < 0.05$
- c: Sigara grubuna göre $p < 0.01$

4.7 – Testis Dokusu NO Bulguları

Testis dokusu NO düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi tablo 4.7 ve grafik 4.7 de verilmiştir (ortalama \pm SD). S grubunda K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselme bulundu ($p < 0.01$). S-E, S-L ve S-E-L tedavi gruplarında S grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azalma bulundu ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$).

Tablo 4.7 Doku NO düzeyleri ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)

Grup	Kontrol	Sigara	Sigara + E vitamini	Sigara + L-NAME	Sigara + E vitamini + L-NAME
Veri	26.990 \pm 6.362	38.480 \pm 5.776	27.950 \pm 5.717	27.490 \pm 1.435	28.380 \pm 5.433



Grafik 4.7 Doku NO düzeyleri ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)

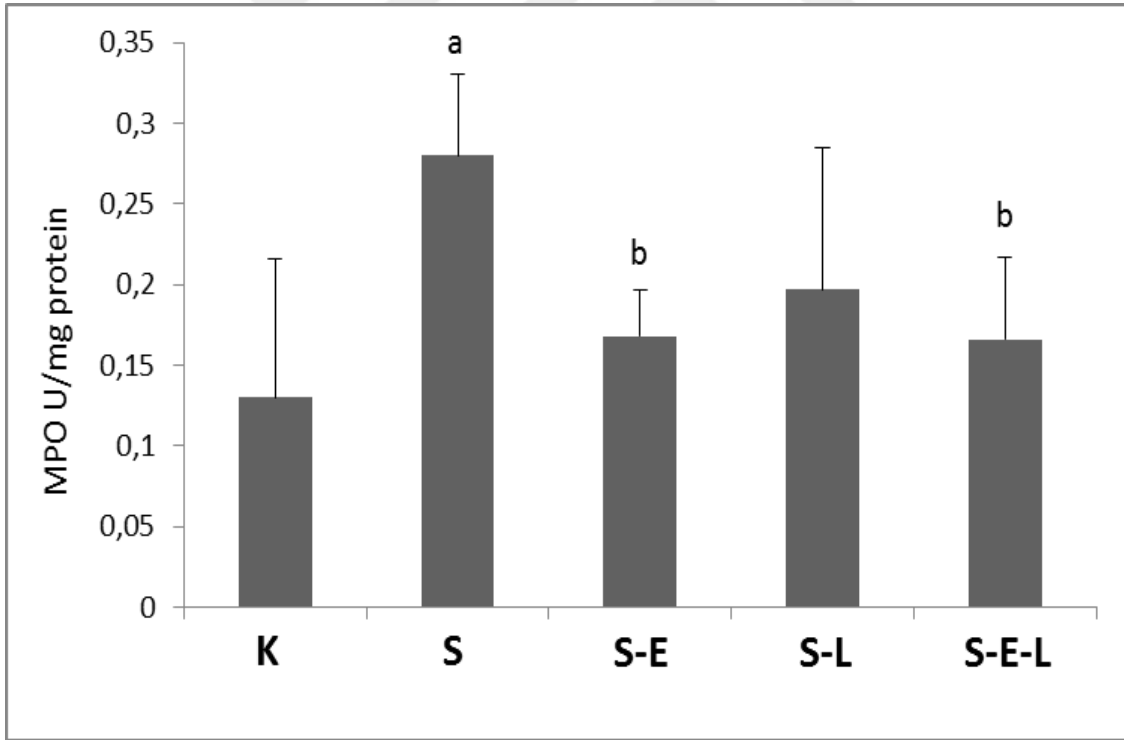
- a: Kontrol grubuna göre $p < 0.01$
- b: Sigara grubuna göre $p < 0.05$
- c: Sigara grubuna göre $p < 0.01$

4.8 – Testis Dokusu MPO Bulguları

Testis dokusu MPO enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi tablo 4.8 ve grafik 4.8 de verilmiştir (ortalama \pm SD). S grubunda K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselme bulundu ($p < 0.01$). S-E ve S-E-L tedavi gruplarında S grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma bulundu ($p < 0.05$).

Tablo 4.8 Doku MPO enzim aktiviteleri (U/mg protein)

Grup	Kontrol	Sigara	Sigara + E vitamini	Sigara + L-NAME	Sigara + E vitamini + L-NAME
Veri	0.133 \pm 0.086	0.280 \pm 0.051	0.168 \pm 0.029	0.197 \pm 0.088	0.166 \pm 0.051



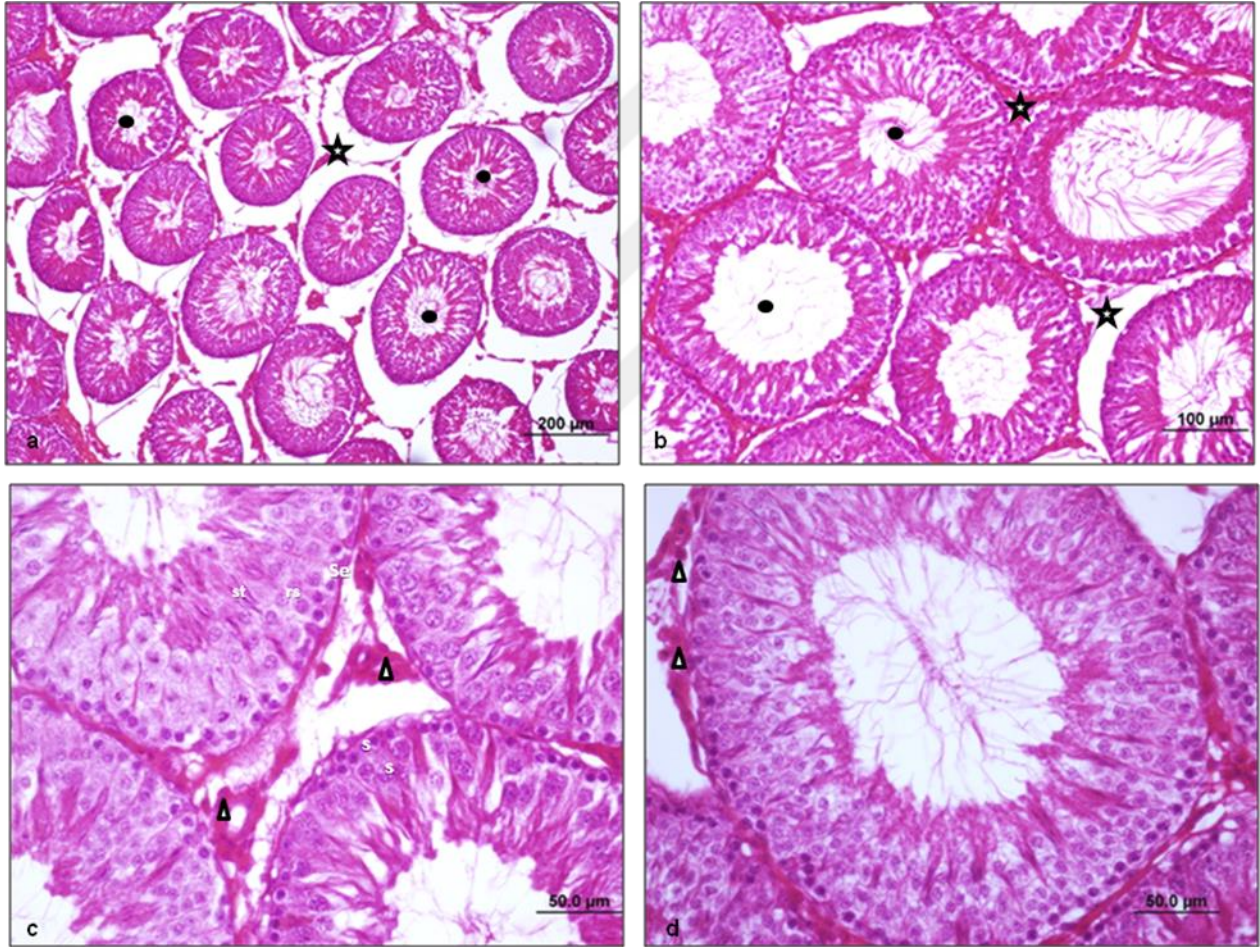
Grafik 4.8 Doku MPO enzim aktiviteleri (U/mg protein)

a: Kontrol grubuna göre $p < 0.01$

b: Sigara grubuna göre $p < 0.05$

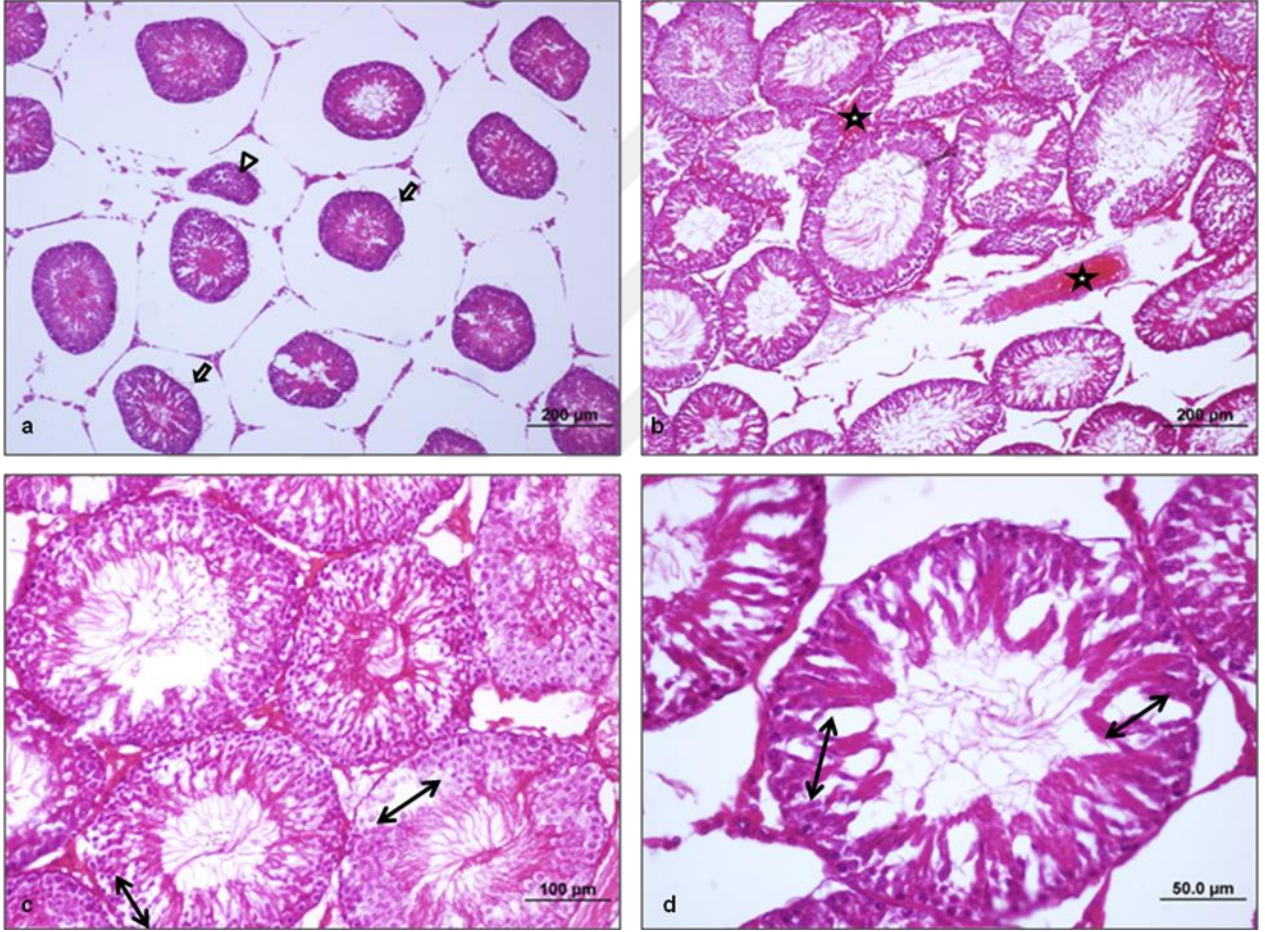
4.9 – Testis Dokusu Histolojik Bulguları

Kontrol grubuna ait deney hayvanlarından alınan testis örneklerinin ışık mikroskopik değerlendirmelerinde kontrol grubunu oluşturan sıçan testislerinin normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri; spermatogonyum, primer spermatosit, spermatid hücreleri ve tübüllerde devam eden Spermatojenez aşamasıyla beraber normal histolojik yapıda gözlemlendi. Ayrıca interstisyel alan ve Leydig hücreleri normal gözlemlendi. Şekil 4.1 de testislerin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopu görüntüsü verilmiştir.



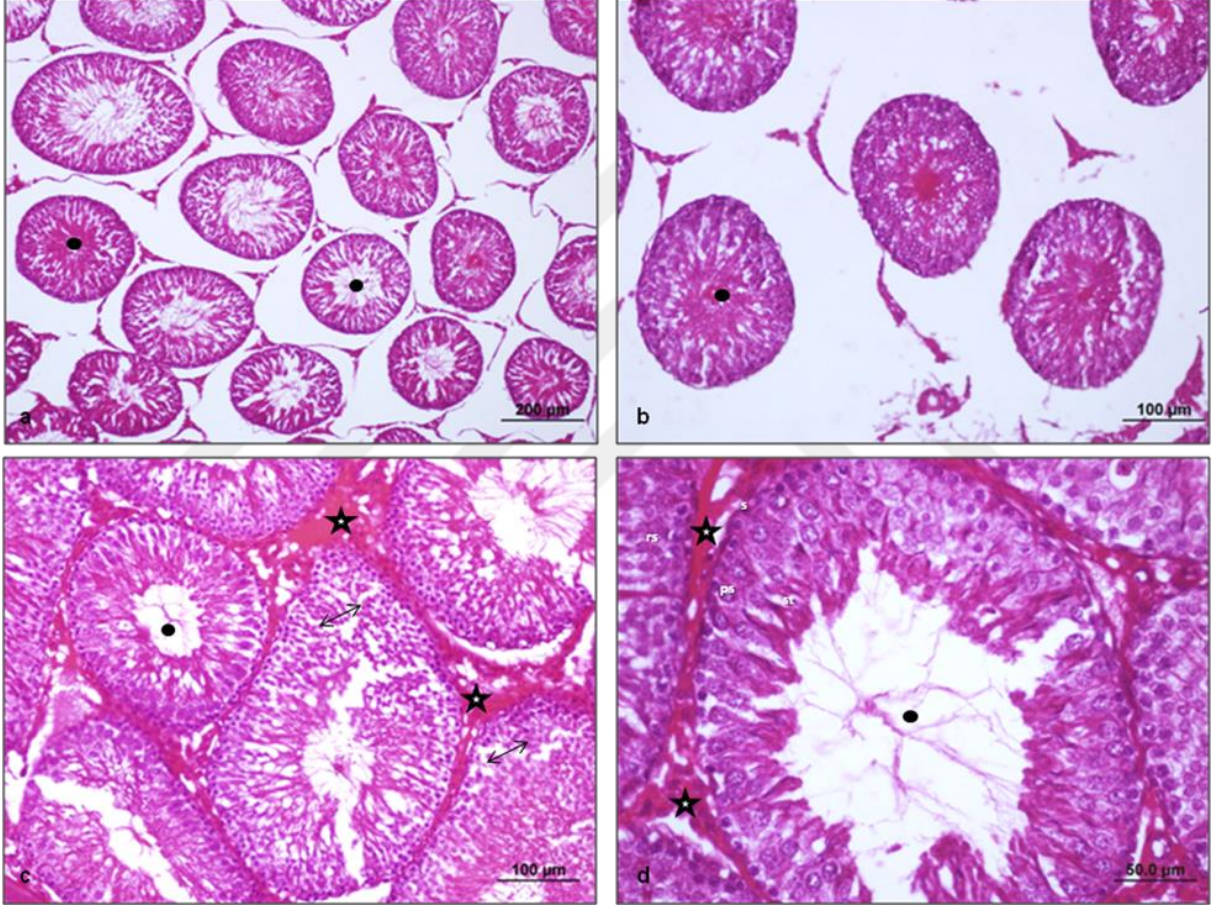
Şekil 4.1 Kontrol grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü. Normal yapıdaki seminifer tübüller (●) ve tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri; spermatogonyum (s), primer spermatosit (ps), spermatid hücreleri (rs-st) ve tübüllerde devam eden Spermatojenez görülmekte. Normal görünümlü interstisyel alan (*) ve Leydig hücreleri (▶) izlenmekte (a-d) (bar: 200µm, bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE).

Sigara dumanı grubuna ait deney hayvanlarından alınan testis örneklerinin ışık mikroskopik değerlendirmelerinde sigara dumanı grubunu oluşturan sıçan testislerinde yoğun hasar izlendi. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler, hücresel kayıplar ile birlikte yoğun tübüler hasar ve atrofik tübül yapıları görüldü. İnterstisyel alanda ise ayrılmalar, ödem ve vasküler kongesyon dikkat çekti. Ayrıca tübül duvarından ayrılmış bazal membran yapısı görüldü. Şekil 4.2 de testislerin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopu görüntüsü verilmiştir.



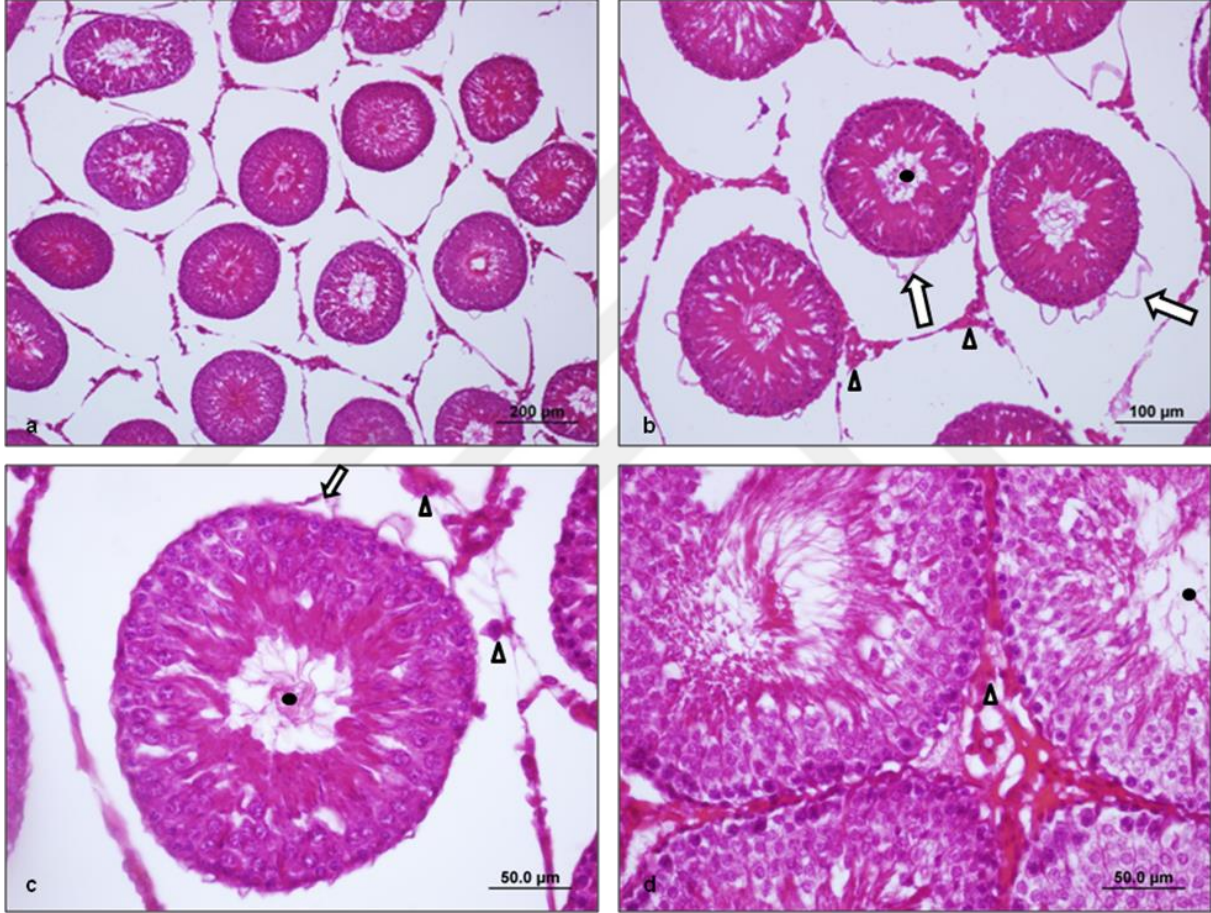
Şekil 4.2 Sigara dumanı grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler, hücresel kayıplar ile birlikte yoğun tübüler hasar (<—>) ve atrofik tübül yapıları (▶) görülmekte. İnterstisyel alanda ise ayrılmalar, ödem ve vasküler kongesyon (*) dikkat çekmekte. Ayrıca tübül duvarından ayrılmış bazal membran yapısı (→) görülmekte (a-d) (bar: 200µm, bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE)

Sigara dumanı + E vitamini grubuna ait deney hayvanlarından alınan testis örneklerinin ışık mikroskopik değerlendirmelerinde E vitamini + Sigara dumanı grubunu oluşturan sıçan testislerinde bazı tübüllerde hasar devam etse de genellikle azalmış tübüller hasar ve normale yakın yapıdaki seminifer tübüller ile devam eden Spermatojenez izlendi. İnterstisyel alanda ise ödemin devam ettiği görüldü. Şekil 4.3 de testislerin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopu görüntüsü verilmiştir.



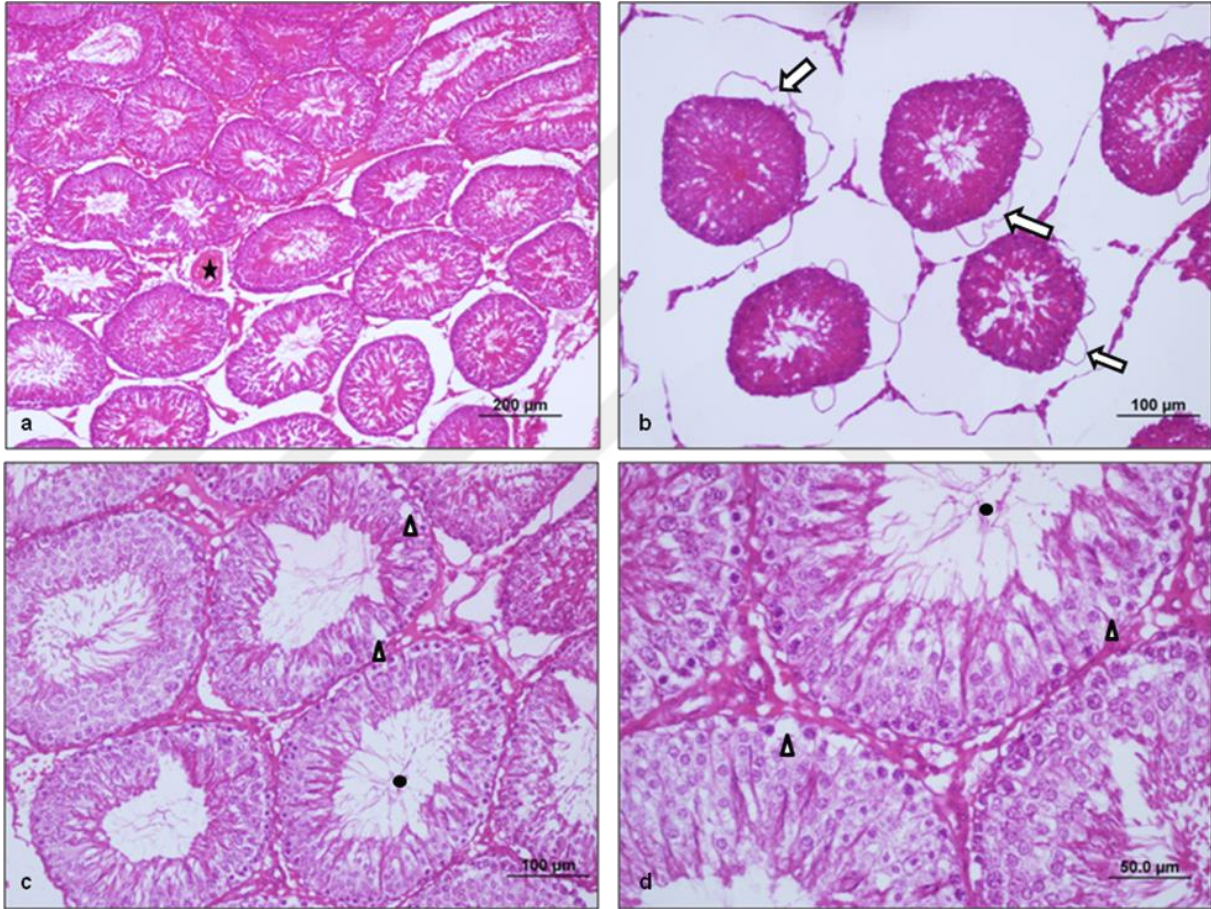
Şekil 4.3 Sigara dumanı + E vitamini grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü. Bazı tübüllerde hasar devam etse de genellikle azalmış tübüller hasar ve normale yakın yapıdaki seminifer tübüller (●) ile devam eden Spermatojenez izlenmekte. İnterstisyel alanda ise ödemin devam ettiği görülmekte (*) (a-d) (bar: 200µm, bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE)

Sigara dumanı + L-NAME grubuna ait deney hayvanlarından alınan testis örneklerinin ışık mikroskopik değerlendirmelerinde tübül duvarından ayrılmış bazal membran yapısı dışında, genel görünümde diğer gruplara göre azalmış tübüler hasar ve normale yakın yapıdaki seminifer tübüller ile devam eden Spermatojenez izlendi. İnterstisyel alan ve Leydig hücreleri normale yakın yapıda gözlemlendi. Şekil 4.4 de testislerin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopu görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.4 Sigara dumanı + L-NAME grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü. Tübül duvarından ayrılmış bazal membran yapısı (→) dışında, genel görünümde azalmış tübüler hasar ve normale yakın yapıdaki seminifer tübüller (●) ile devam eden Spermatojenez izlenmekte. İnterstisyel alan ve Leydig hücreleri (▶) normale yakın yapıda gözlenmekte (a-d) (bar: 200µm, bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE).

Sigara dumanı+E vitamini+L-NAME grubuna ait deney hayvanlarından alınan testis örneklerinin ışık mikroskopik değerlendirmelerinde tübül duvarından ayrılmış bazal membran yapısı ve bazı tübüllerde kısmi hücresel hasar gözlemlense de genel olarak azalmış tübüller hasar ve normale yakın yapıdaki seminifer tübüller ile devam eden Spermatojenez izlendi. İntersisyel alanda birkaç vasküler kongesyon izlense de genel değerlendirmede interstisyel alan ve Leydig hücreleri normale yakın yapıda gözlemlendi. Şekil 4.5 de testislerin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopu görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.5 Sigara dumanı + E vitamini + L-NAME grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü. Tübül duvarından ayrılmış bazal membran yapısı (→) ve bazı tübüllerde kısmi hücresel hasar (▶) gözlemlense de genel olarak azalmış tübüller hasar ve normale yakın yapıdaki seminifer tübüller (●) ile devam eden Spermatojenez izlenmekte. İntersisyel alanda birkaç vasküler kongesyon izlenmekte (*) (a-d) (bar: 200μm, bar: 100μm, bar: 50.0μm, HE).

5- TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada sigara dumanı maruziyetinin neden olduğu testikular oksidatif stres sonucu oluşan hasara, L-NAME ve E vitamininin koruyucu ve tedavi edici etkileri incelenmiştir.

Çalışma kapsamında günlük olarak her bir sıçan için ikişer kalem sigara dumanı maruziyeti sağlanmıştır. Aktif ve pasif sigara içicileri göz önünde bulundurulduğundan sigaraların filtreleri çıkartılarak katran ve gaz fazındaki tüm bileşenlere maruziyet sağlanması amaçlanmıştır.

Sigara kullanımı ülkelerin gelişmiş veya gelişmekte olmasına bakmaksızın yasal olarak kullanılabilen ve bağımlılığın söz konusu olduğu en büyük toplumsal sorunlardan birisidir. Yirminci yüzyılda sigaraya bağlı ölümlerin yüz milyon civarında olduğu, sigara kullanımının önlenmesine yönelik çalışma yapılmazsa bu sayının yirmibirinci yüzyılda bir milyara ulaşacağı uzmanlar tarafından ortaya konulmuştur (Söylemez vd., 2011). Aktif içiciler göz önüne alınarak yapılan bu tahminlere birde pasif içiciler eklenirse durumun ciddiyeti bir kez daha ortaya serilmiş olur. Sigara kullanımının toplumsal bir sorun olması yalnız ölümle ilişkili olmamakta, aynı zamanda toplumun devamlılığı olan üreme üzerine de olumsuz etkileri olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Söylemez vd., 2011; Ozyurt vd., 2006). Bu çalışmalarda sigara dumanı maruziyeti ile leyding hücrelerinde fonksiyonel bozulma, gonadal hormonlarda dengesizlik ve DNA seviyesinde meydana gelen hasar ile spermatozoada azalma olduğu ortaya konulmuştur (Valdes-Socin vd., 2010; Al-Azemi, Omu, Fatinikun, Mannazhath & Abraham, 2009; Gaur, Talekar & Pathak, 2010).

Oksidatif stres, serbest radikal üretimiyle antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması sonucunda hücresel hasarla sonuçlanan bir durum olarak tanımlanır (Jenkins, 2000). Oluşan oksidatif stres antioksidan savunma sistemi ile kontrol edilmeye çalışılsa bile bazen yetersiz kalır ve dışarıdan antioksidanlara ihtiyaç duyulur (Thomas, 1995). Sigaranın serbest radikaller ile testikular oksidatif strese sebep olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Söylemez vd., 2011; Ozyurt vd., 2006).

Sigara, alkol, kadmiyum, sülfür dioksit, bisfenol A, cisplatin ve formaldehitin de içinde bulunduğu pek çok etken testiste oksidatif stresi indüklemektedir. Testiste oksidatif stres ile testis kanseri, testis torsiyonu, varikosel, hipertroidizm, diabet, enfeksiyon, üreme hormonu dengesizliği ve ksenebiyotiklerin olumsuz etkileri gibi sonuçların ortaya çıktığı çalışmalarda saptanmıştır (Aitken & Roman, 2008).

Ön hipofizden salgılanan FSH seminifer tübüllerde sertoli hücrelerine etki ederek testislerin gelişmesini sağlar, sperm proteinlerini ve sperm yapımını arttırır. Ön hipofizden salgılanan bir diğer hormon olan LH ise plazma zar reseptörlerine bağlanır ve leyding hücrelerinden testosteron salgılanmasını uyarır. FSH ve LH hormonlarının salınımını uyan hipotalamus hormonu gonadotropin salıcı hormondur. Yeterli düzeyde testosteron salgılanması durumunda negatif feed-back ile gonadotropin salıcı hormonun salınımı inhibe edilir.

L-NAME tüm NOS izoformlarının inhibitörüdür ve biyolojik sistemlerde NO'nun etkilerini araştırırken in vivo ve in vitro çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Üreme hormonlarının regülasyonunda, nikotine bağlı oluşan hormonal bozukluğun giderilmesi amacıyla L-NAME'nin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda düşük testosteron ve FSH ile yüksek LH düzeyleri, üreme yeteneğinin azalması ile sonuçlanan hipofiz-gonadal eksenin bozulması ile ilişkilendirilmiştir. L-NAME'nin testosteron üzerine iyileştirici etkisi ana etken olmasa da leyding hücre düzeyinde testosteron salgısı üzerinden olduğu ileri sürülmüştür (Oyeyipo, Raji & Bolarinwa, 2015).

Nikotin uygulaması ile erkek üreme hormonları üzerindeki değişimlerin araştırıldığı bir çalışmada testosteron, FSH, LH ve prolaktin düzeylerindeki değişimler incelenmiş ve nikotin uygulaması ile gonadal hormonlarda düzensizlik olduğu belirtilmiştir (Oyeyipo, Raji & Bolarinwa, 2013).

Çalışmamızda testosteron seviyelerinde K grubuna kıyasla S grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma bulunmuştur ($p < 0.001$). Sigarada bulunan bileşenlere bağlı olarak oksidatif stres tetiklenmiş ve hücresel düzeyde testosteron salgılanmasının azalmasına sebep olmuştur. S-E ve S-L gruplarında S grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış testosteronun arttığı belirlenmiştir (sırasıyla: $p < 0.05$, $p < 0.01$). S-E-L grubunda ise S grubuna kıyasla artış gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Normal fizyolojik durumlarda progesteron ve testosteron seviyelerine NO'nun inhibitör etkisinin olabileceği öne sürülen bir çalışmada L-NAME'nin steroid hormonlar üzerine etkisi araştırıldığında, L-NAME uygulaması ile değişen NO sentezinin testis kan akışında önemli bir etki yaparak testosteron düzeyini arttırdığı ortaya konulmuştur (Sharma vd., 1998). Weiner vd. ile Hull vd. farklı zamanlarda yaptıkları çalışmalar ile testosteronun NOS aktivitesini arttırdığını söylemişlerdir (Weiner vd., 1994; Hull vd., 1999).

Yaşa ve/veya diyabete bağlı olarak testiste oluşan oksidatif stres sonucunda testosterondaki azalmanın E vitamini kullanılarak düzeltilebileceğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Aybek, Aybek, Rota,

Şen & Akbulut, 2008). Sönmez vd.'nin testis dokusunda yapmış oldukları bir çalışmada oksidatif stres durumunda azalmış olan testosteron düzeyinin E vitamini ile arttırılabileceğini göstermişlerdir (Sönmez, Yüce & Türk, 2007). Rao ve Sharma, yapmış oldukları çalışmada androjen sentezindeki bozulma ile testosteron seviyesinde azalmanın olduğunu ve E vitamini uygulaması ile testosteron seviyesinin normal düzeye çıkarılabileceğini göstermişlerdir (Rao & Sharma, 2001).

Testosteron düzeyindeki düşüşün hipofiz bozukluğundan ziyade testikular bozukluktan kaynaklı olduğu ileri sürülmüştür (Oyeyipo vd., 2013). Yaptığımız çalışma neticesinde sigara dumanı maruziyeti sonucu oluşan testosteron azalmasına, güçlü bir antioksidan olan E vitamininin reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu oksidatif hasarı durdurması ile ve NOS inhibitörü olan L-NAME'nin NO miktarını azaltarak testosteron salınımını arttırdığını ve NOS ile testosteron arasında karşılıklı regülasyonun olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda K grubuna kıyasla S grubunun LH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuştur ($p < 0.001$). S-E, S-L ve S-E-L gruplarının LH düzeylerinde ise sigara dumanı maruziyeti sonucu oluşan artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır (sırasıyla: $p < 0.001$, $p = 0.001$, $p < 0.001$).

Testosterondaki düşüğe bağlı olarak LH düzeyinde artış olması, ana sebep olmasa bile negatif feed-back mekanizmasının durması ile açıklanabilir (Oyeyipo vd., 2013).

Hormon salınımında NO'nun önemli bir yere sahip olduğunu gösteren bir çalışmada ön hipofizden salgılanan gonadotropin salıcı hormon kaynaklı LH salınımında azalma olduğu ortaya konmuştur (Ceccatelli, 1997). Başka bir çalışmada ise NO'nun sentezlenmesinde rol alan NOS aktivitesinin leyding hücrelerinde parakrin etkiye sahip olduğu söylenmektedir (Davidoff, Middendorff, Mayer & Holstein, 1995).

Hipofiz gonadal eksen fonksiyonlarına E vitamininin etkisine bakılan bir çalışmada yedi ay süresince E vitamini uygulamasına bağlı olarak LH düzeylerinde E vitamini yoksunluğunda azalma gözlenirken, E vitamini takviyesi olduğunda artış olduğu görülmüştür. Aynı çalışma kapsamında uygulama süresine bağlı olarak E vitamininin dört haftaya kadar LH seviyesini azalttığı sekizinci haftada ise arttırdığı görülmüştür. Önceki çalışmalarda E vitamini yoksunluğunda leyding hücrelerinin dejenere olduğu ve Spermatojenezin kayda değer şekilde azaldığı Umeda vd. tarafından bildirilmiş, E vitamini takviyesi ile normale döndüğü ileri sürülmüştür (Umeda, Kato, Muta & Ibayashi, 1982). Gupta vd. tarafından yapılan

çalışmada leyding hücrelerinin normal fonksiyonlarının korunmasında E vitamininin önemi gösterilmiştir (Gupta, Gupta, Dhakal, Thakur & Ahnn, 2004).

Bu çalışma ile NOS inhibitörü olan L-NAME'nin NO sentezini azaltarak gonadotropin salıcı hormonun stimüle ettiği LH salınımıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu sonuç Oyiyevo vd. ve Ceccatelli tarafından yapılan çalışmalarla uyumludur. Ayrıca dejenere olmuş testikular hücrelerin azalmış olabileceği ve gonadal eksenin düzelmiş olabileceği E vitamini uygulamasıyla açıklanabilir. Umeda vd.'nin yaptığı çalışma ile paralel sonuçlar elde edilmiştir. E vitamini ve L-NAME birlikte uygulandıklarında da olumlu sonuç vermiştir.

FSH düzeylerinin değerlendirilmesi neticesinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. NO salınımı ile FSH salgılanması arasında pozitif ilişki olduğunu ileri süren çalışmaların aksine bazı çalışmalar FSH düzeyindeki bozukluğun L-NAME uygulaması ile düzeltildiğini belirtmiştir (Kosior-Korzecka & Bobowiec, 2006; Oyeyipo vd., 2015). E vitamininin testikular fonksiyonlarda ve hipofiz-gonadal eksenindeki önemi Cooper vd.'nin yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada testiste gözlenen lezyonun E vitamini ile düzeltilebileceği ileri sürülmüştür (Cooper, Kling & Carpenter, 1987). Çalışmamızda bu çalışmalarla paralel olabilecek sonuçlar elde edilememiştir. Gruplar arası FSH seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememesi, LH salınımının GnRH düzeyinde küçük değişikliklere eşlik etmesi ancak FSH'nın böyle GnRH değişimlerine geç cevap vermesinden dolayı olabileceğini düşündürdü. Oksidatif hasar sonucu testis hücrelerindeki dejenerasyonun FSH salınımı üzerine ne denli etkisi olduğu tam anlamıyla bilinmemektedir. Çalışmamızın sonucu, FSH salınımindaki düzenleyicilerin uyguladığımız maddelerle veya dozlarıyla etkileşiminin zayıf olduğunu düşündürdü.

Sigara dumanı maruziyeti kaynaklı testikular oksidatif stres sonucunda testiste lipit peroksidasyonunun belirlenmesi için doku MDA seviyeleri ölçüldü. K grubuna kıyasla S grubunda MDA seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı saptandı ($p < 0.001$). MDA seviyesinde ki bu artış lipit peroksidasyonuna ve doku hasarına işaret etmektedir. S-E, S-L ve S-E-L gruplarında ise MDA seviyelerinde K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark yokken ($p > 0.05$), S grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.01$).

Vücutta hücre zarının yapısında bulunan lipitler veya lipit içeren moleküller E vitamini ile korunarak reaktif serbest radikallerin hücreye zarar vermesi engellenir. Dış etkilerle oluşan lipit radikalleri oksijenle reaksiyona girerek reaktif lipitperoksidi oluşturur. Oluşan lipitperoksit lipit ve

lipoproteinleri hasara uğratar. E vitamini bu reaktif lipitperoksid ile reaksiyona girerek stabilitesi yüksek tokoferol radikallerini ve hidroperoksidi oluşturur ve hasarı engeller. Tokoferol radikali ortamda bulunan C vitamini veya glutatyon peroksidaz ile reaksiyona girerek rejenere olur. C vitamini ve glutatyon peroksidaz ise NADPH ile rejenere olur (Balci, 1995).

Yapılan çalışmalarda doğal antioksidan olan E vitamininin oksidan-antioksidan dengeyi koruyarak çeşitli etkenlerle oluşan oksidatif stresi engellediği ortaya konulmuştur (Coban vd., 2013; Keskes-Ammar vd., 2003; Sahoo, Roy & Chainy, 2008). Beyin dokusunda yapılan bir çalışmada da E vitamini uygulaması ile NO kaynaklı lipit peroksidasyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (Escames vd., 1997). Testis dokusunda yapılan çalışmalarda ise farklı sebeplerle oluşturulan oksidatif hasar sonucu MDA seviyesindeki artışın E vitamini kullanılarak düşürüldüğü ortaya konulmuştur (Zhou, Qiu, Zhang, Tian & Wang, 2006; Gupta vd., 2004).

Argininden NO sentezini katalize eden enzim olan NOS enzimi L-NAME ile inhibe edilmekte, böylece oksidatif bir durumda fazla miktarda NO sentezlenmesi azaltılmış olmaktadır. L-NAME'nin de üreme hücrelerine NO üzerinden etkili olduğu çalışmalarda ortaya konulmuştur (Bahmanzadeh, Abolhassani, Amidi, Salehi & Abbasi, 2008). Barlas ve Hatiboğlu L-NAME uygulaması ile ilgili yaptıkları çalışmada testis dokusundaki NO seviyesinde azalma olduğunu göstermişlerdir (Barlas, Hatiboğlu, 2002).

Çalışmamızda E vitamininin sigara kaynaklı oksidatif hasarı azalttığı ve MDA seviyesindeki artışı engellediği bulunmuştur ($p < 0.001$). Bir diğer yandan NOS enzimini inhibe ederek NO sentezini azaltan L-NAME'nin sigara kaynaklı oluşan lipit peroksidasyonundaki artışı azalttığı çalışmamızda ortaya konulan bir diğer bulgudur ($p < 0.01$). S-E, S-L ve S-E-L grupları göz önüne alındığında E vitamininin L-NAME'ye kıyasla MDA seviyesinde ki azalmada daha iyi sonuç verdiği görülmektedir (sırasıyla: $p < 0.001$, $p < 0.01$). E vitamini hücre bütünlüğünü koruma görevini membranda bulunan lipit ve türevleri ile etkileşime geçerek yaptığından daha iyi sonuçlar elde edildiği düşünülmektedir. Çalışmamızda E vitamininin koruyucu etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarla paralel sonuçlar bulunmuştur. L-NAME'nin ise NO sentezini inhibe etmesinden dolayı NO harici reaktif serbest radikallerden kaynaklı oksidatif hasarı gidermede etkisinin E vitaminine kıyasla az olduğu düşünülmüştür. Bulduğumuz sonuçlar L-NAME'nin üreme hücrelerine etkisini araştıran çalışmaları destekler niteliktedir.

Çalışmamızda S grubu K grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak doku GSH düzeyinde anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p < 0.001$). S-E, S-L ve S-E-L gruplarında ise K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ancak S-E, S-L ve S-E-L grupları S grubuna

kiyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla: $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.01$).

E vitamininin testiste meydana gelen hasarlara karşı koruyucu etkisi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Uzun, Kalender, Durak, Demir & Kalender, 2009). Yapılan çalışmalarda testis dokusundaki oksidatif stres üzerine E vitamininin etkisi incelenmiş ve GSH seviyesinin oksidatif strese bağlı olarak azaldığı ve E vitamini uygulaması ile normal seviyede kaldığı bulunmuştur (Zhou, 2006).

Testikular oksidatif strese yönelik yapılan başka bir çalışmada ise E vitamini uygulanması ile GSH seviyesinin normale döndüğü bulunmuştur (Sahoo, Roy & Chainy, 2008).

NO'nun sebep olduğu oksidatif stresin belirteçlerinden olan GSH seviyesinin NO miktarının artması ile ters orantılı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Schild vd., 2003). GSH miktarının oksidatif strese bağlı olarak azaldığı ve çeşitli inhibitörlerle (L-NAME, vs.) NO sentezinin azaltılması sonucunda GSH seviyesinin normal aralığa döndüğü farklı dokularda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu çalışmaların ışığında, testiste artan NO seviyesi L-NAME ile düşürülüp olası testikular oksidatif stres giderilebilir.

Süperoksit radikale karşı savunma sistemindeki GSH kilit bir role sahiptir. Dokudaki GSH konsantrasyonu ve hücrel glutatyondaki sülfidril grubunun disülfide yükseltgenme hızı oksidatif stresin durumu hakkında bilgi verir. Süperoksit radikali ve lipit peroksidasyon miktarı ile GSH arasında ters orantı olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Meister, 1983). Çalışmamız da yalnız S grubunda K grubuna kıyasla anlamlı azalma bulundu. S grubunda GSH düzeyinin düşmesi sigaradan kaynaklı olarak oluşan oksidatif stresin GSH tüketimini arttırması ile açıklanabilir. GSH tüketimi oksitlenmiş ve zarar görmüş moleküllerin onarılması ve pekçok hücrel fonksiyonun düzenlenmesi ile olmaktadır. S-E, S-L ve S-E-L gruplarında ise GSH'ın K grubuna kıyasla anlamlı fark göstermemesi bizi, E vitamininin ve L-NAME'nin oksidatif stresi azaltarak GSH tüketimini azalttığı sonucuna ulaştırabilir. Sonuçlarımız literatürü desteklemektedir.

CAT enzim aktivitelerini ölçtüğümüzde, K grubuna kıyasla S grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). S-E ve S-L gruplarında K grubuna kıyasla anlamlı bir fark görünmezken S grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış saptanmıştır (sırasıyla: $p<0.05$, $p<0.01$). S-E-L grubunda ise diğer gruplara kıyasla anlamlı bir fark bulunmamıştır. E vitamini ve L-NAME'nin ayrı olarak uygulandığı gruplarda CAT aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde normal düzeye çıktığı ölçülmüşken birlikte uygulandığı grupta ise anlamlı düzeyde olmasa da S grubuna kıyasla artış bulunmuştur.

CAT enzimi oksidatif stresin belirlenmesinde kullanılabilen önemli enzimlerden birisidir. Oksidatif stres ile konsantrasyonu artan H₂O₂'nin su ve oksijene parçalanmasını katalize ederek antioksidan özellik gösterir. Sigaranın gaz ve katran fazlarında bulunan bileşenlerden dolayı hücresel düzeyde serbest radikal miktarı artar. Önemli serbest radikallerden biri olan H₂O₂ düzeyindeki artış ortamdaki CAT aktivitesinde azalmaya neden olur. Yapılan çalışmalarda testikular oksidatif stres durumunda CAT aktivitesinde azalma saptanmıştır. E vitamini uygulaması ile testikular oksidatif strese bağlı CAT aktivite azalmasının normale getirildiği yine bu çalışmalarda ortaya konulan sonuçlardandır (Sahoo vd., 2008).

Yapılan bir başka çalışmada testisteki antioksidan savunma sisteminin hasar görmesi sonucu CAT aktivitesindeki azalmanın E vitamini uygulaması ile normale çıkarıldığı ortaya konulmuştur (Ognjanović vd., 2010). E vitamini serbest radikal zincir reaksiyonunu kırarak oksidatif stresi azaltmakta ve bu sebeple antioksidanların seviyeleri normal değerlere dönmektedir.

Testikular oksidatif stres üzerine yapılan farklı çalışmalarda azalan CAT düzeyinin antioksidan ilavesi ile normal düzeye çıkartıldığı gösterilmiştir (Armagan vd., 2008). Karaciğer ve böbrek üzerinde yapılan çalışmalarda da CAT enziminin antioksidan özelliği ortaya konulmuş ve artan oksidatif strese bağlı olarak oluşan H₂O₂'nin su ve oksijene parçalanması reaksiyonunu katalize ettiğinden hücresel düzeyde azalma olduğu saptanmıştır (Balahoroğlu, Dülger, Özbek, Bayram & Şekeroğlu, 2008).

Çeşitli çalışmalarda oksidatif stres sonucu düşmüş olan CAT aktivitesinin L-NAME uygulaması ile normale çıkarılabileceği ortaya konulmuştur (Shafaroodi vd., 2010). Aynı zamanda bu çalışmalar L-NAME'nin yalnız NOS inhibitörü olarak değil bununla beraber reaktif serbest radikallerin stabil hale getirilmesinde antioksidan savunma sistemine katkısı olduğunu da göstermektedir. Ahmed & Kurkar tarafından testis dokusunda yapılan bir çalışmada oksidatif stresin ve NO'nun aşırı üretiminin sonucu olarak CAT aktivitesinde azalma olduğu ortaya konulmuştur (Ahmed & Kurkar, 2014).

Sigara dumanı maruziyeti sonucu oluşan testikular oksidatif stresin neden olduğu CAT düzeyindeki azalmanın doğal bir antioksidan olan E vitamini ile normal düzeye çıkarılabileceği çalışmamızda bulunmuştur. Oksidatif stresle mücadelede antioksidan savunma sisteminin birbiri ile ilişkili olarak çalıştığı bir kez daha görülmüş olmaktadır. NO inhibitörü olan L-NAME'nin hem NOS enzim kompleksini inhibe etmekte hem de antioksidan savunma sistemine katkı sağlayarak CAT aktivitesini arttırmada etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar literatürdeki çalışmaları desteklemektedir. Bununla beraber E vitamini ve L-NAME uygulamasının birlikte değil de ayrı

olarak yapılmasının daha verimli olduğu çalışmamızda gösterilmiştir. Birlikte uygulanması ile CAT aktivitesinde normale dönme gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Çalışmamızda doku NO seviyesi ölçülmüş ve K grubuna kıyasla S grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış bulunmuştur ($p < 0,01$). Sigaranın gaz ve katran fazında bulunan çeşitli bileşenlerden kaynaklı serbest radikaller oksidatif stresi tetiklemiştir. Oksidatif streste etkili olan pek çok serbest radikalden birisinin de NO olduğu dokudaki seviyesinin artmış olmasından anlaşılmaktadır. S grubuna kıyasla S-E, S-L ve S-E-L gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma gözlenmiştir (sırasıyla: $p < 0,01$, $p < 0,01$, $p < 0,05$). S-E grubunda E vitamininin etkisi ile oluşan oksidatif stres giderilmiş ve doku NO seviyesi normal seviyesine düşmüştür. S-L grubunda ise L-NAME uygulanmış ve NOS'ın inhibe edilmesiyle NO seviyesinin normal seviyeye düştüğü düşünülmüştür. S-E-L grubunda da S-E ve S-L gruplarında olduğu gibi NO seviyesini normal seviyeye düşürdüğü bulunmuştur.

NO oksidatif streste çok hassas ve önemli bir yere sahiptir. NO kendi başına önemli bir serbest radikal olmasının yanında oksidatif strese diğer serbest radikallere dolaylı yoldan etki ederek de katkıda bulunmaktadır. NO sentezinde anahtar role sahip olan NOS prooksidatif bir enzimdir. NOS inhibisyonu ile NO ve NO etkili serbest radikallerin oluşumu engellenebilir (Söylemez, 2011). NOS enziminin inhibisyonunda arginin türevi bileşikler sıklıkla kullanılmaktadır (Víteček, Lojek, Valacchi & Kubala, 2012).

NOS inhibitörlerinden arginin türevi olanlar içinde L-NAME ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmış ve L-NAME ile NO sentezinin azaltıldığı ortaya konulmuştur (Lerner, 2015; Vardareli, Dundar, Angin, Saricam & Inal, 2003; Pfeiffer, Leopold, Schmidt, Brunner & Mayer, 1996). Testiste oksidatif stres durumunda NO'nun orjininden itibaren iki hücre çapına kadar oksidatif etkilere sahip olduğu Szabo vd. tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir (Szabo, Ischiropoulos, & Radi, 2007). Turner and Lysiak yaptıkları çalışmada normal NO düzeyinin leyding hücrelerine olumsuz etkisinin düşük olmasına rağmen yüksek NO düzeyinin oksidatif strese ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Turner & Lysiak, 2008). Shiraishi vd. tarafından yapılan çalışmada testiste NO üretiminin L-NAME kullanılması ile inhibe edildiği ortaya konulmuştur (Shiraishi, Yoshida & Naito, 2003).

Yapılan bazı çalışmalarda ise arginin türevi bileşiklerden olan L-NAME'nin uygulama süresine bağlı olarak NOS inhibitörü değil de aktivatörü olarak davrandığı ortaya atılmıştır (Kopincová, Púzserová & Bernátová, 2012).

Testis dokusunda iskemi reperfizyonla oluşturulan oksidatif hasarın giderilmesinde antioksidan kullanımı ile, artan NO miktarı normal değerlerine düşürülmüştür (Koltuksuz vd., 2000). Artan oksidatif stresin bir belirteci olarak NO miktarının düzenlenmesinde E vitamini ve melatonin uygulandığı bir çalışmada da E vitamininin oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Escames vd., 1997).

NO'nun kendi veya dolaylı olarak etki ettiği diğer serbest radikallerden kaynaklı oksidatif streste E vitamini, doğal antioksidan özelliği ile hücresel düzeyde oluşan reaktif lipidperoksidin zincirleme reaksiyonunu kesmekte ve oksidan-antioksidan dengenin korunmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Escames vd. tarafından yapılan çalışmayı destekler nitelikte sonuç elde edilmiştir. NO sentezinin katalitik etkinliğini üstlenen NOS enzimi L-NAME ile inhibe edilmiştir. Bu yolla NO ve NO etkili serbest radikal oluşumu azaltılmıştır. L-NAME'nin NOS inhibitörü olması sebebiyle E vitamininden daha anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlarımız yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Çalışmamız E vitamini ve L-NAME tedavisi ile sigara kaynaklı oksidatif hasarın giderilebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda MPO enzim aktivitesi ölçülmüş ve K grubuna kıyasla S grubunda MPO aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış bulunmuştur ($p < 0.01$). S-E ve S-E-L gruplarında K grubuna kıyasla anlamlı bir değişim olmazken S grubuna kıyasla anlamlı düzeyde MPO aktivitesinin azaldığı saptanmıştır ($p < 0.05$). Ortamda serbest radikallerin artmasıyla MPO aktivitesinde artış gözlenmişken antioksidan ilave edilmesiyle bu artış görülmemektedir.

MPO nötrofiller tarafından oksidanların üretiminde temel bir rol oynamaktadır. Nötrofiller serbest oksijen radikalleri için önemli bir kaynaktır ve bu nedenle birçok inflamatuvar bozuklukta oluşan doku hasarında önemli bir efektör olarak kabul edilir (Sener vd., 2003). Çeşitli dokularda yapılan oksidatif hasarın giderilmesi çalışmalarında MPO aktiviteleri ölçülmüş ve antioksidan kullanımı ile oksidatif hasar ile artan MPO aktivitesinde azalma saptanmıştır (Balahoroğlu vd., 2008).

Yapılan çalışmalarda hücresel oksidatif hasarın belirlenmesinde MPO önemli bir belirteç olmuş, doğal bir antioksidan olan E vitamini kullanımı ile reaktif serbest radikal reaksiyonları kırıldığından MPO aktivitesindeki artışın normal aralığa indirilebildiği saptanmıştır (Galeano vd., 2001).

Asetaminofen kaynaklı karaciğer ve böbrek toksisitesinin giderilmesinde E vitamininin etkisinin incelendiği bir çalışmada, oluşan toksisiteye bağlı reaktif ara ürünlerin MPO aktivitesini arttırdığı ve E vitamini kullanılması ile MPO aktivitesinin normal değerlere döndüğü bulunmuştur

(Şener, Şehirli & Ayanoglu-Dülger, 2003). Adedara vd.'nin yapmış olduğu üreme toksisitesi ile ilgili çalışmada antioksidan uygulaması ile, artmış MPO aktivitesinin düşürülerek toksisitenin önüne geçilebileceği gösterilmiştir (Adedara, Subair, Ego, Oyediran & Farombi, 2017). Uz vd. testis dokusunda yapmış oldukları çalışmada antioksidan ilavesi ile MPO aktivitesinin azaldığını ve oksidan-antioksidan dengenin yeniden sağlandığını göstermişlerdir (Uz vd., 2012).

E vitamini doğal bir antioksidan olması sebebiyle çalışmamızda kullanılmış ve sigara dumanı maruziyeti sonucunda oksidanlar lehine olan durumu düzeltmede olumlu sonuç vermiştir. Bulgularımız literatürdeki çalışmalarla paralellik göstermektedir. L-NAME uygulanan grupta ise MPO aktivitesinin K grubundaki düzeye inmemiş olması L-NAME'nin MPO aktivitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Literatürdeki çalışmalara baktığımızda testikular oksidatif stresin giderilmesi için L-NAME kullanımı ile MPO aktivitesi arasında bir ilişkiye rastlanmamıştır. Çalışmamızda L-NAME uygulaması ile oksidatif stresin giderilmesinde MPO aktivitesinin belirteç olarak kullanılmasının anlamlı olmadığı görülmüştür.

Sigara dumanı maruziyeti sonucu oluşan testikular oksidatif stres için E vitamini ve L-NAME'nin ayrı ayrı kullanımlarında daha iyi sonuç alınabileceği çalışmamızda görülmüştür. Testikular hasarın belirlenmesi için ölçtüğümüz hormonlardan testosteron düzeyindeki artış ile LH düzeyindeki azalış ve hücresel düzeyde oluşan oksidatif hasarın belirlenmesinde değerlendirdiğimiz MDA, NO düzeyleri ile MPO aktivitesinde yükselme, GSH düzeyi ile CAT aktivitesindeki azalma sonucunda, sigara dumanı maruziyeti sonucu gonadal hormonlarda düzensizlik olduğu ve oksidatif stresin olduğu görülmüştür. E vitamini ve L-NAME uygulanması ile hormonal düzensizlik ve oksidatif hasarın ekseriyetle önüne geçilmiştir. Ancak E vitamini ve L-NAME'nin birlikte uygulandığı grupta bazı değerler normal seviyeye yaklaşıp da istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmemektedir. Çalışmamız neticesinde sigara dumanı maruziyeti ile oluşan testikular oksidatif stresi düzeltmede E vitamini ve L-NAME'nin olumlu etkileri olduğunu düşünmekteyiz.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda E vitamini ve L-NAME'nin sigara dumanı maruziyeti sonucu oluşan testikular oksidatif strese etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla testis doku homojenatında MDA, GSH, NO düzeyleri ile CAT ve MPO enzim aktiviteleri, kardiyak yolla alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda ise gonadal hormonlardan testosteron, FSH ve LH seviyeleri ölçüldü.

Sonuç olarak;

Sigara dumanına maruz bırakılan sıçanlarda serumda ölçülen testosteron seviyesi K grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaldı. S-E ve S-L gruplarında hormonal bozukluğun S grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artarak düzeldiği bulunmuştur. S-E-L grubunda ise E vitamini ile L-NAME'nin birlikte verilmesi testosteron seviyesinde anlamlı bir düzelme göstermemiştir.

FSH düzeyinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken E vitamini ve L-NAME uygulamalarında S grubuna kıyasla anlamlı olmayan artışlar bulundu.

Testosteron üretimini uyaran LH düzeyi K grubuna kıyasla S grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttı. E vitamini ve L-NAME uygulaması ile S-E, S-L ve S-E-L gruplarında S grubuna kıyaslandığında LH düzeyinin anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu.

Testis doku homojenatında yapılan ölçümlerde MDA düzeyinin K grubuna kıyasla S grubunda anlamlı bir farkla arttığı, S-E, S-L ve S-E-L gruplarında S grubuna kıyasla anlamlı bir farkla azaldığı bulundu.

GSH düzeyinin K grubuna kıyasla S grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir farkla azaldığı, S-E, S-L ve S-E-L gruplarında S grubuna kıyasla anlamlı bir farkla arttığı belirlendi.

Biyolojik sistem için optimal koşullarda faydasından bahsedilse de yüksek düzeylerde bulunduğu zararlı bir madde olan NO düzeyi K grubuna kıyasla S grubunda anlamlı bir farkla arttı, S-E, S-L ve S-E-L gruplarında S grubuna kıyasla anlamlı bir farkla azaldı.

Antioksidan enzimlerden CAT enzim aktivitesi K grubuna kıyasla S grubunda anlamlı bir farkla azalırken, S-E ve S-L gruplarında S grubuna kıyasla anlamlı bir farkla arttığı bulundu. E vitamini ve L-NAME'nin birlikte uygulandığı S-E-L grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmedi.

Bir diğer antioksidan enzim MPO aktivitesi S grubunda K grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artarken S-E ve S-E-L gruplarında S grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaldı.

Çalışmamızda sadece nikotin uygulaması ile oluşturulan oksidatif strese ek olarak sigarada bulunan tüm maddelere maruziyet sonucu oluşan oksidatif stresin durumu göz önüne alındı ve E vitamini ve L-NAME kullanımı ile hasarın ne denli giderilebileceği araştırıldı. Bulgularımız sigara dumanı maruziyeti sonucu oluşan testikular oksidatif stresin E vitamini ve L-NAME ile düzeltilebileceğini göstermektedir. Çalışmamıza istinaden pasif veya aktif sigara kullanımı ile oluşan üreme sistemi üzerindeki hasarın tedavi edilmesine yönelik çalışmaların geliştirilmesi ile hem sosyal hem de toplumsal açıdan faydalar elde edilebileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Adedara, I. A., Subair, T. I., Ego, V. C., Oyediran, O., & Farombi, E. O. (2017). Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats. *Chemico-biological interactions*, 263, 88-98.

Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.

Ahmed, M. A., & Kurkar, A. (2014). Effects of opioid (tramadol) treatment on testicular functions in adult male rats: The role of nitric oxide and oxidative stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 41(4), 317-323.

Aitken, R. J., & Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1(1), 15- 24.

Aladağ, M. A., Türköz, Y., & Özerol, İ. H. (2000). Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 20(2), 107-111.

Al-Azemi, M. K., Omu, A. E., Fatinikun, T., Mannazhath, N., & Abraham, S. (2009). Factors contributing to gender differences in serum retinol and α -tocopherol in infertile couples. *Reproductive biomedicine online*, 19(4), 583-590.

Altug, S., Demiryürek, A.T, Kanzık, İ.,(1998). Nitrik Oksit Ve Peroksinitritin Miyokard Üzerindeki Etkileri, *FABAD J. Pharm. Sci.*, 23: 153-159.

Andersen, A. N., Semczuk, M., & Tabor, A. (1984). Prolactin and Pituitary-Gonadal Function in Cigarette Smoking Infertile Patients. *Andrologia*, 16(5), 391-396.

Arıncı, K., & Elhan, A. (2006). *Anatomi*, 1. Cilt, Güneş Kitabevi, ISBN, 975-7467-29-4, Ankara.

Armagan, A., Uzar, E., Uz, E., Yilmaz, H. R., Kutluhan, S., Koyuncuoglu, H. R., ... & Serel, T. A. (2008). Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Human & experimental toxicology*, 27(7), 547-552.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Aslan, R., Şekeroğlu, M. R., & Bayiroğlu, F. (1995). Serbest radikal türlerin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma. Sağlık Bil. Derg, 2, 137-142.

Aslan, R., Şekeroğlu, M. R., Gültekin, F., & Bayiroğlu, F. (1997). Blood lipoperoxidation and antioxidant enzymes in healthy individuals: Relation to age, sex, habits, lifestyle and environment. Journal of Environmental Science & Health Part A, 32(8), 2101-2109.

Atallk, K. E., & Dogan, N. (1997). Nitrik oksit ve fizyolojik etkileri. Genel Tıp Dergisi; 7(3):167-9

Ataman, S. (2007). Sigara kullanımının oksidatif stres ve serum mineral madde düzeylerine etkisi (Doctoral dissertation, Adnan Menderes Üniversitesi).

Aybek, H., Aybek, Z., Rota, S., Şen, N., & Akbulut, M. (2008). The effects of diabetes mellitus, age, and vitamin E on testicular oxidative stress. Fertility and sterility, 90(3), 755-760.

Bahmanzadeh, M., Abolhassani, F., Amidi, F., Sh, E., Salehi, M., & Abbasi, M. (2008). The effects of nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) on epididymal sperm count, motility, and morphology in varicocelized rat. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 16(1), 23-28.

Balahoroğlu, R., Dülger, H., Özbek, H., Bayram, I., & Şekeroğlu, M. R. (2008). Protective effects of antioxidants on the experimental liver and kidney toxicity in mice. Eur J Gen Med, 5(3), 157-164.

Balcı, E. (1995). Doğal E vitamini hayat iksiri. Tur ofset, İstanbul.

Barlas, M., & Hatiboğlu, C. (2002). The effect of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. International urology and nephrology, 34(1), 81-86.

Bilir, N., Özcebe, H., Ergüder, T., & Mauer-Stender, K. (2012). Tobacco control in Turkey: story of commitment and leadership. Copenhagen, Denmark.

Bridges, A. B., Scott, N. A., McNeill, G. P., Pringle, T. H., & Belch, J. J. F. (1992). Circadian variation of white blood cell aggregation and free radical

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

indices in men with ischaemic heart disease. *European heart journal*, 13(12), 1632-1636.

Bruhwyler, J., Chleide, E., Liégeois, J. F., & Carreer, F. (1994). Nitric oxide: a new messenger in the brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 17(4), 373-384.

Ceccatelli, S. (1997). Expression and plasticity of NO synthase in the neuroendocrine system. *Brain research bulletin*, 44(4), 533-538.

Cengiz, S. (2007). Immobilization of catalase onto clays / Çeşitli killer üzerine katalaz immobilizasyonu, Master's thesis, DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY

Coban, J., Bingul, I., Yesil-Mizrak, K., Dogru-Abbasoglu, S., Oztezcan, S., & Uysal, M. (2013). Effects of carnosine plus vitamin E and betaine treatments on oxidative stress in some tissues of aged rats. *Current aging science*, 6(2), 199-205.

Cooke, MD, J. P., & Dzau, MD, V. J. (1997). Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annual review of medicine*, 48(1), 489-509.

Cooper, D. R., Kling, O. R., & Carpenter, M. P. (1987). Effect of vitamin E deficiency on serum concentrations of follicle-stimulating hormone and testosterone during testicular maturation and degeneration. *Endocrinology*, 120(1), 83-90.

Cortas, N. K., & Wakid, N. W. (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clinical chemistry*, 36(8), 1440-1443.

Çekmen, M. B., Turgut, M., Türköz, Y., Aygün, A. D., & Gözükara, E. M. (2001). Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrics*, 10(4), 226-235.

Davidoff, M. S., Middendorff, R., Mayer, B., & Holstein, A. F. (1995). Nitric oxide synthase (NOS-I) in Leydig cells of the human testis. *Archives of histology and cytology*, 58(1), 17-30.

Dejam, A., Hunter, C. J., Schechter, A. N., & Gladwin, M. T. (2004). Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 32(3), 423-429.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Demir, R. (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara.

Diplock, A. (1998). Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59.

Dündar, Y. (2000). Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon Kocatepe Üniversitesi.

Dündar, Y., & Aslan, R. (1999a). Oksidan-antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. Hayvancılık Araştırma Dergisi, 9(1-2), 32-39.

Dündar, Y., & Aslan, R. (1999b). Hücre Moleküler Statüsünün Anlaşılması ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller – Antioksidanlar. İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi, 2(2), 134-142.

Elliott, J. G. (1999). Application of antioxidant vitamins in foods and beverages: Developing nutraceuticals for the new millenium. Food Technology, 53(2), 46-48.

Elsayed, N. M., & Bendich, A. (2001). Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. Nutrition Research, 21(3), 551-567.

Escames, G., Guerrero, J. M., Reiter, R. J., Garcia, J. J., Munoz-Hoyos, A., Ortiz, G. G., & Oh, C. S. (1997). Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. Neuroscience letters, 230(3), 147-150. ISO 690

Evelson, P., Ordóñez, C. P., Llesuy, S., & Boveris, A. (1997). Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 38(2-3), 215-219.

Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. Annual review of biochemistry, 44(1), 147-159.

Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. Science, 201(4359), 875-880.

Friedrich, W. (1987). Handbuch der vitamine. Wien etc: Urban Schwarzenberg.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Galeano, M., Torre, V., Deodato, B., Campo, G. M., Colonna, M., Sturiale, A., ... & Altavilla, D. (2001). Raxofelast, a hydrophilic vitamin E-like antioxidant, stimulates wound healing in genetically diabetic mice. *Surgery*, 129(4), 467-477.

Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2006). *Color Textbook of Histology E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Gaur, D. S., Talekar, M. S., & Pathak, V. P. (2010). Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian journal of Pathology and Microbiology*, 53(1), 35.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of biological chemistry*, 177(2), 751-766.

Gupta, R. S., Gupta, E. S., Dhakal, B. K., Thakur, A. R., & Ahnn, J. (2004). Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Mol. cells*, 17(1), 132-139.

Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, 41(12), 1819-1828.

Güray, A., Samancı, N., Ovalı, F., & Dağoğlu, T. (1997). Nitrik Oksit: Fizyolojisi ve Klinik Önemi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 17(2), 115-119.

Gürdal, F., & Ademoğlu, E. (2005). *Biyokimya*. Nobel Kitap Evi, 746-747.

Harber, F., & Weiss, J. (1934, November). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. In *Proc. R. Soc. Lond. A* (Vol. 147, No. 861, pp. 332-351). The Royal Society.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, 1-85.

Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S., & Aruoma, O. I. (1995). Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 35(1-2), 7-20.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Hull, E. M., Lorrain, D. S., Du, J., Matuszewich, L., Lumley, L. A., Putnam, S. K., & Moses, J. (1999). Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behavioural brain research*, 105(1), 105-116.

Janoff, A., Pryor, W. A., & Bengali, Z. H. (1987). NHLBI workshop summary. Effects of tobacco smoke components on cellular and biochemical processes in the lung. *The American review of respiratory disease*, 136(4), 1058-1064.

Jenkins, R. R. (2000). Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *The American journal of clinical nutrition*, 72(2), 670s-674s.

Ji, L. L., Stratman, F. W., & Lardy, H. A. (1988). Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle: influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Archives of biochemistry and biophysics*, 263(1), 150-160.

Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2009). *Temel Histoloji*, (Çeviri: Aytakin, Y., Solakoğlu, S.,) 10. Baskıdan Çeviri, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 135.

Karafakoğlu, Y. S. (2004). Tütün çalışanlarında oksidan-antioksidan durum. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5(1).

Kaya, H. (2014). Erişkin erkek sıçanlarda lityum karbonat ile oluşturulan testis hasarı üzerine E vitaminin etkisi (Master's thesis, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi).

Keskes-Ammar, L., Feki-Chakroun, N., Rebai, T., Sahnoun, Z., Ghozzi, H., Hammami, S., ... & Bahloul, A. (2003). Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Archives of andrology*, 49(2), 83-94.

Kılınç, A., & Kılınç, K. (2003). Nitrik oksit: biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. *Palme*.

Kidd, P. M. (1997). Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern Med Rev*, 2(3), 155-176.

Klebanoff, S. J. (1999). Myeloperoxidase. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 111(5), 383-389.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Koca, N., & Karadeniz, F. (2003). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 16, 32-37.

Kocyigit, A., Erel, O., & Gur, S. (2001). Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities. *Clinical biochemistry*, 34(8), 629-633.

Koltuksuz, U., Irmak, M. K., Karaman, A., Uz, E., Var, A., Özyurt, H., & Akyol, Ö. (2000). Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urological research*, 28(6), 360-363.

Kopincová, J., Púzserová, A., & Bernátová, I. (2012). L-NAME in the cardiovascular system–nitric oxide synthase activator?. *Pharmacological Reports*, 64(3), 511-520.

Kosior-Korzecka, U., & Bobowiec, R. (2006). Leptin effect on nitric oxide and GnRH-induced FSH secretion from ovine pituitary cells in vitro. *Journal of physiology and pharmacology*, 57(4), 637.

Köse, T. (2006). Deneysel diffüz beyin hasarında nitrik oksit sentetaz inhibitörü aminoguanidin'in etkileri (Doctoral dissertation, SDÜ Tıp Fakültesi).ISO 690

Lapenna, D., De Gioia, S., Mezzetti, A., Ciofani, G., Consoli, A., Marzio, L., & Cuccurullo, F. (1995). Cigarette smoke, ferritin, and lipid peroxidation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 151(2), 431-435.

Lartillot, S., Kedziora, P., & Athias, A. (1988). Purification and characterization of a new fungal catalase. *Preparative biochemistry*, 18(3), 241-246.

Lawrence, R. A., & Burk, R. F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 71(4), 952-958.

Lerner, E. (2015). Nitric oxide inhibition strategies. *Future Science Oavol.* 1, No. 1

Liu, R. Z., Gao, J. C., Zhang, H. G., Wang, R. X., Zhang, Z. H., & Liu, X. Y. (2010). Seminal plasma zinc level may be associated with the effect of

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

cigarette smoking on sperm parameters. *Journal of International Medical Research*, 38(3), 923-928.

Machlin, L. J. (1991). *Handbook of vitamins*. M. Dekker.

Marquez, L. A., & Dunford, H. B. (1997). Mechanism of the oxidation of 3, 5, 3', 5'-tetramethylbenzidine by myeloperoxidase determined by transient- and steady-state kinetics. *Biochemistry*, 36(31), 9349-9355.

McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.

Meister A. (1983). Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids. *Biochem Soc Trans*;11:793-4.

Mero, N., Van Tol, A., Scheek, L. M., Van Gent, T., Labeur, C., Rosseneu, M., & Taskinen, M. R. (1998). Decreased postprandial high density lipoprotein cholesterol and apolipoproteins AI and E in normolipidemic smoking men: relations with lipid transfer proteins and LCAT activities. *Journal of Lipid Research*, 39(7), 1493-1502.

Moncada, S. R. M. J., Palmer, R. M. L., & Higgs, E. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43(2), 109-142.

Muriel, P. (2000). Regulation of nitric oxide synthesis in the liver. *Journal of Applied Toxicology*, 20(3), 189-195.

Nelson, D. P., & Kiesow, L. A. (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, 49(2), 474-478.

Nicholls, P. (2012). Classical catalase: ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 95-101.

Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H., & Gotoh, N. (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1322S-1326S.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Nusbaum, M. L., Gordon, M., Nusbaum, D., McCarthy, M. A., & Vasilakis, D. (2000). Smoke alarm: a review of the clinical impact of smoking on women. *Primary care update for Ob/Gyns*, 7(5), 207-214.

Ognjanovic, B. I., Markovic, S. D., Dordevic, N. Z., Trbojevic, I. S., Stajin, A. S., & Saicic, Z. S. (2010). Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q 10 and Vitamin E. *Reproductive Toxicology*, 29(2), 191-197.

Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.

Onat, T., Emerk, K., & Sözmen, E. Y. (2002). İnsan biyokimyası. Palme yayıncılık, 666.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3122-3128.

Oyeyipo, I. P., Raji, Y., & Bolarinwa, A. F. (2013). Nicotine alters male reproductive hormones in male albino rats: the role of cessation. *Journal of human reproductive sciences*, 6(1), 40.

Oyeyipo, I. P., Raji, Y., & Bolarinwa, A. F. (2015). NG-nitro-L-arginine methyl ester protects against hormonal imbalances associated with nicotine administration in male rats. *North American journal of medical sciences*, 7(2), 59.

Ozcelik, E. (2012). Kitosan ve blueberry'nin asetaminofen aracılı karaciğer toksisitesi üzerine etkileri (Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi)

Ozyurt, H., Pekmez, H., Parlaktas, B. S., Kus, I., Ozyurt, B., & Sarsilmaz, M. (2006). Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian journal of andrology*, 8(2), 189-193.

Packer, L. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *The American journal of clinical nutrition*, 53(4), 1050S-1055S.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Pekmez, H., Sönmez, M. F., Kuş, İ., Türkoğlu, A. Ö., Ögetürk, M., Ozan, E., & Sarsılmaz, M. (2003). Sıçan Akciğerinde Sigara Maruziyeti ile Oluşan Histolojik Değişiklikler Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester (Cape)'in Koruyucu Etkisi. *Fırat Tıp Dergisi*; Cilt: 8 Sayı: 3; 133-137.

Pfeiffer, S., Leopold, E., Schmidt, K., Brunner, F., & Mayer, B. (1996). Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *British journal of pharmacology*, 118(6), 1433-1440.

Racah, D., Fabreguettes, C., Azulay, J. P., & Vague, P. (1996). Erythrocyte Na⁺-K⁺-ATPase activity, metabolic control, and neuropathy in IDDM patients. *Diabetes Care*, 19(6), 564-568.

Rao, M. V., & Sharma, P. S. N. (2001). Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. *Reproductive Toxicology*, 15(6), 705-712.

Sahoo, D. K., Roy, A., & Chainy, G. B. (2008). Protective effects of vitamin E and curcumin on L-thyroxine-induced rat testikular oxidative stress. *Chemico-biological interactions*, 176(2), 121-128.

Sancak, B., Cumhuri, M., & Vakfı, O. G. (2002). Fonksiyonel anatomi: baş-boyun ve iç organlar. ODTÜ Geliştirme Vakfı.

Schild, L., Reinheckel, T., Reiser, M., Horn, T. F., Wolf, G., & Augustin, W. (2003). Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. *The FASEB journal*, 17(15), 2194-2201.

Schmidt, K. (1992). Schutz vor oxidativem Streß: fit und vital durch Vitamin E. MKM-Verlag.

Sener, G., Tosun, O., Kaçmaz, A., Arbak, S., Ersoy, Y., & Ayanoğlu-Dülger, G. (2003). Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life sciences*, 72(24), 2707-2718. ISO 690

Shafaroodi, H., Ebrahimi, F., Moezi, L., Hashemi, M., Doostar, Y., Ghasemi, M., & Dehpour, A. R. (2010). Cholestasis induces apoptosis in mice cardiac cells: the possible role of nitric oxide and oxidative stress. *Liver International*, 30(6), 898-905.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Sharma, A. C., Sam, A. D., Lee, L. Y., Hales, D. B., Law, W. R., Ferguson, J. L., & Bosmann, H. B. (1998). Effect of NG-nitro-L-arginine methyl ester on testikular blood flow and serum steroid hormones during sepsis. *Shock*, 9(6), 416-421.

Shiraishi, K., Yoshida, K., & Naito, K. (2003). Activation of endothelial nitric oxide synthase in contralateral testis during unilateral testicular torsion in rats. *Archives of andrology*, 49(3), 179-190.

Sofikitis, N., Miyagawa, I., Dimitriadis, D., Zavos, P., Sikka, S., & Hellstrom, W. (1995). Effects of smoking on testikular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *The Journal of urology*, 154(3), 1030-1034.

Sohn, H. O., Lim, H. B., Lim, Y. G., Lee, D. W., & Kim, Y. T. (1993). Effect of subchronic administration of antioxidants against cigarette smoke exposure in rats. *Archives of toxicology*, 67(10), 667-673.

Sönmez, M., Yüce, A., & Türk, G. (2007). The protective effects of melatonin and vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reproductive Toxicology*, 23(2), 226-231.

Söylemez, H., Uğraş, Y. M., Beytur, A., Oğuz, F., Kuruş, M., & Karabulut, A. B. (2011). Sigara dumanına maruz kalan sıçanlarda resveratrolün testis dokusundaki antioksidan etkisinin değerlendirilmesi. *Türk Üroloji Dergisi*, 37, 235-41.

Srivastava, S. K., & Beutler, E. (1968). Accurate measurement of oxidized glutathione content of human, rabbit, and rat red blood cells and tissues. *Analytical biochemistry*, 25, 70-76.

Stoker, T. E., Parks, L. G., Gray, L. E., & Cooper, R. L. (2000). Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Critical reviews in toxicology*, 30(2), 197-252.

Stratton, S. P., & Liebler, D. C. (1997). Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effect of β -carotene and α -tocopherol. *Biochemistry*, 36(42), 12911-12920.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., & Fujikura, T. (1983). Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical biochemistry*, 132(2), 345-352.

Szabo, C., Ischiropoulos, H., & Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*, 6(8), 662.

Şener, G., Şehirli, A. Ö., & Ayanoğlu-Dülger, G. (2003). Protective effects of melatonin, vitamin E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. *Journal of pineal research*, 35(1), 61-68.

Teilmann, G., Juul, A., Skakkebaek, N. E., & Toppari, J. (2002). Putative effects of endocrine disrupters on pubertal development in the human. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 16(1), 105-121.

Tekin, N., Akyüz, F., & Temel, H. E. (2011). NO levels in diabetes mellitus: Effects of l-NAME and insulin on LCAT, Na⁺/K⁺ ATPase activity and lipid profile. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 5(4), 191-195.

Terzioğlu, F., Yücel, A. G. Ç., & Karatay, A. G. G. (2008). Sigara ve İnfertilite. *Klasmat Matbaacılık, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 731, Ankara.*

Thomas, M. J. (1995). The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working?. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 35(1-2), 21-39.

Tunçtan, B., & Abacıoğlu, N. (1998). Measurement of nitric oxide in biological samples, Diazotization method. *FABAD J. Pharm. Sci*, 23(4), 161-170.

Turner, T. T., & Lysiak, J. J. (2008). Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of andrology*, 29(5), 488-498.

Townsend, D. M., Tew, K. D., & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3), 145-155.

Umeda, F., Kato, K. I., Muta, K., & Ibayashi, H. (1982). Effect of vitamin E on function of pituitary-gonadal axis in male rats and human subjects. *Endocrinologia japonica*, 29(3), 287-292.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Utagawa, T. (2004). Arginine metabolism: enzymology, nutrition, and clinical significance. *J Nutr*, 134, 2741S-2897S.

Uz, E., Söğüt, S., Şahin, Ş., Var, A., Özyurt, H., Güleç, M., & Akyol, Ö. (2002). The protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *World journal of urology*, 20(4), 264-270.

Uzun, F. G., Kalender, S., Durak, D., Demir, F., & Kalender, Y. (2009). Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. *Food and chemical toxicology*, 47(8), 1903-1908. ISO 690

Valdes-Socin, H., Vroonen, L., Latta, A. I., Betea, D., Petrossians, P., Geenen, V., & Beckers, A. (2010). The endocrine effects of smoking. *Revue medicale de Liege*, 65(9), 498-501.

Van Der Meulen, J. H., McArdle, A., Jackson, M. J., & Faulkner, J. A. (1997). Contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: the role of vitamin E. *Journal of Applied Physiology*, 83(3), 817-823.

Vardareli, E., Dundar, E., Angin, K., Saricam, T., & Inal, M. (2003). Effects of intrarectal and intraperitoneal N (G)-nitro-L-arginine methyl ester treatment in 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid induced colitis in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(4), 271-276.

Víteček, J., Lojek, A., Valacchi, G., & Kubala, L. (2012). Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges. *Mediators of inflammation*, 2012.

Wallach, E. E., Stillman, R. J., Rosenberg, M. J., & Sachs, B. P. (1986). Smoking and reproduction. *Fertility and sterility*, 46(4), 545-566.

Weiner, C. P., Lizasoain, I., Baylis, S. A., Knowles, R. G., Charles, I. G., & Moncada, S. (1994). Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(11), 5212-5216.

World Health Organization, & Research for International Tobacco Control. (2008). WHO report on the global tobacco epidemic, 2008: the MPOWER package. World Health Organization.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

World Health Organization. (2013). State of the science of endocrine disrupting chemicals–2012. An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO. WHO Press, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Yardimci, S., Atan, A., Delibasi, T., Sunguroglu, K., & Güven, M. C. (1997). Long-term effects of cigarette-smoke exposure on plasma testosterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels in male rats. *BJU International*, 79(1), 66-69.

Yargıçoğlu, P., Yaraş, N., Açar, A., Gümüşlü, S., Abidin, I., & Bilmen, S. (2004). Effects of N-nitro l-arginine methyl ester (l-NAME), a potent nitric oxide synthase inhibitor, on visual evoked potentials of rats exposed to different experimental stress models. *Acta Physiologica*, 180(3), 307-316.

Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 74(1), 139-163.

Zalata, A. A., Ahmed, A. H., Allamaneni, S. S., Comhaire, F. H., & Agarwal, A. (2004). Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J Androl*, 6(4), 313-318.

Zhou, D. X., Qiu, S. D., Zhang, J., Tian, H., & Wang, H. X. (2006). The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. *Asian journal of andrology*, 8(5), 584-588.

Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Yakup KARA
Doğum tarihi ve yeri : 07.10.1991 / Mersin
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri :Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp
Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Odunpazarı/ESKİŞEHİR

Eğitim Durumu

(Tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru ilköğretim, lise, üniversite, yabancı dil / diller) : Atatürk İlköğretim Okulu, Erdemli Lisesi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, İngilizce

Mesleki Deneyim : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenci Laboratuvarı (Eylül 2015-Haziran 2017, Eylül 2018-devam ediyor)

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar: -

Yayınlar: Uluslararası Biyokimya Kongresi - 2017 / 28. Ulusal Biyokimya Kongresinde "Investigation The Effects Of L-Name (N-Nitro L- Arginine Methyl Ester) And Vitamin E (A-Tocopherol) To Testicular Oxidative Stress Caused By Exposure To Cigarette Smoke In Male Rats" sözlü bildirisi (Makale, Sözlü Bildiri, Poster Bildiri, Kitap, Kitap Bölümü vd.)

Bilimsel Etkinlikler

Burslar : -
Ödüller : -
Projeler : Bilimsel araştırma projesi: "Erkek sıçanlarda sigara dumanı maruziyeti ile oluşan testikular oksidatif strese L-NAME'nin (N-Nitro L-Arginin Metil Ester) ve Vitamin E'nin (alfa-tokoferolün) etkisinin incelenmesi"
Sözlü Konferans veya Seminerler : Uluslararası Biyokimya Kongresi - 2017 / 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, Sözlü Bildiri ve Poster Sunumu
Kurslar ve Eğitim Programları : -