

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**TÜTÜN DUMANINA MARUZ KALAN RATLARDA
HESPERETİNİN TESTİS DOKUSUNDAKİ
ANTIOKSİDAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OSMAN FATİH YILMAZ

2015

ONAY SAYFASI

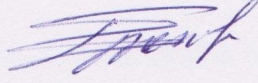
Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Enver OZAN

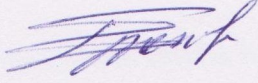
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı



Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Enver OZAN

Danışman

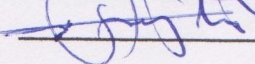
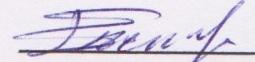


Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İ. Enver Ozan

Doç. Dr. Mehmet Gül

Yrd. Doç. Dr. Tunçay KULOĞLU



İTHAF SAYFASI

Sevgili aileme...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, danışman hocam sayın Prof. Dr. İ. Enver OZAN 'a, tezimin her aşamasındaki yardımlarından dolayı tez projesi yardımcı yürütücü hocalarım sayın Doç. Dr. Dürrin Özlem DABAK 'a ve Yrd. Doç. Dr. Gonca OZAN' a,

Eğitimim süresince bilgi birikimlerinden faydalandığım Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri sayın Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK'e, Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU 'na, Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na ve Yrd. Doç. Dr. Nevin KOCAMAN'a, ayrıca tezimin deneysel kısmına destek olan Veteriner Fakültesi hocalarımızdan sayın Prof. Dr. Seyfettin GÜR'e ve Arş. Gör. Şeyma KAYA'ya,

Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen arkadaşım Arş Gör. Nalan KAYA'ya, ayrıca yüksek lisans arkadaşlarım Songül AY YILMAZ'a ve Füsun ERHAN'a,

Tezime sağladığı finansmandan ötürü Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP) 'ne,

Son olarak eğitim hayatım boyunca manevi desteklerini her zaman hissettiğim aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI.....	ii
İTHAF SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	5
3. GİRİŞ	9
3.1. TESTİS	9
3.1.1. Testis Anatomisi	9
3.1.2. Testis Embriyolojisi.....	11
3.1.3. Testis Fizyolojisi.....	14
3.1.4. Testis Histolojisi	17
3.1.4.1. Testisler	17
3.1.4.2. Seminifer tübüller.....	17
3.1.4.3. Spermatogenez	18
3.1.4.4. Spermiyogenez.....	19
3.1.4.5. Sertoli hücreleri.....	19
3.1.4.6. Kan-testis bariyeri	20
3.1.4.7. Leydig hücreleri	21
3.2. Tütün	21
3.2.1. Tütün Kullanımın Tarihçesi.....	22
3.2.2. Tütünün İçeriği	22
3.2.3. Tütün Epidemiyolojisi	24
3.2.4. Tütünün İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	25

3.3. Serbest Radikaller.....	27
3.4. Nitrik Oksit ve Endotelial Nitrik Oksit Sentaz.....	28
3.5. Apoptozis.....	29
3.6. Antioksidanlar	31
3.7. Flavonoidler.....	33
3.7.1. Hesperetin	33
3.8. Araştırmanın Amacı	36
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
4.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri	37
4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	38
4.3. Deney düzeneği ve tütün dumanının verilmesi	39
4.4. Doku Örneklerinin Alınması	40
4.5. Vücut ve Organ Ağırlıklarının Ölçülmesi	43
4.6. Spermatolojik Değerlendirmeler	41
4.6.1. Sperm Yoğunluğu	41
4.6.2. Sperm Motilitesi	42
4.7. Histokimyasal Analizler	42
4.8. TUNEL Metodu	44
4.7. İmmunohistokimyasal Değerlendirme	46
4.10. Biyokimyasal Analizler	51
4.10.1. Testis dokusunda malondialdehit düzeyinin tayini.....	48
4.10.2. Testis dokusunda katalaz aktivitesinin tayini	49
4.10.4. Testis dokusunda glutatyon peroksidaz aktivitesinin tayini	49
4.11. İstatistiksel Analiz	49
5. BULGULAR.....	50
5.1. Vücut Ağırlık Değişim Yüzdesi	50
5.2. Üreme organları ağırlıkları.....	51
5.3. Rölatif testis ağırlığı	51
5.4. Spermatolojik Değerlendirmeler	52
5.6. Histokimyasal Değerlendirmeler.....	53
5.7. TUNEL Bulguları.....	61

5.8. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) İmmünreaktivitesi	66
5.9. Biyokimyasal Analizler	69
6.TARTIŞMA.....	71
7. KAYNAKLAR	77
8. ÖZGEÇMİŞ	85

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: Tütün dumanında bulunan bazı maddeler.....	23
Tablo 2: Tütün kullanımının epidemiyolojisi.....	24
Tablo 3: Tütün kullanımının insan sağlığına etkileri..	26
Tablo 4: Serbest radikaller	27
Tablo 5: Antioksidanların sınıflandırılması	32
Tablo 6: Ratlara verilen pelet yemin bileşimi	38
Tablo 7: Deney hayvanlarının gruplandırılması.....	39
Tablo 8: Histolojik takip işlem basamakları.	43
Tablo 9: TUNEL boyama prosedürü.....	45
Tablo 10: İmmünohistokimyasal boyama prosedürü.	46
Tablo 11: Üreme organ ağırlıkları (gr).....	51
Tablo 12: Sperm parametreleri.....	52
Tablo 13: Histolojik değerlendirmelere ait histoskor tablosu.	54
Tablo 14: Apoptotik indeks (%).	62
Tablo 15: eNOS immünreaktivitesi.	66
Tablo 16: Grupların testis dokusu MDA, CAT ve GSH-Px düzeyleri.	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Testisin anatomik görünümü.	10
Şekil 2: Primordiyal germ hücrelerinin göçü ve gonadal farklılık.	12
Şekil 3: Spermatogenezin hormonal kontrolü	16
Şekil 4: Testisin histolojik görünümü.....	18
Şekil 5: Spermatogenez	19
Şekil 6: Apoptozis yolağı	30
Şekil 7: Hesperidin (a) ve Hesperetin (b) kimyasal yapısı.....	34
Şekil 8: Tütün dumanı verilmesinin şematik gösterimi.	40
Şekil 9: Vücut ağırlık değişim yüzdesi. Değerler ortalama olarak verilmiştir.	50
Şekil 10: Rölatif testis ağırlığı (gr). Değerler ortalama olarak verilmiştir.	51
Şekil 11: Tüm gruplara ait sperm görüntüleri.....	53
Şekil 12: Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, interstisyel alan ve normal spermatogenez. H&E.....	55
Şekil 13: Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül bazal membranı ve interstisyel alandaki damar. PAS	55
Şekil 14: Kontrol grubu. Normal spermatogenez. Masson'un üçlü boyası.....	56
Şekil 15: Tütün dumanı grubu. Atrofik tübüller, seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon ve interstisyel alanda ödem. H&E.....	56
Şekil 16: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül bazal membranında ayrılmalar, interstisyel alanda ödem, vasküler konjesyon, seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon. H&E	57
Şekil 17: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül bazal membranında ayrılmalar ve interstisyel alanda ödem. PAS.....	57

Şekil 18: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon ve vasküler konjesyon. Masson'un üçlü boyası.....	58
Şekil 19: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. Seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon. H&E	58
Şekil 20: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. Seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon. PAS	59
Şekil 21: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. Vasküler konjesyon, seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon. Masson'un üçlü boyası.....	59
Şekil 22: Tütün dumanı + HES grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, normal spermatogenez. H&E.....	60
Şekil 23: Tütün dumanı + HES grubu. Normal görünümlü seminifer tübül bazal membranı ve vasküler konjesyonda azalma. PAS	60
Şekil 24: Tütün dumanı + HES grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli ve normal spermatogenez. Masson'un üçlü boyası	61
Şekil 25: Kontrol grubu. TUNEL	63
Şekil 26: Tütün dumanı grubu. TUNEL pozitif hücre. TUNEL.....	63
Şekil 27: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. TUNEL pozitif hücre. TUNEL.	64
Şekil 28: Tütün dumanı + HES grubu. TUNEL pozitif hücre. TUNEL.....	64
Şekil 29: Pozitif kontrol rat meme dokusu. TUNEL pozitif hücre. TUNEL.....	65
Şekil 30: Negatif kontrol. TUNEL.	65

Şekil 31: Kontrol grubu. İnterstisyel alanda hafif derecede eNOS immünreaktivitesi.....	67
Şekil 32: Tütün dumanı grubu. İnterstisyel alanda artmış eNOS immünreaktivitesi.....	67
Şekil 33: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. İnterstisyel alanda artmış eNOS immünreaktivitesi.....	68
Şekil 34: Tütün dumanı + HES grubu. İnterstisyel alanda hafif derecede eNOS immünreaktivitesi.....	68
Şekil 35: Negatif kontrol.	69

KISALTMALAR LİSTESİ

- ABP** : Androjen bağlayıcı protein
AEC : 3-Amino-9-ethyl carbazole
AMH : Anti-Müllerian hormon
ATP : Adenozin trifosfat
CAT : Katalaz
DAB : Diamino benzidin
DNA : Deoksiribonükleik asit
eNOS : Endotelyal nitrik oksit sentaz
FSH : Follikül stimüle edici hormon
GHS-Rd : Glutasyon redüktaz
GnRH : Gonadotropin serbestleyici hormon
GSH : Glutasyon
GSH-Px : Glutasyon peroksidaz
GSSG : Okside glutasyon
HES : Hesperetin
H&E : Hematoksilen- Eozin
H₂O₂ : Hidrojen peroksit
HRP : Horse Radish Peroksidaz
IL-1 : İnterlökin-1
iNOS : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LDL : Düşük dansiteli lipoprotein
LH : Luteinizan hormon
NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat- hidrojen
NO : Nitrik oksit
NOS : Nitrik oksit sentazlar
nNOS : Nöronal nitrik oksit sentaz
PAS : Periyodik Asit Schiff
PBS : Phosphate buffered saline

- RNS** : Reaktif nitrojen türleri
- ROS** : Reaktif oksijen türleri
- SOD** : Süperoksit dismutaz
- TBA** : Tiobarbitürik asit
- TBF** : Testis belirleyici faktörü
- TUNEL** : Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling
- TNF-a** : Tümör nekrosiz faktör a

1. ÖZET

Tütün, Solanaceae (Patlıcangiller) familyasına ait Nicotiana cinsi içerisinde yer alan oldukça zehirli bir bitkidir. Tütün dumanına maruz kalmanın başta solunum yolu hastalıkları olmak üzere çeşitli kanser türlerine ve kronik kardiyovasküler hastalıklara neden olduğu tespit edilmiştir. Bu hastalıkların genel olarak tütünde bulunan kimyasalların dokularda meydana getirdiği oksidatif stres sebebiyle ortaya çıktığı ileri sürülmektedir.

Tütün dumanında bulunan ve kanla taşınan toksik maddelerin oksidan-antioksidan sistem arasındaki dengeyi dokular aleyhine değiştirmektedir.

Flavonoidler bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin geniş bir grubudur. Antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflammatuvar özelliklerinin olduğu bildirilmiştir. Hesperetin limon, portakal ve greyfurt gibi turunçgillerde bol miktarda bulunan bir flavonoiddir.

Bu çalışmada tütün dumanı maruziyetinin testis dokusunda oluşturacağı hasara karşı hesperetin koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 8 haftalık ve ortalama 200 ± 10 gr ağırlığında, 24 adet erişkin Spraque-Dawley cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar grup I (Kontrol), grup II (Tütün dumanına maruz bırakılan), grup III (Tütün dumanına maruz bırakılan + mısırözü yağı), grup IV (Tütün dumanına maruz bırakılan + hesperetin) olmak üzere rastgele 4 eşit gruba ayrıldı. Grup II, grup III ve grup IV' deki ratlar, günde iki defa birer saat tütün dumanına maruz bırakıldı. Grup IV'deki ratlara, tütün dumanına ilaveten gavaj yoluyla mısırözü yağında hazırlanmış hesperetin gün

aşırı 50 mg/kg dozunda uygulandı. Grup III'deki ratlara ise hesperetini çözmede kullanılan miktarda mısırözü yağı gün aşırı gavaj yoluyla verildi.

12 haftalık deney süresi sonunda tüm gruptaki ratlar dekapite edildi. Testis dokuları çıkarılarak rutin histolojik takip serilerinden geçirildi. Elde edilen preparatlara H&E, PAS ve Masson'un üçlü boyamaları yapıldı. Ayrıca apoptozis için TUNEL metodu ile endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) immünohistokimyasal boyaması uygulandı. Kan örnekleri ile biyokimyasal analizler, sperm örnekleri ile de sperm analizleri yapıldı.

Tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarında yer alan ratların ortalama vücut ağırlık değişim yüzdesinde, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Tütün dumanı + hesperetin grubunun vücut ağırlığı değişim yüzdesinin ise diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı biçimde düştüğü tespit edildi.

Sağ testis, sol testis, sol epididimis, sağ epididimis, prostat bezi, seminal vezikül ve rölatif testis ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenemedi.

Sperm yoğunluğu ve sperm motilitesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, tütün dumanı uygulamasının kontrol grubuna kıyasla anormal sperm oranını önemli bir biçimde arttırdığı tespit edildi. Hesperetin uygulamasının ise anormal sperm oranını düşürdüğü belirlendi.

Tütün dumanına maruz bırakılan gruptaki testis dokularında seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon, atrofik tübüller, vasküler konjesyon, seminifer tübül bazal membranlarında ayrılmalar, interstisyel alanda ödem ve bazı

tübüllerde lümeneye dökülmüş immatür hücreler tespit edildi. Tütün dumanı + mısırözü yağı uygulanan gruptaki bulgular, tütün grubu ile benzerdi.

Tütün dumanı ile birlikte hesperetin uygulanan grupta ise testis dokusunda seminifer tübül bazal membran ayrılmalarında, germinal epitel dejenerasyonu, vasküler konjesyon ve interstisyel ödemde belirgin şekilde iyileşmeler gözlemlendi.

Tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarında kontrol grubuna kıyasla TUNEL pozitif hücrelerin sayısında anlamlı bir artış bulundu. Tütün dumanı + hesperetin grubunda ise TUNEL pozitif hücre sayısının kontrol grubu ile benzer olduğu gözlemlendi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarında eNOS immünreaktivitesi açısından anlamlı bir artış tespit edildi. Tütün dumanı + hesperetin grubunda ise eNOS immünreaktivitesinde azalma olduğu gözlemlendi.

Malondialdehit (MDA) düzeylerinin kontrol grubuna göre tütün dumanı ve tütün dumanı+ mısırözü yağı gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı, hesperetin uygulamasının ise MDA seviyesini kontrole yakın bir düzeye indirdiği tespit edildi. Katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitelerinin, kontrol grubuna göre tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarında, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi. Tütün dumanı + hesperetin grubunda ise GSH-Px aktivitesinin tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarına kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı tespit edildi. Ancak CAT aktivitesi açısından tütün dumanı ve tütün dumanı

+ mısırözü yağı grubu ile tütün dumanı + hesperetin grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi.

Çalışmamızın sonucunda elde edilen bulgular ışığında tütün dumanına maruz kalmanın erkek üreme sistemi üzerine olumsuz etkileri olduğu tespit edildi. Hesperetin ise antioksidan özelliği sayesinde tütün dumanının oluşturduğu olumsuz etkileri belirgin biçimde azalttığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Tütün dumanı, Hesperetin, Histoloji, Biyokimya, Testis.

2. ABSTRACT

EXAMINATION OF ANTIOXIDANT EFFECT OF HESPERETIN ON TESTICULAR TISSUE IN RATS THAT WERE EXPOSED TO TOBACCO SMOKE

Tobacco, part of the family Solanaceae genus *Nicotiana*, is a highly toxic plant. It is known that tobacco smoke exposure causes respiratory system diseases, several cancer types and chronic cardiovascular diseases. It is suggested that these diseases arise because of the oxidative stress on tissues created by tobacco smoke.

Toxic substances in tobacco smoke which are carried to every part of the body by blood, are likely to change the balance between oxidant - antioxidant systems against tissues.

Flavonoids are a large group of phenolic compounds that are widely distributed in plants. Several properties have been reported from flavonoids, such as antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory effects. Hesperetin is one of the most abundant flavonoids found in citrus fruits, such as lemons, oranges and grape fruits.

In our study, it is aimed to examine the protective effects of hesperetin against oxidative damage on testis tissue caused by tobacco smoke exposure.

In this study, 8 weeks old and average 200±10 grams weight twenty-four male Sprague-Dawley rats were used. The rats were divided randomly into 4 equal groups: group I (Control), group II (Tobacco smoke), group III (Tobacco smoke + corn oil) and group IV (Tobacco smoke + hesperetin). The rats in group II, III and IV were exposed to tobacco smoke 1 hour twice a day. In addition to tobacco smoke exposure, 50 mg/kg hesperetin (dissolved in corn oil) was applied

to the rats in group IV by oral gavage. Equal amount of corn oil used in solving hesperetin was applied to the rats by oral gavage in group III .

At the end of the 12 weeks experimental period, rats were decapitated. Testicular tissues were removed and processed by using routine parafine techniques. The testis slides were stained by H&E, PAS and Masson's Trichrome methods. Also TUNEL methods and eNOS stain were applied. Biochemical analyzes on blood samples and sperm analyzes on sperm samples were performed.

A significant decrease of percentage of body weight change was detected in tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil groups when compared with control group. Percentage of body weight change in tobacco smoke + hesperetin group, a significant decrease was detected compared with the other groups.

There was no statistically difference detected in weights of right testis, left testis, epididymis, prostate, seminal vesicle and relative testis weight, between the groups.

The difference of sperm motility and sperm concentration between the groups was found no statistically significant. A significant increase in abnormal sperm amount was detected in tobacco smoke group compared with control group. It was found that reduction in the amount of abnormal sperm in tobacco smoke + hesperetin group compared with tobacco smoke group.

In rat testis tissues of tobacco smoke group; degeneration in germinative epithelium, atrophic tubules, vascular congestion, seperation in seminiferious tubule basement membranes, edema in interstitial area and immature cell debris in tubule lumen were detected. The similiar findings of tobacco smoke group were found in tobacco smoke + corn oil group.

Significant improvement were observed in separation of seminiferous tubule basement membranes, germinative epithelium degeneration, vascular congestion and intersitial edema in rat testis tissues of tobacco smoke + hesperetin group.

A significant increase of TUNEL positive cells in tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil groups was detected, compared to the control group. The number of TUNEL positive cells in tobacco smoke + hesperetin group was observed similar to control group.

A significantly increased eNOS immunoreactivity was observed in tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil groups compared to the control group. Also decreased eNOS immunoreactivity was detected in tobacco smoke + hesperetin group.

A significant increase was detected in the levels of MDA, in tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil groups compared with the control group. It was found that hesperetin administration reduced the MDA levels similar to the control group. CAT and GSH-Px enzyme activities in tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil groups were significantly decreased compared to the control group. Also significantly increase in GSH-Px enzyme activities was detected in tobacco smoke + hesperetin group compared with the tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil groups. But CAT activities in tobacco smoke + hesperetin group wasn't different from the CAT levels of tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil groups.

As a result of our study, it was detected that exposure to tobacco smoke negatively effects the male reproductive system. It was also observed that hesperetin, which is used as a protector against tobacco smoke exposure, decreases the negative effects of tobacco smoke prominently by means of its antioxidant property.

KEY WORDS: Tobacco smoke, Hesperetin, Histology, Biochemistry, Testis.

3. GİRİŞ

3.1. TESTİS

3.1.1. Testis Anatomisi

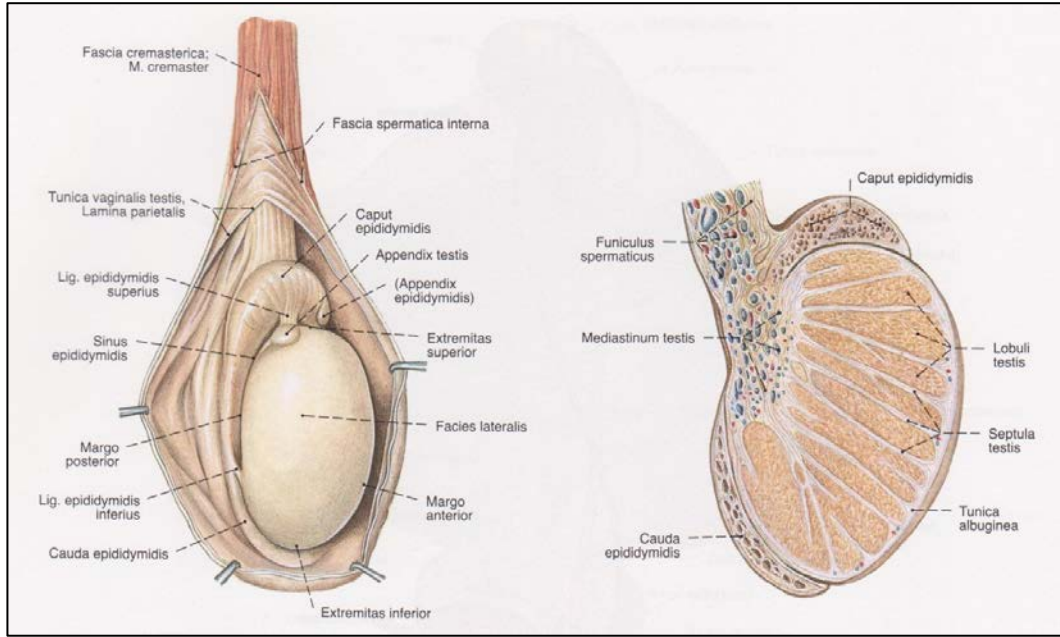
Funiculus spermaticus'a asılı halde bulunan testisler, bir çift olup scrotum içinde yer alırlar. Yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve 10-14 gr ağırlığında olan testisler, iri bir badem büyüklüğündedirler.

Testisler; lamina visceralis (epiorchium), tunica albuginea ve tunica vasculosa olmak üzere üç tabaka ile sarılmıştır. Erişkinlerde fascia spermatica internanın iç, testisin de dış yüzünü örten çift yapraklı seröz bir zar vardır ve “tunica vaginalis testis” olarak adlandırılır.

“Lamina visceralis (epiorchium)”, epididimis'in büyük kısmı ile arka kenarının medial bölümü hariç, testisi örten ve bu iki oluşumu birbirine bağlayan yapıdır.

“Tunica albuginea”, testisi saran mavimsi beyaz renkli, sıkı yapılı fibröz bir tabakadır. Tunica albuginea'yı arka kenarı hariç olmak üzere, dıştan tunica vaginalis testisin lamina visceralis'i örter. Tunica albuginea, arka kenarda ise testisin içine doğru kalın, vertikal yarım bir bölme şeklinde uzantılar gönderir ve “mediastinum testis” adını alır. Mediastinum testisin ön ve yan kısımlarından çıkan bölmeler, testisi saran tunica albuginea'ya tutunurlar. “Septula testis” adını alan bu bölmeler testisi piramit şeklinde boşluklara ayırır. Bu boşluklarda ise “tubuli seminiferi contorti” ve “tubuli seminiferi recti” adı verilen tüp şeklinde kanalcıklar bulunur.

Tunica albuginea'nın iç yüzünde bulunan damar ağı tabakasına “tunica vasculosa” denir. Tunica albuginea ve septula testis'ler arasındaki boşluklarda uzun tüplerin oluşturduğu kanalcık kümeleri vardır ve “lobuli testis” olarak adlandırılırlar. Ayrıca her bir lobçuk, bir veya daha fazla küçük tüpler şeklindeki kanalcıklardan oluşur. Kıvrıntılı seyriden dolayı bu tüplere “tubuli seminiferi contorti” denilir. Lobçukların mediastinum testis'e bakan tepe kısımlarında bu boruların seyri düzleşir ve birbirleriyle birleşerek “tubuli seminiferi recti” adını alırlar. Tubuli seminiferi recti'ler birbirleriyle anastomoz yaparak “rete testis” denilen ağı yapıyı oluştururlar (Şekil 1).



Şekil 1: Testisin anatomik görünümü. (1)

Rete testis, mediastinum testis'in üst bölümünde, sayıları 12 ile 15 arasında değişen kanallar şekline dönüşerek “ductuli efferentes testis” adını alır. Bu kanallar ise testisin arka kenarının üst kısmından tunica albuginea'yı delerek dışarı çıkarlar.

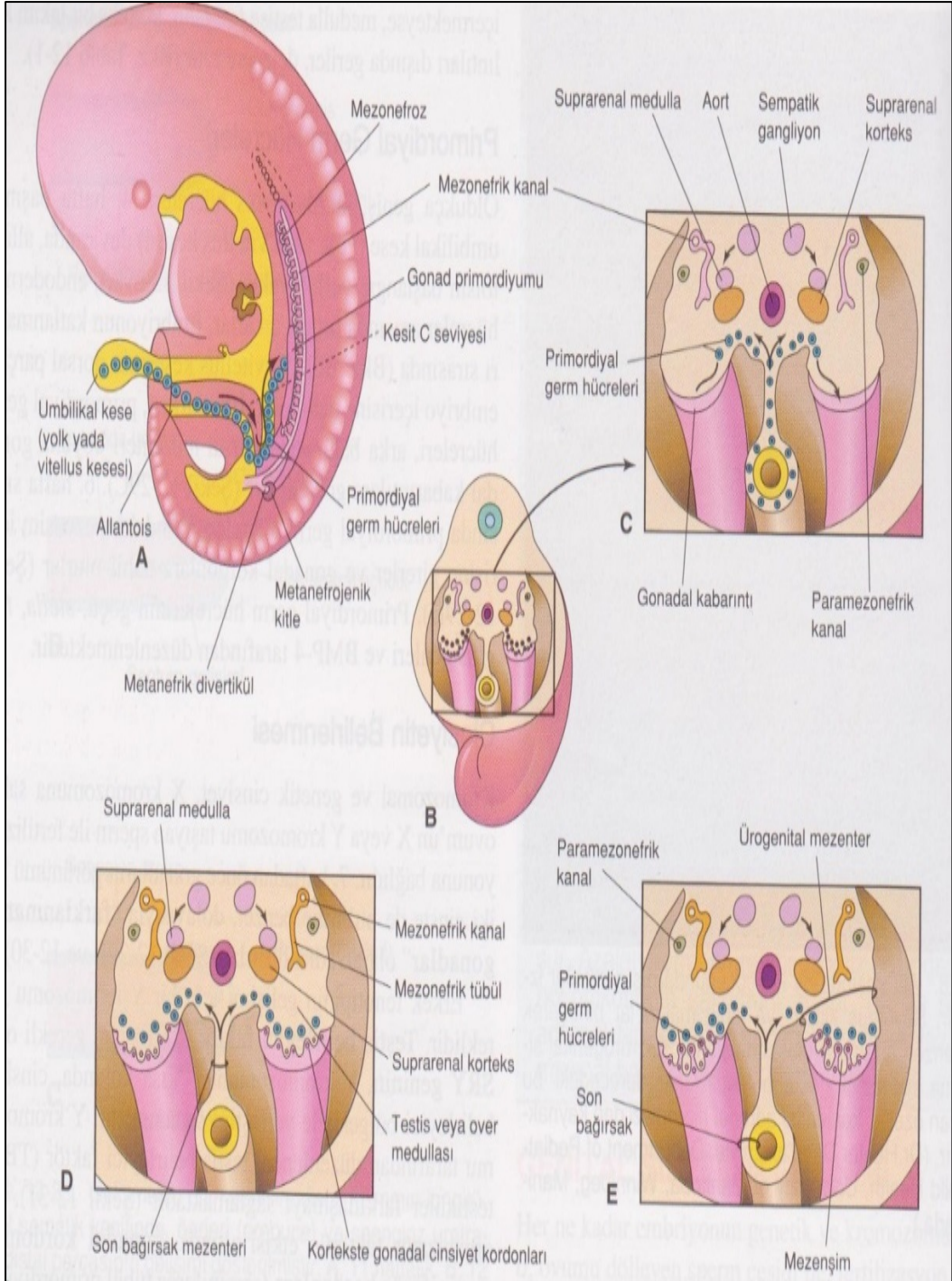
Testis ve epididimis, aortanın dalı olan *a. testicularis*'den beslenirler. Testis ve epididimis venleri ise önce funiculus spermaticus'u ağ şeklinde sararak

plexus pampiniformis'i, daha sonra da birbirleriyle birleşerek, *v. testicularis*'i oluştururlar. Bunlardan sağ taraftaki *v. cava inferior*'a, sol taraftaki ise *v. renalis sinistra*'ya açılırlar (2).

3.1.2. Testis Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmakla birlikte gonadların erkek veya dişi özellikleri ancak 7. haftadan sonra gözlenebilir. Gonadlar başlangıçta, genital ya da gonadal şişkinlikler adı verilen kölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş uzunlamasına şişlikler şeklinde görülür. Germ hücreleri, gelişimin 6. haftasına kadar genital kıvrımların içinde belirmezler (3).

Primordiyal germ hücreleri, 4. hafta başında umbilikal kese (yolk kesesi ya da vitellus kesesi) duvarında, allantoyisin başlangıç yerine yakın endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanması sırasında primordiyal germ hücreleri, arka barsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler. 6. hafta sırasında primordiyal germ hücreleri, altındaki mezenşim içersine girerler ve gonadal kordonlara dahil olurlar (Şekil 2).



Şekil 2: Primordiyal germ hücrelerinin göçü ve gonadal farklılık (4).

Y kromozomun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktör (TBF) için SRY geni farklanmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar fonksiyonu görmektedir. Transkripsiyon faktörü olan Sox9 da testiküler farklılaşma için gereklidir. Testis belirleyici faktör gonadal kordonları uyararak, onların farklanmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına neden olur. Kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece rete testis oluşur. Gonadal kordonların –seminiferöz kordonlar- kalın bir fibröz kapsül olan tunica albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur.

Tunica albuginea'nın gelişimi, testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis, aşamalı olarak dejenere olan mezonefroza ayrılır ve kendi mezenterisi olan mezorşiyum ile asılı hale geçer. Seminiferöz kordonlar; seminiferöz tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklıdır.

Seminiferöz tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşim ile ayrılmışlardır. 8. haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları –testosteron ve androstenedione- salgılamaya başlarlar. Bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genitalerin maskülin olarak farklılaşmasını uyarırlar. Testosterona ilaveten, fetal testisler glikoprotein karakterli bir hormon olan Anti Müllerian Hormon (AMH) salgırlar. Sertoli hücreleri (destek hücreleri) tarafından salgılanan bu hormon, uterus ve tuba uterinalara farklılaşan paramezonefrik (müllerian) kanalların gelişimini baskılar. Bu hormonun salgılanması puberteye kadar devam eder. Seminiferöz tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar (yani lümenleri yoktur) ancak puberteden itibaren lümen gelişir.

Fetal testiste Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluğu oluştururlar. Daha sonraki fetal gelişim sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, ductuli efferentes'i oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam ederek ductus epididimis'i oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar (4).

3.1.3. Testis Fizyolojisi

Seminifer tübüllerde iki ya da üç sıra halinde bulunan spermatogonyumlar, puberteden itibaren mitoz bölünmeler geçirerek sürekli olarak proliferasyon gösterirler. Daha sonra spermatogonyumlar, değişik basamaklardan geçerek spermleri oluştururlar. Bu olaya spermatogenez denilir ve bir takım hormonların etkisinde gerçekleşir.

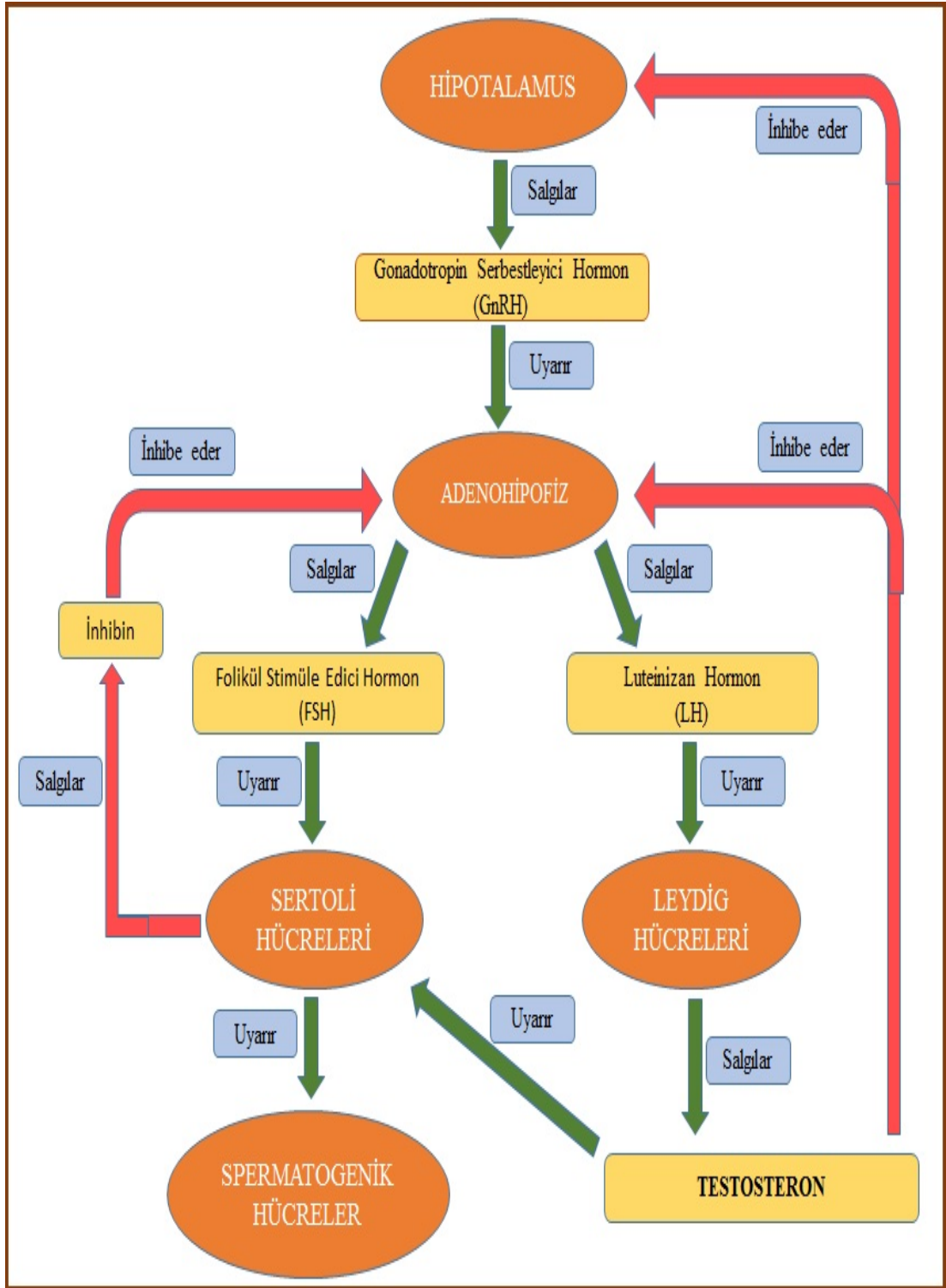
Erkek ve kadın her iki cinstede cinsel işlevlerin kontrolü, büyük oranda hipotalamustan salgılanan "gonadotropin serbestleyici hormon (GnRH)" ile sağlanır. Bu hormon, ön hipofiz bezini uyararak "luteinizan hormon (LH)" ve "folikül stimüle edici hormon (FSH)" salgılanmasına neden olur. Luteinizan hormon, testislerden testosteron salgılanması için başlıca uyarandır. Folikül stimüle edici hormon ise özellikle spermatogenez uyarır.

Testosteron; testislerde intersitisyel alanda yerleşim gösteren Leydig hücrelerinden salgılanan bir hormon olup, sperm yapımının ilk aşaması olan testisin germinal hücrelerinin büyüme ve bölünmeleri için gereklidir. Testosteron salgılanması, ön hipofiz bezinden salgılanan LH' nin uyarısıyla gerçekleşir. Testosteron salgılanması negatif geri bildirim ile gerçekleşir. Salgılanan testosteron hormonu, bir süre sonra ön hipofiz bezini uyararak LH ve FSH

üretimini baskılar, böylece LH ve FSH' nin miktarındaki azalmaya bağlı olarak testislerde üretilen testosteron hormonu miktarı da azalmış olur.

Folikül stimüle edici hormon, seminifer tübüllerde bulunan Sertoli hücrelerine, özgül FSH reseptörleri aracılığıyla bağlanır. Bu bağlanma, buradaki hücrelerin büyümesine ve spermatogenez için gerekli olan maddelerin üretilmesine neden olur.

Spermatogenezin hızlı artışı ile Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin hormonu, ön hipofiz bezini uyararak FSH salgısını baskılar (Şekil 3). Spermatogenezin az olduğu durumda ise ön hipofiz bezinden FSH salgısı artar ve yeniden spermatogenez artmaya başlar (5).



Şekil 3: Spermatogenezin hormonal kontrolü (5).

3.1.4. Testis Histolojisi

3.1.4.1. Testisler

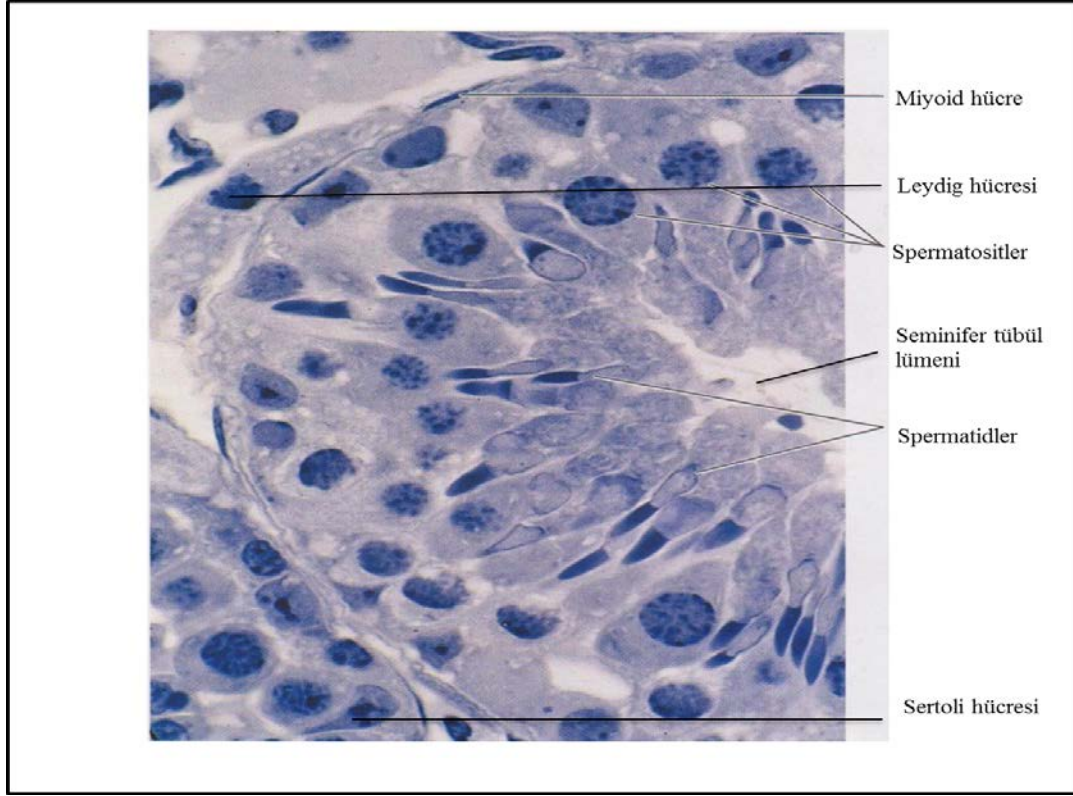
Her bir testis, dışta tunika albuginea adı verilen kalın bir bağ dokusu kılıfı ile çevrilidir. Daha ite ise tunika vasküloza adı verilen damarca zengin olan bir gevşek bağ dokusu ile sarılıdır. Tunika albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşarak ve her bir testis içerisine uzanarak mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testisten içeriye doğru uzanan ince bir bağ doku yapısında olan septumlar testisi lobüller olarak adlandırılan bölümlere ayırırlar. Her bir lobül içerisinde 1-4 adet seminifer tübül bulunur.

3.1.4.2. Seminifer tübüller

Seminifer tübüller, uzun ve kıvrıntılı tübüller olup germinal epitel adı verilen çok katlı epitel ile döşelidir. Bazal laminaya yapışık olan en iteki tabakası, düz kas özelliği de gösteren yassılaşmış miyoid hücreler içerir. Germinal epitel; sperm üretimini sağlayan spermatogenik hücreler ile gelişmekte olan spermleri besleyen, destekleyen Sertoli hücreleri olmak üzere iki tip hücre içerir.

Germinal epitelde bulunan spermatogonyumlar, seminifer tübülün bazal membranı üzerine oturmuştur. Spermatogonyumlar, spermatogeneze girerek erkek üreme hücresi olan spermleri (spermatozoonları) meydana getiren ilkel üreme hücreleridir (şekil 4).

Her bir seminifer tübülün arasında; fibrositleri, kan damarlarını, sinirleri, lenf damarlarını ve Leydig hücrelerini içeren bir bağ doku bulunur. Mediastinum testiste seminifer tübüller düzleşerek, kısa ve dar yapılı kanallara dönüşürler. Rete testis adını alan bu kanallar, spermatogenik hücrelerden yoksun kübik veya alçak prizmatik epitel ile döşelidir.



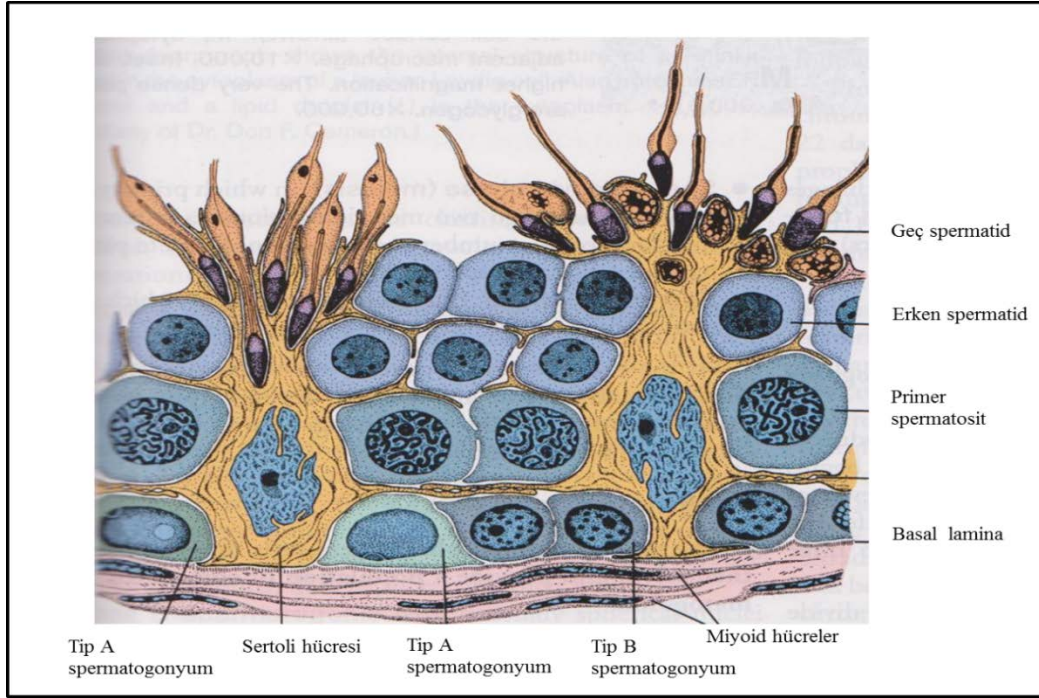
Şekil 4: Testisin histolojik görünümü (6).

3.1.4.3. Spermatogenez

Spermatogenez, sperm üretim sürecidir. Spermatogonyumlar, pubertede mitoz bölünmeler geçirerek çoğalmaya başlarlar. Bu süreçte oluşan yeni hücreler iki yoldan birini izlerler. A tipi spermatogonyumlar olarak adlandırılan hücrelerden bir kısmı kök hücre olarak bölünmeyi sürdürüp yeni hücreler oluştururlar.

Diğer bir hücre grubu ise B tipi spermatogonyumlar olarak adlandırılırlar ve spermleri oluşturan öncül (progenitor) hücrelerdir. B tipi spermatogonyumlar farklılaşarak, 46 kromozomlu (insanda) primer spermatoisitlere dönüşürler. Daha sonra bu hücreler hemen birinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Spermatogenezin en büyük hücreleri olan primer spermatoisitler, birinci mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatoisitler olarak adlandırılırlar. Kromozom

sayısı yarıya inen bu hücreler, hemen ikinci mayoz bölünmeye girdiklerinden testis kesitlerinde gözlenmeleri zordur. İkinci mayoz bölünme sonucunda 23 kromozom içeren ve spermatid adını alan hücreler meydana gelmesiyle spermatogenez sonlanır (Şekil 5).



Şekil 5: Spermatogenez (7).

3.1.4.4. Spermiyogenez

Spermiyogenez, sperm oluşumunun son aşamasıdır ve bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Temel olarak; akrozom oluşumu, çekirdek yoğunlaşması ve uzaması, kamçı oluşumu ile sitoplazmik artıkların oluşumu gibi evrelerden oluşan spermiyogenez, sperm olgunlaşması için gerekli olan karmaşık bir süreçtir. Spermatidlerden farklılaşan sperm, daha sonra seminifer tübül lümenine bırakılırlar (6).

3.1.4.5. Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri, sperm, sperm, sperm beslenmesinde, desteklenmesinde ve olgunlaşmasında çok önemli rol oynar. Sınırları güçlükle ayırt edilen bu hücreler

prizmatik görünümlü olup, bazal membrandan seminifer tübül epiteline kadar uzanırlar. Tepe kısımlarında spermlerin lümene bırakılmasına kadar yerleştiği, kriptaya benzer girintiler bulunur.

Sertoli hücreleri belirgin bir çekirdekçik ile ökromatin bir çekirdeğe sahiptir. Bitişik hücreler taban ve yan yüzeylerindeki sıkı bağlantı kopleksleriyle birbirlerine tutunurlar (8).

Sertoli hücrelerinin birkaç işlevi vardır. Bunlar;

1. Gelişmekte olan spermlerin desteklenmesi, korunması ve beslenmelerinin düzenlenmesi.
2. Sitoplazmik artıkların fagosite edilmesi.
3. Androjen bağlayıcı protein salgılanması.
4. Embriyonik gelişim sırasında AMH salgılanması.
5. Spermleri zararlı maddelerden korumak için kan-testis bariyerini oluşturması.
6. FSH üretimin baskılayan inhibin üretilmesi (6).

3.1.4.6. Kan-testis bariyeri

Komşu Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları, tıkayıcı sıkı bağlantılar ile birbirlerine kaynaşırlar ve her bir seminifer tübülü bazal kompartman ve adlüminal kompartmana ayıran kan-testis bariyerini oluştururlar. Bu bariyer sayesinde spermatogenezle oluşan spermler, plazma proteinleri ile kan kaynaklı antikordlardan uzak tutulmuş olunur. Çünkü spermatogenik hücreler, vücut tarafından yabancı madde olarak tanınıp buna karşı immün yanıt oluşturabilirler.

Bu şekilde kan-testis bariyeri, kişinin kendi spermine karşı otoimmün yanıt oluşturarak antikor oluşumunu engellemiş olur. Sonuçta spermatogenezin bozularak sterilitenin ortaya çıkışı engellenir (9).

3.1.4.7. Leydig hücreleri

Seminifer tübüllerin arasındaki bölgelerde yer alan Leydig hücreleri testosteron salgılayan önemli hücrelerdir. Hücre yüzeyleri mikrovillus bakımından oldukça zengindir. Sahip olduğu organel ve inklüzyonların çoğu testosteron sentezini ve salgısını düzenler.

Leydig hücreleri tarafından sentezlenen testosteron mikrovilluslar tarafından yüzey alanı arttırılmış hücre zarından difüzyon ile geçerek hızla dolaşımında yer alan steroid bağlayıcı proteinlere bağlanır (8).

3.2. Tütün

Tütün, bitki sistematığında Solanaceae familyası (Patlıcangiller)'nin , "Nicotiana" cinsi içerisinde yer alan bir bitkidir (10). "Nicotiana" cinsine ait yaklaşık 65 tane tür vardır. Ancak bu türlerden sadece "*Nicotiana tabacum*" ve "*Nicotiana rustica*" türleri tütün ürünleri yapımında kullanılmaktadır (11,12).

Tütün, başlangıçta bir şifa bitkisi olarak insanların dikkatini çekse de sonraki dönemlerde sigara, nargile, pipo, puro, enfiye ve çiğneme şeklinde keyif verici olarak kullanılmaya başlanmıştır (13).

Tütün yaprağının kimyasal ve fiziki özellikleri oldukça önemlidir. Bu nedenle yaprağında ihtiva ettiği nikotin, total azot ve indirgen maddelerin miktarları tütün ürünlerinin üretiminde büyük önem taşımaktadır. Fiziksel olarak

da yaprağın büyüklüğü, biçimi, su tutma kabiliyeti ve yanma özelliği önemlilik arz eder.

Tütünü diğer bitkilerden ayıran en önemli özelliği, organik azotlu bir madde olan nikotin içermesidir. Köklerde sentezlenip yapraklarda depolanan nikotin; keyif verici ve bağımlılık yapan güçlü bir alkaloidtir (14,15).

3.2.1. Tütün Kullanımın Tarihçesi

Tütün ilk olarak Amerika kıtasında ortaya çıkmış ve Amerika'nın keşfedilmesiyle beraber diğer ülkelere götürülmüştür (16). Kızılderililer, "petom" adını verdikleri tütünün kurutulmuş yapraklarını, uzun çubuklarla veya tütün yaprağına sararak ilkel bir puro şeklinde tütürerek kullanmışlardır (17).

Orta Amerika'da yaşayan halklar arasında tütün kullanımının giderek yaygınlaşması üzerine İspanya, Portekiz, İngiltere ve Fransa gibi ülkeler, Amerika kıtasındaki sömürgelerinde tütün üretimine başlamışlardır. Bu sayede tütün ticaretinden gelir sağlama yoluna gitmişlerdir.

Tütünün ilk defa yabancı gemiciler aracılığıyla İstanbul'a getirildiği çeşitli kaynaklarda ifade edilmektedir (16).

Önceleri dini törenlerde kullanılan tütün, sonradan süs ve şifa bitkisi olarak kullanılmıştır. Keyif verici olarak yaygınlaşmasından sonra da tüketimi hızla artmıştır (16).

3.2.2. Tütünün İçeriği

Tütünün yapraklarında yaklaşık 2500 civarında inorganik ve organik madde bulunur. Oysa tütün dumanında 4000 civarında madde bulunur ki bunların çoğunluğu toksik etkilere sahiptir. Tütün yapraklarının 500-900°C'lik bir sıcaklıkta yanmasıyla bu toksik ürünler meydana gelir (18,19).

1985 yılında The International Agency for Research on Cancer (IARC) tütün dumanının insanlar için birinci grup karsinojen olduğunu kabul etmiştir. Dumanında yer alan maddeler farmakolojik olarak aktif, mutajenik veya toksik özelliktedir (20) (Tablo 1).

Tablo 1: Tütün dumanında bulunan bazı maddeler (21).

TÜTÜN DUMANINDA BULUNAN BAZI MADDELER			
	Madde	Kullanıldığı yerler	Başlıca etkisi
Partikül fazı	Nikotin	Böcek ilacı	Bağımlılık yapar. Taşikardi, baş ağrısı depresyon, epileptik ataklar.
	Arsenik	Tarım ve böcek ilaçları, boya imalatı, fare zehiri	
	Benzopiren		Erkek ve kadında infertilizasyon, ampizem ve solunum sistemi hasarı.
	Benzen	Kauçuk, vernik ve mürekkep yapımı.	Kromozomal aberasyonlar.
	Strien	Plastik, polyester ve sentetik kauçuk üretimi.	Spontan düşük ve anormal sperm sayısında artış,
	Fenol		
	Naftalmin		
	Radyoaktif elementler	Polonium-210, kurşun-210, radyum-226	
	Gaz fazı	Karbonmonoksit	Egzoz gazı
Karbondioksit		Egzoz gazı	
Aldehitler (formaldehit)		Endüstride fertilizer, boya, dezenfektan, mumyalama sıvısı.	Karsinojen. Astım, gözde kaşınma gibi alerjik reaksiyonlar,
Hidrojen siyanid		Buharla dezenfeksiyon, insektisit, fotoğrafçılık.	Nazal irritasyon, konfüzyon, baş ağrısı, vertigo,
Amonyak			Yoğun irritasyon, ciddi göz hasarı ve astım.
Aseton, azot, vinil klorid, nitrosaminler, akrolein			

3.2.3. Tütün Epidemiyolojisi

Tütün ürünlerinin kullanım sıklığı, 'Küresel Yetişkin Tütün Araştırması (KYTA) Türkiye 2012' raporuna göre erkeklerde % 41,5 kadınlarda ise % 13,1 olduğu bildirilmiştir. Sigara % 25,7'lik değerle en fazla kullanılan tütün ürünü iken nargilede bu oran %0,8'dir. Öte yandan günde içilen sigara sayısının ortalamasının ise 19,2 olduğu tespit edilmiştir. Günde içilen sigara sayısı erkeklerde %20,3 iken kadınlarda %15,3'tir. 18-34 yaş aralığındaki kişilerin %16,1'i 15 yaşından önce, %58,7'si ise, 18 yaşından önce sigara içmeye başlamıştır (22).

Bazı ülkelerde sigara içimi azalmakla birlikte dünya üzerinde yaklaşık 1,2 milyar kişi halen sigara içmektedir. Genel olarak erkeklerin %57'si kadınların ise %10'u tütün ve tütün ürünlerini kullanmaktadır (23). Sigara içimi dünya ülkeleri arasında giderek artmakta olup üçüncü dünya ülkeleri arasında 2025 yılına kadar içici sayısının 4,5 milyardan 7,1 milyara çıkması beklenmektedir. (24).

Tablo 2: Tütün kullanımının epidemiyolojisi (22).

Tütün ürünü içme durumu	Toplam	Erkek	Kadın
Halen içen	27,1 (25,8-28,3)	41,5 (39,4-43,5)	13,1 (12,0-14,3)
Hergün içen	23,8 (22,6-25,0)	37,3 (35,4-39,3)	10,7 (9,6-11,8)
Ara sıra içen	3,3 (2,9-3,7)	4,1 (3,5-4,9)	2,4 (2,0-3,0)
Ara sıra içen, önceden hergün içen	1,5 (1,2-1,8)	2,0 (1,6-2,5)	1,0 (0,7-1,3)
Ara sıra içen, hiç hergün içmeyen	1,8 (1,5-2,2)	2,2 (1,7-2,8)	1,4 (1,1-1,9)
Tütün ürünü içmeyen	72,9 (71,7-74,2)	58,5 (56,5-60,6)	86,9 (85,7-88,0)
Eskiden hergün içen	9,4 (8,7-10,2)	14,4 (13,2-15,8)	4,6 (3,9-5,4)
Hiç hergün içmeyen	63,5 (62,1-64,8)	44,1 (42,1-46,1)	82,3 (80,9-83,7)
Eskiden ara sıra içen	3,7 (3,3-4,2)	4,2 (3,6-5,0)	3,2 (2,7-3,9)
Hiç içmemiş olan	59,8 (58,3-61,2)	39,9 (37,9-41,9)	79,1 (77,5-80,6)
<hr/>			
Tütün ürünü içme durumu	Toplam	Erkek	Kadın
Halen içen	14.764,3	11.138,3	3.626,0
Hergün içen	12.980,8	10.026,5	2.954,4
Ara sıra içen	1.783,4	1.111,8	671,7
Ara sıra içen, önceden hergün içen	805,1	530,7	274,4
Ara sıra içen, hiç hergün içmeyen	978,4	581,1	397,3
Tütün ürünü içmeyen	39.783,5	15.723,6	24.059,8
Eskiden hergün içen	5.152,6	3.879,0	1.273,6
Hiç hergün içmeyen	34.630,8	11.844,6	22.786,3
Eskiden ara sıra içen	2.028,0	1.138,8	889,1
Hiç içmemiş olan	32.602,9	10.705,7	21.897,1

3.2.4. Tütünün İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Tütün; trafik kazaları, alkol, AIDS, uyuşturucu gibi önlenabilir ölüm nedenlerinin hepsinden daha ölümcül olanıdır. Yetişkin ölümlerinin yaklaşık her 10 tanesinden biri, sigaraya bağlı nedenlerle olmaktadır. Daha da önemlisi önümüzdeki yıllarda bu oranın artacağı ve 2030 yılında ölümlerin yaklaşık 10 milyonu sigara kaynaklı olacağı tahmin edilmektedir. (25).

En fazla kullanılan tütün ürünü olan sigara, temel bir halk sağlığı problemi olup kronik hastalıklarda oldukça önemli rol oynar. Sigara içimi ile kalp-damar hastalıkları, akciğer hastalıkları ve çeşitli kanser tipleri arasında sıkı bir ilişki olduğunu gösteren birden fazla klinik çalışma bulunmaktadır (26).

Sigaranın neden olduğu bu hastalıklar yüzünden her yıl tüm dünyada milyonlarca kişi ölmektedir. Tütünün yanmasıyla ortaya çıkan dumandaki kimyasal bileşenler, çeşitli doku ve organlarda toksik etki meydana getirir (3) (Tablo 3).

Tablo 3: Tütün kullanımının insan sağlığına etkileri (22).

TÜTÜN KULLANIMININ İNSAN SAĞLIĞINA ETKİLERİ	
ÜST SOLUNUM SİSTEMİ	Otit, rinosinüzit, üst aerodijestif sistem kanserleri, oral ve farengeal kanser, larenks ödemi ve kanseri,
ALT SOLUNUM SİSTEMİ	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH), akciğer kanseri, astım, İnterstisyel Akciğer Hastalığı (İAH), nonspesifik enfeksiyonlar ve pnömoni, tüberküloz, Good-Pasture Sendromu
KALP- DAMAR SİSTEMİ	Akut miyokard infarktüsü, endotel disfonksiyonu, ateroskleroz, inflamasyon, tromboz
GASTROİNTESTİNAL SİSTEM	Gastroözofageal reflü hastalığı, dispepsi, Crohn hastalığı, özofagus-mide- kolorektal-pankreas kanserleri
ÜROGENİTAL SİSTEM	Böbrek, mesane ve prostat kanserleri, böbrek yetmezliği, infertilite, erken menapoz, spontan abortus, konjenital malformasyonlar
SİNİR SİSTEMİ	İnme, demans, Parkinson Hastalığı, Multiple Skleroz, baş ağrısı, migren
KAS-İSKELET SİSTEMİ	Osteoporoz, kırık iyileşmelerinde gecikme, osteoartrit, romatoid artrit,
GÖZ VE CİLT	Maküla dejenerasyonu, katarakt, erken cilt yaşlanması, yara iyileşmesinde bozulma,
İMMÜN SİSTEM	Doğal öldürücü hücrelerde, alveolar makrofaj fonksiyonlarında, serum lizozim seviyesinde ve IgG ile IgA seviyelerinde azalma, IL-8, IL-16 ve alveolar makrofaj sayısında artış.

3.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller; dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron ya da elektronlar içeren kimyasal türlerdir (28, 29). Bu ortaklanmamış elektronlardan dolayı oldukça reaktif olan serbest radikaller vücuttaki tüm hücre bileşenleri (yağlar, proteinler, kompleks karbohidratlar ve nükleik asitler) ile kimyasal reaksiyona girerler. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) kaynaklı bu reaksiyonlar ise doku hasarına neden olurlar (28) (Tablo 4).

Tablo 4: Serbest radikaller (30).

Reaktif türler	Formülü	Özellikleri	
Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	Süperoksit radikali	$\cdot\text{O}_2^-$	Çok kararsız, sinyal iletici
	Hidrojen peroksit	H_2O_2	Hücresele toksik, sinyal iletici
	Hidroksil radikali	$\cdot\text{OH}$	Çok kararsız, yüksek derecede reaktif ajan
	Peroksil radikali	$\text{ROO}\cdot$	Lipidlerin reaksiyon ürünü
	Singlet oksijen	$^1\text{O}_2$	Uyarılmış oksijen molekülü, radikal ve radikal olmayan formda
	Ozon	O_3	Çevresel toksin
Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)	Nitrik oksit	$\text{NO}\cdot$	Çevresel toksin, endojen sinyal molekülü
	Peroksi nitrit	$\text{ONOO}\cdot$	Yüksek derecede reaktif
	Nitrojen dioksit	$\cdot\text{NO}_2$	Yüksek derecede reaktif radikal, çevresel toksin
	Nitrojen oksitler	NO_x	Çevresel toksinler, NO ve $\cdot\text{NO}_2$ ihtiva eder.

Serbest radikaller genelde hücre sinyali ve vital fizyolojik fonksiyonlar için gereklidir. Ancak konsantrasyonlarının artması, hücresele redüksiyon-oksidasyon (redoks) dengesinde değişime ve normal biyolojik fonksiyonun

bozulmasına neden olabilir. Serbest radikallerin bir türü olan ROS'lar ve vücuttaki antioksidan koruma sistemleri arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres meydana gelir (31).

Endojen ROS'ların düşük seviyeleri kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve sperm-oosit füzyonu için gereklidir (32, 33). Ancak erkek germ hücreleri yüksek reaktif seviyelerine karşı oldukça duyarlıdır (34). Motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, ovum penetrasyonu ve sperm başının decondensasyonu gibi normal sperm üretim aşamaları fertilizasyon için şarttır. Ancak birçok çalışmada bu aşamaların oksidatif stres ile ilgili mekanizmalar nedeniyle sekteye uğradığı gösterilmiştir (35-38).

Membranlarının çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin olması sebebiyle sperm serbest radikal kaynaklı peroksidaz hasarlarına karşı oldukça duyarlıdır (39). Yüksek miktardaki ROS'lar; membran proteinleri, membran lipitleri, mitokondriyal ve nükleer DNA ile etkileşerek sperm üretimi ve kalitesini olumsuz yönde etkiler (40, 41).

3.4. Nitrik Oksit ve Endotelial Nitrik Oksit Sentaz

Nitrik Oksit (NO); nitrik oksit sentazlar (NOS) adı verilen bir enzim ailesi tarafından sentezlenen inorganik serbest radikal bir gazdır. NOS ailesi 3 farklı izoformdan meydana gelir; nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) (42).

NOS izoformları fonksiyonel olarak NO üretme etkilerine bağlı olarak 2 gruba ayrılır: eNOS ve nNOS Ca^{+2} kalmodulin aracılı bir mekanizma ile düzenlenen aktive gösterirken (43,44), iNOS aktivitesi proinflatuar sitokinler

(IL-1, TNF- α , interferon γ) ve bakteriyel lipopolisakkaritler gibi inflamatuvar uyarılara cevaben uyarılır (45).

Testislerde NO/NOS; spermatogenezde (46-50), sperm motilitesi ve matürasyonunda (46, 51). Leydig hücre steroidogenezinde (52-54) düzenleyicidir. Testiküler hormon ve sitokinlerinin üretimine katkı sağlarlar. Ayrıca seminifer tübül epitelindeki adherens bağlantıların ve tight junctionların (sıkı bağlantıların) düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (50).

Başarılı bir fertilizasyon için fizyolojik olarak belli bir seviyede NO'ye ihtiyaç duyulur. Sperm ile yumurtanın birleşmesi sırasında spermin akrozomundan salınan NO, yumurtada mayoz II'nin tamamlanmasını aktive eder (55).

Hem nNOS hemde eNOS; erkek üreme sisteminde normal fizyolojik olaylarda önemli rol üstlenirler. Bunlardan biri de testislerdeki intersistiyel hücrelerden steroid hormonların biyosentezinin ve sekresyonunun düzenlenmesidir (56, 57).

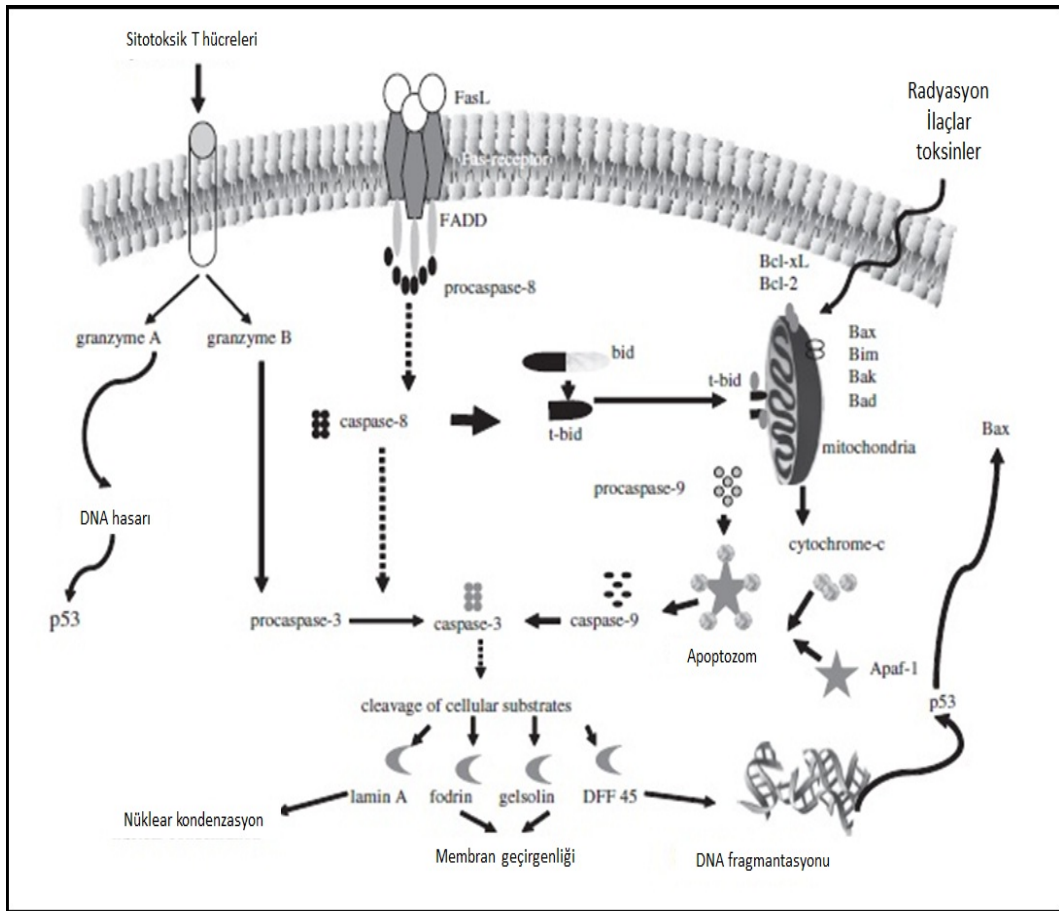
3.5. Apoptozis

19. yüzyılın ortalarından itibaren çok hücreli organizmalarda özellikle embriyogenez gibi çok önemli fizyolojik olayların temelinde apoptozis adı verilen hücre ölümünün var olduğu bildirilmiştir (58, 59).

Yunanca'dan köken alan apoptozis terimi kelime anlamı itibariyle "dökülme ya da düşme" anlamına gelmektedir. Organizmanın yaşam döngüsünün devamı için bu süreç oldukça gereklidir. Apoptozis; patolojik ve fizyolojik şartlarda dokulardaki hücre popülasyonlarının regülasyonunda ve korunmasında, çok hücreli organizmaların gelişiminde aktif olarak rol oynar (60).

Çevresel kimyasalların çoğu hormonal olarak aktif olup, doğrudan endokrin sistemi etkileyerek üreme sistemi üzerine olumsuz etkiler yapar (61-63).

Spermatogenez esnasında oluşan ROS'lar, testislerdeki apoptozisin düzenlenmesinde yer alırlar (64). Testiküler apoptozis, spermatogenez süresince devamlı olarak gerçekleşir. Bu düzenleyici süreçte hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yollar rol oynarlar (65, 66).



Şekil 6: Apoptozis yolağı (67).

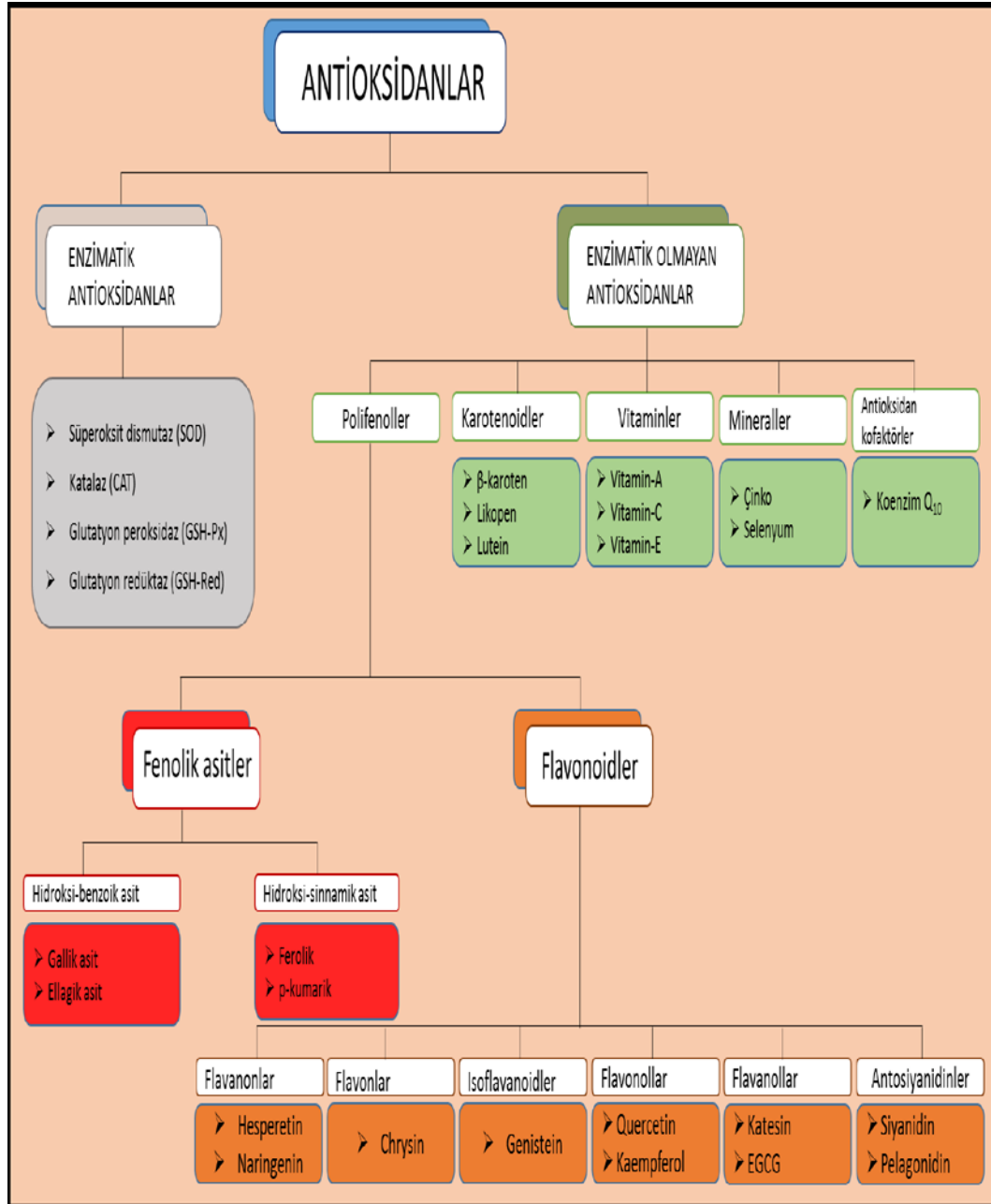
3.6. Antioksidanlar

Antioksidanlar; lipid peroksidasyonunu yavaşlatmada görev alan, yapısında monohidroksi/polihidroksi fenol bulunan kimyasal bileşiklerdir (68). Bu bileşikler hidrojen atomunu vermek için düşük aktivasyon enerjisine sahiptir ve ikinci serbest radikalleri oluşturmazlar (69) (Tablo 5).

Organizmalar, hücreleri ve organları reaktif oksijen türlerine karşı korumak için oldukça özel ve kompleks antioksidan koruma sistemlerine sahiptir. Hem endojen hem de ekzojen kaynaklı bu sistemler; besin kaynaklı antioksidanlar (askorbik asit, tokoferoller, vitamin E, vb.), antioksidan enzimler (SOD, GSH-Px, GSH-Rd), metal bağlayan proteinler (ferritin, laktoferrin ve albumin) olmak üzere çeşitli bileşenlerden oluşur. (70).

Antioksidanlar iki farklı grupta sınıflandırılır: primer (doğal) antioksidanlar ve sekonder (sentetik) antioksidanlar. Primer antioksidanlar, lipid radikallerle etkileşime girerek onları daha stabil hale getiren zincir kırıcı antioksidanlardır. Sekonder antioksidanlar ise serbest radikalleri yakalayıp zincir tepkimeleri durdurarak işlev görürler (71).

Tablo 5: Antioksidanların sınıflandırılması (72).



3.7. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşenlerin geniş bir grubudur. Bu bileşenler doğada hem serbest halde hem de glikozillenmiş formda bulunabilir. Yapılan bazı çalışmalarda flavonoidlerin anti-oksidan, anti-kanserojen ve anti-inflamatuvar gibi özellikleri olduğu rapor edilmiştir (73, 74).

Flavonoidler, oksijen içeren bir piren halkası (C) ve bu halka ile ilişkili iki adet benzen halkası (A ve B) içerir. Piren halkasının C-3 pozisyonunda bir adet hidroksil grubu bulunduranlar 3-hidroksiflavonoidler olarak sınıflandırılırken hidroksil bulundurmayanlar ise 3-deoksiflavonoidler olarak sınıflandırılır (75).

Flavonoidlerin yapılarında yer alan hidroksil gruplarının serbest radikalleri süpürücü görevi vardır ve bu özellikleri sayesinde antioksidan özellik gösterirler (76, 77).

Yapısal farklılıklarına göre Flavonoidler; Flavonoller, Flavonlar, Flavanonlar, Katesinler, Antosiyanidinler ve İzoflavonlar olmak üzere altı büyük gruba ayrılırlar (78).

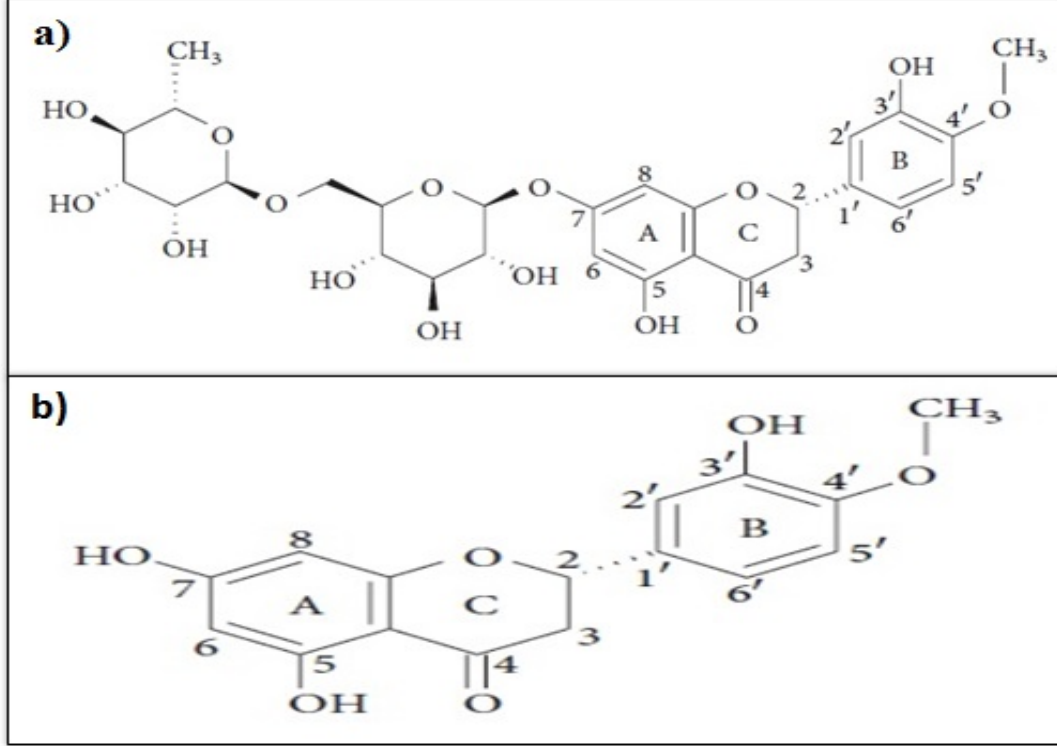
3.7.1. Hesperetin

Hesperetin (HES) (3', 5, 7-trihydroxyl -4'-methoxyl flavanone) limon, portakal ve greyfurt gibi turunçgillerde en bol bulunan flavanoiddir (79) (Şekil 7a).

Hesperidin ise yaygın olarak narenciye meyvelerinde glikozillenmiş halde bulunan bir flavanoid olup ilk olarak Fransız kimyager Lebreton tarafından narenciye kabuğundan izole edilmiştir (80) (Şekil 7b).

Hesperidin ve hesperetin önemli biyolojik aktivitelere sahip olduklarından biyoflavonoid olarak da adlandırılırlar (80).

Şekil 7: Hesperidin (a) ve Hesperetin (b) kimyasal yapısı (81).



Hesperidin (hesperetin-7-rutinoside)'nin aglikon formu olan hesperetin özellikle anti-inflamatuvar, anti-karsinojenik, anti-hipertansif, anti-aterojenik ve antioksidan gibi farmakolojik özellikleri vardır (80, 82, 83). Hesperetin biyolojik olaylardaki baskılayıcı mekanizması; antioksidan aktivitesi, enzim inhibisyonu ve serbest radikalleri süpürme kapasitesinden ileri gelmektedir (84).

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda; peroksi nitrit, hidrojen peroksit ve diğer bazı kimyasal toksinlerin dokularda meydana getirdiği oksidatif stres kaynaklı hasarlara karşı hesperetin ve hesperidin koruyucu etkileri araştırılmıştır (85, 86). Hesperetin ve hesperidin antioksidan özelliği iki farklı yoldan gerçekleşir. Birincisi, doğrudan serbest radikal süpürücü etki. Diğeri ise hücrel

antioksidan korunma mekanizmasına katılma. Serbest radikalleri doğrudan süpürücü etkisi; deoksiribonükleik asit (DNA), protein ve diğer dokuları; iç ve dış çevre faktörlerinin oluşturduğu hasarlara karşı korumada önemlidir (87).

Hesperidin, bağırsaklarda aglikon formu olan hesperetine dönüştürüldükten sonra emilimi gerçekleşir. Bu dönüşümü ise, bağırsak mikroflorasında yer alan alfa rannoizidaz ve beta glukozidaz (ya da endo-beta glukozidaz) enzimlerini üreten bakteriler gerçekleştirir (88). Kolonositlerce aktif transport ve transselüler pasif difüzyon ile absorbe edilen hesperetin ayrıca enterositlerce de direkt absorbe edilir (89, 90).

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda hesperetinin meme (91), mesane (92), ve kolon (93, 94) kanserlerini baskıladığı bildirilmiştir. Hesperetinin diğer major narenciye flavanonlarından olan narengenin gibi antioksidan özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (95, 96). Ancak bu etkinin diğer polifenollerle karşılaştırıldığında daha zayıf olduğu düşünülmektedir. Hesperetinin diğer bir özelliği ise lipid metabolizması ile ilişkilidir. Hesperetinin HepG2 hücrelerinden apolipoprotein B sekresyonunu düzenleyerek, kolesterol ester sentezini inhibe ettiği rapor edilmiştir (97). Tavşanlar üzerine yapılan bir çalışmada ise yüksek kolesterol diyeti ile birlikte uygulanan hesperetinin düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve hepatik kolesterol seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir (98).

3.8. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada tütün dumanı maruziyetinin testis dokusunda oluşturacağı hasara karşı hesperetinin koruyucu etkilerinin TUNEL metodu, spermatolojik değerlendirmeler ile histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 05/02/2014 tarih ve 2014/4 sayılı 43 no'lu kararı gereğince etik yönden uygun bulunarak, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM), Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarları ve Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya laboratuvarında yapıldı.

Çalışma bütçesinin tamamı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)'nin TF.14.26 proje no'lu kararı gereğince karşılandı.

4.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri

Çalışmada kullanılan ve ağırlıkları ortalama 200 ± 10 gr olan 24 adet 8 haftalık erişkin Sprague-Dawley cinsi erkek ratlar, FÜDAM biriminden temin edildi. Ratlar deney süresince buldukları ortamın sıcaklığı 21 ± 1 °C arasında sabit tutularak 12 saat (07:00-19:00) aydınlık, 12 saat (19:00- 07:00) karanlık foto periyodunda barındırıldı.

Ratlar Elazığ Yem Sanayi A.Ş. Yem Fabrikası'nda pelet şeklinde özel olarak hazırlanmış rat yemleriyle beslendi. Yemlerin bileşimi tablo 6'da gösterildi. Tüm hayvanlara standart rat yemi verilerek ad libitum su ve yiyecek alımları sağlandı. Yemler; çelik kaplarda, su ise paslanmaz çelik bilyeli cam biberonlarda günlük normal çeşme suyu olarak verildi.

Tablo 6: Ratlara verilen pelet yemin bileşimi

Madde adı (%)	Miktarı
Buğday	15
Mısır	10
Arpa	27
Kepek	8
Soya	29,4
Balık unu	8
Tuz	0,6
Kavimix VM23-Z	0,2
Methionin*	0,2
DCP**	1,6

* 1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0,006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth., 0,32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca bulunur. ** % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur.

4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada kullanılan 24 adet rat, ilk tartımları yapıldıktan sonra her grupta 6 adet rat olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı (Tablo 7).

Çalışma boyunca tüm ratlar, haftalık olarak tartıldı. FÜDAM'daki diğer ratların duman kokusundan etkilenmemesi için tütün dumanına maruz bırakılan ratlar, ayrı bir odada barındırıldılar.

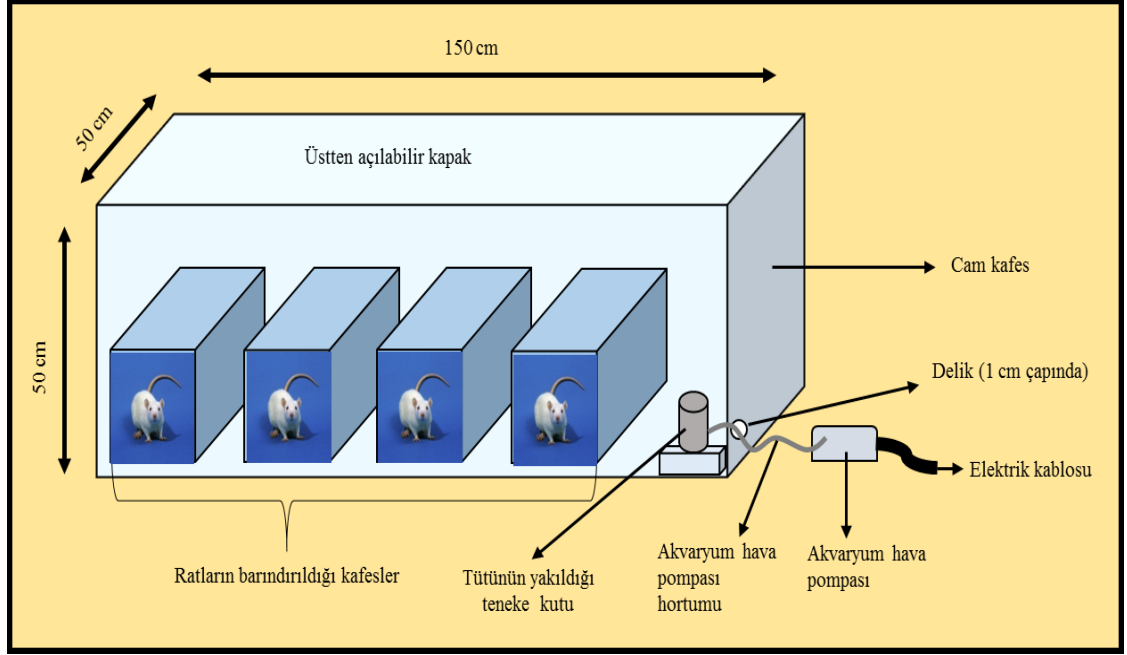
Tablo 7: Deney hayvanlarının gruplandırılması.

Gruplar	Uygulamalar
Kontrol grubu (Grup I)	Herhangi bir işlem uygulanmadı.
Tütün dumanına maruz bırakılan grup (Grup II)	Özel olarak hazırlanmış cam kafes içerisinde günde 2 defa 1'er saat tütün dumanına maruz bırakıldı.
Tütün dumanına maruz bırakılan + mısırözü yağı grubu (Grup III)	Tütün dumanına ek olarak HES'i çözmede kullanılan miktarda mısırözü yağı gün aşırı oral gavaj ile verildi.
Tütün dumanına maruz bırakılan + HES grubu (Grup IV)	Tütün dumanına ek olarak 50 mg/kg dozunda mısırözü yağında çözdürülmüş HES (W431300-5G, Lot No: SLBG8900V, Sigma-Aldrich, U.K.) gün aşırı oral gavaj ile verildi.

4.3. Deney düzeneği ve tütün dumanının verilmesi

150x50x50 ebatlarında kapağı üstten açılabilir şekilde cam kafes yaptırıldı. Bir kenarına yaklaşık 1 cm genişliğinde delik açıldı. 10 cm çapında ve 12 cm yüksekliğinde teneke kutu alınarak alt kısmına yakın yerde 1 cm genişliğinde delik açıldı. Teneke kutunun içerisine sigara yapımında kullanılmaya hazır yaklaşık 10 gr tütün, tartılarak konuldu. Daha sonra kafes içerisindeki ratlar ile tütünün içinde bulunduğu teneke kutu cam kafes içerisine bırakıldı.

Yaklaşık 25 cm uzunluğunda plastik bir akvaryum pompa hortumunun bir ucu teneke kutuya takılırken diğer ucu ise hava pompasına (AP-001 Xilong Aquarium Air Pump, China) takıldı (Şekil 8).



Şekil 8: Tütün dumanı verilmesinin şematik gösterimi.

Tütün yakıldı ve alevlenmesi için hava pompasından hava verildi. Tütünden duman çıkmasıyla beraber cam kafesin kapağı kapatıldı ve dumanın kafesin her tarafına yayılması sağlandı. Bir saatin sonunda cam kafesin kapağı açıldı ve ratlar kafesleriyle birlikte dışarı alındı. Deney süresi olan 12 hafta boyunca bu işlemler her gün tekrarlandı.

4.4. Doku Örneklerinin Alınması

Deney süresi sonunda tüm gruplardaki ratlar, ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) anestezisi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından ratların testis, epididimis, seminal vezikül ve prostat bezi dokuları hızla çıkarılarak adipoz dokularından arındırıldı. Tartımları yapıldıktan sonra bu dokular, histopatolojik ve histokimyasal çalışmalar için bouin solüsyonuna

alındı. Ayrıca ratlardan biyokimyasal analizler için kan ve doku örneği de alındı. Kandan elde edilen serum ile testis dokusu örnekleri daha sonra çalışılmak üzere -20 °C’de saklandı.

4.5. Vücut ve Organ Ağırlıklarının Ölçülmesi

Dekapitasyon işleminden sonra ratlatların testis, prostat bezi, seminal vezikül ve epididimis dokuları adipoz dokudan arındırıldı ve tartıldı. Ayrıca testisler için aşağıdaki formül yardımıyla rölatif testis ağırlığı hesaplandı.

$$\text{Rölatif Testis Ağırlığı} = \frac{\text{Absolut testis ağırlığı (gr)} \times 100}{\text{Vücut ağırlığı (gr)}}$$

4.6. Spermatolojik Değerlendirmeler

4.6.1. Sperm Yoğunluğu

Sağ epididimisin kauda kısmı, içerisinde 1 ml fizyolojik su (%0.9’luk NaCl) bulunan petri kabında bistüri ile iyice parçalandıktan sonra 2 dakika süresince ezildi. Epididimal dokudaki spermatozoonların tamamının fizyolojik suya geçmesi için oda sıcaklığında yaklaşık 4 saat inkübe edildi. Daha sonra spermatozoon içeren süpernatant, alyuvar pipetinin 0.5 çizgisine kadar çekildi. Üzerine 101 çizgisine kadar 5gr sodyum bikarbonat, 1 ml formalin, 25 mg eozin ve 100 ml distile su içeren solüsyon çekildi. Dolayısıyla süpernatant 1:200 oranında sulandırılmış oldu. 10 µl sulandırılmış süpernatant, lamel yapıştırılmış Neubauer lamının her iki sayım alanına (toplam 400 küçük kare, 0.1 mm³ hacim) bırakıldı. 5 dakika beklenerek solüsyon içerisindeki spermatozoonların tüm alana homojen bir şekilde dağılması sağlandı.

Her iki sayım alanındaki tüm karelere düşen spermatozoonlar ışık mikroskobunun 200'lük büyütmesinde sayıldı ve hesaplandı.

4.6.2. Sperm Motilitesi

Bu ölçüm için bir lam mikroskobun ısıtma tablasına yerleştirilerek 37 °C'ye ısıtıldı. Birkaç damla Tris tamponu [3.63 gr Tris (hidroksimetil) aminometan, 0.50 gr glukoz, 1.99 gr sitrik asit ve 100 ml distile su] ısıtma tablası üzerindeki lama damlatıldıktan sonra sol kauda epididimisten kesit yapılarak alınan ve spermatozoon içeren sıvı, bu tampon üzerine bırakıldı. Lamel yardımıyla karıştırılarak homojen bir hal alması sağlandı. Işık mikroskobunda 400'lük büyütmede 3 farklı saha incelenerek gözle motilite yüzdesi belirlendi. Bu 3 farklı sahanın ortalama değerleri yüzde motilite oranı olarak hesaplandı.

4.7. Histokimyasal Analizler

Testis dokuları bouin solüsyonunda 7-8 saat boyunca tespit edildikten sonra sırasıyla % 50, % 60 ve % 70 dereceli etanol serilerinde yıkandı. Rutin histolojik takip serilerinden (Tablo 8) geçirilerek parafin (P3558- 1kg Sigma Aldrich, Paraplast Embedding Media, U.S.A) bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler histokimyasal olarak Hematoksilen-Eozin (H&E), Masson'un üçlü boyası ve Periyodik Asit Schiff (PAS) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda (Novel N-800M) incelenip fotoğraflandı.

Tablo 8: Histolojik takip işlem basamakları.

SIRA	İŞLEM	SÜRE
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1.5 saat
3	% 96 Alkol	30 dakika
4	% 96 Alkol	30 dakika
5	% 100 Alkol	30 dakika
6	% 100 Alkol	30 dakika
7	Alkol + Ksilol	15 dakika
8	Ksilol I	10 dakika
9	Ksilol II	20 dakika
10	Yumuşak parafin + Ksilol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 saat
12	Yumuşak parafin – Sert parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat
14	Gömme	

4.8. TUNEL Metodu

Polilizinli lamlara parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling (TUNEL) Kiti (Lot No: 2470976, ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore) kullanılarak Tablo 9' da gösterilen TUNEL boyama işlemleri uygulanarak apoptozise giden hücreler belirlendi. Pozitif kontrol için meme dokusu kullanılırken negatif kontrol dokusunda ise Tdt enzimi yerine Reaction Buffer kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı.

TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilin ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösterenler ise apoptotik hücreler olarak değerlendirildi.

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik İndeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı.

Tablo 9: TUNEL boyama prosedürü.

SIRA	İŞLEM	SÜRE
1	60°C etüv	Bir gece
2	Ksilol	3x15 dakika
3	% 100, % 96, % 80, % 70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1: 500 dilüsyondaki Proteinaz K solüsyonu	7 dakika
7	PBS	3x5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı	5 dakika
9	PBS	3x5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	6 dakika
11	Çalışma solüsyonu (% 77 µl Reaction Buffer + % 33 TdT Enzyme)	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (1 ml) +Distile su (34 ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3x5 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3x5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilen	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.	

4.7. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Testis dokusunda endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. (Tablo 10).

Tablo 10: İmmunohistokimyasal boyama prosedürü.

SIRA	İŞLEM	SÜRE
1	Ksilol I	10 dakika
2	Ksilol II	10 dakika
3	Ksilol III	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7+5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS	3x5 dakika
11	H ₂ O ₂	10 dakika
12	PBS	3x5 dakika
13	UV blok	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3x5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3x5 dakika
18	Streptavidin Peroksidaz	20 dakika
19	PBS	3x5 dakika
20	AEC	5 dakika
21	Distile su	5 dakika
22	Mayer's hematoksilen	10 saniye
23	Çeşme suyu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinizasyon ve dehidratasyon işlemlerinden sonra antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ bloker (TA-125-HP Lot No: HP18180, Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific) kullanıldı. Zemin boyasını engellemek için ise UV block (TA-125-UB, Ultra V Block, Thermo Scientific) kullanıldı.

Primer antikor (PA1712-1 Lot No: 01714jd011231, Polyclonal Anti-NOS3Antibody, Boster Immunoleader) damlatılan dokular 60 dakika inkübe edildi. Daha sonra dokular, PBS (P4417-100TAB, Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich) ile yıkanarak sekonder antikor (TP-060-BN, Biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), Thermo Scientific) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi.

Sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS'te yıkanan dokular Horse Radish Peroksidaz (HRP) (TS-060-HR, Streptavidin Peroxidase, Thermo Scientific) enzimi ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra distile su içerisine alındı. Dokulara AEC (3-Amino-9-ethyl carbazole) substrat solüsyonu (TA-060-HA, AEC Substrate System, Thermo Scientific) damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak distile su ile reaksiyon sonlandırıldı.

Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular, distile sudan geçirilerek uygun kapatma solusyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı.

Negatif kontrol olarak kullanılan dokularda ise primer antikor yerine PBS kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Novel N-800M) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde; immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76-100) ve şiddeti (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu (Histoskor = yaygınlık x şiddet).

4.10. Biyokimyasal Analizler

Dekapitasyon işleminin hemen ardından testis dokuları serum fizyolojik ile yıkanıp -20 °C'de saklandı. Çalışma günü çözdürülen doku örnekleri % 1.15'lik KCl ile 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp homojenize edildikten sonra glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin saptanması için 11000 rpm'de 20 dakika, diğer analizler için ise 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlarda malondialdehit (MDA), katalaz (CAT) ve GSH-Px aktivitesi tayini aşağıda belirtilen yöntemlere göre yapıldı.

4.10.1. Testis dokusunda malondialdehit düzeyinin tayini

Testis dokusunda MDA tayini Placer yöntemine göre yapıldı (99). Bu yöntem lipid peroksidasyonu sonucu oluşan aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Reaksiyon sonucunda oluşan pembe renkli kompleksin absorbansı 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek lipid peroksidasyonunun derecesi saptanmaktadır.

4.10.2. Testis dokusunda katalaz aktivitesinin tayini

Testis dokusunda CAT aktivitesinin ölçümü Aebi yöntemine göre yapıldı (100). Bu yöntemde H₂O₂'nin CAT tarafından iki molekül su ve bir molekül oksijene yıkım hızı 240 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

4.10.4. Testis dokusunda glutatyon peroksidaz aktivitesinin tayini

Testis dokusunda GSH-Px aktivitesi ölçümü için Beutler metodu kullanıldı (101). GSH-Px, hidrojen peroksit aracılığıyla GSH, okside glutatyona (GSSG) katalizler. Okside glutatyon oluşum hızı glutatyon redüktaz (GSH-Rd) reaksiyonu aracılığıyla ölçülür. Reaksiyon ortamındaki t-butilhidroperoksidin her bir molekülünün redüksiyonu için 1 mol GSSG oluşur. GSSG'nın GSH'a redüksiyonu ise GSH-Rd enziminin katalizlediği bir tepkime ile gerçekleşir. Bu tepkimede GSSG'nin her bir molünün redüksiyonu için 1 mol Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat- Hidrojen (NADPH) okside olur. GSH-Px aktivitesi de NADPH oksidasyonunu takiben spektrofotometrik olarak 340 nm'deki sistemin optik dansitesindeki düşüşten hesaplanır.

4.11. İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama \pm standart sapma değerleri olarak bildirildi. $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Normal dağılım gösteren grupları karşılaştırarak aralarındaki farklılıkları tespit etmek amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) uygulandı ve ikili karşılaştırmalar için de Post-Hoc Tukey testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizler SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programı kullanılarak yapıldı.

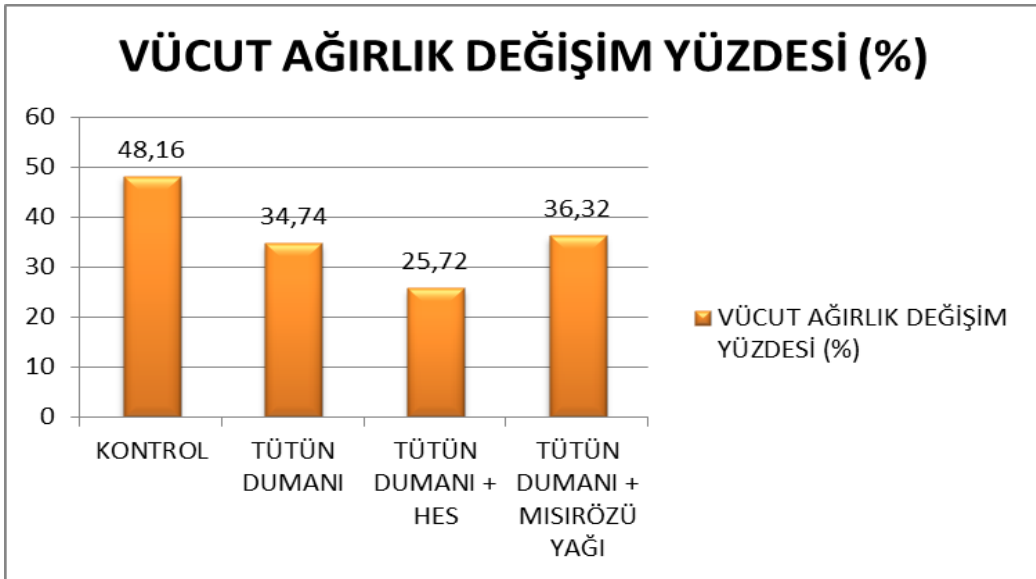
5. BULGULAR

5.1. Vücut Ağırlık Değişim Yüzdesi

Deney süresince düzenli yapılan tartımlar sonucu elde edilen verilerden aşağıdaki formül aracılığıyla tüm gruplardaki ratların ortalama vücut ağırlık değişim yüzdeleri hesaplandı.

$$\text{Vücut ağırlık değişim yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Son Ağırlık} - \text{İlk Ağırlık} \times 100}{\text{Son Ağırlık}}$$

Tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarında yer alan ratların ortalama vücut ağırlık değişim yüzdesinde, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($p < 0.05$). Tütün dumanı + HES grubunun vücut ağırlığı değişim yüzdesinin ise diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı biçimde düştüğü tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 9).



Şekil 9: Vücut ağırlık değişim yüzdesi. Değerler ortalama olarak verilmiştir.

5.2. Üreme organları ağırlıkları

Sağ testis, sol testis, sol epididimis, sağ epididimis, prostat bezi, seminal vezikül ve rölatif testis ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenemedi ($p>0.05$) (Tablo 11).

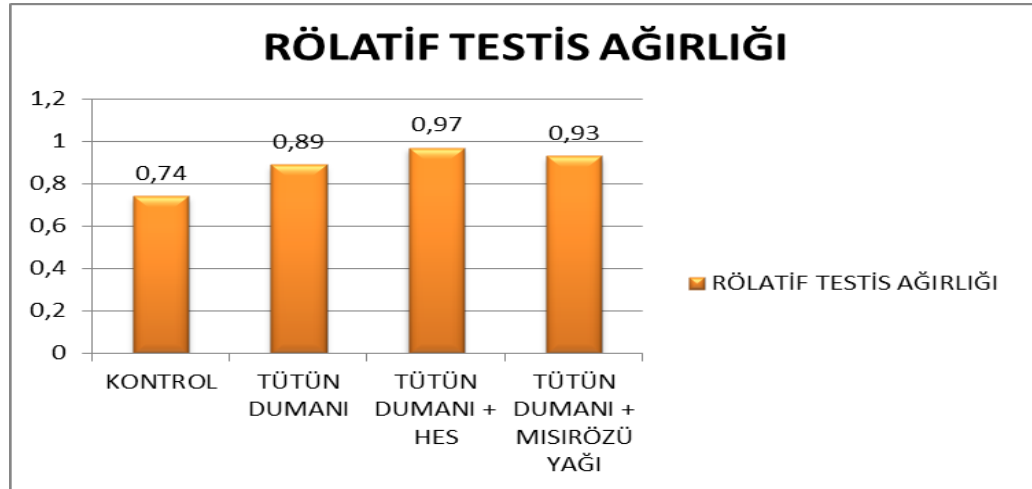
Tablo 11: Üreme organ ağırlıkları (gr).

Gruplar	Sağ testis	Sol testis	Sol epididimis	Sağ epididimis	Prostat bezi	Seminal vezikül
Kontrol grubu	1.24±0.09	1.28±0.06	0.54±0.07	0.51±0.04	0.68±0.16	1.18±0.30
Tütün dumanı grubu	1.35±0.12	1.36±0.11	0.53±0.04	0.51±0.06	0.49±0.15	1.14±0.09
Tütün dumanı + Mısırozü yağı grubu	1.36±0.10	1.37±0.09	0.51±0.06	0.51±0.08	0.46±0.13	1.03±0.12
Tütün dumanı + HES grubu	1.35±0.10	1.36±0.08	0.49±0.05	0.54±0.02	0.58±0.23	0.98±0.41

Değerler; ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

5.3. Rölatif testis ağırlığı

Gruplar arasında rölatif testis ağırlığı açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 10).



Şekil 10: Rölatif testis ağırlığı (gr). Değerler ortalama olarak verilmiştir.

5.4. Spermatolojik Değerlendirmeler

Sperm yoğunluğu ve sperm motilitesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Tütün dumanı uygulamasının kontrol grubuna kıyasla anormal sperm oranını önemli bir biçimde arttırdığı tespit edildi ($p<0,05$). HES uygulamasının ise anormal sperm miktarını oldukça düşürerek kontrol grubuna yakın bir değere getirdiği hesaplandı ($p<0,05$) (Tablo 12).

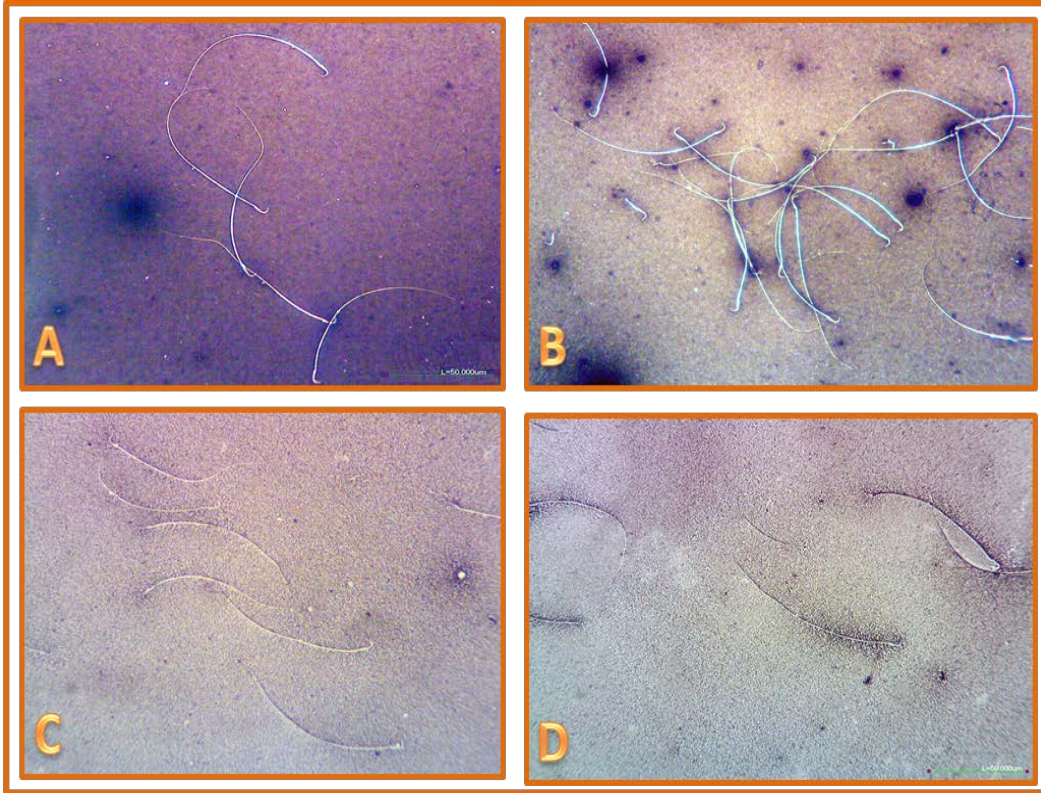
Tablo 12: Sperm parametreleri.

Gruplar	Sperm yoğunluğu ($\times 10^6$ sperm/caudo 1ml^{-1})	Sperm motilitesi (%)	Anormal sperm miktarı (%)
Kontrol grubu	46.25 \pm 7.2	65.00 \pm 10.62	5.75 \pm 0.95
Tütün dumanı grubu	45.50 \pm 6.40	62.50 \pm 8.16	7.75 \pm 0.57 ^a
Tütün dumanı + Mısırözü yağı grubu	43.50 \pm 9.05	62.50 \pm 9.57	7.50 \pm 0.81 ^a
Tütün dumanı + HES grubu	46.00 \pm 9.00	65.00 \pm 5.00	4.00 \pm 0.00 ^b

Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^bTütün dumanı grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0,05$).



A: Kontrol B: Tütün dumanı C: Tütün dumanı + HES D: Tütün dumanı + Mısırözü yağı

Şekil 11: Tüm gruplara ait sperm görüntüleri. x200.

5.6. Histokimyasal Değerlendirmeler

Kontrol grubuna (grup I) ait ratların testis dokusu preparatları ışık mikroskobu altında incelendiğinde seminifer tübüllerin bazal membranı, germinal epiteldeki hücreler ve interstisyel alan normal yapıda izlendi (Şekil 12-14).

Deney süresi boyunca tütün dumanına maruz bırakılan grupta (grup II) seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon, atrofik tübüller, vasküler konjesyon, çok sayıda seminifer tübül bazal membranlarında ayrılmalar, interstisyel alanda ödem ve bazı tübüllerde lümene dökülmüş immatür hücreler tespit edildi (Şekil 15-18).

Tütün dumanı + mısırözü yağı uygulanan gruptaki (grup III) bulgular, tütün grubu ile benzerdi (Şekil 19-21).

Tütün dumanı ile birlikte HES uygulanan grupta (grup IV) ise kontrol grubuna yakın normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli ve normal spermatogenez izlendi. Seminifer tübül bazal membran ayrılmalarında azalma, germinal epitel dejenerasyonunda, vasküler konjesyonda ve interstisyel ödemde belirgin şekilde iyileşmeler gözlemlendi (Şekil 22-24).

Tüm gruplardaki ratlara ait preparatlar incelenerek histoskor tablosu oluşturuldu. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Kontrol grubu ve tütün dumanı grubu ile kıyaslanarak istatistiksel açıdan anlamlı bulunan değerler işaretlendi (Tablo 13).

Tablo 13: Histolojik değerlendirmelere ait histoskor tablosu.

Gruplar	Konjesyon	Seminifer tübül dejenerasyonu	Lümen dökülen hücre	Lümendeki sperm yoğunluğu	Bazal membran ayrılması	Atrofik tübül	İntersitisyel ödem
Kontrol grubu	0,50 \pm 0,57	0,25 \pm 0,50	0,00 \pm 0,00	2,75 \pm 0,50	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm ,00	0,25 \pm 0,50
Tütün dumanı grubu	2,50 \pm 0,57 ^a	3,00 \pm 0,00 ^a	2,00 \pm 0,81 ^a	1,00 \pm 0,00 ^a	1,75 \pm 0,50 ^a	2,25 \pm 0,50 ^a	2,25 \pm 0,50 ^a
Tütün dumanı + Mısırözü yağı grubu	2,00 \pm 0,81 ^a	2,50 \pm 0,57 ^a	1,75 \pm 0,95 ^a	1,25 \pm 0,50 ^a	1,75 \pm 0,50 ^a	1,75 \pm 0,95 ^a	1,75 \pm 0,50 ^a
Tütün dumanı + HES grubu	0,75 \pm 0,50	0,00 \pm 0,00 ^b	0,25 \pm 0,50 ^b	2,25 \pm 0,50 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,50 \pm 0,57 ^b	0,50 \pm 0,57 ^b

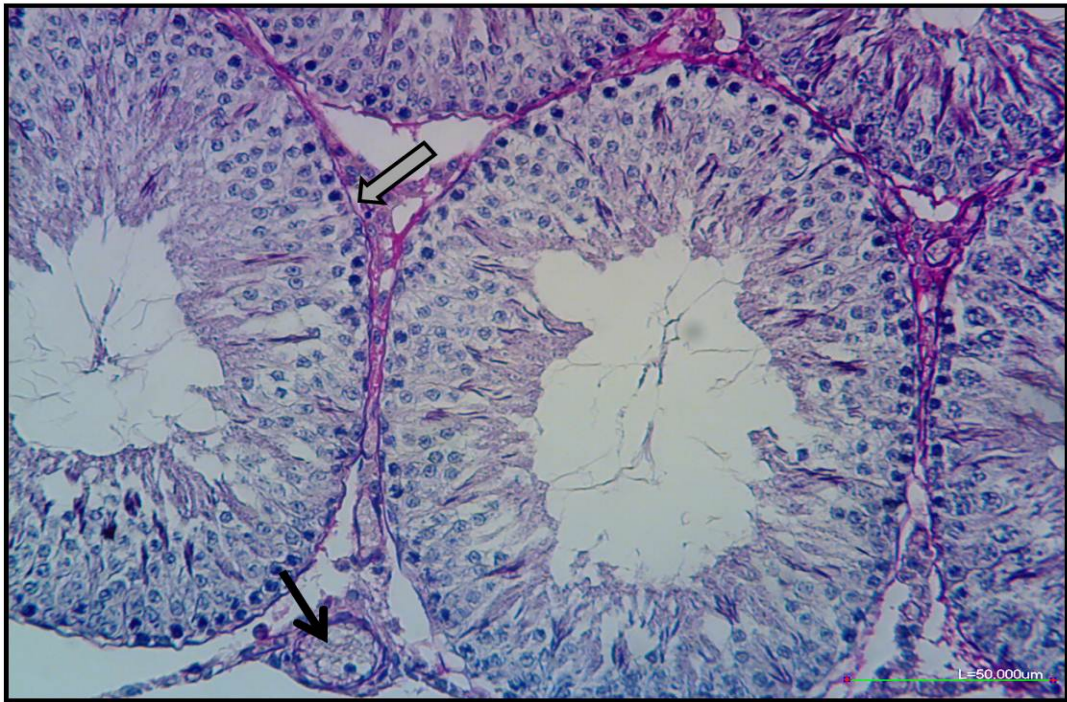
Değerler; ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

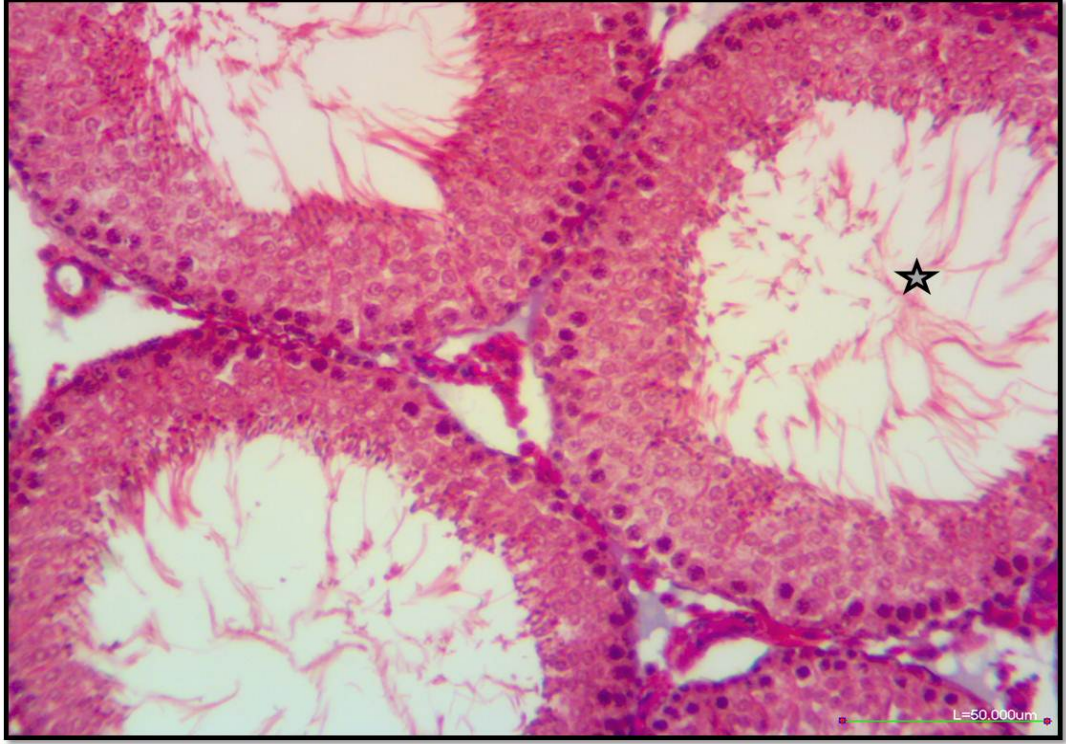
^bTütün dumanı grubuna göre karşılaştırıldığında (p<0.05).



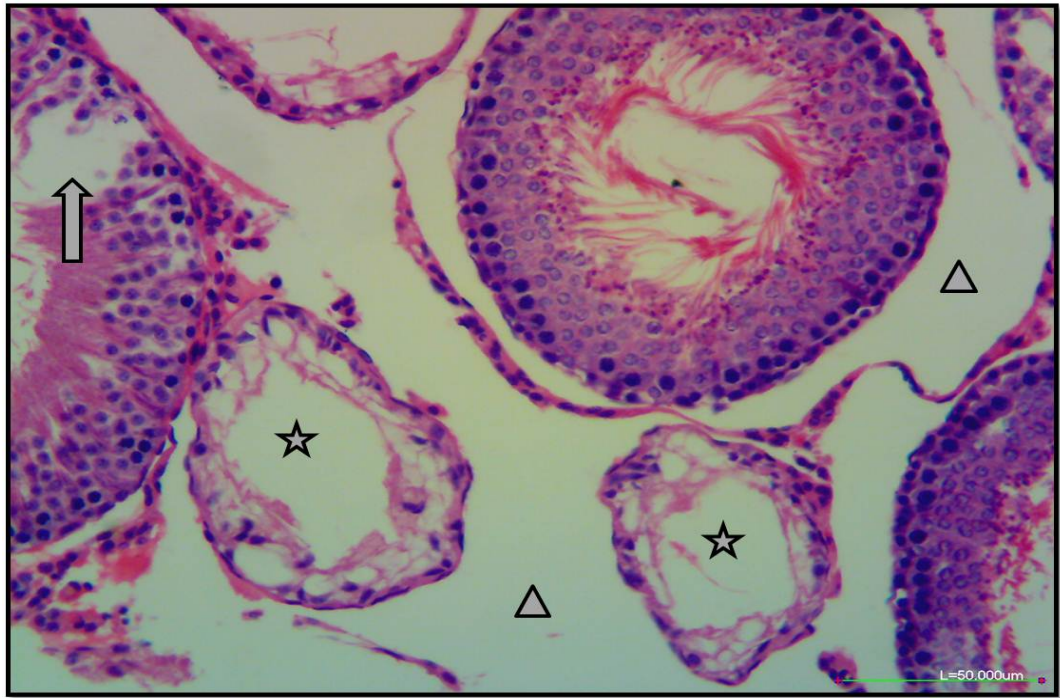
Şekil 12: Kontrol grubu. Normal görümlü seminifer tübül germinal epiteli (↔), interstisyel alan (⇒) ve normal spermatogenez (☆). H&E x 200.



Şekil 13: Kontrol grubu. Normal görümlü seminifer tübül bazal membranı (⇒) ve interstisyel alandaki damar (→). PAS x200.



Şekil 14: Kontrol grubu. Normal spermatogenez (☆). Masson'un üçlü boyası x200.



Şekil 15: Tütün dumanı grubu. Atrofik tübüller (☆), seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (⇒) ve interstisyel alanda ödem (Δ). H&E x200.



Şekil 16: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül bazal membranında ayrılmalar (→), interstisyel alanda ödem (◊), vasküler konjesyon (Δ), seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (⇔). H&E x200.



Şekil 17: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül bazal membranında ayrılmalar (→) ve interstisyel alanda ödem (◊). PAS x200.



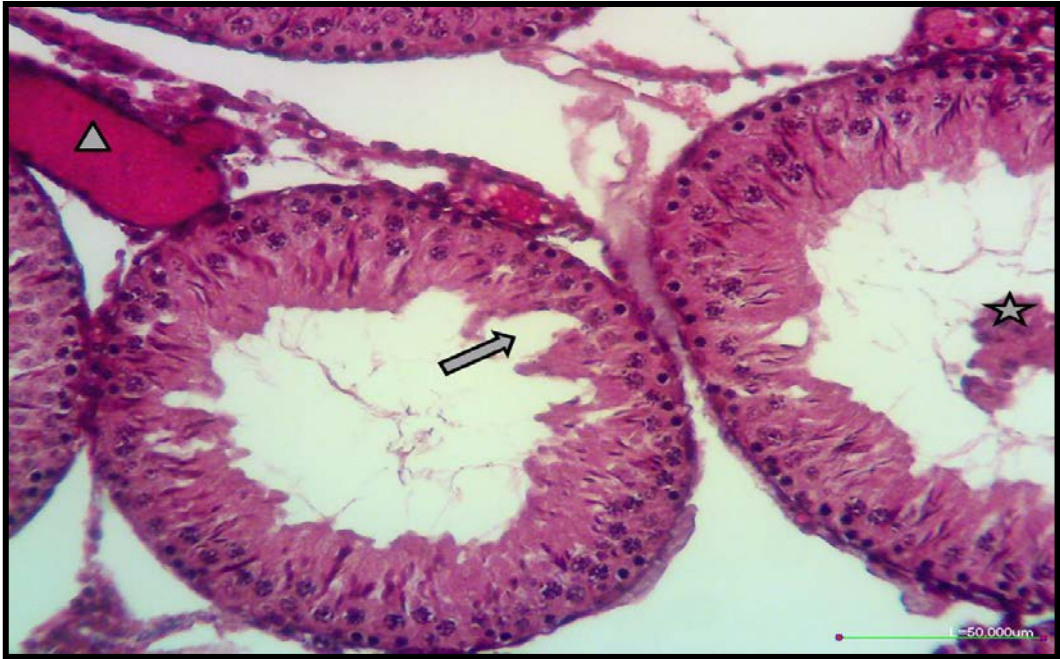
Şekil 18: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (⇒) ve vasküler konjesyon (Δ). Masson'un üçlü boyası x200.



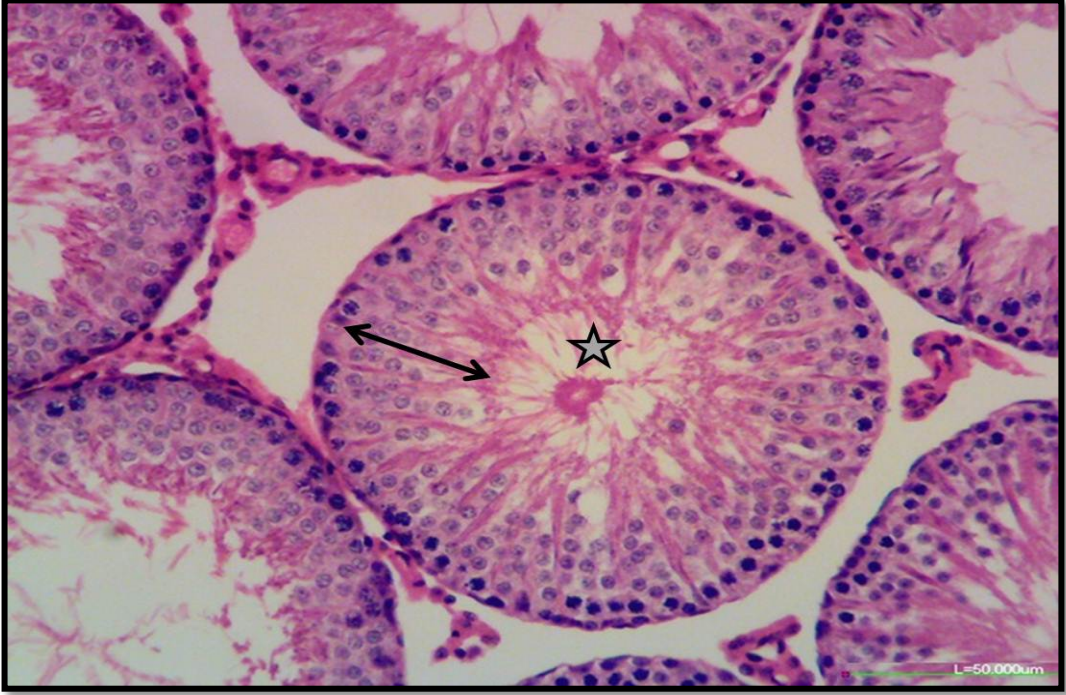
Şekil 19: Tütün dumanı + mısırozü yağı grubu. Seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler (☆) ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (⇒). H&E x200.



Şekil 20: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. Seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler (☆) ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (⇒). PAS x200.



Şekil 21: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. Vasküler konjesyon (Δ), seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler (☆) ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (⇒). Masson'un üçlü boyası x200.



Şekil 22: Tütün dumanı + HES grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli (↔), normal spermatogenez (☆). H&E x200.



Şekil 23: Tütün dumanı + HES grubu. Normal görünümlü seminifer tübül bazal membranı (→) ve vasküler konjesyonda azalma (⇒). PAS x200.



Şekil 24: Tütün dumanı + HES grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli (↔) ve normal spermatogenez (★). Masson'un üçlü boyası x200.

5.7. TUNEL Bulguları

Apoptotik hücreleri belirlemek için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; testis dokusunda spermatogenez seri hücrelerinde TUNEL pozitifliği tespit edildi. TUNEL pozitifliği; kontrol grubu (Şekil 25) ile tütün dumanı + HES grubu (Şekil 28) arasında benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tütün dumanı grubunda anlamlı bir artış vardı ($p < 0.05$) (Şekil 26). Tütün dumanı grubu ile tütün dumanı + mısırözü yağı grubu (Şekil 27) karşılaştırıldığında ise tütün dumanı + mısırözü yağı grubunda istatistik olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p > 0.05$) (Tablo 14). Pozitif kontrol için rat meme dokusu kullanıldı (Şekil 29). Negatif kontrolde TUNEL pozitifliğine rastlanmadı (Şekil 30).

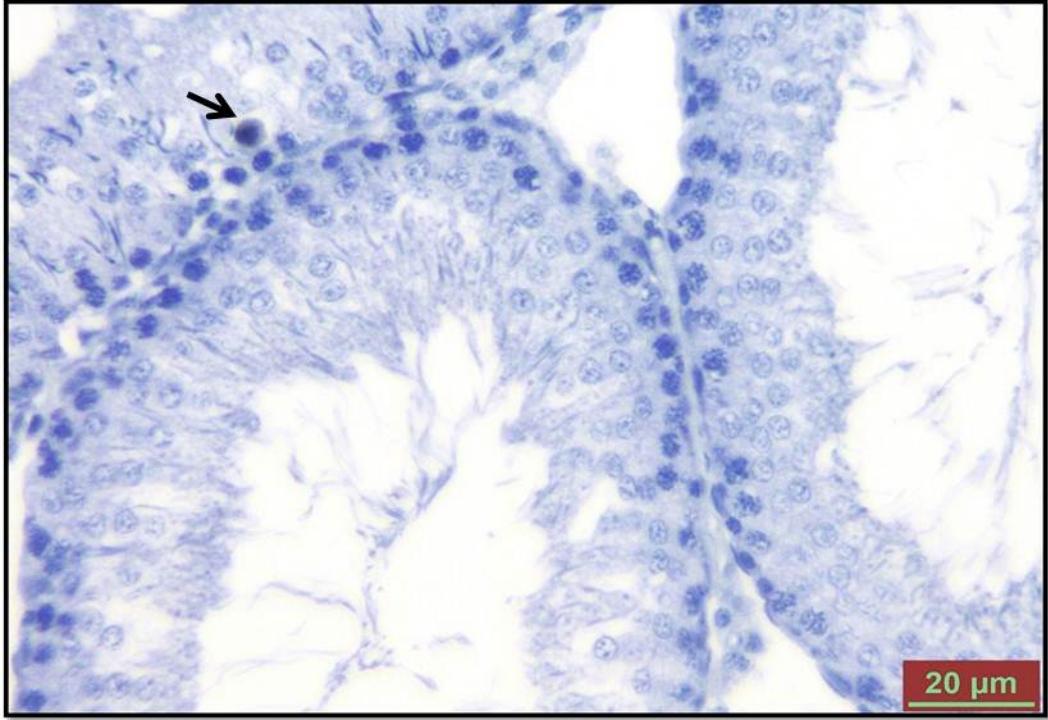
Tablo 14: Apoptotik indeks (%).

GRUP	APOPTOTİK İNDEKS (%)
Kontrol grubu	1.33 ± 0.51
Tütün dumanı grubu	5.16 ± 0.75 ^a
Tütün dumanı + Mısırözü yağı grubu	5.66 ± 0.81 ^a
Tütün dumanı + HES grubu	1.75 ± 0.50 ^b

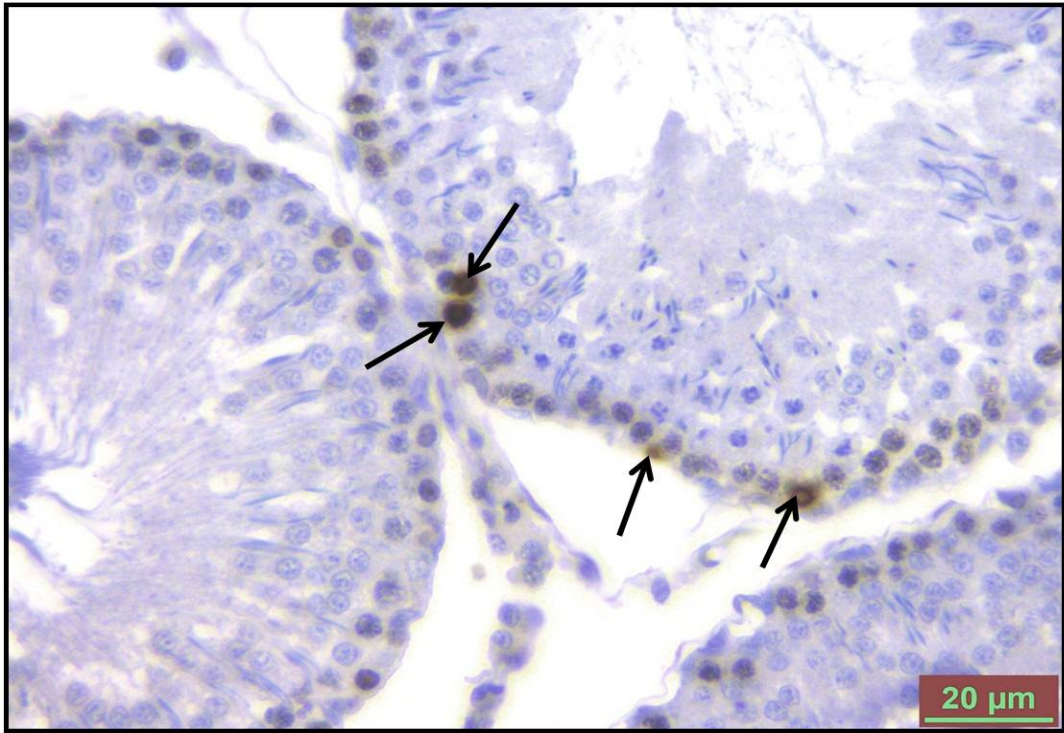
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

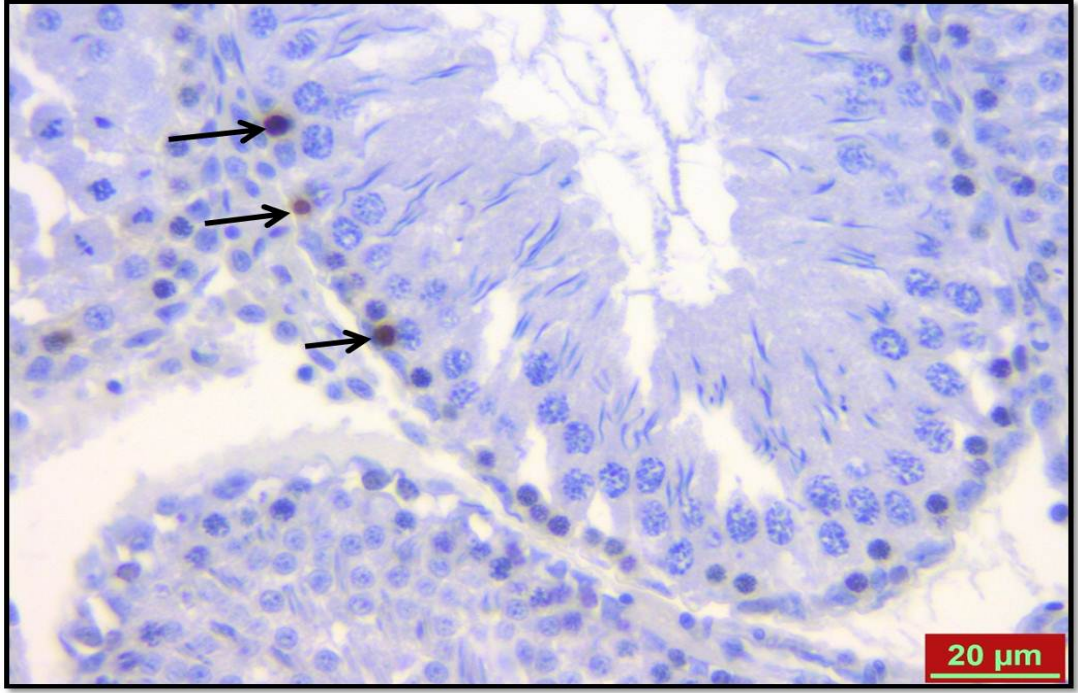
^bTütün dumanı grubuna göre karşılaştırıldığında, (p<0.05).



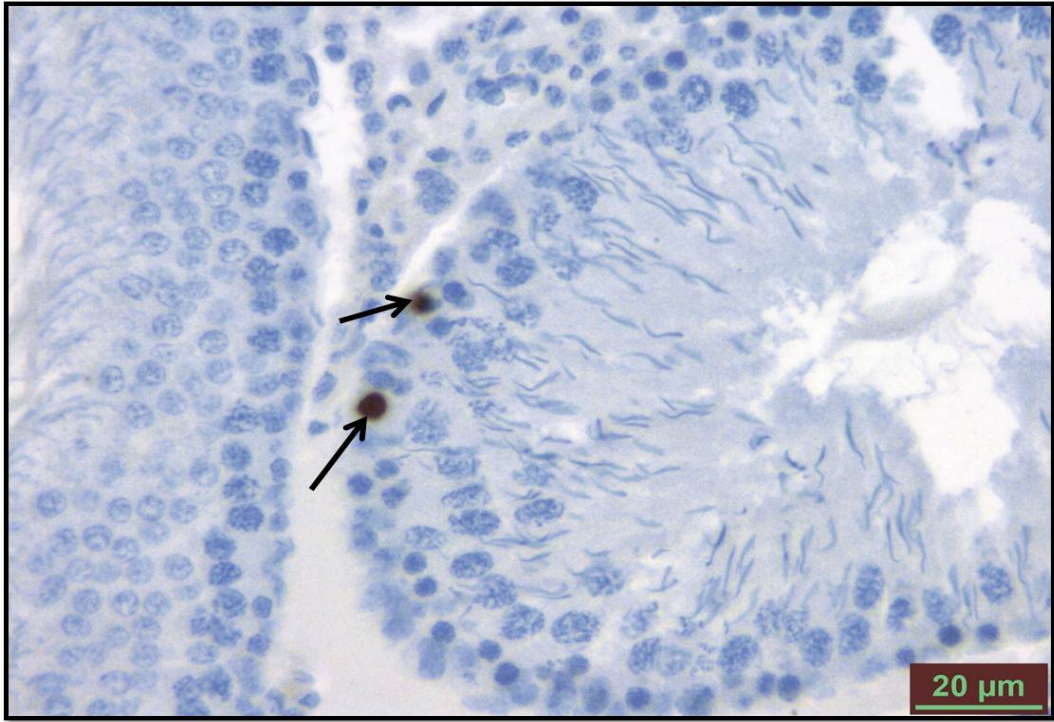
Şekil 25: Kontrol grubu. TUNEL pozitif hücre (→). TUNEL x400.



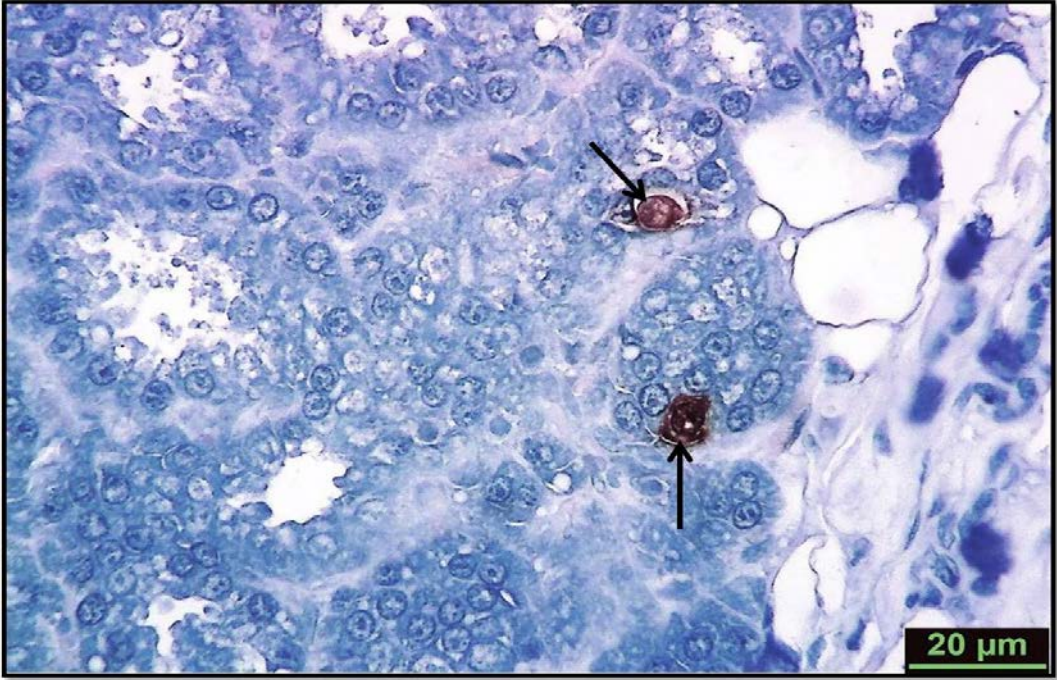
Şekil 26: Tütün dumanı grubu. TUNEL pozitif hücre (→). TUNEL x400.



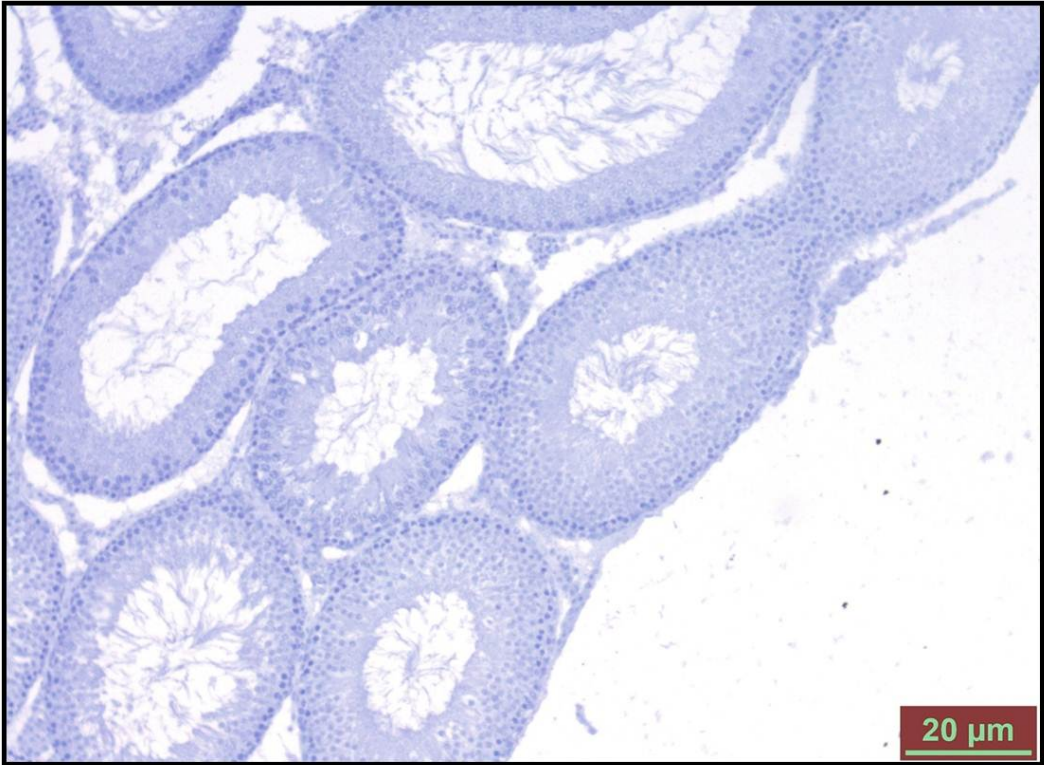
Şekil 27: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. TUNEL pozitif hücre (→). TUNEL x400.



Şekil 28: Tütün dumanı + HES grubu. TUNEL pozitif hücre (→). TUNEL x400.



Şekil 29: Pozitif kontrol rat meme dokusu. TUNEL pozitif hücre (→). TUNEL x400.



Şekil 30: Negatif kontrol. TUNEL x100.

5.8. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) İmmünreaktivitesi

Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) immünreaktivitesini belirlemek için yapılan immünohistokimyasal boyamada eNOS immünreaktivitesi testis dokusunda interstisyel alanda görüldü. eNOS immünreaktivitesi kontrol grubunda (Şekil 31) ve tütün dumanı + HES (Şekil 34) grubunda benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tütün dumanı grubunda (Şekil 32) eNOS immünreaktivitesi açısından anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$). Tütün dumanı grubu ile tütün dumanı + mısırözü yağı grupları (Şekil 33) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 15). Negatif kontrolde eNOS immünreaktivitesine rastlanmadı (Şekil 35).

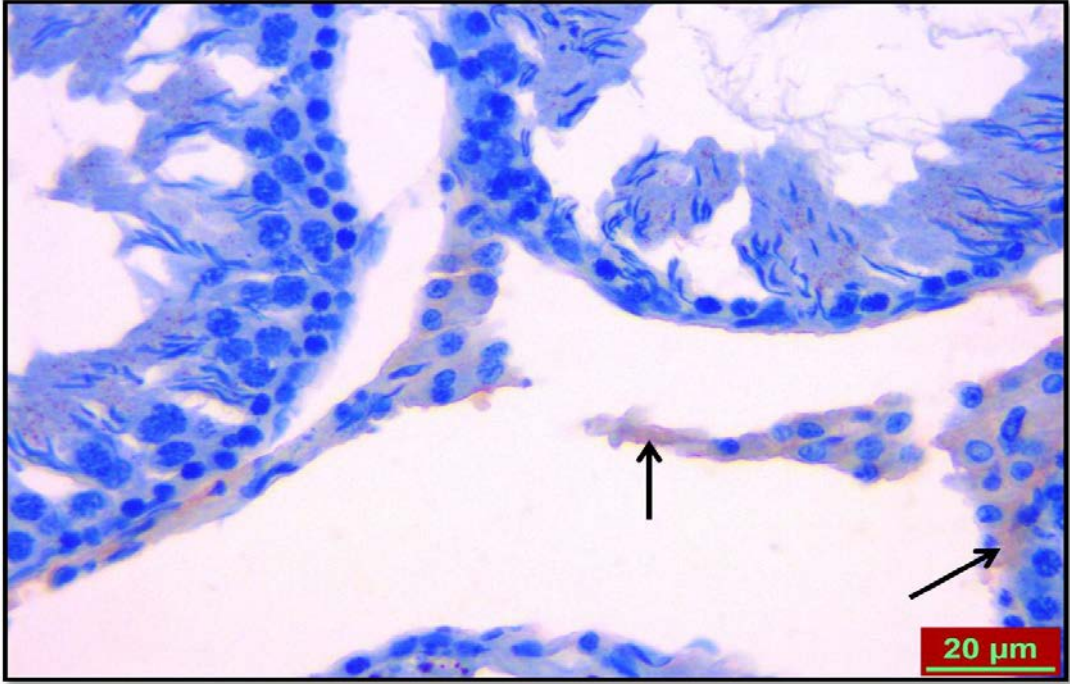
Tablo 15: eNOS immünreaktivitesi.

GRUPLAR	HİSTOSKOR (yaygınlık x şiddet)
Kontrol grubu	0.28± 0.07
Tütün dumanı grubu	1.60±0.31 ^a
Tütün dumanı + Mısırözü yağı grubu	1.45± 0.35 ^a
Tütün dumanı + HES grubu	0.28± 0.18 ^b

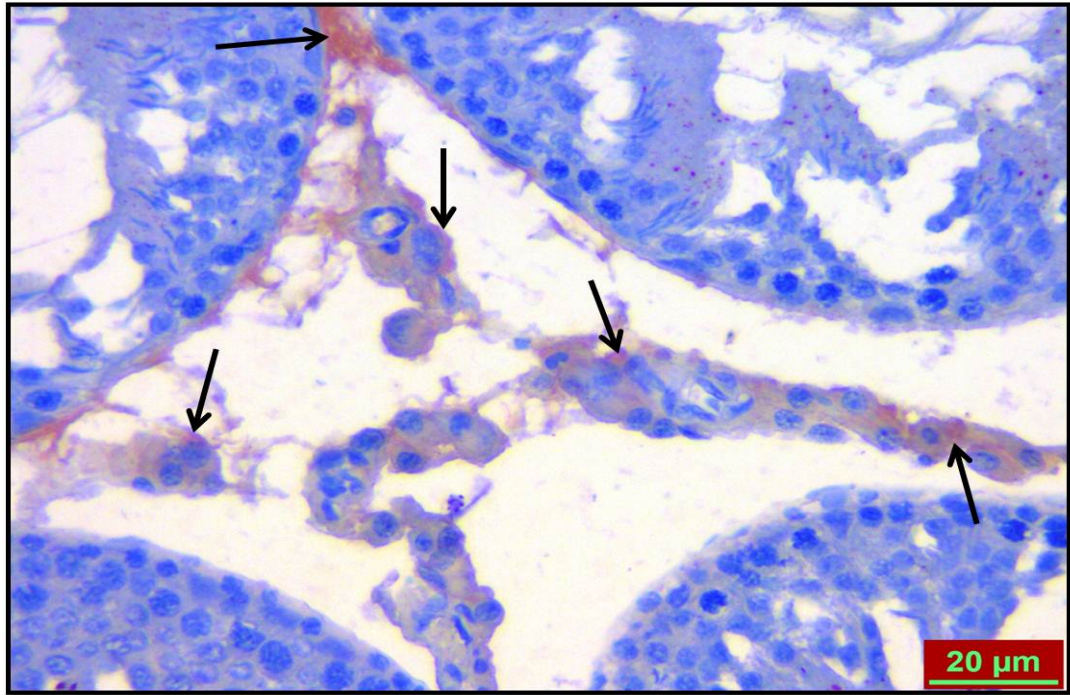
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

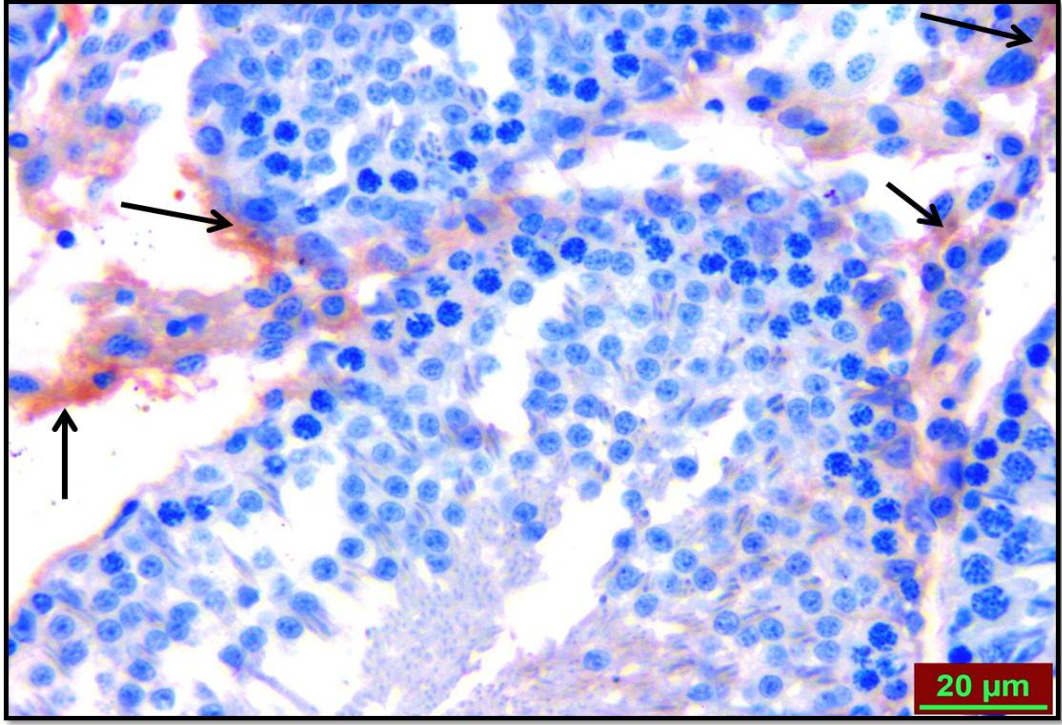
^bTütün dumanı grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).



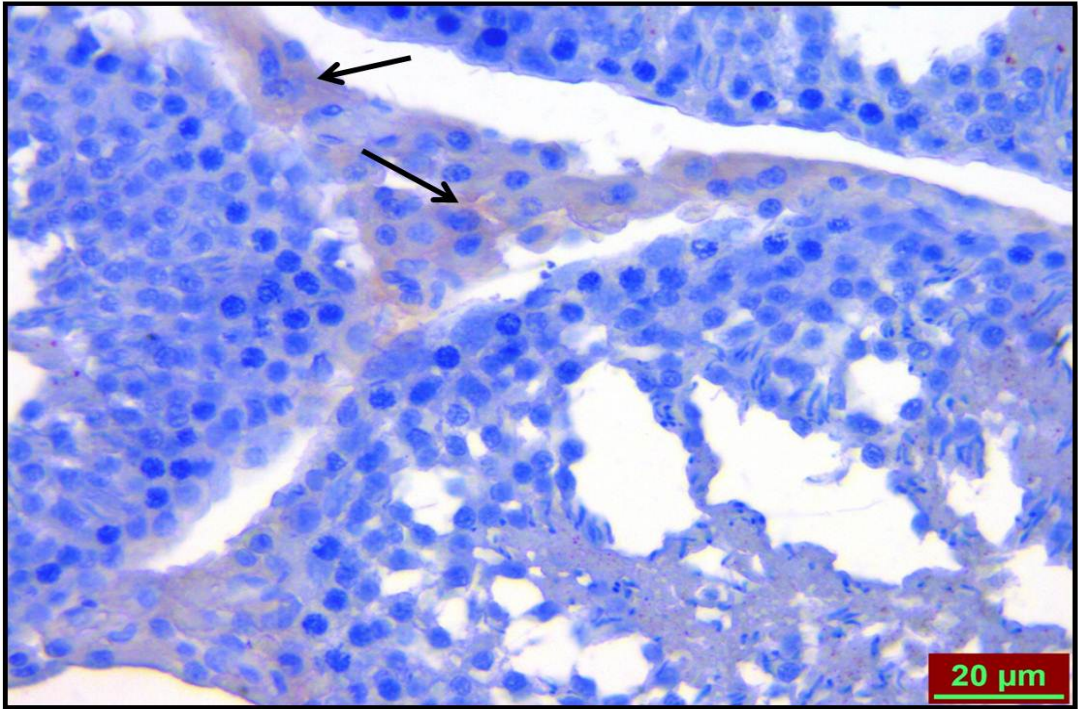
Şekil 31: Kontrol grubu. İnterstisyel alanda hafif derecede eNOS immünreaktivitesi (→). x400.



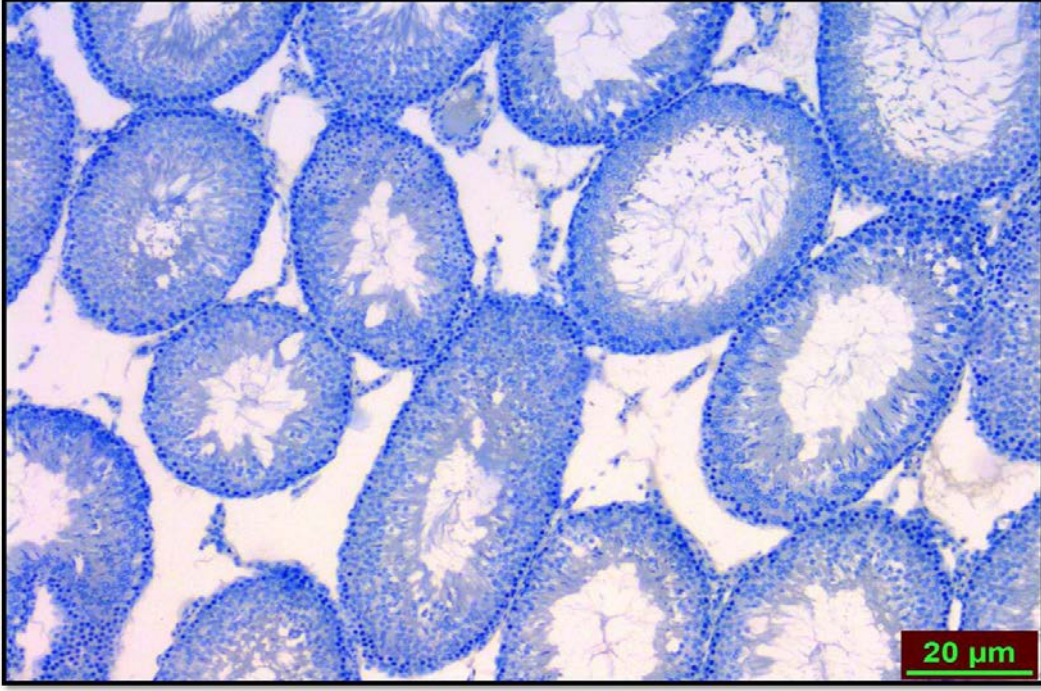
Şekil 32: Tütün dumanı grubu. İnterstisyel alanda artmış eNOS immünreaktivitesi (→). x400.



Şekil 33: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. İnterstisyel alanda artmış eNOS immünreaktivitesi (→). x400.



Şekil 34: Tütün dumanı + HES grubu. İnterstisyel alanda hafif derecede eNOS immünreaktivitesi (→). x400.



Şekil 35: Negatif kontrol. x100.

5.9. Biyokimyasal Analizler

Yapılan analizlerin değerlendirmesinde lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeylerinin tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ($p < 0.001$). Tütün dumanı + HES grubunda ise tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarına göre anlamlı düzeyde azalarak kontrol grubuna yakın düzeylerde olduğu saptandı ($p < 0.001$).

Antioksidan savunma sisteminin enzimlerinden olan CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin; kontrol grubuna göre tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ($p < 0.001$). CAT aktivitesi açısından tütün dumanı + HES ile tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilmedi ($p > 0.05$). GSH-Px aktivitesinin tütün dumanı + HES grubunda

tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı tespit edildi ($p < 0.001$). Kontrol grubu ile tütün dumanı + HES grubu arasında GSH-Px aktiviteleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p > 0.05$) (Tablo 16).

Tablo 16: Grupların testis dokusu MDA, CAT ve GSH-Px düzeyleri.

	MDA (nmol/g doku)	CAT (k/g protein)	GSH-Px (U/g protein)
Kontrol grubu	13,930 ± 0,726 ^b	20,298 ± 1,182 ^b	107,433 ± 6,699 ^b
Tütün dumanı grubu	21,867 ± 1,282 ^a	13,119 ± 1,856 ^a	71,417 ± 5,701 ^a
Tütün dumanı+ mısırözü yağı grubu	21,311 ± 0,878 ^a	12,413 ± 2,559 ^a	64,910 ± 5,603 ^a
Tütün dumanı + HES grubu	13,887 ± 0,942 ^b	14,818 ± 2,068 ^a	118,720 ± 9,693 ^b
p değeri	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubu ile karşılaştırıldığında,

^bTütün dumanı grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.001$).

6.TARTIŞMA

Dünyada her yıl yaklaşık 6 milyon kişinin ölümüne neden olan tütün kullanımı, önlenebilir ölüm sebepleri içerisinde ilk sıralarda yer almaktadır. Sigara gibi tütün ürünlerinin kullanımında herhangi bir azalma gerçekleşmezse, 2020 yılında dünyada her yıl yaklaşık 10 milyon kişinin buna bağlı hastalıklar nedeniyle öleceği ve bunlardan 7 milyonunun gelişmekte olan ülkelerde meydana geleceği tahmin edilmektedir (22).

Tütün dumanına maruz kalmanın üreme sistemi, kardiyovasküler sistem, alt ve üst solunum sistemleri ile diğer organ sistemlerine olumsuz etkileri olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (21).

İnfertilite günümüzde oldukça yaygın bir sağlık problemi olup, bu konu üzerine yapılan bilimsel çalışmalar hızla devam etmektedir.

Tütün ürünlerinin erkek üreme sistemleri üzerine etkilerini incelemek amacıyla Wistar cinsi ratlar üzerine yapılan bir çalışmada tütün dumanına maruz kalmanın sperm miktarını, motilitesini ve fertilizasyon kapasitesini düşürdüğü bildirilmiştir (102).

Başka bir çalışmada ise yine Wistar cinsi ratlar, 9 hafta boyunca günde 20 adet sigaranın dumanına maruz bırakılmıştır. Çalışma sonunda sigara dumanına maruz kalan grupta vücut ağırlığının düştüğü, sperm konsantrasyonu, motilitesi ve hareketliliğinin ise bozulduğu rapor edilmiştir (103). La Maestra ve arkadaşları ise erkek farelerde 10 haftalık sigara dumanı maruziyetinin epididimal spermatozoon sayısında azalma ve anormal sperm yüzdesinde artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir (104).

Bizim çalışmamızda da yalnızca tütün dumanına maruz kalan gruptaki ratların ortalama vücut ağırlık değişim yüzdesinde, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlendi. Sperm yoğunluğu ve sperm motilitesi açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) Ancak tütün dumanı uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anormal sperm oranını önemli bir biçimde arttırdığı tespit edildi.

Sprague-Dawley cinsi ratların 13 hafta boyunca günde 3 defa 8'er dakika sigara dumanına maruz bırakılması ile oluşan testiküler hasarın histolojik değerlendirmesinde ise spermatogenetik seri hücrelerinin sayısında, seminifer tübül epitelinin yüksekliğinde ve tübül çaplarında azalma görülmüştür (105). 2 ay boyunca günde 2 saat sigara dumanına maruz bırakılan Wistar cinsi ratların testis dokularında seminifer tübül germinal epitelinin bütünlüğünde bozulma, spermatogenetik seri hücrelerde yoğun dejenerasyon ve bazı tübüllerin bazal membranlarında ayrılmalar gözlemlendiği bildirilmiştir (106).

Çalışmamızda da 12 hafta boyunca günde 2 saat tütün dumanına maruz bırakılan ratların testis dokusunda literatür ile uyumlu şekilde seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon, atrofik tübüller, çok sayıda seminifer tübülün bazal membranlarında ayrılmalar ve interstisyel alanda ödem tespit edildi.

Testis dokusundaki spermatogenetik seri hücrelerinin dejenerasyonu hem gelişimde hem de ilerleyen safhalarda oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. Bu dejenerasyonun temelinde esas olarak apoptozis adı verilen programlanmış hücre ölüm mekanizması vardır. Normal spermatogenez sürecinde, hücresel gelişim ve farklılaşmanın yanı sıra gerçekleşen apoptozis sperm oluşumunda da kritik rol oynar (107). Apoptozis ile gerçekleşen hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan

spermatogenetik seri hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (108-110).

Spermatogenezde testiküler germ hücre ölümünün hormonal bir kontrol mekanizması altında gerçekleştiği bildirilmiştir (111, 112). Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi çevresel uyaranlara karşı olan hassaslığı da germ hücrelerinin apoptozisini arttıran önemli bir faktördür (113). Sonuç olarak testiküler fizyolojiyi bozan çevresel uyaranların varlığında patolojik düzeyde apoptozis gerçekleşir ve bu durum spermatogenezde bozulmalara dolayısıyla da infertiliteye neden olabilir (114).

Testis dokusu üzerine yapılan bir çalışmada Spraque-Dawley cinsi ratların sigara dumanına maruz kalması sonucunda yoğun apoptozis gözlemlendiği bildirilmiştir (115). Wistar cinsi ratlar ile yapılan başka bir çalışmada ise 8 hafta boyunca sigara dumanına maruz kalmanın testis dokusunda seminifer tübül dejenerasyonuna, atrofik tübüller sayısında ve apoptozis düzeyinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (116). Bizim çalışmamızda ise 12 haftalık deney süresince günde 2 saat uygulanan tütün dumanının ratların testis dokusunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptozisi istatistiksel olarak önemli biçimde arttırdığı tespit edildi.

Nitrik oksit, erkek üreme sistemi üzerinde önemli görevler üstlenerek sperm motilitesini ve fertilizasyon potansiyelini destekler. Oksidatif stres gibi riskli durumlarda artan NO konsantrasyonu, testis dokusu üzerinde olumsuz etki gösterir. Testis torsiyonunda ve deneysel inflamasyon çalışmalarında NO konsantrasyonunun belirgin biçimde arttığı bildirilmiştir (117). Spermatogenetik seri hücrelerindeki apoptozis artışı ile NOS aktivitesinin artışı arasında ilişki

olduğu rapor edilmiştir (118). Yapılan bir çalışmada Wistar cinsi ratların testis dokusunda kadmiyum ile oluşturulmuş hasar sonucu eNOS immünreaktivitesinin arttığı bildirilmiştir (119). Bizim alışmamızda da 12 hafta boyunca tütün dumanına maruz kalan ratlarda interstisyel alanda eNOS immünreaktivitesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı görüldü.

Hesperetin ile yapılan ilk çalışmalar daha çok anti-oksidan, anti-inflamatuvar, anti-karsinojenik gibi özellikleri üzerine olmuştur (80). Yeni farmakolojik özellikleri, moleküler hedefleri ve etki mekanizmaları keşfedildikçe hesperetin ile ilgili çalışmalar artmıştır (120). Flavonoidler gibi antioksidan bileşikler özellikle oksidatif hasar kaynaklı çeşitli kanser türleri ve kardiyovasküler hastalıklar gibi patolojik durumlardan korunma açısından oldukça önemli roller üstlenmişlerdir (80, 121).

Tütün dumanının testis dokusunda meydana getireceği hasarlara karşı hesperetinin nasıl bir etki göstereceği ile ilgili herhangi bir literatür çalışması bulunmamaktadır. Ancak hesperetinin H₂O₂, nikotin, gama radyasyon, peroksinitrit, ve siklofosfamid ile oluşturulmuş çeşitli doku hasarlarına karşı koruma gösterdiği ve oluşan bu hasarları azalttığı gösterilmiştir (85, 122-125).

Yapılan bir çalışmada rat testis dokusunda doksorubisin ile oluşturulmuş oksidatif stres kaynaklı meydana gelen testiküler hasara karşı 25 mg/kg, 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarında hesperetin uygulanmasının koruma sağladığı rapor edilmiştir (126). Diğer bir çalışmada ise teratojen, karsinojen, ve mutajen özellik gösteren bir hidrokarbon olan benzopiren ile oluşturulan testiküler hasar üzerine

uygulanan hesperetinin sperm morfolojisi, motilitesi ve sayısında düzelme yaptığı tespit edilmiştir (127).

Shagirtha ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kadmiyum ile oluşturulan testiküler hasara karşı koruyucu amaçla kullanılan hesperetinin 40 mg/kg dozunda maksimum koruma elde edildiği bildirilmiştir. Bu dozda uygulanan hesperetinin testis dokusunda oluşan histopatolojik değişikliklere belirgin bir şekilde azalttığı, oksidatif stres belirteci olan MDA seviyesini düşürdüğü ayrıca antioksidan enzim sistemlerinin önemli üyelerinden CAT ve GSH-Px seviyelerini de arttırdığı rapor edilmiştir (128). Deneysel olarak oluşturulan testis torsiyonu çalışmasında ise hesperetinin testis dokusunda MDA seviyesini azalttığı, CAT aktivitesini ise arttırdığı rapor edilmiştir (129)

Bizim çalışmamızda da, tütün dumanına maruz bırakılan gruptaki ratların testis dokusunda; seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon, vasküler konjesyon, çok sayıda seminifer tübül bazal membranlarında ayrılmalar ve interstisyel alanda ödem tespit edildi. Tütün dumanı ile birlikte HES uygulanan gruptaki ratların testis dokusunda ise literatür ile uyumlu olarak kontrol grubuna yakın görünümlü seminifer tübül germinal epiteli ve normal spermatogenez izlendi. Seminifer tübül bazal membran ayrılmalarında azalma, germinal epitel dejenerasyonunda, vasküler konjesyonda ve interstisyel ödemde belirgin şekilde iyileşmeler gözlemlendi.

Ratlarla yapılan bir çalışmada doksorubisin ile oluşturulmuş oksidatif strese karşı uygulanan hesperetinin kalp dokusunda apoptozisi azattığı rapor edilmiştir (130).

Bizim çalışmamızda da tütün dumanına maruziyetine bağlı oluşan oksidatif stres kaynaklı hasara karşı 50 mg/kg dozunda uygulanan hesperetin testis dokusunda apoptotik indeksi azalttığı gözlemlendi. Ayrıca biyokimyasal analizlerde ise hesperetin MDA seviyesini azalttığı, GSH-Px aktivitesini ise arttırdığı tespit edildi. Bununla birlikte hesperetin CAT seviyesinde anlamlı bir değişim yapmadığı gözlemlendi.

Elde ettiğimiz bulgular ışığında 12 hafta boyunca günde 2 saat uygulanan tütün dumanının rat testis dokusunda hasara yol açtığı tespit edildi. Antioksidatif özelliği bilinen ve özellikle turunçgillerin yapısında bulunan hesperetin, tütün dumanı maruziyetinin testislerde meydana getirdiği hasara karşı koruyucu bir etkisinin olduğu gözlemlendi.

7. KAYNAKLAR

1. Putz R, Pabst R. Sobotta İnsan Anatomisi Atlası. 5. Baskı, İstanbul: Beta basım yayım dağıtım, 2001; 190.
2. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2001; 330-332.
3. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Basaklar C (Çeviren). 6. baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 1990; 257.
4. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Dalcık H (Çevirenler). 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2009; 263-265.
5. Hall JE. Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji. Yegen B (Çeviren). 12. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2013; 973-984.
6. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Solakoğlu S, Aytekin Y (Çevirenler). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2009; 418-427.
7. Ross MH, Pawlina W. Histology A Text and Atlas. 6th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011; 791.
8. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çevirenler). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri, 2009; 385.
9. Eroschenco VP, Di Fiore. Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle, Demir R. (Çeviren). Ankara: Palme Yayıncılık, Ankara. 2013; 479.
10. Türkiye'de Tütün. Yapı ve Kredi Bankası A.Ş. İktisadi Araştırma Yayınları, 1971; 8.
11. Gür M. Tütüncülüğe Giriş ders Notları, 1977;1.
12. Otan H, Apti R. Tütünün Sistematikteki Yeri ve Özellikleri. T.C. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı. İzmir, 1989; 83: 10.
13. Aslan ME. 2000'li yıllarda Türkiye'de uygulanan tütün politikalarında değişim ve makro etkileri. Dönem projesi. Ankara Üniversitesi, 2009.
14. Otan H, Apti R. Tütün. 1.baskı. İzmir: ETAEM yayını, 1989: 9.
15. Aksu S. Tütün kimya ve teknolojisi. 1. baskı. İstanbul: Tekel Enstitüleri yayınları 1967.
16. Tütün Eksperleri Yüksek Okulu. Tütüncülüğe giriş. İstanbul: TEYO yayını, 1978.
17. Nafiz Z. Tütün ziraati ve hastalıkları. 1. baskı, İstanbul: Cezri matbaa, 1932.
18. Picciotto MR. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U. Trends Pharmacol Sci 2003; 24: 493-499.
19. Wonnacott S, Sidhpura N, Balfour DJ. Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. Curr Opin Pharmacol 2005; 5: 53-59.
20. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. World Health Organization International Agency for Research on Cancer, 2004; 83.
21. Tütün ve tütün kontrolü. Toraks kitapları. Türk Toraks Derneği. İstanbul: Aves Yayıncılık, Ocak 2010.

22. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Küresel Yetişkin Tütün Araştırması Türkiye 2012. Ankara: Anıl Matbaa, 2014.
23. Hecht SS. Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. *Langenbecks Arch Surg* 2006; 391: 603-613.
24. Doll R, Peto R, Hall E, et al. Mortality in relation to consumption of alcohol: 13 years' observations on male British doctors. *BMJ* 1994; 309: 911-918.
25. Nusbaum ML, Gordon M, Nusbaum D, et al. Smoke alarm: A review of the clinical impact of smoking on women. *Prim Care Update Ob/Gyns* 2000; 7: 207-214.
26. US Public Health Service, US Department of Health and Human Services, The Office of Disease Prevention and Health Promotion. *The Facts* Palo Alto, CA: Bull Publishing Co.1988.
27. Ezzati M, Lopez AD. Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet* 2003; 362: 847-852.
28. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 620-650.
29. Free radical biology and medicine: it's a gas, man. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 29: R491-511.
30. Domej D. Oxidative stress and free radicals in COPD – implications and relevance for treatment. *International Journal of COPD* 2014; 9: 1207–1224.
31. Aprioku JS. Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis. *J Reprod Infertil* 2013; 14: 158-172.
32. Aitken RJ. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 169-173.
33. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 200; 16: 1922-1930.
34. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* 2005; 26: 654-660.
35. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl* 2008; 29: 488-498.
36. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001; 8: 851-862.
37. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002; 29: 817-827.
38. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, et al. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril* 2006; 86: 878-885.
39. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *Superoxide*

- dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987; 8: 338-348.
40. Morte MI, Rodrigues AM, Soares D, et al. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. *Anim Reprod Sci* 2008; 106: 36-47.
 41. Yeni D, Gundogan M, Cigerci IH, et al. Seasonal variation of oxidative stress parameters in ram seminal plasma. *J Anim Vet Adv* 2010; 9: 49-55.
 42. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, et al. Isoforms of nitric oxide synthase: characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 1849–1857.
 43. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78: 915–918.
 44. Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell* 1994; 8: 919–925.
 45. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 255–266.
 46. Zini A, O’Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod* 1996; 55: 935–941.
 47. Kang Y–M, Zhang J, Li J, Duan X–L. Expression of eNOS in rat testis from infancy to maturity. *Acta Zool Sin* 2003; 49: 339–345.
 48. Lee NPY, Cheng CY. Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics. *Biol Reprod* 2004; 70: 267–276.
 49. Sun L, Ren YP, Jiang W, et al. Expression and role of nitric oxide synthase in the testis and epididymis of *Macaca fascicularis*. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2006; 12: 876–878.
 50. Lee NPY, Chang CY. Nitric oxide and cyclic nucleotides. Their roles in junction dynamics and spermatogenesis. *Oxid Med Cell Longev* 2008; 1: 25–32.
 51. O’Bryan MK, Zini A, Cheng CY, Schlegel PN. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. *Fertil Steril* 1998; 70: 1143–1147.
 52. Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, Holstein AF. Nitric oxide synthase (NOS–I) in Leydig cells of the human testis. *Arch Histol Cytol* 1995; 58: 17–30.
 53. Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP. Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinol* 1996; 137: 5337–5343.
 54. Kostic TS, Andric SA, Maric D, et al. Involvement of inducible nitric oxide synthase in stress–impaired testicular steroidogenesis. *J Endocrinol* 1999; 163: 409–416.
 55. Kim BH, Kim CH, Jung KY, et al. Involvement of nitric oxide during in vitro fertilization and early embryonic development in mice. *Arch Pharm Res* 2004; 27: 86–93.

56. Welch C, Watson ME, Poth M, et al. Evidence to suggest nitric oxide is an interstitial regulator of Leydig cell steroidogenesis.. *Metabolism* 1995; 44, 234–238.
57. Sengoku K, Tamate K, Zoshida T, et al. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fert. Steril* 1998; 69, 522–527.
58. Gluecksmann A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews* 1951; 26: 59-86.
59. Lockshin RA and Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 545-550.
60. Leist M, and Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2001; 2: 589-598.
61. Daston GP, Gooch JW, Breslin WJ, et al. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. *Reprod Toxicol* 1997; 11: 465–481.
62. Jensen TK, Toppari J, Keiding N, Skakkebaek NE. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clin Chem* 1995; 41: 1896–1901.
63. Cravedi JP, Zalko D, Savouret JF et al. The concept of endocrine disruption and human health. *Med Sci* 2007; 23: 198–204.
64. Erkkila K, Pentikainen V, Wikstrom M, Parvinen M, Dunkel L. Partial oxygen pressure and mitochondrial permeability transition affect germ cell apoptosis in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4253–4259.
65. Tripathi R, Mishra DP, Shaha C. Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways. *J Reprod Immunol* 2009; 83: 31–35.
66. Moreno RD, Lizama C, Urzua N, Vergara SP, Reyes JG. Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat. *Cell Tissue Res* 2006; 325: 533–540.
67. Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2010; 365: 1501–1515.
68. German J. Food processing and lipid oxidation. *Adv Exp Med Biol* 1999; 459: 23–50.
69. Gutteridge JMC, Halliwell B. *Antioxidants in Nutrition, Health and Disease* Oxford; Oxford University Press, 1994.
70. Jacob, R.A., *The Integrated Antioxidant System*. *Nutr Res* 1995; 15: 755-766.
71. Hurrell R Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *J. Nutr* 2003; 133: 2973S–2977S.
72. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevent: mechanims of action, *J. Nutr* 2004; 134: 3479-3485.
73. Harborne JB, Williams CA. *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry* 2000; 55: 481–504.
74. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63: 1035–1042.
75. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* 2004; 24: 851–874.

76. Arul D, Subramanian P. Inhibitory effect of naringenin (citrus flavonone) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013; 434: 203–209.
77. Keser S, Celik S, Turkoglu S, et al. Total phenolic contents and free-radical scavenging activities of grape (*Vitis vinifera* L.) and grape products, *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2013; 64: 210–216.
78. Kinoshita T, Lepp Z, Kawai Y, et al. An integrated database of flavonoids. *BioFactors* 2006; 26: 179–188.
79. Mouly P, Gaydou EM, Auffray A. Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using lipid chromatography. *J Chromatogr A* 1998; 800: 171–179.
80. Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res* 2001; 15: 655–669.
81. Constantin RP, do Nascimento GS, Constantin RP, et al. Citrus Flavanones Affect Hepatic Fatty Acid Oxidation in Rats by Acting as Prooxidant Agents. *Biomed Res Int*. 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/342973>.
82. Cai YZ, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 2004; 74: 2157–2184.
83. Lin N, Sato T, Takayama, et al. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 2065–2071.
84. Kaur G, Tirkey N, Chopra K. Beneficial effect of hesperidin on lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity. *Toxicology* 2006; 226: 152–160.
85. Kalpana KB, Srinivasan M, Menon VP. Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H₂O₂ induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane. *Mol Cell Biochem* 2009; 323: 21–29.
86. Kamaraj S, Anandakumar P, Jagan S, et al. Modulatory effect of hesperidin on benzo(a)pyrene induced experimental lung carcinogenesis with reference to COX-2, MMP-2 and MMP-9. *Eur J Pharmacol* 2010; 649: 320–327
87. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytother. Res* 2015; 29: 323–331
88. Kim DH, Jung EA, Sohng IS, et al. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res* 1998; 21: 17-23
89. Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, et al. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 235–242.

90. Nielsen ILF, Chee WSS, Poulsen L, et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *J Nutr* 2006; 136: 404–408.
91. So FV, Guthrie N, Chambers AF, et al. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer* 1996; 262: 167- 181.
92. Yang M, Tanaka T, Hirose Y, et al. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4 hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int J Cancer* 1997; 73: 719- 724.
93. Tanaka T, Makita H, Kawabata K, et al. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 957–965.
94. Miyagi Y, Om AS, Chee KM, Bennink MR. Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice. *Nutr Cancer* 2000; 36: 224-229.
95. van Acker FA, Schouten O, Haenen GR, et al. Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett* 2000; 473: 145-148.
96. Jeon SM, Bok SH, Jang MK, et al. Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits. *Clin Chim Acta* 2002; 317: 181-190.
97. Borradaile NM, Carroll KK, Kurowska EM. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids* 1999; 34: 591-598.
98. Kurowska EM, Borradaile NM, Spence JD, Carrol CC. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. *Nutr Res* 2000; 20: 121-129.
99. Placer ZA, Cushmann LL, Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation (as malondialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry* 1966; 16: 359-364.
100. Aebi H. Catalase. In: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods In Enzymatic Analysis*, Academic Press New York: 1983; 276-286.
101. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-890.
102. Yamamoto Y, Isoyama E, Sorkitis N, et al. Effects of smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. *Urol Res* 1998; 26: 45-48.
103. Sankako MK, Garcia PC, Piffer RC, et al. Possible mechanism by which zinc protects the testicular function of rats exposed to cigarette smoke. *Pharmacological Reports* 2012; 64: 1537-1546.
104. La Maestra, S, de Flora S, Micale RT. Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.08.006>.
105. Mohamed M, Sulaiman SA, Jaafar H. Antioxidant Protective Effect of Honey in Cigarette Smoke-Induced Testicular Damage in Rats.. *Int. J Mol Sci* 2011; 12: 5508-5521.

- 106.Güven MC, Can B, Ergün A, Saran Y, Aydos K. Ultrastructural effects of cigarette smoke on rat testis. *Eur Urol* 1999; 36: 645-649.
- 107.Sinha Hikim AP, Wang C, Lue Y, et al. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endoc and Metab* 1998; 83: 152.
- 108.Ayaşhoğlu E. Apoptoz. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi* 2001; 21: 57-62.
- 109.Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. Involvement of Apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 1995; 136: 2770-2775.
- 110.Rodriguez I, Christiane O, Araki K, et al. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J* 1997; 24: 2262-2270.
- 111.Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 643-650.
- 112.Yin Y, Hawkins KL, Devvolf WC, Morgantaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 1997; 18: 159- 165.
- 113.Rodriguez JB, Garcia CM. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl* 1998; 19: 487-497.
- 114.Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Reviews* 1995; 11: 101-105.
- 115.Rajpurkar A, Jiang Y, Dhabuwala CB, et al. Cigarette smoking induces apoptosis in rat testis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002; 21: 243-248.
- 116.Ozkan L, Yardimoglu M, Ozkurkucugil C. Protective effects of pentoxifylline on the seminiferous tubules morphology in smoking rats. *Research Web Pub* 2013; 1: 1-7.
- 117.O'Bryan, MK, Schlat S, Gerdprasert O, et al. Inducible nitric oxide synthase in the rat testis: evidence for potential roles in both normal function and inflammation-mediated infertility. *Biol. Reprod* 2000; 63: 1285–1293.
- 118.Shikone T, Billig H, Hsueh AJW. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol Reprod* 1994; 51: 865-872.
- 119.Sönmez MF, Tascioglu S. Protective effects of grape seed extract on cadmium-induced testicular damage, apoptosis, and endothelial nitric oxide synthases expression in rats. *Toxicology and Industrial Health* 1–9 © The Author(s) 2015. DOI: 10.1177/0748233714566874.
- 120.Chiba H, Kim H, Matsumoto A, et al. Hesperidin prevents androgen deficiency-induced none loss in male mice. *Phytother Res* 2014; 28: 289–295.
- 121.Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1603–1616.
- 122.Balakrishnan A, Menon VP. Protective effect of hesperidin on nicotine induced toxicity in rats. *Indian J Exp Biol* 2007; 45: 194–202.

123. Pradeep K, Ko KC, Choi MH, et al. Protective Effect of Hesperidin, a Citrus Flavanoglycone, Against gamma-Radiation-Induced Tissue Damage in Sprague-Dawley Rats. *J Med Food* 2012; 15: 419–427.
124. Sudheer KM, Srinivasan KK, Unnikrishnan MK. Hesperidin inhibits nitrite-induced methemoglobin formation. *Indian J Pharm Sci* 2003; 65: 436–438.
125. Shrivastava M, Kar V, Shrivastava S. Cyclophosphamide altered the myocardial marker enzymes: Protection provoked by Hesperidin in Rats. *Int J Phytomed* 2013; 5: 141–145.
126. Trivedi PP, Tripathi DN, Jena GB. Hesperetin protects testicular toxicity of doxorubicin in rat: Role of NF κ B, p38 and caspase-3. *Food and Chemical Toxicology* 2011a; 49: 38-47.
127. Arafa HMM, Aly HAA, Abd-Ellah MF, El-Refaey HM. Hesperidin attenuates benzo[α]pyrene-induced testicular toxicity in rats via regulation of oxidant/antioxidant balance. *Toxicol Ind Health* 2009; 25: 417–427.
128. Shagirtha K, Pari L. Hesperetin, a citrus flavonone, protects potentially cadmium induced oxidative testicular dysfunction in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2011; 74: 2105–2111.
129. Çelik E. Ratlarda deneysel testis torsiyonu ile oluşturulan iskemi/reperfüzyon hasarından korunmada hesperetin etkileri. Uzmanlık tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 2012.
130. Trivedi PP, Kushwaha S, Tripathi DN, Jena GB. Cardioprotective effects of hesperetin against doxorubicin-induced oxidative stress and DNA damage in rat. *Cardiovasc Toxicol* 2011b; 11: 215-225.

8. ÖZGEÇMİŞ

05 Mayıs 1988'de Muş'ta doğdum. 2007 yılında Elazığ Merkez Anadolu Lisesi'nden mezun olup, 2008 yılında Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. 03.07.2012 tarihinden lisans eğitimi tamamlayıp 2013 yılı bahar döneminde Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Programı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.