

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELATONUN UYGULANAN RATLARIN TESTİS DOKUSUNDA  
SÜPEROKSİD DISMUTAZ-1 (SOD-1), GLUTATYON  
PEROKSİDAZ-4 (GPx-4) VE KATALAZ ENZİMİNİN  
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONU

Öğr. Gör. Taylan Özgür KAYA  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Turgay DEPREM

2014 - KARS

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELATONUN UYGULANAN RATLARIN TESTİS DOKUSUNDA  
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ-1 (SOD-1), GLUTATYON  
PEROKSİDAZ-4 (GPx-4) VE KATALAZ ENZİMİNİN  
İMÜNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONU

Öğr. Gör. Taylan Özgür KAYA  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Turgay DEPREM

Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından  
desteklenmiştir. Proje No: 2012-VF-26

2014 - KARS

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı çerçevesinde Taylan Özgür KAYA tarafından hazırlanmış olan “**Melatonin Uygulanan Ratların Testis Dokusunda Süperoksit Dismutaz-1 (SOD-1), Glutasyon Peroksidaz-4 (GPx-4) ve Katalaz Enzimi’nin İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunma sınavı sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ...birliği..... ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi  
15.05.2014

**İmza**

**Adı Soyadı :**

Başkan : Prof. Dr. Hatice ERDOST  
Üye : Prof. Dr. Şahin ASLAN  
Üye : Doç. Dr. Hasan ÖZEN  
Üye : Doç. Dr. Ebru KARADAĞ SARI  
Üye : Yrd. Doç. Dr. Turgay DEPREM



Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .....gün ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serpil DAĞ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## Ç İNDEK İLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>S İMGELER ve KISALTMALAR D İZ İNİ</b>	<b>I</b>
<b>TABLolar D İZ İNİ</b>	<b>III</b>
<b>EK LLER D İZ İNİ</b>	<b>IV</b>
<b>GRAF İKLER D İZ İNİ</b>	<b>V</b>
<b>RES İMLER D İZ İNİ</b>	<b>VI</b>
<b>ÖNSÖZ</b>	<b>VIII</b>
<b>1. G İRİŞ İM</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL B İLG İLER</b>	<b>3</b>
2.1. Serbest Radikaller	3
2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	4
2.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	6
2.2.1.1. Melatonin	8
2.2.1.2. Süperoksit Dismutaz	15
2.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz	17
2.2.1.4. Katalaz	19
2.3. Erkek Genital Sistemi	20
2.3.1. Testis	20
2.4. Antioksidanlar ve Testis İlişkisi	25
<b>3. MATERYAL ve METOT</b>	<b>27</b>
3.1.1. Deney Hayvanı Materyali	27
3.1.2. Melatonin	27
<b>3.2. METOT</b>	<b>28</b>
3.2.1. Melatonin Uygulanması	28
3.2.2. Ratlarda Canlı Ağırlık Ölçümü	28

3.2.3. Ratlardan Testis Örneklerinin Alınması	28
3.2.4. Histolojik ncelemeler	29
3.2.5. mmunohistokimyasal ncelemeler	29
3.2.6. statistiksel Analiz	30
<b>4. BULGULAR</b>	<b>31</b>
4.1. Ratların Canlı A ırlık Bulguları	31
4.2. Ratların Testis A ırlık Bulguları	41
4.3. Ratların Tubulus Seminiferus Kontortus Çap Bulguları	42
4.4. Histolojik De erlendirme Bulguları	43
4.5. mmunohistokimyasal De erlendirme Bulguları	49
4.5.1. SOD-1 mmunoreaktivitesi Bulguları	49
4.5.2. GPx-4 mmunoreaktivitesi Bulguları	55
4.5.3. Katalaz mmunoreaktivitesi Bulguları	60
<b>5. TARTI MA VE SONUÇ</b>	<b>66</b>
<b>6. ÖZET</b>	<b>81</b>
<b>7. SUMMARY</b>	<b>83</b>
<b>8. KAYNAKLAR</b>	<b>85</b>
<b>9. ÖZGEÇM</b>	<b>105</b>

**S İMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

- ABC:** Avidin-Biotin-Peroksidaz  
**ABP:** Androjen Bağlayıcı Protein  
**AFMK:** N-Asetil-N-Formil-5-Metoksikinüramin  
**cAMP:** Siklik Adenozin Monofosfat  
**CAT:** Katalaz  
**CuZn-SOD:** Bakır Çinko Süperoksit Dismutaz  
**DAB:** Diaminobenzidin  
**dk.:** Dakika  
**DNA:** Deoksiribonükleik Asit  
**EC-SOD:** Ekstraselüler SOD  
**F:** F De eri  
**Fe-SOD:** Demir Süperoksit Dismutaz  
**Fe:** Demir  
**FSH:** Folikül Stimüle Edici Hormon  
**GnRH:** Gonadotropin Salıverici Hormon  
**GPx:** Glutatyon Peroksidaz  
**gr:** Gram  
**GSH:** Glutatyon  
**GSSG:** Okside Glutatyon  
**GSSG-Rd:** Glutatyon Redüktaz  
**H.E.:** Hematoksilen Eosin  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Hidrojen Peroksit  
**6-HMS:** 6-Hidroksimelatonin Sülfat  
**IDO:** İndolamin 2,3-Dioksijenaz  
**i.p.:** İnteraperitoneal  
**kg:** Kilogram  
**LH:** Lüteinleştirici Hormon

## II

**MDA:** Melondialdehit

**mg:** Miligram

**Mn:** Manganez

**Mn-SOD:** Mangan Süperoksit Dismutaz

**mRNA:** Mesajcı Ribonükleik Asit

**NAT:** N-Asetiltransferaz

**Ni-SOD:** Nikel çeren Süperoksit Dismutaz

**NO:** Nitrik Oksit

**NOS:** Nitrik Oksit Sentaz

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Süperoksit

**OH<sup>-</sup>:** Hidroksil

**ONOO:** Peroksi nitrit

**PAS:** Periyodik Asit Shift

**PBS:** Fosfat Buffer Salin

**PHGPx:** Fosfolipid Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz

**RNA:** Ribonükleik Asit

**ROS:** Reaktif Oksijen Türleri

**SD:** Standart Sapma

**SOD:** Süperoksit Dismutaz

**snGPx:** Sperm Nükleus Glutasyon Peroksidaz

**µm:** Mikrometre

**%:** Yüzde

### III

#### TABLolar D Z N

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 1.</b> Antioksidanların genel sınıflandırılması	7
<b>Tablo 2.</b> Deney grupları ve yapılan uygulamalar	28
<b>Tablo 3.</b> Dokulardaki SOD-1, GPx-4 ve Katalaz immunoreaktivitesinin derecelendirilmesi	30
<b>Tablo 4.</b> Deneme grubu içinde günlere göre ortalama canlı a ırlıkların kar ıla tırılması	32
<b>Tablo 5.</b> Sham grubu içinde günlere göre ortalama canlı a ırlıkların Kar ıla tırılması	34
<b>Tablo 6.</b> Kontrol grubu içinde günlere göre ortalama canlı a ırlıkların kar ıla tırılması	36
<b>Tablo 7.</b> Gruplararası günlere göre ortalama canlı a ırlıkların kar ıla tırılması	38
<b>Tablo 8.</b> Gruplar arasında testis a ırlıklarının kar ıla tırılması	41
<b>Tablo 9.</b> Gruplar arasında tubulus seminiferus kontortus ap de erleri kar ıla tırılması	42
<b>Tablo 10.</b> Testisteki yapılar ve SOD-1 reaksiyon yo unlu u	50
<b>Tablo 11.</b> Testisteki yapılar ve GPx-4 reaksiyon yo unlu u	55
<b>Tablo 12.</b> Testisteki yapılar ve katalaz reaksiyon yo unlu u	61



## IV

### EK LER D Z N

#### Sayfa No

**ekil 1.** Melatoninin pinealositlerde sentezi ve salgılanması

9

## GRAFİKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Grafik 1.</b> Deneme grubunda günlere göre canlı ağırlıklarının karşılaştırılması	33
<b>Grafik 2.</b> Sham grubunda günlere göre canlı ağırlıklarının karşılaştırılması	35
<b>Grafik 3.</b> Kontrol grubunda günlere göre canlı ağırlıklarının karşılaştırılması	37
<b>Grafik 4.</b> Günlere göre canlı ağırlıkların ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması	40
<b>Grafik 5.</b> Gruplar arasında testis ağırlıklarının karşılaştırılması	41
<b>Grafik 6.</b> Gruplar arasında tubulus seminiferus kontortus çap değişimleri karşılaştırılması	42

## VI

### RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Resim 1.</b> Kontrol grubu testis dokusunun histolojik görünümü	43
<b>Resim 2.</b> Sham grubu testis dokusunun histolojik görünümü	44
<b>Resim 3.</b> Kontrol grubu testis dokusunun histolojik görünümü	44
<b>Resim 4.</b> Sham grubu testis dokusunda tubulus seminiferus kontortusun histolojik görünümü	45
<b>Resim 5.</b> Deneme grubu testis dokusunun histolojik görünümü	46
<b>Resim 6.</b> Deneme grubu testis dokusunda tubulus seminiferus kontortusun histolojik görünümü	47
<b>Resim 7.</b> Kontrol grubu testis dokusunda tubulus seminiferus kontortusun histolojik görünümü	48
<b>Resim 8.</b> Kontrol grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi	50
<b>Resim 9.</b> Sham grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi	51
<b>Resim 10.</b> Deneme grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi	51
<b>Resim 11.</b> Kontrol grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi	52
<b>Resim 12.</b> Kontrol grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi	52
<b>Resim 13.</b> Sham grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi	53
<b>Resim 14.</b> Sham grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi	53
<b>Resim 15.</b> Deneme grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi	54
<b>Resim 16.</b> Kontrol grubu testis dokusunda negatif SOD-1 immunoreaktivitesi	54
<b>Resim 17.</b> Kontrol grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi	56
<b>Resim 18.</b> Sham grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi	56
<b>Resim 19.</b> Deneme grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi	57
<b>Resim 20.</b> Kontrol grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi	57

## VII

<b>Resim 21.</b> Deneme grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi	58
<b>Resim 22.</b> Kontrol grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi	58
<b>Resim 23.</b> Sham grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi	59
<b>Resim 24.</b> Deneme grubu testis dokusunda negatif GPx-4 immunoreaktivitesi	59
<b>Resim 25.</b> Kontrol grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi	61
<b>Resim 26.</b> Sham grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi	62
<b>Resim 27.</b> Deneme grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi	62
<b>Resim 28.</b> Sham grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi	63
<b>Resim 29.</b> Deneme grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi	63
<b>Resim 30:</b> Sham grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi	64
<b>Resim 31:</b> Kontrol grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi	64
<b>Resim 32.</b> Kontrol grubunun testis dokusunun damar endotelinde katalaz immunoreaktivitesi	65
<b>Resim 33:</b> Sham grubu testis dokusunda negatif katalaz immunoreaktivitesi	65

## VIII

### ÖNSÖZ

Bu çalı mada eksojen olarak melatonin uygulaması yapılan ratların testis dokusunda süperoksit dismutaz-1 (SOD-1), glutatyon peroksidaz-4 (GPx-4) ve katalazın immunohistokimyasal lokalizasyonunun incelenmesi amaçlanmı tır.

Doktora e itimim süresince bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, çalı malarımın yönlendirilmesinde ve devamında her türlü deste i sa layan, ilgisi ve manevi deste i ile de her zaman yanımda olan çok de erli danı man hocam Yrd. Doç. Dr. Turgay DEPREM'e, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, pratik çözümleri ile bana yol gösteren ve her türlü deste i sa layan de erli hocam Prof. Dr. ahin ASLAN'a, tez çalı mam süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandı m de erli hocalarım Doç. Dr. Ebru KARADA SARI'ya, Yrd. Doç. Dr. Serap KORAL TA ÇI'ya, yine desteklerinden dolayı Patoloji Anabilim Dalı Ö retim Üyesi Doç. Dr. Mahmut SÖZMEN ile Doç. Dr. Hasan ÖZEN'e, istatistiksel de erlendirmelerde deste ini gördü üm Prof. Dr. Turgut KIRMIZIBAYRAK'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulundu u süre zarfında bilgi ve deneyimlerinden yararlandı m, bilime dair prensiplerini kendime örnek aldı m ilk danı manım Prof. Dr. Nurhayat YECAN GÜLMEZ'e, yine desteklerini esirgemeyen de erli arkada m Seher KOÇ SALTAN'a, maddi ve manevi deste i ile her zaman yanımda olan, en yakın destekçim, hayat yolda m ve sevgili e im Ezgi ERM KAYA'ya, tüm sıkıntı ve zorluklara ra men bugünlere gelmeme ve bu güzellikleri ya amama vesile olan anneme ve babama, maddi deste inden dolayı KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Ara tırmalar Yönetim Kurulu Ba kanlı ı'na ve adını yazamadı m eme i geçen herkese çok te ekkür ederim.

## 1. G R

Hücre sel ya amın süreklili i karma ık biyokimyasal tepkimelerin dengeli bir ekilde yürümesine ba lıdır. Bu dengeyi bozacak yönde ortaya çıkan endojen veya eksojen kaynaklı faktörler hücre hasarına neden olurlar. Radikal reaksiyonları hücre homeostazının bir parçasıdır. Sa lıklı hücreler homeostatik olarak antioksidanların kullanılmasıyla serbest radikalleri ortadan kaldırırlar. Hücreler, antioksidan savunma sistemleri ile reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine kar ı korunmaktadırlar (5).

Serbest radikallerin anormal üretimi protein, lipid ve nükleik asitler gibi bazı moleküllerin yıkımlanmasına yol açarak birçok hastalı ın temelini meydana getirirler. Normal artlar altında serbest radikallerden dolayı olu acak zararlı etkiler hücre sel koruma sistemleri ile kontrol edilmektedir. Bu koruyucu sistemler melatonin, vitamin E, Vitamin C ve glutatyon gibi enzimatik veya enzimatik olmayan maddeler aracılı ı ile etkilerini göstermektedirler (19).

Biyolojik sistemlerde prooksidan/antioksidan dengenin bozulması ile meydana gelen oksidatif stres, birçok patolojik durumla ili kilendirilmektedir. Organizma, prooksidan etki gösteren serbest radikallerin hasarına kar ı, antioksidan adı verilen maddelerle kendini savunmaktadır. Melatoninin endokrin ve sirkadiyen ritm üzerine bilinen etkilerinin yanısıra, antioksidan etkiye de sahip oldu u gösterilmi tir. Hatta antioksidanlar içerisinde, melatoninin en güçlü radikal tutucu oldu u öne sürüldü ünden, melatonine olan ilgi giderek artmaktadır ve antioksidan özelli i gün geçtikçe önem kazanmaktadır (202).

Çe itli çalı malar, melatoninin güçlü bir antioksidan oldu unu göstermi tir (18,19). Melatonin serbest radikallerin ve reaktif türlerinin direkt temizleyicisidir. Di er yandan çe itli antioksidan enzimler üzerine uyarıcı etkiye sahip oldu u da belirtilmi tir (19). Ayrıca farklı yollarla antioksidan sistemi destekledi i belirtilmi ve süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin enzim aktiviteleri ve gen ekspresyonları üzerine önemli etkilerinin oldu u da bildirilmi tir (90,169).

Melatoninin antioksidan faaliyetinden ba ka di er önemli fizyolojik aktiviteleri sirkadiyen ritimlerin kontrolü, immün sistemin artı ve mevsimsel reproduksiyon siklusların düzenlenmesidir (6,177). Farklı türlerin reproduktif sistemlerinde melatonin için ba lanma bölgeleri bulunmu tur. Melatonin hem lipid hem de sulu ortamda çözünebilir biçimdedir. Germinal epiteli korumak için kan-testis bariyerini geçebilme özelli ine sahiptir ve testisi oksidatif stresten korumaktadır (115).

Melatonin uygulamasının, erkek genital sistemde glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz üzerine olan etkisini inceleyen birçok çalı ma yapılmı (7,11,46,128,157,166) ve son dönemde bu konu ara tırmacıların ilgi oda ı haline gelmi tir.

Bu çalı mada, eksojen olarak melatonin uygulanan ratların testis dokusunda süperoksit dismutaz-1, glutasyon peroksidaz-4 ve katalaz enziminin lokalizasyonlarının immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi ve melatoninin bu enzimlerin da ılımı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmı tır.

## 2. GENEL B LG LER

### 2.1. Serbest Radikaller

Elektronlar atomlarda "orbital" adı verilen uzaysal bölgede çift olarak bulunurlar. Ço u molekül çift elektronlu, az sayıda molekül ise tek yani eksik elektronludur. Eksik elektronu olan bu moleküller oldukça reaktif bir özellikte ve kararsız yapıdadırlar. Bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkile ime girerler ve bu molekülden ya bir elektron alır ya da ona bir elektron verirler. Bu eilde ba ka moleküller ile çok kolayca elektron alı veri ine girerek onların yapısında bozulmalara yol açan bu moleküllere “serbest radikaller” “oksidan moleküller” veya “reaktif oksijen partikülleri” adı verilir. Reaktif oksijen türleri, foto-oksidasyon, emisyon gibi çevresel kaynaklı olabilece i gibi mitokondrial metabolizma ve normal hücrese fonksiyonlar esnasında da olu maktadır (24,27, 55,63,170).

Oksijen insan ya amı için çok gerekli olmasına ra men, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda yo un bir zarar verme gücüne sahiptir (42). Ço unu serbest radikallerin olu turdu u reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülü ile kıyaslandı nda, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır (118). Serbest radikaller stabil olmayan, yüksek enerjili bile iklerdir ve dı atomik orbitallerindeki bir veya daha fazla çift olu turmamı elektronlar serbest radikallere büyük bir reaktivlik kazandırdı ndan dolayı DNA, nükleotid koenzimler, protein ve lipidler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Bu zararın ya lanmayı te vik etti i ve ayrıca ba ı klık sisteminde zayıflama, çe itli kanser türleri, kalp-damar hastalıkları, katarakt, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalı a sebep oldu u ile ilgili bilgiler bulunmaktadır (42).

Serbest radikal reaksiyonları, normal metabolik yolların i leyi lerinin do al bir sonucudur. Oksidan moleküller, organizmada ba lıca glukozun oksidasyonu olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırasında ve sonrasında devamlı bir olu um durumundadır ve endojen antioksidanlar adı verilen moleküller



aracılı 1 ile sürekli etkisizleştirme işlemi içerisinde. Bu karlılıklı etkileşim olayları organizmada bir denge halindedir (132).

Serbest radikallerin oluşumunun antioksidan kapasiteyi aşması durumunda metabolik ve fonksiyonel birçok bozukluk meydana gelmektedir. Dokularda, tekli elektronların oksijene sürekli akışı endojen oksidatif stresi meydana getirir. Oksijenden türeyen süperoksit radikali, peroksit, hidroksil (OH<sup>-</sup>) radikali ve diğer serbest radikaller çok reaktiftir. Bundan dolayı membran bütünlüğünü sağlayan fosfolipidlerin, proteinlerin, DNA ve RNA gibi moleküllerin bütünlüğünü tehdit ederler (12,17,162).

Aslında serbest radikal molekülleri, belirli düzeyde kaldıkları müddetçe, organizmanın enfeksiyöz ajanlara ve yabancı maddelere karşı savunmasında önemli moleküllerdir. Ancak serbest radikallerin belirli düzeyin üzerinde oluşması ve antioksidanların yetersiz kalması durumunda söz konusu serbest radikaller hücrenin yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerin yapısını bozarak zararlı etkilere neden olurlar (30,62,72,87,138).

## **2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri**

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir (37).

Antioksidanlar 'ekstra' elektrona sahip moleküllerdir. Bu ekstra elektronu vererek serbest radikalleri nötrleştirirler yani etkisiz hale getirirler ve böylece onların normal oksijen molekülleri durumuna gelmelerini sağlarlar (158). Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler (4). Erişkin insan organizmasında reaktif oksijen metabolitlerini ve lipid kökenli ara ürünleri detoksifiye ederek koruyucu etki gösteren antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır (107). Serbest radikallere karşı savunma enzimatik ve enzimatik olmayan olarak yapılır (4). Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde,

enzimatik olmayan antioksidanlar ise glutatyon (GSH) hariç hücre dışı nda daha fazla etkilidir (127). Antioksidanların, hücrelerin normal solunumu esnasında yan ürün olarak meydana gelen reaktif oksijen türlerine karşı vücut savunma sisteminde önemli bir role sahip olduklarına inanılmaktadır (58).

Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek, reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılabilirler gibi, serbest radikal oluşumunu önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısmında bulunabilirler (4).

Antioksidan moleküller, oksidan moleküllerinin yol açtığı hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz duruma getirirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, seruloplazmin, transferin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı yapmaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (61).

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler:

1) Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- Bağlatıcı reaktif türleri uzaklaştırıcı etki,
- Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki (127).

2) Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

- Süpürücü/temizleyici etki gösterenler; Yeni radikal oluşumunu engeller ve oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Örnek olarak SOD ve GPx enzimleri ve bazı bağlatıcı proteinler verilebilir.

- Giderici etki gösterenler; Oksidanlarla etkile ip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitesini söndüren ve inaktif hale getiren bile iklerdir. Örnek olarak, vitaminler (Vit A-beta karoten, Vit C-askorbat, Vit E- -tokoferol), flavonoidler, mannitol ve antosiyanidinler verilebilir.
- Zincir kırıcı etki gösterenler; Zincirleme olarak devam eden tepkimeleri belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Örnek olarak bazı vitaminler, ürik asit, bilirubin ve albumin gösterilmektedir.
- Tamir edici etki gösterenler; Radikalin olu turdu u hasarı onarıcı etki. Bu grupta DNA tamir enzimleri, methionin sülfoksid redüktaz sayılabilir (4,127,203).

### 2.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar, do al (endojen kaynaklı) ve do al olmayan (eksojen kaynaklı) antioksidanlar olmak üzere iki ana grupta toplanabilir (65).

#### ➤ **Eksojen Antioksidanlar:**

Eksojen antioksidanlar; vitaminler ve ilaç antioksidanları olarak sınıflandırılır (4).

#### ➤ **Endojen Antioksidanlar:**

**1- Enzim olmayan endojen antioksidanlar:** Enzimatik olmayan antioksidanların etkisi antioksidan moleküle bir elektron veya hidrojen transferi ekinde özetlenebilir (204).

**2- Enzim olan endojen antioksidanlar:** Bu enzimler dioksijen redüksiyonu ara bile iklerini veya oksidan zararına u ramı bile ikleri do rudan uzakla tırabilirler (204). Antioksidan maddeler ve bunların genel sınıflandırılması Tablo 1'de gösterilmi tir (4).

Eksojen Antioksidanlar	Endojen Antioksidanlar	
	Enzim Olmayanlar	Enzim Olanlar
- Ksantin Oksidaz inhibitörleri	<b>a) Sıvı fazda</b> (sitosol ya da kan plazmasında) bulunanlar	-Süperoksit dismutaz
Allopürinol		-Glutasyon Peroksidaz
Oksipürinol	-Melatonin	-Katalaz
Tungsten	-Askorbik asit	-Mitokondril sitokrom
Folik Asit	-Sistein	oksidaz sistemi
-NADPH Oksidaz inhibitörleri	-Ürat	-Glutasyon-S-transferaz
Adenozin	-Transferrin	-Hidroperoksidaz
Lokal Anestezikler	-Laktoferrin	
Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar	-Hemoglobin	
Diphenylene iodonium	-Miyoglobin	
-Soya fasulyesi inhibitörleri	-Albümin	
-Rekombinant süperoksit dismutaz	-Ferritin	
-Asetilsistein	-Metiyonin	
-Ebselen	-Bilirubin	
-Mannitol, barbitüratlar, albümin, sitokinler, demir elatörleri, nötrofil adezyon inhibitörleri...	-Glutasyon	
	<b>b) Lipid fazda</b> bulunanlar	
	- Karoten	
	- tokoferol (E vitamini)	

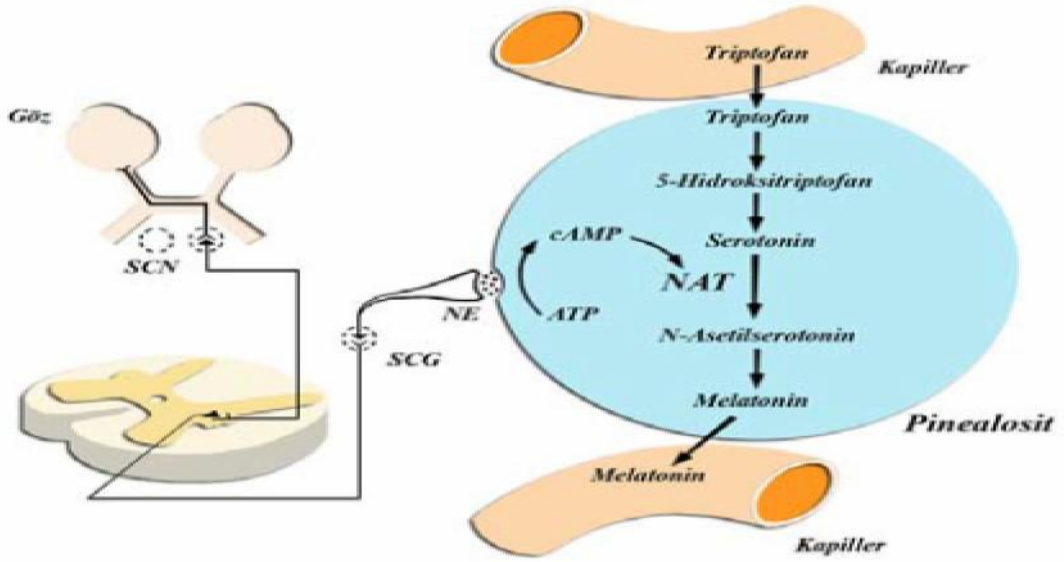
**Tablo 1.** Antioksidanların genel sınıflandırılması (4).

### 2.2.1.1. Melatonin

Melatonin, pineal bezin beta adrenerjik reseptörlerinin aktivasyonu ile triptofandan sentezlenen bir hormondur. Üretimi ve salınımı karanlık oldu unda ba lar ve aydınlıkla birlikte sona erer. Aydınlık dönemin uzaması veya aniden ı ı a çıkılması durumu melatonin üretimini durdurmaktadır. Bu nedenden dolayı melatonine “karanlı ın biyokimyasal tanımlayıcısı” ekinde sembolik bir isim de verilmi tir (146). nsanlarda melatonin salınımı karanlı ın çökmesinden hemen sonra ba layıp (20:<sup>00</sup>-23:<sup>00</sup>), gecenin ortasında (02:<sup>00</sup>-04:<sup>00</sup>) pik seviyelere ula ır, sabah saatlerinde (07:<sup>00</sup>-09:<sup>00</sup>) ise sona ermektedir. Serum melatonin düzeyi ya a göre de i iklik göstermektedir. Yeni do anlarda melatonin seviyesi oldukça dü üktür. Üçüncü aydan sonra melatonin salgılanması ritmik özellik kazanır. Melatoninin en yüksek seviyesi ya amın üç ile be inci yılları arasında saptanır. Ya lanmayla beraber melatonin salgılanması azalır (57,79,198). Melatonin salınımı üzerine cinsiyetin etkisinin olmadı ı bildirilmi tir (79). Melatoninin pineal bezin di nda ba ırsak, retina gibi organlarda da sentezlendi i gösterilmi olmasına ra men bu sentezin plazma melatonin seviyesine etkisi yok denecek kadar azdır (195). Sentezin düzenlenmesi primer olarak geceye, yani karanlı a ba lıdır. Sentezlenen melatonin pineal bezin endokrin hücreleri olan pinealositlerden hızlı bir ekinde salgılanmaktadır (147).

Melatonin 45 yıl önce ke fedilmi olmasına ra men serbest oksijen radikal süpürücüsü ve antioksidan olarak tanınması 15 yıl kadar öncesine dayanmaktadır. Bu tarihten önce melatoninin memelilerde sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde etkili oldu u biliniyordu. Melatonin pineal bezden salgılanan ve triptofandan kökenini alan bir moleküldür. Ancak melatoninini dü ük miktarlarda üretebilen ba ka organlar da bildirilmi tir. Retinal dokuda üretildi ini gösteren çalı malar oldu u gibi (135) overler, lens dokusu, gastrointestinal dokuda üretilebildi ine ili kin bulgular bulunmaktadır. Bunun yanı sıra bazı vücut sıvılarında ve hücrelerde melatonin düzeylerinin serum düzeylerinden yüksek oldu u saptanmı tır. Örne in kemik ili i hücrelerinde (175), safranın içeri inde (174) ve serebrospinal sıvıda (165) serumdan daha yüksek oranlarda melatonin düzeyleri bildirilmi tir.

Pineal bez içerisinde sempatik sinir uçlarındaki en önemli nörotransmitter noradrenalin'dir. Noradrenalin, postsinaptik reseptörler olan pinealosit membranındaki  $\beta$  ( ) ve  $\alpha$  ( ) reseptörlerine bağlanır. Yaklaşık olarak % 85 melatonin  $\beta$ -reseptörlerinin aktivasyonu ile %15'i ise  $\alpha$ -reseptörlerinin uyarılması ile sentezlenir,  $\beta$  ( ) ve  $\alpha$  ( ) adrenerjik reseptörlerin uyarılması ile hücre içinde siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve N-asetiltransferaz (NAT) artışı olur: Melatoninin ön maddesi olan triptofan, pinealositler içinde önce serotonine, daha sonra melatonine dönüşmektedir. Geceleri melatoninin salınımı büyük bir yükselme gösterir. Yükselmiş melatonin seviyesinin bu şekilde kalma süresi karanlığın süresine bağlıdır. Kış aylarında, uzamış gecelerde, bu süre uzun olmaktadır. Pinealektomi veya sempatik duyarısızlaştırma melatoninin gece yükselmesini önler (9).



**ekil 1.** Melatoninin pinealositlerde sentezi ve salgılanması (183).

Melatonin karaciğerde metabolize olmaktadır ve başlıca metaboliti 6-Hidroksimelatonin sülfat (6-HMS)'dir. İnsanlarda ekzojen melatoninin kısa bir metabolik yarı ömrü (20-60 dk.), büyük bir hepatik geçi etkisi vardır (98). Yapılan bir çalışmada deneklere melatonin verilerek tükürük ve serumdaki melatonin seviyeleri ile idrardaki 6-Hidroksimelatonin sülfat seviyesi ölçülmü ; puberte öncesi çocukların, melatoninin yeti kinlere nazaran daha hızlı metabolize ettikleri

saptanmı tır. Tüm çalı ma genelinde serum ve tükürük melatonin de erleri arasındaki oranın denekler arasında 55 kata varan de i iklikler gösterdi i gözlemlenmi tir (32).

#### ❖ Melatoninin Etki Yerleri:

##### a) *Seksüel Olgunluk ve Üreme*

Ekzojen melatonin, ya a, türe, doza ve uygulama zamanına göre de i kenlik göstermekle birlikte, üremeyi modifiye etmektedir. Belli türlerde, antigonadotropik etki gösterir. Günlük karanlıkta kalma saatlerinin de i mesi ile birlikte, melatonin salgılanması de i ir. Bu durum, üreme sistemi ile mevsim arasında ba lantı olabilece ini dü ündürmektedir. Örne in, mevsimsel üreme gösteren hamsterlarda, uzun dönem karanlık, daha fazla melatonin salgılanmasından dolayı üremeyi inhibe eder; erkeklerde testiküler gerilemeye, di ilerde anöstrus'a neden olur. nsan mevsimsel üreme göstermemesine ra men, epidemiyolojik çalı malarda, farklı co rafi alanlarda, gebelik ve do um oranının mevsimsel da ılım sergiledi i belirtilmi tir. Kı ları uzun olan bölgelerde, hipotalamo-gonadal sistem aktivasyonu ve gebelik yaza oranla dü üktür. Pineal bez, puberteyi de etkilemektedir. Melatonin seviyesinde dü ü meydana geldi inde, hipotalamogonadal sistem aktive olur. Çocukluk ve ergenlik ça ı boyunca melatonin sentezi giderek dü ü gösterir. Amenorede, serum melatonin konsantrasyonu yüksek bulunmu tur. Hızlı ve sürekli (uzun süreli ise) egzersiz durumunda, serum melatonin konsantrasyonda yükselme meydana gelir ve bu durum amenoreye neden olabilir. Melatonin, deney hayvanlarında, gonadotropin salıverici hormon (GnRH) salınımını inhibe eder. nsanlarda benzer veriler henüz tamamiyle aydınlatılmamı tır (29). Genç kadınlara, 4 ay boyunca oral olarak verilen 300 mg dozda melatoninin, lüteinle tirici hormon (LH) salınımını ve ovulasyonu inhibe etti i, progestin uygulamasının bu etkiyi artırdı ı gösterilmi tir (196). Overlerin fonksiyonlarını direkt bir ekilde de etkileyebilir. Granüloza hücrelerinin membranında melatonin reseptörlerinin varlı ı gösterilmi tir (199).

Buna ek olarak eksojen melatoninin uygulanması serum testosteron seviyesinde azalmaya neden olur. Melatonin hipofiz bezinden GnRH indüklü LH salınımını azaltarak (192), testosteron sekresyonunu ya indirek olarak hipotalamo-hipofizer aks aracılığıyla (68,151,193) ya da leydig hücrelerindeki direk etkisi aracılığıyla (191) gonadal seviyede (164) testosteron salgılanmasının baskılanmasına neden olur ve rapor edilmiştir.

Diğer yandan, belirli bir yaştan itibaren melatonin düzeyindeki ciddi düşüşün, immün sistemde olduğu gibi, endokrin sistemde de bir zayıflamaya yol açtığı ve buna bağlı olarak da seks hormonu üretiminde azalma meydana gelmesi sonucu, seksüel performansta düşüş ve cinsiyet organlarında dejenerasyon geliştiği iddia edilmektedir (88).

#### ***b) Antioksidan Etkisi***

Melatonin sirkadiyan ritmin biyolojik regülasyonunda, mizaç, üreme, uyku, tümör büyümesi ve yaşlanma sürecinde etkili olduğu bilinen bir nörohormondur. Melatoninin yaklaşık 25 yıldır bilinen önemli bir etkisi de antioksidan özelliğidir. Melatoninin serbest oksijen radikal süpürücü özelliği olduğu ilk kez Ianas ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur (75). *n vitro* (173) ve *n vivo* (176) çalışmalarda melatoninin yüksek toksik hidroksil (OH<sup>-</sup>) radikali ve oksijen kaynaklı diğer radikalleri temizleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, melatoninin bilinen antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, vitamin C, vitamin E gibi) daha fazla etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (144). Antioksidan etkinin görülebilmesi için melatonin konsantrasyonunun gece yarısı görülen pik değerinden çok daha yüksek seviyede olması gerekmektedir. Bu nedenden dolayı insanda antioksidan etkinin görülebilmesi muhtemelen yalnızca farmakolojik dozlarda olmaktadır. Bir çalışmada, ratlarda ana hepatik kanal ligate edilmiş ve bilirubinemiye bağlı olarak serbest radikallerle böbrekte gelişen hasar değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, melatonin verilen ratlarda serbest radikallere bağlı gelişen böbrek hasarının anlamlı derecede azaldığı, serum malondialdehit (MDA) düzeylerinin düşüşü ve serumda total antioksidan etkinliğin arttığı görülmüştür (35). Melatonin antioksidan etkisinin yanı sıra birçok antioksidan



enzimi de stimüle edici, prooksidan enzimlerin ve nitrik oksidin sentezini inhibe edici etkiye sahiptir. Ba ka bir çalı mada, hamsterlerde yanak keselerinde iskemi reperfüzyon hasarı meydana getirilmi ve hem sistemik melatonin verilen hem de lokal melatonin uygulanan hayvanlarda serbest radikallere ba lı reperfüzyon hasarının anlamlı derecede azaldı ı görülmü tür (21).

Melatoninin antioksidan etkisi üç temel ba lıkta toplanmı tır:

**a. Direkt Antioksidan Etki:**

Melatoninin oksidatif strese neden olabilen serbest radikalleri detoksifiye ederek onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildi i bildirilmektedir (23,149). Melatoninin antioksidan özelli i, yapısında bulunan pirol halkasından dolayı olmaktadır. Fizyolojik durumlarda pek çok indol melatonine benzer ekilde yıkılmaktadır, ancak O<sub>2</sub> (süperoksit) varlı nda, melatoninin pirol halkasının indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ile enzimatik ya da hemin ile nonenzimatik olarak yıkımı, yüksek reaktiviteye sahip, N-asetil-N-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) olu umuyla sonuçlanmaktadır (66). Melatoninin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlı nda da AFMK olu turdu u ve bu metabolitin radikal tutucu aktivite gösterdi i tespit edilmi tir (149).

Alfa-tokoferol, askorbat ve GSH gibi zincir reaksiyonlarını kırabilen di er antioksidanlardan farklı olarak, melatonin peroksil radikalini yakalayarak, yayılan lipid peroksidasyonunu sonlandırmaktadır (66). Melatoninin bu antioksidanlardan daha güçlü oldu u (149), mannitolden 14 kat ve GSH'dan 5 kat daha güçlü bir ekilde hidroksil (OH) radikalini yakaladı ı (173) yapılan *in vitro* çalı malarla gösterilmi tir. 5-OH-triptofan, 5-OH-triptamin ve serotonin ile kar ıla tırıldı nda, melatoninin, nitrik oksit (NO) olu umunu azaltan en güçlü indol oldu u belirlenmi tir. *n vitro* ko ullarda melatoninin doza ba ımlı bir ekilde, peroksinitrit (ONOO) 'in yol açtı ı oksidasyonu önledi i ve ayrıca kendisi nitrasyona u rayarak ONOO'i detoksifiye etti i; *in vivo* enflamasyon modelinde denitrotirozin olu umunu baskılayıcı etkiye sahip oldu u bildirilmi tir (23,149).

### **b. Antioksidan Enzim Aracılı Etki:**

Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki melatoninin, GPx, SOD, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz ve g-glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonları ya da aktiviteleri üzerine arttırıcı etkiye sahip oldu u ve bu yolla oksidatif stresi baskıladı ı bildirilmi tir (23,149). Ratlara, akut/kronik olarak uygulanan melatoninin beyin dokusu bakır çinko süperoksit dismutaz (CuZn-SOD) ve Manganez süperoksit dismutaz (Mn-SOD) sentezini arttırdı ı ve bu yolla beyin dokusunu oksidatif hasardan korudu u (90); ayrıca anne rata verilen melatoninin plasentadan geçebildi i ve fetus beyinde SOD aktivitesinde artı a neden oldu u gösterilmi tir (181). Gece öldürülen ratlarda gündüze göre, beyin GPx aktivitesinin daha yüksek seviyede bulunması, melatoninin fizyolojik antioksidan etkisine ba lanmaktadır. Ratlarda böbrek, karaci er ve beyin dokusundaki GPx aktivitesinde, melatonin uygulandıktan 3 saat sonra artı oldu u gözlenmi tir (134). Melatonine benzer biçimde, nöral GPx aktivitesinin, gündüz dü ük; gece yüksek oldu u bulunmu tur (143). Pinealektomi yapılan ratların akci er, karaci er ve beyin GPx aktivitelerinde anlamlı dü ü ler oldu u saptanmı tir (145). GSH havuzunu koruyan glutatyon redüktaz aktivesinin, devamlı karanlı a maruz bırakılan ku ların beyinde daha yüksek seviyede oldu u ve ekzojen melatonin uygulaması ile de deney hayvanlarında aktivitenin yükseldi i bildirilmi tir (133). Melatonin uygulanan ratların, karaci er glutatyon redüktaz aktivitesinde yakla ık olarak 2 kat artı oldu u belirlenmi tir (201). Melatonin tarafından g-glutamilsistein sentetazın uyarılmasıyla, insan endotel hücrelerinde total GSH içeri inde yükselme oldu u öne sürülmektedir (187).

### **c. Prooksidan Enzim Aracılı Etki:**

Melatoninin bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal olu umunu azaltıcı etki gösterdi i ve bu yolla da antioksidan sistemi destekledi i öne sürülmektedir (23,149). *In vitro* ve *in vivo* ko ullarda, NO ve daha ileri a amada ONOO olu umuna yol açan nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinin, fizyolojik melatonin konsantrasyonlarında inhibe edildi i bildirilmektedir (22).

Beyin iskem/reperfüzyon modelinde de, NOS inhibisyonuna neden olan melatoninin düzeltici etkilerinin olabilece i ileri sürülmektedir (56).

Melatonin hem suda ve hem de lipid fazda çözünebildi inden dolayı, organizmada çok geni bir alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kolay bir ekilde kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen melatonin için, bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, melatoninin tüm intraselüler komponentlere rahat bir ekilde ula abilmesini sa lamaktadır. Böylelikle melatonin, hücre zarını, organelleri ve çekirde i etkili bir ekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Hücre membranı ile temas etti inde, fosfolipid tabakanın dı yüzeyine tutunan melatonin, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye etmekte ve membranı korumaktadır. melatonin varlı ında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan  $O_2$ ,  $H_2O_2$  ve OH gibi radikallerin üretiminde de azalma olmaktadır. Melatoninin çekirde e kadar ula abilme özelli inden dolayı, DNA'nın oksidatif hasara kar ı korunmasında, melatonine bir üstünlük sa lamaktadır (9). Daha da önemlisi, melatoninin di er antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve 5 yıl gibi uzun süre kullanımında bile toksik bir etki göstermemesidir (145).

### **Enzim Olan Endojen Antioksidanlar**

Çe itli hasara neden olan etkenlere kar ı hücreler kendilerini korumak için savunma mekanizmaları geli tirmişlerdir. Bunlardan en önemlileri hücre içi antioksidan enzim sistemleridir. Strese ba lı lipid peroksidasyonu hasarını önlemek için; glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi etkinlikleri kanıtlanmış olan endojen enzimlerin yanı sıra eksojen olarak verilen antioksidan etkinli e sahip maddelerin de faydalı oldu u kanıtlanmıştır (59). En önemli antioksidan enzim süperoksit dismutazdır. Bu enzim süperoksit radikalini daha zararsız bir bile ik olan hidrojen peroksite ( $H_2O_2$ ) dönü türen tepkimeyi katalizlemektedir. Hidrojen peroksit, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile ayrıtılır. Katalaz, hidrojen peroksitin su ve oksijene ayrımını hızlandıran bir enzimdir. Hidrojen peroksit metabolizmasının ikinci yola ı glutatyon peroksit

yola ıdır. Bu enzim glutatyon redüktazla i birli i yapar. Glutatyon peroksidaz ile hidrojen peroksit suya indirgenirken, aynı zamanda intraselüler GSH da okside glutatyona dönü türülmektedir (97).

### 2.2.1.2. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz, süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve oksijen molekülüne dönü türen, antioksidatif reaksiyonların tam ortasında rolü olan önemli bir enzimdir (117). Bu enzimatik aktivite ilk olarak McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır (112).

Bu enzim; süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönü ümünü katalizler. Hidrojen peroksit daha sonra glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimi aracılı ı ile etkisiz duruma getirilmektedir. Hücre bölünmelerindeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir role sahiptir (51).

SOD'un be farklı formu bulunmaktadır: Vücutta en bol olarak bulunan CuZn-SOD sitoplazmada yer alırken, mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) mitokondrilerde yer alır. Demir süperoksit dismutaz (Fe-SOD), *E. coli*, *Bacteroides fragilis* ve *Propionibacterium shermanii* bakterilerinde anaerobik ortamda Fe içeren, aerobik ortamda ise Mn içeren SOD enziminin kullanıldığını özel bir sistem ekinde bulunmaktadır. Nikel içeren Süperoksit dismutaz (Ni-SOD), *Streptomyces griseus* bakterisinde tanımlanmış homotetramerik yapılu nikel içeren bir izoenzimdir (16).

Memelilerde üç çe it SOD bulunmaktadır (100).

**1) Sitozolik SOD (CuZn-SOD, SOD1) :** Fungus, bitki, hayvan, insan hücreleri gibi ökaryotik hücrelerde sitozol, nükleer membran ve mitokondri intermembran bo lu unda, eritrositlerde bulunan süperoksit dismutazdır (25,171). Hayvan hücrelerinde CuZn-SOD'lar daha çok sitozolde yerle mi tir. Bunun yanı sıra iç ve dı mitokondriyel membran arasındaki bo lukta, çekirdekte ve lizozomlarda bulunurlar (69). CuZn-SOD'un kofaktörleri çinko ve bakırdır. Bakır enzimin aktivitesinden, çinko ise stabilitesinden sorumludur. Birçok ökaryot ve

hatta prokaryotlarda da i ik varyantları belirlenmiştir. Bu grubun ço unlu unu ökaryotik hücrelerde bulunan sitozolik dismutaz olur (169).

**2) Mitokondrial SOD (Mn-SOD, SOD-2):** Mitokondride bulunur ve tetramerik yapıdadır. Kofaktörü mangandır.

**3) Ekstraselüler SOD (EC-SOD, SOD-3):** . Ekstraselüler SOD (EC-SOD), Marklund tarafından 1982'de tanımlanmıştır ve CuZn- SOD'dan farklı olarak bakır ve çinko taşıyan salgısal SOD'dur (110). Ekstraselüler bölümlere salgılanmaktadır ve tetramerik yapıdadır (139). Ekstraselüler SOD sadece endotelial hücreler ve fibroblast tarafından sentezlenir ve heparan sülfatlara ba lı olarak hücre yüzeyinde eksprese edilir. Damar endotelinden salınan endotelial heparin gev etici faktör plazmada süperoksit tarafından nötralize edildi i için ekstraselüler SOD (EC-SOD) damar tonusunun düzenlenmesinde muhtemel rol oynamaktadır (110).

nsanda SOD'un iki tipi bulunmaktadır. Bunlar; Mn-SOD ile CuZn-SOD'dur. Genel olarak hücrede bol bulunan izomer sitozolik CuZn-SOD'dur (70).

Mn-SOD ve CuZn-SOD hayvanlarda baskın olan formlardır. Omurgasızlarda SOD aktivitesi büyük ölçüde de i kenlik göstermektedir. Fakat aktivitesi omurgalılara göre genellikle daha dü üktür. Omurgasız CuZn-SOD formu memelilerdeki ile benzer özellik gösterir. Amfibilerdeki SOD en yüksek aktiviteyi beyinde en dü ük aktiviteyi akci erde gösterirken, yüksek omurgalılarda ise karaci erde aktivite genellikle en yüksektir (2).

### 2.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

GPx ilk olarak Mills (102,114,188) tarafından kefedilmiştir. Daha sonraları memeli GPx'lerinin diğer tipleri izole edilmiş ve organizmaların büyük bir bölümünde ekspres edildiği bildirilmiştir (71).

GPx, glutasyonu okside ederek  $H_2O_2$ 'yi  $H_2O$ 'ya indirgemektedir. Glutasyonun okside formunun (GSSG) tekrar GSH'a indirgenmesi ise glutasyon redüktaz (GR) tarafından sağlanır. SOD maksimum etkinlik için bakır, çinko ve manganeze ihtiyaç duyarken; GPx selenyum ve katalaz demir gibi geçi metallerinin kofaktörlüğüne ihtiyaç duymaktadır (53).

Normal koellullarda hücredeki hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan esas olarak glutasyon peroksidaz sorumludur. GPx lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özelliğe sahip bir enzimdir. Selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız olmak üzere iki farklı tipi bulunmaktadır. Selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz hem hidrojen peroksiti hem de lipid hidroperoksitlerini metabolize ettiği halde hücrenin sitozol (%70) ve mitokondri (%30) fraksiyonlarında lokalize olan selenyum bağımsız glutasyon peroksidaz ise sadece lipid hidroperoksitlerini metabolize etmektedir (74).

#### **Glutasyon peroksidazların sınıflandırılması;**

GPx 1 (Klasik ya da sitosolik)

GPx 2 (GI-GPx, Gastrointestinal)

GPx 3 (pGPx, Plazma)

GPx 4 (PHGPx ya da fosfolipid hidroperoksit)

GPx 5 (Epididimal)

GPx 6 (Olfaktörük epitel) (71).

Bunlardan GPx-5 ve GPx-6 dışında bütün memeli GPx proteinleri selenosistein içerir (71). Dokularda GPx izoenzimlerinin dağılımları farklıdır. GPx-1'in çoğu memeli türlerinin çeşitli dokularda açık bir şekilde dağılım gösterdiği bilinmektedir (20,52). GPx-2 başlıca lokalize olduğu yer gastrointestinal sistemdir.

GPx-3'ün böbrekte, GPx-4'ün ise testiste lokalize olduğu bildirilmiştir. GPx'in iki izoenzimi daha bulunmaktadır. Bunlar; GPx-3 ile nükleotid/protein sekans bakımından benzer yapıya sahip GPx-5 ve GPx-4 ile benzer bir yapıda olan GPx-6'dır (52).

GPx-4 (PHGPx, Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz), karakterize edilen selenyum içeren dördüncü glutatyon peroksidazdır. PHGPx ilk olarak 1982 yılında Ursini ve arkadaşları tarafından peroksidasyon inhibe edici protein olarak tanımlanmıştır (190). GPx-4 ile diğer GPx'ler arasında birçok fark bulunmaktadır. Başlıca yapısal fark, diğer GPx'lerin tetramerik yapıda olmasına rağmen GPx-4'ün monomer yapıda olmasıdır (189). GPx-4'ün diğer GPx'lerden farkı fosfolipid peroksitleri substrat olarak kullanır ve buna ilaveten hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksitlerle de reaksiyona girer (106,182). GPx-4 ayrıca timin hidroperoksiti de indirger (15). GPx-4'ün özelliklerinden birisi de bu enzimin farklı dokudaki dağılımı göstermesidir (28,77). GPx-4 için mRNA normal rat dokularında (özellikle rat testislerinde) yoğun bir şekilde ifade edilir (77). GPx-4'ün mRNA seviyeleri nöral hücreler, hepatomalar, nefroblastoma ve memeli miyoepitel hücreleri gibi kültür hücrelerinde diğer dokulara oranla daha yüksektir. Testiste ve nispeten kültür hücrelerinde GPx-4'ün oranı GPx-1'e göre belirgin bir şekilde daha yüksektir (77).

Glutatyon peroksidaz memeli dokularında geni bir şekilde dağılımı göstermiştir. Karaciğer en zengin kaynaklarından biridir. Normal rat ve insan karaciğerinde bu selenoenzim organın çözünebilir proteininin yaklaşık % 25'ini oluşturmaktadır (168). Glutatyon peroksidaz bütün hücrelerde bulunur (33). Ratlarda Glutatyon peroksidazların dağılımı çok geni bir şekilde çalışılmıştır. Hepatositlerde selenyum bağımlı glutatyon peroksidazın başlıca sitosolde, mitokondrinin matriksinde (47,48,108,109) ve nükleusda (109) lokalize olduğu bildirilmiştir.

Karaciğerde en yüksek, akciğer, kalp ve beyinde orta, kasta ise düşük aktivitede bulunmaktadır. GPx, ağırlı hidrojen peroksit varlığı durumunda GSH'nin okside glutatyon (GSSG, glutatyon disülfid) oksidasyonunu katalize etmektedir. Bu arada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de suya dönüşürülerek detoksifiye edilmiş olur (127).

#### 2.2.1.4. Katalaz

Hidrojen peroksidi, oksijen ve suya parçalayan bu enzimin (104) etkisi ilk kez 1818'de Thenard tarafından hayvan dokularında saptanmıştır. 1901'de Loew bu etkinin özel bir enzim tarafından olduğunu belirlemiştir (137). Bu enzim tüm hayvan ve bitkilerde ve bazı bakterilerde bulunur. 1923'te Warburg, enzimin siyanid ile inhibe edildiğini, bunun nedeninin ise enzimin demir içermesinden kaynaklandığını, 1930 yılında ise Hellström ve Zeile enzimin prostetik grubunun hematin olduğunu belirlemişlerdir. Katalaz, metabolik olarak üretilen peroksitlerin elimine edilmesinde fonksiyoneldir (206). Katalaz enzimi hayvanlarda tetramerik yapıda bulunmaktadır. Katalaz, sitokrom sistemini içeren bütün aerobik hücrelerde bulunur. Anaerobik hücrelerde ise sadece radyasyona dirençli olan bakterilerde olduğu saptanmıştır (137). Enzim aktivitesi bakımından; hayvan dokularında hücresel düzeyde özellikle eritrosit, karaciğer ve böbrek hücrelerinde, hücre içinde ise karaciğerde peroksizomlar (105) tarafından olmak üzere sitozolde ve endoplazmik retikulumda aktivite yüksektir. En düşük enzim aktivitesi bağı dokuda belirlenmiştir. Düz kas ve kalp kası hücrelerinde peroksizomlarda, iskelet kasında ise endoplazmik retikulumda katalaz aktivitesi yüksektir. Eritrositlerde; hücre membranında ve sitoplazmada enzim aktivitesi saptanmıştır (171). Katalaz enzimi, metil ve etil hidroperoksitler, formik asit, fenoller ile hidrojen peroksit gibi küçük moleküllere etkilidir (160).

Katalaz daha önce de belirtildiği üzere  $H_2O_2$ 'nin katabolizmasında, etanol, metanol ve elemental civa gibi maddelerin peroksidatik oksidasyonunda görev alan önemli bir antioksidan enzimdir. Katalaz bu fonksiyonunu iki yolla gerçekleştirir. Birinci yol; katalaz'ın  $H_2O_2$ 'nin yıkımından sorumlu olduğu katalitik yoldur (1). İkinci yol ise katalaz enziminin  $H_2O_2$ 'nin  $O_2$ 'den faydalanarak elemental civa, etanol veya metanol gibi hidrojen donörleri ile gösterdiği peroksidatik reaksiyondur (1,64,161).

Katalaz ve glutatyon peroksidazın fonksiyonları birbirine çok benzer fakat hücre içi dağılımları çok farklıdır. Katalaz bağıca peroksizomlarda en yüksek aktiviteyi gösterirken, glutatyon peroksidaz en yüksek aktiviteyi sitozol ve



mitokondrial matrikste gösterir. Eritrositlerde her iki enzim de sitozolde bulunur ve hidrojen peroksitin yıkımında önemli derecede öneme sahiptirler (171).

### 2.3. Erkek Genital Sistemi

Bu sistem; erkek hücrelerinin üretildiği testisler, üretilen hücreleri ileten kanallar (tubulus rektus, rete testis, duktuli eferentes, epididimis, duktus deferens), bu kanallara açılan yardımcı bezler (vezikula seminalis, bulboüretral bez ve prostat) ve dış genital organ olan penisten ibarettir (178).

#### 2.3.1. Testis

Testis, bel bölgesindeki intermedier mezodermin urogenital plak'ından meydana gelmektedir. Bu bölgedeki coelom epitelinde sağ-sollu (bilateral) iki kabartı olur. Crista genialis denilen bu kabartılar testisin çatısını oluştururlar; fakat cinsiyet hücrelerinden yoksundurlar. Çünkü cinsiyet hücreleri kökenini bu bölgeden değil, barsak epitelinden (endoderm) almaktadırlar (67).

Testisler, scrotum içerisinde ve funiculus spermaticus'a asılı bir şekilde bulunurlar. Testisler çift olarak yanlardan biraz basık ve oval olan organlar septum scroti ile birbirlerinden ayrılmışlardır (10,126,184). İnsanlarda her bir testisin ağırlığı yaklaşık olarak 10-15 gramdır (126). Sıçanlarda ise testis ağırlıkları vücut ağırlığının % 1'i kadar olmaktadır (39).

Testisler, dıştan içe doğru üç tabaka ile çevrelenir. Bu tabakalar sıraya göre; tunica vaginalis testis, tunica albuginea ve tunica vasculosa'dır (49).

**Tunica albuginea:** En belirgin katman olan tunica albuginea sıkı yapılı fibröz bir tabakadır. Elastikliği az olan bu kapsül kollagen lif bakımından zengindir. Tunica albuginea, testisin arka yüzünde kalınlıklaarak mediastinum testis'i meydana getirmektedir. Testis damar ve sinirleri ile sperma kanalcıkları mediastinum testisten giriş-çıkışı yapar (10,93,126,184).

Tunica albuginea'dan ayrılan ve ba dokusundan olu an lamellere septula testis denir. Bu yapılar, testis parankimasını 250-300 kadar lobüllere ayırmaktadır. Her bir testis lobulusu içerisinde tubulus seminiferus kontortus adı verilen 3-4 kanalcık bulunur. Seminifer tubüller gev ek ba dokusu ile sarılı ekildedirler ve birbirleriyle anastomoz yaparlar. Bu kanalcıkların etrafını saran ba dokuda ise sinirler, kan ve lenf damarları ve leydig hücreleri bulunur. Seminifer tubül duvarında yerle mi olan spermatogenetik hücreler spermatozoa üretmektedir. Leydig hücrelerinden testosteron hormonu salgılanır. Tubulus seminiferus kontortus'ların uç kısımları düzle erek tubulus seminiferus rectus adını almaktadır. Tubulus seminiferus rectus'lar mediastinum testis'e gelirler. Burada rete testis adı verilen ve a yapımı olan kanalcıklara açılmaktadırlar. Rete testis'ten ayrılan 12-15 kadar küçük kanalcıklara ise duktuli efferentes testis adı verilir. Bu kanalcıklar da, epididimis'in kaput epididimis parçasına açılmaktadır (10,41,126,184).

Tubulus seminiferus kontortus duvarındaki hücreler, ekil, durum ve fonksiyon bakımından birbirlerinden farklı iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar spermatogenetik hücreler ve sertoli hücreleridir (101,126).

**I. Sertoli hücreleri:** ekil olarak uzun ve dar sütunlara benzerler. Yüksek boylu piramidal hücreler olan sertoli hücreleri tabanları bazal membrana oturmu , tepeleri ise kanal bo lu una dogru uzanır (101,126). Düzenli bir ekilde germ hücreleri arasında bulunurlar ve sayıca spermatogenetik hücrelerden azdırlar. Hücre sınırları mikroskobik incelemelerde güçlükle seçilmektedir. Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları saydam, çekirdekleri ince uzun, hücrenin uzun eksenine paralel konumlu ve kromatince fakirdir. Bu nedenden dolayı çekirdekçikleri belirgin olarak göze çarpar (101).

### **Sertoli hücrelerinin görevleri:**

1.Geli mekte olan spermatozoonların korunmasını, beslenmesini ve desteklenmesini, geli en spermilerin oto-immun reaksiyondan korunmasını sa lamaktadır (101).

2.Fagositoz; spermiogenezis esnasında fazla spermatid sitoplazması, artık cisimcik eklinde bulunmaktadır. Bu sitoplazmik parçacıklar fagosite edilir ve sertoli hücreleri tarafından yeniden kullanılır (81).

3.Sekresyon; sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tubüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgırlar. Androjen-baglayıcı-protein salgılanması ise sertoli hücreleri tarafından, folikül stimüle edici hormon'un (FSH) kontrolü altında olur. Bu protein testosteronu bağlayarak, hormonun tubul içerisinde birikimini sa lamaktadır. Ayrıca FSH sentezini ve hipofiz ön lobundan salgılanmasını baskılayan inhibin adı verilen bir peptidi de salgırlar (81,101).

4.Anti-müllarian hormon yapımı; Glikoprotein yapıda olan bir hormondur ve embriyonal hayatta müller kanalının regresyonunu sa lar (101,185).

### **II. Spermatogenetik hücreler (Germ hücreleri):**

Embriyonal hayatta testis tasla ına sokulan primordiyal germ hücreleri çoğalarak spermatogenetik hücreleri meydana getirmektedirler Bu hücreler, seminifer tubül duvarında çeşitli olgunlaşma evrelerine göre sıralanırlar ve bazal membrandan kanalcı ın bo lu una do ru radier konumda uzanan kolonlar meydana getirirler (81,101,126).

Bazal membrana en yakın olan spermatogenetik hücreler en primitif olanlarıdır. Bu hücrelere spermatogonium adı verilir. Nispeten küçük ve yuvarlak olan spermatogoniumlar primordiyal germ hücrelerinden meydana gelirler ve soluk renkte boyanan bir çekirde e sahiptirler. Pubertaya kadar, spermatogenetik hücre olarak seminifer tubül duvarında yalnızca spermatogoniumlar bulunur. Pubertada hormonal etki ile bu hücreler mitozla çoğalarak di er tip hücreleri olu tururlar.

Spermatogoniumlar, çekirdeklerinin biçimi, büyüklüğü, kromatin dağılımı ve histokimyasal özelliklerine göre Tip A ve Tip B olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Her çekirdek 46 kromozoma sahiptir (81,101,126).

Tip A (Ana hücre): Oval şekilli çekirdeğe sahiptir. Mitoz ile çoğalan bu hücrelerin yarısı tip A olarak kalırken diğeri yarısı büyüyerek tip B'ye dönüşür.

Tip B: Bu hücreler ana spermatogoniumlardan daha büyüktür ve çekirdekleri yuvarlaktır. Tip B'nin mitozla çoğalmasıyla meydana gelen hücrelerin tümü farklı olarak primer spermatozoid'i (spermatozoid-I) oluştururlar. Primer spermatozoidler bazal membrandan uzaklaşırlar ve hacimleri artar (81,101,116,126).

Primer spermatozoid (spermatozoid-I): Bu hücreler hacim olarak en büyüktürler. Seminifer epitelin orta bölümünde bulunurlar ve oval şekillidirler. Primer spermatozoidler oluşturulmaz birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. Bu evre uzun sürdüğünden dolayı kesitlerde en çok sayıda görülen hücreler primer spermatozoidlerdir. Bu hücreler 46 kromozom taşırlar (81,101,116).

Sekonder spermatozoid (spermatozoid-II): Bu hücreler 23 kromozoma sahiptirler ve primer spermatozoidlerin mayoz bölünmesi sonucu oluştururlar. Sekonder spermatozoidler hacim olarak daha küçüktürler. Kısa süre içerisinde ikinci mayoz bölünmeye girdiklerinden dolayı kesitlerde görülmeleri oldukça güçtür. Sonuç olarak, bu hücrelerin bölünmeleriyle spermatid'ler oluşturulur (81,101,116).

Spermatid: Spermatidler sekonder spermatozoidlerin yarısı kadar büyüklüktedir ve 23 kromozom taşırlar. Birbirleriyle sitoplazmik bağlantı yapan sinsiyal hücre kümeleri oluştururlar. Spermatid'ler bölünme sürecine girmezler ve ekilde ikiye bölünerek spermium'a (spermatozoon) dönüşürler (81,101,116).

Sonuç olarak, spermatogoniumdan spermium (spermatozoon) oluşumuna kadar iki evre geçer. Spermatogoniumdan spermatid oluşumuna kadar olan süreçte spermatogenezis, spermatidin ekilde ikiye bölünerek spermiuma dönüşmesi olayına ise spermiogenezis adı verilir (81,101,116).

Tüm memeli türlerinin testisinde tübülleri çevreleyen myoid hücreler bulunur (40). Myoid hücrelerin, spermin tübüllere ilerletilmesi ve sıvının hareketi için bir güç sağlar ve Leydig hücrelerinin testosteron hormonu uyarısını Sertoli hücrelerine aktararak androjen bağlayıcı protein (ABP) yapımına katkı sağlar bildirilmektedir (155).

#### **İnterstisyel Doku ( İnterstisyel Alan):**

İnterstisyel doku gevrek bağ dokusu karakterindedir ve seminifer tübüller arasında lokalize olur. Bu alanda, kan ve lenf damarları, Leydig hücreleri, sinir lifleri, mast hücreleri, fibroblastlar ve makrofajlar bulunmaktadır (49,101,153,184).

İnterstisyel alanda Leydig hücreleri, tek tek ya da gruplar halinde yerleşir. Asidofilik karakterde ve poligonal şekilli olan Leydig hücrelerinin çekirdekleri yuvarlaktır ve aynı zamanda kromatin'den fakirdir (49,101,153,184). Puberte döneminde beliren Leydig hücreleri, sekonder seks karakterlerini belirleyen testosteron hormonunu üretmektedir. Leydig hücreleri steroid hormon sentezi yapan hücrelere özgü organel ve enzimlerden zengindir. Granülsüz endoplazma retikulumu ve tubulus tip mitokondriyonlar steroid dehidrojenaz enzimi ile testosteronun öncüsü kolesterolü içerir (14,80,152,155).

Puberte ile birlikte Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteronun ana fonksiyonları; seksüel istek (libido) belirmesi, eklenik genital bezlerin fonksiyonunun sürdürülmesi, sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkması, spermatogenezin kontrolü, hipofiz ve hipotalamusta negatif geri tepki ve genel anabolik etkiler olarak sayılabilir (40,83,91).

Testis dokusunun hem ekzokrin hem de endokrin fonksiyonları bulunmaktadır. Ekzokrin ile seminifer tübüllerde meydana gelen spermiyum gelişimidir. Endokrin fonksiyonu ise Leydig hücreleri tarafından testosteron üretimidir (60).

FSH ve LH hipofiz ön lobundan salgılanan ve spermatogenezisi düzenleyen bağlayıcı hormonlardır. LH Leydig hücreleri üzerinde etki ederek testosteron üretimini stimüle eder. Testosteron hormonu normal spermatogenetik hücrelerin gelişiminde

gerekli olan hormondur. FSH ise sertoli hücrelerini etkiler ve bu hücrelerde androjen-baglayıcı-protein üretimini artırır. Bu protein testosteron ile bağlanarak tubül lumenine salgılanmaktadır. Tubül lumeninde biriken testosteron hormonu ise sperm yapımını uyarır. Ayrıca, sertoli hücrelerinden spermilerin ya aması ve epididimise taşınmasında rolü olan testiküler sıvı salgılanmaktadır (81,101).

Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron hormonu hem seminifer tubullere, hem de kan yolu ile taşınarak erkek üreme bezlerine ve diğer birçok organa etki etmektedir. Sertoli hücreleri tarafından salgılanan inhibin hormonu ise hipofiz önlobundan gonadotropin hormonlarının salgılanmasını baskılamaktadır (101).

#### **2.4. Antioksidanlar ve Testis Hissi**

Spermatogenez saniyede 1000 sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak devamlı tekrarlanan bir süreçtir. Bu süreçte doğal olarak meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyel oksijen tüketimini sergilemektedir. Ayrıca; testisteki zayıf vaskülarizasyon, bu dokuda oksijen miktarının az olmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı oksijen daha da büyük önem kazanmaktadır. Bu durum oksijen için olan rekabetin ise şiddetli olmasına yol açmaktadır (179).

Testis, steroidogenez ve sperm üretiminin desteklenmesi için antioksidan açıdan korunmasına karşın, bazı endojen ve ekzojen faktörlerin bu savunmayı bozduğu ve oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir. Meydana gelen bozukluklar; kriptoridizm, testiküler torsiyon, varikosel, hipertiroidizm, diyabet, enfeksiyon ve reproduktif hormon dengesizliği dır (76). Bunların sonucunda; erkek germ hücre hattında DNA hasarı, spermatozoonda DNA hasarı, testiküler antioksidan enzim aktivitesinde bozukluk, oksidatif stres indüklenmesi, lipid peroksidasyonunun indüklenmesi, reaktif oksijen türleri (ROS) temizleyicilerinin kaybı, testiküler SOD ve katalaz aktivitesinin baskılanması görülmektedir (179).

Hem spermatogenez hem de Leydig hücresi steroid hormon üretimi oksidatif stresle hasar görebildiği için bu dokudaki düşük oksijen miktarı testisteki mekanizmaların önemli bir parçası olabilmektedir. Bu mekanizmalar ile testis, serbest radikallerin yol açtığı hasarlardan kendini korur (36,50,136,141).

Testis bu korunmayı sağlamak için; çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyiciler içermektedir (179).

Bu antioksidan savunma sistemleri çok önemlidir, çünkü peroksidatif hasar testiküler torsiyondan diyabete ve ksenobiyotik maruziyeti gibi durumlarda patolojik sonuçları destekleyen bozuk testiküler fonksiyonun tek önemli sebebi gibi kabul edilmektedir (13,96). Testiküler mikroçevredeki düşük oksijen miktarına rağmen testis; fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı sebebiyle, oksidatif strese karşı hassas duruma gelmektedir (179). Birçok hastalığın oluğunda rolü olan oksidatif stres, vücudun antioksidan savunma sistemleri ve ROS'un üretimi arasında dengesizlik olduğu zaman ortaya çıkmaktadır (86,205).

Testisteki antioksidan savunmada büyük öneme sahip olan antioksidan enzimler ve bu enzimler üzerine melatoninin etkisi çeşitli çalışmalarla araştırılmıştır (128,131,157,166). Rat testislerinde etanol ile indüklenen lipid peroksidasyon sonrası, melatonin uygulamasıyla birlikte GPx ve katalaz gibi enzimlerin aktivitelerinin arttığını bildirilmiştir (131). Ayrıca melatoninin, deneysel olarak varikosel oluşturulmuş testis dokusunda GPx, SOD ve katalaz enzim seviyeleri üzerine olumlu etki yaptığını bildirilmiştir (128). Hemosistein uygulanan ratların testis dokusundaki GPx, SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin seviyelerindeki azalmanın, melatonin uygulamasıyla birlikte arttığını bildirilmiştir (166).

### 3. MATERYAL VE METOD

Yapılan çalışma Histoloji ve Embriyoloji, Patoloji A. D. laboratuvarları ile Kafkas Üniversitesi Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Deney Hayvanı Materyali

Çalışmada kullanılan deney hayvanları Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edildi. Ortalama 10-12 haftalık, 30 adet erkek *Sprague Dawley* rat, Erzurum Bayramolu Yem Fabrikası A.Ş.'den temin edilen standart rat yemi ve su ile *ad libitum* beslendi. 1 hafta adaptasyon sürecinden sonra, ratlar 3 gruba ayrılarak nem oranının ortalama  $50 \pm 5$  olduğu özel bir ortamda  $22 \pm 2$  °C oda sıcaklığında, 12 saat karanlık, 12 saat ışık ortamında standart kafeslerde barındırıldı. Gruplara göre deneysel uygulamalar Tablo 2'de gösterilmiştir.

##### 3.1.2. Melatonin

Deneme grubuna uygulanan melatonin (Sigma-M5250) soğuk zincir artlarına dikkat edilerek temin edildi. Çalışma süresince -20 °C'de muhafaza edildi.



## 3.2. METOD

### 3.2.1. Melatonin Uygulanması

Deney Grupları	Denek sayısı	Deneysel uygulamalar
Deneme Grubu	10	Etanolde çözdürülüp serum fizyolojikle sulandırılmı 10 mg/kg dozdaki melatonin 21 gün süreyle intraperitoneal (i.p.) yol ile günlük olarak enjekte edildi.
Sham Grubu	10	21 gün süre ile her gün deneme grubuna uygulanan miktarda etanol ve serum fizyolojik intraperitoneal (i.p.) yol ile uygulandı.
Kontrol Grubu	10	Herhangi bir uygulama yapılmadı.

**Tablo 2.** Deney grupları ve yapılan uygulamalar

### 3.2.2. Ratlarda Canlı A ırlık Ölçümü

Deneyel çalı mada kullanılan bütün ratların canlı a ırlıkları deneye ilk ba langıç zamanı "0" kabul edilip 21 günlük süreçte 8 saatlik açlık sonrası, sabah saatlerinde her gün hassas dijital terazi (Precisa-XB220A) ile tartıldı.

### 3.2.3. Ratlardan Testis Örneklerinin Alınması

Yirmi bir günlük (21 gün) deney süresi sonunda eter anestezisi altında, servikal dislokasyonla ratlar ötenazi yapıldıktan sonra testis dokuları alındı.

### 3.2.4. Histolojik ncelemeler

Histolojik ve immunohistokimyasal de erlendirmeler için ayrılan testis doku örnekleri Bouin ve % 10' luk formol solüsyonlarında tespit edildi. Örnekler dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden geçirilerek parafinde bloklandı. Parafin bloklarından 6 µm kalınlı ında seri kesitler alındı. Testislerin histolojik olarak yapısını incelemek için alınan kesitlere Crossmanın üçlü boyaması (Triple Boyama), hematoksilin-eosin (HxE) ve periyodik asit Shiff (PAS) boyamaları uygulandı (103).

Çalı mada tüm gruplardaki ratların seminifer tubül çapı de erlendirmelerinde her bir rat için seksen adet seminifer tubülün çapı oküermikrometre ile ölçüldü. Elde edilen sonuçların istatistiki de erlendirmeleri yapıldı.

### 3.2.5. mmunohistokimyasal ncelemeler

SOD-1, GPx-4 ve CAT'ın testis dokusundaki immunohistokimyasal da ılımını incelemek için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (ABC) tekni i (73) uygulandı. Krom alüm jelatin ile kaplanmış lamlara, parafin bloklarından 5 mikrometre (µm) kalınlı ında seri kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinizasyon ve rehidrasyon i lemlerinden geçirildikten sonra fosfat buffered salin (PBS)' de çalkalanarak endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için %3 lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 M'lık PBS' te hazırlanmış )'de 10 dk. inkube edildi. PBS ile yıkandıktan sonra (3x5 dk.) antijenleri açığa çıkarmak için 10 dk. mikrodalga fırın kullanıldı. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra (3x5 dk.) spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla sekonder antikorun üretildi i türe uygun (Ultra V Blok) serumda (% 10) inkube edildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kesitler oda sıcaklı ında 1 saat süreyle anti-GPx-4 (LifeSpan Biosciences: LS-B1596) (1:40 dilüsyon), anti-SOD-1(Thermo Scientific Pierce Products: LF-PA0013) (1:400 dilusyon) ve anti-CAT'da (Abcam: ab1877) (1:2000) inkube edildi. nkubasyonun ardından yine PBS'de yıkandıktan (3x5 dk.) sonra kesitlere primer antikorun üretildi i türe kar 1

olan biotinlenmiş sekonder antikor (Invitrogen Histostain Plus Broad Spectrum (AEC) (Cat. No: 85-9043) uygulanarak 30 dk. oda ısısında tutuldu. Fosfat buffer salinde yıkandıktan (3x5 dk.) sonra kesitlere streptavidin horse radish peroksidaz ilave edilip oda ısısında 30 dk. süre ile bekletildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan (3x5 dk) sonra kromojen uygulaması için DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tekniği (159) kullanıldı. Kesitlerin üzerine kromojen solüsyonu eklendikten sonra 10 mikroskopunda kontrol edilerek immunoreaktivitenin durumuna göre reaksiyon PBS ile durduruldu. Distile su ile yıkandıktan sonra zıt boyama için hematoksilin yapıldı. Hazırlanan preparatlar BX-051 Olympus (JAPAN) marka ara tırma mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi. Hücrelerdeki SOD-1, GPx-4 ve CAT immunoreaktivitesi, reaksiyonun boyanma şiddetine göre, birbiriyle karşılaştırılarak değerlendirildi. Derecelendirmede kullanılan semboller Tablo 3'de gösterilmiştir.

Dokudaki Reaksiyon Yo unlu u	Semboller
Çok yo un	3
Orta derecede yo un	2
Az yo un	1
Reaksiyon yok	0

**Tablo 3.** Dokulardaki SOD-1, GPx-4 ve Katalaz immunoreaktivitesinin derecelendirilmesi

Dokulardaki SOD-1, GPx-4 ve CAT immunoreaktivitelerinin spesifik olup olmadığını tespit etmek amacıyla alınan kesitlere primer antikor ilave edilmeksizin (negatif kontrol) bütün deneyimler aynı olmak kaydıyla diğer deneyimler aynen uygulandı.

### 3.2.6. istatistiksel Analiz

istatistik analiz için SPSS programının 16.0 versiyonu kullanıldı (167). Gruplar arası farklılıklar için one-way ANOVA testi, çoklu gruplar arasındaki farkın kaynağını bulmak için çoklu karşılaştırma testlerinden Duncan testi uygulandı. istatistiksel analizde güven aralığı 0,05 olarak belirlendi.

## **4. BULGULAR**

Çalı mada ratların canlı a ırlıkları, testis a ırlıkları, tubulus seminiferus kontortus apları, histolojik ve immunohistokimyasal bulguları de erlendirilmi tir.

### **4.1. Ratların Canlı A ırlık Bulguları**

Deney süreci toplamda 21 gün olup, izlenen periyotta her bir gruptaki ratların tartımı 0-21. günler toplam 22 kez yapıldı. Grupların günlere göre kendi içerisinde ve gruplar arasında ortalama canlı a ırlıkları de erlendirilmi tir.

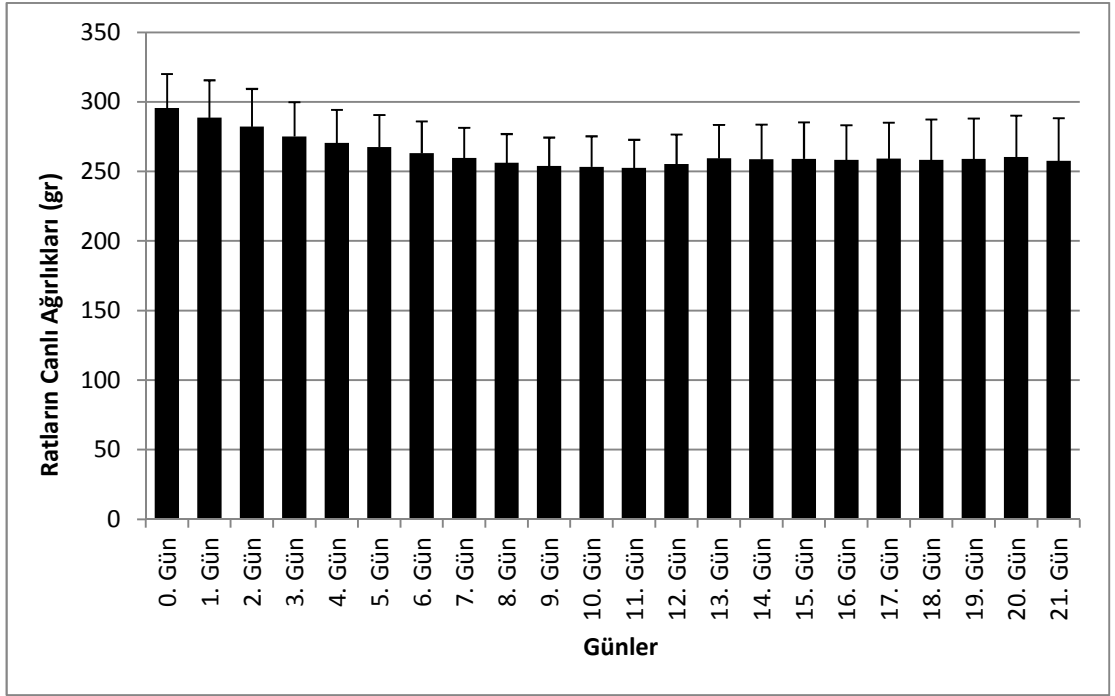
Grupların kendi içerisinde de erlendirilen ortalama canlı a ırlıkları deneme (melatonin) grubu için Tablo 4, sham grubu için Tablo 5, kontrol grubu için ise Tablo 6'da verilmi tir.

Gün	Ortalama Canlı A ırılık (gr)	Standart Sapma De eri	F de eri
0. gün	295,56	24,57	2,17*
1. gün	288,65	27,02	
2. gün	282,25	27,21	
3. gün	275,20	24,71	
4. gün	270,52	23,80	
5. gün	267,63	23,08	
6. gün	263,12	23,01	
7. gün	259,64	21,85	
8. gün	256,26	20,77	
9. gün	253,95	20,54	
10. gün	253,34	22,03	
11. gün	252,48	20,40	
12. gün	255,30	21,43	
13. gün	259,51	24,11	
14. gün	258,71	25,06	
15. gün	259,10	26,34	
16. gün	258,30	25,00	
17. gün	259,20	25,91	
18. gün	258,21	29,21	
19. gün	259,03	29,19	
20. gün	260,45	29,82	
21. gün	257,58	30,87	

**Tablo 4.** Deneme grubu içinde günlere göre ortalama canlı a ırılıkların kar ıla tırılması.

\*P < 0,05. **SD:** Standart Deviation (Standart sapma), **F:** F de eri.

Günlere göre deneme grubunun kendi içinde ortalama canlı a ırılık bakımından günler arası istatistiksel düzeyde anlamlı (P<0,05) bir fark bulundu. Tablo 4’de verildi i üzere melatonin uygulanan grupta ortalama canlı a ırılıkta azalma oldu u görüldü.

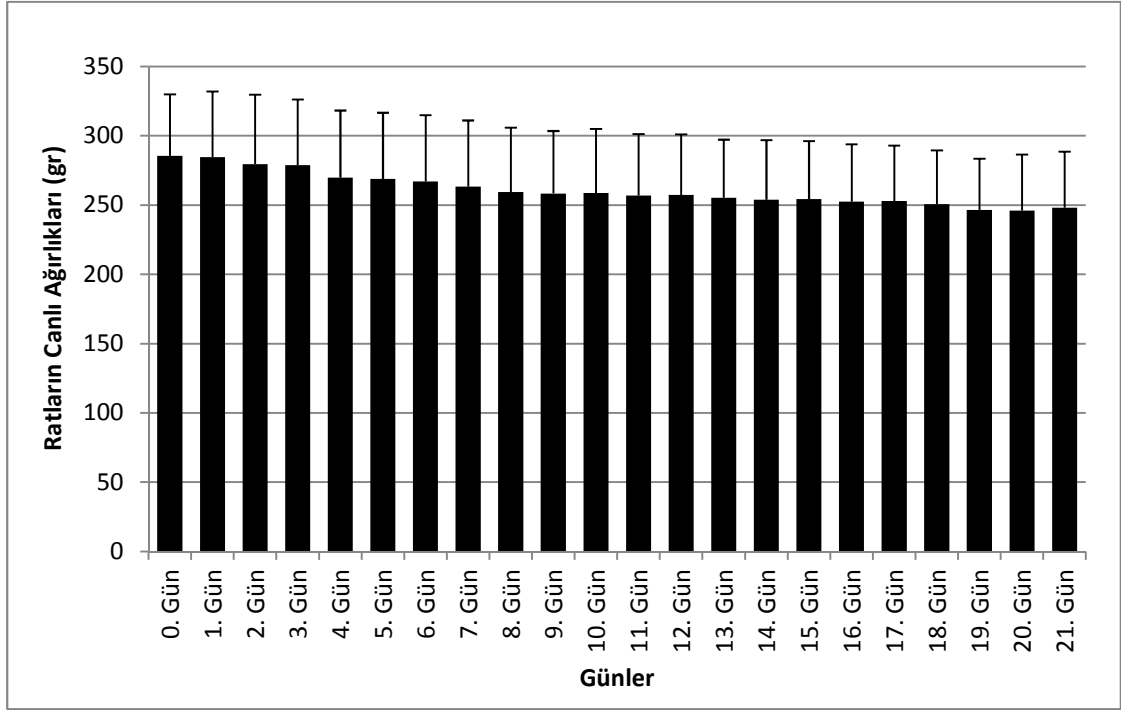


**Grafik 1.** Deneme grubunda günlere göre canlı a ırlıklarının kar ıla tırılması. \*P < 0,05.

Gün	Ortalama Canlı A ırlık (gr)	Standart Sapma De eri	F de eri
0. gün	285,55	44,26	0,731
1. gün	284,50	47,36	
2. gün	279,36	50,14	
3. gün	278,69	47,45	
4. gün	269,84	48,33	
5. gün	268,74	47,81	
6. gün	267,06	47,66	
7. gün	263,30	47,71	
8. gün	259,44	46,35	
9. gün	258,33	45,01	
10. gün	258,58	46,21	
11. gün	256,91	44,18	
12. gün	257,23	43,77	
13. gün	255,29	41,83	
14. gün	253,87	42,89	
15. gün	254,31	41,75	
16. gün	252,52	41,24	
17. gün	252,88	39,90	
18. gün	250,56	38,91	
19. gün	246,48	36,96	
20. gün	246,08	40,38	
21. gün	248,03	40,40	

**Tablo 5.** Sham grubu içinde günlere göre ortalama canlı a ırlıkların kar ıla tırılması.  
**SD:** Standart Deviation (Standart sapma), **F:** F de eri.

Sham grubu içinde ortalama canlı a ırlıkta azalma görülürken, ortalama canlı a ırlık açısından günler arasında istatistiksel düzeyde anlamlı ( $P < 0,05$ ) bir fark gözlenmedi.



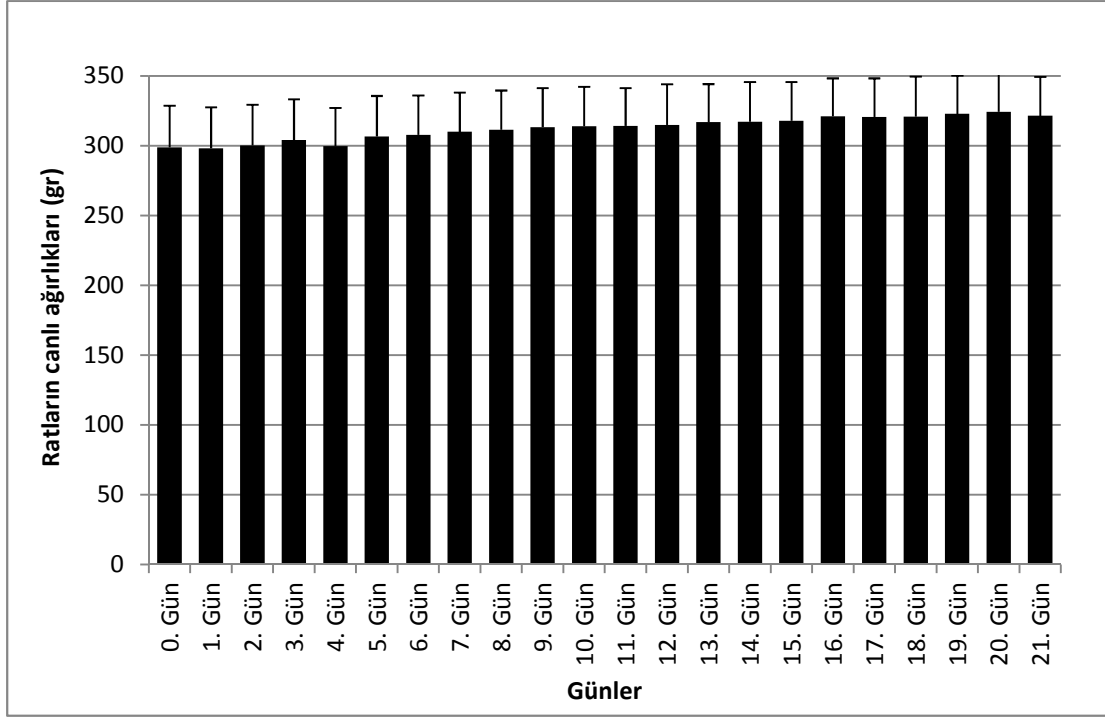
**Grafik 2.** Sham grubunda günlere göre canlı ağırlıklarının karşılaştırılması.



Gün	Ortalama Canlı A ırılık (gr)	Standart Sapma De eri	F de eri
0. gün	298,79	29,85	0,871
1. gün	298,11	29,38	
2. gün	300,23	29,14	
3. gün	304,07	29,16	
4. gün	299,66	27,38	
5. gün	306,68	28,98	
6. gün	307,71	28,34	
7. gün	309,92	28,05	
8. gün	311,38	28,18	
9. gün	313,30	27,97	
10. gün	313,94	28,17	
11. gün	314,13	27,15	
12. gün	314,86	29,14	
13. gün	316,82	27,33	
14. gün	317,21	28,45	
15. gün	317,84	27,85	
16. gün	320,98	27,29	
17. gün	320,54	27,70	
18. gün	320,88	28,65	
19. gün	322,75	27,40	
20. gün	324,26	27,03	
21. gün	321,41	27,86	

**Tablo 6.** Kontrol grubu içinde günlere göre ortalama canlı a ırıklarının karşılaştırılması. **SD:** Standart Deviation (Standart sapma), **F:** F de eri.

Kontrol grubu içinde ortalama canlı a ırılıkta artma görülürken, ortalama canlı a ırılık bakımından günler arasında istatistiksel düzeyde anlamlı ( $P<0,05$ ) bir fark gözlenmedi.



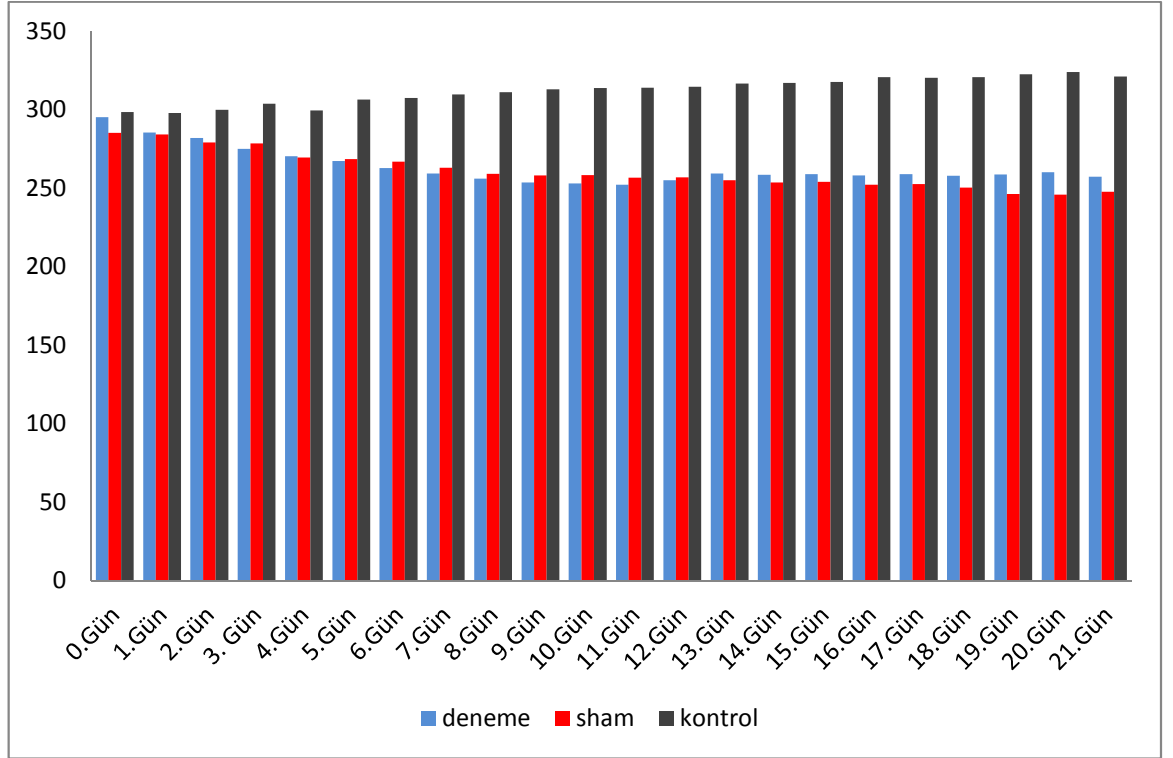
**Grafik 3.** Kontrol grubunda günlere göre canlı ağırlıklarının karşılaştırılması.

Gün	Grup	Ortalama Canlı A ırılık(gr)	SD De eri	F De eri	Fark
0. Gün	Deneme	295,56	24,57	0,41	Fark Yok
	Sham	285,55	44,26		
	Kontrol	298,79	29,85		
1. Gün	Deneme	288,65	27,02	0,38	Fark Yok
	Sham	284,50	47,36		
	Kontrol	298,11	29,38		
2. Gün	Deneme	282,25	27,21	0,93	Fark Yok
	Sham	279,36	50,14		
	Kontrol	300,23	29,14		
3. Gün	Deneme	275,20	24,71	2,00	Fark Yok
	Sham	278,69	47,45		
	Kontrol	304,07	29,16		
4. Gün	Deneme	270,52	23,80	2,38	Fark Yok
	Sham	269,84	48,33		
	Kontrol	299,66	27,38		
5. Gün	Deneme	267,63	23,08	4,05*	Kontrol
	Sham	268,74	47,81		Kontrol
	Kontrol	306,68	28,98		Deneme, Sham
6. Gün	Deneme	263,12	23,01	5,07*	Kontrol
	Sham	267,06	47,66		Kontrol
	Kontrol	307,71	28,34		Deneme, Sham
7. Gün	Deneme	259,64	21,85	6,65*	Kontrol
	Sham	263,30	47,71		Kontrol
	Kontrol	309,92	28,05		Deneme, Sham
8. Gün	Deneme	256,26	20,77	8,51*	Kontrol
	Sham	259,44	46,35		Kontrol
	Kontrol	311,38	28,18		Deneme, Sham
9. Gün	Deneme	253,95	20,54068	10,16*	Kontrol
	Sham	258,33	45,01		Kontrol
	Kontrol	313,30	27,97		Deneme, Sham
10. Gün	Deneme	253,34	22,03	9,90*	Kontrol
	Sham	258,58	46,21		Kontrol
	Kontrol	313,94	28,17		Deneme, Sham
11. Gün	Deneme	252,48	20,40	11,42*	Kontrol
	Sham	256,91	44,18		Kontrol
	Kontrol	314,13	27,15		Deneme, Sham

12. Gün	Deneme	255,30	21,43	10,65*	Kontrol
	Sham	257,23	43,77		Kontrol
	Kontrol	314,86	29,14		Deneme, Sham
13. Gün	Deneme	259,51	24,11	11,51*	Kontrol
	Sham	255,29	41,83		Kontrol
	Kontrol	316,82	27,33		Deneme, Sham
14. Gün	Deneme	258,71	25,06	11,37*	Kontrol
	Sham	253,87	42,89		Kontrol
	Kontrol	317,21	28,45		Deneme, Sham
15. Gün	Deneme	259,10	26,34	11,68*	Kontrol
	Sham	254,31	41,75		Kontrol
	Kontrol	317,84	27,85		Deneme, Sham
16. Gün	Deneme	258,30	25,00	14,07*	Kontrol
	Sham	252,52	41,24		Kontrol
	Kontrol	320,98	27,29		Deneme, Sham
17. Gün	Deneme	259,20	25,91	13,82*	Kontrol
	Sham	252,88	39,90		Kontrol
	Kontrol	320,54	27,70		Deneme, Sham
18. Gün	Deneme	258,21	29,21	14,00*	Kontrol
	Sham	250,56	38,91		Kontrol
	Kontrol	320,88	28,65		Deneme, Sham
19. Gün	Deneme	259,03	29,19	16,89*	Kontrol
	Sham	246,48	36,96		Kontrol
	Kontrol	322,75	27,40		Deneme, Sham
20. Gün	Deneme	260,45	29,82	15,97*	Kontrol
	Sham	246,08	40,38		Kontrol
	Kontrol	324,26	27,03		Deneme, Sham
21. Gün	Deneme	257,58	30,87	14,20*	Kontrol
	Sham	248,03	40,40		Kontrol
	Kontrol	321,41	27,86		Deneme, Sham

**Tablo 7.** Gruplararası günlere göre ortalama canlı a ırlıkların kar ıla tırılması.\*P <0,05  
SD: Standart Deviation (Standart sapma), F: F de eri.

Gruplararası ortalama canlı a ırlık bakımından 0. ve 4. günler arası istatistiksel düzeyde anlamlı fark gözlemlenmezken, 5-21 günler arası kontrol grubu ile deneme ve sham grubu arasında istatistiksel düzeyde anlamlı ( $P<0,05$ ) fark oldu u (Tablo 7) fakat deneme ve sham grubunda istatistiksel düzeyde anlamlı fark olmadı ı belirlendi. Günlere göre gruplararası ortalama canlı a ırlıklarının kar ıla tırılması Grafik 4’de gösterilmi tir.

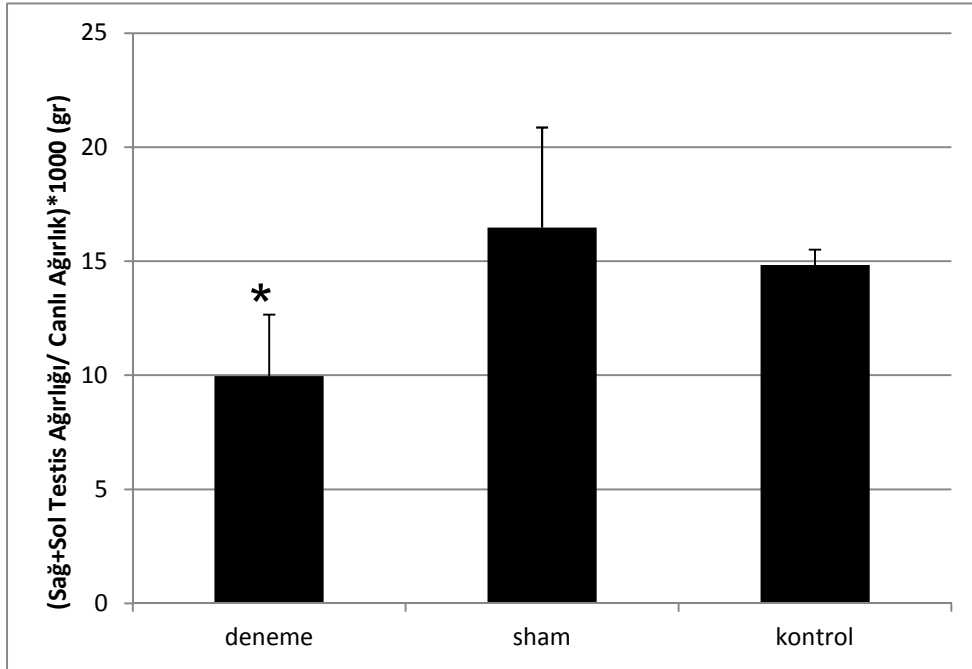


**Grafik 4.** Günlere göre canlı a ırlıkların (gr) ortalamalarının gruplar arası kar ıla tırılması.

#### 4.2. Ratların Testis A ırlık Bulguları

Grup	n	(Sa +Sol Testis A ırlık / Canlı A ırlık)*1000 (gr)	SD	F	Fark
Deneme	10	9,96	2,70	12,70*	Sham, kontrol
Sham	10	16,47	4,39		Deneme
Kontrol	10	14,83	0,68		Deneme

**Tablo 8.** Gruplar arasında testis a ırlıklarının karşılaştırılması. \*P < 0,05. SD: Standart Deviation (Standart Sapma), F: F değeri.



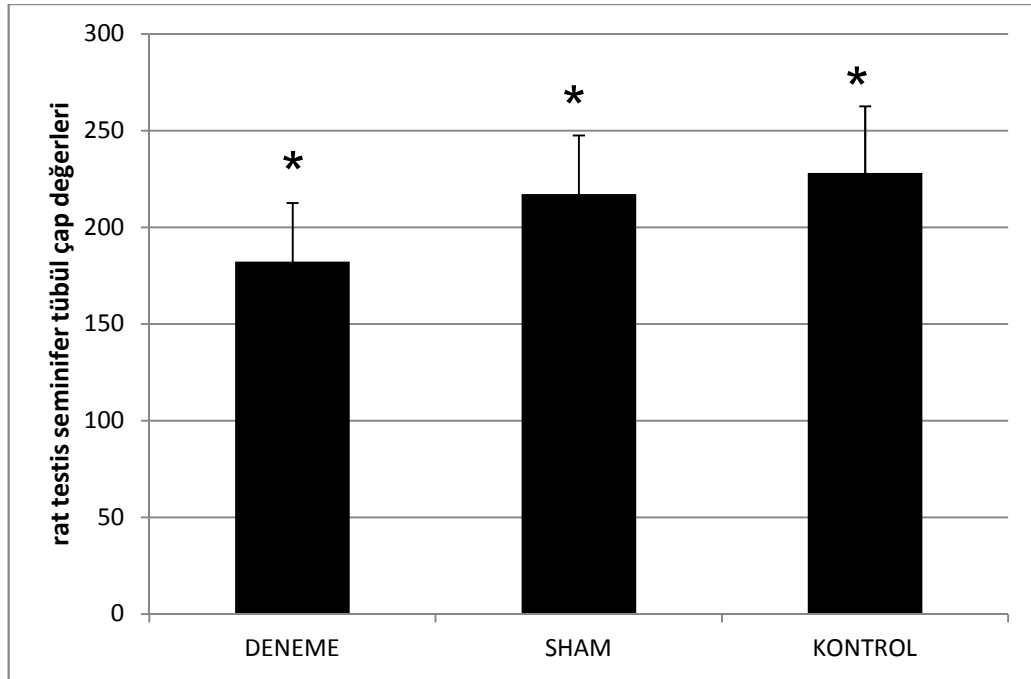
**Grafik 5.** Gruplar arasında testis a ırlıklarının karşılaştırılması. \*P < 0,05.

Deneme, sham ve kontrol grupları arasında, testis a ırlığı yönünden istatistiksel düzeyde (P<0,05) anlamlı bir fark gözlemlendi (Tablo 8). Sham ve kontrol grubunda testis a ırlıkları benzerlik sergilerken deneme grubu testis a ırlığının diğer iki gruba göre düşük olduğu belirlendi.

### 4.3. Ratlarnn Tubulus Seminiferus Kontortus ap Bulguları

Grup	n	Tubulus seminiferus kontortus ap de eri ( $\mu\text{m}$ )	SD	F	Fark
Deneme	10	182,17	30,44	454.49*	Sham, Kontrol
Sham	10	217,18	30,33		Deneme, Kontrol
Kontrol	10	228,08	34,51		Deneme, Sham

**Tablo 9.** Gruplar arasında tubulus seminiferus kontortus ap de erleri kar ıla tırılması.  
\* $P < 0,05$ . **SD:** Standart Deviation (Standart Sapma), **F:** F de eri.



**Grafik 6.** Gruplar arasında tubulus seminiferus kontortus ap de erleri kar ıla tırılması.  
\* $P < 0,05$ .

Testis tubulus seminiferus kontortus apı de eri yönünden deneme, sham ve kontrol grupları arasında istatistiksel düzeyde ( $P < 0,05$ ) anlamlı bir fark gözleendi. Melatonin enjekte edilen grupta tubulus seminiferus kontortusların ortalama apının di er iki gruba göre daha dü ük oldu u belirlendi (Tablo 9).

#### 4.4. Histolojik De erlendirme Bulguları

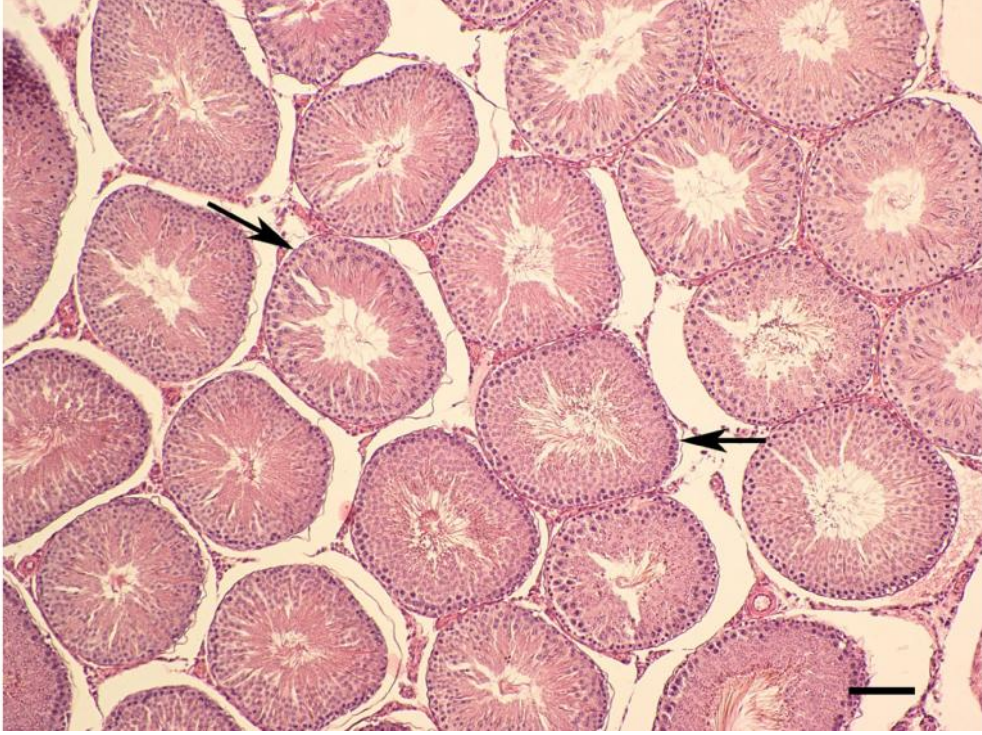
Testis dokusunun histolojik incelemesinde yapılan mikroskopik de erlendirmeler sonucu kontrol ve sham grubundaki rat testislerinin normal yapıya sahip oldu u tespit edildi (Resim 1,2).

Kontrol ve Sham grubunun testis dokularının mikroskopik incelemesinde yuvarlak ve düzgün yapıda tubulus semineforus kontortusların oldu u görülürken bu tubuluslardaki hücre dizisinde, intersitisyel alandaki leydig hücrelerinde ve kan damarlarında herhangi bir histolojik farklılık tespit edilmedi (Resim 3,4).

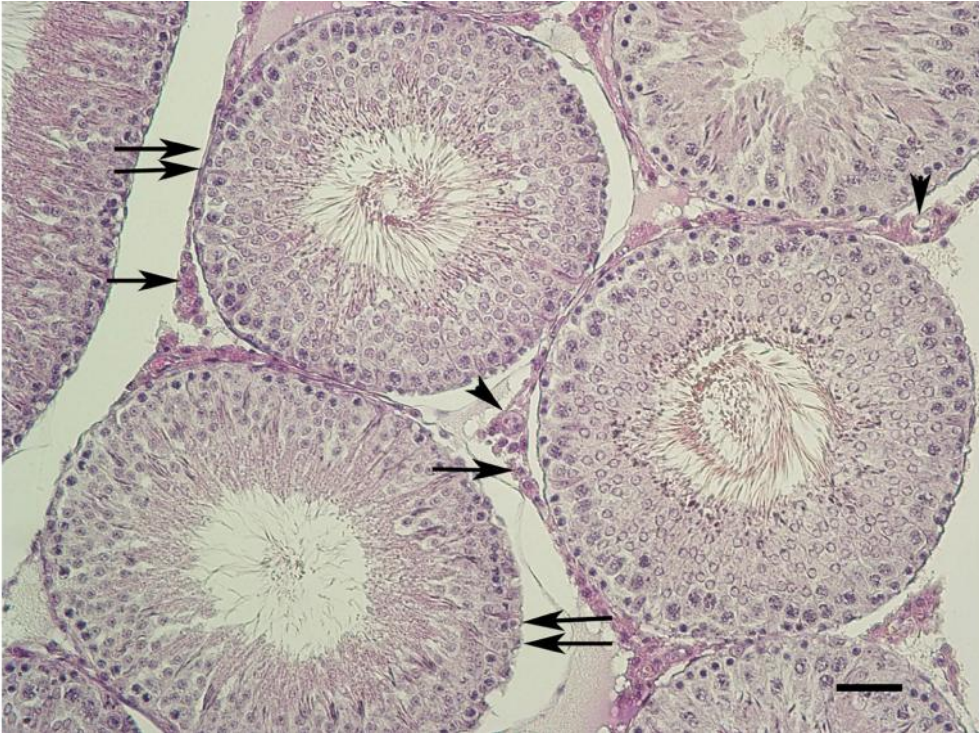


**Resim 1.** Kontrol grubu testis dokusunun histolojik görünümü. Triple boyama. Bar: 100  $\mu$ m.  
Oklar: Tubulus semineforus kontortuslar.





**Resim 2.** Sham grubu testis dokusunun histolojik görünümü. H.E. boyama. Bar: 100  $\mu$ m.  
Oklar: Tubulus seminiferus kontortuslar.

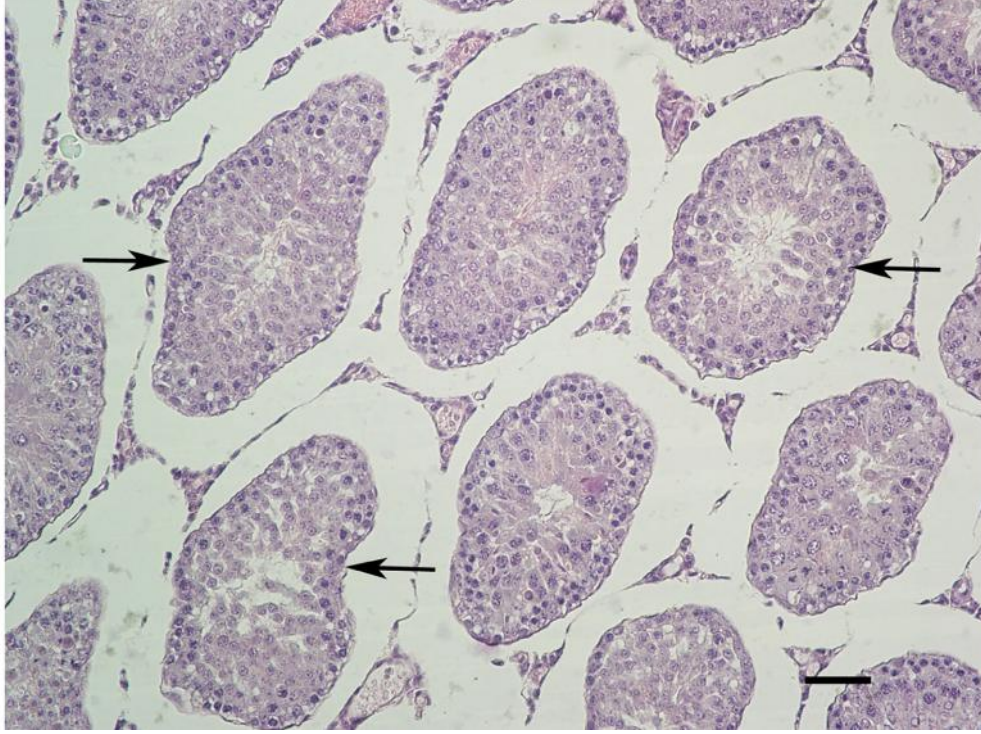


**Resim 3.** Kontrol grubu testis dokusunun histolojik görünümü. Triple boyama. Bar: 50  $\mu$ m.  
Çift ok: Tubulus seminiferus kontortuslar, Ok: Leydig hücresi, Ok ba ı: Kan damarı.

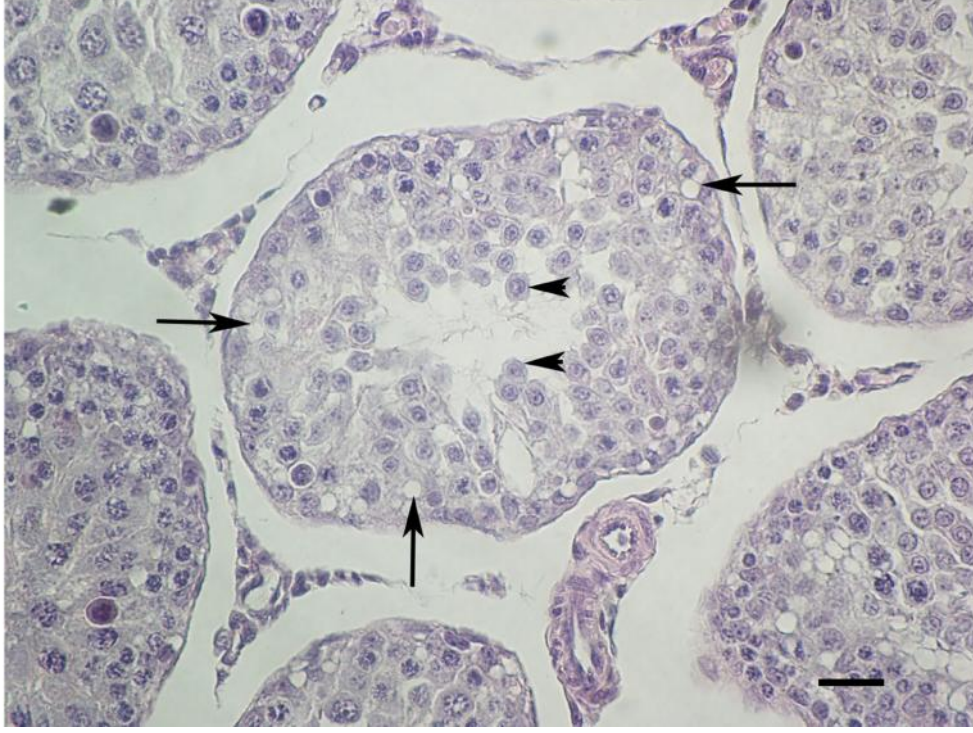


**Resim 4.** Sham grubu testis dokusunda tubulus seminiferus kontortusun histolojik görünümü. H.E boyama. Bar: 25  $\mu$ m. Oklar: Leydig hücreleri, Ok ba ı: Kan damarı.

Deneme grubunda yapılan boyamalar sonrasında mikroskopik incelemelerde, bazı tubulus seminiferus kontortuslarda atrofi (Resim 5), germinal epitel içerisinde vakuolleme ve spermatogenik seriye ait hücrelerde lümen içine dökülme olduğu tespit edildi (Resim 6).

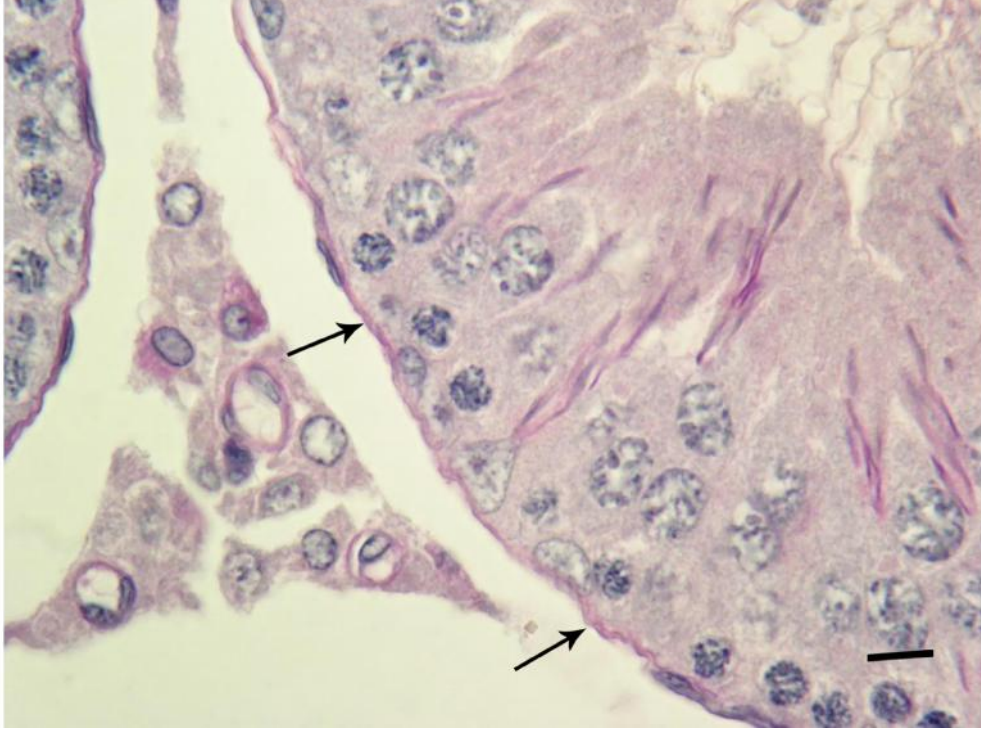


**Resim 5.** Deneme grubu testis dokusunun histolojik görünümü. H.E. boyama. Bar: 50  $\mu$ m.  
Oklar: Tubulus seminiferus kontortuslarda atrofik yapı.



**Resim 6.** Deneme grubu testis dokusunda tubulus seminiferus kontortusun histolojik görünümü. H.E. boyama. Bar: 25  $\mu$ m. Oklar: Tubulus seminiferus kontortus içerisinde vakuolle me, Ok ba 1: Spermatojenik seriye ait hücrelerde lümen içine dökülme.

Kontrol, sham ve deneme gruplarında yapılan PAS boyamaları sonucu, tubulus seminiferus kontortusun bazal membranının boyandı ı gözlemlendi (Resim 7).



**Resim 7.** Kontrol grubu testis dokusunda tubulus seminiferus kontortusun histolojik görünümü. PAS. boyama. Bar: 10  $\mu$ m. Ok: Bazal Membran

## **4.5. İmmunohistokimyasal De erlendirme Bulguları**

### **4.5.1. SOD-1 İmmunoreaktivitesi Bulguları**

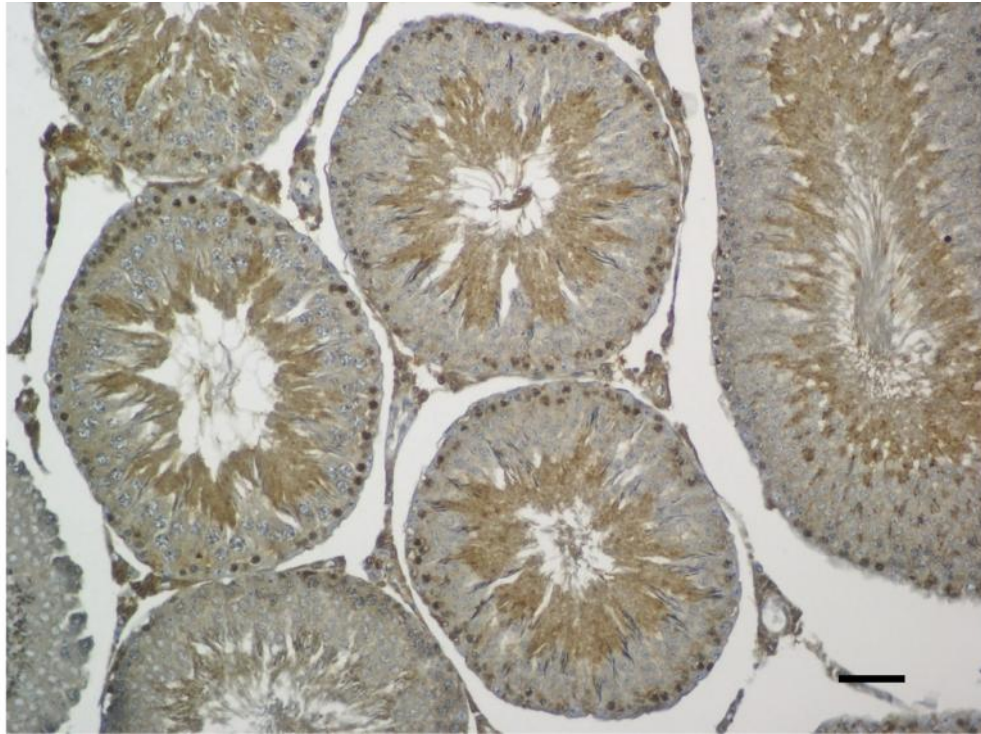
Tüm gruplardan 21. günde alınan testis doku kesitleri süperoksit dismutaz-1 immunoreaktivitesi yönünden incelendi. I ık mikroskopik incelemede sham, kontrol ve deneme gruplarında spesifik SOD-1 immunoreaktivitesi görüldü (Resim 8,9,10).

Kontrol, sham ve deneme gruplarına ait testis doku örneklerinin immunohistokimyasal incelenmesinde, SOD-1 immunoreaktivitesinin spermatogonyumlarda nükleer ve sitoplazmik (Resim 11,13,15) primer spermatozoidlerde, sekonder spermatozoidlerde ve spermatidlerde sitoplazmik tarzda oldu u gözlemlendi (Resim 11,12,13). Bununla beraber SOD-1 immunoreaktivitesinin sertoli hücrelerinde yalnızca sitoplazmik oldu u gözlemlenirken (Resim 13,14), leydig hücrelerinde ise hem sitoplazmik hem de nükleer oldu u tespit edildi. (Resim 11,14) Ayrıca intersitisyel alandaki damar endotel hücrelerinde SOD-1 immunoreaktivitesinin olmadığı gözlemlendi (Resim 14).

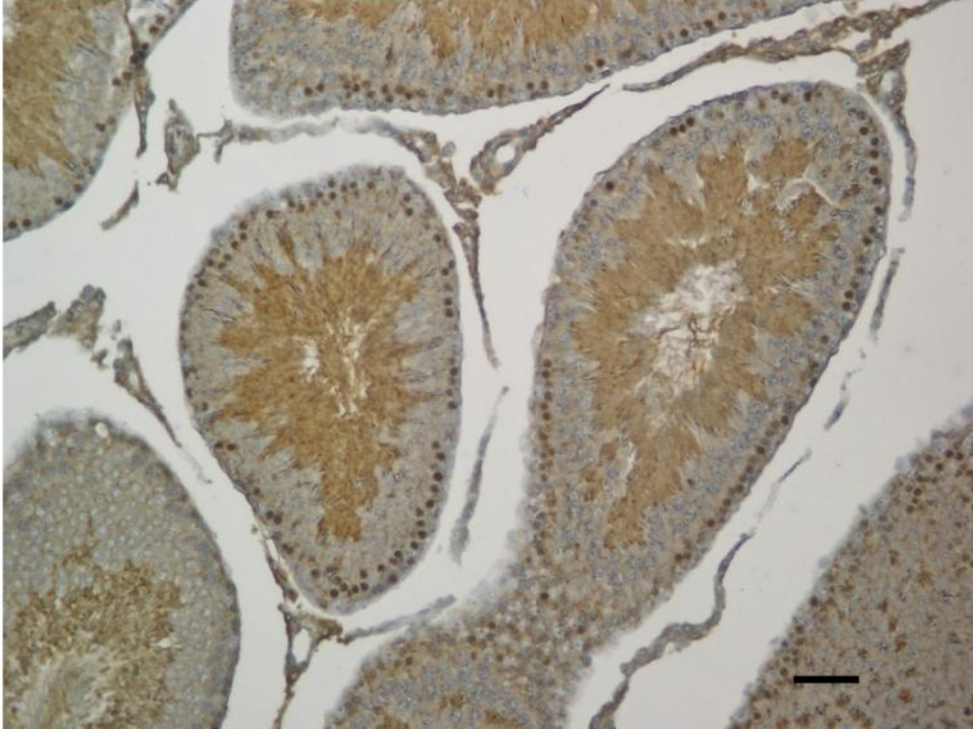
Reaksiyon yo unlulu u bakımından en yo un reaksiyon kontrol grubunda, en zayıf yo unluluk ise deneme grubunda gözlemlendi (Resim 8,9,10).

Testisteki Yapılar	Reaksiyon Yo unlu u		
	Kontrol Grubu	Sham Grubu	Deneme Grubu
Endotel Hücreleri	0	0	0
Spermatogonyum	Çekirdek +3 Sitoplazma +1	Çekirdek +2 Sitoplazma +1	Çekirdek +2 Sitoplazma +1
Primer spermatosit	Çekirdek 0 Sitoplazma +1	Çekirdek 0 Sitoplazma +1	Çekirdek 0 Sitoplazma +1
Sekonder spermatosit	Çekirdek 0 Sitoplazma +1	Çekirdek 0 Sitoplazma +1	Çekirdek 0 Sitoplazma +1
Spermatid	+3	+2	+1
Sertoli hücreleri	Çekirdek 0 Sitoplazma +1	Çekirdek 0 Sitoplazma +1	Çekirdek 0 Sitoplazma +1
Leydig hücreleri	+3	+2	+1

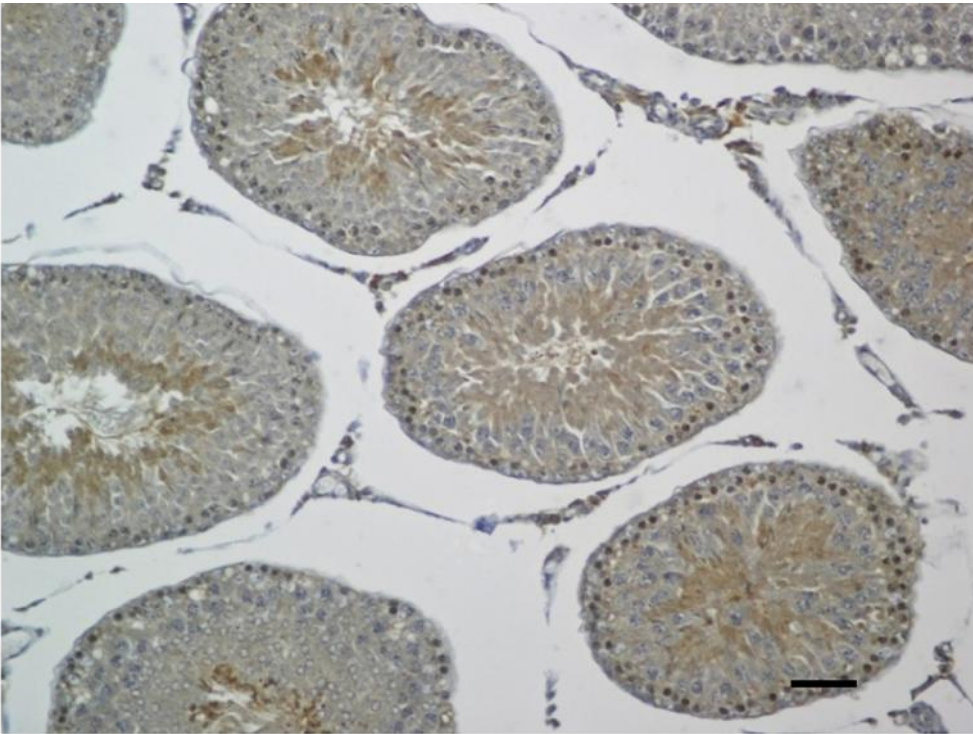
**Tablo 10.** Testisteki yapılar ve SOD-1 reaksiyon yo unlu u.



**Resim 8.** Kontrol grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



**Resim 9.** Sham grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi. Bar: 50  $\mu$ m.

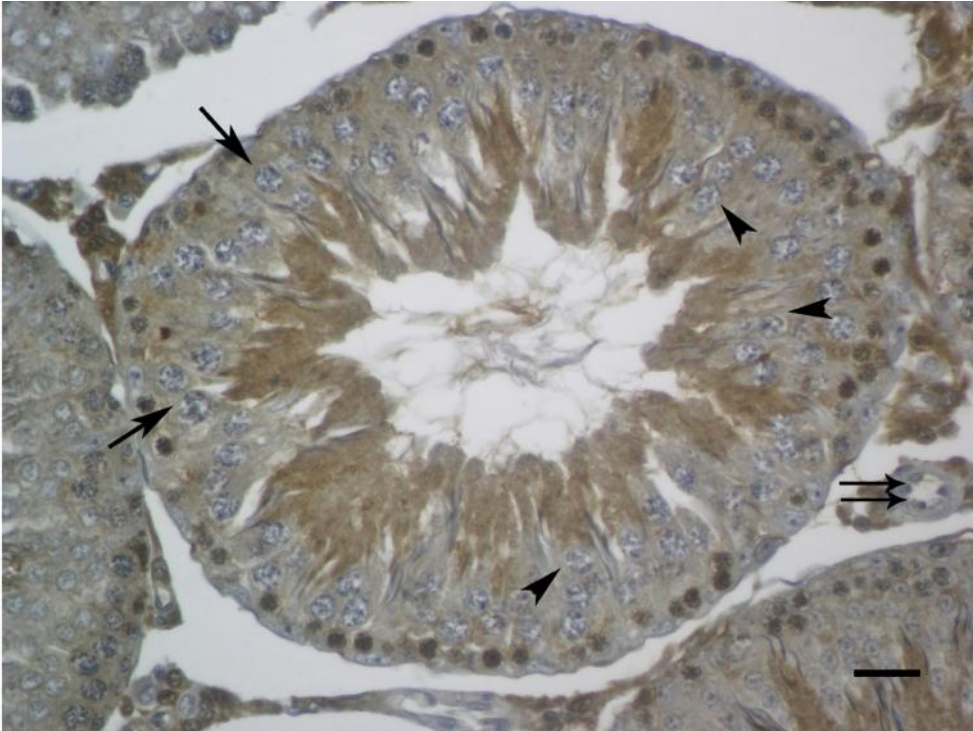


**Resim 10.** Deneme grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi. Bar: 50  $\mu$ m.

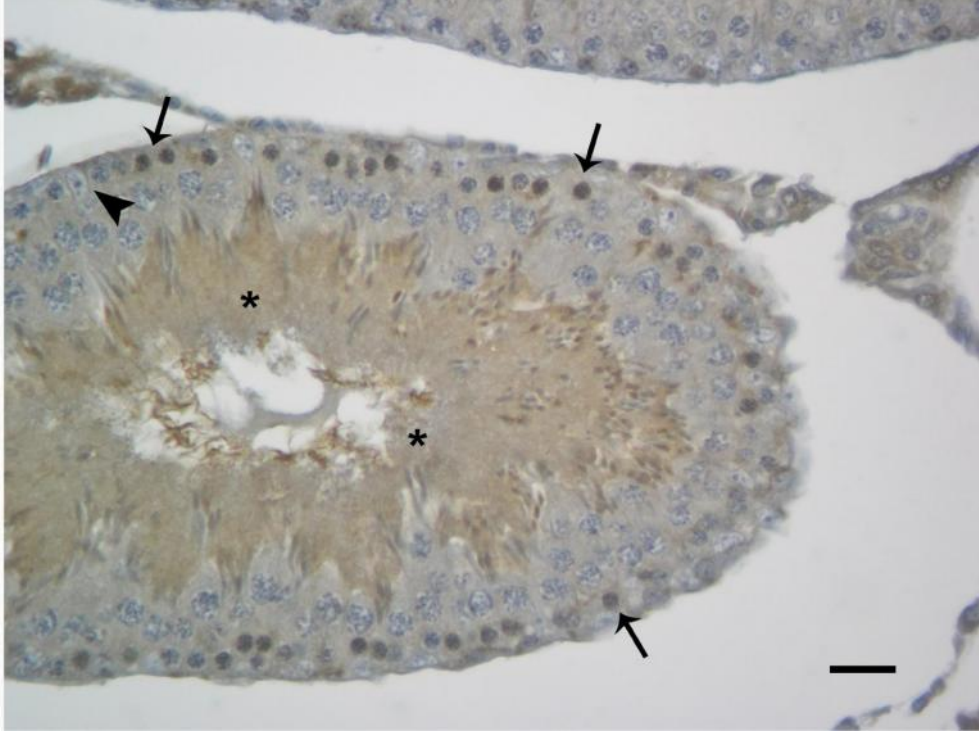




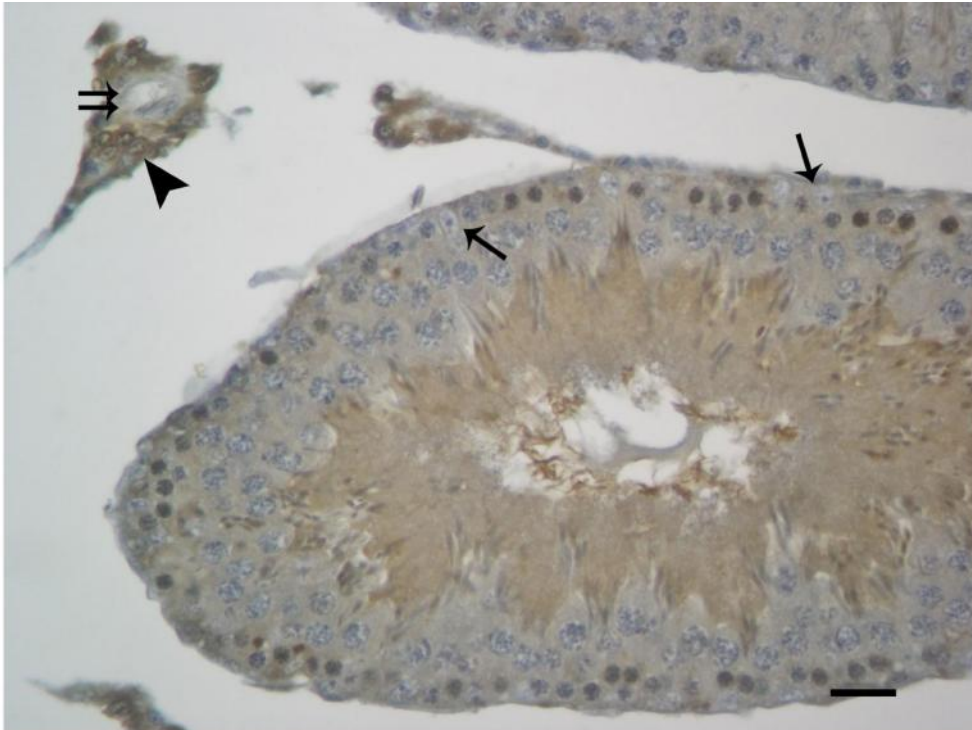
**Resim 11.** Kontrol grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi. Bar: 25  $\mu$ m. Oklar: Spermatogonyumlarda sitoplazmik ve nükleer SOD-1 immunoreaktivitesi, Ok ba ı: Leydig hücrelerinde SOD-1 immunoreaktivitesi, \*: Spermatidlerde SOD-1 immunoreaktivitesi.



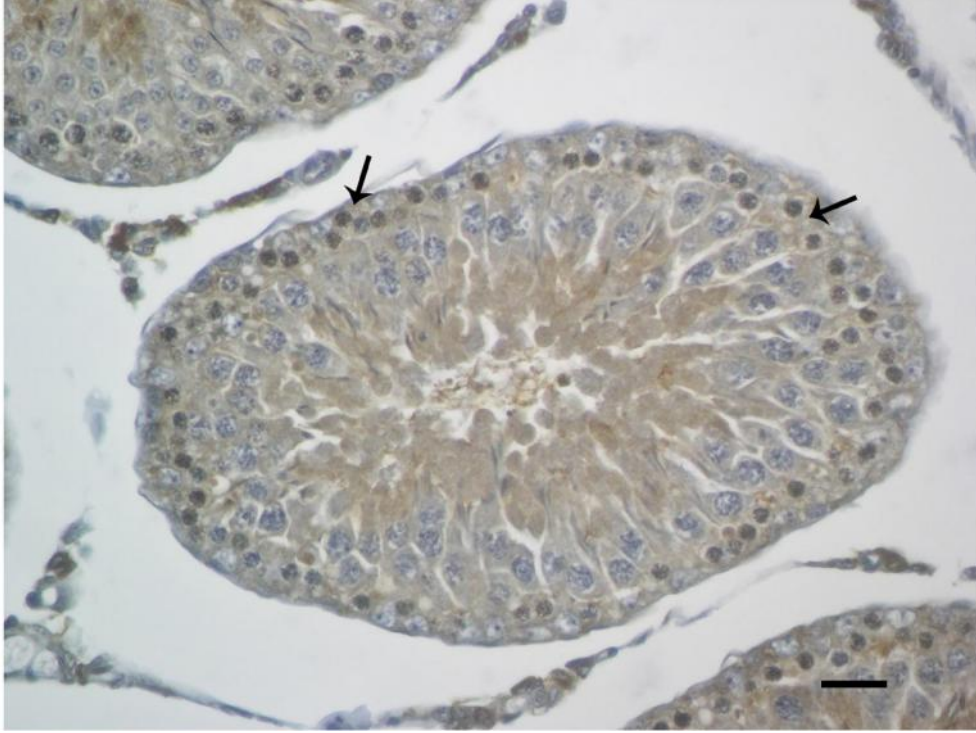
**Resim 12.** Kontrol grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi. Bar: 25  $\mu$ m. Oklar: Primer spermatositlerde sitoplazmik SOD-1 immunoreaktivitesi, Ok ba ı: Sekonder spermatositlerde sitoplazmik SOD-1 immunoreaktivitesi, Çift ok: Damar endoteli.



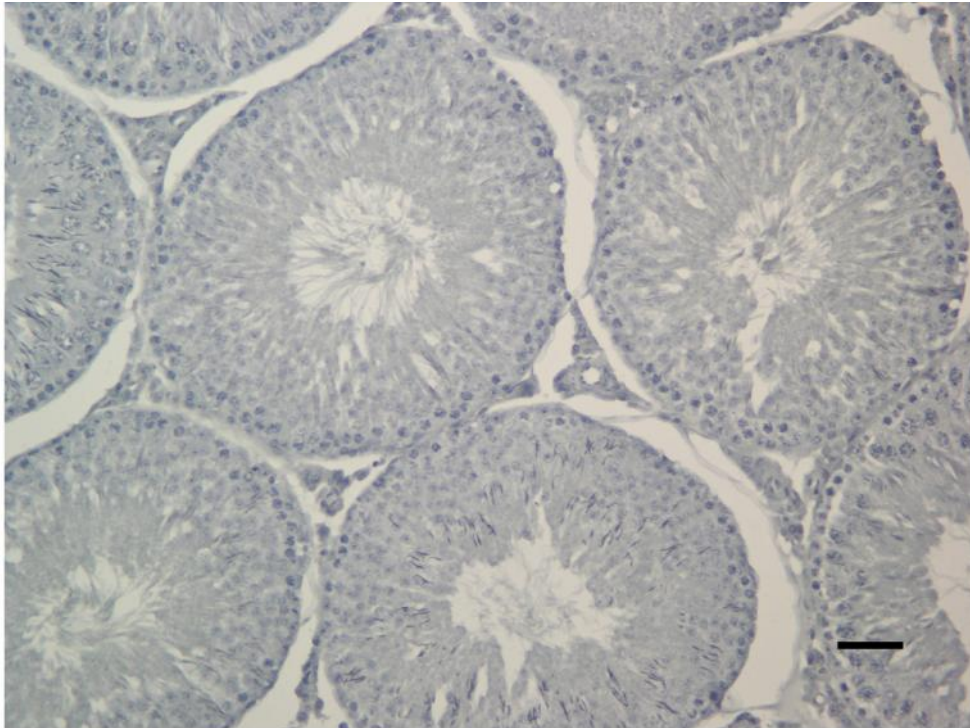
**Resim 13.** Sham grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi. Bar: 25  $\mu$ m. Oklar: Spermatogonyumlarda sitoplazmik ve nükleer SOD-1 immunoreaktivitesi, Ok ba ı: Sertoli hücesinde sitoplazmik SOD-1 immunoreaktivitesi, \*: Spermatidlerde SOD-1 immunoreaktivitesi.



**Resim 14.** Sham grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi. Bar: 25  $\mu$ m. Ok: Sertoli hücesinde sitoplazmik SOD-1 immunoreaktivitesi, Ok ba ı: Leydig hücelerinde SOD-1 immunoreaktivitesi, Çift ok: Kan damarı.



**Resim 15.** Deneme grubu testis dokusunda SOD-1 immunoreaktivitesi. Bar: 25  $\mu$ m.  
Ok: Spermatogonyumlarda sitoplazmik ve nükleer SOD-1 immunoreaktivitesi.



**Resim 16.** Kontrol grubu testis dokusunda negatif SOD-1 immunoreaktivitesi.  
(Negatif kontrol). Bar: 50  $\mu$ m.

#### 4.5.2. GPx-4 immunoreaktivitesi Bulguları

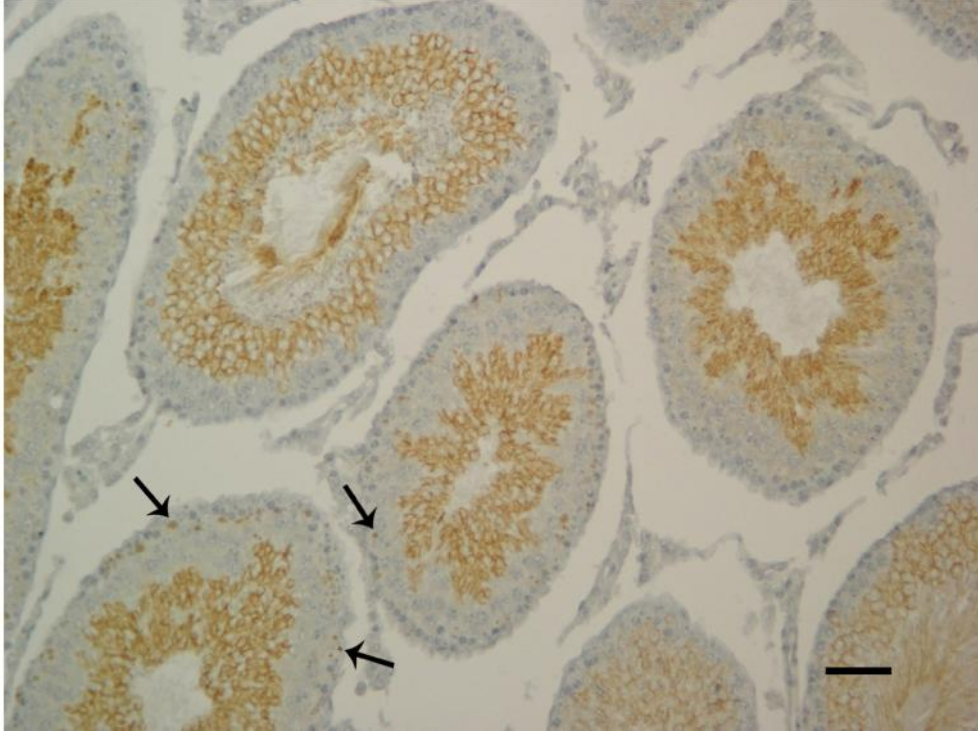
Tüm gruplardan 21. günde alınan testis doku kesitleri glutatyon peroksidaz-4 immunoreaktivitesi yönünden incelendi. İlk mikroskopik incelemede sham, kontrol ve deneme gruplarında spesifik Gpx-4 immunoreaktivitesi görüldü (Resim 17,18,19).

Kontrol, sham ve deneme grubuna ait testis doku preparatlarının immunohistokimyasal incelenmesinde, intersitisyel alandaki damar endotel hücrelerinde, Leydig hücrelerinde, primer spermatositlerde, sertoli hücrelerinde immunoreaktivitenin olmadığı (Resim 20,21) ancak spermatogonyumlarda odaklar halinde olduğu görüldü (Resim 17,22). GPx-4 immunoreaktivitesinin sekonder spermatositlerde ve spermatidlerde sitoplazmik olduğu gözlemlendi (Resim 21,23).

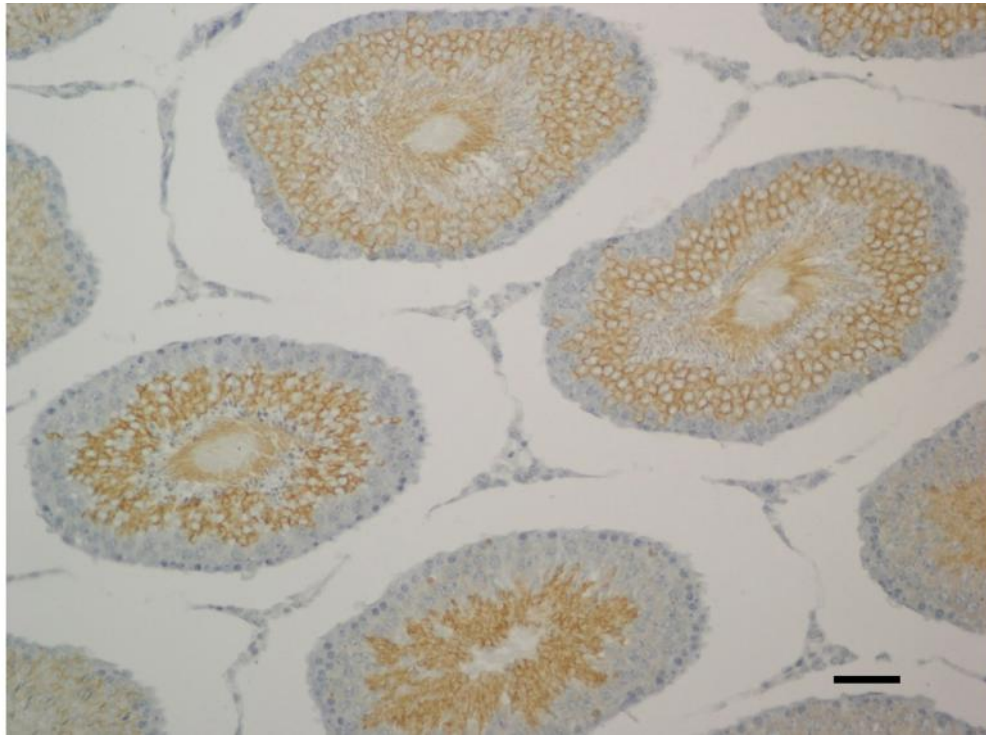
Reaksiyon yoğunluğu bakımından en yoğun reaksiyon kontrol grubunda gözlenirken, en zayıf yoğunluğun deneme grubunda olduğu gözlemlendi (Resim 17,18,19).

Testisteki Yapılar	Reaksiyon Yoğunluğu		
	Kontrol Grubu	Sham Grubu	Deneme Grubu
Endotel Hücreleri	0	0	0
Spermatogonyum (odaklar halinde)	+3	+2	+1
Primer spermatosit	0	0	0
Sekonder spermatosit	Çekirdek 0 Sitoplazma +3	Çekirdek 0 Sitoplazma +2	Çekirdek 0 Sitoplazma + 1
Spermatid	+3	+2	+1
Sertoli hücreleri	0	0	0
Leydig hücreleri	0	0	0

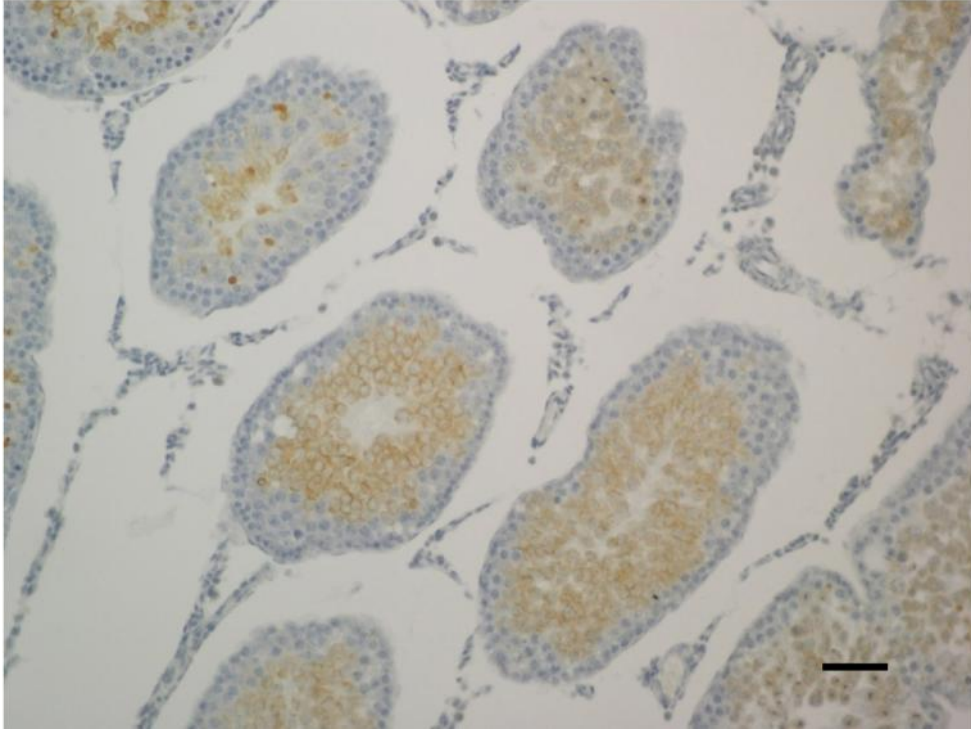
**Tablo 11.** Testisteki yapılar ve GPx-4 reaksiyon yoğunluğu.



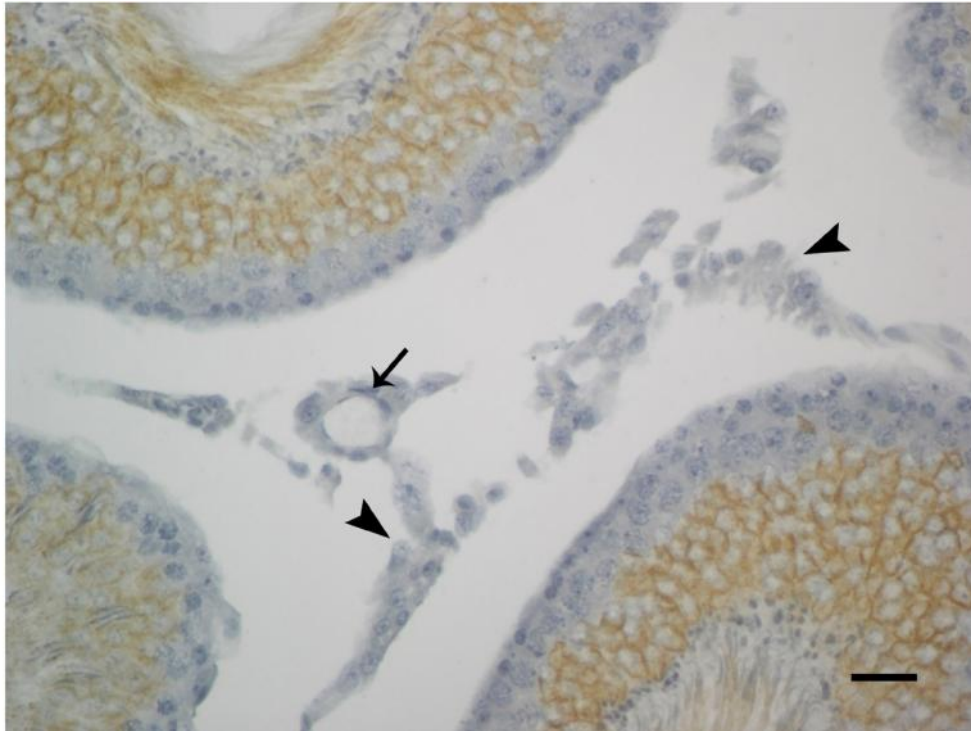
**Resim 17.** Kontrol grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi. Bar: 50  $\mu$ m.  
Ok: Spermatogonyumlarda odaklar halinde GPx-4 immunoreaktivitesi.



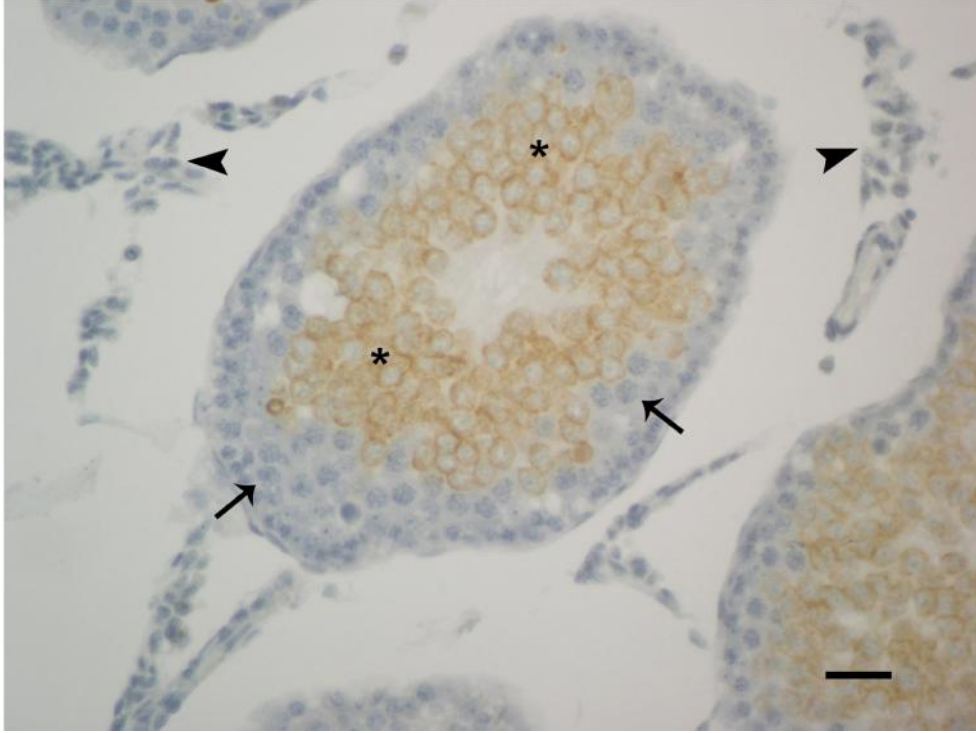
**Resim 18.** Sham grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi. Bar: 50  $\mu$ m.



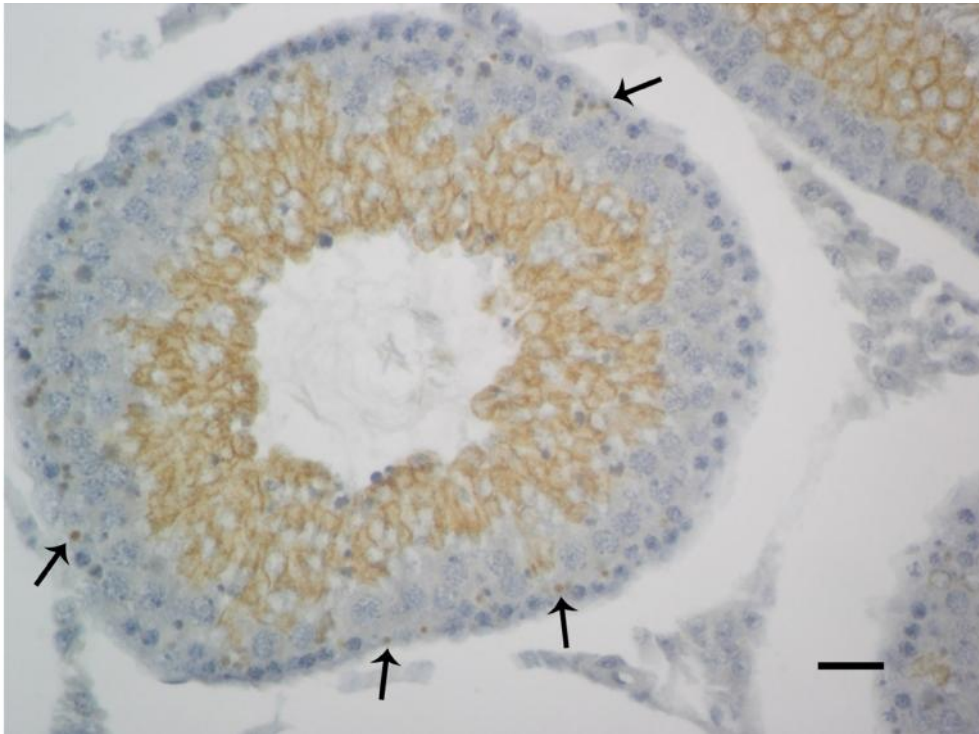
**Resim 19.** Deneme grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi. Bar: 50  $\mu$ m.



**Resim 20.** Kontrol grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi. Bar: 25  $\mu$ m.  
Ok: Damar endoteli, Okba 1: Leydig hücreleri.



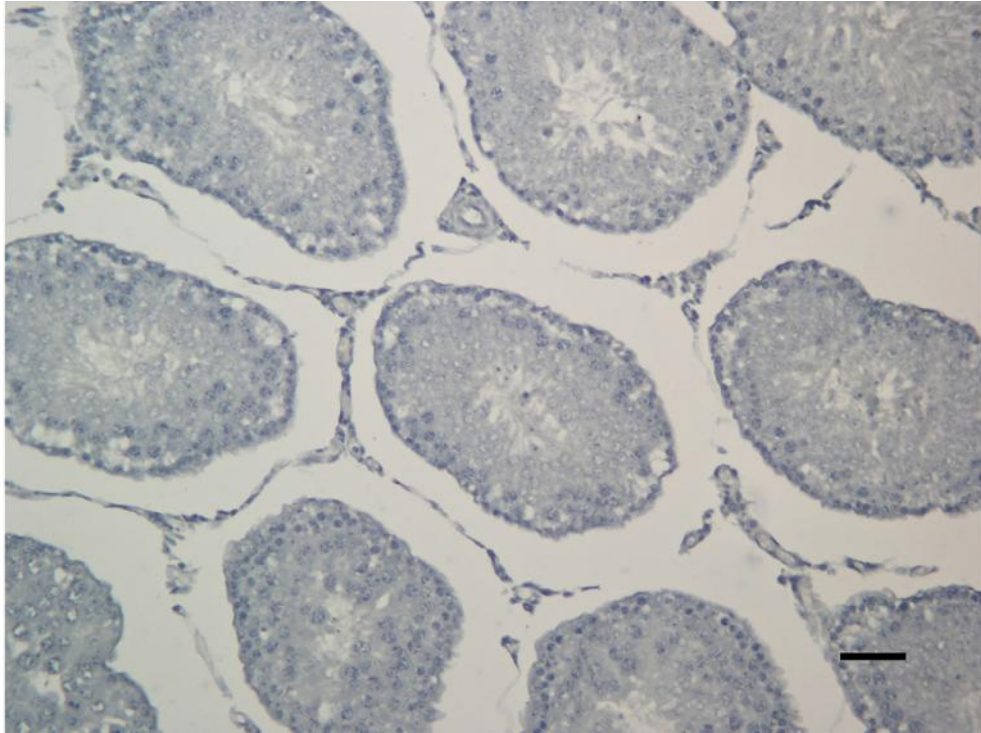
**Resim 21.** Deneme grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi. Bar: 25  $\mu$ m. Ok: Primer spermatosit, Ok ba 1: Leydig hücreleri. \*: Sekonder spermatositlerde sitoplazmik GPx-4 immunoreaktivitesi.



**Resim 22.** Kontrol grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi. Bar: 25  $\mu$ m. Ok: Spermatogonyumlarda odaklar halinde GPx-4 immunoreaktivitesi.



**Resim 23.** Sham grubu testis dokusunda GPx-4 immunoreaktivitesi. Bar: 25  $\mu$ m.  
Ok: Sekonder spermatositlerde sitoplazmik GPx-4 immunoreaktivitesi, Ok ba 1: Spermatidlerde GPx-4 immunoreaktivitesi.



**Resim 24.** Deneme grubu testis dokusunda negatif GPx-4 immunoreaktivitesi (Negatif kontrol).  
Bar: 50  $\mu$ m.



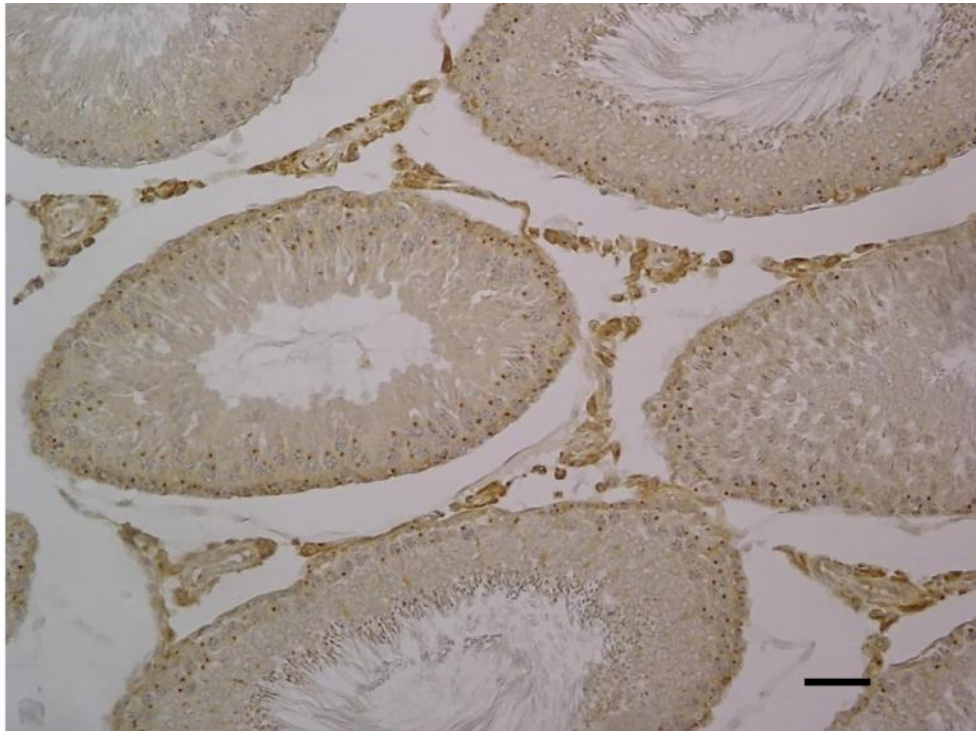
#### 4.5.3. Katalaz mmunoreaktivitesi Bulguları

Tüm gruplardan 21. günde alınan testis doku kesitleri katalaz immunoreaktivitesi yönünden incelendi. İlk mikroskopik incelemede sham, kontrol ve deneme gruplarında spesifik katalaz immunoreaktivitesi görüldü (Resim 25,26,27).

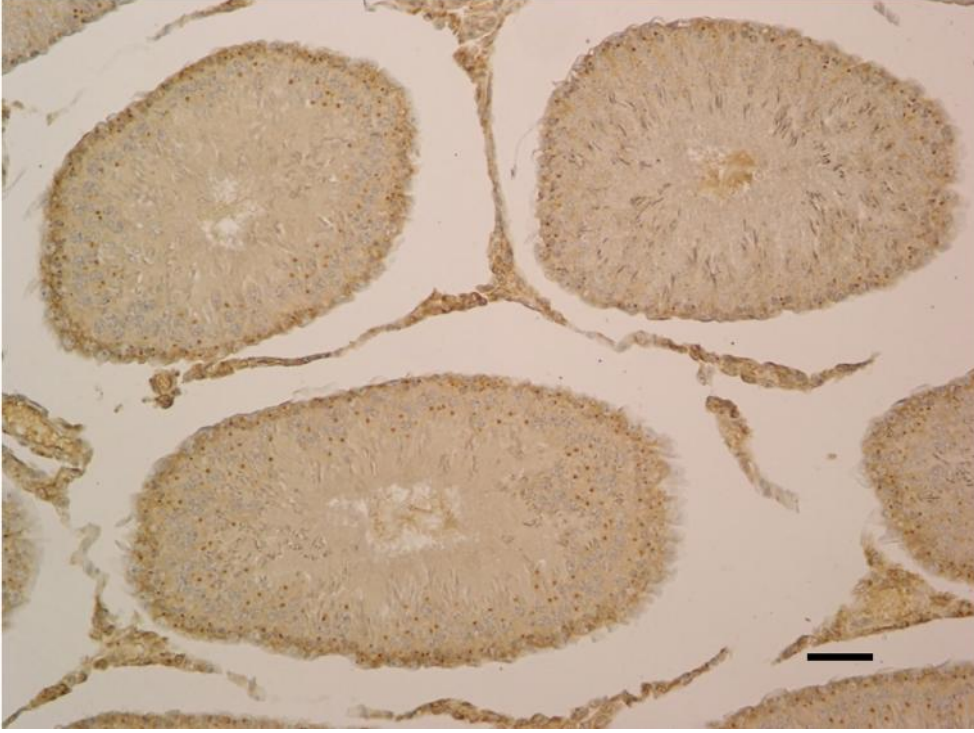
Bütün gruplara ait testis doku örneklerinin immunohistokimyasal incelenmesinde, katalaz immunoreaktivitesinin spermatogonyum, primer ve sekonder spermatositlerde sitoplazmik olduğu gözlemlendi (Resim 28,29,30). Ayrıca bütün gruplarda, spermatogonyum ve primer spermatositlerin çekirdeğine eklenik odaklar halinde katalaz immunoreaktivitesi tespit edildi (Resim 30). Sertoli hücrelerinde yalnızca sitoplazmik tarzda reaksiyon olduğu gözlemlenirken, Leydig hücrelerinde ise hem nükleer hem de sitoplazmik tarzda reaksiyon gözlemlendi (Resim 31). Ayrıca intersitisyel alandaki damar endotel hücrelerinde katalaz immunoreaktivitenin olduğu gözlemlendi (Resim 32). Reaksiyon yoğunluğu yönünden katalaz immunoreaktivitesinin melatonin uygulanan grupta diğer iki gruba göre (kontrol, sham) çok az düzeyde zayıf olduğu gözlemlendi (Resim 25,26,27).

Testisteki Yapılar	Reaksiyon Yo unlu u		
	Kontrol Grubu	Sham Grubu	Deneme Grubu
Endotel Hücreleri	+2	+2	+1
Spermatogonyum	Çekirdek 0, Sitoplazma: +1, +2, +3	Çekirdek 0 Sitoplazma:+1, +2, +3	Çekirdek 0 Sitoplazma +1, +2
Primer spermatosit	Çekirdek 0, Sitoplazma +1	Çekirdek 0 Sitoplazma +1	Çekirdek 0 Sitoplazma +1
Sekonder spermatosit	Çekirdek 0, Sitoplazma +1	Çekirdek 0 Sitoplazma +1	Çekirdek 0 Sitoplazma +1
Spermatid	+1	+1	+1
Sertoli hücreleri	Çekirdek 0, Sitoplazma:+1, +2, +3	Çekirdek 0 Sitoplazma:+1, +2, +3	Çekirdek 0 Sitoplazma +1, +2
Leydig hücreleri	+3	+3	+2

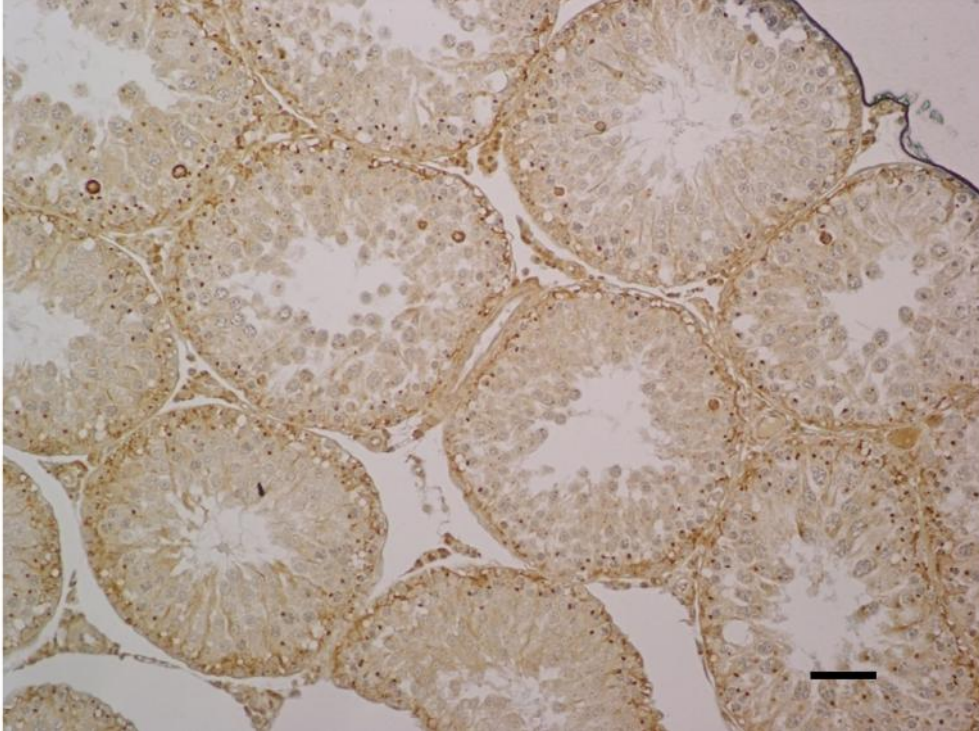
**Tablo 12.** Testisteki yapılar ve katalaz reaksiyon yo unlu u



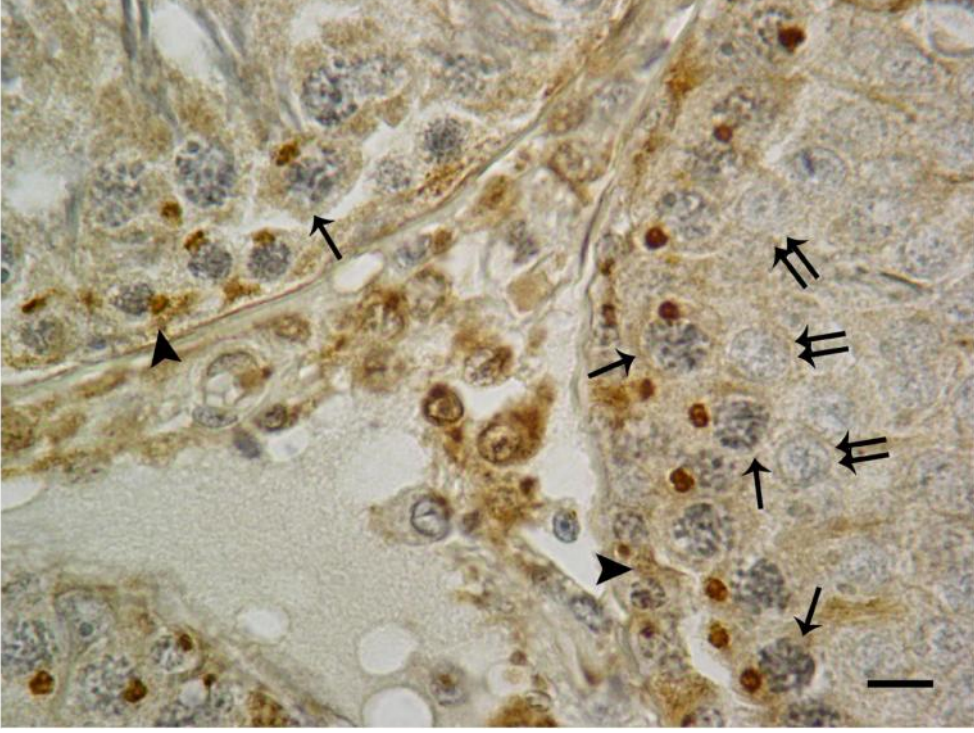
**Resim 25.** Kontrol grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



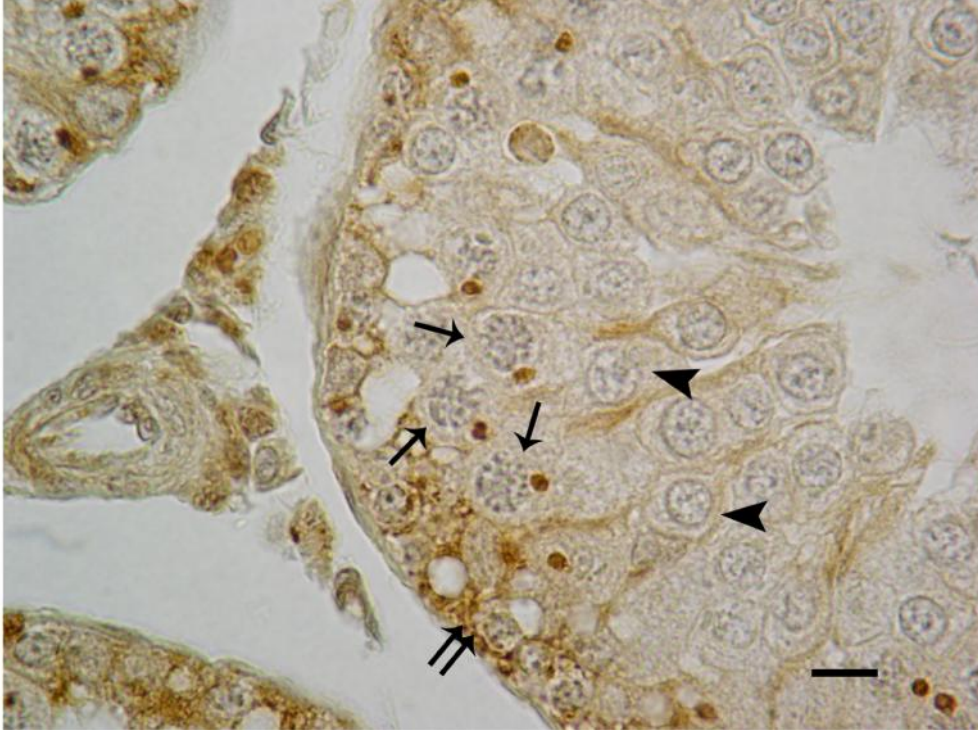
**Resim 26.** Sham grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi. Bar: 50  $\mu$ m.



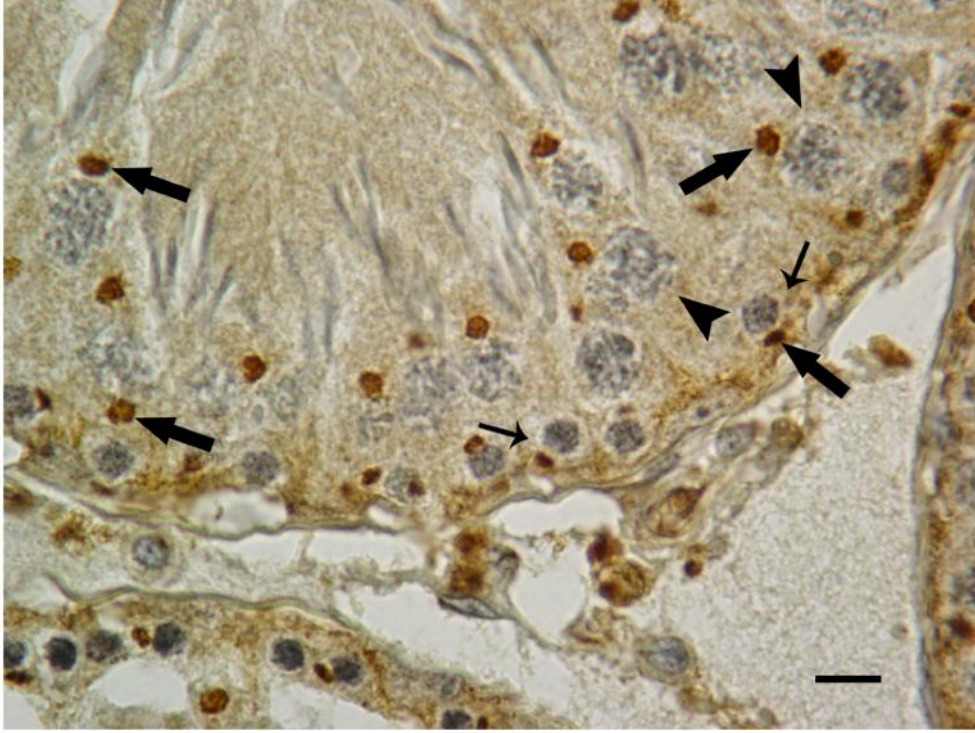
**Resim 27.** Deneme grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi. Bar: 50  $\mu$ m.



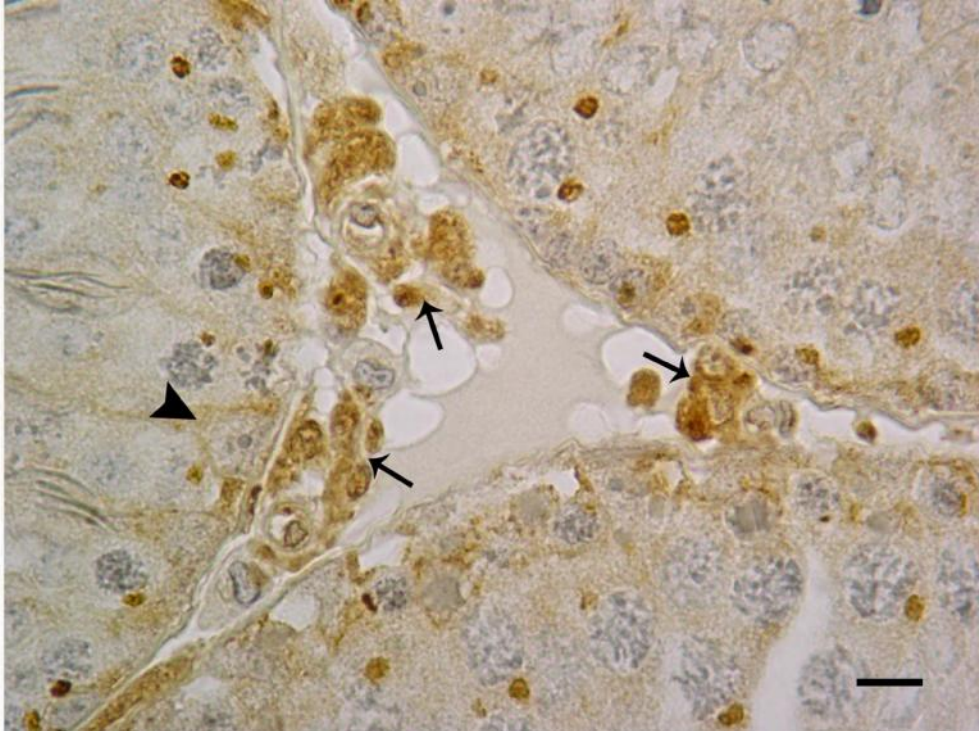
**Resim 28.** Sham grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi. Bar:10  $\mu$ m. Ok: Primer spermatositlerde sitoplazmik katalaz immunoreaktivitesi, Ok ba 1: Spermatogonyumlarda sitoplazmik katalaz immunoreaktivitesi, Çift ok: Sekonder spermatositlerde sitoplazmik katalaz immunoreaktivitesi.



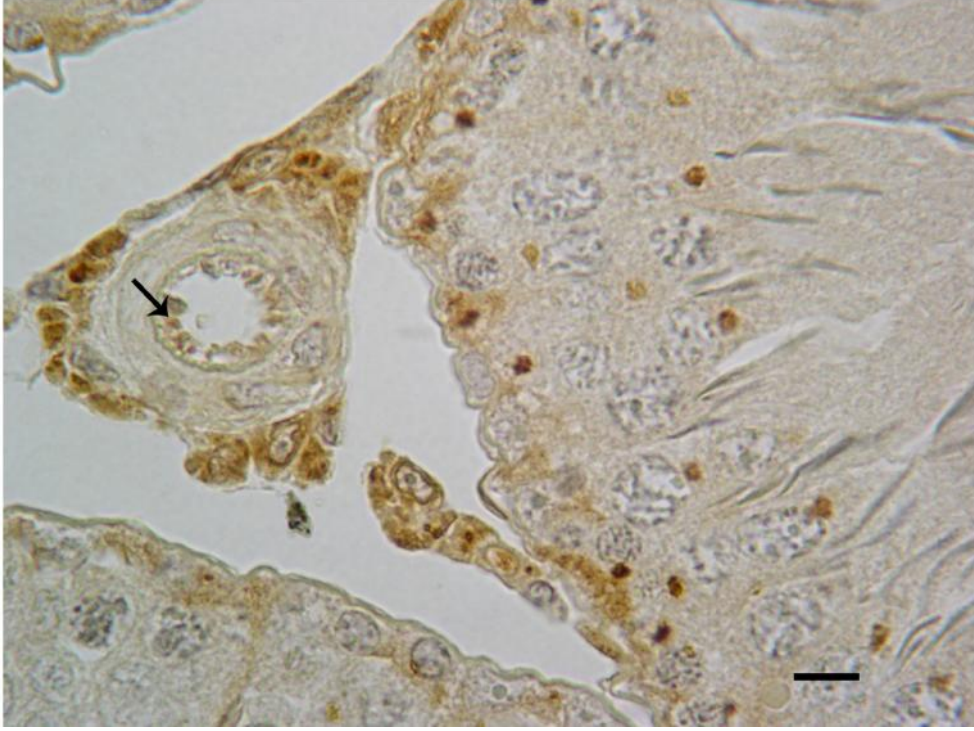
**Resim 29.** Deneme grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi. Bar: 10  $\mu$ m. Ok: Primer spermatositlerde sitoplazmik katalaz immunoreaktivitesi. Çift ok: Spermatogonyumlarda sitoplazmik katalaz immunoreaktivitesi, Ok ba 1: Sekonder spermatositlerde sitoplazmik katalaz immunoreaktivitesi.



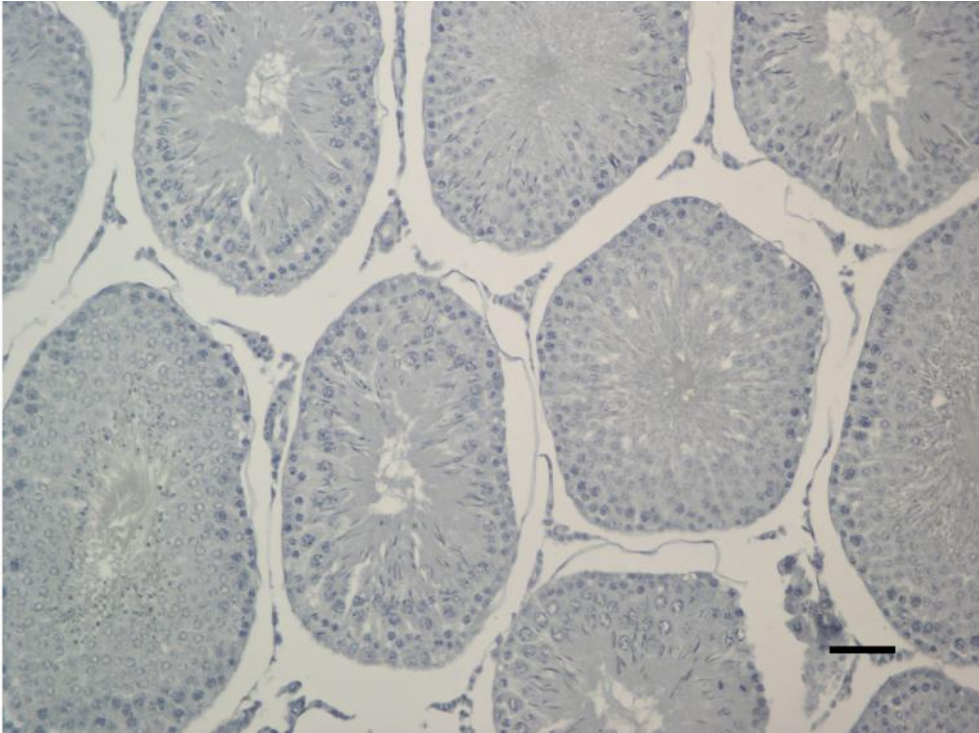
**Resim 30.** Sham grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi. Bar: 10  $\mu$ m. Ok: Spermatogonyumlarda sitoplazmik katalaz immunoreaktivitesi, Ok ba ı: Primer spermatositlerde sitoplazmik katalaz immunoreaktivitesi, Kalın ok: Spermatogonyum ve Primer spermatositlerin sitoplazmasında odaklar halinde katalaz immunoreaktivitesi.



**Resim 31.** Kontrol grubu testis dokusunda katalaz immunoreaktivitesi. Bar: 10  $\mu$ m. Ok: Leydig hücrelerinde katalaz immunoreaktivitesi, Ok ba ı: Sertoli hücrelerinde sitoplazmik katalaz immunoreaktivitesi.



**Resim 32.** Kontrol grubu testis dokusunun damar endotelinde katalaz immunoreaktivitesi. Bar: 10  $\mu$ m. Ok: Damar endoteli.



**Resim 33.** Sham grubu testis dokusunda negatif katalaz immunoreaktivitesi (Negatif kontrol). Bar: 50  $\mu$ m.

## 5. TARTI MA VE SONUÇ

Bu çalı mada, son yıllarda önemi oldukça artan melatonin hormonunun ekzojen uygulamasının testis dokusunda Süperoksit dismutaz-1, Glutasyon peroksidaz-4 ve Katalaz enzimine etkisini incelemek amaçlanmıştır. Bu amaçları kin erkek ratlara 3 hafta boyunca hergün melatonin uygulaması yapılmı ve sonrasında canlı a ırlık, testis a ırlı ı ve tubulus seminiferus kontortus çaplarındaki de i iklikler belirlenmiştir. Bununla birlikte testis dokusundaki histolojik de i iklikler incelenmiştir, SOD-1, GPx-4 ve Katalaz enziminin dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu araştırılmıştır.

Melatoninin çe itli etkilerini incelemek için yapılan çalı malarda farklı süre ve dozlarda melatonin uygulaması yapıldı ı görülmü tür. El-Sokkary ve arkadaşları (44) kronik etanol uygulamasından kaynaklanan lipid peroksidasyon ürünleri üzerine melatoninin etkisini belirlemek amacıyla 30 gün boyunca 10 mg/kg dozunda deri altı enjeksiyonu ile melatonin uygulamı lardır. Ku ve arkadaşları (92) rat ön hipofiz bezi hücrelerinde leptin üretimine eksojen melatoninin ve pinealektominin etkisini belirlemek amacıyla 2 ay boyunca 3 mg/kg dozda melatonin uygulamı lardır. Ji ve arkadaşları (82) testiste melatoninin üreme hücresi apoptozisi ve kadmiyum indüklü hücresel stress üzerindeki etkilerini incelemek için 5 mg/kg (i.p) dozda melatonin uygulamı lardır. Farklı bir çalı mada Erdemir ve arkadaşları (46) melatoninin antioksidan etkisini belirlemek amacıyla ratlara 50 mg/kg (i.p) dozda melatonin uygulamı lardır. Mauriz ve arkadaşları (111) rat karaci erlerinde melatoninin antioksidan enzimler üzerine olan etkisini belirlemek için 4 hafta süre ile 20 mg/L dozunda içme sularına melatonin katmı lardır. Vardı ve arkadaşları (194) yaptıkları çalı mada deneysel diyabet sonrası karaci erde meydana gelen de i iklikler üzerine melatoninin etkilerini incelemek için ratlara 8 hafta süresince 10 mg/kg (i.p) dozda melatonin uygulamı lardır. Koral Ta çı (89), fare karaci erinde melatonin uygulamasının glutasyon peroksidaz enzimine olan etkisini incelemek amacıyla farelere 4 hafta boyunca 10 mg/kg (i.p) dozda melatonin uygulaması yapmıştır. Lankoff ve arkadaşları (99) fare karaci erinde nodularinin neden oldu u oksidatif strese karşı melatoninin koruyucu etkisini ve

antioksidan enzim aktivitesine etkisini ara tırmak amacıyla farklı dozlarda (5, 10, 15 mg/kg) melatonini intraperitoneal yol ile uygulamı lardır. Farklı bir alı mada Ku ve arkada ları (95) erkek ratlara 2 hafta süresince 25 mg/kg intraperitoneal yol ile melatonin uygulaması lardır. Ba ka bir alı mada da (38) karaci erde sigaranın meydana getirdi i yapısal de i iklikler üzerine C vitamininin ve melatoninin etkilerini ara tırmak amacıyla ratlara 4 mg/kg (i.p) dozda 3 ay süresince melatonin uygulanmı tır.

Bizim alı mamızda melatoninin dozu, alı malarda en ok kullanılan (11, 44,85,89,113,172,194,197) doz olan 10 mg/kg olarak belirlenmi ve intraperitoneal yolla 21 gün boyunca hergün uygulanmı tır.

- **Canlı A ırlık ve Testis A ırlı ı De erlendirmeleri**

Cam ve arkada ları (30) yaptıkları alı mada ratlara 4 hafta boyunca melatonin uygulaması yapmı lardır. Ratların canlı a ırlıklarını da inceledikleri bu alı manın ba langıcında ilk canlı a ırlıklarının bütün gruplarda benzer oldu unu, alı manın sonunda ise hem kontrol hem de yalnızca melatonin uygulanan grubun 4 hafta sonundaki canlı a ırlıklarının ba langı canlı a ırlıklarına göre artmı oldu unu bildirmi lerdir.

im ek ve arkada larının (163) ratlara melatonin uygulaması yaptıkları alı malarında 1.gün, 21. gün ve 42. gün aralıklarında gruplar arasındaki canlı a ırlıklarını da incelemi lerdir. alı manın ba langıcında benzer a ırlıklara sahip olan grupların 21. ve 42. gününde kontrol grubu ile sadece melatonin uygulanan grubun canlı a ırlıkları arasında anlamlı bir fark olmadı ını bildirmi lerdir.

Arma an ve arkada ları (11) diabetik ratlarda melatoninin antioksidan enzimler üzerine etkisini incelemek için yapmı oldukları bir alı mada sekiz hafta 10 mg/kg dozunda melatonin uygulamasından sonra, diabetik ratların ve melatonin uygulanmı diabetik ratların ortalama vücut a ırlıklarının kontrol grubuna göre anlamlı bir ekilde azaldı ını bildirmi lerdir.



Do urman ve arkada ları (43) alı malarında ratlarda melatoninin hem ık hem de karanlık periyotlarda vücut a ırlı ında azalmaya yol açtı ını bildirmi lerdir. Terron ve arkada ları (180) ratlarda melatoninin canlı a ırlık üzerine etkilerini inceledikleri alı malarında, kontrol ve melatonin gruplarında canlı a ırlık kazanımı bakımından kontrol grubunda artı oldu u görülürken, melatonin grubunun canlı a ırlık kazanımında ise önemli bir azalma oldu unu bildirmi lerdir.

Canpolat ve arkada ları (31) ratlara melatonin uygulaması yaptıkları alı malarında sham ve melatonin gruplarını canlı a ırlık bakımından da incelemi ler ve alı manın sonunda sham grubundaki ratların canlı a ırlıklarının ba langıç a ırlıklarına göre artı görülürken, melatonin uygulanan gruptaki ratların canlı a ırlıklarının ise ba langıç a ırlıklarına göre azalma gösterdi ini belirtmi lerdir

Wolden-Hanson ve arkada ları (200) yaptıkları alı mada melatoninin do rudan canlı a ırlı ında bir azalmaya neden oldu unu bildirmi lerdir. Rios-Lugo ve arkada ları (150) alı malarında 9 hafta boyunca melatonin uyguladıklarını ve uygulamanın 3. haftasından itibaren melatoninin canlı a ırlık kazanımında azalmaya neden oldu unu belirtmi lerdir.

Ahmad ve arkada ları (3) yapımı oldukları alı mada *funambulus pennanti*'ye melatoninin farklı dozlarını uygulamı lar, sonucunda testis a ırlı ı ve vücut a ırlı ında azalma belirlerken, bu azalmanın testis a ırlı ında vücut a ırlı ına göre daha fazla oldu unu saptamı larıdır.

alı mamızda günlere göre ortalama canlı a ırlık bakımından deneme ve sham gruplarının canlı a ırlıklarında azalma oldu u belirlendi. Deneme grubunda ortalama canlı a ırlık açısından günler arasında istatistiksel düzeyde anlamlı ( $P<0,05$ ) bir fark görülürken, sham grubu içinde ise günler arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark olmadı ı görüldü. Kontrol grubu içinde ortalama canlı a ırlıkta artma görülürken, ortalama canlı a ırlık açısından günler arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark gözlenmedi. Bulgularımız Cam ve arkada ları

(30) ile im ek ve arkadaşlarının (163) bulgularıyla farklılık göstermiştir. Bununla birlikte bulgularımız, birçok çalışmada (3,11,31,43,150,180,200) ile benzer olarak canlı a ırlık bakımından deneme grubunda, kontrol ve sham gruplarına kıyasla istatistiksel düzeyde anlamlı ( $P<0,05$ ) olarak azalma olduğunu göstermiştir. Ayrıca canlı a ırlık bakımından gruplar arasında 0. ve 4. günler arası istatistiksel düzeyde anlamlı fark gözlemlenmezken, 5-21 günler arası kontrol grubu ile deneme ve sham grubu arasında istatistiksel düzeyde anlamlı ( $P<0,05$ ) fark olduğu ancak sham ve deneme grubunda istatistiksel düzeyde anlamlı fark olmadığı gözlemlenmiştir. (Tablo 7)

Rashed ve arkadaşları (142) melatoninin farklı dozlarının ve uygulama sürelerinin rat testisleri üzerine olan etkilerini ara tırdıkları bir çalışmada melatonin uygulamasının testis a ırlığında ve boyutunda belirgin azalmalara neden olduğunu bildirmişlerdir. Aynı ara tırmacılar, melatoninin hipofiz bezi tarafından sentezlenen ve spermatogenez için gerekli olan ve testosteronun etkisinin düzenlenmesinde rolü olan LH ve FSH'da azalmaya yol açtığını bildirmişler. Buna ilaveten melatonin uygulanan ratların testis dokusunda testosteronun azaldığını yorumunda bulunmuşlardır. Testosteron sekresyonundaki azalmadan dolayı germ hücrelerindeki protein sentezinde azalmalar olacağını bu yüzden çalışmalarında, germ hücrelerinin farklı derecelerde dejeneratif değişiklikler gösterdiğini ve melatoninin testiküler gerilemeye neden olan etkili bir madde olduğunu bildirmişlerdir.

Ku ve arkadaşları (94) erkek ratlarda pineal bez ve testis arasındaki ultra yapısal kar ılıklı ili kiyi belirlemek üzere yaptıkları çalışmada pinealektomi yapılan ratlarda; testis a ırlığının kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde arttığını saptamışlardır. Aynı çalışmada melatonin uygulanmış pinealektomili gruptaki ratların testis a ırlıklarının pinealektomili gruba ve kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca testosteron hormonunun melatonin salgılanmasını baskıladığını ve böylece GnRH üzerine melatoninin inhibitör etkisini kaldırdığını ya da tersi etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Çalı mamızda deneme grubu testis a ırlıklarının kontrol ve sham grubuna göre dü ük oldu u gözlemlenirken, deneme ile di er grupların testis a ırlıkları arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı ( $P<0,05$ ) oldu u gözlemlendi. Çalı mamızın bulguları yapılan bir çok çalı maya (3,94,142) paralel olarak melatonin uygulamasının ratların testis a ırlı nı azalttı nı göstermi tir. Bu azalmanın nedeninin; Rashed ve arkadaş larının (142) belirtti i üzere melatoninin testosteron hormonunun salgılanmasını azaltıcı etki gösterdi i ve bundan dolayı testis dokusunda testosteron sekresyonundaki bu azalmadan dolayı olu an testiküler gerilemeden kaynaklanabilece ini dü ünmekteyiz.

- **Histolojik ve Histometrik De erlendirmeler**

Mehraein ve arkadaş ları (113) melatonin uygulamasından sonra fare testislerinde morfometrik de erlendirmeler sonucunda tubulus seminiferus kontortus çapında anlamlı bir azalma oldu unu bildirmi lerdir.

Tuncer ve arkadaş ları (186) yaptıkları çalı mada, rat testislerinde melatonin ve çinkonun etkilerini incelemi lerdir. Bu çalı mada (186) melatonin uygulamasının; spermatogenik aktivitede azalma, tubüler dejenerasyon, nekrozis, tubül lümenlerinde tıkanıklık gözlemleni lerdir.

Ooi ve Ng'nin (129) yaptıkları bir çalı mada erkek golden hamsterlerinde melatonin enjeksiyonunun spermatogenezis inhibisyonuna ve seminifer tubül çaplarında bir azalmaya neden oldu unu bildirmi lerdir.

Ng ve Ooi'nin (121) fare testis histolojisi üzerine pineal indollerinin etkisini ara tırmak üzere yaptıkları bir çalı mada kontrol grubuna göre melatonin uygulanan grupta seminifer tubül çaplarında anlamlı bir azalma oldu unu ve seminifer tubüllerde atrofi meydana geldi ini bildirmi lerdir. Aynı ara tırmacılar (121) melatoninin, hipotalamik reseptörleri üzerine etkisi aracılı ı ile LH salıcı hormon sekresyonunu inhibe ederek antigonadotropik etki gösterdi ini ve ayrıca hipofiz bezi üzerine direk etki ederek LH sekresyonunu baskıladı nı ifade

etmi lerdir. Böylece hipotalamik ve hipofiz seviyede pineal indollerinin bu muhtemel eyleminin fare spermatogenezisi üzerine olumsuz etki göstermesinin nedeni olabilece ini bildirmi lerdir.

Reiter ve arkadaşları (148) 50 gün boyunca yeti kin erkek hamsterlara uyguladıkları melatoninin testislerde ve yardımcı üreme organlarında atrofiye yol açtı ını bildirmi lerdir

Kanter (85) çalı masında iskemi reperfüzyon sonrası rat testislerinde iddetli testiküler hasar meydana geldi ini ve melatonin uygulanmasıyla testiküler hasarın önlendi i bildirmi tir.

Yaptı ımız çalı mada, ratların testis dokusu seminifer tubül çapları bakımından incelendi inde ortalama tubül çap de eri bakımından gruplar arasında anlamlı ( $P<0,05$ ) bir fark belirlendi. Bununla birlikte deneme grubundaki tubulus seminiferus kontortusların ortalama çap de erinin kontrol ve sham grubuna göre dü ük oldu u gözlemlendi. Çalı mamızın sonuçlarına göre melatoninin tubulus seminiferus kontortus çapında azalmaya neden olması Ng ve Ooi (121), Ooi ve Ng (129) ve Mahrein ve arkadaşlarının (113) çalı malarını destekler niteliktedir. Çalı mamızda deneme grubundaki tubulus seminiferus kontortus çaplarındaki azalmanın; Rashed ve arkadaşları (142) ile Ng ve Ooi'nin (121) belirtti i üzere melatonin hormonunun LH sekresyonu üzerine baskılayıcı etki göstermesinden dolayı, testosteron hormonunun eksikli inden kaynaklanacak olan testiküler gerileme, atrofik yapı ve dejenerasyonların sonucu olarak olu acak yapı bozukluklarından kaynaklanabilece ini dü ünmekteyiz.

Çalı mamızda kontrol ve sham grubunda testis dokusunun histolojik yapısında herhangi bir farklılık olmadı ı ve normal yapıda oldu u belirlendi. Deneme grubunda ise yapılan birçok çalı mayla (121,148,186) uyumlu olarak yo un bir testiküler dejenerasyon ve bazı tubulus seminiferus kontortuslarda atrofi, germinal epitel içerisinde vakuolle me ve lümende spermatozit dökülmelerinin oldu u tespit edildi. Ancak bulgularımızın Kanter'in (85) sonuçlarıyla farklılık gösterdi i belirlendi.

➤ **Süperoksit Dismutaz-1'in immunohistokimyasal De erlendirmeleri**

Ookawara ve arkadaşları (130) farelerde ekstraselüler süperoksit dismutaz enziminin fare testisinde spermatogonyumlarda, peritübüler intersitisyumda ve kapsülde lokalize olduğunu bildirmişlerdir. Nonogaki ve arkadaşları (123) ise insanlarda CuZn-SOD enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonunun ayrıntılı olarak spermatogonyumlarda lokalize olduğunu tanımlamışlardır. Sakai ve arkadaşlarının (156) yaptıkları çalışmada rat testisinde SOD enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonunun primer spermatozoidlerde çok güçlü bir şekilde bulunduğunu ifade etmişlerdir.

Kampfer ve arkadaşları (84) insan testisinde katalaz ve SOD-2 enziminin peritübüler duvar hücrelerinde immunoreaktivite gösterdiğini ayrıca katalaz enziminin sertoli hücrelerinde ve SOD-2 enziminin Leydig hücrelerinde reaktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Oberley ve arkadaşları (125) yeti kin hamster testis dokusunda CuZn-SOD (SOD-1) enziminin olgun spermatozoidlerde +1 yaşta diffüz ve sitoplazmik tarzda ve katalaz enziminin +1 ile +2 yaşta yine diffüz ve sitoplazmik tarzda immunoreaktivite gösterdiğini ve Leydig hücrelerinde her iki enzimin diffüz ve sitoplazmik tarzda +4 yaşta immunoreaktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ancak spermatogonyumlarda ve sertoli hücrelerinde herhangi bir reaksiyon olmadığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda literatür bildirimlerine (123,130) paralel olarak spermatogonyumlarda SOD immunoreaktivitesi belirlendi. Ancak çalışmamızda spermatogonyumlarda SOD-1 immunoreaktivitesinin varlığını Oberley ve arkadaşlarının (125) bulgularından farklı niteliktedir.

Primer spermatozoidlerde SOD immunoreaktivitesinin görülmesi Sakai ve arkadaşlarının (156) bulgularını destekler niteliktedir. Leydig hücrelerinde SOD immunoreaktivitesi çeşitli çalışmalarla (84,125) belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada Leydig hücrelerinde SOD immunoreaktivitesi görülmesi bu çalışmaların

(84,125) bulguları ile paralellik göstermektedir. Ayrıca çalı mamızda leydig hücrelerindeki reaksiyonun hem sitoplazmik hem de nükleer tarzda olması Oberley ve arkadaşlarının (125) bulgularını destekler niteliktedir. Fakat çalı mamızda sertoli hücrelerinde SOD-1 immunoreaktivitesinin görülmesi Oberley ve arkadaşlarının (125) bulgularıyla farklılık göstermektedir.

Ayrıca çalı mamızda spermatidlerde ve sekonder spermatositlerde SOD-1 immunoreaktivitesi belirlendi. Ancak bu sonucumuzu destekleyecek herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Bu durumun kullanılan materyal ve yöntemlerin farklılığından kaynaklanabileceğini ve daha ayrıntılı çalı lması gerektiğini düşünmekteyiz.

#### ➤ **Glutasyon Peroksidaz-4'ün Immunohistokimyasal De erlendirmeleri**

Anmin ve arkadaşları (8) fare dokusunda glutasyon peroksidazın immunohistokimyasal lokalizasyonunu ara tırdıkları çalı malarında, leydig hücrelerinde orta derece bir immunoreaktivite gözlemlenmiştir. Puglisi ve arkadaşları (140) fare testislerinde GPx-4'ün immunohistokimyasal lokalizasyonunun primer spermatositlerde ve spermatidlerde olduğunu bildirmişlerdir.

Oberley ve arkadaşları (124) yaptıkları çalı mada testis dokusunda GPx enziminin immunolokalizasyonunun spermatogonyumlarda ve olgun spermatidlerde +3 yoğunlukta ve sitoplazmik tarzda olduğunu bildirmişlerdir. Borchert ve arkadaşlarının (26) yaptıkları çalı mada ise northern blot analizine göre sperm nükleus glutasyon peroksidaz (snGPx) mRNA ekspresyonunun, baskın bir şekilde geç spermatidlerin nükleusunda haritalandığını bildirmişlerdir. Godeas ve arkadaşlarının (54) rat epididimal spermatozoonunda glutasyon peroksidaz-4 enziminin rolü ve dağılımını ara tırdıkları çalı mada GPx-4 enziminin immunogold lokalizasyonunun spermatidlerde olduğunu bildirmişlerdir.

Roveri ve arkadaşlarının (154) rat testisinde GPx-4 enziminin immunositokimyasal olarak lokalizasyonunu belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada GPx-4'ün olgunlaşmamış spermatogonyumların sitoplazmasının tamamında lokalize olduğunu ancak olgunlaşmış primer spermatozoidlerin mitokondrisinde, çekirdek zarında ve sitoplazmanın periferik bölgelerinde sınırlı reaksiyon olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte primer spermatozoidlerin ve spermatogonyumların tümünün bu immunoreaktiviteyi göstermediği ve sertoli hücreleri ile birlikte spermatozoidlerde, spermatozoonlarda ve Leydig hücrelerinde immunoreaktivite olmadığını bildirmişlerdir.

Yine başka bir çalışmada Imai ve arkadaşları da (78) insan testisinde immunohistokimyasal yöntemleri kullanarak GPx-4'ün spermatozoonun gövde kısmındaki mitokondriyumda yoğun bir şekilde bulunduğunu, immunohistokimyasal olarak geç spermatozoidlerde ve spermatozoidlerde yoğun bir şekilde lokalize olduğunu ve GPx-4'ün mRNA düzeyinin hemen hemen immunohistokimyasal düzeyiyle aynı olduğunu fakat az miktarda da spermatogonyumda ve sertoli hücrelerinde de sinyaller olduğunu belirtmişlerdir. Nayernia ve arkadaşlarının (119) yaptıkları çalışmalarında immunohistokimyasal ve western blot analizi ile fare testisinde GPx-4 enziminin spesifik olarak Leydig hücrelerinde ve spermatozoidlerde lokalize olduğunu bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, birçok çalışmaya (54,78,119,124,140) paralel şekilde spermatozoidlerde GPx-4 immunoreaktivitesi belirlendi. Ancak bulgularımız, spermatozoidlerde immunoreaktivite bulunmadığını bildiren Roveri ve arkadaşlarının (154) bulgularıyla farklılık göstermektedir.

Spermatogonyumlarda Oberley ve arkadaşları (124) ile Roveri ve arkadaşları (154) GPx immunoreaktivitesi belirlemişlerdir. Ancak Roveri ve arkadaşları (154) spermatogonyumların tümünde immunoreaktivite olmadığını da belirtmiştir. Çalışmamızda ise Oberley ve arkadaşları (124) ile Roveri ve arkadaşlarının (154) sonuçları ile uyumlu olarak spermatogonyumlarda GPx-4 immunoreaktivitesi belirlendi. Ayrıca bulgularımız immunoreaktivitenin spermatogonyumların sitoplazmasında odaklar halinde görüldüğünü göstermiştir.

Primer spermatoisitlerde GPx-4 immunoreaktivitesini bildiren e itli ara tırmacıların (140,154) aksine, yaptı ımız alı mada primer spermatoisitlerde GPx-4 immunoreaktivitesi tespit edilmedi. alı mamızda sekonder spermatoisitlerde immunoreaktivite belirlenmesi Imai ve arkadaşlarının (78) bulgusunu destekler niteliktedir.

Leydig hücrelerinde GPx immunoreaktivitesinin bazı ara tırmalarda (8,200) bulundu unu, bazı ara tırmalarda (154) ise bulunmadı ı bildirilmi tir. alı mamızda ise Roveri ve arkadaşlarının (154) bulgularını destekler nitelikte leydig hücrelerinde reaksiyon olmadı ı belirlendi. Ayrıca alı mamızda GPx-4 immunoreaktivitesinin sertoli hücrelerinde görülmemesi Roveri ve arkadaşlarının (154) bulgularını destekler niteliktedir.

#### ➤ **Katalazın mmunohistokimyasal De erlendirmeleri**

Nenicu ve arkadaşlarının (120) yaptıkları alı mada fare testisinde immunofloresans tekni i ile immunoelektron mikroskopunda katalaz enziminin leydig hücrelerinde ok yo un oldu unu, spermatoisit ve spermatidlerde zayıf bir immunoreaktivite gösterdi ini ve elektron mikroskopunda ise spermatogonyumda katalaz reaktivitesi oldu unu belirtmi lerdir. Yine aynı tekni i kullanarak nsan testislerinde katalaz enziminin ba lıca leydig hücrelerinde ve seminifer tübülün bazal bölgelerinde özellikle sertoli hücrelerinde immunoreaktivite gösterdi ini bildirmi lerdir.

Zini ve arkadaşları (207) rat testisinde katalaz mRNA'sının in situ lokalizasyonu ve geli imsel modeline göre bu enzimin intersitisyumda ekspre oldu unu öne sürmektedir. Bu alı maya göre mRNA ekspresyonunun öncelikle peritübüler ve intersitisyel hücrelerde oldu u bildirilmi tir.

Bizim alı mamızın sonuçları Oberley ve arkadaşları (125) ile Nenicu ve arkadaşlarının (120) bulgularıyla benzer olarak leydig hücrelerinde katalaz immunoreaktivitesinin görüldü ünü göstermi tir. Ayrıca leydig hücrelerindeki reaksiyonun sitoplazmik tarzda olması Oberley ve arkadaşlarının (125) alı malarını destekler niteliktedir.



Sertoli hücrelerinde katalaz immunoreaktivitesinin bazı ara tırmalarda (84,120) bulundu u, bazılarında (125) ise bulunmadı ı bildirilmi tir. Çalı mamızda sertoli hücrelerinde katalaz immunoreaktiviteai belirlendi. Bu sonuçlar Kampfer ve arkadaş ları (84) ile Nenicu ve arkadaş larının (120) bulguları ile paraleldir. Ayrıca spermatidlerde katalaz immunoreaktivitesinin görülmesi Nenicu ve arkadaş larının (120) bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Yapılan bir çalı mada (120) bizim bulgularımızla paralel olarak spermatogonyumlarda katalaz immunoreaktivitesinin oldu u bildirilirken, ba ka bir çalı mada (125) reaksiyon görülmemesi bizim bulgularımızla farklılık göstermektedir. Çalı mamızın sonuçları Nenicu ve arkadaş larının (120) bulgularıyla benzer olarak spermatositlerde katalaz immunoreaktivitesinin görüldü ünü göstermi tir.

Ayrıca çalı mamızda spermatogonyum ve primer spermatositlerin çekirde ine eklenik olarak bulunan ve katalaz aktivitesi bakımından peroksizom organeli olabilece ini dü ündü ümüz yapıda çok yo un reaksiyon görüldü. Ancak bu bulgumuzu destekleyecek herhangi bir literatüre rastlanmamı tır. Bunun nedeninin çalı mada kullanılan materyal ve yöntemlerin farklı olmasından kaynaklanabilece ini ve daha ayrıntılı çalı lması gerekti ini dü ünmekteyiz.

#### ➤ Genel De erlendirmeler

Melatonin pineal bezden salgılanan bir hormon olarak fizyolojik, immunolojik ve biyokimyasal fonksiyonlara sahiptir. Do rudan serbest radikal tutucu etkileri ve antioksidan enzim sentezlerini stimule ederek antioksidan etkileri vardır (122). Erkek üreme sisteminde bu hormonun antioksidan enzimler üzerine olan etkilerini farklı metodlarla inceleyen çe itli çalı malar yapılmı tır (46,128,131,157,166).

Öner yido an ve arkadaş ları (131) rat testislerinde etanol indüklü lipid peroksidasyonunda melatoninin muhtemel koruyucu etkilerini ara tırmı lar ve bunun sonucunda melatonin uygulanan grupların testis dokusunda biyokimyasal

olarak GPx ve katalaz seviyelerinin arttı rını ve CuZn-SOD seviyesinin ise sabit kaldı rını bildirmi lerdir. Onur ve arkada ları (128) deneysel sol varikosel olu turulan ratların testis dokusunda melatoninin etkisini ara tırmak için yaptıkları çalı mada melatonin uygulanan gruplarda doku MDA seviyelerinin azaldı rı ve spektrofotometrik ölçüm ile GPx, SOD ve katalaz enzim seviyelerinin arttı rını bildirmi lerdir. Yine Semerciöz ve arkada ları (157) deneysel olarak sol taraflı varikosel olu turulmu ratlarda melatonin uygulanmasıyla biyokimyasal ölçümler sonucu testis dokusunda malondialdehit ve nitrik oksit seviyelerinin azaldı rı ve süperoksit dismutaz ile glutatyon peroksidaz enzim seviyelerinin arttı rını bildirmi lerdir.

Sönmez ve arkada larının (166) yaptıkları çalı mada hemosistein uygulanan ratlarda melatonin ve E vitamininin epididimal sperm özellikleri ve antioksidan enzimler üzerine olan etkilerini incelemek için yaptıkları bir çalı mada hemosistein uygulanan grupta plazma GPx, SOD ve katalaz antioksidan enzim seviyelerinde kontrol grubuna göre bir dü ü ün meydana geldi i ve bununla beraber melatonin uygulanmasıyla bu dü ü ün yükseldi i bildirilmi tir.

Erdemir ve arkada ları (46) ratlarda tek taraflı testiküler torsiyon sonrası melatoninin sistemik dola ımdaki antioksidan etkisini ara tırmak için yaptıkları çalı mada melatonin uygulanan grupta kan süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinde azalma oldu unu bildirmi lerdir.

Vural ve arkada ları (197) diyabetik ratlarda melatoninin lipid peroksidasyonuna ve antioksidan enzimler üzerine etkilerini incelemek amacıyla yaptıkları çalı mada melatonin uygulamasının diyabetik ratlarda eritrosit GPx ve SOD aktiviteleri üzerinde stimüle edici etkiye sahip oldu unu belirtmi lerdir.

Erdem ve arkada ları (45) iskelet kası iskemi-reperfüzyon yaralanması üzerine melatoninin koruyucu etkisini ara tırdıkları çalı malarında iskemi/reperfüzyon grubunda yapılan de erlendirmeler sonucunda melatonin verilen grupta ( /R + melatonin), biyokimyasal ölçümler sonucu SOD, GPx ve katalaz antioksidan enzim aktivitesinde, /R grubuna göre anlamlı azalma tespit

edildi ini, ancak bu de erlerin kontrol grubuna göre yüksek bulundu unu belirtmi ledir.

Yapılan literatür taramalarında melatonin uygulaması sonrası testiste GPx-4, SOD-1 ve katalaz immunoreaktivitesini inceleyen herhangi bir çalı maya rastlanmamı olup, ara tırmacıların ço unlu u (46,128,131,157,166) melatoninin testiste bu antioksidan enzimler üzerine olan etkilerini farklı metodlarla incelemi lerdir. Bu çalı malara göre melatoninin testiste GPx seviyesi üzerine bazı ara tırmacılar (128,131,157,166) artırıcı etki gösterdi ini belirlerken Erdemir ve arkadaş ları (46) ise azaltıcı etkiye sahip oldu unu bildirmi lerdir. Birçok çalı mada (128,157,166,197) melatonin testiste SOD seviyesi üzerine arttırıcı etkiye neden oldu u bildirilirken, Öner- yido an ve arkadaş larına (131) göre herhangi bir de i ikli e neden olmamaktadır. Melatoninin testiste katalaz enzim seviyesi üzerine arttırıcı etkiye neden oldu unu bildiren birçok çalı ma (128,131,166) da mevcuttur.

### **Sonuç:**

Çalı mamızda melatonin uygulanan ratların testis dokusunda histolojik yapı, GPx-4, SOD-1 ve katalazın immunohistokimyasal lokalizasyonu, ratların canlı a ırlıkları, testis a ırlıkları ve testis tubulus seminiferus kontortus çapı incelemesi yapıldı. Yapılan histolojik incelemelerde kontrol ve sham grubunda testisin histolojik yapısının klasik bilgilerle (46,81,101,116,126) paralel oldu u ancak melatonin uygulanan grupta tubulus seminiferus kontortuslarda atrofi ve dejenerasyon oldu u belirlenmi tir.

Yaptı ımız ara tırmada canlı a ırlık incelemelerinde melatonin enjeksiyonu bazı literatürlerin (3,10,31,43,150,180,200) bulgularına uygun olarak canlı a ırlı ı azalttı ı belirlenmi tir. Testis dokularının a ırlıklarında birçok literatürle (3,94,142,) paralel olarak melatonin enjekte edilen deneme grubunda azalma görüldü ü ve gruplar arasında istatistiksel düzeyde farklılık oldu u belirlendi. Melatonin enjeksiyonunun literatür bildirimlerine (113,121,129) uygun olarak tubulus seminiferus kontortus çapını azalttı ı ve bu azalma bakımından gruplar arasında istatistiksel düzeyde fark oldu u belirlendi.

ncelemelerimizde testiste; SOD-1 immunoreaktivitesi kontrol, sham ve deneme gruplarının tüm germ hücrelerinde, sertoli hücrelerinde ve leydig hücrelerinde farklı yo unlukta görüldü. Deneme grubunda kontrol ve sham grubuna göre reaksiyon yo unlu unun daha zayıf oldu u belirlendi.

Bütün gruplarda GPx-4 immunoreaktivitesinin spermatogonyumlarda odaklar halinde, sekonder spermatositlerin sitoplazmasında ve spermatidlerde farklı yo unlukta oldu u gözlemlendi. Deneme grubunda immnoreaktivitenin sham ve kontrol grubuna göre daha zayıf oldu u belirlendi.

Katalaz immunoreaktivitesi SOD-1 immunoreaktivitesine benzer olarak tüm germ hücrelerinde, sertoli hücrelerinde, leydig hücrelerinde farklı yo unlukta gözlemlendi. Ayrıca katalaz immunoreaktivitesinde, SOD-1 ve GPx-4'den farklı olarak spermatogonyum ve primer spermatosit sitoplazmasına eklenik olarak bulunan ve katalaz aktivitesi bakımından peroksizom organeli olabilece ini dü ündü ümüz yapılarında immunoreaktivite oldu unu belirlendi. Di er enzimlerin immunoreaktivitelerinden biraz farklı olarak katalaz enzimi immunoreaktivitesinin di er gruplara göre çok az düzeyde zayıf oldu u tespit edildi.

Melatonin uygulamasının testislerde SOD-1, GPx-4 ve katalaz enzimlerinin immunoreaktivitesini azalttı ı belirlendi. Melatoninin bu antioksidan enzim seviyeleri üzerine artı a neden oldu unu bildiren ve farklı tekniklerle yapılan birçok çalı manın (128,131,157,166,197) aksine bizim çalı mamızda melatonin uygulanmı grupta SOD-1, GPx-4 ve katalaz enziminin immunoreaktivite yo unlu unun di er gruplara göre azaldı ı belirlendi. Bizim çalı mamızda belirtti imiz ve birçok ara tırmacının (121,148,186) bildirdi i gibi melatonin hormonu uygulamaları testiste tubulus seminiferus kontortuslarda atrofiye ve testiküler dejenerasyona neden olmaktadır. Bunun nedeninin ise melatonin uygulamasının hipofiz bezinden GnRH indüklü LH salınımını azaltarak (192), testosteron salgılanmasını inhibe etmesinden dolayı olabilece ini dü ünmekteyiz. Deneme grubu testis dokusundaki bu bozulmalardan dolayı SOD-1, GPx-4 ve katalaz immunoreaktivitesinde azalma meydana geldi i kanaatindeyiz. Melatonin uygulamasının antioksidan enzimler üzerine etkisinin, testis dokusunda hücrel

düzyeyde daha ayrıntılı çalı ılması gerekti ini dü ünmekteyiz. Ayrıca çalı mamızın melatoninin testis üzerine etkisi konusunda yapılacak yeni çalı malara da ık tutaca ını dü ünüyoruz.

## 6.ÖZET

Bu çalı ma, eksojen olarak melatonin uygulaması yapılan ratların testisinde süperoksit dismutaz-1, glutasyon peroksidaz-4 ve katalazın immunohistokimyasal lokalizasyonunun incelenmesi amacıyla yapılmı tır.

Çalı mada kullanılan 30 adet erkek sprague dawley rat, deneme (10), sham (10), kontrol (10) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Deneme grubuna 3 hafta boyunca etanolde çözdürölüp serum fizyolojikle sulandırılmı 10 mg/kg dozda melatonin (i.p.) uygulandı. Sham grubuna da sadece ethanol ve serum fizyolojik solüsyonu uygulandı. Kontrol grubuna ise hiçbir uygulama yapılmadı. Deney süresi bitiminde, grupların canlı a ırlıkları, testis a ırlıkları, tubulus seminiferus kontortus çapları, testis doku örneklerinde süperoksit dismutaz-1, glutasyon peroksidaz-4 ve katalazın immunohistokimyasal lokalizasyonu ve dokunun normal histolojik yapısı incelendi.

Yapılan immunohistokimyasal incelemeler sonucunda, tüm gruplarda SOD-1'in benzer özellikte immunolokalizasyon gösterdi i ancak deneme grubunda melatonin uygulamasının SOD-1 immunoreaktivitesini belirgin bir ekilde azalttı ı gözlemlendi. Çalı mamızda saptadı ımız bulgulara ba lı olarak GPx-4'ün bütün gruplarda benzer özellikte immunoreaktivite gösterdi i ve melatonin uygulamasının GPx-4 immunoreaktivitesinde belirgin bir ekilde azalmaya neden oldu u belirlendi. Katalaz immunolokalizasyonu incelendi inde, gruplar arası immunoreaktivitenin benzer oldu u fakat di er enzimlerin immunoreaktivitelerinden biraz farklı olarak katalaz enzimi immunoreaktivitesinin di er gruplara göre çok az düzeyde zayıf oldu u tespit edildi. Ayrıca canlı a ırlık ölçümleri bakımından melatonin uygulamasının canlı a ırlı ı azalttı ı belirlendi. Melatonin uygulamasının testis dokularının a ırlıklarında deneme grubunda belirgin bir azalmaya neden oldu u ve bu azalmanın di er iki gruba göre istatistiksel düzeyde anlamlı oldu u görüldü. Gruplar arasında tubulus seminiferus kontortus çapı de erinin istatistiksel düzeyde anlamlı oldu u, deneme grubunda tubulus seminiferus kontortusunun ortalama çapının di er iki gruba göre daha dü ük oldu u belirlendi. ncelemeler sonucunda deneme grubunda, yo un bir testiküler dejenerasyon, bazı tubulus seminiferus kontortuslarda

atrofi, germinal epitel içerisinde vakuolleme ve spermatogenetik seriye ait hücrelerde lümen içine dökülme olduğu tespit edildi.

**Anahtar Sözcükler:** Melatonin, Testis, SOD-1, GPx-4, Katalaz, immunohistokimya

## 7. SUMMARY

The aim of this study was to examine the immunohistochemical localization of superoxide dismutase-1, glutathione peroxidase-4 and catalase in testis of rats to which the melatonin was administered exogenously.

30 male Sprague Dawley rats used in this study were divided into three groups as experimental (n=10), sham (n=10), control (n=10). The experimental group was administered with 10 mg/kg melatonin (i.p.) that was dissolved in ethanol and diluted with normal saline for 3 weeks. Ethanol and isotonic NaCl solution was administered to sham group. No administration was performed on the control group. At the end of the experiment time, some examinations were made regarding the live weights, testis weights, tubulus seminiferus contortus diameter of groups, as well as immunohistochemical localization of superoxide dismutase-1, glutathione peroxidase -4 and catalase in testis tissue samples and normal histological structure of the tissue.

As a result of the immunohistochemical examinations, it was observed that SOD-1 demonstrated similar immunolocalization in the all groups but melatonin administration decreased SOD-1 immunoreactivity prominently in the experimental group. Depending on the findings of our study, GPx-4 demonstrated similar immunoreactivity in the all groups and it was determined that melatonin administration caused to decreasing GPx-4 immunoreactivity prominently. Analyzing the catalase immunolocalization, it was identified that immunoreactivity was similar between the groups but catalase enzyme immunoreactivity was detected as little different from other enzymes which was weak in a very low level compared to immunoreactivity of other groups. Besides, in terms of the live weight measurements, it was determined that melatonin administration decreased the live weight. It was observed that melatonin administration caused pronounced reduction in the weight of testis tissue in the experiment group and this decreasing was statistically significant compared the other two groups. Value of tubulus seminiferus contortus diameter was statistically significant between the groups, tubulus seminiferus contortus diameter average in experimental group was lower than



compared the other groups. According to studies of experimental groups, the intense testicular degeneration, atrophy in some tubulus seminiferus contortus, cells which belong to spermatogenic serie poured into the lumen, vacuolization in germinal epithelial cells were determined.

**Keywords:** Melatonin, Testis, SOD-1, GPx-4, Catalase, Immunohistochemistry.

## 8. KAYNAKLAR

1. **Aebi, H.:** Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105:121-126, 1984.
2. **Ahmad, S.:** Oxidative stres and antioksidant defenses in biology. Chapman and Hall Inc. 447s. London. 1995.
3. **Ahmad, R., Haldar, C.:** Effect of intra-testicular melatonin injection on testicular functions, local and general immunity of a tropical rodent *Funambulus pennanti*. *Endocrine*. 37: 479-488, 2010.
4. **Akku , .:** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. Konya. 1995.
5. **Aksoy, Y.:** Antioksidan Mekanizmada Glutatyonun Rolü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*. 22(4): 442-448, 2002.
6. **Allegra, M., Reiter, R.J., Tan, D.X., Gentile, C., Tesoriere, L., Livrea, M.A.:** The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J. Pineal. Res.* 34: 1–10, 2003.
7. **Anjum, S., Rahman, S., Kaur, M., Ahmad, F., Rashid, H., Ansari, R.A., Raisuddin, S.:** Melatonin ameliorates bisphenol A-induced biochemical toxicity in testicular mitochondria of Mouse. *Food and Chemical Toxicology*. 49(11): 2849–2854, 2011.
8. **Anmin, Z., Yan, X., Boqi, G., Jingzhen, Z.:** mmunohistochemical localization of glutathione peroxidase in mice tissues. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2: 013, 1993.
9. **Arendt, J.:** Melatonin. *Clin. Endocrinol.* 29: 205-229, 1988.
10. **Arıncı, K., Elhan A.:** Anatomi. Güne Kitabevi Ltd. Sti. Ankara, 1995.
11. **Armagan, A., Uz, E., Yılmaz, H.R., Soyupek, S., Oksay, T., Ozcelik, N.:** Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Asian J. Androl.* 8(5): 595-600, 2006.
12. **Balz, F.:** Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins: Mechanism of Action. *Am. J. Med.* 97(3): 5-13, 1994.

13. **Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demaurex, N., Krause, K-H.:** A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* 276: 37594-37601, 2001.
14. **Banks, W.J.:** Applied veterinary histology. 2nd edition, Williams&Wilkins Press. Page 489-505. Baltimore, 1985.
15. **Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B., Williamson, G.:** Reduction of thymine hydroperoxide by phospholipid hydroperoxide glutathioneperoxidase and glutathione transferases. *FEBS Lett.* 410:210–212, 1997.
16. **Baskin, S.I., Salem, H.:** Oxidants, antioxidants, and free radicals. Taylor and Francis, pp 26-35. Washington DC, 1997.
17. **Bast, A., Haenen, G.R., Doelman, C.J.:** Oxidants and Antioxidants: State of the Art. *Am. J. Med.* 91: 2-13, 1991.
18. **Bayda , G., Erçel, E., Canatan, H., Dönder, E., Akyol,A.:** Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. *Cell Biochem. Funct.* 19: 37-41, 2001.
19. **Baydas, G., Gursu, M.F., Yilmaz, S., Canpolat,S., Yasar, A., Cikim, G., Canatan, H.:** Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neurosci. Lett.* 323(3): 195-198, 2002.
20. **Beckett, G.J., Arthur, J.R.:** Selenium and endocrine systems. Review. *Journal of Endocrinology.* 184: 455–465, 2005.
21. **Bertuglia, S., Marchiafava, P.L., Colantuoni, A.:** Melatonin prevents ischemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation. *Cardiovascular Research.* 31(6): 947-752, 1996.
22. **Bettahi, I., Guerrero, J.M., Reiter, R.J., Osuna, C.:** Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of prostaglandin E2 and cyclic AMP production in rat hypothalamus: a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase. *J. Pineal Res.* 25(1): 34-40, 1998.
23. **Beyer, C.E., Steketee, J.D., Saphier, D.:** Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. *Biochem. Pharmacol.* 56(10): 1265-1272, 1998.

24. **Bohr, V.A., Dianov, G.L.:** Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie.* 81 (1-2): 155-160, 1999.
25. **Bolann, B.J., Ulvik, R.J.:** Improvement of a direct spectrophotometric assay for routine determination of superoxide dismutase activity. *Clinical Chemistry.* 37(11): 1993-1999, 1991.
26. **Borchert, A., Savaskan, N.E., Kuhn, H:** Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathion peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis-and trans-regulatory elements. *J. Biol. Chem.* 278(4): 2571-2580, 2003.
27. **Boveris, A.:** Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina.* 58(4): 350- 356, 1994.
28. **Brigelius-Flohe, R.:** Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27(9-10): 951–965, 1999.
29. **Brzezinski, A.:** Mechanisms of disease: melatonin in humans. *N. England J. Med.* 336(3): 186-195, 1997.
30. **Cam, M., Yavuz, Ö., Güven, A., Ercan, F., Bukan, N., Üstünda , N.:** Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pineal Res.* 35: 212-220, 2003.
31. **Canpolat, S., Aydin, M., Yasar, A., Colakoglu, N., Yilmaz, B., Kelestimur, H.:** Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on immunohistochemical ghrelin staining of arcuate nucleus and serum ghrelin levels in the rat. *Neurosci. Lett.* 410(2): 132-136, 2006.
32. **Cavallo, A., Ristchel, W.A.:** Pharmacokinetics of melatonin in human sexual maturation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81(5): 1882-1886, 1996.
33. **Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W., Harrison, P.R.:** The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J.* 5(6): 1221-7, 1986.
34. **Cheeseman, K.H., Slater, T.F.:** An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49(3): 481-493, 1993.

35. **Chen, C.Y., Shiesh, S.C., Tsao, H.C., Chen, F.F., Lin, X.Z.:** Protective effect of melatonin on renal injury of rats induced by bile duct ligation. *Digestive Dis. Sci.* 46(4): 927- 931, 2001.
36. **Chen, H., Liu, J., Luo, L., Baig, M.U., Kim, J-M., Zirkin, B.R.:** Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp. Gerontol.* 40: 728-736, 2005.
37. **Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T.:** Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Journal of the Turkish Nephrology.* 3-4: 92-95, 1997.
38. **Çolako lu, N., Ozan, E., Sönmez, M.F., Yılmaz, S., Ozan, G.:** Sigaranın karaci erde olu turdu u yapısal de i iklikler üzerine melatonin ve C vitamini nin etkileri. *Fırat Tıp Derg.* 10(3): 108-112, 2005.
39. **Çöven, N.:** Prenatal ve postnatal dönemdeki ratlarda testisin histogenezisi üzerinde ık mikrobik çalı malar. Doktora Tezi. Elazı , 1994.
40. **Dellmann, H.D, Brownn, E.M.:** Textbook of veterinary histology. 3rd Edition, Lea&Febiger. s: 282-308. Philadelphia, 1987.
41. **Dere, F.:** Anatomi. 3. Baskı, Okullar Pazarı Kırtasiye ve Tic. Pazarlama Ltd. ti. Adana, 1994.
42. **Diplock, A.:** Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p. Belgium, 1998.
43. **Do urman, H., Uzunören, N., kilimur, E., Altu , T.:** Melatonin uygulanan sıçanlarda a ırlık artı ı, gonad geli imi ve kan glutasyon düzeyleri. *Endokrinolojide Yöneli ler.* 7(4): 114-116, 1998.
44. **El-Sokkary, G.H., Reiter, R.J., Tan, D-X., Kim, S.J., Cabrera, J.:** Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. *Alcohol& Alcoholism.* 34(6): 842-850, 1999.
45. **Erdem, M., Bostan, B., Güne , T., Özkan, F., en, C., Özyurt, H., Köseo lu, R.D., Erdo an, H.:** Melatoninin iskelet kası iskemi-reperfüzyon yaralanması üzerine koruyucu etkisi. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi.* 21(3):166-171, 2010.
46. **Erdemir, F., Parlakta , B.S., Özyurt, H., Boztepe, Ö., Atı , Ö., ahin, .:** Antioxidant effect of melatonin in systemic circulation of rats after unilateral testicular torsion. *Turk J. Med. Sci.* 38(1): 1-6, 2008.

47. **Esposito, L.A., Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Cottrell, B., MacGregor, G.R., Wallace, D.C.:** Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 754-66, 2000.
48. **Esworthy, R. S., Ho, Y. S., Chu, F.F.:** The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 340: 59-63, 1997.
49. **Fawcett, D.W. :** A textbook of histology. W.B. Saunders Co. Philadelphia, 1986.
50. **Free, M.J., Schluntz, G.A., Jaffe, R.A.:** Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biol Reprod.* 14: 481-488, 1976.
51. **Fridovich, I.:** Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 239-257, 1983.
52. **Fukuhara, R., Kageyama, T.:** Structure, gene expression, and evolution of primate glutathione peroxidases. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.* 141: 428- 436, 2005.
53. **Garewal, HS.:** Antioxidants and disease prevention. CRC Press LLC. pp 3-19. Florida. 1997.
54. **Godeas, C., Tramer, F., Micali, F., Soranzo, M., Sandri, G., Enrico Panfili, E.:** Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction.* 57(6): 1502-1508, 1997.
55. **Gracy, R.W., Talent, J.M., Kong, Y., Conrad, C.C.:** Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutat. Res.* 428 (1-2): 17-22, 1999.
56. **Guerrero, J.M., Reiter, R.J., Ortiz, G.G., Pablos, M.I., Sewerynek, E., Chuang, J.I.:** Melatonin prevents increases in neural nitric oxide and cyclic GMP production after transient brain ischemia and reperfusion in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J. Pineal Res.* 23(1): 24-31, 1997.
57. **Gupta, D., Riedel, L., Frick, H.J.:** Circulating melatonin in children: In relation to puberty, endocrine disorders functional tests and racial origin. *Neuroendocrinol. Lett.* 5: 63-78, 1983.

- 58. Gutteridge, J. M.:** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*. 41: 1819-1828, 1995.
- 59. Güneli, E., Çiçek, R., Canoruç, N., Kelle, ., Akkoç, H., Dursun, M.** (2003). mmobilizasyon+So uk stresine maruz kalan sıçanlarda karaci er lipit peroksidasyon düzeyine vitamin E, selenyum ve allopurinolün etkileri. *T. Klin. J. Gastroenterohepatol*. 14(3): 167-172, 2003.
- 60. Habert R., Veniard, B., Brignaschi, P., Gangnerau, M.N., Picon, R.:** Absence of development of late steroidogenic lesions in rat testis during the end of fetal life. *Arch. Androl*. 22(1): 41-48, 1989.
- 61. Halliwell, B.:** Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 49(10): 1341-1348, 1995.
- 62. Halliwell, B.:** Free radicals and antioxidant: a personel view. *Nutr Rev*. 52: 253-265, 1994.
- 63. Halliwell, B., Cross, C.E.:** Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect*. 10: 5-12, 1994.
- 64. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.:** *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2.Edt. Oxford. 1996.
- 65. Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E.:** Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med*. 119(6): 598-620, 1992.
- 66. Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D-X.** The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 17(3): 347-357, 1993.
- 67. Hassa, O., A tı, R.N.:** *Embriyoloji*. Yorum Matbaacılık. S: 133-134. Ankara, 2003.
- 68. Hattori, A.C., Herbert, D.C., Vaughan, M.K., Yaga, K., Reiter, R.J.:** Melatonin inhibits luteinising hormone releasing hormone (LHRH) induction of LH release from fetal rat pituitary cells. *Neurosci. Lett*. 184:109–112, 1995.

69. **Heikkila, R.E., Cabbat, F.S., Cohen, G.:** In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. *J. Biol. Chem.* 251(7): 2182-2185, 1976.
70. **Helle, R.A., Jesper, B.N., Fleming, N.:** Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry.* 43(4): 562-68, 1997.
71. **Herbette, S., Roeckel-Drevet, P., Drevet, J. R.:** Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. Review. *FEBS J.* 274: 2163-80, 2007.
72. **Hogg, N.:** Free radical in disease. Semen repaired endocrine. 16(4): 241-248, 1998.
73. **Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H.:** Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal Histochemistry & Cytochemistry.* 29: 577-580, 1981.
74. **Hunt, J.V., Smith, C.C.T., Wolff, S.P.:** Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes.* 39: 1420-4, 1990.
75. **Ianas, O., Olivescu, R., Badescu, I.:** Melatonin involvement in oxidative processes. *Rom. J. Endocrinol.* 29:117-123, 1991.
76. **Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda, J., Shimizu, Y., Murata, M., Kumagai, J., Tanaka, T.:** Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol. Reprod.* 61(2): 393-399, 1999.
77. **Imai, H., Sumi, D., Hanamoto, A., Arai, M., Sugiyama, A.:** Nakagawa, Y. Molecular cloning and functional expression of a cDNA for rat phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: 3'-untranslated region of the gene is necessary for functional expression. *J. Biochem.* 118(5): 1061-1067, 1995.
78. **Imai, H., Suzuki, K., Ishizaka, K., Ichinose, S., Oshima, H., Okayasu, I., Emoto, K., Umeda, M., Nakagawa, Y.:** Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol. Reprod.* 64(2): 674-683, 2001.



- 79. Iquichi, H., Kato, K.I., Ibayashi, H.:** Age dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55: 27-29, 1982.
- 80. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O.:** Basic histology (Temel Histoloji). Çeviren: Aytekin, Y., Barı Kitabevi, 6. baskı, sayfa 495-516, stanbul, 1993.
- 81. Junqueira L.C., Carneiro, J., Kelley R.O.:** Temel Histoloji. (Çeviri editörü; Prof. Dr. Yener Aytekin). Barı Kitabevi. stanbul, (1992).
- 82. Ji, Y.L., Wang, H., Meng, C., Zhao, X.F., Zhang, C., Zhang, Y., Zhao, M., Chen, Y.H., Meng, X.H., Xu, D.X.:** Melatonin alleviates cadmium-induced cellular stress and germcell apoptosis in testes. *J. Pineal Res.* 52: 71-79, 2012.
- 83. Johnson, K.E.:** Histology and cell biology. 2nd Ed., Harwal Publishing Company, s: 295-304, USA, 1991.
- 84. Kampfer, C., Spillner, S., Spinnler, K., Schwarzer, J.U., Terradas, C., Ponzio, R., Puigdomenech, E., Levalle, O., Köhn, F.M., Matzkin, M.E., Calandra, R.S., Frungieri, M.B., Mayerhofer, A.:** Evidence for an adaptation in ROS scavenging systems in human testicular peritubular cells from infertility patients. *Int. J. Androl.* 35(6): 793-801, 2012.
- 85. Kanter, M.:** Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia–reperfusion injury in rats. *Experimental and Molecular Pathology.* 89(3): 314-320, 2010.
- 86. Kaur, P., Kaur, G., Bansal, M.P.:** Tertiary-butyl hydroperoxide induced oxidative stress and male reproductive activity in mice: Role of transcription factor NF-kappaB and testicular antioxidant enzymes. *Reprod. Toxicol.* 22: 479-484, 2006.
- 87. Khan, A.U., Wilson, T.:** Reactive oxygen species as cellular Messenger. *Chem. Biol.* 2(7): 437-445, 1995.
- 88. Klatz R, Goldman R.:** Stopping the clock. second Edition. Bantam Books. 27-47. New York, 1997.

- 89. Koral Ta ı, S., Glmez, N.:** Melatonin uygulanan farelerin karaci er dokusunda glutasyon peroksidazın immunohistokimyasal da ılımı ve RT PCR ile gen ekspresyonu. Doktora Tezi. Kars, 2011.
- 90. Kotler, M., Rodriguez, C., Sainz, R.M., Antolin, I., Menendez-Pelaez, A.:** Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J. Pineal Res.* 24: 83-89, 1998.
- 91. Krinke, G.J.:** The Laboratory Rat. 1st Ed, Academic Press, s: 150-152, 311-312, Switzerland, 2000.
- 92. Kus, I., Sarsilmaz, M., Colakoglu, N., Kukner, A., Ozen, O.A., Yilmaz, B., Kelestimur, H.:** Pinealectomy Increases and Exogenous Melatonin Decreases Leptin Production in Rat Anterior Pituitary Cells: an Immunohistochemical Study. *Physiol. Res.* 53: 403-408, 2004.
- 93. Ku , .:** Sıçanlarda pineal bez ile testisler arasındaki fonksiyonel ili kinin morfolojik olarak incelenmesi. Doktora Tezi. Elazığ, 1999.
- 94. Ku , I., Sarsilmaz, M., Ogetrk, M., Yilmaz, B., Kele timur, H., Oner, H.:** Ultrastructural interrelationship between the pineal gland and the testis in the male rat. *Arch. Androl.* 45(2): 119-124, 2000.
- 95. Ku , ., Zararsız, ., getrk, M., Yilmaz, H.R.:** Formaldehit nrotoksisitesine ba lı hipokampusta geli en oksidatif hasar ve melatonin hormonunun koruyucu etkisi: deneysel bir alı ma. *Fırat Tıp Derg.* 12(4): 256-260, 2007.
- 96. Kumagai, A., Kodama, H., Kumagai, J., Fujuda, J., Kawamura, K., Tanikawa, H., Sato, N., Tanaka, T.:** Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol. Hum. Reprod.* 8: 118-123, 2002.
- 97. Kwiecien, S., Brozowski, T., Konturek, S.J.:** Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *Journal of Physiology and Pharmacology.* 53(1): 39-50, 2002.
- 98. Lane, E.A., Moss, H.B.:** Pharmacokinetics of melatonin in man: First pass hepatic metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61(6): 1214-1216, 1985.

99. **Lankoff, A., Banasik, A., Nowak, M.:** Protective effect of melatonin against nodularin-induced oxidative stress in mouse liver. *Arch. Toxicol.* 76(3): 158-165, 2002.
100. **Lee, R.G.:** 'Fibrosis and cirrhosis'. *Diagnostic Liver Pathology*, First Ed, Mosby-year Book Inc. 280-304, 1994.
101. **Leeson, T.S., Leeson, C.R., Paparo, A.A.:** *Text/Atlas of Histology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1988.
102. **Lei, X.G., Cheng, W.H., McClung, J.P.:** Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. Review. *Annu. Rev. Nutr.* 27: 41-61, 2007.
103. **Luna, L.G.:** *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. Third Ed. Mc Graw-Hill Book Comp. London. 1968.
104. **Mackay, J.W., Bewley, G.C.:** The genetics of catalase in *Drosophila Melanogaster*: Isolation and characterization of acatalasemic mutants. *Genetics.* 122(3): 643-652, 1989.
105. **Mailer, K., Maestro, R.F.:** Stability of the anti-oxidative enzymes in aqueous and detergent solution, *Moll. Cell. Biochem.* 107(1): 47-54, 1991.
106. **Maiorino, M., Thomas, J.P., Girotti, A.W., Ursini, F.:** Ursini, F. Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides. *Free Radic. Res. Commun.* 12-13:131-135, 1991.
107. **Mannervik, B.:** The enzymes of glutathione metabolism: an overview. *Biochem. Soc. Trans.* 15(4): 717-718, 1987.
108. **Mannervik, B.:** Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 113: 490-5, 1985.
109. **Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B.:** Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17: 24-38, 2003.
110. **Marklund, S.L.:** Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79(24): 7634-7638, 1982.

111. **Mauriz, J.L., Molpeceres, V., García-Mediavilla, M.V., González, P., Barrio, J.P., M.V., González-Gallego, J.:** Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J.Pineal Res.* 42(3): 222-230, 2007.
112. **Mccord, J.M., Fridovich, I.:** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244(22): 6049-6055, 1969.
113. **Mehraein, F., Feraidoon Negahdar, F.:** Morphometric evaluation of seminiferous tubules in aged mice testes after melatonin administration. *Cell. Journal.* 13(1): 1-4, 2011.
114. **Mills, G. C.:** Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229: 189-97, 1957.
115. **Mogulkoc, R., Baltaci, A.K., Aydin, L., Oztekin, E., Tuncer, I.:** Pinealectomy increases oxidant damage in kidney and testis caused by hyperthyroidism in rats. *Cell. Biochem. Funct.* 24: 449-453, 2006.
116. **Moore, K.L., Persaud, T.V.N.:** The developing human, clinically oriented embryology. 5 th ed., W.B. Saunders Co. Philadelphia. 1993.
117. **Mruk, D.D., Silvestrini, B., Mo, M.Y., Cheng, C.Y.:** Antioxidant superoxide dismutase - A review: Its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* 65(4): 305-311, 2002.
118. **Nawar, W.W.:** Lipids. In "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), pp: 225-319. Marcel Dekker. New York. 1996.
119. **Nayernia, K., Diaconu, M., Aumüller, G., Wennemuth, G., Schwandt, I., Kleene, K., Kuehn, H., Engel, W.:** Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: expression pattern during testicular development in mouse and evolutionary conservation in spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development.* 67(4): 458-464, 2004.
120. **Nenicu, A., Lüers, G.H., Kovacs, W., Bergmann, M., Baumgart-Vogt, E.:** Peroxisomes in Human and Mouse Testis: Differential Expression of Peroxisomal Proteins in Germ Cells and Distinct Somatic Cell Types of the Testis. *Biol. Reprod.* 77(6): 1060-1072, 2007.

121. **Ng, T.B., Ooi, V.E.C:** Effect of pineal indoles on testicular histology of mice. *Arch. Androl.* 25(2): 137-145, 1990.
122. **Nishida, S.:** Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. *Endocrine.* 27:131-6, 2005.
123. **Nonogaki, T., Noda, Y., Narimoto, K., Shiotani, M., Mori, T., Matsuda, T., Yoshida, O.:** Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. *Hum. Reprod.* 7(1): 81–85, 1992.
124. **Oberley, T.D., Oberley, L.W., Slattery, A.F., Elwell, J.H.:** Immunohistochemical localization of glutathione-S- transferase and glutathione peroxidase in adult Syrian hamster tissues and during kidney developmnet. *Am. J. Pathol.* 139 (2): 355-369, 1991.
125. **Oberley, T.D., Oberley, L.W., Slattery, A.F., Lauchner, L.J., Elwell, J.H:** Immunohistochemical localization of antioxidant enzymes in adult Syrian hamster tissues and during kidney development. *Am. J. Pathol.* 137: 199-214, 1990.
126. **Ödar, V.:** *Anatomi.* Hacettepe Tas Kitapçılık Ltd. Sti., Ankara, 1986.
127. **Oksidatif Stres:** [http://odevsitesi.com/default.asp? islem=dok\\_ indir&odevno =51936.](http://odevsitesi.com/default.asp?islem=dok_indir&odevno=51936) 2006.
128. **Onur, R., Semerciöz, A., Orhan, I., Yekeler, H.:** The effects of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulator proteins (Bax and Bcl-2) in experimentally induced varicocele. *Urol. Res.* 32: 204-208, 2004.
129. **Ooi, V.E.C, Ng, T.B.:** Histological studies on the effects of pineal 5-methoxyindoles on the reproductive organs of the male golden hamsters. *J Pineal Res.* 7(4): 315–324, 1989.
130. **Ookawara, T., Imazeki, N., Matsubara, O., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Nakao, C., Sato, Y., Ohno, H.:** Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am. J. Physiol.* 275: 840-847, 1998.
131. **Öner yido an, Y., Gürdöl, F., Öner, P.:** The effects of acute melatonin and ethanol treatment on antioxidant enyzme activities in rat testes. *Pharmacological Research.* 44(2): 89-93, 2001.

132. **Özdemir, G:** Reaktif oksijen partikülleri. Roche bilimsel eserler serisi. Eski ehir, 1993.
133. **Pablos, M.I., Reiter, R.J., Ortiz, G.G., Guerrero, J.M., Aqapito, M.T., Chuang, J.I., Sewerynek, E.:** Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem. Int.* 32(1): 69-75, 1998
134. **Pahkla, R., Zilmer, M., Kullisaar, T., Rago, L.:** Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro. *J. Pineal Res.* 24(2): 96-101, 1998.
135. **Pang, S.F., Allen, A.E.:** Extra-pineal melatonin in the retina: Its regulation and physiological function. *Pineal Res. Rev.* 4:55–95, 1986.
136. **Peltola, V., Mantyla, E., Huhtaniemi, I., Ahotupa, M.:** Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the rat testis after cigarette smoke inhalation or administration of polychlorinated biphenyls or polychlorinated naphthalenes. *J. Androl.* 15: 353-361, 1994.
137. **Percy, M.E.;** Catalase : An old enzyme with a new role? *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 62(10): 1006-1014, 1984.
138. **Peskin, A.V.:** Interaction of reactive oxygen species with DNA. A review. *Biochemistry.* 62(12): 1341-1347, 1997.
139. **Powers, S.K., Leeuwenburgh, C.:** Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 31(7): 987-997, 1999.
140. **Puglisi, R., Bevilacqua, A., Carlomagno, G., Lenzi, A., Gandini, L., Stefanini, M., Mangia, F., Boitani, C.:** Mice overexpressing the mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in male germ cells show abnormal spermatogenesis and reduced fertility. *Endocrinology.* 148 (9):4302–4309, 2007.
141. **Quinn, P.G., Payne, A.H.:** Oxygen-mediated damage of microsomal cytochrome P-450 enzymes in cultured leydig cells: Role in steroidogenic desensitization. *J. Biol. Chem.* 259: 4130-4135, 1984.

142. **Rashed, R.M., Mohamed, I.K., El-Alfy, S.H.:** Effects of Two Different Doses of Melatonin on the Spermatogenic Cells of Rat Testes: A Light and Electron Microscopic Study. *Egypt. J. Histol.* 33(4): 819-835, 2010.
143. **Reiter, R.J.:** Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur. J. Endocrinol.* 134(4): 412-420, 1996.
144. **Reiter, R.J.:** The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochem. Int.* 27(6): 453-60, 1995.
145. **Reiter, R.J.:** Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals:a brief review. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 26(11): 1141-1155, 1993.
146. **Reiter, R.J.:** Melatonin. The chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.* 79: 153-158, 1991.
147. **Reiter, R.J., Carneiro, R.C., Oh, C.S.:** Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm. Metab. Res.* 29(8): 363-372, 1997.
148. **Reiter, R.J., Rudenn, P.K., Sackman, J.W., Vaughan, M.K., Johnson, L.Y., Little, J.C.:** Subcutaneous melatonin implants inhibit reproductive atrophy in male hamsters induced by daily melatonin injections. *Endocr. Res. Commun.* 4(1): 35-44, 1977.
149. **Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C., Gitto, E.:** Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J. Biomed. Sci.* 7(6): 444- 458, 2000.
150. **Rios-Lugo, M.J., Joménez-Ortega, V., Fernández-Mateos, M.P., Scacchi, P.A., Cardinali, D.P., Esquifino, A.I.:** Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *J. Pineal Res.* 49(4): 342-348, 2010.
151. **Rivest, R.W., Jaconi, M.E., Gruaz, N., Sizenenko, P.C., Aubert, M.L.:** Short-term and long-term effects of melatonin on GnRH-stimulated gonadotropin secretion in pituitaries of sexually maturing rats. *Neuroendocrinology.* 46(5): 379–386, 1987.
152. **Ross, M.H., Kaye I.G., Pawlina, W.:** *Histology a text and atlas.* 4.th edition, Lippincott Williams&Wilkins Press. Page 690-694. USA, 2003.

153. **Ross, M.H., Romrell, L.J., Kaye, G.I.:** Histology. A Text and Atlas. 3rd., Williams&Wilkins. Baltimore. 1995.
154. **Roveri, A., Casasco, A., Maiorino, M., Dalan, P., Calligaro, A., Ursini, F.:** Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J. Biol. Chem.* 267(9): 6142-6146, 1992.
155. **Russell, L.D., Ettlin, R.A, Hikim, A.P.S., Cleg, E.D.:** Histological and histopatological evaluation of the testis. Cache River Press, page 1-160, USA. 1990.
156. **Sakai, Y., Aminaka, M., Takata, A., Kudou, Y., Yamauchi, H., Yoshiharu Aizawa, Y., Sakagami, H.:** Oxidative stress in mature rat testis and its developmental changes. *Develop. Growth Differ.* 52: 657-663, 2010.
157. **Semercioz, A., Onur, R., Ogras, S., Orhan, I.:** Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experimentally induced left varicocele. *Neuro Endocrinol. Lett.* 24(1-2): 86-90, 2003.
158. **Serbest Radikal Nedir?** [http://img.vebso.hu/p/tr/wl/doc/Nutriway\\_Natural\\_Multi\\_Carotene.PDF](http://img.vebso.hu/p/tr/wl/doc/Nutriway_Natural_Multi_Carotene.PDF). 2006.
159. **Shu, S., Ju, G. ve Fan, L.:** The glucose oxidase-dab-nickel in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience Lett.* 85: 169–171, 1988.
160. **Sichak, S.P., Basu D., Turner, C.:** Failure of benzene and phenol to serve as substrates for the peroxidatic action of catalase. *J. Toxicol. Environ. Health.* 31(3): 227-233, 1990.
161. **Sichak, S.P., Dounce, A.L.:** Analysis of the peroxidatic mode of action of catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* 249(2) :286-295, 1986.
162. **Sies, H.:** Oxidative stress: From Basic Research to Clinical Application. *Am. J. Med.* 91(3): 31-8, 1991.
163. **Simsek, N., Kaya, M., Kara, A., Can, I., Karadeniz, A., Kalkan, Y.:** Effects of melatonin on islet neogenesis and beta cell apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats: an immunohistochemical study. *Domestic Animal Endocrinology.* 43: 47-57, 2012.



164. **Sirotkin, A.V., Schaeffer, H.J.:** Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. *J. Endocrinol.* 154: 1-5, 1997.
165. **Skinner, D.C., Malpaux, B.:** High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology.* 140: 4399–4405, 1999.
166. **Sönmez, M., Yüce, A., Türk, G.:** The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reproductive Toxicology.* 23(2): 226-231, 2007.
167. **SPSS Inc.,** Released 2007. *SPSS for Windows, Version 16.0.* Chicago.
168. **Stadtman, T.C.:** Biological function of selenium. Review. *Nutr. Rev.* 35(7): 161-6, 1977.
169. **Steinman, H.;** *Superoxide dismutases: Protein chemistry and structure-function relationships,* CRC Press. 1: 11-68, 1982.
170. **Stohs, S.J.:** The role of free radicals in toxicity and disease. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* 6 (3-4): 205-228, 1995.
171. **Sun, Y., Oberley, L.W., Elwell, J.H., Sierra-Rivera, E.:** Antioxidant enzyme activities in normal and transformed mouse liver cells. *Int. J. Cancer.* 44(6): 1028-1033, 1989.
172. **ener, G., Jahovic, N., Tousn, O., Atasoy, B.M., Ye en, B.Ç.:** Melatonin ameliorates ionizing radiation-induced oxidative organ damage in rats. *Life Sciences.* 74(5): 563-572, 2003.
173. **Tan, D-X., Chen L-D., Poeggeler, B., Manchester, L.C., Reiter, R.J.:** Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1:57-60, 1993.
174. **Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W.B, Hanes, M.A., Farley, N.J.:** High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci.* 65(23): 2523 2529, 1999.

- 175. Tan, D.X., Manchester, L.J., Reiter, R.J., Qi, W.B., Zhanq, M., Weintraub, S.T., Cabrera, J., Sainz, R.M., Mayo, J.C.:** Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: Its origin and significance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1472(1-2): 206– 214, 1999.
- 176. Tan, D.X., Pöeggeler, B., Reiter, R.J., Chen, L.D., Manchester, L.C., Barlow-Walden, L.R.:** The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen role in vivo. *Cancer Lett.* 70(1-2): 65-71,1993.
- 177. Tan, D.X., Reiter, R.J., Manchester, L.C., Yan, M.T., El-Sawi, M., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Kohen, R., Allegra, M., Hardeland, R.:** Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Top. Med. Chem.* 2: 181–197, 2002.
- 178. Tanyolaç, A:** Özel histoloji. 3. Baskı, Yorum basın yayın, s: 132-143, Ankara, 1999.
- 179. Tekcan, M.:** Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis. *Infertilite, Androloji bülteni.* 37: 131-136, 2009
- 180. Terron, M.P., Delgado-Adamez, J., Pariente, J.A., Barriga, C., Paredes, S.D., Rodriguez, A.B.:** Melatonin reduces body weight gain increases nocturnal activity in male Wistar rats. *Physiology & Behavior.* 118: 8-13, 2013.
- 181. Thomas, L., Drew, J.E., Abramovich, D.R., Williams, L.M.:** The role of melatonin in the human fetus (review). *Int. J. Mol. Med.* 1(3):539-543, 1998.
- 182. Thomas, J.P., Maiorino, M., Ursini, F., Girotti, A.W.:** Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* 265(1): 454–461, 1990.
- 183. Topal, T., Öter, ., Korkmaz, A.:** Melatonin ve kanserle ili kisi. *Genel Tıp Derg.* 19(3):137-143, 2009.
- 184. Trainer, T.D.:** Histology of the normal testis. *Am. J. Surg. Pathol.* 11: 797-809, 1987.

185. **Tran, D., Picard, J.Y., Campargue J., Josso, N.:** Immunocytochemical detection of anti-müllerian hormone in sertoli cells of various mammalian species including human. *J. Histochem. Cytochem.* 35(7): 733-43, 1987.
186. **Tuncer, I., Sunar, F., Toy, H., Baltaci, A.K., Mogulkoc, R.:** Histological effects of zinc and melatonin on rat testes. *Bratisl. Lek. Listy.* 112(8): 425-427, 2011.
187. **Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Todoroki, S., Iida, T., Cho, S., Honma, K., Kondo, T.: et al.** Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol. Med.* 27(7-8): 838-847, 1999.
188. **Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohé, L.:** Diversity of glutathione peroxidases. *Meth. Enzymol.* 252: 38-53, 1995.
189. **Ursini, F., Maiorino, M., Gregolin, C.:** The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 839(1): 62–70, 1985.
190. **Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., Gregolin, C.:** Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta.* 710(2): 197–211, 1982.
191. **Valenti, S., Guido, R., Giusti, M., Giordano, G.:** In vitro acute and prolonged effects of melatonin on purified rat Leydig cell steroidogenesis and adenosine 3, 5 –monophosphate production. *Endocrinology.* 136: 5357–5362, 1995.
192. **Vanecek, J.:** Inhibitory effect of melatonin on GnRH induced LH release. *Rev. Reprod.* 4: 67–72, 1999.
193. **Vanecek, J.:** Melatonin inhibited release of luteinising hormone (LH) via decrease of Ca<sup>2+</sup> and cyclic AMP. *Physiol. Res.* 47: 329–335, 1998.

- 194. Vardı, N., Iraz, M., Öztürk, F., Gül, M., Uçar, M., Çetin, A., Nalçacı, N., Otlu, A.:** Deneysel diyabetin sıçan karaci erinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkileri. *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.* 27: 641-648, 2007.
- 195. Vermeulen, M., Palermo, M., Giordano, M.:** Neonatal pinealectomy impairs murine antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Neuroimmunol.* 43: 97-101, 1993.
- 196. Voordouw, B.C., Euser, R., Verdonk, R.E., Alberda, B.T., de Jong, F.H., Drogendijk, A.C., Fauser, B.C., Cohen, M.:** Melatonin and melatonin-progestin combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74(1):108-117, 1992.
- 197. Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N.:** Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J. Pineal Res.* 31: 193-198, 2001.
- 198. Waldhauser, F., Weiszenbacher, G., Tatzer, E., Gisinger, B., Waldhauser, M., Schemper, M., Frisch, H.:** Alternations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 648-52, 1988.
- 199. Webley, G.E., Luck, M.R.:** Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 78(2): 711-717
- 200. Wolden-Hanson, T., Mitton, D.R., McCants, R.L., Yellon, S.M., Wilkinson, C.W., Matsumoto, A.M., Rasmussen, D.D.:** Daily melatonin administration to middle-age male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology.* 141(2): 487-497, 2000.
- 201. Yazıcı, C.:** Sentetik Seks Steroidlerinin ve Melatoninin Oksidan Antioksidan Sistem Üzerine Etkilerinin Rat Modelinde Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. Kayseri, 1999.
- 202. Yazıcı, C., Köse, K.:** Melatonin: Karanlıkta antioksidan gücü. *Erciyes Üniv. Sa. Bil. Derg.* 13(2): 56-65, 2004.

- 203. Young, I.S., Woodside, J.V.:** Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol. 54: 176-186, 2001
- 204. Zagal, A., Mazmancı, B.:** Tekstil atık suyunun *oreochromis niloticus*'da toksik etkisinin bazı antioksidan enzimler kullanılarak ara tırılması. Yüksek Lisans Tezi. Mersin, 2008.
- 205. Zangar, R.C., Davydov, D.R., Verma, S.:** Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. Toxicol. Appl. Pharmacol. 199:316-331, 2004.
- 206. Zel, A., Dadoo, R., Geer, B.W., Heinstra, P.W.H:** The involvement of catalase in alcohol metabolism in *Drosophila melanogaster* larvae. Arch. Biochem. Biophys. 287(1): 121-127, 1991.
- 207. Zini, A., and Schlegel, P. N.:** Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. J. Androl., 17: 473, 1996

## 9. ÖZGEÇM

Kars 1980 doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Kars'ta tamamladım. 1999 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi'nde lisans öğrenimime başladım ve 2004 yılında bu fakülteden mezun oldum. 2004 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans öğrenimime başladım ve 2007 yılında yüksek lisans öğrenimimi tamamladım. 2007 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimime başladım. 2009 yılında Kafkas Üniversitesi Kars Meslek Yüksek Okulu'na Öğretim Görevlisi olarak atandım halen aynı görevime devam etmekteyim. Evliyim.