

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

**TÜTÜN DUMANINA MARUZ KALAN RATLARDA
ELLAJİK ASİDİN TESTİS DOKUSUNDAKİ
ANTIOKSİDAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NALAN KAYA

2015

ONAY SAYFASI

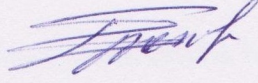
Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Enver OZAN

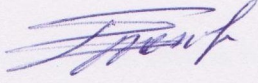
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı



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

Prof. Dr. Enver OZAN

Danışman

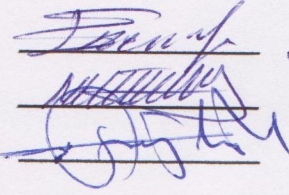


Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Enver Ozan

Doç. Dr. Mehmet Gül

Yrd. Doç. Dr. Tunçay KULOĞLU



İTHAF SAYFASI

Sevgili Aileme...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince tecrübelerinden faydalandığım, değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. İ. Enver OZAN 'a, tezimin değerlendirme aşamasında ilgi, öneri ve yardımlarından dolayı tez projesi yardımcı yürütücü hocalarım sayın Doç. Dr. Dürrin Özlem DABAK'a ve Yrd. Doç. Dr. Gonca OZAN' a,

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

Tez çalışmamda yardımcı olarak katkıda bulunan değerli arkadaşım Bio. Osman Fatih YILMAZ ile yüksek lisans arkadaşlarım Songül AY YILMAZ'a ve Füsun ERHAN'a,

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

Son olarak yaşamım boyunca destekleri hiç esirgemeyen canım aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI.....	ii
İTHAF SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	5
3. GİRİŞ	9
3.1. Testis	9
3.1.1. Testis Anatomisi	9
3.1.2. Testis Embriyolojisi.....	11
3.1.3. Testis Fizyolojisi.....	15
3.1.4. Testis Histolojisi	18
3.1.4.1. Testisler	18
3.1.4.2. Seminifer tübüller.....	18
3.1.4.3. Sertoli hücreleri.....	20
3.1.4.4. Leydig hücreleri	20
3.1.4.5. Spermatogenez	21
3.1.4.6. Spermiyogenez.....	22
3.2. Tütün	23
3.2.1. Tütün Kullanımın Tarihçesi.....	23
3.2.2. Tütünün İçeriği	24
3.2.3. Tütün Ürünlerinin Kullanımı	26
3.2.4. Tütün Kullanımının Epidemiyolojisi	26
3.2.5. Tütün Dumanının Vücuttaki Etkileri.....	27

3.3. Serbest Radikaller.....	28
3.4. Nitrik Oksit ve Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz.....	31
3.5. Apoptozis.....	32
3.6. Antioksidanlar	33
3.7. Fenolik Fitokimyasallar.....	36
3.7.1. Ellajik Asit.....	37
3.7.2. Farmakolojik Aktiviteleri.....	38
3.7.3. Moleküler Hedefleri.....	39
3.7.4. Antioksidatif Etkisi.....	39
3.8. Araştırmanın Amacı	40
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
4.1. Deney Hayvanlarının Beslenmeleri ve Barındırılmaları	41
4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	42
4.3. Deney düzeneği ve tütün dumanının verilmesi	43
4.4. Doku Örneklerinin Alınması	44
4.5. Vücut ve Organ Ağırlıklarının Ölçülmesi	45
4.6. Semen Analizi	45
4.6.1. Sperm Yoğunluğu	45
4.6.2. Sperm Motilitesi	46
4.7. Histolojik Değerlendirmeler.....	46
4.8. TUNEL Metodu	48
4.9. İmmunohistokimyasal Değerlendirme	50
4.10. Biyokimyasal Analizler.....	52
4.10.1. Testis dokusunda malondialdehit düzeyinin tayini.....	53
4.10.2. Testis dokusunda katalaz aktivitesinin tayini	53
4.10.3. Testis dokusunda glutatyon peroksidaz aktivitesinin tayini	53
4.11. İstatistiksel Analiz	54
5. BULGULAR.....	55
5.1. Vücut Ağırlık Değişim Yüzdesi	55
5.2. Üreme organları ağırlıkları.....	55

5.3. Rölafif testis ağırlığı	56
5.4. Semen Analizi	57
5.6. Histolojik Değerlendirmeler	58
5.7. TUNEL Bulguları	66
5.8. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) İmmünreaktivitesi	70
5.9. Biyokimyasal Analizler	74
6. TARTIŞMA	76
7. KAYNAKLAR	82
8. ÖZGEÇMİŞ	92

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: Tütün kullanımının vücuttaki etkileri	28
Tablo 2: Serbest radikaller	29
Tablo 3: Antioksidanların sınıflandırılması	35
Tablo 4: Ratlara verilen pelet yemin bileşimi	42
Tablo 5: Histolojik takip işlem basamakları	47
Tablo 6: TUNEL boyaması işlem basamakları	49
Tablo 7: İmmünohistokimyasal boyama prosedürü	51
Tablo 8: Üreme organ ağırlıkları	56
Tablo 9: Semen parametreleri	57
Tablo 10: Histolojik değerlendirmelere ait histoskor tablosu.....	59
Tablo 11: Apoptotik indeks.....	67
Tablo 12: eNOS immünreaktivitesi.....	71
Tablo 13: Grupların testis dokusu MDA, CAT, GSH-Px düzeyleri.....	75

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Testisin anatomik görünümü.....	11
Şekil 2: Gonadal gelişim.....	14
Şekil 3: Spermatogenezin hormonal kontrolü.....	17
Şekil 4: Testisin histolojik görünümü.....	19
Şekil 5: Spermatogenez.....	22
Şekil 6: Apoptozis oluşum yolağı.....	33
Şekil 7: Ellajik asidin kimyasal yapısı.....	38
Şekil 8: Ellajik asitin moleküler hedefleri.....	39
Şekil 9: Deney hayvanlarının tütün dumanına maruz bırakılma düzeneği.....	44
Şekil 10: Vücut ağırlık değişim yüzdesi. Değerler ortalama olarak verilmiştir...55	
Şekil 11: Rölatif testis ağırlığı (gr). Değerler ortalama olarak verilmiştir.....56	
Şekil 12: Tüm gruplara ait sperm görüntüleri.....	58
Şekil 13: Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, interstisyel alan ve normal spermatogenez. H&E.....	60
Şekil 14: Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, bazal membranı ve interstisyel alan ve normal spermatogenez. PAS.....	60
Şekil 15: Kontrol grubu. Normal histolojik görünümlü seminifer tübül germinal epiteli ve bazal membranı, interstisyel alan ve normal spermatogenez. Masson'un üçlü boyası.....	61
Şekil 16: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler, atrofik tübül, interstisyel alanda ödem ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon. H&E.....	61

Şekil 17: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül bazal membranında ayrılmalar, vasküler konjesyon. H&E.....	62
Şekil 18: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül bazal membranında ayrılmalar ve interstisyel alanda ödem. PAS.....	62
Şekil 19: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon, vasküler konjesyon ve interstisyel alanda ödem. Masson'un üçlü boyası.....	63
Şekil 20: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. Seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon. H&E.....	63
Şekil 21: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. Seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon. PAS.....	64
Şekil 22: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. Vasküler konjesyon ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon. Masson'un üçlü boyası.....	64
Şekil 23: Tütün dumanı + EA grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli ve normal spermatogenez H&E.....	65
Şekil 24: Tütün dumanı + EA grubu. Normal görünümlü seminifer tübül bazal membranı, seminifer tübül germinal epiteli ve vasküler konjesyonda azalma. PAS.....	65
Şekil 25: Tütün dumanı + EA grubu. Normal görünümlü seminifer tübül bazal membranı ve normal spermatogenez. Masson'un üçlü boyası.....	66
Şekil 26: Kontrol grubu. TUNEL pozitif hücre.....	67
Şekil 27: Tütün dumanı grubu. TUNEL pozitif hücre.....	68
Şekil 28: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. TUNEL pozitif hücre.....	68

Şekil 29: Tütün dumanı + EA grubu. Az sayıda TUNEL pozitif hücre.....	69
Şekil 30: Pozitif kontrol rat meme dokusu. TUNEL pozitif hücre.....	69
Şekil 31: Negatif kontrol. TUNEL.....	70
Şekil 32: Kontrol grubu. İnterstisyel alanda eNOS immünreaktivitesi.....	71
Şekil 33: Tütün dumanı grubu. İnterstisyel alanda artmış eNOS immünreaktivitesi	72
Şekil 34: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. İnterstisyel alanda artmış eNOS immünreaktivitesi.....	72
Şekil 35: Tütün dumanı + EA grubu. İnterstisyel alanda eNOS immünreaktivitesi	73
Şekil 36: Negatif kontrol.....	73

KISALTMALAR LİSTESİ

- ABP** : Androjen bağlayıcı protein
- AEC** : 3-Amino-9-ethyl carbazole
- AMH** : Anti-Müllerian hormon
- ATP** : Adenozin trifosfat
- CO** : Karbon monoksit
- CAT** : Katalaz
- DAB** : Diamino benzidin
- DNA** : Deoksiribonükleik asit
- EA** : Ellajik asit
- eNOS** : Endotelyal nitrik oksit sentaz
- FSH** : Follikül stimüle edici hormon
- GHS-Rd** : Glutasyon redüktaz
- GnRH** : Gonadotropin serbestleyici hormon
- GSH** : Glutasyon
- GSH-Px** : Glutasyon peroksidaz
- GSSG** : Okside glutasyon
- H&E** : Hematoksilen- Eozin
- H₂O₂** : Hidrojen peroksit
- HRP** : Horse Radish Peroksidaz
- IL-1a** : İnterlökin-1a
- IL-6** : İnterlökin-6
- LH** : Luteinizan hormon
- NADPH** : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat- hidrojen

- NO** : Nitrik oksit
- NOS** : Nitrik oksit sentazlar
- nNOS** : Nöronal nitrik oksit sentaz
- Nrf 2** : Nükleer eritroit-2 bağlantılı faktör-2
- PAS** : Periyodik Asit Schiff
- PBS** : Phosphate buffered saline
- RNS** : Reaktif nitrojen türleri
- ROS** : Reaktif oksijen türleri
- SOD** : Süperoksit dismutaz
- TBA** : Tiobarbitürik asit
- TBF** : Testis belirleyici faktörü
- TUNEL** : Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling
- TNF-a** : Tümör nekrosiz faktör a

1. ÖZET

Tütün dumanında bulunan kimyasalların dokularda oluşturduğu oksidatif stres sonucunda; hücrel metabolizmada bozukluklar, lipit peroksidasyonu, membran geçirgenliğinde artış, protein ve DNA oksidasyonu meydana gelir. Tütün dumanına maruz kalınması sonucunda, birçok dokunun ve organın zarar gördüğü bilinmektedir.

Tütün dumanında bulunan ve kan yoluyla vücudun her yerine taşınan toksik maddelerin dokulardaki oksidan - antioksidan sistemler arasındaki dengeyi bozması olasıdır. Bu durumda artan serbest radikaller, doku hasarına yol açacaktır.

Ellajik asit nar, çilek, böğürtlen, ahududu ve üzüm gibi birçok bitkide bulunan ve dokuları oksidatif hasara karşı koruması ile tanınan polifenolik bir bileşiktir. Ayrıca antikanserojenik, antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkileri de bilinmektedir.

Bu çalışmada tütün dumanının testis dokusunda meydana getireceği oksidatif hasara karşı, güçlü bir antioksidan olan ellajik asidin koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 8 haftalık ve ortalama 200±10 g ağırlığında 24 adet erişkin Sprague-Dawley cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar; grup I (Kontrol), grup II (Tütün dumanına maruz bırakılan), grup III (Tütün dumanına maruz bırakılan + mısırözü yağı) ve grup IV (Tütün dumanına maruz bırakılan + Ellajik asit) olmak üzere rastgele 4 eşit gruba ayrıldı.

Grup II, grup III ve grup IV' deki ratlar, günde iki defa birer saat tütün dumanına maruz bırakıldı. Grup III' deki ratlara tütün dumanına ilaveten ellajik asidi çözümede kullanılan miktarda mısırözü yağı, grup IV'deki ratlara ise tütün dumanına ilaveten mısırözü yağında çözülmüş ellajik asit 12 mg/kg dozunda gün aşırı oral gavaj yoluyla verildi.

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

Tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarındaki ratların ortalama vücut ağırlık değişim yüzdesinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Tütün dumanı + ellajik asit grubu ile diğer gruplar arasında ise istatistiksel açıdan fark bulunamadı.

Sağ ve sol testis ağırlıkları açısından tütün dumanı + ellajik asit grubunda tütün dumanı grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0,05$). Epididimis, prostat bezi ve seminal vezikül ağırlıklarında ise gruplar arası istatistiksel bir farklılık olmadığı tespit edildi.

Tütün dumanı + ellajik asit grubundaki ratların rölatif testis ağırlıklarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi.

Sperm yoğunluğu ve sperm motilitesi değerlerinin gruplar arasındaki farkı istatistiksel açıdan anlamsız bulundu. Tütün dumanı uygulamasının kontrol grubu

ile karşılaştırıldığında anormal sperm miktarını anlamlı biçimde arttırdığı tespit edildi. Ellajik asit uygulamasının ise anormal sperm miktarını tütün dumanı grubuna kıyasla ciddi anlamda düşürdüğü tespit edildi.

Işık mikroskobu altında yapılan histolojik değerlendirmelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tütün dumanına maruz bırakılan gruba ait kesitlerde seminifer tübül germinal epitelinde önemli derecede dejenerasyon, seminifer tübülün bazal membranlarında ayrılmalar, vasküler konjesyon, atrofik tübüller, interstisyel alanda ödem, ve bazı tübüllerin lümenlerine dökülmüş immatür hücreler tespit edildi. Tütün dumanı + mısırözü yağı uygulanan gruba ait kesitlerde ise yalnızca tütün dumanına maruz bırakılan grup II ile benzer bulgulara rastlandı.

Tütün dumanı ile birlikte ellajik asit uygulanan grupta ise; testis dokusunda germinal epitel dejenerasyonunda, vasküler konjesyonda, interstisyel ödemde belirgin iyileşme ve seminifer tübül bazal membranlarındaki ayrılmalarda azalma gözlemlendi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarında TUNEL pozitif hücrelerde anlamlı bir artış vardı. Tütün dumanı + ellajik asit grubunda ise, TUNEL pozitif hücre sayısının kontrol grubu ile benzer olduğu belirlendi.

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

Malondialdehit (MDA) düzeylerinin kontrol grubuna göre tütün dumanı ve tütün dumanı+ mısırözü yağı gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı, ellajik asit uygulamasının ise MDA seviyesini kontrole yakın bir düzeye indirdiği tespit edildi. Katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitelerinin; kontrol grubuna göre tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulundu. Tütün dumanı + ellajik asit grubunda ise hem CAT hem de GSH-Px aktivitelerinin tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarına kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı tespit edildi.

Sonuç olarak yapılan bu deneysel çalışma sonucunda tütün dumanına maruz kalmanın erkek üreme sistemini etkileyerek hasar verdiği tespit edildi. Tütün dumanı maruziyetine karşı koruyucu amaçla kullanılan ellajik asidin ise; antioksidan özelliği sayesinde, tütün dumanının oluşturduğu olumsuz etkileri belirgin biçimde azalttığı gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Tütün dumanı, Ellajik asit, Histoloji, Biyokimya, Testis.

2. ABSTRACT

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

The disorders on cellular metabolism, lipid peroxidation, increase on membrane permeability, protein and DNA oxidation occurs because of the oxidative stress on tissues created by chemicals in tobacco smoke. It is known that exposure to tobacco smoke damages many tissues and organs.

Toxic substances in tobacco smoke which are carried to every part of the body by blood, are likely to disturb the balance between oxidant - antioxidant systems on tissues. In this case, increased free radicals cause tissue damage.

Ellagic acid is a polyphenol compound that found in fruits such as pomegranate, strawberry, blackberry, raspberry and grape. Its known that ellagic acid has protective effects against oxidative damage. Also its anti-cancerogenic, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects are known.

In our study, it is aimed to examine the protective effects of ellagic acid, which is a powerful anti-oxidant, against oxidative damage on testis tissue caused by the chemicals in tobacco smoke.

In this study, 8 weeks old and average 200±10 grams weight twenty-four male Spraque-Dawley rats were used. The rats were divided randomly into 4 equal groups: group I (Control), group II (Tobacco smoke), group III (Tobacco smoke + corn oil) and group IV (Tobacco smoke + ellagic acid).

The rats in group II, III and IV were exposed to tobacco smoke 1 hour twice a day. In addition to tobacco smoke exposure, 12 mg/kg and dissolved in

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

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

A significant decrease of percentage of body weight change was detected in tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil groups when compared with control group. There was no significantly difference between tobacco smoke + ellagic acid and the other groups in terms percentage of body weight change.

Right and left testis weights of rats in tobacco smoke + ellagic acid group, significantly increased compared with control group. There was no statistically difference detected in epididymis, prostate and seminal vesicle weights between the groups.

The relative testis weights of rats in tobacco smoke + ellagic acid group were significant increased compared to the control group.

The difference of sperm motility and sperm concentration between the groups wasn't found significant. A significant increase in abnormal sperm amount was detected in tobacco smoke group compared with control group. The reduction

in the amount of abnormal sperm was found in tobacco smoke + ellagic acid group compared with tobacco smoke group.

In histological examination with light microscope of rat testis tissues in tobacco smoke group compared with control group; degeneration in seminiferous tubule germinative epithelium, separation in basement membranes, vascular congestion, atrophic tubules, edema in interstitial area and immature cell debris in tubule lumen were detected. On the other hand, in the rat testis which were experimented tobacco smoke + corn oil, similar finding with the tobacco smoke group were detected.

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

In tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil groups, a significant increase was detected in TUNEL positive cells number compared to the control group. In tobacco smoke + ellagic acid group, the number of TUNEL positive cells was detected similar to control group.

A significantly increased eNOS immunoreactivity was observed in tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil group compared to the control group. On the other hand, eNOS immunoreactivity decreased in tobacco smoke + ellagic acid group.

A significantly increase was detected in the levels of MDA, in tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil groups compared with the control group. It

was found that ellagic acid administration reduced the MDA levels similar to the control group. CAT and GSH-Px enzyme activities in tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil groups were significantly decreased compared to the control group. Also significantly increase in CAT and GSH-Px enzyme activities was detected in tobacco smoke + ellagic acid group compared with the tobacco smoke and tobacco smoke + corn oil groups.

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

KEY WORDS: Tobacco smoke, Ellagic acid, Testis, Rat, TUNEL.

3. GİRİŞ

3.1. Testis

3.1.1. Testis Anatomisi

Testisler scrotum içinde yer alan, “sperma” adı verilen erkek cinsiyet hücreleri ve “androjen” adı verilen erkek cinsiyet hormonunun yapımından sorumlu, bir çift erkek üreme organıdır.

Yanlardan biraz basılmış bir kuş yumurtası büyüklüğündedir. Ağırlığı yaklaşık 20-25 gram olup, üst ve alt uçlar arası 4 - 5 cm, ön ve arka kenar arası 2,5 - 3 cm, iç ve dış yüz arası ise yaklaşık 2 - 2,5 cm kadardır.

Testisin üst ucu ile arka kenarı hariç diğer kısımları “scrotum” içinde serbest olarak bulunur ve düzgün yüzeylidir. Testisin arka kenarının orta kısmında bulunan “mediastinum testis”ten testis damar ve sinirleri ile sperm kanalcıkları girip çıkar.

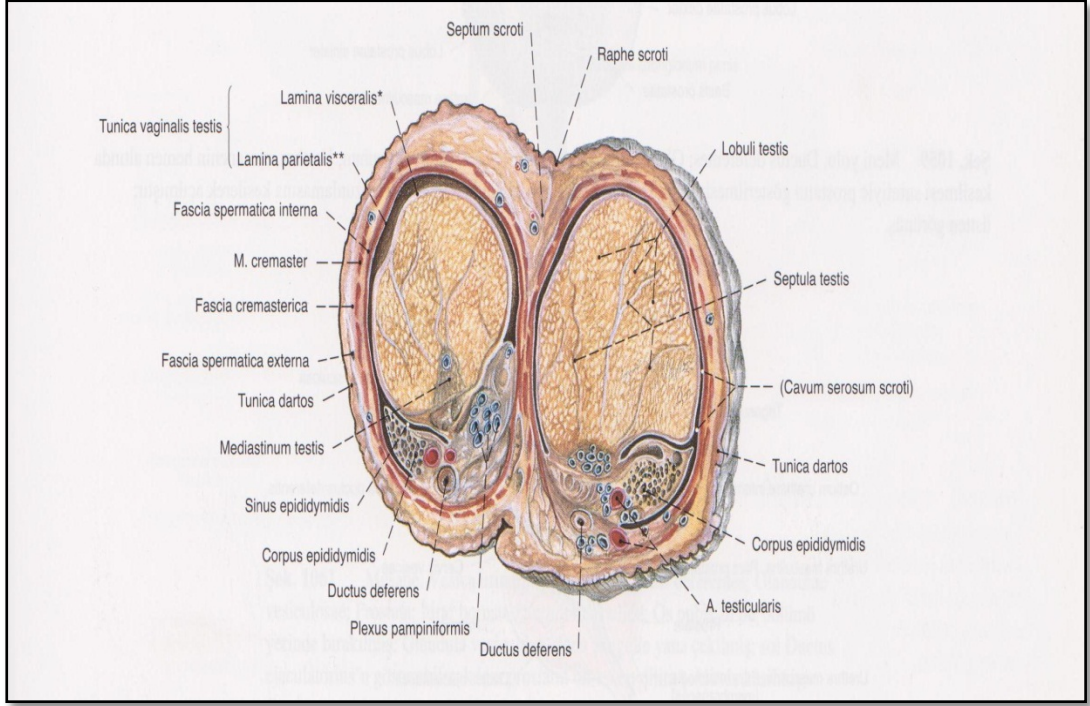
“Tunica vaginalis testis” adı verilen iki yapraklı seröz zarın “lamina visceralis (epiorchium)” adı verilen iç yaprağı testis ve epididimisi örttükten sonra ikisinin arasına sokularak dış kısımda “sinüs epididimisi” oluşturur. “Lamina parietalis (periorchium)” adı verilen dış yaprağı ise scrotumun iç yüzünü örter. Bu iki lamina prenatal hayatta testislerin karından scrotuma inerken beraberlerinde sürükledikleri peritoneum uzantısıdır.

Testisin arka kenarı boyunca scrotuma tutunmayı sağlayan “ligamentum epididimis superius” ve “ligamentum epididimis inferius” adı verilen birleştirici bağlar mevcuttur.

Tunica vaginalis testisin visseral yaprağının altındaki fibröz kısma “tunica albuginea” adı verilir. Tunica albuginea'nın iç yüzünden çıkan ve bağ dokusundan oluşan lamellere “septula testis” adı verilir.

Septula testis'ler mediastinum testise gelince birbirleri ile birleşerek daha kalın bağ doku örgüsü ile ayrılmış bölmecikleri oluşturur. Her bir lobulus içinde asıl testis salgısı işini yapan ve birbirleriyle anastomozlaşmış “tubuli seminiferi contorti” adı verilen 3-4 kanalcık bulunur.

Tubuli seminiferi contorti'lerin uç kısımları, “tubuli seminiferi recti” adı verilen düz kanalcıklar halinde devam ederek “mediastinum testise” gelirler. Burada “rete testis” adı verilen ağ yapmış olan kanalcıklara açılırlar (Şekil 1). Rete testis'ten ayrılan 12-15 kadar küçük kanalcığa “ductuli efferentes testis” adı verilir. Bu kanalcıklar epididimisin “caput epididimisini” meydana getirirler (1).



Şekil 1: Testisin anatomik görünümü (2).

3.1.2. Testis Embriyolojisi

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, ovumu dölleyen sperm çeşidi ile fertilizasyon esnasında belirleniyor olsa da erkek ve dişi morfolojik özellikleri, embriyonik olarak 7. haftaya kadar ayırt edilemez. Genital sistem erken dönemde her iki cinste de birbirine benzer, bu nedenle genital sistemin gelişiminin başlangıç dönemi "seksüel gelişimin farklanmamış safhası" olarak adlandırılır.

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar. Mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde "gonadal kabartı" oluşur. "Gonadal kordonlar" adı verilen parmak şeklindeki epitelyal kordonlar da altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Bu safhadaki

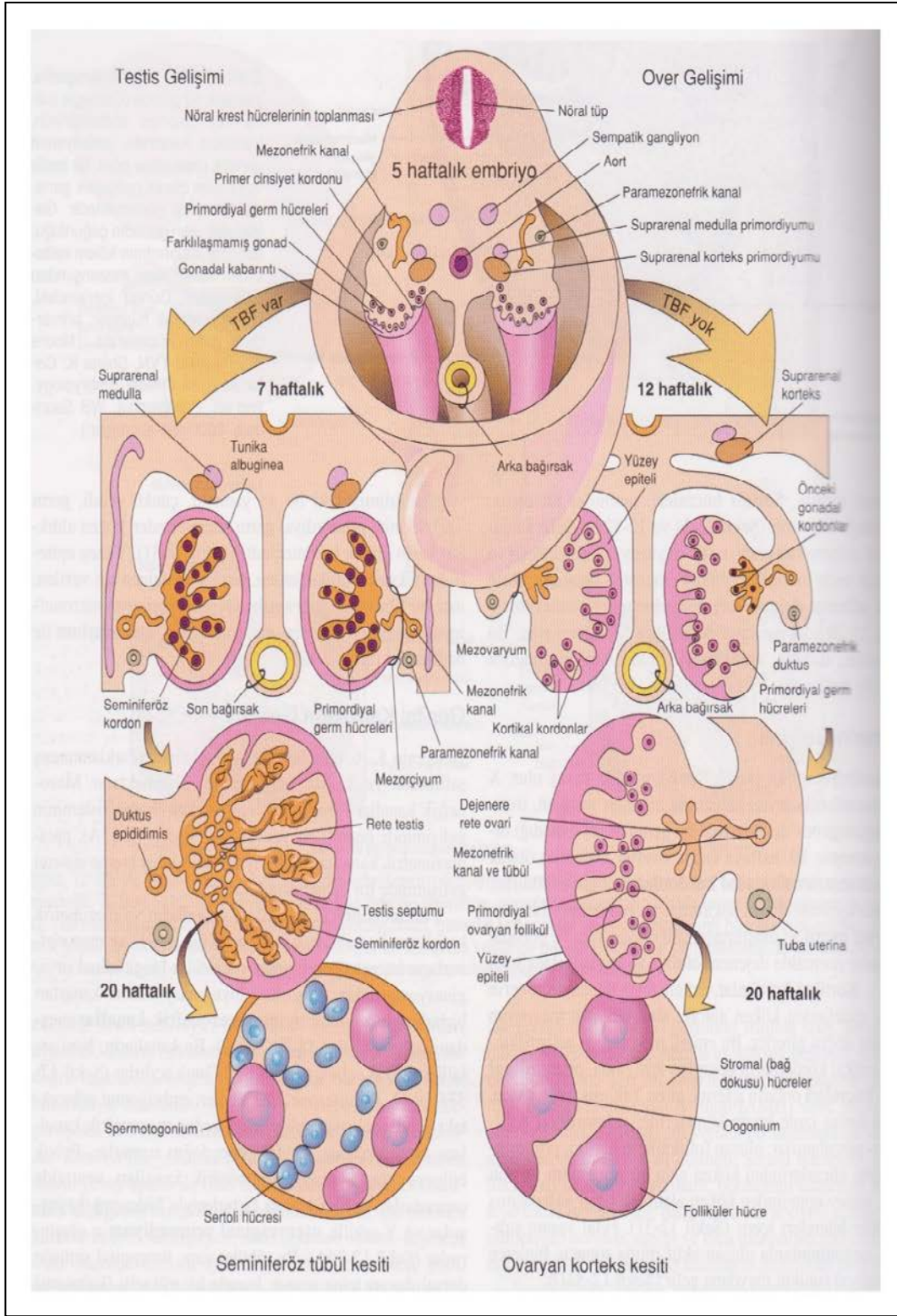
farklanmamış gonad, dışta yer alan bir korteks ve iç tarafta yer alan bir medulladan oluşmaktadır (3).

İnsan embriyosunda primordiyal germ hücreleri gelişimin erken evrelerinde yolk kesesi duvarında allantoise yakın bir yerde endoderm hücreleri arasında belirir. Amibik hareketlerle son barsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerler. 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6. haftada da genital kıvrımları işgal eder. Kıvrımlara gelemediği takdirde gonadlar gelişemez. Gonadların over veya testise farklanmasında primordiyal germ hücrelerinin belirleyici etkisi vardır. Eğer embriyo, genetik olarak erkekse primordiyal germ hücreleri XY cinsiyet kromozom kompleksini taşırlar. Testis belirleyici faktörü (TBF) kodlayan Y kromozomunun etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları çoğalmaya devam eder. Çoğalan primitif cinsiyet kordonları medullanın iç kesimlerine doğru ilerleyerek “testis” ya da “medullar kordonları” oluştururlar. Bezin hilusuna doğru, kordonlar “rete testis” tübüllerini oluşturacak olan ince hücre sıralarından oluşmuş bir ağ şekline dönüşür (Şekil 2).

Gelişimin ilerleyen safhalarında testis kordonları “tunica albuginea” adlı yoğun fibröz bir bağ dokusuyla yüzey epitelinden ayrılır. Dördüncü ayda testis kordonları, primitif germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden türeyen “sertoli hücrelerinden” meydana gelmiştir. “İnterstisyel Leydig hücreleri” gonadal şişkinliğin orijinal mezenşiminden köken alır.

Gelişimin 8. haftasında Leydig hücrelerinden testosteron salınımı başlar. Puberteye kadar solid halde kalan kordonların içi pubertede boşalarak “seminifer tübülleri” oluştururlar. Seminifer tübüller kanalize olduktan sonra rete testis tübülleriyle birleşir ve “ductuli eferenteslere” katılırlar. Bu eferent ductuslar,

mezonefrik sistemin geri kalan boşaltım túbülleri olup rete testis ile mezonefrik (Wolffian) kanallar arasındaki ilişkiyi sağlarlar (4).



Şekil 2: Gonadal gelişim (3).

3.1.3. Testis Fizyolojisi

Gonadotropin serbestleyici hormon (GnRH) 10 amino asitli bir peptid olup, hipotalamusun arkuat nükleusunda yer alan nöron gövdelerinden salgılanır. Bu nöronların sonlanmaları başlıca hipotalamusun median eminens bölgesinde gerçekleşir. Bu bölgedeki nöronlardan salgılanan GnRH, hipotalamik-hipofizer portal sistem damarlarına serbestlenir. Daha sonra portal kan yoluyla ön hipofize taşınarak Luteinizan hormon (LH) ve Follikül stimüle edici hormon (FSH)' nın salgılanmasını uyarır.

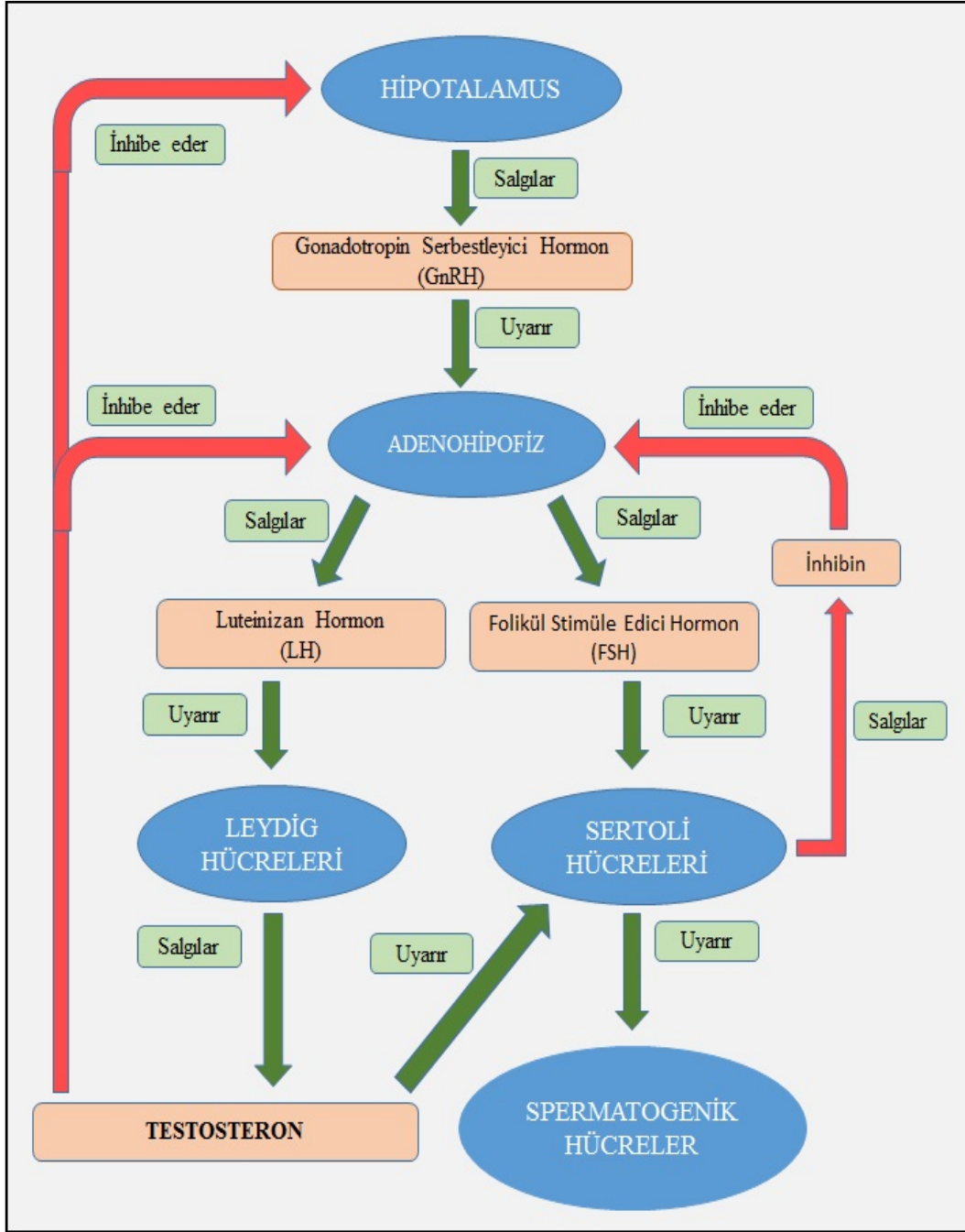
Testislerde interstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması, ancak hipofiz bezinden salgılanan LH' nin uyarısı ile gerçekleşir. Salgılanan testosteron miktarı, uyarıcı LH miktarıyla doğru orantılıdır. Testislerde olgun Leydig hücreleri normalde doğumdan sonra birkaç hafta kadar bulunur, daha sonra 10 yaşından sonrasına kadar bulunmaz. Ancak herhangi bir yaştaki çocuğa saflaştırılmış LH enjekte edildiğinde veya puberte döneminde LH salgısının arttığı durumlarda, testislerdeki interstisyel dokuda bulunan fibroblastlar, fonksiyon gören Leydig hücrelerine dönüşürler.

Luteinizan hormon uyarısı ile testislerden salgılanan testosteron hormonu, karşıt olarak ön hipofizden LH sekresyonunu etkiler. Bu inhibisyonun büyük kısmı, olasılıkla testosteronun doğrudan hipotalamusa etkisi sonucu, GnRH salgısının azaltılmasına bağlıdır. Bu da daha sonra, ön hipofizden LH ve FSH salgısını azaltır. LH'nin azalması da testislerin testosteron sekresyonunda azalmaya neden olur. Böylece testosteron salgısının çok fazla olması halinde, otomatik olarak negatif geri bildirim etkisiyle hipotalamus ve ön hipofizin salgısı azaltılarak testosteron sekresyonu baskılanır ve hormon düzeyi normale getirilir.

Buna zıt olarak, testosteronun çok az olması halinde hipotalamustan yüksek düzeyde GnRH salgılanır. Ön hipofizden LH ve FSH salgısı artmasına bağlı olarak testiküler testosteron sekresyonu da artar.

Folikül stimüle edici hormon, seminifer tübüllerde özgül FSH reseptörleriyle Sertoli hücrelerine bağlanır. Bu olay, hücrelerin büyümesine ve çeşitli spermatogenik maddelerin salgılanmasına neden olur.

Aynı anda interstisyel alanlardaki Leydig hücrelerinden tübüller içine difüze olan testosteron hormonu, spermatogenez üzerinde şiddetli bir tropik etki gösterir. Bu nedenle, spermatogenezin başlaması için, FSH ve testosteron hormonlarının her ikisi de gereklidir. Seminifer tübüller sperm yapımını azalttığında, ön hipofiz bezinden FSH salgısı belirgin olarak artar. Spermatogenezin hızlanması durumunda ise FSH salgısı azalır. Ön hipofiz bezi üzerindeki bu negatif geri bildirim etkisinin sebebi, Sertoli hücrelerinden salgılanan, “inhibin” adı verilen bir başka hormondur. Bu hormon, doğrudan ön hipofiz bezi üzerinde, FSH salgısını baskılayan kuvvetli bir etkiye sahiptir (5) (Şekil 3).



Şekil 3: Spermatogenezin hormonal kontrolü. (5).

3.1.4. Testis Histolojisi

3.1.4.1. Testisler

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşur (6). Testisler başlıca testosteron hormonu ve spermatozoon üretiminden sorumludurlar.

Testislerin dış kısmı “tunica albuginea” adı verilen yoğun bağ doku yapısındaki kalın bir kapsül ile çevrilidir. Tunica albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak “mediastinum testisi” oluşturur. Mediastinum testisten organ içerisine giren fibröz uzantılar, testisi yaklaşık 250 adet piramidal lobüle ayırır. Her lobülde gevşek bağ doku ile sarılı 1-4 adet ”seminifer tübül” yer alır. Seminifer tübüller arasında kalan “interstisyel alan” ise Leydig hücreleri adı verilen interstisyel hücrelerin yanı sıra sinirler, kan ve lenf damarları içerir.

Embriyolojik gelişim esnasında testisler scrotuma göç ederken, her bir testis peritonu “tunica vaginalis” adı verilen çift katlı seröz bir kese şeklinde beraberinde sürüklerler. Tunica vaginalis testisin ön ve yan kısımlarında tunica albuginea’yı örter (7).

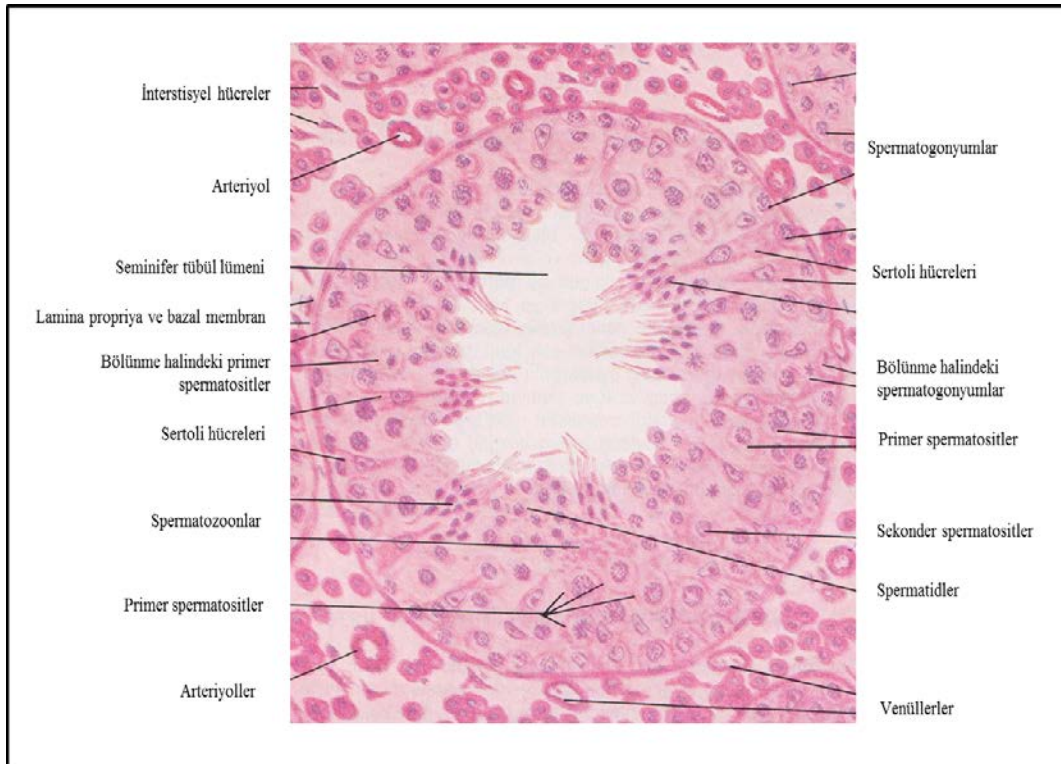
3.1.4.2. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüllerin duvarı peritübüler bağ doku kılıfı, bazal membran ve çok katlı seminifer tübüllerin germinal epitelden oluşur.

Peritübüler bağ doku kılıfı; kollajen lifler, miyoepitelyal hücreler ve bağ doku kaynaklı yassı hücrelerden meydana gelir. Germinal epitelin hücreleri; spermatogenetik germ hücreleri ve Sertoli hücreleri (destek hücreleri) olmak üzere iki gruba ayrılır.

Spermatogenetik germ hücreleri; bazal laminaya yakın olarak bulunan ”Tip A ve Tip B spermatogonyumlar”, Tip B spermatogonyum’dan köken alan ve boyutları daha büyük olan “primer spermatositler”, daha küçük ve kısa olan “sekonder spermatositler” ve bunlardan farklılaşan “spermatidler” ile “spermatozoon”lardan oluşur.

Sertoli hücreleri bazal membrana dayanır ve spermatogenetik seri hücreler arasında uzanırlar. Bu hücreler bazal kısımlarından birbirlerine bağlanarak ‘kan-testis bariyeri’ni oluşturur. Sertoli hücrelerinin, germinal epitelin alt sıralarındaki farklılaşan germ hücrelerini destekleyici ve besleyici görevleri de vardır. Bunun dışında fagositik özellikleri de bulunur (8) (Şekil 4).



Şekil 4: Testisin histolojik görünümü. (9)

3.1.4.3. Sertoli Hücreleri

Puberteden sonra seminifer tübül epitelinin yaklaşık %10'unu Sertoli hücreleri oluşturur. Spermatozoonlar lümene bırakılana dek, Sertoli hücrelerinin kriptaya benzer girintilerine yerleşik konumda bulunurlar. Bitişik hücreler taban ve yan yüzeylerindeki sıkı bağlantı kompleksleriyle (gap junction) birbirine tutunur. Bu tutunma kompleksleri, epiteli bazal ve adluminal bölmelere ayırarak 'kan-testis bariyeri'nin oluşmasını sağlar. Böylece seminifer tübül yapısının içindeki spermatogenetik seri hücreler, otoimmün reaksiyonlarından ve kanda bulunan maddelerden korunur (10).

Bunun yanı sıra Sertoli hücrelerinin çok önemli fonksiyonları vardır: Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi ve beslenmesinin düzenlenmesi, spermiyogenez sırasında spermatid sitoplazmasının atılan kısmının fagosite edilmesi, embriyonik gelişim esnasında erkek fetusta paramezonefrik (Müller) kanalların gerilemesini sağlayan bir glikoprotein olan Anti-Müllerian Hormon (AMH) üretimi. FSH ve testosteron kontrolü altında seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm taşınmasında kullanılan androjen bağlayıcı proteinin (ABP) salgılanması ve ön hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin peptidinin sekresyonu (7).

3.1.4.4. Leydig Hücreleri

Testislerde seminifer tübüller arasında kalan bölgelerde diğer bir deyişle interstisyel alanda bağ dokusu, sinirler, pencereci kapillerler ve lenf damarı gibi yapılar bulunur. Bu yapılar arasında ergenlikten itibaren belirginleşen ve işlevsel hale gelen bir takım hücreler yer alır.

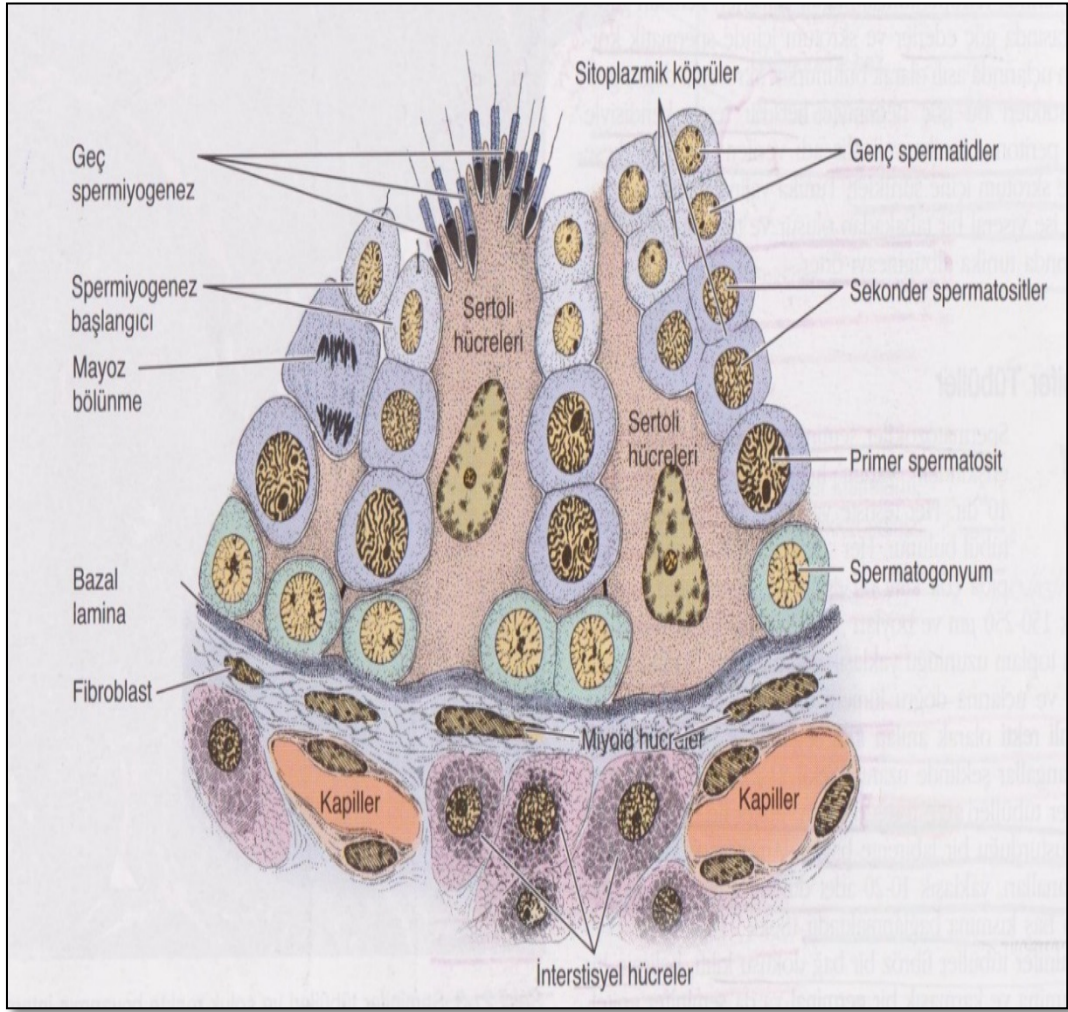
Yuvarlak ya da çokgen şekilli, merkezi yerleşmiş bir çekirdeğe sahip olan bu hücelere Leydig hücreleri denir. Temel görevi erkeklik hormonu olan testosteronun sentezi ve salgısını düzenlemektir.

Testosteron hormonu spermatogenez, cinsiyet farklılaşması ve gonadotropinlerin salgısının kontrolü için önemli bir hormondur (7).

3.1.4.5. Spermatogenez

Spermatogonyumlar, seminifer tübülün bazal membranına oturmuş olan, çapları yaklaşık 12 µm olan, aralıksız yenilenen diploid kök hücre topluluğudur. Bölündüklerinde seminifer tübüllerin üçte bir orta bölgesinde bulunan büyük nükleuslara sahip primer spermatositleri oluştururlar. Bu hücreler 10-22 gün sonra mayoz bölünme geçirerek sekonder spermatositleri meydana getirirler. Sekonder spermatositler deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonuna uğramaksızın hızla ikinci mayoz bölünmeyi geçirerek haploid kromozom sayısına sahip, yuvarlak hücreler olan spermatidleri oluştururlar (Şekil 5).

Spermatidler, Sertoli hücrelerinin girintileri arasına gömülmüş durumdadır. Lümene doğru ilerlerken şekilleri uzar ve “spermiyogenez” adı verilen mitoz bölünmenin gerçekleşmediği karmaşık bir olgunlaşma sürecine girerler (10).



Şekil 5: Spermatogenez (7).

3.1.4.6. Spermiyogenez

Yuvarlak şekilli, hareketsiz spermatidlerin uzayarak hareketli spermatozoonlara dönüştüğü sıralı değişimleri kapsayan karmaşık bir olgunlaşma sürecidir. Seminifer tübül epitelinin üst katmanlarında gerçekleşen bu değişiklikler; çekirdek kromatinin yoğunlaşması, çekirdeğin uzaması, akrozomun oluşması, sitoplazma organellerinin tipik hücredeki konumuna yerleşmesi, tek bir kamçı yapısının oluşması ve artık sitoplazmanın ortadan kalkması şeklinde sıralanabilir.

İlk olarak Golgi kompleksinin çekirdeğe bitişik kısmında birkaç adet küçük akrozom vezikülü oluşur. Bu veziküller birleşerek çekirdek zarına tutunan, zarla sarılı, tek ve büyük bir akrozom oluşturur. Vezikül içerisinde önce çekirdeğin ön yüzünü, olgun durumda ise spermatozoonun ön tarafını oluşturacak olan akrozom granülü meydana gelir. Değişime uğramış lizozom yapısında olan akrozom, fertilizasyonda spermatozoonların dışındaki oosit zona pellusidasını ve korona radyatasını aşabilme olanağı sağlayan hiyaluronidaz, lizozomal hidrolazlar ve proteaz içerir (10).

3.2. Tütün

Tütün, tarımsal üretim döneminden sonra bazı teknik aşamalardan geçerek “işlenmiş tütün” haline dönüşen bir endüstri bitkisidir (11).

Solanaceae (patlıcangiller) familyasına ait olan tütün taksonomik olarak “nicotiana” cinsine dahildir. 65 farklı türe sahip olan bu cinsin “*Nicotiana tabacum*” ve “*Nicotiana rustica*” türleri endüstriyel amaçlı olarak kullanılmaktadır. Genellikle tek yıllık bir bitki olan tütünün yetişmesi, iklim şartlarına bağlı olarak değişim göstermekle birlikte ortalama 80-120 gündür (12).

3.2.1. Tütün Kullanımının Tarihçesi

Tütünün ilk olarak Christopher Colomb ve arkadaşları tarafından Amerika'dan Avrupa'ya getirildiği bilinmektedir (13).

Colomb, San Salvador'da tütün yapraklarının yerliler tarafından çubuklarla tütürüldüğünü, ağızda çiğnendiğini görmüş ve tütün içtikleri “tobacco” adındaki saz borusundan dolayı bu bitkiye ‘tütün’ adını vermiştir (14).

Maya ve Aztekler’de tütün yaprakları yara tedavisinde kullanılırken; tütün dumanı ise göğüs hastalıkları ve baş ağrılarının tedavisinde kullanmıştır (16).

Portekiz’deki Fransız elçisi Jean Nicot, tütünün astım, öksürük, baş ve mide ağrılarına iyi geldiğini Fransız Kraliçesine sunmuştur. Bu gelişme üzerine tütüne “Kraliçe otu” ya da “Sefir otu” adı da verilmiştir (15). Fransa’dan diğer Avrupa ülkelerine yayılan tütüne, Jean Nicot’a ithafen “nicotiana”, 1828 yılında bulunan alkaloitine de “nicotin” ismi verilmiştir (13).

Osmanlı’da ise ilk tütün tarımının Makedonya, Yenice ve Kırcalı’de; Anadolu’da ise Ege Bölgesi’nde İzmir’in Selçuk ilçesine bağlı Ayasuluk tepelerinde yapıldığı kaydedilmiştir (15).

3.2.2. Tütünün İçeriği

Kurutulmuş tütün içeriğinin büyük bir kısmını karbonhidratlar ve proteinler oluşturur. Bunun yanı sıra alkaloidler, terpenler, polifenoller, aromatik hidrokarbonlar, ketonlar, aldehytler, aminler, nitriller, azot ve oksijenin heterosiklik bileşikleri, pestisidler gibi birçok bileşen de mevcuttur.

Tüm alkaloidlerin yaklaşık %95’i nikotindir. Nikotinin çok büyük bir kısmı tütün bitkisinin kök uçlarında sentezlenir, yapraklarında depolanır. Buna bağlı olarak nikotin miktarı kök gelişmesi ile yakından ilgilidir. Kurak koşullarda yetiştirilen tütünlerde, kökler suya ulaşma amacıyla büyümeye ve gelişmeye devam ettiklerinden nikotin oranları yüksektir. Bazı araştırmacılara göre ise kurak koşullarda düşük pH nedeniyle oluşan asit ortamda nikotin buharlaşmadığından, bu koşullarda yetişen tütün bitkisinin nikotin yüzdesi daha yüksek olacaktır (17).

Nikotin tütün bağımlılığından sorumlu olan maddedir. İnhalasyon, sindirim veya deri yoluyla vücuda alındığında tamamına yakını emilir. Bir

sigaradaki nikotin miktarı kullanılan tütünün türüne ve imalat teknolojisine göre değişmekle beraber 20 mg'a kadar çıkabilir.

En yaygın kullanılan tütün ürünü olan sigaranın içilmesi esnasında nikotinin yanarak ayrışması sonucu büyük bir kısmının tahrip olması nedeniyle vücuda alınan nikotin miktarı 1 mg kadardır. Ancak bu miktar içilen sigaranın cinsine, inhalasyonun derinliğine ve inhalasyondan sonra nefes tutma süresine göre 0.05 mg ile 2 mg arasında değişme gösterebilir. Beyinde, adrenal bez medullasında, burun ve mide mukozasında, böbrekte, tükürük bezlerinde konsantre olur. Nikotin maruziyetinin epileptik ataklara, merkezi sinir sistemi depresyonuna, kusmaya, fetusta gelişme geriliğine, erken doğuma ve düşük doğum ağırlığına neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca nikotinin anne sütü aracılığıyla bebeğe geçtiği de bilinmektedir (18-21).

Tütün bitkisinin doğal komponentleri olan nitrozaminler, tütünün yakılarak inhale edilmesi, çiğnenmesi ya da toz haline getirilerek enfiye şeklinde buruna çekilmesi ile vücuda girerler. Tütünün bütün çeşitlerinde nitrozaminlerin kanserojen etkileri mevcuttur (19-22).

Tütünde bulunan ve insan sağlığı açısından potansiyel karsinojen olduğu bilinen diğer bir bileşen de stirandır. Baş ağrısına, oküler ve konjunktival irritasyona, bulantıya, halsizliğe, baş dönmesine, motor koordinasyonunda bozulmaya, dikkat eksikliğine ve renk görme keskinliğinde azalmaya yol açar.

Gebelerde spontan düşük riskini artırırken erkeklerde anormal sperm yüzdesinde artışa neden olur. Plastik, polyester, sentetik kauçuk gibi farklı endüstri alanlarında kullanılır.

Tütünün yanması ile ortaya çıkan ve inhalasyon ile vücuda alınan diğer bir bileşen ise karbon monoksit (CO) bir gazıdır. Bu gaz hemoglobine güçlü bir afinite ile bağlanır ve kanın oksijen taşıma kapasitesini oldukça düşürür. Kalpten kaynaklanan göğüs ağrılarının artmasına, egzersiz toleransının azalmasına ve baş ağrısına yol açar. Miyoglobine bağlanarak kalp kası ve diğer kasların fonksiyonunu bozar. Psikomotor fonksiyonlarda azalmaya neden olur. Fetus üzerine toksik etkisi bilinmektedir.

Tütün dumanı içeriğindeki bir diğer madde olan benzopiren ise kanserojendir. Düşük dozlarda tekrarlayan maruziyeti, tek bir seferdeki yüksek doz maruziyetine göre daha toksiktir. Hem dişi hem de erkek üreme sistemi üzerine olumsuz etkileri vardır (18-21).

3.2.3. Tütün Ürünlerinin Kullanımı

Genetik olarak modifiye edilmiş ya da saf haldeki tütün yaprağının tamamen veya bir kısmının hammadde olarak kullanılması ile elde edilen tüm ürünler “tütün ürünü” olarak adlandırılır. En yaygın kullanılan tütün ürünleri sigara, pipo, puro, nargilelik tütün, enfiye ve çiğnemelik tütündür (1).

3.2.4. Tütün Kullanımının Epidemiyolojisi

2012 yılında yapılan Küresel Yetişkin Tütün Araştırması (KYTA) verilerine göre Türkiye’de toplam 14,8 milyon kişi (%27,1) tütün ürünü kullanmaktadır. Tütün kullanım sıklığı erkeklerde %41,5 iken, kadınlarda bu oran %13,1 olarak hesaplanmıştır. Tütün ürünü kullananlar içinde %23,8’lik bölüm her gün tütün kullanmaktadır (erkeklerin %37,3’ü, kadınların %10,7’si). Tütün ürünü

kullananların çok büyük bir kısmı (%94,8) mamul sigara içmekte olup, %0,8 lik oranla nargile az tüketilen bir tütün ürünüdür.

Her gün sigara içenlerin yaklaşık dörtte üçü (%70,4) günde 11 ve daha fazla sayıda sigara içmektedir; günde içilen ortalama sigara sayısı ise 19,2'dir.

Her gün sigara içenlerin her gün sigara içmeye başladıkları yaş ortalaması 17,1 olup, sigara içenlerin %58,7'si sigara satın almak için yasal yaş sınırı olan 18 yaşından daha önce sigara içmeye başlamışlardır. Kadınlarda sigaraya başlama yaşı ortalama 17,9 iken, erkeklerde ortalama 16,8'dir (23).

3.2.5. Tütün Dumanının Vücuttaki Etkileri

Dünya genelindeki önlenebilir hastalıkların ve erken ölümlerin en sık karşılaşılan nedeni tütün ürünlerinin kullanımınıdır. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) tütün ürünlerinin kullanımına bağlı ölümler; kanser ölümlerinin üçte birini, tüm erken ölümlerin ise beşte birini oluşturmaktadır (24).

Tütün içeriğindeki oldukça zararlı 4000'i aşkın kimyasaldan dolayı vücuttaki tüm doku ve sistemler üzerinde oldukça olumsuz etkilere sahiptir. Solunum sistemi, kardiyovasküler sistem ve üreme sistemi tütün kullanımından nispeten en fazla etkilenen sistemlerdir (25) (Tablo 1).

Tablo 1: Tütün kullanımının vücuttaki etkileri (25).

TÜTÜN KULLANIMININ VÜCUTTAKİ ETKİLERİ	
Saçlar	Koku ve sararma (lekelenme)
Solunum ve akciğerler	Akciğer kanseri, öksürük ve balgam, nefes darlığı. Pnömoni, astım, kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH), anfizem, tüberküloz.
Kalp	Miyokard infarktüsü, koroner arter hastalıklar
Gözler	Gözlerin içeri kaçması, körlük (makula dejenerasyonu) ve katarakt
Eller	Zayıf dolaşım (soğuk parmak): Periferik damar hastalığı Katran lekeli parmaklar.
Beyin ve zihinsel etkileri	İnme, bağımlılık, kaygı, beyin kimyasında değişiklik
Göğüs	Özefagus kanseri
Kan	Lösemi
İmmün sistem	Güçsüzlük, halsizlik
Deri	Erken yaşta kırışıklıklar
Dişler	Renk değişikliği, lekelenme, plak, diş kaybı, gingivit
Karaciğer	Kanser
Ağız ve boğaz	Dudak, ağız, boğaz ve larinks kanserleri Tat alımında azalma ve sigara dumanı kokusu
Burun	Koku alımında azalma
Kemikler	Osteoporoz, omurga ve kalça kırıkları
Ayak ve bacaklar	Bacak ağrılarında artış ve kangren: Periferik damar hastalığı Buerger hastalığı
Böbrekler ve mesane	Kanser
Dişi üreme sistemi	Adet ağrıları, erken menapoz Serviks kanseri İnfertilite ve hamile kalmada gecikme
Erkek üreme sistemi	Spermlerde; şekil bozukluğu, hareket kaybı ve sayılarında azalma İnfertilite ve iktidarsızlık

3.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller; reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) gibi ortaklanmamış elektronlara sahip, yarılanma ömürleri oldukça kısa olan yapılardır (26) (Tablo 2).

Tablo 2: Serbest radikaller (27)

Reaktif Türler		Yarılanma süresi (saniye)	Üretim şekli	Etkileşimi
Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$)	10^{-9}	Vücutta artmış demir konsantrasyonu	Lipid, karbohidrat, protein ve nükleik asitler gibi hücrel bileşiklerle etkileşir.
	Süperoksit radikali ($\text{O}_2\cdot$)	10^{-6}	Genellikle mitokondri ve kardiyovasküler sistem	Demir- kükürt içeren enzimleri inaktive eder.
	Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Kararlı	Metabolik reaksiyonlar sürecinde	Lipid, protein ve nükleik asitlerle etkileşir.
	Organik hidroperoksit (ROOH)	Kararlı	Geçiş metal iyonları reaksiyonlarıyla	PUFA daki lipit peroksidasyonu ile etkileşir.
	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)	10^{-6}	Fotosentez ve kimyasal reaksiyonlar	Hücrel protein ve lipitlerle etkileşir.
Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)	Nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$)	5	Nörotransmitter ve kan basıncı düzenleyici	Nükleik asitlerin yıkımı ve deaminasyonu.
	Peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$)	10^{-3}	NO Ve $\text{O}_2\cdot$ formlarından	Siklooksijenaz enziminin aktive edilmesi.
	Peroksinitröz asit (ONOOH)	Oldukça kararlı	$\text{ONOO}\cdot$ ' nin Protonlanmış formu	Nörotransmitterlerle etkileşir.

Yüksek konsantrasyondaki serbest radikaller; proteinler, lipidler ve DNA gibi biyomoleküller ile reaksiyona girerler. Ayrıca vücutta serbest radikallerin artışı, oksidatif strese, hücrenin fizyolojik fonksiyonunda değişime ve birçok hastalığın oluşmasına neden olur (27).

Memeli hücreleri, oksidanların ve antioksidanların oluşumu arasında denge kurulmasına izin veren bir antioksidan koruma sistemine sahiptir. Bu iki sistem arasındaki dengede meydana gelen aksaklıklar, oksidatif strese neden olur. Oksidatif hasar; yaşam döngüsü boyunca birikir ve miyokardiyal infarktüs, ateroskleroz, nörodejeneratif bozukluklar, romatoid artrit, kanser gibi farklı patolojik durumlara yol açar (28).

Normal testiküler fonksiyon açısından serbest radikaller ile antioksidan sistem arasındaki dengenin korunması oldukça önemlidir (29). Testislerde redoks homeostazisini sağlamak ve spermleri oksidatif hasardan korumak için seminal plazmada çok sayıda etkili enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemleri mevcuttur. Seminal plazmada bulunan enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD) (30, 31), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GHS-Rd) ve katalaz (CAT) dır (32).

Non-enzimatik antioksidanlar ise askorbat (33, 34), α -tokoferol (35), pirüvat (36), glutatyon (GSH) (37, 38), taurin ve hipotaurindir (39). Seminal plazma antioksidan konsantrasyonunun, sağlıklı erkeklerde infertil erkeklere oranla daha yüksek olduğu görülmüştür (34, 40, 41).

Memeli spermatozoa membranları, sperm akışkanlığını sağlayan çoklu doymamış yağ asitlerinden zengindir. Ancak bu durum spermleri serbest radikal kaynaklı peroksidaz hasarlarına karşı oldukça duyarlı kılar (30). Yüksek miktardaki ROS; membran lipitleri, proteinleri, nüklear ve mitokondriyal DNA ile etkileşerek sperm üretimini ve kalitesini olumsuz yönde etkiler (42, 43). ROS kaynaklı DNA hasarı germ hücrelerindeki apoptozisi artırır (44).

3.4. Nitrik Oksit ve Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz

Birçok protein ve molekül; testislerdeki spermatogenik sürecin başlaması ve germ hücrelerinin gelişimi gibi birçok hücrel mekanizmanın düzenlenmesinde rol alır. Bu moleküllerden bazıları iyi şekilde karakterize edilmiş sitokinlerden interlökin-1a (IL-1a), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör a (TNF-a) olup bunun yanı sıra inflamasyon ve immüitenin protein karakterli olmayan düzenleyicilerden nitrik oksit (NO) de bu gruba dahil edilir (44, 45).

Nitrik oksit; sinir sisteminde, kardiyovasküler sistemde ve immün sistemde biyolojik olarak işlem gören kısa ömürlü serbest radikaldir (46). Küçük molekül boyutu ve difüzyon özelliğinden dolayı birçok mekanizmada oldukça etkilidir. Bunun yanı sıra üretildiği yerlerden başka yerlerde de aktivite gösterebilir. 1 µm' den daha az seviyelerde düzenleyici molekül görevi üstlenen NO, yüksek seviyelerde serbest radikallerin oluşumu yoluyla DNA, protein ve lipitlerde hasara neden olabilir (47). NO ayrıca spermatogenezis sürecinde germ hücrelerindeki apoptozisi regüle eder. Aşırı NO seviyesinin, doğrudan germ hücre apoptozisini tetiklediği bildirilmiştir (48).

Nitrik oksit sentazlar (NOS); L-arjininden, NO ve L- citiullinine döngüsünü katalizleyen enzim ailesidir. NOS'lar testislerde infertilite, spermatogenezis ve sperm maturasyonu ile ilişkilidir (49).

Nitrik oksit sentazlar fonksiyonel olarak iki formda bulunurlar: endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) Ca⁺² bağımlı fonksiyon gösterirken, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) fonksiyonu Ca⁺²

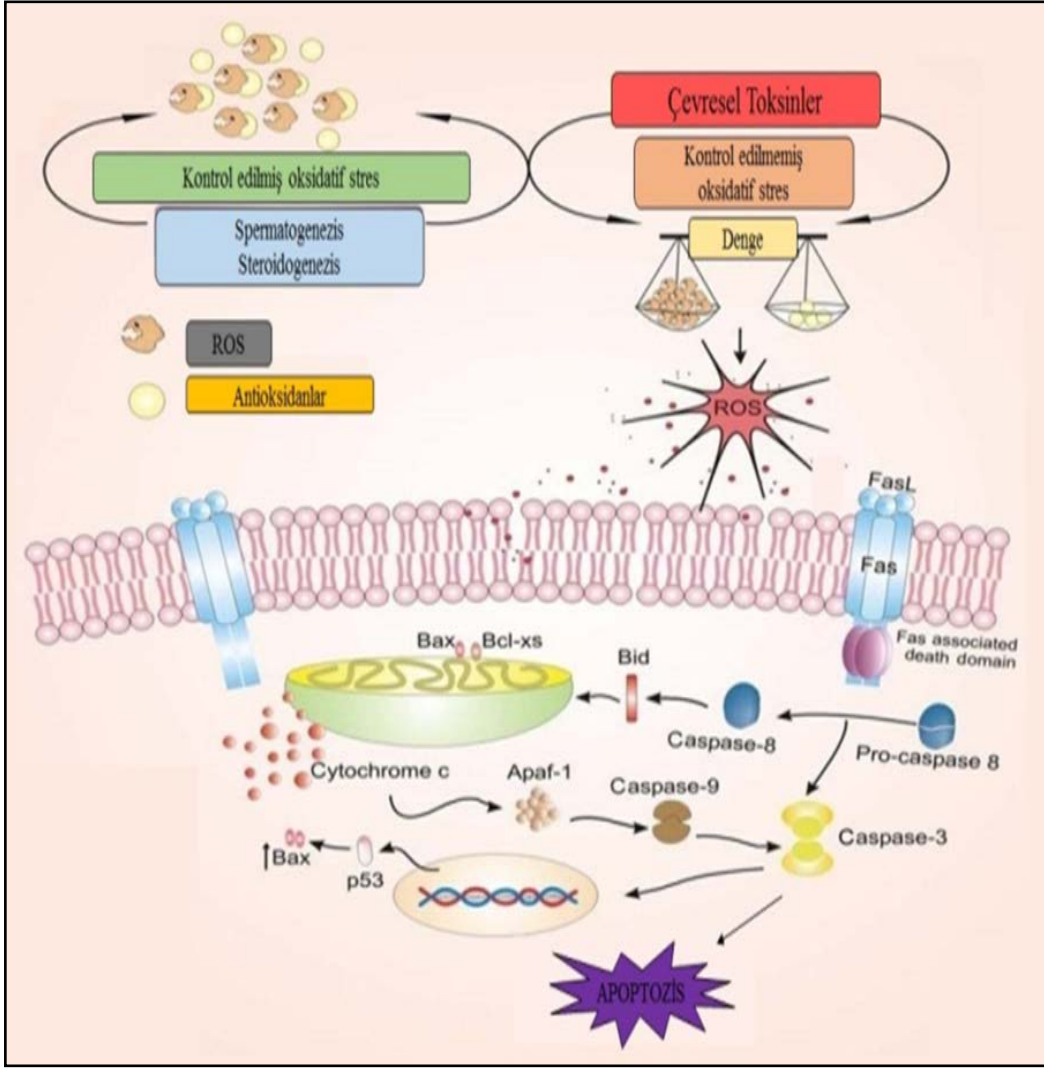
bağımlı değildir (46, 50). Endotelyal nitrik oksit sentaz; damar gevşemesinde ve fizyolojik olarak yeterli seviyede NO üretiminde görev alır (51). Testislerde eNOS'un Leydig hücrelerinden, Sertoli hücrelerinden, spermatogenetik seri hücrelerden ve endotelyal hücrelerden eksprese edildiği bildirilmiştir (49).

3.5. Apoptozis

Programlanmış hücre ölümü terimi ilk olarak 1964 yılında ortaya atılmıştır ve patolojik bir durumdan çok, kontrollü ve sıralı bir olay dizisidir (52).

Gelişim boyunca gereğinden fazla üretilen hücreler apoptozis ile elimine edilir. Ayrıca birçok doku ve organın oluşumunda da apoptozisin rol aldığı bilinmektedir (53). Çevresel kontaminantların çoğu testiküler hücrelerin oksidan-antioksidan sistemleri arasındaki dengeyi bozar ve apoptozis gibi bağlantılı diğer yolları aktive ederek hasar meydana getirir (54) (Şekil 6).

Normal testiküler olaylar esnasında ortaya çıkan ROS'lar testis fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (55). Testislerdeki ROS'ların en önemli kaynağı olarak semendeki fagositik lökositler görülse de, germ hücreleri de önemli bir ROS üretme potansiyeline sahiptir (56). Spermatogenezis sürecinde oluşan bu ROS'lar, testiküler apoptozisin düzenlenmesinde görev alırlar (57). Testislerdeki apoptoziste hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yollar kullanılır (58, 59).



Şekil 6: Apoptozis oluşum yolağı (55).

3.6. Antioksidanlar

Antioksidanlar, hücreleri serbest radikaller olarak bilinen stabil olmayan moleküllere karşı koruyan maddelerdir. Serbest radikallerle etkileşip onları stabilize hale getirerek neden olabilecekleri hasarları engeller (60).

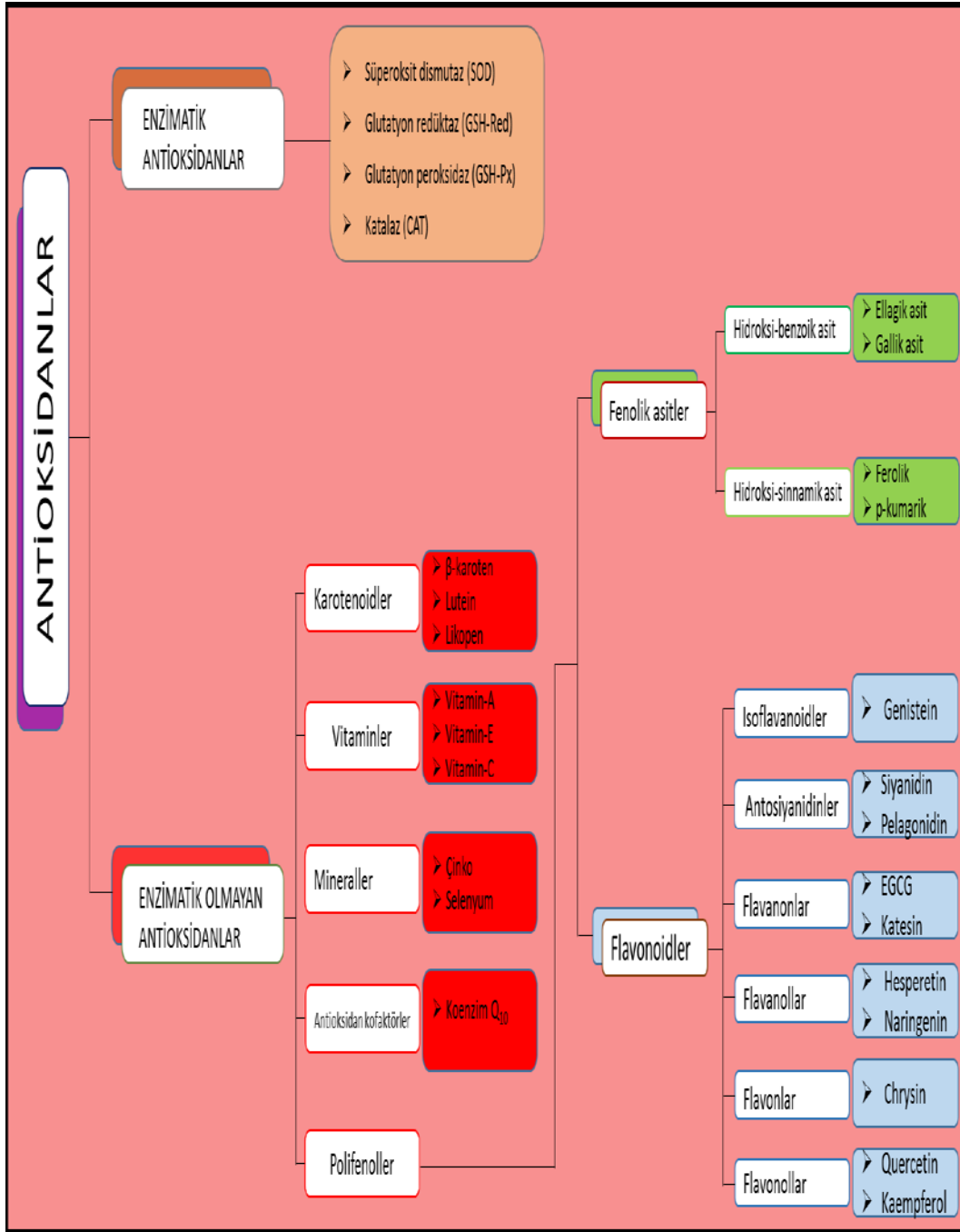
Oksidasyon tepkimeleri yaşam için elzem olsa da aynı zamanda hücreler açısından oldukça tehlikelidir. Bu nedenle canlılar farklı antioksidanlardan oluşan oldukça kompleks antioksidan koruma sistemlerine sahiptir. Antioksidanların seviyesindeki düşüş ya da antioksidan enzimlerin aktivitesinin baskılanması

hücrel hasara ve hücre ölümüne yol açan oksidatif stres oluşumuna neden olur (61).

Antioksidanlar Gutteridge ve Halliwell'in tanımına göre 3 kategoriye ayrılır: primer antioksidanlar, sekonder antioksidanlar ve tersiyer antioksidanlar (62).

Enzimatik antioksidanlar doğrudan ya da dolaylı yoldan ROS'lara karşı savunmaya katkıda bulunurlar. CAT, SOD, GSH-Px ve GSH-Rd bunlara örnektir. Non-enzimatik antioksidanlardan GSH, vitamin E ve vitamin C, ROS ve RNS'leri süpürücü; ürik asit ise plazma, albumin, N-asetilsistein ve melatonindeki peroksinitritleri süpürücü olarak işlev görür (63) (Tablo 3).

Tablo 3: Antioksidanların sınıflandırılması (64).



3.7. Fenolik Fitokimyasallar

Fenolik bileşenler ya da diğer bir deyişle fenolik fitokimyasallar bitki orijinli sekonder metabolitler olup, doğadaki besin kaynaklarının en bol bulunan çeşitlerinden biridir. Bu fenolik metabolitler, bitkileri biyolojik ve çevresel strese karşı koruyarak işlev görürler. Ayrıca bakteriyel veya fungal enfeksiyon gibi patojenik olaylara cevaben de sentezlenirler (65-67).

Ellajik asit (EA) gibi fitokimyasallar özellikle sebze ve meyvelerin önemli bileşenleri olup, sağlık üzerine yararlı etkilerini kanser, karaciğer hastalıkları ve vasküler hastalıklar gibi oksidasyon ile ilişkili hastalıklar üzerine gösterirler. Fitokimyasalların biyolojik fonksiyonlarını hem doğrudan bir antioksidan gibi davranarak hem de hücrel antioksidan enzim sistemlerini uyararak gösterdikleri ve bu şekilde oksidatif stresin negatif etkilerine karşı mücadele ettikleri düşünülmektedir. Yapılarındaki fenolik halka ve hidroksil bileşenlerinden dolayı efektif antioksidanlar gibi fonksiyon görerek serbest elektronları yok edebilirler.

Elde edilen kanıtlar biyolojik sistemlerde patojenitenin uyarılmasından serbest radikal kaynaklı oksidatif stresin önemli derecede sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Hücrel sistemlerde oksidatif stres için akla gelen ilk mekanizma reaktif oksijen türlerinin oluşumudur. Hücrelerde bu reaktif oksijen türlerinin hızlıca yok edilmesini sağlayan birçok antioksidan sistemlerinin olduğu bilinmektedir. Endojen antioksidan enzimler, GSH ve diğer doku tiyoller gibi çok sayıda endojen antioksidan faktörler, hem proteinleri, koenzim Q, bilirubin ve üratlar, çeşitli besin içerikleri (ilk olarak vitaminler ve fenolik fitokimyasallar) reaktif oksijen türlerine karşı biyolojik koruma sistemlerini oluşturur (68, 69).

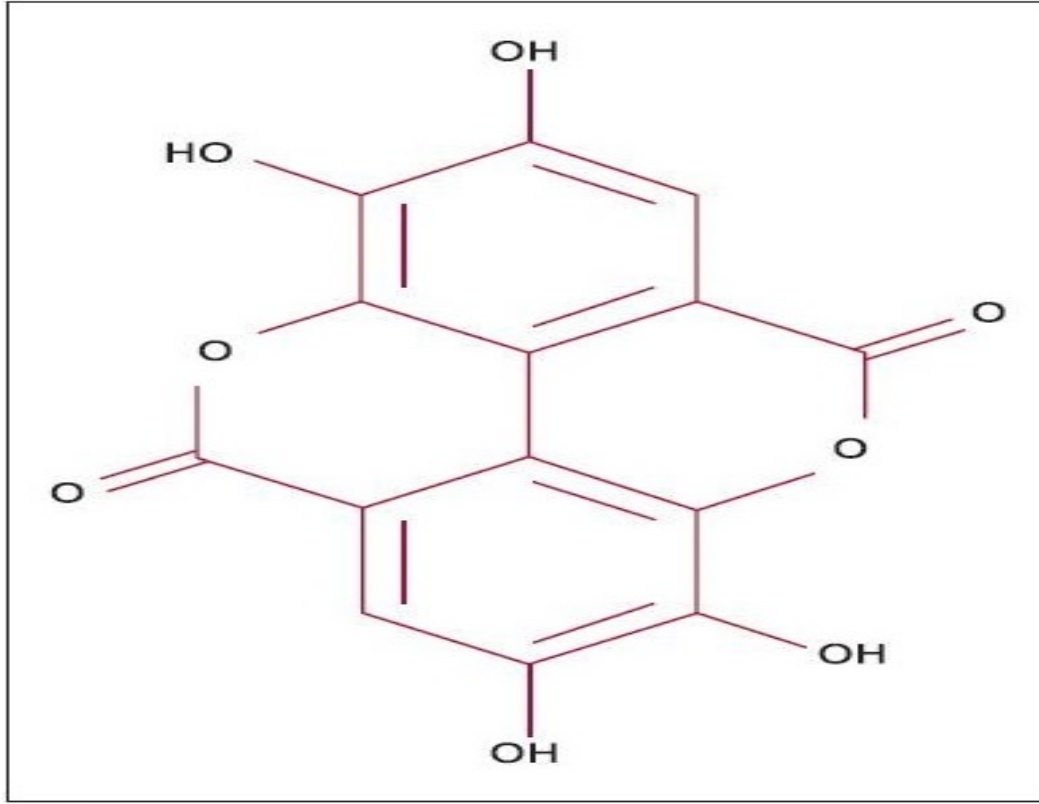
Fenolik fitokimyasalların oksidatif stres kaynaklı hastalıklar üzerindeki etkileri tam olarak aydınlatılmamıştır. Ancak bu hastalıklar üzerindeki pozitif etkilerini GSH, askorbat, SOD, CAT kaynaklı antioksidan koruma cevabını güçlendirerek gerçekleştirdikleri düşünülmektedir.

Epidemiyolojik veriler sebze ve meyveden zengin diyetle beslenen populasyonlarda kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi kronik hastalıkların insidansının daha düşük olduğunu ortaya koymaktadır (70-73).

3.7.1. Ellajik Asit

Ellajik asit (2,3,7,8-tetrahydroxy[1]-benzopyranol[5,4,3-cde]benzopyran-5,10-dione) başta kırmızı meyveler olmak üzere çeşitli bitki türlerinde bulunan fenolik bir lakton bileşiğidir (Şekil 7). 1831 yılında Braconnot tarafından keşfedilmiştir (74). Moleküler ağırlığı $302.197 \text{ g mol}^{-1}$ olup, oldukça termostabil bir moleküldür (75). Bitki hücre duvarlarının ve hücre membranlarının yapısal bir bileşeni olarak “ellajitanninler” de denilen suda çözünebilir tanninler biçiminde bulunur.

Ellajitanninler glukozun ellajik asitli esterleridir. Hidroliz oldukları zaman EA'yı oluştururlar. Nar, çilek, ahududu, kızılıcık ve üzümde EA konsantrasyonu oldukça yüksektir (76, 77).



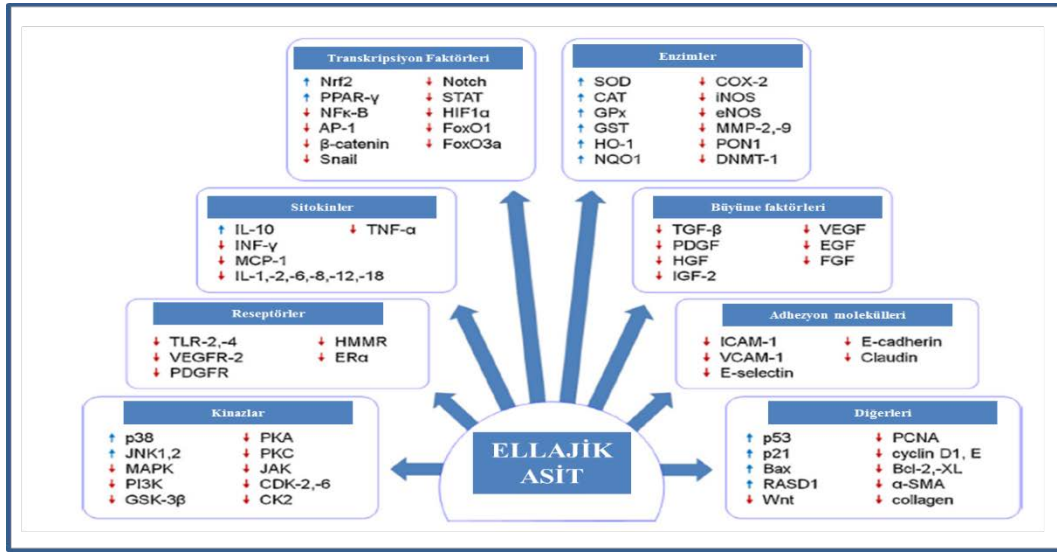
Şekil 7: Ellajik asidin kimyasal yapısı (78).

3.7.2. Farmakolojik Aktiviteleri

Yapılan çalışmalarda ellajik asidin kuvvetli antioksidan etkisinin yanı sıra antimutajenik (79), antigenotoksik (80,81), antiapoptotik (82–84), antikarsinojenik (85), antibakteriyal (86), antiviral (87), antialerjik (88), antiinflammatuvar (89, 90), antiatherojenik (91), antidiyabetik (92), antiepileptik (93), antidepresan (94), nöroprotektif (95), nefroprotektif (96), kardiyoprotektif (97) ve hepatoprotektif aktiviteleri olduğu bildirilmiştir (98).

3.7.3. Moleküler Hedefleri

Ellajik asit vücuttaki etkilerini çoklu yolların düzenlenmesi ile gerçekleştirir: nükleer eritroit-2 bağlantılı faktör-2 (Nrf2) üzerinden antioksidan cevabın aktivasyonu, proinflamatuvar ajanların inhibisyonu, bazı büyüme faktörlerinin ekspresyonunun düzenlenmesi, adhezyon moleküllerinin azaltılması (99) (Şekil 8).



Şekil 8: Ellajik asitin moleküler hedefleri (99).

3.7.4. Antioksidatif Etkisi

Ellajik asit reaktif oksijen türlerine karşı süpürücü aktivite gösterir. Yapısındaki fonksiyonel dört tane hidroksil ve iki tane lakton grupları sayesinde $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , H_2O_2 ve $ONOO^{\cdot}$ radikallerini ortadan kaldıracaktır (100-102). Ayrıca GSH sentaz, glutamat-sistein ligaz katalitik alt ünitesi ve glutamat-sistein ligaz düzenleyici alt ünitesinin regülasyonu ile GSH seviyesini artırır. Bunu yanı sıra SOD, CAT, GSH-Px ve GSH-S-transferaz enzimlerinin oluşumlarını indükler (103-105). Bu sayede çeşitli patolojik durumların ana sebeplerinden olan oksidatif strese karşı antioksidan cevabı güçlendirerek hücrel koruma sağlar.

3.8. Araştırmanın Amacı

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

4. GEREÇ-YÖNTEM

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 05/02/2014 tarih ve 2014/4 sayılı 42 no'lu kararı gereğince etik yönden uygun bulunarak, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM), Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarları ve Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

Çalışma bütçesinin tamamı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)' nin TF. 14.27 proje no' lu kararı gereğince karşılandı.

4.1. Deney Hayvanlarının Beslenmeleri ve Barındırılmaları

Çalışmamızda FÜDAM'dan temin edilen ortalama ağırlığı 200 ± 10 gr olan 24 adet 8 haftalık erişkin Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Deney hayvanları FÜDAM hayvan laboratuvarında 12 saat (07:00-19:00) aydınlık - 12 saat (19:00- 07:00) karanlık periyodunda, 21 ± 1 °C ortam sıcaklığında takip edildi. Özel olarak tasarlanmış kafeslerde barındırılan ratlar, Elazığ Yem Sanayi A.Ş. Yem Fabrikası'nda özel olarak hazırlanmış pelet yem şeklindeki rat yemleriyle beslenerek ad libitum su ve yiyecek alımları sağlandı. Pelet yemlerin içeriği tablo 4'de gösterilmiştir.

Yemler için çelik kaplar, su için ise paslanmaz çelik bilyeli cam biberonlar kullanıldı.

Tablo 4: Ratlara verilen pelet yemin bileşimi.

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

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

** % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur.

4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

24 adet rat deney başlangıcında ilk tartımları yapıldıktan sonra her grupta 6 adet rat olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı.

Kontrol grubu (Grup I) : Bu gruptaki ratlara deney süresi olan 12 hafta boyunca herhangi bir işlem uygulanmadı.

Tütün dumanına maruz bırakılan grup (Grup II) : Bu gruptaki ratlar, deney için özel olarak tasarlanmış cam kafes içerisinde günde 2 defa 1'er saat tütün dumanına maruz bırakıldı.

Tütün dumanına maruz bırakılan + Mısırözü yağı grubu (Grup III) :

Bu gruptaki ratlara, tütün dumanına ilaveten ellajik asidi çözmede kullanılan miktarda mısırözü yağı, gün aşırı oral gavaj yoluyla verildi.

Tütün dumanına maruz bırakılan + EA grubu (Grup IV) :

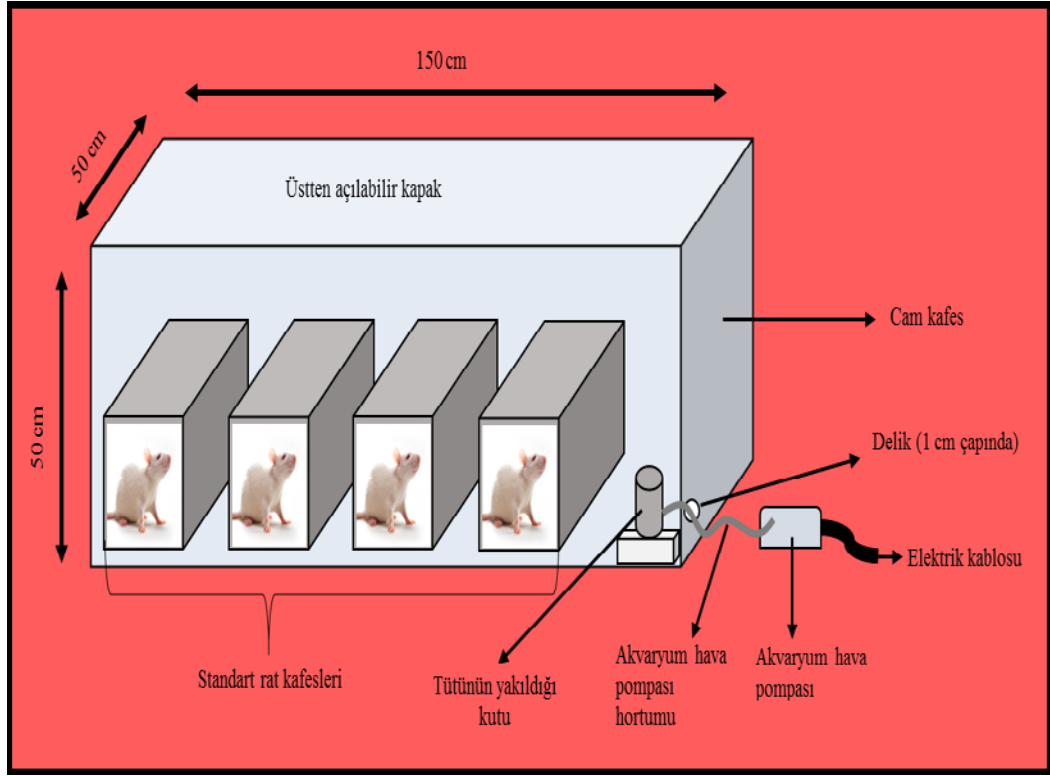
Bu gruptaki ratlara, tütün dumanına ilaveten gün aşırı 12 mg/kg dozunda mısırözü yağında çözdürülmüş EA (A15722 Lot: 10176718, Ellagic acid hydrate, Alfa Aesar, Germany) oral gavaj yoluyla verildi.

Deney süresi boyunca tüm ratlar, her hafta düzenli olarak tartılarak olası kilo değişimleri takip edildi. Ayrıca FÜDAM'daki deney hayvanları ünitesinde bulunan diğer çalışmalara ait deney hayvanlarının duman kokusundan etkilenmemesi için tütün dumanına maruz bırakılan ratlar, ayrı bir odada barındırıldılar.

4.3. Deney düzeneği ve tütün dumanının verilmesi

Ratların tütün dumanına maruz bırakılması için, 150x50x50 boyutlarında kapağı üstten açılabilir şekilde özel bir cam kafes dizayn edildi. 10 gramlık tütünün yanması ile ortaya çıkan duman akvaryum hava pompası (AP-001 XILONG Aquarium Air Pump, China) aracılığıyla cam kafes içerisine verildi.

Tütün dumanı verilecek her bir gruba ait ratlar, ayrı kafeslerde olacak biçimde bu düzenek aracılığıyla deney süresi boyunca her gün eşit miktarda dumana maruz bırakıldılar (Şekil 9).



Şekil 9: Deney hayvanlarının tütün dumanına maruz bırakılma düzeniği.

4.4. Doku Örneklerinin Alınması

12 haftalık deney süresi sonunda tüm gruptaki ratlar intraperitoneal olarak uygulanan ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) anestezisi altında dekapite edildi. Ratların testis, seminal vezikül, prostat bezi ile epididimis dokuları hızla çıkarıldı histolojik analizler için bouin solüsyonuna alındı. Biyokimyasal analizler için ratlardan kan örneği ile testis dokusu alındı. Doku örnekleri ve kandan elde edilen serum daha sonra çalışılmak üzere -20°C 'de saklandı.

4.5. Vücut ve Organ Ağırlıklarının Ölçülmesi

12 haftalık deney süresi sonunda ratlar dekapite edildikten sonra testisler, epididimisler, seminal vezikül ile prostat bezi çıkarılarak çevre yağ dokularından arındırıldıktan sonra tartıldı. Testislere ait rölatif ağırlık hesaplandı.

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

4.6. Semen Analizi

4.6.1. Sperm Yoğunluğu

Sağ kauda epididimis petri kabı içerisinde 1 ml serum fizyolojik (%0,9'luk NaCl) ile bistüri yardımıyla parçalandı. Parçacıklar 2 dakika boyunca bir pensle iyice ezildi. Epididimisteki bütün spermatozoonların serum fizyolojiye geçmesi için oda sıcaklığında 4 saat inkubasyona bırakıldı. Bekleme süresini takiben spermatozoon içeren sıvı alyuvar pipetinin 0.5 çizgisine kadar; 5g sodyum bikarbonat, 1 ml formalin, 25 mg eozin ve 100 ml distile su içeren solüsyon da 101 çizgisine kadar çekildi. Böylece spermatozoon içeren sıvı 1:200 oranında sulandırılmış oldu.

Yaklaşık 10 µl sulandırılmış sıvı önceden lamel yapıştırılmış Neubauer lamının her iki sayım (toplam 400 küçük kare, 0.1 mm³ hacim) alanına lamelin kenarına pipetin ucu değdirilerek yerleştirildi. Neubauer lamı ışık mikroskobuna yerleştirilip 5 dakika beklenecek şekilde solüsyon içerisindeki spermatozoonların tüm alana homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Her iki sayım alanındaki tüm karelere düşen spermatozoonlar ışık mikroskobunda x200'lük büyütmede sayıldı.

4.6.2. Sperm Motilitesi

Motilite ölçümünde kullanılacak lam, ısıtma tablası üzerine yerleştirilerek sıcaklığının 37 °C'ye ulaşması sağlandı. Isıtılan lama birkaç damla Tris tamponu [Tris (hidroksimetil) aminometan (3.63 g), glukoz (0.50 g), sitrik asit (1.99 g) ve distile su (100 ml)] damlatıldı. Sol kauda epididimise bistüri yardımıyla birkaç defa kesi atıldı. Kesi bölgelerinden çıkan ve spermatozoon içeren sıvı Tris tamponu üzerine damlatılıp lamel yardımıyla karıştırılarak homojen bir hal alması sağlandı. Motilite hesaplaması, sol kauda epididimisten alınan bir damla süspansiyon için 3 farklı saha incelenip ortalamaları alınarak yapıldı.

4.7. Histolojik Değerlendirmeler

Testis dokuları bouin solüsyonunda yaklaşık 8 saat boyunca tespit edildikten sonra sırasıyla % 50'lik, % 60'lık ve % 70'lik etil alkol solüsyonlarında yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden (Tablo 5) geçirilerek dehidrate edildi. Dehidratasyondan sonra ksilolde parlatılıp parafine (P3558-1kg Sigma-Aldrich Paraplast Embedding Media, U.S.A) gömüldü. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler rodajlı ve polilizinli lamlara alındı. Hazırlanan preparatlar Hematoksilen- Eozin (H&E) boyası, Periyodik Asit Schiff (PAS) boyası ve Masson'un üçlü boyası ile boyandı. Işık mikroskopunda (Novel N-800M x20) incelenip fotoğraflandı.

Tablo 5: Histolojik takip işlem basamakları.

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

4.8. TUNEL Metodu

Soğutulan parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler polilizinli lamlara alındı. Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı. Negatif kontrol için doku üzerine Tdt enzimi yerine Reaction Buffer kullanılarak diğer basamaklarda herhangi bir değişiklik yapılmadı.

Kit içeriğinde belirtilen (Lot No: 2470976, ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore) ve Tablo 6' de gösterilen terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling (TUNEL) boyama işlemleri uygulanarak apoptoze giden hücreler belirlendi.

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. Değerlendirmede Harris hematoxilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi çekirdek boyaması gösteren hücreler ise apoptotik hücreler olarak kabul edildi.

Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı.

Tablo 6: TUNEL boyaması işlem basamakları.

SIRA	İŞLEM	SÜRE
1	60°C etüv	Bir gece
2	Ksilol	3x15 dakika
3	% 100, % 96, % 80, % 70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS (phosphate buffered saline)	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	7 dakika
7	PBS	3x5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı (%3 H ₂ O ₂)	5 dakika
9	PBS	3x5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	6 dakika
11	Çalışma solüsyonu (% 70 µl Reaction Buffer + % 30 TdT Enzyme)	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2 ml) + Distile su (68 ml) oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3x5 dakika
15	DAB Dilution Buffer (600 µl) + DAB Substrate (12 µl)	5-10 dakika
16	PBS	3x5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilin	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	Uygun kapatma solüsyunu ile kapatma.	

4.9. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Testis dokusunda eNOS immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. (Tablo 7).

Polilizinli lamlara soğutulmuş parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Ksilol ile deparafinizasyon ve şeffaflaştırma işleminden sonra dokular azalan dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ bloker (TA-125-HP Lot No: HP18180, Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific) ile muamele edildi. Zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Ultra V Block, Thermo Scientific) solüsyonu uygulamasından sonra primer antikor (PA1712-1 Lot No: 01714jd011231, Polyclonal Anti-NOS3Antibody, Boster Immunoleader) damlatılan dokular 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra dokular, PBS (P4417-100TAB, Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich) ile yıkandı. 30 dakika nemli ve karanlık ortamda oda ısısında sekonder antikor (TP-060-BN, Biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), Thermo Scientific) ile inkübe edildi. PBS ile yıkanan dokular Horse Radish Peroksidaz (HRP) (TS-060-HR, Streptavidin Peroxidase, Thermo Scientific,) enzimi ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı.

Tablo 7: İmmünohistokimyasal boyama prosedürü.

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

Dokulara AEC (3-Amino-9-ethyl carbazole) substrat solüsyonu (TA-060-HA, AEC Substrate System, Thermo Scientific) damlatıldı. Reaksiyon ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra bütün dokularda eş zamanlı olarak distile su ile sonlandırıldı. Mayer's hematoksilin ile zıt boyaması yapıldı. Distile su ile yıkanan preparatlar kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı.

Negatif kontrol olarak kullanılan dokularda ise primer antikor yerine PBS kullanıldı, diğer basamaklarda herhangi bir değişiklik yapılmadı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Novel N-800M x20) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

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

4.10. Biyokimyasal Analizler

Dekapitasyondan hemen sonra eksize edilen testis dokuları serum fizyolojik ile yıkanıp -20 °C'de çalışma gününe kadar muhafaza edildi. Çözdürülen doku örnekleri % 1.15'lik KCl ile 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp homojenize edildikten sonra, 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. GSH-Px aktivitesinin saptanması için ise homojenize edilen doku örnekleri 11000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlarda MDA, CAT ve GSH-Px aktivitesi tayini aşağıda belirtilen yöntemlere göre yapıldı.

4.10.1. Testis dokusunda malondialdehit düzeyinin tayini

Dokuda MDA tayini Placer metoduna göre yapıldı (106). Bu metodun temeli lipit peroksidasyonu sonucu oluşan aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonuna dayanmaktadır. Reaksiyon sonucunda pembe renkli bir kompleks oluşmakta ve çözeltinin absorbanı 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek lipit peroksidasyonunun derecesi saptanmaktadır.

4.10.2. Testis dokusunda katalaz aktivitesinin tayini

Dokuda CAT aktivitesinin ölçümü Aebi metoduna göre yapıldı (107). Bu yöntemde H_2O_2 'nin CAT tarafından iki molekül su ve bir molekül oksijene yıkım hızı 240 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

4.10.3. Testis dokusunda glutatyon peroksidaz aktivitesinin tayini

Dokularda GSH-Px aktivitesi ölçümü için Beutler metodu kullanıldı (108). GSH-Px, GSH'in okside glutatyona (GSSG) oksidasyonunu H_2O_2 kullanarak katalizler. GSSG oluşum hızı GSH-Rd reaksiyonu aracılığıyla ölçülür. Reaksiyon ortamındaki t-butilhidroperoksidin (enzim ölçümlerinde en uygun peroksid substratıdır) her bir molekülünün redüksiyonu için 1 mol GSSG oluşur. GSSG'nın GSH'a redüksiyonu ise GSH-Rd enziminin katalizlediği reaksiyonla gerçekleşir. Bu reaksiyonda GSSG'nin her bir molünün redüksiyonu için 1 mol Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat- Hidrojen (NADPH) okside olur. GSH-Px aktivitesi de NADPH oksidasyonunu takiben spektrofotometrik olarak 340 nm'deki sistemin optik dansitesindeki düşüşten hesaplanır.

4.11. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programında yapıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma değerleri olarak sunuldu. $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Normal dağılım gösteren çoklu grupların aralarındaki farklılıkları test etmek için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) uygulandı. İkili karşılaştırmalar için ise Post-hoc Tukey testi kullanıldı.

5. BULGULAR

5.1. Vücut Ağırlık Değişim Yüzdesi

Deney boyunca düzenli yapılan tartımlar sonunda tüm gruplardaki ratların ortalama vücut ağırlık değişim yüzdeleri hesaplandı (Şekil 10).

Tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarındaki ratların

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

ortalama vücut ağırlık değişim yüzdesinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($p < 0.05$). Tütün dumanı + EA grubu ile diğer gruplar arasındaki fark ise istatistiksel açıdan anlamsız bulundu ($p > 0.05$).



Şekil 10: Vücut ağırlık değişim yüzdesi. Değerler ortalama olarak verilmiştir.

5.2. Üreme organları ağırlıkları

Sağ ve sol testis ağırlıkları açısından tütün dumanı + EA grubunda hem kontrol grubuna hem de tütün dumanı grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0,05$). Epididimis, prostat bezi ve seminal vezikül ağırlıklarında gruplar arası istatistiksel bir farklılık olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$) (Tablo 8).

Tablo 8: Üreme organ ağırlıkları (gr).

Gruplar	Sağ testis	Sol testis	Sol epididimis	Sağ epididimis	Prostat bezi	Seminal vezikül
Kontrol grubu	1.22±0.11	1.24±0.13	0.54±0.07	0.49±0.02	0.61±0.13	1.12±0.33
Tütün dumanı grubu	1.32±0.10	1.33±0.12	0.51±0.04	0.48±0.04	0.53±0.14	1.07±0.05
Tütün dumanı + Mısırozü yağı grubu	1.33±0.09	1.35±0.09	0.47±0.05	0.46±0.03	0.47±0.11	0.91±0.18
Tütün dumanı + EA grubu	1.57±0.11 ^{a,b}	1.57±0.09 ^a	0.57±0.05	0.55±0.08	0.62±0.14	1.13±0.30

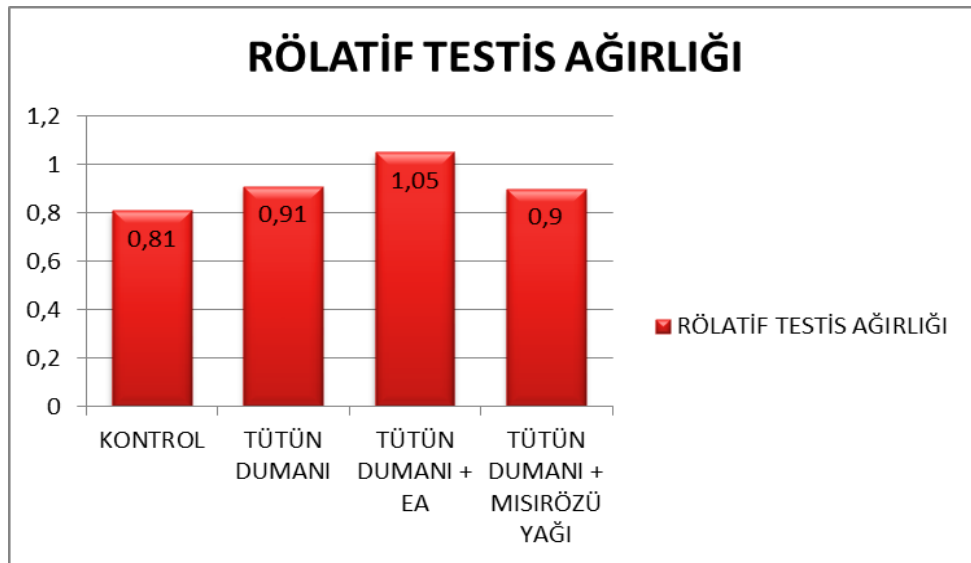
Değerler; ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

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

5.3. Rölatif testis ağırlığı

Tütün dumanı + EA grubundaki ratların rölatif testis ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu (p<0.05). Diğer gruplar arasında rölatif testis ağırlığı açısından önemli bir fark bulunmadı (p>0.05) (Şekil 11).



Şekil 11: Rölatif testis ağırlığı (gr). Değerler ortalama olarak verilmiştir.

5.4. Semen analizi

Sperm yoğunluğu ve sperm motilitesi değerlerinin gruplar arasındaki farkı istatistiksel açıdan önemli bulunmadı ($p>0,05$). Tütün dumanı uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anormal sperm miktarı anlamlı biçimde arttırdığı tespit edildi ($p<0,05$). EA uygulamasının ise anormal sperm miktarını kontrol grubuna ve tütün dumanı grubuna kıyasla ciddi anlamda düşürdüğü tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 9).

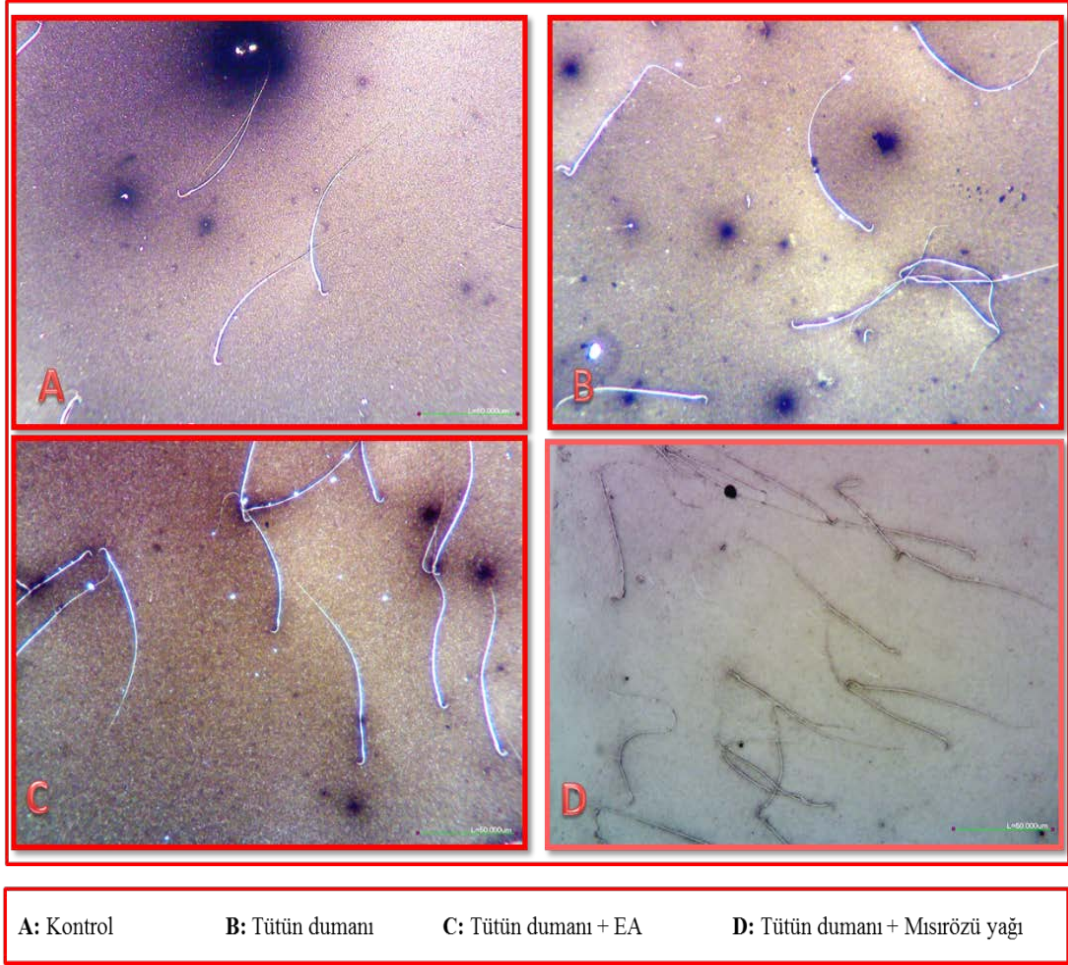
Tablo 9: Semen parametreleri.

Gruplar	Sperm yoğunluğu ($\times 10^6$ sperm/caudo 1ml^{-1})	Sperm motilitesi (%)	Anormal sperm miktarı (%)
Kontrol grubu	44.25 \pm 6.13	62.50 \pm 9.58	5.75 \pm 0.95
Tütün dumanı grubu	42.50 \pm 7.50	60.00 \pm 8.16	7.50 \pm 1.25 ^a
Tütün dumanı + Mısırözü yağı grubu	41.50 \pm 9.57	60.00 \pm 8.16	6.25 \pm 0.50
Tütün dumanı + EA grubu	45.50 \pm 9.84	62.500 \pm 5.77	3.50 \pm 1.29 ^{a,b}

Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

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



Şekil 12: Tüm gruplara ait sperm görüntüleri. x200.

5.6. Histolojik Değerlendirmeler

Kontrol grubuna (grup I) ait ratların testis dokuları incelendiğinde seminifer tübüllerin germinal epiteli ile bazal membranları ve interstisyel alan normal yapıda izlendi (Şekil 13-15).

12 hafta boyunca tütün dumanına maruz bırakılan grup II' ye ait kesitlerde seminifer tübül germinal epitelinde önemli derecede dejenerasyon, vasküler konjesyon, atrofik tübüller, interstisyel alanda ödem, çok sayıda seminifer tübülün bazal membranlarında ayrılmalar ve bazı tübüllerin lümenlerine dökülmüş immatür hücreler tespit edildi (Şekil 16-19).

Tütün dumanı + mısırözü yağı uygulanan grup III' e ait kesitlerde ise yalnızca tütün dumanına maruz bırakılan grup II ile benzer bulgulara rastlandı (Şekil 20-22).

Tütün dumanı ile birlikte EA uygulanan grup IV' te ise kontrol grubuna benzer şekilde normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli ve normal spermatogenez izlendi. Germinal epitel dejenerasyonunda, vasküler konjesyonda, interstisyel ödemde belirgin iyileşme ve seminifer tübül bazal membranlarındaki ayrılmalarda azalma gözlemlendi (Şekil 23-25).

Tüm gruplardaki ratlara ait kesitler incelenerek bu bulgulara göre histoskor çıkarıldı (Tablo 10). Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Kontrol grubu ve tütün dumanı grubu ile kıyaslanarak istatistiksel açıdan anlamlı bulunan değerler işaretlendi.

Tablo 10: Histolojik değerlendirmelere ait histoskor tablosu.

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

Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

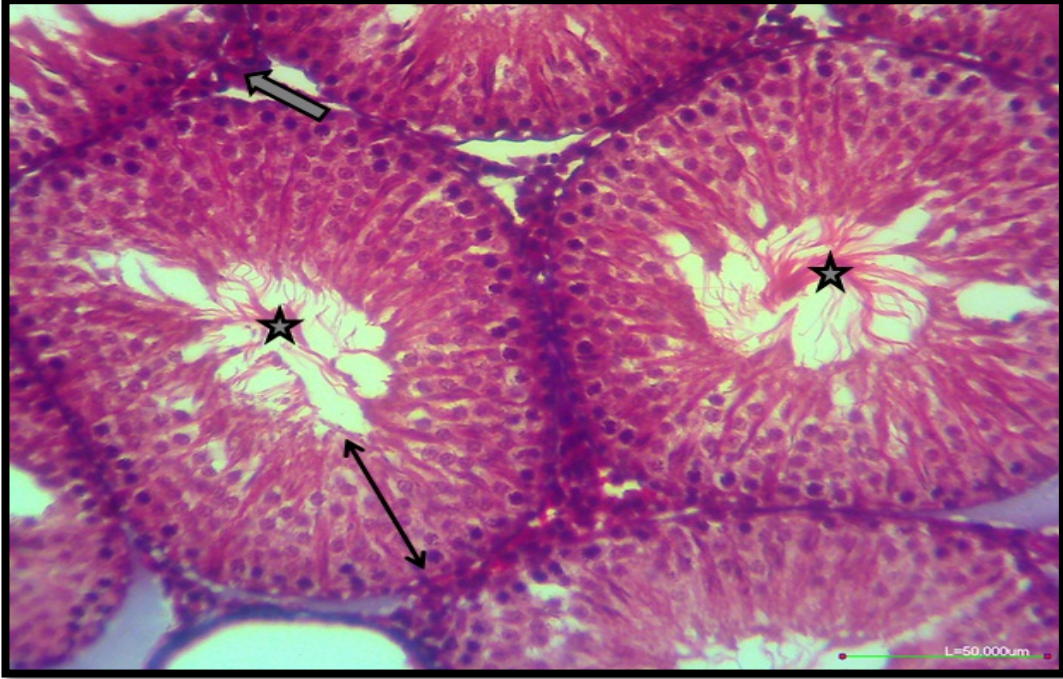
^bTütün dumanı grubuna göre karşılaştırıldığında, (p<0.05).



Şekil 13: Kontrol grubu. Normal görünlü seminifer tübül germinal epiteli (\leftrightarrow), interstisyel alan (\Rightarrow) ve normal spermatogenez (\star). H&E x200.



Şekil 14: Kontrol grubu. Normal görünlü seminifer tübül germinal epiteli (\leftrightarrow), bazal membranı (\blacktriangleright) ve interstisyel alan (\Rightarrow) ve normal spermatogenez (\star). PAS x200.



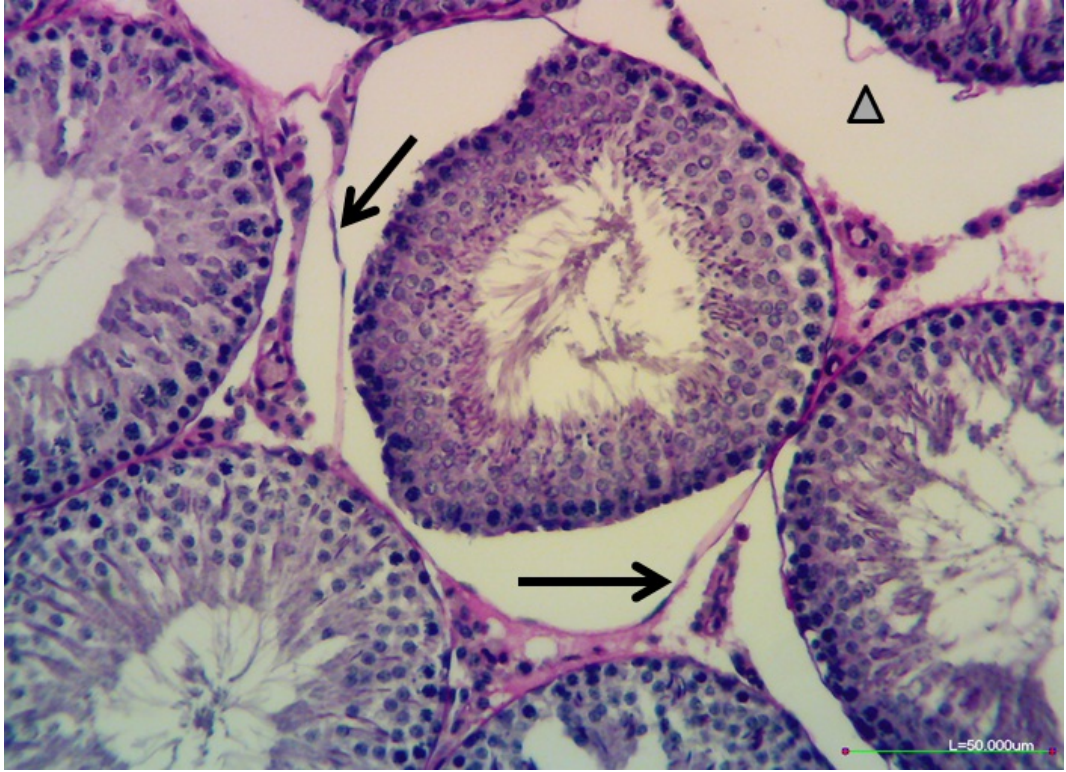
Şekil 15: Kontrol grubu. Normal histolojik görünümlü seminifer tübül germinal epiteli ve bazal membranı (\leftrightarrow), interstisyel alan (\Rightarrow) ve normal spermatogenez (\star). Masson'un üçlü boyası x200.



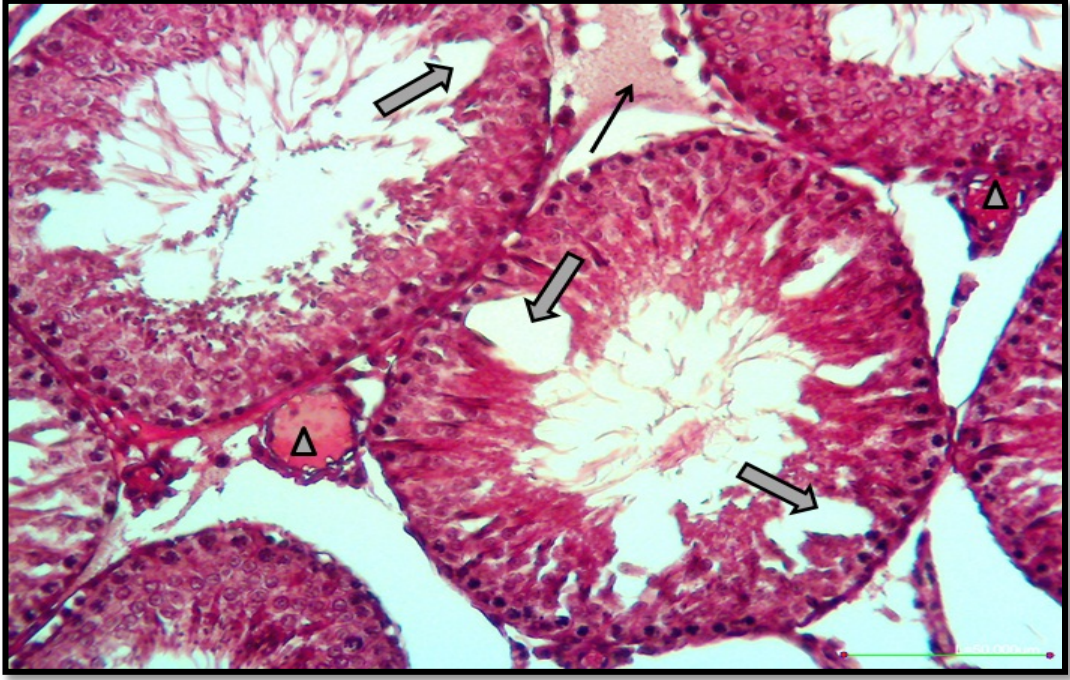
Şekil 16: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler (\downarrow), atrofik tübül (\star), interstisyel alanda ödem (Δ) ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (\Rightarrow). H&E x200.



Şekil 17: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül bazal membranında ayrılmalar (→), vasküler konjesyon (◇) H&E x200.



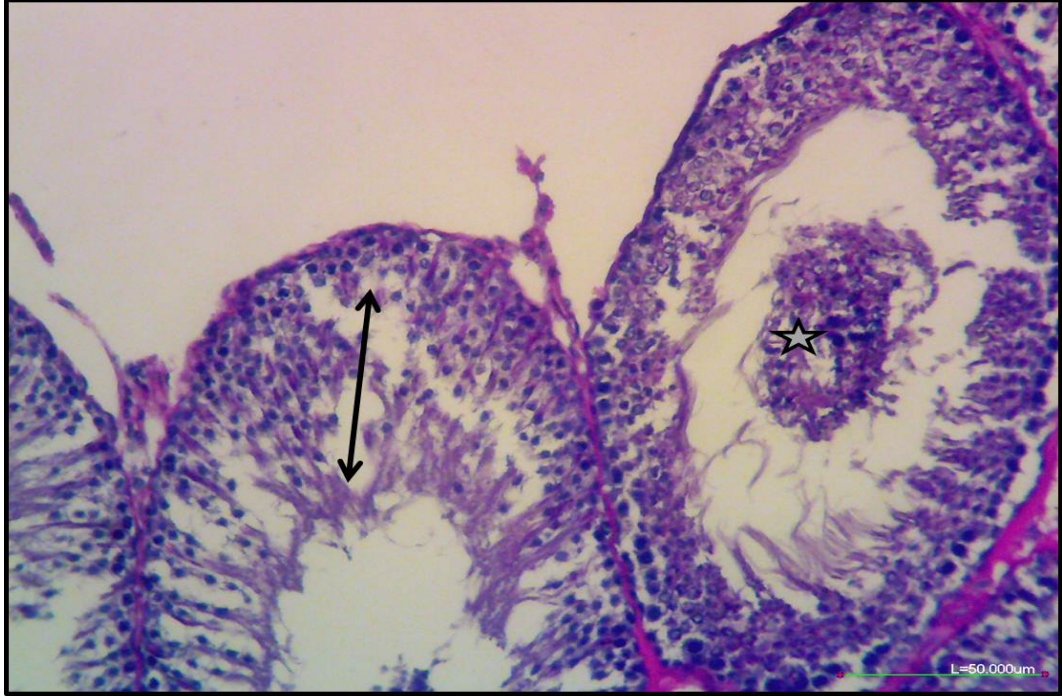
Şekil 18: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül bazal membranında ayrılmalar (→) ve interstisyel alanda ödem (Δ). PAS x200.



Şekil 19: Tütün dumanı grubu. Seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (\Rightarrow), vasküler konjesyon (Δ) ve interstisyel alanda ödem (\rightarrow). Masson'un üçlü boyası x200.



Şekil 20: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. Seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler (\star) ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (\Rightarrow). H&E x200.



Şekil 21: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. Seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler (☆) ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (↔). PAS x200.



Şekil 22: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. Vasküler konjesyon (Δ) ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (⇒). Masson'un üçlü boyası x200.



Şekil 23: Tütün dumanı + EA grubu. Normal görümlü seminifer tübül germinal epiteli (↔) ve normal spermatogenez (☆) H&E x200.



Şekil 24: Tütün dumanı + EA grubu. Normal görümlü seminifer tübül bazal membranı (→), seminifer tübül germinal epiteli (⇒) ve vasküler konjesyonda azalma (Δ). PAS x200.



Şekil 25: Tütün dumanı + EA grubu. Normal görümlü seminifer tübül bazal membranı (→) ve normal spermatogenez (☆). Masson'un üçlü boyası x200.

5.7. TUNEL Bulguları

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği testis dokusunda spermatogenik seri hücrelerinde gözlemlendi. TUNEL pozitifliği; kontrol grubu (Şekil 26) ve tütün dumanı + EA grubunda (Şekil 29) benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tütün dumanı grubunda anlamlı bir artış vardı ($p < 0.05$) (Şekil 27). Tütün dumanı grubu ile kıyaslandığında tütün dumanı + mısırözü yağı grubunda ise anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p > 0.05$) (Şekil 28). Pozitif kontrol için rat meme dokusu kullanıldı (Şekil 30). Negatif kontrolde ise TUNEL pozitifliğine rastlanmadı (Şekil 31). (Tablo 11).

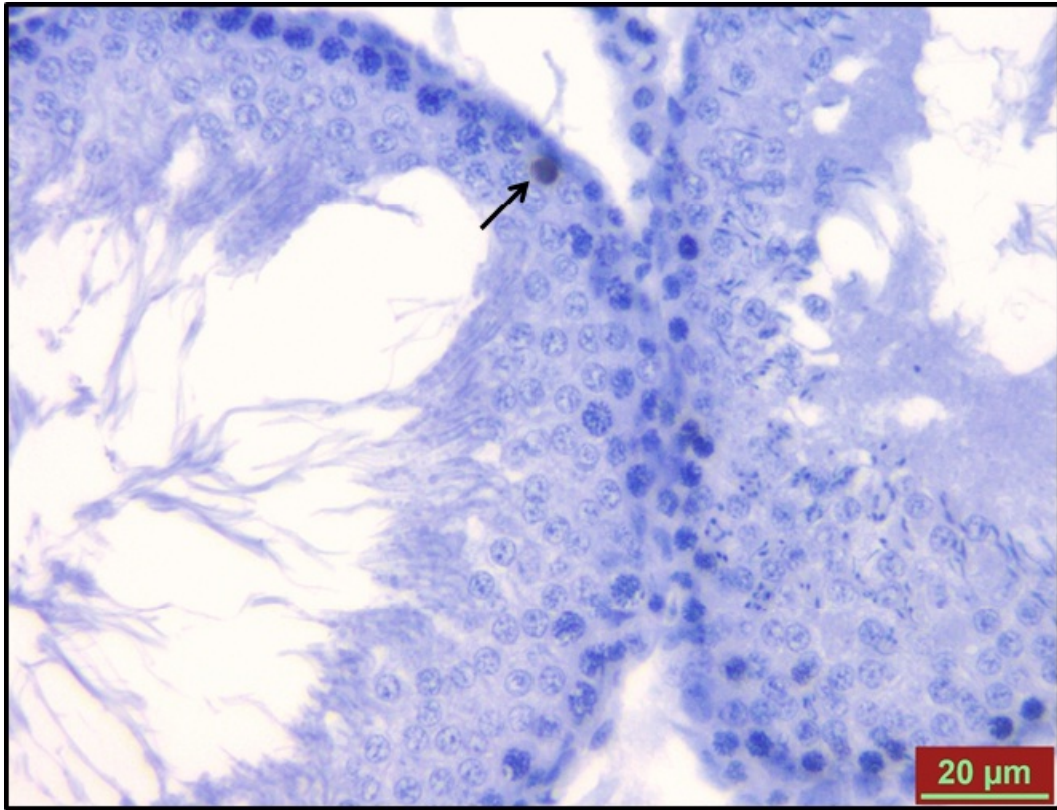
Tablo 11: Apoptotik indeks (%).

GRUPLAR	APOPTOTİK İNDEKS (%)
Kontrol grubu	1.16 ± 0.40
Tütün dumanı grubu	4.83 ± 0.98 ^a
Tütün dumanı + Mısırözü yağı grubu	4.50 ± 0.83 ^a
Tütün dumanı + EA grubu	1.85 ± 0.69 ^b

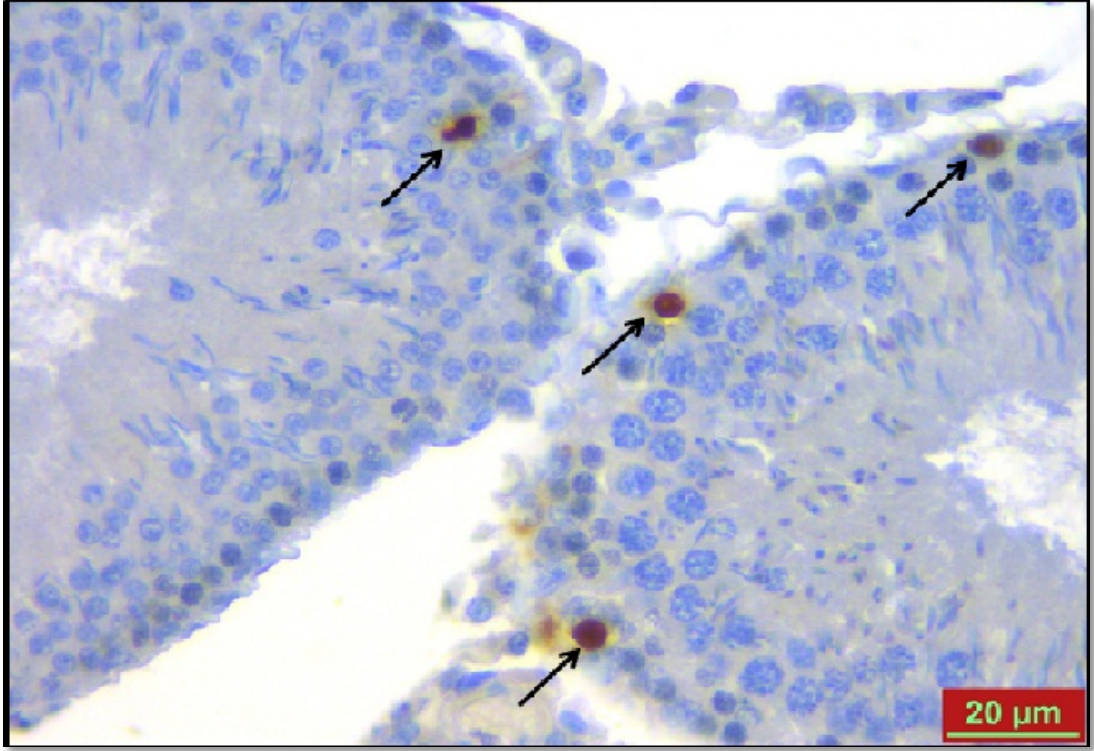
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

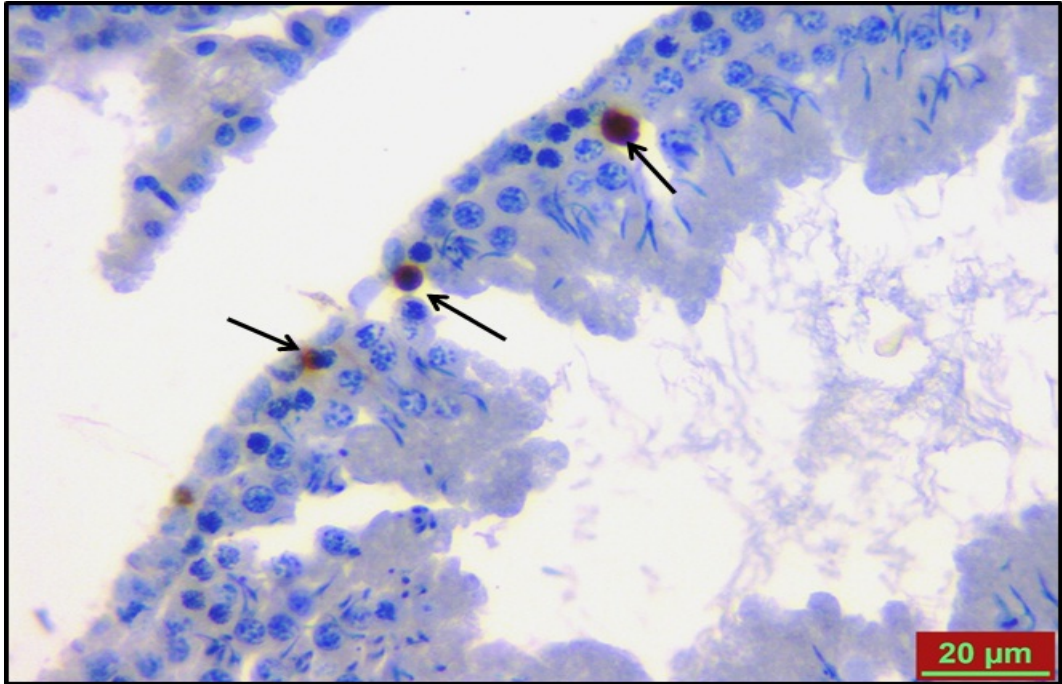
^bTütün dumanı grubuna göre karşılaştırıldığında, (p<0.05).



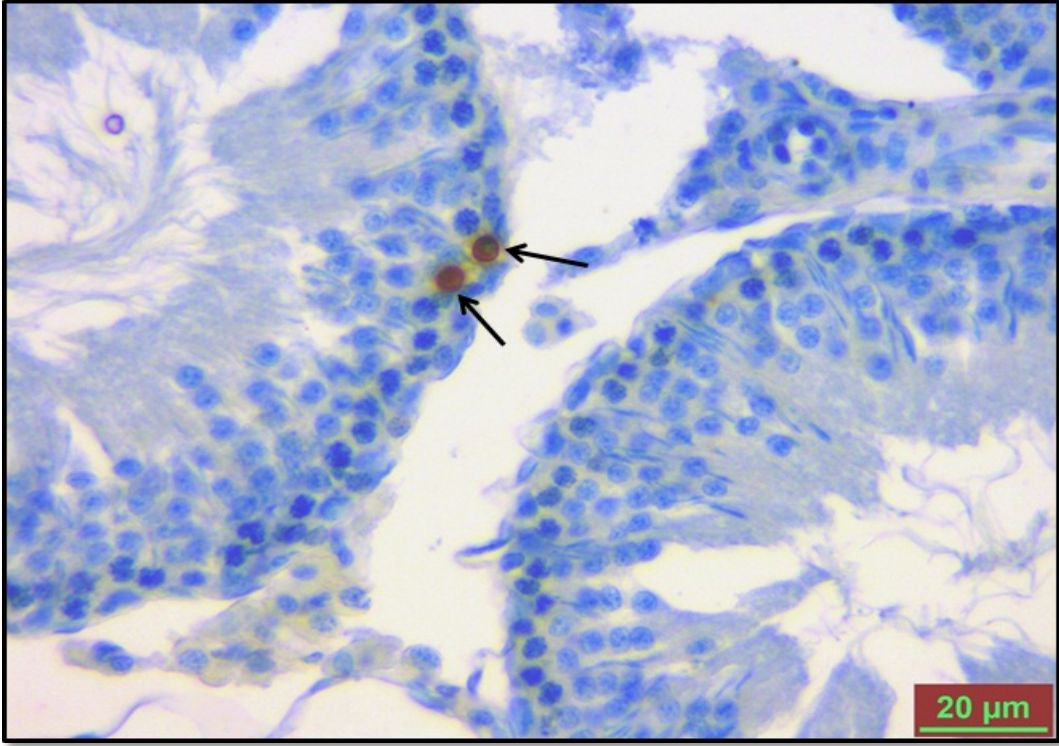
Şekil 26: Kontrol grubu. TUNEL pozitif hücre (→). x400



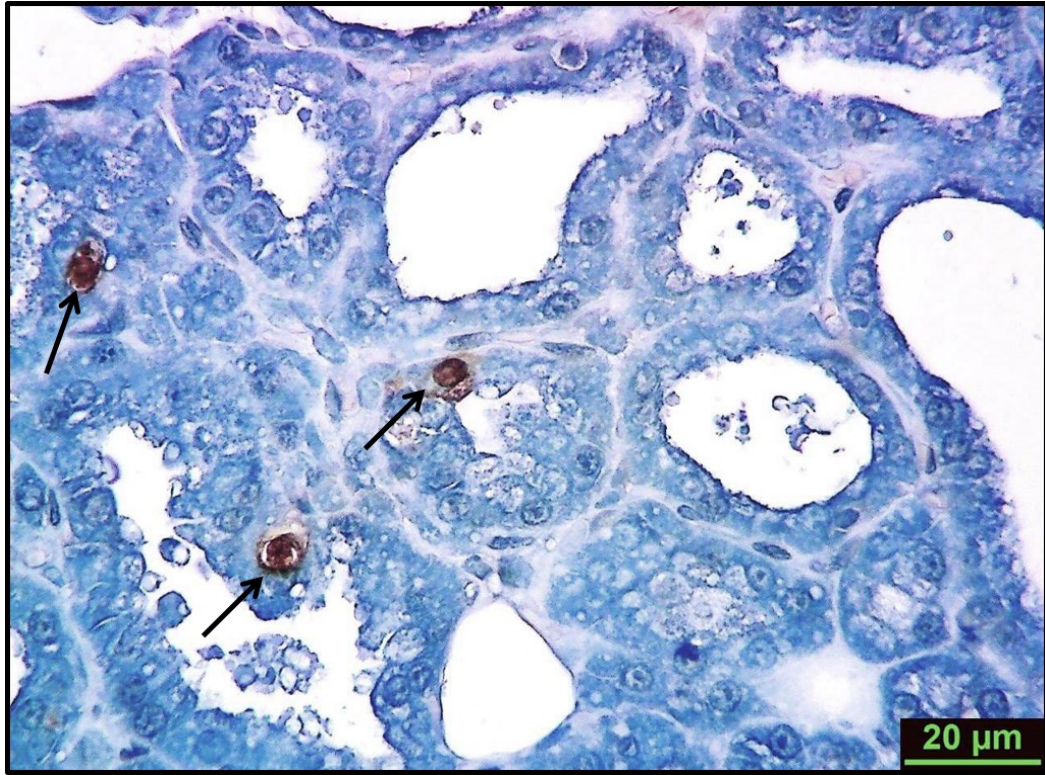
Şekil 27: Tütün dumanı grubu. TUNEL pozitif hücre (→). x400.



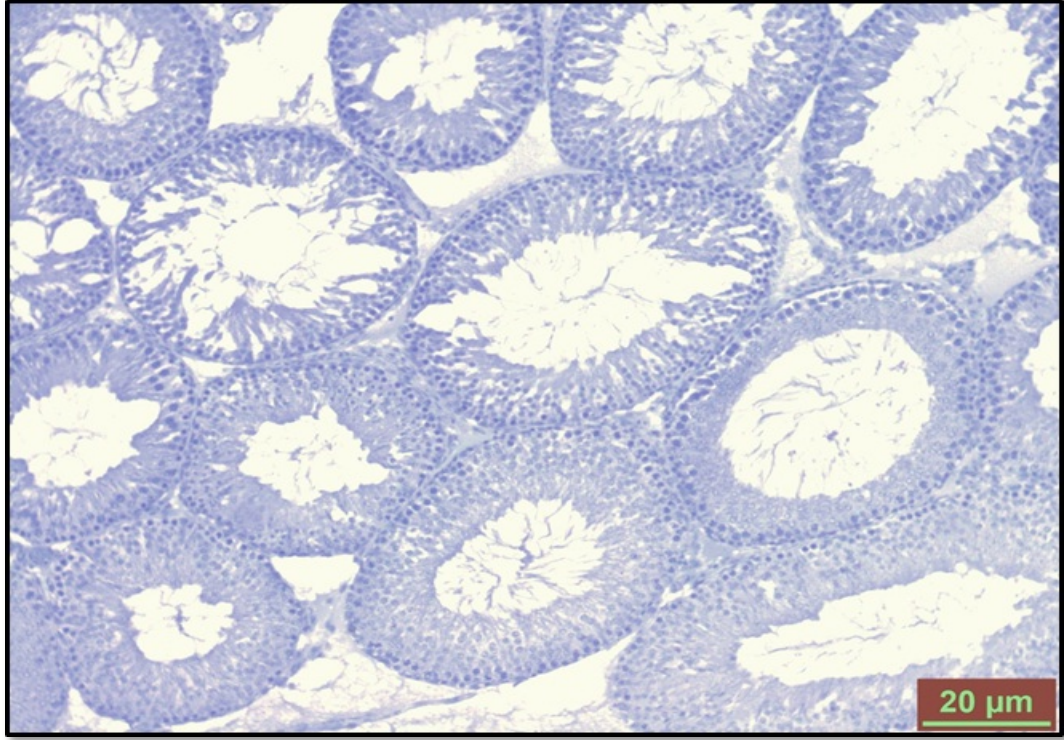
Şekil 28: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. TUNEL pozitif hücre (→). x400.



Şekil 29: Tütün dumanı + EA grubu. Az sayıda TUNEL pozitif hücre (→). x400.



Şekil 30: Pozitif kontrol rat meme dokusu. TUNEL pozitif hücre (→). x400.



Şekil 31: Negatif kontrol. TUNEL. x100.

5.8. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) İmmünreaktivitesi

Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; eNOS immünreaktivitesi testis dokusunda interstisyel alanda görüldü. eNOS immünreaktivitesi kontrol grubunda (Şekil 32) ve tütün dumanı + EA (Şekil 35) grubunda benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tütün dumanı grubunda anlamlı bir artış vardı ($p < 0.05$) (Şekil 33). Tütün dumanı grubu ile kıyaslandığında tütün dumanı + mısırözü yağı grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Şekil 34). Negatif kontrolde ise eNOS immünreaktivitesine rastlanmadı (Şekil 36). (Tablo 12).

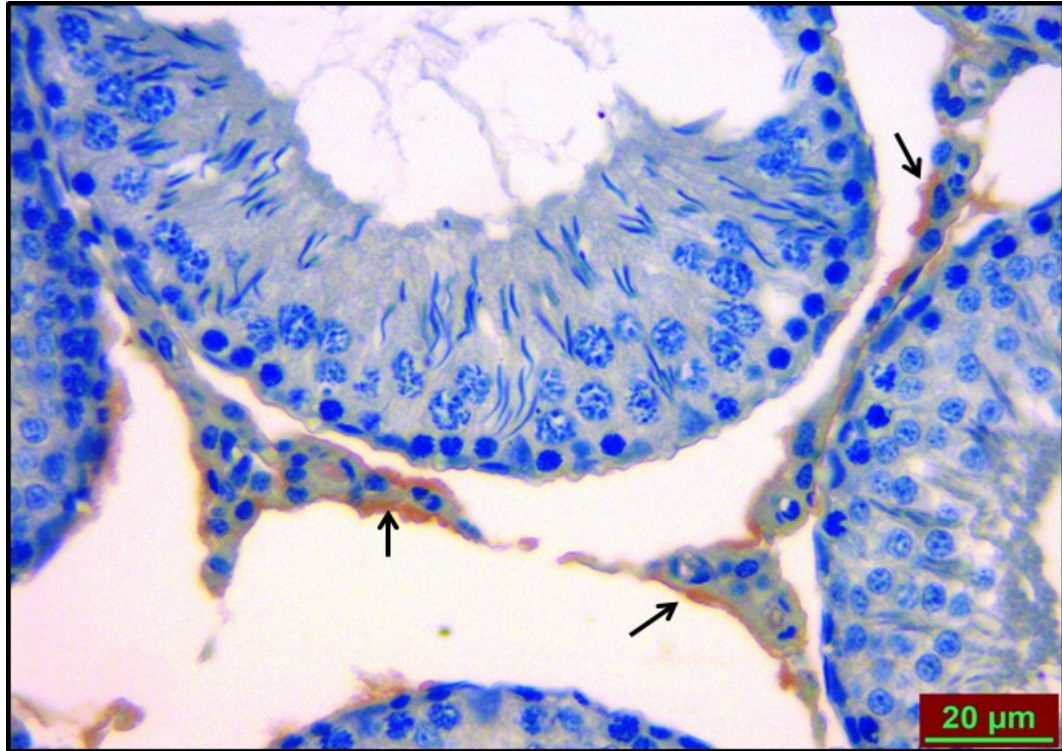
Tablo 12: eNOS immünreaktivitesi.

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

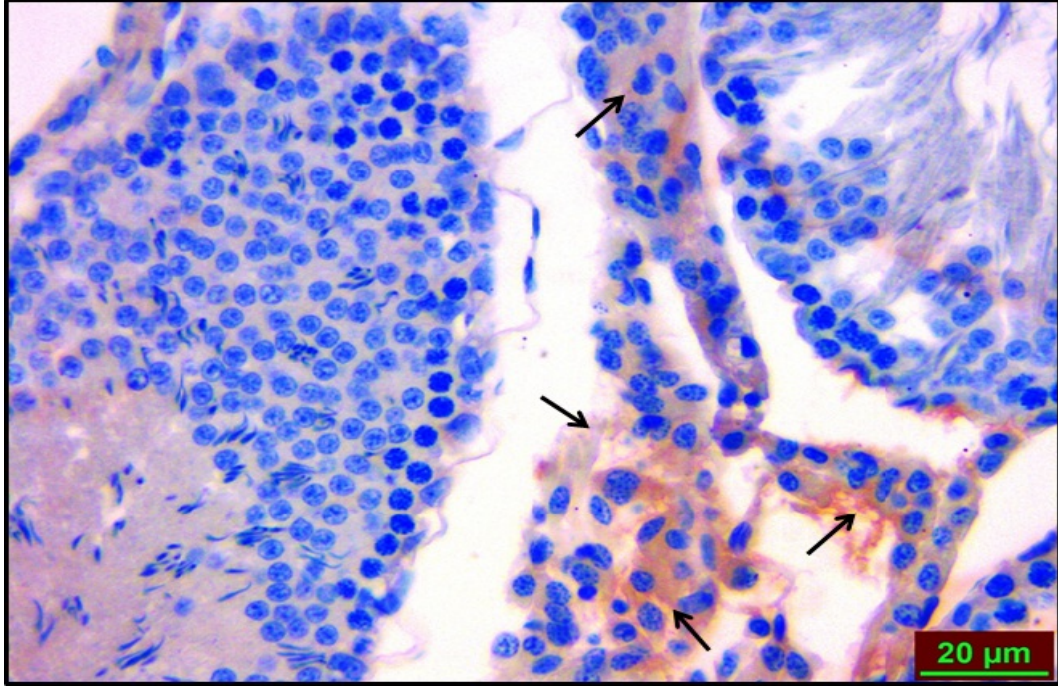
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

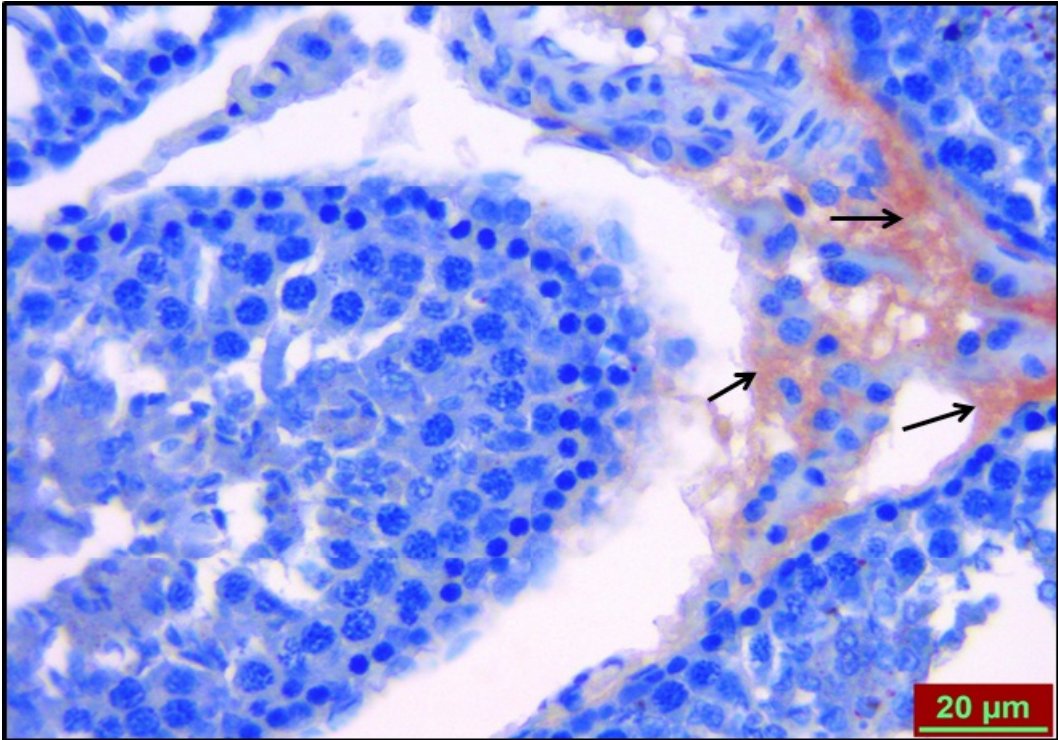
^bTütün dumanı grubuna göre karşılaştırıldığında, (p<0.05).



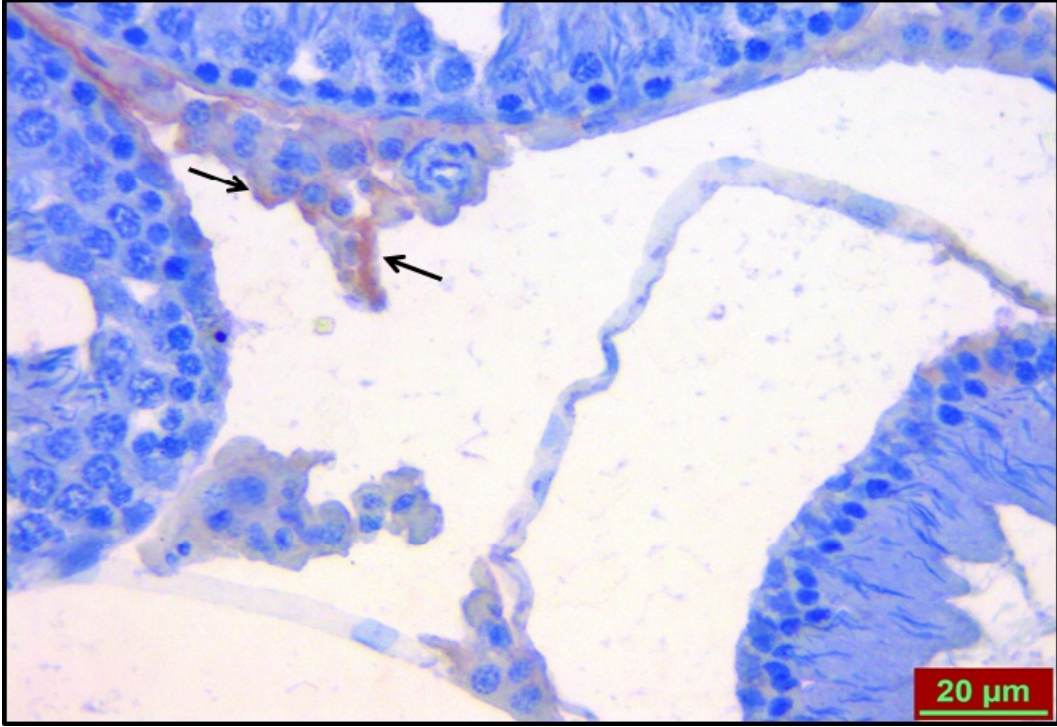
Şekil 32: Kontrol grubu. İnterstisyel alanda eNOS immünreaktivitesi (→). x400.



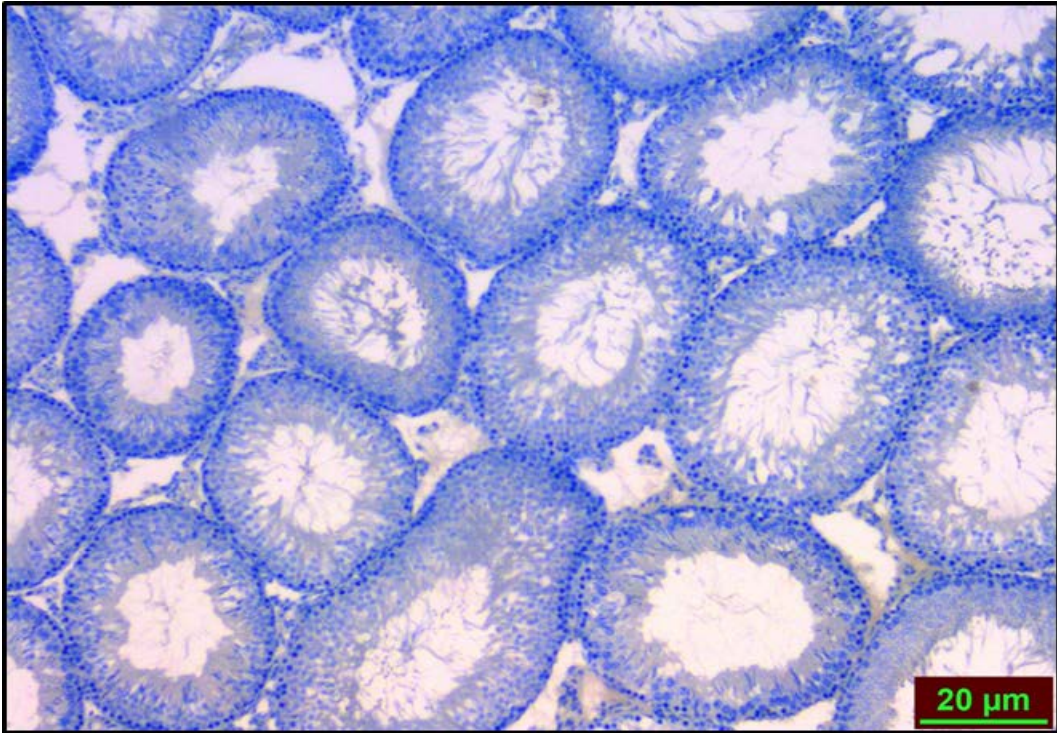
Şekil 33: Tütün dumanı grubu. İnterstisyel alanda artmış eNOS immünreaktivitesi (→). x400.



Şekil 34: Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu. İnterstisyel alanda artmış eNOS immünreaktivitesi (→). x400.



Şekil 35: Tütün dumanı + EA grubu. İnterstisyel alanda eNOS immünreaktivitesi (→). x400.



Şekil 36: Negatif kontrol. x100.

5.9. Biyokimyasal Analizler

Grupların testis dokusu MDA düzeyleri ile GSH-Px ve CAT aktiviteleri Tablo 9’da verilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeylerinin tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($p<0.001$). Tütün dumanı + EA grubunda ise tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarına göre anlamlı düzeyde azalarak kontrol grubuna yakın düzeylerde olduğu saptandı ($p<0.001$).

Bununla birlikte antioksidan savunma sisteminin enzimlerinden olan CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin; kontrol grubuna göre tütün dumanı ve tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulundu ($p<0.001$). Hem CAT hem de GSH-Px aktivitelerinin tütün dumanı + EA grubunda tütün dumanı + mısırözü yağı gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı tespit edildi ($p<0.001$). Kontrol grubu ile tütün dumanı + EA grubu arasında CAT ve GSH-Px aktiviteleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p>0.05$).

Tablo 13: Grupların testis dokusu MDA, CAT, GSH-Px düzeyleri.

GRUPLAR	MDA (nmol/g doku)	CAT (k/g protein)	GSH-Px (U/g protein)
Kontrol grubu	14,030 ± 0,857 ^b	20,404 ± 0,922 ^b	107,395 ± 6,763 ^b
Tütün dumanı grubu	21,864 ± 1,246 ^a	13,130 ± 1,614 ^a	71,127 ± 5,696 ^a
Tütün dumanı + mısırözü yağı grubu	21,409 ± 0,965 ^a	12,446 ± 2,734 ^a	64,828 ± 5,613 ^a
Tütün dumanı + EA grubu	14,742 ± 1,544 ^b	19,880 ± 1,495 ^b	109,429 ± 15,691 ^b
p değeri	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, b: Tütün dumanı grubu ile karşılaştırıldığında (p < 0.001).

6. TARTIŞMA

Tütün kullanımı, ciddi anlamda birçok sağlık sorununa yol açan, tedavi edilebilir hastalık ve ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer alan risk faktörüdür. Tütün dumanına maruz kalanların normal yaşam süresinin kısaldığı ve ölüm yaşının düştüğü bilinmektedir. Dünya genelinde her 10 ölümden birinin nedeni tütün kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklardır (23). Tütün kullanımının solunum sistemi, kardiyovasküler sistem, üreme sistemi ve gastrointestinal sistemler üzerinde olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (109).

Erkek infertilitesi insanoğlunun günümüzdeki en büyük sağlık problemlerinden biridir. Dolayısıyla bu konunun aydınlatılması amacıyla sürekli yeni bilimsel araştırmalar yapılmaktadır.

Tütün dumanına maruz bırakılan deney hayvanlarının vücut ağırlıklarında düşüş olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (110, 111). Çalışmamızda da bu sonuçlarla uyumlu olarak tütün dumanına maruz kalan hayvanların vücut ağırlığı değişim yüzdelerinde azalma bulunmuştur.

Yamamoto ve arkadaşlarının Wistar cinsi ratlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada tütün dumanına maruz kalmanın sperm miktarını, motilitesini ve fertilizasyon kapasitesini azalttığı bildirilmiştir (112). Bir başka çalışmada ise 10 hafta boyunca sigara dumanına maruz bırakılan erkek farelerin epididimal spermatozoon sayısında azalma ve kuyruksuz sperm anomalisinde artış tespit edilmiştir (111). Kapawa ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada ise Wistar cinsi ratlarda 10 haftalık tütün maruziyetinin hareketli sperm yüzdesinde ve motilitede azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (113).

Bizim yaptığımız sperm analizlerinde ise sperm yoğunluğu ve sperm motilitesi değerlerinin gruplar arasındaki farkı istatistiksel açıdan anlamsız olarak belirlendi. Ancak literatürle paralel olarak tütün dumanı uygulamasının anormal sperm miktarını anlamlı bir biçimde arttırdığı tespit edildi.

60 gün boyunca günde 2 saat sigara dumanına maruz bırakılan Wistar cinsi ratlara ait testis dokularının elektron mikroskobu altında incelenmesi sonucu spermatogenetik seri hücrelerinde önemli derecede dejenerasyon ve belirgin ayrılmalar gözlemlendiği, germinatif epitel bütünlüğünün ise zarar gördüğü bildirilmiştir (114). 13 hafta boyunca günde 24 dakika sigara dumanına maruz bırakılan Sprague-Dawley cinsi ratların testis dokuları incelendiğinde; seminifer tübül çaplarında, germinal epitel yüksekliğinde, Leydig ve spermatogenik seri hücrelerinin sayılarında azalma olduğu rapor edilmiştir (115). La Maestra ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada ise 10 hafta boyunca günde 3 saat sigara dumanına maruz bırakılan erkek farelerin testislerindeki seminifer tübüllerde dejenerasyon ve atrofi, seminifer tübül germinatif epitelinde incelme, interstisyel alanda ödem ve Leydig hücrelerinin sayısında azalma tespit edilmiştir (111).

Bizim çalışmamızda da literatürdeki bu bulgulara paralel olarak 12 hafta boyunca günde 2 saat tütün dumanına maruz bırakılan gruptaki ratlara ait kesitlerde seminifer tübül germinal epitelinde önemli derecede dejenerasyon, çok sayıda seminifer tübülün bazal membranlarında ayrılmalar, vasküler konjesyonda artış, atrofik tübüller ve interstisyel alanda ödem tespit edildi.

Dokuda fizyolojik ortamın korunmasında, canlılığın devamlılığında ve bozulmuş fonksiyonlu hücrelerin ortadan kaldırılmasında etkin olan

programlanmış hücre ölümü apoptozis, testiküler dokuda da sık gerçekleşen bir olaydır. Spermatogenezis; spermatogonyumlardan hücre bölünmesi ve farklılaşması yoluyla olgun sperm oluşmasıdır. Sağlıklı bir spermatogenezis süreci içinde, devamlı olarak gerçekleşen hücresel gelişim ve farklılaşmanın yanı sıra germ hücrelerde apoptozis de görülür ve bu durum sperm oluşumu kritik rol oynar (116, 117) Apoptozis, spermatogeneziste genellikle spermatositler ve spermatogonyumlarda gerçekleşir (118). Germ hücrelerindeki bu hücresel ölüm spermatozoanın normal gelişimi açısından oldukça önemlidir (119). Yapılan bir çalışmada testis dokusunda devamlı olarak spontan apoptozis gerçekleştiği rapor edilmiştir (120). Testiste, hücresel farklılaşma esnasında hasar gören bu germ hücrelerinin ortadan kaldırılmasına yönelik bu süreçte erkek germ hücrelerinin yaklaşık % 75'i apoptozise maruz kalır (121). Testiküler gelişimin erken dönemlerinde başlayan apoptozis süreci, gelişen germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında oranı dengede tutmaya yönelik fizyolojik bir olaydır (122-125). Spermatogeneziste germ hücre apoptozisinin hormonal olarak düzenlendiği tespit edilmiştir (126, 127). Hipofizektomize ratların hem germ hücrelerinde hem de somatik hücrelerinde yoğun apoptozis gerçekleştiği ve FSH veya hCG hormon tedavilerinin bu yoğun apoptozis engellenebildiği gösterilmiştir (127, 128). Testis dokusunun ısı ve radyasyon gibi faktörlere olan duyarlılığı da germ hücrelerindeki apoptozisi artıran önemli bir etkendir (129). Özetle testis dokusundaki dengeyi bozan dış uyaranların varlığında fizyolojik olmayan yüksek düzeylerde apoptozis gerçekleşir, bu duruma bağlı olarak da spermatogeneziste bozulma ve infertilite durumları ortaya çıkabilir (130-132).

Rajpurkar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada peripubertal dönemdeki Sprague-Dawley cinsi ratlar 45 gün boyunca sigara dumanına maruz bırakılmış olup bu durumun testislerde apoptotik indeksi arttırdığı bildirilmiştir (133). Yine başka bir çalışmada 8 hafta boyunca günde 3 saat sigara dumanına maruz bırakılan Wistar cinsi ratların testis dokusu incelenmiş ve seminifer tübül dejenerasyonu, atrofik tübüllerde ve apoptotik indekste artış olduğu gösterilmiştir (134). Çalışmamızda 12 hafta boyunca günde 2 saat uygulanan tütün dumanı maruziyetinin ratların testislerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptotik indeksi istatistiksel olarak anlamlı biçimde arttırdığı görüldü.

Erkek üreme fonksiyonu ve fertilizasyon açısından önemli roller üstlenen NO, fizyolojik durumlarda sperm motilitesini ve canlılığını destekler. Ancak oksidatif stres gibi durumlarda yükselen NO konsantrasyonu istenmeyen etkiler gösterir. Testiküler torsiyonda ve çeşitli inflamasyon modellerinde NO seviyesinin belirgin biçimde arttığı tespit edilmiştir (135, 136). Apoptotik germ hücrelerinin artışı ile NOS aktivitesinin artması ve total antioksidan kapasitesinin azalması arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir (137). 8 haftalık Wistar cinsi ratlarda kadmiyum ile oluşturulmuş testiküler hasar sonucu eNOS immünreaktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (138). Bizim çalışmamızda da tütün dumanına maruz kalan ratlarda interstisyel alanda eNOS immünreaktivitesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı görüldü.

Spermatozoalar plazma membranlarındaki çoklu doymamış yağ asitleri ve sitoplazmalarındaki süpürücü enzimlerin konsantrasyonlarındaki düşüklük sebebiyle aşırı ROS kaynaklı hasarlara oldukça duyarlıdırlar (139, 140). Serbest radikal artışı hücre membranlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerini oksitleyip

bozulmalarına neden olarak lipid peroksidasyonunu uyarabilir. Sperm lipidlerinin peroksidasyonu spermatozoa membran lipidlerinin matris yapısına zarar verebilir. Buna bağlı olarak meydana gelen hücre içi adenosin tri fosfat (ATP)'nin hızlı kaybı, aksonemal hasara, sperm hareketliliğinin azalmasına ve spermin boyun kısmında defektlere neden olur (141, 142). ROS biriktiği zaman meydana gelen bu oksidatif hasara karşı testislerde çeşitli antioksidan enzimler kullanılarak korunma mekanizmaları gelişir. Bunlardan en önemlileri CAT ve GSH-Px'tir (143). Wistar cinsi ratlar üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada günde 4 defa 30'ar dk uygulanan tütün dumanının testislerde MDA seviyesini arttırdığı, GSH-Px ve CAT düzeyinin ise düşürdüğü bildirilmiştir (144).

Tütün dumanı maruziyetinin testis dokusundaki etkilerine karşı ellajik asidin nasıl bir rol oynadığına dair herhangi bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Ancak ellajik asidin çok güçlü bir antioksidan olduğu rapor edilmiştir (145, 146).

Yapılan iki ayrı çalışmada 8 haftalık Sprague-Dawley cinsi ratlarda 15mg/kg dozunda siklosporin-A ve 7 mg/kg dozunda sisplatin ile oluşturdukları testiküler hasarlar sonucunda anormal sperm yüzdesinde artış, spermatogenik seri hücrelerinde nekrozis, tübüler dejenerasyon ve atrofi, interstisyel ödem, vasküler konjesyon ve lümene dökülmüş immatür hücreler gözlenmiştir. 10 mg/kg dozunda oral gavaj yoluyla uygulanan ellajik asitin ise bu bulguların çoğunda belirgin biçimde azalma sağlayarak testiste koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca yine aynı çalışmada siklosporin-A uygulaması MDA seviyesinde artışa; GSH-Px, GSH ve CAT aktivitesinde ise düşüşe neden olmuştur. Ellajik asit uygulamasının bu değişimleri önleyerek, oksidatif stres kaynaklı doku hasarını engellediği bildirilmiştir (83, 147). Adriamisin ile oluşturulan testiküler hasara

karşı 2 mg/kg dozunda uygulanan ellajik asidin koruyucu etki göstererek lipid peroksidasyonunu ve apoptozisi azalttığı rapor edilmiştir (148).

Bizim çalışmamızda da tütün dumanı ile birlikte uygulanan ellajik asidin ratların rölatif testis ağırlıklarını kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı bulundu.

Anormal sperm miktarını ise kontrol grubu ve tütün dumanı grubuna kıyasla ciddi anlamda düşürdüğü tespit edildi. Histolojik değerlendirmelerde tütün dumanı + ellajik asit grubunda kontrol grubuna benzer şekilde normal görünümlü seminifer tübül germinal epitel ve normal spermatogenez izlendi. Ellajik asit uygulamasının, tütün dumanına maruz kalma sonucu ortaya çıkan seminifer tübül germinal epitel dejenerasyonunda, vasküler konjesyonda, interstisyel ödemde belirgin iyileşmeyi ve seminifer tübül bazal membranlarındaki ayrılmalarda azalmayı sağladığı görüldü. Ayrıca ellajik asit uygulamasının interstisyel alandaki eNOS immünreaktivitesini düşürdüğü ve apoptotik indeksi azalttığı tespit edildi. Ayrıca tütün dumanı maruziyeti ile birlikte uygulanan ellajik asidin testis dokusunda MDA düzeyini düşürdüğü, antioksidan enzimlerden CAT ve GSH-Px düzeylerini ise arttırarak dokuda koruma sağladığı bulundu.

Sonuç olarak çalışmamızın bulguları birlikte değerlendirildiklerinde 12 hafta boyunca günde 2 saat uygulanan tütün dumanının rat testis dokusunda oksidatif hasara yol açtığı görüldü. Güçlü antioksidan özelliği bilinen ve beslenmede yaygın olarak tüketilen, özellikle kırmızı meyvelerin yapısında bulunan ellajik asitin, tütün dumanı kaynaklı bu oksidatif hasara karşı ciddi anlamda koruyucu bir etki gösterebileceği tespit edildi.

7. KAYNAKLAR

1. Kuran O. Sistematik Anatomi. 3. Baskı, İstanbul: Filiz Kitabevi, 1993; 498-499.
2. Putz R, Pabst R. Sobotta İnsan Anatomisi Atlası. 5. Baskı, İstanbul: Beta basım yayım dağıtım, 2001; 191.
3. Moore KL. Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Dalçık H (Çevirenler). 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2009; 263-266.
4. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Basaklar C (Çeviren). 6. baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 1990; 260.
5. Hall JE. Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji. Yegen B (Çeviren). 12. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2013; 973-984.
6. Damjanov I. Histopathology: A Color Atlas and Text Book. International Edition, USA: Williams & Wilkins, 1996; 297.
7. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Solakoğlu S, Aytekin Y (Çevirenler). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2009; 418-427.
8. Papadopoulos GC, Pavlou HM. Karşılaştırmalı Histoloji Atlası. Mutus R, Bozkurt H, Aktas A (Çevirenler). Nobel Tıp Kitapevleri, 2012; 154.
9. Di Fiore MSH. Histoloji Atlası. Kayalı H (Çeviren). 5. Baskı, İstanbul: Güven Yayınları, 1981; 209.
10. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çevirenler). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri, 2009; 385.
11. Şuben M. Tütün fabrikasyonu. 1.baskı, İstanbul: TEYO yayını, 1989.
12. Otan H, Apti R. Tütün. 1.baskı, İzmir: ETAEM yayını, 1989.
13. Tütün Eksperleri Yüksek Okulu. Tütüncülüğe giriş. İstanbul: TEYO yayını, 1978.
14. Barış İ. Sigara ve sağlık. 1. Baskı, Ankara: MEB yayınları, 1994.
15. Nafiz Z. Tütün ziraati ve hastalıkları. 1. baskı, İstanbul: Cezri matbaa, 1932.
16. Özendi S. Avrupa Birliği'nde tütün kontrolü ve Türkiye'deki uygulamalarının incelenmesi. Tez, Ankara: 2006.
17. Azkan N. Tütün yaprağının kimyasal bileşimi. Sigara ve sağlık. Bursa, 2002; 10-17.
18. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. World Health Organization International Agency for Research on Cancer 2004; 83.
19. Hymowitz N. Tobacco. Clinical Textbook of Addictive Disorders. NewYork: The Guilford Press, 2005; 105-116.
20. Kay J, Tasman A. Substance Abuse: Nicotine Dependence. Essentials of Psychiatry, Wiley & Sons Ltd, 2006; 413-477.
21. Öztuna M. Sigara bağımlılığı ve kadın. İ.Ü. Cerrahpaşa tıp fak. sürekli tıp eğitimi etkinlikleri sempozyum dizisi, no: 62, 2008;127-142.

22. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Nat Cancer Ins* 1999; 91: 1194-1210.
23. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Küresel Yetişkin Tütün Araştırması Türkiye 2012. Ankara: Anıl Matbaa, 2014.
24. Benowitz NL, Brunetta PG. Smoking hazards and cessation. In: Mason RJ, Broaddus C, Murray JF, Nadel JA (Editors). *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine*. 4th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders 2005; 2453-2468.
25. *The Tobacco Atlas* © World Health Organization Brighton: 2002; 32-33.
26. Oberley TD, Oberley LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol* 1997; 12: 525-535.
27. Valluru L, Dasari S, Wudayagiri R. Role of free radicals and antioxidants in gynecological cancers: current status and future prospects. *Oxid Antioxid Med Sci* 2014; 3: 15-26.
28. Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 2004; 52: 794-804.
29. Gavella M, Lipovac V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl* 1992; 28 (2):135-141.
30. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, et al. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987; 8(5): 338-348.
31. Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, et al. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic Res*. 2005; 39(7): 697-705.
32. Pons E, Sipila P, Britan A, et al. Epididymal expression of mouse GPX proteins: analysis of the mechanisms of GPX5 tissue and region-specific expression through in vitro and in vivo approaches. Charlottesville, Va: The Van Doren Company; 2003; 74-93.
33. Thiele JJ, Friesleben HJ, Fuchs J, et al. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum Reprod*. 1995; 10(1): 110-115.
34. Colagar AH, Marzony ET. Ascorbic acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. *J Clin Biochem Nutr*. 2009; 45(2):144-149.
35. Kutlubay R, Oguz EO, Can B, et al. Vitamin E protection from testicular damage caused by intraperitoneal aluminium. *Int J Toxicol*. 2007; 26 (4): 297-306.
36. Webb GW, Arns MJ. Effect of pyruvate and lactate on motility of cold stored stallion spermatozoa challenged by hydrogen peroxide. *J Equine Vet Sci*. 2006; 26: 406-411.
37. Lenzi A, Culasso F, Gandini L, et al. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum Reprod*. 1993; 8 (10): 1657-1666.

38. Giannattasio A, De Rosa M, Smeraglia R, et al. Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *J Endocrinol Invest.* 2002; 25 (11): 983-986.
39. Alvarez JG, Storey BT. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod.* 1983; 29 (3): 548-555.
40. Xu K, Shang X, Chen Y, et al. Measurement of uric acid of seminal plasma in fertile and infertile males. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2004; 10 (12): 900-901, 906.
41. Khosrowbeygi A, Zarghami N, Deldar Y. Correlation between sperm quality parameters and seminal plasma antioxidants status. *Iran J Reprod Med.* 2004; 2: 58-64.
42. Morte MI, Rodrigues AM, Soares D, et al. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. *Anim Reprod Sci.* 2008; 106 (1-2): 36-47.
43. Yeni D, Gundogan M, Cigerci IH, et al. Seasonal variation of oxidative stress parameters in ram seminal plasma. *J Anim Vet Adv.* 2010; 9: 49-55.
44. Cudicini C, Kercret H, Touzalin AM, et al. Vectorial production of interleukin 1 and interleukin 6 by rat sertoli cells cultured in a dual culture compartment system. *Endocrinology.* 1997;138: 2863–2870.
45. O'Bryan MK, Schlatt S, Gerdprasert O, et al. Inducible nitric oxide synthase in the rat testis: evidence for potential roles in both normal function and inflammation-mediated infertility. *Biol Reprod.* 2000; 63: 1285–1293.
46. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991; 43: 109–134.
47. Davis KL, Martin E, Turko IV, et al. Novel effects of nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 203–236.
48. Taneli F, Vatansever S, Ulman C, et al. The effect of spermatic vessel ligation on testicular nitric oxide levels and germ cell-specific apoptosis in rat testis. *Acta Histochem* 2005; 106: 459–466.
49. Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod.* 2001; 65: 514–521.
50. Xie QW, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J. Leuk. Biol.* 1994; 56; 576–582.
51. Moon C, Ahn M, Kim S, et al. Increased expression of both constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in the delayed phase of acute experimental testicular torsion. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 453–456.
52. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol.* 1964; 10: 643-649.

53. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*. 2000; 407 (6805): 796-801.
54. Mathur PP, Saradha B, Vaithinathan S. Impact of environmental toxicants on testicular function. *Immun Endoc Metab Agents Med Chem*. 2008; 8: 79–90.
55. Mathur PP, D’Cruz SC. The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian J of Andrology*. 2011; 13: 585–591.
56. Fisher HM, Aitken RJ. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *J Exp Zool*. 1997; 277: 390–400.
57. Erkkila K, Pentikainen V, Wikstrom M, et al. Partial oxygen pressure and mitochondrial permeability transition affect germ cell apoptosis in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84: 4253–4259.
58. Tripathi R, Mishra DP, Shaha C. Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways. *J Reprod Immunol*. 2009; 83: 31–35.
59. Moreno RD, Lizama C, Urzua N, et al. Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat. *Cell Tissue Res*. 2006; 325: 533–540.
60. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol*. 1997; 82 (2): 291–295.
61. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007; 297 (8): 842–857.
62. Singh RP, Khanna R, Kaw JL, et al. Comparative effect of benzantrone and 3-bromobenzanthrone on hepatic xenobiotic metabolism and anti-oxidative defense system in guinea pigs. *Arch Toxicol* 2003; 77: 94-99.
63. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 1993; 300: 535-543.
64. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevent: mechanisms of action, *J. Nutr* 2004; 134: 3479-3485.
65. Mann J. *Secondary Metabolism*. Oxford Chemistry Series, Oxford: Clarendon Press, 1978.
66. Bravo L. Phenolic phytochemicals: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev*. 1998; 56: 317–333.
67. Crozier A, Burns J, Aziz AA. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: Measurements and bioavailability. *Biol. Res*. 2000; 33: 79–88.
68. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci*. 1999; 4: 339–345.
69. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med*. 2001; 31: 1287–1312.
70. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*. 1992; 18: 1–29.

71. Serdula MK, Byers MAH, Simoes E. The association between fruit and vegetable intake and chronic disease risk factors. *Epidemiology*. 1996; 7: 161–165.
72. Tapiero H, Tew KD, Ba GN. Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.* 2002; 56: 200–207.
73. Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA. Plant polyphenols: Are they the new magic bullet? *Proc. Nutr. Soc.* 2003; 62: 599–603.
74. Malini P, Kanchana G, Rajadurai M. Antidiabetic efficacy of ellagic acid in streptozotocin induced diabetes mellitus in albino wistar rats, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2011; 4: 127–128.
75. García-Nino WR, Zazueta C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacological Research*. 2015; 97: 84–103.
76. Marwan AG, Nagel CW. Characterization of cranberry benzoates and their antimicrobial properties. *J. Food Sci.* 1986; 51: 1069–1070.
77. Chen H, Zuo Y, Deng Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by highperformance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 2001; 13: 387–395.
78. Yılmaz B, Usta C. Nar'ın (*Punica granatum*) terapötik etkileri. *Türk Aile Hek Derg* 2010; 14: 146-153.
79. Zahin M, Ahmad I, Gupta RC, et al. Punicalagin and ellagic acid demonstrate antimutagenic activity and inhibition of benzo[a]pyrene induced DNA adducts, *Biomed Res Int*. 2014; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/467465>.
80. Rehman MU, Tahir M, Ali F, et al. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of ellagic acid, *Mol. Cell. Biochem.* 2012; 365: 119–127.
81. Abraham SK. Anti-genotoxic effects in mice after the interaction between coffee and dietary constituents, *Food Chem. Toxicol.* 1996; 34: 15–20.
82. Khanduja KL, Avti PK, Kumar S, et al. Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: a Bcl-2 independent mechanism. *Biochim, Biophys, Acta* 2006; 1760: 283–289.
83. Turk G, Ceribasi AO, Sakin F, et al. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis, *Reprod. Fertil. Dev.* 2010; 22: 587–596.
84. Ou HC, Lee WJ, Lee SD, et al. Ellagic acid protects endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010; 248: 134–143.
85. Li T, Chen G, Su C, et al. Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells, *Anticancer Res.* 2005; 25: 971–980.

86. Abuelsaad AS, Mohamed I, Allam G, et al. Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic aeromonas hydrophila in a murine model, *Life Sci.* 2013; 93: 714–722.
87. Park SW, Kwon MJ, Yoo JY, et al. Antiviral activity and possible mode of action of ellagic acid identified in Lagerstroemia speciosa leaves toward human rhinoviruses, *BMC Complement Altern. Med.* 2014; 14: 171, <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-14-171>.
88. Choi YH, Yan GH. Ellagic acid attenuates immunoglobulin E- mediated allergic response in mast cells, *Biol. Pharm. Bull.* 2009; 32: 1118– 1121.
89. Promsong A, Wo C, Sathakarn S, et al. Ellagic acid modulates the expression of oral innate immune mediators: potential role in mucosal protection, *J. Oral Pathol. Med.* 2014; <http://dx.doi.org/10.1111/jop.12223>.
90. El-Shitany N, El-Bastawissy E, El-desoky K. Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant. *Int. Immunopharmacol.* 2014; 19: 290–299.
91. Kuo MY, Ou HC, Lee WJ, et al. Ellagic acid inhibits oxidized low-density lipoprotein (OxLDL)-induced metalloproteinase (MMP) expression by modulating the protein kinase C, extracellular signal-regulated kinase, peroxisome proliferator-activated receptor, nuclear factor-B (PKC- ERK). *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 5100–5108, <http://dx.doi.org/10.1021/jf1041867>.
92. Mda SP, De Carvalho JE, Lajolo FM, et al. Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries using in vitro models. *J. Med. Foods.* 2010;13: 1027–1035, <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2009.0257>.
93. Dhingra D, Jangra A. Antiepileptic activity of ellagic acid, a naturally occurring polyphenolic compound, in mice. *J. Funct. Foods.* 2014; 10: 364–369. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.011>.
94. Dhingra D, Chhillar R. Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice, *Pharmacol. Rep.* 2012; 64: 796–807.
95. Kwak H, Jeon S, Sohng B, et al. Beta-secretase (BACE1) inhibitors from pomegranate (*Punica granatum*) husk. *Arch. Pharm. Res.* 2005; 28:1328–1332.
96. El-Garhy AM, Abd El-raouf OM, El-sayeh BM, et al. Ellagic acid antiinflammatory and antiapoptotic potential mediate renoprotection in cisplatin nephrotoxic rats, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2014; 28: 472–479, <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.21587>.
97. Kannan MM, Quine SD. Ellagic acid inhibits cardiac arrhythmias, hypertrophy and hyperlipidaemia during myocardial infarction in rats. *Metabolism.* 2013; 62: 52–61, <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2012.06.003>.
98. Lee JH, Won JH, Choi JM, et al. Protective effect of ellagic acid on concanavalin A-induced hepatitis via toll-like receptor and mitogen-activated protein kinase/nuclear factor B signaling pathways. *J. Agric. Food Chem.* 2014; <http://dx.doi.org/10.1021/jf503188c>.

99. García-Nino WR, Zazueta C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacological Research*. 2015; 97: 84–103.
100. Venkatesan P, Rao MN. Structure-activity relationships for the inhibition of lipid peroxidation and the scavenging of free radicals by synthetic symmetrical curcumin analogues, *J. Pharm. Pharmacol.* 2000; 52: 1123–1128.
101. R. Cozzi, R. Ricordy, F. Bartolini, et al., Taurine and ellagic acid: two differently acting natural antioxidants, *Environ. Mol. Mutagen.* 1995; 26: 248–254.
102. Nugroho A, Rhim TJ, Choi MY, et al. Simultaneous analysis and peroxynitrite-scavenging activity of galloylated flavonoid glycosides and ellagic acid in *Euphorbia supina*, *Arch. Pharm. Res.* 2014; 37: 890–898, <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-013-0307-z>.
103. Hseu YC, Chou CW, Senthil KJ, et al. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes, *Food Chem. Toxicol.* 2012; 50: 1245–1255, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.020>.
104. Padma VV, Selvi PK, Sravani S. Protective effect of ellagic acid against TCDD-induced renal oxidative stress: modulation of CYP1A1 activity and antioxidant defense mechanisms, *Mol. Biol. Rep.* 41 (2014) 4223–4232, <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-014-3292-5>.
105. ATSDR. Toxicological profile for carbon tetrachloride, U.S. Department of Health and Human services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005.
106. Placer ZA, Cushmann LL, Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation (as malondialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry* 1966; 16: 359-364.
107. Aebi H. Catalase. In: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods In Enzymatic Analysis*, Academic Press New York: 1983; 276-286.
108. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-890.
109. Foulds J, Delnevo C, Douglas M, et al. *Handbook of the Medical Consequences of Alcohol and Drug Abuse* © 2008 by The Haworth Press, Inc. doi:10.1300/6039_13.
110. Audi SS, Marjorie E, Abhaya A, Borker S. Effect of cigarette smoke on body weight, food intake and reproductive organs in adult albino rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 2006; 44: 562-565.
111. La Maestra, S., de Flora S. And Micale R.T., Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *Int. J. Hyg. Environ. Health* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.08.006>.
112. Yamamoto Y, Isoyama E, Sorkitis N, et al. Effects of smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. *Urol Res* 1998; 26: 45-48.

113. Kapawa A, Giannakis D, Tsoukanelis K, et al. Effects of paternal cigarette smoking on testicular function, sperm fertilizing capacity, embryonic development, and blastocyst capacity for implantation in rats. *Andrologia* 2004; 36: 57-68.
114. Güven MC, Can B, Ergün A, Saran Y, Aydos K. Ultrastructural effects of cigarette smoke on rat testis. *Eur Urol* 1999; 36: 645-649.
115. Mohamed M, Sulaiman SA, Jaafar H. Antioxidant Protective Effect of Honey in Cigarette Smoke-Induced Testicular Damage in Rats.. *Int. J Mol Sci* 2011; 12: 5508-5521.
116. Sinha Hikim AP, Wang C, Lue Y, et al. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endoc and Metab* 1998; 83: 152.
117. Sharpe R M: Regulation of spermatogenesis. in *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil E, Neill J D. Raven Press. New York, 1994; 1364-1434.
118. Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU, et al. Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development* 2000; 56: 353-359.
119. Jefferson KP, Persad RA, Holly MP. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol* 2000; 86: 598-606.
120. Kerr JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 825-830.
121. Hsueh AJW, Eisenhauer K, Chun S, et al. Gonadal Cell Apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research* 1996; 51: 432-457.
122. Ayaşhoğlu E. Apoptoz. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi* 2001; 21: 57-62.
123. Hikim S, Amiya P, Wang C, Leung A, Swerdloff R S. Involvement of Apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antagonist treatment 2000; 57: 136-141.
124. Rodriguez I, Christiane O, Araki K, Garcia I, et al. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J* 1997; 24: 2262-2270.
125. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; 53: 451-465.
126. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 643-650.
127. Yin Y, Hawkins KL, Devvolf WC, Morgantaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 1997; 18: 159- 165.
128. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, et al. Apoptotic Cell Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatric Research* 1996; 40: 351-356.
129. Rodriguez JB, Garcia CM. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl* 1998; 19: 487-497.

130. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-245.
131. Cohen JJ. Overview: Mechanisms of apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130.
132. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Reviews* 1995; 11: 101-105.
133. Rajpurkar A, Jiang Y, Dhabuwala CB, et al. Cigarette smoking induces apoptosis in rat testis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002; 21: 243-248.
134. Ozkan L, Yardimoglu M, Ozkurkugil C. Protective effects of pentoxifylline on the seminiferous tubules morphology in smoking rats. *Research Web Pub* 2013; 1: 1-7.
135. O'Bryan, MK, Schlat S, Gerdprasert O, et al. Inducible nitric oxide synthase in the rat testis: evidence for potential roles in both normal function and inflammation-mediated infertility. *Biol. Reprod* 2000; 63: 1285–1293.
136. Taneli F, Vatansver S, Ulman C, et al. The effect of spermatic vessel ligation on testicular nitric oxide levels and germ cell specific apoptosis in rat testis. *Acta Histochem* 2005; 106: 459–466.
137. Shikone T, Billig H, Hsueh AJW. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol Reprod* 1994; 51: 865-872.
138. Sönmez MF, Tascioglu S. Protective effects of grape seed extract on cadmium-induced testicular damage, apoptosis, and endothelial nitric oxide synthases expression in rats. *Toxicology and Industrial Health* 1–9 © The Author(s) 2015. DOI: 10.1177/0748233714566874.
139. Aitken RJ, McLaughlin EA. Molecular mechanisms of sperm capacitation: progesterone-induced secondary calcium oscillations reflect the attainment of a capacitated state. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 63: 273–293.
140. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59: 2–11.
141. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Yüce A, Çeribaşı AO. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology* 2007; 67: 778–785.
142. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Çeribaşı AO, Yüce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril* 2008; 89(5): 1474–1481.
143. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153: 83–104.
144. Ozyurt H, Pekmez H, Parlaktas BS, et al. Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian J Androl* 2006; 8: 189–193.
145. Zafrilla P, Ferreres F, Tomás-Barberán FA. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 3651-3655.

146. Mullen W, McGinn J, Lean MEJ. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 5191–5196.
147. Turk G, Ates A, Sonmez M, et al. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril.* 2008; 89: 1474-1481.
148. Çeribaşı AO, Sakin F, Türk G, et al. Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Exp Toxicol Pathol.* 2012; 64: 717-724.

8. ÖZGEÇMİŞ

17 Eylül 1990 tarihinde İzmir’de doğdum. 2008 yılında İzmir Yunus Emre Anadolu Lisesi’nden mezun olup aynı yıl Cumhuriyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nü kazandım. 2012 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 19.02.2013 tarihinde Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kapsamında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atanıp, aynı dönem ilgili birimde yüksek lisans eğitimime başladım.