

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ARSENİK TOKSİSİTESİNİN TESTİSTE
OLUŞTURDUĞU HASARA KARŞI
RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

EZGİ DURSUN

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2010

DEU.HSI.MSc-2007970044

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ARSENİK TOKSİSİTESİNİN TESTİSTE
OLUŞTURDUĞU HASARA KARŞI
RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

EZGİ DURSUN

Danışman Öğretim Üyesi : Doç. Dr. Işıl TEKMEK


(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2009.KB.SAG.038 sayı ile desteklenmiştir.)

DEU.HSI.MSc-2007970044

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı öğrencisi EZGİ DURSUN, 'ARSENİK TOKSİSİTESİNİN TESTİSTE OLUŞTURDUĞU HASARA KARŞI RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ' konulu yüksek lisans tezini 01.09.2010 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

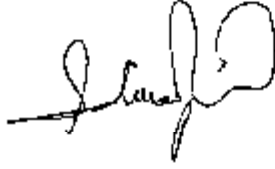
BAŞKAN

Doç. Dr. Işıl TEKMEK



ÜYE

Doç.Dr. Bekir Uğur ERGÜR



ÜYE

Doç.Dr. Mukaddes GÜNELİ



İÇİNDEKİLER

Sayfa no

ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
KISALTMALAR.....	vii
TEŞEKKÜR.....	x
1 ÖZET.....	1
2 GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
3 GENEL BİLGİLER.....	8
3.1 Testis	8
3.1.1 Testisin Embriyolojisi.....	8
3.1.2 Testisin Anatomisi	9
3.1.3. Testisin Histolojisi	10
3.1.3 Testisin Fizyolojisi.....	17
3.2 Apoptoz ve Nekroz Tanımı.....	17
3.2.1 Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları.....	19
3.2.2 Apoptoz Saptama Yöntemleri.....	21
3.2.3 Spermatogeneziste Apoptozun Rolü	23
3.3 Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri.....	23
3.3.1 Serbest Radikal Kaynakları	24
3.3.2 Serbest Radikaller ile Oluşan Hücre Hasarları.....	26
3.4 Antioksidan Maddeler	28
3.4.1 Doğal (endojen) Antioksidanlar.....	28
3.4.2 Eksojen Antioksidanlar.....	29
3.4.3 Gıda Antioksidanları	29
3.5 Oksidatif Stres, Antioksidan Sistemler ve Testis.....	29
3.6 Resveratrol.....	31
3.6.1 Resveratrolün Biyosentezi.....	32
3.6.2 Resveratrolün Emilimi.....	33
3.6.3 Resveratrolün Dokulara Taşınması.....	33

3.6.4	<i>Resveratrolün Hücre İçi Reseptörlere Bağlanması</i>	34
3.6.5	<i>Resveratrolün Atılımı</i>	34
3.6.6	<i>Resveratrolün Biyolojik Aktiviteleri</i>	34
3.6.7	<i>Resveratrolün Vazodilatör Etkisi</i>	34
3.6.8	<i>Trombosit Agregasyonu İnhibisyonu</i>	35
3.6.9	<i>Antiinflatuvar Aktivite</i>	35
3.6.10	<i>Resveratrolün Antioksidan Aktivitesi</i>	35
3.7	Arsenik	36
3.7.1	<i>Metabolizma ve Toksisitesi</i>	38
4	GEREÇ VE YÖNTEM	40
4.1	Arseniğin Hazırlanışı	41
4.2	Resveratrolün Hazırlanışı	41
4.3	Doku Örneklerinin Hazırlanışı	41
4.4	Rutin Işık Mikroskopik Doku Takibi	42
4.4.1	<i>Hematoksilen Eosin Boya Protokolü</i>	42
4.4.2	<i>Periyodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü</i>	43
4.4.3	<i>Masson Trichrome Boya Protokolü</i>	43
4.5	Morfometrik İncelemeler	44
4.5.1	<i>Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru</i>	44
4.5.2	<i>Seminifer Tübül Çap Ölçümü</i>	44
4.5.3	<i>Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü</i>	45
4.6	İmmünohistokimyasal İncelemeler	45
4.6.1	<i>TUNEL Protokolü</i>	45
4.6.2	<i>Caspase 3 Boya Protokolü</i>	46
4.7	Biyokimyasal İncelemeler	46
4.7.1	<i>MDA Düzeylerinin Belirlenmesi</i>	46
4.7.2	<i>GSH (indirgenmiş glutatyon) Düzeylerinin Belirlenmesi</i>	48
4.8	Ultrastrüktürel İncelemeler	50
4.8.1	<i>Elektron Mikroskopik Doku Takibi</i>	50
4.9	Veri Değerlendirme	51
5	BULGULAR	52
5.1	Hayvan Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	52

5.2	Işık Mikroskopik Bulgular	53
5.2.1	<i>Hematoksilen-Eosin Boyama</i>	53
5.2.2	<i>PAS Boyama.....</i>	59
5.2.3	<i>Masson Trichrome Boyama</i>	68
5.3	Morfometrik Bulgular	72
5.3.1	<i>Johansen Testiküler Biyopsi Skoru.....</i>	72
5.3.2	<i>Seminifer Tübül Çap Ölçümü.....</i>	72
5.3.3	<i>Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü.....</i>	74
5.4	İmmünohistokimyasal Bulgular.....	75
5.4.1	<i>TUNEL Boyama</i>	75
5.4.2	<i>Caspase 3 boyama.....</i>	80
5.5	Elektron Mikroskopik Bulgular.....	84
5.6	Biyokimyasal Bulgular	88
5.6.1	<i>MDA Değerleri.....</i>	88
5.6.2	<i>GSH Değerleri.....</i>	90
6	TARTIŞMA	92
7	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	96
8	KAYNAKLAR	97

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Testis anatomisi	1
Şekil 2 : Sertoli hücresi ve spermatogenik hücrelerle olan ilişkisi	13
Şekil 3: Hücre içi ve dışı yollarla uyarılan apoptozun biyokimyası	21
Şekil 4: Resveratrolün kimyasal yapısı.	31
Şekil 5: Resveratrolün biyosentezi	32
Şekil 6: Resveratrolün kanda taşınması ve hücre içine geçişi	33
Şekil 7: Arsenik trioksitin hücredeki hedefleri	39
Şekil 8: Jonhsen Testiküler Biyopsi Skor Tablosu.....	44
Şekil 9: MDA standartlarının hazırlanması.	48
Şekil 10: GSH standartlarının hazırlanması.....	49
Şekil 11: Başlangıç ve son vücut ağırlıkları	52
Şekil 12: Kontrol grubuna ait testis kesiti (H&E) X20.	54
Şekil 13: Alkol grubuna ait testis kesiti (H&E) X20.....	54
Şekil 14: Arsenik grubuna ait testis kesiti (H&E) X20.	55
Şekil 15: Arsenik grubuna ait testis kesiti (H&E) X20.	55
Şekil 16: Arsenik grubuna ait testis kesiti (H&E) X20.	56
Şekil 17: Arsenik grubuna ait testis kesiti (H&E) X40.	56
Şekil 18: Ars+RES 10mg/kg grubu testis kesiti (H&E) X20.....	57
Şekil 19: Ars+RES 10mg/kg grubu testis kesiti (H&E) X40.....	57
Şekil 20: Ars+RES 20mg/kg grubu testis kesiti (H&E) X20.....	58
Şekil 21: Ars+RES 20mg/kg grubu testis kesiti (H&E) X40.....	58
Şekil 22: Kontrol grubuna ait testis kesiti (PAS) X20.....	60
Şekil 23: Kontrol grubuna ait testis kesiti (PAS) X40.....	60
Şekil 24: Kontrol grubuna ait testis kesiti (PAS) X100.....	61
Şekil 25: Alkol grubuna ait testis kesiti (PAS) X20.....	61
Şekil 26: Alkol grubuna ait testis kesiti (PAS) X40.....	62

Şekil 27: Alkol grubuna ait testis kesiti (PAS) X100.....	62
Şekil 28: Arsenik grubuna ait testis kesiti (PAS) X20.	63
Şekil 29: Arsenik grubuna ait testis kesiti (PAS) X40.	63
Şekil 30: Arsenik grubuna ait testis kesiti (PAS) X100.	64
Şekil 31: Ars+RES 10mg/kg grubuna ait testis kesiti (PAS) X20.	64
Şekil 32: Ars+RES 10mg/kg grubuna ait testis kesiti (PAS) X40.	65
Şekil 33: Ars+RES 10mg/kg grubuna ait testis kesiti (PAS) X100.	65
Şekil 34: Ars+RES 20mg/kg grubuna ait testis kesiti (PAS) X20.	66
Şekil 35: Ars+RES 20mg/kg grubuna ait testis kesiti (PAS) X40.	66
Şekil 36: Ars+RES 20mg/kg grubuna ait testis kesiti (PAS) X100.	67
Şekil 37: Kontrol grubuna ait testis kesiti (Masson Trichrome) X20.....	69
Şekil 38: Alkol grubuna ait testis kesiti (Masson Trichrome) X20.....	69
Şekil 39: Arsenik grubuna ait testis kesiti (Masson Trichrome) X20.	70
Şekil 40: Ars+Res 10 mg/kg grubuna ait testis kesiti (Masson Trichrome) X20.....	70
Şekil 41: Ars+Res 20 mg/kg grubuna ait testis kesiti (Masson Trichrome) X20.....	71
Şekil 42: Tüm grupların Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru ortalaması.....	72
Şekil 43: Tüm grupların seminifer tübül çap ortalaması.....	73
Şekil 44: Tüm grupların seminifer tübül bazal membran kalınlığı ortalaması.	74
Şekil 45: Kontrol grubuna ait testis kesiti (TUNEL) X20.....	75
Şekil 46: Alkol grubuna ait testis kesiti (TUNEL) X20.	76
Şekil 47: Arsenik grubuna ait testis kesiti (TUNEL) X10.....	76
Şekil 48: Arsenik grubuna ait testis kesiti (TUNEL) X40.....	77
Şekil 49: Arsenik grubuna ait testis kesiti (TUNEL) X40.....	77
Şekil 50: Arsenik grubuna ait testis kesiti (TUNEL) X40.....	78
Şekil 51: Ars+RES 10mg/kg grubuna ait testis kesiti (TUNEL) x20.....	78
Şekil 52: Ars+RES 20mg/kg grubuna ait testis kesiti (TUNEL).....	79
Şekil 53: Tüm grupların Caspase 3 pozitif hücre sayıları yüzdesi.....	80

Şekil 54: Kontrol grubuna ait testis kesiti (Caspase 3) X20	81
Şekil 55: Alkol grubuna ait testis kesiti (Caspase 3) X20	81
Şekil 56: Arsenik grubuna ait testis kesiti (Caspase 3) X40.....	82
Şekil 57: Arsenik+ Res 10 mg/kg grubuna ait testis kesiti (Caspase 3) X20.....	82
Şekil 58: Arsenik+ Res 20 mg/kg grubuna ait testis kesiti (Caspase 3) X20.....	83
Şekil 59: Kontrol grubuna ait testis dokusu ince kesiti X1250.....	85
Şekil 60: Alkol grubuna ait testis dokusu ince kesiti X1250.	85
Şekil 61: Arsenik grubuna ait testis dokusu ince kesiti X1250.....	86
Şekil 62: Arsenik grubuna ait testis dokusu ince kesiti X 1600.....	86
Şekil 63: Ars+RES 10mg/kg grubuna ait testis dokusu ince kesiti X1250.....	87
Şekil 64: Ars+RES 20mg/kg grubuna ait testis dokusu ince kesitiX 1250.....	87
Şekil 65: Ortalama MDA değerleri	88
Şekil 66: MDA standart grafiği.....	88
Şekil 67: Tüm grupların MDA ölçümleri ($\mu\text{M} \pm \text{SH}$).....	89
Şekil 68: Ortalama GSH değerleri	90
Şekil 69: GSH standart grafiği	90
Şekil 70: Tüm grupların GSH ölçümleri ($\mu\text{mol/gr}$).....	91

KISALTMALAR

ABP: Androjen bağlayıcı protein

AMH: Anti müllerian hormon

apaf1: Apoptoz proteaz aktive edici faktör 1

As III: Arsenik trioksit

As V: Arsenik pentaoksit

ATP: Adenozin trifosfat

BCA: Biçinkoninik asit

BHT: Bütillenmiş hidroksitoluen

BL: Bazal lamina

BSA: Sığır serum albumin

CTL: Sitotoksik T hücreleri

DES: Dietilstilbesterol

DMA: Dimethylarsinic acid

DNA: Deoksiribonükleik asit

DTNB: 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit

FAD: Flavin adenin dinucleotid

FasL: Fas ligandı

FMN: Flavin mononucleotid

FSH: Folikül stimüle edici hormon

GnRH :Gonodotropin serbestleştirici hormon

GSH: İndirgenmiş glutatyon

GSSG: Glutatyon disülfit

H&E: Hematoksilen-Eosin

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

hCG: Human chorionic gonadotropin

L': Lipid

LH: Luteinize edici hormon

MDA: Malondialdehit

MES: 2-N- morfolino etansülfonik asit

MMA: Monomethylarsonic acid

MPA: Metafosforik asit

NAD: Nikotin adenin dinucleotid

NADH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

NMPI: N-metil-2-fenilindol

NO : Nitrik oksit

O₂' : Singlet oksijen

OH' : Hidroksil radikali

OH': Hidroksil radikali

PAS: Periyodik asit schiff

PBS: Potasyum fosfat buffer

RES: Resveratrol

RNA: Ribonükleik asit

ROO': Peroksil radikali

ROS : Reaktif oksijen türleri

SAM: S-adenosylmethionine

Se: Sertoli

SH: Sülfidril

SOD: Süperoksit dismutaz

SRY: Y kromozomunun seks belirleyici bölgesi

Stc: Spermatozoid

Stg: Spermatozoid

TDF: Testis belirleyici faktör

Tdt :Terminal deoxynucleotidyl transferase

TEAM: Trietanolamin

TNB: 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit

TNFR: Tümör nekrozis faktör reseptör

TNF- α : Tümör nekrozis faktör

TOMP: Tetramethoxypropane

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt]- mediated dUTP- biotin nick-end labeling

UV: Ultra viyole

V: Vezikül

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans tezimi sunarken, Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki asistanlık eğitimim boyunca bana yol gösteren ve eğitimimde katkısı bulunan tüm hocalarıma, Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Alper Bağrıyanık'a, tezimin hazırlanması sürecinde benden yardımlarını esirgemeyen ve her düştüğümde beni kaldıran başta danışmanım olan Doç. Dr. Işıl Tekmen'e, Doç. Dr. Bekir Uğur Ergur'a, tezimin her aşamasında emeğİ geçen Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Gülgün Oktay ve asistan arkadaşım Didem Keleş'e, tezimin düzeltme aşamalarında emeğİ geçen Dr. Burcu Çinkooğlu ve Dr. Anıl Gürkan'a, beni her daim güçlü kılan sevgili asistan arkadaşlarım Ziya Denek, Gülsah Bitgül ve Seçil Ayça Çavuş'a, hayatım boyunca bana yol gösteren, bana kanatlarımı verip uçmayı öğreten sevgili anne ve babama sonsuz teşekkür ederim.

Ezgi Dursun

1 ÖZET

ARSENİK TOKSİSİTESİNİN TESTİSTE OLUŞTURDUĞU HASARA KARŞI RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ezgi Dursun

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Balçova,
İzmir.**

AMAC

Bu çalışmada arseniğin toksik etkilerine karşı sıçanlarda testis dokusunda resveratrolün yapısal, antiapoptotik ve oksidatif stres üzerine etkilerini incelemek amaçlanmıştır.

YÖNTEM

Çalışmada Wistar cinsi yetişkin erkek sıçanlar (200-300gr) kullanıldı. Sıçanlar 5 gruba ayrıldı: I. grup: Kontrol grubu. Arseniğe maruz kalmamış normal ad libitum beslenen grup (n=7). II. grup : Alkol grubu. Resveratrol alkol ile çözüleceğinden alkolün etkilerini görmek için oluşturulan grup (n=7). III. grup: Arsenik grubu. Oral gavage ile günlük 5mg/kg arsenik verilen grup (n=7). IV. grup : Arsenik + Resveratrol grubu. Oral gavage ile günlük 5mg/kg arsenik verilen ve oral gavage ile günlük 10 mg/kg Resveratrol ile tedavi edilen grup (n=7). V. grup: Arsenik + Resveratrol grubu. Oral gavage ile günlük 5mg/kg arsenik verilen ve oral gavage ile günlük 20 mg/kg Resveratrol ile tedavi edilen grup (n=7). Tüm gruplar için deney süresi 28 gün olarak belirlendi. Deney sonunda biyokimyasal olarak malondialdehit (MDA), glutasyon (GSH) ve apoptozu göstermek için TUNEL ve Caspase 3 yöntemi kullanıldı. Yapısal değişiklikler için ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik incelemeler yapıldı. Gruplar arasındaki farklar one-way ANOVA posthoc LSD testi ile gösterildi. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı.

BULGULAR

Kontrol grubuna göre arsenik grubu MDA değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu. GSH değerleri arsenik grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Işık mikroskopik ve elektron mikroskopik olarak yapılan incelemelerde arsenik grubu seminifer

tübüllerinde vakuolizasyon, atrofi, germ hücre dejenerasyonu, tübül lümeninde debris gözlemlendi. Yapılan immünohistokimyasal incelemeler sonucu arsenik grubu seminifer tübüllerinde kontrol grubuna oranla TUNEL(+) hücre sayısının ve Caspase 3 immunoreaktivite gösteren hücre sayısının arttığı, resveratrol ile tedavi edilen gruplarda ise sayının azaldığı gözlemlendi.

SONUC

Sonuç olarak bu çalışmada arseniğin toksik etkilerine karşı testis dokusu üzerinde resveratrolün koruyucu etkisi ilk kez gösterilmiştir. Resveratrol, antioksidatif etkisi aracılığıyla antiapoptotik etki gösterebilmektedir.

Anahtar kelimeler: Arsenik, testis, resveratrol, apoptoz, oksidatif stres

SUMMARY

PROTECTIVE EFFECTS OF RESVERATROL AGAINST ARSENIC TOXICITY ON TESTIS

Ezgi Dursun

Dokuz Eylul University Medicine Faculty Department of Histology and Embryology,
Balçova, İzmir

Purpose

In this study we aimed to investigate protective effects of resveratrol on arsenic induced toxicity, apoptosis and oxidative stress on testis.

Material-Method

In this study, adult male Wistar rats (200-300 gr) were used. Rats were divided in five groups. Group I: Control group: Non- arsenic group, rats were fed ad libitum (n=7). Group II: Alcohol group: Because of resveratrol was soluble in alcohol, to see the effects rats were given alcohol by intragastric route (n=7). Group III: Arsenic group: Rats were given 5mg/kg/day arsenic by intragastric route. Group IV: Arsenic+Resveratrol group: Rats were given 5mg/kg/day arsenic and 10mg/kg/day resveratrol by intragastric route (n=7). Group V: Arsenic+Resveratrol group: Rats were given 5mg/kg/day arsenic and 20mg/kg/day resveratrol by intragastric route (n=7). Experimental process was chosen 28 days for all groups. After the experimental process, oxidative stress marker malondialdehyde (MDA), antioxidant enzyme glutathione (GSH) and TUNEL and Caspase 3 immunohistochemistry for apoptosis were examined in each group. Light microscopic and electron microscopic observations were used for ultrastructural changes. All data were analyzed by one-way ANOVA posthoc LSD test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

MDA levels in arsenic group showed a significant increase compare with control group. GSH levels were significantly lower than those control group. Light microscobic and electron microscobic investigations showed that on arsenic tissues, seminifer tubules showed vacuolization, atrophy, germ cell degeneraion and celluar debris on tubul lumens. After immunohistochemical investigations apopitotic cell death was increased in arsenic group compared with control group. Resveratrol decreased TUNEL(+) cells and caspase 3 immunostaining showed no increased apoptosis on treated groups compared with arsenic group.

Conclusion

In conclusion, the protective effects of resveratrol on arsenic induced toxicity on testis was demonstrated firstly in the present study. Resveratrol exhibits antiapopitotic effect via with its antioxidant properties.

Key words: Arsenic, testis, resveratrol, apopitosis, oxidative stress

2 GİRİS VE AMAC

Arsenik, azot ailesinden olan metalloid özellik gösteren ve insanlar için oldukça zararlı çevresel toksik bir elementtir. Arseniğin akut toksisitesi kimyasal formuna bağlıdır. Elemental, gaz, organik ve inorganik formlarda bulunabilir.

İnorganik arsenik, arsenik trioksit (As III) ve arsenik pentaoksit (As V) olmak üzere iki formu içinde barındırır. Gaz formu en toksik formudur. Doğada en çok bulunan formu inorganik arseniklerden arsenik trioksittir (1).

Her gün dünyada milyonlarca insan kontamine olmuş su ya da yiyeceklerden sindirim yolu ya da havadan inhalasyon yoluyla toksik seviyelerdeki arseniğe maruz kalmaktadır. Arseniğin sıklıkla kullanıldığı alanlar herbisitler, insektisitler, gıda koruyucuları, fosil yakıt ürünleridir (1).

Çevresel yollardan olan arsenik alınımı çoğunlukla inorganik formun dominant olarak bulunduğu içme suyu ile olmaktadır. İçme suyunda yüksek dozlarda arsenik bulunan ülkeler başlıca Tayvan, Çin, Meksika, Arjantin, Tayland, Finlandiya, Bulgaristan ve Bangladeş'tir. Fakat düşük dozlarda olsa da uzun süreli arsenik alınımı insanlar için ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır (2).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, suda bulunabilecek arsenik miktarı 10µg/L' den (günlük 20 µg/L) daha azdır. Maksimum kontaminasyon seviyesi ise 50µg/L (günlük 100µg/L)' dir (2).

Kokusuz ve renksiz olan arsenik gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve parenteral yollardan absorbe olur. Plasentaya kolayca geçerek fetusta birikebilir. İnorganik arseniğin gastrointestinal absorpsiyon hızı çok yüksektir. En fazla absorpsiyon ince bağırsaktan olur. Solunum yoluyla alınan arsenik %80 sistemik absorpsiyonla sonuçlanır. Arseniğin cilt tarafından sistemik absorpsiyonu ise çok fazla değildir. Sayısız yolla alınan arsenik oldukça karsinojendir ve kronik alınımı insanlarda deri, mesane, akciğer kanseri, hipertansiyon, şeker hastalığı, renal bozukluklar gibi pek çok hastalığa yol açmaktadır (3). Yapılan diğer çalışmalar böbrek, karaciğer, uterus, prostat, testis gibi organların arseniğin hedef organları arasında olduğunu göstermiştir (4).

Arseniğin karsinojen özelliği ile ilgili çeşitli hücresel mekanizmalar açıklanmıştır. Yapılan hayvan çalışmaları sonucunda üzerinde birleşilen bir hipotez henüz bulunmamaktadır. Buna

rağmen, arseniğin reaktif oksijen türleri, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı, tümör oluşumu ile ilişkili olduğuna dair birçok kanıt bulunmaktadır. Son çalışmalar arseniğin hücrede reaktif oksijen türleri oluşumuna neden olduğunu göstermektedir. Arseniğin bu toksisitesi, karaciğerde gerçekleşen detoksifikasyon sonucu ortaya çıkan metile olmuş ürünlerinin bir sebebidir (5).

Karsinojen etkilerinin yanında mitokondride hücresel solunumu baskılaması, oksidatif strese yol açması arseniğin başlıca toksik etkilerindendir (1).

Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), antioksidan savunma sistemleri ile ortadan kaldırılır. ROS, direkt veya indirekt yollarla apoptotik veya nekrotik hücre ölümünü başlatabilir. Serbest radikaller hücre veya dokunun tipine ve etki süresiyle şiddetine bağlı olarak değişen sitotoksik veya mutajenik etkiler oluşturabilmektedir. Yapılan çalışmalarda arseniğin , lipid peroksidasyonunu ve serbest radikallerin oluşumunu indüklediği bildirilmiştir (5).

Resveratrol (3,5,4' trihidroksstilbene) birçok hücresel aktiviteye etki eden, kırmızı şarap dahil olmak üzere çeşitli besinlerde bulunan polifenolik bir fitoaleksindir (6). Fitoaleksinler bitkiler tarafından üretilen kimyasallar olup, bitkileri mantarlar gibi patojenik mikroorganizmalardan korurlar. Bitkiler için olduğu kadar insan sağlığı açısından da resveratrolün birçok faydası bulunmaktadır (6). Gastrointestinal sistemce kolayca emilir. En yüksek absorpsiyon ise %70 oranında oral yolla olmaktadır (7).

Resveratrolün cis ve trans formu olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Antioksidan olarak resveratrol, oksidatif strese bağlı olarak oluşan hücresel hasarları ve apoptozu önleyebilir (8). Resveratrol ile tedavi *in vivo* ve *in vitro* indirgenmiş glutatyon (GSH), düzeylerini artırmaktadır. Süperoksit anyonlarını ve hidrojen peroksiti hücreden uzaklaştırmada oldukça güçlü bir etkisi vardır (8).

Resveratrol antioksidan özelliğinin yanı sıra damar gevşetici bir ajandır, damarda pıhtı oluşumunu engelleyerek aterosklerozisi önler. Lipoprotein metabolizmasını düzenler, yaşlanmaya karşı etkilidir (8). Prostaglandin aktivitesini baskılayarak antiinflamatuvar etki yaratır, böylece kanser sonrası terapilere karşı koruyucu etkisi vardır. Resveratrol aynı zamanda bir fitoöstrojen gibi davranarak östrojen reseptörlerine bağlanma eğilimindedir.

Böylece östrojen bağımlı genlerin transkripsiyonunu tetikler. Östrojene bağımlı kanserlerde ve kalp hastalıklarında resveratrol bu özelliği ile oldukça etkili bir antioksidandır (9).

Trans resveratrolun dietilstilbestrol (DES) ve östrojene olan bu yapısal benzerliği aynı zamanda erkek üreme sistemi ile de ilişkilidir. Östrojen yanıt sistemlerini etkileyerek erkek üreme sistemi nöroendokrin sistemine feedback etkisi ile spermatogenezde dolaylı olarak rol oynar (9,10).

Bu bilgiler ışığında çalışmanın amacı; arsenik toksisitesinin testiste oluşturduğu hasara karşı resveratrolün koruyucu etkilerini araştırmaktır. Resveratrolün doku düzeyindeki etkilerini göstermek amacıyla testis dokusu; ışık mikroskopik, elektron mikroskopik ve immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiştir. Oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla, lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA (malondialdehit) ve antioksidan savunma sistemi göstergesi olan GSH değerleri spektrofotometrik olarak incelenmiştir.

3 GENEL BİLGİLER

Doğada dengelerin değişmesi, endüstrinin gelişmesi ve atıkların hızla içme suyuna karışması ile gıda ve su yolu ile arseniğe günümüzde daha çok maruz kalınmaktadır. Arseniğe maruz kalma tüm biyolojik sistemlerde yan etki oluşturabilmekte ve kansere kadar varabilecek sonuçları nedeniyle insan sağlığı açısından önemli bir unsur teşkil etmektedir. Bu çalışmada testis üzerine arseniğin etkileri ve resveratrolün antioksidan etkisi araştırılmıştır.

Arseniğe maruz kalmanın neden olabileceği sonuçların belirlenmesi ile buna karşı koruyucu çeşitli antiapoptotik veya antioksidan destekli yaklaşımların değerlendirilmesi açısından çalışma önem taşımaktadır. Bu çalışmada resveratrolün testis dokusunda koruyucu etkisinin olup olmadığı ilk kez araştırılacak ve konuyla ilgili literatüre yeni bir kaynak sağlanmış olacaktır.

3.1 Testis

3.1.1 Testisin Embriyolojisi

Gonadlar yani testis ve ovaryum başlıca üç kaynaktan gelişir. Bunlar; karın arka duvarını döşeyen mezotel, alttaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve primordial germ hücreleridir (11,12). Gonad gelişiminin ilk evresi; 5. haftada mezonefrozun medialinde mezotelin kalınlaşması ile başlar. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin çoğalması, mezonefrozun medial kısmında bir kabartının oluşmasına neden olur. Buna gonadal ya da genital kabartı denir. Daha sonra parmak şeklindeki epitel kordonları alttaki mezenşim içerisine ilerler. Bu kordonlar primer seks kordonları olarak isimlendirilir. Bu şekilde farklanmamış gonadda dışta korteks ve içte ise medulla şekillenir. Embriyonun taşıdığı kromozoma göre korteks ve medulla farklı yönde gelişecektir. XY kromozomu taşıyan embriyolarda korteks gerilerken medulla testise farklanacaktır. Embriyoner gelişimin 4. haftasının başında, vitellus kesesinin allantoise yakın kısmındaki endodermal hücreler arasında ilkel seks hücreleri olan primordial germ hücreleri oluşur. Embriyonun katlanması sırasında vitellus kesesinin dorsal kısmı embriyonun içine katılır ve bu sırada primordial germ hücreleri arka bağırsağın dorsal mezenterisi aracılığıyla gonadal kabartıya göç eder. Altıncı haftada primordial germ hücreleri gonadal kabartıda bulunan mezenşime girerek, primer seks kordonlarının yapısına katılır.

Cinsel farklanma, döllenmede oluşan genetik cinsiyete bağlıdır. Gonadların farklanması genetik cinsiyetin belirlenmesinden sonra olmaktadır. Böylece embriyonun hormonal ortamı

belirlenmekte ve hormonların etkisi altında genital kanal sistemi ve dış genital organlar şekillenmektedir (11,12). Embriyoner gelişim sırasında 7. haftadan önce gonadlar farklılaşmamıştır ve her iki cinsten de görünüş olarak benzerdir. Bu farklılaşmamış gonadlar hem kortikal hem de meduller bölgeler içerir, testis ya da ovaryum yönünde farklılaşabilir. Genetik cinsiyetin; belirlenmesi X kromozomu taşıyan bir ovumun, X ya da Y kromozomu taşıyan bir spermle döllenmesine bağlıdır. Testisin ve erkek fenotipinin gelişimi Y kromozomunun varlığını gerektirir, yani testislerin gelişimi aktif bir olaydır. Y kromozomu üzerinde kısa kolda bulunan SRY geni (Y kromozomunun seks belirleyici bölgesi) cinsiyet tayini için belirleyicidir. Öte yandan dişi cinsiyet tayini pasif bir olay olup Y kromozomunun ve SRY geninin yokluğunda ya da XX kromozom yapısının varlığında farklılaşmamış gonadlar ovaryuma dönüşür. Bu genellikle testislerin gelişiminden 2 hafta daha geç ortaya çıkar.

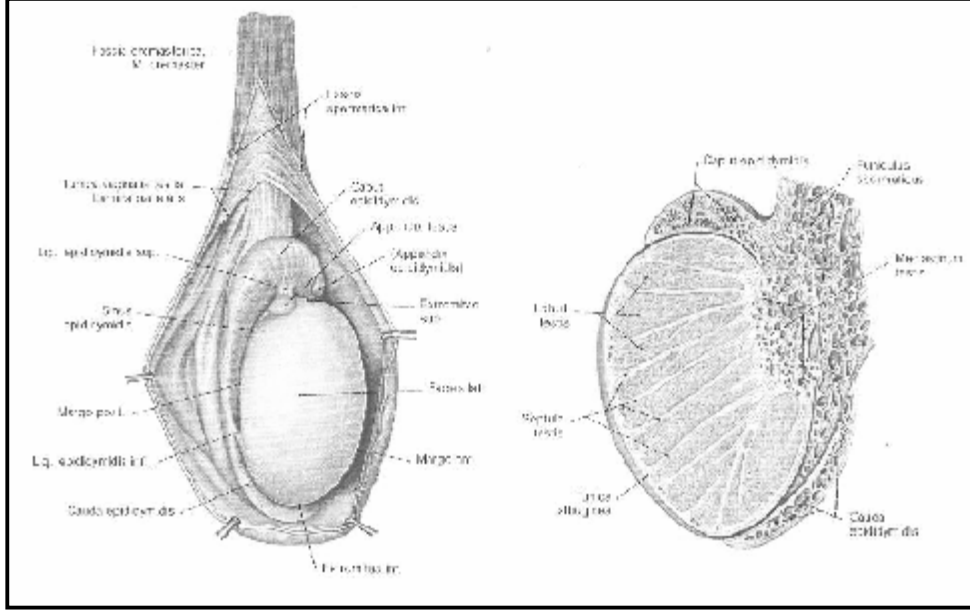
Erkeklerde TDF (testis belirleyici faktör) geninin etkisiyle, primer seks kordonları seminifer tübüllere farklılaşır. Seminifer tübüllerin arasını dolduran mezenşimden köken alan Leydig hücreleri, 8. haftadan itibaren androjenik hormonları (testesteron ve androstenedione) salgılamaya başlarlar. Bu hormonlar, mezonefrik kanalların ve dış genital organlarının maskulin olarak farklılaşmasını uyarır.

3.1.2 Testisin Anatomisi

Testisler erkekte temel üreme organı olup, skrotum içinde yer alırlar. Oval şekilde, yanlardan basık herbiri 2.5x3.5 cm boyutlarında, 10-15 gr ağırlığındadır. Olgun testisin posterior yüzü epididim ile ilişkilidir. Çift organ olan testisler; erkek üreme hücreleri olan spermatozoonlar ile erkek seks hormonları androjenleri üretir (13). Testis içerisinde bulunan tubuli rekti ve rete testis ile testis dışında yerleşik epididimis, duktus deferens, ejakülatör kanallardan oluşan genital kanal sistemi ile bunlarla ilişkili bez yapıları olan seminal veziküller, prostat ve bulboüretal bezler ve cinsel birleşme organı olan penis erkek üreme sistemini oluşturur (14,15).

Duktus deferens ile birlikte testislere ulaşan testiküler arter aracılığı ile testislerin beslenmesi sağlanır. Testiküler arter, kapsülü geçmeden önce bir çok dala ayrılır ve intratestiküler damar ağını oluşturur. Testis içerisindeki kapiller yataklar pampiniform pleksusu oluşturan çok sayıdaki ven aracılığı ile toplanır ve testiküler arter, duktus deferens ile birlikte spermatik kordonu yapar. Testisin venöz kanı sağda v.cava inferior'a, solda

v.renalis'e dökülür. Testis venleri içerisinde kan, testis arterlerinden daha düşük ısıda olup bu, arteriyel kanın ısısını azaltır ve böylece testisteki ısının vücudun diğer kısımlarından daha düşük kalmasını sağlar. Testislerin innervasyonu otonom sinirlerle olmaktadır.



Şekil 1: Testis anatomisi (13).

3.1.3. Testisin Histolojisi

Testisler dıştan testiküler kapsül adı verilen 3 tabakalı bir kapsül ile sarılıdır. Bunlar tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vaskülozadır. Tunika vaginalis mezotelyal hücrelerin oluşturduğu en dıştaki tabakadır. Peritondan köken alan seröz bir kesedir. Testisin ön ve yan yüzeylerini çevreleyen viseral tabakası ve skrotum üzerinde uzanan pariyetal tabakası bulunmaktadır. Tunika albuginea en belirgin tabaka olup düz kas hücreleri içeren yoğun bir tabakadır. Bazal lamina ile tunika vaginalisten ayrılır. Tunika albuginea testisin posterior tarafında kalınlaşarak mediastinum testis olarak organ içine sokulur. Mediastinum testis diğer bezlerde kanalların, kan damarlarının, lenfatiklerin ve sinirlerin bez içine bağlandığı hilum yapısına karşılık gelmektedir. İnce fibröz bölmeler, mediastinumdan ışınal olarak uzanarak insanda piramit şeklinde yaklaşık 250 adet lobülü oluşturur. Her bir lobül, sayıları 1-4 arasında değişen seminifer tübül içerir. Seminifer tübüller arasındaki boşluk; kan damarları, lenfatik kanallar, makrofajlar ve androjenleri salgılayan Leydig hücre grupları tarafından

doldurulan interstisyel dokudan oluşmuştur. Kan damarları ağlarını içeren tunika vasküloza, gevşek bağ dokusundan oluşan en iç tabakadır (16).

3.1.2.1 Seminifer tübül yapısı

Seminifer tübüller oldukça kıvrımlı yapılar olup, yoğun kapiller ağ ile çevrelenmiştir. Her biri yaklaşık 30-70 cm uzunlukta ve 150-250 µm çapındadır. Tübüller, lobülün tepesine doğru kıvrımlarını kaybederek düz tüp biçimini alırlar (tubuli rekti) ve rete testis ile devam ederler. Rete testis, mediastinum içerisinde dar kanallardan oluşan bir ağ yapısıdır. Buradan yaklaşık 10-12 adet efferent kanal çıkar. Bunlar spermlerin epididimise taşınmasına aracılık eder. Seminifer tübül epitelinin üzerine oturduğu bazal laminanın dışında peritübüler doku bulunur. Peritübüler doku; myoid hücreler, fibroblastlar ve bağ dokusu fibrillerinden oluşur (16). Seminifer tübül kompleksi, özelleşmiş çok katlı epitel ile döşelidir ve iki tip hücre içerir. Bunlar sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler olan spermatogonyumlar, spermatositler spermatidler ve spermatozoonlardır (16).

3.1.2.2 Membrana propria

İnce bir bazal lamina üzerine oturmuş olan seminifer epitel dıştan özelleşmiş fibröz bir doku ile sarılmıştır. Bu sınırlayıcı tabakaya membrana propria ya da peritübüler bağ dokusu adı verilir. Membrana propria 4 alt tabakadan oluşmuştur. İçten dışa doğru sıralanacak olursa;

- 1) İç hücresel olmayan tabaka: Bol miktarda kollajen lif, glikoprotein ve hyaluronik asit içeren bir tabakadır.
- 2) İç hücresel tabaka: İnce, uzun şekilli miyoid hücrelerden oluşmuştur. Her iki yüzlerinde küçük invaginasyonlar içerir. Çekirdekleri ince ve uzun olan miyoid hücrelerin bol miktarda granüler endoplazmik retikulum içeren sitoplazmaları lipid damlacıklarına, mikropinositotik veziküllere ve miyoflamanlara sahiptir.
- 3) Dış hücresel olmayan tabaka: Dışta yer alan glikoprotein yapısında ince bir bazal laminadır.
- 4) Dış hücresel tabaka: Fibroblastlardan meydana gelmiştir.

Miyoid hücrelerin organizasyonu türlere göre değişim göstermektedir. Kemiricilerde tek tabaka halinde düzenlenirken, insanlarda ve bazı türlerde 3-5 tabakalıdır. Miyoid hücreler kasılabilme özelliğindedir. Kasılarak seminifer tübülün çapını değiştirebilir ve spermatozoonların tübül içerisine hareketine yardım ederler.

3.1.2.3 Sertoli hücrelerinin ince yapısı ve işlevi

Sertoli hücreleri spermatozoonların desteklenmesinde ve olgunlaşmasında çok önemli rol oynar. Puberteden sonra seminifer tübül epitelindeki hücrelerin yaklaşık %10'unu Sertoli hücreleri oluşturur. Sınırları güçlükle ayırt edilen bu prizmatik hücreler, bazal membrandan seminifer tübül epiteline kadar uzanır. Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral hücre membranlarının sınırları düzensizdir. Tepe kısımlarında, yeni oluşan spermatozoonlar lümene bırakılıncaya kadar spermatidlerin yerleştiği kriptaya benzer girintiler bulunur. Çekirdek olukludur ve heterokromatin kitleleri ile ilişkili geniş bir çekirdekçik içerir. Sertoli hücrelerinin sitoplazması granülsüz (düz) endoplazmik retikulum ile doludur, ancak granüllü endoplazmik retikulum miktarı sınırlıdır. Bol miktarda mitokondriyon içerirler. Golgi kompleksi iyi gelişmiştir ve endolizozomların oluşturduğu çok sayıda vezikül vardır.

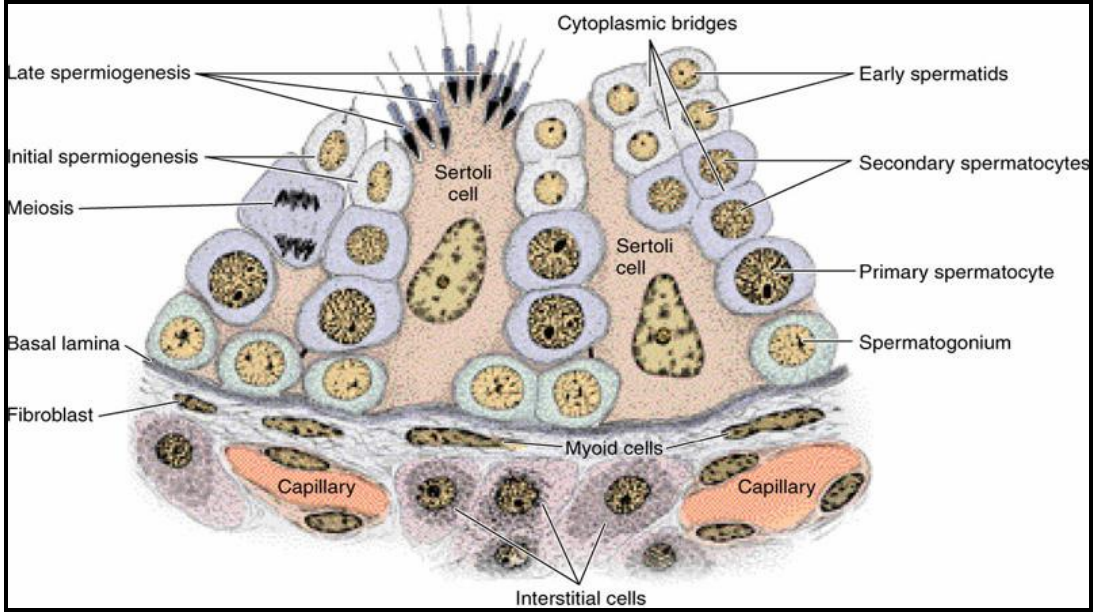
Sitoplazmada mikrotübüller ve ara filamanlardan oluşan gelişmiş bir hücre iskeletinin yanı sıra, yassı mitokondriyonlar, çok sayıda lipid damlacığı ve lipofuskin içeren lizozomlar bulunur. Ayrıca sitoplazmalarında içerikleri ve işlevleri henüz tanımlanmamış olan Charcot-Bottcher kristaloidleri denilen inklüzyon cisimcikleri vardır. Bitişik hücreler taban ve yan yüzeylerindeki sıkı bağlantı kompleksleriyle (zonula okludens) birbirine tutunur. Bu tutunma kompleksleri, epiteli bazal ve adluminal bölmelere ayırır. Buna bağlı olarak oluşan kan-testis bariyeri spermatogonyumlarla primer spermatositleri daha tepedeki sekonder spermatositler ve spermatidlerden ayırır. Bu, seminifer tübül lümeninin içindeki yapıları dolaşım sistemindeki antijenlerden yalıtır, dolayısıyla spermatositler ve spermatidleri otoimmün bağışıklık reaksiyonlarından ve kanda bulunan maddelerden korur.

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları şunlardır:

- 1) Gelişmekte olan spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek,
- 2) Seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı sağlamak,

- 3) Folikül stimüle edici hormonun (FSH) uyarımıyla, androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezlemek. (Bu protein, seminifer tübül içerisinde spermatogenezin gerçekleşebilmesi için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar.)
- 4) Spermiyogenez sonunda atılan rezidüel cisimcikleri fagosit etmek,
- 5) Olgun spermatidlerin aktin aracılı kasılmalarla, spermiyasyon sürecinde seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak,
- 6) Anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin ve uyarıcı aktivin adı verilen peptidleri salgılamak,
- 7) Anti-Müllerian Hormon (AMH) üreterek, embriyonal gelişim sırasında erkek fetusta Müller (Paramezonefrik) kanalların gerilemesini sağlar (17,18).

Sertoli hücreleri puberteden sonra postmitotiktir. Erişkin testiste mitotik hücre bölünmesi gözlenmez (16,19).



Şekil 2 : Sertoli hücresi ve spermatogenez hücreleriyle olan ilişkisi (18).

3.1.2.4 Spermatogenez hücreleri

Spermatogenez hücreleri düzenli olarak bölünen olgun spermatozoona farklılaşan hücreler olup, 4-8 tabaka hücre içerirler. Bazaldan lümenine doğru hücre tipleri; spermatogonyumlar, spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlardır.

3.1.2.4.1 Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar, bazal kompartmanda bazal lamina ile ilişkide olan hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi bağlantıların altında yer aldıkları için spermatogonyumlar kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar. Spermatogonyumların 3 temel morfolojik tipi gözlenir: Tip A spermatogonyumlar, seminifer epitelin kök hücreleridir. Çekirdek oval, yoğun bazofilik ve ince granüler kromatinlidir. Puberteden itibaren mitotik hücre bölünmeleri geçirek tip A koyu spermatogonyumları ya da tip A açık spermatogonyumları oluştururlar. Tip A açık spermatogonyumlar oval çekirdekli, soluk boyanan, ince granüler kromatinli hücrelerdir. Mitotik bölünmeler sonucu farklı tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip B spermatogonyumlar, merkezi yerleşimli çekirdekçiğe sahip sferikal çekirdek içerirler. Çekirdek kromatini çekirdekçik çevresinde ve çekirdek kılıfı boyunca yoğunlaşma gösterir (20).

3.1.2.4.2 Spermatisitler

Tip B spermatogonyumlar mitoz bölünmeler sonucu primer spermatisitleri oluşturur. Primer spermatisitler, DNA (deoksiribonükleik asit) sentezini tamamladıktan hemen sonra mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Profaz safhasından sonra sırasıyla leptoten, zigoten, pakiten ve diploten fazlarını geçirek diakinez safhasına ulaşırlar. Profaz evresi yaklaşık 22 gün sürdüğünden, kesitlerde incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu primer spermatisitlerdir. Bu uzamış profaz evresinden sonra kardeş kromatid çiftleri; metafaz, anafaz ve telofaz evrelerini geçirek sekonder spermatisitleri oluşturur.

Primer spermatisitler, spermatogenik serideki en büyük hücrelerdir ve çekirdeklerindeki sinaptonemal kompleksin varlığı ile karakterize edilirler. Birinci mayoz bölünmeden sonra oluşan sekonder spermatisitler $2n$ DNA ve 23 kromozom ($22+X$ veya $22+Y$) içerir. İnterfazda kısa süre kalmaları ve hızla ikinci mayotik bölünmeye girmeleri nedeniyle testis kesitlerinde sekonder spermatisitlerin görülmelerini oldukça zordur (17,21).

3.1.2.4.3 Spermatisidler

Spermatisidler, sekonder spermatisitlerin ikinci mayoz bölünmesi ile oluşan hücrelerdir. Spermatisidler, 7-8 μm çapta olup yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan çekirdek içerirler. Seminifer tübüllerde lümen yakınında, Sertoli hücrelerinin derin sitoplazmik çöküntülerine yerleşmiş şekilde bulunurlar. Spermatisidler spermiyogenez adı verilen bir farklılaşma süreci

geçirerek spermatozoonlara farklılıklar. Bu süreçte; akrozom oluşumu, çekirdeğin yoğunlaşması ve uzaması, kuyruk gelişimi ve sitoplazma kaybı gözlenir.

Spermatid, merkezi yerleşimli bir çekirdek, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri ve bir çift sentriyole sahiptir. Spermatidin olgun sperme farklılaşma süreci 4 aşamada gerçekleşir. Bunlar sırasıyla; golgi fazı, şapka fazı, akrozomal faz ve maturasyon fazıdır. Sonuçta bir spermatogonyumdan 4 olgun spermium oluşur. Spermatid spermiyogenez aşamasını Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma katlantılarında geçirir. Olgun spermium spermiyasyon denilen olayla tübül lümenine verilir (16).

3.1.2.4.4 Spermatozoon

İnsanda spermatogonyumdan spermatozoon oluşumu yaklaşık 64 günde gerçekleşmektedir ve bu süreç spermatogenezis olarak adlandırılır. Olgun spermatozoon baş, boyun ve kuyruktan oluşur.

Baş, akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur. Çekirdek yoğun kromatin içermekte olup yassı biçimlidir. Özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom, çekirdeğin anterior yarısını örter. Akrozom içerisinde akrozin denilen tripsin benzeri proteazlar, asit fosfataz, hyaluronidaz ve nöraminidaz gibi hidrolitik enzimler içerir.

Boyun, baş ve kuyruk arasındaki bağlantıyı sağlayan bir çift sentriolun bulunduğu dar bir parçadır. Sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksoneme distal sentriol kaynaklık yapar. Yapısal yönden silyuma benzeyen kuyruk; orta parça, esas parça ve son parça olarak üçe bölünmüştür.

Kuyruk; orta parça, esas parça ve son parça olarak üçe bölünmüştür. Kuyruğun orta parçası, sarmal olarak dizilmiş mitokondrilerin oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun fibriller adı verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz adet uzunlamasına seyreden filamandan oluşmuştur. Kuyruğun en uzun parçası esas parçadır. Yedi dış yoğun fibrille sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur. Hem dış yoğun fibriller hem de fibröz kılıf, sperm öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturur. Son parça, dış yoğun fibriller ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı sadece aksonemi bulunan kuyruğun çok kısa bir parçasıdır (17,21).

3.1.2.5 İnterstisyum

Testisin seminifer túbülleri arasındaki boşluklar; Leydig hücreleri, bağ dokusu elemanları, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Testiküler kapillerler pencereci tiptedir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine olanak sağlar.

3.1.2.6 Leydig hücreleri

Seminifer túbüllerin arasındaki gevşek bağ dokusunda eozinofilik Leydig hücreleri yer alır. Leydig hücreleri; 15 µm çapında, periferde yer alan ve bir ya da iki çekirdekçiği bulunan çekirdeğe sahip, büyük hücrelerdir. Hücre yüzeyinde çok sayıda mikrovillus yer alır. Bu hücreler çoğunlukla pencereci tip kapiller ve küçük lenf damarlarına yakın konumda yerleşmiştir. Sitoplazmalarında steroid salgılayan hücelere özgü bir özellik olan yoğun, sıkı paketlenmiş düz endoplazmik retikulum bulunur. Nispeten daha az sayıda ribozom ve granüllü endoplazmik retikulum, çok sayıda túbüler kristal mitokondri, çekirdeğin hemen yanında büyük bir Golgi kompleksi ve çok sayıda yuvarlak lipid damlacığı bulunur. Salgı vezikülleri bulunmaz. Ayrıca insanlarda Reinke kristalleri denilen kristalize proteinler de sitoplazmada görülür.

Leydig hücreleri, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondri ve agranüler endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilir. İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri hem de miktarları hormonal uyarımlarla düzenlenir. Gebelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon, maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Androjenik hormonlar, gelişim sırasında erkek genital organların farklılanması için gereklidir (17,19).

3.1.2.7 Kan-testis bariyeri

Kan-testis bariyeri, interstisyel kan damarları ile seminifer túbüller arasında yer alan, Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile oluşan bir bariyerdir. Kandan gelen zararlı ajanlara karşı germ hücrelerinin korunmasını sağlar. Seminifer túbüllere immünoglobülinlerin geçmesini önler.

Spermatogenez sırasında birtakım proteinler ortaya çıkar. Seksüel olgunlaşma immunolojik yeteneğin gelişmesinden sonra meydana geldiği için, farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanmaktadır. Böylece, germ hücrelerinin ölümüne sebep

olabilecek bir immün yanıt tetiklenmektedir. Kan-testis bariyeri, gelişen spermeler ve immün sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimi ortadan kaldıracaktır (17).

3.1.3 Testisin Fizyolojisi

Testisler birbirinden farklı iki temel işleve sahiptir. Bunlar erkek germ hücresi olan spermiumların üretilmesi ve seks hormonu testosteronun sentezlenmesi, depolanması ve salgılanmasıdır. Testisin bu işlevi puberte döneminde başlar ve hipotalamo-hipofizer sistemin kontrolü altındadır. Hipotalamustan salgılanan gonodotropin serbestleştirici hormon (GnRH) hipofiz bezinin ön lobundan luteinize edici hormonun (LH) salgılanmasını uyarır. LH ise Leydig hücrelerinde bulunan reseptörlere bağlanarak, bu hücrelerde kolesterolden başlıca testosteron olmak üzere östrojen dahil diğer hormonların sentezlenmesini sağlar. Diğer bir hipofiz ön lobu hormonu olan FSH ise yine hipotalamustan GnRH aracılığı ile salgılanır ve Sertoli hücrelerinde ABP sentezini ve salınımını uyarır. ABP, testosteronu bağlayarak testosteron seviyesinin seminifer tübüllerde yüksek yoğunlukta kalmasını sağlar. Bu şekilde bölgesel olarak ortamda yüksek yoğunlukta bulunan testosteron, FSH'ın etkisiyle spermatogenezin normal olarak gerçekleşmesine olanak tanır. Testisler günde holokrin tip salgılama ile yaklaşık 200.000.000 spermiumun oluşumunu gerçekleştirir (17).

3.2 Apoptoz ve Nekroz Tanımı

Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürlür. Bu mekanizmalar nekroz ve apoptozdur. Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptoz ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir (22).

Apoptoz aslında Latince'de ağaçların yapraklarının dökülmesini tanımlamak için kullanılan bir kelimedir. Apo, ayrı; ptosis, düşen anlamındadır. Sonradan yapılan araştırmalar ışığında bugün artık bilindiği gibi apoptoz birçok fizyolojik ve biyolojik olayda önemli rol oynayan bir süreçtir. İstenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılması, embriyogenez sürecinde farklılaşma, immün sistemin gelişimi, inflamasyonun çözülmesi, organ sistemlerinde hücre sayısının kontrolü, hasarlı ve zararlı hücrelerin ortadan kaldırılması, organizmanın iç

dengesinin devamlılığında ve daha birçok durumda apopitoz önem kazanmaktadır. Bu sürecin bozulması organ işlevlerinde bozulma ve neoplaziye neden olur (23).

Hem nekroz hem de apopitoz, yöntem olarak hücre ölüm şekli olmalarına rağmen bu iki ölüm şeklinin hem histolojik hem de fizyolojik nedenlerinde büyük farklılıklar vardır. Nekrozun karakteristik özelliği ölümün hücre grubunda ortaya çıkmasıdır ve nekrozun en yaygın nedeni oksijen yetersizliği anlamına gelen hipoksidir. Bununla birlikte arsenik, siyanid, insektisitler gibi toksik maddeler ve ağır metaller de nekroza neden olabilir (23). Nekroza neden olan olaylar, hücre ve organel parçalanmasına yol açan membran geçirgenliğinin artmasında ve bunun sonucunda da sitoplazmanın ve çekirdek içeriğinin hücreler arasındaki boşluğa salınmasında rol oynar (23). Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması inflamasyona sebep olur. Bu olayın karakteristik özelliği makrofaj ve nötrofillerin nekrotik dokuya göç etmesidir. Göç eden bu hücreler nekrotik dokuyu fagosite eder. Bu nedenle inflamasyon nekrozun önemli bir işaretidir. Apopitoz ise nekrozdaki tamamen farklı olarak inflamasyon olmaksızın gerçekleşen, genlerle düzenlenen, programlı, RNA (ribonükleik asit), protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır (24). Hastalıklar gereğinden fazla apopitoz sonucunda veya apopitozun yetersizliği gibi durumlarda ortaya çıkabilmektedir. Apopitozun artması nörodejeneratif hastalıklara, AIDS'te görülen lenfosit yetersizliğine, azalması ise malignite ve otoimmün hastalıklara yol açabilir (25).

Apopitozun görüldüğü örnekler aşağıda özetlenmiştir (23) :

- Embriyogenez ve fütogenez sırasında normal gelişimin sağlanabilmesi amacıyla, oluşmuş olan hücrelerin bir kısmı apopitoza gitmektedir. Özellikle sinir sisteminin ve immün sistemin gelişiminde apopitoz önemli rol oynamaktadır.
- Derideki keratinositlerin yüzeye göç edip epidermisin en üst tabakası olan stratum korneumu oluşturmaları,
- Tümörlerde regresyon fazında hücre ölümü,
- Akut inflamatuvar cevapta nötrofillerin ölümü,
- Sitotoksik T hücrelerce indüklenen hücre ölümü,
- Viral hastalıklarda hücre hasarı,

-Toksik uyarılardaki hücre ölümü,

-Pankreas, parotis ve böbrek gibi organlarda kanal obstrüksiyonlarına bağılı olarak gelişen atrofilerde,

-Proliferasyona uğrayan hücre topluluklarında (örn:barsak kript epiteli) apopitoz sık oluşur.

Apoptoz birçok hastalıkla da yakından ilişkilidir. Alzheimer, Parkinson, amiyotrofik iskemik hasarda, reperfüzyon hasarında, hepatit ve otoimmün hastalıklarda apoptoz sık gözlenir (25).

3.2.1 Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları

Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar;

- 1) Apoptozun başlatılması,
- 2) Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu,
- 3) Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması,
- 4) Fagositoz olarak özetlenebilir (22).

Hücrenin apoptoza gidebilmesi için ilk önce, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyal ile karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden (intrinsek) veya dışından (ekstrinsek) gelebilir (22).

3.2.1.1 Hücre dışından kaynaklanan, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ile (Tümör nekrozis faktör süperailisi üyeleri ve bunların reseptörleri) düzenlenen apoptoz:

Hücre membranındaki reseptör moleküller, farklı efektörleri aktive ederek hücre davranışlarını değiştirebilir (26). Hücre membran reseptörleri hücre ölümünü de tetikleyebilir. Apoptozda rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup tümör nekrozis faktör reseptör (TNFR) ailesidir.

Bu reseptör grubunun en az 19 üyesi vardır. Reseptörlerin biyolojik etkileri çeşitlidir ve apoptoz ile sınırlı değildir (22). Bir kısmı apoptoz oluştururken, bir kısmı proliferasyona neden olur. Bir kısmı ise her ikisini de oluşturur. TNFR içinde apoptoz oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1'dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında hücrenin

sitoplazmasında bulunan parçaları, adaptör proteinlere bağlanır. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Ölüm bölgeleri, ölüm reseptörlerine ligand bağlandığı zaman apoptotik mekanizmayı uyarır ve hücre dışından gelen uyarıyı hücre içine iletir. Bu yolağın prototipi Fas proteindir. Fas yalnızca Fas ligandı (FasL) olarak isimlendirilen bir ekstrasellüler sinyal tarafından tetiklenir. FasL, Fas'a bağlandığı zaman kaspaz 8'i aktive eder ve tüm kaspaz zinciri olaya katılır (27).

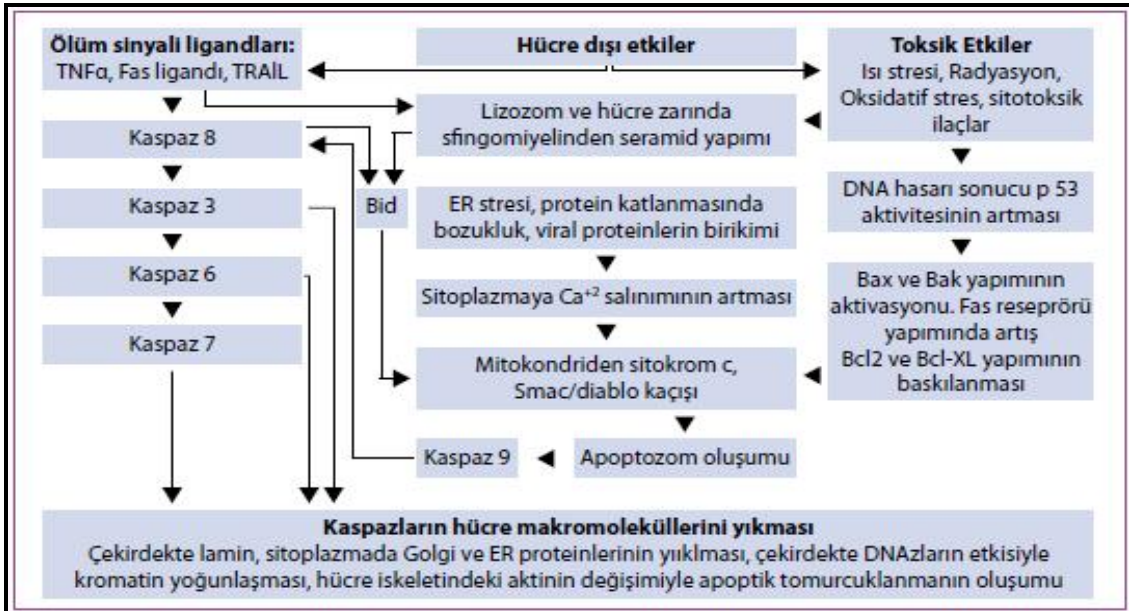
3.2.1.2 Hücre içinden kaynaklanan, mitokondriyal yolla düzenlenen apoptoz:

İç sinyallerle oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynamaktadır. Sinyaller dış mitokondri zarında geçirgenlik artışına neden olurlar. Mitokondri dış zarının geçirgenliğini bazı proteinler ayarlamaktadır. Bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir. Bu grubu oluşturan proteinlerin bir kısmı antiapoptotik, bir kısmı ise proapoptotiktir (28). Bcl-2 proteini antiapoptotiktir. Mitokondri dış membranına ve apoptoz proteaz aktive edici faktör 1'e (apaf 1) tutunmuştur. Hücrenin içinden kaynaklanan apoptotik sinyaller apaf 1'in mitokondriden ayrılmasına neden olur. Bu ayrılma dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Geçirgenliğin artması, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom c'nin sitozole çıkmasına neden olur. Sitokrom c'nin salınımı hücrede apoptozun başladığının göstergesidir. Sitokrom c sitoplazmada apaf 1, kaspaz 9 ve adozin trifosfat (ATP) ile birleşir. Oluşan yapıya apoptozom denir. Apoptozom sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3' ü aktive ederek apoptoza neden olur (28).

Apoptoz gelişiminde bir diğer yol, viral enfeksiyonlara karşı esas savunma mekanizmaları olarak tanımlanan sitotoksik T hücrelerinin (CTL) viral yolla enfekte olmuş hücrelerde apoptoza neden olmasıdır. CTL'lerin ana görevi malign ve/veya virüs ile enfekte olmuş hücrelerin öldürülmesidir (29). Yabancı antijenleri tanıdıklarında yüzeylerinde FasL oluşur, hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunurlar. CTL'ler sitoplazmalarında granzyme B (serin proteaz) ve perforin adı verilen ve apoptoz oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler (30). Perforin, transmembran por oluşturucu bir proteindir. CTL'ler hedef hücrelerin membranlarında perforin ile porlar oluşturarak, sitoplazmalarına granzyme B salgılar. Granzyme B hedef hücrelere girerek kaspazları aktive eder (29).

Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı olduğunda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozuna neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. İnsan tümörlerinin %50'den fazlasında mutasyona uğradığı tespit edilen p53 geninin, kanser oluşumunu

önlemede kritik rol oynadığı kabul edilmektedir. Normalde inaktif durumda bulunan p53 geni, DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p21 genini harekete geçirir. p21 geni hücrenin geç G1 fazında kalarak, S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre siklusu durdurularak oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalmasa engellenir. p53 geni DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse, hücre siklusundaki blok kalkar. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni bax proteinini (bcl-2 grubu proteinlerden, proapoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptoza giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (29, 31).



Şekil 3: Hücre içi ve dışı yollarla uyarılan apoptozun biyokimyası (28).

3.2.2 Apoptoz Saptama Yöntemleri

Apoptoz hücre morfolojisi esas alınarak yada histokimyasal ve biyokimyasal teknikler kullanılarak hücrede DNA kırıklarının belirlenmesi yoluyla saptanabilir.

- Hücre morfolojisi esas alınarak floresans maddelerin (Hoechst boyası, DAPI, propidium, iyodür) kullanılması ile yapılan boyalarla floresans mikroskobu ile inceleme yapılabildiği gibi, kültür ortamında üretilen hücreleri incelemek için faz kontrast mikroskobu da kullanılabilir. Faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepçikler izlenebilir. Hücreler henüz ortama yayılmış halde iseler hücrelerin sitoplazmalarında ortaya çıkan vakuoller gözlenebilir. Işık mikroskobu ile

incelendiğinde apoptotik hücrelerin karakteristik özellikleri yoğunlaşmış ve büzüşmüş bir sitoplazma ile çekirdeksel değişikliklerdir. Kromatin kondenzasyonu ve kromatinin çekirdek zarının periferinde toplanması, çekirdeğin küçülmesi ve parçalara ayrılması en önemli morfolojik özelliklerdir (32). Apoptotik hücre karakterindeki çekirdek ve hücreyel organeller düzeyindeki değişiklikler ise elektron mikroskobu ile gözlemlenebilir.

- DNA fragmentasyonunun belirlenmesi: TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt]- mediated dUTP- biotin nick-end labeling) yöntemi tek ya da çift iplikli DNA kırıklarına işaretlenmiş nükleotidlerin bağlanması esasına dayanır. Apoptotik hücrelere ait DNA'lar hızlıca parçalanmakta olduklarından, birdenbire hücre içerisindeki kromatin ağ bütünlüğünü kaybeder ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı çok yükselir. Hücrede Tdt (terminal deoxynucleotidyl transferase) enzimi, ortama eklenen biotin dUTP'yi, parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına transfer eder. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları, ortama FITC gibi floresans veren bir madde ile bağlanmış avidin eklendiğinde görünür hale gelir (33).
- In situ hibridizasyon tekniği: Apoptozun belirlenmesi için işaretlenmiş poly (A) problemleri kullanılması esasına dayanır. Apoptotik DNA'nın denaturasyona duyarlılığı formalin ile tespit edilip parafine gömülmüş dokularda çalışılmaktadır (33).
- Anneksin V yöntemi: Hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olur. Bu fosfatidilserinler bir floresans madde (örn: FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilebilir. Bu belirleme flow sitometri yöntemi kullanılarak yapılır ve floresans mikroskobu ile incelenir (33).
- Apoptoza özgü proteinlerin saptanması: Western blotting ya da immünohistokimya yöntemleri kullanılarak kaspazlar gibi sadece apoptotik hücrelerde aktif hale gelen ya da eksprese olan (örn: Bcl-2 vb.) bazı proteinlerin dokuda tespit edilmesi esasına dayanır.

3.2.3 *Spermatogeneziste Apopitozun Rolü*

Doku canlılığında ve devamında, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında apopitoz kuşkusuz önemli bir rol oynamaktadır. Apopitoz testiküler dokuda da sık rastlanan bir olaydır. Spermatogenezde, genellikle spermatositler ve spermatogonyumlarda programlı hücre ölümüne yol açar (34). Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın gelişimi için mutlaka gereklidir. Kerr yaptığı bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apopitoz gerçekleştiğini ortaya koymuştur (35).

Testiste germ hücrelerinin %75'i apopitoza maruz kalır ve bu şekilde defektif germ hücrelerinin yok edilmesi sağlanır. Apopitotik hücre eliminasyonu, erken gelişim evresinde başlar ve sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasında uygun sayısal oran sağlamaya yönelik bir fizyolojik yanıt olarak tanımlanmaktadır (36). Bazı durumlarda testislerde programlı hücre ölümlerinde artış olabilir. Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda gözlenen hücre ölümlerindeki artış bu gibi durumlara örnek olarak verilebilir (37).

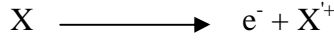
Spermatogenezde testiküler germ hücre apopitozunun hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (38). Hipofizektomize immatür ratlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde masif apopitozun ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da insan koryonik gonadotropin (hCG) tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir. Ayrıca, gonadotropin ya da testosteron eksikliği dışında matürasyon arresti ve hipospermatogeneze yol açan tüm klinik durumlarda da apopitoz görülebilir. Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere olan duyarlılığı da germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini arttıran diğer bir faktördür (39). Testiküler fizyolojiyi bozan eksojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apopitoz gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (39).

3.3 **Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri**

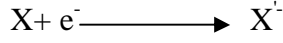
Serbest radikal, herhangi bir atom ya da molekülün, dış yörüngesinde çift oluşturmamış bir elektron içermesi durumu olarak tanımlanır.

İlk defa 1900 yılında Goomberg tarafından keşfedilmiştir. Organik ve inorganik yapılı olup etkileşime girdiği molekülün yapısal özelliklerini değiştiren aktiviteye sahiptir. Serbest radikaller üç şekilde oluşabilir (40) :

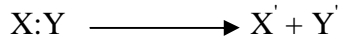
1) Non- radikal bir molekülden tek bir elektron kaybı.



2) Non-radikal bir molekülün tek bir elektron kazanması.



3) Homolitik yarıma. Normal bir molekülün kovalan bağının homolitik yarılmalar sonucu eşleşmemiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması.



Bilinen bazı serbest radikal çeşitleri şunlardır;

- Süperoksit radikalleri ($O_2^{\cdot-}$)
- Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
- Hidroksil radikali (OH \cdot)
- Peroksil Radikali (ROO \cdot)
- Nitrik Oksit (NO)

3.3.1 Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller endojen ya da eksojen kaynaklara bağlı olarak üretilir.

3.3.1.1 Endojen kaynaklar

3.3.1.1.1 Mitokondrial ve endoplazmik retikulum elektron transport zinciri

İnsan vücudu tarafından alınan oksijenin yaklaşık %85'i mitokondrial elektron transport zincirinde kullanılmaktadır. Mitokondriler ATP üretimi için esas kaynağı oluşturan organellerdir. Metabolik enerji üretimi için öncelikle yağ asidi veya glukoz oksidize olur ve elektron taşıyıcıları örneğin nikotin adenin dinucleotid (NAD), flavin mononucleotid (FMN), flavin adenin dinucleotid (FAD) yoluyla elektron kaybederler. Sonuç olarak indirgenmiş nikotin adenin dinucleotid (NADH) ve flavinler (FMNH₂ ve FADH₂) oluşur. NADH ve indirgenmiş flavinler iç mitokondrial membranda tekrar oksidize olurken organizmanın temel yakıtı olan ATP kazanılmaktadır (40). Oksidasyon basamaklı bir şekilde gerçekleştiği için

enerji salınımı da yavaş yavaş olmaktadır. NADH'dan ayrılan elektronlar zincirdeki enzimlerin yapısında bulunan demir iyonlarının indirgenmesinde kullanılmaktadır. Elektron transport zincirinde en son oksijeni kullanan oksidaz enzimi, sitokrom oksidazdır. Sitokrom oksidaz demir ve bakır iyonları içerir. Bu metaller oksijenin indirgenmesinde rol oynar (41). Elektron transport zincirinin erken basamaklarında birkaç elektron oksijene doğru sızmakta ve bu sızma süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Normal şartlarda mitokondride indirgenen oksijenin % 1-3'ü süperoksit radikali oluşturabilmektedir. Mitokondri hasar gördüğünde sızma artmakta ve dolayısıyla süperoksit radikalleri de artmaktadır (42). Endoplazmik retikulumda da NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase) P450 redüktaz enzimidaki flavinlerden oksijene elektron kaçağı olmakta ve süperoksit radikalleri oluşmaktadır (40).

3.3.1.1.2 Ksantin oksidaz sistemi

Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz ve diğer oksidan enzimler önemli reaktif oksijen radikal kaynaklarıdır. Organizmaya alınan oksijenin % 10-15'i mitokondride kullanılmaz. Değişik oksidaz ve oksijenaz sistemleri tarafından doğrudan veya kimyasal tepkimeler yolu ile kullanılır. Ksantin ve hipoksantinün ürik asite oksidasyonu ksantin dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenmektedir. Elektronlar oksijene değil NAD^+ üzerine aktarılmaktadır, bu nedenle normal koşullarda ROS üretimi olmamaktadır (40,41). İskemi sırasında sitozolik kalsiyumun artması sonucu hücre içi proteazlar aktive olarak ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürür. İnozin de hipoksantine dönüşür. Böylece dokularda biriken hipoksantin ve ksantin reperfüzyonla gelen oksijen ile ksantin oksidaz enzimi aracılığıyla birleşerek singlet oksijen (O_2') oluşturur (43).

3.3.1.1.3 Nötrofil fagositoz sistemi

Makrofaj, nötrofil ve eozinofiller de serbest radikal üretir. Nötrofil ve makrofajların plazma membranında bulunan NADPH enzim sistemi aktive olunca süperoksit radikalleri oluşur. Süperoksit radikali de hidrojen peroksite indirgenir.

3.3.1.1.4 Araşidonik asit metabolizması

Prostaglandinlerin sentezindeki ilk basamak olan yağ asidi substratının elde edilmesi için fosfolipaz A₂ enzimi aktive olarak membran lipidlerinden araşidonik asidi ayırmaktadır. Araşidonik asidin prostaglandin, lökotrien ve tromboksanlara oksidasyonu sırasında ROS oluşumu gözlenmektedir (40).

3.3.1.2 Eksojen kaynaklar

Organizmada serbest radikal oluşturan eksojen kaynaklar şunlardır (40):

- İyonizan radyasyon,
- Hepatotoksinler (Karbon tetraklorür),
- Ksenobiyotikler,
- Redoks siklusu yapan maddeler (paraquat, nitrofurantoin),
- Kemoterapötikler (Adriamisin),
- Hava kirliliği,
- Sigara
- Metal iyonları (demir, bakır, kadmiyum, civa, arsenik).

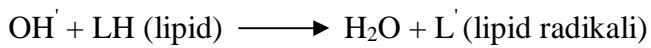
3.3.2 Serbest Radikaller ile Oluşan Hücresel Hasarlar

Serbest radikaller lipidler, proteinler ve DNA gibi hücresel bileşenlerde oksidan hasar oluşturmaktadır. Serbest radikallerin organizmada oluşturduğu ana etkiler şunlardır:

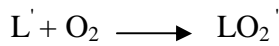
3.3.2.1 Lipid peroksidasyonu

Serbest radikal hasarının esas süreci lipid peroksidasyonu olarak kabul edilmektedir. Doymamış çoklu yağ asitlerinin yan zinciri ya da metilen karbonu üzerinden radikal aracılığıyla bir hidrojen atomunun çıkarılması lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır. Lipid peroksidasyonunun zincirleme reaksiyonu üç aşamada gerçekleşir (44);

a) Başlangıç aşamasında, hidroksil radikali doymamış yağ asidinden bir hidrojen çıkararak lipid peroksidasyonunu başlatır.



b) İlerleme aşamasında, lipid radikali oksijen molekülü ile hızlıca reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini oluşturur.



Oluşan peroksil radikali diğer lipid moleküllerine saldırır ve onların hidrojen atomunu çıkartarak, lipid hidroperoksitleri oluştururken aynı zamanda birbiri ardına ikincil oksidasyonları oksijenle birleşerek devam ettirecek lipid radikali oluşur.

c) Reaksiyon, lipid peroksil radikalının antioksidanlar tarafından temizlenmesiyle ya da iki lipid peroksil radikalının kombinasyonu ile keton ve alkol gibi radikal olmayan ürünlere dönüşmesiyle sonlanır.

Lipid peroksidasyonu, membran yapısının bozulması ve iyon geçirgenliğinin artmasıyla birlikte membran akışkanlığının kaybında artışa neden olur. Bu olaylar hücre ölümü ile sonlanır. Hücrede oluşan oksidatif ve nitrozatif hasar daha sonra doku ve organ sistemlerinde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olarak çeşitli patolojik durumlara yol açar (44).

3.3.2.2 DNA ve serbest radikal hasarı

Reaktif oksijen radikallerinin aşırı üretimi DNA molekülünün tüm bileşenleri üzerine modifikasyonlara neden olur. OH', hem pürin hem de pirimidin bazlarında hasar oluşturur ve deoksiriboz halkasında yarıma ve zincir kırılmalarına neden olur. Genetik materyalin sürekli modifiye edilmesi karsinogenezis, yaşlanma ve mutajenezisin ilk adımlarını oluşturur (45).

3.3.2.3 Proteinler ve serbest radikal hasarı

Proteinler ve proteinlerin yapıtaşı olan aminoasitler de serbest radikallerin hedeflerindedir. Protein oksidasyonu, proteinlerin OH' ve diğer radikallerle kovalent değişikliklere uğraması sonucunda meydana gelir. Proteinlerin amino asit yan zincirlerinin oksidatif hasarı sonucu protein oksidasyonu ürünleri ve karbonil türevleri oluşabilmektedir. Proteinlerdeki karbonil grupları oksidatif hasarın göstergesi olarak görülmektedir. Membran lipidlerinin oksidasyonu sonucu lipid radikalleri oluşmakta, proteinlere hasar verip proteinlerin parçalanmasına ve polimerizasyonuna neden olmaktadır. Doku veya plazma örneklerinde spektrofotometrik yöntemle serbest radikal hasarının göstergesi olan protein oksidasyonu ürünleri ölçülebilmektedir (42,46).

3.4 Antioksidan Maddeler

Antioksidanlar, hücrede ve hücreler arası sıvıdaki serbest radikalleri etkisiz hale getiren maddelerdir. Daha önce sayılan çeşitli patolojik süreçler sonucu oksidan-antioksidan sistemin dengesi bozulabilir. Bu durumda antioksidan mekanizmalar tükenir (deplezyon). Sonuç olarak serbest radikal etkinliği artarak hücre zedelenmesi ve ölüm gelişebilir (47).

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşın vücutta pek çok savunma sistemi geliştirilmiştir. Meydana gelen serbest radikallerin toksisitesi ya direkt olarak radikal temizleyicilerle ya da indirekt olarak antioksidanlarla antagonize edilir. Direkt radikal temizleyiciler, radikallerin başlattığı zincirleme reaksiyonları ilk basamaklarda durdurarak radikallerin etkisinin artmasını önlerler. İndirekt radikal temizleyiciler ise radikal süpürücü etki ile reaksiyona girmeden daha zararsız moleküllere dönüştürerek veya diğer moleküllerden serbest radikal oluşmasını engelleyerek antioksidan etki yaparlar (48).

Bilinen antioksidanlardan bazıları şunlardır;

3.4.1 Doğal (endojen) Antioksidanlar

3.4.1.1 Enzim olanlar

- Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
- Süperoksit dismutaz
- Katalaz
- Glutatyon Peroksidaz
- Glutatyon-S-transferaz
- Glutatyon redüktaz

3.4.1.2 Enzim olmayanlar

3.4.1.2.1 *Lipid fazda bulunanlar:* Alfa tokoferol, beta karoten.

3.4.1.2.2 *Sıvı fazda bulunanlar:* Askorbik asit, hemoglobin, metionin, albumin, bilirubin, glutatyon, miyoglobin, melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin.

3.4.2 Eksojen Antioksidanlar

- Ksantin oksidaz inhibitörleri: Tungsten, Allopürinol, Folik Asit, Pterin Aldehit, Oksipürinol.
- NADPH oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvarlar, difenil iodonium, rekombinant superoksid dismutaz, Trolox- C (E vitamini analogu).
- Eksojen antioksidan aktiviteyi arttıran maddeler: Ebselen, Asetilsistein.
- Diğer non enzimatik serbest radikal toplayıcıları: Mannitol.
- Demir döngüsünün inhibitörleri: Desferoksamin, Seruloplazmin, Nötrofil adezyon inhibitörleri.
- Resveratrol
- Sitokinler: TNF, Barbitüratlar, İnterlökin-1, Demir şelatörleri.

3.4.3 Gıda Antioksidanları

- Bütile hidroksitoluen
- Bütile hidroksiyanisol
- Sodyum benzoat
- Etioksiquin
- Propilgat
- Fe-Süperoksit dismutaz (47).

3.5 Oksidatif Stres, Antioksidan Sistemler ve Testis

Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (49). Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipitlere saldırarak zarar verir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz

etkilerinden korunur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerine yaptığı olumsuz etkiye oksidatif stres denir (50).

Testiste spermatogenez aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir ve saniyede 1000 sperm üretilmektedir. Bu süreçte meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek miktarda mitokondriyal oksijen tüketimini gösterir. Testiste vaskularizasyonun zayıf olması nedeniyle de bu dokuda oksijen miktarı düşük ve oksijen miktarı için olan rekabet oldukça fazladır. Hem spermatogenez hem de Leydig hücre steroidogenezi, oksidatif stresle hasar görebilmektedir. Testis dokusundaki düşük oksijen miktarı, testisin kendini serbest radikallerin hasarından koruyabileceği mekanizmaların önemli bir parçası olabilmektedir. (45). Testiküler mikro çevredeki düşük oksijen miktarına rağmen testis, fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle, oksidatif strese hassas hale gelmektedir (45).

Testis serbest radikallerin hasarından korunmak için çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyiciler içermektedir. Bu antioksidan sistemler, hem enzimatik hem de non-enzimatik öğelerden oluşabilir (51). Enzimatik öğelerden bazıları süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'tir. Testis ROS elimine eden enzimlere ek olarak, oksidatif hasara karşı korunmak için küçük molekül ağırlıklı antioksidan faktörlere de başvurmaktadır. Bu faktörler iyonlar ve serbest radikal süpürücü etkinlik gösteren maddelerdir. Çinko, E vitamini, C vitamini, melatonin, sitokrom c bunlar arasında sayılabilir (52).

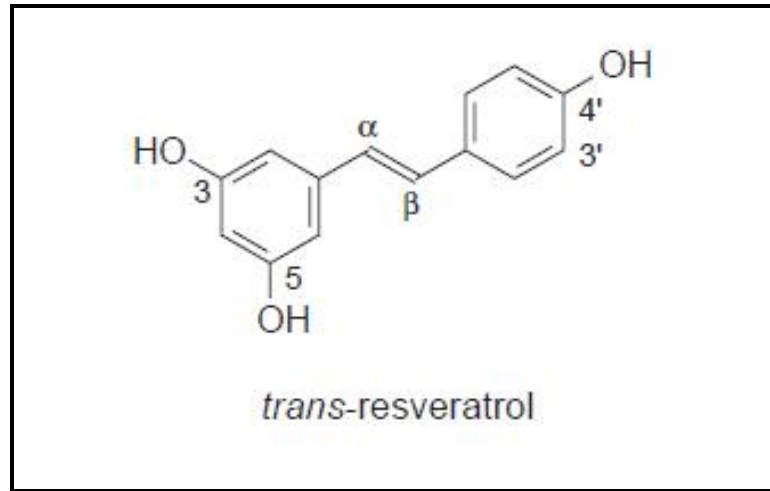
Testis; steroidogenez ve sperm üretimini desteklemek amacı ile antioksidan açıdan korunmasına rağmen, bazı endojen ve eksojen faktörlerin bu savunmayı bozduğu ve oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir. Sonuçta germ hücre hattında DNA hasarı, spermatozoada DNA hasarı, testiküler antioksidan enzim aktivitesinde bozukluk, oksidatif stres indüklenmesi, lipid peroksidasyonunun indüklenmesi, ROS temizleyicilerin kaybı, testiküler SOD ve katalazın baskılanması gerçekleşmektedir. Bu gibi savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda erkek infertilitesinde de kullanılan antioksidan terapi devreye girmektedir. Antioksidan terapi ile lipid peroksidasyon potansiyelinin azaltılması, fertilizasyon oranlarının gelişmesiyle paralellik göstermektedir (53).

3.6 Resveratrol

Bitkilerin biyotik veya abiyotik bir stres faktörü ile karşılaştıklarında sentezledikleri düşük molekül ağırlığındaki antimikrobiyal organik bileşiklere fitoaleksinler adı verilmektedir. Fitoaleksinler, bitki savunma mekanizmalarının ürünleri olarak sentezlenen sekonder (ikincil) metabolitlerdir. Çok düşük miktarlarda sentezlenmekte olan bu maddelerin, bitkilerin stres koşulları altında korunma ve dayanma mekanizmalarını oluşturmalarında rol oynadıkları bilinmektedir (54).

Resveratrol (RES); bitkiler tarafından travmatik zedelenme, ultraviyole ışığa maruziyet ya da fungal enfeksiyona (*Botrytis cinerea*) karşı cevap olarak sentezlenen non-flavonoid yapıda polifenolik bir fitoaleksindir. RES, stilben fitoaleksinlerin en aktif bileşiğidir (54,6).

3,5,4' trihidroksistilben olarak da adlandırılan RES'in molekül formülü $C_{14}H_{12}O_3$ ve molekül ağırlığı 228,25 daldondur. Bitkilerde polifenoller, RES de dahil genelde glikozit yapısındadır. Bu nedenle RES, 3-O- β -D-glikozit piceid olarak da bilinir ve cis ve trans olmak üzere iki izomeri bulunmaktadır. İzomerleri cis piceid ve trans piceid olmak üzere isimlendirilir. Bunun yanında doğal analogları ve konjüгатları da vardır (7). Bitkilerde daha çok trans izomeri bulunması nedeniyle bütün araştırmalar genel olarak trans izomeri üzerinden yapılmıştır (54,6).



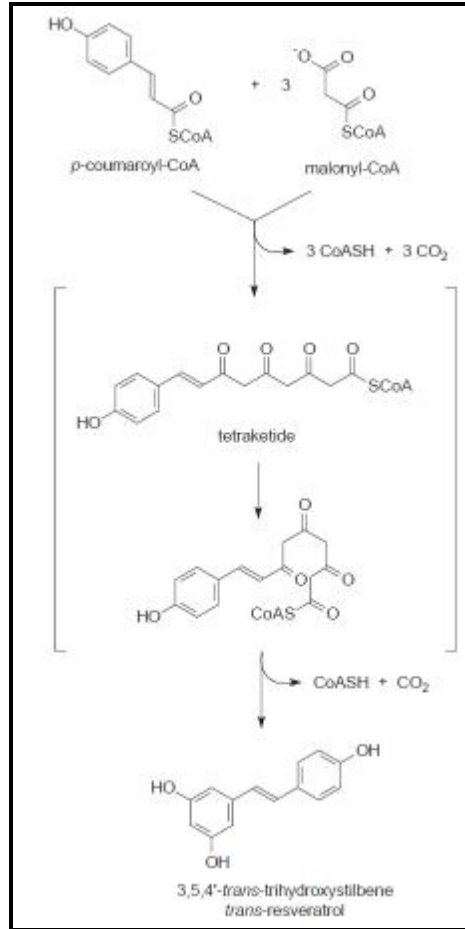
Şekil 4: Resveratrolün kimyasal yapısı (7).

Resveratrol, kırmızı duttan sarıçama kadar birçok bitkide bulunur. Bunlar; *Vitis vinifera* (asma), *Polygonum cuspidatum* (sivri uçlu çoban değneği), *Bauhinea* türleri, *Ladin* türleri,

Pinus sylvestris (sarıçam), *Veratrum grandiflorum* (çöpleme), Ökalyptus, *Pistacia vera* (Antep fıstığı), *Arachis hypogea* (yer fıstığı), *Morus rubra* (kırmızı dut), *Artocarpus* (ekmek ağacı) türleri, *Vaccinum* türleri, *Rheum rhaponticum* (Isgın), *Veratrum* türleri, *Cassia* türleri, *Gnetum montanum*'dur. Ancak en çok üzüm kabuğunda (50-100 µg/g) ve yer fıstığında (0.02-1.79 µg/g) bulunur. Kırmızı şaraptaki RES miktarı yaklaşık 1-10 mg/l'tir. Beyaz şarap genel olarak kırmızı şarapta bulunan RES'in % 1-5'i kadar RES içerir (55,56).

3.6.1 Resveratrolün Biyosentezi

Resveratrol sentezi yapısal değil indüklenebilirdir. Stres, travma, enfeksiyon ya da UV ışığı maruziyetinde stilben sentaz enziminin katalize ettiği bir dizi reaksiyon ile sentezlenir. Resveratrolün biyosentezi p-kumarol- coA'nın, p-kumarol kalıntısı ile malonil-coA'dan 3 adet C-2 alt ünitesinin dekarboksilasyonu ile kondensasyon sonucu oluşur (şekil 6). Daha ileri reaksiyonları resveratrolün bifenolik halkasının 3.pozisyonunda glikozil ya da sülfat kalıntıları ile konjuge olmasıdır (7) .



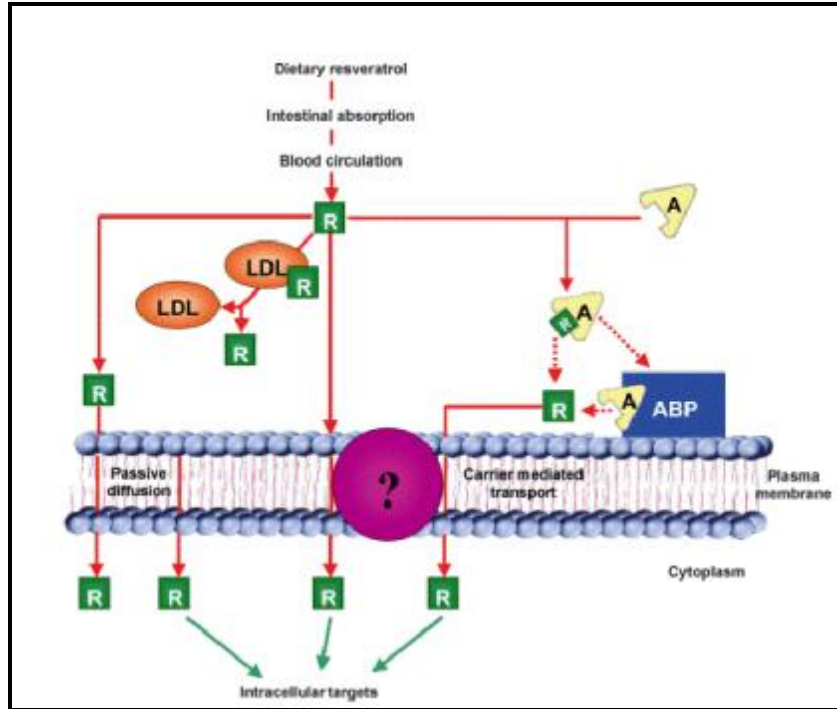
Şekil 5: Resveratrolün biyosentezi (7).

3.6.2 Resveratrolün Emilimi

Resveratrol oral yolla alındıktan sonra çoğunlukla barsaklardan emilir. Büyük kısmı jejunumda, az kısmı ise ileumda emilir ve bir saat gibi kısa bir sürede kana geçer. Karaciğer, böbrek, kalp ve beyin başta olmak üzere çeşitli organlara dağılır. Oral yolla 25 mg verildiğinde en az %70'inin emildiği bildirilmiştir. Resveratrol biyotransformasyonu az miktarda barsaklarda olmaktadır, fakat asıl olarak karaciğer mikrozomlarında biyotransformasyon gerçekleşmektedir (7).

3.6.3 Resveratrolün Dokulara Taşınması

Resveratrolün hidrofilik konjuge hale gelmesi kana geçişini, vücut dağılımını ve ekresyonunu kolaylaştırır. Resveratrolün lipoproteinlere bağlanarak taşındığı bildirilmiş olsa da esas olarak albumine bağlanarak kanda taşınmaktadır. Hepatoblastoma hücreleri üzerinde resveratrolün kinetik karakteri ile ilgili yapılan bir çalışmaya göre RES hücre içine asıl olarak taşıyıcı aracılı geçiş ve pasif difüzyon ile alınmaktadır (57). RES albumine bağlanıp kompleks oluşturduktan sonra albumin, membran reseptörlerince tutulur daha sonrada bu reseptörler tarafından serbest resveratrolün hücre membranına doğru salıverildiği düşünülmektedir (57). Şekil 6 'da resveratrolün dokulara taşınımı gösterilmiştir.



Şekil 6: Resveratrolün kanda taşınması ve hücre içine geçişi (57).

3.6.4 Resveratrolün Hücre İçi Reseptörlere Bağlanması

Genistein ve resveratrol gibi fitoöstrojenler, insan östrojenleri ile bazı yapısal benzerlikler göstermektedir ve östrojen reseptörlerine bağlanabilme kapasitesine sahiptir. Resveratrol ile östrojen reseptörleri arasındaki etkileşimi gösteren bazı çalışmalar mevcuttur (57). Resveratrol, östrojenle ilgili genlerin ifadenmesini indüklemek için estradiol ile kombine olduğundan "süperagonist" olarak fonksiyon görmektedir. Resveratrol, meme kanseri hücrelerinde östrojen reseptör agonisti olarak rol oynamaktadır (8).

3.6.5 Resveratrolün Atılımı

Resveratrolün emiliminin hızlı olduğu, dokulara kolay taşındığı ve büyük oranda idrar yolu ile atıldığı gösterilmiştir (57).

Plazmada serbest trans-resveratrol çok az miktarda bulunur ve yarı ömrü kısadır. Atılım zamanı plazmada bulunan resveratrolün konsantrasyonuna bağlıdır. Üretilen ve atılan miktarlar arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır. İdrarda çok düşük miktarda glikolize olmayan resveratrol bulunabilir, onun dışında böbrekte başlıca doğal formda bulunurken, idrarda konjuge formu büyük çoğunluktadır (7).

3.6.6 Resveratrolün Biyolojik Aktiviteleri

Yapılan çalışmalarda resveratrolün birçok dokuda farklı etkileri olduğu ortaya konmuştur. Bu etkiler 4 ana başlık altında toplanabilir (8):

- Vazodilatör etki
- Trombosit agregasyonu inhibisyonu
- Antiinflamatuvar aktivite
- Antioksidan aktivite

3.6.7 Resveratrolün Vazodilatör Etkisi

Damar endotel hücrelerinden salınan nitrik oksit, damar düz kasında kasılma-gevşeme yanıtları üzerine etkisi olduğu bilinmektedir. Resveratrolün de vazodilatör etkisinin, nitrik oksit antagonizması yolu ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ayrıca resveratrolün; damar tonusunu düzenleme, endotel fonksiyonunun devamına etkileri de tespit edilmiştir (58).

3.6.8 Trombosit Agregasyonu İnhibisyonu

Trombositler; yaralanan damarda hasarlı alanın subendotelyal tabakalarına yapışırlar. Yaralanma yüzeyine yayılarak agregasyonu ve trombus oluşumu için yeni trombositlerin toplanmasına katkıda bulunurlar. Bu hasarlanan endotelin normal iyileşme sürecidir. Kanama-pıhtılaşma fonksiyonunun temel hücresi olan trombosit fonksiyonlarının yetersizliği kanamaya, fazlalığı ise tromboza yol açabilir. Trombosit aktivasyon ve agregasyonunun artışı tromboz ve ateroskleroz patogenezinde önemli risk faktörleridir (59). Agregasyonu tetikleyen ajanların trombositlerde hücre içi kalsiyumu arttırdıkları, inhibe edicilerin ise azalttıkları görülmüştür. Resveratrolün trans formu hücre içi kalsiyum miktarını düşürerek agregasyonu engeller. Resveratrolün cis izomerinin ise daha fazla antiagregan olduğunu gösterilmiştir (60).

3.6.9 Antiinflamatuvar Aktivite

Resveratrolün bu aktivitesinin proteazlar, kompleman sistemi, bradikininler, NO, sitokinler, adhezyon molekülleri ve prostaglandinler gibi inflamasyondan sorumlu tutulan maddelerin oluşumunu engelleyerek gösterdiği düşünülmektedir (56). Trans-resveratrolün antioksidan ve antiinflamatuvar etkisinin, immün sistem hücrelerinde inflamatuvar sitokinleri düzenleyerek ortaya koyduğu bilinmektedir (56). İnvitro bir çalışmada trans-resveratrolün doğal öldürücü hücrelerinin sitotoksitesini azalttığı, CD4 ve CD8 T lenfositlerinde de sitokin üretimini düşürdüğü gösterilmiştir (60). Bir başka çalışmada resveratrolün hücrel toksisiteyi azalttığı, lenfosit proliferasyonunu baskıladığı, lenfosit kaynaklı interlökinlerin ve tümör nekroz faktör alfanın (TNF- α) üretimini azalttığı gösterilmiştir (61).

3.6.10 Resveratrolün Antioksidan Aktivitesi

Polifenoller; flavanoidler, antosiyaninler, fenolik asitler, lignanslar ve stilbenleri kapsayan bir antioksidan ailesidir. Resveratrol (3,5,4' trihidroksistilben) stilbenlerin alt grubu olup üzüm, şarap, yer fıstığı ve yaban mersininde bulunan polifenolik bir bileşiktir (56). Resveratrolün doğal antioksidan rolü üç farklı antioksidan mekanizma ile açıklanmaktadır;

- Koenzim Q ile yarışmak ve ROS oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmak,
- Mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak,
- Fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibisyonudur (56).

Birçok çalışmada resveratrolün hem süperoksit hem de hidroksil radikalini yakalama yeteneğinin olduğu gösterilmiştir. Resveratrol biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini de sağlamaktadır (62).

İskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarı, dokuda lipid peroksidasyonunu artırmakta ve peroksi radikaller oluşturmaktadır. Koroner oklüzyonla iskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarının oluşturulduğu bir çalışmada resveratrol, koroner perfüzatta lipid peroksidasyonu göstergesi kabul edilen MDA düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır (63). Resveratrolün bakır şelasyon kapasitesinin yüksek olduğu bilinmektedir. Resveratrolün bakır şelasyon kapasitesinin yüksekliği, antioksidan özelliği ve radikal süpürücü özelliği birbiri ile uyumaktadır (64). Serbest radikallerin DNA hasarı da yaptığı bilinmektedir. Resveratrolün potent hidroksil radikal süpürücü etkisi ile DNA kırılmalarını azalttığı ortaya konmuştur. Düşük dansiteli lipoproteinlerin peroksidasyonunun resveratrol tarafından belirgin olarak azaltıldığı gösterilmiştir (65).

Resveratrolün sayılan etkilerinin yanında çeşitli hücresel ve moleküler etkileri de vardır. Yapılan çalışmalarda trans-resveratrol, dietilstilbesterol ve östradiol yapısal benzerliklerinden ve resveratrolün fitoöstrojen olarak sınıflanmasını sağlayan östrojen yanıt sistemini düzenlemesinden bahsedilmektedir (9). Östrojen kadın hormonu olarak bilinse de erkek üreme sisteminde de nöroendokrin feedback ile kontrol edilerek testisten ve androjenlerden lokal aromatzasyonla üretilmektedir. Bu üretim testisin parakrin fonksiyonu dahilinde gerçekleşir (66). Bu bilgiler ışığında yapılmış bir çalışmada yapısal olarak östrojenlere benzeyen trans-resveratrolün yetişkin sıçanlarda spermatogenez ve testis üzerine tedavi edici etkisi araştırılmış ve oral resveratrol tedavisi ile sıçanlarda spermatozoa üretiminde artış görülmüş ve herhangi bir yan etkiye rastlanmamıştır (10).

3.7 Arsenik

Arsenik 'As' simgesi ile gösterilen azot ailesinden metalloid özellik gösteren bir element olup, yeryüzünde yaygın olarak bulunan bir kimyasaldır. Arsenik; çevrede bitki ve hayvanlarda, toprakta ve atmosferde doğal olarak bulunur (1).

Arsenik temel olarak pestisit üretiminde, herbisit üretiminde, gıda katkı maddelerinde, cam, fişek ve bazı lazer ekipmanların üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca As-72, As-74 ve As-76 gibi radyoaktif izotopları tıpta tanı yöntemlerinde kullanılır. Arsenik bileşikleri

özellikle cilde, göze, solunum yollarına iritan etki gösterdiğinden savaş gazı olarak da kullanılmıştır (1).

Arsenik iki oksidasyon durumunda bulunabilir; trivalent form (As_2O_3 ; As III) ve pentavalent form (As_2O_5 ; As V). Doğada en çok bulunan formu, inorganik arseniklerden arsenik trioksittir. As III, As V'den 60 kat daha fazla toksiktir. Organik arsenik toksik özellik göstermezken, inorganik arsenik oldukça toksiktir. Özellikle (+5) değerlikli bileşikleri toprakta diğer arsenik türlerine oranla daha fazla bulunur. Topraktaki organik maddelere bağlı olarak da bulunan arsenik, organik maddelerin okside olmasıyla suya ve oradan bitkilere geçer.

Doğal su kaynakları ve denizlerde değişen oranlarda arsenik bulunmaktadır. Kapalı ortamlar içinse en önemli arsenik kaynağı sigara dumanıdır. Tahıllarda, pirinçte ve diğer birçok yiyecekte inorganik arsenik bulunur. Yiyeceklerle alınan arseniğin yaklaşık olarak %20'si inorganik arseniktir. Diğer bir değişle bir yetişkinin aldığı toplam organik arseniğin %80'i normal şartlarla besinlerle alınır (67).

Arsenik vücuda içme suyu, gıdalar ve solunum yoluyla alınmakla birlikte en büyük maruziyet kaynağı içme sularıdır. Kokusuz ve renksiz olan arsenik; gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve parenteral yollardan absorbe olur. İnorganik arseniğin gastrointestinal absorpsiyon hızı çok yüksektir. En fazla absorpsiyon ince barsakta gerçekleşmektedir. Sütteki kazein, absorpsiyonu azaltır. Solunum yoluyla alınan arsenik %80 sistemik absorpsiyonla sonuçlanır. Arseniğin cilt tarafından sistemik absorpsiyonu çok fazla değildir. Akut alımda en fazla dağılım karaciğer ve böbrekte olur, daha sonra ise sırayı beyin alır. Ufak dozda kronik maruziyette sistemin içeren proteinlerce zengin olan saç, tırnak ve ciltte birikir. Kronik birikme akciğerde olur. Ayrıca arsenik, plasentayı kolayca geçerek fetusta birikebilir (67).

Arsenik, hemoglobine bağlanarak kanda taşınır. Plazma proteinlerine zayıf bir şekilde bağlanır, kırmızı kan hücreleri içinde parçalanabilir ve hücre içi proteinlere bağlanabilir. Atılımı başlıca idrarla olmaktadır. İdrardaki total arsenik konsantrasyonu genellikle yakın zamanda arseniğe maruziyetin bir göstergesidir (1).

Absorbe olan organik ve inorganik arseniğin kandaki yarılanma ömrü çok kısadır. İnorganik arseniğin yarı ömrü insanlarda dört gündür. Saç ve tırnak, vücudun diğer dokularıyla kıyaslandığında arsenik konsantrasyonunun en yüksek olduğu bölgelerdir. Bunun nedeni bu bölgelerin trivalent arsenikle kolayca bağlanabilen sülfidril (SH) grupları içeren keratine zengin olmasıdır (1).

3.7.1 Metabolizma ve Toksikitesi

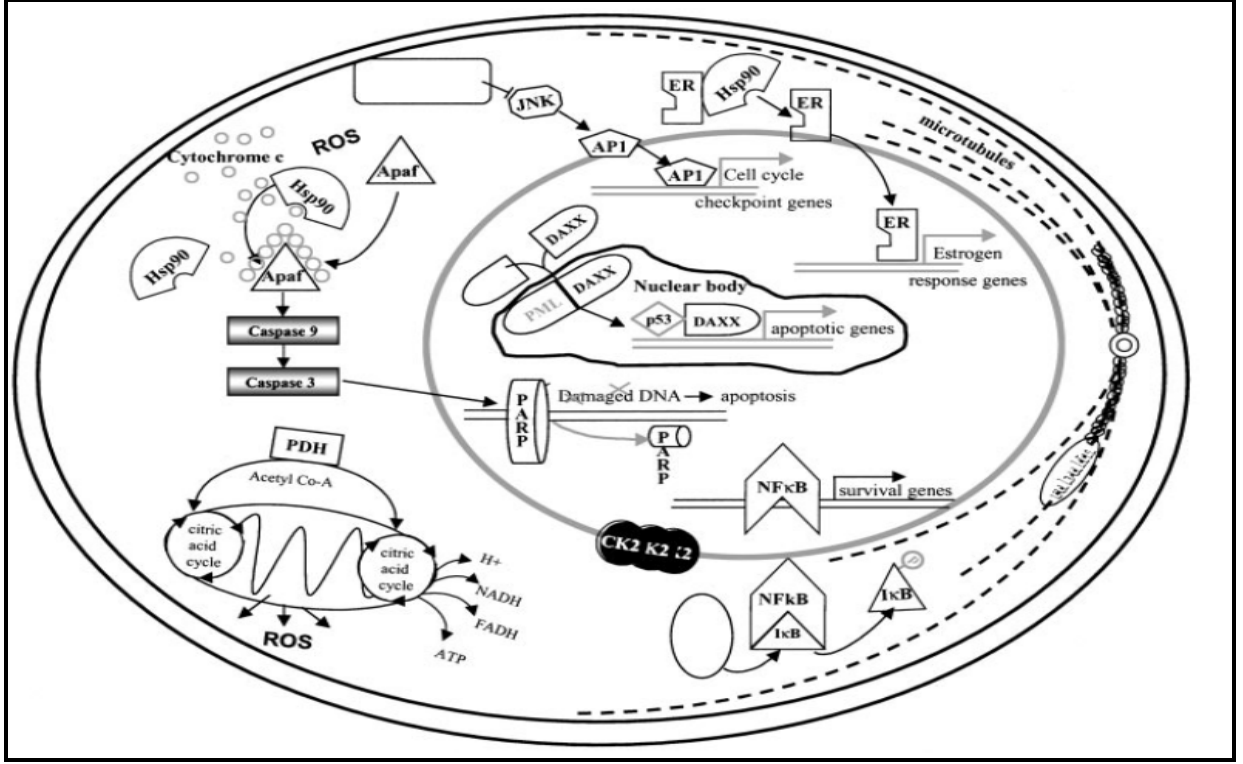
Diğer toksik metaller gibi arseniğin metabolizması da benzer şekilde çalışmaktadır. Potansiyel toksik formları daha az toksik forma dönüştürmek, depolamak ya da hücreden atılımını sağlamak esastır. Oldukça reaktif olan inorganik arsenik türleri çevre ve insanlar için potansiyel toksik formlar olduğundan, arseniğin biometilasyonu primer detoksifikasyon mekanizması olarak düşünülmektedir. Detoksifikasyonun ana rotası metilasyon ile belirlenmektedir. Karaciğer metilasyonun olduğu ana organdır, fakat birçok hücrenin arseniği metile etme yeteneğinin olduğu düşünülmektedir (5).

İnorganik arsenik, metil donorü S-adenosylmethionine (SAM) aracılığı ile metiltransferazların katalizlediği tepkimelerle önce monomethylarsonic acide (MMA) daha sonra ise dimethylarsinic acide (DMA) metile edilir. Farklı metil transferazların mono ve dimetilasyon yollarında rol aldığı düşünülmektedir. Arseniğin ana metabolitleri olan MMA ve DMA daha sonra üre ile atılır. Bununla birlikte trivalent formları içerisinde arsenikten daha reaktif olan MMA(III) ve DMA(III) gibi ara metabolitler de ortaya çıkabilir (68).

Arseniğin +3 değerlikli yani trivalent formları en toksik formlarıdır. As III, proteinlerdeki thiol gruplarına bağlanmada yüksek afinite gösterir. Vicinal thiollerle kompleks kurarak, hücrede önemli yollarında görev alan, DNA replikasyon ve tamir mekanizmasında rol alan 200'den fazla enzimi inhibe edebilmektedir. Bağlı durumda olmayan arsenik ise, arseniğin redox döngüsü sırasında reaktif oksijen türleri ve DNA hasarı oluşturarak toksik etki gösterir. As III özellikle karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, gastrointestinal mukoza, keratinden zengin saç , tırnak gibi dokuların proteinlerinin thiol ve sülfidril gruplarına bağlanır (1).

Arsenik bir pro-oksidandır ve lipid peroksidasyonuna, protein ve enzim oksidasyonuna, GSH seviyesinde azalmaya, DNA oksidasyonuna neden olabilmektedir. Ayrıca arsenik, NO gibi reaktif oksijen türleri oluşturmakta ve DNA tamir mekanizması, sinyal iletimi ve apoptoz ile ilişkili olan poly ADP-ribosylation üretimine neden olmaktadır. Sonuç olarak arsenik, DNA kırıklarına ve NAD seviyelerinde azalmaya yol açarak hücreye zarar vermektedir.

Arsenik trioksitin hücredeki etki mekanizması şekilde gösterilmektedir(3).



Şekil 7: Arsenik trioksitin hücredeki hedefleri (3).

4 GEREC VE YÖNTEM

Bu çalışma, arseniğin testiste oluşturduğu hasara karşı resveratrolün koruyucu etkisini incelemek amacı ile deneysel olarak oluşturulmuştur.

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Birimi'nden (DETFAB) temin edilen, Wistar suşu toplam 35 erkek sıçan (200-300gr) kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deneysel Hayvanları Laboratuvarları'nda 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

5 çalışma grubu oluşturuldu. Deneysel grupları aşağıdaki şekilde düzenlendi:

I. grup: Kontrol grubu: Normal ad libidum beslenen grup (n=7).

II. grup: Alkol grubu: Resveratrol alkol ile çözüleceğinden alkolün etkilerini görmek için günlük 1mg/kg alkol verilen grup (n=7).

III. grup: Arsenik grubu : Oral gavage ile günlük 5mg/kg arsenik verilen grup (n=7).

IV. grup: Arsenik + Resveratrol grubu : Oral gavage ile günlük 5mg/kg arsenik verilen ve oral gavage ile günlük 10 mg/kg Resveratrol ile tedavi edilen grup (n=7).

V. grup: Arsenik + Resveratrol grubu : Oral gavage ile günlük 5mg/kg arsenik verilen ve oral gavage ile günlük 20 mg/kg Resveratrol ile tedavi edilen grup (n=7).

Tüm gruplar için deney süresi 28 gün olarak belirlendi. Arseniğin toksik etkisine karşı araştırmacı ve personel için maske ve eldiven kullanıldı. Toksik maddelerin hazırlanması, inhalasyonla zehirlenme riskine karşı çeker ocakta yapıldı. Sakrifikasyondan sonra hayvanlar ve ortaya çıkan atıklar, tıbbi atık torbalarına alınarak, Deneysel Hayvanları Multidisiplin Laboratuvarı tarafından hastanenin imha bölümüne gönderilerek kurallara uygun koşullarda yok edildi.

Tüm bu çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu'nun 74/2008 protokol no'lu 19.09.2008 gün ve 106 sayılı etik kurulu onayı doğrultusunda gerçekleştirildi.

4.1 Arseniğin Hazırlanışı

Arsenik, $\geq 99,0\%$ saflıkta *Sigma Aldrich* (USA)'den temin edildi. Arsenik ve tedavi grupları için belirlenen 5mg/kg'lık arsenik dozu için sıçanların ortalama kiloları hesaplandı. Ortalama 200 gr gelen sıçanlar için orantı hesabı yapılarak, her sıçanın günlük alması gereken arsenik miktarı 1 mg/kg olarak belirlendi. Belirlenen doz 1mL'lik insülin enjektörü ile oral gavage yöntemiyle verileceğinden 1mL'si 1 mg/kg arsenik içerecek şekilde stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyonun tazeliği gözetilerek haftalık solüsyonlar hazırlandı. Stok solüsyon oda sıcaklığında, güneş ışığı almayan bir yerde, toksik etkisine karşı ağzı sıkıca kapalı falcon tüplerde saklandı.

4.2 Resveratrolün Hazırlanışı

Resveratrol, $\geq 98,0\%$ saflıkta *Cayman Chemicals* (USA)'dan temin edildi. Tedavi gruplarına verilecek resveratrol dozunu belirlemek için sıçanların ortalama kiloları hesaplandı. Tedavi grubu için 10mg/kg ve 20mg/kg olmak üzere iki farklı doz seçildi. Seçilen 10mg/kg resveratrol dozu için ortalama 200 gr gelen bir sıçanın günlük alması gereken miktar 2mg/kg olarak belirlendi. Seçilen 20mg/kg resveratrol dozu için ortalama 180 gr gelen bir sıçanın ise günlük alması gereken miktar orantı hesabı yapılarak 3,6 mg/kg olarak belirlendi. Resveratrolün tazeliğini koruması açısından haftalık stok solüsyonlar hazırlanması tercih edildi. Stok solüsyonlar 50 mL'lik falcon tüplerde hazırlandı. 10 mg/kg olan ilk tedavi grubu için ependorf tüp içerisinde 100mg/kg RES tartıldı. Tartılacak doz stok solüsyondan 1mL'lik insülin enjektörü ile çekildiğinde içerisinde günlük alınması gereken 2mg/kg dozu içerecek şekilde belirlendi. Otomatik pipet 250 mL'ye ayarlanarak 1,25 mL %100 saflıkta etanol içerisinde RES çözüldü. Yavaş hareketlerle çözdürülen RES en son vorteksenerek falcon tüp içerisine aktarıldı ve 50mL olacak şekilde üzeri distile su ile tamamlandı. İkinci tedavi grubu içinse 200mg/kg RES ependorf içerisinde tartılarak 1,25mL %100 saflıkta etanol ile çözüldü. Falcon tüpe aktarılarak üzeri distile su ile tamamlandı. Falcon tüpler buzdolabında, ışıktan korunması amacıyla alüminyum folyo ile sarılarak saklandı.

4.3 Doku Örneklerinin Hazırlanışı

Deney süresi biten sıçanların ağırlıkları sakrifikasyondan önce hassas terazi ile tartıldı. Sıçanlar sakrifikasyon için eter anestezisi altına alındı. Ardından testis dokuları çıkarıldı. Sol testis ışık mikroskopik inceleme için, sağ testis ise elektron mikroskopik ve biyokimyasal inceleme için ayrıldı. Işık mikroskopik incelemeler için sol testis %10'luk formaldehite alındı.

Sağ testisin bir kısmı elektron mikroskopik inceleme için %2,5'lik gluteraldehite, diğer kısmı ise biyokimyasal inceleme için PBS (potasyum fosfat buffer) tampon içerisinde ependorf tüplere alındı. Biyokimyasal inceleme için alınan örnekler -80°C'ye kaldırıldı. %10'luk tamponlu formaldehitte 2 gün bekletilen testis dokuları rutin histolojik takip işlemlerinden geçirildi.

4.4 Rutin Işık Mikroskopik Doku Takibi

Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60°C etüvde gerçekleştirildi.

- Ø %70'lik alkol (20 dk.)
- Ø %80'lik alkol (20 dk.)
- Ø %96'lık alkol (20 dk.)
- Ø %96'lık alkol (20 dk.)
- Ø Aseton 1 (20 dk.)
- Ø Aseton 2 (20 dk.)
- Ø Aseton 3 (20 dk.)
- Ø Aseton 4 (20 dk.)
- Ø Ksilol 1 (30 dk)
- Ø Ksilol 2 (30 dk)
- Ø Parafin 1 (1 saat)
- Ø Parafin 2 (1 saat)

Dokular parafine gömüldü. Mikrotom yardımıyla dokulardan lizinli lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerin bir kısmı ışık mikroskopunda incelenmek üzere Hematoksilen Eosin (H&E), Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Masson Trichrome boyası ile, diğer kısmı ise immunohistokimyasal incelemeler için TUNEL ve Caspase 3 yöntemiyle boyandı.

4.4.1 Hematoksilen Eosin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dk 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dk (etüvde), diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Hematoksilen (02475, Convastain, Mayer's Hematoksilen) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika Eozin (01602E,

Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absölü alkolden geçirilen kesitler, şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

4.4.2 Periyodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dk 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dk (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absölü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi. Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 3-5 dakika periyodik asit ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 1-2 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 20-23 dk schiff boyası ile boyandı. Boyamadan sonra kesitler 5 dk akarsuda tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absölü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dk üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

4.4.3 Masson Trichrome Boya Protokolü

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absölü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi. Akarsuda 5 dakika bekletildikten sonra Masson Trichrome boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinden dokular üzerine 8 damla Weigert hematoksilen boyası ile 8 damla ferrik klorür çözeltisi damlatıldı ve 20 dakika bekletildi. Ardından 1 dakika distile su ile yıkandıktan sonra 8 damla asit-alkol çözeltisi ile 1 dakika bekletilen kesitler, distile suyla iyice yıkandı. Ardından 8 damla Ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulandı, 5 dakika sonra uzaklaştırıldı. Daha sonra 1 ml stok asit çözeltisi ve 29 ml distile su ile hazırlanan asitli su ile kısaca yıkandı. 8 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 20 dakika muamele edildikten sonra asitli su ile yıkandı ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyandı. Boyamanın ardından akarsu altında yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilene ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

4.5 Morfometrik İncelemeler

4.5.1 Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

Rutin doku takip işlemlerinin ardından 5 µm kalınlığında alınan kesitler PAS ile boyandı. Her grup için ayrı ayrı 100 tübül değerlendirilerek, her bir tübüle Johnsen testiküler biyopsi skorlaması yapıldı. Yöntemin skor tablosu şekil 8'de gösterilmiştir (69). Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma için One Way ANOVA Bonferroni testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Skor	Histolojik Bulgular
10	Komplet spermatogenez, çok sayıda spermatozoa, düzgün yükseklikte germinal epitel, normal çaplı tübüler lümen.
9	Çok sayıda spermatozoa, disorganize germinal epitel, oblitere tübüler lümen.
8	Tübüler kesit başına 5 ± 10 'dan daha az spermatozoa.
7	Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid, spermatosit ve Spermatotogonia.
6	Spermatozoa yok, 5 ± 20 spermatid, çok sayıda spermatosit ve Spermatotogonia.
5	Spermatozoa ve spermatid yok, çok sayıda spermatosit ve Spermatotogonia.
4	Spermatozoa ve spermatid yok, spermatosit 5'den az, fakat çok sayıda spermatogonia.
3	Sadece spermatogonia.
2	Germinal hücreler yok, sadece Sertoli hücreleri var.
1	Tübüllerde hiç hücre yok.

Şekil 8: Johnsen Testiküler Biyopsi Skor Tablosu.

4.5.2 Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Rutin doku takip işlemlerinin ardından 5 µm kalınlığında alınan kesitler PAS ile boyandı. Seminifer tübül çap ölçümü için oval yada ovale yakın tübüller tercih edildi. Her grup için 100 tübül olacak şekilde rastgele seçilen toplamda 500 tübülde, 20X'lik objektifte UTHSCA Image Tool Version 3.0 programı kullanılarak çap ölçümü yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma için One Way ANOVA Bonferroni testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4.5.3 Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

Rutin doku takip işlemlerinden geçirildikten sonra 5 µm kalınlığında alınan kesitler PAS ile boyandı. Bazal membran ölçümü, her bir gruptan rastgele seçilen 50 tübülde 100X'lik objektif altında UTHSCA Image Tool Version 3.0 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma için One Way ANOVA Bonferroni testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4.6 İmmünohistokimyasal İncelemeler

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için DNA fragmentasyonu immünolojik yöntemle gösterildi. Bu yöntemde biyotinlenmiş nükleotid, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzimini kullanarak DNA'nın 3'-OH ucuna bağlanır. Daha sonra işaretlenmiş streptavidin bu biyotinlenmiş nükleotidlere bağlanır. Bu prosedüre göre fragmente nükleuslar koyu kahverengi olarak boyanır.

4.6.1 TUNEL Protokolü

Bu teknik için *ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection* kiti (Milipore S7101, USA) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dk üçer değişim ksilen ile şeffaflandırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dk bekletildi. Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizildi. Kesitler 15 dk proteinaz K ile inkübe edildi. Ardından 3 kez 5'er dakika tampon solüsyon ile yıkandı. Her yıkamadan sonra doku etrafındaki fazla su kurutma kağıdı ile alındı. Daha sonra kesitler endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %3'lük H₂O₂ ile 10 dk inkübe edildi. Tekrar kesitler tampon solüsyon ile yıkandı. Kesitler 10 dk Equilibration Buffer ile inkübe edildi. Ardından kesitler Tdt enzyme (770 µL reaction buffer+330 µL Tdt enzyme) ile 37°C'de etüvde 1 saat bekletildi. 1 saatin sonunda kesitler working strength stop/wash buffer (100 µL stop wash buffer+3400 µL distile su) ile 10 dk inkübe edildi. Tampon solüsyon ile yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Bunun için 30 µL DAB substratı ve 1470 µL DAB dilution buffer karıştırılarak hazırlandı ve karanlık bir yerde kullanılmadan önce yarım saat dinlenmeye bırakıldı. Kesitler üzerine hazırlanan DAB solüsyonu konup, yaklaşık 4 dk beklendi. Preparatlar distile su ile yıkandı. Lamların üzerine Harris Hematoksilen damlatılıp 10-15 sn beklenerek zemin boyaması yapıldı. Akarsuya alınan kesitler, boyanın fazlası

giderildikten sonra, lamalar kurutulmadan alkol ve ksilen serilerinden geçirilip, entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

4.6.2 Caspase 3 Boya Protokolü

Kesitler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra 30'ar dakika, üçer değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Boyanacak alanın etrafı PapPen ile sınırlandırıldı. Ardından sitrat solüsyonu içinde 600 watta mikrodalgada 6 dakika tutulan kesitler, soğuması için oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika bekletildi. Ardından 3 kez 5'er dakika tampon solüsyon ile yıkandı. Daha sonra, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ uygulandı. Tekrar 3 kez 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat bloklama solüsyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edildi. Primer antikor rat spesifik anti-caspase-3 (1:100; Neomarkers, Fremont, CA) antikoruna bir gece +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoruna (85-9043 Zymed Histostain kit San Francisco, USA) ile 30 dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla Diaminobenzidin (Roche, Germany) kullanılarak görünür hale getirildi. Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dakika yıkanan kesitler alkol ve ksilen serilerinden geçirilip entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

4.7 Biyokimyasal İncelemeler

4.7.1 MDA Düzeylerinin Belirlenmesi

MDA düzeyleri, *BIOXYTECH MDA-586™ Spectrophotometric Assay For Malondialdehyde* kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Yöntemin prensibi, kromojenik reaktif olan N-metil-2-fenilindol (NMPI)'un 45°C'de MDA ile yaptığı reaksiyona dayanmaktadır. Burada bir molekül MDA, 2 molekül NMPI ile reaksiyon vererek 586nm'de maksimum absorban veren stabil bir molekül olan karbosiyenin boyası oluşmaktadır.

- Ø Öncelikle tüm dokuların 100mg olacak şekilde tartımları yapıldı ve miktarın 4 katı hacimde 10mM PBS pH 7,4 (Sigma – Kat No: P4417) tamponu eklendi.

- Ø Homojenizasyon sırasında örnek oksidasyonunu engellemek için homojenatlara son konsantrasyonu 5mM olacak şekilde asetonitril içerisinde çözünmüş Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT) eklendi (4µl BHT / 400µl doku homojenatı).
- Ø Daha sonra her tüpe birer adet paslanmaz çelik bilye konularak Tissue Lyser II (Quiagen) cihazında 25 Hz – 30sn’de homojenize edildi.
- Ø Homojenizasyon sonrası homojenatlar 3000xg ve +4°C’de 10 dakika santrifüj (Heraeus) edildi.
- Ø Analiz için berrak süpernatantlar ayrı tüplere alındı.
- Ø **BCA total protein tayini:** Örnek lizatlarının olabildiğince konsantre olması gerekir, bu nedenle öncelikle homojenattaki protein konsantrasyonu Biçinkoninik asit (BCA) tayin yöntemi ile total protein tayini belirlendi. Yöntemin prensibi, alkali koşullarda protein tarafından Cu^{2+} iyonunun Cu^{1+} iyonuna indirgenmesine ve BCA reaktifi tarafından renk değişimine dayanmaktadır. Protein tayini Pierce BCA kiti (Thermo - 23225) kullanılarak belirlendi.
 - Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA), kör olarak distile su kullanıldı.
 - Öncelikle farklı konsantrasyonlarda (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 µg/ml) BSA standardı hazırlandı.
 - İçerisinde biçinkoninik asit bulunan BCA A Reaktifi ve % 4 bakır sülfat içeren BCA B Reaktifi 50:1 oranında karıştırılarak “Working Reagent” hazırlandı.
 - Örnekler 150 kat seyreltildi.
 - 96 kuyucuklu bir mikroplağa standart ve seyreltilmiş örneklerden 25’er µl eklendi.
 - Her kuyucuğa 200 µl “Working Reagent” eklendi.
 - 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
 - ELISA okuyucuda (Bio-Tek) 562 nm’de örnek ve standartların absorbands değerleri okundu.
 - Elde edilen absorbands verilerine karşı standart konsantrasyonu grafiği çizildi ve bu standart grafiğinden yararlanılarak örneklerin total protein konsantrasyonu hesaplandı. Tüm örneklerin total protein konsantrasyonları 15-60 mg/ml içermesi nedeniyle lizatların MDA tayini için uygun olduğu belirlendi.
- Ø Protein tayininden sonra şekil 9’da gösterildiği gibi farklı konsantrasyonlarda seri standartlar hazırlandı. Burada 20µM Tetramethoxypropane (TOMP) stok çözeltisi, MDA standardı olarak kullanıldı.

20µM stok TOMP standard hacmi (µl)	0	25	50	100	150	200
dH₂O hacmi (µl)	200	175	150	100	50	0
Son Konsantrasyonu (µM)	0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0

Şekil 9: MDA standartlarının hazırlanması.

- Ø Her tüpe 200µl örnek süpernatantları ve standartlar konuldu.
- Ø Daha sonra her tüpe 10µl probucol ve 650µl R1 reaktifi (NMPI) eklendi
- Ø Tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı.
- Ø Her tüpe 150µl R2 reaktifi (Konsantre HCl) eklendi.
- Ø Tüplerin kapakları iyice kapatılarak vorteks ile iyice karışması sağlandı.
- Ø Daha sonra tüpler 45°C’de 60 dakika su banyosunda inkübe edildi.
- Ø İnkübasyon sonrası tüpler 3000xg’de 10 dakika salınlı santrifüj cihazında (Heraeus) santrifüj edilerek berrak süpernatant elde edilmesi sağlandı.
- Ø Berrak üst faz küvete aktarılarak spektrofotometre cihazında (PG – T80) 586nm’de absorbans ölçümü yapıldı.
- Ø Standartların absorbans değerlerinden standart grafiği çizildi ve örneklerin MDA konsantrasyonu standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.

4.7.2 GSH (indirgenmiş glutatyon) Düzeylerinin Belirlenmesi

Glutatyon (GSH) düzeyleri, *CAYMAN Glutathione Assay* kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Yöntemin prensibi, GSH’ın sülfidril grubunun 5,5’-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyon vermesi ve sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşturmasına dayanmaktadır. Burada GSH ve TNB arasında oluşan disülfid karması glutatyon redüktaz tarafından indirgenir ve tekrar GSH ve daha fazla TNB oluşur. TNB oluşumunun oranı, örnekteki GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. TNB’nin 405nm’de absorbasının ölçülmesi ile örnekteki GSH değeri belirlenir.

- Ø Öncelikle tüm dokuların 50mg olacak şekilde tartımları yapıldı ve miktarın 4 katı hacimde MES tamponu (0,2M 2-(N- morfolino) etansülfonik asit, 0,05 M fosfat ve 1mM EDTA pH 6,0) eklendi.

- Ø Daha sonra her tüpe birer adet paslanmaz çelik bilye konularak Tissue Lyser II (Quiagen) cihazında 25 Hz – 30sn’de homojenize edildi.
- Ø Homojenizasyon sonrası homojenatlar 10.000xg ve +4°C’de 15 dakika santrifüj (Heraeus) edildi.
- Ø Analiz için berrak süpernatantlar ayrı tüplere alındı.
- Ø Süpernatantlardaki proteinlere ait sülfidril grupların girişim yapmasını engellemek amacıyla örneklerin deproteinizasyonu yapıldı. Bunun için 1:1 oranında süpernatantlara metafosforik asit (MPA) eklendi ve vorteks ile iyice karışması sağlandı. Ardından 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2.000g’de 2 dakika santrifüj (Heraeus) edildi. Dikkatlice üst faz alındı ve ayrı bir tüpe konuldu ve 1ml süpernatant başına 50µl 4M trietanolamin (TEAM) konuldu ve hemen vortekslendi.
- Ø Deproteinizasyon işleminin ardından GSH’a ait standart grafiğini hazırlayabilmek için 50µM GSH (Sigma - G6529) stok standart çözeltisi hazırlandı ve bu stok çözelti kullanılarak şekil 10’da gösterildiği gibi farklı konsantrasyonlarda seri standartlar hazırlandı.

Standartlar	50µM Stok GSH Hacmi (µl)	MES Tamponu Hacmi (µl)	GSH Konsantrasyonu (µM)
A	0	500	0
B	5	495	0,5
C	10	490	1,0
D	20	480	2,0
E	40	460	4,0
F	80	420	8,0
G	120	380	12,0
H	160	340	16,0

Şekil 10: GSH standartlarının hazırlanması.

- Ø Her örnek ayrıca 50 kat seyreltildi.
- Ø 96 kuyucuklu bir mikroyuvarla seyreltilmiş örnek ve standartlardan 50µl konuldu ve plağın üstü kapatıldı.

- Ø Daha sonra bir tüpe Assay Cocktail hazırlandı. Bunun için; 11,25ml MES tamponu, 0,45ml Cofactor Mixture, 2,1ml Enzyme Mixture, 2,3ml distile su ve 0,45ml DTNB çözeltileri bir tüp içerisinde karıştırıldı.
- Ø Hazırlanan Assay Cocktail'den tüm kuyucuklara çok kanallı pipet yardımı ile 150µl eklendi.
- Ø Plağın kapağı kapatılarak bir mikropalak karıştırıcıya (Labnet- Vortemp56) yerleştirildi ve mikropalak okuyucu (Elx800 – Biotek Instrument) yardımı 405nm'de ile her 5 dakikada bir olmak üzere toplam dört absorbans ölçümü yapıldı.
- Ø Alınan dört absorbans ölçümün ortalamaları alındı ve standartların ortalama absorbans değerlerinden standart grafiği çizildi ve örneklerin ortalama absorbans değerleri ile GSH konsantrasyonu standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.

4.8 Ultrastrüktürel İncelemeler

4.8.1 Elektron Mikroskopik Doku Takibi

- Ø Diseksiyon ile testis dokusundan 1 mm³ parçalar alınarak %2,5 fosfat tamponlu glutraldehit içerisinde fiksasyon yapıldı.
- Ø Örnekler Sorenson fosfat buffer ile 3–4 kez değiştirilerek 15–20 dakika yıkandı. (Glutaraldehit şişelerinden boşaltılıp üzerine tampon solüsyonu konur).
- Ø Örnekler 1 kısım PBS + 1 kısım osmium tetroksit (OsO₄) solüsyonu karışımında 1 saat bekletildi. Ependorf tüplerin içine 500 µl OsO₄ + 500 µl tampon konuldu. (Bu işlem her şişe için otomatik pipet kullanılarak yapılır.) Tüpler alüminyum folyo ile kapatılıp oda sıcaklığında 1 saat karanlık ortamda bekletildi.
- Ø Örnekler PBS ile 15–20 dakika yıkandı. (Üç küçük beher içine PBS konulur. OsO₄'ten çıkan parçalar çalkalanır. Çıkan parçalar kurutma kağıdında süzdürülüp en son içinde tampon olan ependorf tüpe konur.)
- Ø Dehidratasyon İşlemi
 - % 70 Alkol10 dakika
 - %100 (Absolu) Alkol.....10 dakika
 - %100 (Absolu) Alkol.....10 dakika
 - Propilen oksit (Merck®)...15 dakika
 - Propilen oksit (Merck®)...15 dakika

Ø İnfiltrasyon işlemleri

- Dokular kurumayacak şekilde 1:1 oranında hazırlanan propilen oksit + araldit karışımına alındı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
 - Arada hafif hareketlerle karıştırıldı.
 - Araldite CY212 Resin (TAAB®) ve DDSA (dodecenyl succinic anhydride TAAB®) 1:1 oranında karıştırıldı, her şişeye 2 mL konuldu. Dokular yeni araldite karışımında yaklaşık 6-12 saat bekletildi.
 - Araldite CY212 Resin (TAAB®) ve DDSA (TAAB®) 1:1 oranında hazırlanan bu yeni karışıma (gömülecek materyal sayısına göre hesaplanarak) BDMA (Benzyl Dimethylamine TAAB®) ilave edilerek gömme materyali hazırlandı. Bu karışım içine gömülen dokular 60°C'lik etüvde 48 saat polimerize edildi.
- Ø Daha sonra 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alınarak, toluidin mavisiyle boyanıp alan belirlendi.
- Ø Belirlenen alanlardan ince kesitler formuvar kaplı gridler üzerine alındı.
- Ø Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlaması yapıldı ve transmisyon elektron mikroskopunda (Carl Zeiss Libra 120) değerlendirildi.

4.9 Veri Değerlendirme

Çalışma sürecinde elde edilen parametrik veriler değerlendirilirken, istatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Değerlendirmede ortalama, standart sapma, ANOVA varyans analizi, LSD testi kullanıldı.

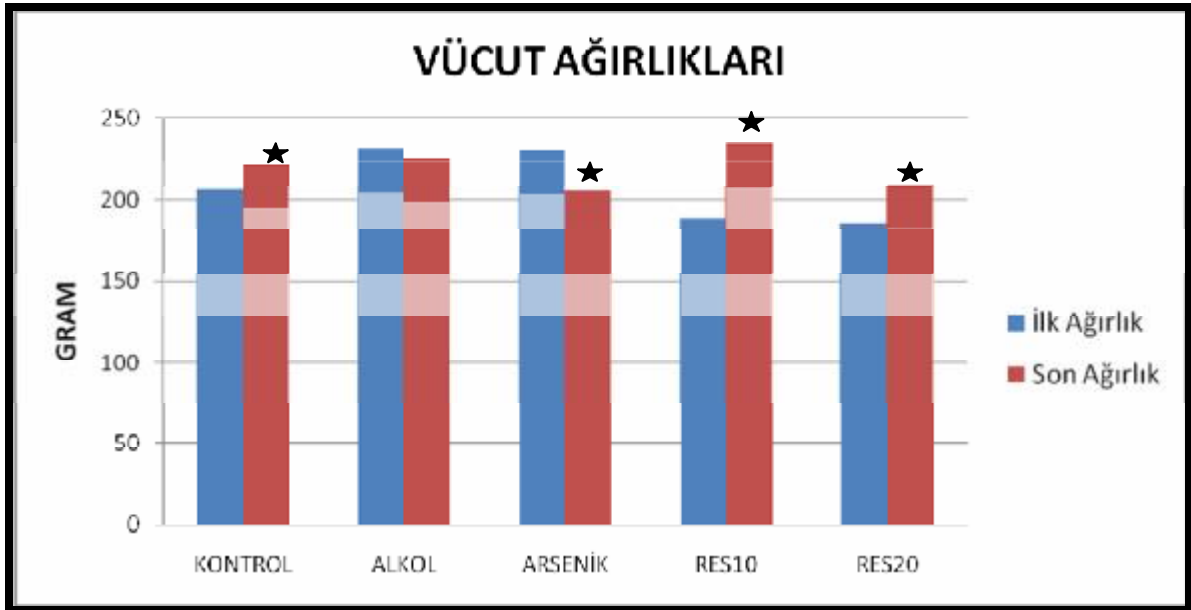
Nonparametrik verilerden olan hayvan ağırlıkları değerlendirilirken, deney başlangıcında ve deney sonunda (sakrifikasyon öncesi) hayvanların ağırlıkları ölçüldü. Sonuçlar SPSS 15.0 programında Wilcoxon Signed Ranks testi kullanılarak değerlendirildi.

Morfometrik verilerde ise Bonferroni testi kullanıldı. Çalışma sürecinde elde edilen tüm verilerin değerlendirilmesinde $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5 BULGULAR

5.1 Hayvan Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney başlangıcında ve deney sonunda (sacrifikasyondan önce) hayvanların ağırlıkları ölçüldü. Başlangıç ve son ağırlıklar şekil 11'de gösterilmektedir. Deney sonunda kontrol ve tedavi grupları hayvan ağırlıklarında anlamlı olarak artış bulundu ($p < 0.05$). Arsenik grubunda ise hayvan ağırlıklarında anlamlı olarak azalma gözlemlendi ($p < 0.05$). Alkol grubu hayvan ağırlıklarında ise anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$). Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, arsenik grubu sıçanların ağırlık kaybettikleri görülmektedir. Sonuçlar SPSS 15,0 programında Wilcoxon Signed Ranks Testi kullanılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 11: Başlangıç ve son vücut ağırlıkları

5.2 Işık Mikroskopik Bulgular

5.2.1 Hematoksilen-Eosin Boyama

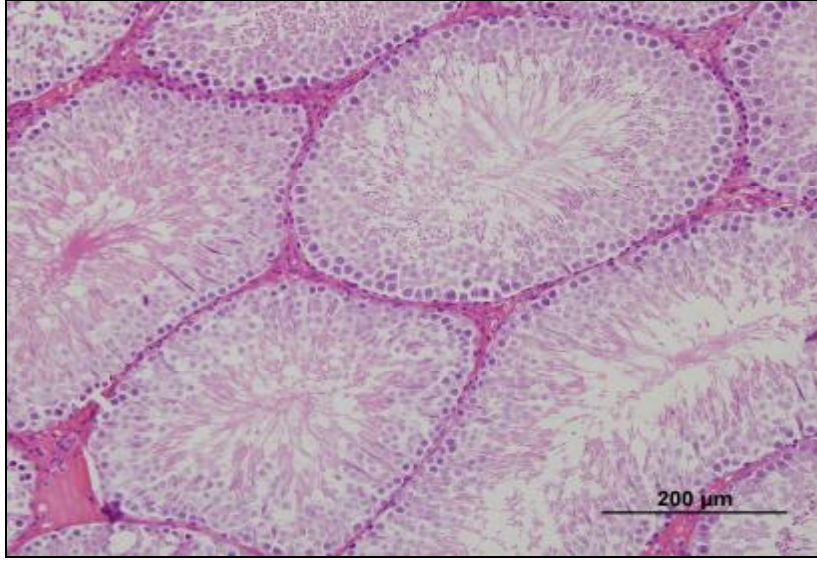
Kontrol grubuna ait testis kesitleri incelendiğinde, seminifer tübül çaplarının birbirine yakın olduğu, germ hücrelerinin seminifer tübülün bazalinden lümenine doğru spermatogonyumdan spermatide kadar düzgün bir biçimde sıralandığı görüldü. Spermatogonyumlar bazal membranın hemen üzerinde yerleşimli, koyu nukleuslu olarak gözlemlendi. Bazal membranın normal kalınlıkta olduğu, interstisyel alanda Leydig hücrelerinin vasküler yapılara yakın yerleşimli olduğu gözlemlendi (Şekil 12).

Alkol grubu testis kesitleri incelendiğinde, birkaç vakuolize olmuş tübül dışında kontrol grubuna yakın testiküler morfoloji gözlemlendi (Şekil 13).

Arsenik grubu testis kesitleri incelendiğinde, kontrol grubuna oranla seminifer tübül lümeninde artış gözlemlendi (Şekil 14). Seminifer tübül epitelinde deplesyon, dejenere olmuş germ hücrelerinin dökülmesiyle nedeniyle tübül lümeninde hücre debrisleri gözlemlendi (Şekil 15). Germ hücrelerinde dejenerasyonla birlikte seminifer tübül epitelinde hücre sırasının bozulduğu, sekonder spermatidlerin kaybı nedeniyle lümeninde hiç spermatozoa olmadığı gözlemlendi.

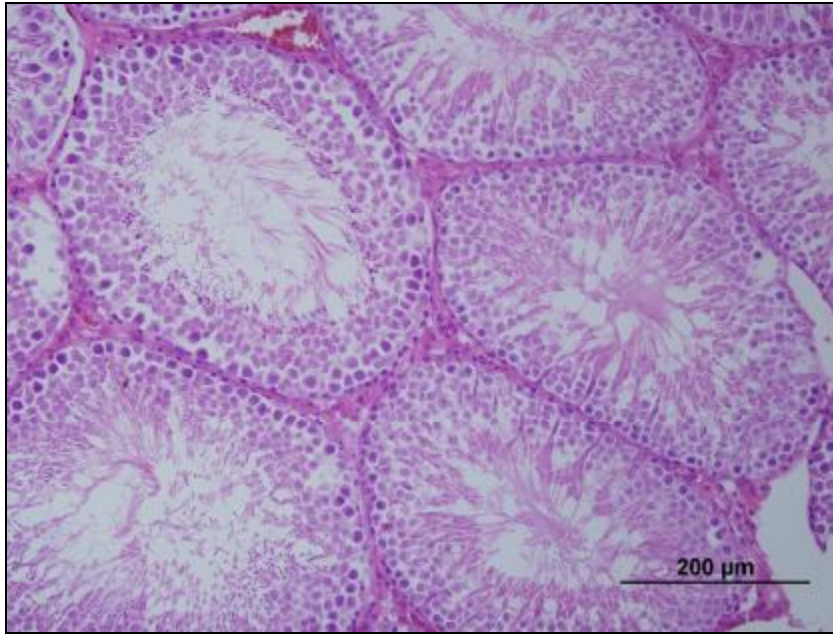
Leydig hücrelerinde azalmaya bağlı olarak interstisyel alanda bağ doku artışı tespit edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tübül çaplarının birbirinden farklı olduğu, düzgün oval şekillerini kaybedip irregular bir şekil aldığı gözlemlendi (Şekil 16). Ayrıca seminifer tübüllerde atrofi, dilatasyon ve vakuolizasyon gözlemlendi. Atrofik seminifer tübüllerde vakuolize spermatogonik hücreler gözlemlendi (Şekil 17).

Tedavi grupları olan Arsenik+ RES 10mg/kg ve Arsenik+RES 20mg/kg grubu testis kesitleri incelendiğinde, Arsenik+RES 20mg/kg grubuna ait seminifer tübül çaplarının kontrol grubuna göre arttığı, germ hücre dizisinin seminifer tübül bazalinde lümenine doğru düzgün ve eksiksiz sıralandığı, bazal membran kalınlığının kontrol grubuna yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 20,21).



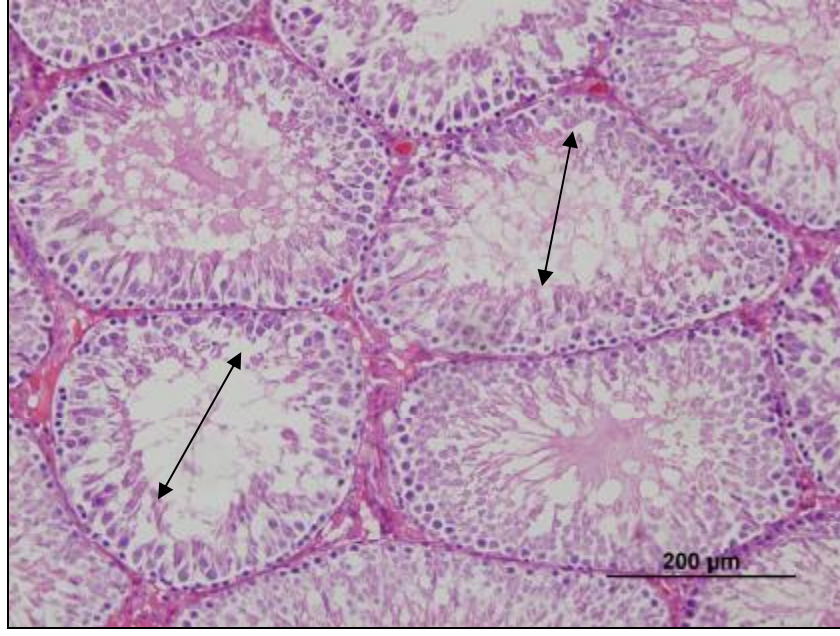
Şekil 12: Kontrol grubuna ait testis kesiti (H&E) X20.

Normal testis morfolojisi gözlenmekte.



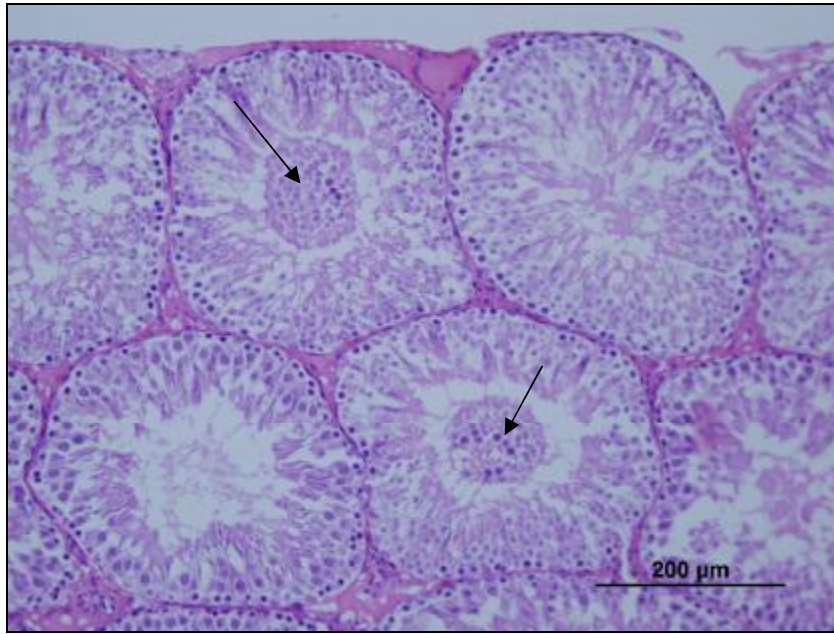
Şekil 13: Alkol grubuna ait testis kesiti (H&E) X20.

Normal testis morfolojisi gözlenmekte.



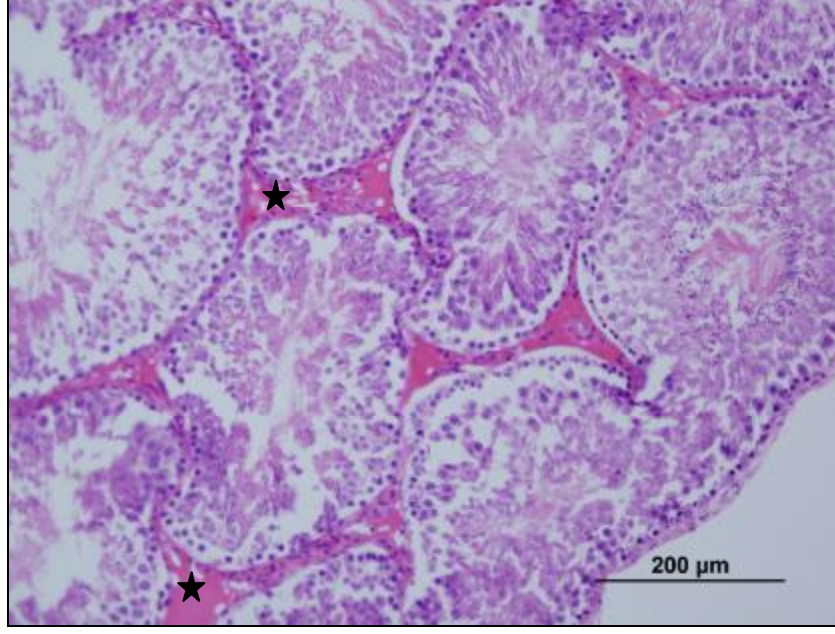
Şekil 14: Arsenik grubuna ait testis kesiti (H&E) X20.

Seminifer tübül lümeninde genişleme (ok), tübül epitel kalınlığında azalma gözlenmektedir. Bu tübüllerin lümeninde olgun spermiumlar gözlenmemektedir.



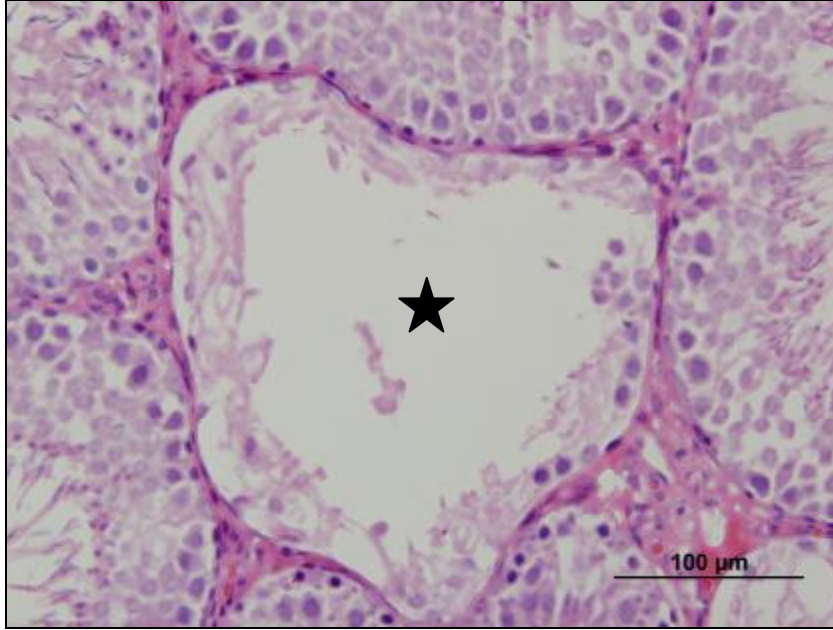
Şekil 15: Arsenik grubuna ait testis kesiti (H&E) X20.

Pek çok tübülün lümeninde, dejenere olan germ hücrelerinin dökülmesiyle oluşan hücre debrisleri gözlenmektedir (ok).



Şekil 16: Arsenik grubuna ait testis kesiti (H&E) X20.

Seminifer tübüller düzgün oval şekillerini kaybedip, irregular bir şekil almış. İnterstisyel alanda bağ doku artışı gözlenmekte (yıldız).



Şekil 17: Arsenik grubuna ait testis kesiti (H&E) X40.

Seminifer tübüllerde atrofi gözlenmekte (yıldız).

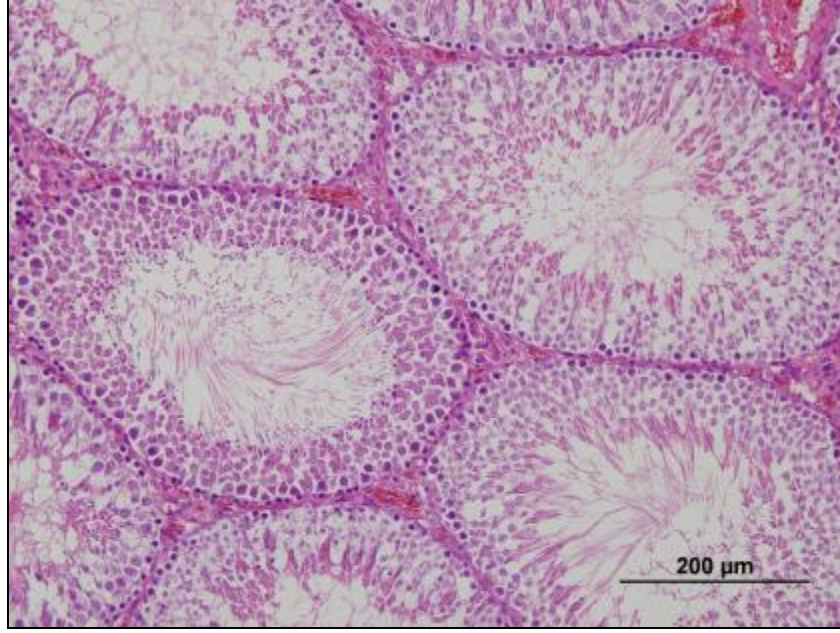


Şekil 18: Ars+RES 10mg/kg grubu testis kesiti (H&E) X20.

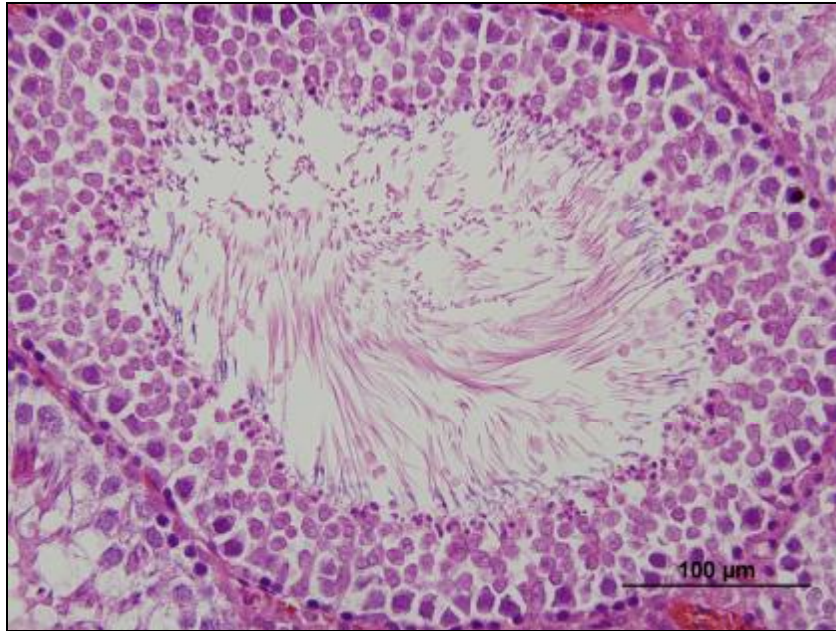
Seminifer tübüller kontrol grubuna yakın morfoloji göstermekte.



Şekil 19: Ars+RES 10mg/kg grubu testis kesiti (H&E) X40.



Şekil 20: Ars+RES 20mg/kg grubu testis kesiti (H&E) X20.



Şekil 21: Ars+RES 20mg/kg grubu testis kesiti (H&E) X40.

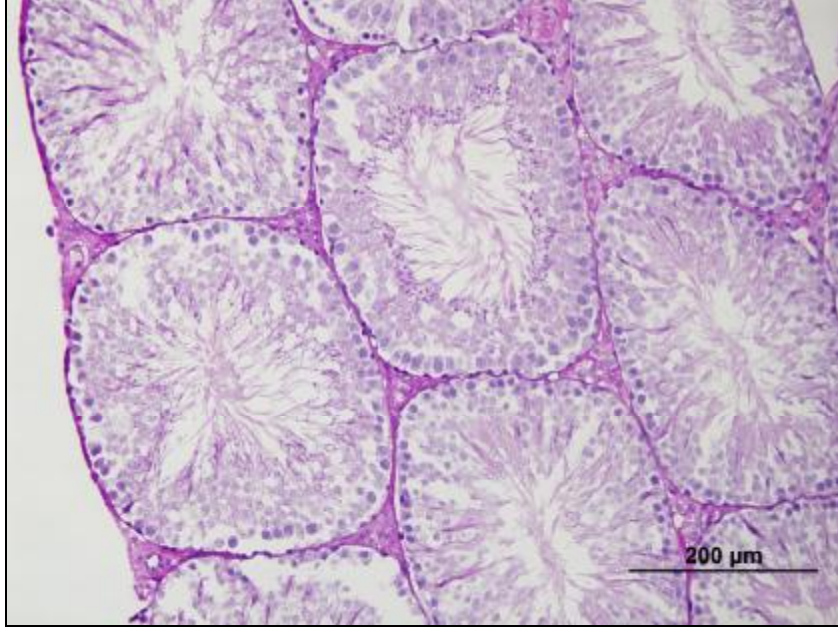
5.2.2 PAS Boyama

Kontrol grubu PAS boyamaları incelendiğinde, bazal membranın normal kalınlıkta olduğu, seminifer tübül çaplarının birbirine yakın ve interstisyel alanda bağ dokunun normal olduğu gözlemlendi (Şekil 23,24).

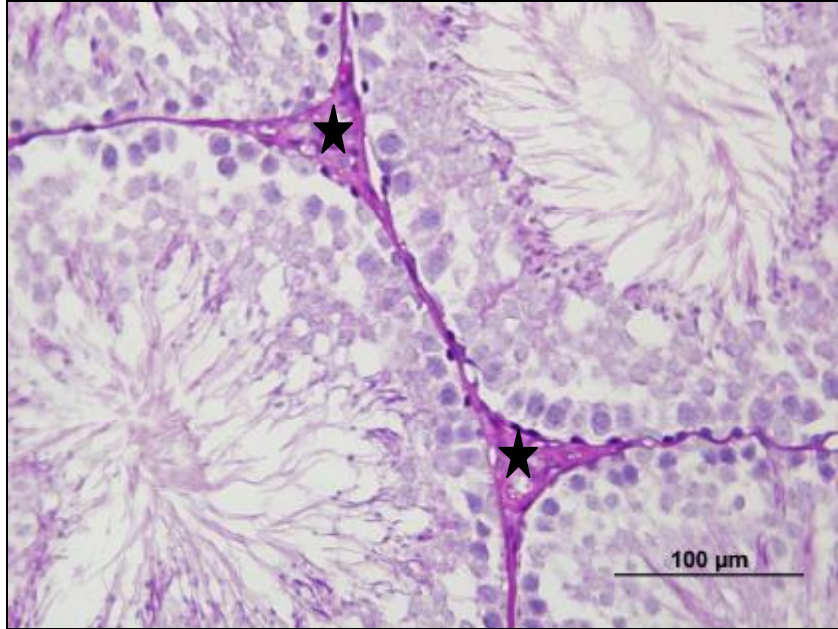
Alkol grubu PAS boyamaları incelendiğinde, birkaç vakuolize olmuş tübül dışında kontrol grubuna yakın testiküler morfoloji gözlemlendi. Bağ doku artışı gözlenmedi (Şekil 26).

Arsenik grubu testis kesitleri incelendiğinde, kontrol grubuna oranla arsenik grubu seminifer tübüllerinin bazal membran kalınlığında artışı, interstisyel alanda bağ doku artışı gözlemlendi (Şekil 29,30).

Resveratrol ile tedavi edilen gruplarda bazal membran kalınlığının kontrol grubuna yakın olduğu gözlemlendi. İnterstisyel alanda bağ doku artışı gözlenmedi. Seminifer tübüller normal testiküler morfolojiye sahipti (Şekil 32,35). Tedavi grupları arasında bazal membran kalınlığı ve testiküler morfoloji açısından bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 22: Kontrol grubuna ait testis kesiti (PAS) X20.



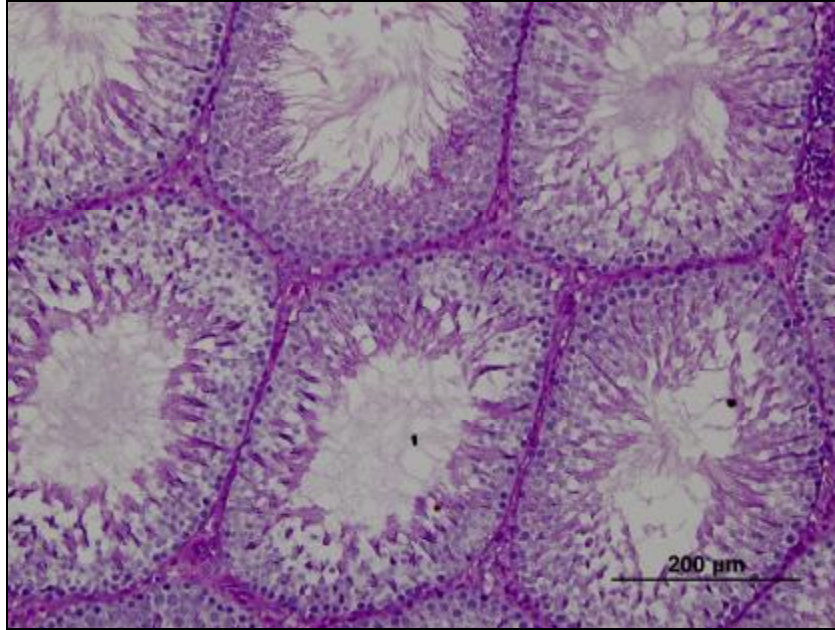
Şekil 23: Kontrol grubuna ait testis kesiti (PAS) X40.

İnterstisyel alanda bağ doku normal görünümde (yıldız).

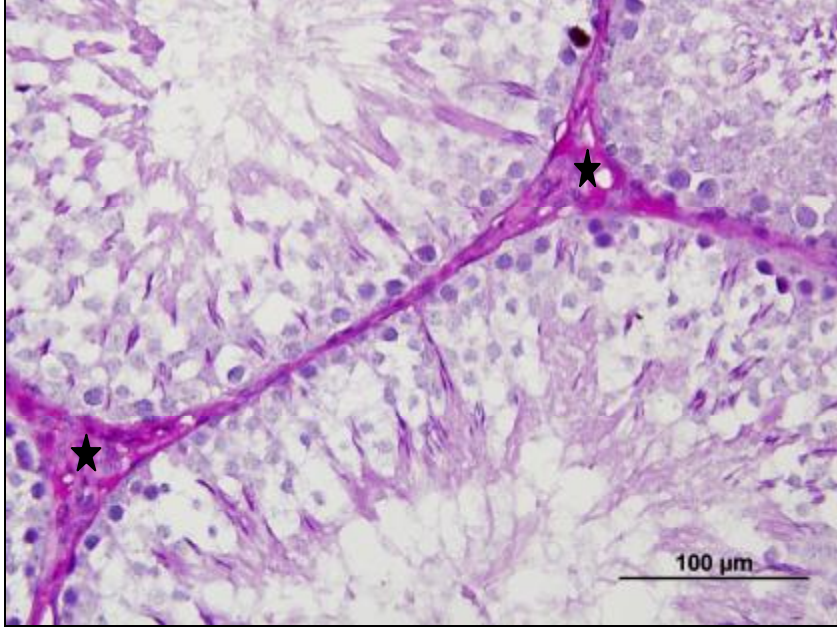


Şekil 24: Kontrol grubuna ait testis kesiti (PAS) X100.

Seminifer tübül bazal membranı normal kalınlıkta (ok).



Şekil 25: Alkol grubuna ait testis kesiti (PAS) X20.



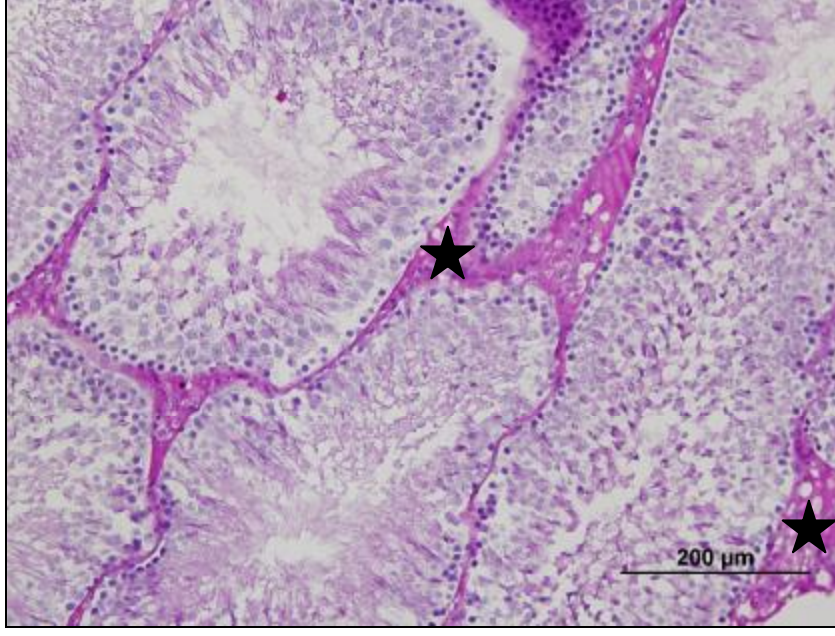
Şekil 26: Alkol grubuna ait testis kesiti (PAS) X40.

İnterstisyel alanda bağ doku normal görünümde (yıldız).



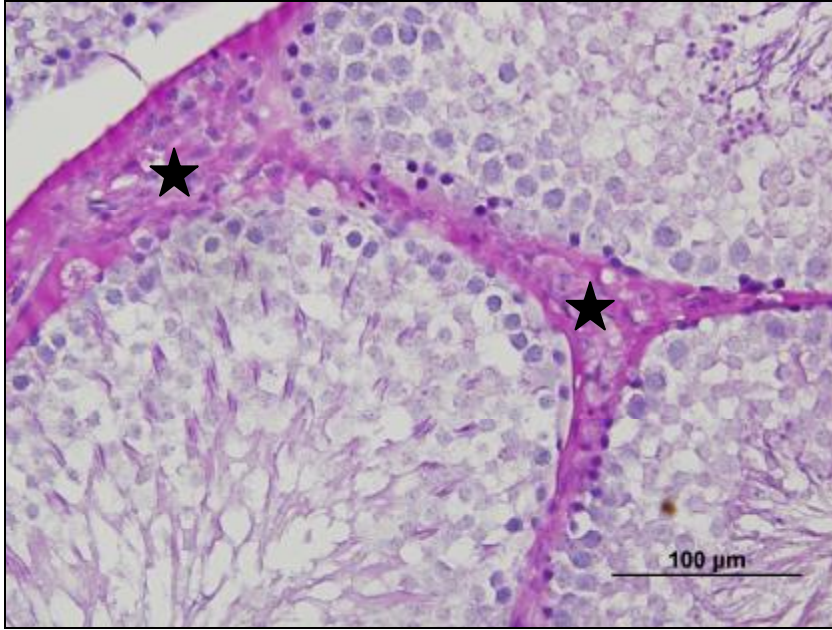
Şekil 27: Alkol grubuna ait testis kesiti (PAS) X100.

Bazal membran kalınlığı kontrol grubuna yakın gözlenmekte (ok).



Şekil 28: Arsenik grubuna ait testis kesiti (PAS) X20.

İnterstisyel alanda bağ doku artışı gözlenmekte (yıldız).



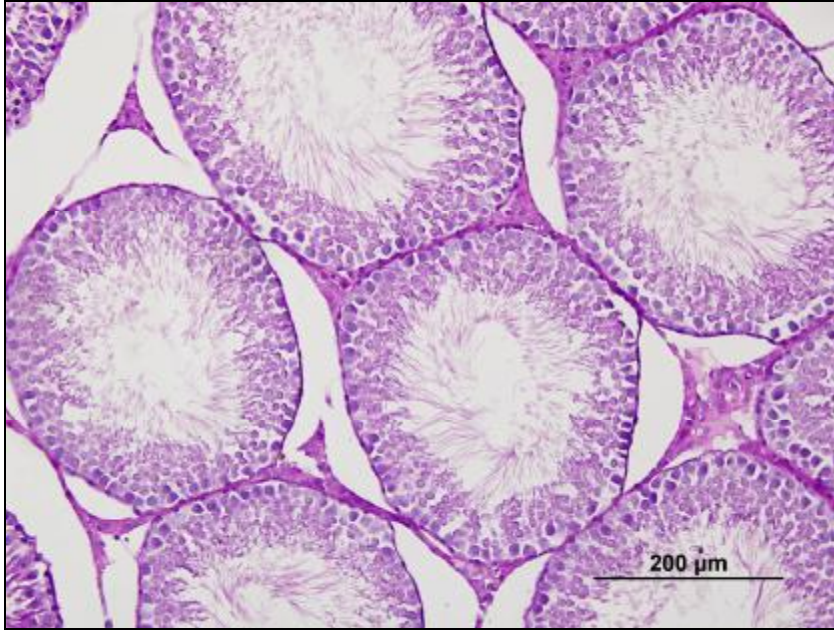
Şekil 29: Arsenik grubuna ait testis kesiti (PAS) X40.

İnterstisyel alanda bağ doku artışı gözlenmekte (yıldız).

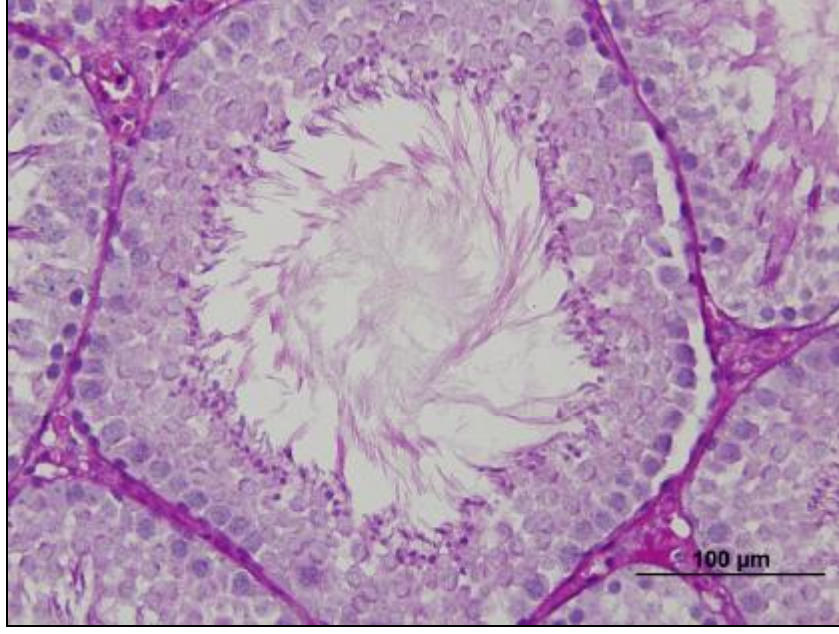


Şekil 30: Arsenik grubuna ait testis kesiti (PAS) X100.

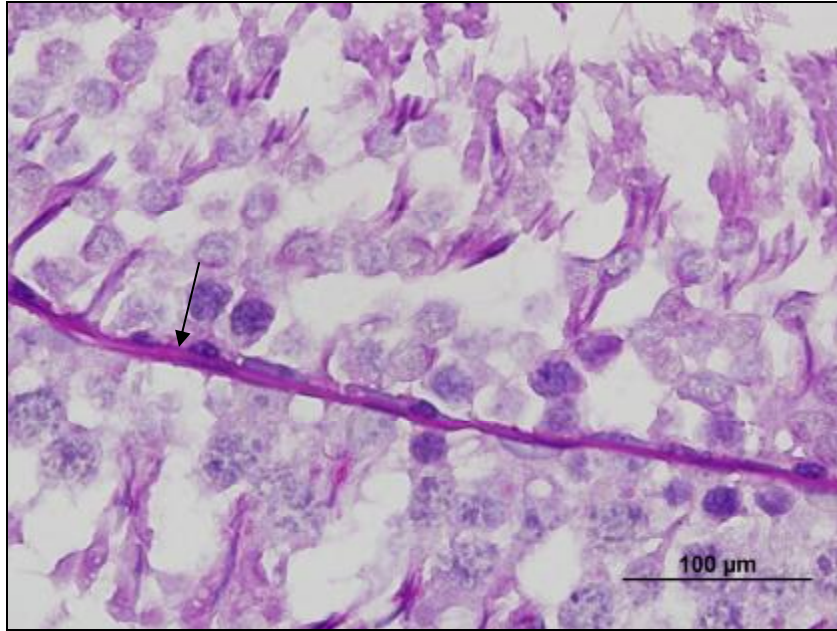
Seminifer tübül bazal membran kalınlığında artış gözlenmekte (ok).



Şekil 31: Ars+RES 10mg/kg grubuna ait testis kesiti (PAS) X20.



Şekil 32: Ars+RES 10mg/kg grubuna ait testis kesiti (PAS) X40.

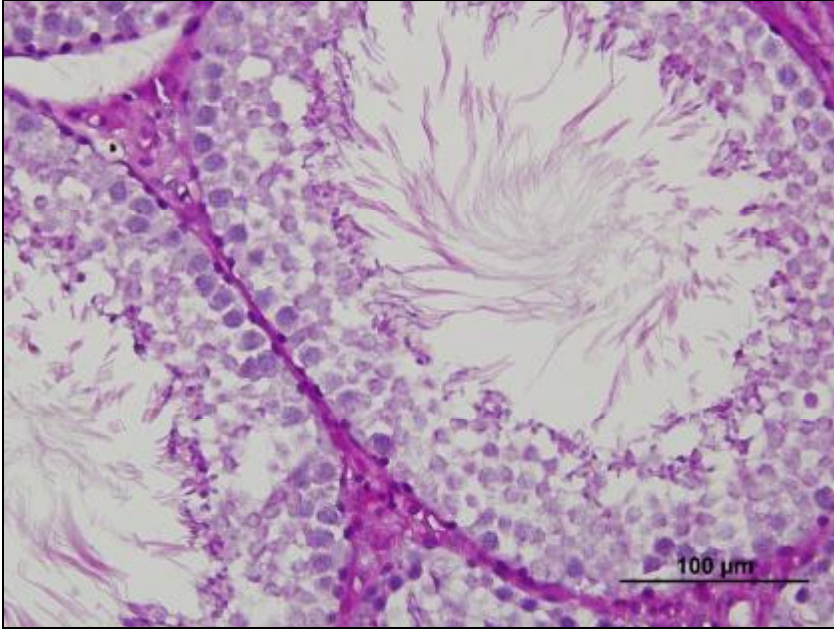


Şekil 33: Ars+RES 10mg/kg grubuna ait testis kesiti (PAS) X100.

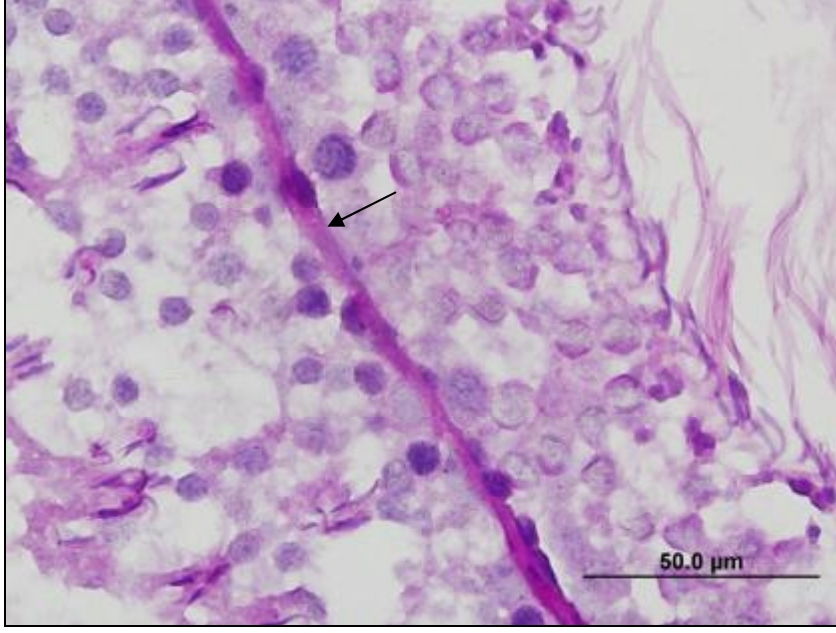
Bazal membran kalınlığı kontrol grubuna yakın gözlenmekte (ok).



Şekil 34: Ars+RES 20mg/kg grubuna ait testis kesiti (PAS) X20.



Şekil 35: Ars+RES 20mg/kg grubuna ait testis kesiti (PAS) X40.



Şekil 36: Ars+RES 20mg/kg grubuna ait testis kesiti (PAS) X100.

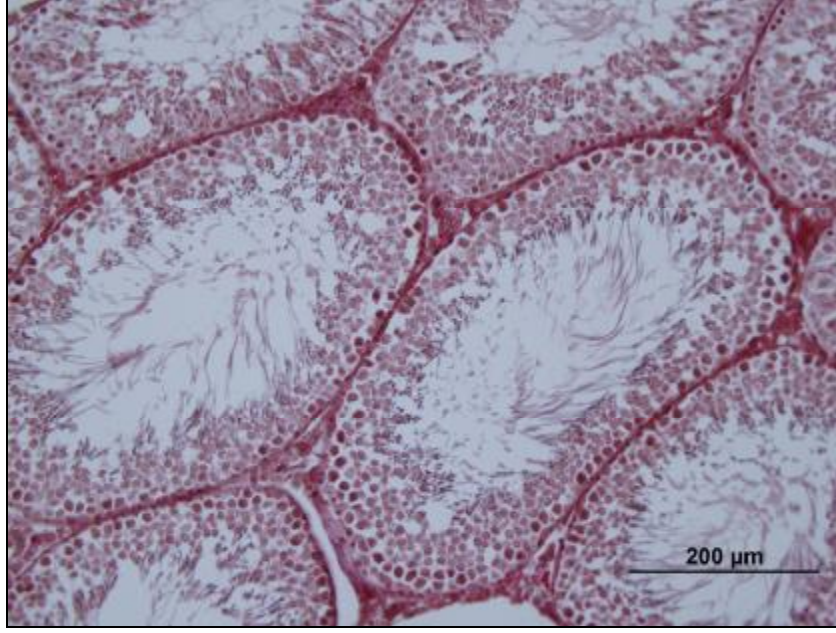
Bazal membran kalınlığı kontrol grubuna yakın gözlenmekte (ok).

5.2.3 *Masson Trichrome Boyama*

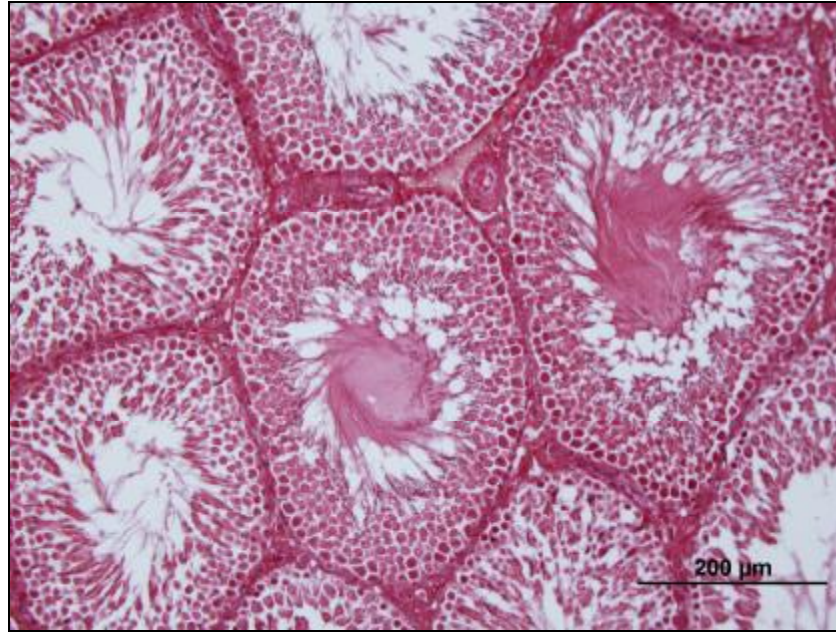
Tüm gruplar için bağ doku artışını görmek amacı ile, PAS metoduna ek olarak üçlü boyama metodu (Masson Trichrome) kullanıldı. Masson Trichrome ile boyanan kontrol grubuna ait testis kesitleri incelendiğinde, interstisyel alanda bağ dokunun normal olduğu gözlemlendi (Şekil 37). Benzer şekilde alkol grubu testis kesitleri incelendiğinde, interstisyel alanda bağ doku artışına rastlanmadı (Şekil 38).

Arsenik grubuna ait kesitler incelendiğinde, interstisyel alanda seminifer tübül bazal membranına yakın yerlerde bağ doku artışının olduğu gözlemlendi (Şekil 39).

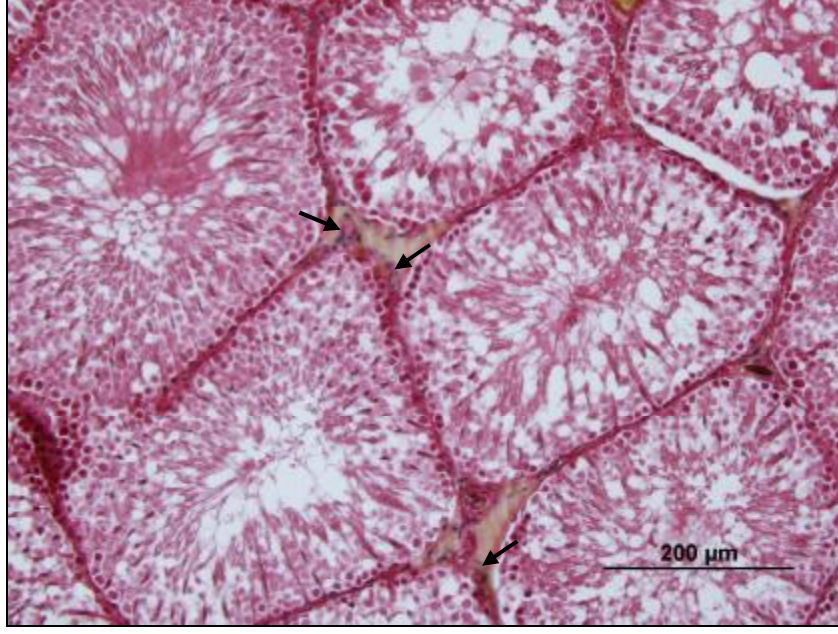
Resveratrol ile tedavi edilen her iki grupta ise bağ doku artışı gözlemlenmedi. Tedavi grupları kontrol grubuna yakın testiküler morfoloji göstermekteydi (Şekil 40,41).



Şekil 37: Kontrol grubuna ait testis kesiti (Masson Trichrome) X20.

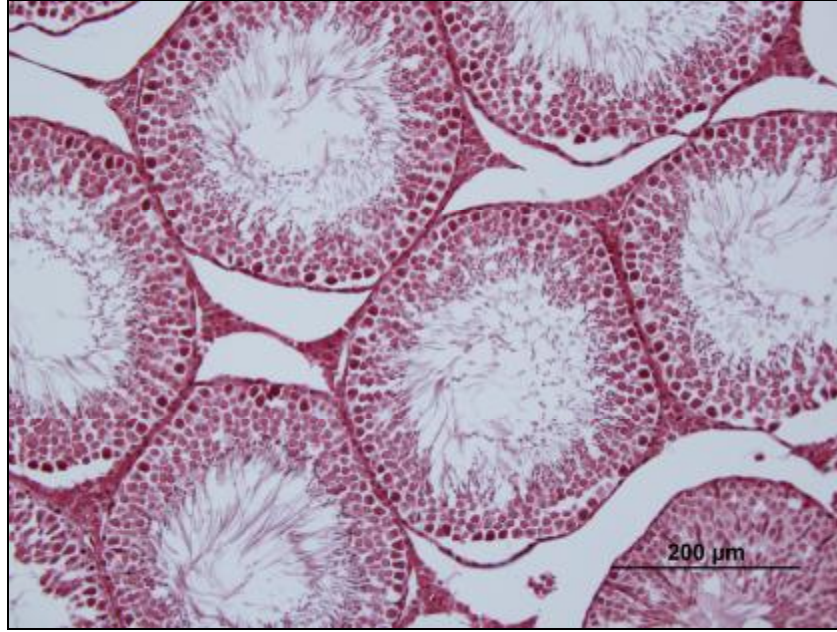


Şekil 38: Alkol grubuna ait testis kesiti (Masson Trichrome) X20.

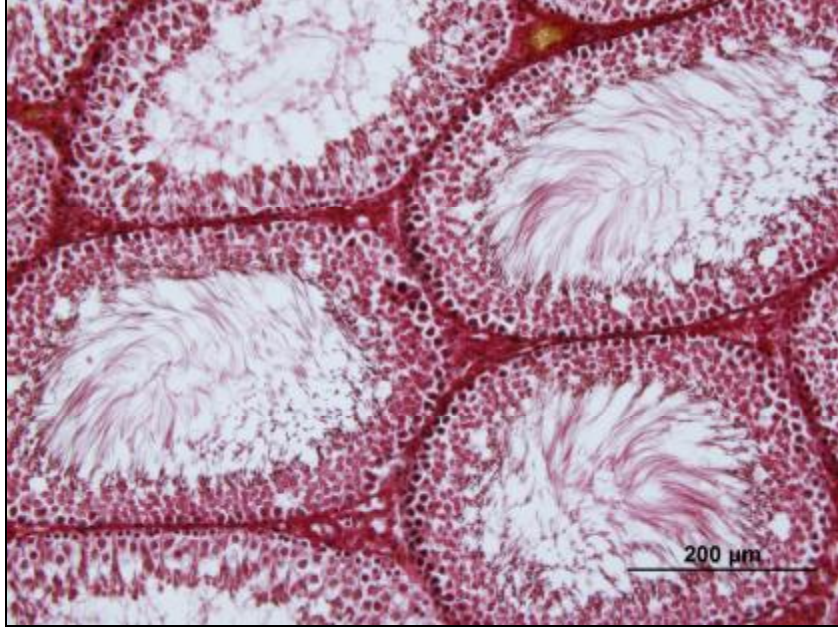


Şekil 39: Arsenik grubuna ait testis kesiti (Masson Trichrome) X20.

İnterstisyel alanda bağ doku artışı gözlenmekte (ok).



Şekil 40: Ars+Res 10 mg/kg grubuna ait testis kesiti (Masson Trichrome) X20.



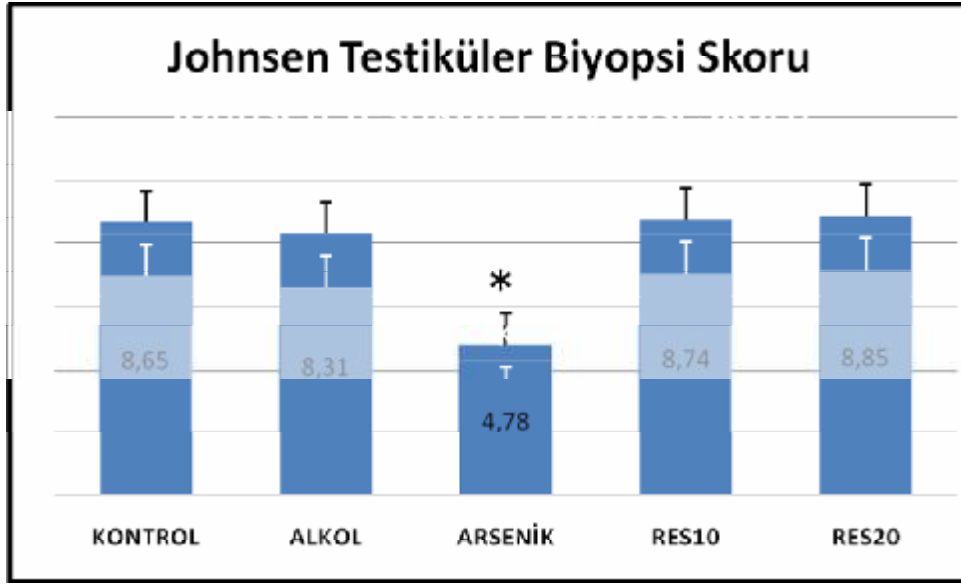
Şekil 41: Ars+Res 20 mg/kg grubuna ait testis kesiti (Masson Trichrome) X20.

5.3 Morfometrik Bulgular

5.3.1 Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

PAS ile boyanan testis kesitlerinde yapılan incelemeler sonucu, tüm grupların Johnsen testiküler biyopsi skorlarını gösteren şekil aşağıdadır (Şekil 42). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, alkol grubu testiküler biyopsi skorlarında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Arsenik grubuna ait kesitlere testiküler biyopsi skorlaması yapıldığında ise, kontrol grubuna oranla biyopsi skorlarının ortalamasında anlamlı bir azalma bulundu ($p < 0.05$).

Resveratrol ile tedavinin ardından, testiküler biyopsi skor ortalamalarının kontrol grubuna yakın olduğu gözlemlendi. Tedavi grupları arasında ise testiküler biyopsi skoru açısından herhangi bir fark gözlemlenmedi ($p > 0.05$). (One Way ANOVA, Bonferroni.)



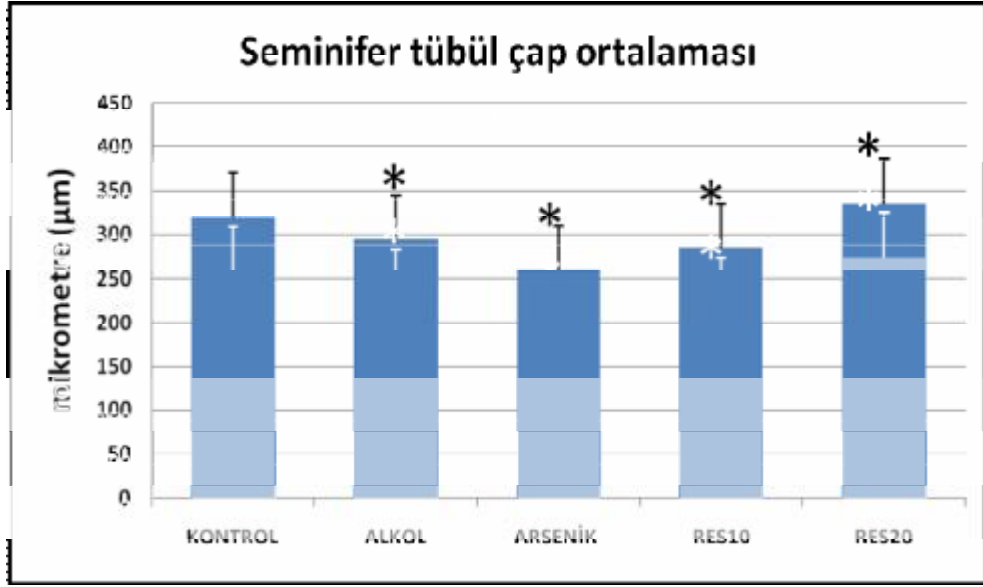
Şekil 42: Tüm grupların Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru ortalaması

5.3.2 Seminifer Tübül Çap Ölçümü

PAS ile boyanan testis kesitlerinde, 20X'lik objektifte UTHSCA Image Tool Version 3.0 programı kullanılarak çap ölçümü yapıldı. Tüm grupların seminifer tübül çap ölçümlerini gösteren şekil aşağıdadır (Şekil 43). Yapılan ölçümler sonucunda kontrol grubuna göre; alkol, arsenik ve Arsenik+ Resveratrol 10 mg/kg grubu seminifer tübül çaplarında anlamlı bir

azalma bulundu ($p<0.05$). Buna karşılık, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Arsenik+ Resveratrol 20 mg/kg grubu seminifer tübül çapında ise anlamlı olarak artış bulundu ($p<0.05$).

Tedavi grupları arasında bir karşılaştırma yapıldığında ise, düşük doz alan grubun seminifer tübül çapı yüksek doz alan grubun seminifer tübül çapına göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). (One Way ANOVA, Bonferroni.)

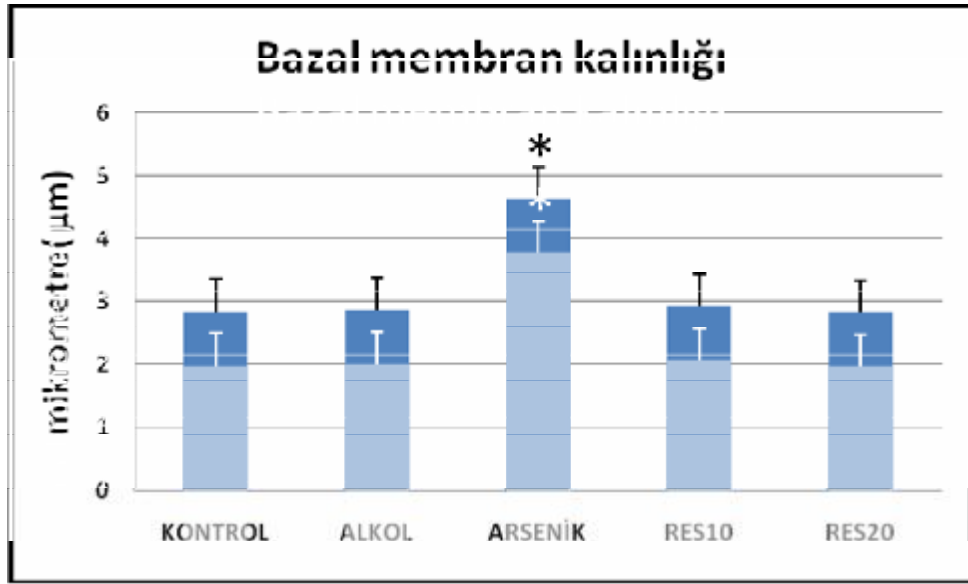


Şekil 43: Tüm grupların seminifer tübül çap ortalaması

5.3.3 Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

PAS ile boyanan testis kesitlerinde, 100X'lik objektifte UTHSCA Image Tool Version 3.0 programı kullanılarak bazal membran kalınlığı ölçümü yapıldı. Tüm grupların seminifer tübül bazal membran kalınlık ölçümlerini gösteren şekil aşağıdadır (Şekil 44). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, arsenik grubu bazal membran kalınlığında anlamlı bir artış bulundu ($p<0.05$). Alkol grubu bazal membran kalınlığı, kontrol grubuna yakın değerlerdeydi.

Resveratrol verilen gruplarda yapılan ölçümler sonucu, bazal membran kalınlığının kontrol grubuna yakın değer gösterdiği bulundu. Arsenik grubu ile karşılaştırıldığında ise tedavi grubu bazal membran kalınlıkları anlamlı derece azalmış bulundu ($p<0.05$). (One Way ANOVA, Bonferroni.)

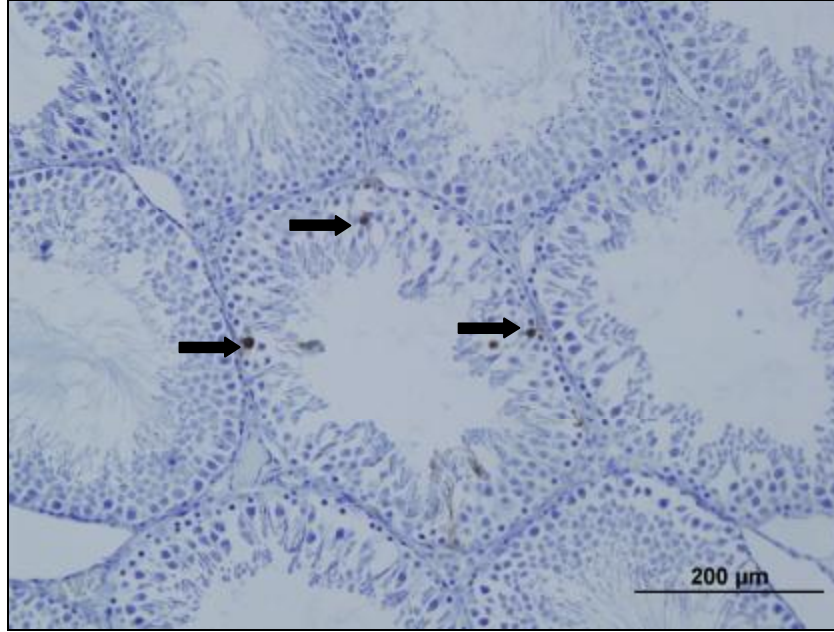


Şekil 44: Tüm grupların seminifer tübül bazal membran kalınlığı ortalaması.

5.4 İmmünohistokimyasal Bulgular

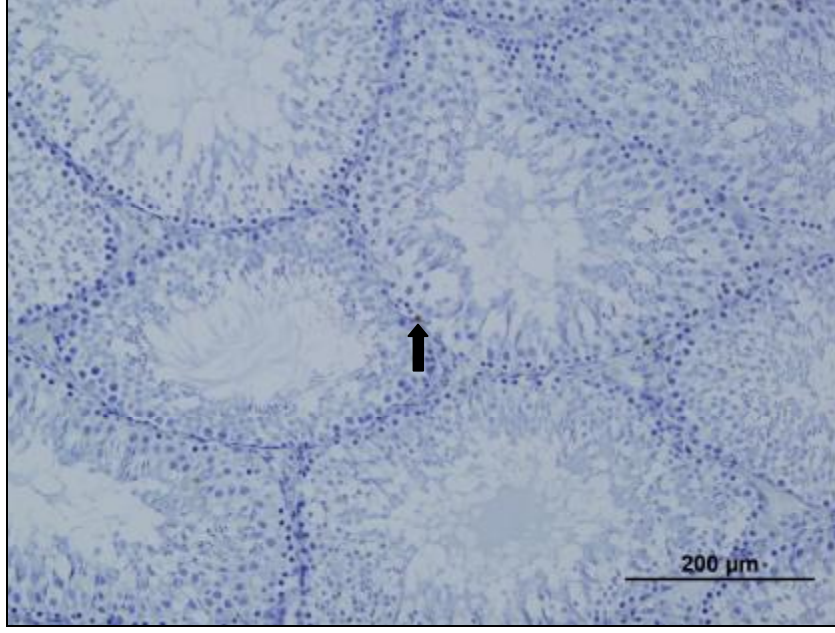
5.4.1 TUNEL Boyama

Kontrol grubu TUNEL boyamalarında birkaç hücre dışında TUNEL(+) hücreye rastlanmadı (Şekil 45). Alkol grubu TUNEL boyanan kesitler incelendiğinde ise kontrol grubuna yakın sayıda TUNEL(+) hücre içermekteydi. Arsenik grubu TUNEL boyamaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bu gruptaki TUNEL(+) hücre sayısının arttığı gözlemlendi (Şekil 48). Arsenik+RES 10mg/kg ve Arsenik+RES 20 mg/kg grupları TUNEL boyamaları incelendiğinde resveratrol tedavisinin ardından TUNEL(+) hücre sayısının azaldığı gözlemlendi (Şekil 51) .



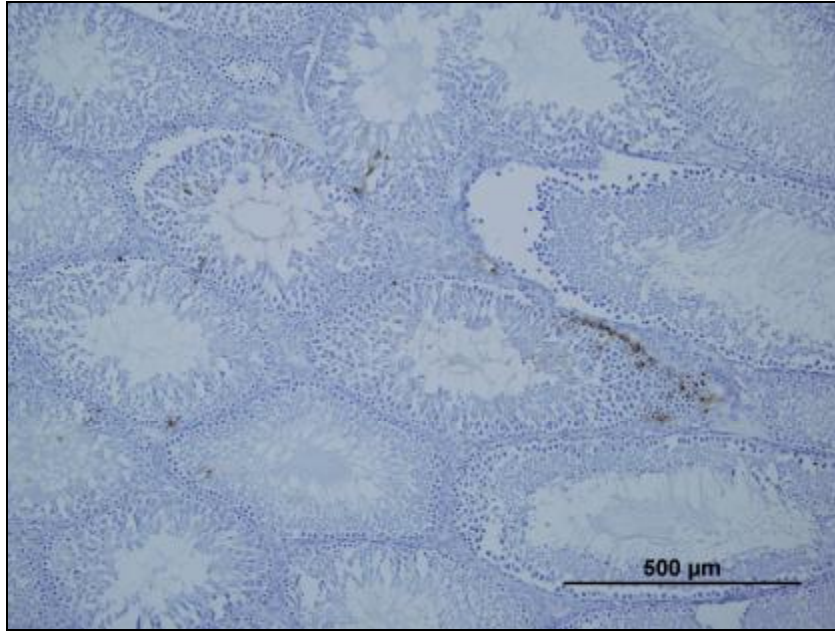
Şekil 45: Kontrol grubuna ait testis kesiti (TUNEL) X20.

Oklar TUNEL(+) hücreleri göstermektedir.

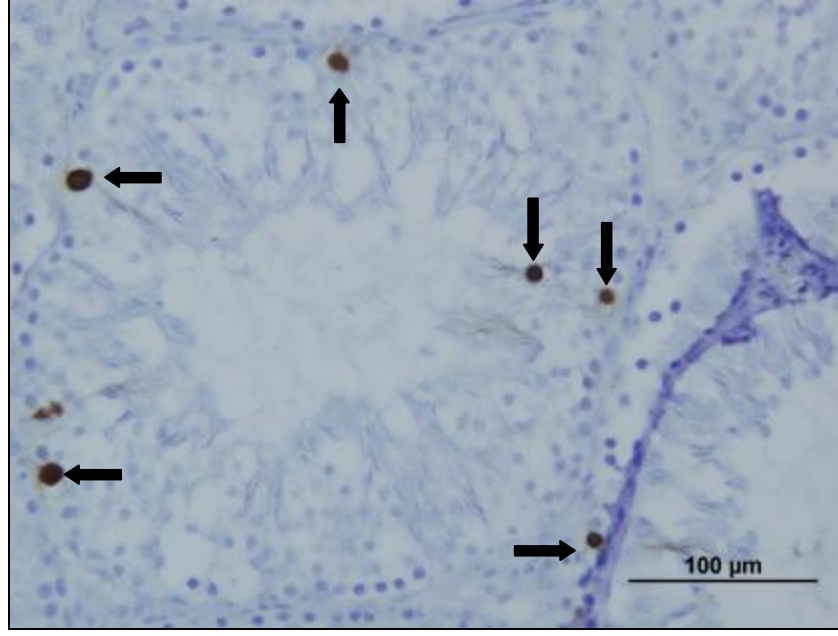


Şekil 46: Alkol grubuna ait testis kesiti (TUNEL) X20.

Ok TUNEL(+) hücreyi göstermektedir.

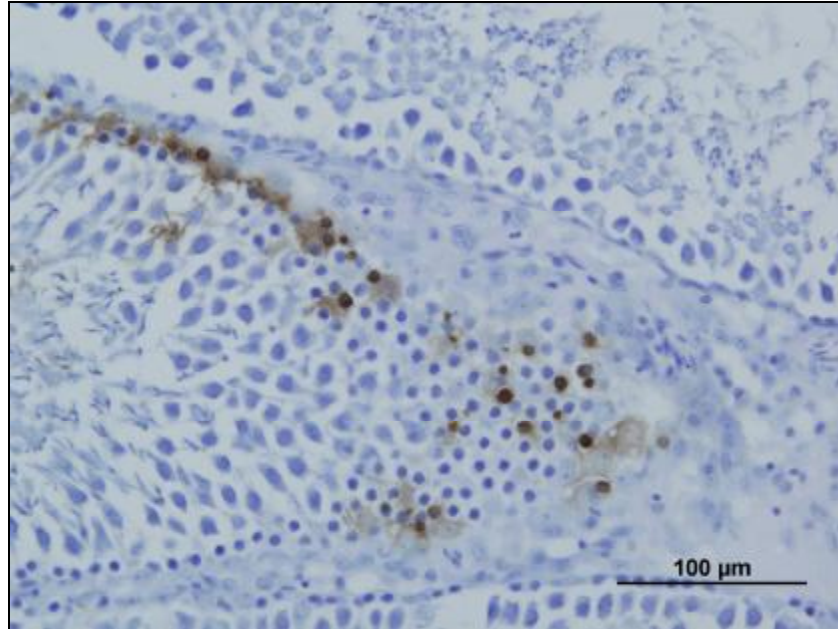


Şekil 47: Arsenik grubuna ait testis kesiti (TUNEL) X10.

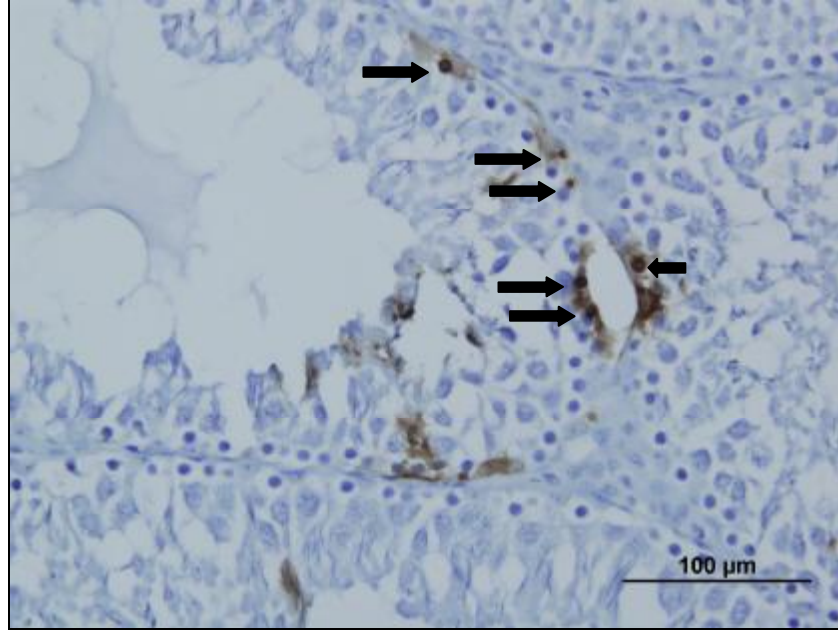


Şekil 48: Arsenik grubuna ait testis kesiti (TUNEL) X40.

Oklar TUNEL(+) hücreleri göstermektedir.

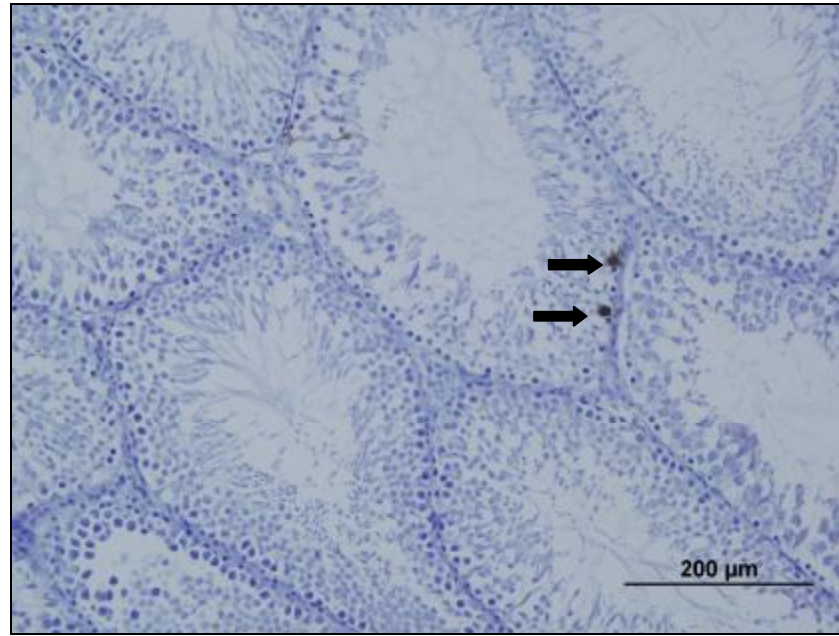


Şekil 49: Arsenik grubuna ait testis kesiti (TUNEL) X40.



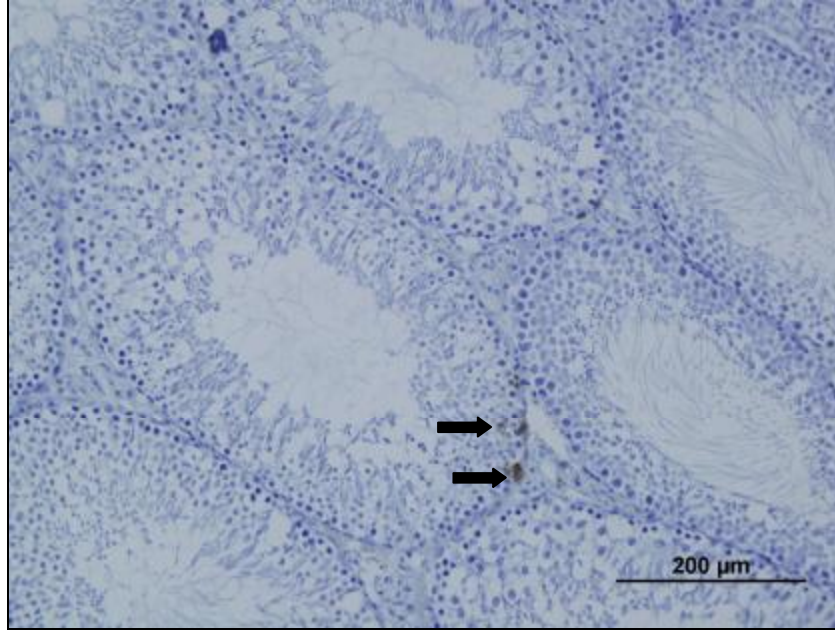
Şekil 50: Arsenik grubuna ait testis kesiti (TUNEL) X40.

Oklar TUNEL(+) hücreleri göstermektedir.



Şekil 51: Ars+RES 10mg/kg grubuna ait testis kesiti (TUNEL) x20.

Oklar TUNEL(+) hücreleri göstermektedir.



Şekil 52: Ars+RES 20mg/kg grubuna ait testis kesiti (TUNEL)

5.4.2 Caspase 3 boyama

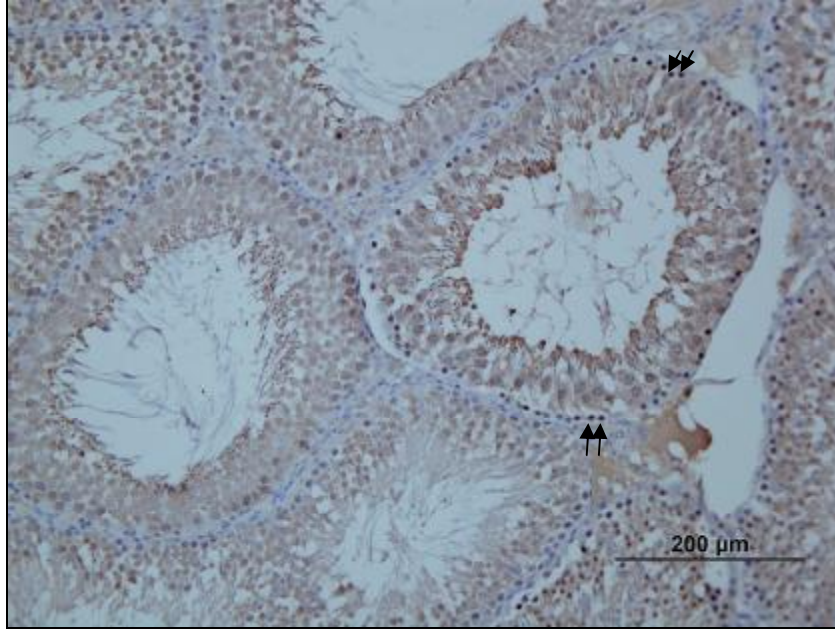
TUNEL boyamaya ek olarak apoptotik hücreleri belirlemek için diğer bir yöntem olan Caspase 3 immün boyama yapıldı. Caspase 3 immün boyama ile yapılan değerlendirme sonucunda tüm gruplara ait pozitif hücre sayılarını gösteren şekil aşağıdadır (şekil 53).

Kontrol grubu kesitleri incelendiğinde birkaç pozitif hücre dışında caspase 3 immunoreaktivite gösteren hücreye rastlanmadı (Şekil 54). Alkol grubu testis kesitleri de kontrol grubuna yakın sayıda pozitif hücre içermekteydi (Şekil 55).

Arsenik grubu caspase 3 immün boyama sonuçlarına bakıldığında, kontrol grubuna oranla apoptotik hücre sayısının artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 56). Her iki tedavi grubu caspase 3 immün boyama sonuçları incelendiğinde ise resveratrol ile tedavinin ardından, pozitif hücre sayısının arsenik grubuna oranla anlamlı derece azaldığı gözlemlendi (Şekil 57,58).

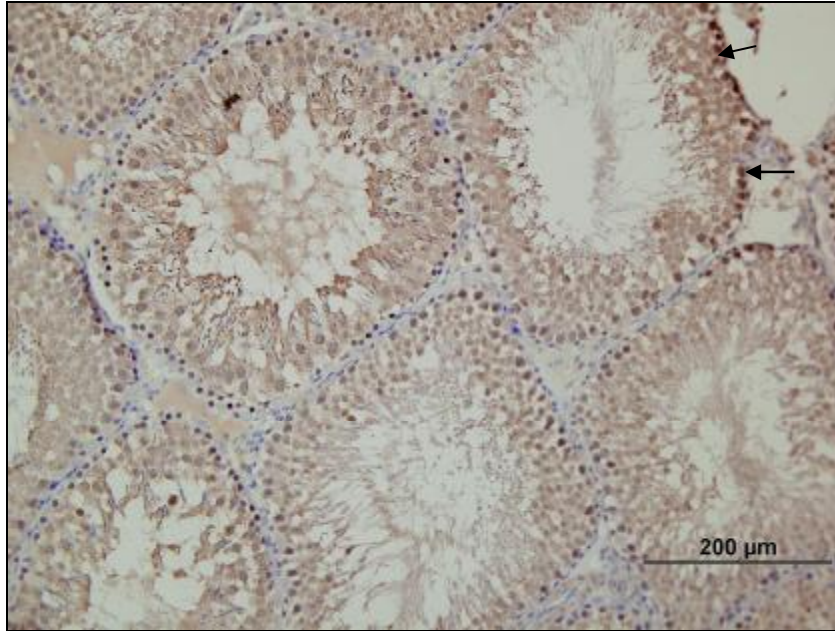
Grup	Pozitif hücre sayısı %
Kontrol	0,6 ±0,3
Alkol	0,62± 0,2
Arsenik	70,2 ±1.5
Arsenik+ Res 10 mg/kg	30,5 ±1,1
Arsenik+ Res 20 mg/kg	20,8± 2,5

Şekil 53: Tüm grupların Caspase 3 pozitif hücre sayıları yüzdesi

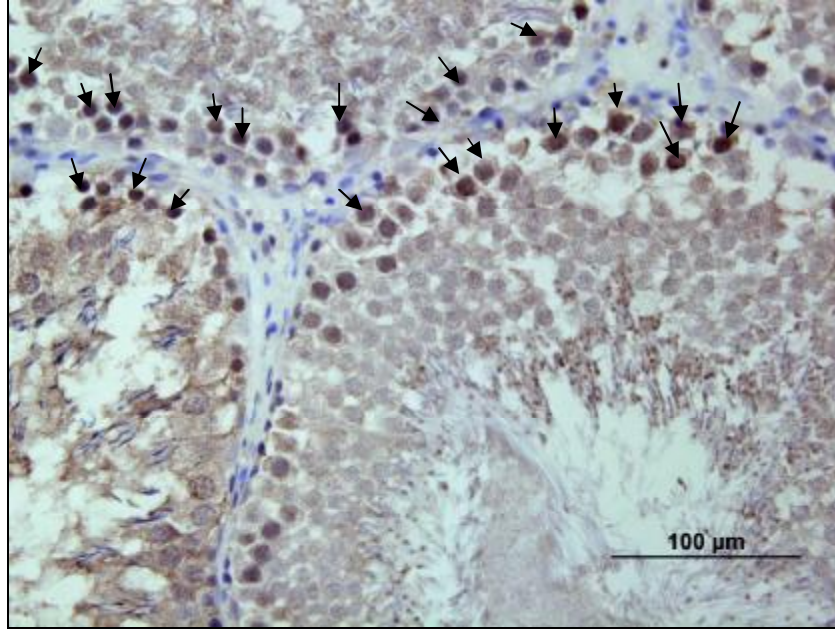


Şekil 54: Kontrol grubuna ait testis kesiti (Caspase 3) X20

Oklar Caspase 3 immün reaktivite gösteren hücreleri göstermektedir.

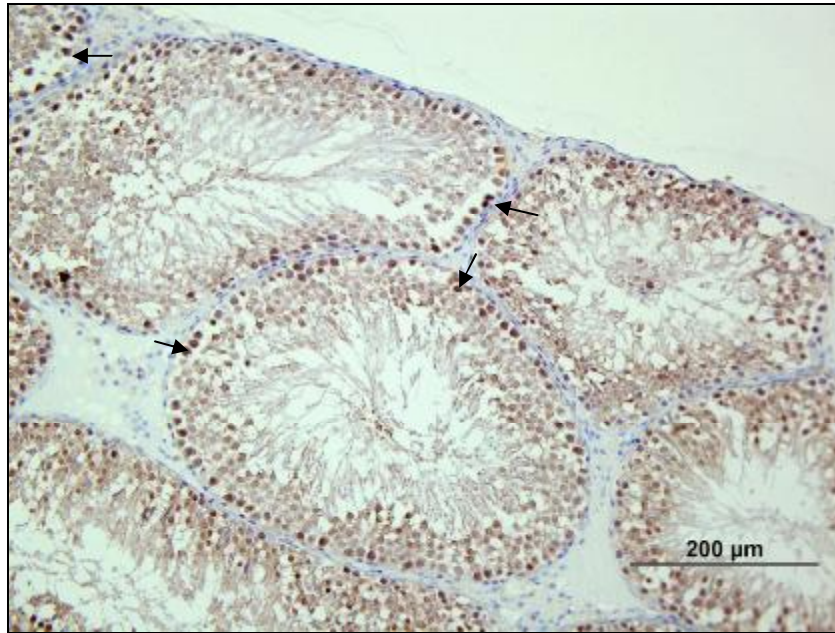


Şekil 55: Alkol grubuna ait testis kesiti (Caspase 3) X20

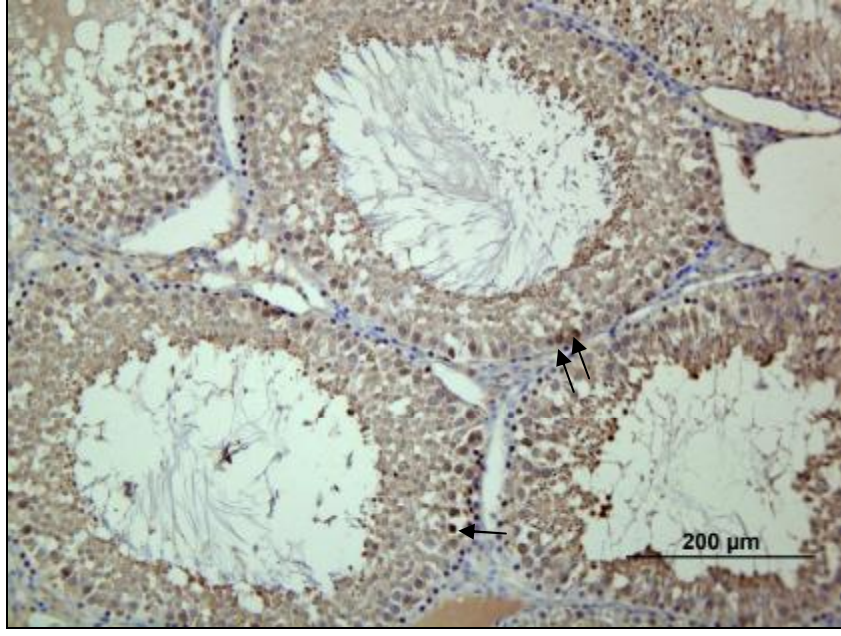


Şekil 56: Arsenik grubuna ait testis kesiti (Caspase 3) X40

Oklar Caspase 3 immün reaktivite gösteren hücreleri göstermektedir.



Şekil 57: Arsenik+ Res 10 mg/kg grubuna ait testis kesiti (Caspase 3) X20



Şekil 58: Arsenik+ Res 20 mg/kg grubuna ait testis kesiti (Caspase 3) X20

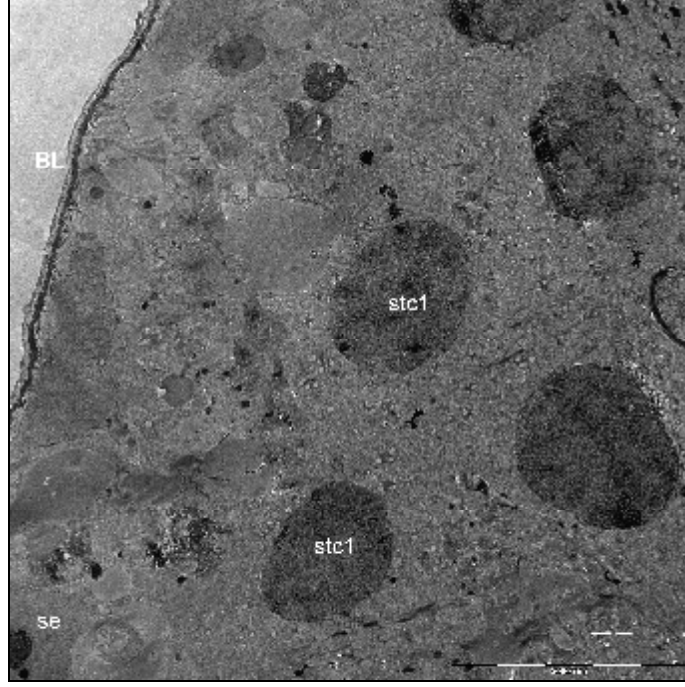
5.5 Elektron Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubundan alınan testis doku örnekleri incelendiğinde, bazal lamina üzerine oturmuş olan spermatogonyumların yuvarlak çekirdeklere sahip olduğu gözlemlendi. Tek olan çekirdekçik, merkezi yerleşimliydi. Sertoli hücrelerinin aralarında, Sertoli hücre sitoplazması ile sarılı olarak gözlenen primer spermatozoidler gelişigüzel dağılımlı mitokondriyonlara sahipti. Orta elektron yoğunluğunda primer ve sekonder spermatozoidlerin üzerinde spermatidler yer almaktaydı (Şekil 59).

Alkol grubundan alınan testis doku örnekleri incelendiğinde, kontrol grubu ile benzer yapı göstermekteydi. Bazal lamina üzerine oturmuş spermatogonyumlar düzgün yuvarlak şekilli idi. Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreleri içeren seminiferöz epitel hücrelerinin normal sitoplazmik yapılarında dikkati çekecek bir farklılaşmanın olmadığı gözlemlendi (Şekil 60).

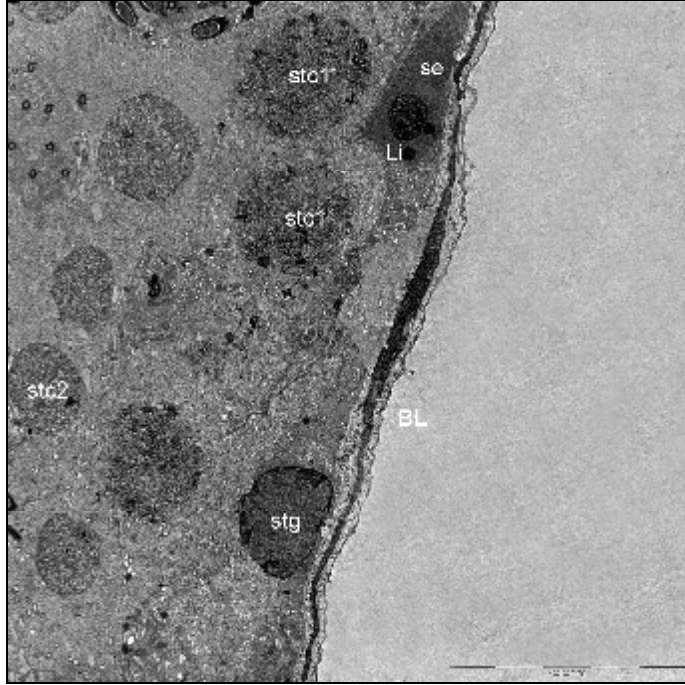
Arsenik grubundan alınan testis doku örnekleri incelendiğinde ise Sertoli hücreleri ve spermatogonyumların hemen altında yer alan bazal laminanın kalınlaştığı gözlemlendi. Arsenik maruziyetinin ardından, Sertoli hücreleri ile spermatogenik hücrelerin aralarındaki mesafenin genişlemiş olduğu ve böylece boşlukların oluştuğu dikkat çekmekteydi. Bazı alanlarda Sertoli hücreleri ile ilişkili hiçbir spermatogenik hücre bulunmamaktaydı. Bu da hücresel dökülmeyi işaret etmekteydi (Şekil 61). Spermatogonyumlarda da büzüşme ve düzensiz boşluklar gözlemlenmekteydi. Sitoplazmada elektron yoğun cisimcikler dikkati çekmekteydi. Ayrıca arsenik alan grupta mitokondriyal kristalinité gözlemlenmekteydi (Şekil 62).

Resveratrol ile tedavi edilen gruplardan alınan testis doku örnekleri incelendiğinde, membrana propria, Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler kontrol grubuna benzer görünümdeydi. Bazal lamina üzerine oturan spermatogonyumlar normal yoğunlukta idi. Seminifer tübüllerde normal konsantrasyondaki spermatozoidlerin yanı sıra, hücresel bütünlüğü bozulmamış spermatozoidlere de rastlanmaktaydı (Şekil 63,64). Resveratrol ile tedavinin ultrastrüktürel olarak arseniğin vermiş olduğu hasarları önlediği gözlemlendi.



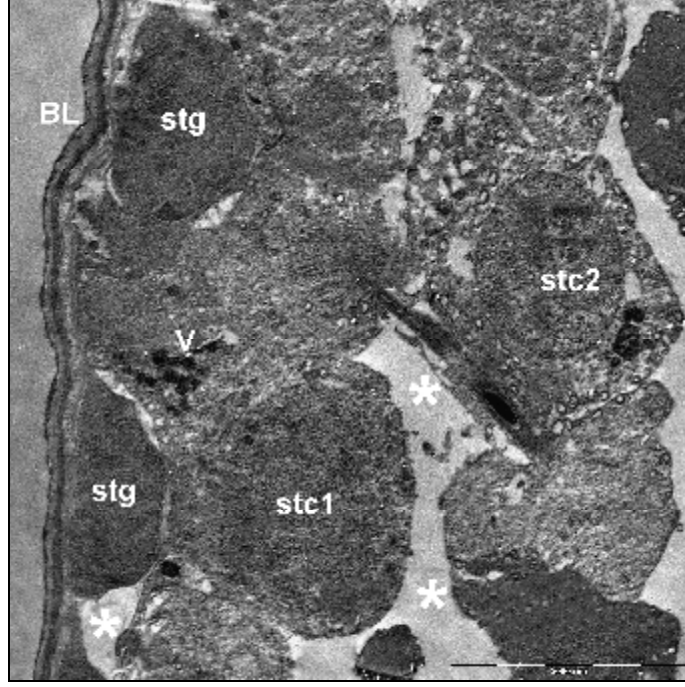
Şekil 59: Kontrol grubuna ait testis dokusu ince kesiti X1250.

Bazal lamina (BL) üzerine oturmuş spermatogonyumlar ve belirgin bir çekirdeğe sahip sertoli hücresi (se) ve üzerinde primer spermatozoidler (stc1) gözlenmektedir.



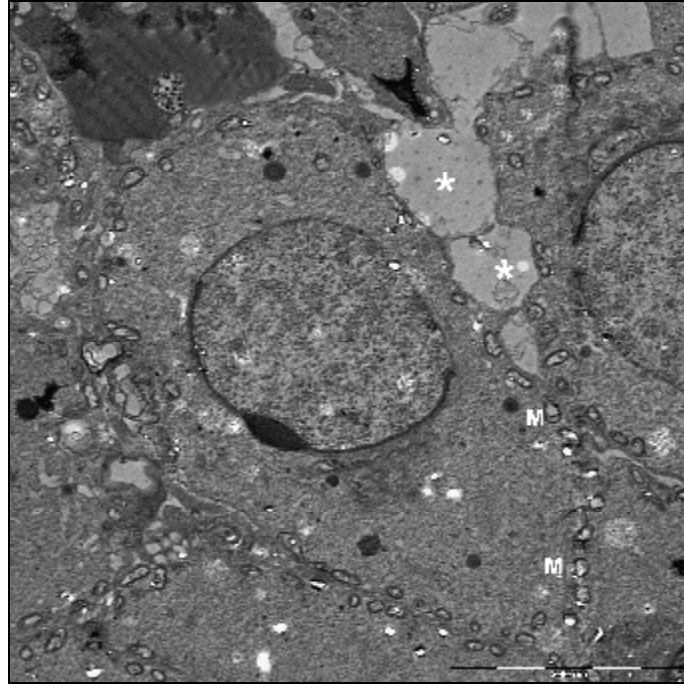
Şekil 60: Alkol grubuna ait testis dokusu ince kesiti X1250.

Bazal laminanın (BL) hemen üzerine oturmuş spermatogonyum (stg) ve belirgin çekirdek, çekirdekçik ve sitoplazmasında lipid (Li) bulunduran sertoli hücresi (se). Gelişim sırasına göre seminifer tübül epitelinde yerleşen primer (stc1) ve sekonder (stc2) spermatozoidler gözlenmektedir.



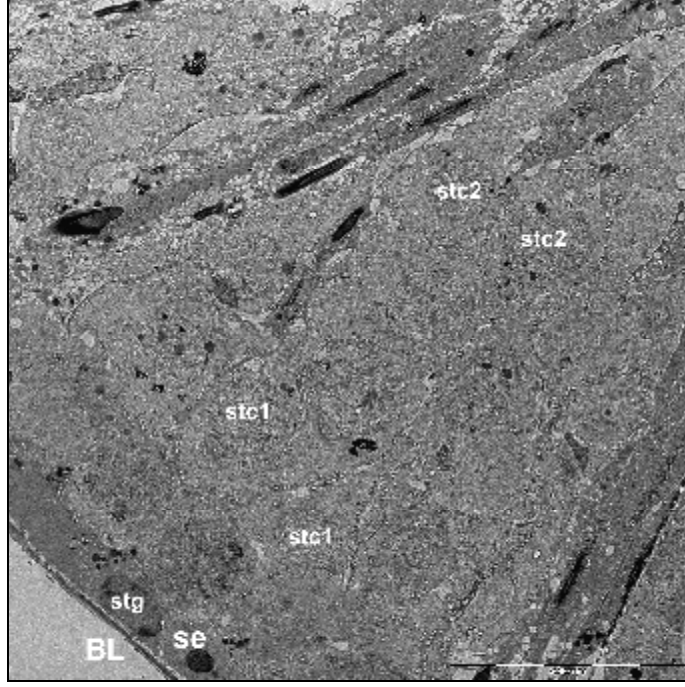
Şekil 61: Arsenik grubuna ait testis dokusu ince kesiti X1250.

Seminifer tübül epitel bütünlüğünün bozulduğu ve yer yer ayrılmaların olduğu (yıldız) gözlenmekte. Sitoplazmada elektron dens veziküllere rastlanmakta (V).



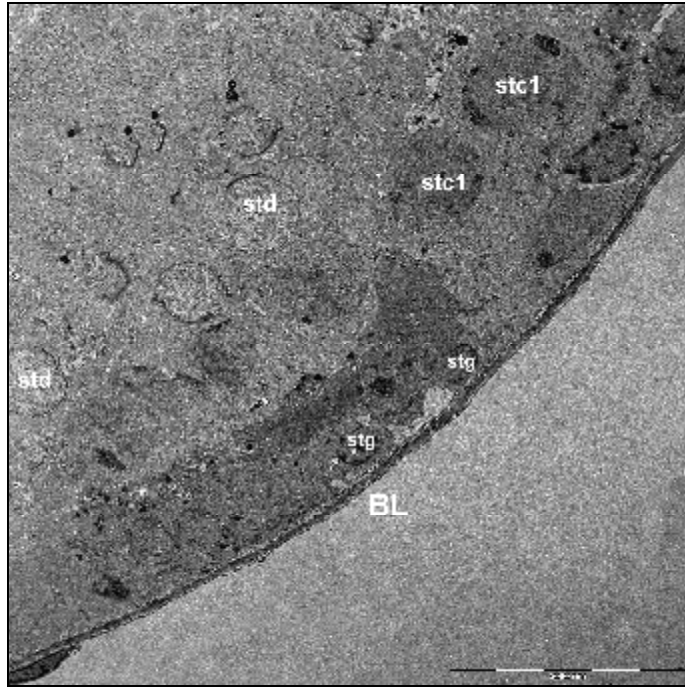
Şekil 62: Arsenik grubuna ait testis dokusu ince kesiti X 1600.

Mitokondrilerin krista yapılarının bozulduğu (M) ve komşu hücreler arasında yer yer boşlukların olduğu (yıldız) gözlenmektedir.



Şekil 63: Ars+RES 10mg/kg grubuna ait testis dokusu ince kesiti X1250.

Seminifer tübül epiteli hücre bütünlüğü korunmuş, kontrol grubuna yakın özellik göstermektedir.



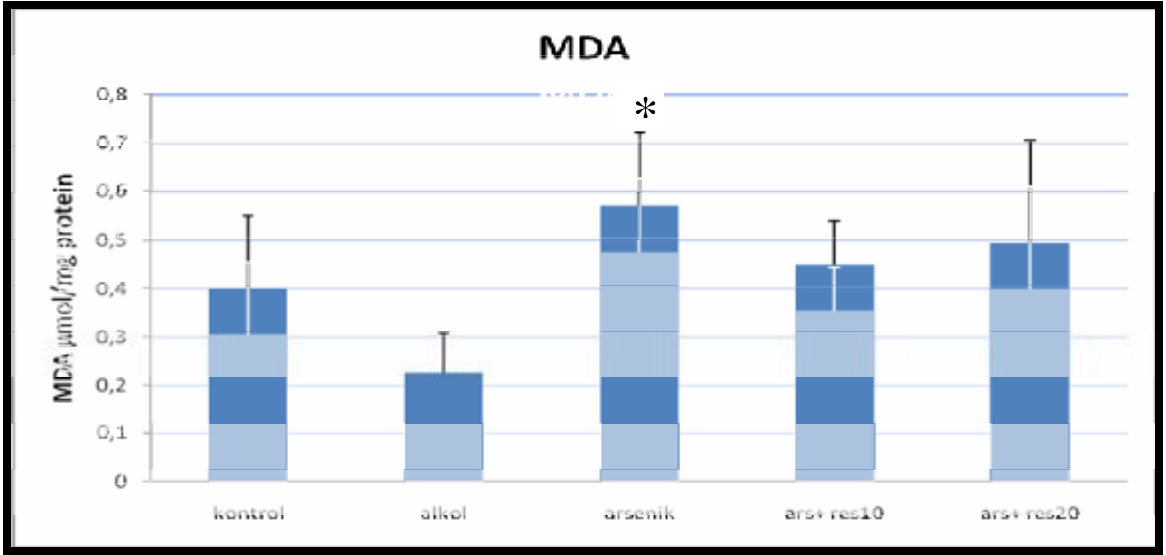
Şekil 64: Ars+RES 20mg/kg grubuna ait testis dokusu ince kesiti X 1250.

Seminifer tübül epiteli hücre bütünlüğü korunmuş, kontrol grubuna yakın özellik göstermektedir.

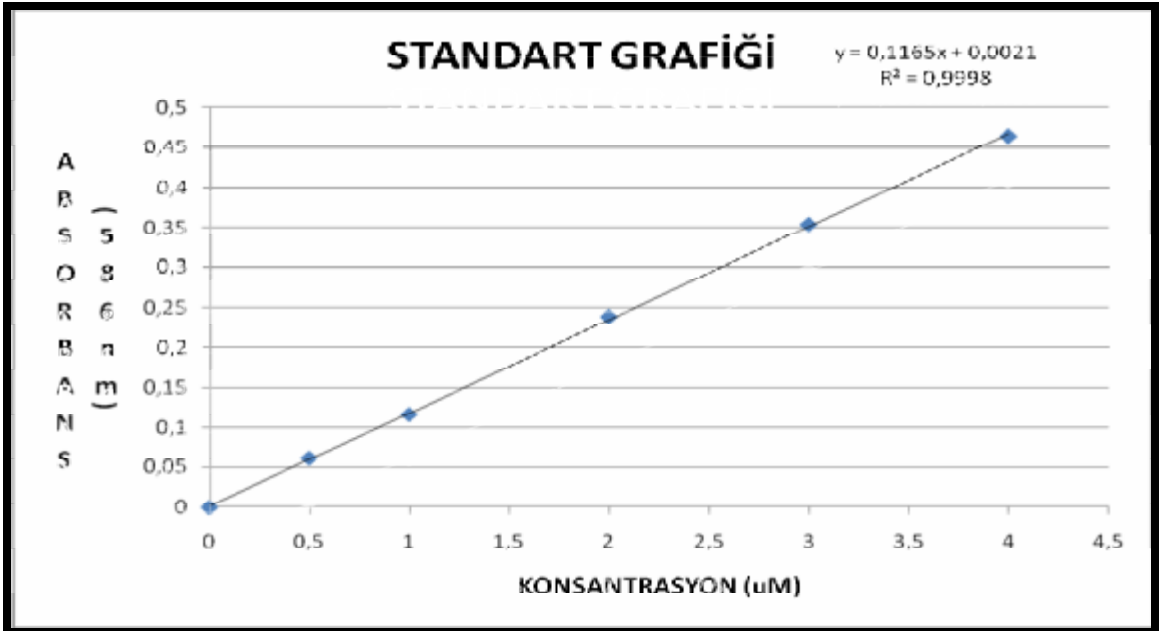
5.6 Biyokimyasal Bulgular

5.6.1 MDA Değerleri

Tüm grupların ortalama MDA değerleri şekil 65'de, MDA standart grafiği şekil 66'da ve tüm grupların MDA ölçümleri şekil 67'de gösterilmektedir. Kontrol grubuna göre arsenik grubunda MDA değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$). Alkol ve kontrol grupları MDA değerlerinde ise anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$). (One Way ANOVA, LSD).



Şekil 65: Ortalama MDA değerleri



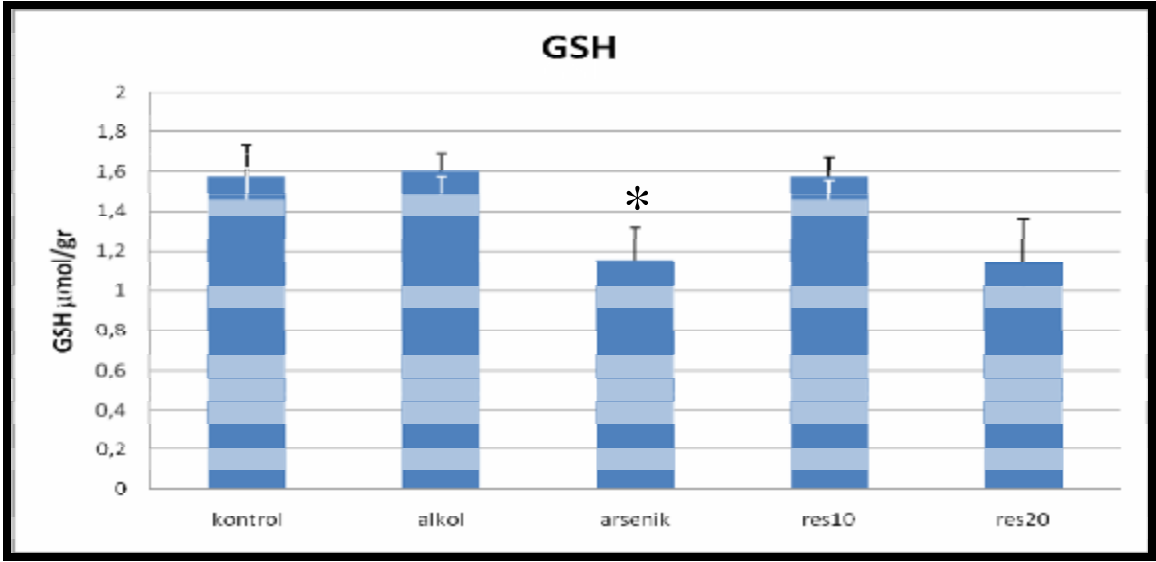
Şekil 66: MDA standart grafiği

Grup	Tüp No	mg DOKU BAŞINA (µM)
kontrol	1	0,077
kontrol	2	0,061
kontrol	3	0,081
kontrol	4	0,068
kontrol	5	0,056
kontrol	6	0,052
kontrol	7	0,061
alkol	8	0,063
alkol	9	0,067
alkol	10	0,061
alkol	11	0,061
alkol	12	0,085
alkol	13	0,083
alkol	14	0,065
arsenik	15	0,092
arsenik	16	0,090
arsenik	17	0,100
arsenik	18	0,096
arsenik	19	0,090
arsenik	20	0,094
arsenik	21	0,095
ars+RES10	22	0,078
ars+RES10	23	0,073
ars+RES10	24	0,106
ars+RES10	25	0,119
ars+RES10	26	0,087
ars+RES10	27	0,104
ars+RES10	28	0,089
ars+RES20	29	0,083
ars+RES20	30	0,088
ars+RES20	31	0,160
ars+RES20	32	0,097
ars+RES20	33	0,124
ars+RES20	34	0,097
ars+RES20	35	0,109

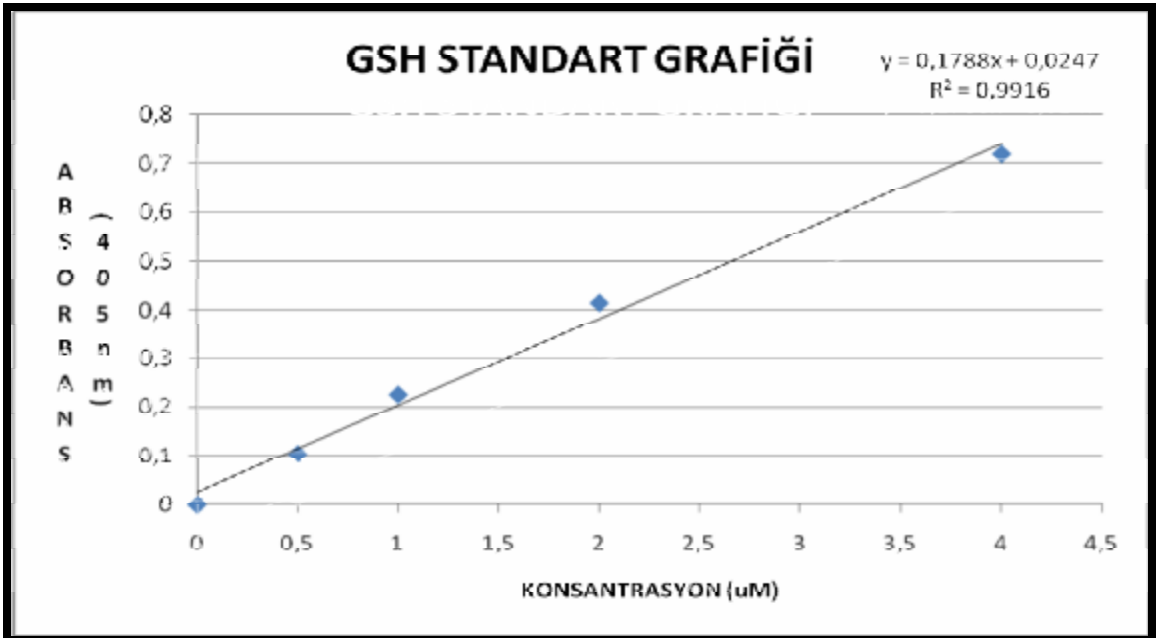
Şekil 67: Tüm grupların MDA ölçümleri ($\mu\text{M} \pm \text{SH}$)

5.6.2 GSH Değerleri

Tüm grupların ortalama GSH değerleri şekil 68'de, GSH standart grafiği şekil 69'da ve tüm grupların GSH ölçümleri şekil 70'de gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre arsenik grubu GSH değerleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Tedavi gruplarında ise GSH değerleri arsenik grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Kontrol ve alkol grupları arasında GSH değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0.05$). (One Way ANOVA, LSD).



Şekil 68: Ortalama GSH değerleri



Şekil 69: GSH standart grafiği

Tüp No	Örnekler	Örneklerin Ortalama Abs Değerleri	KonsxSF 50	mg Doku Başına Kons.
1	Kontrol	0,3005	77,13	1,54
2	Kontrol	0,28375	72,44	1,45
3	Kontrol	0,306	78,66	1,57
4	Kontrol	0,3075	79,08	1,58
5	Kontrol	0,17625	42,38	0,85
6	Kontrol	0,3615	94,18	1,88
7	Kontrol	0,412	108,31	2,17
8	Alkol	0,30575	78,59	1,57
9	Alkol	0,2955	75,73	1,51
10	Alkol	0,38375	100,41	2,01
11	Alkol	0,326	84,26	1,69
12	Alkol	0,254	75,71	1,64
13	Alkol	0,2475	62,3	1,25
14	Alkol	0,356	77,1	1,35
15	Arsenik	0,33	85,37	1,71
16	Arsenik	0,2465	62,02	1,24
17	Arsenik	0,0825	16,16	0,32
18	Arsenik	0,243	61,05	1,22
19	Arsenik	0,262	66,36	1,33
20	Arsenik	0,09	62,7	1,23
21	Arsenik	0,165	54,1	1,31
22	Ars+RES 10	0,269	63,4	0,92
23	Ars+RES 10	0,1432	72,8	1,12
24	Ars+RES 10	0,2945	75,45	1,51
25	Ars+RES 10	0,20325	49,93	1
26	Ars+RES 10	0,15475	36,37	0,73
27	Ars+RES 10	0,1895	46,09	0,92
28	Ars+RES 10	0,23725	59,44	1,19
29	Ars+RES 20	0,02475	0,01	0
30	Ars+RES 20	0,22975	57,34	1,15
31	Ars+RES 20	0,3095	79,64	1,59
32	Ars+RES 20	0,317	81,74	1,63
33	Ars+RES 20	0,3085	79,36	1,59
34	Ars+RES 20	0,19925	48,81	0,98
35	Ars+RES 20	0,2095	51,68	1,03

Şekil 70: Tüm grupların GSH ölçümleri (µmol/gr)

6 **TARTISMA**

Bu çalışmada, arsenik toksisitesinin testiste oluşturduğu hasara karşı resveratrolün koruyucu etkisi yapısal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak araştırılmıştır.

Çalışmamızda, testiste oksidatif stres belirteçlerinden biri olan doku MDA düzeyleri değerlendirildi. Yapılan çalışmalar arsenik maruziyeti ile lipid peroksidasyonu arasında ilişki bulunduğu göstermektedir. Chang ve ark. yaptıkları bir çalışmada, kronik arsenik maruziyetinin testis dokusu MDA seviyelerini arttırdığını göstermiştir (70). Garcia- Chavez ve ark. arseniğe maruz kalan sıçanlarda MDA seviyelerinin yükseldiğini göstermiştir (71). Das ve ark. sıçan testis dokusunda kronik arsenik maruziyetinin MDA seviyelerini arttırdığını göstermiştir (72). Bizim çalışmamızda arsenik grubu MDA seviyeleri kontrol, alkol ve tedavi grupları ile kıyaslandığında anlamlı olarak yüksek bulundu. Çalışmamızın sonuçları literatürü desteklemektedir.

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar resveratrolün lipid peroksidasyonunu önlediğini göstermektedir. Kasdallah Grissa ve ark. yaptıkları çalışmada resveratrolün lipid peroksidasyonun önlediğini, MDA değerlerini düşürdüğünü göstermiştir (73). Şener ve ark. iskemik böbrek modelinde resveratrolün lipid peroksidasyonunu düşürdüğünü göstermiştir (74). Uğuralp ve ark. testiküler iskemi modelinde resveratrol ile tedavi edilen grupların MDA seviyelerinin düştüğünü göstermiştir (75). Çalışmamızda RES uygulaması, testis dokusunda arseniğin neden olduğu MDA artışını önlemiştir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi testis dokusunda arseniğin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna resveratrolün etkisini gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Antioksidan enzim dengesinin bozulması, antioksidan enzim aktivitelerinde depleyona neden olmaktadır. ROS ve radikal süpürücü etkisiyle GSH, kendini okside formu olan glutatyon disülfite (GSSG) dönüştürür. Böylece dokuda GSH seviyelerinin azalması, doku hasarını ve lipid peroksidasyonunu gösteren önemli bir faktördür (54). Pal ve ark. sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada, arsenik toksisitesinin testis dokusu GSH seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir (76). Chang ve ark. farelerde yaptıkları bir çalışmada arseniğin GSH seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir (70). Çalışmamızın bulguları diğer çalışmaları desteklemektedir. Çalışmamızda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arsenik grubu GSH değerleri anlamlı olarak düşük bulundu.

Resveratrolün antioksidan etkinliğini göstermek için yapılan çalışmalar, doku GSH düzeylerinin resveratrol ile arttığını göstermiştir. Wang ve ark. yaptıkları çalışmada resveratrolün doku GSH düzeylerini arttırdığını göstermiştir (77). Uğuralp ve ark. testis iskemi modelinde resveratrolün GSH düzeylerini arttırdığını göstermiştir (75). Şener ve ark. yaptıkları bir çalışmada iskemi sonrası resveratrolün doku GSH düzeylerini arttırdığını göstermiştir (74). Ancak arsenik maruziyeti ile birlikte RES verilerek testis doku GSH düzeylerine bakılan bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda, RES ile tedavinin testis dokusunda antioksidan enzim aktivitesi olan GSH'ı yükselttiği bulundu. Arsenik ile birlikte resveratrol verilen gruplarda GSH seviyelerinin yükselmesi ve kontrol grubu ile yakın seviyelerde kalması, resveratrolün oksidatif stresi azaltarak, GSH tüketimini düşürmesine bağlı olduğu düşünülmüştür. Arsenik alan grupta GSH seviyelerinin düşmesi, oksidatif stres halinde dokuda GSH tüketiminin artması ile açıklanabilir.

Serbest radikal üretimi patofizyolojinin bir parçasıdır ve pek çok metalin toksisitesi serbest radikal üretimi ile ilgilidir. Arseniğin de ROS oluşturduğu bilinmektedir (3). Serbest radikaller direkt yada indirekt yollarla hücre ölümüne yol açabilmektedir. Spermatogonik hücreler de dahil olmak üzere pek çok hücre tipinde apoptoz, ROS ve oksidatif stres ile bağlantılıdır. Bu çalışmada, testis dokusunda apoptozu göstermek amacıyla TUNEL ve caspase 3 boyama yapıldı. Arseniğe maruz kalma sonucunda testis dokusunda apoptozun arttığı gözlemlendi. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, arsenik toksisitesinin DNA kırıklarına yol açtığı ve apoptotik hücre ölümünü arttırdığını göstermektedir (72,78). Çalışmamızın sonuçları literatürü desteklemektedir. Çalışmamızda arsenik verilen grupta, kontrol grubuna göre apoptozun anlamlı olarak arttığı bulundu. Tedavi gruplarında ise resveratrolün; TUNEL(+) hücre sayısını ve caspase 3 immunoreaktivite gösteren hücre sayısını arsenik grubuna göre anlamlı olarak azalttığı gösterilmiş ve resveratrolün testis dokusunda apoptozu önlediği sonucuna varılmıştır.

Antioksidatif ajanlar, serbest radikal oluşumunu azaltarak antiapoptotik etki gösterebilmektedir. Son dönemlerde, antioksidan özelliğe sahip doğal maddelerin ve besinlerin, serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarı üzerine olan etkileri birçok araştırmacı tarafından çalışılmaktadır. Bu doğal bileşiklerden biri de resveratroldür. En çok bilinen antioksidanlar olan E vitamini ve C vitamininden güçlü olan RES, hidroksil ve süperoksit radikallerini süpürür, hidroksil radikallerinin neden olduğu lipid peroksidasyonunu

inhibe eder, protein oksidasyonunu engeller (55). Serum antioksidan kapasitesini arttırır. Resveratrolün ayrıca; antikanser, östrojenik, damar gevşetici, antiinflamatuvar etkisi olduğu tespit edilmiştir (7). Çeşitli deneysel modellerde resveratrolün antiapoptotik etkisi gösterilmiştir (79,80).

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar resveratrolün antiapoptotik etkisi bulunduğuna işaret etmektedir fakat, arseniğin neden olduğu apoptoza karşı etkisinin olup olmadığı belli değildir. Çalışmamızda bu konuya da açıklık getirilmiştir; arsenik maruziyetine karşın resveratrol ile tedavi edilen testis dokusunda, arsenik grubuna göre apoptotik hücre sayısı anlamlı olarak azalmıştır.

Arsenik, testis dokusunda ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik düzeyde belirlenen spermatid kaybı ve testiküler hasar bulguları oluşturmaktadır. Sanghamitra ve ark. farelerde yaptıkları bir çalışmada, oral yolla arsenik verilen farelerin testis dokusunda seminifer tübül çapında azalma ve testiküler atrofiyi göstermiştir (81). Benzer şekilde Manna ve ark. arsenik ile yaptıkları bir çalışmada, testiste seminifer tübüllerde dejenerasyon, nekroz ve spermatozoidlerde defoliasyonu göstermiştir (82). Das Neves ve ark. farelerde yaptıkları bir çalışmada, arseniğin testis seminifer tübüllerinde atrofiye yol açtığını göstermiştir (83). Çalışmamızda morfometrik olarak yaptığımız ölçümlerle de doğruladığımız seminifer tübül çaplarının azalması, bazal membran kalınlığındaki değişiklikler ve germ hücreleri, seminifer tübüllerde dejenerasyon, atrofi ve tübül lümeninde spermium kaybı literatürle paralellik göstermektedir.

Zhao ve ark. arsenik ile oluşturulmuş kardiyotoksisite üzerine yaptıkları bir çalışmada, resveratrolün ışık mikroskopik olarak arseniğin neden olduğu hasarı önlediğini göstermiştir (84). Bizim çalışmamızda olduğu gibi arsenik toksisitesine karşı testis dokusunda resveratrolün, ışık ve elektron mikroskopik etkilerini gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda, resveratrol ile tedavi edilen gruplar arsenik grubu ile karşılaştırıldığında, arseniğin neden olduğu hasar bulgularını resveratrolün önlediği bulundu. Tedavi gruplarının kontrol grubu ile benzer testiküler morfoloji gösterdiği gözlemlendi. Elektron mikroskopik kesitler incelendiğinde, resveratrol ile tedavi edilen grupların arseniğin neden olduğu testiküler hasarı önlediği gözlemlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada, arsenik toksisitesinin testiste neden olduğu hasara karşı resveratrolün koruyucu etkisi ilk kez incelenmiştir. Resveratrol, antioksidatif etkisi aracılığıyla koruyucu etki göstermektedir. Arseniğin erkek infertilitesinde oluşturduğu zararlı etkilerin önlenmesi açısından antioksidanlar önem taşımaktadır. Arseniğin hasar oluşturuca mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve koruyucu yada destek tedavilerinin geliştirilmesi açısından çalışmaların ilerletilmesi gerekmektedir.

7 SONUC VE ÖNERİLER

Literatürde arsenik toksisitesine karşı testis dokusunda resveratrolün, ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik etkilerini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamız literatürdeki boşluğu dolduracaktır.

Arseniğin neden olduğu hücre hasarına karşı resveratrolün koruyucu etkisinin olup olmadığı belli değildir. Çalışmamız bu konuya da açıklık getirmiştir. Resveratrolün koruyucu etkisini göstermek için çalışmamızda iki farklı doz kullanılmış; dozlar arasında hücre hasarını önleme açısından herhangi bir fark bulunmamıştır. Ayrıca biyokimyasal olarak oksidatif stres belirteci olan MDA ve antioksidan savunma sistemi göstergesi olan GSH düzeyleri ilk kez gösterilmiştir.

Bu bilgiler ışığına çalışmamızın, arseniğin etki mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesine ve koruyucu terapilerin kullanılmasına yol göstereceği inancındayız.

8 KAYNAKLAR

- 1- Pradosh R, Anupama S. Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. *Current Science*, 2002;82(1): 38-45.
- 2- Pott WA, Bengamin SA, Yang RSH. Pharmacokinetics, metabolism and carcinogenicity of arsenic. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2001;169: 165-214.
- 3- Miller WH, Hyman J, Schipper M, Lee JS et al. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Research*, 2002;62: 3893–3903.
- 4- Waalkes MP, Keefer LK, Diwan BA. Induction of proliferate lesions of the uterus, testes, and liver in Swiss mice given repeated injections of sodium arsenate: possible estrogenic mode of action. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000;166: 24-35.
- 5- Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem*, 2004;255: 67–78.
- 6- Gerogiannaki-Christopoulou M, Athanasopoulos P, Kyriakidis N, Gerogiannaki AI et al. Trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Control*, 2006;17(9): 700-706.
- 7- Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient. Molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem*, 2005;16(8): 449-466.
- 8- Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: A therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv*, 2006;6: 36-47.
- 9- Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 1997;94: 14138–14143.
- 10- Juan ME, Gonzalez-Pons E, Munuera T, Ballester J et al. Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *Nutrient Metab*, 2005;135(4): 757-760.
- 11- Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human Clinically Oriented Embryology*. Sixth Edition. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1998; 18-40.
- 12- Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. Sixth Edition. Baltimore, Williams & Wilkins, 1990; 24-30.

- 13- Yıldırım M. İnsan Anatomisi. Altıncı Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2003; 226-236.
- 14- Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. First Edition. Philadelphia, W.B Saunders Company, 1997; 262-267.
- 15- Berman I. Color Atlas of Histology. Second Edition. Connecticut, Appleton & Lange, 1998; 310-317.
- 16- Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology. Second Edition. USA, Saunders Elsevier, 2009; 378-387.
- 17- Ross MH, Pawlina W. Histology A Text and Atlas. 5th Edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 728-748.
- 18- Junquera LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology. Eleventh Edition. USA, The McGraw-Hill Companies, 2005; 418-429.
- 19- Kierszenbaum AL. Üreme sistemi In: Demir R, editör, Histoloji ve Hücre Biyolojisi. 1. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006; 531-564.
- 20- Özgür H, Kaya M, Doran Ş, Solmaz S. Ultrastructure of the seminiferous tubules in human testes before and after varicocelelectomy. Anat Embryol, 2003;207: 343–353.
- 21- Kaya M, Polat S, Mete UÖ, Tap Ö ve ark. Özel Histoloji Ders Notları. Adana, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları, 2006; 156-161.
- 22- Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, editor. Fundamental Immunology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999.
- 23- Özoran Y. Apoptosis. In: Robbins S, Cotran R, Kumar V, editors. Basic Pathology. 5th Edition. Philadelphia: WB Saunders company, 1992; 14-15.
- 24- Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2002;9(2): 143-148.
- 25- Guerrero A, Arias M. Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach. Third Edition. Boston, Academic Press, 2001; 1171-1184.
- 26- Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Menage a trois. Mutation Reserach, 2009;674: 3-22.

- 27- Guerrero A, Arias M. Apoptosis. *Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach*, Third Edition. Boston, Academic Press, 1998; 159-188.
- 28- Gastman BR. Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck*, 2001;23: 409-25.
- 29- Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and autoimmunity. In: Koopman WJ, editor. *A textbook of rheumatology: Arthritis and allied conditions*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- 30- Budd RC. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest*, 2002;109: 437-42.
- 31- Ferri KF, Kroemer G. Mitochondria-the suicide organelles. *BioEssays*, 2001;23: 111-115.
- 32- Schneider P, Tschoop J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 2000;74: 281-286.
- 33- Hilton DA, Love S, Barber R. Demonstration of apoptotic cells in tissue sections by in situ hybridization using digoxigenin-labelled poly-A oligonucleotide probes to detect thymidine-rich DNA sequences. *J Histochem Cytochem*, 1997;42: 13-20.
- 34- Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU, Lock MTW et al. Apoptosis regulation in the testis: Involvement of bcl-2 family members. *Mol Reprod Development*, 2000;56: 353-359.
- 35- Kerr JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: Assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil*, 1991;95: 825-830.
- 36- 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.
- 37- Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y et al. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Repr*, 1999;61: 393-399.
- 38- Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW. Hormonal control of apoptotic cell death in testis: Gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol*, 1993;7: 643-650.
- 39- Blanco- Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl*, 1998;19(4): 487-497.

- 40- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th. Edition. New York, Oxford Science Publications, 2006.
- 41- Tamer L, Polat G, Eskandari G. Serbest radikaller. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2000;1: 52-58.
- 42- Dean RT, Fu S, Stocker R. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. Biochemistry Journal, 1997;324: 1-18.
- 43- Chung HY, Baek BS, Song SH. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. Age, 1997;20: 127-140.
- 44- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact, 2006;160(1): 1-40.
- 45- Kasprzak KS. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. Free Radic Biol Med, 2002;32(10): 958-967.
- 46- De Zwart LL, Meerman JH, Commander JN. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and humans. Free Radic Biol Med, 1999;26: 202-226.
- 47- Akkus İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları Sağlık Dizisi, 1995;5: 28-42.
- 48- Cheeseman K, Slater T. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull, 1993;49(3): 481-493.
- 49- Janos Z, Krishnamurti D. Oxidative Stres and Disease 10: Nutrients and Cell Signaling. NewYork, Taylor & Francis, 2005.
- 50- Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology Association, 1997;3(4): 92-95.
- 51- Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. J Androl, 1992;13: 450-455.
- 52- Atiken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. Oxid Med Cell Longev, 2008;1(1): 15-24.
- 53- El-Missiry MA, Shalaby F. Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. J Biochem Mol Toxicol, 2000;14: 238-243.
- 54- Langcake P, Pryce RJ. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. Phytochemistry, 1976;16: 1193-1196.

- 55- Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*, 2000;66(8): 663-673.
- 56- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem*, 1997;30(2): 91-113.
- 57- Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 2000;141(10): 3657-3667.
- 58- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Ricci T, Jantzen F et al. Endothelium, dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995;26: 90-95.
- 59- Jäger U, Nguyen-Duong H. Relaxant effect of trans-resveratrol on isolated porcine coronary arteries. *Arzneimittelforschung*, 1999;49(3): 207-211.
- 60- Falchetti R, Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M et al. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci*, 2001;70: 81–96.
- 61- Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA et al. Immunomodulatory activity of resveratrol: Suppression of lymphocyte proliferation, development of cell mediated cytotoxicity and cytokine production. *Biochem Pharmacol*, 2001;2: 1299–1308.
- 62- De La Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: Mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans*, 2007;35: 1156-1160.
- 63- Li-Man H, Ming-Jai S, Wing-Keung C, Chin-Wei C et al. The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *Br J Pharmacol*, 2002;135: 1627-1633.
- 64- Fulgenzi A, Bertelli AA, Magni E, Ferrero E et al. In vivo inhibition of TNF alpha-induced vascular permeability by resveratrol. *Transplant Proc*, 2001;33: 2341-2343.
- 65- Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low- density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr*, 1998;68(2): 258-265.
- 66- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J et al. A role for estrogens in the male reproductive system. *Nature*, 1997;390: 509–511.
- 67- Brown KG. Arsenic, Drinking Water and Health (A Report Prepared for ACHS). USA, 2002.
- 68- Wirth JJ, Mijal RS. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Syst Biol Reprod Med*, 2010;56(2): 147-167.

- 69- Johnsen SG. Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results of 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1970; 1(1): 2–25.
- 70- Chang SI, Jin B, Youn P, Park C et al. Arsenic induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007;218(2): 196-203.
- 71- Garcia-Chavez, Segura B, Merchant H, Jimenez I et al. Functional and morphological effects of repeated sodium arsenite exposure on rat peripheral sensory nerves. *J Neurol Sci*, 2007;258(1-2): 104-110.
- 72- Das J, Ghosh J, Manna P, Sinha M et al. Taurine protects rat testes against NaAsO_2 induced oxidative stress and apoptosis via mitochondrial dependent and independent pathways. *Toxicol Lett* 2009;187(3): 201-210.
- 73- Kasdallah Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M et al. Protective effects of resveratrol on ethanol induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol Alcohol*, 2006;41(3): 236-239.
- 74- Sener G, Tuğtepe H, Yüksel H, Cetinel S et al. Resveratrol improves ischemia/reperfusion induced oxidative renal injury in rats. *Arch Med Res*, 2006;37(7): 822-829.
- 75- Uguralp S, Mızrak B, Bay Karabulut A. Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg*, 2005;15(2): 114-119.
- 76- Pal S, Chattrjee AK. Possible beneficial effects of melatonin supplementation on arsenic induced oxidative stress in wistar rats. *Drug Chem Toxicol*, 2006;29(4): 422-433.
- 77- Wang J, He D, Zhang Q, Han Y et al. Resveratrol protects against cisplatin induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Cancer Biother Radiopharm*, 2009;24(6): 675-680.
- 78- Das AK, Bag S, Sahu R, Dua TK et al. Protective effect of *Corchorus olitorius* leaves on sodium arsenite-induced toxicity in experimental rats. *Food Chem Toxicol*, 2010;48(1): 326-335.
- 79- Jiang Y, Peng T, Luo Y, Li M et al. Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2,5-hexanedione. *Chin Med J*, 2008;121(13): 1204-1209.

80- Uguralp S, Usta U, Mızrak B. Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg*, 2005;15(5): 333-336.

81- Sanghamitra S, Hazra J, Upadhyay SN, Singh RK et al. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J Physiol Pharmacol*, 2008;52(1): 84-90.

82- Manna P, Sinha M, Sil PC. Protection of arsenic induced testicular oxidative stress by arjunolic acid. *Redox Rep*, 2008;13(2): 67-77.

83- Das Neves RN, Carvalho F, Carvalho M, Fernandes E et al. Protective activity of hesperidin and lipoic acid against sodium arsenite acute toxicity in mice. *Toxicol Pathol*, 2004;32(5): 527-535.

84- Zhao XY, Liu Y, Chai LM, Chen JX et al. Resveratrol protects against arsenic trioxide induced cardiotoxicity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 2008;154(1): 105-113.