

Sigara dumanına maruz kalan sıçanlarda resveratrolün testis dokusundaki antioksidan etkisinin değerlendirilmesi

Evaluation of antioxidant effect of resveratrol on testicular tissue in rats that were exposed to cigarette smoke

Haluk Söylemez¹, Yahya Murat Uğraş², Ali Beytur², Fatih Oğuz², Meltem Kuruş³, Aysun Bay Karabulut⁴

¹Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

²İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Malatya

³İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Malatya

⁴İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya

Özet

Amaç: Bu çalışmanın amacı sigaranın sıçan testis biyokimyası ve histolojisi üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya koymak ve bu etkinin resveratrol ile değiştirilip değiştirilemeyeceğini incelemektir.

Gereç ve yöntem: Bu çalışma için 32 erkek Wistar Albino sıçan 4 gruba ayrılarak 6 hafta süren bir deney yapıldı. Grup 1 kontrol olarak belirlenirken, Grup 2 sadece sigara dumanına maruz bırakıldı. Grup 3'e sadece 10 mgr/kg/gün intraperitoneal resveratrol uygulandı. Grup 4 ise hem sigara dumanına maruz bırakıldı, hem de eşzamanlı 10 mgr/kg intraperitoneal resveratrol uygulandı. Deney sonunda hayvanların tümü sakrifiye edilerek testisleri alındı. Testis dokusunda malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH) ve nitrik oksid (NO) düzeylerine bakıldı; doku örnekleri ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Hayvanların tartı takibinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi. Sigara ile birlikte resveratrol verilen grupta sadece sigara verilen gruba göre MDA seviyelerinde düşüş gözlemlendi. Sadece sigara grubunda GSH seviyesinde anlamlı düşüş ve sigara ile birlikte resveratrol verilen gruptaki GSH seviyesindeki artış görüldü. NO seviyeleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi. Histolojik incelemede seminifer tübüllerdeki spermatogenezi gösteren Johnsen skoru sadece sigara verilen grupta diğer gruplardan anlamlı olarak düşük bulundu.

Sonuç: Sigara dumanına maruz kalan sıçanlarda testiste oksidatif stres ortaya çıkmaktadır ve resveratrol direkt veya dolaylı antioksidan etkisiyle bu hasarı önlemede etkilidir.

Anahtar sözcükler: Resveratrol; sigara; testis.

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the negative effects of cigarette on testicular biochemistry and histology of rats and to evaluate if resveratrol could alter these effects.

Materials and methods: Thirty-two male Wistar Albino rats were divided into 4 groups for an experiment of 6 weeks. Group 1 was used as control; Group 2 was only exposed to cigarette smoke. Group 3 only received intraperitoneal injections of resveratrol (10 mg/kg/day). Group 4 was exposed to both cigarette smoke and resveratrol (10 mg/kg/day). At the end of the experimental period, the rats were sacrificed and testes of all rats were removed. Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and nitric oxide (NO) levels were measured on testicular tissue and histopathologic examination was performed with light microscope.

Results: Weight follow-up of rats revealed no significant difference among groups. MDA level was lower in cigarette smoke and resveratrol group than that of only cigarette smoke group. GSH level showed significant decrease in only cigarette smoke group, while GSH level increased in cigarette smoke and resveratrol group. Differences in NO levels were not statistically significant among groups. The histological evaluation revealed that Johnsen score which indicates spermatogenesis was significantly lower only in cigarette smoke rats than all other groups.

Conclusion: Oxidative stress develops in testis of rats that were exposed to cigarette smoke, and resveratrol has preventive effects on this damage with direct or indirect antioxidant activity.

Key words: Cigarette; resveratrol; testis.

Sigara, içinde barındırdığı çeşitli toksik maddelerle organizmadaki bütün sistemleri olumsuz etkilemektedir. Hücre siklusu hızlı olan spermatozoanın sigara dumanında bulunan mutajenik ve karsinojenik maddelere karşı daha hassas olduğu gösterilmiştir.^[1] Ayrıca sigaranın testis dokusunda oksidatif strese yol açtığı kanıtlanmıştır.^[2] Oksidatif stres serbest radikallerin yol açtığı ve hücrelere fiziksel hasar veren bir süreçtir. Vücutta serbest radikaller oksidatif fosforilasyon, ürik asit metabolizması ve prostoglandin sentezi gibi biyokimyasal olaylar sonucu sürekli olarak oluşur. Oksidatif stres, hücrel antioksidan sistemi oluşturan süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve melatonin tarafından giderilir.^[3]

Testis kan damarları açısından zengin bir organdır. Bu nedenle sigarada bulunan ve kanla taşınan toksik maddelerin bu organda oksidan-antioksidan sistem arasındaki dengeyi dokuların aleyhine değiştirmesi olasıdır. Bu durumda artan serbest radikaller, testiste doku hasarına yol açar. Oksidatif stresin spermatozoa fonksiyonlarını bozduğu ve anormal spermatozoa üretimine yol açtığı bilinmektedir.^[4]

Resveratrol (3, 4', 5-trihydroxy-trans-stilbene) üzüm ve şarapta bulunan antioksidan ve antiproliferatif etkili doğal bir fitoaleksindir. Yayınlar resveratrolün inflamatuvar olaylarda, aterosklerozda ve karsinogenezde düzenleyici rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca resveratrolün antioksidan, antisiklooksijenaz, lipid ve lipoprotein metabolizmasını düzenleyici etkinliği de gösterilmiştir.^[5-7]

Resveratrolün radikal süpürücü etkisi ile deoksiribonükleik asit (DNA) hasarını azalttığı gösterilmiştir.^[8] Resveratrolün sağlıklı sıçan testisinde spermatozoa miktarını resveratrol verilmeyen gruba göre anlamlı miktarda arttırdığı da gösterilmiştir.^[9] Testis torsiyonu yapılarak iskemi reperfüzyon oluşturulmuş sıçan testisinde de resveratrolün testiste oluşan oksidatif hasarı anlamlı olarak giderdiği ortaya konmuştur.^[6,10]

Sigaranın testis dokusunda oksidatif strese yol açtığı bilinmesine rağmen, resveratrolün antioksidan etkinliğinin bu durumu nasıl değiştirdiğini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada sigara dumanına maruz bırakılan sıçanlara resveratrol verilmesinin testis histolojisi ve biyokimyası üzerine olan etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

Gereç ve yöntem

Hayvanların seçimi ve hazırlığı

Çalışmada 40 adet Wistar Albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar 6 aylık olup ağırlıkları ortalama 328.71 ± 31.11 gr olarak ölçüldü. Çalışma İnönü Üniversitesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda, Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün belirlediği hayvan deneyi kuralları çerçevesinde ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alınarak yapıldı. Hayvanlar 40x60 cm'lik standart kafeslerde 4'erli gruplar halinde barındırıldı. Beslenmelerinde standart 8 mm'lik pellet yem ve günlük taze musluk suyu kullanıldı. Oda ışığı 12 saat aydınlık 12 saat karanlık, sıcaklık $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ve nem oranı $\%50 \pm 10$ olacak şekilde ayarlandı.

Deney hazırlığı ve kullanılan gereçler

Hayvanlar, uyum süreci tamamlanmasını takiben randomize olarak 8'erli 4 gruba ayrıldı. Her grup 4'erli 2 kafeste barındırıldı. Birinci gruba hiçbir ek işlem yapılmadı (Grup 1), ikinci grup sigara dumanına maruz bırakıldı (Grup 2), üçüncü gruba günlük intraperitoneal 10 mgr/kg resveratrol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) enjeksiyonu yapıldı (Grup 3), dördüncü gruba günlük olarak intraperitoneal 10 mgr/kg resveratrol enjeksiyonu yapıldı ve sigara dumanına maruz bırakıldı (Grup 4).

Boyutu 75x50x50 cm olan cam odacık şeklinde hazırlanan kabinin içerisine dört ayrı tel bölme yapılarak 2. ve 4. kafesteki sıçanlar bu bölmelere alındı. Her bölme 4 sıçan yerleştirildi. Dışarıdaki bölmenin içinde 1 sigara/saat olmak üzere sigara dumanı üretildi ve yakılan sigaranın hem ucundan hem de filtresinden çıkan duman hava motoru yardımı ile gaz odasının içine pompalandı. Hayvanlar gaz odasında 6 saat boyunca 6 adet sigara dumanına maruz bırakıldı. Sıçanların kaldığı bölmeler her gün sırayla değiştirilerek sigara dumanına dengeli maruziyetleri sağlandı (Şekil 1).

Hayvanlar başlangıçta ve 2 haftada bir tartılarak ağırlıkları kaydedildi. Yedinci haftanın ilk günü hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Son ağırlıkları ölçüldü. Genital kabarıklık hizasında orta hat kesisi yapılarak testisleri 4 sağ ve 4 sol olacak şekilde randomize olarak çıkarıldı. Epididimleri ayrılarak testislerin yaş ağırlıkları kaydedildi. Gruplar arasında fark olup olmadığının gösterilmesi için testis dokusunda biyokimyasal parametrelerden malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH) ve nitrik oksid (NO)

düzeylerine bakıldı. Dokudaki NO üretimini tayin etmek için NO'e göre daha stabil olan nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) seviyeleri ölçüldü. Nitrat seviyeleri modifiye kadminyum indirgenme testi ile saptandı. Nitrit seviyelerinin saptanması ise sulfanilamid ve naphthyletilen diamine (NDA) deazodidasyonu ile kararlı hale getirildikten sonra örnekler deproteinize edildi. Nitrat bakır kaplı kalsiyum ile glisine tampon içinde pH 9.7'ye indirgendi. Absorbans, 90 dakika sonra 545 nm dalga boyunda ölçülerek nmol/gwet doku cinsinden verildi.

Histopatolojik inceleme için çıkarılan testisler Bouin's solüsyonunda tespit edilerek hemotoksilen-eozin (H-E) boyaması uygulandı. Her kesitte 10 seminifer tübül değerlendirilerek, Johnsen kriterlerine göre 1'den 10'a kadar skorlandı.

İstatistiksel hesaplamalar SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) yazılımı kullanılarak yapıldı. Tek örneklemeli *Kolmogorov-Smirnov* testi ile verilerin normal dağılıma uyup uymadığı incelendi. Tüm gruplarda normal dağılım olması durumunda, grup içi değerlendirmeler *one-way Anova* testi ve gruplararası karşılaştırmalar post-hoc testlerden *Least Significant Difference* parametrik testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma (ort. $\pm$ SS) olarak verildi.

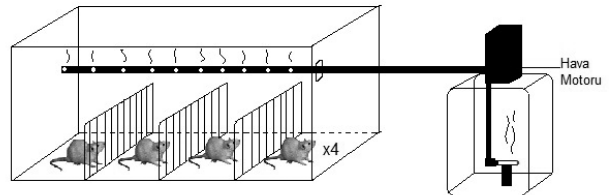
Bulgular

Deney sonuna kadar bütün sıçanlar yaşatıldı. Sıçanların başlangıçtaki ağırlıkları ile deney süresi boyunca ölçülen ağırlıkları açısından gruplar arasında fark yoktu ($p > 0.05$). Aynı şekilde takip eden ölçümlerde de ağırlıkları açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$). Deney sonunda çıkarılan testis yaş ağırlığı açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 1).

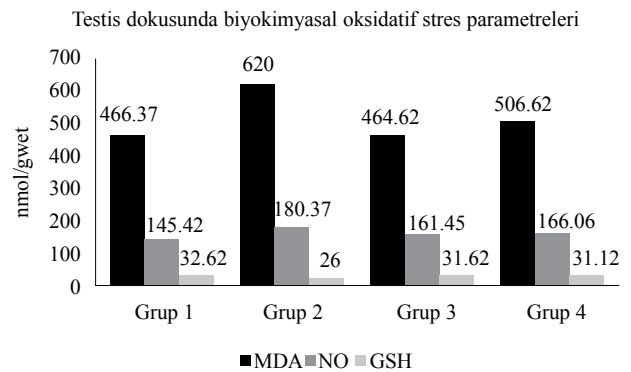
Dört grubun testis MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, Grup 2 sıçanlarda MDA düzeyi istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p < 0.05$). MDA doku düzeyi açısından kontrol grubu ve diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Ayrıca testis GSH düzeyleri Grup 2 sıçanlarda diğer gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.05$). GSH doku düzeyi açısından kontrol grubu ve diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Dört grubun testis NO düzeyleri ince-

lendiğinde, Grup 2 sıçanlarda daha yüksek değerler saptanmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$). Testis dokusunda ölçülen MDA, GSH ve NO değerleri Şekil 2'de verilmiştir.

Testis dokusunun histolojik incelemesinde, Grup 1 sıçanların testis dokusu normal karakterde izlendi, patolojik bir görünüm yoktu (Şekil 3a). Grup 2'de sıçan testis dokusunu dıştan saran tunika albuginea hafif kalınlaşma izlendi. İntersisyal alanda kontrol grubundaki gibi eozinofilik sitoplazmalı, büyük eksantrik ve kromatinden fakir çekirdekli, 1-2 çekirdekçikli normal histolojideki Leydig hücrelerine rastlandı. İntersisyal bağ dokusunda da hafif kalınlaşma izlendi. Seminifer tübül sınırlarının genellikle bozulduğu, ancak yer yer normal alanların da bulunduğu izlendi. Sınırları bozulmuş tübül epitelinde vakuolizasyon alanları mevcuttu. Bu tübüllerde genelde germ hücre diziliminin bozulduğu ve spermiyogenezin duraksadığı gözlemlendi. Bazı tübüllerin lumeninde immatür hücrelere rastlanırken bazı tübüllerde Sertoli hücrelerinde artış gözlemlendi (Şekil 3b). Üçüncü grupta histolojik



Şekil 1 Sıçanların sigara dumanına maruz bırakıldığı düzenek.



Şekil 2 Gruplara göre testis dokusunda ölçülen ortalama MDA, GSH ve NO değerleri.

görünümünün kontrol grubuyla benzerlik gösterdiği, tunika albugineanın normal kalınlıkta olduğu, seminifer tübül aralarını dolduran intersisyel bağ dokusunun kan ve lenf damarlarından zengin gevşek bağ dokusu olduğu gözlemlendi (Şekil 3c). Dördüncü grupta histolojik değişikliklerin kontrol grubuna benzer olduğu saptandı. Ancak bazı alanlarda sadece sigara alan gruptakine benzer şekilde az miktarda vakuolizasyon ve buna bağlı olarak seminifer tübüllerde germ hücre diziliminin bozulduğu gözlemlendi (Şekil 3d).

Her bir testis örneğinin histolojik kesitlerinde Johnsen skorlamasına göre saptanan değerler toplanarak bir sıçan için toplam Johnsen skoru saptandı. Toplam Johnsen skoru Grup 2'de istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0.05$) (Tablo 2).

Tartışma

Sigara, toplumun en önemli sağlık sorunlarından biridir. Günümüzde yaklaşık 1.1 milyar kişi sigara içmektedir ve bu insanların 800 milyonu gelişmekte olan ülkelerde yaşamaktadır. Yirminci yüzyılda dünyada 100 milyon kişi sigaraya bağlı ölmüş olup, kullanımında değişim olmazsa yirmibirinci yüzyılda bu rakamın 1 milyarı bulacağı tahmin edilmektedir.^[11] Sadece aktif kullanan insanlar değil, pasif içicilerin de sigara dumanının etkilerine maruz kaldığı düşünülürse sigaranın bu rakamlardan çok daha fazla sayıda insanı etkilediği gerçeği ortaya çıkmaktadır. Günümüz tıbbının üzerinde çalıştığı ve daha da çalışması gereken konulardan biri de bu kadar yaygın kullanılan bir maddenin içinde bulunan kimyasalların vücuttaki etkilerine karşı önlem alabilmektir.

Sigaranın erkek cinsel sağlığı ve üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Bu etkilerin hormonal yapının değişmesine bağlı olduğunu iddia eden çalışmalar olduğu gibi,^[12] DNA hasarına bağlı olduğu veya kaudal spermatozoa içeriğinde sayı ve motilitenin azaldığını ve Leydig hücre sekretuar fonksiyonunda bozulma olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur.^[13-15]

Sigaranın vücuttaki olumsuz etkilerinin dokularda oluşturduğu oksidatif strese bağlı olduğu bilinmektedir. Oksidatif stres serbest radikallerin dokularda fiziksel hasara yol açtığı bir süreçtir. Bu hasar antioksidan maddelerle giderilmeye çalışılır.^[3] Serbest radikaller sigaraya bağlı olarak testiste de oksidatif strese sebep olur.^[2] Testiste sigara dışı nedenlerle oksidatif stres geliştiği ve oluşan serbest radikallerin antioksidanlarla giderildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur.^[6,10] Bu çalışmalarda kuvvetli bir antioksidan olan resveratrolün testiste iskemi-reperfüzyon ile oluşturulan oksidatif stres üzerinde olumlu etkileri de gösterilmiştir. Öte yandan sigaraya bağlı olarak testiste oluşan oksidatif hasarın antioksidan bir madde olan kafeik asit feniletel ester (CAPE) ile giderildiği de gösterilmiştir.^[2]

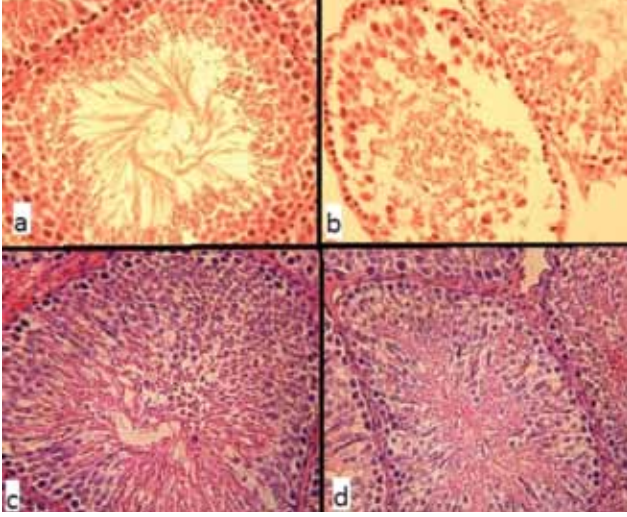
Biz de bu çalışmada, sigara dumanına maruz bırakılan sıçanlarda testiste oksidatif strese bağlı meydana gelen histolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile resveratrolün bunlar üzerine etkisini araştırdık. Çalışmamızda testiste oksidatif stres belirteçlerinden biri olarak doku MDA düzeyleri değerlendirildi. Artmış MDA konsantrasyonu, lipid peroksidasyonunu ve doku hasarını işaret eder.^[16] Yaptığımız

Tablo 1. Deney bitiminde (6. hafta) hayvanların toplam ağırlıkları ve çıkarılan testis yaş ağırlıkları (Ort.±SS).

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p değeri
Sıçanların toplam ağırlıkları	343.12±40.83	346.00±35.90	340.87±37.01	343.12±20.61	>0.05
Testis yaş ağırlıkları	1.46±0.19	1.53±0.21	1.46±0.10	1.56±0.13	>0.05

Tablo 2. Johnsen (Jn) testis biopsi skoru karşılaştırması (Ort.±SS)

	Jn 6	Jn 7	Jn 8	Jn 9	Jn 10	Jn toplam
Grup 1	0	0.25±0.46	0.62±0.51	0.37±0.51	8.75±0.46	97.62±1.40
Grup 2	0.50±0.75	1.25±1.03	1.62±1.40	2.87±1.24	3.50±1.19	86.87±4.38
Grup 3	0	0.12±0.35	1.00±0.75	2.12±0.99	6.75±1.03	95.50±1.69
Grup 4	0	0	0.62±0.51	2.25±1.03	7.12±0.83	96.50±0.92



Şekil 3

Gruplara göre seminifer tübüllerin histolojik görüntüsü (x400, H-E). (a) Grup 1'de normal histolojik görünümlü seminifer tübül. (b) Grup 2'de sınırları bozulmuş seminifer tübül. Germ hücre dizilimi bozulmuş, spermiogenez duraksamış ve atrofiye giden tübül. (c) Grup 3'de normal histolojik görünümlü seminifer tübül. (d) Grup 4'de az miktarda vakolizasyon dışında normal seminifer tübül.

çalışmada doku MDA düzeyleri sigara verilen grupta anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$). Diğer gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı olarak fark bulunmadı ($p > 0.05$). Sigara dumanının etkilerinin diğer dokularda ve testiste araştırıldığı çalışmalarda doku MDA düzeylerinin uygun bir parametre olduğu gösterilmiştir.^[2,17] Aynı şekilde resveratrolün oksidatif stres üzerine olumlu etkisini, dokularda MDA düzeylerini azaltarak gösterdiği de bilinmektedir.^[10,17,18] Ancak sigara dumanına maruziyet ile birlikte resveratrol verilerek doku MDA düzeylerinin değerlendirildiği bir çalışma yoktur. Bu bilgilerden hareketle çalışmamız, resveratrolün sigaranın oksidatif stres sonucu lipid peroksidasyonu ile oluşturduğu doku hasarını olumlu olarak etkilediğini, ancak normal dokuda MDA düzeyleri üzerine etkisinin olmadığını göstermiştir.

Bir diğer biyokimyasal parametre olarak testis GSH düzeyleri incelendi. Nitekim GSH süperoksit radikale karşı hücrel savunma sisteminin kilit bileşenidir. GSH konsantrasyonu ve hücrel glutatyonun sülfidril grubunun disülfide (GSH-GSGG^-) yükseltgenme hızı oksidatif stresin bir göstergesidir. GSH seviyelerinin süperoksit radikali ile süperoksit kökenli diğer bileşenlerin yarattığı lipid peroksidasyon

miktarı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir.^[19] Doku GSH düzeyleri sadece sigara verilen grupta diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.05$). Diğer gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$). Literatürde gerek sigara dumanı gerekse diğer sebeplerle oksidatif stres oluşturulan çalışmalarda doku GSH düzeylerinin oksidatif sürecin takibi için iyi bir parametre olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda da doku GSH düzeylerinin resveratrol ile arttığı gösterilmiştir.^[10] Ancak sigara dumanına maruziyet ile birlikte resveratrol verilerek doku GSH düzeylerinin bakıldığı bir çalışma yoktur. Yaptığımız çalışmada sigara dumanına maruz kalan grupta GSH düzeylerinin düşmesi, oksidatif stres halinde dokuda GSH tüketiminin artması ile açıklanabilir. Sigara ve resveratrolün beraber verildiği grupta GSH seviyelerinin kontrol grubu ile aynı seviyede kalması resveratrolün oksidatif stresi azaltarak GSH tüketimini düşürmesine bağlı olduğu düşünülmüştür. Sadece resveratrol verilen grupta kontrol grubuna göre artış olmaması da bu düşüncüyü desteklemektedir.

Oksidatif stres sürecinde NO seviyelerindeki artış çok hassas ve dinamik bir bulgudur. Bu çalışmada da oksidatif stresin ve resveratrolün etkilerini değerlendirmek için doku NO düzeyleri incelendi. Aslında NO, serbest radikal oluşumunda etkili bir maddedir ancak bunu kendi başına değil, diğer serbest radikallerin oluşumuna katkıda bulunarak dolaylı yoldan gerçekleştirmektedir. Nitrit oksit sentetaz (NOS) dokularda NO sentezinin gerçekleşmesine yol açan prooksidatif bir enzimdir. NOS'un inhibisyonu NO düzeyini azaltarak serbest radikal oluşumunu engelleyebilir. Resveratrolün NOS aktivitesini inhibe ettiği ve oksidatif stres sonucu yükselen doku NO düzeylerini düşürdüğünü gösteren çalışmalar mevcuttur.^[20] Sigara dumanına maruz bırakılmış sıçanlarda da doku NO düzeylerinin yükseldiği ve antioksidan bir madde olan CAPE ile NO düzeylerinin düştüğü gösterilmiştir.^[2] Çalışmamızda 4 grubun NO düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$). Bu çalışmada NO düzeylerinin birbirine oldukça yakın olup, aralarındaki küçük farkların da istatistiksel olarak anlamlı olmamasına sebep olarak sigaraya maruz kalma süresinin NO üzerinde daha belirleyici bir faktör olması düşünülmektedir. Ozyurt ve ark.^[2] tarafından yapılan çalışmada, 60 gün gibi daha uzun süre sigaraya maruz bırakılmış sıçanlarda

testis NO değerlerinin kontrol grubu ile yakın değerleri olduğu ancak farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Bu konuda ileri sürülecek diğer sebep ise çalışmamızda kullandığımız resveratrolün dozunun NO düzeylerini etkileyebilecek konsantrasyona ulaşmaması olabilir.

Doku örneklerinde MDA ve GSH düzeyleri anlamlı olarak farklı iken NO düzeylerinin farklı olmamasının diğer bir nedeni de lipid peroksidasyonundan sorumlu tek faktörün NO olmaması şeklinde düşünülebilir. Yani NO dışındaki sebepler de sigaranın etkilerinin ortaya çıkmasında rol almış olabilir.

Bu çalışmada histolojik parametrelerden Johnsen skoru kullanıldı. Bunun nedeni Johnsen skorunun seminifer tübüllerde gerçekleşen spermatogenezin yeterliliğini ve olgun spermatozoa sayısını vermesidir. Spermatogenez üzerine sigaranın olumsuz etkilerinin olduğu artık yaygın bir şekilde bilinmektedir.^[21,22] İskemi-reperfüzyon modeliyle oluşturulan oksidatif strese de spermatogenezin olumsuz etkilendiği ve semen spermatozoa sayısının düştüğü gösterilmiştir.^[6] Aynı çalışmada resveratrolün oksidatif stres sonucu germ hücrelerinde meydana gelen apoptozisi azalttığı kanıtlanmıştır. Antioksidanların oksidatif stres sonucu bozulan spermatogenez üzerine olumlu etkilerinden hareketle sigara ve resveratrolün testiste ortaya çıkaracağı etkilerin Johnsen kriterleri ile aydınlatılabileceğini düşündük.

Dört grubun testis seminifer tübülleri histolojik olarak incelendiğinde Johnsen skoru sadece sigara verilen grupta diğerlerinden anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). Diğer iki grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Bulgularımız ışığında sigara dumanına maruziyetin tübüler spermatozoa maturasyonunu bozduğu saptandı. Sigara dumanı ile birlikte resveratrol kullanılmasının spermatozoa maturasyonunu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benzer kaldığı görüldü. Sigara dumanına maruziyetle birlikte resveratrol verilmesinin sperm maturasyon süreci üzerindeki olumsuz etkiyi değiştireceğini düşünüyoruz. Doksan gün boyunca 20 mgr/kg/gün resveratrol verilen sıçanlarda tübüler dansitenin azaldığını ve semen sperm sayısının arttığını gösteren çalışma mevcuttur.^[9] Bizim yaptığımız çalışmada resveratrol verilen sıçanlarda sperm maturasyonunun kontrol grubu ile benzer olduğu görüldü. Bunun nedeni, çalış-

mamızda sıçanlara verilen resveratrol doz ve süresinin Juan ve ark.^[9] tarafından yapılan çalışmadakinden daha az olması olabilir.

Bu konuda bizim çalışmamızdan daha uzun süreli olarak sigara dumanına maruz bırakılacak ve resveratrol dozunun artırılarak yapılacağı yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Yapılacak çalışmalarda histolojik incelemelerin ultrastrüktürel seviyede elektron mikroskobu ile değerlendirilmesi bu konuda daha fazla bilgi verecektir.

Sonuç olarak, sigara dumanının, sıçan testisinde oksidatif strese yol açtığını, bu sürecin bir parçası olarak doku MDA düzeylerini arttırdığını ve doku GSH düzeylerini azalttığını saptadık. Aynı şekilde, dumana maruziyetin toplam Johnsen skorunu düşürdüğünü gördük. Sigara dumanına maruziyet esnasında resveratrol verilmesinin doku MDA düzeyini düşürdüğünü, doku GSH düzeyini azalttığını, toplam Johnsen skorunu arttırdığını ve doku NO düzeylerine etkisiz olduğunu gözlemledik.

Çalışmamızda sigara içmenin veya pasif olarak sigara dumanına maruz kalmanın testis dokusunda oksidatif hasara yol açtığı, sperm maturasyonunu bozduğu ve muhtemelen fertilité üzerine olumsuz etkisi olacağı sonucuna vardık. Bunu engellemek için ideal olan şüphesiz ki sigara içmemek ve pasif olarak sigara dumanına maruz kalmaktan kaçınmaktır. Ancak bunun önüne geçilemiyorsa sigara dumanına maruziyet sonucunda testiste ortaya çıkan olumsuz etkilerin resveratrol ile değiştirilebileceğini düşünüyoruz.

Çıkar çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

1. Stillman RJ, Rosenberg MJ, Sachs BP. Smoking and reproduction. *Fertil Steril* 1986;46:545-66.
2. Ozyurt H, Pekmez H, Parlaktas BS, Kus I, Ozyurt B, Sarsilmaz M. Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian J Androl* 2006;8:189-93. [\[CrossRef\]](#)
3. Kalra J, Chaudhary AK, Prasad K. Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. *Int J Exp Pathol* 1991;72:1-7. [\[CrossRef\]](#)
4. Zalata AA, Ahmed AH, Allamaneni SS, Comhaire FH, Agarwal A. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J Androl* 2004;6:313-8.

5. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 1995;235:207-19. [\[CrossRef\]](#)
6. Uguralp S, Usta U, Mizrak B. Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg* 2005;15:333-6. [\[CrossRef\]](#)
7. Kirimlioglu V, Ara C, Yilmaz M, Ozgor D, Isik B, Sogutlu G, et al. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, protects gastric tissue against the oxidative stress in cholestatic rats. *Dig Dis Sci* 2006;51:298-302. [\[CrossRef\]](#)
8. 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;68:258-65.
9. Juan ME, Gonzalez-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodriguez-Gil JE, Planas JM. Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *J Nutr* 2005;135:757-60.
10. Uguralp S, Mizrak B, Bay Karabulut A. Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg* 2005;15:114-9. [\[CrossRef\]](#)
11. World Health Organization. Fact Sheet No. 339. July 2011. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/index.html>
12. Valdes-Socin H, Vroonen L, Latta AI, Betea D, Petrossians P, Geenen V, et al. The endocrine effects of smoking. *Rev Med Liege* 2010;65:498-501.
13. Al-Azemi MK, Omu AE, Fatinikun T, Mannazhath N, Abraham S. Factors contributing to gender differences in serum retinol and alpha-tocopherol in infertile couples. *Reprod Biomed Online* 2009;19:583-90. [\[CrossRef\]](#)
14. Pacey AA. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Hum Fertil (Camb)* 2010;13:189-93. [\[CrossRef\]](#)
15. Gaur DS, Talekar MS, Pathak VP. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian J Pathol Microbiol* 2010;53:35-40. [\[CrossRef\]](#)
16. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186:421-31. [\[CrossRef\]](#)
17. Hung LM, Su MJ, Chu WK, Chiao CW, Chan WF, Chen JK. The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *Br J Pharmacol* 2002;135:1627-33.
18. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, Gharbi N, Kamoun A, et al. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol Alcohol* 2006;41:236-9. [\[CrossRef\]](#)
19. Meister A. Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids. *Biochem Soc Trans* 1983;11:793-4. [\[CrossRef\]](#)
20. Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:1988-95.
21. Kapawa A, Giannakis D, Tsoukanelis K, Kanakas N, Baltogiannis D, Agapitos E, et al. Effects of paternal cigarette smoking on testicular function, sperm fertilizing capacity, embryonic development, and blastocyst capacity for implantation in rats. *Andrologia* 2004;36:57-68. [\[CrossRef\]](#)
22. Soares SR, Melo MA. Cigarette smoking and reproductive function. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20:281-91. [\[CrossRef\]](#)

Yazışma (Correspondence): Yard. Doç. Dr. Haluk Söylemez.
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, 21100
Diyarbakır, Türkiye.
Tel: 0422 341 06 60-5825 e-posta: drhaluks@yahoo.com
doi:10.5152/tud.2011.044