

**MELATONİN VE C VİTAMİNİ'NİN KRONİK ALKOLİK
SIÇANLARIN TESTİS DOKUSUNDAKİ
HASAR VE eNOS İMMUNREAKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ***
**Effect of Melatonin and Vitamin C on Damage and Expression of
Endothelial NOS in Testes of Chronic Alcoholic Rats**

Mehmet Fatih SÖNMEZ¹, Derya AKKUŞ², Funda SELVİ³, Esra BALCIOĞLU⁴

Özet: Bu çalışmada alkolün testiste oluşturduğu hasar ve eNOS ekspresyonu üzerine melatonin ve C vitamini koruyucu etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada 24 adet 200-250 gr ağırlığında Wistar cinsi ergin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar rasgele olarak dört gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol (n:6); ikinci grup deney süresince (28 gün) alkol içeren sıvı diyet alan (n:6); üçüncü grup deney boyunca alkol içeren sıvı diyet ile birlikte 40mg/kg/gün intraperitoneal C vitamini alan (n:6); dördüncü grup deney süresince alkol içeren sıvı diyet ile birlikte 4mg/kg/gün intraperitoneal melatonin alan sıçanlardan (n:6) oluşturuldu. Deney süresince alkol içeren sıvı diyet alan gruptaki sıçanların testis dokularında ödem, damarlarda dilatasyon ve konjesyon tespit edildi. Bazı seminifer tübüllerde atrofi, spermatogenetik seriye ait hücrelerde lümen içine dökülme, dejenerasyon ve seminifer tübül epitelinde vakuolizasyon gözlemlendi. Melatonin ve C vitamini uygulanan gruplarda ise nispeten bazı bulgular düzelme gözlenmesine rağmen hasar devam etmekteydi. eNOS immunoreaktivitesi yapılan boyamada intertisyel Leydig hücrelerinde (++) ve tunika albuginea (+) boyanma ayırt edildi. Dejenere olan hücrelerde eNOS immunoreaktivitesinde artış saptandı. Melatonin ve C vitamini uygulanan gruplarda boyamada değişiklik saptanmadı. Sonuç olarak kronik alkol tüketiminin testiste dokusunda hasara yol açtığı, ancak bu hasarın melatonin ve C vitamini verilmesi ile kısmen düzeldiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kronik alkol tüketimi, testis, eNOS, melatonin, C vitamini

Summary: The aim of this study was to determine the alterations in testes caused by alcohol consumption and the effects of melatonin and vitamin C on these changes in rats. Twenty-four adult male Wistar rats weighting 200-250g were used in this study. Rats were divided into four groups. The first group served as control (n:6). The second group received ethanol treatment for 28 days (n:6). The third group was given ethanol and supplemented with 40 mg/kg/day vitamin C (intraperitoneally) (n:6). The fourth group was given ethanol and supplemented with 4 mg/kg/day melatonin (intraperitoneally) (n:6). Light microscopic examinations revealed testicular edema and dilatation and congestion of vessels in the ethanol-fed group. In some seminiferous tubules we observed atrophy, desquamation of seminiferous epithelium into the tubular lumen, epithelial degeneration and vacuolization. In melatonin and vitamin C treated groups, there was a partial recovery but the damage remained in a great extent. eNOS immunoreactivity was (++) in Leydig cells, (+) in some spermatogenic cells and (+) in tunica albuginea. eNOS immunoreactivity was increased in degenerated cells. In melatonin and vitamin C treated groups, no significant change in eNOS immunoreactivity was observed. Present results indicated that chronic alcohol consumption caused damage to testicles and especially melatonin and vitamin C administration produced in some degree provided protection against alcohol-induced damage.

Keywords: Chronic alcohol consumption, testes, eNOS, melatonin, vitamin C

¹ Yrd.Doç.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.His-Embr. AD, Kayseri

² Y.Lisans Öğr.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.His-Em. AD, Kayseri

³ Arş.Gör.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.His-Embr. AD, Kayseri

⁴ Arş.Gör.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.His-Embr. AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 21.07.2009 Kabul Tarihi : 24.03.2010

*Bu çalışma 22-25 Haziran 2009 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi tarafından düzenlenen 19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

Alkol tüketiminin erkek genital sistem aktivitelerini olumsuz yönde etkilediği hem insan, hem de laboratuvar hayvanları ile yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Alkol bir testiküler toksindir ve erkeklerde düşük sperm miktarı ve bozulmuş sperm hareketi ile dölllenme anormalliğine neden olmaktadır (1). Çok sayıdaki epidemiyolojik çalışmada aşırı alkol tüketiminin testosteron üretiminde bozulmaya ve testis atrofisine neden olduğu bildirilmektedir (2). Alkol bu etkilerinin bir kısmını hipotalamus-hipofiz-gonadal (HPG) aksını etkileyerek yapmaktadır (2-3). Alkolün veriliş şekline bağlı olarak plazma luteinleştirici hormon (LH) seviyesinin değişiklik gösterdiği, akut alkol uygulaması sonucu plazma LH seviyesinde hızlı bir düşüş gözlenmesine rağmen uzun süreli alkol uygulaması ile plazma LH seviyesinin normal sınırlara geldiği belirtilmektedir (4). Alkolün testis üzerine direkt olan etkisi metaboliti olan asetaldehite dönüşmesi sonucunda olmaktadır. Karaciğer dokusunda olduğu gibi testis dokusunda da alkol reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumuna neden olmaktadır. Bunun sonucunda ise lipid peroksidasyonu artar ve protein ve DNA'da oksidatif hasar meydana gelir (5).

Nitrik oksit (NO) vazodilatasyon, nörotransmitter ve immun cevap gibi değişik biyolojik fonksiyonlara katılan oldukça reaktif bir gaz molekülüdür. NO sentaz (NOS) argininden NO sentezini sağlayan enzimdir. NOS'un endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. NOS izoformları hipotalamus, hipofiz ve gonadal organlarda tanımlanmıştır (6-8). NO'nun HPG aksının regülasyonunda önemli rol aldığı bilinmektedir (9).

Melatonin pineal bezden salgılanan ve antioksidan özellikleri iyi bilinen bir hormondur. Değişik yollarla toksik olan oksijen ve nitrojen radikallerini yıkar ve antioksidatif enzimleri uyarır (10-11). Daha önceki çalışmalarda melatoninin testiste oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarını iyileştirdiği bildirilmektedir (12-14). C vitamini suda çözün-

vitaminlerden biridir. Vitamin C çok hızlı elektron transferiyle ROS'u temizler ve böylelikle lipid peroksidasyonunu inhibe eder ve sitotoksik serbest radikalleri ortadan kaldırır (15).

Daha önceki çalışmalarda bildirildiği üzere alkol oksidatif bir maddedir ve lipid peroksidasyonunu artırmaktadır. Biz bu çalışmada alkolün oksidatif hasarı üzerine antioksidan olarak melatonin ve C vitamini etkilerini ve bu süreç içinde eNOS'un bir rolünün olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde yapıldı. Erciyes Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulundan onay alındı. Çalışmada 24 adet 200-250 gr ağırlığında Wistar cinsi ergin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 28 günlük deney süresince 21 °C oda ısısında ve 12 saat aydınlık (7:00-19:00) ve 12 saat karanlık (19:00-7:00) döngüsünün uygulandığı ortamda çelik kafeslerde beslendi. Sıçanlar her bir grupta altı sıçan olacak şekilde rasgele olarak dört gruba ayrıldı. Birinci grup (kontrol) alkolsüz sıvı diyet ile beslenen sıçanlar; ikinci grup deney süresince alkol içeren sıvı diyet alan; üçüncü grup deney boyunca alkol içeren sıvı diyet ile birlikte günlük 40mg/kg/gün intraperitoneal C (Redokson, Bayer) vitamini uygulanan; dördüncü grup deney süresince alkol içeren sıvı diyet ile birlikte günlük 4mg/kg/gün intraperitoneal melatonin (Merck, kat. no:814537) uygulanan sıçanlardan oluşturuldu.

Kronik alkol tüketimi için deneklerin her biri ayrı kafeslere yerleştirildi. Modifiye sıvı diyet literatürde belirtildiği gibi hazırlandı (16). Çalışmanın başlangıcında bütün deneklere alışmaları için bir hafta boyunca alkol içermeyen sıvı diyet verildi. Bir hafta sonunda deney gruplarına üç gün %2,4 alkol içeren sıvı diyet verildi. Daha sonra izleyen günlerde alkol konsantrasyonu önce dört gün boyunca % 4,8, sonraki 21 gün boyunca ise %7,2 olacak şekilde ayarlandı. Kontrol grubu alkol içermeyen izokalorik sıvı diyet ile beslendi. Sıvı diyet günlük

olarak taze hazırlandı ve her gün aynı saatte (10:00) deneklere verildi. Sıçanların vücut ağırlıkları her gün ölçüldü ve aldıkları alkol miktarı günlük olarak kaydedildi. Denekler alkollü veya alkol-süz sıvı diyet dışında başka bir madde ile beslenmedi.

Deneyin sonunda sıçanlar intraperitoneal ketamin (100mg/kg) anestezisi altında dekapite edildi. Dekapitasyondan sonra testis dokuları hızlıca çıkarıldı. Klasik yöntemlere göre dokular %10'luk nötral formalin içinde 24 saat fikse edildi. Tespit edilen dokular musluk suyunda yıkandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilol ile şeffaflaştırılan dokular parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5–6 mm kalınlığında kesitler Hematoksilen-Eozin ve Masson'un üçlü boyası ile boyandı ve Olympus BX-51 fotomikroskopla incelenerek fotoğraflar elde edildi.

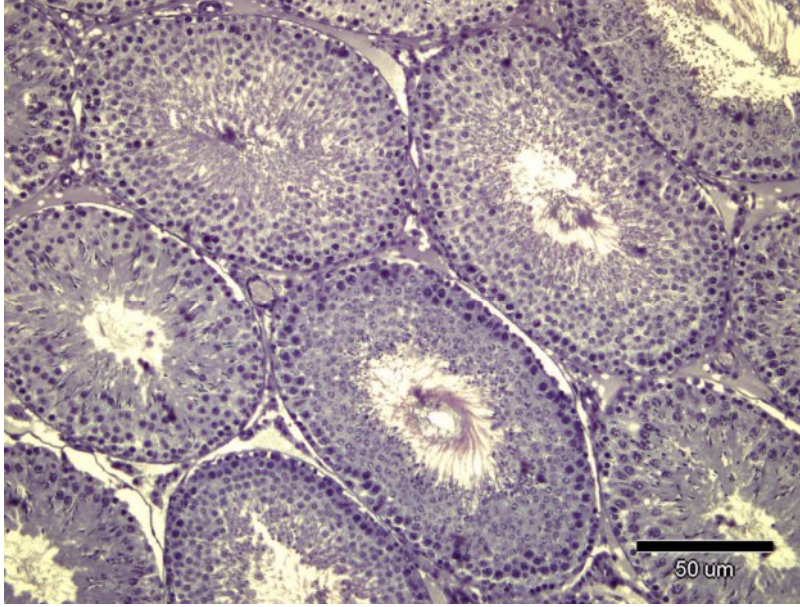
eNOS ekspresyonu streptavidin-biotin peroksidaz yöntemiyle (17) tavşan poliklonal antikorunu kullanarak testis dokularında immunohistokimyasal olarak saptandı. Parafin kesitler öncelikle ksilol ile deparafinize edildi. Deparafinize edilen kesitler dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildikten sonra 20 dak. antijen geri kazanımı için 2N HCl ile muamele edildi. Metanol içinde %3'lük H₂O₂ ile 10 dak. boyunca endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi. Daha sonra 3X5 dak. fosfat tamponuyla yıkanan dokular oda ısısında nemli ortamda 20 dak. fosfat tamponu içinde hazırlanmış %1.5'lik normal keçi serumu ile inkube edildi. Kesitler daha sonra 4 °C de bir gece boyunca eNOS (sc.654 Santa Cruz Biotechnology, USA) (fosfat tamponunda hazırlanmış %1,5 normal keçi serumunda sulandırılmış 2µg/ml eNOS) primer antikor ile muamele edildi. Negatif kontrol kesitlerine primer antikor yerine fosfat tamponu uygulandı. Kesitler daha sonra fosfat tamponuyla yıkandıktan sonra oda ısısında nemli ortamda 30 dak. boyunca biotinli tavşana karşı keçi IgG sekonder antikorunu

ile inkube edildi. Fosfat tamponu ile yıkanan dokular streptavidin-horseradish-peroksidaz ile 30 dak muamele edildikten sonra Aminoetil Karbazol (AEC) (kırmızı) substrat kit ile 5 dak. boyandı. Son olarak hematoksilin ile zıt boyama yapılan dokular dsitile su ile yıkandıktan sonra kapatma solüsyonuyla kapatıldı.

Immunohistokimyasal boyama yoğunluğu iki histolog tarafından bağımsız olarak değerlendirildi. eNOS boyanma derecesi boyanma yoksa (-), az boyanma (+), orta boyanma (++) ve güçlü boyanma (+++) olacak şekilde skorlandı (17).

BULGULAR

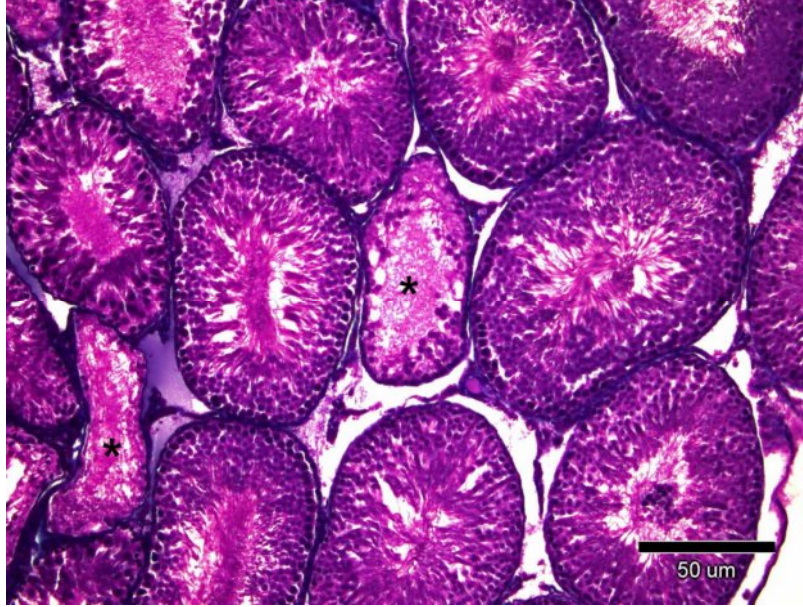
Günlük alkol tüketimi 13.4 ± 2.19 g/kg olarak belirlendi. Sıçanların vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı. Çalışmamızda ışık mikroskopik incelemelerde kontrol grubuna ait testis dokuları normal olarak gözlemlendi (Şekil 1). Deney süresince sadece alkol alan gruptaki sıçanların testis dokularında ödem, damarlarda dilatasyon ve konjesyon tespit edildi (Şekil 2). Bazı seminifer tübüllerde atrofi (Şekil 3), spermatogenetik seriye ait hücrelerde lümen içine dökülme (Şekil 4), dejenerasyon ve seminifer tübül epitelinde vakuolizasyon (Şekil 5) gözlemlendi. Melatonin ve C vitamini uygulanan gruplarda ise nispeten bazı bulgularda düzleme gözlenmesine rağmen hasar devam etmekteydi. eNOS immunoreaktivitesi yapılan boyamada intertisyel Leydig hücrelerinde (++) (Şekil 6), bazı spermatogenetik seriye ait hücrelerde (+) ve tunika albuginea (+) boyanma ayırt edildi. Alkol alan grupta eNOS immunoreaktivitesi kontrol grubuna benzerlik göstermekteydi ancak dejenere olan hücrelerde boyanmada artış saptandı (Şekil 7). Melatonin ve C vitamini uygulanan gruplarda boyanmada değişiklik saptanmadı. Negatif kontrol kesitlerinde primer antikor yerine PBS kullanıldı ve boyanma gözlenmedi (Şekil 8).



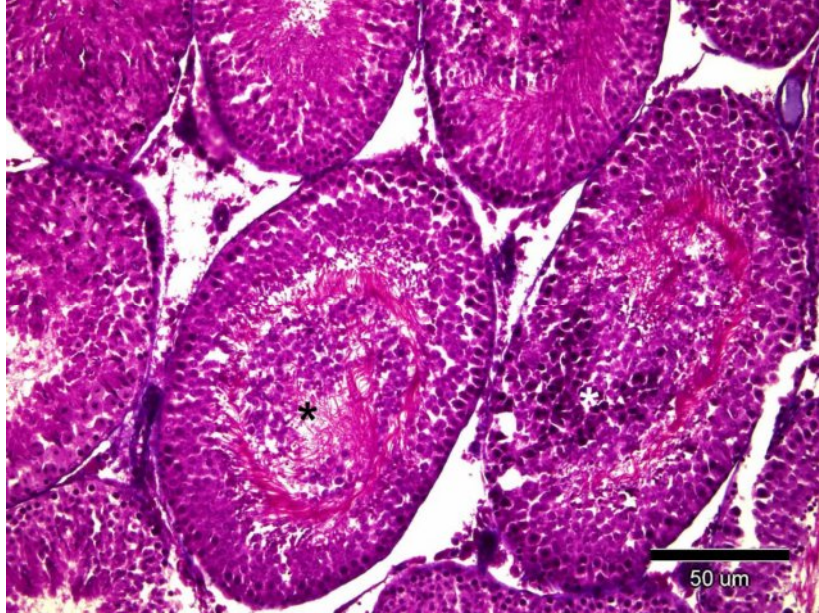
Şekil 1. Sıvı diyet ile beslenen kontrol grubu sıçanlarda testis dokusunda seminifer tübül yapıları normal olarak gözlenmekte. H&E. (Ölçek Çubuğu: 50 mm)



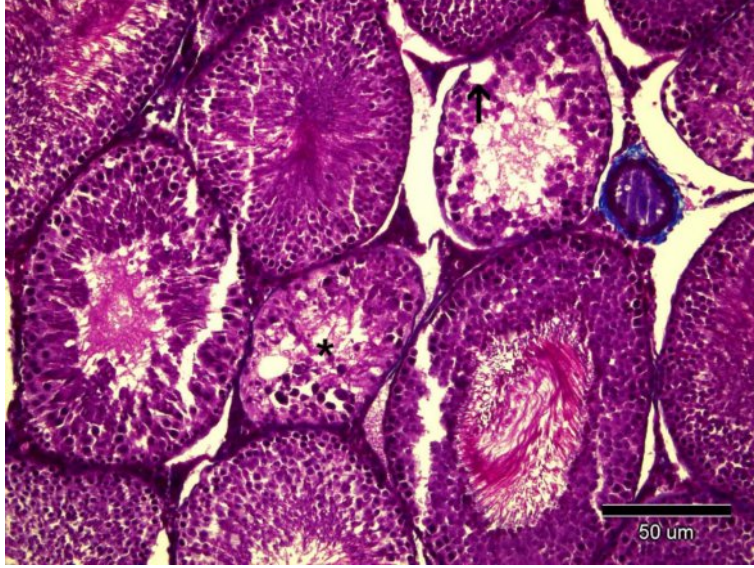
Şekil 2. Alkol içeren sıvı diyet alan ikinci grup sıçanların testis dokusunda seminifer tübüller arasında ödem ve kan damarlarında dilatasyon ve konjesyon ayırt edilmekte. H&E. (Ölçek Çubuğu: 50 mm)



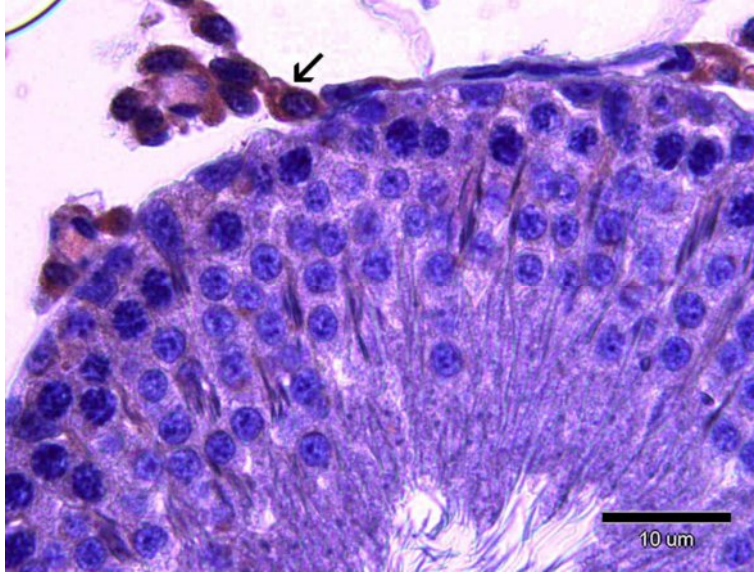
Şekil 3. Alkol içeren sıvı diyet alan ikinci grup sıçanların testis dokusunda normal tübüllerin arasında atrofiye ve dejenere olmuş seminifer tübüller (yıldız). Masson'un üçlü boyası. (Ölçek Çubuğu: 50 mm)



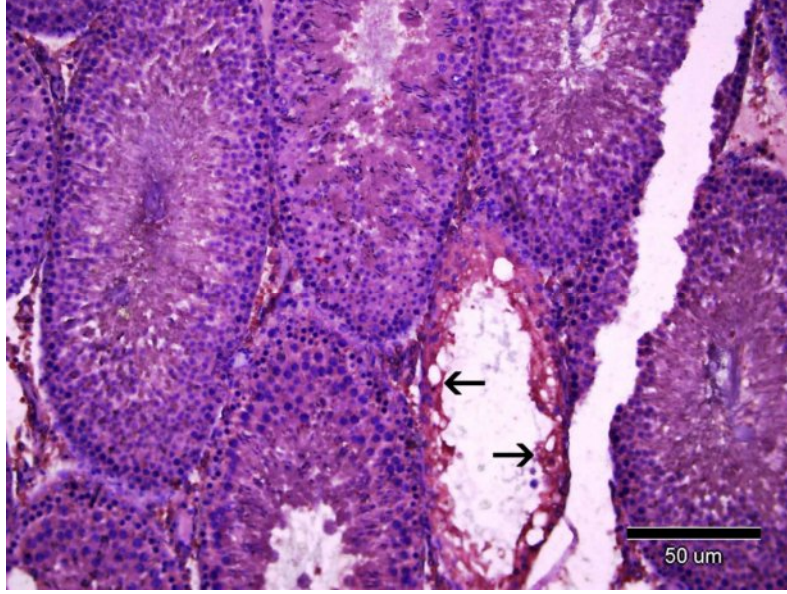
Şekil 4. Alkol içeren sıvı diyet alan ikinci grup sıçanların testis dokusunda seminifer tübül epitelinde lümene dökülmeler (yıldız). Masson'un üçlü boyası. (Ölçek Çubuğu: 50 mm)



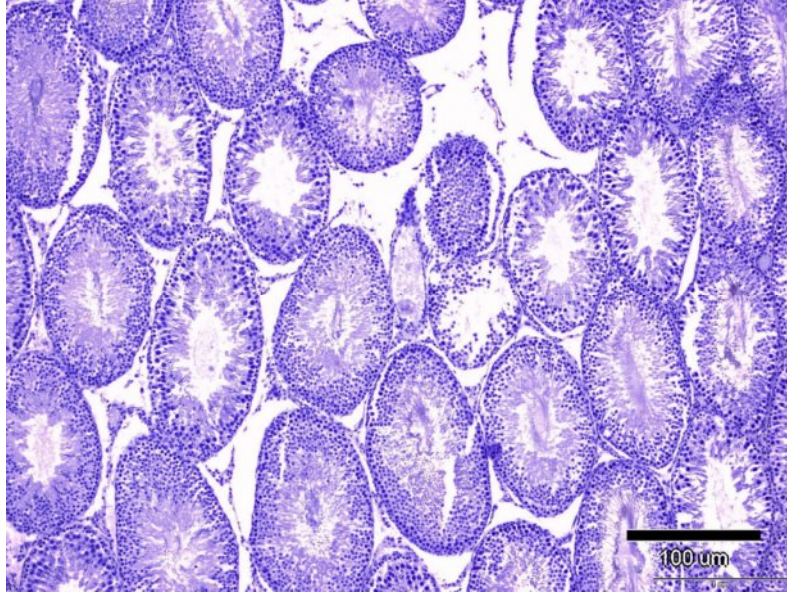
Şekil 5. Alkol içeren sıvı diyet alan ikinci grup sıçanların testis dokusunda seminifer tübül epitel hücreleri arasında vakuolizasyon (ok) ve tübül epitel düzeninin kaybolduğu (yıldız) ayırt edilmekte. Masson'un üçlü boyası. (Ölçek Çubuğu: 50 mm)



Şekil 6. Sıvı diyet ile beslenen kontrol grubu sıçanlarda özellikle intertisyel Leydig hücrelerinde (++) eNOS boyanması (ok) ayırt edilmekte. İmmunohistokimya. (Ölçek Çubuğu: 10 mm).



Şekil 7. Alkol içeren sıvı diyet alan ikinci grup sıçanların testis dokusunda atrofik ve dejenere olmuş seminifer tübül epitelinde artmış olan eNOS boyanması. İmmunohistokimya. (Ölçek Çubuğu: 50 mm)



Şekil 8. Negatif kontrol. (Ölçek Çubuğu: 100 mm)

TARTIŞMA

Alkol birçok toplulukta yaygın olarak kullanılan bir maddedir. Fazla miktarda alkol tüketiminin başta karaciğer olmak üzere gastrointestinal sistem, sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemde hasara neden olduğu bilinmektedir (18). Birçok çalışmada alkolün erkek genital sistem üzerine toksik etkili olduğu gösterilmiştir. Akut ve kronik alkol tüketiminin hipotalamusta LHRH ve hipofizde LH seviyesini azalttığı ve aynı zamanda testisten testosteron salgılanmasını baskıladığı bilinmektedir (19). Kronik alkol tüketiminin insanlarda ve deney hayvanlarında seksüel disfonksiyona neden olduğu ve sperm üretimini bozduğu bilinmesine karşın altta yatan mekanizma tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Birkaç muhtemel mekanizma savunulmaktadır. Bunlardan biri opioidlerdir. Testiküler opioidlerden olan beta-endorfin seviyesi akut ve kronik alkol tüketimi sonucunda artmaktadır ve bu testis hasarı ile ilişkili olabilir. Artan beta-endorfin testosteron sentezlenmesini ve salgılanmasını baskılamaktadır (20).

Alkolün testiste oluşturduğu hasarın bir diğer sebebi oksidasyon mekanizmasıdır. Oksidan ve antioksidanlar arasındaki denge bozulduğu zaman oksidatif stres oluşmaktadır. Kalp, karaciğer ve sinir sisteminde alkolle oluşturulan hasarın artmış oksidatif stres ile ilişkili olduğu çok iyi bilinmektedir (21). Emanuele ve arkadaşları (22) yaptıkları çalışmada alkolün oksidatif mekanizmayla testiste hasar oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada alkol verilen sıçanların testis dokularında ödem, damarlarda dilatasyon ve konjesyon tespit edildi. Bazı seminifer tübüllerde atrofi, spermatogenetik seriye ait hücrelerde lümen içine dökülme, dejenerasyon ve seminifer tübül epitelinde vakuolizasyon gözlemlendi. Martinez ve arkadaşları (23) alkol verilen deneklerin testis dokusunda seminifer tübüllerinin çapında düzensizlik, germinal epitel hücreleri arasında boşluklar, seminifer tübüller arasında dilatasyon ve seminifer tübül lümenine ölü hücrelerin döküldüğünü tespit etmişlerdir. Yine bu çalışmada elektron mikroskopik incelemelerde özellikle Sertoli hücreleri ve spermatogonyumların sitoplaz-

malarında lipit damlacıkları, epitelin bazal ve apikal yüzeyleri arasında açılma tespit edilmiş, ancak Leydig hücreleri kontrole yakın olarak izlenmiş. Gavalier ve arkadaşları (24) yaptıkları çalışmada etanol uygulanan sıçanların Leydig hücrelerinin daha küçük olduğu, daha az sitoplazma, daha büyük mitokondri ve daha az düz endoplazmik retikulum içerdiğini gözlemişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada etanol uygulaması testiste hücre proliferasyonunu azaltmakta ve apoptozisi artırarak erkek genital sistem aktivitesini baskılamaktadır (25). Bamac ve arkadaşları (26) da etanolün testis dokusunda apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir.

Serbest radikal üretimi ve lipit peroksidasyonu alkolün testiste oluşturduğu hasardan sorumlu olan mekanizmalardır. Antioksidanların azalması ve testis atrofisi arasında direkt bir korelasyon bulunmaktadır. Kronik alkol tüketiminde vitamin C, selenyum, glutatyon ve vitamin E gibi endojen antioksidanların baskılandığı bildirilmektedir (27). Melatonin antioksidan özellikleri olan, pineal bezden salgılanan bir hormondur (28-30). Melatoninin erkek üreme sistemi üzerine olan etkileri değişik hayvan deneylerinde incelenmiştir. Melatonin özellikle üreme sistemindeki reseptörlerine bağlandığı zaman steroid hormon sentezini tetiklemektedir (31,32). Melatonin Leydig hücrelerinde testosteron üretimini direkt olarak etkilemektedir (33-35). Alkol, sıçanlarda ve insanlarda melatonin üretimini baskılamaktadır (36). Kurcer ve arkadaşları (37) melatonin uygulamasının testiste iskemi-reperfüzyon ile oluşturulan histopatolojik bozuklukları düzelttiğini gözlemişlerdir. Bu çalışmada melatonin verilen sıçanların testis dokusunda alkol alan gruba göre germinal epiteldeki dökülme ve atrofik seminifer tübüllerde azalma gözlemlendi. Alkol grubunda görülen ödem ve damarlarda dilatasyon, melatonin uygulanan sıçanlarda gözlenmedi. Koruyucu amaçlı uygulanan melatonin kısmen düzelmeye sağladı. Bu bulgular literatürdeki bulgular ile uyumludur (33-37). Vitamin C suda çözünen antioksidan özellikleri bulunan bir vitamindir. Vitamin C uygulamasının kurşun ile testis-

te oluşturulan oksidatif hasarı ve sonucunda sperm motilitesindeki azalmayı düzelttiği bildirilmektedir (38). Başka bir çalışmada C vitamini uygulamasının kadmiyum ile oluşturulan hasara karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (39). Bu çalışmada alkol ile birlikte koruyucu amaçlı verilen C vitamini bazı hasarların oluşumunu engellediği belirlendi. Alkol grubunda oluşan ödem ve seminifer tübüllerinde hücre dökülmesi C vitamini uygulaması ile azalmıştı.

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) ile L-argininden sentezlenen kısa ömürlü biyolojik bir mediyatördür. NOS enzim ailesinin bugüne kadar endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilen NOS (iNOS) olmak üzere üç alt tipi tanımlanmıştır. Alkolün testiste oluşturduğu patolojiye aracılık eden mekanizmalardan biri de NO'dur. NOS hem hipofizin gonodotrop hücrelerinde hem de testisin Leydig ve sertoli hücrelerinde, damar endotelinde ve immun sistem hücrelerinde bulunmaktadır (40,41). Bizim yaptığımız bu çalışmada eNOS immunreaktivitesini Leydig hücreleri başta olmak üzere bazı spermatogenetik hücrelerde ve damar endotelinde gözlemledik. Alkol uygulaması ile bu hücrelerdeki eNOS boyanmasında bir değişiklik olmadı ancak dejenere olan seminifer tübüllerde eNOS boyanmasında bir artış tespit edildi. Bu artış NO'nun alkolün oluşturduğu testis hasarına aracılık edebileceğini düşündürmektedir. Melatonin ve C vitamini uygulamasının eNOS immunreaktivitesinde önemli bir değişiklik yapmadığı tespit edildi.

Sonuç olarak kronik alkol tüketimi testis dokusunda hasara yol açmaktadır. Antioksidan özellikleri olan melatonin ve C vitamini bu hasar kısmen azalmaktadır. eNOS immunohistokimyasal olarak kolaylıkla testis dokusunda tanımlanabilmektedir. Alkol tüketimi özellikle dejenere olan tübüllerde eNOS immunoreaktivitesini artırmaktadır. eNOS alkolün oluşturduğu testis hasarına aracılık edebilir. Bu konuda daha detaylı çalışmalar ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Alcohol abuseduration-dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants inmales. *Indian J Physiol Pharmacol* 2006, 50 (3): 291–296.
2. Cicero TJ, Meyer ER, Bell RD. Effects of ethanol on the hypothalamic-pituitary-luteinizing hormone axis and testicular steroidogenesis. *Pharmacol Exp Ther* 1979; 208: 210–15.
3. Adams ML, Little PJ, Bell B, Cicero TJ. Alcohol affects rat testicular interstitial fluid volume and testicular secretion of testosterone and betaendorphin. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 258:1008–14.
4. Giannessi F, Giambelluca MA, Grasso L, Scavuzzo MC, Ruffoli R. Curcumin protects Leydig cells of mice from damage induced by chronic alcohol administration. *Med Sci Monit* 2008; 14(11):237-42.
5. Quintans LN, Castro GD, Castro JA. Oxidation of ethanol to acetaldehyde and free radicals by rat testicular microsomes. *Arch Toxicol* 2005; 79:25–30.
6. Lloyd RV, Jin L, Qian X, Zhang S, Scheithauer BW. Nitric oxide synthase in the human pituitary gland. *Am J Pathol* 1995; 146:86-94.
7. Burnett AL, Ricker DD, Chamness SL, et al. Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. *Biol Reprod* 1995; 52:1-7.
8. Chamness SL, Ricker DD, Crone JK, et al. The effect of androgen on nitric oxide synthase in the male reproductive tract of the rat. *Fertil Steril* 1995; 63:111-1107.
9. Ceccatelli S, Hulting AL, Zhang X, et al. Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11292-11296.

10. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, et al. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Acta Biochim Pol* 2003; 50:1129-46.
11. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36:1-9.
12. Ozturk A, Baltacı AK, Mogulkoc R, Ozturk B. The effect of prophylactic melatonin administration on reperfusion damage in experimental testis ischemia-reperfusion. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; 24:170-2.
13. Abasiyanik A, Dagdonderen L. Beneficial effects of melatonin compared with allopurinol in experimental testicular torsion. *J Ped Surg* 2004; 39:1238-41.
14. Duru FI, Noronha CC, Akinwande AI, Okanlawon AO. Effects of torsion, detorsion and melatonin on testicular malondialdehyde level. *West Afr J Med* 2007; 26:312-5.
15. Halliwell B, Wasil M, Grootveld M. Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. *FEBS Lett* 1987; 213:15-17.
16. Uzbay IT, Kayaalp SO. A modified liquid diet of chronic ethanol administration: validation by ethanol withdrawal syndrome in rats. *Pharmacol Res* 1995; 31:37-42.
17. Sonmez MF, Colakoglu N, Kukner A, Ozan E, Dabak DO. Immunolocalization of TGF-beta2 in the rat thymus during late stages of prenatal development. *Acta Histochem.* 2009;111(1):68-73.
18. Lieber CS. Hepatic and other medical disorders of alcoholism: from pathogenesis to treatment. *J Stud Alcohol* 1998; 59:9-25.
19. Herman M, Kang SS, Lee S, James P, Rivier C. Systemic administration of alcohol to adult rats inhibits leydig cell activity: time course of effect and role of nitric oxide. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30(9):1479-1491.
20. Gianoulakis C. Characterization of the effects of acute ethanol administration on the release of beta-endorphin peptides by the rat hypothalamus. *European Journal of Pharmacology* 1990; 180:21-29.
21. SIES H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 1997; 82:291-295.
22. Emanuele NV, Lapaglı N, Steiner J, et al. Peripubertal Paternal Etoh Exposure. *Endocrine* 2001; 14(2): 213-9.
23. Martinez M, Macera S, de Assis GF, et al. Structural evaluation of the effects of chronic ethanol ingestion on the testis of Calomys callosus. *Tissue Cell* 2009; 41(3):199-205.
24. Gavaler JS, Perez HA, Estes L, Van Thiel DH. Morphologic alterations of rat Leydig cells induced by ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 1983; 1:341-7.
25. Koh PO, Kim MO. Ethanol exposure decreases cell proliferation and increases apoptosis in rat testes. *J Vet Med Sci* 2006; 8(10):1013-7.
26. Bamac Y, Colak T, Bamac B, et al. Comparative study on apoptosis in the testes of normal and alcoholic rats. *Saudi Med J.* 2005; 26(6):928-33.
27. Oner-Iyidoğan Y, Gürdöl F, Oner P. The effects of acute melatonin and ethanol treatment on antioxidant enzyme activities in rat testes. *Pharmacol Res* 2001; 44(2):89-93.
28. Manev H, Uz T, Joo JY. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin-deficient rats. *FASEB J* 1996; 10:1546-51.

29. Reiter RJ. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol* 1997; 38:103–17.
30. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1:57–60.
31. Cagnacci A, Volpe A. Influence of melatonin and photoperiod on animal and human reproduction. *J Endocrinol Invest* 1996; 19:382–411.
32. Yu ZH, Chow PH, Pang SF. Identification and characterization of 2[125I]-iodomelatonin binding sites in the rat epididymis. *J Pineal Res* 1994; 17:195–201.
33. Ellis CC. Inhibition of rat testicular androgen synthesis in vitro by melatonin and serotonin. *Endocrinology* 1972; 90:17–28.
34. Ng T, Lo LLH. Inhibitory actions of pineal indoles in steroidogenesis in isolated rat leydig cells. *J Pineal Res* 1988; 5:229–43.
35. Persengiev S, Kehajova J. Inhibitory action of melatonin and structurally related compounds on testosterone production by mouse Leydig cells in vitro. *Cell Biochem Funct* 1991; 9:281–6.
36. Röjdmarm S, Wikner J, Adner N, Andersson DEH, Wetterberg L. Inhibition of melatonin secretion by ethanol in man. *Metabolism* 1993; 42:1047–51.
37. Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, et al. Effect of melatonin on testicular ischemia/reperfusion injury in rats: is this effect related to the proinflammatory cytokines? *Fertil Steril* 2008; 89:1468–73.
38. Hsu PC, Liu MY, Hsu CC, Chen LY, Guo YL. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen toxicity in the rat sperm. *Toxicology* 1998; 128:169–179.
39. Sen Gupta R, Kim J, Gomes C, et al. Effect of ascorbic acid supplementation on testicular steroidogenesis and germ cell death in cadmium-treated male rats. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 30:221(1-2):57-6.
40. McCann SM, Rettori V. The role of nitric oxide in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 211:7-15.
41. Rettori V, Belova N, Dees WL, et al. Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:10130- 10134.