



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RADYASYON VE YÜKSEK ISI UYGULANMASININ  
SIÇAN TESTİS MORFOLOJİSİ, HÜCRE ÖLÜMÜ  
VE KAN TESTİS BARIYERİ ÜZERİNE ETKİLERİ:  
İNFERTİLİTE AÇISINDAN DEĞERLENDİRME**

GÖZDE ERKANLI  
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Feriha ERCAN

İSTANBUL-2008

## İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	4
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Testis Embriyolojisi	6
4.2. Testis Histolojisi	9
4.2.1. Testisin Histofizyolojisi	16
4.2.2. Kan-Testis Bariyeri ve Sıkı Bağlantılar	17
4.3. Akım Sitometresi (Flow Cytometry)	20
4.4. TUNEL Metodu	21
5. GEREÇ VE YÖNTEM	24
5.1. Sıçanların Gebe Bırakılması	24
5.2. Deney Grupları	24
5.3. Işık mikroskopik Preparasyon ve Histolojik Skorlama	25
5.4. ZO-1 ve Okludin İmmunohistokimyası	26
5.5. TUNEL Yöntemi	26
5.6. Geçirimli Elektron Mikroskobu Preparasyonu	27
5.7. Akım Sitometri Yöntemi	27
5.8. İstatistiksel Analiz	28
6. BULGULAR	29
6.1. Testis Ağırlığı	29
6.2. Testis Alanı	29
6.3. Morfolojik Bulgular	31
6.4. Semifer Tübül Hasarı Histopatolojik Skorlama Bulguları	35
6.5. ZO-1 ve Okludin İmmunohistokimyası Bulguları	42
6.6. TUNEL Bulguları	53
6.7. TUNEL Pozitif Hücrelerin Sayısal Analizi	58
6.8. Elektron Mikroskop Bulguları	59
6.9. Akım Sitometresi Bulguları	76
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	79
8. KAYNAKLAR	88
9. ÖZGEÇMİŞ	93
10. ETİK KURUL ONAYI	103

## 1. ÖZET

Radyasyon (RAD) ve hipertermi (HT), spermatogenik koloni büyümesi, sperm sayısı, testis ağırlığında düşme ile beraber infertiliteye neden olan etkenlerdendir.

Bu çalışmanın amacı radyasyon ve hipertermi uygulamış sıçanların testisindeki değişiklikleri araştırmaktır. Bu çalışmada 4 deney grubu kullanılmıştır: 1) Kontrol grubu. 2) HT grubu: postnatal 10. günde hipertermi uygulanmıştır. 3) RAD grubu: gestasyonel 17. günde radyasyon uygulanmıştır. 4) RAD + HT grubu: gestasyonel 17. günde radyasyon ve postnatal 10. günde hipertermi uygulanmıştır. Tüm deney gruplarındaki sıçanlara postnatal 3 ve 6 ay sonra anestesi altında %4'lük paraformaldehit ile perfüzyon fiksasyonu yapılmıştır. Testisler tartılmış, ve testis örneklerinin bir bölümüne rutin parafin takibi uygulanmış ve kesitlere morfolojik inceleme için hematoksilin-eosin boyası, ZO-1 ve okludin immunohistokimyası, TUNEL metodu ve akım sitometresi uygulanmıştır. Testis örneklerinin diğer bölümü de elektron mikroskopik inceleme için hazırlanmıştır

Testis ağırlığı ve alan ölçümü sonuçlarına HT grubu hariç RAD ve RAD+HT grubunda düşüş gözlenmiştir. HT grubunda bazı seminifer tubullerde vakuol oluşumları gözlenirken, RAD grubunda seminifer tubullerde dejenerasyon ve spermatogenik hücrelerde azalma, RAD+HT grubunda ise tek sıra Sertoli hücrelerinden oluşan atrofik seminifer tubuller gözlenmiştir. HT, RAD ve RAD+ HT gruplarında ZO-1 ve okludin proteinlerinin dağılımında düşüş, TUNEL pozitif hücre sayısında artış, ve akım sitometresi sonuçlarına göre haploid, diploid ve tetraploid hücrelerde düşüş gözlenmiştir. Elektron mikroskopik bulgulara göre HT grubu genel olarak normale yakın izlenirken, sıkı bağlantılarda bozulmalar, bazı spermatogenik hücrelerde ve spermatidlerde vakuoller gözlenmiştir. RAD ve RAD+ HT grubundaki spermatogenik hücrelerde ileri derecede hasar gözlenmiştir.

Sonuç olarak, radyasyon ve hipertermi seminifer tubullerde spermatogenik hücrelerde apoptozisi arttırmakta ve haploid, diploid ve tetraploid hücre sayısının azalmasına ve kan-testis bariyerinde yer alan ZO-1 ve okludin dağılımının değişmesine neden olmaktadır. Sıçanda gelişim döneminde alınan radyasyon ve hipertermi testiste spermatogenik serideki hücre sayısını azaltarak infertiliteye sebep olabilir.

## **2. SUMMARY**

### **ALTERATIONS OF TESTICULAR MORPHOLOGY, CELL DEATH AND BLOOD-TESTIS BARRIER IN RATS EXPOSED TO IRRADIATION AND HYPERTHERMIA: EVALUATION FOR INFERTILITY**

Administration of irradiation (IR) and hyperthermia (HT) causes infertility by decreasing the spermatogenic colony growth and the number of sperms in rats.

The aim of this study was to investigate the alterations of testicular morphology and blood-testis barrier in rats exposed to in utero irradiation and postnatal hyperthermia. Four groups of rats were used in this study: 1) Control group, 2) HT group (rats exposed to hyperthermia on postnatal 10th day), 3) IR group (rats exposed to IR on the 17th gestational day), 4) IR+HT group (rats exposed to IR on the 17th gestational day and then to HT on postnatal 10th day). Three and six months after the experimental procedures, the rats were perfused with 4% paraformaldehyde and testis tissue samples were prepared for routine paraffin embedding. Paraffin sections were examined for general morphology, ZO-1 and occludin immunohistochemistry, TUNEL method, flow cytometry and electron microscopy.

A decrease in the testicular weight and area was observed in the IR and IR+HT groups but not in the HT group. Some degenerated seminiferous tubules with vacuoles were observed in the HT group and degenerated seminiferous tubules with decreased number of spermatogenic cells were observed in the IR group. In IR+HT group, atrophic tubules were observed with only Sertoli cell line. ZO-1 and occludin immunoreactivities were significantly decreased in HT, IR and IR+HT groups compared to the control group. Six months after the experimental procedures degenerative changes in all groups were severe. TUNEL positive cells were observed to be increased in HT, IR and IR+HT groups 3 and 6 months after the experimental procedures compared to the control group. According to the flow cytometry results, haploid, diploid and tetraploid cells were decreased in HT, IR and IR+HT groups compared to the control group. Although the degeneration of tight junctions and vacuolization in some spermatogenic cells and spermatids were seen in HT group in



electron microscopy, the morphology was nearly normal in this group. More severe degeneration was shown in IR and IR+HT groups ultrastructurally.

In conclusion, IR and HT administrations caused a decrease in the blood-testis barrier proteins ZO-1 and occludin, and a severe degeneration of seminiferous tubules with increased spermatogenic cell death. Administration of IR and HT in the developing rats may cause infertility due to a decreased number of spermatogenic colony cells in the testis.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Çevresel faktörlerden olan radyasyon ve hipertermi infertiliteye sebep olan faktörlerdendir. Sıçanlarda yapılan deneysel çalışmalarda radyasyon ve hipertermi; spermatogenik koloninin büyümesine, sperm sayısının ve testis ağırlığının değişmesine ve buna bağlı olarak da steriliteye direk etkisi olduğu gösterilmiştir (38, 34). Ayrıca testiste bölünen hücre popülasyonunun apoptosisini tetiklediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (27, 1, 15).

Testis radyasyona en hassas organlardan birisidir. Embriyonik dönemde alınan radyasyon sıçanda gonositler üzerine etki ederek infertiliteye sebep olduğu gösterilmiştir (21). İyonize radyasyonun, yetişkin sıçanlarda da spermatogenik serideki hücrelerin hasarına ve apoptozisine neden olduğu gösterilmiştir (1, 13). Uygulanan radyasyon dozuna ve süresine göre spermatogenik serideki hücrelerin geri dönüşümünün olduğu bildirilmiştir (38). Uzun süreli ve yüksek doz radyasyona maruz kalan sıçanlarda ise spermatogenik serideki hücrelerde geri dönüşümün çok uzun zamanda olabileceği ya da geri dönüşümün olmadığı bildirilmiştir (38).

Erkeklerde infertiliteye sebep olan önemli çevresel faktörlerden bir diğeri de hipertermidir. Deneysel çalışmalarda ısının şiddetine ve süresine bağlı olarak testiste spermatogenik serideki hücrelerin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (7, 32).

Ayrıca hem radyasyonun ve hem de hiperterminin testisteki spermatogenik hücrelere bir diğeri etkisi de spermatogenetik serideki hücrelerde hücre ölümünü tetikleyerek haploid, diploid ve tetraploid hücre oranlarını değiştirmesidir. Bu uygulamalardan en çok spermatogenik serideki proliferen hücreler ve spermatidler etkilenmektedir. Radyasyon ve hipertermi uygulamaları sonucu haploid (spermatid ve spermatozoa) hücre sayısının düştüğü gösterilmiştir (8, 12).

Testisdeki hasar modellerinde spermatogenik serideki hücrelerin etkilenmesinin yanı sıra kan-testis bariyerinin de hasarlandığı bildirilmiştir (14, 29). Radyasyon ve hipertermi uygulamalarının kan testis bariyerindeki proteinler üzerine olan etkilerini araştıran az sayıda çalışma vardır. Radyasyon ve hipertemi uygulanmış sıçanlarda kan-testis bariyerinde yer alan zonula okludens 1 (ZO-1) ve okludin gibi proteinlerin azalması sonucu kan-testis bariyerinin bozulduğu bildirilmiştir. Kan testis bariyerin bozulmasının da spermatogenik serideki hücreler üzerine etki ettiği vurgulanmıştır (14).

Daha önce yapılan çalışmalarda radyasyon ve hiperterminin tek tek uygulamasının testis morfolojisi ve spermatogenik serideki hücreler üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Ancak hem radyasyon hem de hiperterminin birlikte uygulandığı çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ilk kez *in utero* radyasyon ve postnatal hiperterminin birlikte uygulandığı sıçan testisinde hem spermatogenik serideki hücrelerin niteliksel ve niceliksel özelliklerini, hem de kan testis bariyerinde yer alan proteinlerin dağılımını incelemek amaçlanmıştır. Emriyonik dönemde uygulanan radyasyonun ve postnatal dönemde uygulanan hiperterminin uzun dönemde testiste spermatogenik serideki hücrelerin morfolojisine olan etkileri genel ışık mikroskopik tekniklerle, spermatogenik seriyi oluşturan hücre popülasyonundaki değişiklikler akım sitometresi ile, spermatogenik serideki hücrelerin programlı ölümü TUNEL yöntemi ile ve kan testis bariyerinde ki ZO-1 ve okludin proteinlerinin dağılımı immunohistokimya tekniği ve geçirimsiz elektron mikroskopu tekniğiyle araştırılacaktır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ :

Kromozomal ve genetik cinsiyet fertilizasyon ile sağlanır, X kromozomuna sahip ovumun X veya Y kromozomu taşıyan sperm ile döllenmesine bağlıdır. Gelişmekte olan gonadlar XX veya XY kromozom kompleksine sahip olurlar. Yedinci haftadan önce gonadların görünümü her iki cinsten de birbirine benzer, dolayısıyla farkedilmemiş gonadlar olarak adlandırılırlar. Erkek fenotipinin gelişimi için Y kromozomu gereklidir fakat bu kromozomun yalnızca kısa kolu seks tayini için önemlidir. Testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan SRY geninin, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleştiği saptanmıştır. Y kromozomu, farkedilmemiş gonadın medullası üzerinde testis belirleyici etkiye sahiptir. Y kromozomu tarafından düzenlenen, TDF, testiküler farklılaşmayı sağlar bu faktörün etkisi altında, primer seks kordonları seminifer tubüllere farklılaşırlar. Y kromozomunun yokluğu over gelişimiyle sonuçlanır. Sonuç olarak seks kromozomunun tipi farklılaşmamış gonadın hangi yönde gelişeceğini belirlemektedir.

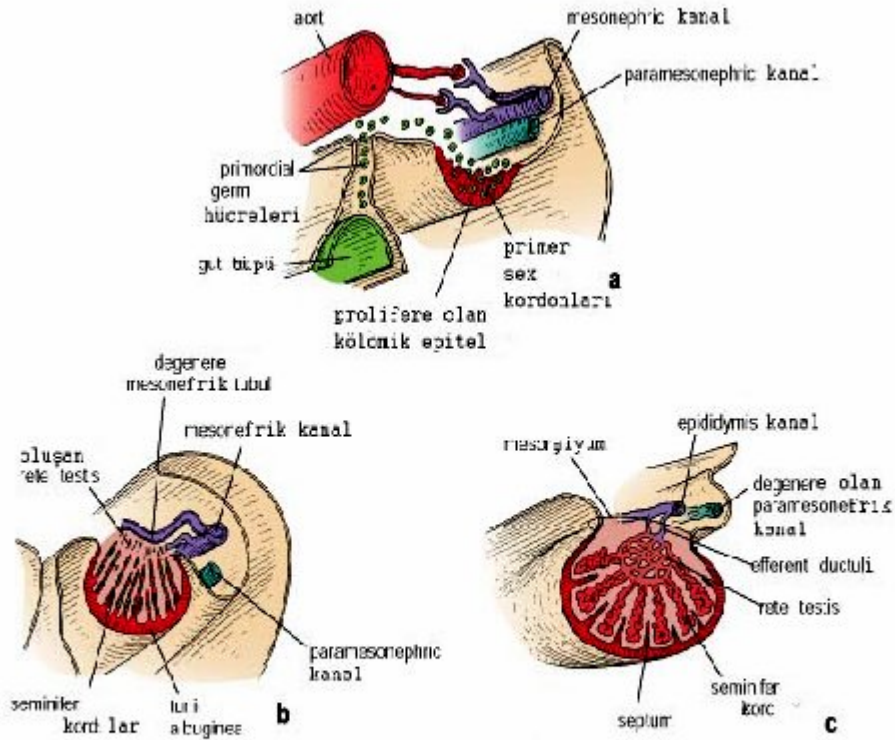
Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar.

- Posterior abdominal duvarın mezotel epitelyumu (mezodermal epitel)
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordial germ hücreleri

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar, mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık –gonadal (genital) kabartı- oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar –primer seks kordonları- altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farkedilmemiş gonad şimdi, dışta yer alan bir medulladan oluşmaktadırlar. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farkedilmemiş gonad'ın korteksi overe diferensiyasyon olur,

medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise farklanır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenere olur.

Primordial germ hücreleri 4. hafta başında vitellüs kesesi duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın, endodermal hücreler arasında ortaya çıkar. Embriyonun katlanmaları sırasında vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur. Bu olurken, primordial germ hücreleri, arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler. Altıncı haftada primordial germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerler ve primer seks kordonlarına dahil olurlar (Resim 1) (35).



Copyright © 2003 Lippincott Williams and Wilkins

**Resim 1:** Testis gelişiminin şematik gösterimi (46).

Seks kromozom kompleksinde bir Y kromozomu taşıyan embriyolarda, genellikle testisler gelişmektedir. Testislerin gelişimi koordineli bir seri genin indüksiyonu ile sağlanır.

Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktörler için SRY geni, farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar fonksiyonu görmektedir. Testis belirleyici faktör (TDF), primer seks kordonlarını uyararak, onların farklılaşmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece rete testis oluşur. Seks kordonlarının (semifer-testiküler- kordonların) kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Yoğun tunika albuginea gelişimi fötusta testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefroz'dan ayrılır ve kendi mezenteri olan mesorşiyum ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tubullere, tubuli rekti ve rete testise farklılaşırlar.

Seminifer tubuller, intertisyal hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. Sekizinci haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları –testosteron ve andosteron- salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik duktusların ve dış genitalerin maskulin olarak farklılaşmasını indüklerler. Testosteron üretimini insan koryonik gonodotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık periyod'da en yüksek değerine ulaşmıştır. Testosterona ilaveten fötal testisler glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MIS) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. Antimüllerian hormon, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır, hormonun salgılanması puberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik duktusların gelişimini baskılar.

Seminifer tubuller, puberteye kadar solid halde kalırlar, puberteden itibaren lumen gelişir. Seminifer tubul duvarında iki tip hücre bulunur.

- Sertoli hücreleri, destek hücreleri olan bu hücreler, testisin yüzey epitelinden gelişirler.
- Spermatogonia, primordial sperm hücreleri olan bu hücreler, primordial germ hücrelerinden farklıdır.

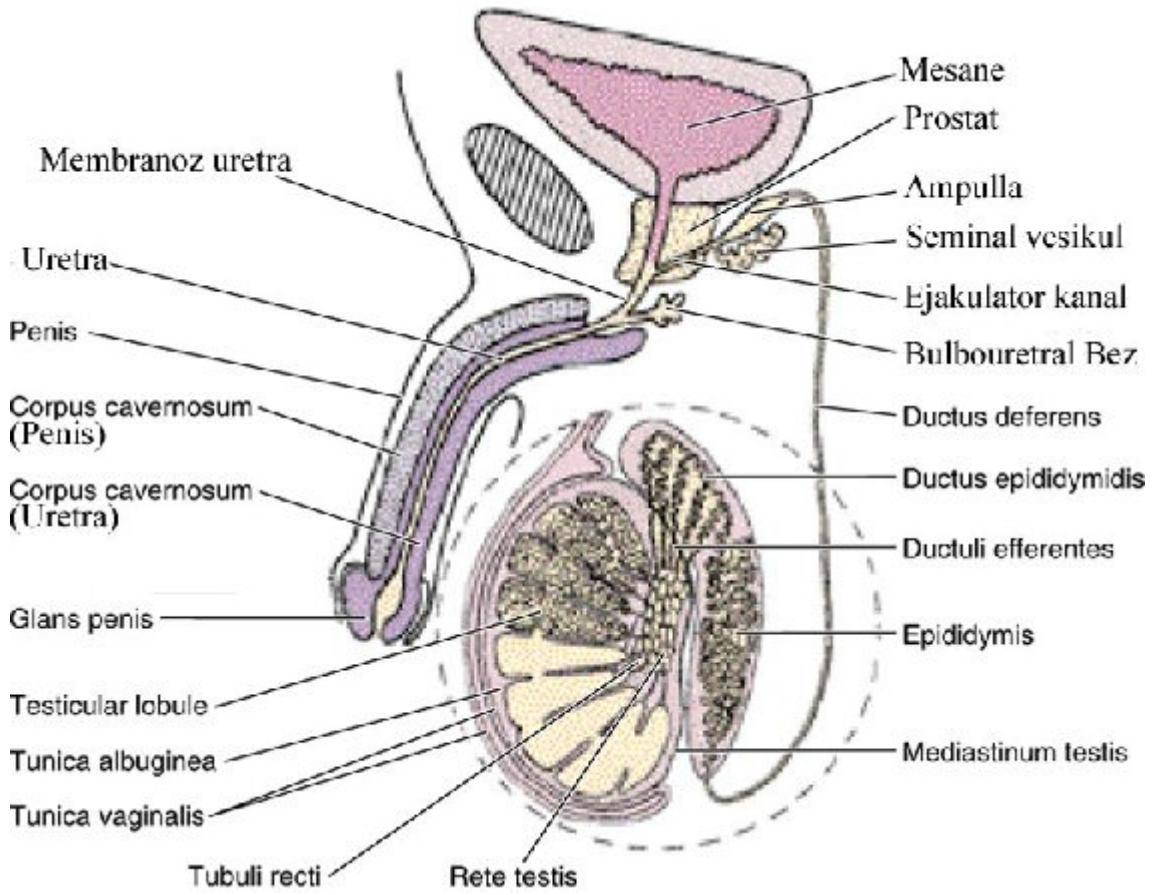
Fötal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer tubullerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktusları oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu duktuslar, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktus ile bağlanırlar (35).

#### **4.2. TESTİS HİSTOLOJİSİ :**

Erkek üreme sistemi, testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmuştur. Testisin temel görevi hormon ve spermatozoa üretmektir. Testosteron testiste üretilen en temel hormondur. Testosteron, spermatogenezis, embriyonik ve fetal gelişim esnasındaki seksüel farklılaşma ve gonodotropin salgılanmasını kontrol etmek gibi önemli görevleri vardır.

Her bir testis, *tunika albuginea* adı verilen yoğun bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül tarafından çevrelenmiştir. Tunika albuginea testisin posterior yüzünde kalınlaşır, bu kalınlaşan bölgeye *mediastinum testis* adı verilir. Bu fibröz septa beze doğru ilerler ve yaklaşık 250 piramidal parçalara böler, her bir parçaya *testiküler lobül* adı verilir. Ve bu lobüller arasında çoğunlukla iletişim vardır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 *seminifer tübüül* yer alır. Bu bağ dokusunda bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel (Leydig) hücreler bulunur. Seminifer tubuller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları oluştururlar.

Her bir seminifer tubul yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-40 cm uzunlukta olup, karmaşık yapıda çok katlı bir epitelyum ile döşelidir. Kıvrımlı tubuller bir şebeke oluştururlar. Bu şebekedeki her tubul başlangıçta kör uçludur ve dallara ayrılır. Her bir tubul sonlanırken lumeni daralır ve düz tubuller ya da *tubuli rekti* adıyla bilinen kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tubuller, seminifer tubullerin *rete testis* denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Mediastinumun bağ dokusunda bulunan rete testis, 10-20 *duktuli efferentes* ile *epididimisin* baş kısmını bağlamıştır (20, 46).



**Şekil 2:** Erkek genital sistemi. Testis ve epididimisin genital sistemdeki diğer bölümlerden farklılıkları ve testiküler lobüllerin bağlantıları gösterilmektedir (20).



Seminifer tubuller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir *germinal* ya da *seminifer epiteld*den oluşur. Seminifer tübülü saran *tunica propria* birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olarak bulunan en içteki katman düz kas özellikleri gösteren yassılaştırmış *myoid hücre*lerden oluşur. Epitel iki tip hücreden meydana gelmektedir: *Sertoli* ya da *destek hücre*leri ile *spermatogenik seriyi* oluşturan hücreler.

Spermatogenik seri hücreleri bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar. Bu erkek germ hücrelerinin sürekli farklılaşma sürecindeki çeşitli evrelerde bulunabilirler. Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu olay üç faza ayrılabilir; spermatositogenez olarak adlandırılan evrede spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelir. Spermatogonyumların ardı ardına iki bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelir. Spermatositlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu spermatidlerin olduğu evre mayoz adını alır. Spermiyogenez ise spermatidlerin özenli bir hücre farklılaşma süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu safhadır.

Spermatositogenez (spermatogenez); bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş bir germ hücresi olan, spermatogonyum ile başlar. Bu yaklaşık 12 µm çapında, nispeten küçük bir hücredir. Seksüel olgunlaşmada bu hücreler bir seri mitoz geçirirler. İnsanda morfolojik olarak ayrılabilen 3 tip spermatogonyum vardır: koyu renkli boyananlar koyu tip A spermatogonyum, soluk renkli boyanan açık tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyum. Koyu tip A spermatogonyum kök hücre rezervi olarak görev alır. Zaman zaman tip B spermatogonyuma farklılaşan açık tip A spermatogonyuma bölünür.

Tip A spermatogonyum spermatogenik serinin kök hücreleridir. Tip B spermatogonyum ise primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir.

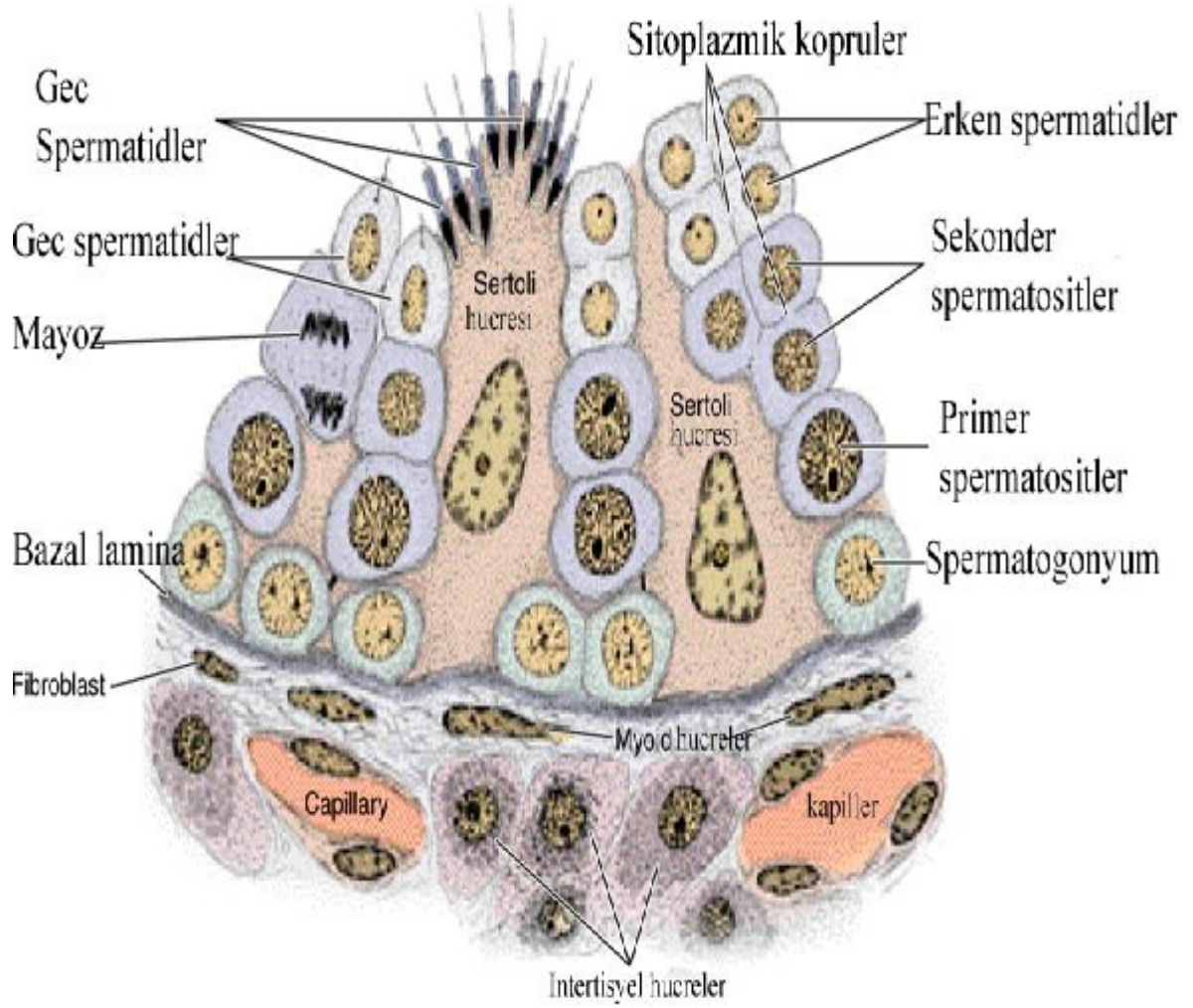
Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositte spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynarlar. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma olur.

İnsanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki süreç yaklaşık 64 gündür. Bu süreç dalgalanmalar şeklinde oluşur, her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez. Bu durum her bölgesinde spermatogenezin farklı bir safhasının izlendiği seminifer tübüllerin düzensiz görünümünü açıklar. Aynı zamanda neden seminifer tubullerin bazı bölgelerinde spermatozoonların bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin bulunduğunu da açıklamaktadır. Seminifer epitelyum siklusu germinal epitelyumde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. İnsanda her bir siklus yaklaşık  $16\pm 1$  gün sürer ve spermatogenez 4 siklustan sonra biter.

Seminifer tübüllerde bulunan bir diğer hücre de Sertoli hücreleridir. Sertoli hücreleri spermatogonik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tubulün lümenine uzanır. Işık mikroskopunda, Sertoli hücrelerinin sınırları belirsiz olarak görülür, çünkü bunların spermatogonik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları vardır. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda hücrelerin bol miktarda düz endoplazmik retikulum, bir miktar kaba endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozom içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış nukleusta çok sayıda kıvrılmalar, belirgin bir nukleolus ve az miktarda heterokromatin görülür.

Bitişik Sertoli hücreleri birbirlerine spermatogonyumlar seviyesinde sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Bu spermatogonyumlar içine kanda bulunan metaryallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogenez sırasında

spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan bir yolunu bulup geçerek adluminal kompartmana çıkarlar. Burada spermatogenezin daha ileri safhaları, kandan gelen ürünlerden bir kan-testis bariyeri ile korunurlar. Bu bariyer Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile oluşturulur. Spermatozitler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin flagellar kuyrukları geliştikçe bunlar Sertoli hücrelerinin apikal uçlarından çıkan püsküller şeklindeki çıkıntılar halinde görülürler. Sertoli hücreleri ‘sıkı bağlantılar (gap junction)’ denilen birleşmelerle de ilişki kurar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır.



**Şekil 3:** Çevreleyen doku ile birlikte seminifer tubulün bir parçası. Seminifer epitel 2 tip hücreden oluşmuştur: Spermatogenik seri hücreleri ve destek ya da sertoli hücreleri (20).

Sertoli hücrelerinin en az dört önemli fonksiyonu vardır:

- Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmelerinin düzenlenmesi
- Fagositoz: Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde atılır. Bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücrelerindeki lizozomlar tarafından fagosit edilir ve sindirilir.
- Sekresyon: Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgırlar. Androjen bağlayıcı protein (ABP) sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından FSH ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiyol haline çevirebilirler. Bu hücreler aynı zamanda, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin adı verilen bir peptid salgırlar.
- Anti-Müllerian Hormon üretimi: bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanalların gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise Wolf (mezonefrik) kanallardan köken alan yapıların gelişmesini sağlar.

Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Bunlar özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, x-ışını ışınımı gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdır ve bu zararlı etkiler karşısında spermatogenez seri hücrelerine göre çok daha dirençlidirler. Memelilerde spermatozoonların salınımı muhtemelen hücre hareketlerinin bir sonucudur. Bu hareket Sertoli hücrelerinin apeksinde bulunan mikrotubuller ve mikrofilamentler ile sağlanır.

Testisin seminifer tubulleri arasındaki intertisyel doku da bağ dokusu, sinirler, kan ve lenfatik damarlar bulunmaktadır. Testiküler kapillerler pencerelidir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsaade ederler. İntertisyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun şebeke, bu organda alınan intertisyel sıvı ile lenf sıvısının birleşimindeki benzerliği açıklamaktadır. Bağ dokusu çeşitli tipte

hücreler içerir. Bunlar arasında fibroblast, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Puberte sırasında ek bir hücre tipi belirgin hale gelir, bu yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir nükleusu ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan bir hücredir. Steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir. Bu hücreler sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondri ve düz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilerek, hücre organelleri arası işbirliğine bir örnek oluşturur.

Leydig hücrelerinin hem aktiviteleri hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonların bulunması embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreleri hamileliğin 18. haftasına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra gebelik boyunca ve hipofizden sonra salınan LH uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar (20, 46).

#### **4.2.1. Testisin Histofizyolojisi**

Vucüt içi sıcaklığının (37 °C) altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin regülasyonunda ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35 °C'dir, bu birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Zengin bir venöz pleksus (*pampiniform pleksus*) her bir testiküler arterin etrafını sarar, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlar. Diğer faktörler; skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki krameter kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir.

Spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi endokrin faktörler oluşturur. Spermatogenez, hipofizin foliküler stimulan (FSH) ve lüteinizan hormonlarının (LH)

testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH intertisyel hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder. FSH'ın ise Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını stimüle ettiği ve sonuçta cAMP'nin artışına yol açtığı ve aynı zamanda ABP'nin sentez ve salgılanmasını sağladığı bilinmektedir. Bu protein testosteron ile bağlanır ve testosteronu seminifer tubullerin lümenine taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır, östrojen ve progesteronlarla inhibe edilir.

Spermatozoonlar epididimise, uygun bir medyum olan testiküler sıvı içinde taşınırlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP içerir (20).

#### **4.2.2. Kan-Testis Bariyeri ve Sıkı Bağlantılar**

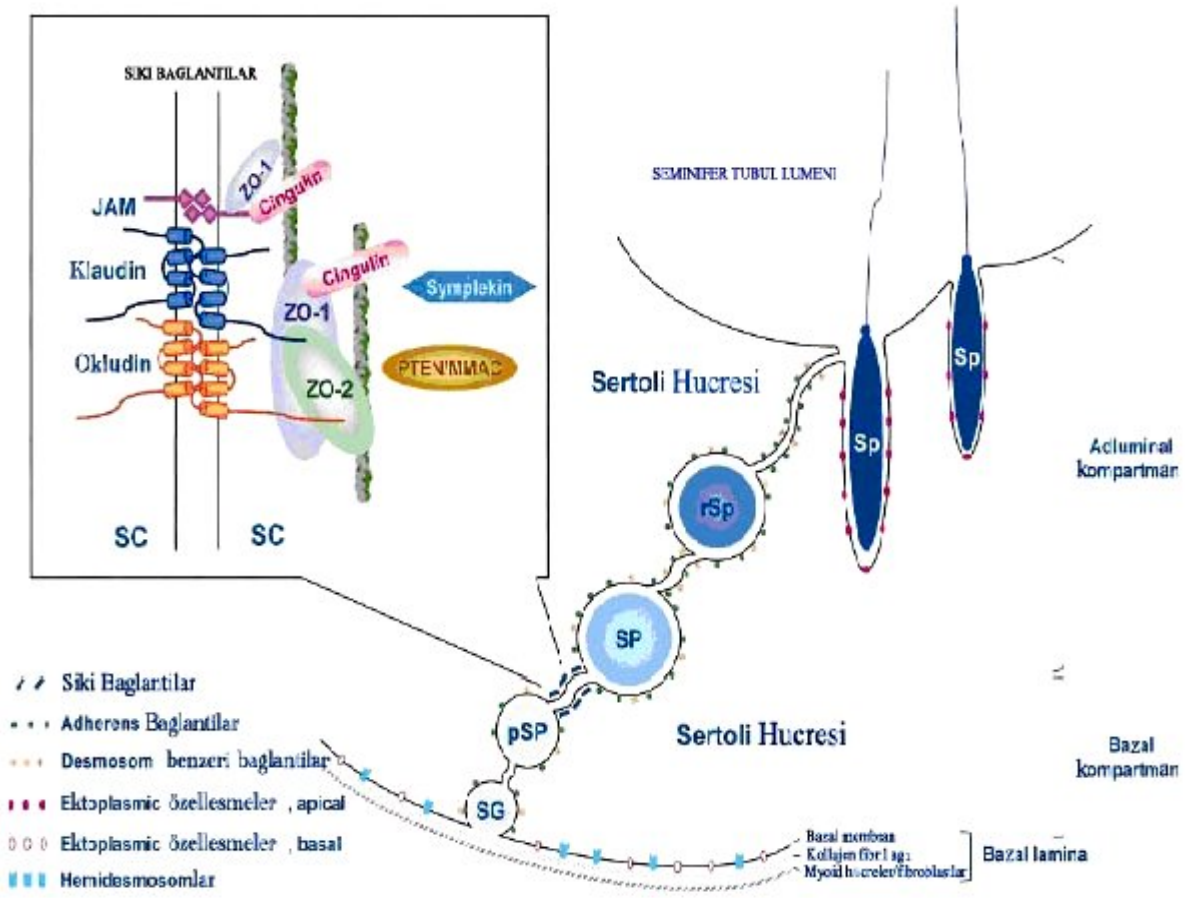
Spermatogonyumların farklılaşması sperme özgü proteinlerin ortaya çıkmasına yol açar. Seksüel olgunlaşmanın, immunolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra ortaya çıkması sebebiyle farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immün yanıtı teşvik edebilirler. Kan-testis bariyeri, gelişen spermler ve immün sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimi ortadan kaldırır. Bu bariyer seminifer tubullere immünglobulinlerin geçmesini önler ve bu sayede serumlarında çok yüksek düzeyde sperm antikoru bulunan hastalarda herhangi bir fertilitte bozukluğu görülmez. Sertoli hücre bariyeri böylece seminifer epiteli bir otoimmün reaksiyondan korumuş olur.

Kan ile seminifer tubullerin iç bölgesi arasında bir bariyerin bulunması, sıvı içine kandan çok az maddenin geçmesini açıklayan bir olgudur. Testiküler kapillerler pencereli tiptedirler ve büyük moleküllerin serbest olarak geçişine izin verirler. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (*tight junctions*) bu bariyerden sorumludurlar. Erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önemli rol oynarlar (20).

Seminifer epitelyumdaki sıkı bağlantılar; adherens bağlantılar ve desmozomların membrandaki lokalizasyonu ile oluşur. Sıkı bağlantılar bazal laminanın yanındaki seminifer epitelyumun bazal kompartmanındaki Sertoli hücreleri arasında bulunur. Testisdeki sıkı bağlantı bölgesinde periferel membran proteinler dizisi ve 3 farklı sıkı bağlantı integral membran proteinlerinden oluşur. Bunlar; zonula okludens çeşitleri olan, zonula okludens-1 (ZO-1), zonula okludens-2 (ZO-2), okludin, klaudin gibi sıkı bağlantı proteinleridir (Şekil 4). Sıkı bağlantıların en yüzeyde olanı zonula okludenstir. Ağa benzer bir yapı oluşturacak şekilde katlanma ve kıvrılmalar gösterir. Kabartı ve olukların sayısı ve kaynaşma yerleri epitelyumun sıvı alışverişi ile çok yakından ilgilidir. Sıkı bağlantının esas fonksiyonu oldukça sıkı bir tutunma meydana getirmek böylece epitelyum hücreleri arasından her iki yöne doğru madde geçişini engellemektir. Bazı epitellerde elektriksel potansiyeller epitelin molekül transport yeteneğini etkileyerek moleküllerin epitelden geçişini düzenler (28).

Sıkı bağlantı bariyerinde yer alan okludinin kan testis bariyerinin regülasyonunda çok önemli rolü vardır. Okludin ile direkt bağlantısı olan diğer sıkı bağlantı proteinleri arasında bulunan bağlantı komponentleri ZO-1 ve ZO-2'dir (11). Okludinin C-terminal bölgesi, bazolateral membranda Okludin'in hedefi olarak ZO-1'e bağlanır ve sıkı bağlantıda okludin lokalizasyonu için ZO-1'in varlığı gereklidir. Farede okludin Sertoli hücrelerinin dip bazal bölgelerinde bulunur ve maturasyonla yoğunluğu artar. Sıçan Sertoli hücrelerinde de benzer bulgular göstermesine rağmen, insan ve kobayda Sertoli hücrelerinde okludinin bulunmadığı bildirilmiştir (37). Testis sıkı bağlantılarındaki okludin izoformları türe özgüdür. Testiste okludin Sertoli hücreleri arası bağlantı bölgesinde bazal olarak çok kuvvetli immunreaktivite gösterir. Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında da yaygın bir immunreaktivite görülebilir. Okludinin analog patterni olan ZO-1 immnreaktivitesi Sertoli hücreleri arası bağlantı bölgelerinde, sitoplazmasında ve subselüler alanda daha yoğun olarak görülmektedir (9, 43, 49).





**Şekil 4:** Sıkı bağlantıların seminifer epitelyumdaki yapılarını ve bunların adherens bağlantılarını ve dezmozomlardaki lokalizasyonunu gösteren diafragmatik çizimi (28).

### 4.3. Akım Sitometresi (Flow Cytometry)

Akım sitometresi, floresan renk veren maddelerle (fluorokromlarla) işaretli süspansiyon halindeki hücrelerin ışık kaynağı önünden tek tek geçerken verdikleri floresan yoğunluğu ölçümüne dayalı bir analiz yöntemidir (25, 42). Üç ana kullanım alanı vardır. Bunlardan ilki, hücre içi ve hücre yüzeyinde bulunan antikor oluşturabilmiş proteinlerin değerlendirilmesi yanında belli bir yüzey antijen proteinin taşıyan hücre topluluklarının spesifik antikorlarla diğerlerinden ayırd edilmesidir. İkincisi fonksiyonel çalışmalarda oksidatif burst, fagositoz, hücre içi  $Ca^{+2}$  ölçümü vs'dir. Üçüncüsü de hücre siklus analizi ve DNA ploidi değerlendirmeleridir (42).

DNA miktarının nicel ölçülmesinde propidyum iodid, ethidyum bromid, mitramisin gibi fluorokrom boyaların çift sarmallı DNA'ya rastgele bağlanması ile elde edilen floresans yoğunluğu hücredeki DNA yoğunluğuyla doğru orantılı olduğundan, bilgisayar ekranına yansıyan değerler hücrelerin siklus içindeki dağılımını verir. G0/G1 deki hücreler X miktar DNA'ları ile belli X miktar floresan alırlarken teorik olarak G2+M fazındaki hücreler 2X boyanır. Her iki zirve arasında yayılan hücreler ise S fazını verir (17, 30).

Flow sitometri ile sayılan binlerce hücrenin dağılımı bir histogram ile görülür. Dağılım önceden tanımlanmış bir matematiksel fonksiyona oturtmaya çalışılarak değerlendirilir. Hücre siklus analizlerinde incelenen sentez fazı (S) ve hücre büyüme fazı (S+ G2/M) proliferatif aktivitenin kantitatif olarak tanımlanmasında kullanılır.

Flow sitometrik yöntem taze dokulara veya fikse edilmiş parafine gömülü dokulardan elde edilen kesitlere uygulanabilir. Günümüzde onkolojik bilimlerde tümör tipini ve evresini tanımlamada sıklıkla kullanılmaktadır (5).

#### 4.4. TUNEL Metodu

Apoptozis, gereksiz yada uyuşmayan hücreleri elimine eden programlanmış hücre ölümü formudur. Ölüm faktörleri, yaşam devamlılığı, eksternal büyüme gibi aktif cevaplardan kökenlenen efektör yollar veya multipl sinyaller tarafından kontrol edilirler.

Apoptozisin tanımlanan karakteristiği hücre morfolojisinin tamamen değişmesidir. Elektron mikroskopik incelemelerde, hücrenin büzülmesi, kromatin marjinasyonu, membran kabarcıklaşması, nükleer kondensasyon ve sonra segmentasyon ve apoptotik cisimlere bölünmesi ki bazen fagosite edilebilmesiyle karakterizedir. Apoptoziste DNA fragmentasyonu, hücre morfolojideki ultrasüruktürel değişikliklerle ilişkilidir. Apoptoziste ortaya çıkan DNA fragmentasyonunu göstermenin bir yolunda TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling*) metodudur.

Apoptozis hasar indüklü hücre ölümü (nekroz) dan farklıdır. Apoptozisin nekrotik hücre ölümünden çeşitli morfolojik ve biyokimyasal farklılıkları vardır.

Bu yöntemle, DNA kırıklarının serbest 3'OH uçları modifiye nukleotidlerle enzimatik olarak işaretlenir. DNA fragmentasyonundan kökenlenen bu yeni DNA uçları, morfolojik olarak gözlenebilen nukleuslarda ve apoptotik cisimciklerde bulunurlar. Bu yöntemle kromatin kondensasyonu oluşmuş ve DNA kırıkları bulunan erken evre apoptozise özgüdür. Daha sonra nukleusda major morfolojik değişiklikler oluşmaya başlar (4, 6).

TUNEL metodu, kimyasal olarak işaretlenmiş ve işaretlenmemiş nükleotidler kullanılarak serbest 3'OH uçlarının işaretlenmesi prensibine dayanır. Reaksiyon tamponuna eklenmiş olan nükleotidler, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak enzimatik olarak DNA'ya bağlanması sağlanır. TdT tek sarmallı ya da çift sarmallı DNA'nın 3'OH uçlarına serbest olarak eklenen nükleotid trifosfatları katalizler. Serbest olarak bulunan nükleotidler digoksigenenin-konjugat eklenmesiyle bir oligomer oluştururlar. Daha sonra digoksigenin ile konjuge olan nükleotidler peroksidaz reaksiyonu verebilen anti-digoksigenin antikoru ile bağlanması sağlanır. Böylece bağlanmış peroksidaz antikoru, immunohistokimya ve immunositokimya hassas görünüm sağlayan kromojenik substratlarla bağlanması sağlanır. Sonuç olarak apoptotik cisimciklerde çok yüksek oranda bulunan 3'OH uçlarının hassas ve spesifik boyanması sağlanır (Şekil 5) (48).



Apoptosis sonucu,  
DNA fragmanlarının ortaya çıkması



Digoksinin-dNTP ile kuyruk oluşması



Antikor konjugatıyla bağlanması



Kromojen ile boyanması

Şekil 5: TUNEL methodunun prensibinin şematik gösterimi (3).

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

### 5.1. Sıçanların Gebe Bırakılması:

Bu çalışmanın yapılabilmesi için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (23.11.2006-40.2005.mar). Bir dişi- 1 erkek veya 2 dişi- 1 erkek olacak şekilde talaşsız kafeslerde Wistar-albino ırkı sıçanlar bir gece boyunca çiftleşmeye bırakılmıştır. Ertesi gün vaginal plak görülen sıçanlar gebeliğin 0. günü kabul edilerek ve ayrı kafeste gebeliğin takibi yapılmış, vaginal plak görülmeyen sıçanlardan vaginal smear alınmıştır. Vaginal smear pozitif çıkan sıçanlar ayrı kafeslerde takip edilmiştir. Hayvanlar, uygun kafesler içinde, 12 saat aydınlık-karanlık ortamda, standart sıçan yemi ile beslenmişler ve musluk suyu içmişlerdir.

### 5.2. Deney Grupları:

1- Kontrol Grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara radyasyon ve/veya hipertermi uygulaması yapılmamıştır. Standart laboratuvar şartlarında tutulmuşlardır.

2- Hipertermi Grubu (HT, n=14) : Postnatal 10. günde yavru sıçanların vucüt ısısı rektal olarak kontrol edilip  $38\pm 2^{\circ}\text{C}$  olacak şekilde tüm sıçanlarda standardize edilmiştir.

3- Radyasyon Grubu (RAD, n=14) : Gebe sıçanlara embriyonik 17. günde 100cG'lik radyasyon uygulanmıştır.

4- Radyasyon ve Hipertemi Grubu (RAD + HT, n=14): Gebeliğin 17. gününde sıçanlar 100cG'lik radyasyona maruz bırakılmış sıçanlardan doğan sıçanlara postnatal 10. günde hipertermi uygulanmıştır. Rektal ısı aynı şekilde kontrol edilmiştir.

Radyasyon uygulamaları Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Abd 'da SSD tekniğiyle kobalt 60 teleterapi sistemi kullanılarak tek fraksiyon yapılmıştır. Tüm deney gruplarındaki hayvanlar postnatal 90. ve 180. güne kadar bekletilmek üzere tüm bakımları sağlanmıştır.

Tüm deney gruplarındaki sıçanlara postnatal 90. ve 180. günde 50 mg/kg ketamin ve 12 mg/kg ksilazin hidroklorid ile derin anestesi altında %4'lük fosfat tamponlu paraformaldehit ile intrakardiyak perfüzyon fiksasyonu yapılmıştır. Testisler tartılmış daha sonra ışık mikroskopik, zonula ocludens (ZO)-1 ve occludinin immunohistokimyası, TUNEL, akım sitometresi ve elektron mikroskopik incelemeler için hazırlanmıştır.

### **5.3. Işık mikroskopik Preparasyon ve Histolojik Skorlama**

Tüm gruplardan alınan sağ testisler ışık mikroskopik incelemeler için hazırlanmıştır. Perfüzyon fiksasyonundan sonra testisler aynı fiksatifte gece boyunca bırakılmıştır. Fiksasyondan sonra testis dokusu çeşme suyunda 2 saat yıkandıktan sonra, yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edilmiş, toluen ile şeffaflaştırılmış, 60 °C'lik etüvde parafinde gece boyunca bekletildikten sonra oda ısısında parafin içine gömülerek bloklanmıştır. Parafin bloklardan yaklaşık 5 µm kalınlığında alınan her 5 kesitte biri toplam 5 kesit genel morfolojik değerlendirme ve kantitatif analiz yapabilmek için Hematoksilin-Eosin (H&E) boyası ile boyanmıştır. Boyalı kesitlerden imaj programı (NIH Image Analysis) kullanılarak testis çapı ölçülmüştür. Her kesitte preparat saat yönünde kaydırılarak rastgele seçilen 5 benzer alandaki x 200 büyütmede seminifer tubullerde histolojik hasar skorlaması Rex A. Hess (1988)'in çalışmasından modifiye edilerek aşağıdaki gibi yapılmıştır (18):

- 1) Normal: Normal spermatogenezis ve hücreler arası bağlantı
- 2) Regresif: Seminifer tubullerin bir veya birden fazla bozukluk içermesi: hücreler arası bağlantı normal olmakla birlikte gevşek hücrel organizasyon, hücrel dejenerasyon (piknotik nukleus, granüler eozinofilik sitoplazma, karyolizis)
- 3) Dejeneratif: Düzensiz yerleşimli ve hücreler arası bağlantısı olmayan az sayıda germ hücreleri ve Sertoli hücreleri.
- 4) Atrofik: Sadece Sertoli hücreleri, ya nadiren germ hücreleri ve Sertoli hücreleri ya da az sayıda hücrel bağlantıları olmayan germ hücreleri ve Sertoli hücreleri.

#### 5.4. ZO-1 ve Okludin İmmunohistokimyası

Pozitif şarjlı lamlara alınan 5 µm kalınlığında parafin kesitler 1 gece 56 °C'lik etüvde bekletilmiş, deparafinize etmek amacıyla toluende 30 dakika bekletilmiş, saf alkol ve %96'lık alkol de 15 dakika bekletildikten sonra distile suya alınmıştır. Kesitler proteaz (1mg/ml, Sigma) enziminde 10 dakika inkübe edilmiştir, PBS ile yıkandıktan sonra %3 hidrojen peroksitte 10 dakika, PBS'de yıkanma işleminden sonra bloklama solüsyonunda ((Scy Tek Ultra Tek HRP, anti-polivalent, UHP 125) 15 dakika bekletilmiştir. Tavşan anti ZO-1 (1:100, Zymed laborotories) primer antikorida 6 saat veya tavşan anti-okludin (1:150, Zymed laborotories) primer antikorida 1 gece +4 °C'de bekletilmiştir. Kesitler 3 kere 5'er dakika PBS' de yıkandıktan sonra keçi anti tavşan sekonder antikorda 25 dakika, PBS ile yıkamadan sonra, streptoavidin peroksidazda (Scy Tek Ultra Tek HRP, anti-polivalent, UHP 125) 25 dakika, PBS ile yıkandıktan sonra, AEC kromojeninde (20 µl AEC kromojen + 1 ml AEC substrat tamponu) (Scy Tek ACJ 125 AEC Chromogen/sustrate Bulb Pack, USA) 15 dakika beklemiş, distile suda yıkama işleminden sonra, Keiser gliserin jel (Merck) ile kesitler kapatılmıştır.

#### 5.5. TUNEL Yöntemi

Pozitif şarjlı lamlara alınan 5 µm kalınlığında her 5 kesitte bir toplam 4 kesit, ksilen ile deparafinize edilmiş, inen alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiş ve PBS ile yıkanmıştır. TUNEL metodu üretici firmanın (Apoptag Plus Peroksidaz *In situ* apoptosis Kiti, Chemicon International, S7101) verdiği kullanım kılavuzundaki yöntemle göre yapılmıştır. Yapılan işlemler aşağıdaki gibidir: Proteinaz K'da (20 µg/ml, Sigma) 15 dakika tutulmuş, distile su ile yıkamadan sonra, kesitler PBS'de hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksitte 5 dakika bırakılmış, PBS ile yıkanmış, dengeleme tamponunda 30 dakika bırakılmıştır. Daha sonra tüm kesitler 37 °C'lik etüvde TdT (terminal deoksiniükleotidil transferaz) enziminde 1 saat tutulduktan sonra, oda ısısında yıkama tamponunda 15 saniye ajite edildikten sonra 10 dakika inkübe edilmiş, PBS'de 3 kere 1'er dakika yıkamadan sonra, antidigoksinin konjugatta 30 dakika bekletilmiş,



PBS'de 2'şer dakikadan 4 kez yıkanmıştır. Kesitler boyama için peroksidaz substratında 6 dakika bekletildikten sonra, 3 kez 1'er dakika distile suda yıkanmış, sonra Mayer Hematoksilin ile boyanmış ve entellan ile kapatılmıştır. Boyalı kesitler saat yönünde kaydırılarak benzer 5 alanda x400 büyütmede TUNEL pozitif hücreler sayılmıştır. Sayılan hücreler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Tüm ışık mikroskopik preparatlar Olympus BX51 fotomikroskop ile incelenerek değerlendirilmiş ve fotoğraflanmıştır.

### **5.6. Geçirimli Elektron Mikroskobu Preparasyonu**

Perfüzyon fiksasyonundan sonra sol testislerden alınan doku örnekleri %2,5 'luk 0.1 M PBS tamponlu (pH 7.2) glutaraldehit fiksatifi içerisinde 4 °C'de 4 saat immersiyon fiksasyonu yapılmış, tamponda yıkamadan sonra, %1'lik osmiyum tetroksitle 1 saat postfiksasyon yapılmıştır. Yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek suyu alınmış, propilen oksitten geçirilerek 60 °C'deki etüvde epon 812'ye gömülmüştür. Ultramikrotomda (Reichert, Supernova ultramicrotome) alınan yarı ince kesitler (1 µm) toluidin mavisi boyası ile boyanmıştır. Yarı ince kesitlerde yer tayini yapıldıktan sonra bakır gridler üzerine alınan yaklaşık 60 nm kalınlığındaki ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanmıştır. İnce kesitler, JEOL 1200 SX TEM ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

### **5.7. Akım Sitometri Yöntemi**

Hücre döngüsündeki değişiklikleri ölçmek amacıyla, parafine gömülü dokulardan 40 µm kalınlıkta alınan kesitler, toluen ile deparafinize ve inen alkol serileriyle (%100, %96, %90, %70) rehidrate edilmişlerdir. Proteinaz K, PBS tampon içerisinde (1/10) 37 °C'de 30 dakika bekletilen doku kesitleri PBS tampon ile yıkandıktan sonra filtre edilmiş, PBS içerisinde 1500 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüpündeki tampon atıldıktan sonra doku kesitleri üzerine propidyum

iodid solüsyonu konularak 15 dakika karanlıkta +4 °C'de DNA metaryalinin boyanması sağlanmıştır. Örnekler FacScan cihazıyla incelenmiştir.

### **5.8. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analiz Graph- Pad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analizler için ANOVA testi kullanılmıştır.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.

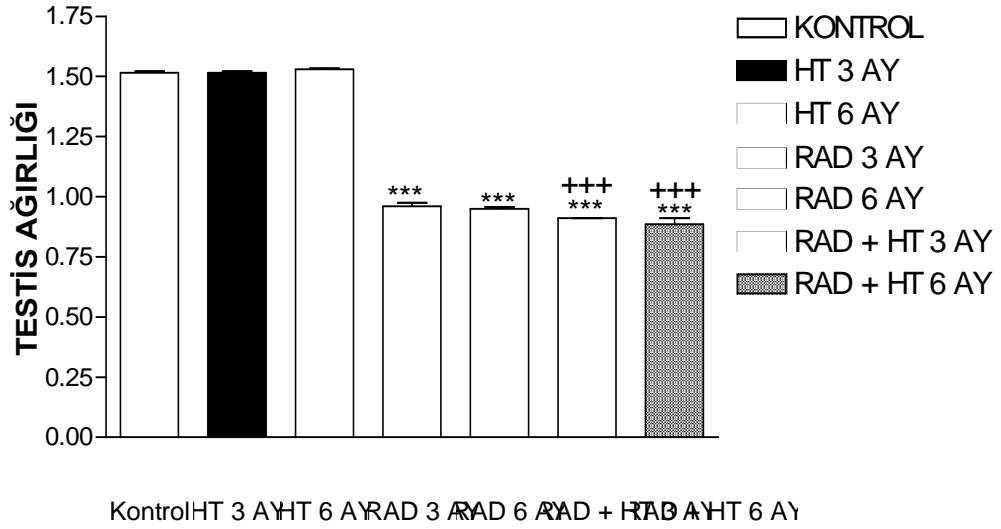
## **6. BULGULAR**

### **6.1. Testis Ağırlığı**

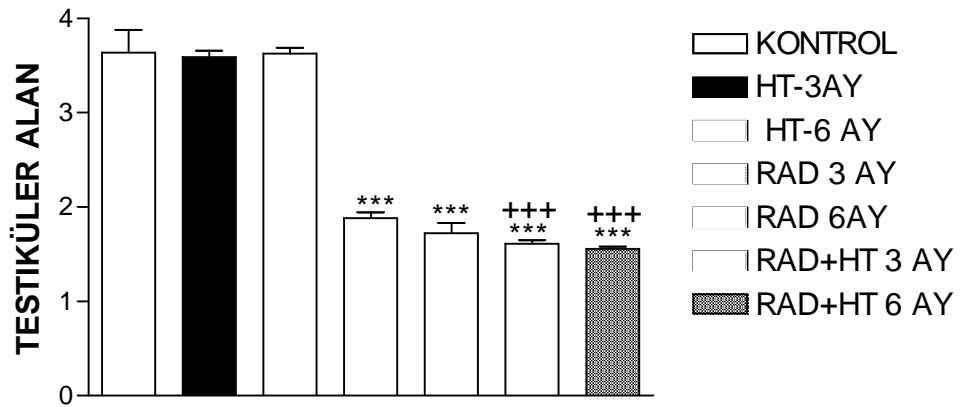
Kontrol grubunda testis ağırlığı  $1,52 \pm 0,1$ gr iken hipertermi grubunda 3 ay sonra  $1,52 \pm 0,08$  gr, 6 ay sonra  $1,51 \pm 0,1$  gr; radyasyon grubunda 3 ay sonra  $1,21 \pm 0,01$  gr, 6 ay sonra  $0,98 \pm 0,02$  gr; radyasyon ve hipertermi grubunda 3 ay sonra  $0,92 \pm 0,03$  gr, 6 ay sonra  $0,93 \pm 0,01$  gr'dır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında radyasyon ve radyasyon + hipertermi uygulanmış gruplarda testis ağırlığının anlamlı bir şekilde düştüğü gözlenmiştir (Grafik 1).

### **6.2. Testis Alanı**

Kontrol grubunda testis alanı  $3,83 \pm 0,3$  cm<sup>2</sup> iken hipertermi grubunda 3 ay sonra  $3,61 \pm 0,2$  cm<sup>2</sup>, 6 ay sonra  $3,62 \pm 0,15$  cm<sup>2</sup>; radyasyon grubunda 3 ay sonra  $1,9 \pm 0,1$  cm<sup>2</sup>, 6 ay sonra  $1,72 \pm 0,18$  cm<sup>2</sup>; radyasyon ve hipertermi grubunda 3 ay sonra  $1,61 \pm 0,02$  cm<sup>2</sup>, 6 ay sonra  $1,55 \pm 0,04$  cm<sup>2</sup>'dir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında radyasyon ve radyasyon+hipertermi uygulanmış gruplarda testis alanının anlamlı bir şekilde düştüğü gözlenmiştir (Grafik 2).



**Grafik 1:** Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış testiküler ağırlık grafiği. \*\*\*:  $p < 0,001$ ; kontrolle, +++:  $p < 0,001$ ; eş zamanlı HT grubuyla kıyaslanmıştır.



**Grafik 2:** Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış testiküler alan grafiği. \*\*\*:  $p < 0,001$ , kontrolle, +++ :  $p < 0,001$ ; eş zamanlı HT grubuyla kıyaslanmıştır.

### **6.3. Morfolojik Bulgular:**

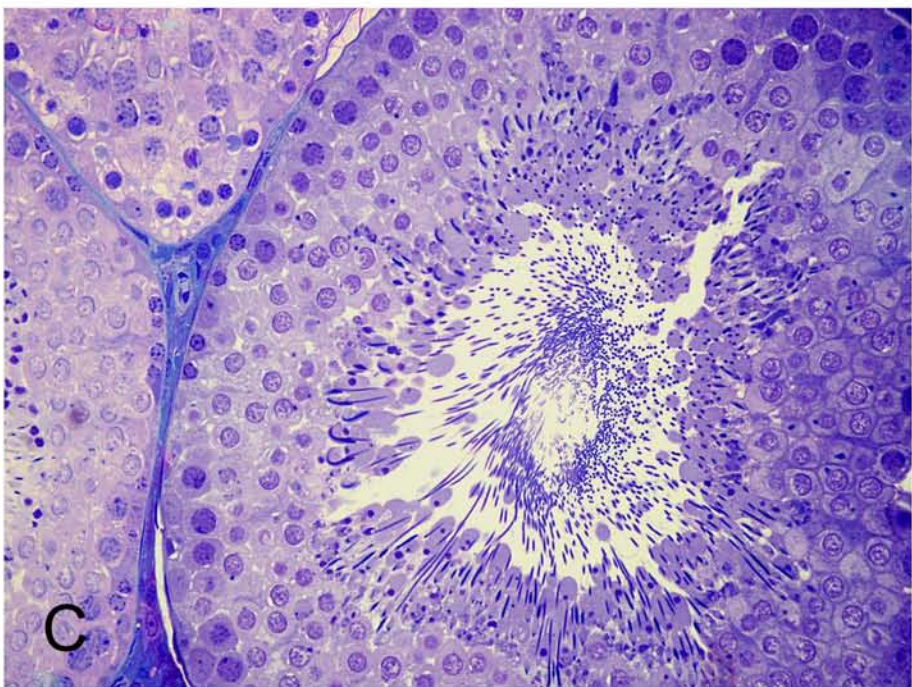
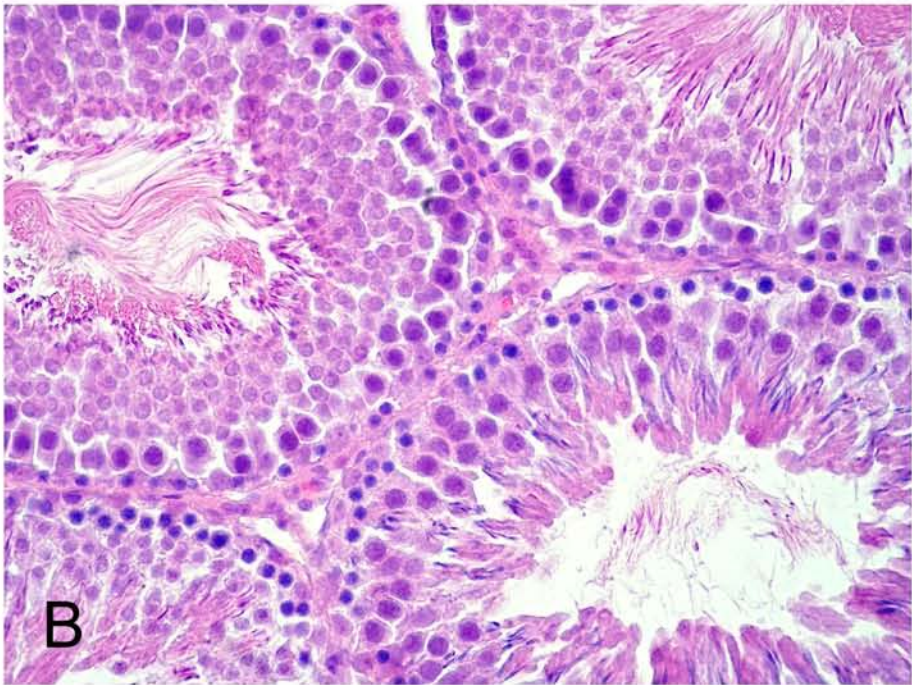
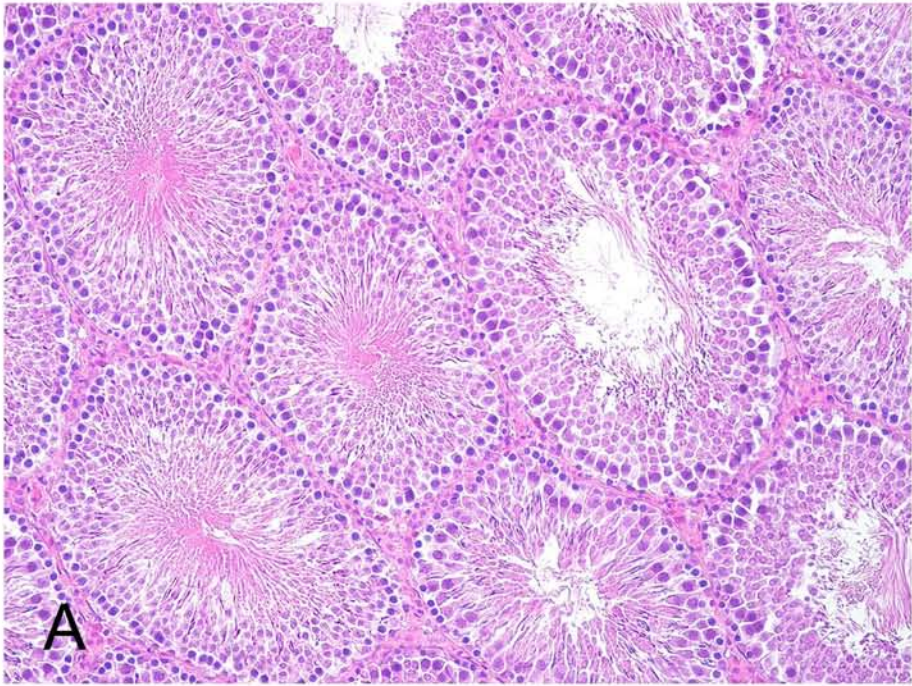
#### **Kontrol Grubu:**

Hem H&E ile boyanan hem de toluidin mavisi boyası ile boyalı yarı ince kesitlerde testislerde, normal morfolojik yapı gözlenmiştir. Seminifer tubullerdeki spermatogenik hücreler olan spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit ve spermatidler düzenli dizilmiştir. Birçok seminifer tubulün lümeninde çok sayıda spermatozoa görülmüştür. Sertoli hücreleri normal görünümdeydi. Tubul kontürleri düzgün olup intertisyel alan normal özellikteydi (Resim 1).

#### **Hipertermi Grubu:**

Hipertermi uygulamasından 3 ay sonra; hem H&E ile hem de toluidin mavisi boyası ile boyalı kesitlerde, bazı alanlarda dejeneratif seminifer tubullerinin olduğu gözlenmiştir. Seminifer tubullerde spermatogenik hücrelerin bazılarında vakuol görülürken, bazılarında spermatogenik serideki hücrelerde azalma dikkati çekmiştir. Bazı seminifer tubullerin lümeninde döküntü hücrelere rastlanmıştır. Hücreler arası alanlarda genişlemeler olmakla birlikte genel seminifer tubul organizasyonunun düzgün olduğu gözlenmiştir. Bazı seminifer tubullerin kontürlerinin bozulduğu ve interstisyel alanda hafif kalınlaşma olduğu gözlenmiştir. (Resim 2). Hipertermi uygulamasından 6 ay sonra; hem H&E ile hem de toluidin mavisi boyası ile boyalı kesitlerde, dejeneratif tubullerin arttığı ve atrofik tubullerinde az olmakla birlikte var olduğu gözlenmiştir. Seminifer tubullerde spermatogenik hücrelerin bazılarında vakuol görülürken, çoğunda spermatogenik serideki hücrelerde azalma dikkati çekmiştir. Birçok seminifer tubullün lümeninde döküntü hücreleri vardı. Eosinofilik sitoplazmalı ve piknotik nukleuslu hücrelerin sayısının arttığı gözlenmiştir. Hücreler arası alanlardaki genişlemelerin ileri derecede olduğu ve seminifer tubul organizasyonunu bozulmuştur. Seminifer tubullerin kontürlerinin bozulduğu ve interstisyel alanda orta düzeyde kalınlaşma olduğu gözlenmiştir. (Resim 3).



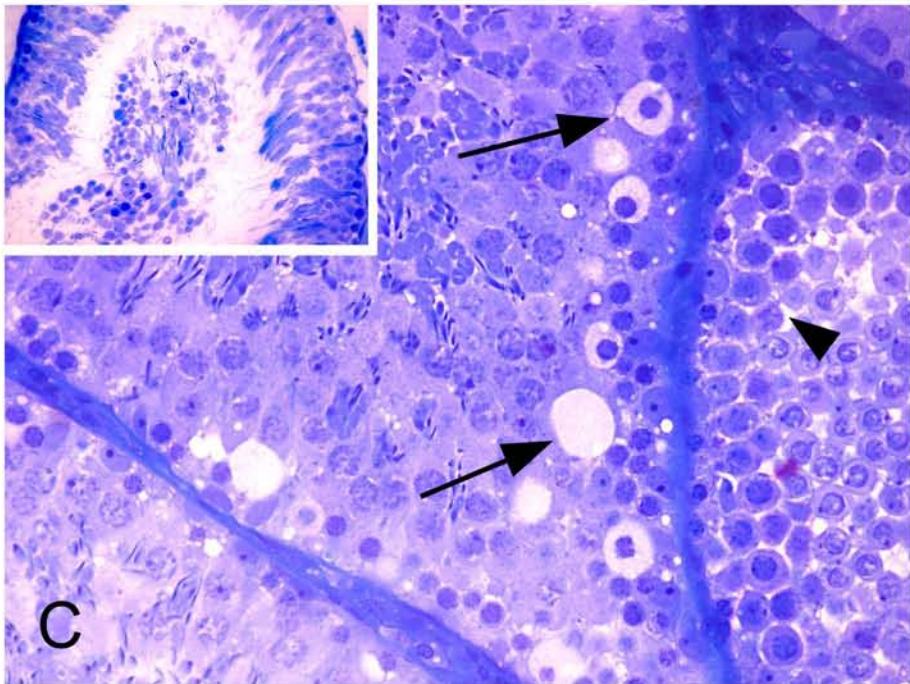
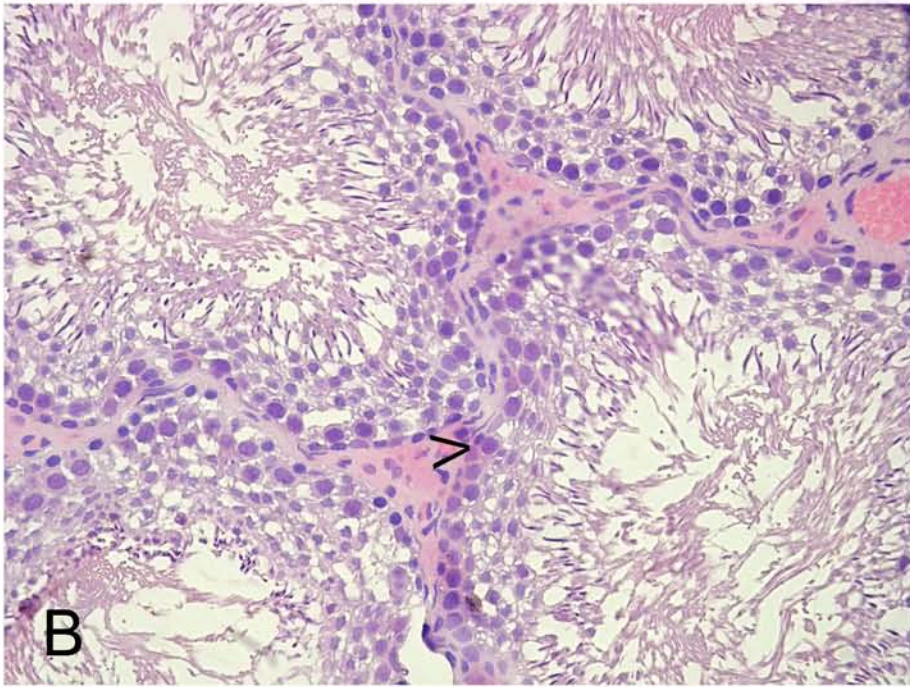
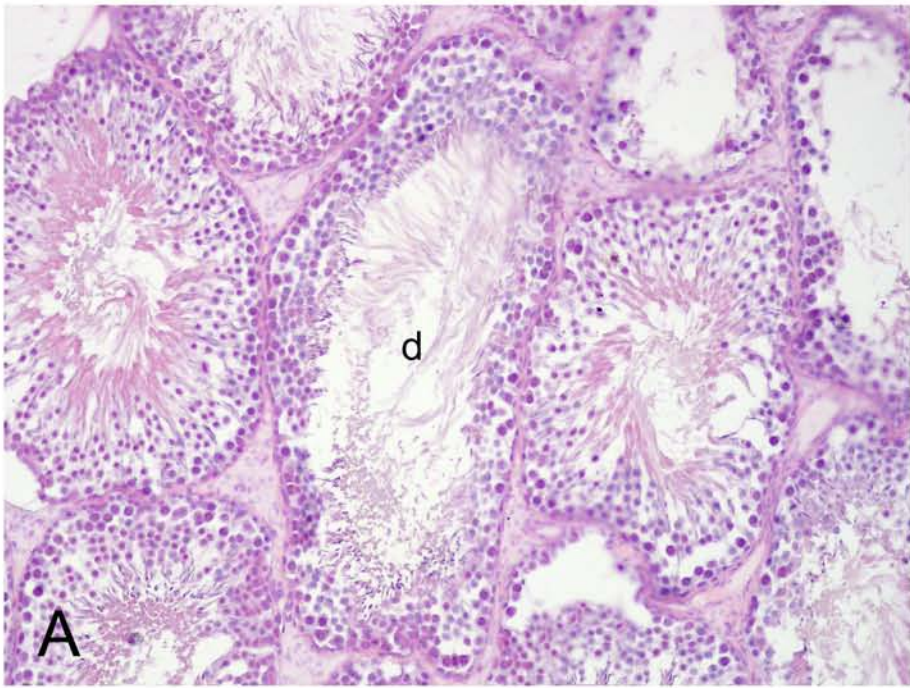


**Resim 1:** *Kontrol grubunda;* spermatogenik serideki spermatogonyumların, primer spermatositlerin, sekonder spermatositlerin, spermatidlerin, spermatozoaların, Sertoli hücrelerinin, Leydig hücrelerinin ve seminifer tubul kontürlerinin düzenli yapısı görülmektedir.

**A, B:** H&E boyası, **C:** Toluidin mavisi boyası boyası.

Orijinal büyütme **A:** x200, **B:**x400, **C:** x1000



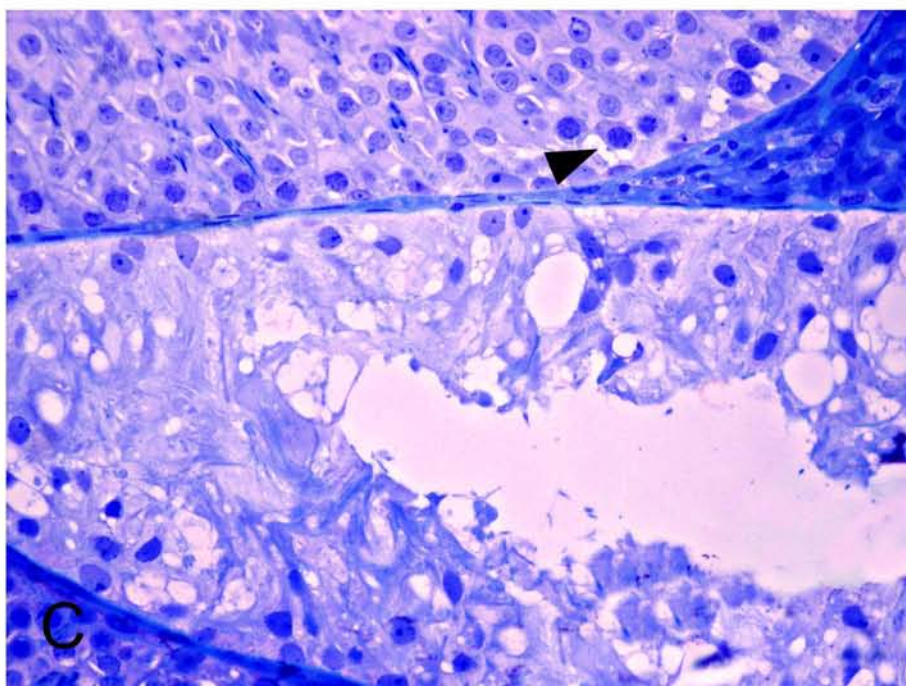
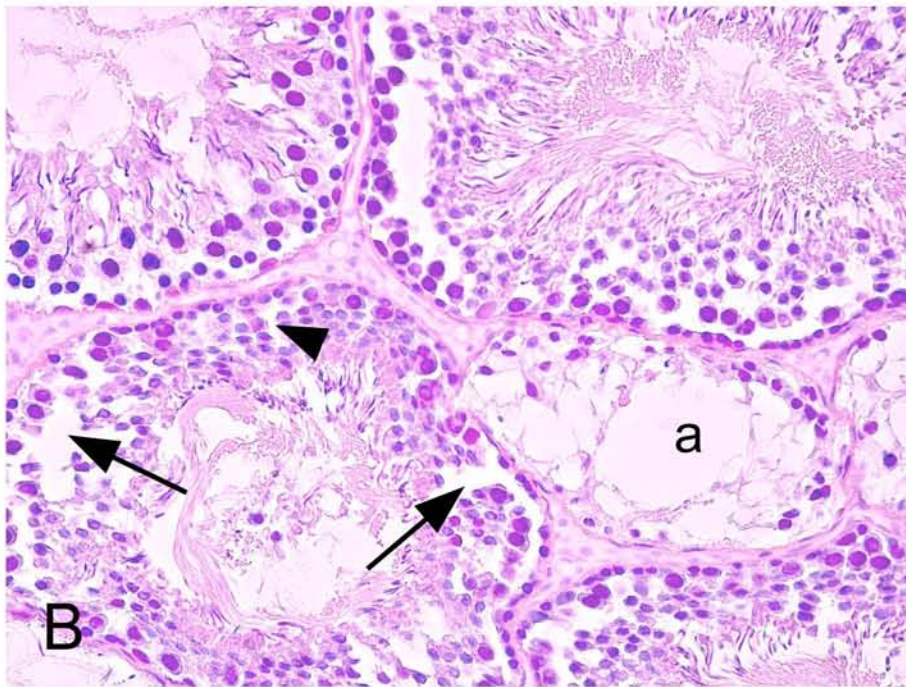
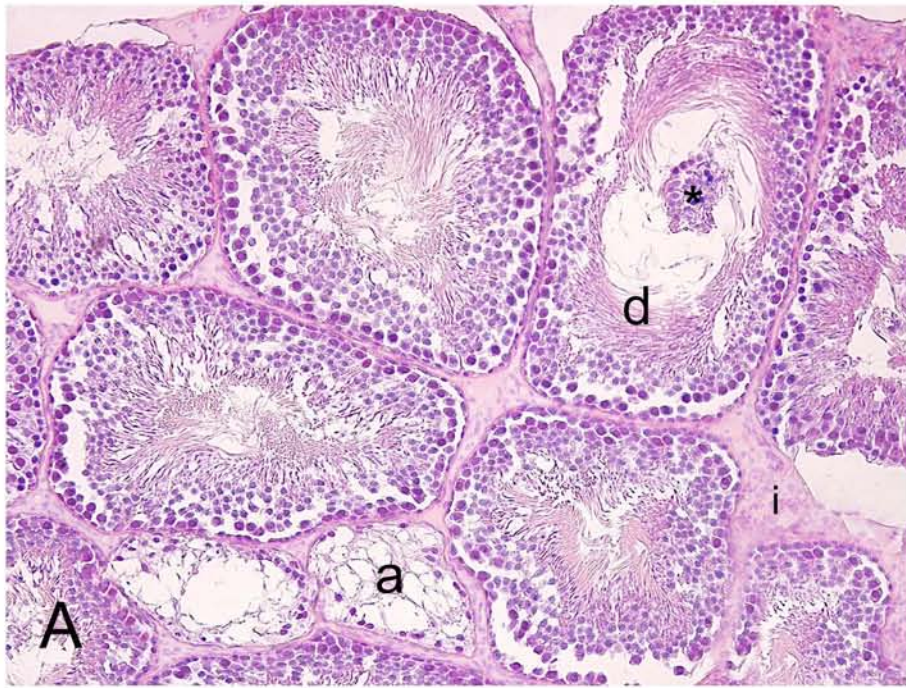




**Resim 2: Hipertermi uygulamasından 3 ay sonra;** seminifer tubullerde kontür bozukluğuyla (>) beraber bazı seminifer tubullerde dejenerasyon (d) gözlenmektedir. Yarı ince kesitlerde bazı spermatogenik hücrelerde vakuol (→) ve hücreler arası alanlarda ayrılmalar (▶), seminifer tubul lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri (\*) görülmektedir.

**A, B:** H&E boyası, **C:** toluidin mavisi boyası; orijinal büyütme

**A:** x200, **B:**x400, **C:**x1000, küçük resim: 200.



**Resim 3: Hipertermi uygulamasından 6 ay sonra;** bazı seminifer tubullerde dejenerasyon (d) ve lümende hücre döküntüleri (\*), hücreler arasındaki bağlantılarda açılma (►) ve hasar (→) gözlenmektedir.

**A, B:** H&E boyası, **C:** toluidin mavisi boyası

Orijinal büyütme; **A:** x200, **B:**x400, **C:**X1000

### **Radyasyon Grubu:**

Radyasyon uygulamasından 3 ay sonra; artmış seminifer tubul dejenerasyonu ile paralel olarak spermatogenik hücrelerde azalma, interstisyel doku artışı, nispeten sağlam spermatogenik hücrelerde ise vakuol oluşumu gözlenmiştir. (Resim 4). Radyasyon uygulamasından 6 ay sonra; yoğun derecede seminifer tubul dejenerasyonu ile paralel olarak spermatogenik hücrelerde azalma ve interstisyel doku artışı gözlenmiştir. (Resim 5).

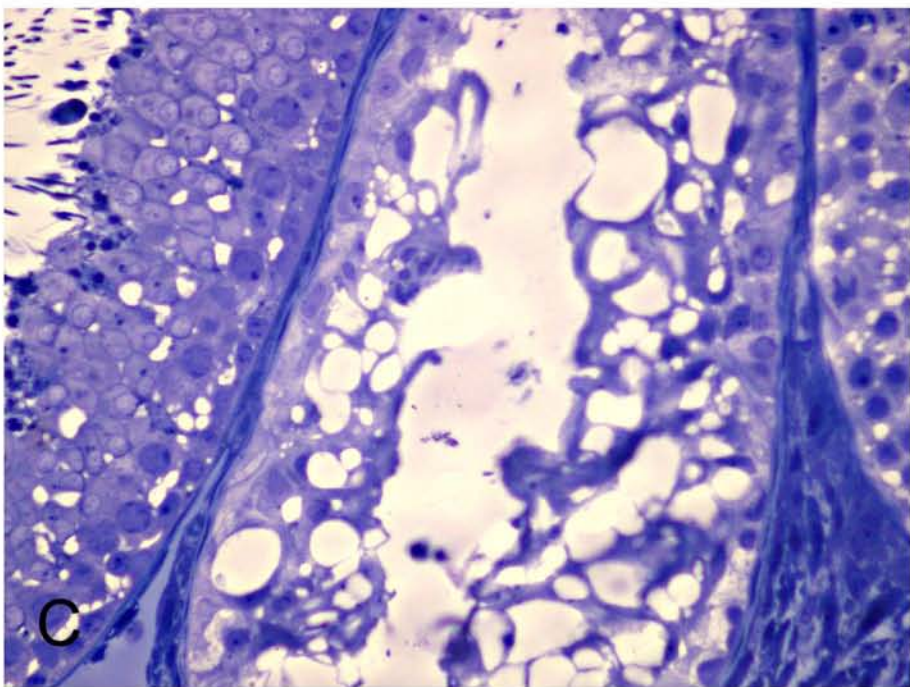
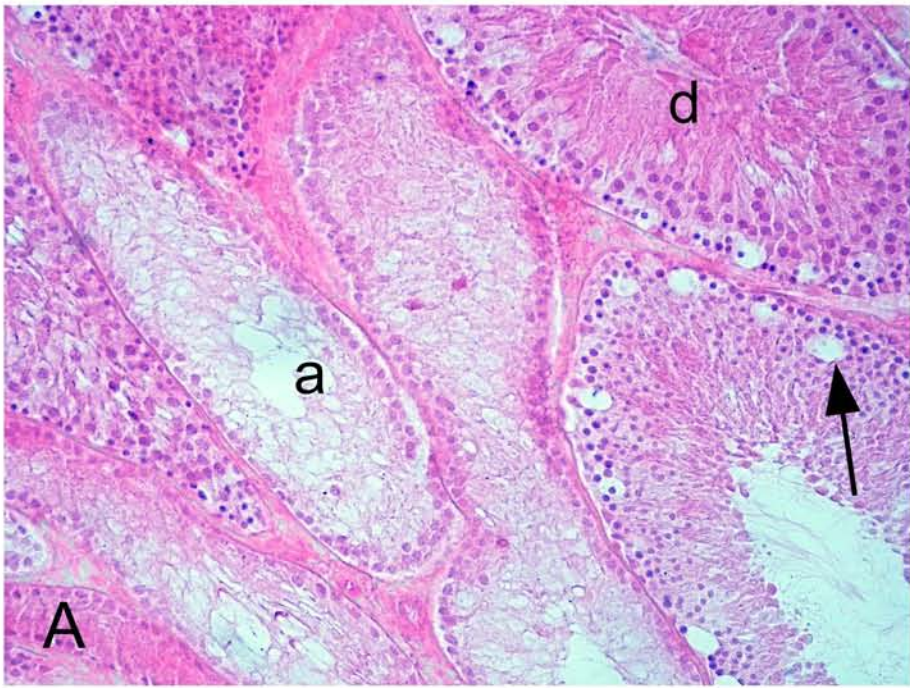
### **Radyasyon ve Hipertermi Grubu:**

Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 3 ay sonra; yoğun derecede seminifer tubul dejenerasyonu ile paralel olarak spermatogenik hücrelerde azalma, interstisyel doku artışı gözlenmiştir. Normal hücre yapısına rastlanmamıştır (Resim 6). Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 6 ay sonra; çok yoğun derecede seminifer tubul dejenerasyonu ile paralel olarak spermatogenik hücrelerde ileri derecede azalma, interstisyel doku artışı gözlenmiş, normal yapıda spermatogenik hücreye rastlanmamıştır (Resim 7).

### **6.4. Seminifer Tübül Hasarı Histopatolojik Skorumla Bulguları:**

Tüm deney gruplarındaki seminifer tubullerdeki histopatolojik değerlendirmeler Grafik 3'te gösterilmiştir. Buna göre kontrol grubunda normal seminifer tubul yapısı gözlenirken, hipertermi uygulanmış grupta 3 ay sonra, regresif seminifer tubullerin sayısının arttığı, altı ay sonrada bu artışın daha fazla olduğu gözlenmiştir. Radyasyon grubunda 3 ay sonra, normal tubul sayısı oldukça azalmış olduğu, sırasıyla regresif dejeneratif ve atrofik tubul sayısında artış olduğu görülmüştür. Aynı grupta 6 ay sonra ise özellikle atrofik tubul sayısının diğerlerine göre oldukça fazla sayıda olduğu görülmüştür. Radyasyon ve hipertermi uygulanmış grupta ise hem 3 ay hem de 6 ay sonra normal tubul yapısının yok denecek kadar az olduğu, atrofik tubul sayısının da oldukça fazla olduğu gözlenmiştir (Grafik 3).



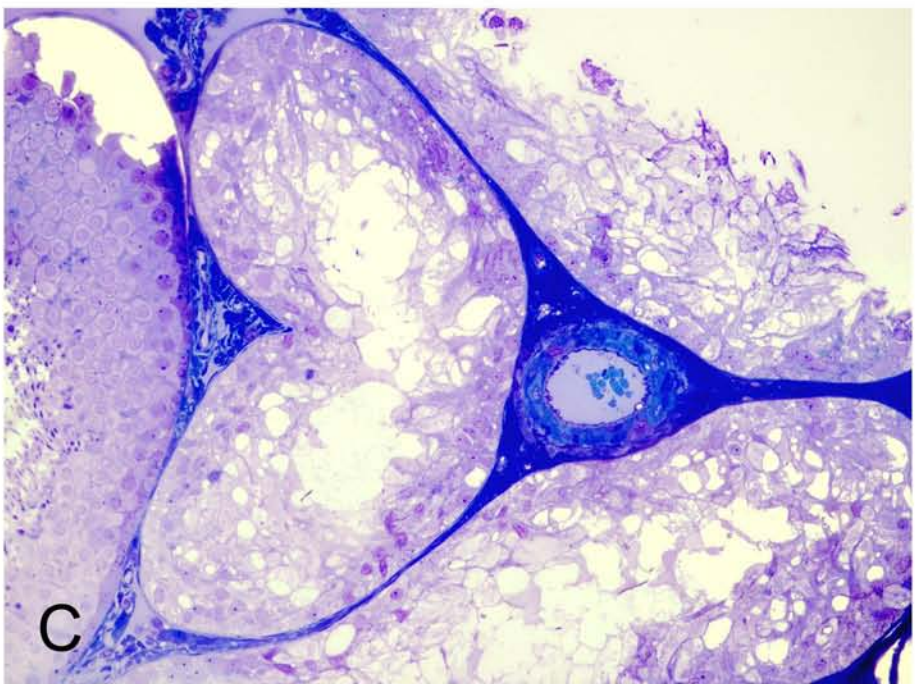
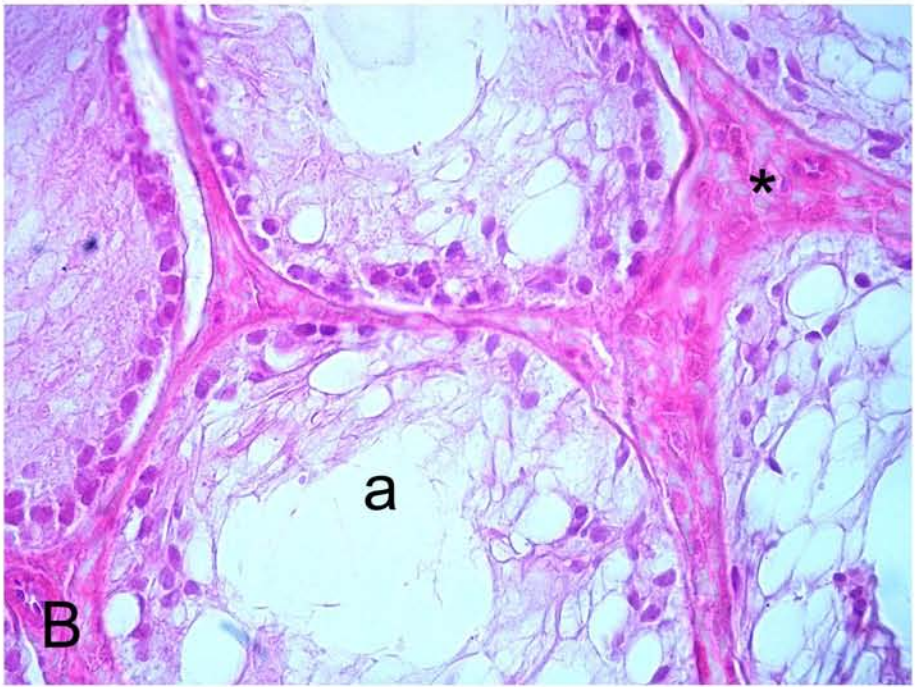
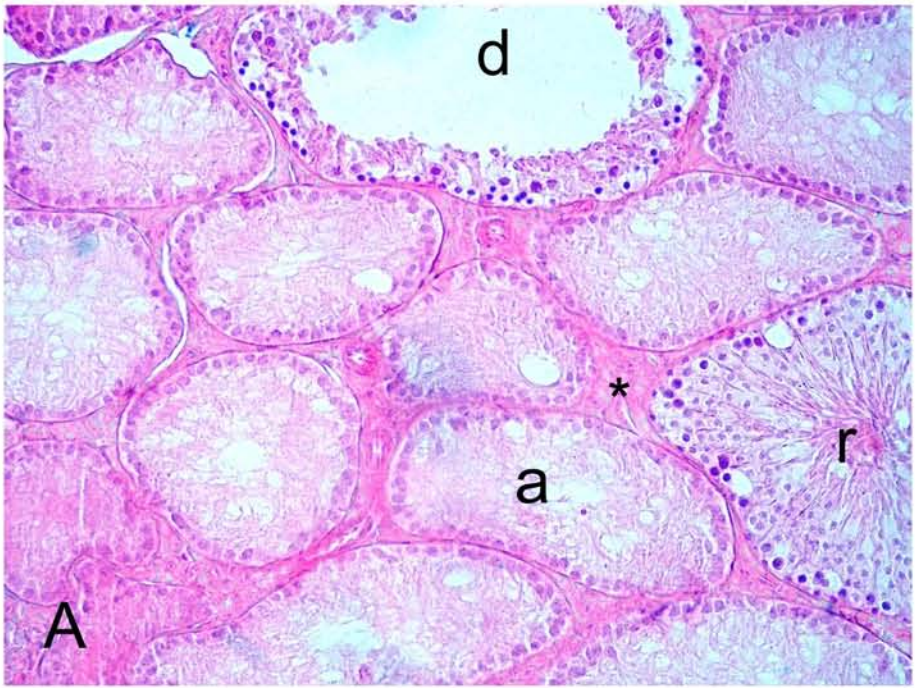


**Resim 4: Radyasyon uygulamasından 3 ay sonra;** dejeneratif (d), atrofik (a) tubuller spermatogenik hücrelerde azalma, intertisyel dokuda artış (\*) ve bazı spermatogenik hücrelerde ise vakuol (→) gözlenmektedir.

**A, B:** H&E boyası, **C:** toluidin mavisi boyası

Orijinal büyütme: **A:** x200, **B:** x400, **C:** x1000



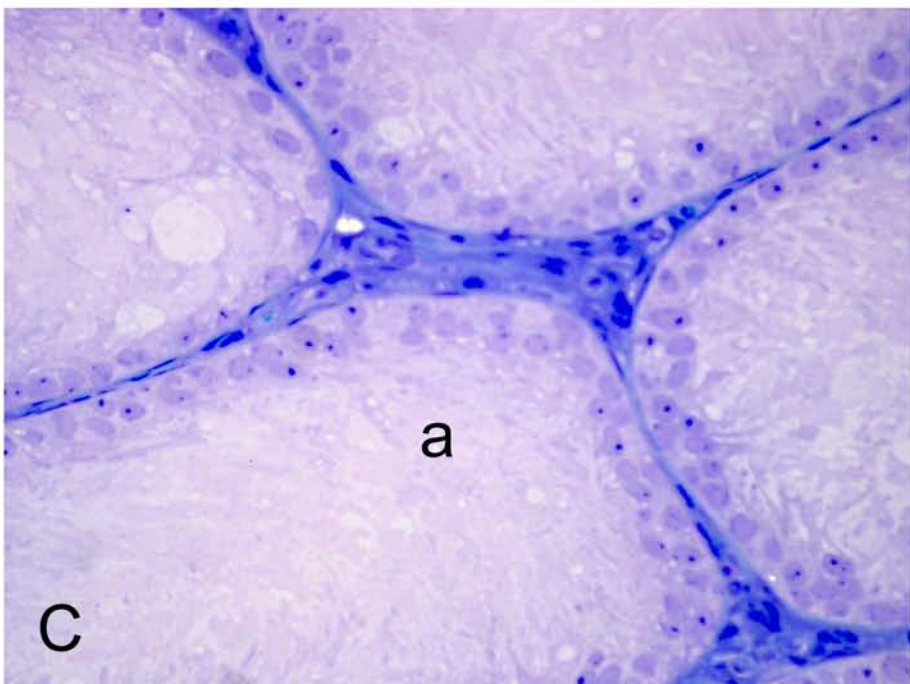
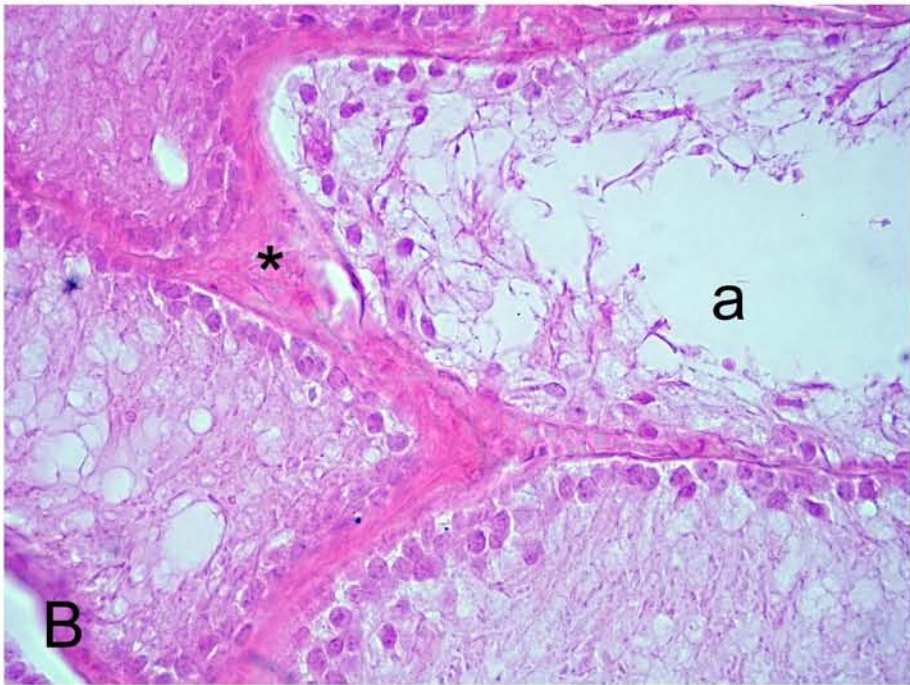
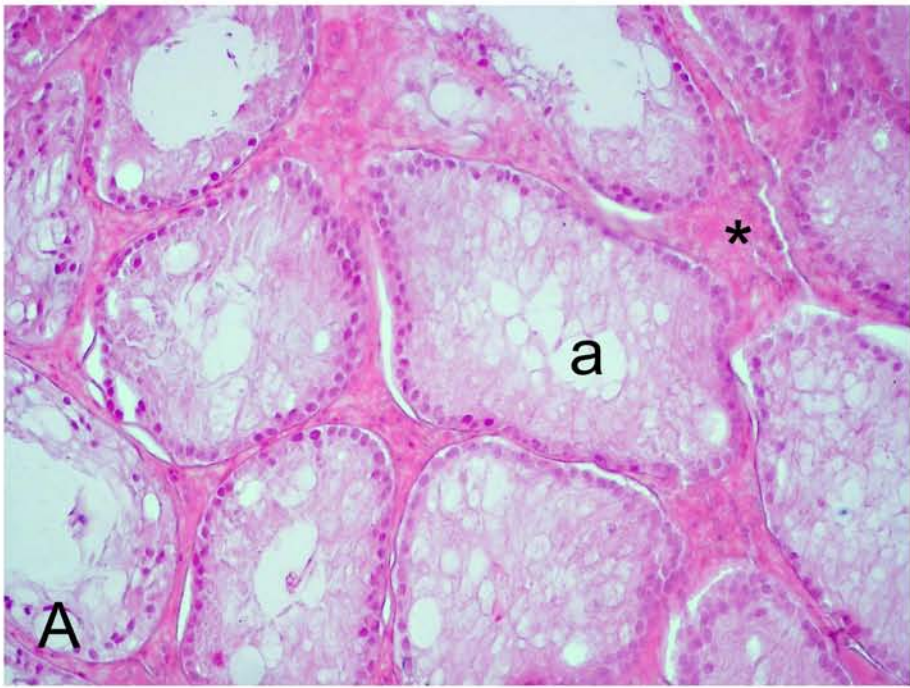


**Resim 5:** *Radyasyon uygulamasından 6 ay sonra; regresif (r) dejeneratif (d) ve atrofik (a) seminifer tubuller ve intertisyel doku artışı (\*) görülmektedir.*

**A, B:** H&E boyası, **C:** toluidin mavisi boyası

Orijinal büyütme: **A:** x200, **B:** x400, **C:** x1000



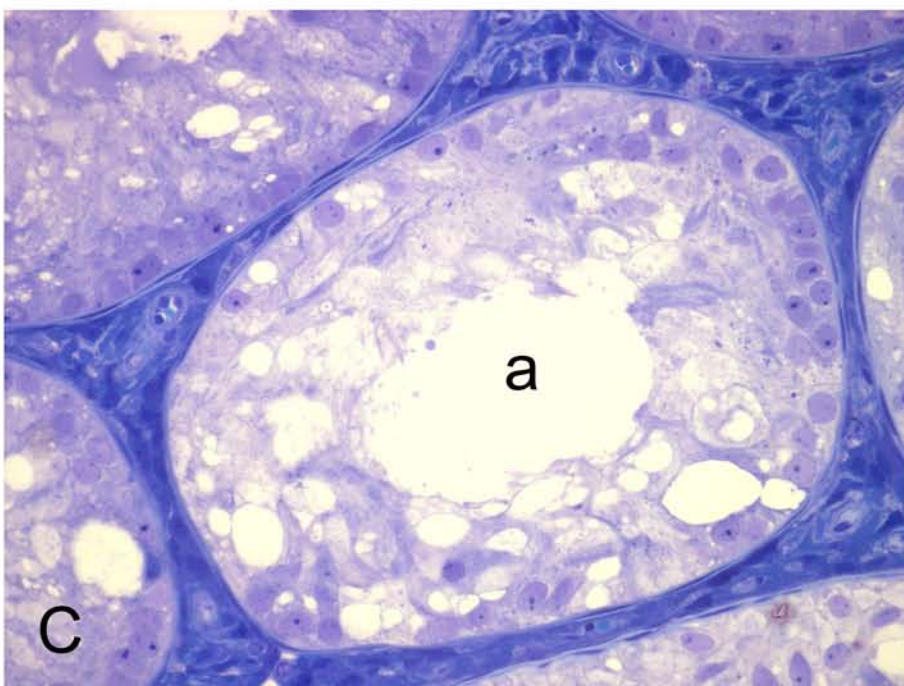
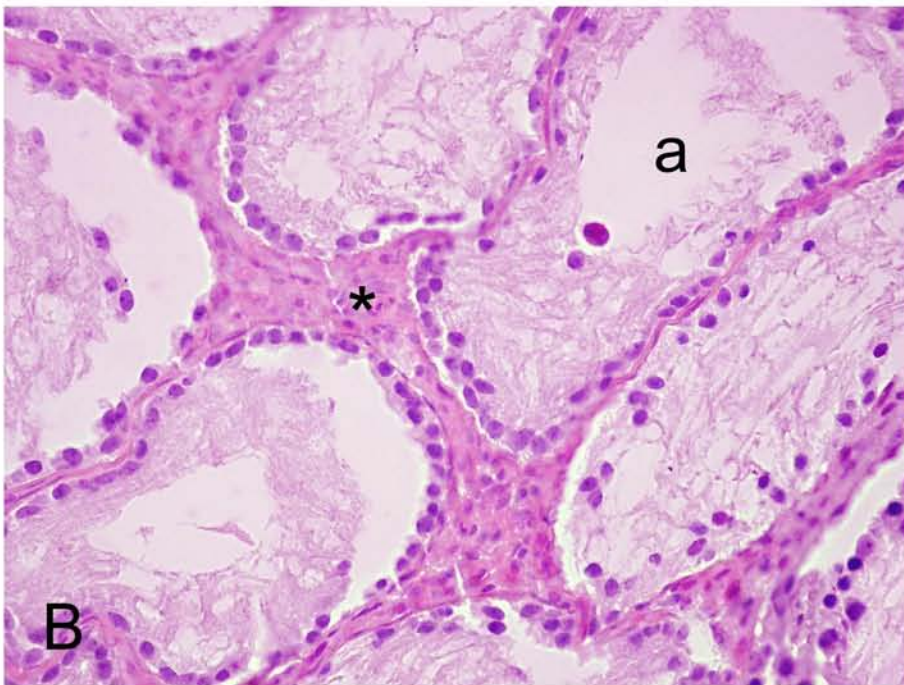
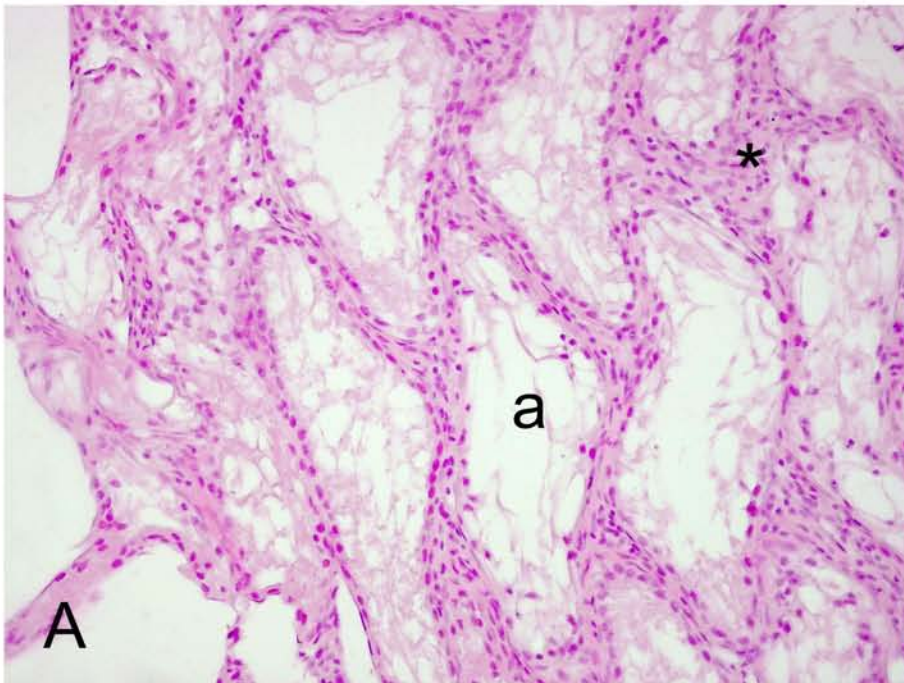


**Resim 6:** *Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 3 ay sonra; yoğun derecede atrofik seminifer tubuller (a) ve intertisyel doku artışı (\*) gözlenmektedir.*

**A, B:** H&E boyası, **C:** toluidin mavisi boyası

Orijinal büyütme: **A:** x200, **B:** x400, **C:** x1000

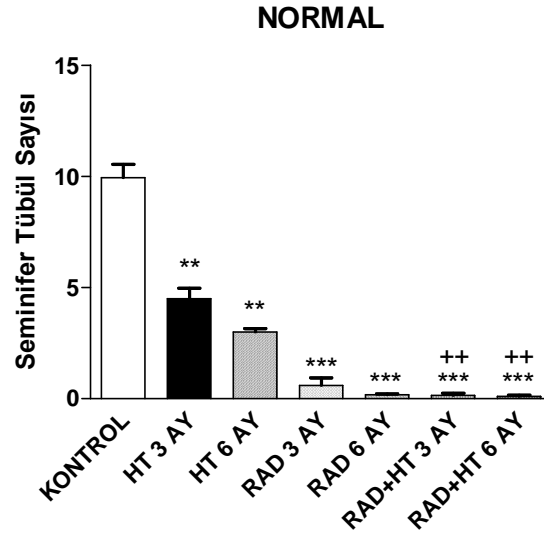




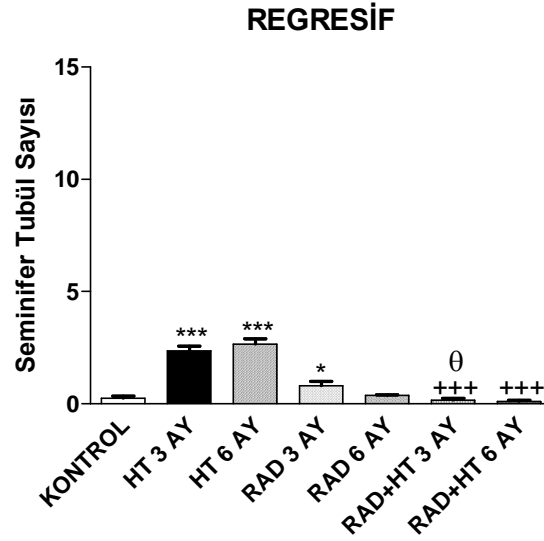
**Resim 7:** *Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 6 ay sonra; çok yoğun derecede atrofik seminifer tubuller (a) ve intertisyel doku artışı (\*) gözlenmektedir.*

**A, B:** H&E boyası, **C:** toluidin mavisi boyası

Orijinal büyütme: **A:** x200, **B:** x400, **C:** x1000

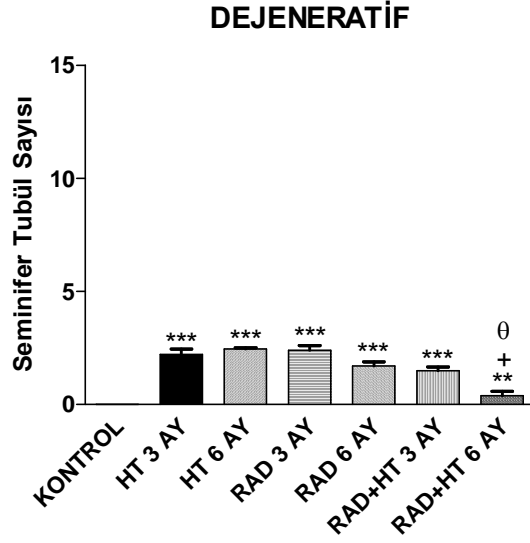


A)

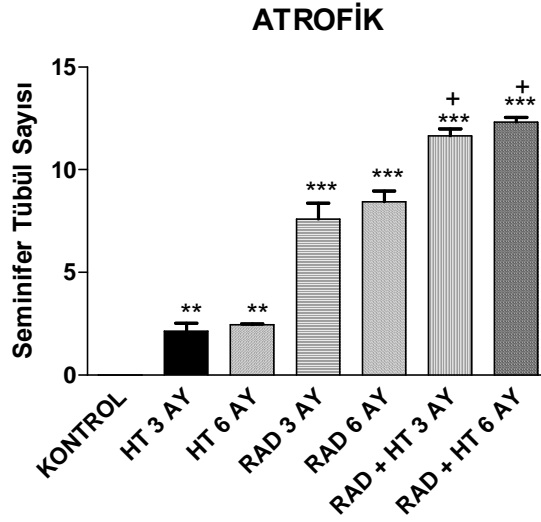


B)

**Grafik 3:** Deney gruplarında seminifer tubüllerde histopatolojik skorlama grafiği. A) normal, B) regresif, C) dejeneratif ve D) atrofik tubul sayısının gruplar arasındaki dağılımı. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  kontrole göre kıyaslanmıştır. ++:  $p < 0,01$ , +++:  $p < 0,001$  HT grubuna göre,  $\theta$ :  $p < 0,05$  RAD grubuna göre kıyaslanmıştır.



C)



D)

**Grafik 3:** Deney gruplarında seminifer tubullerde histopatolojik skorlama grafiği. **A)** normal, **B)** regresif, **C)** dejeneratif ve **D)** atrofik tubul sayısının gruplar arasındaki dağılımı. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  kontrole göre; +:  $p < 0,05$ , HT grubuna göre, θ:  $p < 0,01$  RAD grubuna göre kıyaslanmıştır.

## **6.5. ZO-1 ve Okludin İmmunohistokimyası Bulguları:**

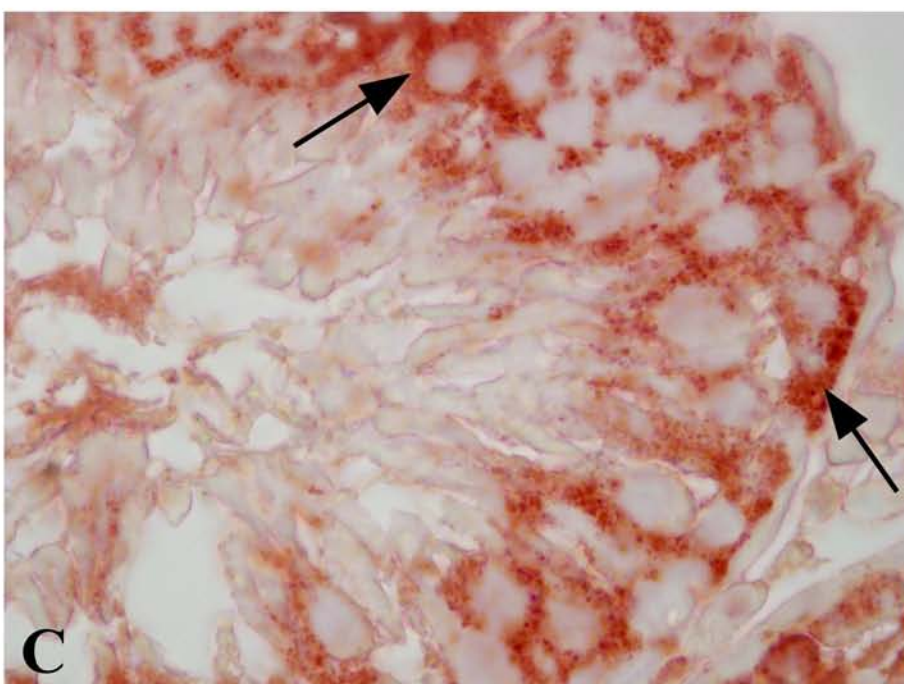
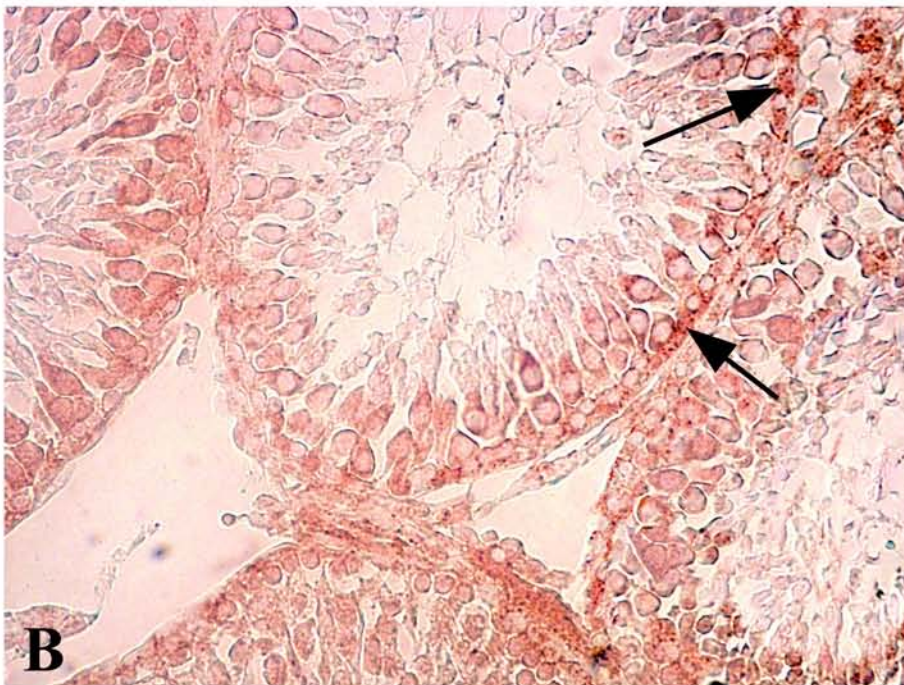
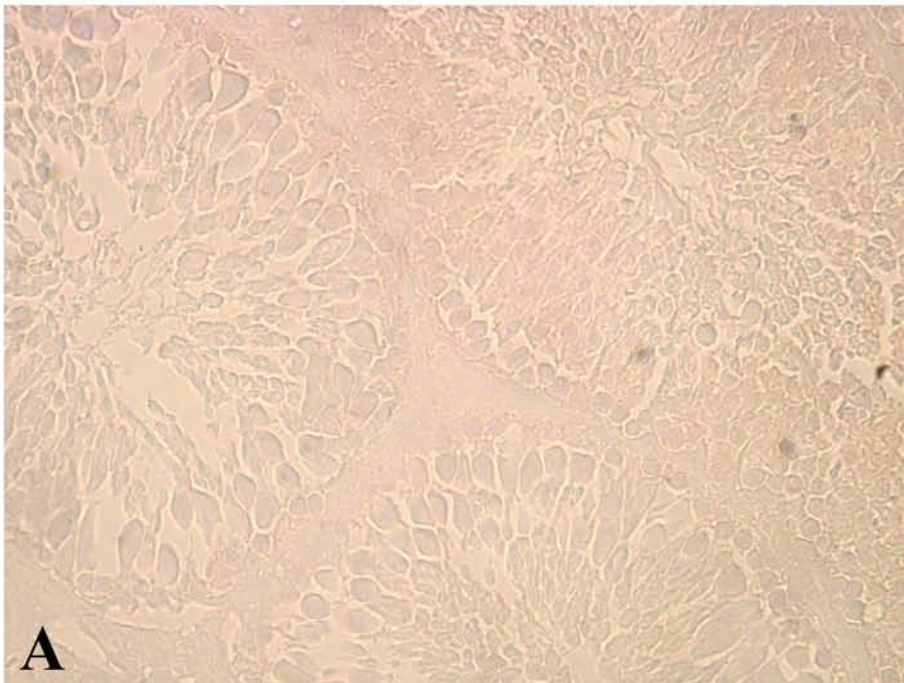
### **Kontrol Grubu:**

ZO-1 immunohistokimyasını doğrulamak amacıyla primer antikoru çıkarıp diğer immunohistokimya tekniği aynı olacak şekilde yapılan negatif kontrollerde herhangi bir boyanma gözlenmemiştir (Resim 8A). ZO-1 immunohistokimyası yapılmış seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerinin ve bazalde yerleşmiş spermaogenetik seriye ait hücrelerin periferik sitoplazmalarında kahverengi olarak boyanmış ZO-1 immunoreaktivitesi (ir) gözlenmiştir (Resim 8B). Okludin immunohistokimyasını doğrulamak amacıyla primer antikoru çıkarıp diğer immunohistokimya tekniği aynı olacak şekilde yapılan negatif kontrollerde herhangi bir boyanma gözlenmemiştir (Resim 8A). Okludin immunohistokimyası yapılmış seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerinin intertisyal alana yakın olan bazal kısımlarında kahverengi olarak boyanmış Okludin ir görülmüştür (Resim 8 B).

### **Hipertermi Grubu:**

HT uygulanmasından 3 ay sonra; ZO-1 immunohistokimyası yapılmış testiste birçok seminifer tübüldeki Sertoli hücrelerinin ve bazalde yerleşmiş spermatogenetik seriye ait hücrelerin periferik sitoplazmalarında ZO-1 ir gözlenmiştir. (Resim 9A). Okludin immunohistokimyası yapılmış testiste birçok seminifer tübüldeki Sertoli hücrelerinin intertisyal dokuya yakın olan bazal kısımlarında okludin-ir görülmüştür. (Resim 9 B). Kontrol grubuna göre ZO-1 ve okludin immunreaktivitesinde azalma izlenmiştir. HT uygulanmasından 6 ay sonra; ZO-1 immunohistokimyası yapılmış testiste bazı seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerinin ve bazalde yerleşmiş spermatogenetik seriye ait hücrelerin periferik sitoplazmalarında ZO-1 ir gözlenmiştir. (Resim 10A). Okludin immunohistokimyası yapılmış testiste bazı seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerinin intertisyal dokuya yakın olan bazal kısımlarında okludin-ir görülmüştür (Resim 10B). Kontrole ve HT 3 ay grubuna oranla ZO-1 ve okludin immunreaktivitesinde azalma izlenmiştir (Tablo 1).

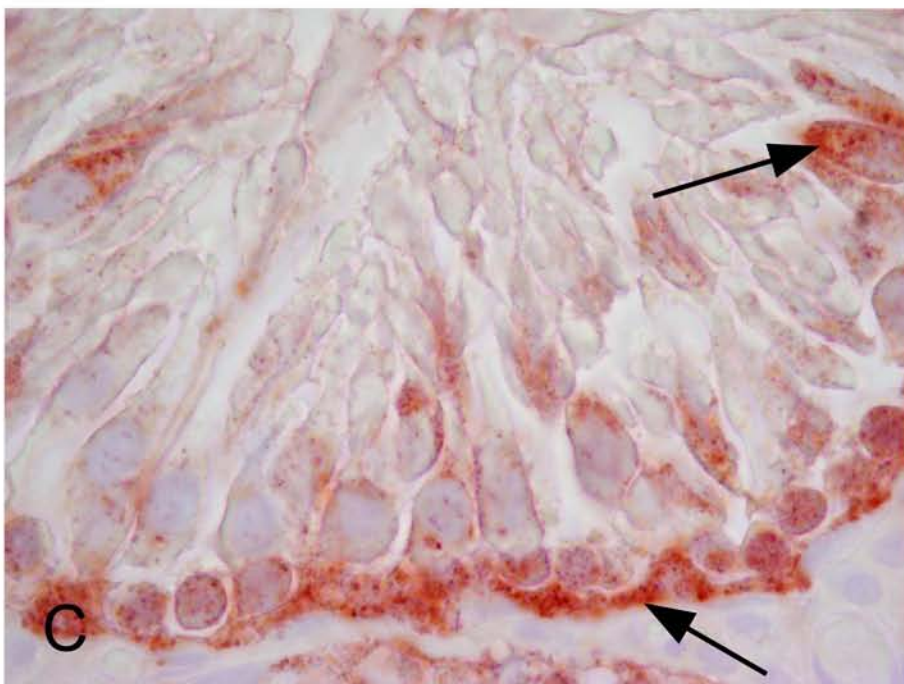
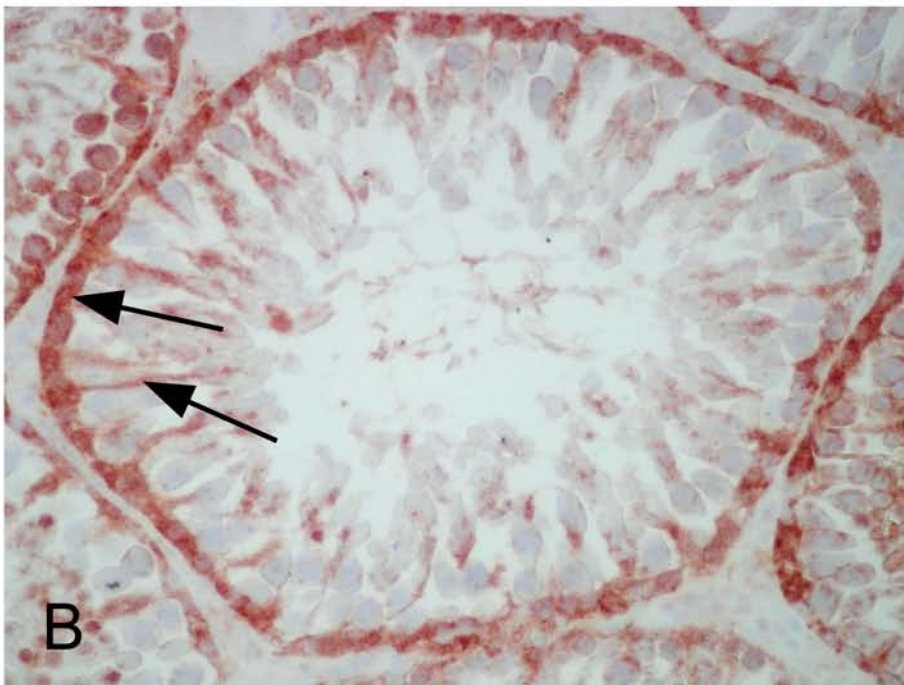
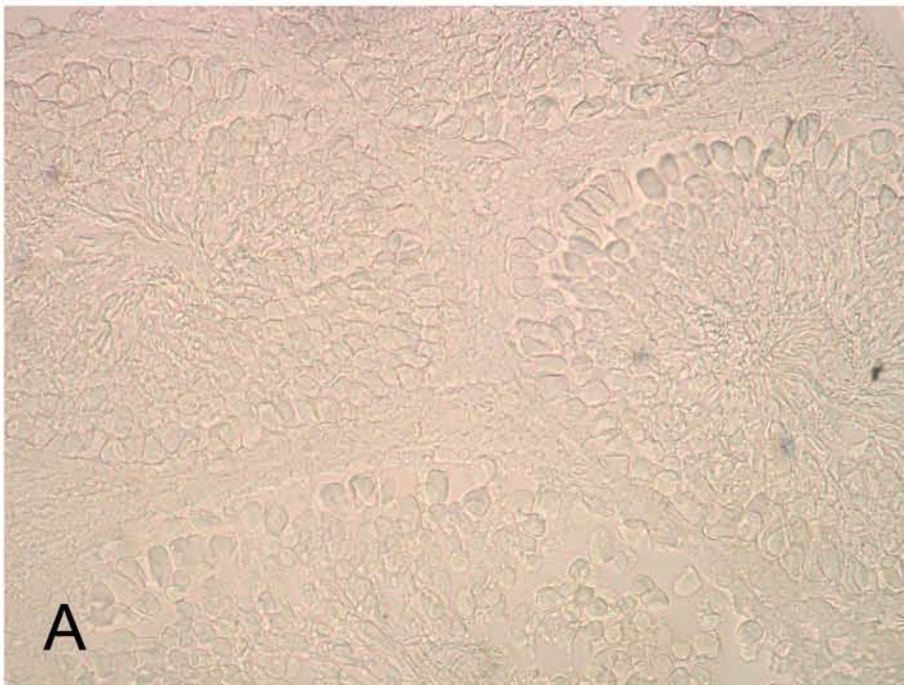




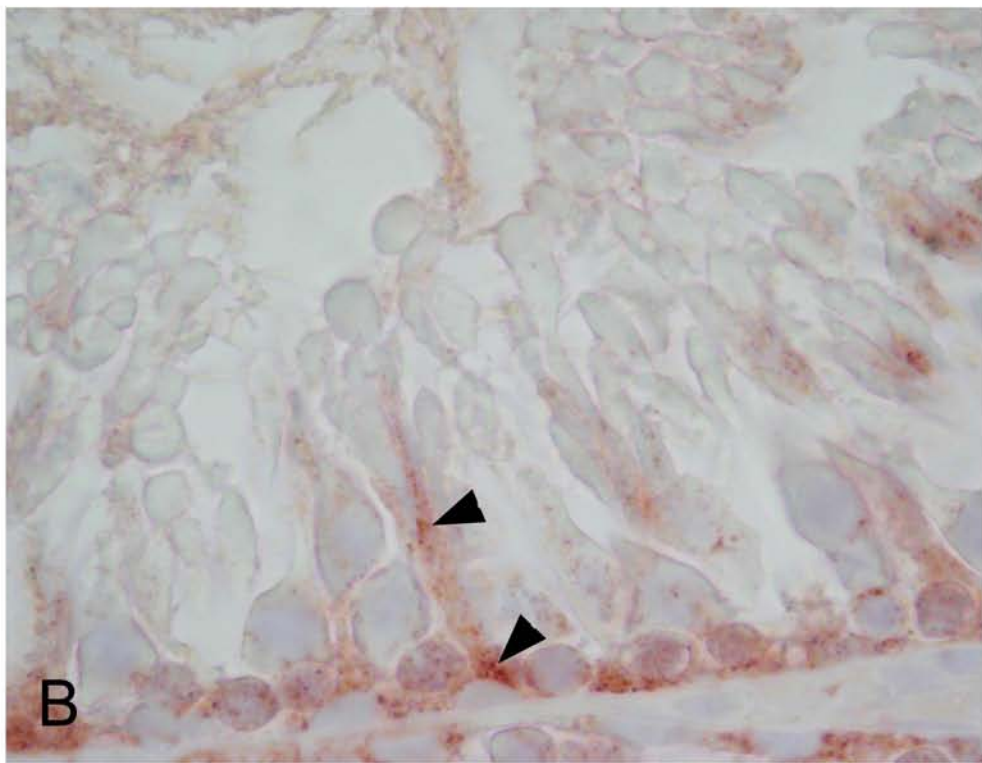
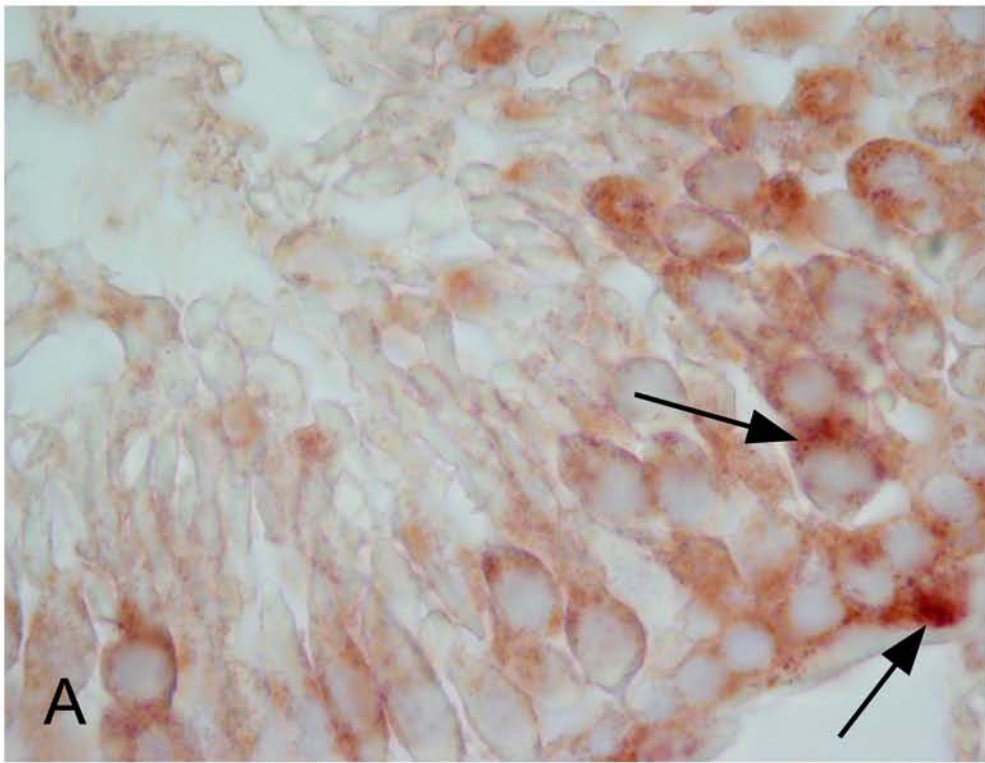


**Resim 8:** *Kontrol grubunda; A) ZO-1 immunohistokimyası negatif kontrolünde boyanma gözlenmemektedir. B, C) Sertoli hücrelerinin ve bazalde yerleşmiş spermatogenik seriye ait hücrelerin periferik sitoplazmalarında kahverengi olarak boyanmış ZO-1 immunorektivitesi (ir) (→) gözlenmektedir.*

Orijinal büyütme. **A, B:** x400, **C:** x1000.



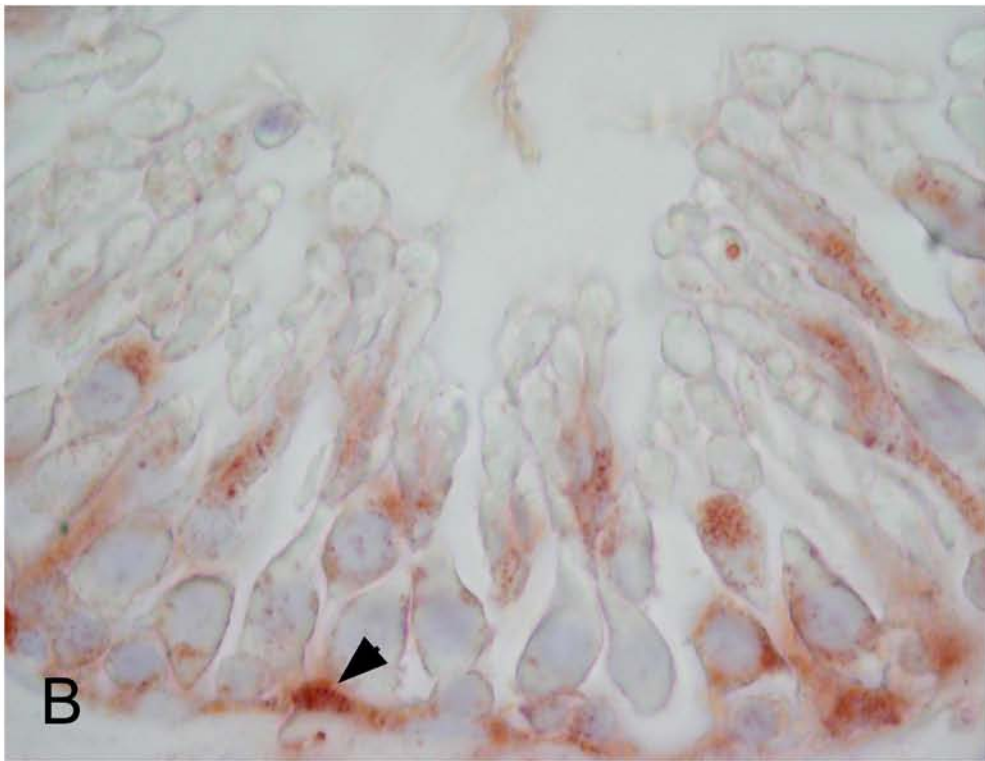
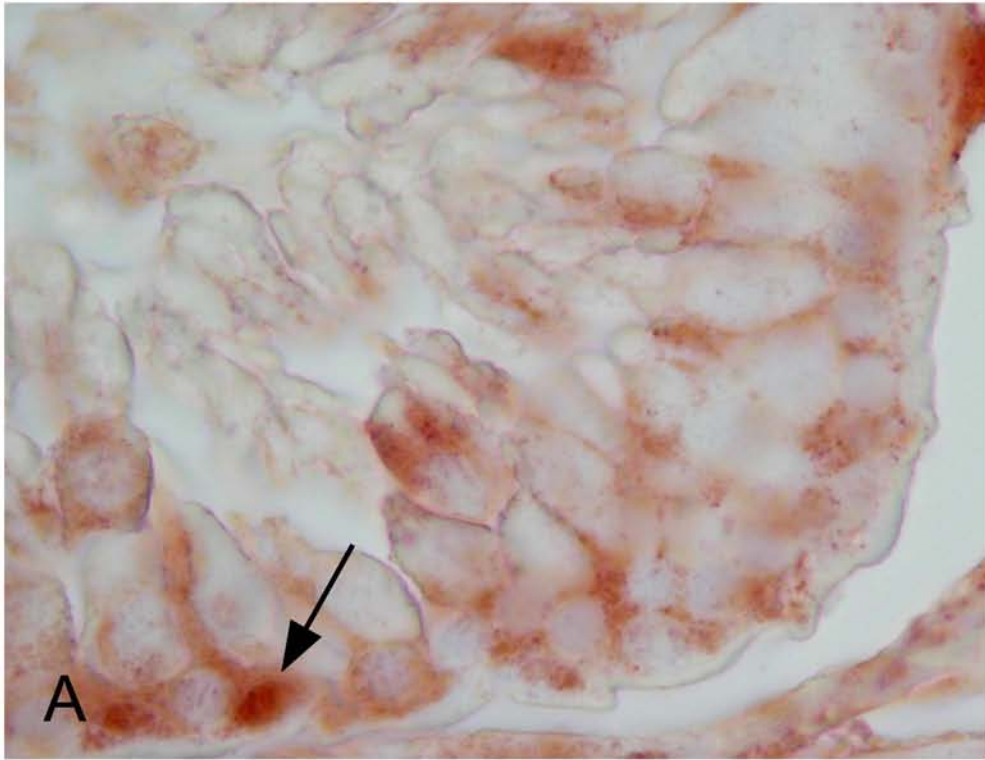
**Resim 9:** *Kontrol grubunda; A)* Okludin immunohistokimyası negatif kontrolünde boyanma gözlenmemektedir. **B, C)** Sertoli hücrelerinin intertisyal alana yakın olan bazal kısımlarında kahverengi olarak boyanmış Okludin ir (→) görülmektedir. Orijinal büyütme **A, B:** x400, **C:** x 1000.



**Resim 10:** *HT uygulanmasından 3 ay sonra;* **A)** Sertoli hücrelerinin ve bazalde yerleşmiş spermatogenetik seriye ait hücrelerin periferik sitoplazmalarında ZO-1-ir (→) izlenmektedir. **B)** Sertoli hücrelerinin intertisyal dokuya yakın olan bazal kısımlarında azalmış Okludin-ir (►)görülmektedir.

Orijinal büyütme **A, B:** x1000.





**Resim 11:** *HT uygulanmasından 6 ay sonra;* **A)** Sertoli hücrelerinin ve bazalde yerleşmiş spermatogenetik seriye ait hücrelerin periferik sitoplazmalarında azalmış ZO-1 ir (→) gözlenmektedir. **B)** Sertoli hücrelerinin intertisyel dokuya yakın olan bazal kısımlarında azalmış Okludin-ir (►) görülmektedir.

Orijinal büyütme **A, B:** x 1000.

### **Radyasyon Grubu:**

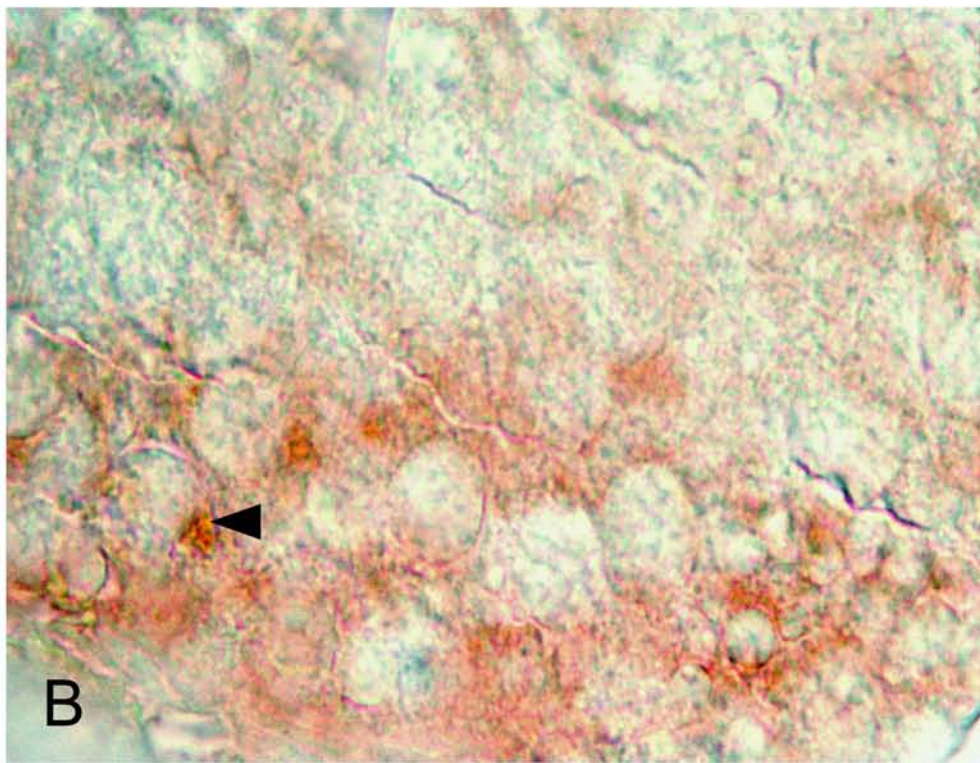
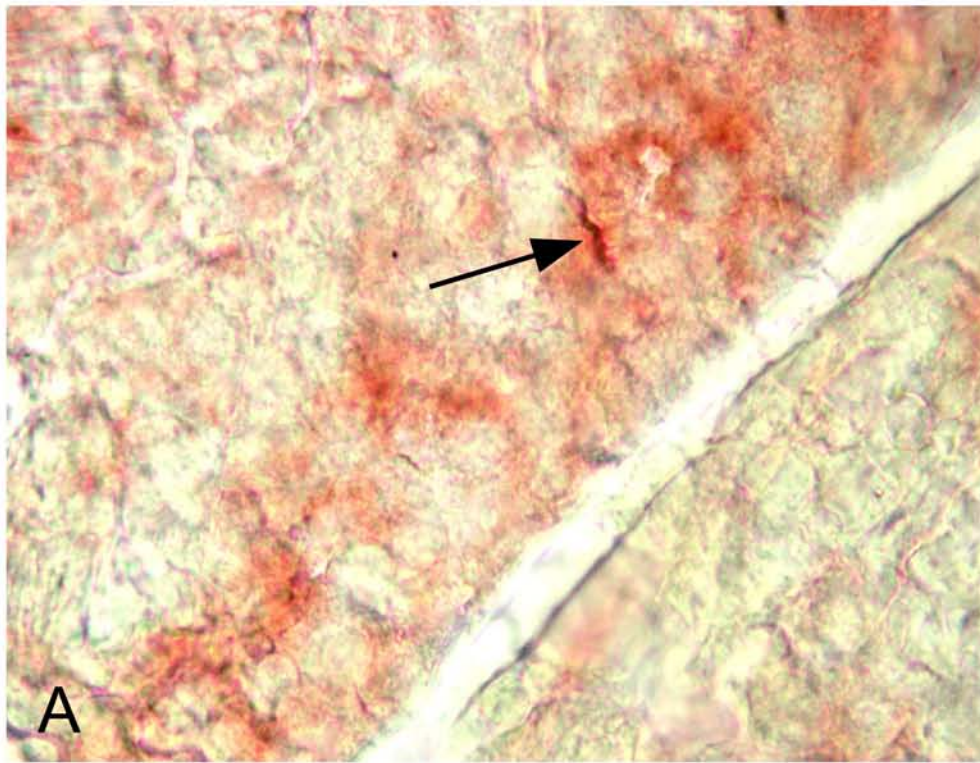
Radyasyon uygulanmasından 3 ay sonra; ZO-1 immunohistokimyası yapılmış testiste sadece bir kaç seminifer tübüldeki Sertoli hücrelerinin ve bazalde yerleşmiş spermatojenetik seriye ait hücrelerin periferik sitoplazmalarında ZO-1 ir gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre ZO-1 immunreaktivitesinde ciddi bir şekilde azalma izlenmiştir (Resim 12A). Okludin immunohistokimyası yapılmış testiste sadece bir kaç seminifer tübüldeki Sertoli hücrelerinin intertisyel dokuya yakın olan bazal kısımlarında zayıf okludin-ir görülmüştür. (Resim 12 B). Radyasyon uygulanmasından 6 ay sonra; testiste seminifer tubullerde ZO-1 ir (Resim 13A) ve Okludin-ir alan gözlenmemiştir (Resim 13 B).

### **Radyasyon ve Hipertermi Grubu:**

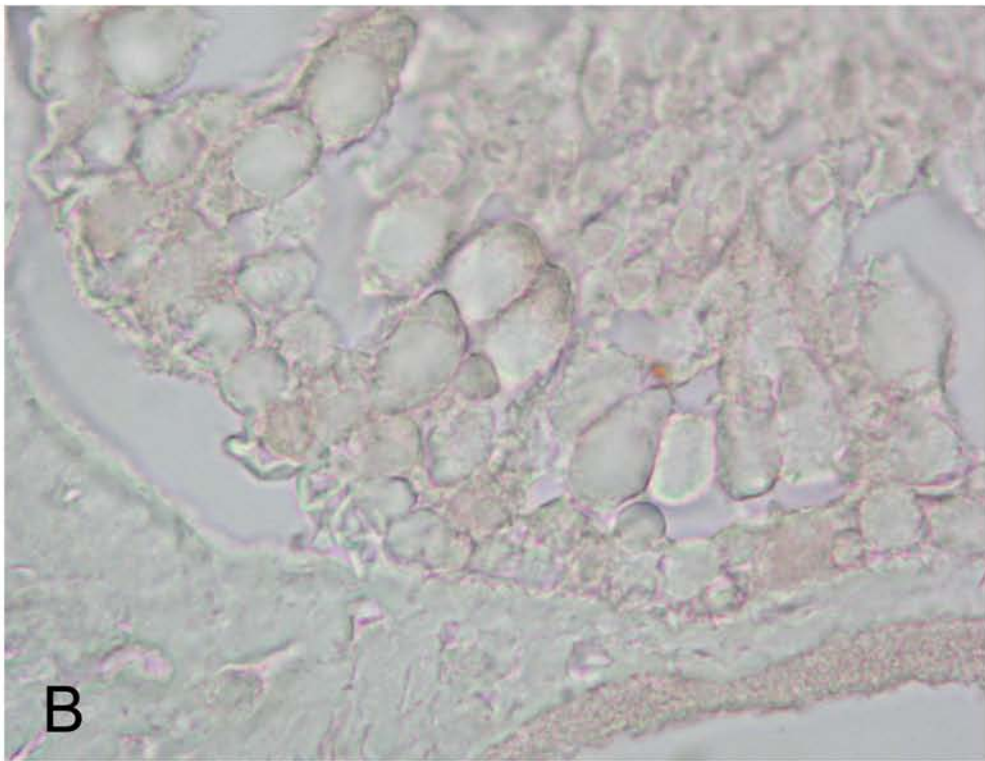
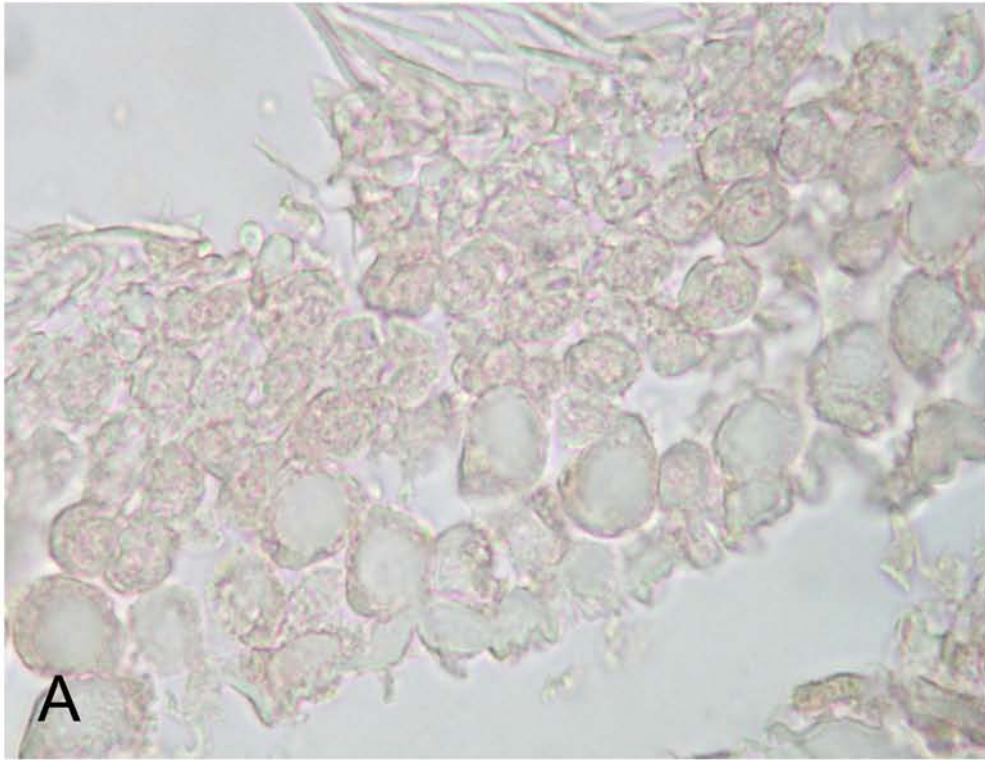
Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 3 ve 6 ay sonra testiste seminifer tubullerde ZO-1 ir (Resim 14A, 15A) ve Okludin-ir (Resim 14B, 15B) alan gözlenmemiştir.

ZO-1 ve okludin immunoreaktivitesinin gruplara göre dağılımı Tablo 1'de özetlenmiştir.



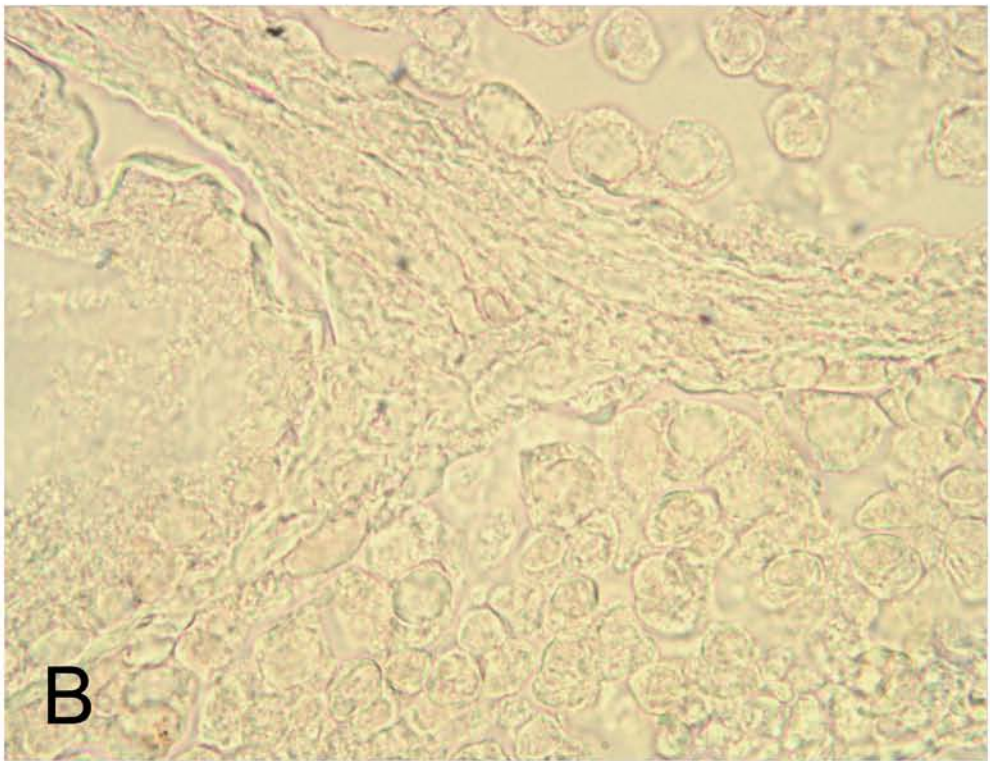
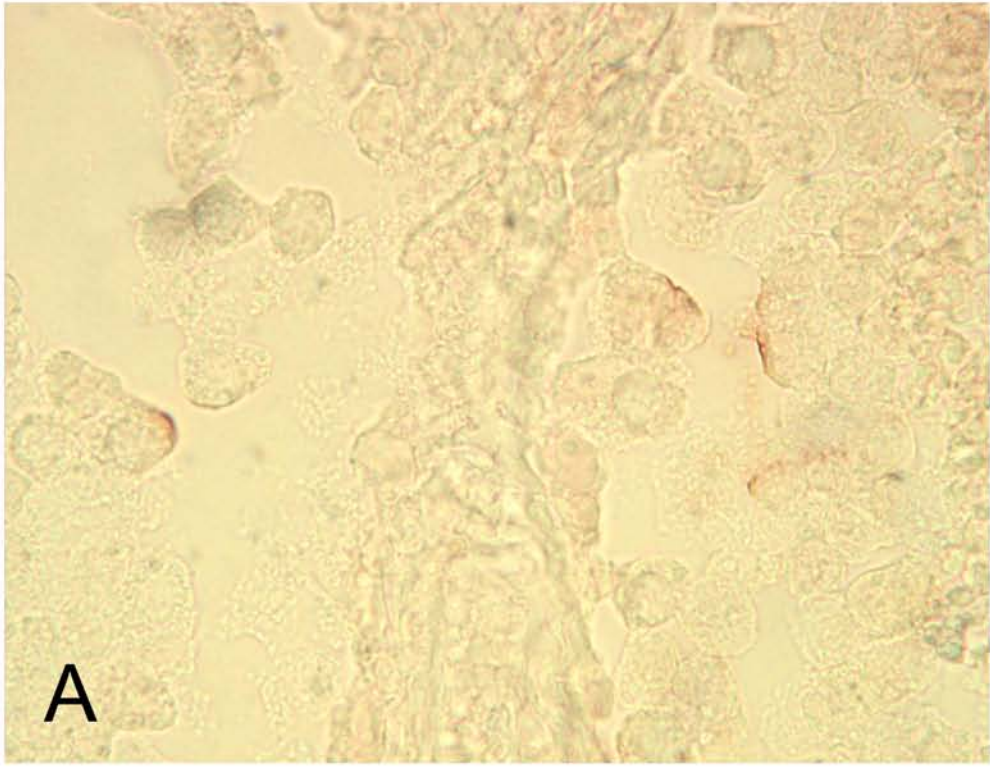


**Resim 12:** *Radyasyon uygulanmasından 3 ay sonra; A) ZO-1 immunreaktivitesinde (→) ciddi şekilde azalma izlenmektedir. B) Sertoli hücrelerinin intertisyel dokuya yakın olan bazal kısımlarında zayıf Okludin-ir (▶) görülmektedir.*  
Orijinal büyütme **A, B:** x 1000.



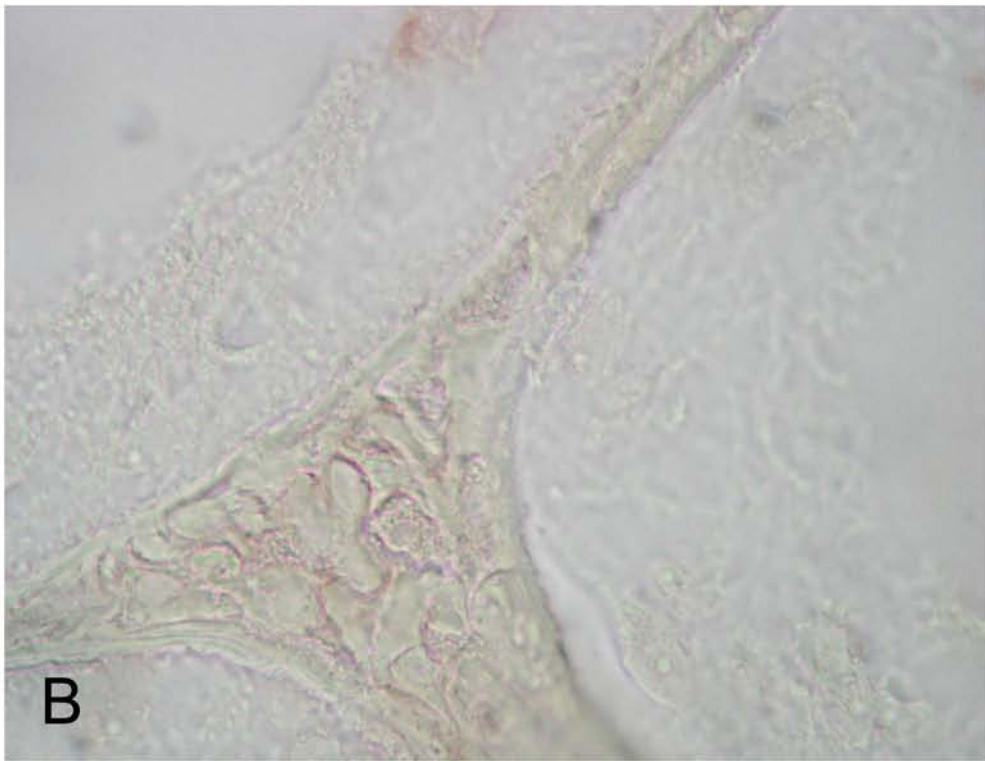
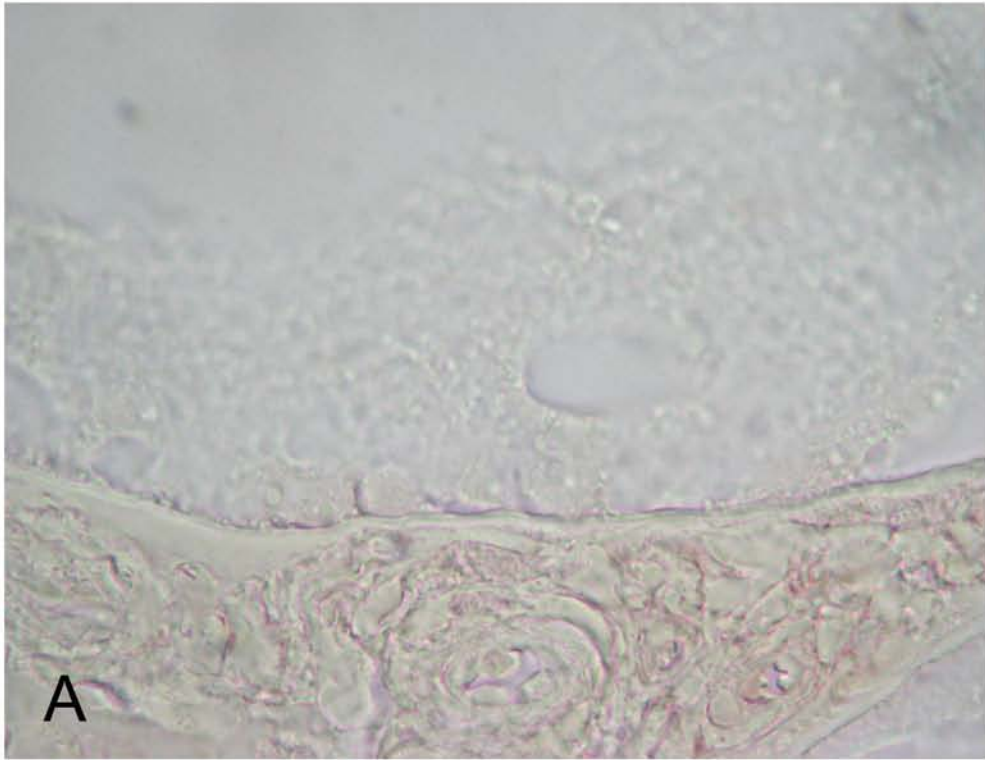
**Resim 13:** *Radyasyon uygulanmasından 6 ay sonra; A) testiste seminifer tubullerde ZO-1 ir ve B) Okludin-ir alan gözlenmemektedir.*  
Orijinal büyütme **A, B:** x1000.





**Resim 14:** *Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 3 sonra; A) testiste seminifer tubullerde ZO-1 ir ve B) Okludin-ir gözlenmemektedir.*

Orijinal büyütme **A, B:** x1000.



**Resim 15:** *Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 6 ay sonra; A) testiste seminifer tubullerde ZO-1 ir ve B) Okludin-ir gözlenmemektedir.*

Orijinal büyütme **A, B:** x1000.



	<b>KONTROL</b>	<b>HT 3 AY</b>	<b>HT 6 AY</b>	<b>RAD 3 AY</b>	<b>RAD 6 AY</b>	<b>RAD + HT 3 AY</b>	<b>RAD + HT 6 AY</b>
<b>ZO-1 immunreaktivitesi</b>	+++	++	+	+/-	-	-	-
<b>OKLUDİN immunreaktivitesi</b>	+++	++	+	+/-	-	-	-
<b>+++; yoğun; ++: orta derecede; +: az; +/-: çok az; -: yok</b>							

**Tablo 1:** Deney gruplarındaki seminifer tübüllerde ZO-1 ve Okludin immunreaktivitesindeki boyanma derecesini gösteren tablo.

## **6.6. TUNEL Bulguları:**

### **Kontrol Grubu:**

Tiroid bezine ait kesit ile yapılan pozitif kontrolde TUNEL pozitif hücrelerin koyu kahverengi boyalı olduğu görülmüştür (Resim 16A). Kontrol grubuna ait testis kesitlerinde seminifer tübüllerde bulunan az sayıdaki hücrede TUNEL pozitif işaretlenme görülmüştür (Resim 16B).

### **Hipertermi Grubu:**

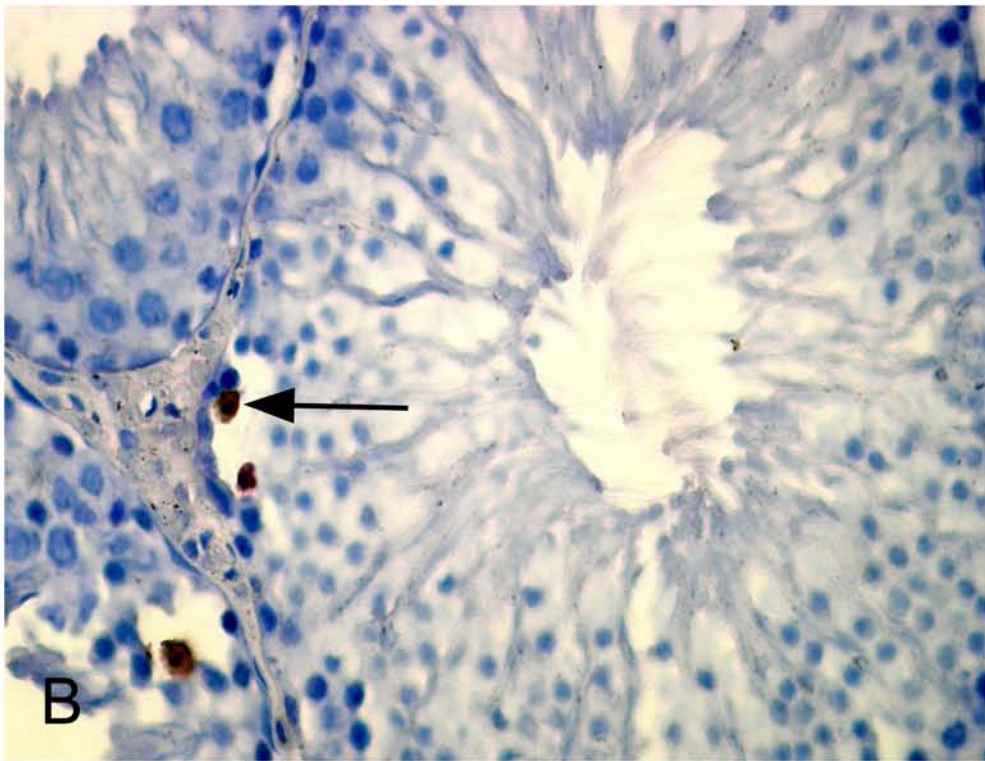
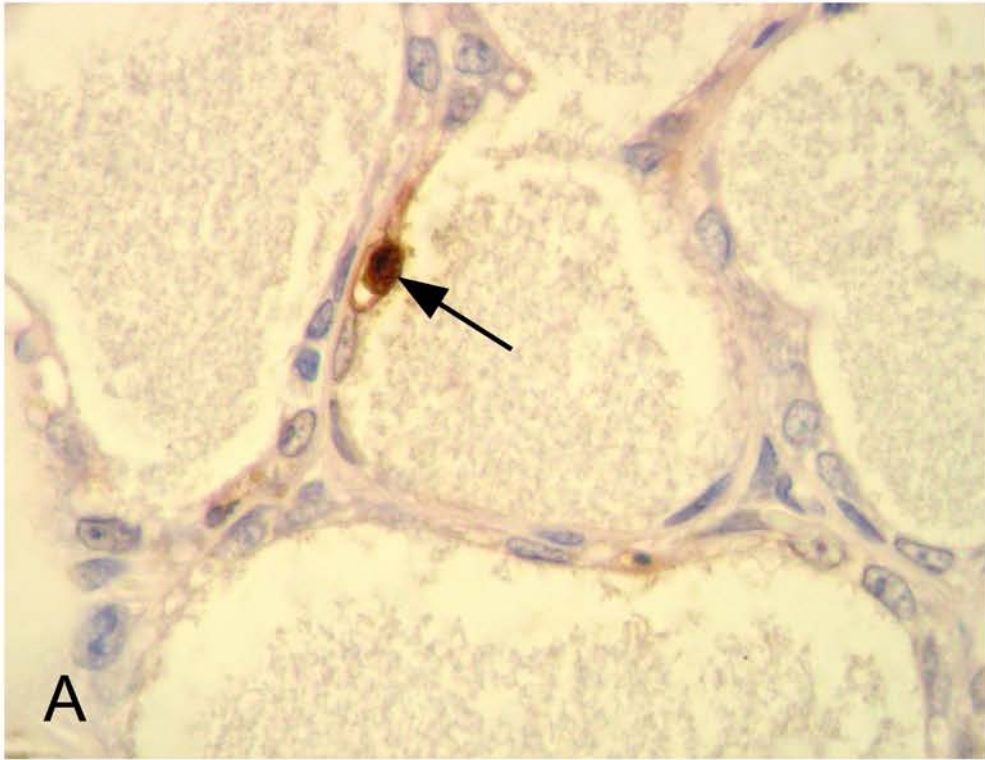
Hipertermi uygulamasından 3 ay sonra (Resim 17A), kontrol grubuna oranla TUNEL pozitif hücrelerdeki artış dikkati çekmektedir. Hipertermi uygulamasından 6 ay sonra kontrole ve hipertermi uygulamasından 3 ay sonraki gruba kıyasla seminifer tübüllerdeki TUNEL pozitif hücre sayısında artış olduğu görülmüştür (Resim 17 B).

### **Radyasyon Grubu:**

Radyasyon uygulamasından 3 ay sonra (Resim 18A), kontrol grubuna oranla TUNEL pozitif hücrelerdeki artış dikkati çekmektedir. Radyasyon uygulamasından 6 ay sonra kontrole ve radyasyon uygulamasından 3 ay sonraki gruba kıyasla seminifer tübüllerdeki TUNEL pozitif hücre sayısında artış görülmüştür (Resim 18B).

### **Radyasyon ve Hipertermi Grubu:**

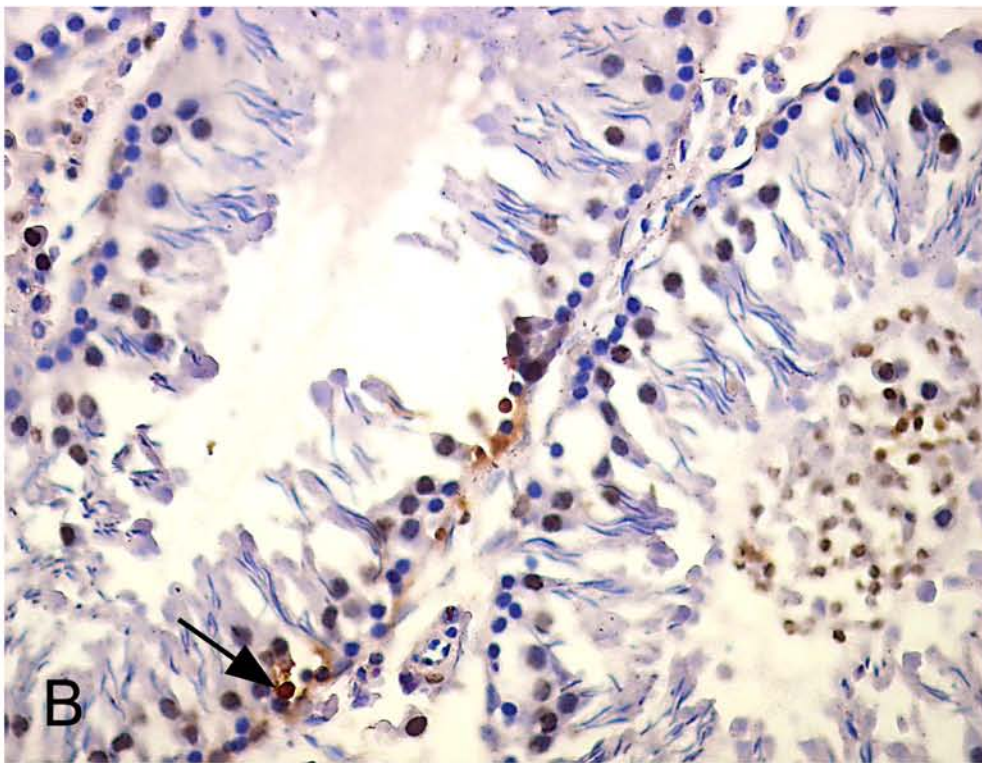
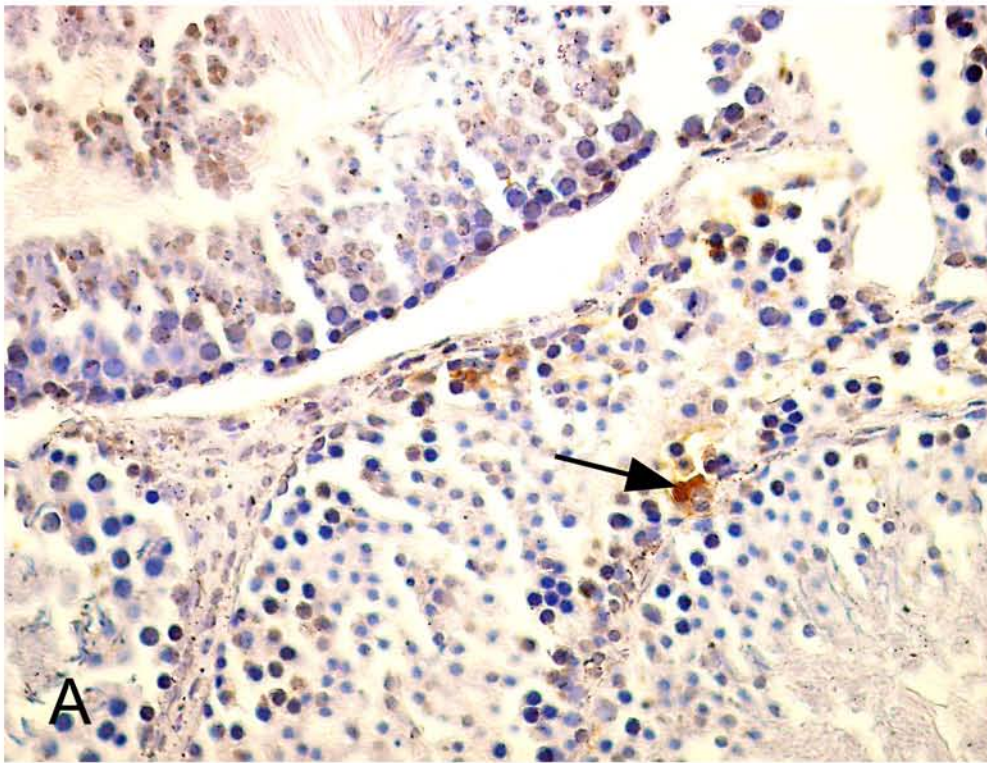
Radyasyon + hipertermi uygulamasından 3 ay sonra (Resim 19A), kontrol grubuna oranla TUNEL pozitif hücrelerdeki artış dikkati çekmektedir. Radyasyon + hipertermi uygulamasından 6 ay sonra kontrole ve radyasyon+ hipertermi uygulamasından 3 ay sonraki gruba kıyasla seminifer tübüllerde bulunan TUNEL pozitif işaretlenmenin fazla olduğu görülmüştür (Resim 19B).



**Resim 16:** **A)** Tiroid bezine ait pozitif kontrolde TUNEL pozitif (→) hücreler görülmektedir. **B)** Kontrol grubuna ait testis kesitlerinde seminifer tübüllerde bulunan az sayıdaki hücrede TUNEL pozitif (→) işaretlenme görülmektedir.

Orijinal büyütme: x400

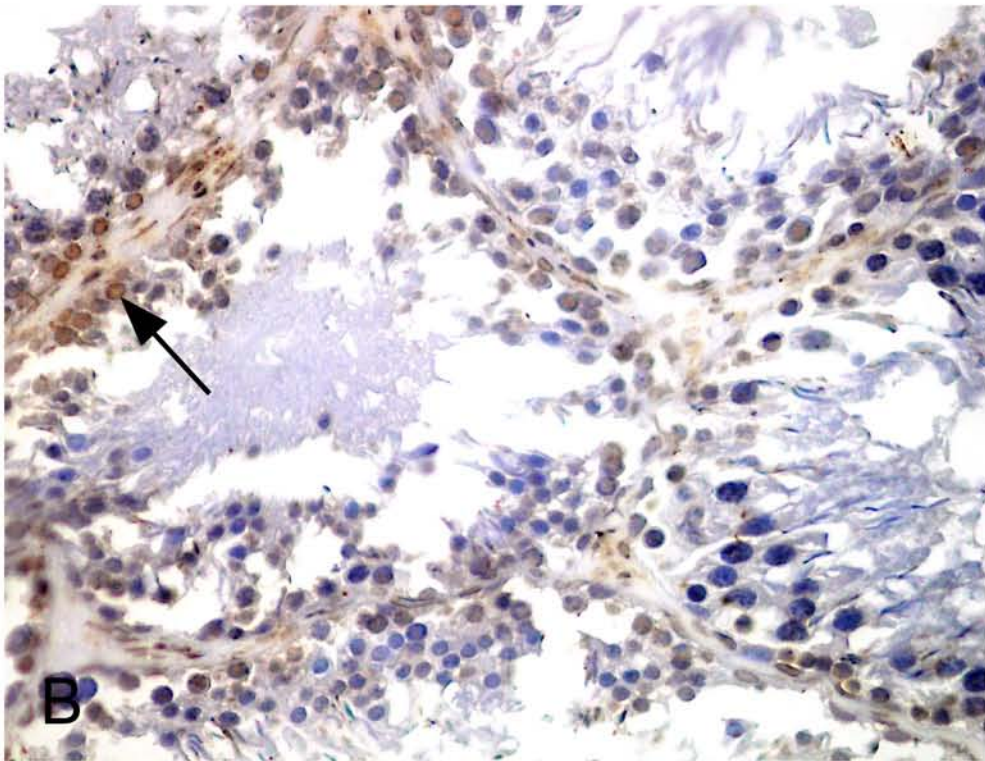
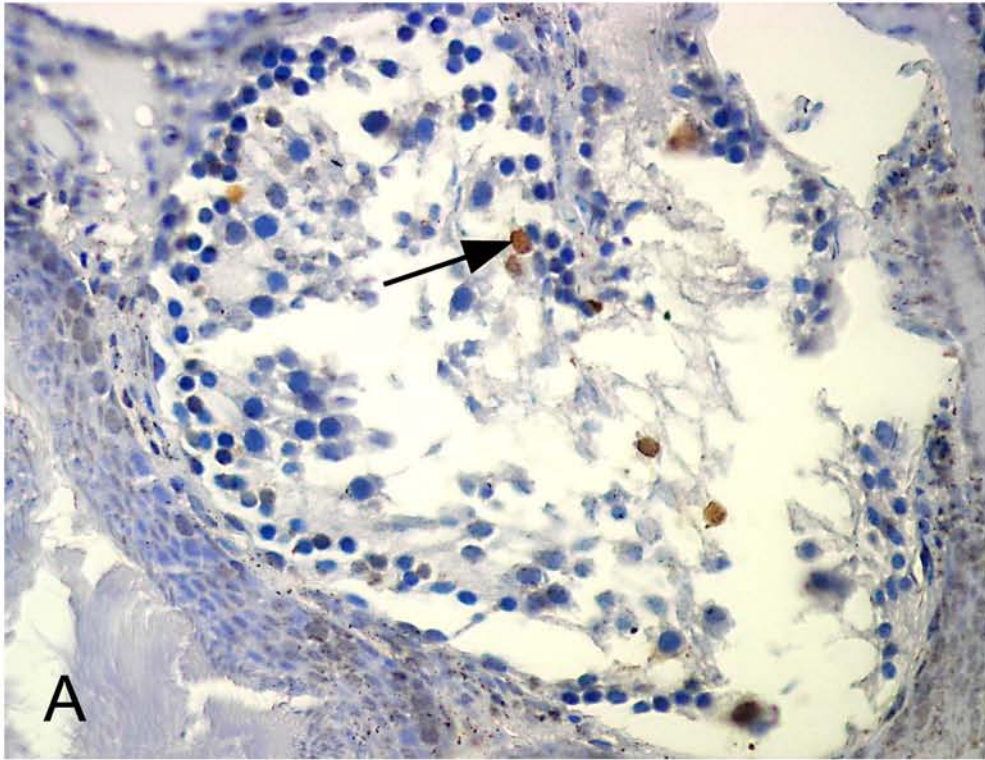




**Resim 17: A)** *Hipertermi uygulamasından 3 ay sonra* TUNEL pozitif (→) hücrelerdeki artış gösterilmektedir. **B)** *Hipertermi uygulamasından 6 ay sonra* TUNEL pozitif (→) artış olduğu görülmektedir.

Orijinal büyütme: x400

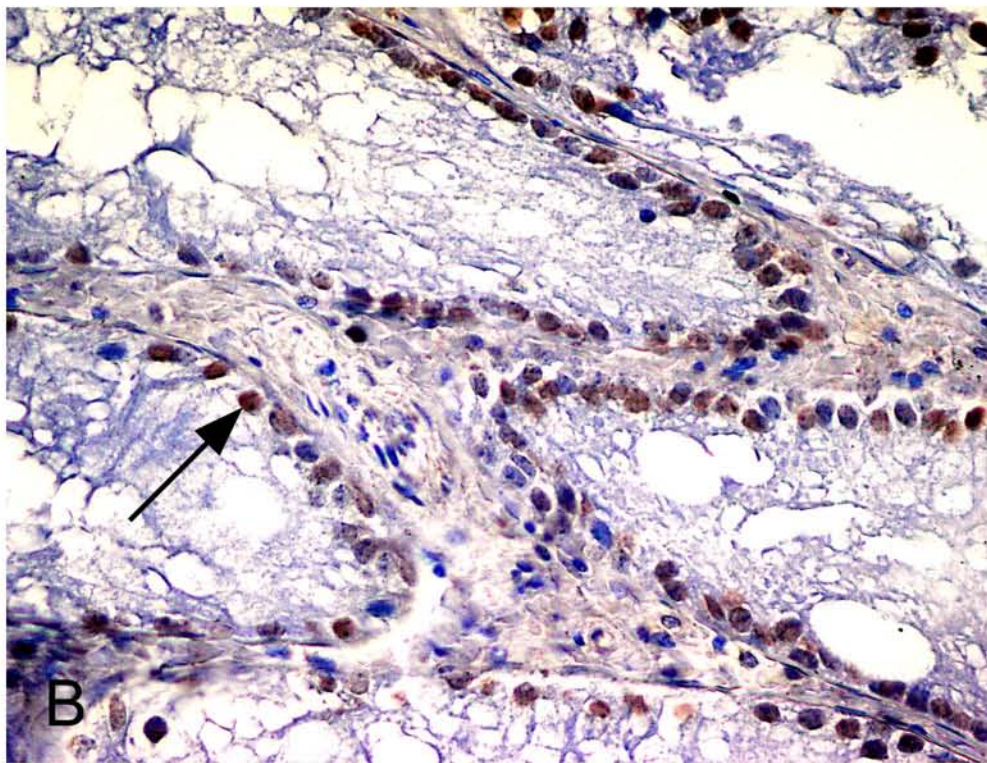
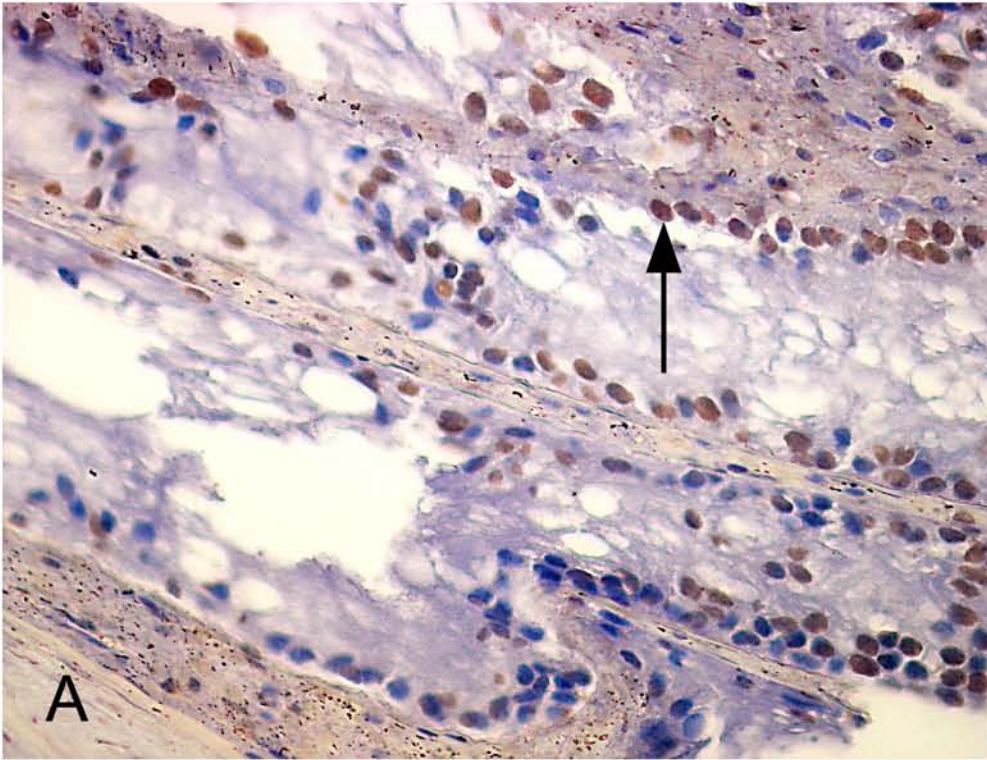




**Resim 18:** **A)** *Radyasyon uygulamasından 3 ay sonra* TUNEL pozitif (→) hücrelerdeki artış gösterilmektedir. **B)** *Radyasyon uygulamasından 6 ay sonra* TUNEL pozitif (→) hücrelerdeki artış olduğu görülmektedir.

Orijinal büyütme: x400.

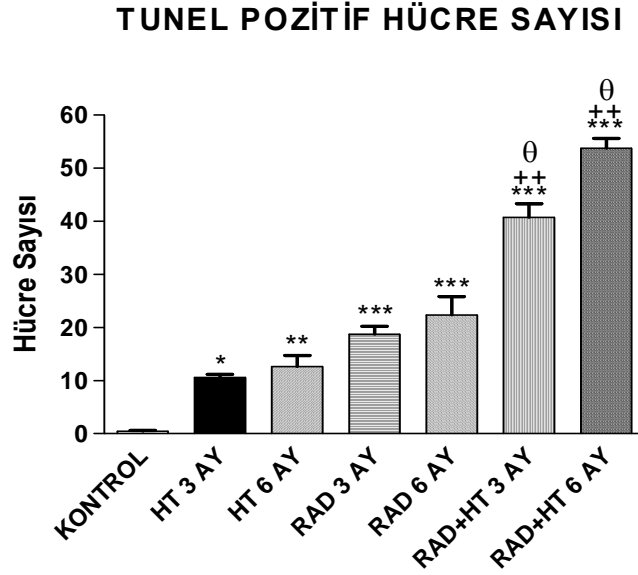




**Resim 19:** **A)** *Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 3 ay sonra;* TUNEL pozitif (→) hücrelerdeki artış gösterilmektedir. **B)** *Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 6 ay; sonra TUNEL pozitif (→) artış olduğu görülmektedir.*  
Orijinal büyütme: x400.

## 6.7. TUNEL Pozitif Hücrelerin Sayısal Analizi:

Kontrol grubunda ortalama TUNEL pozitif hücre sayısı  $0,47 \pm 0,12$  iken hipertermi grubunda 3 ay sonra TUNEL pozitif hücre sayısı  $10,05 \pm 0,21$  ( $p < 0,05$ ), 6 ay sonra TUNEL pozitif hücre sayısı  $12,6 \pm 0,9$  ( $p < 0,01$ ); radyasyon grubunda 3 ay sonra TUNEL pozitif hücre sayısı  $18,77 \pm 2,3$  ( $p < 0,001$ ), 6 ay sonra  $22,4 \pm 7,7$  ( $p < 0,001$ ); radyasyon ve hipertermi grubunda 3 ay sonra TUNEL pozitif hücre sayısı  $40,77 \pm 5,1$  ( $p < 0,001$ ), 6 ay sonra  $53,75 \pm 4,5$  ( $p < 0,001$ )'dir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm deney gruplarında TUNEL pozitif hücre sayısının anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Hipertermi grubu ile ve radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon+hipertermi grubunda 3 ay ve 6 ay sonraki dönemlerde TUNEL pozitif hücrelerin sayısındaki artış anlamlıdır (Grafik 3).



**Grafik 4:** Deney gruplarında TUNEL pozitif hücre sayım grafiği. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  kontrole göre, ++:  $p < 0,01$ , HT grubuna göre, θ:  $p < 0,05$ , RAD grubuna göre kıyaslanmıştır.

## **6.8. Elektron Mikroskop Bulguları:**

### **Kontrol grubu:**

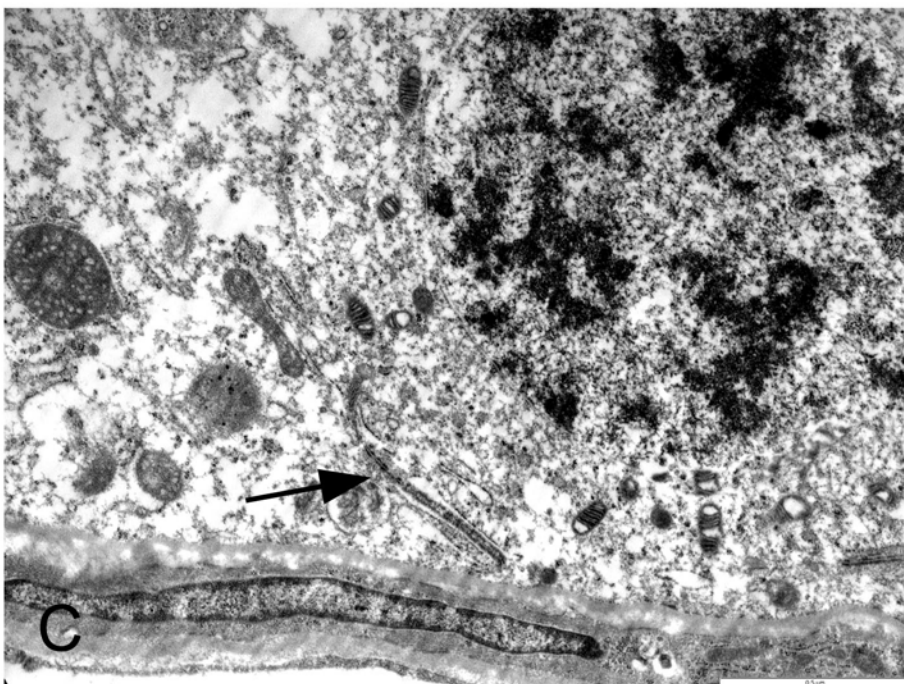
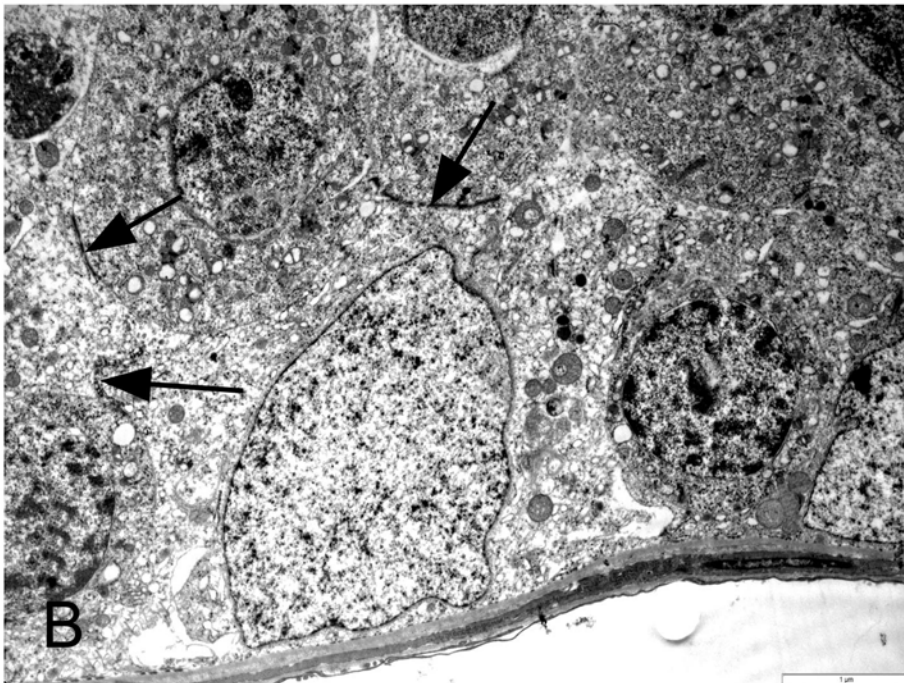
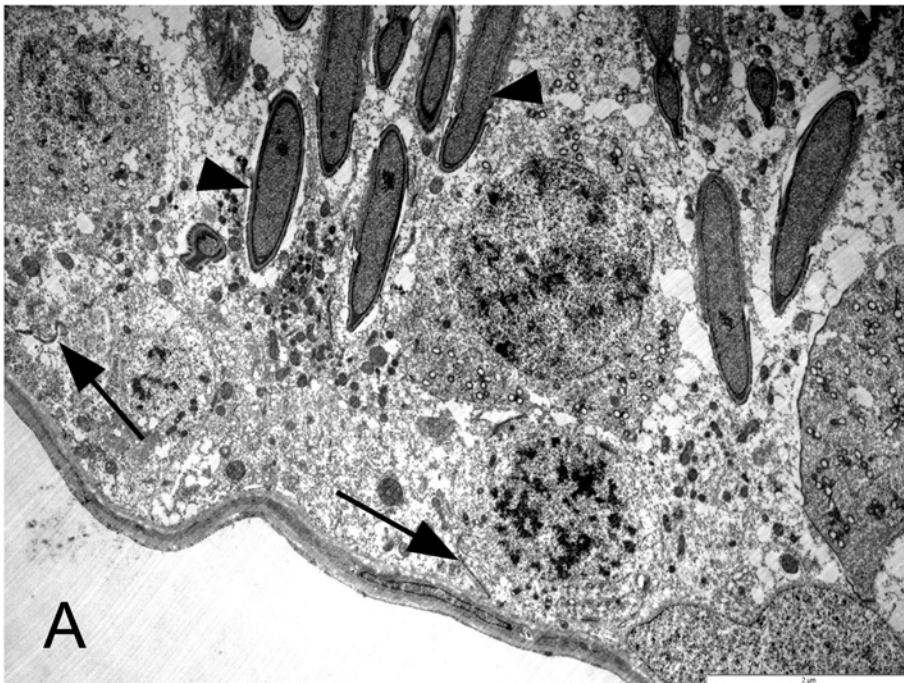
Bazal lamina üzerine oturan düzenli morfolojide Sertoli hücreleri ve spermatogonyumların varlığı gözlenmiştir. Sertoli hücreleri arasında düzenli morfolojide sıkı bağlantılar bulunmaktaydı. Bazalden lumene doğru spermatogenik seriye ait değişik evrelerdeki primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatitler gözlendi. Seminifer tubullerin lumeninde düzenli morfolojide bol miktarda sperm başı ve kuyruk morfolojileri gözlenmiştir (Resim 20 A, B, C, D, E, F).

### **Hipertermi grubu:**

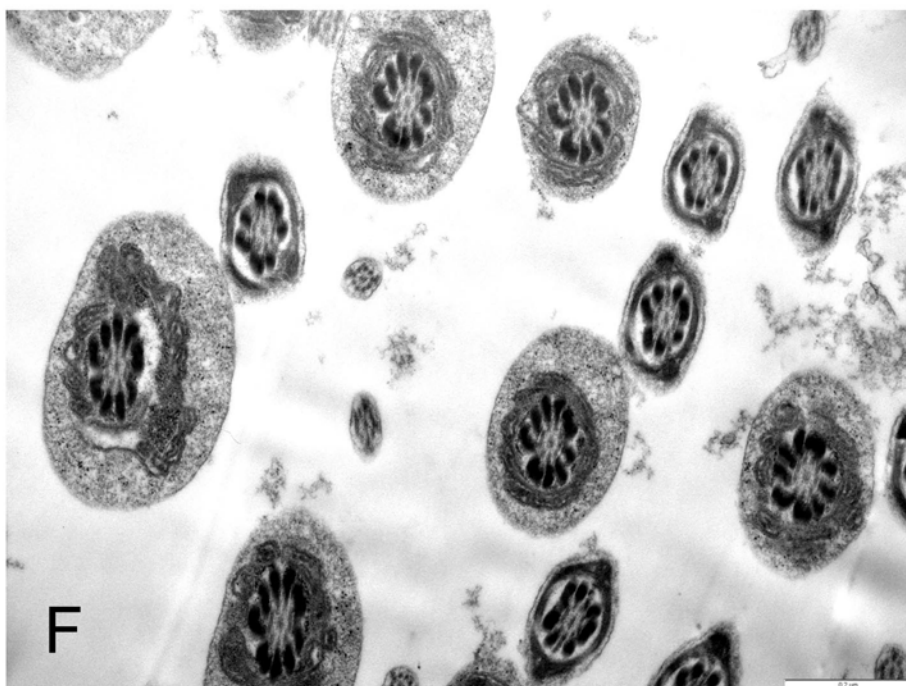
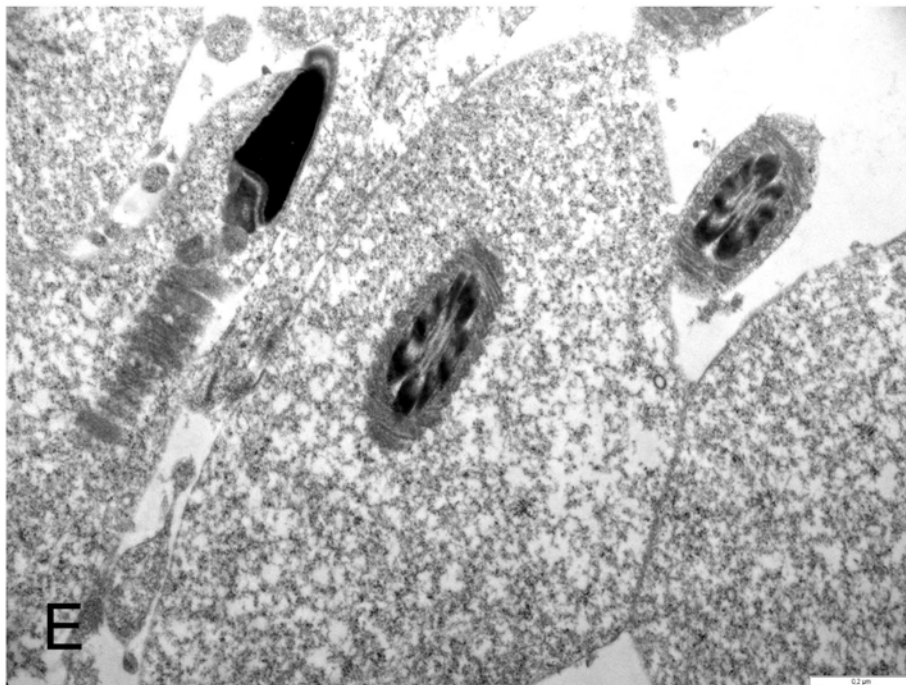
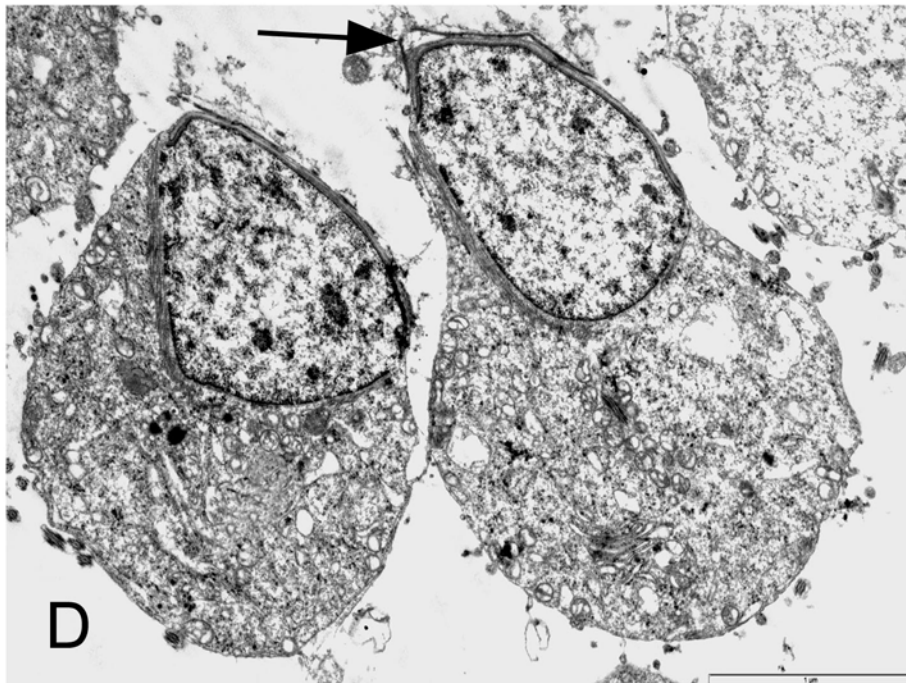
Hipertemi uygulamasından 3 ay sonra bazal lamina üzerine oturan birçok alanda düzenli morfolojide spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri gözlenmiştir. Bazı alanlarda Sertoli hücrelerinde sıkı bağlantıların altındaki sitoplazmik alanlarda vakuol oluşumlarına rastlanmıştır. Bazalden lumene doğru spermatogenik seriye ait değişik evrelerdeki primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatitler gözlenmiştir. Lümende düzenli morfoloji de sperm yapılarının yanısıra sperm baş anomolisi olan spermere rastlanmıştır. (Resim 21 A, B, C, D, E, F).

Hipertemi uygulamasından 6 ay sonra bazal lamina üzerine oturan birçok alanda düzenli morfolojide spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri gözlenmiştir. Bazı alanlarda Sertoli hücrelerinde sıkı bağlantıların altındaki sitoplazmik alanlarda büyük vakuol oluşumlarına rastlanmıştır. Bazalden lumene doğru spermatogenik seriye ait değişik evrelerdeki primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatitler gözlenmiştir. Bazı alanlarda apoptotik hücelere rastlanmıştır. Lumene doğru sitoplazmasında çok sayıda vakuol içeren hasarlı spermatitlere rastlanmıştır. Lümende düzenli morfoloji de sperm yapılarının yanısıra sperm baş ve boyun kuyruk anomolisi olan spermere rastlanmıştır (Resim 22 A, B, C, D, E, F, G, H, I).

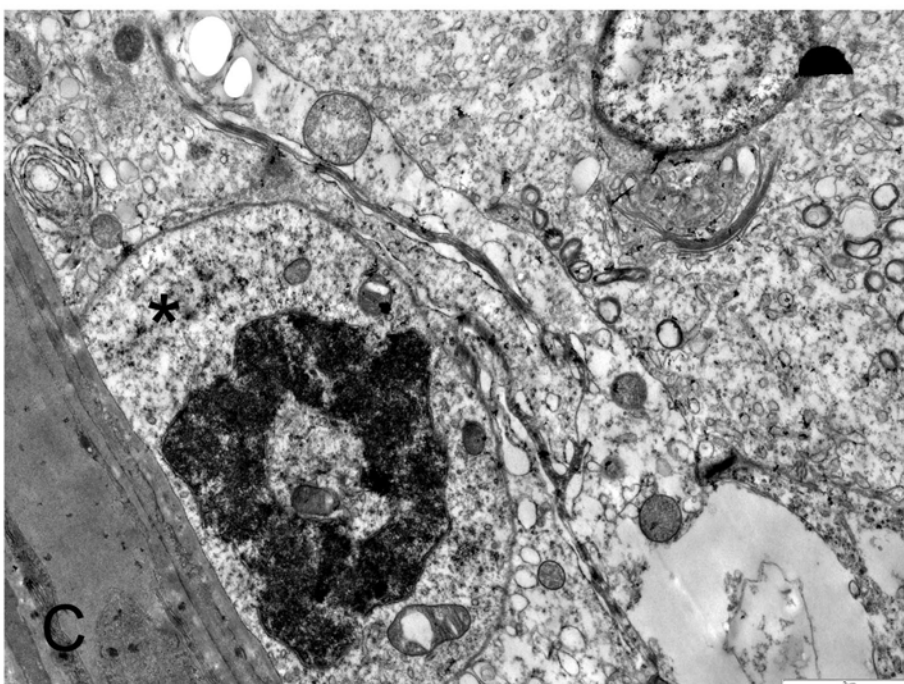
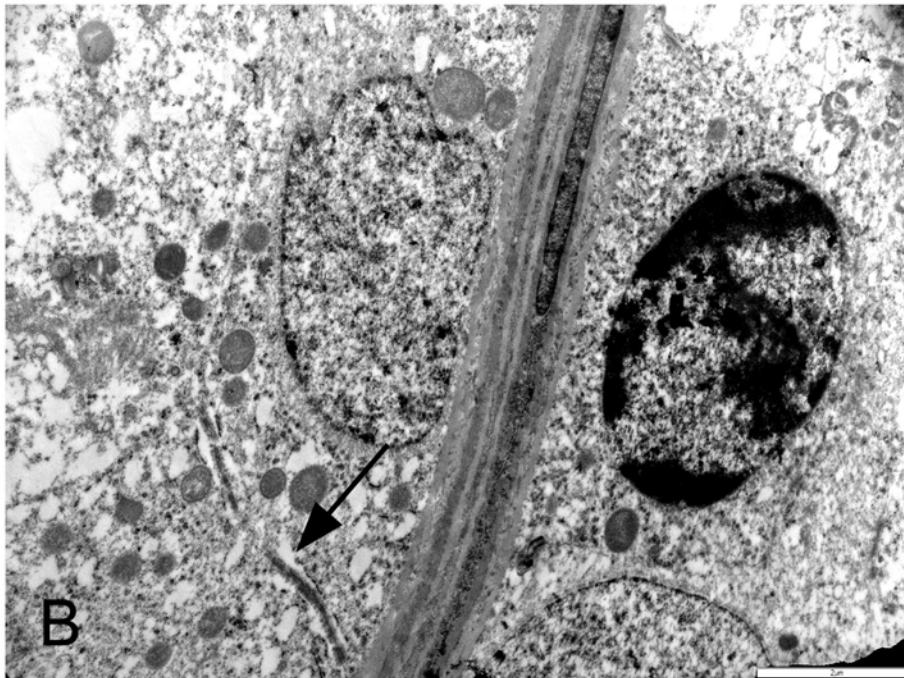
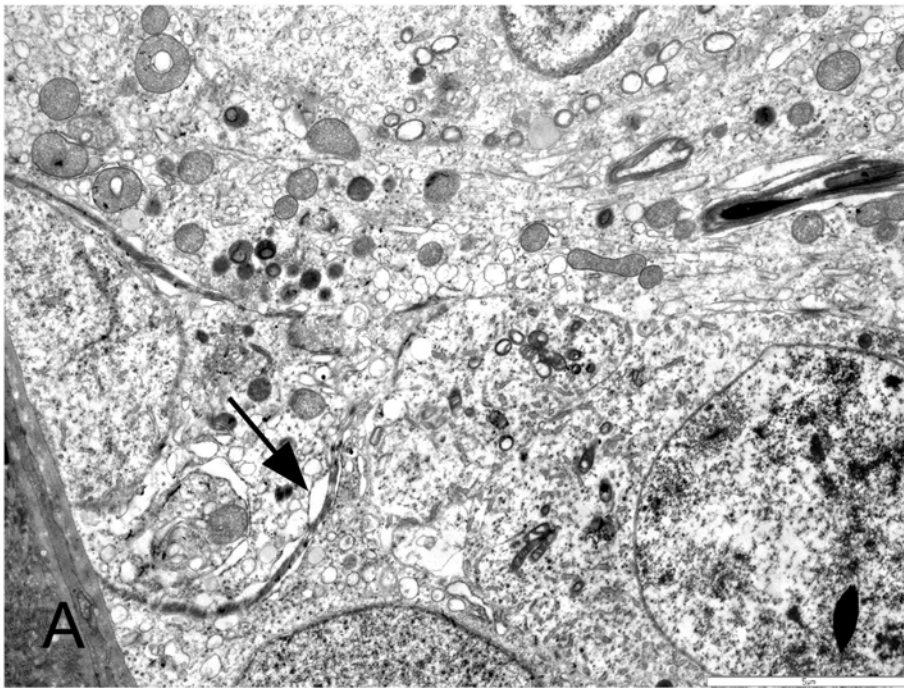




**Resim 20 A, B, C:** *Kontrol grubunda* düzenli morfolojide bazal membranın, Sertoli hücrelerinin, spermatogonyumun ve primer spermatositlerin ve Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların (→) düzenli morfolojisi görülmektedir (**A, B, C**). Düzenli morfolojide uzamış spermatidler (▶) (**A**).

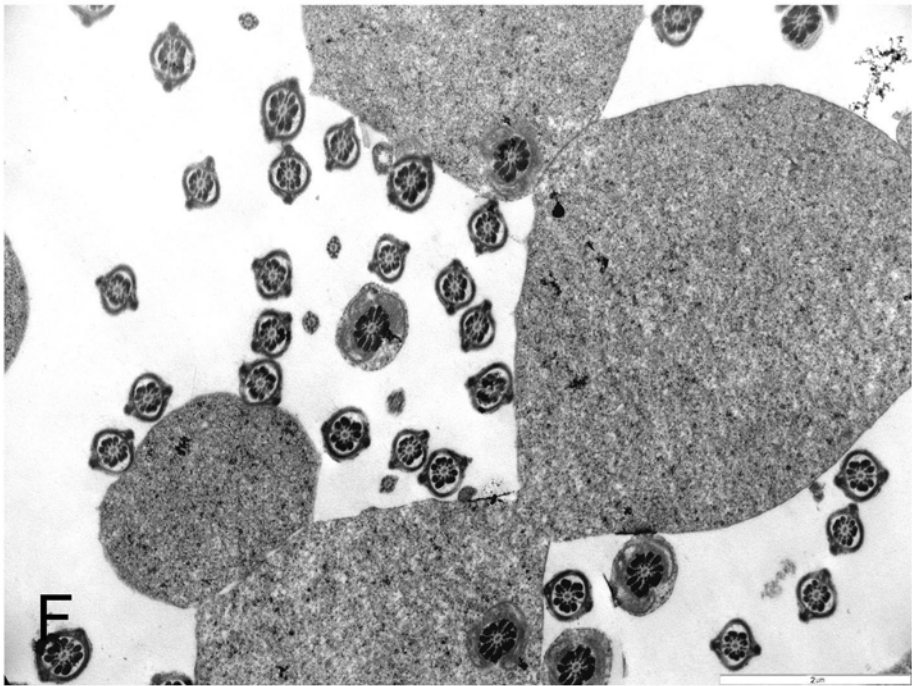
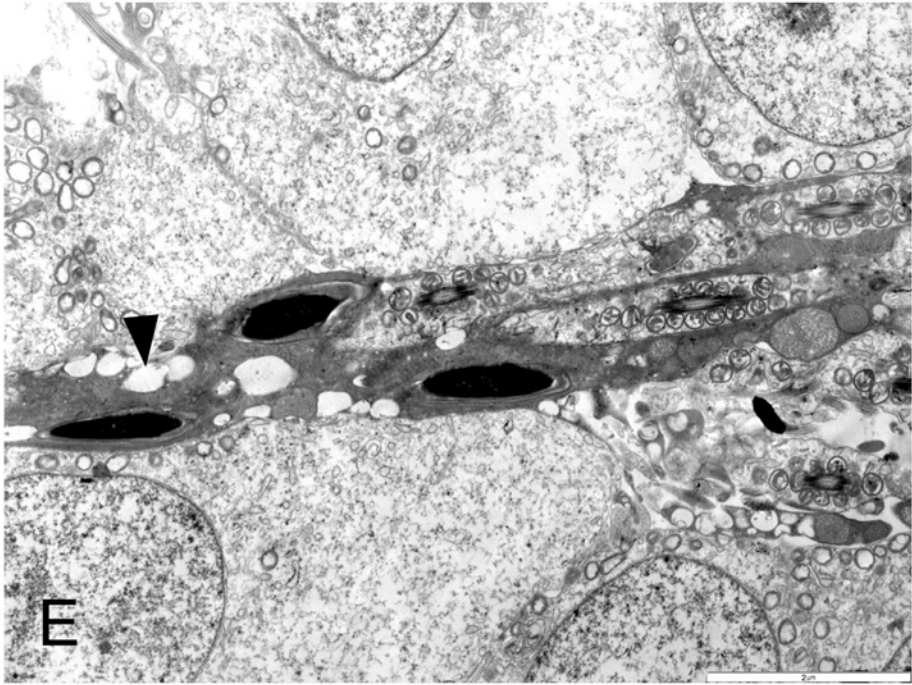
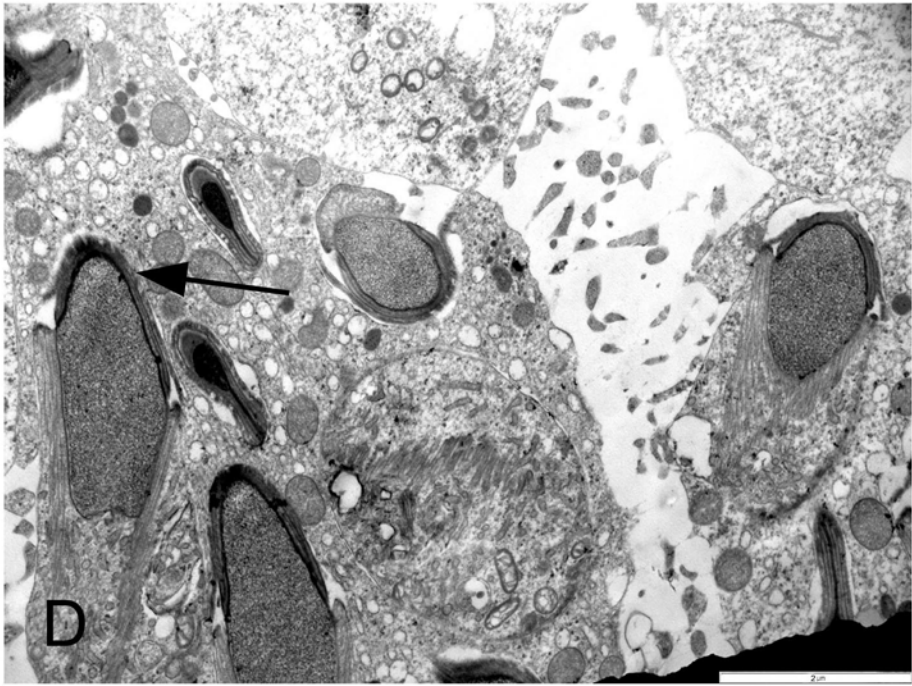


**Resim 20 D, E, F:** *Kontrol grubunda* düzenli kardeş spermatitlerde nukeus etrafında akrozom oluşumu (→) (**D**), luminal bölgede düzenli morfolojide sperm baş boyun (**E**) ve kuyruk enine kesitleri (**E, F**) görülmektedir.

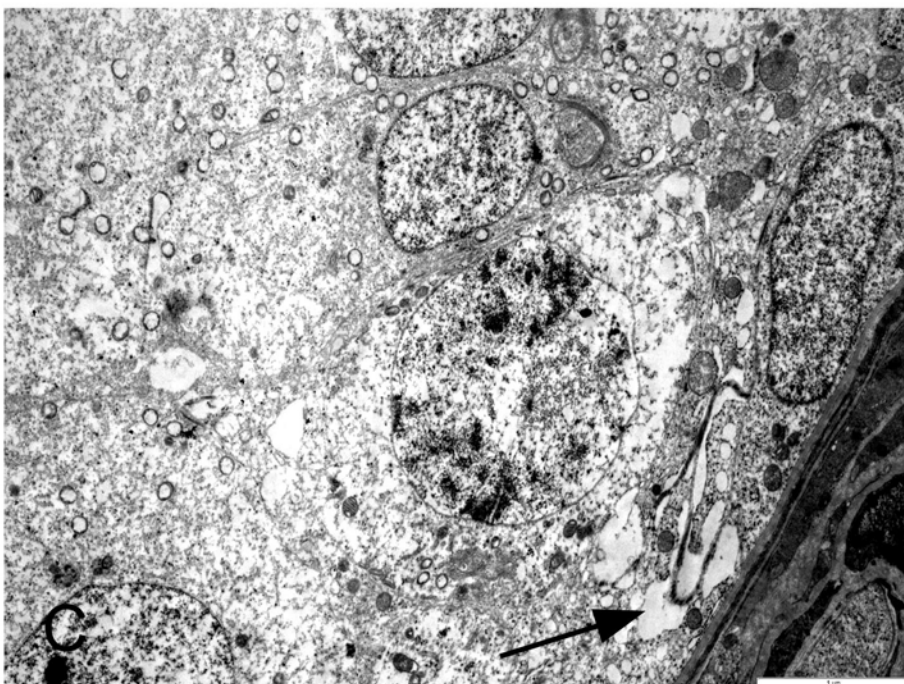
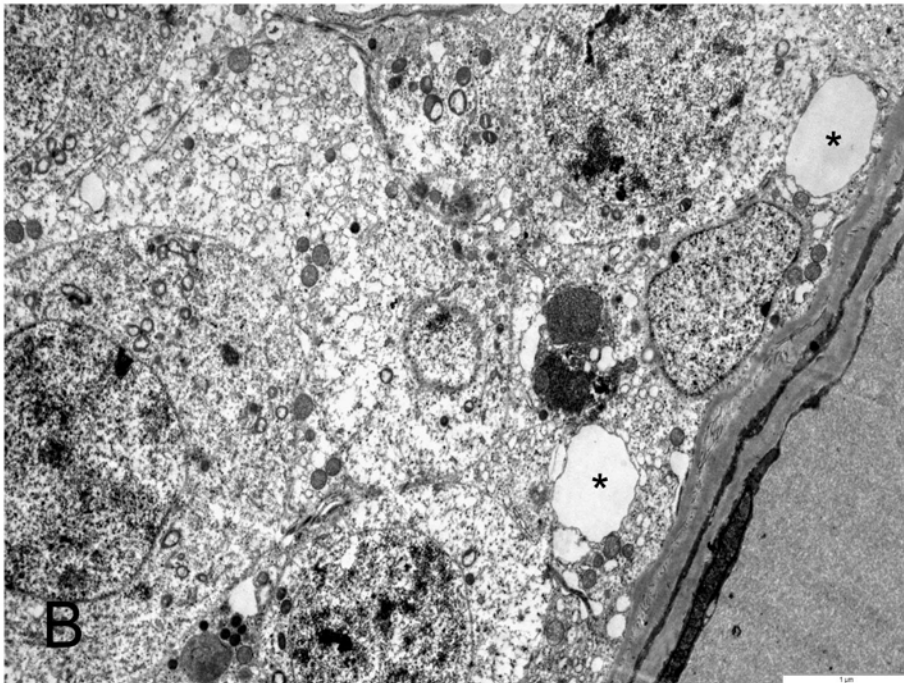
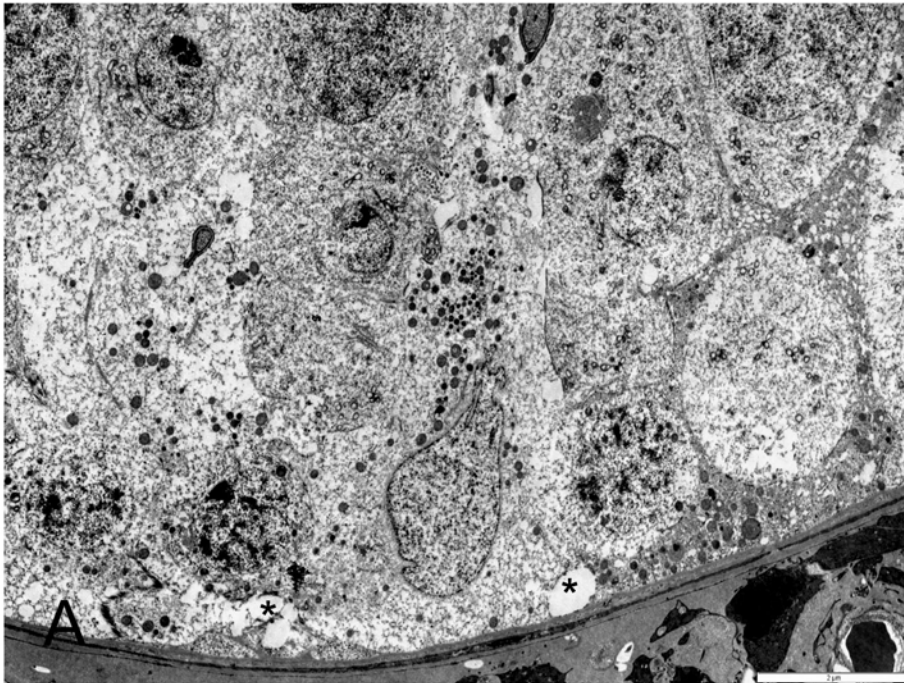


**Resim 21 A, B, C:** *Hipertermi uygulamasından 3 ay sonra* Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantı bölgelerinin etrafında vakuol oluşumu ( $\rightarrow$ ), (**A, B**) ve mitoz aşamasındaki düzenli spermatogonyum (\*) (**C**) görülmektedir.

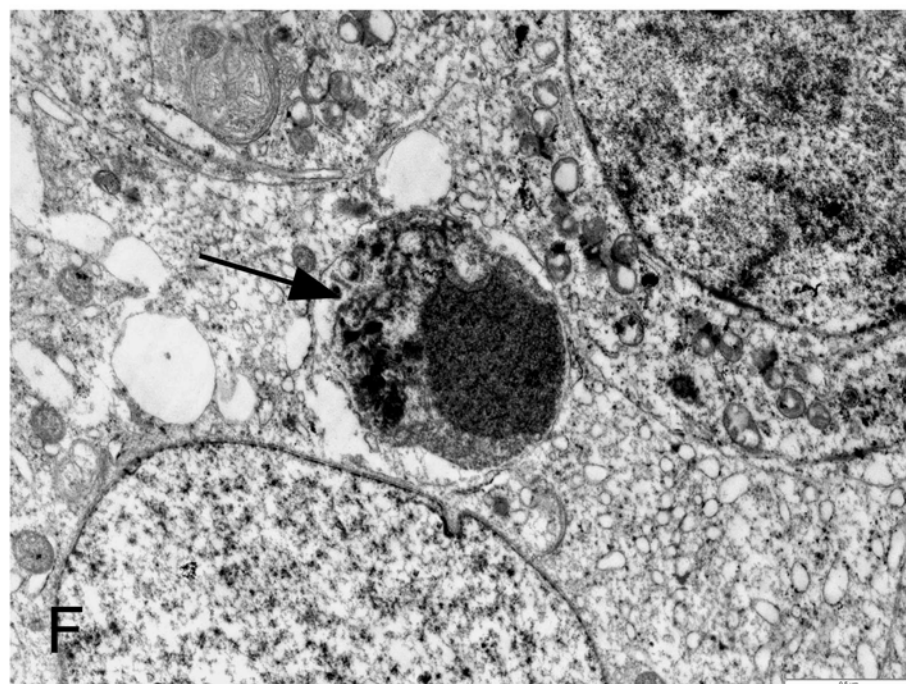
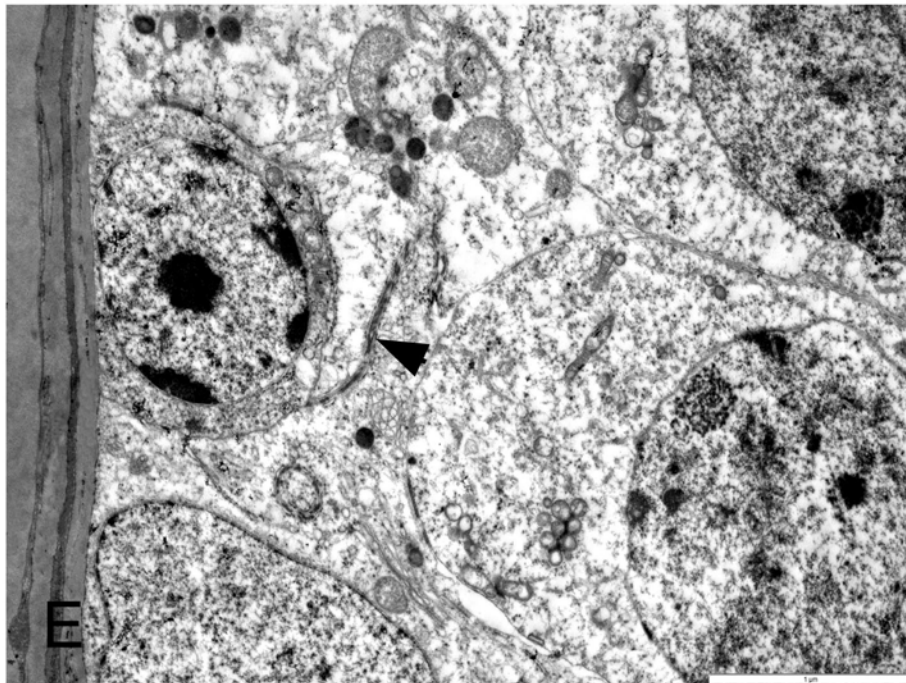
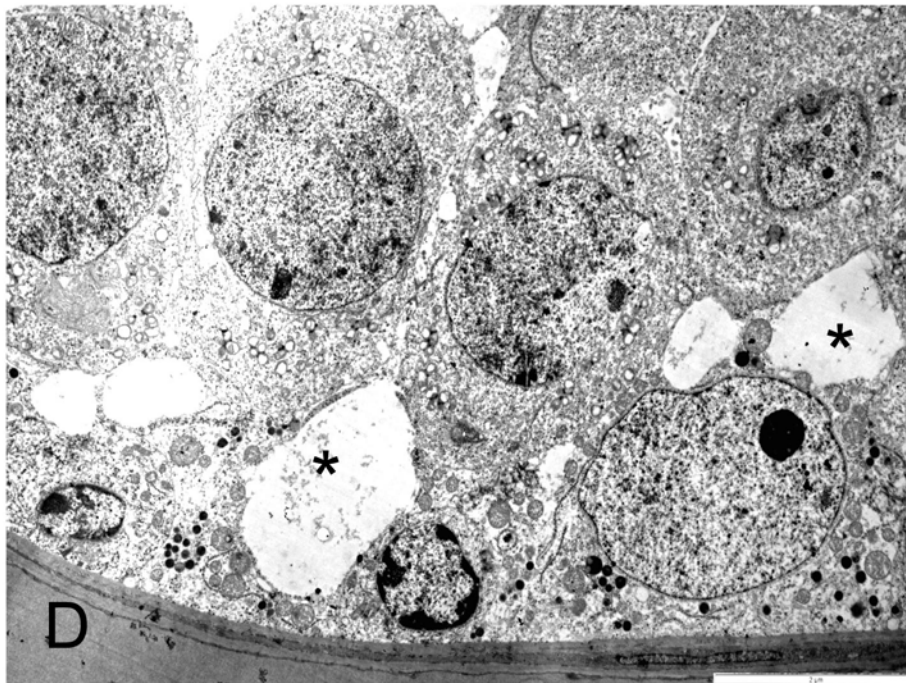




**Resim 21 D, E, F:** *Hipertermi uygulamasından 3 ay sonra*, akrozom oluşumu aşamasındaki spermatidler (→) (**D**) ve baş bölgesinde vakuelleri (►) olan dejenere olmuş spermler ve normal morfolojide boyun (**E**) ve kuyruk (**F**) kesitleri görülmektedir.

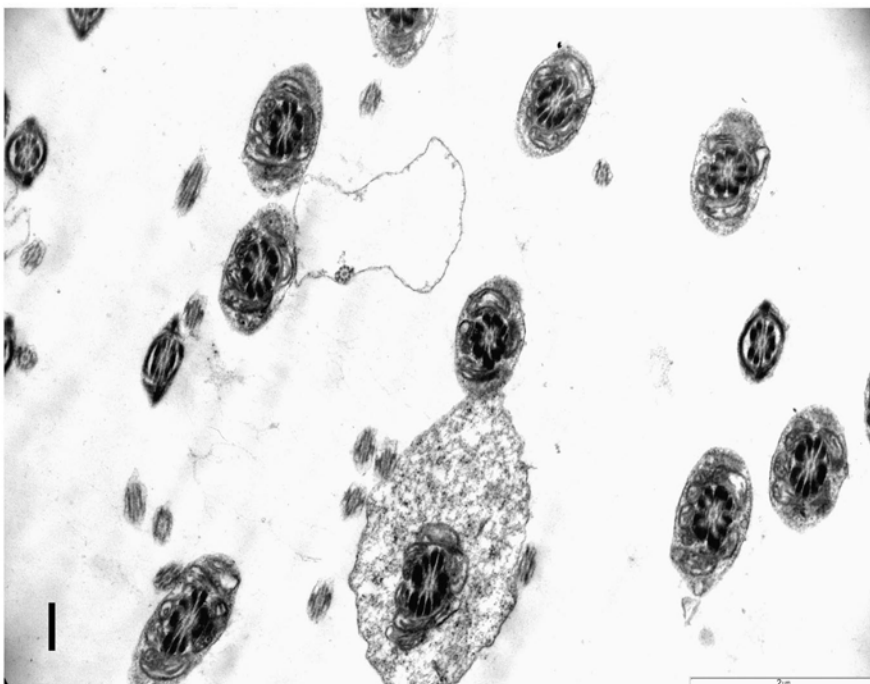
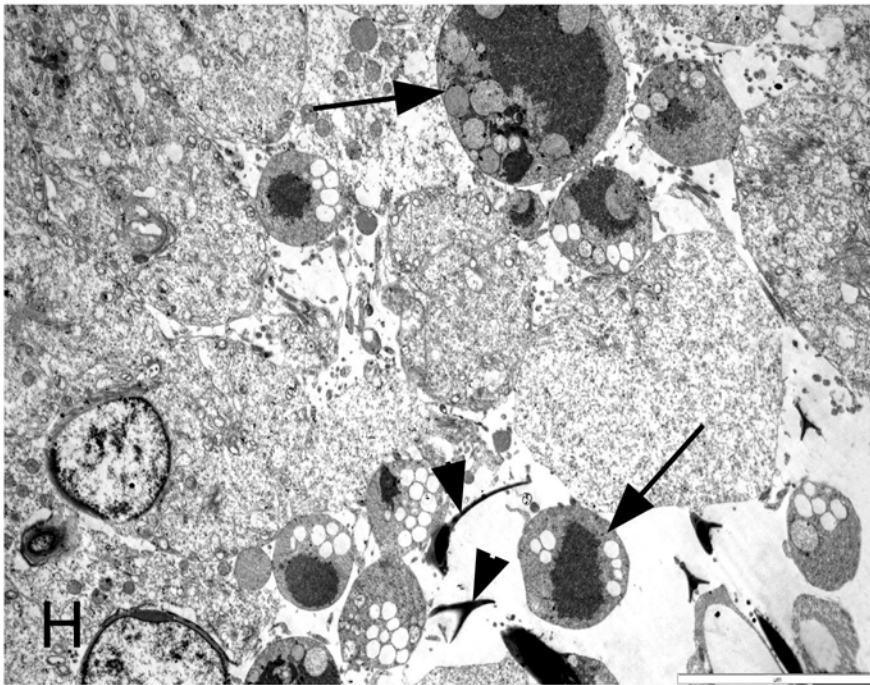
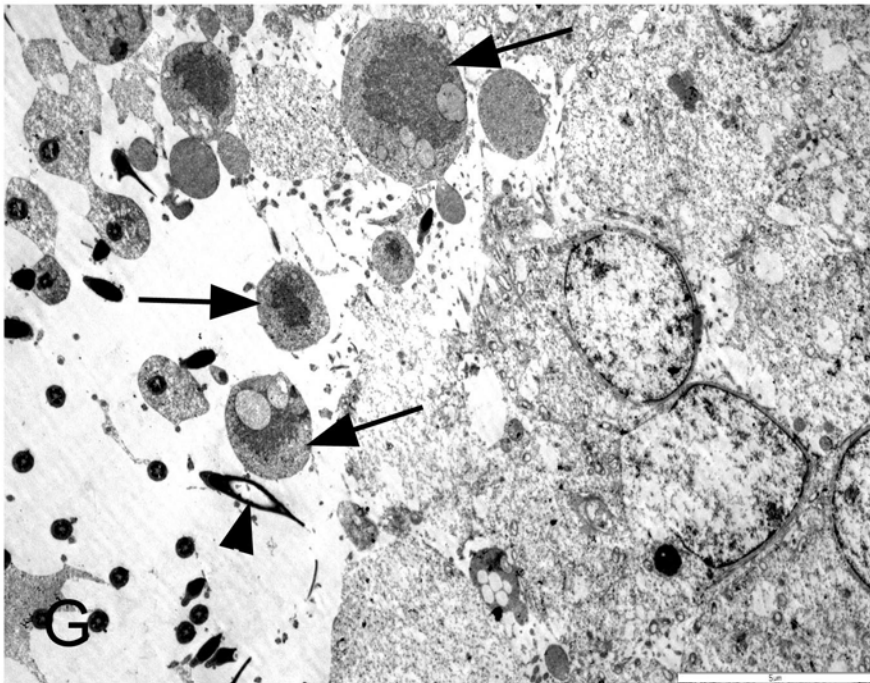


**Resim 22 A, B, C:** *Hipertermi uygulamasından 6 ay sonra* Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında (\*) (**A, B**) ve sıkı bağlantıların etrafında vakuol oluşumları (→) (**C**) ve genel olarak düzenli morfolojide spermatogenik seriye ait hücreler (**A, B, C**) görülmektedir.





**Resim 22 D, E, F:** *Hipertermi uygulamasından 6 ay sonra* sıkı bağlantıların etrafında vakuol oluşumu (\*) (**D**), bazı hücreler arasındaki sıkı bağlantı yapılarının düzenli morfolojisi (►) (**E**), apoptotik hücrelerin (→) (**F**) varlığı görülmektedir.



**Resim 22 G, H, I:** *Hipertermi uygulamasından 6 ay sonra luminal bölgede hasarlı spermatitler (→) ve spermatozoalar (►) (G, H) ve genel olarak düzenli morfolojide sperm kuyruk enine kesitleri (I) görülmektedir.*

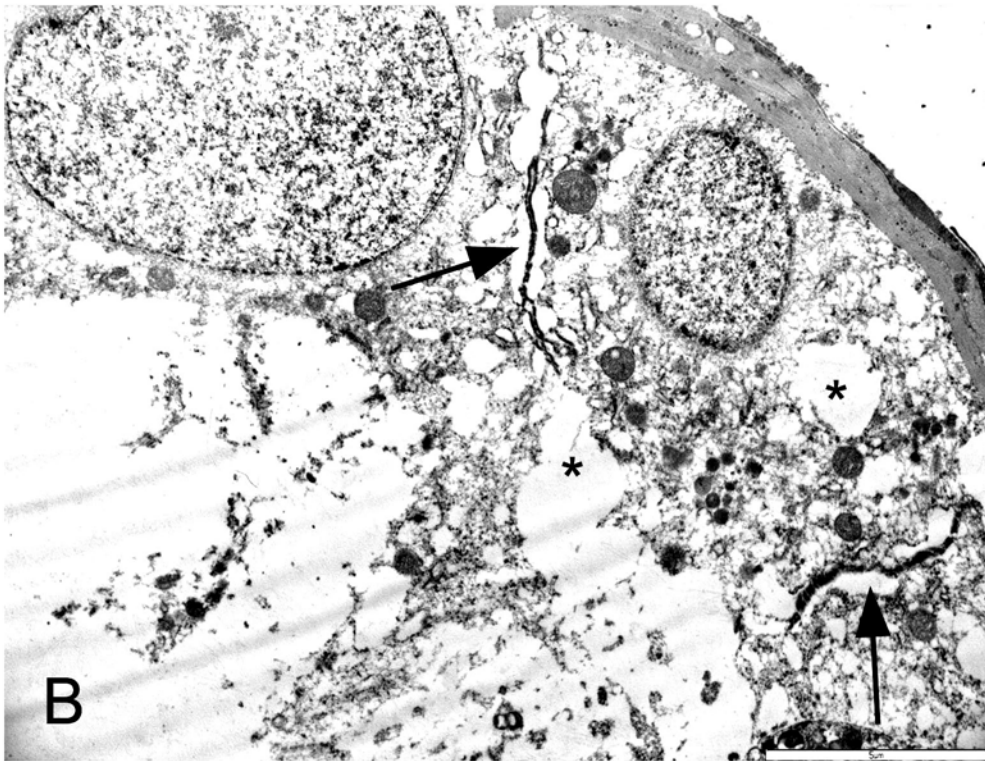
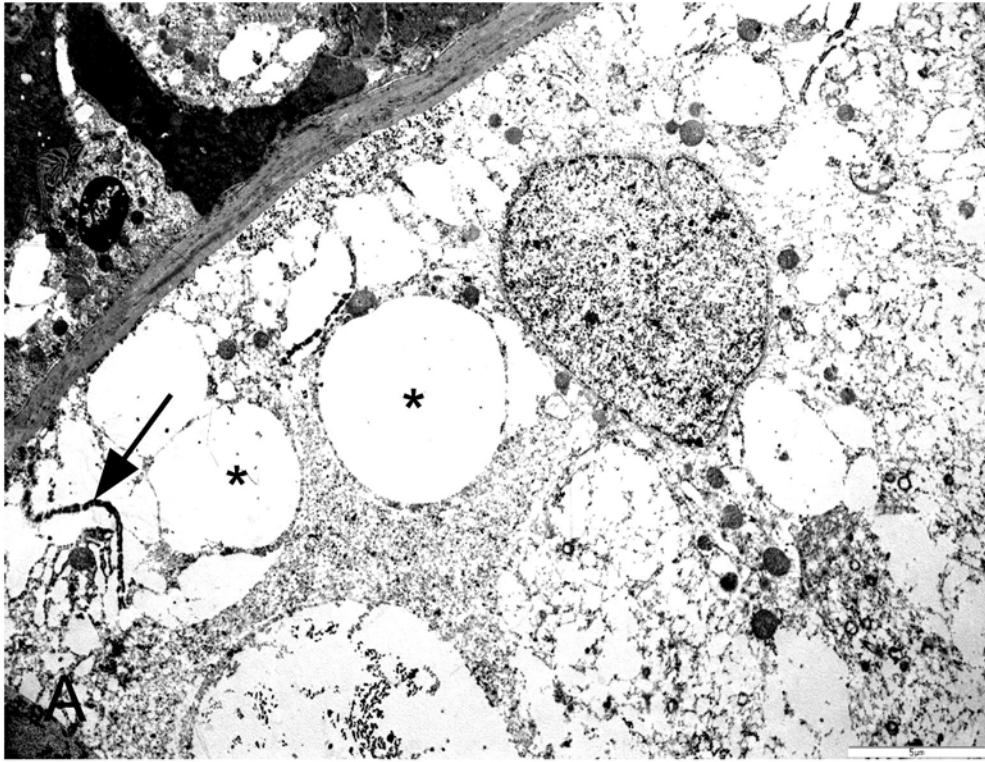
### **Radyasyon grubu:**

Radyasyon uygulamasından 3 ay sonra bazal laminada spermatogonyumlara ve Sertoli hücrelerine doğru parmaklı uzantılar şeklinde düzensiz yapılara rastlanmıştır. Bir çok alanda hem spermatogenik seriye ait hücrelerin hem de Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında organellerin yapısında bozulma ve ileri derece vakuolizasyon ve sıkı bağlantıların yapısında düzensizlik ve ayrılma gözlenmiştir. Bazalden lumene doğru spermatogenik seriye ait hücrelerin arasında apoptotik hücrelere rastlanmıştır. Lümeninde sperm baş anomolisi olan spermatastomata rastlanmıştır. (Resim 23 A, B, C, D).

Radyasyon uygulamasından 6 ay sonra bazal laminada spermatogonyumlara ve Sertoli hücrelerine doğru parmaklı uzantılar şeklinde düzensiz yapılara rastlanmıştır. Bir çok alanda hem spermatogenik seriye ait hücrelerin hem de Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında organellerin yapısında bozulma ve ileri derece vakuolizasyon ve sıkı bağlantıların yapısında düzensizlikler ve ayrılmalar gözlenmiştir. Bazalden lumene doğru spermatogenik seriye ait hücrelerin nükleuslarında bozulmaların olduğu gözlenmiştir. Lümeninde sperm baş anomolisi olan spermatastomata rastlanmıştır. (Resim 24 A, B, C, D, E, F).

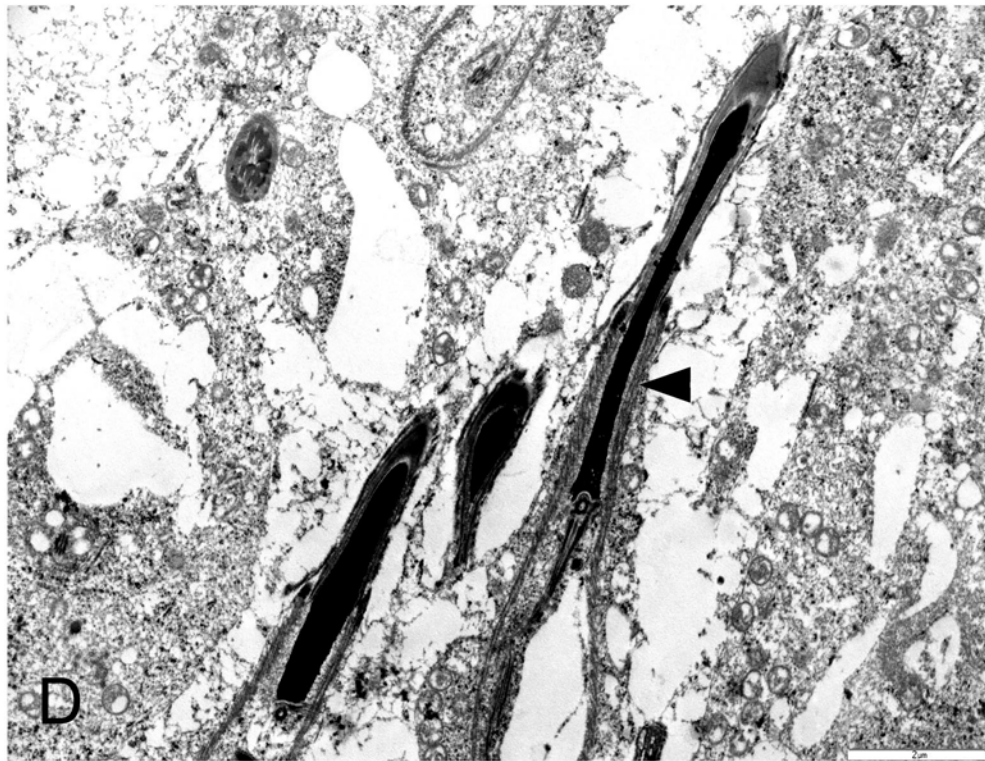
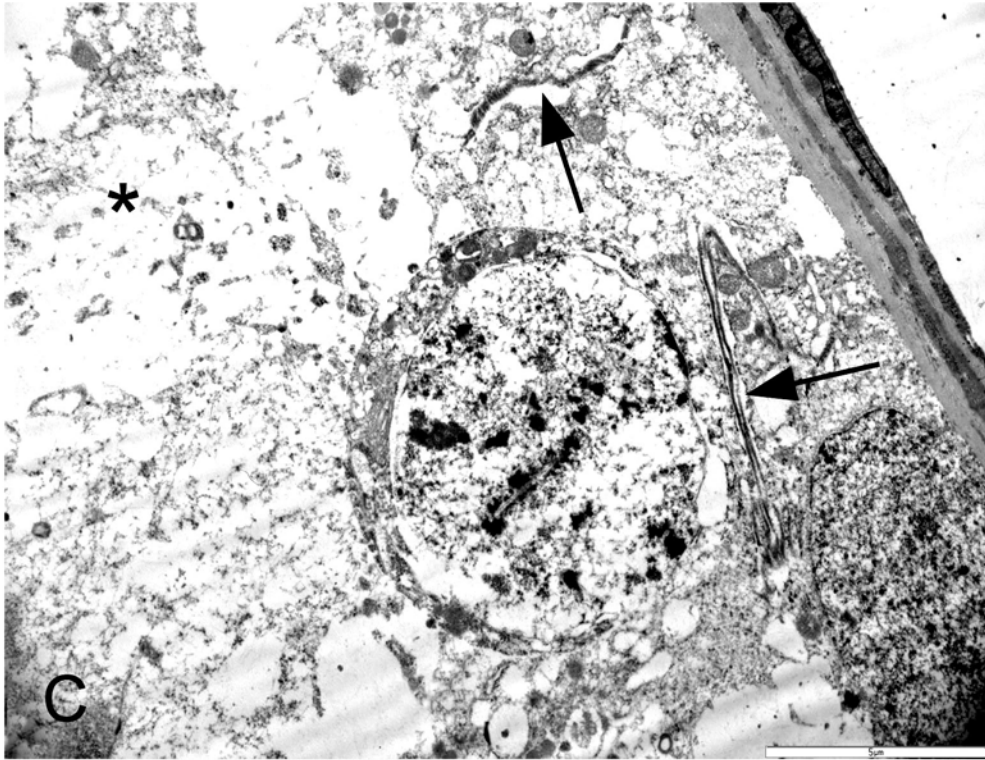
### **Radyasyon ve hipertermi grubu:**

Radyasyon ve hipertermi uygulamasından hem 3 ay (Resim 25 A, B, C, D) hem de 6 ay sonra (Resim 26 A, B, C, D) bazal laminada spermatogonyumlara ve Sertoli hücrelerine doğru ileri derecede parmaklı uzantılar şeklinde düzensizlikler görülmüştür. Spermatogenik seriye ait hücrelerin nükleus morfolojisinin bozulduğu gözlenmiştir. Bir çok alanda hem spermatogenik seriye ait hücrelerin hem de Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında organellerin yapısında bozulma ve ileri derece vakuolizasyon ve sıkı bağlantıların yapısında ileri derecede düzensizlikler ve ayrılmalar gözlenmiştir. Bazalden lumene doğru spermatogenik seriye ait hücrelerde kayıp ve lumende sadece sitoplazmik hücre artıkları gözlenmiştir. Seminifer tubullerin lumeninde spermatastomata gözlenmemiştir.

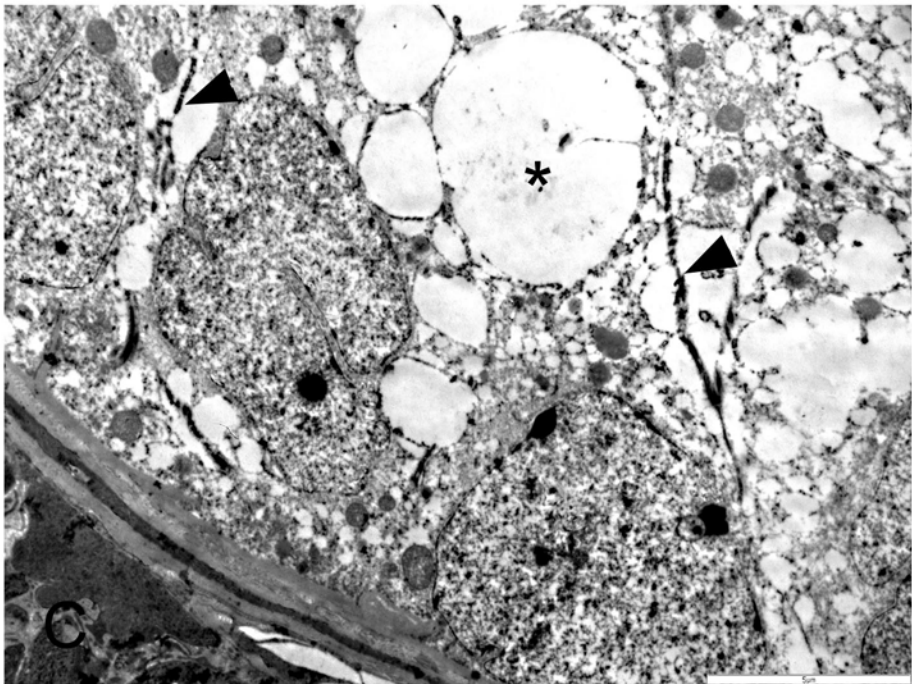
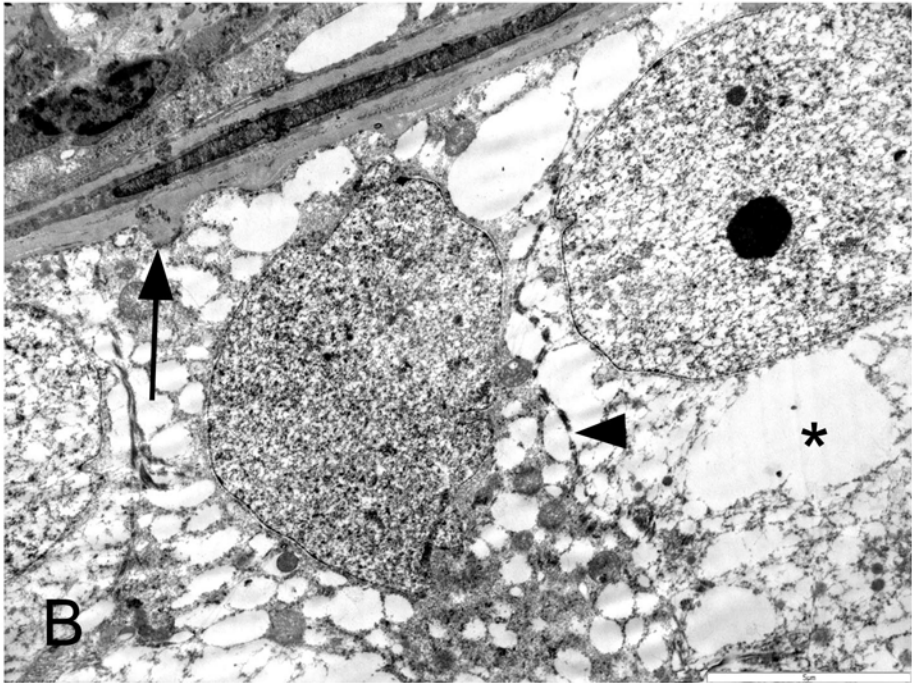
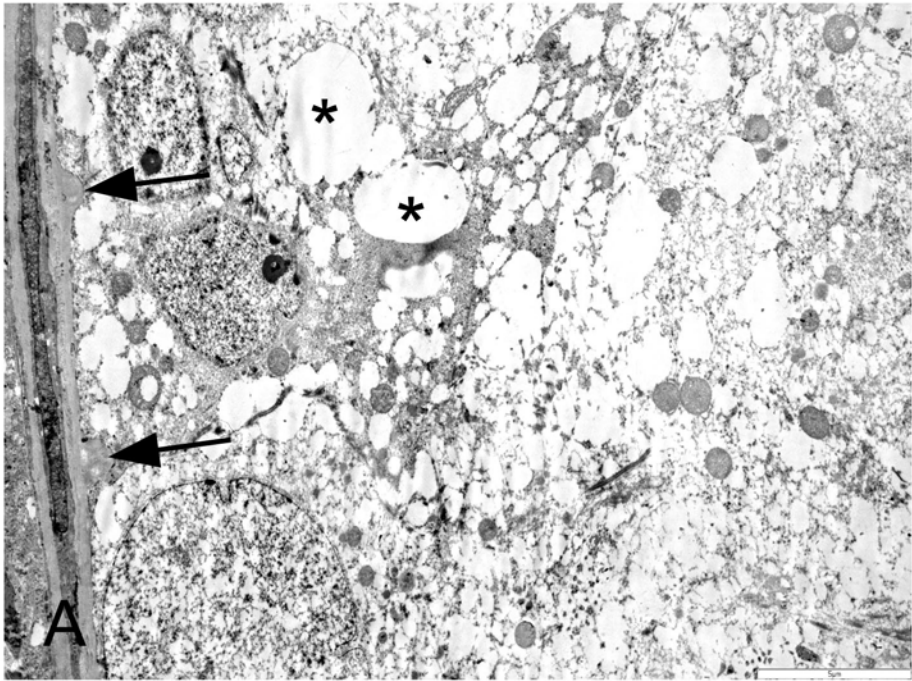




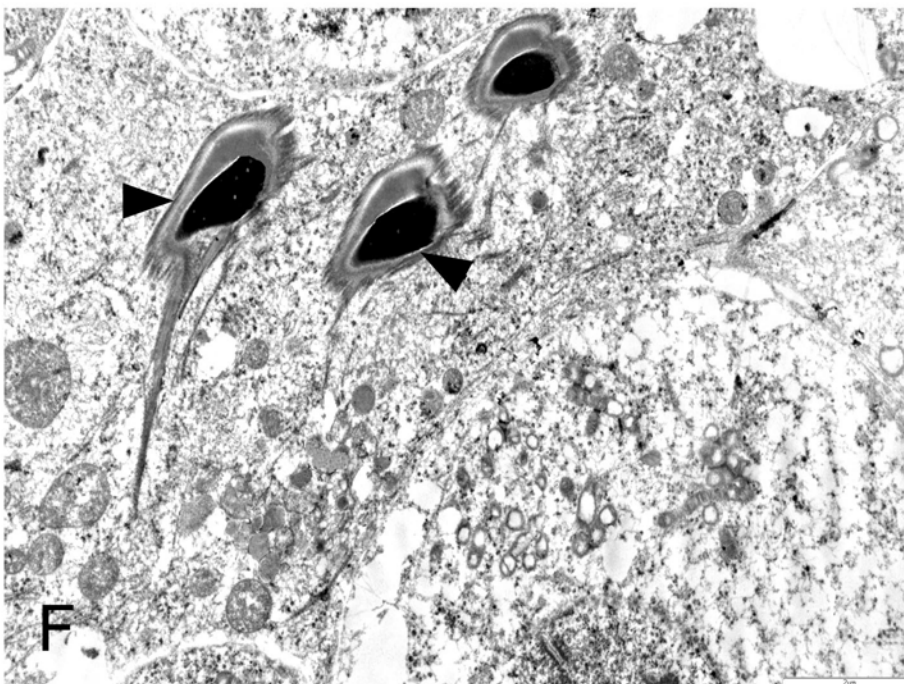
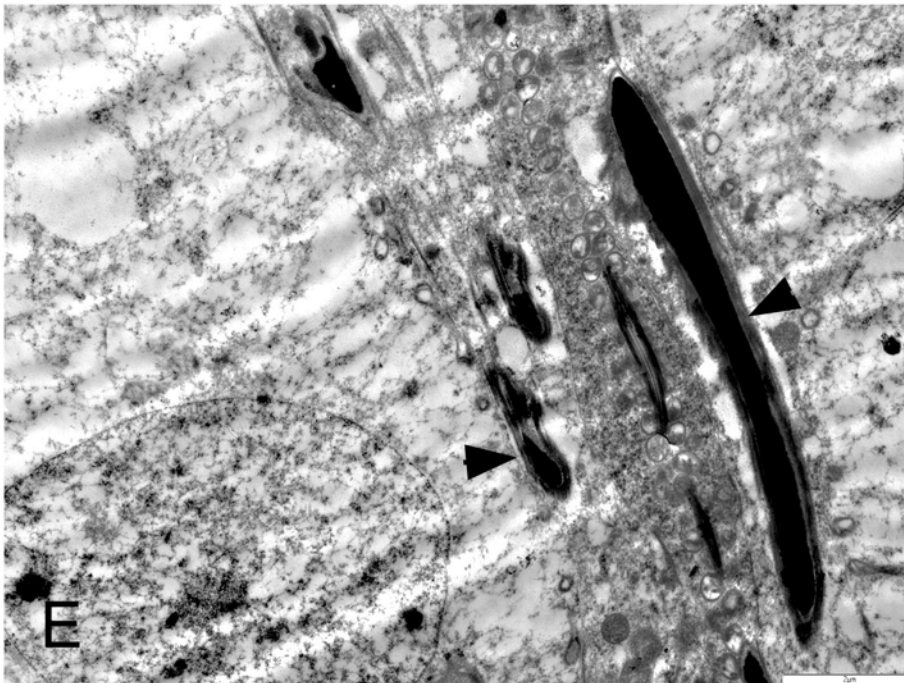
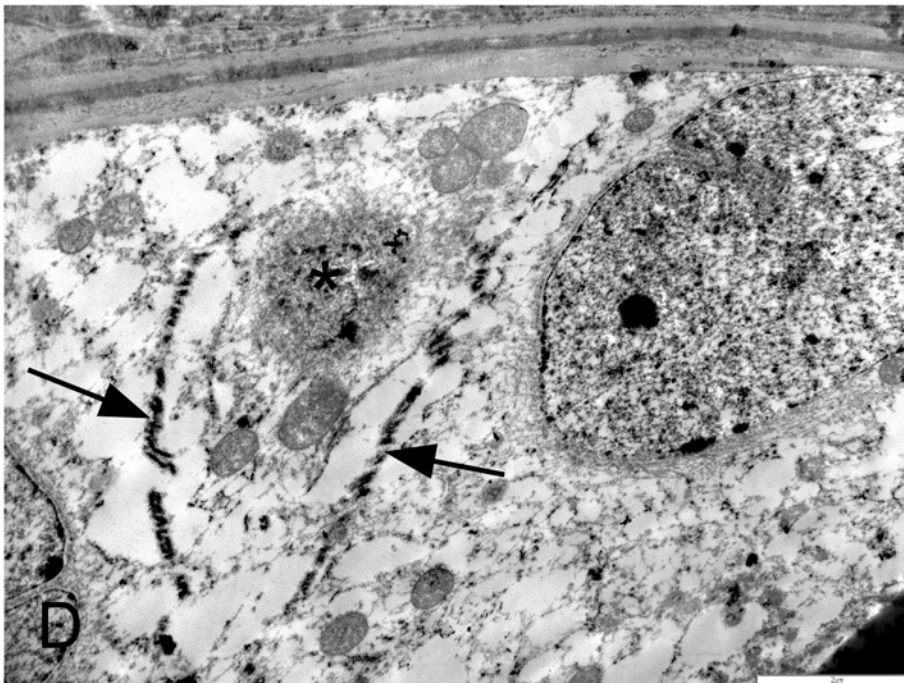
**Resim 23 A, B:** *Radyasyon uygulamasından 3 ay sonra* Sertoli hücrelerinin ve spermatogenik seriye ait hücrelerin sitoplazmalarında organel kaybı ve büyük vakuoller (\*), hücreler arası alanlardaki sıkı bağlantıların etrafında bozulmalar (→) (**A, B**) görülmektedir.



**Resim 23 C, D:** Radyasyon uygulamasından 3 ay sonra, hücreler arası alanlardaki sıkı bağlantıların etrafında bozulmalar ( $\rightarrow$ ), spermatogenik seriye ait hücre sayısında azalma ve dökülmeler (\*) (**C**), ve baş, boyun hasarı olan spermatozoalar ( $\blacktriangleright$ ) (**D**) görülmektedir.

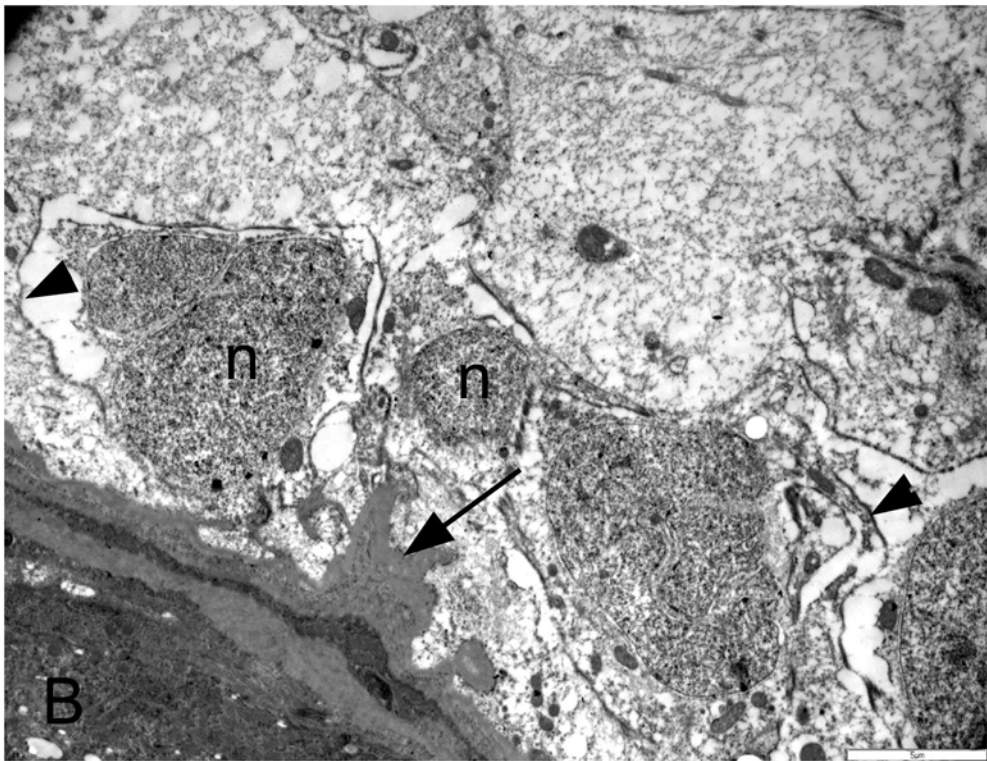


**Resim 24 A, B, C:** Radyasyon uygulamasından 6 ay sonra bazal membran yapısının spermatogenik seriye ait hücelere doğru yapmış olduğu parmaksı uzantılar (→), spermatogenik seriye ait hücelerin ve Sertoli hücelerinin sitoplazmlarında ileri derecede organel kaybı ve büyük vakuoller (\*) görölmektedir. Hüceler arası sıkı bağlantıların yapısının bozulduğu (▶) (A, B, C) görölmektedir.

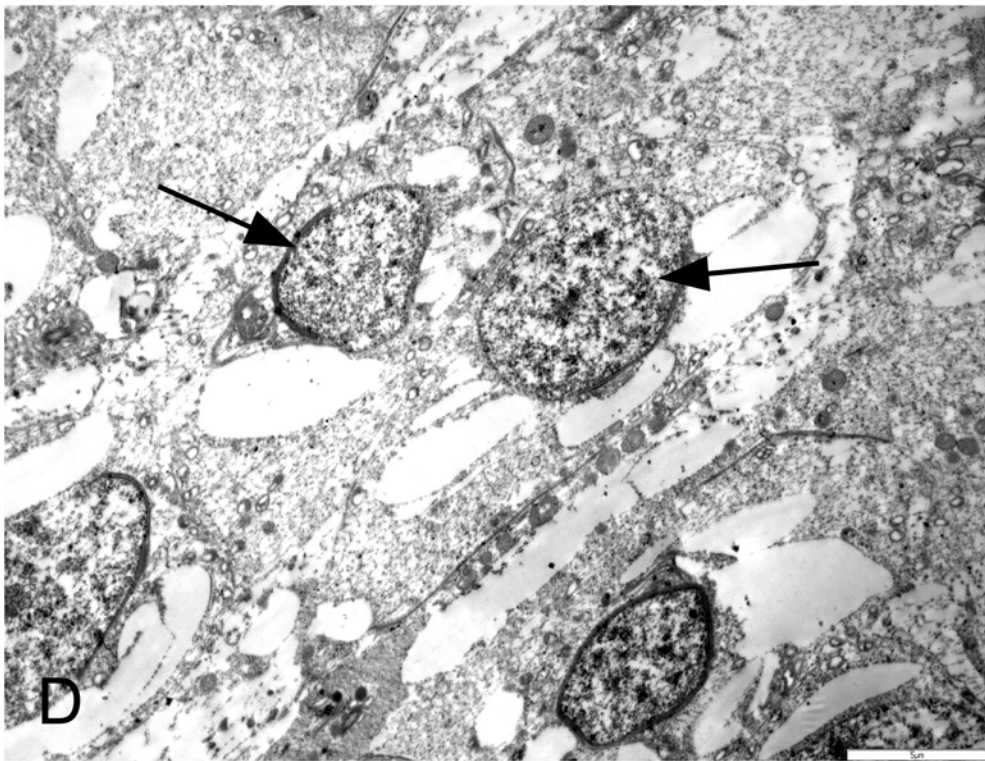
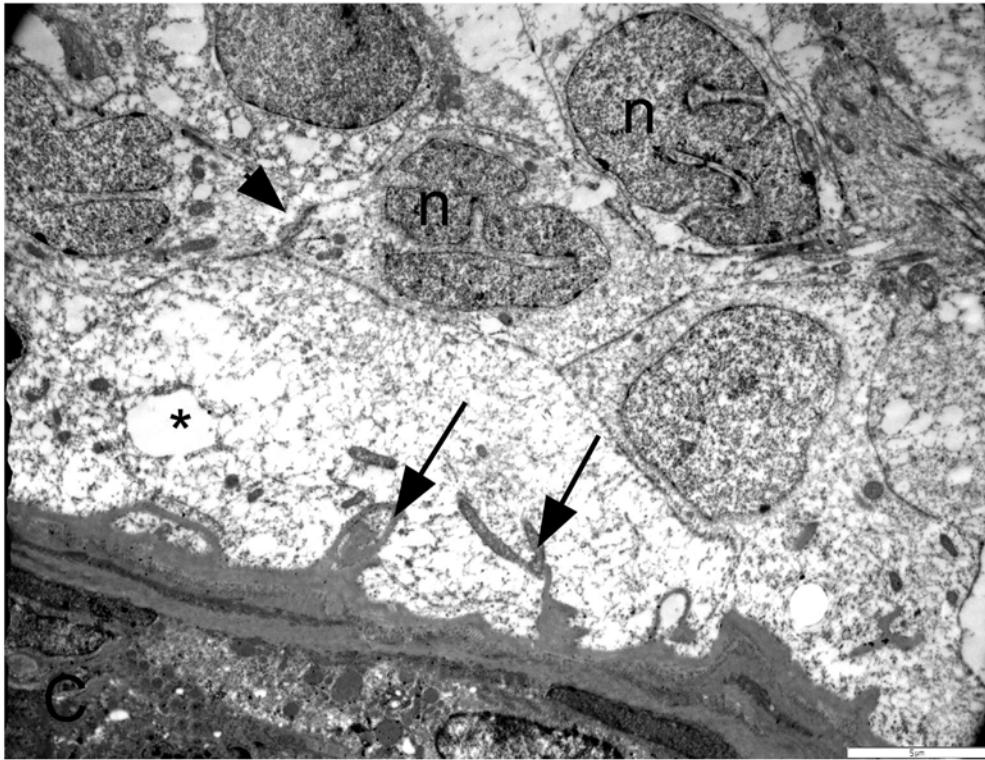




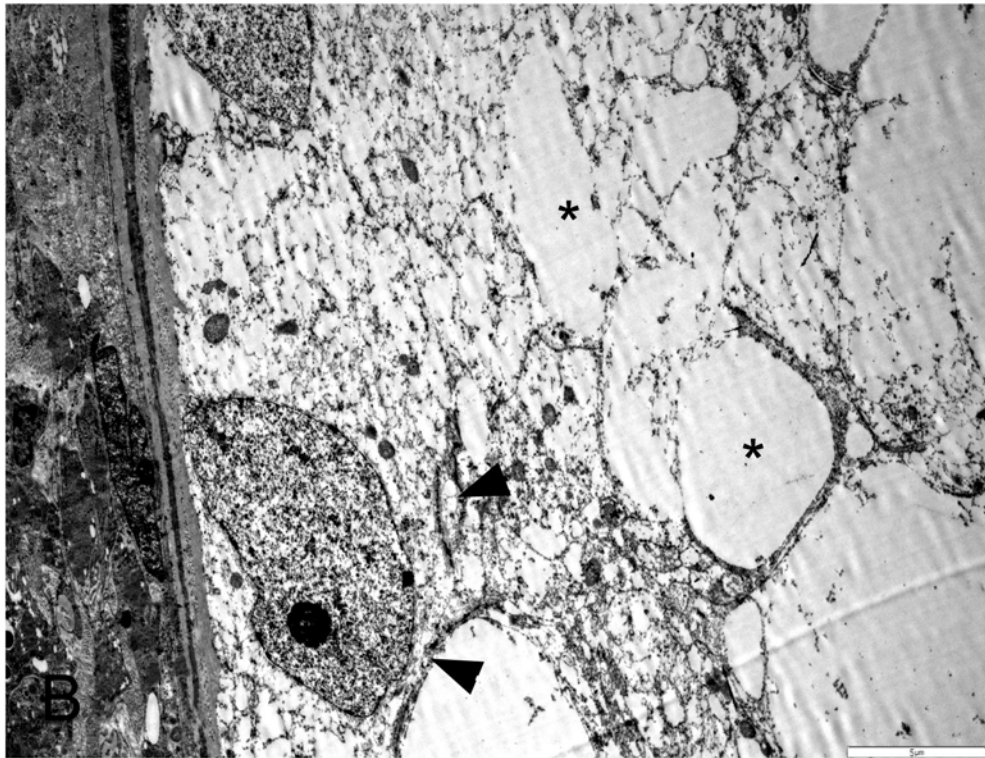
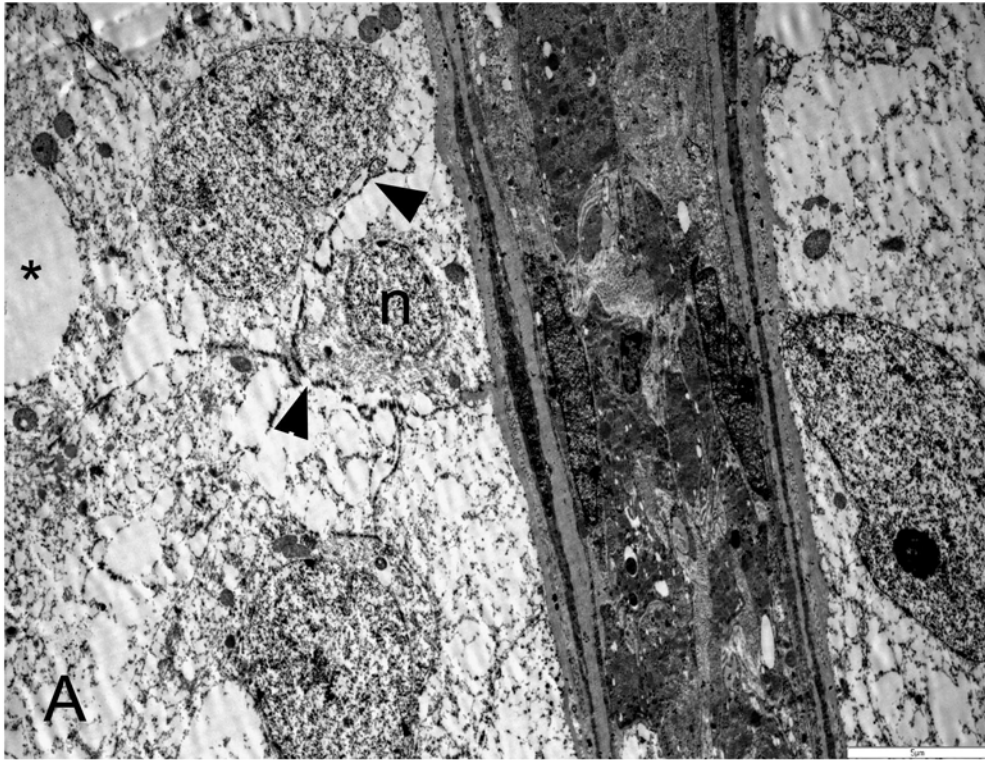
**Resim 24 D, E, F:** *Radyasyon uygulamasından 6 ay sonra bozulmuş nukleus yapısı (\*) ve hücreler arası sıkı bağlantılar (→) (D), baş ve boyun anomali olan hasarlı spermatozoalar (►) (E, F) görülmektedir.*



**Resim 25 A, B:** Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 3 ay sonra bazal membranda parmaksı uzantıların arttığı ( →), spermatogenik seriye ait hücrelerin nukleuslarının (n) düzensiz şekil aldığı görülmektedir. Hem hücrelerin sitoplazmalarında hem de hücreler arası alanlardaki sıkı bağlantıların etrafında büyük vakuollerin (\*) oluştuğu ve hücreler arası sıkı bağlantı yapılarının (▶) bozulduğu görülmektedir.

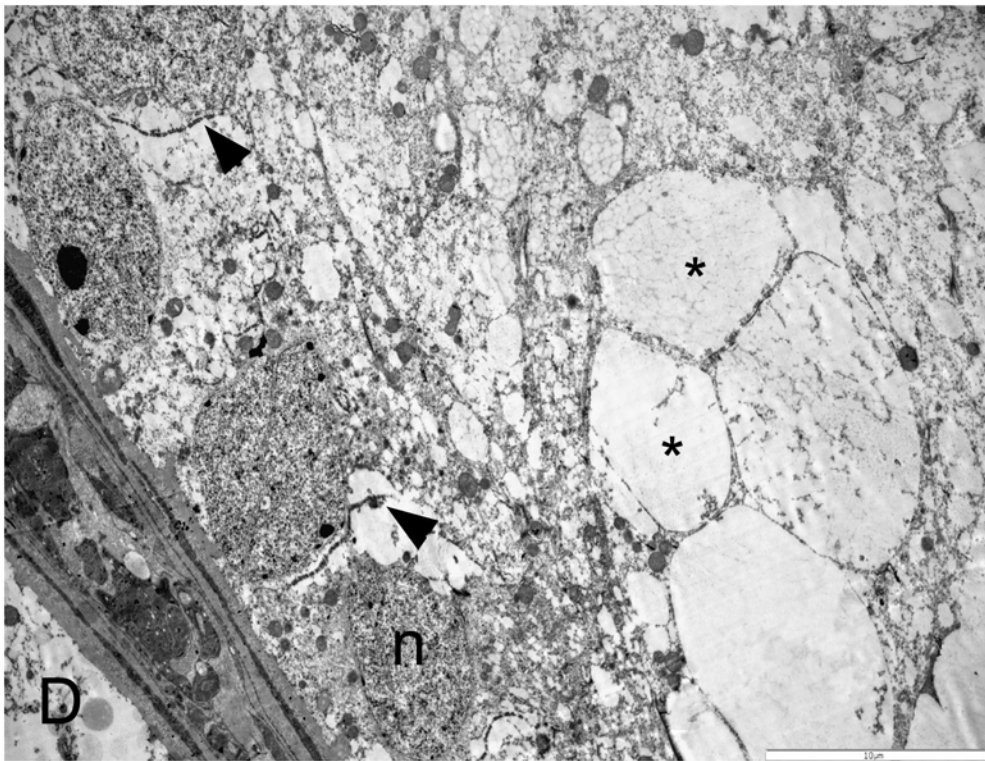
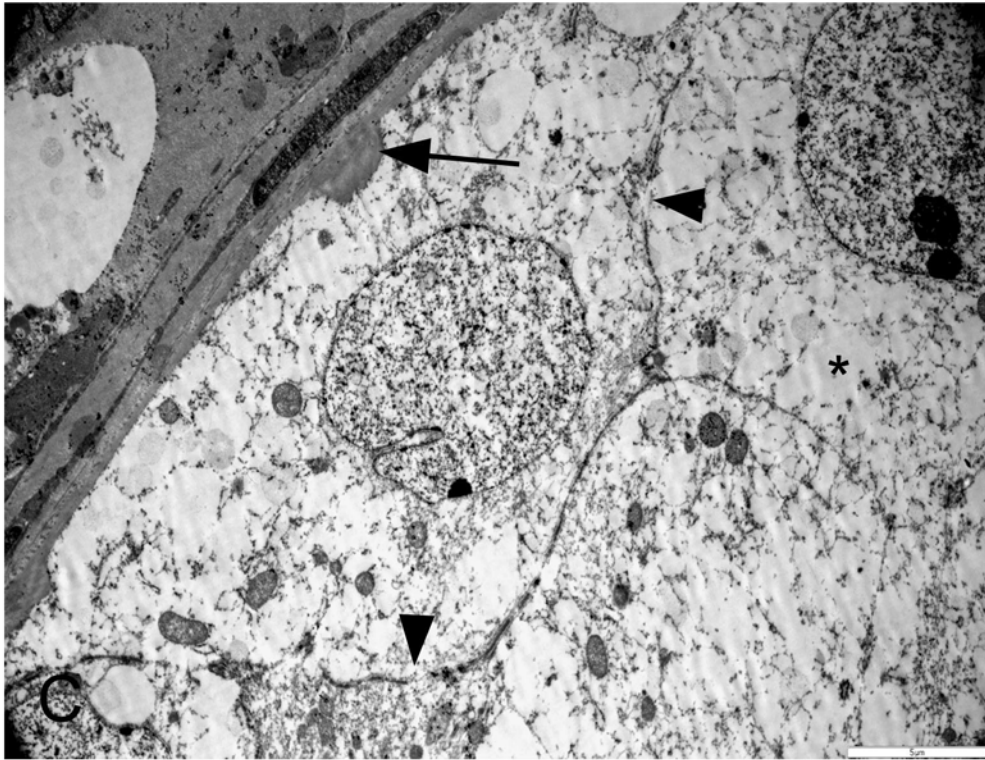


**Resim 25 C, D:** Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 3 ay sonra bazal membranda parmaklı uzantıların arttığı (→), spermatogenik seriye ait hücrelerin nükleuslarının (n) düzensiz şekil aldığı görülmektedir. Hem hücrelerin sitoplazmalarında hem de hücreler arası alanlardaki sıkı bağlantıların etrafında büyük vakuollerin (\*) oluştuğu ve hücreler arası sıkı bağlantı yapılarının (▶) bozulduğu (C); ileri derecede hasarlı spermatidler (→) arttığı (D) görülmektedir.





**Resim 26 A, B:** Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 6 ay sonra ileri derece hasarlı spermatogenik seriye ait hücreler ve Sertoli hücreleri; spermatogenik seriye ait hücrelerin nukleuslarının (n) düzensiz şekil aldığı görülmektedir. Hücreler arası alanlardaki sıkı bağlantıların bozulduğu (►) ve etrafında büyük vakuollerin (\*) oluştuğu (A, B) görülmektedir. Lümene doğru köpüksü hücre artıkları (A, B) görülmektedir.

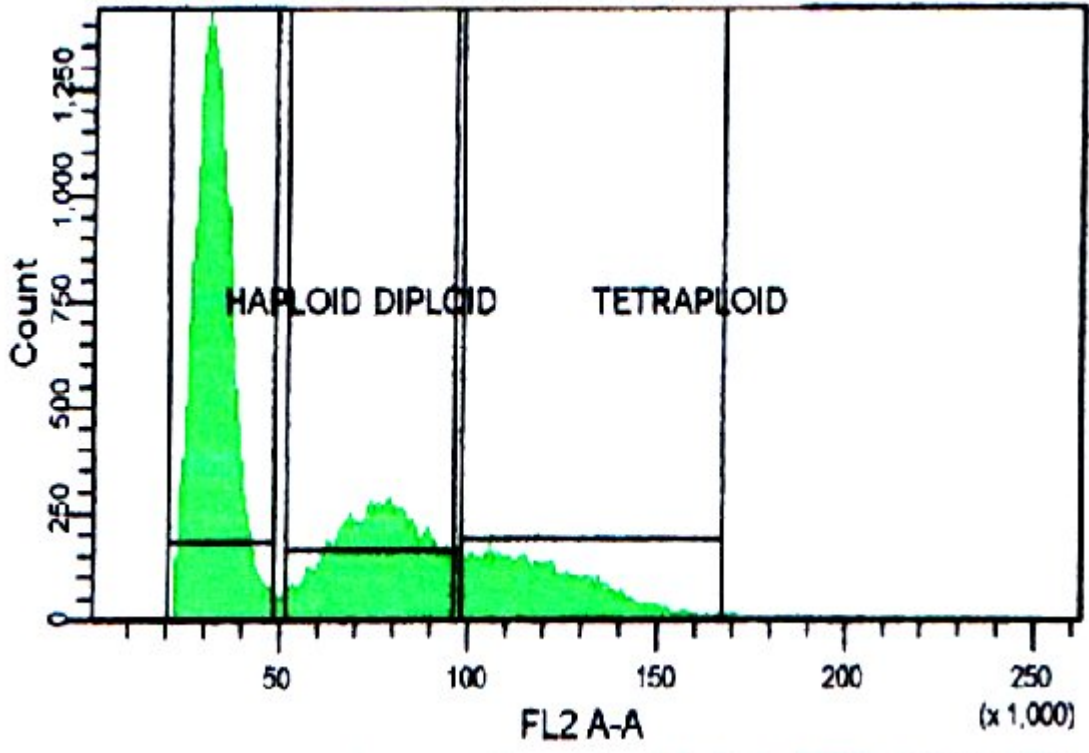


**Resim 26 C, D:** Radyasyon ve hipertermi uygulamasından 6 ay sonra bazal membranda parmaksı uzantıların arttığı (ok) görülmektedir. Sertoli ve spermatogenik seriye ait hücrelerde ileri derece hasar; spermatogenik seriye ait hücrelerde düzensiz nukleuslar (n) görülmektedir. Hücreler arası alanlardaki sıkı bağlantıların bozulduğu (ok başı) ve etrafında büyük vakuollerin (\*) ve lümene doğru köpüksü hücre artıklarının oluştuğu görülmektedir (C, D).

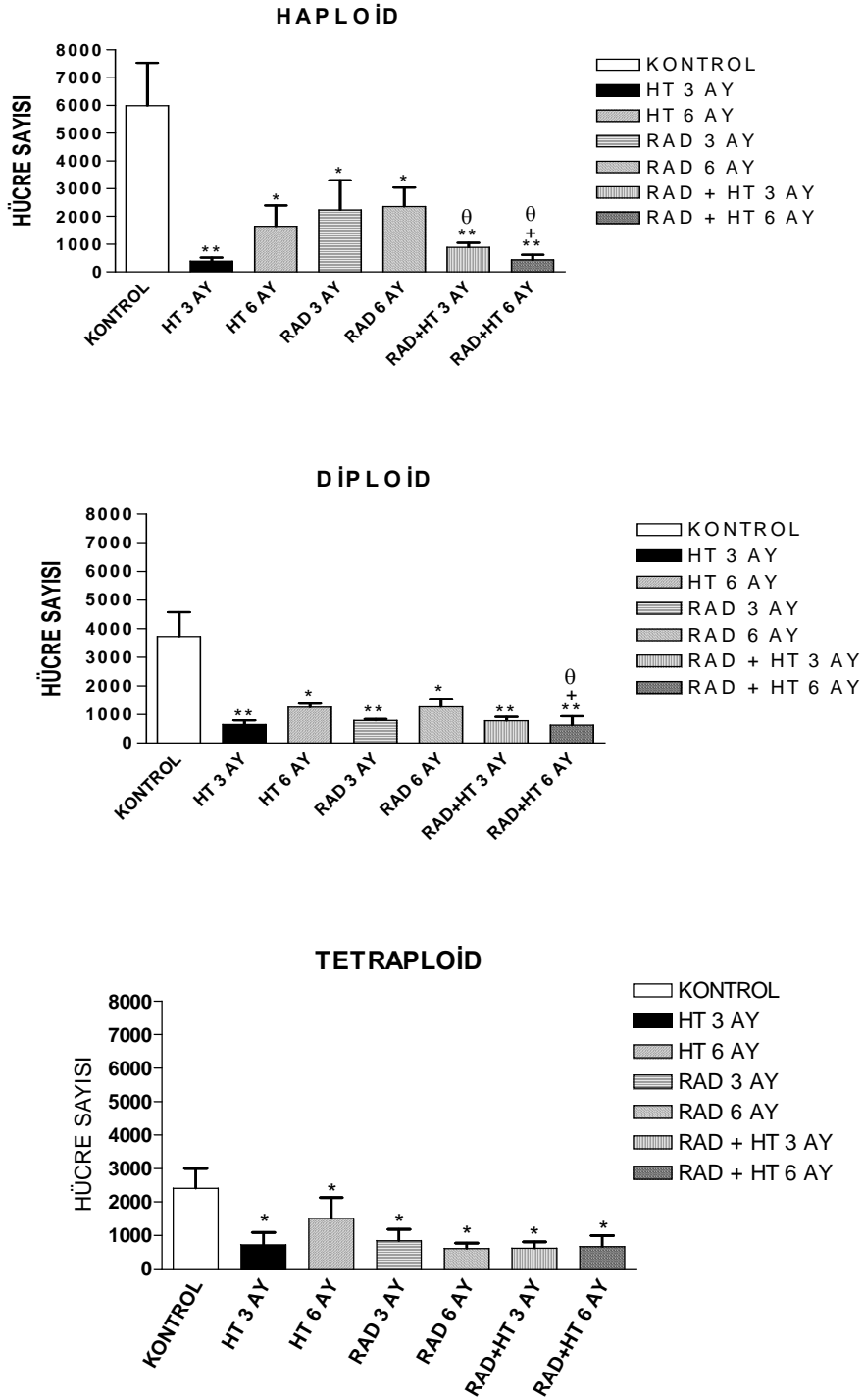
## 6.9. Akım Sitometresi Bulguları:

Kontrol grubu ile kıyaslandığında, hipertermi uygulamasından 3 ay ve 6 ay sonra sırasıyla haploid (3 ay:  $p<0,01$ ; 6 ay:  $p<0,05$ ), diploid (3 ay:  $p<0,01$ ; 6 ay:  $p<0,05$ ), ve tetraploid (3 ay:  $p<0,05$ ; 6 ay:  $p>0,05$ ), hücre sayısında; radyasyon uygulamasından 3 ay ve 6 ay sonra haploid (3 ay:  $p<0,05$ ; 6 ay:  $p<0,05$ ), diploid (3 ay:  $p<0,01$ ; 6 ay:  $p<0,05$ ), ve tetraploid (3 ay:  $p<0,05$ ; 6 ay:  $p<0,05$ ) hücre sayısında; radyasyon ve hipertermi uygulamasından 3 ay ve 6 ay sonra haploid (3 ay:  $p<0,01$ ; 6 ay:  $p<0,01$ ), diploid (3 ay:  $p<0,01$ ; 6 ay:  $p<0,01$ ), ve tetraploid (3 ay:  $p<0,05$ ; 6 ay:  $p<0,05$ ) hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüş gözlenmiştir (Grafik 5, 6).

Hipertermi ve radyasyon+hipertermi grubu ile kıyaslandığında haploid (6 ay:  $p<0,05$ ), diploid (6 ay:  $p<0,05$ ) hücre sayısında; radyasyon ve radyasyon+hipertermi grubuyla kıyaslandığında haploid (3 ay:  $p<0,05$ ; 6 ay:  $p<0,05$ ), diploid (3 ay:  $p<0,05$ ; 6 ay:  $p<0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir (Grafik 6).



**Grafik 5:** Akım sitometrisi ölçüm sonuçlarına göre kontrol grubunda haploid, diploid ve tetraploid hücrelerin dağılımı.



**Grafik 6:** Akım sitometresi ölçüm sonuçlarına göre haploid (A), diploid (B) ve tetraploid (C) hücrelerin gruplara göre dağılımı. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  kontrol grubuna göre, +:  $p < 0,05$ , HT grubuna göre,  $\theta$ :  $p < 0,05$ , RAD grubuna göre kıyaslanmıştır.



## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Spermatogenezise en çok zarar veren çevresel faktörlerin önde gelenleri; yüksek ısı, radyasyon ve kimyasal maddelerdir. Spermatogonyal dejenerasyon radyasyona, testise uygulanan yüksek ısıya ve toksik kimyasallara maruz kalmasının bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Ayrıca hormonlar, büyüme faktörlerindeki bozukluklar ya da immünsistem bozuklukları gibi nedenlerden dolayı da spermatogonyal dejenerasyon olabilir (51).

Radyasyon infertilite konusunda en çok ve ilk çalışılan ajanlardan biridir. İnsan ve sıçanda yapılan çalışmalarda spermatogonik hücrelerin radyasyona çok hassas olduğu gösterilmiştir (23). Radyasyon uygulaması sonucunda kromozomal hasar meydana gelebilir. Bunun sonucunda ise hücre ölümü ve bazı sitogenetik değişiklikler meydana gelir (38). Bir diğer çalışmada ise radyasyon spermatogonik hücrelerin yüksek derecede hasarıyla birlikte, farklılaşan spermatogoniumları da harap ettiği belirtilmiştir (24).

Radyasyonun insanda anti-spermatogonik etkisi bilinmektedir. İnsanın doza bağlı olarak ve bir kez ionize radyasyona maruz kalması sonucu spermatogenezisde geri dönüşümlü hasara neden olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda bu tip hasara en hassas olan hücre grubunun proliferen olan spermatogonyumlar olduğu belirtilmiştir. 20 cGy radyasyon dozu sperm sayısını düşürürken, 75cGy'nin üstündeki dozlar azospermiye neden olmaktadır. 100cGy'lık radyasyon dozu ise azospermiye neden olabileceği gibi 6 aylık süre zarfında geri dönüşümü olabileceği gösterilmiştir. 300cGy'nin üstündeki radyasyon dozunda ise azosperminin yanı sıra geri dönüşümünün 5 yılı aşkın bir sürede olabileceği ya da geri dönüşümsüz olarak kök hücre ölümüne de neden olabileceği bildirilmiştir (22, 38, 47).

Embriyonik dönemde testiste gonositlerin yüksek derecede çoğaldığı evre 14. - 18. günlerdir. Doğumdan sonraki 4.-5. günlerde tekrar proliferen olarak tip A spermatogonyumlara farklılaşırlar. Prenatal dönemde radyasyon uygulamasının

apoptozisi indükleyerek gonositlerin çoğalmasını engellediği ve buna bağlı olarak da oluşacak spermatogonyum sayısında düşüşe sebep olacağı gösterilmiştir (33).

Başka bir deneysel çalışmada, gestasyonel 18. günde 1,5 Gy'lık *in utero* X-ışını radyasyonu verilen sıçanlar doğumdan 90 gün sonra testis ağırlığı, histolojik ve infertilite açısından incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda embriyonik dönemde alınan radyasyonun testiküler büyümeyi engellediği, spermatogenezisi anlamlı bir şekilde azalttığı ve sıçanlardaki infertilite oranını yükselttiği gösterilmiştir (21).

Bizim çalışmamızda embriyonik dönemde 100cGy'lık radyasyon uygulamasının ise hem 3 ay hem de 6 aylık dönemler sonunda spermatogenik seriye ait hücrelerde ileri derece hasar meydana getirdiğini, azospermiye neden olduğunu ve birçok seminifer tubulün tek sıra sadece Sertoli hücresinden meydana geldiğini gözledik. Embriyonik dönemde 100cGy dozunda alınan radyasyonun gelişim döneminde uygulanmasından dolayı 6 aylık dönemde geri dönüşümünün olmaması kök hücre görevi gören spermatogonyumlarda ileri derecede hasar meydana gelmesinden dolayı olabilir.

Yetişkin farelere 0.5 ile 5 Gy'lık tek doz radyasyon uygulanmasından 12 saat sonra testislerinde spermatogenik serideki hücrelerde elektron mikroskopik düzeyde nuklear kromatin kondensasyonu ve nekroza benzer bulgular gözlenmiştir, bunun yanında kromatin marjinasyonu ve nuklear parçalanma gibi apoptozize özgü morfolojik bulgular da gözlenmiştir. Radyasyon uygulamasının sonucunda TUNEL pozitif hücre sayısında da elektron mikroskopi bulgularına benzer olarak artış görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda radyasyon uygulamalarının spermatogonyal dejenerasyonun apoptozisle ilişkili olduğu gösterilmiştir (15). Yapılan başka bir çalışmada 8-10 haftalık erkek farelere 10 dakikalık 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 ve 2000 cGy X-ışını uygulanmış ve yüksek doz X ışını verilen grupta atrofik seminifer tübül sayısının fazla olduğu ve doz artışına paralel olarak TUNEL pozitif hücre sayısında orantılı bir şekilde artış olduğu belirtilmiştir (26).

Bizde çalışmamızda radyasyon ve radyasyon+hipertermi uygulanmış gruplarda 3 ve 6 ay sonra kontrole göre atrofik tubul sayısının arttığını ve TUNEL pozitif hücrelerde artışın olduğunu izledik. Ayrıca spermatogonyum ve primer spermatositlerde TUNEL pozitif işaretlenmenin daha fazla olduğunu gözledik. Aynı deney gruplarında elektron mikroskopik incelemelerimizde de apoptotik hücrelerin zaman içinde arttığını saptadık. Radyasyon ve hiperteminin birlikte uygulandığı sıçanlarda spermatogenik serideki hücre morfolojisindeki hasara paralel olarak apoptotik hücre sayısı da artmaktadır. Radyasyon ve hipertemi geridönüşümsüz olarak spermatogenik seride hasara sebep olmaktadır.

Akım sitometresi taze dokuda DNA miktarı analizleri yapmak için kullanılan tekniklerden biridir. Bunun yanında formalin ile fikse edilmiş ve parafine gömülmüş fare testislerinin iyi bir DNA korunumu sağladığını hücre ekstraksiyonundan sonra akım sitometri analizi ile gösterilebileceğini ortaya koymuştur. Bu tekniğin en büyük avantajı örneklerin uzun süre saklanabileceği gibi birçok tekrar yapılarak testin doğruluğunu arttırmasıdır. Bu yöntemle testiste spermatogenik hücrelerin DNA içerikleri gösterilmektedir (40, 41).

Bizim çalışmamızda da paraformaldehit ile fikse edilmiş ve parafine gömülmüş testis doku örneklerinde akım sitometrik analiz yapılmıştır. Testiste hücrelerin haploid, diploid ve tetraploid içerikleri incelenmiştir.

Radyasyon verilen hayvanlarda akım sitometresi ile spermatogenik serideki DNA miktarındaki değişikliklerin incelenebileceği gösterilmiştir (13). 60 kobalt aletiyle 0,1 ila 1,5 Gy radyasyon verilen fareler 2 ila 35 gün sonra farklı safhadaki spermatogenez frekansı akım sitometresi ile gösterilmiştir. S fazındaki ve 4n hücrelerde azalma görülmekle birlikte zamanla bu değerlerde aşırı derecede artış görülmüştür. Diploid hücre sayısındaki düşüş, spermatogonyumların yüksek derecede öldüğünü göstermektedir. Ayrıca radyasyon verilen hayvanlarda diploid spermatidlerin varlığı gözlenmiştir (12).

Bizde çalışmamızda yukarıdaki çalışmalara paralel olarak radyasyon uygulamasından 3 ay sonra haploid, diploid ve tetraploid DNA içeriğinin azaldığını, özellikle de haploid hücrelerdeki azalmanın daha fazla olduğunu gözledik. Radyasyon uygulamasında 6 ay sonra ise tüm bu hücrelerdeki azalmanın daha fazla olduğunu özellikle de haploid özellikteki spermatidlerin sayısındaki azalmanın daha fazla olduğunu gözledik. Radyasyon ve hiperterminin beraber uygulandığı sıçanlarda da 3 ve 6 ay sonra benzer şekilde haploid, diploid ve tetraploid DNA içeriklerinin anlamlı olarak düştüğünü özellikle de haploid hücre sayısındaki düşüşün diğer DNA içeriklerine göre daha fazla olduğunu gözledik. Bu bulgulara paralel olarak testis ağırlığında anlamlı düşüş olduğunu gözlemledik. Radyasyon ve hipertermi uygulamalarından testisteki haploid içerikli spermatid ve spermatozoaların daha hassas olduğunu gözlemledik. Spermatogonyumlardaki hücre sayısının düşüşüne bağlı olarak uzun dönemde haploid sayıdaki hücrelerde anlamlı düşüş gözlenmiştir.

Tüm vücuda gamma (2), X ışını radyasyon uygulanması (16) yada testiküler radyasyon uygulanması sonucunda gonadal hasar oluşabileceği gösterilmiştir (2). Postnatal 3 ve 5 günlük sıçanlara 5 Gy X-ışını radyasyonu uygulamasından 1, 2, 3, 4, 8 ve 24 saat sonra testiste hücre ölümü değişiklikleri ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmiştir. Radyasyon uygulamasını takiben Sertoli hücrelerindeki apoptozisin 3. ve 4. saatlerden başlayarak 8. saatte pik yaptığı belirtilmiştir, 24. saatte Sertoli hücrelerinin çoğu etkilenmiştir. Bu bulgulara göre ionize radyasyonun, proliferen olan hücreler üzerinde hızlı bir etkisi bulunmaktadır (1). Yapılan ultrastrüktürel bir çalışmada 8 Gy'lik X-ışını radyasyonu uygulamasından sonra germinal epitelyal hücrelerin %66'sının azaldığı görülmüştür. Bu çalışmada radyasyon uygulamasının nukleus kondensasyonuna, sitoplazmada vakuol oluşumuna, sitoplazmik yoğunluğun artışıyla beraber apoptotik cisimciklerin oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir (19) Gamma radyasyon uygulanan sıçanların testisinde yapılan ultrastrüktürel çalışmada bazal laminanın üzerinde büyük vakuoler boşluklar, spermatogenik hücrelerin diziliminde düzensizlikler, spermatogonya sayısında düşüş, nukleusları karyolitik dejenerasyon gösteren primer spermatositler ve nuklear membranlarında devamsızlıklar gözlenmiştir (2)

Bizim çalışmamızda da literatürdeki verilerle uyumlu olarak; radyasyon ve radyasyon+hipertermi uygulanmış gruplarda 3 ay sonra germinal epitelyumdaki hücre sayısının azaldığını, spermatogenik serideki hücrelerin sitoplazmalarında vakuol oluşumunu ve organel sayısında azalma olduğunu, nukleusun yuvarlak yapısının bozularak lobüllü şekle dönüştüğünü, apoptotik hücrelerin varlığını gözledik. Aynı deney gruplarında 6 ay sonra yukarıda belirtilen hasarın ileri derecede olduğunu ve bazal membranda sitoplazmaya doğru düzensiz parmaksı uzantıların oluştuğunu gözledik.

Erkek infertilitesini etkileyen bir diğer önemli faktörde yüksek ısıdır. Spermatogenetik serideki hücrelerin fonksiyonlarını yapabilmeleri ve sperm üretiminin sürekliliği için olması gereken ısının vücut sıcaklığından 1-2 derece daha düşük olması gerektiği bilinmektedir. (x) Uzun yıllar önce testisin normal gelişimine devam edebilmesi için abdominal kavitenin dışına çıkması gerektiği gösterilmiştir. Testisin skrotuma inmemesinden kaynaklanan gelişimsel bir anomali olan kriptorşidizmde testiküler ısının yüksek olmasından dolayı spermatogenezisi engellediği ve infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (34, 45).

İnsan, koyun, domuz, sığır, sıçan, fare gibi çok çeşitli türlerde yüksek ısının yetişkin memeli testislerinde fizyolojik etkisi araştırılmış ve yüksek ısının testisküler ağırlık azalmasına ve kısmen veya tamamen infertiliteye neden olduğu gösterilmiştir (45). Yapılan çalışmalar, normalde 32 °C'de ki ısıda yerleşen fare testisinin ısıya çok duyarlı olduğunu ve ısı değişiminde spermatogenik hücrelerin fonksiyonunun inhibisyonuyla infertiliteye neden olduğunu göstermektedir (24) ve histopatolojik (7, 10) olarak spermatozoa ve spermatidlerin sayıca azalmasına neden olduğu gibi maturasyon siklüsündeki spermatositlerde de bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir.

Başka bir çalışmada özel bir ısıtıcı yardımıyla 35 günlük sıçanlara 45 dakika süre ile 45 °C yüksek ısı uygulamasından 90 gün sonra parankimal hacmin azalmasından dolayı testiküler ağırlığın azaldığı, spermatogenik hücrelerde hasar görüldüğü, spermatidlerde multinuklear yapılara rastlandığı gözlenmiştir (31). Bizim çalışmamızda da postnatal 10. günde uygulanan yüksek ısının (40 -41 °C) 90 ve 180 gün

sonra testis ağırlığında ve alanında kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı görülme bile düşüğe sebep olduğunu gözledik. Ayrıca histolojik incelemelerde bazı seminifer tübüllerde spermatogenik hücrelerde büyük vakuoller şeklinde hasar olduğu ve bazı seminifer tubullerde de tek sıra hücre kaldığını gözledik. Hamilelik döneminde radyasyon ve postnatal 10 günde hipertermi uygulanmış gruplarda ise 90 ve 180 gün sonraki incelemelerimizde testis ağırlığında ve alanında anlamlı olarak düşüş gözledik. Seminifer tubullerin hemen hemen hepsinde sadece tek sıralı Sertoli hücreleri gözledik. Bu bulgularımızda radyasyon ve hiperterminin birlikte uygulanmasının geri dönüşümsüz olarak spermatogenik seride hasara sebep olduğunu düşündürmektedir.

Postnatal 7. günde hipertermi uygulamasıyla vücut ısıları 1 saat boyunca  $41.3 \pm 0.8$  °C'ye tutulduktan 15 saat sonra programlı hücre ölümünün arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada en fazla ısıya hassas hücrelerin spermatogonyuların, primer spermatositlerin ve yuvarlak spermatidlerin olduğu, ancak ileri spermatidlerin ve Sertoli hücrelerinin ise etkilenmediği gösterilmiştir. Bu çalışmada mitoz (spermatogonium) ve mayoz (primer spermatosit) giden hücrelerin ısıyla oluşturulan hücre ölümüne daha hassas olduğu gösterilmiştir (24).

Bir başka çalışmada ise 10 -11 haftalık sıçanların vucüt ısısı  $43^{\circ}\text{C}$ 'e yükseltildikten sonra 4, 15 28, 38, 68 saat sonra testis ağırlığının düştüğü ve TUNEL pozitif hücre sayısında artış olduğu görülmüştür. Bu artışın daha çok spermatositlerde olduğu tespit edilmiştir (45). Yüksek ısı, sinsityumdaki bazı sitoplazmik köprülerde denaturasyona neden olarak komşu hücrelerde de dejenerasyona neden olmaktadır (10) Bu dejenerasyonlarda apoptotik mekanizmaları devreye sokmaktadır. Deneysel kriptorşidizm oluşturulan farelerde (39) ve yetişkin sıçanlarda (27) 1 gün sonra apoptotik kök hücreler görülmektedir. Hipertermi uygulanan yetişkin farelerde de en erken 8. saatte apoptotik kök hücreler görülmüştür. Zamanla da bu apoptotik hücrelerde artış saptanmıştır (45).

Lokal olarak ısı uygulanmış sıçanlarda spermatogenik hücrelerin apoptozosinin incelendiği başka bir çalışmada; testis ısısı  $43^{\circ}\text{C}$  yükseltilmiştir, 12 saat, 1, 3, 6, 10, 50 ve 80 gün sonra testisleri elektron mikroskobu, akım sitometrisi ve TUNEL tekniği ile



incelenmiştir. Yüksek ısı uygulaması haploid hücre sayısında düşüğe ve TUNEL pozitif hücre sayısında artışa sebep olmuştur. Sonuç olarak bu çalışma lokal testiküler ısının spermatogenik hücre apoptozisini artırdığını ve ısıya en hassas hücrelerin spermatositler olduğunu ve uzun dönemde spermatogonyumlardaki apoptozisin arttığını göstermiştir (50).

Isının, farelerde spermatogenezis üzerine etkisini göstermek amacıyla yapılan bir çalışmada Vucüt ısıları 38-40 °C'ye yükseltilmiş ve 20-60 dakika süre ile bu ısıda tutulmuş, uygulamadan 14 ve 28 gün sonra testis ağırlığı ölçülmüş ve akım sitometresi ile DNA içeriği incelenmiştir. Spermatogenezisdeki hücrelerden farklılaşan geç spermatidlerin spermatogonyumlara göre ısıya daha hassas olduğu görülmüştür. Testis ağırlığının da buna bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir (8).

Bizim çalışmamızda da hipertemi uygulamasından 3 ay sonra dejeneratif ve regresif tubul sayısının arttığını, spermatogenik seriye ait hücrelerde yer yer vakuol oluşumunu gözledik. İlaveten bu grupta TUNEL pozitif hücre sayısında artış vardı. Hipertemi uygulamasından 6 ay sonra ise yukarıdaki bulgularda ilerleme gözledik. Radyasyon+ hipertermi uygulanmış gruplarda ise testis ağırlığının düştüğünü, atrofik tübül sayısının arttığını ve TUNEL pozitif hücre sayısının arttığını gözledik. Hiperterminin spermatogenik serideki hücrelerde hücre ölümünü indükleyerek sperm oluşumunu engellediği söylenebilir.

Bizim çalışmamızda akım sitometrik bulgularına göre, hipertermi ve radyasyon+hipertermi uygulamalarından 3 ay sonra haploid, diploid ve tetraploid DNA içeriğinde düşüş gözlemledik. Bu düşüşten en fazla etkilenen hücrelerin haploid içerikli geç spermatidlerin ve spermatozoaların olduğu görüldü. Hipertermi uygulamasından 6 ay sonra ise haploid hücre sayısındaki azalmanın devam ettiğini fakat uygulamadan 3 ay sonraki düşüş kadar çok olmadığını gözledik. Bu da uzun dönemde haploid hücre sayısında geri dönüşümün olduğunu düşündürmektedir. Hipertermi ve radyasyonun beraber uygulamasından 3 ve 6 ay sonra da benzer şekilde haploid, diploid ve tetraploid DNA içeriklerinin anlamlı olarak düştüğünü ancak özellikle haploid hücre sayısındaki

düşüşün diğer DNA içeriklerine göre daha fazla olduğunu gözledik. Bu bulgulara paralel olarak testis ağırlığında anlamlı düşüş olduğunu gözlemledik. Radyasyon ve hipertermi uygulamalarından testisteki haploid içerikli spermatid ve spermatozoaların daha hassas olduğunu ve bu hasarın geri dönüşümsüz olduğu gözlemledik.

Elektron mikroskopik incelemelerimizde de ışık mikroskopik bulgularına paralel olarak hipertermi uygulamasından 3 ay sonra yer yer sitoplazmik vakuollere, ve hasarlı spermatozoalara rastladık. Hipertermi uygulamasından 6 ay sonra ise yukarıdaki bulgulara ek olarak hasarlı spermatositlere ve apoptotik hücelere rastladık. Hipertermi ve radyasyonun birlikte uygulandığı gruplarda ise ileri derecede spermatogenik serideki hücrelerde ve Sertoli hücrelerinde hasar ve çok sayıda apoptotik hücrelerin olduğunu gözledik.

Bir çok in vivo model testisteki bağlantı dinamiklerini araştırmak amacıyla kan-testis bariyerini incelemiştir. Postnatal 14-20 günlük sıçanlarda kan-testis bariyeri ile apoptotik hücre ölüm arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada kan-testis bariyerinin henüz oluşmadığı bu gelişim döneminde zigoten ve pakiten spermatositlerde hücre ölümüne neden olabileceğini ortaya koymuştur (36). Yaşlanmada, deneysel kriptorşidizm/orşitizmde ve testiste patoloji oluşturularak kan-testis bariyerindeki sıkı bağlantı proteinleri incelenmiştir. Kriptorşid yaban domuzu, fare, sıçan ve insanda Sertoli ve Leydig hücrelerinde, proliferen olan ve farklılaşan spermatogenik hücrelerde hasar görülmektedir. Bununla beraber internal sıkı bağlantı proteinlerinde oluşan fonksiyonel hasardan dolayı kan-testis bariyerinde hasara neden olmaktadır. Kan testis bariyerindeki hasarın yanı sıra seminifer epitelyumda anormal spermatogenez ve daha az sıkı bağlantı fibrilleri görülmektedir. Ayrıca bazal membranın normalden daha kalın olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalar bu tip deneysel modellerdeki hasarın, okludin, ZO-1, E-cadherin, proteaz ve proteaz inhibitörleri ile ilgisi olduğunu göstermektedir (28).

Prenatal dönemde radyasyon uygulamasından 3 ay sonra sıçan testisinde kök hücrelerdeki dejenerasyona bağlı olarak sıkı bağlantı proteinlerinin varlığının değiştiği gösterilmiştir (44).

Bizim çalışmamızda da ZO-1 ve okludin immunohistokimyası bulgularına göre kontrolle kıyaslandığında radyasyon ve hipertermi uygulanmış gruplarda spermatogenik hasara paralel olarak giderek düşen bir immunoreaktivite görülmüş, radyasyon ve hiperterminin birlikte uygulandığı gruplarda ise immunoreaktivitenin olmadığı görülmüştür. Elektron mikroskopik incelemelerde de radyasyon ve radyasyon+hipertermi uygulanmış gruplarda sıkı bağlantı bölgelerinin hasarlı olduğu ve sıkı bağlantı bölgelerinin altındaki sitoplazmada büyük vakuollerin olduğu gözlenmiştir. İmmünoreaktivitenin azalması ya da hiç gözlenmemesi ve sıkı bağlantı bölgelerinin ileri derecede hasarlı yapısı radyasyon ve/veya hipertemi etkisinde sıkı bağlantı proteinlerinin sentezinin engellenmesinden ya da sıkı bağlantı proteinlerinin birbirleriyle olan etkileşimlerinin değişmesinden olabilir.

Sonuç olarak; elde ettiğimiz tüm bu bulgulara göre radyasyon ve hipertermi tek başına uygulandığında hücre ölümünde artışa, haploid hücre sayısında düşüşe ve sıkı bağlantı proteinlerinde azalmaya sebep olmuştur, ancak radyasyon ve hipertemi birlikte uygulandığı gruplarda yukarıda belirtilen hasar parametrelerinde ileri derecede artış gözlenmiştir. Buna göre radyasyon ve hipertermi uygulamasıyla infertilite oluşturulan tüm hayvanlarda uzun dönemde spermatogenik hücrelerde hasarın geri dönüşsüz olduğu gösterilmiştir. Deneysel infertilite modeli olarak ilk kez uygulanan ikili hasar modeli; bu tip infertilitenin tanımlanması ve ilerideki erkek infertilite tedavilerine ışık tutması açısından önem taşımaktadır.

## 8. KAYNAKLAR

1. Allan DJ, Gobé GC, Harmon BV.: Sertoli cell death by apoptosis in the immature rat testis following x-irradiation. *Scanning Microsc.*, Mar;2(1):503-12, 1988.
2. Andrieu M. N., Kurtman C., Hicsonmez A., Ozbilgin K., Eser E., Erdemli E.: In vivo Study to Evaluate the Protective Effects of Amifostine on Radiation-Induced Damage of Testis Tissue. *Oncology*, 69:44–51, 2005.
3. Apoptag Plus Peroksidaz In situ Apoptosis. S7101. Chemicon International. Kiti Kullanım Kitapçığı, syf:1-7, 2005.
4. Attanasio A., Schiffer D.: Ultrastructural detection of DNA strand breaks by in situ end-labelling techniques. *J. Pathol.*, 176:27-35, 1990.
5. Bahr G. F., Bartes P. H., Dytech H. E., Koss L. G., Wied G. L., Flow cytometry in diagnostic cytology and its histopathologic bases.
6. Chapman R.S, Chresta C.M., Herberg A.A., Bere H. M., Heer S., Whetton A.D., Hickman J. A., Dive C.: Further characterization of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukemia cells. *Cytometry*, 20:245-256, 1995.
7. Collins P., Lacy D.: Studies on the structure and function of the mammalian testis.II. cytological and histochemical observations on the testis of the rat after a single exposure to heat applied for different lengths of time. *Proc. R. Soc. Lond B. Biol Sci.* 172:17-38. 1969
8. De Vita R, Calugi A, Chiarantano C, Forte D, Mauro F, Uccelli R. Effects of heat on mouse spermatogenesis monitored by flow cytometry. *Int J Hyperthermia.*, May-Jun;6(3):543-51, 1990.
9. Feldman G. J., Mullin J.M., Ryan M.P. Occludin: structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:883-917, 2005.
10. Gasinska A., Hill S. The effect of hyperthermia on the Mouse testis. *Neoplasma.* 37:357-366, 1990.

11. Gumbiner B., Lowenkopf T., Apatira D.: Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl acad Sci U S A.* 88:3460-64. 1991.
12. Hacker U, Schumann J, Göhde W.: Effects of acute gamma-irradiation on spermatogenesis as revealed by flow cytometry. *Acta Radiol Oncol.*, 19(5): 361-8, 1980.
13. Hacker U, Schumann J, Göhde W, Müller K.: Mammalian spermatogenesis as a biologic dosimeter for radiation. *Acta Radiol Oncol.*, 20(4):279-82, 1981.
14. Harhaj N. S., Antonetti D. A.: Regulation of tight junction and loss of barrier function in pathophysiology. *The International journal of biochemistry and cell biology.* 36, 1206-37, 2004.
15. Hasegawa M, Wilson G, Russell LD, Meistrich ML.: Radiation-induced cell death in the mouse testis: relationship to apoptosis. *Radiat Res*, Mar;149(3):316, 1998.
16. Henriksen K, Kulmala J, Toppari J, Mehrotra K, Parvinen M.: Stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: quantification of irradiation effects. *J Androl.*, Jul-Aug;17(4):394-402, 1996.
17. Herman C. J. Cytometric DNA analysis in the management of cancer. *Cancer Supp.* 69; 1553-1556, 1992.
18. Hess R. A., Linder R. E, Strader L. F., Perreault S.D.: Acute effects and long-term sequelae of 1,3-dinitrobenzene on male reproduction in the rat II. Quantitative and Qualitative Histopathology of the Testis. *J. Androl.*, 9:327-342, 1988
19. Hussein MR, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait AT, Adly MA, Abdelraheem MH.: Morphological evaluation of the radioprotective effects of melatonin against X-ray-induced early and acute testis damage in Albino rats: an animal model. *Int J Exp Pathol.*, Jun;87(3):237-50, 2006.
20. Janguerial LC., Carneiro J., Kelley OR.: Temel histoloji (Çev: AYTEKİN Y., SOLAKOĞLU S., AHİŞHALI B.) syf: 407-419, 431-433, Barış kitabevi, 1998.

21. Jensch RP, Brent RL.: effects of prenatal X-irradiation on postnatal testicular development and function in the Wistar rat: development/teratology/behavior/radiation. *Teratology*, 38(5):443-9, 1988.
22. Jockenhövel F.: Hypogonadism and infertility as sequelae of general diseases and toxins. *Internist.(Berl)*, 34:741-755.1993.
23. Kangasniemi M., Huhtaniemi I., Meistrich M. L. : Failure of spermatogenesis to recover despite the presence of a spermatogonia in the irradiated LBNF1 rat. *Biology of reproduction*, 54:1200-1208, 1996..
24. Khan R. V., Brown I. R.: The effect of hyperthermia on the induction of cell death in brain, testis, thymus of the adult and developing rat. *Cell Stress Chaperones.*, 7(1):73-90, 2002
25. Koss L. G., Lipincott J. P. Chapter 36. pp. 1613-1657, 1992.
26. Liu FH, Yang DZ, Wang YF, Liang XP, Peng WM, Cao CA, Chen XG, Guo ZM: Making of the animal model with sterilized testes. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 13(2):125-9. 200
27. Lue YH., Hikim AP, Swerdloff RS., Im P., Taing KS., Bui T., Leung A., Wang C.: Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*, 140:1709-1717. 1999.
28. Lui W., Dolores M., Lee W. M., Cheng C. Y.: Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 68:1087-1097. 2003.
29. Lui W. Y., Wong C., Mruk D. H. D., Yan Cheng C.: TGF-  $\beta$ 3 regulates the blood-testis barrier dynamics via the p38 mitogen activated protein (MAP) kinase pathway: an in vivo study. *Endocrinology*, 144(4): 1139-42, 2003.
30. McGee J. O'D., Isaacson P.G., Wright N. A. *Oxford Textbook of Pathology, Vol 2b Pathology of systems Oxford University Press* P: 2333-2337, 1992.
31. Miraglia SM, Hayashi H.: Histomorphometry of immature rat testis after heating. *J Morphol.*, Jul;217(1):65-74, 1993



32. Montella A, Pirino A.: Morphological findings in cryptorchism in the adult male [Article in Italian]. *Boll Soc Ital Biol Sper.*, Mar;66(3):215-22, Abstract, 1990.
33. Moreno S. G., Dutrillaux B., Coffigny H.: High sensitivity of rat foetal germ cells to low dose-rate irradiation. *Int. J. Radiat. Biol*, 77(4), 529-538, 2001.
34. Moore C. R, Chase H. D.: Heat application and testicular degeneration. *Anat Rec.*, 26: 344-403, 1923.
35. Moore K. L , Persaud T. V. N.: İnsan embriyolojisi. 6. baskı, 2002.
36. Morales A, Mohamed F, Cavicchia JC.: Apoptosis and blood-testis barrier during the first spermatogenic wave in the pubertal rat. *Anat Rec (Hoboken)*. Feb;290(2):206-14, 2007.
37. Moroi S., Saitou M., Fujimoto K., Sakakibara A., Furuse M., Yoshido O., Tsukita S.: Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *Am J Physiol*. 274:1708-17. 1998.
38. Nieschlag E., Behre HM.: *Andrology Male Reproductive health and dysfunction..* Second Edition. Syf: 257-258.
39. Ohta Y., Nishikawa A., Fukazawa Y., Urushitani H., Matsuzawa A., Nishina Y., Iguchi T.: Apoptosis in adult mouse testis induced by experimental cryptorchidism. *Acta Anat (Basel)* 157:195-204. 1994
40. Oliviera H., Loureiro J., Filipe L., Santos C., Ramalho-Santos J., Sousa M., Pereira M.: Flow cytometry evaluation of lead and cadmium effects on mouse spermatogenesis. *Reproductive Toxicology*, 22:529-535. 2006.
41. Otto FJ, Hacker U, Zante J, Schumann J, Göhde W, Meistrich ML.: Flow cytometry of human spermatozoa. *Histochemistry*, Jul 11;61(3):249-54, 1979
42. Quirke P. and Dyson J. E. D. Flow cytometry: methodology and applications in pathology. *Journal of Pathology*, 149; 79-87, 1986.
43. Pelletier R. M., Okawara Y., Vitale M.L., Anderson J.M.: Differential distribution of the tight junction associated protein ZO-1 isoforms  $\alpha^+$  and  $\alpha^-$  in Guinea pig Sertoli cell: a possible association with F-actin and G-actin. *Biology of reproduction* 57: 367-376. 1997

44. Ribeiro A. F., David-Ferreira J. F.: The Inter-Sertoli Cell Tight Junctions In Germ Cell-Free Seminiferous Tubules From Prenatally Irradiated Rats: A Freeze-Fracture Study. *Cell Biol Int.*, Jul;20(7):513-22, 1996
45. Rockett J. C., Mapp F. L., Garges J. B., Luft J.C., Mori C., Dix D.J. : Effect of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression and fertility in adult male mice. *Biology of Reproduction.*: 65, 229-239, 2001.
46. Ross H.M., Romrell J.L.: *Histology: A text and atlas. Section 21: Male reproductive system.* 2nd edition. Syf: 603-625.
47. Rowley M.J., Leach D.R., Warner G.A., Heller C.G. Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis. *Radiat Res.*, 59:665-678. 1974.
48. Sgonc R., Wick G.: Methods for the detection of apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 105: 327, 1994.
49. Siu M. K. Y., Cheng C. Y.: Extracellular matrix: Recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous during spermatogenesis. *Biology of reproduction.* 71: 375-391. 2004.
50. Xu D, Qin D.N, Wang Y, Zhuang C.X, Li W.Q.: Effect of local testicular heating on spermatogenic cell apoptosis in rat. (Abst). *Zhonghua Nan Ke Xue.* Jun;9(3):170-4. 2003.
51. Yang H.S., Han D.K., Kim J.R., Sim J.C.: Effects of  $\alpha$ -tocopherol on cadmium-induced toxicity in rat testis and spermatogenesis. (Abst) *J. Korean Med Sci.* 21:445-51. 2006.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

Ad, Soyad : Gözde Erkanlı  
Doğum Tarihi : 04, Temmuz, 1978  
Doğum Yeri : İstanbul / Türkiye  
Uyruğu : T.C./ 44455258906  
Adres : Ataköy 5. Kısım C/4 D:4 PK: 34750 Bakırköy/İstanbul  
Telefon : Ev: 0212 5595675 Cep: 0532 4678333

## EĞİTİM ve MESLEKİ DENEYİM

1983-1988 : Hamdullah Suphi Tanrıöver İlkokulu, İstanbul / Türkiye  
1988-1989 : Özel Şener Lisesi, Hazırlık sınıfı (yabancı dil: İngilizce, ikinci yabancı dil: Almanca), İstanbul / Türkiye  
1989-1994 : Özel Şener Lisesi, İstanbul / Türkiye  
1994-1995 : Ataköy Lisesi, İstanbul / Türkiye  
1996-2000 : İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü, Lisans, İstanbul / Türkiye  
2000- 2002 : Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Tüp Bebek Merkezi, Embriyoloji ve Androloji laboratuvarı  
2000-2002 : Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, İstanbul  
2002-.... : Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora, İstanbul  
2005 : T.C. Sağlık Bakanlığı ÜYTE (Tüp Bebek) Sertifikası  
2006-.... : Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tüp Bebek Merkezi, Embriyoloji ve Androloji Sorumlusu  
2007 : New England Fertility Center, Boston, USA

## **YABANCI DİLLER:**

İngilizce : İyi derecede

## **TEZ KONULARI:**

**Yüksek Lisans:** Kainik asit uygulamasından sonra yavru ve yetişkin sıçanların hipokampusunda bazik fibroblast büyüme faktörünün dağılımı: İmmünohistokimyasal çalışma.

**Doktora:** In Utero Radyasyon Ve Postnatal Hipertermi Uygulamasının Sıçan Testis Morfolojisi, Hücre Ölümü Ve Kan-Testis Bariyeri Üzerine Etkileri: İnfertilite Açısından Değerlendirme

## **KURSLAR:**

18 Şubat-2 Mart 2002 : Moleküler Biyoloji ve Genetikteki Güncel Temel Uygulamalar Kursu, Marmara Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

16 Nisan 2003 : Course in Epilepsy From basic to Clinical Sciences  
Uludağ üniversitesi, Bursa, Türkiye

29 Mayıs-1 Haziran 2003 : Uygulamalı Steroloji Kursu  
Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye

7-9 Mayıs 2004 : Gamet ve Somatik hücre manipülasyon teknikleri ve embriyonik kök hücrelerin tanımlanması Kursu

Memorial Hastanesi, İstanbul, Türkiye

5-9 Temmuz 2004 : III. Ege Biennial International Neuroscience Graduate Summer School  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye

20 Kasım 2004 : Clinical Epileptology Workshop  
Eastern Mediterranean Epilepsy Academy, Marakeş, Fas

9 Nisan 2005 :Sperm Hazırlama ve İnseminasyon Kursu  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

18-21 Temmuz 2005 :VII. Stereolojik Metotlar ve Uygulamaları Kursu  
İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

13 Aralık 2005 :Deney Hayvanı Kullanımı ve Etik Yaklaşım Kursu  
Marmara Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

16-17 Şubat 2006 :I. International Workshop on Current Techniques and  
Future Trends of Gamete and embryo Manipulation, İstanbul, Türkiye

13-14 Mayıs 2006 :İleri Işık Mikroskopi Kursu, Ankara Üniversitesi,  
Ankara,Türkiye

27 Ekim - 6 Kasım 2006 :VIII. Stereolojik Metotlar ve Uygulamaları Kursu  
Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye

1-30 Temmuz 2006 : Fertility Center of New England,  
Tüp Bebek Merkezi, Embriyoloji ve Androloji  
Laboratuvarı, Boston, ABD

### **KONGRELER:**

Pre- ve post-Konsepsiyonel Yeni Genetik Yaklaşımlar Sempozyumu  
: 5 Ocak 2000, İstanbul Cerrahi Hastanesi, İstanbul,  
Türkiye

I.Ulusal Sinirbilimleri Kongresi : 16-20 Mart 2002, Eskişehir, Türkiye

II. Ulusal IVF Sempozyumu : 4-27 Nisan 2002, Ankara,  
Türkiye

VI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi : 12-15 Eylül 2002, İstanbul, Türkiye

V. European Congress on Epileptology : 6-10 Eylül 2002, Madrid, İspanya  
(V. Avrupa Epilepsi Kongresi)

II. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi : 16-20 Nisan 2003, Bursa,  
Türkiye

II. İn Vitro Seminerleri :16-18 Nisan 2004, Bolu, Türkiye

I. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre  
ve Gen Tedavisi Kongresi : 7-9 Mayıs 2004, İstanbul, Türkiye

VII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi :18-21 Mayıs 2004, Mersin, Türkiye

VIII. Mediterranean Epilepsy Congress : 17-10 Kasım 2004, Marakeş, Fas

Cerrahpaşa Tüp Bebek Günleri  
“Üremeye Yardımcı Tedaviler” : 8 Nisan 2005, İstanbul, Türkiye

Kök Hücre ve Hücre Tedavilerindeki Yenilikler  
Acıbadem-Harvard Tıp Günleri : 21-22 Nisan 2005, İstanbul,  
Türkiye :

13. World Congress on In Vitro Fertilization  
Assisted reproduction & Genetics : 26-29 Mayıs 2005, İstanbul,  
Türkiye

Uluslararası Katılımlı  
17. Ulusal Elektron Mikroskobu Kongresi : 22-24 Haziran 2005, İstanbul, Türkiye

8. Congress of the European Association  
of Clinical Anatomy : 30 Haziran-3 Temmuz 2005, Palermo, İtalya

4. Asian-Pasific International Congress  
of Anatomists : 7-10 Eylül 2005, Kuşadası, Türkiye

8. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi : 27-30 Haziran 2006, Malatya, Türkiye

Focus on Microscopy Kongresi : 10-13 Nisan 2007, Valencia,  
İspanya

## **YAYINLAR:**

### ***ULUSLARASI YAYINLAR:***

1. Akbal C, Türker P, Ozyürek M, Erkanlı G, Şimşek F, Türkeri L. A New Cause of Male Infertility After Cisplatin Exposure: The Effect of Cisplatin on Y Chromosomes. Urology. 2008 Apr 11.
2. Erkanlı G, Ercan F, Sirvancı S, Yananlı HR, Onat F, San T. Time-dependent changes in distribution of basic fibroblast growth factor immunoreactive cells in rat hippocampus after status epilepticus. Neurol Res. 2007 Dec;29(8): 816-23.
3. Erkanlı G, Ercan F, Sirvancı S, Salık E, Yananlı HR, Onat F, San T. Time-dependent changes in distribution of basic fibroblast growth factor



immunoreactive cells in hippocampus after kainic acid injection in rat pups. *Int J Dev Neurosci.* 2007 Oct;25(6): 399-407. Epub 2007 Jun 27.

4. Toklu HZ, Tunali-Akbay T, Erkanli G, Yüksel M, Ercan F, Sener G. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, protects against burn-induced oxidative skin injury. *Burns.* 2007 Nov;33(7): 908-16. Epub 2007 May 22.
5. Jahovic N, Erkanli G, Işeri S, Arbak S, Alican I. Gastric protection by alpha-melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: involvement of somatostatin. *Life Sci.* 2007 Feb 20;80(11): 1040-5. Epub 2006 Nov 28.
6. Sener G, Sehirli O, Velioglu-Oğünç A, Ercan F, Erkanli G, Gedik N, Yeğen BC. Propylthiouracil (PTU)-induced hypothyroidism alleviates burn-induced multiple organ injury. *Burns.* 2006 Sep;32(6): 728-36. Epub 2006 Aug 22.
7. Erkanli K., Kayalar N., Erkanli G., Ercan F., Goksel Ş., Kırallı K. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Pineal Res.* 2005 Oct;39(3): 238-242.
8. Sener G., Toklu H., Ercan F., Erkanli G. Protective effect of beta-glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Int Immunopharmacol.* 2005 Aug;5(9): 1387-96. Epub 2005 Apr 9.
9. Çevik H., Erkanli G., Ercan F., İşman C.A., Yeğen B. Exposure to continuous darkness ameliorates gastric and colonic inflammation in the rat: both receptor and non-receptor-mediated processes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Feb;20(2): 294-303.
10. Şener G., Çetinel Ş., Erkanli G., Gedik N., Yeğen B. Octreotide ameliorates sepsis-induced pelvic inflammation in female rats by a neutrophil-dependent mechanism. *Peptides.* 2005 Mar;26(3): 493-9.
11. Şener G., Toklu H., Kapucu C., Ercan F., Erkanli G., Kaçmaz A., Tilki M., Yeğen B. Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today.* 2005;35(1): 52-9.
12. Sakarcı A, Sehirli O, Velioglu-Ovunc A, Ercan F, Erkanli G, Gedik N, Sener G. Ginkgo biloba extract improves oxidative organ damage in a rat model of thermal trauma. *J Burn Care Rehabil.* 2005 Nov-Dec;26(6): 515-24.
13. Şener G., Sehirli Ö., Erkanli G., Çetinel Ş., Gedik N., Yeğen B. 2-Mercaptoethane sulfonate (MESNA) protects against burn-induced renal injury in rats. *Burns.* 2004 Sep;30(6): 557-64.

*ULUSAL YAYINLAR:*

G.Erkanlı , F.Ercan, S.Şirvanci, E.Salık, T.San, H.Yananlı F.Onat.

Kainik asit uygulamasından sonra yavru ve yetişkin sıçanların hipokampusunda bazik fibroblast büyüme faktörünün dağılımı: İmmünohistokimyasal çalışma. (Distribution of basic fibroblast growth factor after kainic acid injection in young and adult rats: An immunohistochemical study). Epilepsi, Cilt 8, Sayı 3, syf: 139-146: 2002.

*SUNUMLAR:*

*SÖZLÜ SUNULAR:*

*ULUSLARARASI KONGRELER:*

1- Time dependent changes in distribution of basic fibroblast growth factor in young and adult rat hippocampus after kainic acid injection: an immunohistochemical study. G.Erkanlı, E.Salık, F.Ercan, S.Şirvanci, F.Onat, T.San. V. European Congress on Epileptology, 6-10 Eylül 2002, Madrid, Spain, Abstract Book: P189.

2- The distribution of basic fibroblast growth factor immunoreactive cells in human hippocampus with temporal lobe epilepsy: A preliminary study. G. Erkanlı, F. Ercan, S. Şirvancı, M. Uzan, Ç. Özkara, F. Onat, E. Özyurt, N. Yeni, T. Şan. 8<sup>th</sup>. Mediterranean Epilepsy Conference, Marrakech, Morocco, 17-20 Kasım 2004.

*ULUSAL KONGRELER:*

1- Kainik asit uygulamasından 90 gün sonra yavru ve yetişkin sıçanların hipokampusunda bazik fibroblast büyüme faktörünün lokalizasyonu: immunohistokimyasal çalışma. G.Erkanlı, E.Salık, F.Ercan, S.Şirvanci, F.Onat, T.San. VI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 12-15 Eylül 2002, İstanbul, Türkiye, Özet Kitabı, Syf:110

**POSTER SUNUMLARI:**

**ULUSLARARASI KONGRELER:**

1- Time dependent changes in distribution of basic fibroblast growth factor in young and adult rat hippocampus after kainic acid injection: an immunohistochemical study. G.Erkanlı, E.Salık, F.Ercan, S.Şirvanci, F.Onat, T.San. V. European Congress on Epileptology, 6-10 Eylül (October) 2002, Madrid, Spain.

2- Burn-induced hepatic and intestinal injury is prevented by propylthiouracil (PTU) induced hypothyroidism. G. Şener, Ö. Şehirli, A. Velioğlu-Öğünç, F. Ercan, N.Gedik, B. Yeğen. European Congress of Endocrinology, 3-7 Kasım 2005, Götoborg, İsviçre, Özet Kitabı: Syf: 183.

3- Sıçanda etanole bağlı mide hasarında  $\alpha$ -melanosit stimulan hormonun etkisi ve bu etkiye aracılık eden mekanizma. N. Mahovich, G. Erkanlı, S. Arbak, İ. Alican. 8. Congress of the European Association of Clinical Anatomy, 30 Haziran-3 Temmuz 2005, Palermo, İtalya, Özet Kitabı: Syf: 65

4- Development of hippocampal sclerosis in rats exposed to In utero irradiation and postnatal hypertermia Uzan M , Erkanlı G , Sirvanci S , Ercan F , Onat F , Ozkara C. , Kemerdere R., Isler C. , Ulu O. , Ozkaynakci A. VI. European Congress on Epileptology, 1-4 Temmuz 2006, Helsinki, Özet Kitabı:145

5- Observation Of Testical Changes In Experimentally In Utero Irradiation And Hypertemia Induced Infertility Model In Rats. G.Erkanlı, F.Ercan. Congress of Focus on Microscopy, 10-13 Nisan 2007, Valencia, İspanya

6- A New Cause of Male Infertility after Cisplatin Exposure: The Effect of Cisplatin on Y Chromosomes. Cem Akbal, Polat Turker, Mustafa Ozyurek, Gozde Erkanlı, Ferruh Simsek, Levent Turkeri. AUA Annual Meeting, 17-22 Mayıs 2008, Orlanda, Florida, USA.

**ULUSAL KONGRELER:**

1- Kainik asit enjeksiyonu yapılmış yavru ve yetişkin sıçanların hipokampusunda bazik fibroblast büyüme faktörünün dağılımı: immünohistokimyasal çalışma. (Distribution of basic fibroblast growth factor in kainic acid treated young and adult rats: An immunohistochemical study). G.Erkanlı, E.Salık, F.Ercan, S.Şirvanci, F.Onat, T.San. 1.Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 16-20 Mart 2002, Eskişehir, Türkiye. Özet Kitabı, P:37.

2- Kainik asit uygulamasından 30 gün sonra yavru ve yetişkin sıçanların hipokampusunda bazik fibroblast büyüme faktörünün immünohistokimyasal lokalizasyonu. (Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in the hippocampus of immature and adult rats 30 days after administration of kainic acid.) G.Erkanlı, E.Salık, F.Ercan, S.Şirvanci, F.Onat, T.San. 3. Ulusal Epilepsi Kongresi, 8-13 Haziran 2002, Trabzon, Türkiye, Özet Kitabı, P:2

3- Kainik asit enjeksiyonundan sonra yavru ve yetişkin sıçanların hipokampusunda ki zamana bağlı morfolojik değişiklikler. (Time-dependent morphological changes in young and adult rat hippocampus after kainic acid injection.) G. Erkanlı, F. Ercan, S. Şirvanci, E. Salık, Hasan Raci Yananlı, Filiz Onat, Tanguil San. II. Ulusal Nörobilim Kongresi, 16-20 Nisan 2003, Bursa, Türkiye, Neuroanatomy Dergisi, Özet Kitabı, Syf:14

4- Sürekli karanlıkta tutulmuş sıçanlarda gastrik ve kolonik inflamasyonda iyileşme gözlenmektedir. Çevik H., Erkanlı G., İşman Ç.A., Yeğen B.Ç., Ercan F. Uluslararası katılımlı 16. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2-5 Eylül 2003, İzmir, Türkiye, Özet Kitabı, Syf:121.

5- Sepsise bağlı oksidan doku hasarında melatoninin koruyucu etkisi. G. Şener, H.Z.Toklu, C.Kopucu, F.Ercan, G.Erkanlı, A.Kaçmaz, M.Tilki, B.Ç.Yeğen. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 29. Ulusal Kongresi, 1-5 Eylül 2003, Ankara, Türkiye, Özet Kitabı, Syf:151

6- Sıçanlarda sepsise bağlı kardiyopulmoner oksidan hasarda melatoninin koruyucu etkisi. G. Şener, H.Z.Toklu, A.Kaçmaz, F.Ercan, G.Erkanlı, B.Ç.Yeğen. Türk Farmakoloji Derneği 17. Ulusal Farmakoloji Derneği, 1. Klinik Farmakoloji Sempozyumu, 17-21 Ekim 2003, Antalya, Türkiye, Özet Kitabı, Syf:157.

7- Sepsise bağlı oksidan doku hasarında  $\beta$ -glukanın koruyucu etkisi. H.Z.Toklu, K. Paskaloğlu, G.Erkanlı, F.Ercan, G. Şener. Türk Farmakoloji Derneği 17. Ulusal Farmakoloji Derneği, 1. Klinik Farmakoloji Sempozyumu, 17-21 Ekim 2003, Antalya, Türkiye, Özet Kitabı, Syf:158.

8- Whey powder protects against gastric and hepatic oxidative damage in ethanol induced gastric injury. A. Velioglu-Öğünç, N. Jahovic, E. Güzel, D. Ars, F. Ercan, G. Erkanlı, S. Yalçın, B. Yeğen.18. Ulusal Biyokimya Kongresi, 15-19 Mayıs 2004, Trabzon, Türkiye. Turkish Journal of Biochemistry Syf:62

9- Sıçanda etanole bağlı mide hasarında  $\alpha$ -melanosit stimulan hormonun etkisi ve bu etkiye aracılık eden mekanizma. N. Mahovich, G. Erkanlı, S. Arbak, İ. Alican.30. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 30 Ağustos-3 Eylül 2004, Konya, Türkiye, ÖzetKitabı syf: 42.

10- Morphological changes in hippocampus of rat exposed to in utero radiation and postnatal febrile convulsions: a preliminary study. G. Erkanlı, S. Şirvancı, F. Ercan, T. Şan, AE. Özkaynakçı, F. Onat, Ç. Özkara, R. Kemerdere, C. İşler, O. Ulu, B. Öz, M. Uzan. 4<sup>th</sup>. National Congress of Neuroscience, Mersin, 29 Mart- 2 Nisan 2005, Neuroanatomy, 4 (Suppl. 1): 18, 2005.

11- Sıçanda yanığa bağlı uzak doku hasarında gingelişen karaciğer ve ince barsak hasarında Ginkgo biloba ekstresinin koruyucu etkisi. G. Şener, Ö. Şehirli, A. Veliöglu-Öğünç, F. Ercan, G. Erkanlı, N. Gedik. IV.serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği Ulusal Kongresi, 9-12 Mayıs 2005, Antalya, P:24

12- Sıçanda yanığa bağlı gelişen karaciğer ve ince barsak hasarında propiltiyourasil ile oluşturulan hipotrioidizmin koruyucu tekisi. G. Şener, Ö. Şehirli, A. Veliöglu-Öğünç, F. Ercan, G. Erkanlı, N. Gedik, B. Yeğen. IV.serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği Ulusal Kongresi, 9-12 Mayıs 2005, Antalya, P:25

13- *Silybum Marianum* un Antioksidan Elemanı Olan Silmarin'in Yanık- İndüklü Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Etkisi. G. Erkanlı, F. Ercan, H. Z. Toklu, G. Şener. 8. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi, 27-30 Haziran, Malatya, Özet Kitabı:..

14- Sıçanlarda Tnbs İle Oluşturulan Kolitte Ginkgo Biloba'nın Koruyucu Etkisi: Doku Nötrofillerinin Rolü. S. Ö. İşeri, G. Şener, G. Erkanlı, F. Ercan, B. Ç. Yeğen. 8. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi, 27-30 Haziran, Malatya, Özet Kitabı:12

## **PROJELER**

1- 'Metimazol ile sıçanlarda oluşturulan deneysel hipotiroidizm modelinin ve sürekli karanlığın mide ve kolon inflamasyonu üzerindeki koruyucu etkisi'  
Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu  
Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Berrak Ç. Yeğen  
Proje No: HEA-049/050901

2- 'In Utero Radyasyon Ve Postnatal Febril Konvulziyon İle Deneysel Epilepsı Modeli Geliştirilen Sıçanlarda Hipokampal Nöron Hasarı'  
İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu  
Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Çiğdem Özkara

3- 'In utero radyasyon ve hipertermi ile deneysel epilepsi geliştirilmiş sıçanların hipokampusunda görülen değişiklikler: Morfometrik Çalışma'  
Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu  
Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Feriha Ercan

4- 'GAERs sıçanların hipokampusunde G-6 P dehidrogenezin değişimi: histokimyasal çalışma'  
Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu

Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Serap Arbak  
Proje No: 066/131102

### **BURSLAR ve ÖDÜLLER:**

6-10 Eylül 2002, Madrid, İspanya, V. Avrupa Epilepsi Kongresi' ne katılım bursu. Bursiyerler arasından 5 kişiye tanınan "bursary awards symposium" unda sözlü sunu hakkını kazandım.

14 Aralık 2003, 6. Marmara Üniversitesi Yüksek Lisans ve Doktora Günleri 'nde başarı ödülü

### **HOBİLER ve SOSYAL ÜYELİKLER**

Scuba (\*\*2 dalgıçlık brövesi) , Voleybol, Tenis.

Türk Elektron Mikroskopi Derneği Üyeliği  
Histoloji-Embriyoloji Derneği Üyeliği  
Beyin Araştırmaları Derneği Üyeliği  
Yeşilyurt Spor Klubü Asil Üyeliği



## 10. ETİK KURUL ONAYI



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
DENEY HAYVANLARI ARAŞTIRMA ETİK KURULU  
PROJE ONAY FORMU**

**PROJENİN ADI** : In utero radyasyon ve hipertermi uygulanmış sıçanların hipokampus ve testisinde görülen morfolojik değişiklikler.

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ** : Doç. Dr. Feriha ERCAN

**PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR** : Tıb.Bio. Gözde ERKANLI- Uzm.Dr. Serap ŞİRVANCI-Doç.Dr. Mustafa UZAN- Prof. Dr. Çiğdem ÖZKARA- Prof.Dr. Filiz ONAT

**PROJENİN YÜRÜTÜLECEĞİ LABORATUVAR** : M.Ü Tıp Fak. Histoloji-Embriyoloji ABD

**ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI** : 23.11.2006- 40.2005.mar

Sayın : Doç. Dr. Feriha ERCAN

Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'na "In utero radyasyon ve hipertermi uygulanmış sıçanların hipokampus ve testisinde görülen morfolojik değişiklikler." isimli proje ile yapmış olduğunuz başvurunuz, "Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu" tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Çalışmalarınızda başarılar dileriz.

Doç. Dr. Zafer GÖREN  
Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu  
Genel Sekreteri

### Fikir Belirtenler

Prof. Dr. Özdemir AKTAN  
Prof. Dr. Berrak YEĞEN  
Doç. Dr. Zafer GÖREN  
Öğr. Gör. Gürkan SERT  
Vet.Hek. Dilek ÖZBEYLİ

Not: Deneylerin yapılması sırasında ortaya çıkan zorluklar, deney protokolünde yapılması gereken değişiklikler, "Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'na" bildirilmelidir. Bütün yazışmalarda, proje onay tarihi ve onay sayısı belirtilmelidir. Araştırmacıların proje ile yapılan bütün yazışmalarda proje onay tarih ve numarası