

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU TESTİS
HASARINDA APOCYNİN'İN ETKİLERİNİN
HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

MERVE TATLI

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2014970166

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU TESTİS
HASARINDA APOCYNİN'İN ETKİLERİNİN
HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ


YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE TATLI


Danışman Öğretim Üyesi : Doç. Dr. Seda ÖZBAL

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2014970166


Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Merve TATLI ‘RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU TESTİS HASARINDA APOCYNİN’İN ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ’ konulu Yüksek Lisans tezini **28.06.2018** tarihinde başarılı/~~başarısız~~ olarak tamamlamıştır.


Doç. Dr. Seda ÖZBAL
BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR
ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi


Doç. Dr. Selen BAHÇECİ
ÜYE

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Prof. Dr. Kazım TUĞYAN
YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Meltem KURUŞ
YEDEK ÜYE

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	vi
KISALTMALAR.....	x
TEŞEKKÜRLER	xii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Erkek Genital Sistemi.....	7
2.1.1. Erkek Genital Sisteminin Gelişimi	7
2.1.1.1. Kromozomal Cinsiyet Belirlenmesi	7
2.1.1.2. Cinsiyet Belirlenmesinin Mekanizmaları	9
2.1.2. Testis.....	12
2.1.2.1. Testis Embriyolojisi	12
2.1.2.2. Testis Anatomisi	14
2.1.2.3. Testis Fizyolojisi	15
2.1.2.4. Testis Histolojisi	17
2.1.2.4.1. Seminifer Tübül Histolojisi	19
2.1.2.4.1.1. Sertoli Hücreleri	20
2.1.2.4.1.2. Spermatogenik Seri Hücreler	25
2.1.2.4.1.2.1. Spermatogonium	26
2.1.2.4.1.2.2. Primer Spermatozoid	27
2.1.2.4.1.2.3. Sekonder Spermatozoid	27
2.1.2.4.1.2.4. Spermatid.....	27
2.1.2.4.2. İnterstisyel Bağ Doku.....	32
2.1.2.4.2.1. Leydig Hücreleri	32
2.1.3. Erkek Genital Boşaltım Kanalları.....	34
2.1.4. Penis Histolojisi.....	40
2.1.5. Yardımcı Üreme Bezleri	41
2.2. Radyasyon	44
2.2.1. Radyasyon Birimleri	44

2.2.2.	İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri	45
2.2.3.	Radyasyonun Testis Üzerindeki Etkileri	46
2.3.	Reaktif Oksijen Radikalleri (ROS).....	47
2.3.1.	Reaktif Oksijen Radikallerinin Etkileri	49
2.4.	Antioksidan Savunma Sistemi	50
2.5.	Apoptoz	51
2.5.1.	Apoptozun Temel İşlevleri	52
2.5.2.	Apoptozun Morfolojisi.....	52
2.5.3.	Apoptozun Mekanizmaları ve Düzenlenmesi	53
2.6.	Apocynin.....	55
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	57
3.1.	Araştırmanın Tipi	57
3.2.	Araştırmanın Yeri ve Zamanı	57
3.3.	Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	57
3.4.	Çalışma Materyali.....	59
3.5.	Araştırmanın Değişkenleri	59
3.6.	Veri Toplama Araçları.....	59
3.6.1.	Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler	59
3.6.2.	Araştırmada Kullanılan Yöntemler	59
3.6.3.	Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	60
3.6.4.	Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	60
3.6.5.	Histolojik Değerlendirmeler	60
3.6.5.1.	Işık Mikroskopik İncelemeler	61
3.6.5.1.1.	Hematoksilen&Eozin Boyama Yöntemi.....	61
3.6.5.1.2.	Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Yöntemi.....	62
3.6.5.1.3.	Masson Trikrom Boyama Yöntemi	63
3.6.6.	Morfometrik Değerlendirmeler	64
3.6.6.1.	Johnsen's Testiküler Biyopsi Skoruması	64
3.6.6.2.	Seminifer Tübül Çap Ölçümü	65
3.6.6.3.	Seminifer Tübül Epitel Yükseklik Ölçümü	65
3.6.6.4.	Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlık Ölçümü	66
3.6.7.	İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler	66
3.6.7.1.	TUNEL Reaksiyonu	66
3.6.7.2.	Aktive Kaspaz-3 İmmunreaktivitesi	68

3.6.7.3.	ZO-1 İmmunreaktivitesi	70
3.6.7.4.	Occludin İmmunreaktivitesi.....	72
3.6.8.	Elektron Mikroskopik İncelemeler.....	75
3.6.9.	Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	76
3.6.9.1.	Gpx Aktivitesinin Ölçümü	76
3.6.9.2.	Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü.....	77
3.6.9.3.	MDA Değerlerinin Saptanması	77
3.6.9.4.	Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	77
3.7.	Araştırma Planı ve Takvimi	78
3.8.	Verilerin Değerlendirilmesi	79
3.9.	Araştırmanın Sınırlılıkları	79
3.10.	Etik Kurul Onayı	79
4.	BULGULAR	80
4.1.	Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	80
4.2.	Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	81
4.3.	Histokimyasal Bulgular	82
4.3.1.	Işık Mikroskopik Bulgular.....	82
4.3.1.1.	Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama Değerlendirmesi.....	82
4.3.1.2.	Periyodik Asit-Schiff (PAS) Boyama Değerlendirmesi.....	85
4.3.1.3.	Masson Trikrom Boyama Değerlendirmesi	88
4.4.	Morfometrik Bulgular.....	92
4.4.1.	Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması	92
4.4.2.	Seminifer Tübül Çaplarının Değerlendirilmesi.....	93
4.4.3.	Seminifer Tübül Epitel Yüksekliğinin Değerlendirilmesi	94
4.4.4.	Bazal Membran Ölçümlerinin Değerlendirilmesi	95
4.5.	İmmunohistokimyasal Bulgular.....	96
4.5.1.	TUNEL Boyama Bulguları	96
4.5.2.	Aktive Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulgular	100
4.5.3.	ZO-1 İmmunohistokimyasal Bulguları	104
4.5.4.	Occludin İmmunohistokimyasal Bulgular	107
4.6.	Elektron Mikroskopik Bulgular	111
4.7.	Biyokimyasal Bulgular	114
4.7.1.	Glutatyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	114
4.7.2.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Değerlendirilmesi	115

4.7.3.	Malondialdehit (MDA) Seviyelerinin Değerlendirilmesi	116
5.	TARTIŞMA.....	117
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	126
7.	KAYNAKLAR	127
8.	EKLER.....	135
8.1.	Ek-1 Etik Kurul Belgesi.....	135
8.2.	Ek-2 Özgeçmiş	136



TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Deney hayvanı grupları	57
Tablo 2: Doku takip protokolü	60
Tablo 3: Hematoksilen&eoziin boyama protokolü	61
Tablo 4: Periyodik asit schiff (PAS) boyama protokolü	62
Tablo 5: Masson trikrom boyama protokolü	63
Tablo 6 : Johnsen's testiküler biyopsi skorlaması (71)	65
Tablo 7 : TUNEL boyama protokolü	67
Tablo 8 : Aktive Kaspaz-3 immun boyama protokolü	69
Tablo 9 : ZO-1 immun boyama protokolü	71
Tablo 10 : Occludin immun boyama protokolü.....	73
Tablo 11 : Elektron mikroskobu doku takip protokolü	75

SEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Erkek üreme sistemi şematik diyagramı	7
Şekil 2: Dişi ve erkek karyotipleri	8
Şekil 3: Memelilerde cinsiyet belirlenmesinin genel şeması.....	9
Şekil 4: Primer cinsiyet belirlenmesinin başlatılması ile ilgili mekanizmalar	10
Şekil 5 : Gonadal kabartıların lokalizasyonu	12
Şekil 6 : Seminifer kordonların ve tunika albugineanın şematik görüntüsü	13
Şekil 7: Spermatik kordonunun histolojik görüntüsü	15
Şekil 8: Testiküler fonksiyonun hormonal düzenlenmesi	16
Şekil 9: Leydig hücresinden testosteron sentezinin şematik çizimi	17
Şekil 10: Testiküler kapsülün anatomik ve histolojik görüntüsü	18
Şekil 11: Testisin histolojik görüntüsü	19
Şekil 12 : Seminifer tübülün histolojik görüntüsü	20
Şekil 13: Seminifer tübülde sertoli hücreleri (SC)	20
Şekil 14: Sertoli hücresinin elektron mikroskopik görüntüsü	21
Şekil 15: Sertoli-sertoli hücre bağlantısını gösteren elektron mikroskopik görüntü	22
Şekil 16: Sertoli-sertoli arası sıkı bağlantı komplekslerini gösteren şematik görüntü	23
Şekil 17 : Seminifer epiteldeki bağlantı komplekslerini gösteren şematik görüntü	24
Şekil 18: Spermatogonik hücre serisini gösteren şematik diyagram	26
Şekil 19: Seminifer tübülde spermatogonyumların şematik çizimi	27
Şekil 20: Mitoz ve mayoz evrelerinin karşılaştırılması	28
Şekil 21: Spermiojenezin şematik gösterimi	30
Şekil 22: Matür spermin yapısı	31
Şekil 23: Seminifer tübülün intersitisyel bağ doku görüntüsü	32
Şekil 24: Reinke kristallerinin elektron mikroskopik görüntüsü	33
Şekil 25: Erkek genital boşaltım kanalları	34
Şekil 26: Tubuli rektinin histolojik kesitte görüntüsü	35
Şekil 27: Rete testisin histolojik görüntüsü	35
Şekil 28 : Duktuli efferentesin histolojik görüntüsü	36
Şekil 29: Epididimisin kısımları	36
Şekil 30: İnsan duktus epididimisinin histolojik görüntüsü	37
Şekil 31: Duktus deferensin histolojik görüntüsü	37

Şekil 32: Ampulla duktus deferensin histolojik görüntüsü	38
Şekil 33: Duktus ejakulatoryusun histolojik görüntüsü	38
Şekil 34: Üretranın kısımlarının şematik görüntüsü.....	39
Şekil 35: Penil üretranın histolojik görüntüsü	39
Şekil 36: Penisin histolojik görüntüsü.....	40
Şekil 37: Korpus kavernozumun histolojik görüntüsü	40
Şekil 38 : Korpus spongiyozumun histolojik görüntüsü	41
Şekil 39: Erkek yardımcı üreme bezlerinin makroskopik olarak şematik görüntüsü	41
Şekil 40 : Vezikula seminalisin histolojik görüntüsü	42
Şekil 41: İnsan prostat bezinin zonları gösteren şematik diyagram	42
Şekil 42: İnsan prostat bezinin histolojik görüntüsü (Mallory azan-H&E)	43
Şekil 43: İnsan bulboüretal bezinin histolojik görüntüsü.....	43
Şekil 44 : Deneklere skrotal radyasyon uygulanması.....	58
Şekil 45: Grupların deney başlangıcı ve deney sonundaki ağırlık ortalamaları.....	80
Şekil 46 : Grupların testis ağırlık ortalamaları	81
Şekil 47 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (H&E)	83
Şekil 48 : Sham grubuna ait testis kesiti (H&E)	83
Şekil 49 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (H&E).....	84
Şekil 50 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (H&E).....	84
Şekil 51 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (H&E)	85
Şekil 52 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (PAS)	86
Şekil 53 : Sham grubuna ait testis kesiti (PAS)	86
Şekil 54 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (PAS).....	87
Şekil 55 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (PAS).....	87
Şekil 56 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (PAS)	88
Şekil 57 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (Masson Trikrom).....	89
Şekil 58: Sham grubuna ait testis kesiti (Masson Trikrom)	89
Şekil 59 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (Masson Trikrom)	90
Şekil 60 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (Masson Trikrom)	90
Şekil 61 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (Masson Trikrom)	91
Şekil 62 : Grupların Johnsen Testiküler Biyopsi skor ortalamaları.....	92
Şekil 63 : Gruplara ait seminifer tübül çap ortalamaları	93

Şekil 64 : Grupların germinal epitel kalınlık ortalamaları.....	94
Şekil 65 : Gruplara ait bazal membran kalınlık ortalamaları.....	95
Şekil 66 : Gruplara ait TUNEL pozitif hücre sayısı	96
Şekil 67 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (TUNEL).....	97
Şekil 68 : Sham grubuna ait testis kesiti (TUNEL)	98
Şekil 69 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (TUNEL)	98
Şekil 70 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (TUNEL)	99
Şekil 71 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (TUNEL)	99
Şekil 72 : Gruplara ait aktive kaspaz-3 immunreaktivite skorları.....	100
Şekil 73 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (Aktive kaspaz-3)	101
Şekil 74 : Sham grubuna ait testis kesiti (Aktive kaspaz-3)	102
Şekil 75 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (Aktive kaspaz-3)	102
Şekil 76 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (Aktive kaspaz-3)	103
Şekil 77 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (Aktive kaspaz-3)	103
Şekil 78 : Gruplara ait ZO-1 immunreaktivite skorları	104
Şekil 79 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (ZO-1).....	105
Şekil 80 : Sham grubuna ait testis kesiti (ZO-1)	105
Şekil 81 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (ZO-1)	106
Şekil 82 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (ZO-1)	106
Şekil 83 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (ZO-1)	107
Şekil 84 : Gruplara ait occludin immunreaktivite skorları	108
Şekil 85 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (Occludin).....	108
Şekil 86 : Sham grubuna ait testis kesiti (Occludin)	109
Şekil 87 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (Occludin)	109
Şekil 88 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (Occludin)	110
Şekil 89 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (Occludin)	110
Şekil 90 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (Uranil Asetat-Kurşun Sitrata)	111
Şekil 91 : Sham grubuna ait testis kesiti (Uranil Asetat-Kurşun Sitrata)	112
Şekil 92 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (Uranil Asetat-Kurşun Sitrata)	112
Şekil 93 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (Uranil Asetat-Kurşun Sitrata)	113
Şekil 94 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (Uranil Asetat-Kurşun Sitrata) ..	113
Şekil 95 : Gruplar arası Gpx ortalamaları.....	114

Şekil 96 : Gruplar arası SOD ortalamaları.....	115
Şekil 97 : Gruplar arası MDA ortalamaları	116



KISALTMALAR

- ABP : Andorjen Bağlayıcı Protein
AMH : Anti-Müllerian hormon
ATP : Adenozin Trifosfat
Bq : Becquerel
c AMP : Siklik Adenozin Monofosfat
CAT : Katalaz
Co A : Koenzim A
CSF : Koloni Uyarıcı Faktör
DAB : Diaminobenzidin
DHEA : Dehidroepiandrosteron
DHT : Dihidrotestosteron
DNA : Deoksribo Nükleik Asit
FADH : Filavin Adenine Dinucleotide
FSH : Folikül Uyarıcı Hormon
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
Gpx : Glutatyon Peroksidaz
GSH : Glutatyon
GST : Glutatyon S-transferazlar
Gy : Gray
H : Hidrojen
H&E : Hemaoksilen&Eozin
H₂O₂ : Hidrojen Peroksid
ICRP : International Comission on Radiological Protection
Ig : İmmünoglobulinler
IGF : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
İp : İntraperitoneal
LH : Luteinizan Hormon
MDA : Malondialdehit
NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NGF : Nöron Büyüme Faktörü
OH : Hidroksil

O₂ : Oksijen
PAS : Periyodik Asit Schiff
PAP : Prostatik Asit Fosfataz
PSA : Prostatik Spesifik Antijen
PBS : Fosfat Tampon Solüsyonu
PGH : Primordiyal Germ Hücreleri
R : Röntgen
Rad : Radiation absorbed dose
Rem : Röntgen equivalent man
ROMs : Reaktif Oksijen Metabolitleri
ROO : Peroksit radikalleri
ROS : Reaktif Oksijen Radikalleri
RS : Tiyl Radikalleri
StAR : Stereoidogenik Akut Regülatör Protein
Sv : Sievert
SOD : Superoksit Dismutaz
TBF : Testis Belirleyici Faktör
TNF : Tümör Nekroz Faktör
ZP : Zona Pellusida

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübelerini ve bilgi birikimini esirgemeyen, desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Doç. Dr. Seda ÖZBAL'a,

Yüksek lisans eğitimime katkılarını sağlayan Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR, Prof. Dr. Güven ERBİL, Prof. Dr. Kazım TUĞYAN, Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK, Prof. Dr. Ülker CANKURT, Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN, Prof. Dr. Işıl TEKMEK, Doç. Dr. Başak BAYKARA, Doç. Dr. Serap CİLAKER MICİLİ ve biyolog Özcan ÜSTÜN'e,

Tez çalışmalarım sırasında katkıda bulunan Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR'a ve Araş. Gör. Cemre URAL'a, deneysel çalışmalarım esnasında bana bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren ve yanımda olan Pınar AKOKAY'a,

Yüksek lisansın bana kazandırmış olduğu değerli arkadaşlarım; Feyyaz ÖZEL, Gökçen BİLİCİ, Şeyda DEMİR, Filiz YILMAZ, Umut DEMİRDELEN, Selma AYDEMİR, Ayşegül KİRAZ, Cansu BEKDEMİR, Uygur SAÇIK, Betül SARI, Nevin ERSOY ve diğer bölüm arkadaşlarıma,

Beni bu dönemde yalnız bırakmayan, her zaman desteklerini hissettiğim Ceren GÖZETLİK ve Sezen UYSAL'a,

Tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve eksikliklerimi hissetmediğim değerli aileme teşekkürlerimi borç bilirim.

RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU TESTİS HASARINDA APOCYNİN'İN ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

MERVE TATLI

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji
Anabilimdalı, Narlıdere, İzmir, mervetatli92@gmail.com

ÖZET

Amaç :

Çalışmamızda radyasyon uygulanan sıçanlarda, testis dokusunda meydana gelen hasara karşı kuvvetli bir antioksidan olan Apocynin'in koruyucu etkilerini histokimyasal, immünohistokimyasal, elektron mikroskopik ve biyokimyasal düzeyde incelemeyi amaçladık.

Yöntem :

Çalışmamızda 35 adet Wistar albino erkek sıçan (n=7) 5 gruba ayrıldı: 1-Kontrol grubu: normal ad libitum beslenen grup, 2-Sham grubu: 5 gün günde tek doz ip. salin verilen grup, 3-Apocynin grubu: 5 gün 20 mg/kg/gün apocynin salinde ip. verilen grup, 4-Radyasyon grubu: Tek doz 10 Gy skrotal radyasyon uygulanan grup, 5-Apocynin+Radyasyon grubu: Radyasyon öncesi 5 gün ip. 20 mg/kg/gün apocynin salinde verilen ve son dozdan 24 saat sonra tek doz 10 Gy skrotal radyasyon uygulanan grup. Radyasyon uygulamasından 24 saat sonra tüm gruplar kurban edildi.

Işık mikroskopik incelemeler için Hematoksilen & Eozin (H&E), Periyodik Asit Sciff (PAS) ve Masson Trikrom boyaması ile boyandı. Kesitlerde Johnsen's skorlaması yapıldı, seminifer tübül çapı, seminifer tübül epitel yüksekliği ve bazal membran kalınlığı ölçüldü. İmmünohistokimyasal olarak apoptozu değerlendirmek için TUNEL, aktive kaspaz-3 immünohistokimya, hücreler arası sıkı bağlantı kompleksleri için ZO-1 ve Occludin immünohistokimyasal boyama yapıldı. Testis dokusu ultrastrüktürel olarak değerlendirildi. Biyokimyasal incelemeler için doku homojenatlarında Glutatyon Peroksidaz (GPx), Süperoksit Dismutaz (SOD), ve Malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü.

Bulgular :

Yapılan ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik incelemelerde kontrol, sham ve apocynin gruplarında normal yapıda seminifer tübüller, düzgün sıralanmış spermatogenik seri hücreleri, normal kalınlıktaki seminifer tübül çapları, seminifer epitel yükseklikleri ve bazal membran yapısı gözlemlendi.

Radyasyon grubunda germ hücre kaybı, intertisyel alanda bağ doku artışı saptandı. Johnsen's skorlamasında, seminifer tübül çaplarında ve seminifer tübül epitel yüksekliğinde azalma ve bazal membran kalınlığında artış gözlemlendi. Apocynin+radyasyon grubunda ise normale yakın morfolojide testis yapısı gözlemlendi..

Yapılan immunohistokimyasal incelemeler sonucunda radyasyon grubunda kontrol grubuna oranla seminifer tübüllerde TUNEL pozitif boyanan hücre sayısının ve aktive kaspaz-3 immun pozitif boyanan hücre sayısının arttığı, ZO-1 immun pozitif ve occludin immun pozitif hücre sayısının azaldığı saptandı. Apocynin+radyasyon grubunda ise TUNEL pozitif ve aktive kaspaz-3 immun pozitif hücre sayısının azaldığı, ZO-1 immun pozitif ve occludin immun pozitif hücre sayısının ise kontrole yakın bir şekilde arttığı tespit edildi. Biyokimyasal olarak ise Apocynin uygulamasının hasar grubu ile karşılaştırıldığında GPx ve SOD düzeyini arttırdığı, MDA düzeyini ise azalttığı görüldü.

Sonuç :

Radyasyonun oluşturduğu testis hasarında, Apocynin'in oluşan doku hasarını, apoptozu ve oksidatif stresi azaltarak olumlu koruyucu etkileri olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler : apocynin, radyasyon, rat, testis

HISTOLOGICAL INVESTIGATION OF EFFECTS OF APOCYNIN ON TESTIS DAMAGE CAUSED BY RADIATION

MERVE TATLI

Dokuz Eylül University Faculty of Medicine Department of Histology and Embriology, Narlıdere, İzmir, mervetatli92@gmail.com

ABSTRACT

Objective:

The aim of this study is to investigate the effect of apocynin on rat testis damage which is caused by exposure to radiation by histochemically, immunohistochemically, electron microscopically and biochemically.

Method:

In our study, 35 Wistar albino male rats (n=7) were divided into 5 groups; 1-Control group: normal ad libitum fed group, 2-Sham group: 5 days ip. saline given group, 3-Apocynin group: 5 days ip. 20 mg / kg / day apocynin dissolved in saline given group, 4-Radiation group: single dose of 10 Gy scrotal radiation group, 5-Apocynin + Radiation group: 5 days before irradiation the group receive ip. 20 mg / kg / day apocynin saline and after a single dose of 10 Gy scrotal radiation applied 24 hours after the last dose of ip. 20 mg / kg / day apocynin. All groups were sacrificed 24 hours after irradiation.

Hematoxylin & Eosin (H&E), Periodic Acid Schiff (PAS) and Masson Tricrom stainings were made for light microscopic examinations. Johnson's scoring was performed on testis sections besides seminiferous tubule diameter and height, seminiferous tubule basal membrane thickness' were measured. TUNEL, active caspase-3 immunohistochemistry was used to evaluate apoptosis; ZO-1 and Occludin immunohistochemical staining were made for intracellular tight junction complexes. Testicular tissue was evaluated ultrastructurally. Glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) levels were measured in tissue homogenates for biochemical assays.

Results :

Seminiferous tubules, regularly sorted spermatogenic serial cells, seminiferous tubule diameters in normal thickness, seminiferous tubule epithelial height and basal membrane structures were observed normal in control, sham and apocynin groups in light microscopic and electron microscopic examinations.

Germ cell loss, interstitial inland connective tissue growth was detected in the radiation group. Johnsen's score, seminiferous tubule diameter and seminiferous tubule epithelium height were decreased and thickening in the seminiferous tubule basal membrane was found. In the apocynin+radiation group, ameloration in the histomorphology of the testis was observed.

As a result of the immunohistochemical studies, it was found that increase in number of TUNEL positive stained cells and active caspase-3 immunopositive cells in seminiferous tubules, number of ZO-1 immunopositive and occludin immunoreactive cells decreased in the radiation group compared to the control group. In the apocynin + radiation group, it was found that the number of TUNEL positive and active caspase-3 immunopositive cells decreased and number of ZO-1 and occludin immunoreactive cells were increased similar to the control group sections. Biochemically, it was observed that apocynin administration increased GPx and SOD levels and decreased MDA levels when compared to the injury group.

Conclusion:

It has been concluded that apocynin has positive protective (amendatory) effects by reducing tissue damage, apoptosis and oxidative stress in the testis damage caused by radiation.

Keywords: apocynin, radiation, rat, testis

1. GİRİŞ VE AMAC

Doğal ya da yapay radyoaktif çekirdeklerin kararlı yapıya geçebilmek için dışarı saldıkları hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga şeklinde taşınan fazla enerjilerine radyasyon denir. İyonlaşma, radyasyon ile etkileşen herhangi bir maddede ve insanlar dahil tüm canlıların vücudunda meydana gelebilir (1). İyonize radyasyonun canlı organizmalar üzerinde olumsuz biyolojik etkilere sebep olduğu ve bu yan etkilerin de radyasyonun dozuna ve maruz kalış süresine göre değiştiği bilinmektedir (2).

Radyasyona en duyarlı organlar, üreme organları ve bunların hücreleridir. Testis, en radyosensitif organ olmasının yanı sıra radyosensitivitenin derecelerinde, farklı hücrelerden oluşan bir çeşitlilik sağlar.

Spermatogenez; uzun ve karmaşık bir süreçtir. Bu işlem sırasında gelişen sperm hücreleri, endojen ve eksojen streslere karşı duyarlıdır. Sitotoksik ajanlara maruz kalındığında somatik testiküler hücreler veya farklılaşmanın farklı evrelerdeki germ hücreleri zarar görebilir, bu da geçici veya kalıcı fertilité sorunlarına yol açabilir (3).

Bu hücrelerden ışınlanmaya en duyarlı olanı spermatogoniumlardır (4,5). Germ hücrelerinin apoptozu, ışınlanmış testiste son zamanlarda testis hasarından sorumlu mekanizma olarak bildirilmiştir. İyonlaştırıcı radyasyona maruz kalan testiste, öncelikli aktif olarak bölünen spermatogonia ve preleptoten spermatositler de etkilenecek germ hücrelerini apoptoz için indükler. Sertoli hücrelerinin ve leydig hücrelerinin ise radyasyon ile indüklenen apoptoza karşı dirençli olduğu gösterilmiştir (6).

Bazı kimyasalların (radyoprotektanlar), radyasyona bağlı normal doku yaralanmalarına karşı hücreleri korudukları gösterilmiştir (7). Bu amaçla özellikle antioksidanların kullanımı, normal dokuların korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (8). Bu ajanların koruyucu özellikleri, antioksidan aktivitesi tarafından oluşturulan serbest radikalleri temizlemesine dayanır (7). Testiste, radyasyondan etkilenecek diğer önemli komponent de hücreler arası bağlantı kompleksleridir. Hücreler arası sıkı bağlantı kompleksleri, seminifer tübüllerde spermatogenik hücreleri ve sertoli hücrelerini birbirine bağlamakta ve testisteki doku bütünlüğünü sağlamaktadır (9). Adluminal kompartmandaki spermatositler ve spermatidler genelde ışınlamaya daha az duyarlıdır ve hücrelerin matürasyonunda sorun olursa testiste kayıplar meydana gelebilir (10). Diğer yandan destekleyici sertoli hücreleri ve leydig hücreleri, radyasyona karşı oldukça dirençlidir (10).

Testiste radyasyon hasarı, hücreleri birbirine bağlayan zonula okludens ve occludin proteinlerini de etkileyerek yapının bozulmasına yol açmaktadır (11).

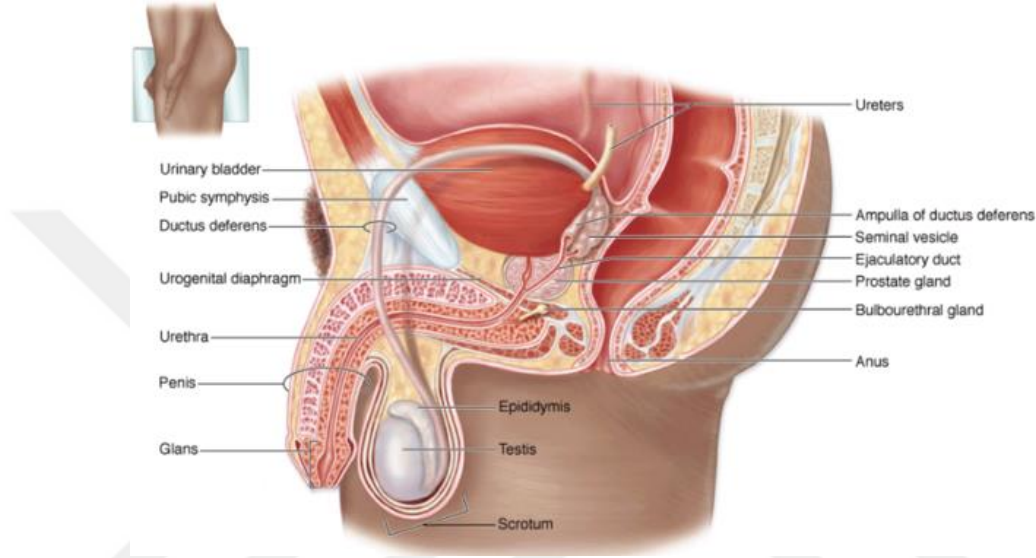
Apocynin, antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiş olan bir antioksidandır. Membran kompleksi ile sitosolik birimlerinin birleşmesini ve NADPH oksidaz aktivasyonunu önleyen bir NADPH oksidaz inhibitörüdür (12). Hücrede peroksidazlar ile oksitlenen ve daha aktif metabolitlere dönüştürülen bir ön ilaçtır (13). Çeşitli in vivo çalışmalar apocyninin, nötrofil oksidatif patlama ve kemotaksisi önlediğini, nötrofil aracılı hücre hasarını azaltmada yardımcı olan bir antiinflamatuvar ajan olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda, yüksek NADPH oksidaz'ın aktivitesi, önemli testiküler hasara yol açtığını göstermiştir ve bu antioksidan testis fonksiyonunu restore etmektedir (14).

Çalışmamızda radyasyon uygulanan sıçanlarda, testis dokusunda meydana gelen hasara karşı kuvvetli bir antioksidan olan Apocynin'in koruyucu etkilerini histokimyasal, immünohistokimyasal, elektron mikroskopik ve biyokimyasal düzeyde etkilerini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Genital Sistemi

Erkek genital sistemi; testisler (gonadlar), genital boşaltım kanalları, kopulasyon organı olan penis ve yardımcı üreme bezlerinden oluşmaktadır. Yardımcı üreme bezleri veziküla seminalisler, prostat bezi ve bulboüretral bezlerdir (Şekil 1).



Şekil 1: Erkek üreme sistemi şematik diyagramı (15)

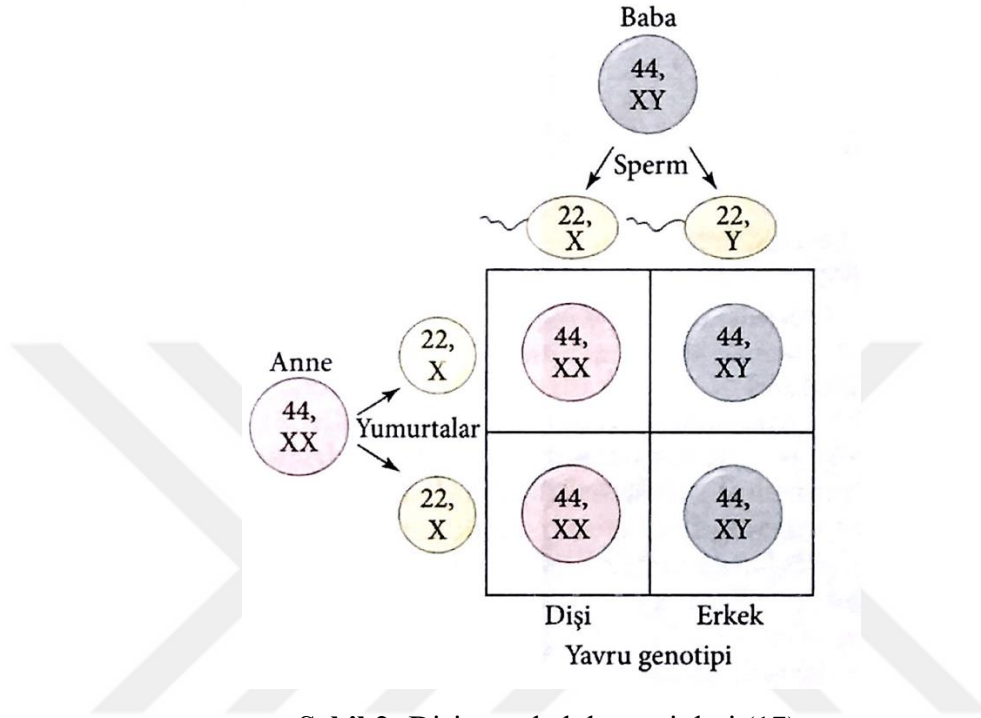
Erkek genital sistemde testisin 2 önemli fonksiyonu vardır. Bunlar; spermatogenez (spermin üretimi) ve stereoidogenezdür (seks hormonu olan androjenlerin sentezlenmesi). Androjenlerden başlıca testosteron, spermatogenez için önemli olup seksüel dimorfizmden (erkek fiziksel ve davranış karakteristikleri) ve erkek embriyonun fenotipik erkek fetusa gelişiminde rol oynamaktadır (16).

2.1.1. Erkek Genital Sisteminin Gelişimi

2.1.1.1. Kromozomal Cinsiyet Belirlenmesi

Kromozal cinsiyet belirlenmesi, primer ve sekonder olarak belirlenmektedir. **Primer cinsiyet belirlenmesi**, gonadların (erkeklerde sperm oluşturan testisler) belirlenmesi olup, cinsiyet tayini belirgin olarak kromozomaldır ve çevresel faktörlerden genellikle etkilenmez. **Sekonder cinsiyet belirlenmesi** ise erkeklerde testislerden salgılanan hormonlara bağlı erkek fenotipi gelişimini içerir (17).

Dişi karyotipi XX iken, erkek karyotipi XY'dir. Y kromozomu, cinsiyet belirlenmesinde kritik öneme sahiptir. Y kromozomu, testis belirleyici faktörü (TBF) kodlayan bir gen taşır. Bu faktör, gonadın ovaryum yerine testise dönüşümünü organize eder (Şekil 2).



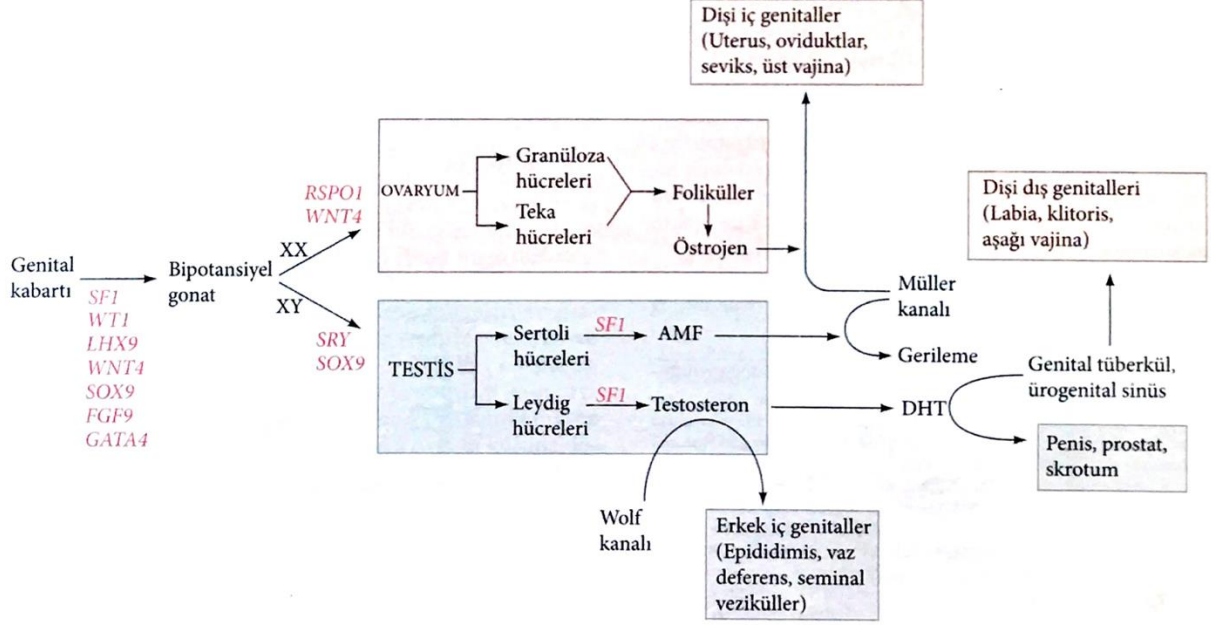
Şekil 2: Dişi ve erkek karyotipleri (17).

Sekonder cinsiyet belirlenmesi gonadlardan bağımsız olarak cinsel fenotiple ilgilidir. Erkek veya dişi kanal sistemini ve dış genital organlarını içerir. Dış genital organların farklılaşması 5α redüktaz vasıtası ile testosteronun dönüşüm ürünü olan dihidrotestosteronun (DHT) etkisiyle eş zamanlı gerçekleşir (16). DHT bulunmadığında, genetik ya da gonadal cinsiyet fark etmeksizin dış genital organlar dişi fenotip yönünde gelişecektir. Erkek genital sisteminde penis, skrotum ve yardımcı üreme bezlerinin oluşumunda görevlidir.

Sekonder cinsiyet karakteri genelde gonadlardan salgılanan hormonlar ve parakrin faktörler tarafından belirlenir (Şekil 3).

- 1) Parakrin faktör, sertoli hücrelerinden salgılanarak Müller kanalının dejenerasyonuna sebep olan AMH (Anti-Müllerian hormon)'dur.
- 2) Fetal leydig hücrelerinden salgılanan steroid hormon olan testosterondur. Testosteron, Wolf kanallarının epididimis, vas deferens ve seminal veziküllere

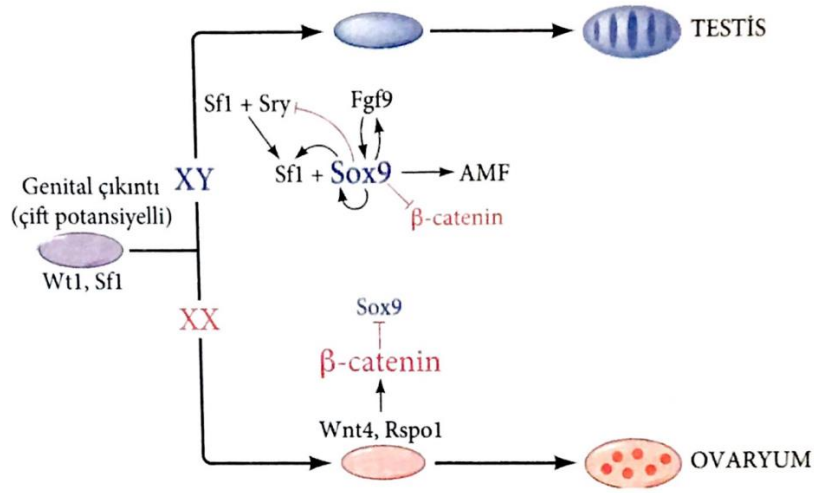
farklılaşmasını; genital tüberkülün penisi oluşturmasının ve labioskrotal kalıntıların skrotumu oluşturmasını sağlar.



Şekil 3: Memelilerde cinsiyet belirlenmesinin genel şeması (17).

2.1.1.2. Cinsiyet Belirlenmesinin Mekanizmaları

Üreme sisteminin farklılaşması fetüste **cinsiyet farklılaşması** olarak bilinir (18). Testislerin oluşumu genler tarafından yönlendirilen bir süreçtir. Normal cinsiyet farklılaşması için fonksiyonunun gerekli olan çeşitli insan genleri tanımlanmıştır. Bunlar; Wt1, Sox9, Fgf9 ve Sf1 genleridir (Şekil 4). Her embriyonik nukleus Y kromozu içermekte ise, genital çıkıntıda aynı faktör kümesi SRY genini aktive eder. Bu gen, Sox9 promotor bölgesine bağlanarak testis belirleyici yolakta anahtar görevine sahip olan bu genin ekspresyonunu artırır. Sox9 ve Fgf 9, ovaryum gelişimini başlatan β -kateninin fonksiyonunu engelleyerek ovaryum oluşturan yolağı engeller (Şekil 4).



Şekil 4: Primer cinsiyet belirlenmesinin başlatılması ile ilgili mekanizmalar (17).

➤ **WT1 :**

Ürogenital sistemin gelişimi ve SRY transkripsiyonunu düzenlemesi için gereklidir.

➤ **SRY : Cinsiyet Belirleyici Y Kromozomu**

İnsanlarda testis belirleyici en önemli gen Y kromozomunun kısa kolunda yer alır. Y kromozomunun sadece kısa koluyla doğru uzun koluna sahip olamayanlar erkek, kısa kolu olmayan ve sadece uzun kola sahip olanlar ise dişi yönde gelişim gösterirler. Nadir görülen XX erkek ve XY kadın olan durumlarda DNA analizi yapıldığında testis belirleyici genin lokalizasyonunun Y kromozomunun kısa kolunun tepesinde ve 3500-baz çifti bölgesine sıkıştırılmış olarak bulunur. Bu bölgede 223 aminoasitlik bir peptid kodlamakta olan erkeğe spesifik bir DNA dizisi bulunmuştur. Bu gene **SRY** denir.

SRY proteinini kodlayan bu gen, genin etkinleştirdiği olaylar dizisini başlatarak embriyonik hücreleri içeren ürogenital çizgide testis oluşumuna sebep olur (18).

➤ **SOX9 : Testis Belirleyici Otozomal Gen**

Sry geni birkaç saat boyunca aktiftir. Bu zaman süresince primer görevi Sox9 genini aktive etmek olan Sry transkripsiyon faktörünü sentezlemektedir. Sox9 özellikle kemik oluşumu gibi çeşitli gelişimsel süreçlerle ilişkili otozomal bir gendir. Buna karşın genital çıkıntıda Sox9 testis oluşumunu uyarmaktadır. Sox9'un ekstra bir kopyasına sahip XX

insanlar, Sry genleri olmasa bile erkek olarak gelişmektedirler. SRY mevcut olsa bile Sox9'un yokluğunda gonadlar testis oluşturamamaktadır.

Sox9 geninin çeşitli fonksiyonları bulunmaktadır;

- 1) Kendi promotor bölgesini aktive edebilme ve böylece uzun zaman boyunca transkribe edilebilme yeteneğine sahip gibi görülmektedir.
- 2) β -kateninin ovaryum oluşumunu indükleyebilme yeteneğini engellemektedir.
- 3) Testis üretimi için gerekli çok sayıdaki genin cis-düzenleyici bölgelerine bağlanmaktadır.
- 4) Anti-müllerian faktör geni üzerindeki promotor bölgeye bağlanarak, erkek fenotip oluşturan yolak ile bağlantı kurmaktadır.
- 5) Testis gelişimine önemli olan parakrin faktör olan Fgf9'u kodlayan genin ekspresyonunu artırır.

➤ **FGF9 : Fibroblast Büyüme Faktörü**

Ekspresyonu Sox9 tarafından aktive edilen Fgf9 geni;

- 1) Sertoli hücre prekürsörlerinin proliferasyonuna neden olan farklılaşmalarını uyandır.
- 2) Mezonefronlardan endotelyal hücrelerin XY gonatlara göçünü aktive eder. Bu durum erkeklere özgü bir süreçtir ve Fgf9 eklenmesinin endotelyal hücrelerin XX gonadlara bu hücrelerin göçüne neden olduğu görülmüştür. Bu hücreler testisin ana arterini oluşturur ve sertoli hücre prekürsörlerinin testis kordonlarını oluşturmasını indüklemeye önemli role sahiptir.

➤ **SF1 (Stereoidojenik Faktör 1) : Sry ve Erkek Gelişim Yolakları Arasında Kritik Bir Bağlantı**

Bipotansiyel gonad oluşumu için gerekli bir gendir. Sry'nin Sfl geninin ekspresyonunun devamlılığını sağladığı düşünülmektedir. Bu genin hem leydig hem de sertoli hücreleri üzerinde maskülenize edici rol oynamaktadır. Sertoli hücrelerinde Sfl'in sry ile iş birliği içinde Sox9'u aktive etmekte ve sox9 ile birlikte çalışarak, anti-müller transkripsiyonunu arttırmaktadır. Leydig hücrelerinde ise testosteron üreten enzimlerin genlerini aktive etmektedir.

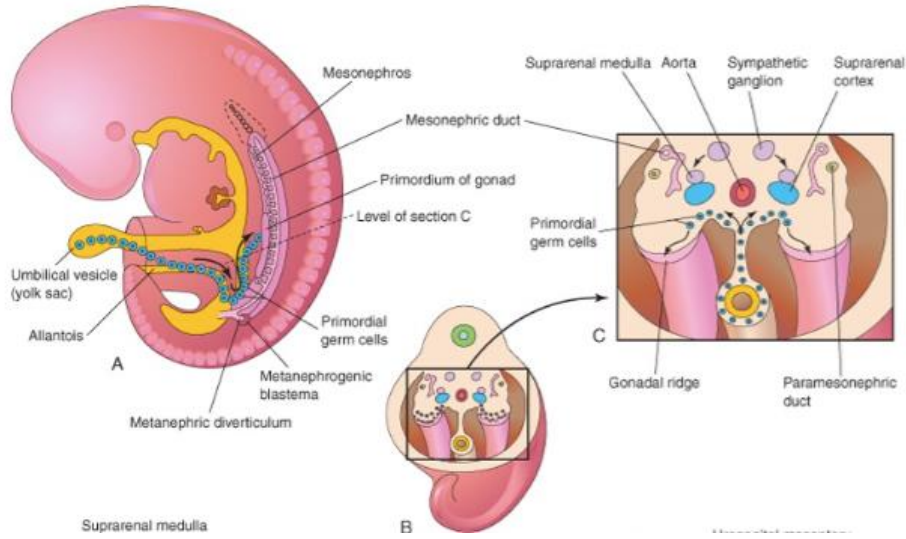
2.1.2. Testis

2.1.2.1. Testis Embriyolojisi

Testisler, üriner sistem ile yakın olacak şekilde abdominal kavite arka duvarında retroperitoneal gelişirler. Testisler, kökenini 3 kaynaktan alır (16);

- 1) **Ara mezoderm**, posteriyor abdominal duvarda bulunan ürogenital kabartıları yapar, leydig hücrelerinin ve miyoid hücrelerin kaynağıdır.
- 2) **Mezodermal epitel (Çöломik mezotelyum)**, ürogenital kabartıları döşerler ve sertoli hücrelerinin kaynağıdır.
- 3) **Primordiyal germ hücreleri**, spermatogonyumlara farklılaşırlar.

Gamet öncüsü hücreler olan primordiyal germ hücreleri (PGH), arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca vitellüs kesesinden gelişmekte olan gonadal kabartılara göç ederler. Burada ürogenital kabartılardaki mezodermal hücreleri ve çöломik mezotelyum hücrelerini proliferasyon ve primer seks kordonlarını oluşturmak üzere indükler (Şekil 5).

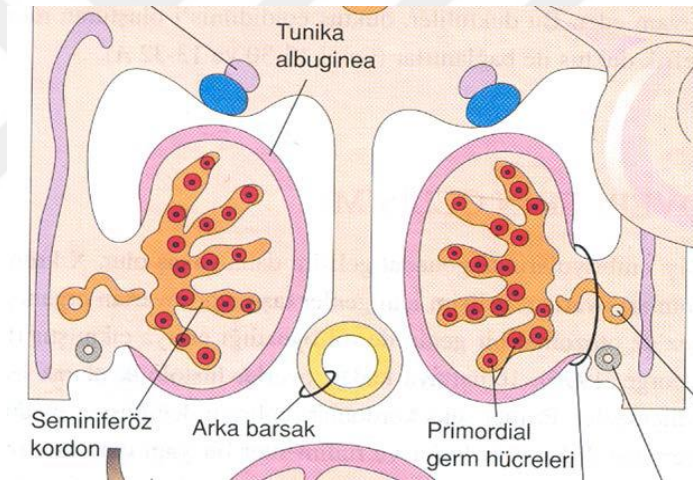


Şekil 5 : Gonadal kabartıların lokalizasyonu (19)

Erkek ve dişi gonadların her ikisi de ortak bir öncüden (**bipotent veya farklılaşmamış gonadlar**) gelişmektedir (17). İnsanlarda bipotent gonad taslakları 4. Haftada görülür ve 7. Haftaya kadar cinsiyet açısından farklılaşmamış olarak kalır. Gonad taslakları orta mezodermde 1 çift bölge olarak bulunurlar ve gelişmekte olan böbreklerin bitişiğindedirler. Gonad taslakları ventral kısımları genital çıkıntı epitelini oluşturur. Farklılaşmamış evrede

genital kabartı epiteli proliferer olur. Bu epitelyum tabakaları gonadların somatik komponentlerini oluşturur. Germ hücreleri 6. haftada gonadlara göç eder ve somatik hücreler tarafından çevrenir.

Eğer fetüs XY ise, somatik hücreler 8. haftanın sonuna kadar çoğalmaya devam ederler ve sertoli hücrelerine farklılaşmalarını başlatırlar. 8 hafta süresince gelişmekte olan sertoli hücreleri gelen germ hücrelerini çevreler ve testis kordonu oluşturacak şekilde kendilerini organize ederler. Bu kordonla gelişmekte olan testisin medulla bölgesinde kıvrımlar oluşturmaya başlar ve mezonefrik kanala yakın bir yerde rete testis denen ince bir kanal ağına bağlanırlar. Sonuçta testis kordonlarını ve germ hücrelerini içeren bu bölge, tunika albuginea adı verilen kalın bir ekstraselüler matriks ile kaplanır. Bunun sonucu olarak germ hücreleri erkek gonadların içine girdikleri zaman organın içinde, testis kordonlarında gelişeceklerdir (Şekil 6).



Şekil 6 : Seminifer kordonların ve tunika albugineanın şematik görüntüsü (19)

Fetal testis kordonundaki sertoli hücreleri, dişi kanalların gelişimini engelleyecek olan anti-Müllerian faktörü salgılamaya başlarlar ve bu hücreler sperm gelişimine destek olur. Aynı anda testislerin interstisyel mezenşim hücreleri de, testosteron üreten leydig hücrelerine farklılaşırlar.

Gelişimin sonraki aşamalarında ise testis kordonları seminifer tübülleri oluşturmak üzere çukur oluştururlar. Germ hücreleri, bu tübüllerin periferine yerleşir ve sperm üretimini sağlayacak olan spermatogenik kök hücre popülasyonunu oluştururlar. Olgun seminifer

tübüllerde, spermler efferent kanallara katılan rete testis aracılığıyla testisin içinden taşınırlar. Bu kanallar mezonefrik böbreğin yeniden şekillenmiş tübülleridir. Seminifer tübülleri, mezonefrik böbreğin toplayıcı kanalı olan **Wolf kanalına** (Nefrik kanal) bağlarlar. Erkek gelişim sürecinde Wolf kanalı farklılaşarak spermi üretraya ve buradan vücudun dışına taşıyan epididimise ve vas deferense dönüşür.

Gebeliğin 26. haftasında testisler posteriyor abdominal duvardan skrotuma iner. Testislerin bu göçüne, gelişmekte olan skrotum ile her bir testisin inferior kutbu arasında bağlantı sağlayan testosteron duyarlı ligament olan gubernakulumun, testosteronun etkisiyle kısalması ve abdominal kavitenin ayrı gelişimi neden olmaktadır. Testisler, inguinal kanaldan geçişskrotuma inerler. Burası abdominal kavite ve skrotum arasında oldukça dar bir kanaldır. İnişleri sırasında duktus deferensi, kan damarlarını, lenf damarlarını ve sinirleri de beraberinde sürüklerler.

2.1.2.2. Testis Anatomisi

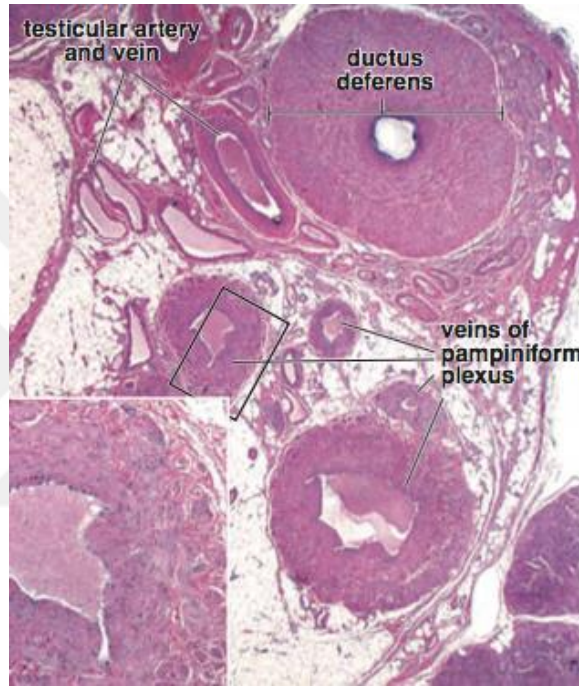
Testis, vücut boşluğunun dışında, deri ve fibromüsküler bir kese olan skrotum içinde asılı olarak bulunan bir çift oval şekilli organdır. Skrotum, karın duvarının aşağıya doğru kese şeklinde çıkıntı yapması ile oluşur ve içeride testislerin taşınması amacıyla ikiye bölünür. Testisler fetal dönem boyunca karın boşluğunda bulunurlar; ancak gestasyonel dönemin 7. ayında skrotuma inerler. Spermlerin üretim görevini üstlenen testisler, bulunduğu ortam sıcaklığının vücut ısısından 2-3°C düşük olması gerekmektedir. Bu nedenle testisler için skrotuma iniş zorunludur.

Testisler kişiden kişiye değişmekte olup ortalama 20-25 g ağırlığında, 2-3 cm genişliğinde, 4-5 cm kalınlığındadır. Her 2 testis de yaklaşık olarak aynı büyüklükte olmalarına rağmen yapısal olarak sol testis sağ testise göre daha aşağıdadır. Ayrıca sağ testis sol testise göre %10 daha ağırdır.

Testisler, abdominal kaviteden skrotuma inerken lenf damarlarını, kan damarlarını, otonomik sinirleri ve abdominal periton uzantısı olan tunika vaginalisi de beraberinde sürükler.

Testise giren ve çıkan bütün yapılar spermatik kordon adını alır. Spermatik kordon; spermatik arter, pampiniform pleksus venleri, lenf damarları, sempatik sinir lifleri ve kremaster kasından oluşur (16).

Her bir testis, arterlerini aorta abdominalisten alarak kanlanmaktadır. Arteria testicularis testise varıncaya kadar karın boşluğunun büyük bir kısmını ve inguinal kanalı geçmek zorundadır. Testise yakın konumda bulunan arteria testicularis testisten abdominal venlere kan taşıyan pampiniform venöz pleksus tarafından çevrenilmektedir. Bu şekilde, testisin düşük sıcaklıkta tutulması sağlanarak kan damarları arasında ısı değişimi gerçekleşir. Arteriyal kan testise girmeden önce, testisten dönen soğuk venöz kan zıt yönlü akım sıcaklık değişim mekanizması aracılığı ile soğutulur (16) (Şekil 7).



Şekil 7: Spermatik kordonunun histolojik görüntüsü (14)

2.1.2.3. Testis Fizyolojisi

Testislerin hormonal kontrolü, hipotalamustan GnRH salgılanması ile başlar (18). Ön hipofize hipotalamo-hipofizer portal kan damarları yolu ile ulaşır ve burada folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) sekresyonunu başlatırlar (Şekil 8).

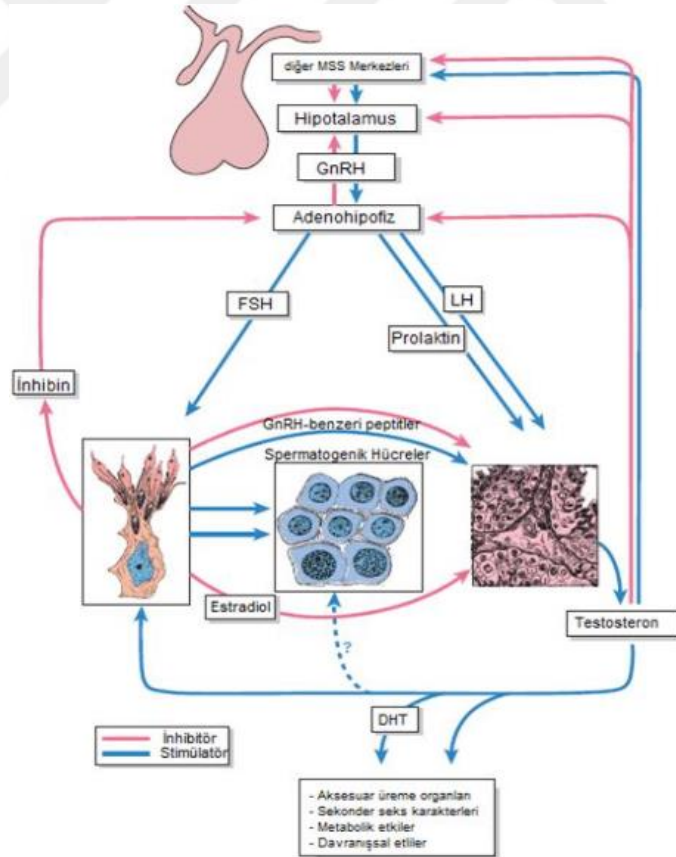
• **FSH** : Sertoli hücrelerinden inhibin ve aktivin üretimini başlatmakla görevli hormondur. Androjen bağlayıcı protein (ABP) de FSH tarafından stimüle edilir. ABP, androjenleri bağlar ve ABP androjen kompleksi, gelişen spermatogenik hücrelerin çevresinde yüksek androjen seviyelerini sağlar.

FSH sekresyonu ise ön hipofize sertoli hücrelerinden major inhibitör sinyal olan inhibin hormonunun etki etmesiyle olur. Bu negatif geri bildirim ile FSH, sertoli hücrelerini inhibin sekresyonunu arttırmak üzere uyarır ve inhibin de FSH salgılanmasını bastırır.

• **LH** : Leydig hücrelerinde, sperm matürasyonu için önemli olan testosteron sekresyonunu uyarır. LH, prolaktin ile beraber Leydig hücre fonksiyonunu düzenler. Prolaktin, LH reseptörünün gen ekspresyonunu düzenler. Aşırı prolaktin, leydig hücrelerinden androjenlerin üretimini azaltıp spermatogenezi zayıflatabilir ve infertiliteye yol açabilir.

Hipotalamo-hipofizer kontrol ile testosteron, negatif geri bildirimlerde bulunabilir. LH sekresyonu 2 yolla baskılanır;

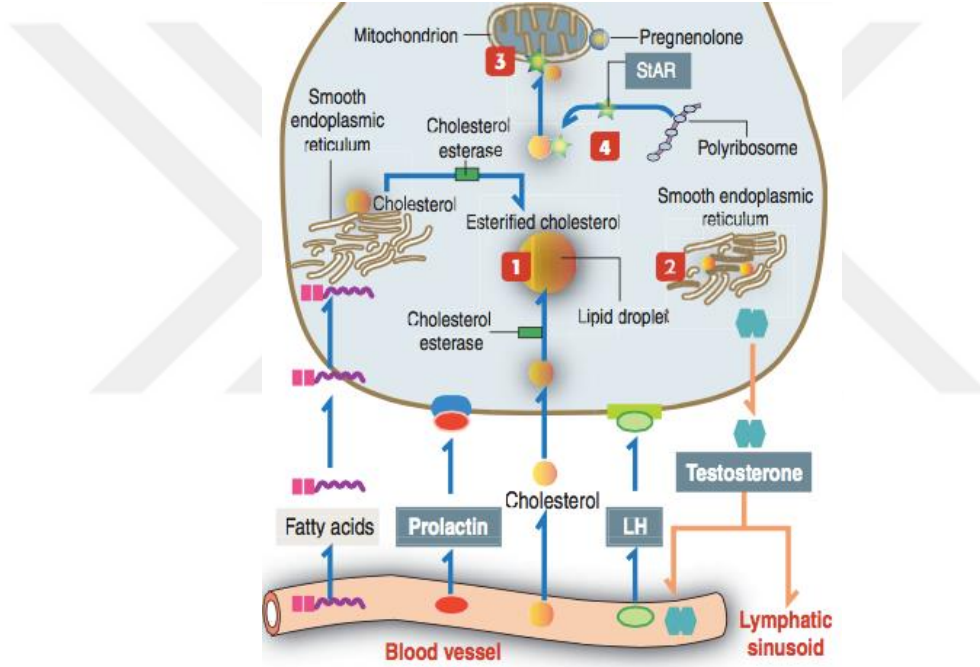
1. Ön hipofize direk etki ederek, gonadotropik hücrelerin GnRH'a cevap olarak daha az salgı yapmalarını sağlar.
2. Hipotalamusu etkileyerek GnRH nöronlarının salgı şiddetini azaltır ve bu da gonadotropinlerin sekresyonunu azaltır.



Şekil 8: Testiküler fonksiyonun hormonal düzenlenmesi (16)

Testosteron Sentezi

Testosteron sentezi sırasında plazma kolesterolü hücreye girer, asetil koenzim A (CoA) tarafından esterleştirilir ve sitoplazmada lipid damlacığı şeklinde depolanır. Düz endoplazmik retikulumda yağ asitleri kolesterole dönüştürüldükten sonra kolesterol, prognerolon üretmek üzere yağ damlacıklarından mitokondriyonlara **stereoidogenik akut regülâtör protein (StAR)** aracılığı ile taşınır. Düz endoplazmik retikulumdaki enzimler prognerolonu progesterona ve onu da testosterona dönüştürür. Oluşan testosteron, kan veya lenf kapillerlerine verilir. Leydig hücreleri tarafından üretilen diğer iki androjenler de dehidroepiandrosteron (DHEA) ve androstenedion'dur (Şekil 9).



Şekil 9: Leydig hüresinden testosteron sentezinin şematik çizimi (20)

2.1.2.4. Testis Histolojisi

Testis, hem ekzokrin hem de endokrin özelliğe sahip bir organdır. Ekzokrin fonksiyonu, testisin aktif holokrin tipi salgısı olup spermiumları salgılamalarıdır. Her ejakülatta 200-300 sperm bulunur. Endokrin fonksiyonu ise androjenlerin, leydig hücrelerince salgılanmasıdır. Androjen, hem yerel olarak seminifer tübüllere hem de kan yolu ile yardımcı üreme bezlerine ve birçok organa etki ederler.

Testislerin her biri testiküler kapsül ile çevrilidir. Kapsül histolojik olarak dıştan içe doğru sırası ile;

- 1) Tunika vaginalis
- 2) Tunika albuginea
- 3) Tunika vasküloza olarak sıralanır.

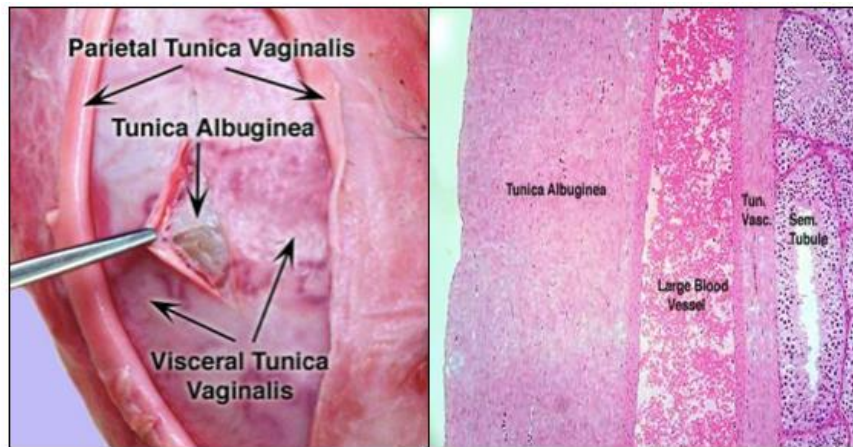
Tunika vaginalis, peritondan kökenlenen seröz bir kesedir. Karın arka duvarından gelişmekte olup skrotuma inerken peritonu da beraberinde sürükler. Bu kese, pariyetal ve visseral yapraklara sahiptir. Pariyetal yaprak, skrotumun iç yüzeyine dayanırken visseral yaprak tunika albugineaya yapışıktır. Tunika albuginea, en belirgin tabaka olup düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındadır. Aralarında düz kas fibrilleri de bulunmaktadır.

Tunika vasküloza, gevşek bağ dokusu özelliğinde olup damarca zengin bir tabakadır. Tunika albugineanın testis içine uzantıları olan septumların iç yüzlerini örter ve bütün lobülleri dıştan sarar.

Kapsül, periyodik konsantrasyonlar yapan bir yapıdır. Bu kontraksiyonlar, testisin hacmini düzenler ve duktus sistemine masaj etkisi yaparak spermilerin hareketine yardımcı olur.

Tunika albuginea, testisin posteriyoru boyunca organ parankiması içine sokularak üçgen şekilli mediastinum testis denen kalınlaşma yapar. Mediastinum testisten ışınal uzanarak sıkı bağ dokusu yapısında ince bölmeler (septula testis) çıkararak testis parankimasını 200-300 lobüle ayırır.

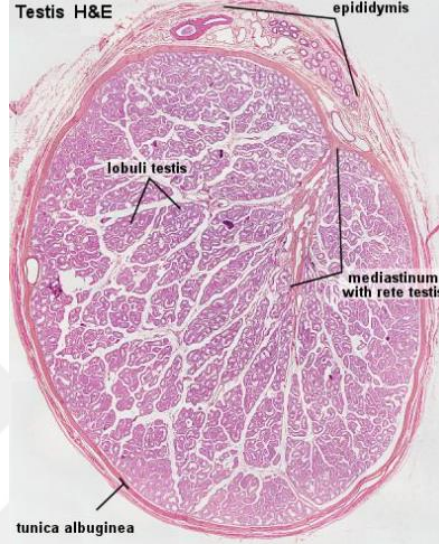
Testisin her bir lobülünde 1-4 adet seminifer tübül bulunur. Bu tübüller arasında intersitisyel bağ doku ve leydig hücreleri mevcuttur. Ayrıca sinirler, kan ve lenf damarları da bulunmaktadır (Şekil 10).



Şekil 10: Testiküler kapsülün anatomik ve histolojik görüntüsü (21)

2.1.2.4.1. Seminifer Tübül Histolojisi

Her seminifer tübül yaklaşık 50 cm uzunluğunda, 150-250 µm çapındadır. Periferde şişkin kör uçlarla başlarlar. Mediastinum testise doğru birbirine yaklaşılarak seyrederek ve sonra lobüllerin kanalcıkları birleşip, mediastinum testis içinde rete testislere açılan düz seyirli tubuli rektleri yaparlar (Şekil 11).



Şekil 11: Testisin histolojik görüntüsü (22)

Seminifer tübül duvarı histolojik olarak 3 tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakalar dıştan içe doğru incelendiğinde;

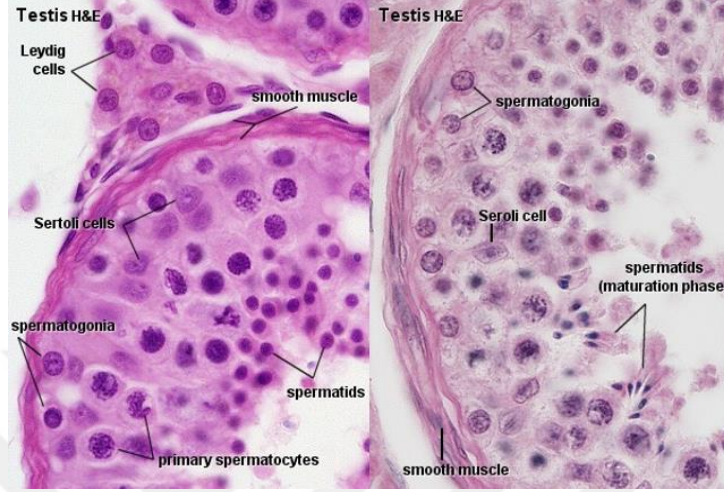
- Lamina propriya
- Bazal lamina
- Seminifer epitel

Lamina Propriya ve Bazal Lamina

Tipik fibroblastlardan yoksun çok tabakalı bağ dokusu yapısında olup peritübüler doku olarak da adlandırılır. İnsanda lamina propriyada bazal lamina dışında 3-5 adet miyoid hücre ve kollajen fibriller bulunur (16).

Miyoid hücreler, bazal lamina ve bol miktarda aktin filamentleri içermeleri ile düz kas hücrelerine benzerler. Fibroblast yokluğunda kollajen sentezleyebilirler. Miyoid hücrelerin ritmik kasılmaları, spermatozoların ve testiküler sıvıların tübüllerden boşaltım kanal sistemine akışına yardım eden peristaltik dalgalanmaları oluşturur.

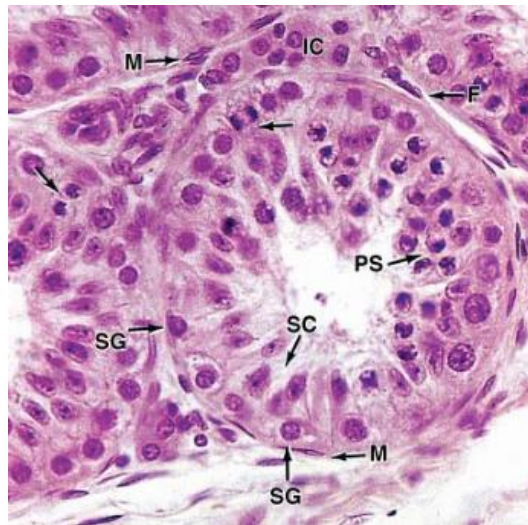
Seminifer epitel, özelleşmiş çok katlı epitelden oluşur. Her bir seminifer tübülü döşeyen epitelde 2 tip hücre vardır. Bunlar; sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleridir (Şekil 12)



Şekil 12 : Seminifer tübülün histolojik görüntüsü (22)

2.1.2.4.1.1. Sertoli Hücreleri

Sustantaküler veya destek hücreleri olarak da adlandırılırlar. Uzun, prizmatik hücreler olup bazal lamina üzerinde spermatogenik seri hücrelerini sararlar ve onların aralarındaki boşlukları doldururlar. Sertoli hücrelerinin yan yüzlerinde farklılaşan spermatositler yer alırken, apikallerinde lümene uzanan olgun spermiumlar, bazal kısımlarında ise spermatogoniumlar yer alır (Şekil 13).

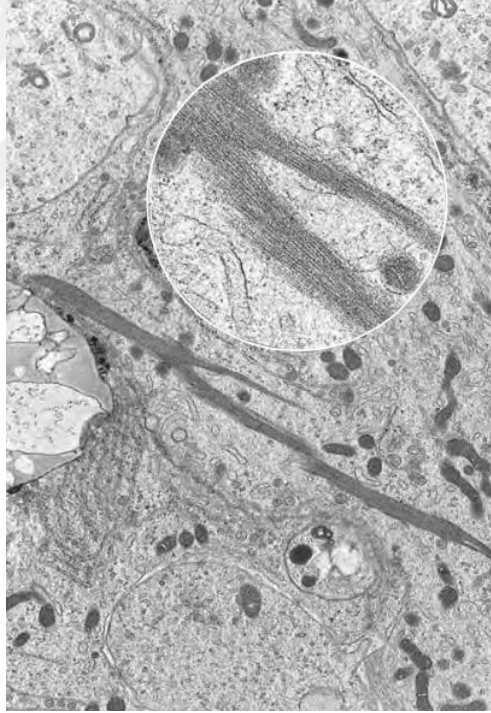


Şekil 13: Seminifer tübülde sertoli hücreleri (SC) (15).

Sertoli hücrelerinin heterokromatin yapıdaki nukleusları olukludur ve bazal kısımdadır. Nukleolusları ise merkezi yerleşimlidir. Bu hücrelerin sitoplazmaları eozinofiliktir ve bunun yanında yaygın agranüler endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ve anüler lamel dizileri içerirler.

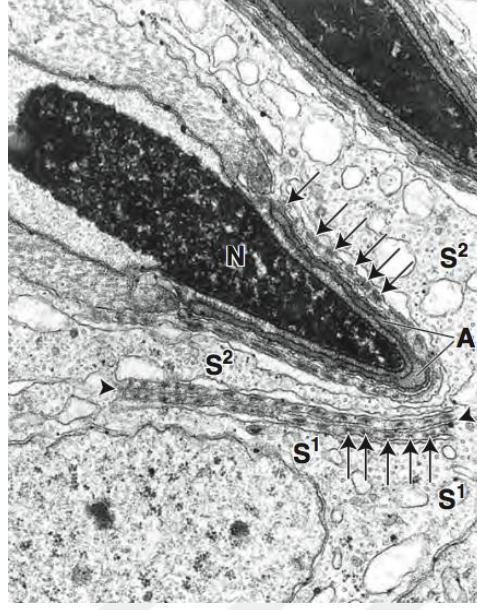
Sitoplazması, hücrenin dikey eksenine paralel yerleşmiş çok sayıda küre şekilli uzun mitokondriyon ve yaygın bir Golgi aygıtı ve lizozomlara, lipid damlacıklarına, veziküllere, glikojen granüllerine ve zengin hücre iskeletine (vimentin, aktin, mikrotübül) sahiptir. 7-9 nm'lik bir filament kılıfı nukleusu sarar ve onu diğer sitoplazmik organellerden ayırır.

İnsanda bazal sitoplazmada karakteristik inklüzyon cisimcikleri (Charcot-Böttcher) bulunur. Bu ince fuziform kristaloidler 10-25 μm uzunluğunda ve 1 μm genişliğindedir. Transmisyon elektron mikroskopi ile paralel ya da birbirine yaklaşan, düz, yoğun, 15 nm çapında zayıf şekilde düzenlenmiş filament demetleri olarak görülürler. Kimyasal fonksiyonları bilinmemektedir (Şekil 14).



Şekil 14: Sertoli hücresinin elektron mikroskopik görüntüsü (16)

Sertoli hücreleri birbirlerine sertoli-sertoli hücre bağlantı kompleksi ile bağlanırlar. Bu bağlantılarda taban ve yan yüzdeki bağlantı kompleksleriyle birbirine tutunurlar (Şekil 15).



Şekil 15: Sertoli-sertoli hücre bağlantısını gösteren elektron mikroskopik görüntü (16)

Komşu membranlarda 50'den fazla paralel kaynaşma çizgisi içeren zonula okludens (ZO-1) olarak bilinen sıkı bir bağlantı içerir. Bu kompleks ile seminifer epitel bazal ve adluminal olacak şekilde iki kompartmana ayrılır. Bazal kompartman, spermatogonyumları ve erken primer spermatositler ile sınırlı iken, adluminal kompartman sekonder spermatositleri ve spermatidleri içerir (16). Erken spermatositler bağlantı kompleksinden geçerek, bazal kompartmandan luminal kompartmana hareket eder. Bu hareket, yeni oluşan spermatositin altında sertoli hücrelerin uzantıları arasında yeni bir bağlantı kompleksinin oluşmasıyla ve ardından spermatosit üzerinde yer alan bağlantının yıkılması ile gerçekleşir. Böylece spermatogenik hücrelerin farklılaşmasında mayoz süreci ve spermiyogenez luminal kompartmanda gerçekleşir (Şekil 12).

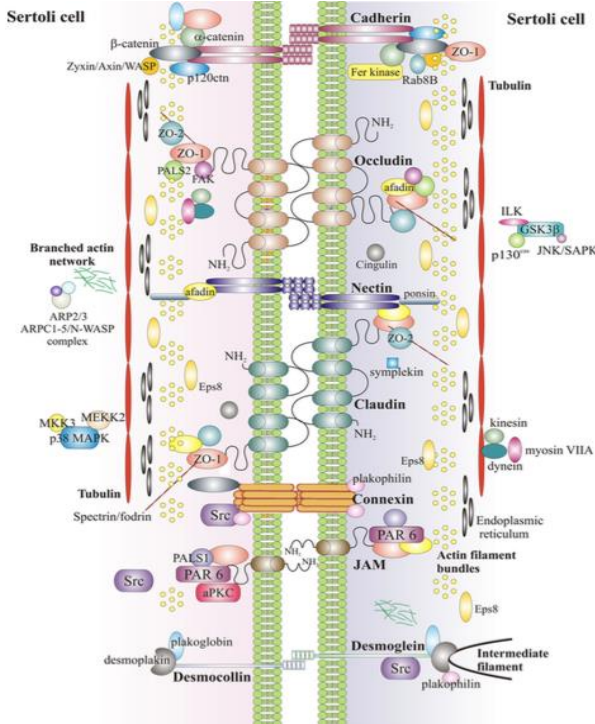
Kan testis bariyeri, bağlantı kompleksi ile oluşan bir bariyerdir. Spermiler ve spermatogenik seri hücrelerinin sahip olduğu moleküller, bu hücreler için özgündürler ve immun sistem tarafından yabancı olarak kabul edilirler. Çünkü spermatogenez, immun kompetanın gelişmesinden çok sonra pubertede gerçekleşir. Bu nedenle farklılaşan spermatogenik seri hücreleri yabancı olarak tanınırlar ve immun cevabı harekete geçirerek antikor oluştururlar. Ancak kan-testis bariyeri, immun sistem ile hücreler arasındaki her türlü etkileşimi kaldırarak immünoglobulinlerin (Ig) tübül içine geçmesini önler. Bu sayede kan-testis bariyeri, spermatogenik seri hücreleri immun sistemden izole ederek korumaktadır.

Bariyerin elemanları sırası ile; sertoli hücresi, seminifer epitel bazal laminası, miyoid hücre, endotel hücresinin bazal laminası ve endotel hücresidir.

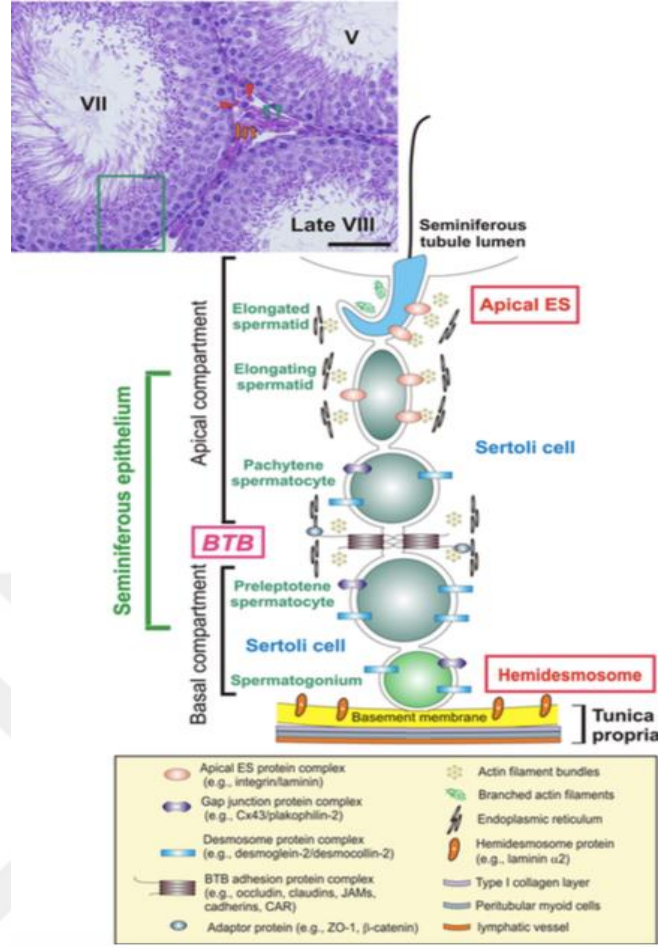
Kan testis bariyeri, sertoli hücreleri arasındaki kompleks bir yapıdadır ve occludin, junctional adhezyon molekülü (JAM-A), claudin-11 ve zonula okludens (ZO-1) gibi sıkı bağlantı proteinleri ile N-cadherin ve kateninler gibi proteinleri de içermektedir (9).

Epitelyal sıkı bağlantılar, ZO-1 ve occludin gibi çoklu integral membran proteinleri içeren multimoleküler membran özelleşmeleridir. 225-kDa'lık bir protein olan ZO-1, sıkı bağlantıların en yüzeysel bölgesinde bulunan integral membran proteinidir. Occludin, sıçan testisi ve epididimis de dahil olmak üzere farklı epitelyal tiplerde tanımlanan ilk sıkı bağlantı ile ilişkili 65-kDa'luk integral membran proteinidir. Sıkı bağlantıda occludinin lokalizasyonu için ZO-1 gereklidir. Sıkı bağlantıların ana görevleri, suyun hücre içi boşluklardan serbestçe geçmesini önlemek için bir fiziksel bariyer yapmak ve hücre kutupluluğu oluşturmak ve korumaktır. Testiste sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, spermatogenez için fizyolojik ortamın savunulması ve germ hücrelerinin bağışıklık sisteminden korunması için kan testis bariyerinin bir bölümünü oluşturur (11).

ZO-1, bazal yerleşimli spermatogenik hücrelerin sitoplazmasında ve özellikle bazaldeki komşu sertoli hücre bağlantılarında gözlenir (11,23). Occludin ise komşu sertoli hücrelerinin bazolateral bölgelerinde lokalizedir (11) (Şekil 16) (Şekil 17).



Şekil 16: Sertoli-sertoli arası sıkı bağlantı komplekslerini gösteren şematik görüntü (24)



Şekil 17 : Seminifer epiteldeki bağlantı komplekslerini gösteren şematik görüntü (24)

Sertoli hücrelerinin görevleri;

- 1. Destekleme:** Spermatogenezde oluşan spermatogonik hücreler birbirlerine bağlıdırlar. Bu zayıf spermatogonik ağı sertoli hücreleri ile desteklenmektedir.
- 2. Besleme:** Spermatogonik hücrelerin, kan-testis bariyeri nedeniyle kan ile bağlantıları kesilmiştir. Hücrelerin ihtiyacı olan metabolitler ve steroidler sertoli hücreleri ile sağlanır.
- 3. Fagositoz:** Spermatogenezde spermatogonik hücrelerden geri kalan sitoplazma ve sitoplazmik köprüler, artık cisim olarak atılır ve sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir.
- 4. Spermiasyon:** Olgun spermiumların aktin aracılı kasılmalarla lümene ulaşmasını sağlayarak hareket kolaylaştırılır.

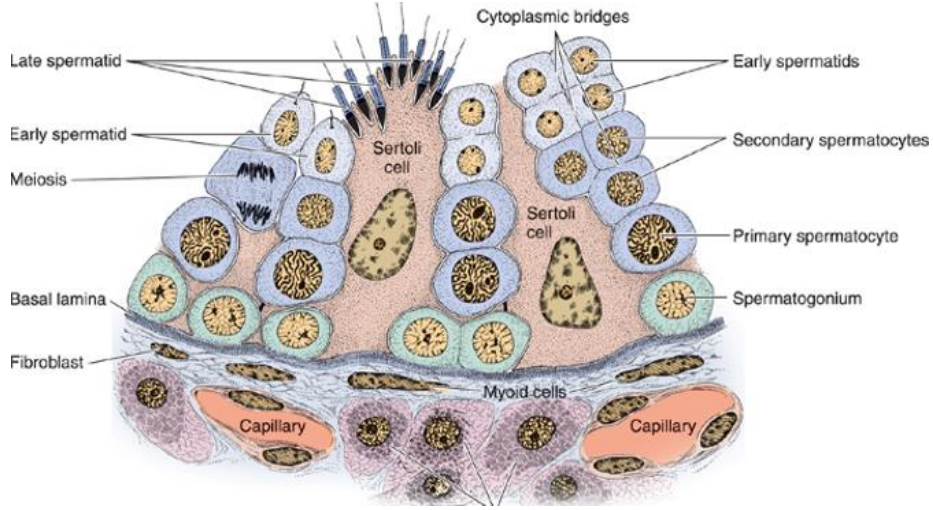
5. Salgılama:

- **Androjen Bağlayıcı Protein (ABP):** Folikül uyarıcı hormon (FSH) tarafından stimüle edilerek salgılanır ve gelişmekte olan spermin normal olgunlaşması için gerekli olan testosteronu seminifer tübüllerin adluminal kompartmanında konsantre eder.
- **İnhibin (steroid olmayan faktör):** Sertoli hücreleri üzerinde FSH ve testosteron reseptörü bulunur. Bu nedenle hücrelerin salgılama fonksiyonlarını hem FSH hem testosteron düzenler. İnhibin, glikoprotein yapıda bir hormondur ve hipofiz bezinden FSH'ın salgılanmasını önleyerek geribesleme mekanizmasını kontrol eder.
- **Aktivin hormonu:** Hipofiz bezinden FSH'ın salgılanmasını aktive eden hormondur.
- **Anti-müllerian hormon:** Embriyogenez sırasında erkeklerde Müller kanalının gelişmesini baskılayan protein yapıda hormondur.
- **Luteinleştirici hormonu salgılayan hormona benzeyen peptid:** Sertoli hücresi ve leydig hücreleri arasında haberci görevi görür ve leydig hücrelerin siklik işlevini düzenler.
- **Testiküler sıvı:** Rete testis hücreleri ile birlikte spermin yaşaması ve duktus epididimise taşınmasını sağlar.

6. Kan testis bariyerinin oluşumu : Sertoli hücreleri arasında bulunan sıkı bağlantı kompleksleri ile kan testis bariyeri yapısını oluşturur.

2.1.2.4.1.2. Spermatogenik Seri Hücreler

Spermatogenik seri hücreler 4-8 tabakalı olup bazalden lümeneye doğru sırasıyla spermatogoniumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermium olarak sıralanırlar. Bu hücreler, düzenli olarak çoğalan ve olgun sperme farklılaşan hücrelerdir (Şekil 18).



Şekil 18: Spermatogenik hücre serisini gösteren şematik diyagram (25)

2.1.2.4.1.2.1. *Spermatogonium*

Spermatogonyal kök hücreler, düzenli bir şekilde çoğalıp olgun spermiuma farklılaşan hücrelerdir. Bu fazda bu hücreler çok sayıda bölünme geçirerek spermatogonium popülasyonunu oluştururlar.

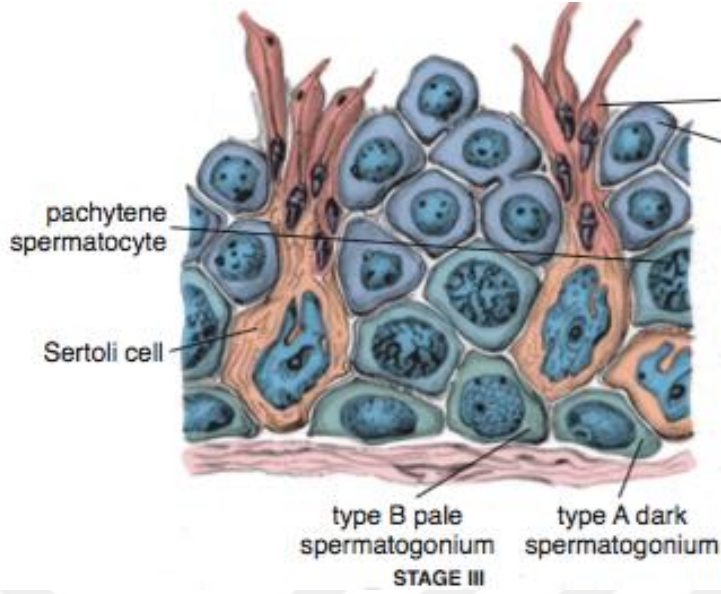
Bu hücreler bazal kompartmandaki bazal lamina ile direkt ilişkili olan diploid hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki tıkaçıcı bağlantı altında yer alırlar, yani bariyerin dışındadırlar.

İnsan spermatogonyumları rutin hematoksin eozin (H&E) preparatlarında nuklear görünümde farklılıklar gösteren spermatogonyal soyları üretirler. Bu hücreler nukleus görünümüne göre 3 tipten oluşurlar (Şekil 19) :

- **Tip A koyu spermatogoniumlar (Ad):** İnce granüllü kromatinler, yoğun bazofilik oval nukleuslara sahiptirler. Düzensiz aralıklarda bölünerek kök hücreler olan tip A açık veya tip A koyu hücreleri oluşturabilirler.

- **Tip A açık spermatogoniumlar (Ap):** İnce granüllü kromatinli oval nukleuslar içerirler. Bunlar, spermi üreten farklılaşma sürecine yöneltilmişlerdir. Ardışık birkaç mitotik bölünme geçirdikten sonra Tip B hücrelerini oluştururlar.

- **Tip B spermatogoniumlar :** Merkezi bir nukleolusun çevresinde ve nuklear zarf boyunca geniş kümeler oluşturacak şekilde yoğunlaşmış kromatinli yuvarlak nukleuslara sahiptirler. Bu hücreler mitoz geçirerek primer spermatositleri oluştururlar.



Şekil 19: Seminifer tübülde spermatogonyumların şematik çizimi (16)

2.1.2.4.1.2.2. Primer Spermatisit

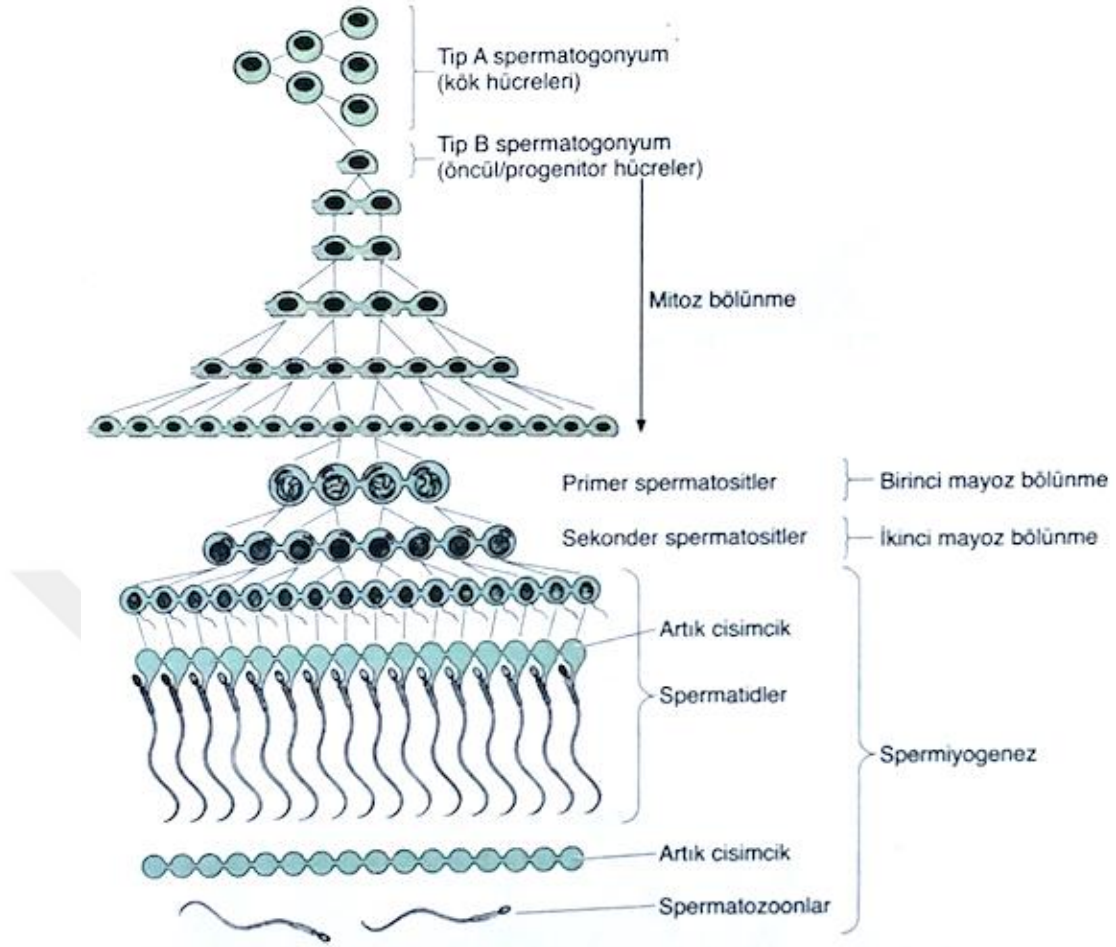
Tip B spermatogonyumların mitotik bölünmesi primer spermatisitleri üretir. Primer spermatisitler, ilk mayoz bölünme geçirecek olan hücrelerdir. Bu hücreler, mayoz bölünmenin profaz safhasına geldiğinde 22 gün bu evrede kalırlar. Oluştuktan kısa süre sonra, mayoz öncesi DNA'larını replike ederler. Bunun sonucunda her bir primer spermatisit normal sayıda kromozom ($2n$) ve DNA ($4d$) içerirler.

2.1.2.4.1.2.3. Sekonder Spermatisit

Primer spermatisitlerin mayoz I geçirmesiyle boyutları artar ve sonucunda haploid kromozoma ($1n$) ve $2d$ DNA'ya sahip sekonder spermatisitler oluşur. Ardından 2. mayoz bölünme ile spermatidler meydana gelmektedir.

2.1.2.4.1.2.4. Spermatisit

Mayoz bölünme ile oluşan haploid spermatidler olgun sperm oluşturmak için farklılaşma sürecine uğrarlar. Haploid olan matür sperm, bir oositi fertilize ettiği zaman diploid durumu yeniden oluşur. Haploid spermatidler, adluminal kompartmanda seminifer tübül lümenine yakın olacak şekilde yerleşirler. Spermatisitler, sertoli hücre sitoplazmalarının kriptaları içinde gömülüdürler (Şekil 20).



Şekil 20: Mitoz ve mayoz evrelerinin karşılaştırılması (15)

Spermatidlerden sperm oluşum süreci (Spermioyogenez) 4 evrede meydana gelmektedir (20) (Şekil 21).

➤ **Golgi Evresi :** Bu faz, spermatidin çok sayıda golgi kompleksinde kümelenen periyodik asit schiff (PAS) + granüllerin bulunması ile karakterizedir. Bu proakrozom granüller glikoprotein bakımından zengin olup akrozomal vezikül denen, nuklear zarfa komşu, membran ile sınırlı bir vezikülü oluşturmak için bir araya gelirler. Burada, akrozomal vezikül genişler ve içeriği artar. Vezikül pozisyonu, gelişmekte olan spermın ön kutbunu belirler. Sentriyoller, jukstanuklear bölgeden spermatidin arka kutbuna göç ederler ve burada sentriyol plazma membranına dik açı ile hizalanırlar. Sentriyol, sperm kuyruğunun aksonemini oluşturmak üzere, 9 periferik, 2 merkezi mikrotübül parçasının bir araya gelişini başlatır.

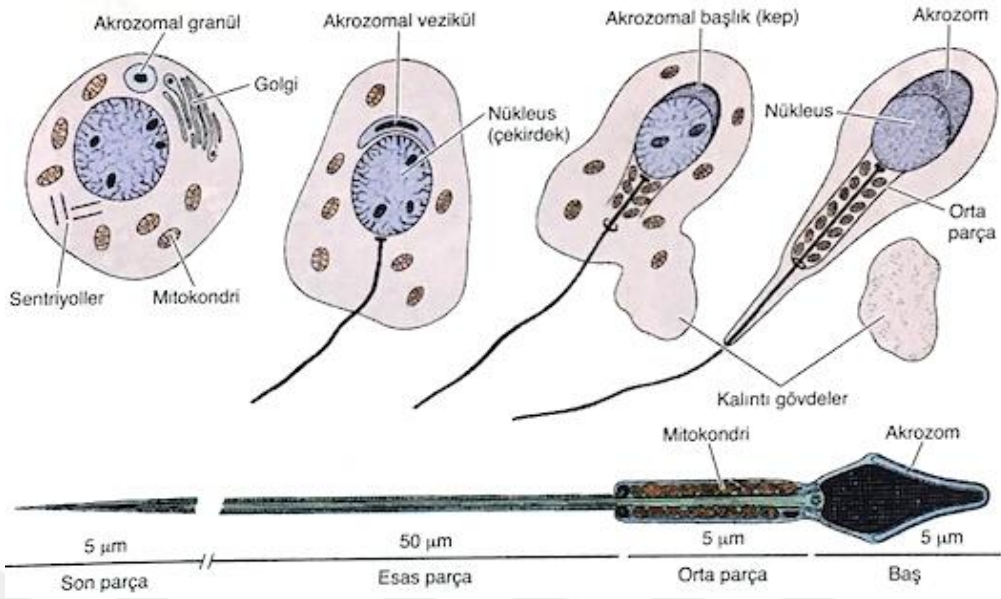
➤ **Kep Evresi** : Akrozomal vezikül nukleusu ön kısmında yayılarak kep şeklini alır. Akrozomal kepin altındaki nuklear zarf parçası porlarını kaybeder, kalınlaşır ve nuklear içerik yoğunlaşır. Spermatidin akrozomal bölgesi bazal kompartmana doğru yerleşecek şekilde döner.

➤ **Akrozomal Evre** : Akrozom, nukleusun üst üçte birlik kısmını örter ve sarmaya devam eder. Sitoplazmik mikrotübüller akrozomunun arka kısmından spermatidin arka kutba doğru uzanarak silindirik bir kılıf olan manşeti oluşturmak üzere organize olurlar.

Flagellum gelişimini önceden başlatan sentriyoller, geriye nukleus arkasına taşınırlar. Burada immatür sentriyol nukleustaki sığ bir oluğa tutunur. Sonra sentriyoller, gelişmekte olan spermin bağlantı parçasını ya da boyun bölgesini oluşturmak üzere şekillenirler. Nukleusa tutunmuş sentriyollerden 9 kalın fibril gelişir ve aksonem, mikrotübül periferinde kuyruğun içine doğru uzanarak dış yoğun fibrilleri oluşturur. Bu fibriller nukleus ve flagellumu birleştirir. Bu nedenle bu bölgeye **bağlantı parçası** denir.

Plazma membranı, oluşmaya başlayan flagellumu sarmak üzere posteriyore hareket ederken, manşet kaybolur ve mitokondriler, boyun bölgesindeki kaba fibrillerin etrafında ve posteriyor uzantısında sıkı bir kılıf oluşturmak üzere sitoplazmanın kalan kısmından göç ederler. Bu bölgeye **orta parça** denmektedir. Orta parçanın distalinde uzunlamasına çok sayıda bağlantı kuşağından oluşan bir fibröz kılıfı, esas parçanın 9 longitudinal fibrilini çevreler ve flagellumun ucuna kadar uzanır. Flagellumun, fibröz kılıfın distalinde kalan bu kısa segmenti **son parça** olarak adlandırılır.

➤ **Olgunlaşma Evresi (Maturasyon)** : Flagellum etrafındaki fazla sitoplazma azalır ve olgun spermatozoon oluşur. Rezidüel cisimsik denem bu yapılar sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirler.



Şekil 21: Spermiojenezin şematik gösterimi (15)

Olgun ve Matür Sperm Yapısı

Olgun sperm yapısı 60 µm uzunluğundadır. Sperm başı yassıdır. Nükleusun anterior kısmındaki akrozomal kep; hiyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akzokrin denen tripsin benzeri proteaz içerir. Bu enzimler, ovaryumda zona pelusidanın delinmesinde görevlidir. Sperm, ovaryum ile temas ettiğinde akrozomal enzimler salıverilirken akrozomal evrenin ilk basamağı gerçekleşmiş olur. Bu süreç, sperm penetrasyonunu ve fertilizasyonu kolaylaştırılmasını sağlar.

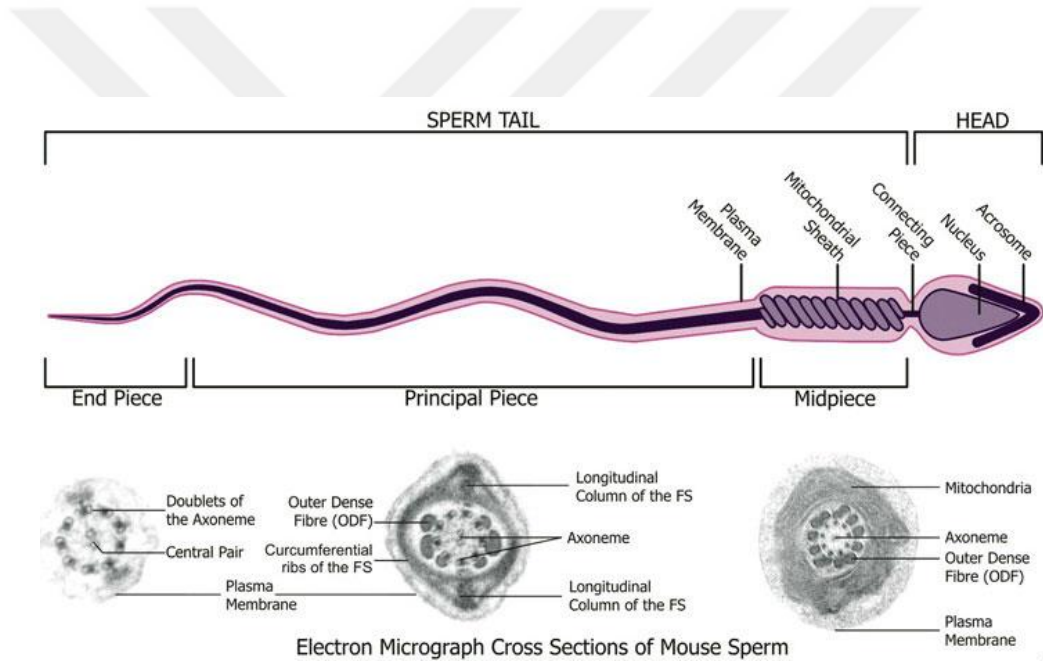
Olgunlaşan sperm, temelde baş ve flagellum olmak üzere 2 kısımdan oluşur (20). Bir bağlantı parçası ile baş, kuyruğa bağlanmıştır. Sperm kuyruğu (flagellum); orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 3 kısma ayrılır. Bağlantı parçası, 1 çift sentriyol içeren dar bir parçadır. Distal sentriyol aksoneme kaynaklık eder. Burası sperm kuyruğunun merkezi bir parçasıdır. Orta parça, mitokondrileri içerir. Mitokondriler, kalın fibrillerin ve aksonemal kompleksin etrafında sarmal şeklinde dizilmişlerdir. Bunlar, kuyruk hareketi için gerekli enerjiyi sağlayarak sperm hareketini kolaylaştırırlar. Esas parça, kalın fibriller ve aksonemal kompleks dışındaki fibröz kılıfı içerir. Son parça, yalnızca aksonemal kompleksi içerir ve yaklaşık 5 µm uzunluğundadır.

Yeni salgılanan sperm hücresi hareketsizdir ve sertoli hücrelerince salgılanan bir sıvı içinde seminifer tübüllerden taşınırlar. Tübülün segmenti olan düz tübüllere giderler.

Mediastinum testiste sıvı ve sperm, tek katlı kübik epitel ile döşeli bir rete testise girer. Buradan duktuli eferentesin ekstraselüler kısmına ve sonra duktus epididimisin proksimaline geçerek burada hareket yeteneği kazanırlar ve bazı olgunlaşma aşamalarından geçerler (Şekil 22).

Bunlar şu şekildedir;

- ✓ Nukleus DNA'sının yoğunlaşması : sperm başının boyutunu azaltır.
- ✓ Sitoplazmanın daha da azalması : sperm hücresi daha ince hale gelir.
- ✓ Plazma membranının lipidlerinde, proteinlerinde değişimler ve glikolizasyon
- ✓ Dış akrozomal membrandaki değişimler (dekapasitasyon): Sperm hücresinin fertilizasyon yeteneğini inhibe etmek amacı ile yüzey ilişkili dekapasitasyon faktörü eklenir.



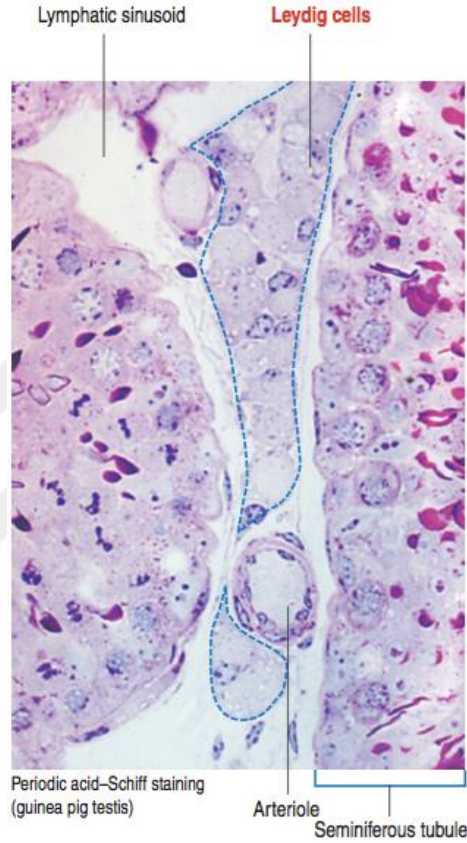
Şekil 22: Matür sperm yapı (26)

Epididimisten sperm hücresinin geçişi sırasında sperm hücre motilitesinin başlaması, intraselüler siklik adozin monofosfat (cAMP), Ca^{+2} düzeylerindeki interselüler pH'daki değişimler ile ilişkilidir. Bu faktörler, flageller aktiviteyi protein kinazların ve protein fosfatazların aktivitesi sonucunda oluşan protein fosforilasyonundaki değişimler üzerinden düzenlenir.

Distal kısmın ve daha geniş kanalların etrafındaki düz kasların kasılması, spermi epididimis kanalını distal kısmına ulaştırana dek, peristaltik hareketler devam eder. Bir süre burada depolanırlar ve canlı olarak 2-3 gün kalabilirler.

2.1.2.4.2. *İnterstitiyel Bağ Doku*

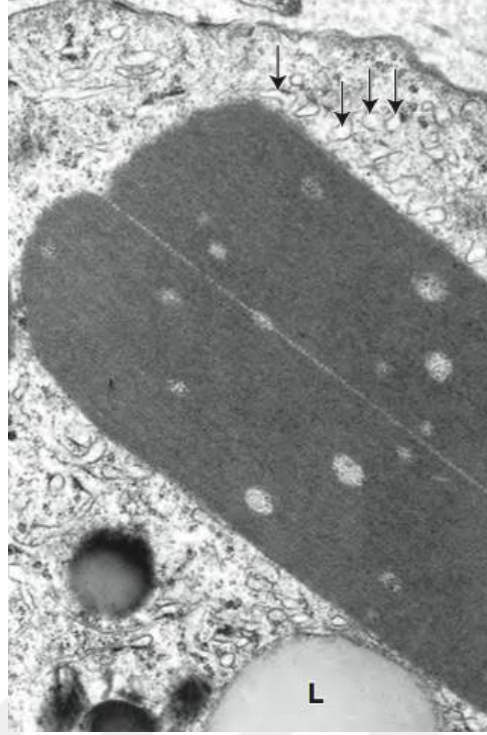
Tübüllerin arasını dolduran interstitiyel bağ doku; arteriyoller, lenfatik sinüzoidler ve leydig hücrelerinden oluşur (Şekil 23).



Şekil 23: Seminifer tübülün interstitiyel bağ doku görüntüsü (20)

2.1.2.4.2.1. *Leydig Hücreleri*

Leydig hücreleri, kan kapillerinin etrafında tek tek veya gruplar halinde bulunan hücrelerdir ve tipik olarak lipid damlacığı içerirler (16). Bu hücrelerde lipofuksin pigmentleri ve çubuk şekilli ayırt edici sitoplazmik kristaller olan reinke kristalleri bulunur (Şekil 24).



Şekil 24: Reinke kristallerinin elektron mikroskopik görüntüsü (16)

Steroid salgılayan hücrelerde bulunan aER ve tübülveziküler kristal mitokondriler içerir. Bundan dolayı Leydig hücreleri eozinofilik karakterdedir. Kolesterolde testosteron sentezi için gerekli enzimler a ER ile ilişkilidir.

Leydig hücreleri, erken fetal yaşam esnasında farklılaşarak testosteron salgırlar. Üreme fonksiyonu, embriyonik gelişim ve cinsel olgunlaşma için gerekli olan bu hormon;

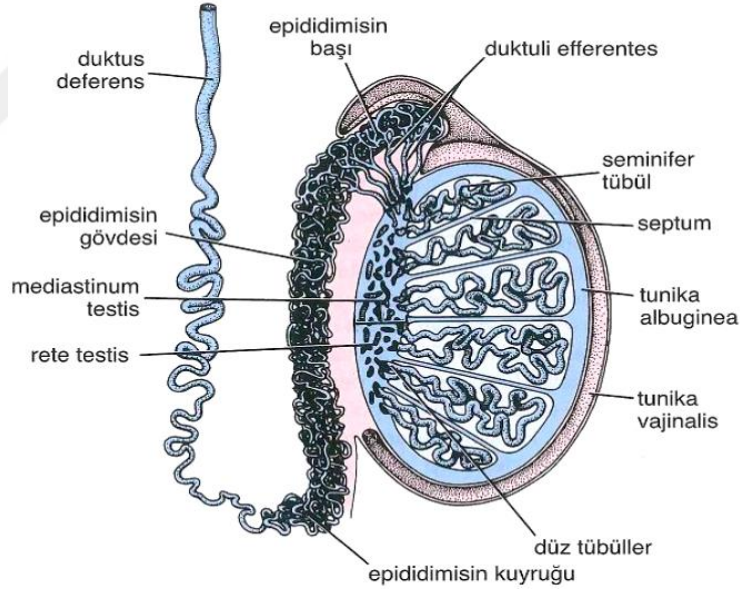
- Embriyoda, erkek fetusta testosteron ve diğer androjenlerin salgılanması, gonadların normal gelişimi için gereklidir.
- Pubertede, sperm üretiminin başlatılması, aksesuar cinsiyet bezlerin salgıları ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden testosteron hormonu görevlidir.
- Yetişkinde, spermatogenezin, sekonder seks karakterlerinin, genital boşaltım kanallarının ve yardımcı üreme bezlerinin devamlılığı açısından testosteron salgılanması önemlidir.

Leydig hücreleri, erkek fetusun farklılaşmasında aktiftir ve fetal hayatın 5.ayından itibaren inaktif olarak devam ederler. Bu inaktif Leydig hücreleri, yaşam boyu aktif olmak üzere pubertede gonadotropik stimülasyona maruz kalırlar ve yeniden androjen salgırlar.

2.1.3. Erkek Genital Boşaltım Kanalları

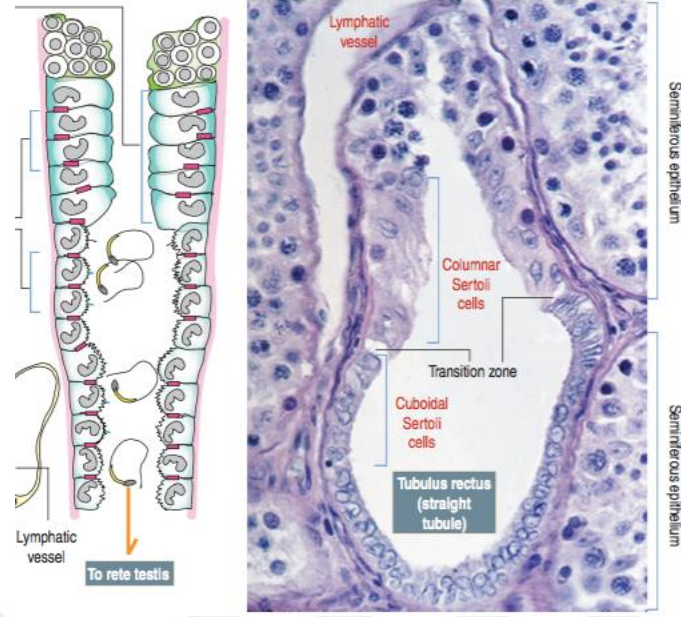
Testisin gelişim sürecinde Wolf kanalının farklılaşmasıyla ve leydig hücrelerince testosteron salgılanması ile birlikte spermi üretraya ve buradan vücudun dışına taşıyan genital boşaltım kanal sistemi stimüle olur (17) (Şekil 25). Bu kanallar sırası ile;

1. Tubuli rekti
2. Rete testis
3. Duktuli efferentes
4. Duktus epididimis
5. Duktus deferens (vas deferens)
6. Ampulla duktus deferens
7. Duktus ejakülatoryus
8. Üretra



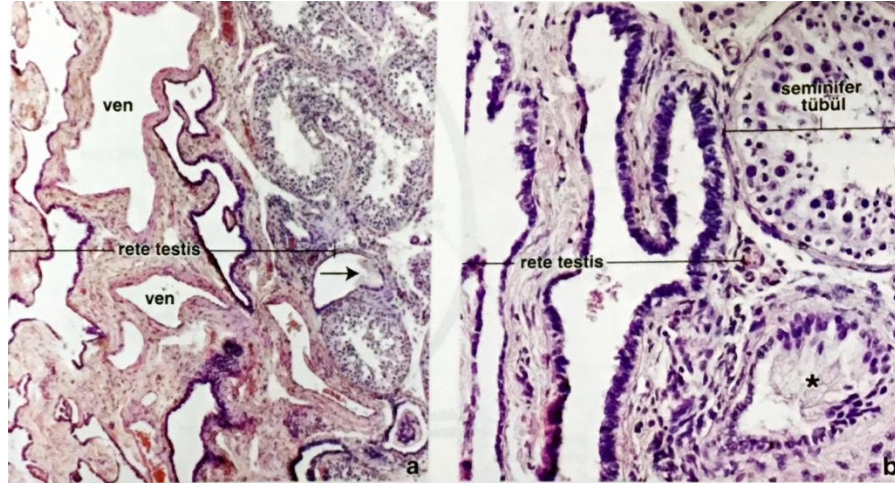
Şekil 25: Erkek genital boşaltım kanalları (16)

1. Tubuli rekti (Tübülüs rektus) : Her seminifer tübül ucunda tubuli rekti denen kanal bulunur. Bu kanal, seminifer tübülleri rete testise bağlarlar ve bunların kısa terminal bölümleri sertoli hücreleri ile döşelidir. Son kısma doğru tübül daralır ve artık tek katlı basit kübik epitel ile döşelidir (Şekil 26).



Şekil 26: Tubuli rektinin histolojik kesitte görüntüsü (20)

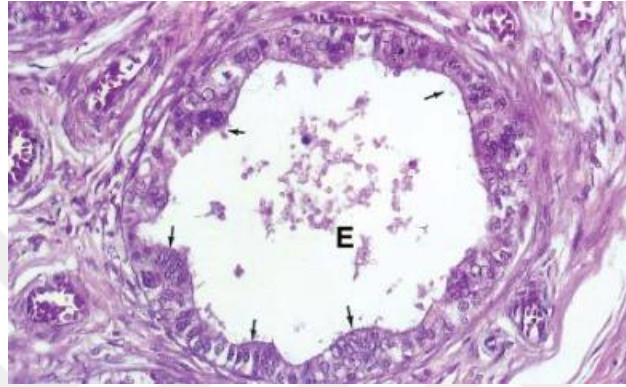
2. Rete testis : Testisin mediastinumun bağ dokusunda düzensiz halde anastomozlaşan kanallardan oluşur. Rete testis epitel, tek katlı basit kübik/alçak prizmatik epitel ile döşelidir. Epitel hücreleri bir apikal silyuma ve birkaç kısa apikal mikrovillusa sahiptir (Şekil 27).



Şekil 27: Rete testisin histolojik görüntüsü (16)

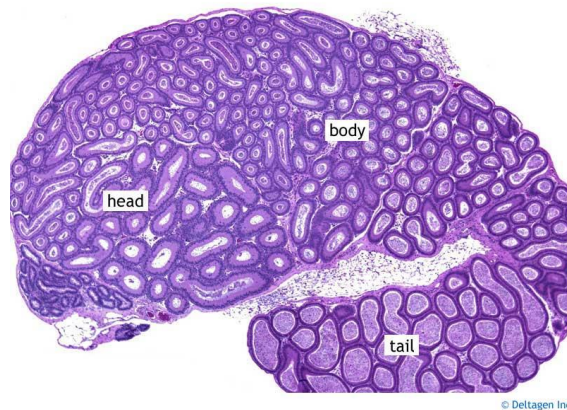
3. Duktuli efferentes : Rete testisin kanallarını duktus epididimisin proksimal parçasına bağlayan kanaldır. İnsanda yaklaşık 20 kanal şeklinde dizilidir. Kanalın epiteli, psödostratifiye epitel (yalancı çok katlı prizmatik epitel) ile döşelidir. Epitel, eferent kanalının tanınmasını sağlayan karakteristik taraklı hatlara sahiptir (Şekil 28).

Epitel, sil taşıyan prizmatik hücrelere, mikrovilluslu kübik hücrelere ve bazal hücreye sahiptir. Sil taşıyan yüksek prizmatik hücreler koyu asidofilik sitoplazmaya, pigment granülleri ve yağ damlacıkları ile karakterizedir. Sillerin hareketi, hareketsiz spermlerin ve salgıların epididimise taşınmasını sağlar. Alçak kübik mikrovilluslu hücreler ise apikallerinde kanaliküler invaginasyonlar ve lizozom içerirler. Epitelin ve onun bazal laminası altında, sirküler seyirli ince bir düz kas tabakası kanalın başlangıç kısımlarında ortaya çıkar.



Şekil 28 : Duktuli efferentesin histolojik görüntüsü (15)

4. Duktus epididimis : Testislerin superiyor ve posteriyor yüzleri boyunca uzanan hilal şekilli kanaldır. Spermatozoonların olgunlaştığı, 4-6 m uzunluğunda oldukça kıvrıntılı bir tübüldür. Anatomik olarak baş, gövde ve kuyruk olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır. Duktuli efferentes baş kısmını, duktus epididimis ise gövde ve kurtuk kısmını oluşturur (Şekil 29).



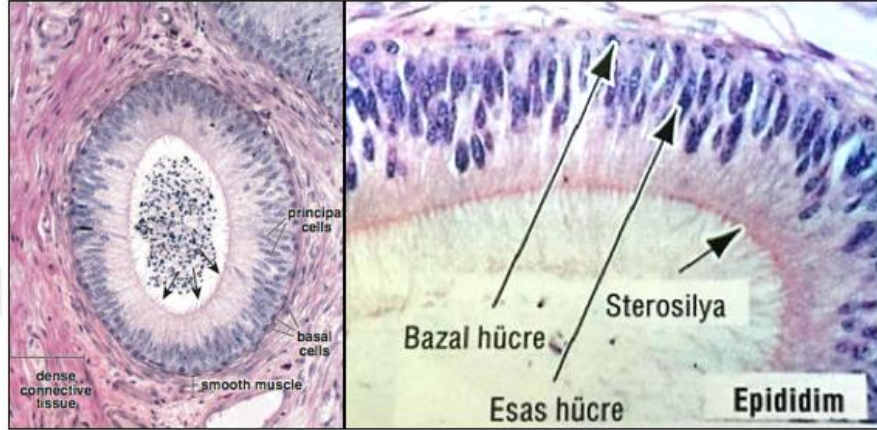
Şekil 29: Epididimisin kısımları

Epididimisin epitelini stereosilyalı psödostratifye epitel döşer ve epitelde 3 tip hücre vardır. Bunlar; esas (silindirik) hücre, bazal hücre ve halo hücreleridir (Şekil 30).

✓ Esas (silindirik) hücre; epididimisin baş kısmında yüksek prizmatik iken, kuyruk kısmında alçak prizmatik şekillidir. Esas hücrenin apikalinde stereosilya denen, uzun, modifiye mikrovilluslar vardır.

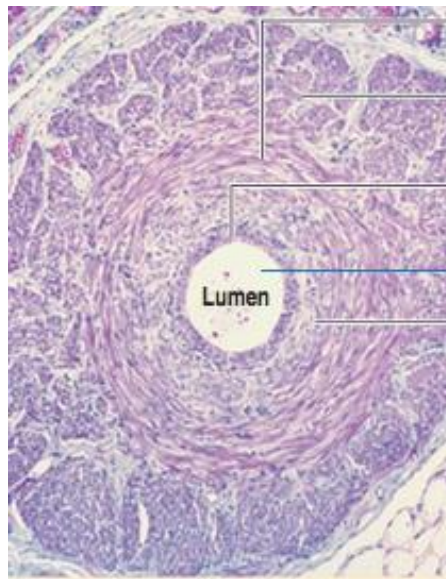
✓ Bazal hücre; epitelin kök hücreleri olup bazal lamina üzerine oturan küçük, yuvarlak hücrelerdir.

✓ Halo hücreleri; göç eden lenfositler olarak bilinen hücrelerdir.



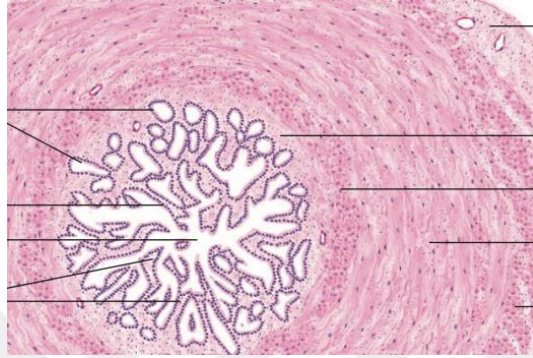
Şekil 30: İnsan duktus epididimisinin histolojik görüntüsü (14, 17)

5. Duktus deferens (Vas deferens): Epididimisin kuyruk kısmından prostatik üretraya kadar uzanan kanaldır. Vas deferens, testisin posteriyor sınırı boyunca testiküler damarlara ve sinirlere yakın olarak yükselir. Sonrasında spermatik kordun komponenti olan inguinal kanaldan geçerek abdomene doğru iner (Şekil 31).



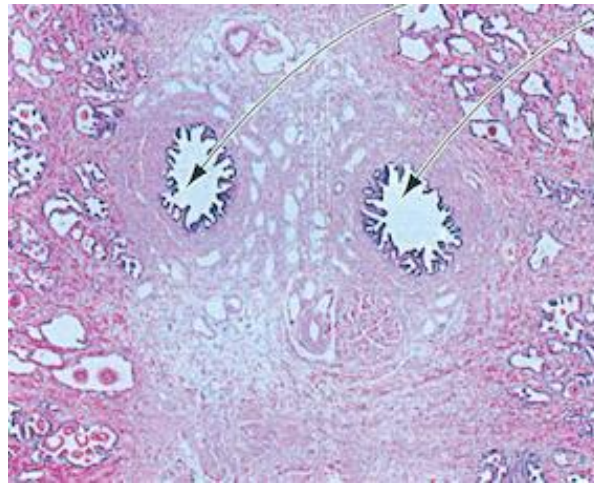
Şekil 31: Duktus deferensin histolojik görüntüsü (16,20)

6. Ampulla duktus deferens : Duktus deferens, prostata girmeden önce bir genişleme yaparak ampulla duktus deferens oluşturur. Duktus deferense göre lümeni daha geniş, epiteli daha kalın ve mukozasındaki kıvrımlar daha fazla ve kas tabakası daha az düzenlidir. Epiteli tek katlı kübik veya tek katlı prizmatik epitelidir. Hücreler sitoplazmalarında bol salgı granülü ve sıkça rastlanan sarı renkli pigment bulundurur (Şekil 32).



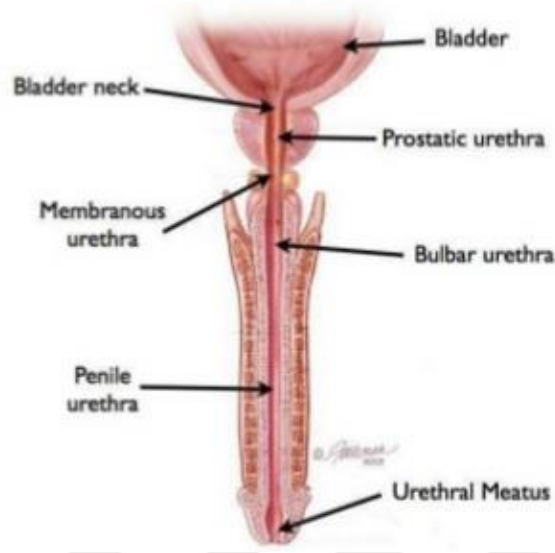
Şekil 32: Ampulla duktus deferensin histolojik görüntüsü (27)

7. Duktus ejakulatoryus: Ampulla duktus deferens, vezikula seminalis ile birleşir ve duktus ejakulatoryusu oluşturarak prostat bezinin içinde üretraya kadar devam eder. Yaklaşık 2 cm uzuluğundadır. Epiteli, psödostratifiye veya tek katlı prizmatik olup mukozası kıvrımlıdır. Üretraya yakın kısımda epitel üretra epiteline dönüşür. Lamina propriyası ise elastik fibrilden zengin bağ dokusudur (Şekil 33).



Şekil 33: Duktus ejakulatoryusun histolojik görüntüsü (20).

8. Üretra: İdrarı, mesaneden eksternal üretral açıklık yolu ile dışarı taşıyan fibromusküler bir tüptür. Yaklaşık 20 cm uzunluğunda olup 3 bölümden oluşmaktadır. Sırası ile; prostatik üretra, membranöz üretra ve penil (spongiyöz) üretradır (Şekil 34).



Şekil 34: Üretranın kısımlarının şematik görüntüsü (28)

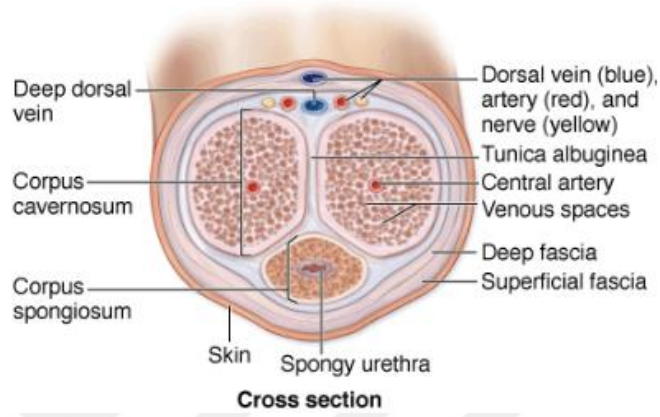
Ayrıca cowper bezinin kanalları ve mukus salgılayan üretral bezler (littre bezleri) penil üretraya boşalır (Şekil 35).



Şekil 35: Penil üretranın histolojik görüntüsü (15)

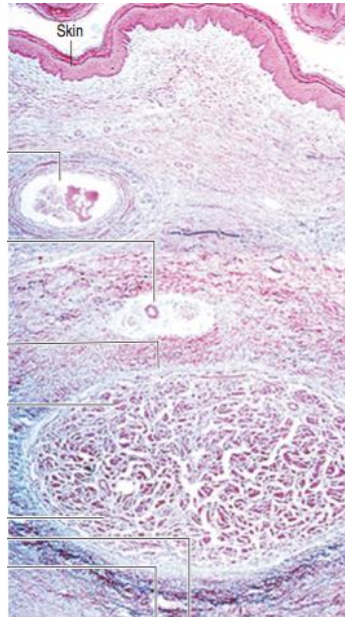
2.1.4. Penis Histolojisi

Penis, idrar ve semenin atılma yolu ve kopulasyon organıdır. Başlıca 2 dorsal erektil doku kütlesi olan korpus kavernozumdan ve 1 ventral doku kütlesi olan korpus spongiyumdan oluşur. Bu 3 parçanın etrafını tunika albuginea denen sıkı bir bağ dokusu sararak kapsül oluşturur (Şekil 36).



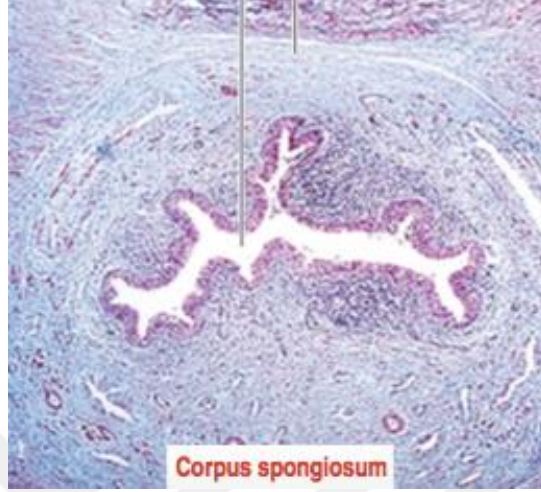
Şekil 36: Penisin histolojik görüntüsü (15)

➤ **Korpus kavernozum** : 2 erektil doku kütlesi arasında septum pektiniformis bulunur. Bu yapı, penis kökünde en kalın olup, öne doğru inceler. Korpus kavernozum, çok sayıda düzensiz şekilli vasküler boşluklar içerir ve vasküler endotelle döşelidir. Korpus kavernozumunu saran tunika albuginea tabakası kalın olup, içte sirküler dışta longitudinal kollajen fibriller ile karakterizedir (Şekil 37).



Şekil 37: Korpus kavernozumun histolojik görüntüsü (20)

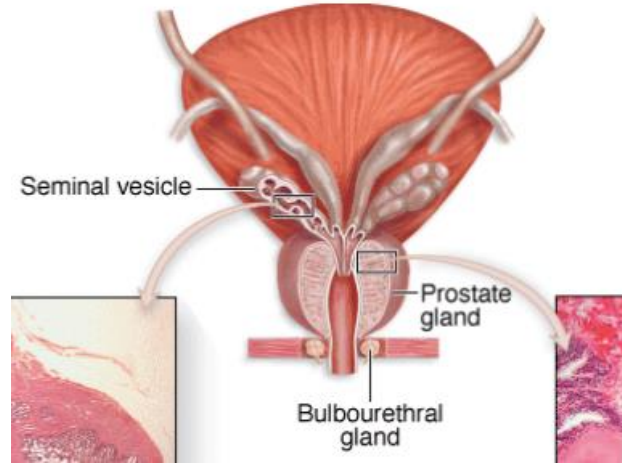
➤ **Korpus spogiyozum** : Korpus spongiyozumun içinde üretranın spongiyoz parçası yer alır. Laküna çapları korpus kavernozum ile aynı olup, tunika albuginea tabakası daha incedir ve elastik fibrilden zengin yapıdadır. Üretra çevresinde mukozal ven pleksusuna, periferde tunika albugineanın iç yüzeyindeki venlere açılırlar (Şekil 38).



Şekil 38 : Korpus spongiyozumun histolojik görüntüsü (20)

2.1.5. Yardımcı Üreme Bezleri

Erkek üreme sisteminin yardımcı bezleri; veziküla seminalisler, prostat bezi ve bulboüretral bezler (cowper bezleri)dir (Şekil 39).

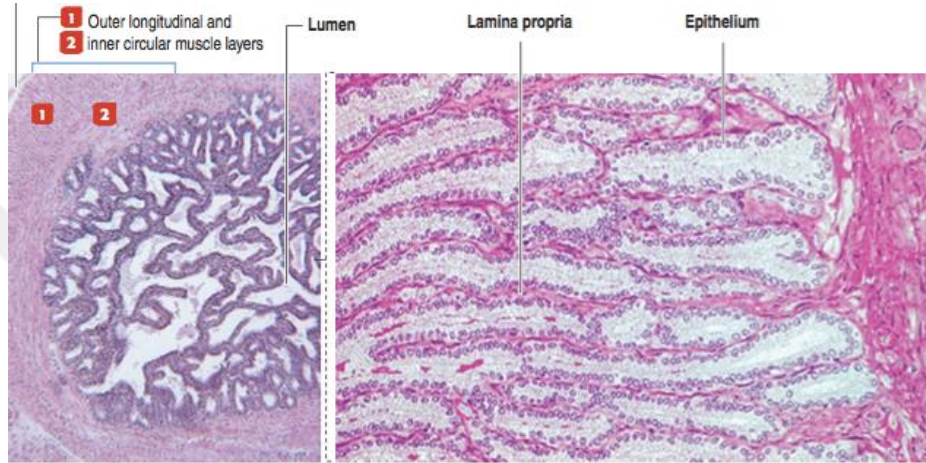


Şekil 39: Erkek yardımcı üreme bezlerinin makroskopik olarak şematik görüntüsü (15)

➤ **Veziküla Seminalis** : Mesanenin posteriyor duvarının üzerinde, duktus deferensin ampullasına paralel konumlanmış, mukozal katlantıları yoğun olan bir çift tübüler bezlerdir. Bu bezler, mezonefrik kanalın (Wolf) gelecekteki ampullayı oluşturacak olan bölgesinin

evajinasyonları olarak gelişirler. Her bir vezikula seminalisin boşaltım kanalı, duktus ejakulatoryusu oluşturmak üzere duktus deferensin ampullası ile birleşir (16).

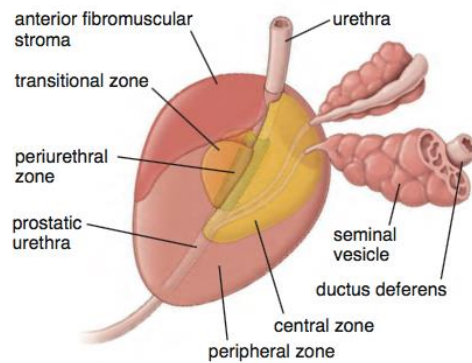
Vezikula seminalisler, sperm için temel substrat görevi gören prostoglandinler, askorbik asit, flavin ve früktoz içeren bir sıvı salgırlar. Bu salgı, beyazımsı sarı renkte olup visköz bir materyaldir ve insan seminal sıvısının yaklaşık %50-70'ini oluşturmaktadır. Vezikula seminalisin salgılama fonksiyonunun salgılama fonksiyonu ve morfolojisi testosteronun kontrolü altındadır (Şekil 40).



Şekil 40 : Vezikula seminalisin histolojik görüntüsü (20)

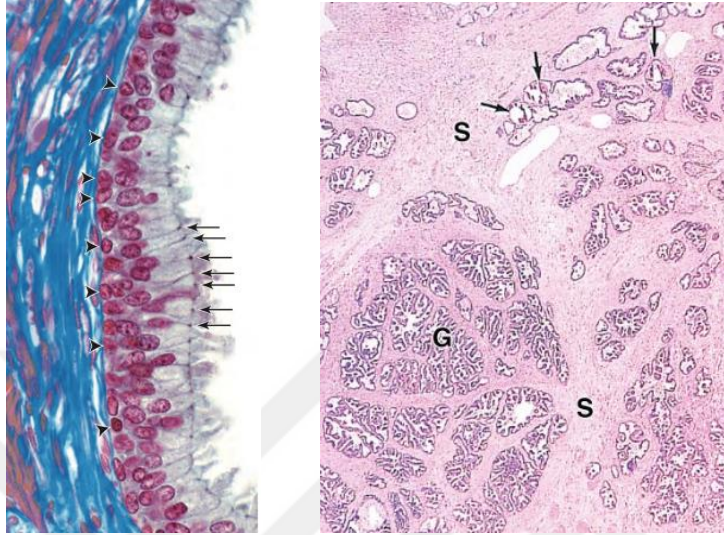
➤ **Prostat Bezi** : Erkek üreme sisteminin en büyük yardımcı üreme bezidir. Bez, pelvis içinde mesanın altında yer alır ve üretranın prostatik parçasını çevreler. Burada, üretraya boşalan yaklaşık 30-50 kadar tübüloaveolar bezden oluşmaktadır. Prostat bezinin temel fonksiyonu, seminal sıvının oluşumuna katkıda bulunacak olan şeffaf, hafif alkali bir sıvı salgılamaktır.

Yetişkin prostat parankimi anatomik ve klinik olarak 4 zona ayrılmaktadır. Bunlar; merkezi zon, periferik zon, transizyonel zon (geçiş zonu) ve periüretral zondur (Şekil 41).



Şekil 41: İnsan prostat bezinin zonlarını gösteren şematik diyagram (16)

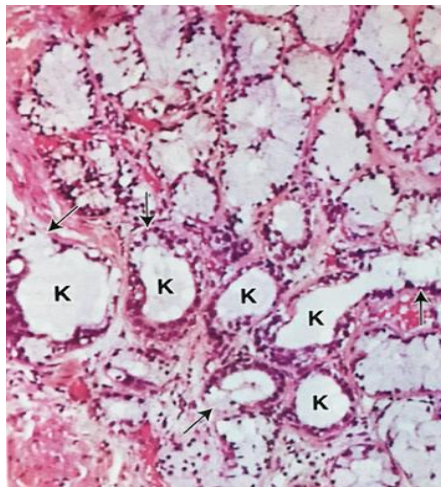
Prostat bezinin epiteli işleve bağlı olarak tek katlı prizmatik, kübik veya psödostratifiye tipte olabilir. Hücreler bol miktarda granüllü endoplazmik reitkulum ve golgi aygıtı içerir. Bu epitelin salgıları; prostatik asit fosfataz (PAP), prostatik spesifik-antijen (PSA), sitrik asit ve fibrinolizindir (Şekil 42).



Şekil 42: İnsan prostat bezinin histolojik görüntüsü (Mallory azan-H&E) (15,16).

➤ **Bulboüretal bezler (Cowper bezleri)** : Ürogenital diyaframda yer alan 1 çift bezelye büyüklüğünde bezdir. Küçük, yuvarlak görünümlü, mukus salgılayan bezlere benzeyen tübüloaveolar bezdir. Bezlerden her birinin kanalı, ürogenital kanalın inferiyor fasiyansından geçerek penil üretranın başlangıç parçası ile birleşir.

Bez epiteli tek katlı prizmatik tipte olup epitel, testosteronun kontrolü altındadır. Epitelin salgısı berraktır. Mukus benzeri bu salgı; galaktozamin, galakturonik asit, sialik asit ve metilpentoz içerir (Şekil 43).



Şekil 43: İnsan bulboüretal bezinin histolojik görüntüsü (16)

2.2. Radyasyon

Radyasyon, doğal ya da yapay radyoaktif çekirdeklerin kararlı yapıya geçebilmek için dışarı saldıkları hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga şeklinde taşınan fazla enerjilerdir. Radyasyon, yapısına göre 2 tip içerir; 1. Parçacık tipi radyasyon, 2. Dalga tipi radyasyon. Parçacık tipi radyasyon, belli bir kütle ve enerjiye sahip çok hızlı hareket eden atomik boyuttaki parçacıkları ifade ederken, dalga tipi radyasyon belli bir enerjiye sahip, ancak kütlesi olmayan ve ışık hızıyla hareket edebilen radyasyon tipidir. Radyasyon, enerjilerine göre ise iyonize ve iyonize olmayan radyasyon olmak üzere iki çeşittir (1).

Radyasyon sınıflandırılması genel olarak aşağıdaki gibidir (2).

➤ Non-iyonize (iyonlaştırıcı olmayan) radyasyon :

- Radyo dalgaları
- Mikrodalga-Kızılötesi ışınları
- Görünen ışık (kırmızı, turuncu, sarı, yeşil, mavi, mor)
- Mor ötesi ışınlar

➤ İyonize (iyonlaştırıcı) radyasyon :

- X-ışınları
- Gama ışınları
- Kozmik ışınlar

➤ İyonize (iyonlaştırıcı) partiküler radyasyon

- Beta parçacıkları
- Alfa parçacıkları
- Nötronlar

2.2.1. Radyasyon Birimleri

Radyoaktivite birimi : Radyoaktif parçacıkların fazla enerjilerini çevreye radyasyon yayarak gidermelerine ‘radyoaktivite’ denir. Birimi Becquerel (Bq)’dir.

Işınlama dozu birimi : X veya gama ışınlarının havayı iyonlaştırma kapasitesinin bir ölçüsüdür. Birimi C/kg’dir. Özel birimi ise Röntgen (R)’dir.

Soğurulan doz birimi : Işınlanan maddenin 1 kg’ına 1 Joule enerji veren radyasyon miktarıdır. Birimi Gray (Gy)’dir. Özel birimi ise rad (radiation absorbed dose)’dır.

1 rad = 0,01 Gy

Eşdeğer doz birimi : Birimi J/kg olup özel adı Sievert (Sv)’dir. Özel birimi ise rem (Röntgen equivalent man)’dir.

2.2.2. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri

İyonize radyasyon, çarptığı maddede yüklü parçacıklar (iyonlar) oluşturabilen radyasyondur. İyonlaşma, radyasyon ile etkileşen bir maddede ve insanlar dahil tüm canlıların vücudunda oluşabilir. İyonize radyasyonun canlı organizmalar üzerinde olumsuz biyolojik etkilere sebep olduğu ve bu yan etkilerin de radyasyonun dozuna ve maruz kalış süresine göre değiştiği bilinmektedir (2). ICRP (Uluslararası Radyolojik Koruma Komisyonu)'de, radyasyonun vücudun her doku veya organı üzerinde farklı etkiler yarattığı ve zararlı etkilerinin vücudun tümü veya bir bölümünün ışınlanmasına göre de değişkenlik gösterdiği ifade edilmiştir (29).

İyonize radyasyon DNA üzerindeki etkisini direkt ve indirekt etki ile oluşturur. Direkt etki, doğrudan molekülün üzerinde, o molekülün yapısını bozacak şekilde gösterilen etkidir. Direkt etkide hasar, biyolojik sistemlerdeki atomlardaki iyonizasyon sonucu ortaya çıkar. Bu da molekülün inaktivasyonuna veya fonksiyonel değişikliğine neden olur. İndirekt etki, su moleküllerinde görülen etkidir. İnsan vücudunun %80'i su içermektedir. Suyun iyonizasyonu ile ortaya çıkan serbest radikallerin, molekülün yapısını bozması ile oluşur.

İyonize radyasyon tarafından yapılan hücresel hasar, reaktif oksijen radikallerinin (ROS) üretimine aracılık etmektedir. İyonlaştırıcı radyasyon, hücrelerdeki suyun radyolizi sırasında serbest radikal oluşumu nedeniyle canlı hücrelere zarar verebilir. Suyun radyolizini oluşturan reaktif türlerden 3 tanesi; sulu elektron, hidrojen radikal (H) ve hidroksil radikalleri (OH)'dir. OH, hücrelerdeki en zarar verici serbest radikaldir. Hücre zarı lipidlerinin yüksek miktarda oluşu, lipid peroksidasyonu, hücre zarı yıkımı ve serbest oksijen radikallerinin doku hasarına neden olan ana faktörlerden biri için önemli bir nedeni olarak kabul edilir. Lipid peroksidasyonunun son ürünü, son derece sitotoksik olan ve antioksidan enzimlerinin hareketini önleyen melondialdehit (MDA)'tir (7).

Radyoterapi olarak bilinen iyonize radyasyon, kanserli hücre sitotoksitesini indüklemeye yeteneğine sahip olan malign tümörlere sahip hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu hastaların yaklaşık 2/3'sine (prostat kanseri, yumuşak doku sarkomu, servikal kanseri vs.) tedavilerinin bir parçası olarak radyoterapi uygulanır (30).

Oksidatif stres, serbest radikal ürünü veya düşük bir antioksidan, savunma ve yapısal ve işlevsel değişiklikler yaparak biyomoleküllerin kimyasal değişikliklere uğraması sonucu ortaya çıkmaktadır. ROS'un jenerasyonu, ışınlama kaynaklı doku hasarının patogenezinde önemli bir rol oynar. İyonize radyasyonun biyolojik ve öldürücü etkileri için birincil hedef

hücresel DNA hasarıdır. Buna ek olarak DNA, lipidler ve proteinler iyonize edici radyasyon ile indüklenen serbest radikaller tarafından saldırıya uğrar. Bu nedenle ROS oluşumunu inhibe eden ve ortadan kaldıran ilaçlar, zarar gören normal dokuya iyonize radyasyon uygulanarak bunun iyileştirici etkisi ile kanserli hastalar için öneme sahip olabilir (31).

2.2.3. Radyasyonun Testis Üzerindeki Etkileri

Radyasyona en duyarlı organ üreme organı ve bunların hücreleridir. Bu hücrelerden ışınlanmaya en duyarlı olanı spermatogonium'lardır (4,5). 0.1-1.2 Gy ile verilen radyasyon hasarında, spermatogoniumların bölünmesi zarara uğrayarak, oligozoospermi ile sonuçlanabilir (32).

Testis, en radyosensitif organ olmasının yanısıra farklı derecelerde farklı radyosensitivite gösteren hücrelere sahiptir. Bu nedenle radyasyon etkilerinin ekspresyonu, doza maruz kaldıktan sonra geçen süreye bağlıdır. Fertilitede radyasyonun akut doz ile öldürücü etkisi iyi bilinmektedir. Germ hücreleri, kısa süreli radyasyona maruz kalma sonucunda zarar görmüş veya ölmüştür (33).

Radyasyonun sıçanlarda ve insanlarda erkek gonadal doku üzerindeki etkileri, farklılaşan spermatogoniyaların eliminasyonu ve daha iyi gelişmiş spermatogonik hücrelerin depleksiyonunu içerir. Farklılaşan spermatogoniyalar çok radyosensitiflerdir ve 3 Gy'den düşük dozlarda ölürler. Çok fazla radyodirenç gösteren kök hücre olan spermatogonia, 3-4 Gy uygulandığında ölmez ve ışınlama sonrası seminifer epitel yeniden oluşturulur (33).

Daha yüksek dozlarda, örneğin 6 Gy'den sonra yaklaşık 2 yıl, 0.5 Gy'den sonra ise yaklaşık 8 ay azoospermi görülebilir ve daha sonra tekrar sperm üretiminin düzgün hale gelebilmesi birkaç yıl kadar sürebilir. Kanser tedavisinde kullanılan fraksiyone radyoterapi, tek doz uygulanan testislere göre daha toksiktir ve tedaviden 5 yıl sonra bile spermatogenezin iyileşmesiyle sonuçlanmayabilir; bu da tüm kök hücrelerin ölmüş olabileceğini düşündürür (34).

Spermatogenez; uzun ve karmaşık bir süreçtir. Gelişen sperm hücreleri, endojen ve eksojen streslere karşı duyarlıdır. Sitotoksik ajanlara maruz kalındığında somatik testiküler hücreler veya farklılaşmanın farklı evrelerdeki germ hücreleri zarar görebilir, bu da geçici veya kalıcı fertilité sorunlarına yol açabilir (3).

Germ hücrelerinin apoptozu, ışınlanmış testisteki hasardan sorumlu mekanizma olarak bildirilmiştir. İyonlaştırıcı radyasyona maruz kalan testiste, öncelikli aktif olarak bölünen spermatogonia ve preleptoten spermatositler etkilenecek germ hücrelerini apoptoz için

indükler. Diğer taraftan testiküler somatik hücreler, germ hücrelerinin radyasyona karşı dirençli olduğunu destekler. Örneğin, sertoli hücrelerinin ve leydig hücrelerinin radyasyon ile indüklenen apoptoza karşı dirençli olduğu gösterilmiştir (6).

Bazı kimyasalların (radyoprotektanlar), radyasyona bağlı normal doku yaralanmalarına karşı hücreleri korudukları gösterilmiştir (7). Bu amaçla özellikle antioksidanların kullanımı, normal dokuların korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (8). Bu ajanların koruyucu özellikleri, antioksidan aktivite tarafından oluşturulan serbest radikalleri temizlenmesi esasına dayanır (7).

Testiste, radyasyondan etkilenecek diğer önemli komponent de kan testis bariyeridir. Kan testis bariyeri, semifer tübüllerde sertoli hücrelerinin birbirleriyle zonula okludens bağlantıları ile bağlanarak germ hücrelerini immün reaksiyondan korumak amacı ile oluşan bariyerdir (9). Adluminal kompartmandaki spermatositler ve spermatidler genelde ışınlamaya daha az duyarlıdır ve hücrelerin matürasyonunda sorun olursa testiste kayıplar meydana gelebilir (10). Diğer yandan destekleyici sertoli hücreleri ve leydig hücreleri, radyasyona karşı oldukça dirençlidir (10). Testiste radyasyon hasarı, sertoli hücrelerini birbirine bağlayan zonula okludens ve occludin bağlayıcı proteinlerini de etkileyerek yapının bozulmasına yol açmaktadır (11).

2.3. Reaktif Oksijen Radikalleri (ROS)

Canlılar, yaşamlarını sürdürebilmek için oksijene (O_2) ihtiyaç duyar. Total O_2 tüketiminin %90 kadarından elektron transport zinciri, %5-10 kadarından da O_2 'nin ihtiyaç duyulduğu diğer reaksiyonlar sorumludur. Elektron transport zincirinde moleküler O_2 , glukoz, yağ asitleri ve amino asitlerin yapısındaki karbon iskeleti gibi yakıtlardan ortaya çıkan NADH ve $FADH_2$ 'den elektron alıp suya indirgenir. Burada O_2 'nin kuvvetli oksitleyici gücü ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağı haline dönüştürülür (35). Moleküler O_2 , paralel spin haldeki iki eşlenmemiş elektron içerir. Bu eşlenmemiş elektrona sahip atom, atom grupları ya da moleküller serbest radikaller olarak isimlendirilir. Bunlar, bir ya da daha çok eşlenmemiş elektron içerir. Kararsız yapıda ve kısa ömürlü olup molekül ağırlıkları düşüktür.

Serbest radikaller, besinlerin O_2 kullanılarak enerjiye dönüşümünde oluşan reaktif moleküllerdir. Bu moleküller hücrede endojen ve ekzojen olmak üzere 2 etkenden kaynaklanırlar. Bu etkenler içinde; hava kirliliğine neden olan fitokimyasal maddeler, demir,

bakır, kadmiyum gibi metal iyonlar, iyonize ve ultraviyole radyasyon, parasetamol, asetaminofen, bleomisin gibi ilaç toksikasyonları sayılabilir (36).

Oksidatif stresin diğeri bir nedeni de kurşun ve kadmiyum vb. çevre kirleticiler ile uzun süre etkileşmek olabilir. Oksidatif stres, vücutta bulunan antioksidan savunma sistemi ile serbest radikal oluşumu arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır (36). Oksidatif stres ile birlikte oluşan ve ROS olarak bilinen bu moleküller lipid, protein ve DNA'ya zarar verir.

ROS çeşitleri, oksijen metabolizması esnasında az miktarda ortaya çıkan **süperoksit radikali (O_2^-)**, **hidrojen peroksit (H_2O_2)** ve **hidroksil radikali ($OH\cdot$)**dir.

➤ **Süperoksit radikali (O_2^-)** : Pek çok aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alıp indirgenmesi yolu ile ortaya çıkar. İndirgenen metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali oluşturabilir. Süperoksit radikali, hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliktedir. Bu radikal anyon hem hidrojen peroksit kaynağı hem de geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir (35).

➤ **Hidrojen peroksit (H_2O_2)** : H_2O_2 , 2 yolla oluşur. 1. Süperoksidin etrafındaki moleküllerden bir elektron alması, 2. O_2 'nin etrafındaki moleküllerden iki elektron alması ile oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi. Süperoksidin dismutasyonu biyolojik sistemlerde H_2O_2 'in asıl üretimine sebep olur. Süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki süperoksit molekülü iki proton alıp H_2O_2 ve O_2 açığa çıkarırlar. Radikal olmayan ürünler, reaksiyon sırasında oluştuğundan dismutasyon reaksiyon olarak da tanımlanır. Bu durum spontan olarak gerçekleşir veya süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile katalizlenir.

H_2O_2 , süperoksit grubundan daha zayıf etkiye sahiptir. Dokulardaki glutatyon peroksidaz (GP_x), katalaz, peroksidaz vs. enzimler ile su ve O_2 gibi daha zayıf etkiye sahip ürünlere dönüştürülür (36).

➤ **Hidroksil radikali ($OH\cdot$)** : Suyun, yüksek enerjiye sahip radyasyon ile etkileşmesi sonucu oluşur. Reaktif oksijen radikallerinin en güçlüsüdür. İleri derecede reaktif bir oksidan radikali olup, yarılanma ömrü çok kısadır. Açığa çıktığı yerde tiyol ve yağ asitleri vb. birçok molekülden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS), karbon merkezli organik radikaller (R), peroksit radikalleri (ROO) gibi radikallerin açığa çıkmasına sebep olarak bu da büyük hasar bırakmaktadır (35).

2.3.1. *Reaktif Oksijen Radikallerinin Etkileri*

ROS oluşumu, enflamasyon, yaşlanma, ozon, kimyasal maddeler ve ilaçlar vb. uyarıların etkisi ile artar. Bu radikaller hücrelerde karbonhidrat, lipid, protein, DNA ve enzim gibi bileşenleri etkileyerek hücre hasarı oluşturur.

• **Serbest radikallerin lipidlere etkileri** : Serbest radikallerin etkilerinde en duyarlı biyomoleküller lipidlerdir. Süperoksit gruplarının açığa çıkardığı singlet oksijen, hücre membranlarında gliserid, fosfolipidler, glikolipidler ve sterol yapısında bulunan doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer ve etan, pentan, aldehitler vb. lipid peroksidasyon son ürünlerini meydana getirir. Lipid peroksitler, indirgenmiş glutatyon (GSH) bağlı olan selenyum içeren bir enzim olan GS-peroksidaz ile lipid alkollere dönüştürülerek inaktive edilirler. Ancak hem süperoksit grupları ile çok fazla lipid peroksidin şekillendirilmesi, hem selenyum eksikliği, hem de dioksin gibi GSH'ın tükenmesine neden olan maddelerin varlığı, serbest lipid gruplarının oluşmasına neden olmaktadır (36). Ortamdaki demir ve bakır iyonları da peroksidasyonu hızlandırmaktadır.

Lipid peroksidasyonunun en önemli son ürünü malondialdehid (MDA) dir. MDA, üç veya daha fazla sayıda bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşur. Aerobik ortamda ortaya çıkan bu radikaller, lipoproteinlerde ve hücre zarında bulunan lipidlere oksidasyon ile sonuçlanır. Lipid hidroperoksitleri ile yıkımı sonucu oluşan düşük molekül ağırlıklı MDA, lipid peroksidasyonunun indeksi olarak kabul edilir.

MDA, hücre membranlarında iyon alışverişini etkileyerek membran bileşiklerinde çapraz bağlanmasına sebep olur ve iyon geçirgenliği ile enzim aktivitesinin değişimi gibi hasarlar oluşturabilir. Bu özelliği nedeniyle, DNA'daki bazlarla reaksiyona girerek mutajen hücre kültürlerinde genotoksik ve karsinojeniktir (37).

Nonenzimatik lipid peroksidasyonu zararlı bir zincir reaksiyondur. Direkt ve indirekt olmak üzere 2 yoldan etki eder; direkt olarak membran yapısını etkiler; indirekt yoldan ise ürettiği reaktif aldehitler ile hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece dokuda hasar oluşturarak pek çok hastalığa yol açar.

• **Serbest radikallerin proteinlere etkileri** : Proteinler, lipidlere göre serbest radikallerden daha az etkilenirler. Etkilenme dereceleri aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Histidin, triptofan, sistein, tirozin, gibi aminoasitlere sahip proteinler daha kolay etkilenirler. Bunun sonucunda, yapısında fazla sayıda disülfid bağı içeren IgG ve albumin vb. proteinlerin tersiyer yapılarında bozulma meydana gelir ve normal olarak işlev

göremezler. Hem proteini olarak bilinen hemoglobin de serbest radikallerden çok fazla zarar görür. Oksihemoglobinin hidrojen peroksit ve süperoksit radikaliyle reaksiyona girmesi methemoglobin oluşumuna yol açar.

• **Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkileri** : İyonlaştırıcı radyasyon sonucu açığa çıkan serbest radikallerin DNA ile etkileşimleri sonucu hücrede mutasyonlar meydana gelebilir ve bu da ölüme yol açabilmektedir. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozla kolaylıkla reaksiyona girer. Aktive olan nötrofillerden kaynaklı hidrojen peroksitin membranlardan kolayca geçmesi sonucu nukleusta DNA hasarı, hücre disfonksiyonu ve hücre ölümü meydana gelebilir.

• **Serbest radikallerin karbohidratlara etkileri**: Karbohidratlara serbest radikallerin etkisi sonucu çeşitli ürünler oluşur. Oluşan ürünler çeşitli patolojik süreçlerde rol alırlar. Diyabet, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, romatoid artrit, kanser gibi pek çok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kaldığı belirtilmiştir. Fakat serbest radikal artışının bu durumlarda sebep veya sonuç olduğu tam olarak bilinmemektedir.

2.4. Antioksidan Savunma Sistemi

Canlı hücrelerdeki karbohidrat, lipid, protein ve DNA gibi maddelerin oksidasyonunu engelleyen ya da geciktirebilen maddelere **antioksidan** denir. Antioksidanlar, hem direkt hem de indirekt yoldan ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların zararlı etkilerine karşı hücreleri korur (36). Reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşturduğu hasarı önlemek için antioksidanlar devreye girer. Bu mekanizmaya ise **antioksidan savunma sistemi** denmektedir.

Antioksidanlar endojen ve eksojen olmak üzere 2 ayrı kaynaktan gelirler (35).

Endojen antioksidanlar : Enzim ve enzim olmayan olmak üzere 2 sınıfta incelenir. Enzim olan endojen antioksidanlar; glutatyon peroksidaz (GSH-GPx), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon S- transferazlar (GST), hidroperoksidazlar ve mitokondriyal sitokrom oksidazlardır. Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar ise; transferrin, melatonin, miyoglobin, hemoglobin, sistein, albümin ve bilirubindir.

Eksojen antioksidanlar : 3 sınıfta incelenirler. Bunlar; vitaminler, gıda ve ilaçlardır.

Vitaminlerdeki antioksidanlar; askorbik asit (vitamin C), vitamin E, β - karoten, folik asit; gıdalardan alınan antioksidanlar; Fe-süperoksit dismutaz, sodyum benzoat, etoksikin, ilaç olarak alınan antioksidanlar; trolox C, ebselen ve asetil sistein, barbitüratlardır.

Antioksidanlar intraselüler ve ekstraselüler olarak görülmektedir. İntraselüler antioksidanlar glutasyon peroksidaz (GSH-GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) dır. Ekstraselüler antioksidanlar ise; vitamin E ve C, transferrin, haptoglobin, albümin, bilirubin, α -1 antitripsin, β -karoten sorumludur (38).

➤ **İntraselüler antioksidan savunma** : Bir metalloenzim olan SOD, süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizler. İnsan hücrelerinde özellikle sitozoldeki bakır ve çinko iyonu içeren SOD ile manganez iyonuna sahip mitokondriyal SOD'un iki izoenzimi vardır. Süperoksit radikallerin dismutasyonu yolu ile veya direkt açığa çıkan hidrojen peroksid ise GPx ve CAT enzimlerince suya dönüştürülür ve detoksifiye edilir. Vitamin E ve C, hücre membranındaki lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır.

➤ **Ekstraselüler antioksidan savunma** : İntraselüler ortamın aksine burada ekstraselüler sıvılardaki enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır. Bu sebeple ekstraselüler savunmadan minör olarak enzimler, majör olarak vitamin E ve vitamin C, transferrin, albümin, bilirubin, haptoglobin, α -1 antitripsin, β -karoten sorumludur.

Belirli düzeyde bulunabilen oksidan molekül artışı, vücutta doğal antioksidanlar tarafından etkisizleştirilir. Böylelikle sağlıklı bir organizmadaki oksidasyon düzeyi ve antioksidanların, bunları etkisizleştirme gücü belirli bir denge içerisindeydir. Oksidanlar, sınırlanan düzeyin üzerinde oluşur ise ya da antioksidanların yetersiz kaldığı durumda, oksidan moleküller organizmadaki yapı elemanları olarak bilinen nükleik asitler, karbonhidrat, lipid, protein ve yararlı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (38).

2.5. Apoptoz

Apoptoz, Yunancada apo (= ayrı) ve ptosis (= ayrı düşen) kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşan sonbaharda yaprak dökümünü ifade eden bir kelimedir (39). Apoptoz, canlının otonom mekanizması ile düzenlenen zararlı, yaşlanmış, bakteriler veya otoreaktif virüslerle enfekte veya istenmeyen kendi hücrelerinin adenosin trifosfat (ATP) kullanımlı ve zaman indeksli iz bırakmadan öldürülmesi sürecidir (40). Yani, bir hücrenin genetik olarak düzenlenen sistematik yok oluş fenomeni olup programlı hücre ölümü olarak da bilinir.

Apoptoz, genler tarafından düzenlenen, hücrenin kendi kendini yok ettiği, programlı olan ve organizmanın RNA, protein sentezi ve enerji ihtiyacı için gerekli homeostazi koruyan bir olaydır (41). Apoptoz sırasında gerekli olmayan hücreler organizmadan atılır. Hücreler, içsel olarak kodlanmış intihar programlarının aktivasyonu ile kendi ölümlerini

başlatabilirler. Apoptoz, hücre membran bütünlüğünün korunduğu kontrollü otosindirim (kendini parçalama) ile karakterizedir (16).

2.5.1. Apoptozun Temel İşlevleri

Komşu hücreye zarar vermeksizin ve onları farklı yönde etkilemeden ve herhangi bir iz bırakmadan hedef hücrenin ortadan kaldırılmasıdır. Örneğin;

✓ Embriyonun gelişimi, diferansiyasyon ve gelişim sırasında (doku atrofisi vs.) organizmaya şekil verir.

✓ Organizmanın toplam hücre sayısını düzenler.

✓ Kontrolsüz hale gelen ve kendine hasar veren immun hücreler, tümör hücreleri, virüsle kontamine olmuş hücreler gibi istenmeyen ve zararlı hücreler yok edilir ve bunlara karşı savunma sistemi oluşturulur.

İnsan embriyosunda, el ve ayak ekstremiteleri gelişimi esnasında parmak arasında bulunan hücreler ve parmak şekillenmesi için apoptoza gider. Bu hücreler ölüme gitmek için programlanmışlardır. Bu programlı hücre ölümünün, fizyolojik olduğu kabul edilir (40).

Apoptoz uyarıcılarından bazıları ise şunlardır;

✓ İyonize radyasyon

✓ Genetik kontrol (embriyonik evreden doğum sonrası yaşam boyu etkilidir)

✓ İlaç ve çevresel faktörler (steroid tedavisi, kemoterapi, kozmik ışınlar vb.)

✓ İskemi sonrası reperfüzyon, mekanik travmalar, viremi, vb.

2.5.2. Apoptozun Morfolojisi

Apoptozda esas morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşarak parçalara ayrılmasıdır. Bir hücrede normalde peş peşe olan 7 kırılma onarımına giderken apoptozda yaklaşık 300000 adet kırılma oluşur ve sonucunda hücre onarımı yapılamaz.

Apoptoz ile uyarılmış olan bir hücre, bulunduğu yerden uzaklaşarak komşu hücreler ile bağlantısını kopararak büzülür ve kromatini yoğunlaşarak piknotik bir görünüme sahip olur. Hücre DNA'sı nükleozomlarda kesilir ve jel elektroforezlerinde tipik bir merdiven bant halinde görülür (41). Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokular ışık mikroskopik incelemelerde hücrelerin çevresinde açık, parlak alanlar şeklinde görülmektedir.

Plazma membranından tomurcuklanma oluşur, sonrasında hücre, çevresinde sitoplazma ile çevrelenmiş kromatin parçalarından meydana gelen apoptotik cisimciklere

bölünür. Apoptotik hücreler makrofajlar tarafından algılanarak fagosite edilir. Bu hücreler plazma membranındaki değişiklikler sayesinde tanınır. Aminofosfolipid transferaz enzimi, hücre membran iç tabakasında bulunan fosfatidil serini membranın dış tabakasına taşır. Fagositik hücrelerdeki vitronektin ve lektin özelliği taşıyan reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanarak fagositoz uyarılır (39).

2.5.3. Apoptozun Mekanizmaları ve Düzenlenmesi

Apoptoz hem hücrenin kendi aktivasyonu hem de hücre dışı çevrelerden gelen uyarılar ile başlamaktadır (39). Apoptoz, önceden hazırlanmış olan hücrede primer başlatılabilir veya uyarı ile sekonder olarak gelişebilir.

Apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi, p53, kaspazlar (inflamatuvar, başlatıcı, efektör), sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriler görevlidir. Apoptoz sırasında hücre içine devamlı olarak kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonlarının görevi, gen regülasyonunda, transglutaminaz aktivasyonunda, proteaz, endonukleaz, ve hücre iskeleti organizasyonunda rol oynamaktır (41).

Apoptotik süreçler çeşitli dış ve iç stimülasyonlar tarafından aktive edilebilir. Hücreyi dış ortamdan uyarılar arasında; koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), tümör nekroz faktör (TNF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar bulunmaktadır. Hücre içi aktivatörler ise; onkogenler, p53 gibi tümör supresörleri (baskılayıcıları), sitokinler, onkojenler (cmyc gibi), bakteriyel-viral enfeksiyonlardır. (16,39). Bunun yanında apoptozu baskılayan ve indükleyen genler de vardır. Baskılayan genler; c-abl geni, Bcl-2 ailesinden bcl-1, bcl-2, bcl-w, bcl-xl genleri (anti-apoptotik), ras onkogeni, p35, A20, çözünebilir fas'tır. İndükleyen genler ise; Bcl-2 grubundan Bax, Bak, Bad, bid genleri (pro-apoptotik), c-myc, p53, p21, fas(CD95/APO1), interlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)'dir.

Apoptoz sürecinde temelde 3 anahtar etmen bulunur. Bu etmenler; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1). Bu etkenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda görülen mitokondri hasarı, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması nükleus membranı kırılması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (39).

Apoptoz 2 yolla düzenlenir. Bunlar, intrinsik (mitokondrial) yol ve ekstrinsik yoldur.

➤ **İntrinsik (mitokondrial) yol :** Hücre içindeki sinyallerle apoptotik uyarı alınması ile beraber proapoptotik protein ailesinden Bid; bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive ederken Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Aktive olan genler mitokondri membranında por oluşumunu indükleyerek zar potansiyelinde değişiklik yaratır. Böylece porlardan sitokrom-c, Endo-G (Endonukleaz-G), Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), kalsiyum ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salgılanmasını uyarır. Sitokrom-c oksidatif fosforilasyon için gerekli elektronları taşır. Smac, IAF (inhibitör apoptotik faktör)ın inhibisyonunu sağlayarak apoptozu hızlandırır. Kaspaz-3 ve kaspaz-8, IAF varlığından dolayı aktivasyonu engellenir.

Mitokondri porundan salgılanan sitokrom-c'ye, sitozolde Apaf-1 ve ATP katılımı ile apoptozom denen bir kompleks oluşur (42,43). Apoptozom, kaspaz-9'u keserek aktifleştirir ve kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3'e dönüştürür. Aktif kaspaz-3 de ICAD (inaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbest hale getirir. CAD, nukleusta yoğunlaşmaya yol açarken, DNA'yı nukleozomal alt birimlere bölerek fragmente olmasını sağlar (41).

➤ **Ekstrinsik yol :** Hücrenin yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF- α) bağlanması ile reseptör trimerik yapı halini alır. Trimerik yapı olan bu reseptör; prokaspaz ve adaptör molekülleri ile birleşip DISC (Death inducing signaling complex) denen yapıyı meydana getirir. Sonrasında inaktif haldeki prokaspaz-8 uzun ve kısa kollarından kesiler ve aktif kaspaz-8 oluşur. Aktif kaspaz-8 de kaspaz-3'ü 2 yolla aktive eder. Ya direkt olarak aktive eder ya da Bid'i keserek dolaylı yoldan intrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Böylece aktifleşen kaspaz-3, CAD aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna sebep olur (39, 41).

2.6. Apocynin

Apocynin (4-hidroksi-3-metoksiasetofenon, asetovanillon), ilk medikal bitki olan *Picrorhiza kurroa* ve Kuzey Amerika ve Asya'da *Apocynum* türlerin çeşitliğinden izole edilmiş fenolik bir bileşiktir (45). Apocynin, peroksidaz ile oksitlenen ve daha aktif metabolitlere dönüşebilen, NADPH oksidaz aktivitesinin artışı önleyen bir antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar bir ilaçtır (46).

Apocynin, membran kompleksi ile sitosolik birimlerinin birleşmesini ve NADPH oksidaz aktivasyonunu önleyen bir NADPH oksidaz inhibitörüdür (12). Hücrede peroksidazlar ile oksitlenen ve daha aktif metabolitlere dönüştürülen bir ön ilaçtır. Çeşitli *in vivo* çalışmalar Apocynin'in, nötrofil oksidatif patlama ve kemotaksisi önlediğini, nötrofil aracılı hücre hasarını azaltmada yardımcı olan bir antiinflamatuvar ajan olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda, yüksek NADPH oksidaz'ın aktivitesi, önemli testiküler hasara yol açtığını göstermiştir ve bu antioksidan testis fonksiyonunu restore etmektedir (47,48).

Apocynin'in endotoksin ile indüklenen akciğer hasarında kemotaksisi önleyerek nötrofil aracılı hücre hasarını azaltmada yardımcı antiinflamatuvar etkisi gösterilmiştir (49). Tiroid dokusunda PCB153 ile indüklenen hasar sonrası oluşan NOX üzerindeki koruyucu ve antiinflamatuvar etkilidir (50). Kalpte, kardiyomiyosit kontraktıl disfonksiyonunda, tempol ve rapamisin ile verildiğinde kontraktıl disfonksiyonu ve anomali oluşmasını önlemektedir (51). Böbrekte renal iskemi/reperfüzyon hasarında, cyclosporin A ile indüklenen nefrotoksisitede, midede etanol ile indüklenen gastrik ülser hasarında ve cisplatin ile indüklenen karaciğer hasarında antiinflamatuvar, antiapoptotik ve antioksidan savunma sistemini artırma etkileri saptanmıştır (52–55). Apocynin'in ventriküler diyastolik fonksiyon ve miyokard kontraktıl fonksiyonunda bir düzelme sağladığı ve katalaz enzim aktivitesini iyileştirdiği gösterilmiştir (56). Daha önce diyabetik hipertensif sıçanlarda apocyninin, NADPH aktivitesini değiştirmeden miyokard oksidatif stresini azalttığı da farklı bir çalışmada gösterilmiştir (57).

Sıçanlarda apocyninin oksidatif stres (ROS) üretimi, mikrogial aktivasyon, kan beyin bariyeri bozulması ve travmatik beyin hasarı sonrası nöron ölümüne karşı koruyucu etkisi belirtilmiştir (58). Ayrıca beyinde apocynin uygulamasının travmatik beyin hasarı sonrası nörodavranışsal bozukluklarını, beyin ödemi ve nöronal hasarı hafiflettiği saptanmıştır (59).

Spinal kord hasarını takiben apocyninin sekonder oksidatif stresi düzenleyerek apoptoz derecesini azalttığı ve sinirsel fonksiyonel iyileşmeyi arttırması ile antiapoptotik ve antiinflamatuvar özelliği gösterilmiştir (60).

Böbrekte gentamisin ile indüklenen nefrotoksisiteye karşı antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik özellikleri gösterilmiştir (61). Apocynin'in karaciğerde ROS üretimini azaltma yolu ile hepatokarsinogenezi baskılayarak antikarsinogenez özelliği belirtilmiştir (62).

Apocynin'in radyasyon hasarını azaltıcı etkisi karaciğer, ince barsak, deri, göz gibi farklı organlar üzerinde gösterilmiştir (63–67).

Tüm bu organlar dışında apocynin'in testiste de lipid peroksidasyonunu önleyici ve oksidatif hasarı azaltıcı etkileri bilinmektedir. Testiste çalışılan pek çok farklı modelde antioksidan etkileri saptanmıştır (12, 43, 52, 53). Farklı organ ve sistemler üzerinde denenen ve antiinflamatuvar, antiapoptotik ve antioksidan olumlu sonuçları gözlenen Apocynin'in, radyasyon hasarında testisteki histolojik etkileri bugüne kadar incelenmemiştir. Bu nedenle bu çalışmada testiste oluşan radyasyon hasarına karşı Apocynin'in koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREC VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız prospektif deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Aralık 2015'te araştırma konusunun belirlenmesi ve literatür taraması ile başlamış olup, **26 Nisan 2016** tarihli Etik Kurul Toplantısından onay alındı. Çalışmamızın deneysel ayağı Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'nda, deneklerde radyasyon hasarı oluşturulması Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, histolojik ve immünohistolojik çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda ve biyokimyasal çalışmalar ise Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi ARLAB'da gerçekleştirildi. Araştırma, Haziran 2018'de tez savunmasıyla tamamlanmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada her birinde 7 denek olacak şekilde toplam 5 grup oluşturuldu (Tablo 1). Deney grupları şu şekilde düzenlendi:

Tablo 1: Deney hayvanı grupları

Deney ve Kontrol Grupları	Grup Başına Denek Adedi
Grup-1 : (Kontrol grubu, n=7) Hiçbir şey uygulanmayan testis doku örnekleri alındı. Bazal değerler için kullanıldı.	7
Grup-2 : (Çözücü verilen grup, n=7) Deneklere 5 gün boyunca günde tek doz ip. yolla 2 cc. salin verildi.	7
Grup-3 : (Apocynin grubu, n=7) Deneklere 5 gün boyunca günde tek doz ip. yolla 20 mg/kg apocynin, 2 cc. salin solüsyonunda çözdürülerek verildi.	7
Grup-4 : (Radyasyon grubu, n=7) Deneklere tek doz 10 Gy skrotal radyasyon uygulandı.	7
Grup-5 : (Apocynin+Radyasyon grubu, n=7) Radyasyon öncesi 5 gün boyunca günde tek doz ip. yolla 20 mg/kg apocynin 2 cc. salin solüsyonunda çözdürülerek verildi ve son dozdan 24 saat sonra tek doz 10 Gy skrotal radyasyon uygulandı.	7
Kullanılan toplam denek sayısı	35

Radyoprotektan uygulaması:

Deneklere radyasyon uygulaması öncesi 5 gün boyunca günde tek doz ip. yolla 20 mg/kg apocynin, 2 cc. salin solüsyonunda çözdürülerek verildi (70).

Radyasyon Uygulanması:

Apocynin uygulamasının bitiminden 24 saat sonra tek doz 10 Gy skrotal radyasyon uygulandı (4, 66). Deney için kullanılacak olan bütün hayvanlara radyasyon uygulanmadan önce intraperitoneal (ip) yoldan 50 mg/kg ketamin+12 mg/kg ksilazin anestezisi uygulandı (11). Sıçanlar, dört ekstremitelerinden köpük bir düzenek üzerine tespit edildikten sonra DEÜTF Radyasyon Onkolojisi AD'da Siemens Primus Lineer Akseleratör cihazında 6 MV-X ışını ile, 300 MU/dk doz hızıyla, tek fraksiyonda 10 Gy dozda, 4x4 cm genişliğinde pelvik alanlar kullanılarak ışınıldı. Işınlama, SSD (source skin distance) yöntemi kullanılarak yapıldı. Sıçan testislerinin 6MV-X ışınının cilt koruyucu etkisinden kaynaklı düşük doz almasını önlemek amacıyla, pelvik bölgeye 1 cm kalınlığında doku eşdeğeri bolus malzemesi konularak ışınlama gerçekleştirildi (33) (Şekil 44).



Şekil 44 : Deneklere skrotal radyasyon uygulanması

Deneklerin yaşamı sonlandırma zamanı ve yöntemi:

Radyasyon grubundakiler radyasyon uygulamasından 24 saat sonra, diğer gruptaki denekler ise eş zamanlı olarak deneyin 7. günün sonunda yüksek doz anestezi altında (160

mg/kg ketamin+20mg/kg ksilazin ip olarak verildi) sakrifiye edildi ve deneklerin testis dokuları çıkarıldı (6).

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları AD'dan alınan Wistar-Albino suşu toplam 35 erkek sıçan (250-300 gr) kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarında 12/12 saat karanlık-aydınlık periyodunda, 20-22°C oda sıcaklığında, %50-60 nisbi nem ortamında barındırıldı. Hayvanlar, dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet ile adlibitum beslendi.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Birinci gruba hiçbir şey uygulanmamış olup, elde edilen testis dokularının ağırlıkları ve histolojik olarak incelenmesinden elde edilen sonuçlar bazal değerler için kullanıldı. Radyasyon ile hasar oluşturulacak olan sıçan gruplarına uygulanan antioksidan (apocynin) bağımsız değişken olup, bu gruplardan alınacak testis dokularının ağırlıkları ve histolojik ve biyokimyasal sonuçlar da bağımlı değişkenler olarak değerlendirildi.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada denek ağırlıklarını ölçmek için terazi, deneklerde radyasyon hasarı oluşturmak için Siemens Primus Lineer Akseleratör cihazı, deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv, kesitlerin alınmasında mikrotom, boyamalarda gerekli distile su için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity chamber ve otomatik mikro pipetler, elektron mikroskopik incelemeler için elektron mikroskobu, biyokimyasal incelemeler için soğutmalı santrifüj cihazı, vorteks cihazı, inkübatör, homojenizatör ve buzluk kullanıldı.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen sol testise ait doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulanmış, ince kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya işlemlerine tabii tutuldu. Histokimyasal değişiklikler için Hematoksilen&Eozin, Masson Trichrome, Periyodik Asit Schiff boyamaları, immünohistokimyasal değişiklikler için

TUNEL, Aktive kaspaz-3, ZO-1, Occludin immun boyamaları yapılmıştır. Sağ testise ait doku örneklerinin yarısı biyokimyasal, diğer yarısı elektron mikroskopik incelemeler için kullanıldı.

3.6.3. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney başlangıcında ve deney sonunda olacak şekilde 2 kez deneklerin ağırlıkları ölçüldü. Elde edilen veriler SPSS 22.0 bilgisayar programına yüklenerek, Wilcoxon İşaretli Sıralar testi ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. Tüm sonuçlar için $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.4. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney sonunda alınan testislerin ağırları ölçüldü. Elde edilen veriler SPSS 22.0 bilgisayar programına yüklenerek, Kruskal Wallis ve Mann-Withney U testi ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. Tüm sonuçlar için $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.5. Histolojik Değerlendirmeler

Doku örnekleri, %10 formalin solüsyonda 48-72 saat bekletilerek fikse edildi. Fikse edilen dokular, fiksatifin uzaklaştırılması için 1 gece akarsuda bekletildikten sonra, rutin histolojik doku takip aşamalarından geçirilerek parafine gömüldü. Elde edilen parafin dokulardan, rotary mikrotom (RM 2255, Leica) yardımı ile 5 μ kalınlığında kesitler alındıktan sonra, önce dokunun düzgün halde alınması için su banyosuna (3000459, Selecta Termofin, Barselona) konuldu, ardından histolojik boyamalar için normal lamlara, immunohistokimyasal boyamalar için ise lizinli lamlara alındı (Tablo 2).

Tablo 2: Doku takip protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Fiksasyon	%10'luk formaldehit	48-72 saat
Yıkama (fiksatiften uzaklaştırma)	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'luk alkol	20'şer dakika
Post fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Ksilen 1-2	30'ar dakika
Parafinizasyon	Yumuşak paraffin (parafin1-2)	1'er saat
Bloklama (gömme)	Sert parafin	

3.6.5.1. Işık Mikroskopik İncelemeler

3.6.5.1.1. Hematoksilen&Eozin Boyama Yöntemi

Alınan kesitler deparafinizasyon için önce 1 gece 60°C’de etüvde bekletildi. Sonrasında sırası ile ksilol-1’de 20 dk etüvde, ksilol-2 ve ksilol-3’te 20 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra azalan alkol serilerinden (%100,96,80,70) geçirilerek rehidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Distile suda çalkalanıp hematoksilen (05-06002L, Bio-Optica, Milano, İtalya) boya solüsyonu içinde 10 dk bekletildi. Ardından akarsu altında 10 dk bekletildikten sonra eosin (05-10003L, Bio-Optica, Milano, İtalya) boya solüsyonu içinde 15 sn bekletilip dehidratasyon işlemi için artan alkol serilerde (%70,80,96,100) çalkalama yapılarak, 3 değişim ksilol serisinde şeffaflaştırmadan sonra kesitler entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 3).

Histolojik olarak germ hücrelerindeki dejenerasyonu, germ hücre tabakalarının düzensizliği ve kaybı ile seminifer tübüllerde dejenerasyon, hemorajik ve ödematöz değişiklikler, değerlendirildi.

Tablo 3: Hematoksilen&eozin boyama protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C’lik etüv	2 saat
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100,100,96,80,70’lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	15 saniye
Dehidratasyon	%70,80,96,100,100’lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1-2-3	20’şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.5.1.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Yöntemi

Parafin kesitler alınarak deparafinizasyon işlemi için önce 1 gece 60°C’de etüvde bekletildi. Ardından ksilol 1-2-3’ten geçirilerek, %100’den %70’e kadar azalan alkol serilerinden geçirilip rehidrate edildikten sonra, distile suda çalkalanıp 10 dakika periyodik asit solüsyonu (1.01646./1, Merck, Darmstadt, Almanya) içerisinde bekletildi. Akarsuya alınan kesitler burada da 10 dakika maruz bırakıldıktan sonra, kuruması için 20 dakika etüve kaldırıldı. Kuruyan kesitler karanlık ortamda Schiff boya solüsyonu (1.09033, Merck, Darmstadt, Almanya) içerisinde 20 dakika bekletildi. Böylece schiff reagentin içerdiği sülfür fuksin, bazik fuksine benzer çözünmeyen işaretli bileşiklerdeki iki komşu aldehit grubunun değişmesini sağladı. Boyamadan sonra 20 dakika akarsuda yıkanan kesitler, nukleusların boyanması için 2 dakika hematoksilen (05-06002L, Bio-Optica, Milano, İtalya) boya solüsyonu içerisinde bekletildi ve sonra %96’lık alkolle çalkalanıp ksilol ile şeffaflandırma yapıldı ve entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 4).

Bir karbonhidrat olan proteoglikan içeren bazal membran yapısının kalınlığındaki değişiklikleri incelemek için PAS boyaması uygulandı.

Tablo 4: Periyodik asit schiff (PAS) boyama protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C’lik etüvde	2 saat
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (60°C’de etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100,100,96,80,70’lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Periyodik asit	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Kurutma	60°C’lik etüv	20 dakika
Boyama	Schiff	20 dakika

Yıkama	Akarsu	20 dakika
Boyama	Hematoksilen	2 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Dehidratasyon	%70,80,96,100,100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.5.1.3. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Testis dokusunda bağ dokusu artışını değerlendirmek amacı ile Masson Trikrom boyaması yapıldı. Alınan parafin kesitler alınarak deparafinizasyon işlemi yapıldı, ardından azalan alkol serilerinden geçirilip dehidrate edildi, distile suda çalkalandı. Masson trikrom boyama seti (5022, GBL, İstanbul, Türkiye) içerisindeki weigert's iron hematoksilin A solüsyonu ile weigert's iron hematoksilin B solüsyonu dokular üzerine damlatılarak nukleusların boyanabilmesi için 10 dakika bekletildi. Pikrik asit alkolik solüsyonu ile eritrositlerin boyanması sağlandı. Distile su ile hemen yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan ponceau asit fuksin azofloksin solüsyonu ile hücre sitoplazmalarının boyanması sağlandı, sonra sırası ile fosfomolibdik solüsyonunu ve masson anilin blue solüsyonunu bağ dokusunun boyanması sağlanarak, distile su ile çalkalanan kesitler artan alkol serilerinden geçirilip ksilen ile şeffaflaştırıldıktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 5).

Tablo 5: Masson trikrom boyama protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C'lik etüvde	2 saat
Deparafinizasyon	Ksilol1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	ksilol 2 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100,100,96,80,70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama

Boyama	A+B solüsyonu	10 dakika
Boyama	C solüsyonu	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	D solüsyonu	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	E solüsyonu	10 dakika
Boyama	F solüsyonu	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü alkol (%100'lük)	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.6. Morfometrik Değerlendirmeler

Hematoksilen&Eozin ve PAS boyası ile boyanan kesitler ışık mikroskopunda incelendi. Elde edilen görüntüler digital görüntü analiz tekniği ile değerlendirildi. Çalışma sırasında testis dokusu değerlendirilirken stereolojik yöntemle (IHSS), seminifer tübüllerin çapları ve tübül epitel kalınlığı ölçülerek elde edilen veriler, istatistiksel yöntemlerle ortalama değerleri bulunarak gruplar arasındaki tübül yapı farklılıkları karşılaştırıldı. Hematoksilen-Eozin ile boyanan kesitler Johnsen's skorlaması ile değerlendirildi (71).

3.6.6.1. Johnsen's Testiküler Biyopsi Skorlaması

Hematoksilen-eozin boyama yöntemi ile boyanan testislere, seminifer tübüllerin morfolojisini incelemek amacıyla Johnsen testiküler biyopsi skorlaması uygulandı (Tablo 6). Çalışmamızda her denekten rastgele 10 seminifer tübül sayılacak şekilde skorlama yapıldı (72). Skorlama sonucunda elde edilen veriler SPSS 22.0 programına yüklenerek gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılıklar değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. Sonuçlar, Kruskal Wallis ve Mann-Withney U testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar için, $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 6 : Johnsen's testiküler biyopsi skorlaması (71)

Skor	Histolojik Bulgular
10	Tam spermatogenez ve mükemmel tübüller
9	Birçok spermatozoa mevcut, ancak germinal epitel disorganize
8	Sadece birkaç spermatozoa mevcut
7	Spermatozoa yok; fakat birçok spermatid mevcut
6	Sadece birkaç spermatid mevcut
5	Spermatozoa veya spermatid yok; ancak birçok spermatosit mevcut
4	Sadece birkaç spermatosit mevcut
3	Sadece spermatogonia mevcut
2	Germ hücreleri yok, sadece sertoli hücreleri mevcut
1	Hiçbir germ hücresi ve sertoli hücresi yok

3.6.6.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Hematoksilen-eozin boyama yöntemi ile boyanan testislerde, seminifer tübüllerin çap ölçümü değerlendirildi. Çalışma sürecinde elde edilen parametrik verilerin morfometrik ölçümleri Image J32 programı ile yapıldı. Çalışmamızda her denekten rastgele seçilen 10 seminifer tübül çapı ölçüldü (73). Bu değerlendirme sonucunda elde edilen veriler, SPSS 22.0 programına yüklenerek gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılıklar değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. Sonuçlar, Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar için, $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.6.3. Seminifer Tübül Epitel Yükseklik Ölçümü

Hematoksilen-eozin boyama yöntemi ile boyanan testislerde, seminifer tübül epitel kalınlıkları değerlendirildi. Çalışma sürecinde elde edilen parametrik verilerin morfometrik ölçümleri Image J32 programı ile yapıldı. Çalışmamızda her denekten rastgele seçilen 10 seminifer tübül epitel kalınlığı ölçüldü (74). Bu değerlendirme sonucunda elde edilen veriler, SPSS 22.0 programına yüklenerek gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılıklar değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. Sonuçlar, Kruskal Wallis

ve Mann-Withney U testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar için, $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.6.4. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlık Ölçümü

Periyodik Asid Schiff boyaması ile boyanan testis dokusundaki seminifer tübül bazal membran kalınlıkları değerlendirildi. Çalışma sürecinde elde edilen parametrik verilerin morfometrik ölçümleri Image J32 programı ile yapıldı. Çalışmamızda her denekten rastgele seçilen 10 seminifer tübülün bazal membranları ölçüldü (33). Bu değerlendirme sonucunda elde edilen veriler, SPSS 22.0 programına yüklenerek gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılıklar değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. Sonuçlar, Kruskal Wallis ve Mann-Withney U testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar için, $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.7. İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler

Apoptozisin belirlenmesi ve değerlendirilmesi:

Hücrelerdeki DNA fragmantasyonunun değerlendirilmesi ve apoptotik hücrelerin belirlenmesi için immunohistokimyasal yöntemler kullanıldı. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar meydana getirmektedir. Sonucunda oluşan kırıkların 3'OH uçlarına terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) aracılığıyla biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksiniükleotidler eklenerek nükleotidler streptavidin-horseradish peroksidaz ile tespit edilir. Sonrasında diaminobenzidin (DAB), işaretlenen örneklerle reaksiyona girerek DNA kırığı olan bölgede çözünemeyen bir substrat meydana getirir. Sonunda zemin boyama için hematoksilin kullanılarak boyama işlemi sonlandırılır.

Apoptoz, her bloktan elde edilen doku kesitlerinin terminaldeoksiniükleotidil transferaz aracılı dUTP nick end-labeling (TUNEL) ve aktive kaspaz-3 immunohistokimyasal boyaması ile değerlendirildi. Kromatinde yoğunlaşma, nükleer fragmantasyon, sitoplazmada büzüşme ve apoptotik cisimciklerin oluşumu hücrelerin, apoptotik hücrelerin özellikleri olarak belirlenerek kesitler incelendi.

3.6.7.1. TUNEL Reaksiyonu

Apoptoza giden hücre çekirdeklerini DNA fragmantasyonu hesaplaması terminaldeoksiniükleotidil transferaz aracılı dUTP nick end-labeling (TUNEL) reaksiyonuyla (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine

Triphosphate DNA Nick-End Labelling parafin kesitlerde TUNEL kiti (06432344001, Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. Alınan kesitle öncelikle 60°C olan etüvde 1 gece bekletildikten sonra deparafinizasyon amacı ile 3 seri değişim ksilole tabi tutuldu. Deparafinizasyon sonrası kesitlere hidrasyon amacı ile sırasıyla %96, %80, %70'lik azalan alkol serilerinden geçirildi ve distile suda çalkalandı. Distile suda bekleyen kesitlerin doku çevreleri Pappen (Z672548-1EA Sigma Tokyo, Japonya) ile sınırlandırıldı. Kesitler fosfat tamponlu solüsyon (PBS) ile yıkandı. 37°C'lik etüvde 10 dakika Proteinaz K (14321500, Roche, Mannheim, Almanya) ile muamele edildi. Ardından PBS ile 3 kez yıkandı ve 1 saat boyunca 37°C'lik etüvde TdT enzim ve label solüsyonu ile inkübe edildi. Converter POD uygulandıktan 30 dakika sonra kesitler, reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla DAB (Roche, Almanya) kromojeni ile muamele edildi ve distile su ile iyice çalkalandı. Hematoksin (05-06002L, Bio-Optica, Milano, İtalya) ile ardalan boyaması yapıldı ve akarsuda yıkandı. Yıkamanın ardından artan alkol serilerinden geçirildi ve 3 değişim ksilol ile şeffaflaştırıldıktan sonra kesitler entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 7).

Apoptotik indeksi hesaplamak için her bir kesitten 10 seminifer tübül sayıldı ve apoptotik morfoloji gösteren hücreler % olarak hesaplandı (75). Bu değerlendirme sonucunda elde edilen veriler, SPSS 22.0 programına yüklenerek gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılıklar değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. Sonuçlar, Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar için, $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 7 : TUNEL boyama protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C'lik etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100,100,96,80,70'lik alkol	Çalkalama

Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dokuların etrafını çizme	Pappen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Proteinaz K (37°C etüvde)	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	Tdt enzim+label solüsyonu (37°C etüvde)	1 saat
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	POD (37°C etüvde)	30 dakika
Boyama	DAB	1 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Zıt boyama	Hematoksilen	1 dakika
Yıkama	Akarsu	1 dakika
Dehidratasyon	%70,80,96,100,100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.7.2. Aktive Kaspaz-3 İmmunreaktivitesi

İmmunohistokimyasal inceleme için alınan kesitler 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Deparafinizasyon için 3 değişim ksilol serilerinden geçirilen kesitler 10 dk. 10 Mm sitrat buffer (20134, Bio-Optica, Milano, İtalya) ile mikrodalgada 600 watta 10 dakika ısıtıldı. Pappen (Z672548-1EA Sigma Tokyo, Japonya) ile çevreleri sınırlandırıldı. Ardından kesitlere, dokulardaki endojen peroksidazları inhibe etmek için 10 dk. %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler 20 dakika oda sıcaklığında bloklama solüsyonu (859043, İnvitrogen, Carlsbad, CA USA) ile enkübe edilerek, ardından yıkama yapılmadan Anti-Kaspaz 3 aktive form 1:100 antikoru (AB3623, Anti-Caspase 3 Antibody,

Merck-Millipore, Darmstadt, Almanya) ile +4°C de enkübe edildi. Sonrasında, önce 20 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor, daha sonra da 20 dakika enzimle isaretli (peroksidaz) avidin-biyotin histostatin (859043, İnvitrogen, Carlsbad, CA USA) uygulandı. Oluşan tepkimenin görünür hale gelmesi için Diaminobenzidin (DAB) (Roche, Almanya) kullanıldı.

Zemin boyaması hematoksilen (05-06002L, Bio-Optica, Milano, İtalya) ile yapıldı ve dehidratasyon işlemi için dereceli alkollerden kesitler gerçekleştirildi, şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 8).

İmmünohistokimyasal skorlamalar için onluk büyütmede olacak şekilde birbiriyle örtüşmeyen alanlar randomize olarak seçildi. Pozitif boyanma, boyamanın derecesi, yoğunluğu ve dağılımı açısından 0'dan 3'e kadar olan semikantitatif skorlama yapılarak değerlendirildi. İmmunreaktivite yok ise 0, hafif ise 1, orta ise 2 ve belirgin olması durumunda 3 puan verildi (76). Bu değerlendirme sonucunda elde edilen veriler, SPSS 22.0 programına yüklenerek gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılıklar değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. Sonuçlar, Kruskal Wallis ve Mann-Withney U testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar için, p<0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 8 : Aktive Kaspaz-3 immün boyama protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C'lik etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100,100,96,80,70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
	Sitrat solüsyonu(mikrodalga)	10 dakika
Soğutma		20 dakika
Dokuların etrafını çizme	Pappen	3x5 dakika

Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük H ₂ O ₂	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blocking solüsyonu	30 dakika
Primer antikor	Primer antikor (Aktive Kaspaz-3)	+4°C'de 1 gece
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Sekonder antikor	Biotinlenmiş sekonder antikor	20 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Sekonder antikor	Streptavidin sekonder antikor	20 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	1 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Zemin boyası	Hematoksilen	1 dakika
Yıkama	Akarsu	1 dakika
Dehidratasyon	%70,80,96,100,100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.7.3. ZO-1 İmmunreaktivitesi

İmmunohistokimyasal inceleme için alınan kesitler 60°C'de 1 gece bekletildi. Deparafinizasyon için 3 değişim ksilol serilerinden geçirilen kesitler 10 dk. 10 Mm sitrat buffer (20134, Bio-Optica, Milano, İtalya) ile mikrodalgada 600 watta 10 dakika ısıtıldı. Pappen (Z672548-1EA Sigma Tokyo, Japonya) ile çevreleri sınırlandırıldı. Ardından kesitlere, dokudaki endojen peroksidadları inhibe etmek için 10 dk. %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 kez 5'er dakika PBS ile kesitler yıkandı, 30 dakika oda sıcaklığında bloklama solüsyonu (859043, İnvitrogen, Carlsbad, CA USA) ile enkübe edilerek, ardından yıkama yapılmadan

ZO-1 1:100 antikoru (bs-1329R, Boston, USA) ile +4°C de enkübe edildi. Sonrasında, önce 20 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor, daha sonra da 20 dakika enzimle isaretili (peroksidaz) avidin-biyotin histostatin (859043, İnvitrogen, Carlsbad, CA USA) uygulandı. Reaksiyonun görünür hale gelmesi için Diaminobenzidin (DAB) (Roche, Almanya) kullanıldı.

Zemin boyaması hematoksilin (05-06002L, Bio-Optica, Milano, İtalya) ile yapıldı ve dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi için dereceli alkollerden geçirilen kesitler şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 9).

İmmünohistokimyasal skorlamalar için onluk büyütmede olacak şekilde birbiriyle örtüşmeyen alanlar randomize seçildi. Pozitif boyanmalar, boyanmanın dereceleri, yoğunlukları ve dağılımları açısından 0'dan 3'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak semikantitatif skorlama ile değerlendirildi. İmmunreaktivite yok ise 0, hafif ise 1, orta ise 2 ve belirgin olması durumunda 3 puan verildi (11). Bu değerlendirme sonucunda elde edilen veriler, SPSS 22.0 programına yüklenerek gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılıklar değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. Sonuçlar, Kruskal Wallis ve Mann-Withney U testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar için, p<0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 9 : ZO-1 immün boyama protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C'lik etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100,100,96,80,70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
	Sitrat solüsyonu(mikrodalga)	10 dakika

Soğutma		20 dakika
Dokuların etrafını çizme	Pappen	3x5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük H ₂ O ₂	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blocking solüsyonu	30 dakika
Primer antikor	Primer antikor (ZO-1)	+4°C'de 1 gece
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Sekonder antikor	Biotinlenmiş sekonder antikor	20 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Sekonder antikor	Streptavidin sekonder antikor	20 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	1 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Zemin boyası	Hematoksilen	1 dakika
Yıkama	Akarsu	1 dakika
Dehidratasyon	%70,80,96,100,100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.7.4. Occludin İmmunreaktivitesi

İmmunohistokimyasal inceleme için alınan kesitler 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Deparafinizasyon için 3 değişim ksilol serilerinden geçirilen kesitler 10 dk. 10 Mm sitrat

buffer (20134, Bio-Optica, Milano, İtalya) ile mikrodalgada 600 watta 10 dakika ısıtıldı. Pappen (Z672548-1EA Sigma Tokyo, Japonya) ile çevreleri sınırlandırıldı. Ardından kesitler, dokudaki endojen peroksidazları inhibe etmek için 10 dk. %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı, 30 dakika oda ısısında bloklama solüsyonu (859043, İnvitrogen, Carlsbad, CA USA) ile enkübe edilerek, ardından yıkama yapılmadan Occludin 1:100 antikorunu (bs-1495R, Boston, USA) ile +4°C de enkübe edildi. Sonrasında, önce 20 dakika biyotinlenmiş sekonder, daha sonra da 20 dakika enzimle isaretli (peroksidaz) avidin-biyotin histostatin (859043, İnvitrogen, Carlsbad, CA USA) uygulandı. Reaksiyonun görünür hale gelmesi için Diaminobenzidin (DAB) (Roche, Almanya) kullanıldı.

Zemin boyaması hematoksilin (05-06002L, Bio-Optica, Milano, İtalya) ile yapıldı ve dereceli alkollerde dehidratasyon için dereceli alkollerden geçirilen kesitler şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 10).

İmmünohistokimyasal skorlamalar için onluk büyütmeye olacak şekilde birbiriyile örtüşmeyen alanlar randomize olarak seçildi. Pozitif boyanmaların dereceleri, yoğunlukları ve dağılımları yönünden 0'dan 3'e kadar olan semikantitatif skorlama yöntemi ile değerlendirildi. İmmunreaktivite yok ise 0, hafif ise 1, orta ise 2 ve belirgin olması durumunda 3 puan verildi (11). Bu değerlendirme sonucunda elde edilen veriler, SPSS 22.0 programına yüklenerek gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılıklar değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. Sonuçlar, Kruskal Wallis ve Mann-Withney U testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar için, p<0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi Sayım sonucu elde edilen sonuçların ortalamaları alınarak, istatistiksel olarak değerlendirildi.

Tablo 10 : Occludin immün boyama protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C'lik etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2 (oda sıcaklığında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3 (oda sıcaklığında)	20 dakika

Rehidratasyon	%100,100,96,80,70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
	Sitrat solüsyonu(mikrodalga)	10 dakika
Soğutma		20 dakika
Dokuların etrafını çizme	Pappen	3x5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük H ₂ O ₂	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blocking solüsyonu	30 dakika
Primer antikor	Primer antikor (Occludin)	+4°C'de 1 gece
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Sekonder antikor	Biotinlenmiş sekonder antikor	20 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Sekonder antikor	Streptavidin sekonder antikor	20 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	1 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Zemin boyası	Hematoksilen	1 dakika
Yıkama	Akarsu	1 dakika
Dehidratasyon	%70,80,96,100,100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.8. Elektron Mikroskopik İncelemeler

Testisten alınan dokulardan 1 mm³ parçalar alınarak, Karnovsky fiksatifine (%2.5 buffered gluteraldehyde+ %2 paraformaldehyde, sodiumphosphate buffer) konan dokular +4° C de 48 saat fikse edildikten sonra sodium fosfat buffer ve osmium tetraoksit ile postfiksasyon sonrası rutin elektron mikroskopik doku takibi uygulandı. Taze hazırlanmış araldit solüsyonuna dokular gömülüp 65 °C’de 48 saat polimerizasyon için bırakıldıktan sonra 1,5 µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı ve Toluidine Blue (%1’lik) boyası ile boyandı. Uygun alanlar bulunup kesitler 90-120 nm kalınlığında alınarak 100 mesh’lik olan Cu gridlere yerleştirildi. İnce kesitlerin tümü transmisyon elektron mikroskopunda (Shuttle&Find–Zeiss Sigma 500 STEM) değerlendirildi (Tablo 11).

Tablo 11 : Elektron mikroskobu doku takip protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Fiksasyon	Karnovsky	1 gece (+4°C)
Yıkama	Sodiumphosphate buffer+sucrose	3x15 dakika
Postfiksasyon	Sodiumphosphate buffer osmiumtetraoxide	90 dakika
Yıkama	Sodium phosphate buffer	3x15 dakika
Dehidratasyon	Aseton	2x15 dakika
Kontrastlama	Aseton+uranil asetat+fosfotungstic asit	1 gece(+4°C)
	%80,90,96 aseton	2x15 dakika
	%100 aseton	3x20 dakika
	Propilen oksit	2x15 dakika
Epona alıştırma	Propilen oksit + epon (2:1)	30 dakika

Epona alıştırma	Propilen oksit+epon (1:1)	30 dakika
Epona alıştırma	Propilen oksit+epon (1:2)	30 dakika
Epona alıştırma	Epon	1 gece (+4°C)
Gömme	Araldit solüsyonu	
Polimerizasyon	Inkübator (65°C)	48 saat
Kesit alma	Yarı ince kesit	
Boyama	Toluidine blue (%1)	30sn-1dk.
Kesit alma	İnce kesitler	

3.6.9. *Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi*

Testis dokusundaki hasarı belirlemek için sağ testis dokusunda GPx enzim aktivitesi, antioksidan savunma sisteminin bir göstergesi olan SOD ve lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA seviyelerine bakıldı.

Homojenizasyon

Cerrahi işlemle alınan testis dokuları serum fizyolojik ile iyice yıkandı. Dokuların bir parçası, pH 7.4 Tris-HCl (50mM tris, %0.05 Brij 35, 0.5 mmol/L fenolmetansulfonil florid (PMSF), 10 µg/ml aprotinin) tamponu kullanılarak 1:8 oranında (w/v) homojenizasyon yapıldı. Bu amaçla Tissue Lyser cihazı kullanıldı (TissueLyser II; Qiagen, West Sussex, UK). Homojenizasyon işlemi süresince doku örnekleri buz üzerinde tutuldu. Elde edilen homojenat, MDA analizi için 2500 g 10 dakika; SOD analizi için ise 14000 xg 5 dakika 4°C' de santrifüj edildi. GPx analizi için dokular, ticari kitin içerisinde bulunan assay buffer ile homojenizasyonu yapıldı. 4°C' de 10000 g 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant elde edildi. Bütün basamaklar +4°C de (buz üzerinde) olacak şekilde yapıldı ve süpernatantlar ölçüm yapılana dek -80°C de saklandı.

3.6.9.1. *Gpx Aktivitesinin Ölçümü*

GPx aktivite ölçümü ticari kolorimetrik kit (BioVision, Cat. No: #K762-100) ile ölçüldü. Enzim ailesinden olan glutatyon peroksidaz (GPx), organizmaları oksidatif

hasardan korumakta önemli rol oynamaktadır. GPx düşük seviyelerde, serbest radikal ile ilgili bozukluklar ile ilişkilendirilir. Prensibi, glutatunun (GSH) glutatyon disulfite (GSSG) oksitlenmesi esnasında GPx'in hidroperoksit miktarını azaltması esasına dayanır. GSSG, NADPH tüketimi sonucu üretilir. NADPH miktarlarının azalması, GPx aktiviteleri ile orantılıdır. Prosedürden sonra, 340 nm'de 5 dakika sürede spektrofotometre ile absorbansları ölçüldü. Sonuçlar hesaplanarak mU/mg protein olarak ifade edildi.

3.6.9.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü

Superoksit dismutazlar (SOD), değerleri, SOD ticari kiti (BioVision, Cat. No: #K335-100) ile değerlendirildi ve spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. SOD, moleküler oksijene süperoksit anyonların dismutazını kataliz eder ve böylece hücrel antioksidan savunma mekanizmasının önemli bir parçasını oluşturan metalloenzimlerdir. Doku homojenatları kit prosedürüne göre hazırlandıktan sonra, 450 nm'de absorbansları değerlendirildi. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.6.9.3. MDA Değerlerinin Saptanması

Doku homojenatları kit prosedürüne göre hazırlandıktan sonra, HPLC yöntemi ile MDA seviyeleri ölçüldü. Testis dokusunda oluşan lipid peroksidasyonu MDA seviyeleri ölçülerek belirlendi. Ölçüm yapmak için (HPLC) yüksek performanslı sıvı kromatografi (Shimadzu VP Series, Tokyo, Japan) cihazı kullanıldı. Lipid hidroperoksitlerinin asitleri katalizlemesi ile MDA'ya parçalandı, oluşan MDA da iki molekül tiyobarbitürik asit (TBA) ve bir molekül MDA'nın oluşturduğu kompleks floresans dedektör ile tespit edildi. 150-4.6 mm, C18 100-5 (Macherey-Nagel) özelliklere sahip kolonda mobil faz olarak 10 mM, %30 metanol içeren fosfat tampon (pH 7) kullanıldı. Ultraviyole detektörün dalga boyu 532 nm'ye, floresan detektörün eksitasyon dalga boyu 515 nm ye, emisyon dalga boyu ise 553 nm'ye ayarlandı. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan (Sigma, 85H2501) kullanıldı. Standart konsantrasyonları 0.75, 1.5, 3, 5, 10, 20, 40, 50 µmol/L olarak belirlendi. Doku MDA değerleri µmol/mg protein olarak ifade edildi.

3.6.9.4. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Tüm testis dokularındaki örneklerde yapılmış olan analiz sonuçları mg proteine oranlandı. Protein ölçümleri için doku örneklerinde biçinkonik asit (BCA) yöntemi kullanıldı. Bunun için Thermo marka (Kat No: BCA, Protein assay Kit, 2325) protein analiz kiti kullanıldı. Yöntem sırasında bakır sülfat BCA çözeltisine eklendiği zaman elma yeşili renk ortaya çıkmakta; bu çözelti de protein çözeltisine eklendiğinde, proteinlerde bulunan

peptid bağları ile etkileşip, alkali koşullarda iki değerlikli Cu^{2+} iyonları bir değerlikli Cu^{+} iyonlarına indirgenip mavi-mor renkli bir kompleks oluştururlar. Mavi rengin şiddeti protein yoğunluğu ile orantılıdır. Bidistile su içinde 25, 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarında protein standartı olarak sığır serum albumini (BSA) standartları hazırlandı. Saptanan protein konsantrasyonları standart grafik ile hesaplandı ve sonuçlar $\mu g/mL$ olarak ifade edildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma sürecinde elde edilen parametrik verilerin morfometrik ölçümleri Image J32 programı ile yapıldı. İstatistiksel analizler ise verilerin, SPSS 22.0 bilgisayar programına yüklenerek yapıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. Deneklerin ilk ve son ağırlıkları Wilcoxon İşaretli Sıralar testi ile, diğer veriler ise Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar için, $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışmada karşılaşılan problem immünohistokimyasal boyamalar sırasında antijen kaybından kaynaklanan antijen antikor bileşkesinin azalması ve buna bağlı olarak dokularda immünohistokimyasal boyamanın yeterince olmamasıdır. Bu nedenle antijen antikor bileşkesini tam olarak oluşturabilmek için tekrar taze doku kesitleri alınıp immunohistokimyasal analizlerden geçirilmiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun **26 Nisan 2016** tarihinde gerçekleştirilen **04/09/2016** no'lu toplantıda, **23/2016** Protokol numara iznine sahip olup etik açıdan uygun bulunmuştur.

Etik kurul onayı EK-1 olarak teze eklenmiştir.

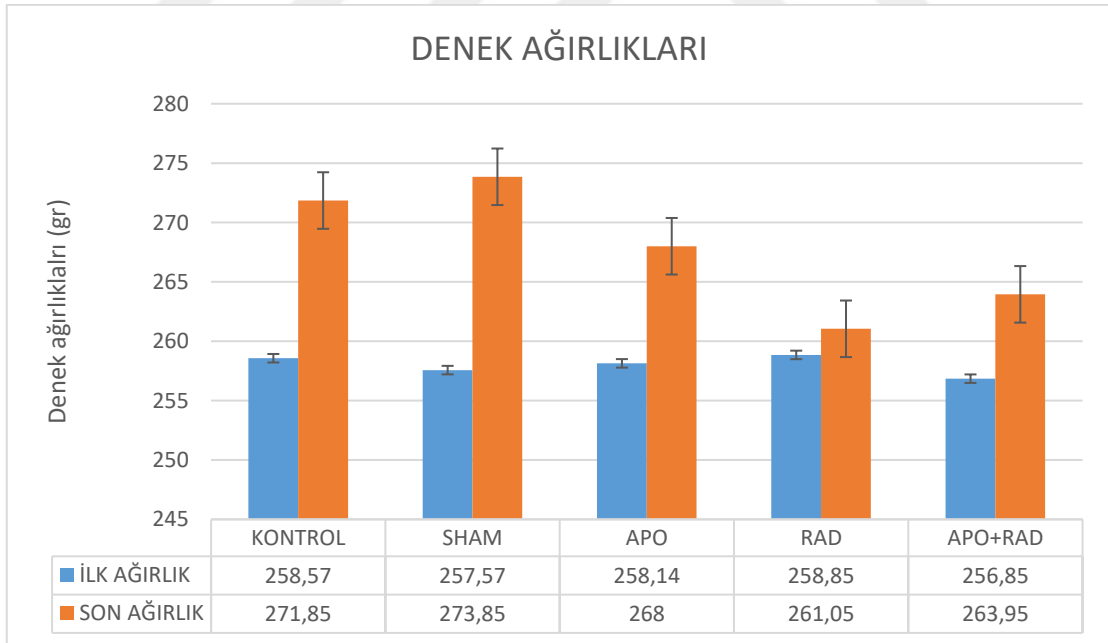
4. BULGULAR

4.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Grupların deney başlangıç ağırlık ortalamaları; kontrol grubunda $258,57 \pm 3,87$ gr, sham grubunda $257,57 \pm 4,14$ gr, apocynin grubunda $258,14 \pm 5,67$ gr, radyasyon grubunda $258,85 \pm 6,69$ gr, apo+rad grubunda $256,85 \pm 5,33$ gr olarak bulundu.

Grupların deney bitiş ağırlık ortalamaları ise kontrol grubunda $271,85 \pm 4,96$ gr, sham grubunda $273,85 \pm 3,81$ gr, apocynin grubunda $268 \pm 5,12$ gr, radyasyon grubunda $261,05 \pm 6,89$ gr, apo+rad grubunda $263,95 \pm 5,04$ gr olarak bulundu.

Kontrol grubu ilk ve son ağırlıkları karşılaştırıldığında ($p=0,063$) sham grubu ilk ve son ağırlıkları karşılaştırıldığında ($p=0,09$), apo grubu ilk ve son ağırlıkları karşılaştırıldığında ($p=0,310$), radyasyon grubu ilk ve son ağırlıkları karşılaştırıldığında ($p=0,735$), apo+rad grubu ilk ve son ağırlıkları karşılaştırıldığında ($p=0,310$) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. (Wilcoxon Sıralı İşaretler Testi) (Şekil 45)



Şekil 45: Grupların deney başlangıcı ve deney sonundaki ağırlık ortalamaları

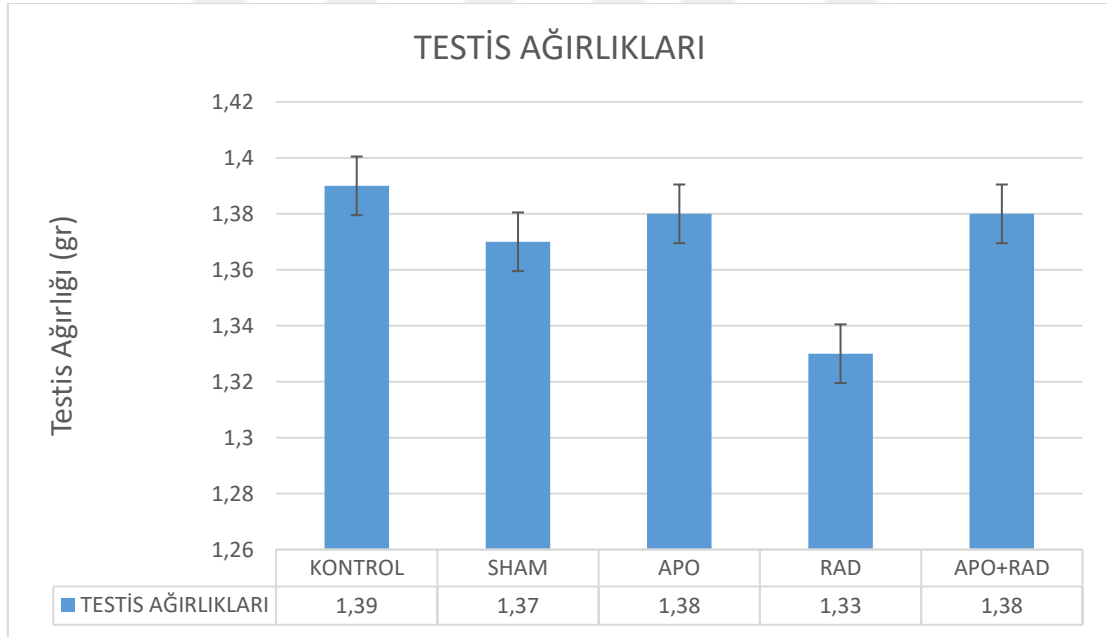
4.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Grupların testis ağırlık ortalamaları; kontrol grubunda $1,39\pm 0,03$ gr, sham grubunda $1,37\pm 0,05$ gr, apocynin grubunda $1,38\pm 0,05$ gr, radyasyon grubunda $1,33\pm 0,02$ gr, apo+rad grubunda $1,38\pm 0,05$ gr olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu; sham, apo ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,609$, $p=0,701$, $p=0,443$). Kontrol grubu, radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,159$).

Radyasyon grubu; sham ve apo ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,848$, $p=0,949$, $p=0,564$).

Apo+rad grubu, sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,798$, $p=0,701$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 46)



Şekil 46 : Grupların testis ağırlık ortalamaları

4.3. Histokimyasal Bulgular

4.3.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.3.1.1. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama Değerlendirmesi

Hematoksilen-eozin boyama yöntemi ile testisin kapsül yapısı, seminifer tübül, tübül epitelindeki spermatogenik seriye ait hücreler ve intersitisyel alan değerlendirildi.

Kontrol grubuna ait testis kesiti incelendiğinde testis kapsül yapısının (tunika albuginea) düzgün yapıda olduğu, seminifer tübül organizasyonunun düzenli, normal morfolojiye sahip ve tübül çaplarının birbirine yakın olduğu görüldü. Seminifer tübüllerdeki spermatogenik seri hücrelerinin düzgün bir şekilde sıralandığı gözlemlendi. Tübül epitel altındaki bazal membran, tübül epitelinden ayrılmamış olarak düzgün şekilde tespit edildi. Bazal membran üzerine oturan spermatogonyumlar da koyu yuvarlak nükleusları ile net bir şekilde ayırt edildi. İntersitisyel alan incelendiğinde ise bağ doku hücreleri, kan damarları ve lenf damarları ve bunlar ile yakın ilişkili Leydig hücreleri gözlemlendi (Şekil 47).

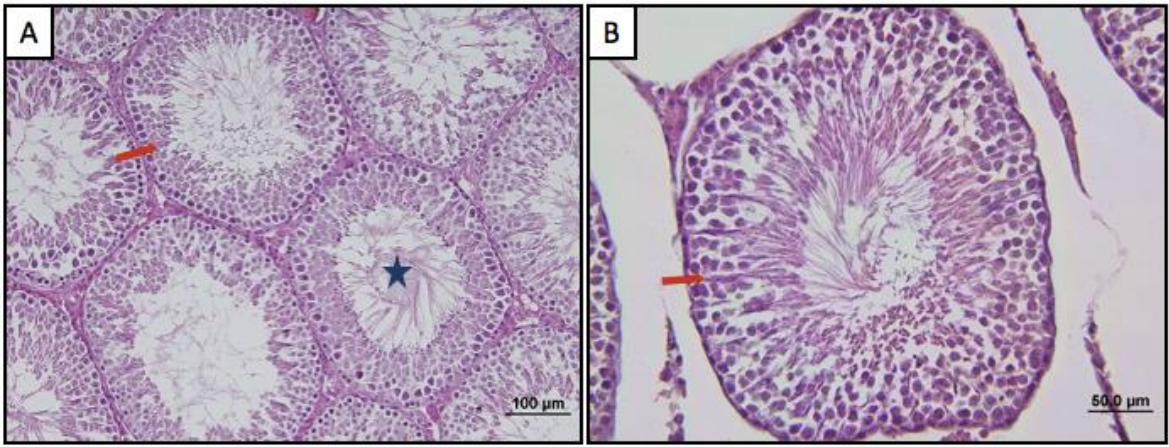
Sham grubuna ait kesit incelendiğinde kontrol grubuna benzer sonuçlar görüldü. Testis kapsülünde bozulma olmadığı, seminifer tübüllerin normal morfolojiye sahip olup birbirine yakın konumlandığı ve düzenli organizasyonda olduğu görüldü. Spermatogenik seri hücrelerinin düzgün şekilde sıralandığı gözlemlendi. Epitel altındaki bazal membranın düzgün olduğu ve membran üzerine oturan koyu nükleuslu spermatogonyumlar tespit edildi. Ayrıca intersitisyel alanda da kan damarları ve lenf damarları ve Leydig hücreleri de gözlemlendi (Şekil 48).

Apocynin grubuna ait kesit incelendiğinde kontrol grubuna yakın bir sonuç gözlemlendi. Testis kapsül yapısının düzgün bir yapıda olduğu görüldü. Seminifer tübül organizasyonunun düzenli ve tübül çaplarının birbirine yakın olduğu, spermatogenik seri hücrelerinin düzgün bir şekilde sıralandığı gözlemlendi. Seminifer tübül lümeninde gelişmekte olan spermiyumlar ve tübül epitel altındaki bazal membran yapısında herhangi bir bozulma olmadığı tespit edildi. İntersitisyel alana bakıldığında ise Leydig hücreleri ve kan ve lenf damarları da bağ dokuda düzgün bir şekilde gözlemlendi (Şekil 49).

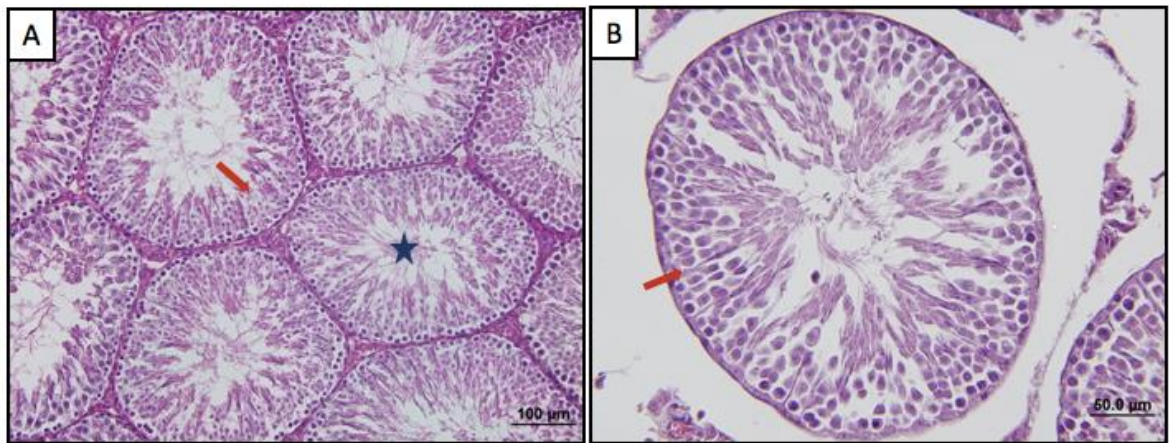
Radyasyon grubuna ait kesit incelendiğinde testis kapsülünün seminifer tübül epitelinden ayrıldığı görüldü. Seminifer tübül çaplarının genişliğinde ve sayısında azalma ve düzensizlik görüldü. Tübül epitelindeki spermatogenik seri hücrelerinin dökülerek düzensizlik ve hücre kaybı tespit edildi. Bazal membranın seminifer tübül epitelinden

ayrıldığı gözlemlendi. Seminifer tübüllerde germ hücrelerin dökülmesi sonucu oluşan vakuolizasyon gözlemlendi (Şekil 50).

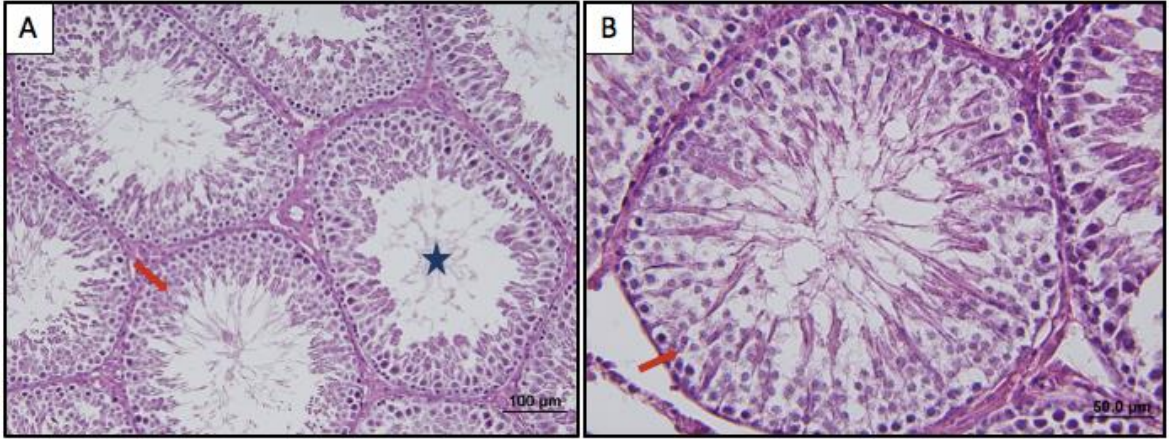
Apocynin+Radyasyon (apo+rad) grubuna ait kesit incelendiğinde testis kapsül yapısının kontrol grubuna yakın olduğu görüldü. Çok sayıda tübülün normale yakın morfolojiye sahip olmasıyla beraber, hasarlı tübül sayısının ve hasar şiddetinin daha az olduğu gözlemlendi. Tübüllerdeki germ hücre kayıplarının azaldığı tespit edildi. Bazal membranın normale yakın bir yapıda olduğu görüldü. İntersitisyel alanda da çoğunlukla normale yakın bir morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 51).



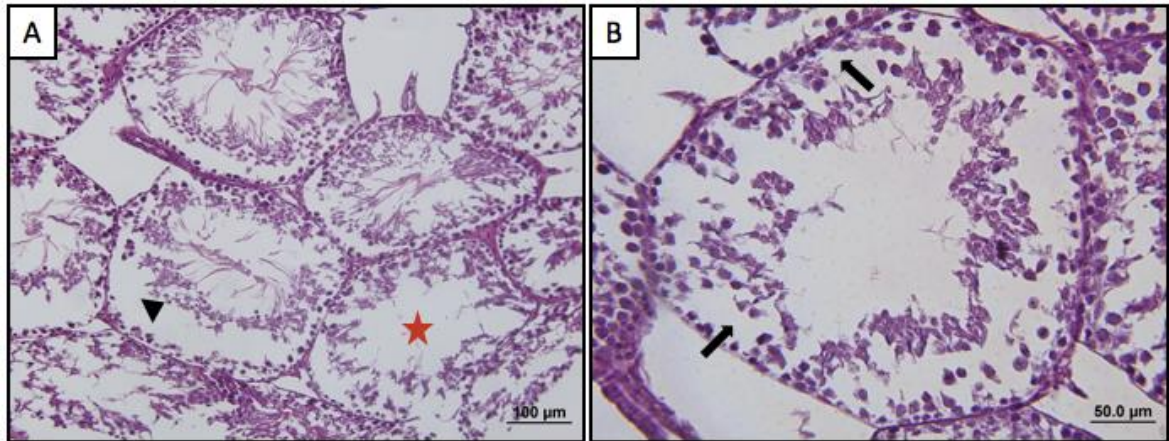
Şekil 47 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (H&E). Düzgün yapıdaki seminifer tübüller (yıldız) ve düzenli yerleşimli spermatogenik seri hücreleri (kırmızı ok). A, x20 B,x40



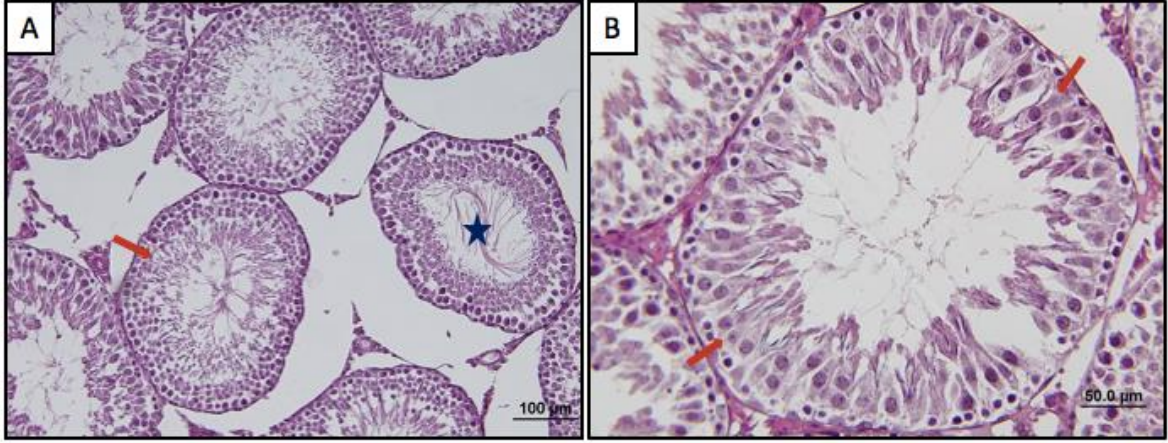
Şekil 48 : Sham grubuna ait testis kesiti (H&E). Düzgün yapıdaki seminifer tübüller (yıldız) ve düzenli yerleşimli spermatogenik seri hücreleri (kırmızı ok). A, x20 B,x40



Şekil 49 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (H&E). Düzgün yapıdaki seminifer tübüller (yıldız) ve düzenli yerleşimli spermatogjenik seri hücreleri (kırmızı ok). A, x20 B,x40



Şekil 50 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (H&E). Sertoli hücreleri ve spermatogjenik hücrelerde kayıp (ok başı), tübüllerde vakuolizasyon (siyah ok). A, x20 B,x40



Şekil 51 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (H&E). Normal morfolojiye yakın seminifer tübüller (yıldız) ve düzenli yerleşimli spermatogenik seri hücreleri (kırmızı ok). A,x20 B,x40

4.3.1.2. *Periyodik Asit-Schiff (PAS) Boyama Değerlendirmesi*

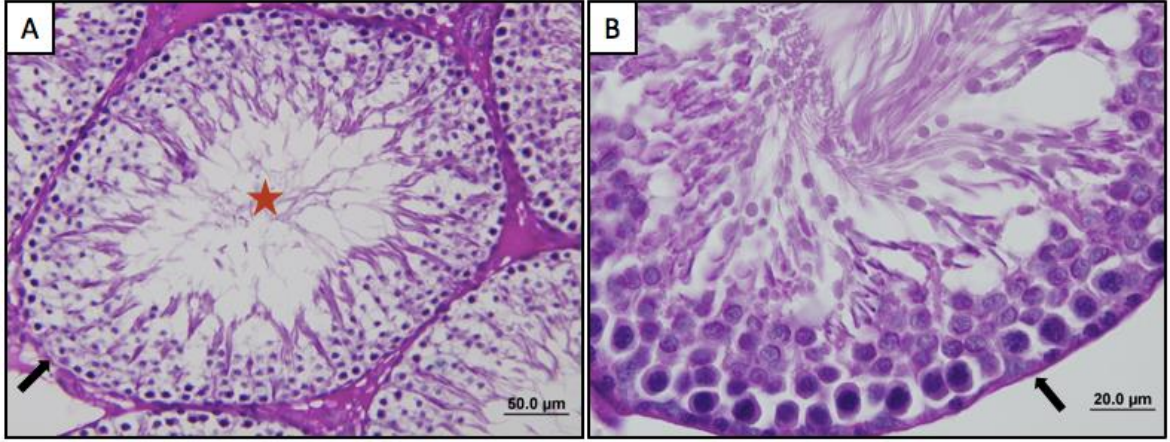
Bu boyama yöntemi ile seminifer tübüllerin organizasyonu ve bazal membran yapısının kalınlığı incelendi.

Kontrol ve sham grupları incelendiğinde, tübül çaplarının normal morfolojiye sahip boyutlarda olduğu, tübüllerin düzgün yerleşim gösterdiği görüldü. Bazal membranın normal kalınlıkta olduğu gözlemlendi (Şekil 52, Şekil 53).

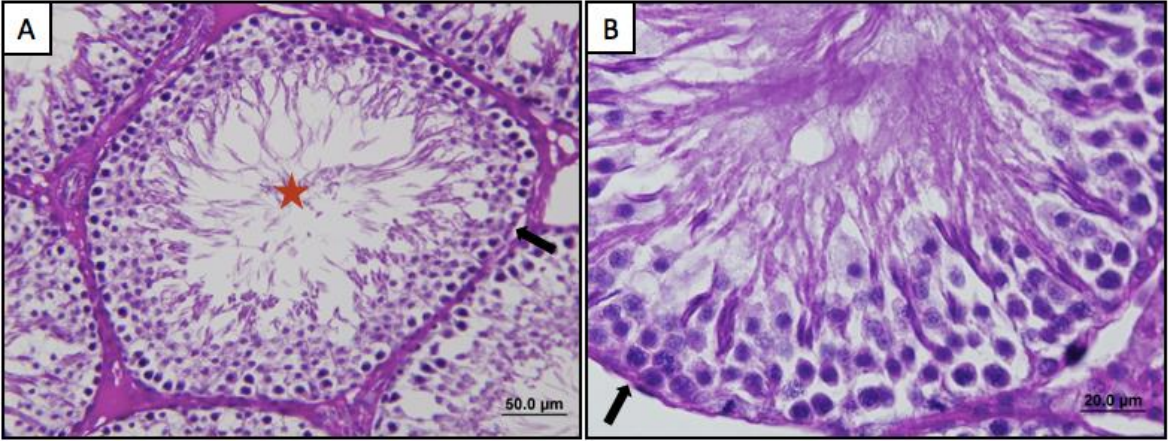
Apocynin grubu incelendiğinde tübül çaplarının normale yakın boyutta olduğu ve bazal membran kalınlıklarının kontrol grubuna yakın bir kalınlıkta olduğu saptandı (Şekil 54).

Radyasyon grubu incelendiğinde, tübül çaplarının boyutlarında azalma olduğu ve bazal membran kalınlıklarında artış gözlemlendi (Şekil 55).

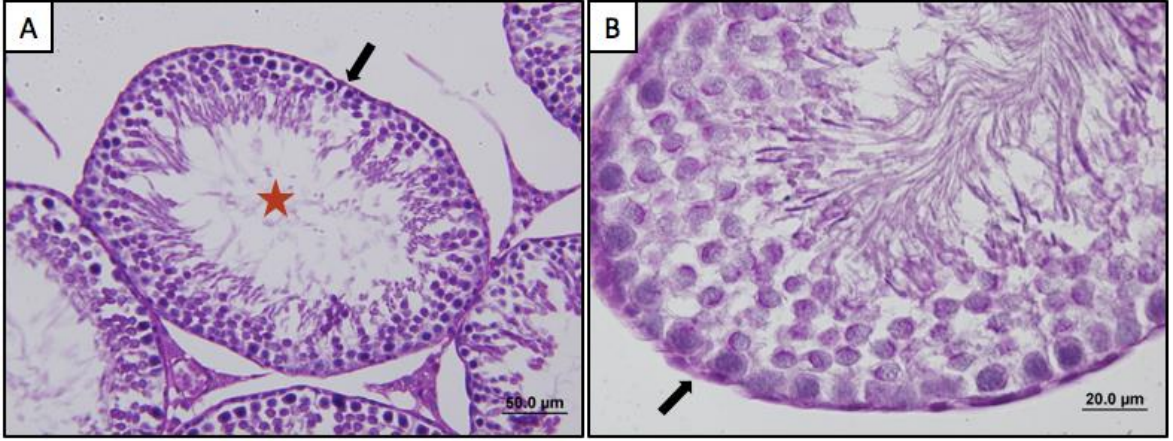
Apocynin+radyasyon grubunda bazal membran kalınlıklarının kontrol grubuna yakın olduğu, tübül çap boyutlarının normal morfolojiye yakın olduğu, seminifer tübüllerin organizasyonunun ve seminifer tübüllerin çaplarının da normale yakın olduğu saptandı (Şekil 56).



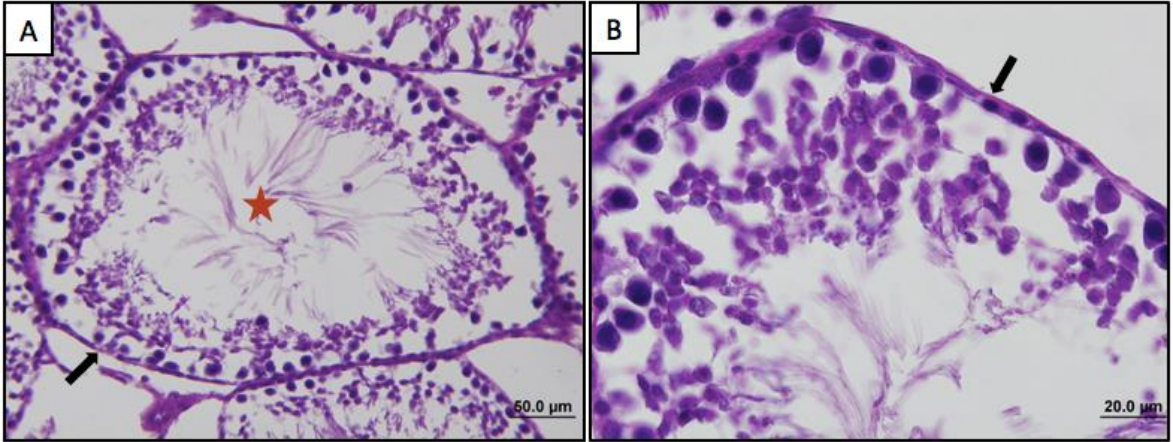
Şekil 52 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (PAS). Normal yapıdaki seminifer tübüller (yıldız) ve normal kalınlıktaki bazal membran (siyah ok). A,x40 B,x100



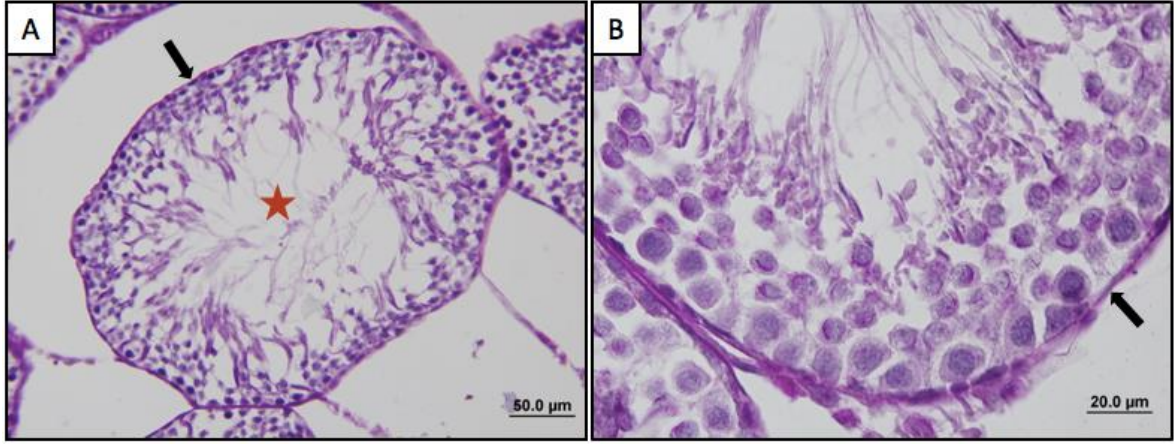
Şekil 53 : Sham grubuna ait testis kesiti (PAS). Normal yapıdaki seminifer tübüller (yıldız) ve normal kalınlıktaki bazal membran (siyah ok). A,x40 B,x100



Şekil 54 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (PAS). Normal yapıdaki seminifer tübüller (yıldız) ve normal kalınlıktaki bazal membran (siyah ok) . A,x40 B,x100



Şekil 55 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (PAS). Seminifer tübül çapında azalma (yıldız) ve bazal membran kalınlaşması (siyah ok). A,x40 B,x100



Şekil 56 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (PAS). Normal morfolojiye yakın seminifer tübüller (yıldız) ve normal kalınlıktaki bazal membran (siyah ok). A,x40 B,x100

4.3.1.3. Masson Trikrom Boyama Değerlendirmesi

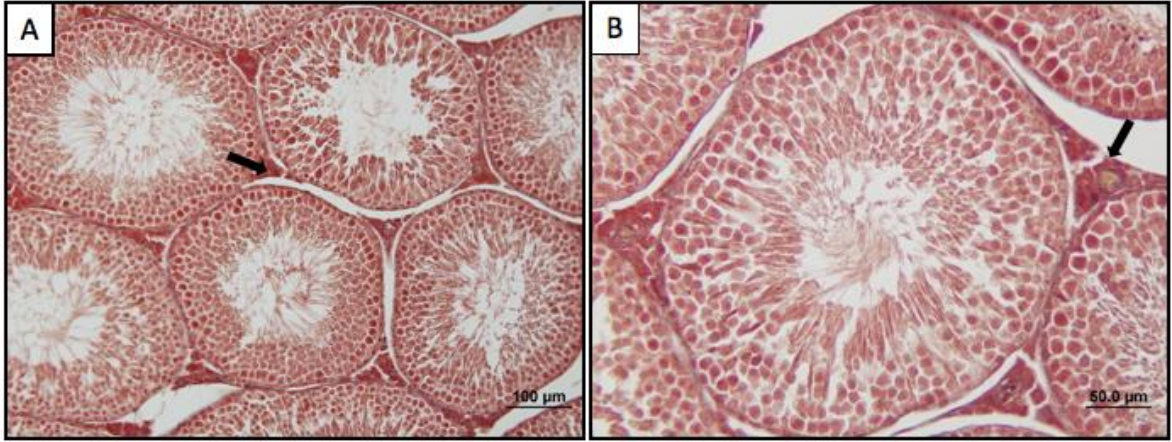
Testis dokusunda bağ doku artışını gözlemlemek için kesitlerde Masson Trikrom üçlü boyama değerlendirme yapıldı.

Kontrol grubu ve sham grubuna ait kesitler incelendiğinde normal yapıdaki intersitisyel alan gözlemlendi (Şekil 57, Şekil 58).

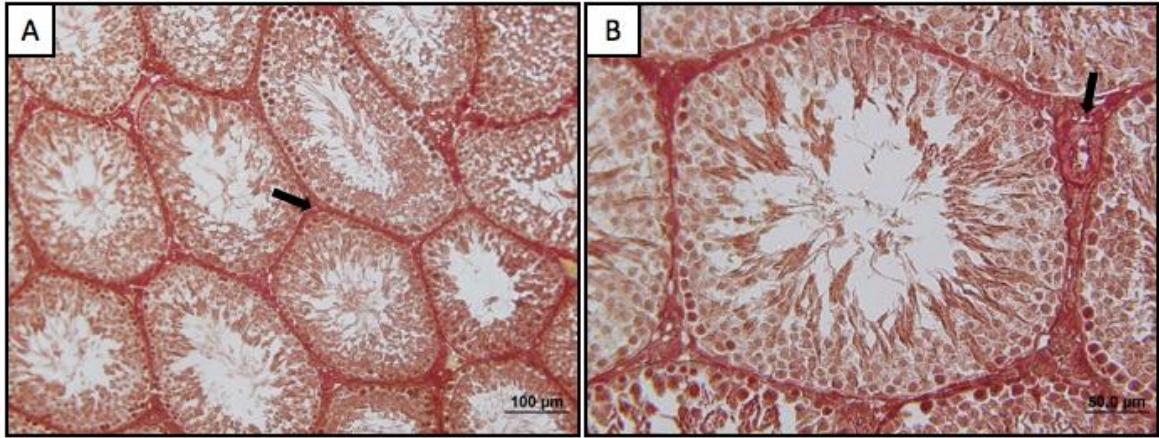
Apocynin grubuna ait kesitler incelendiğinde yine normal yapıdaki bir intersitisyel alan tespit edildi (Şekil 59).

Radyasyon grubuna ait kesitler incelendiğinde intersitisyel alanda bağ doku artışı gözlemlendi (Şekil 60).

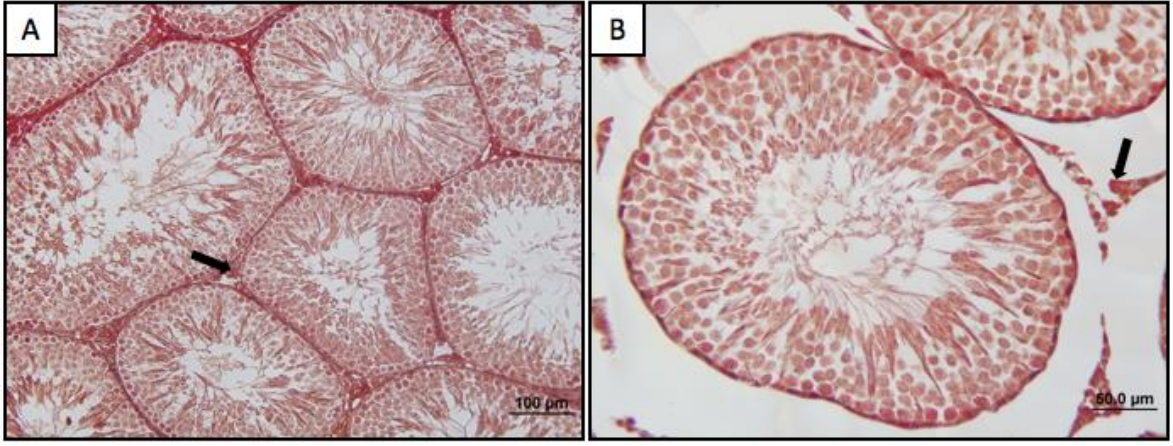
Apocynin+radyasyon grubu incelendiğinde ise intersitisyel alanda normale yakın bir morfolojiye sahip bağ doku olduğu gözlemlendi (Şekil 61).



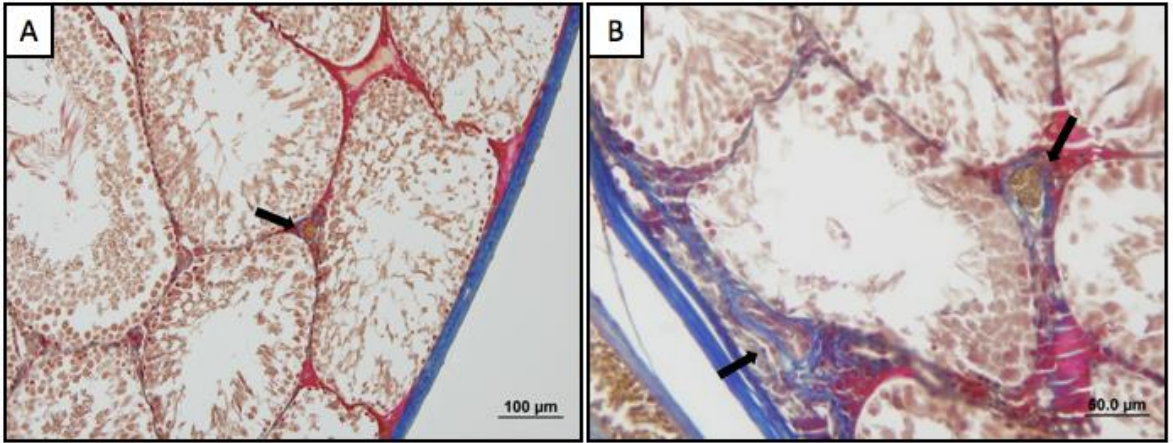
Şekil 57 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (Masson Trikrom). Seminifer tübüller arasında normal yapıda intersitisyel alan (siyah ok) gözlenmektedir. A, x20 B,x40



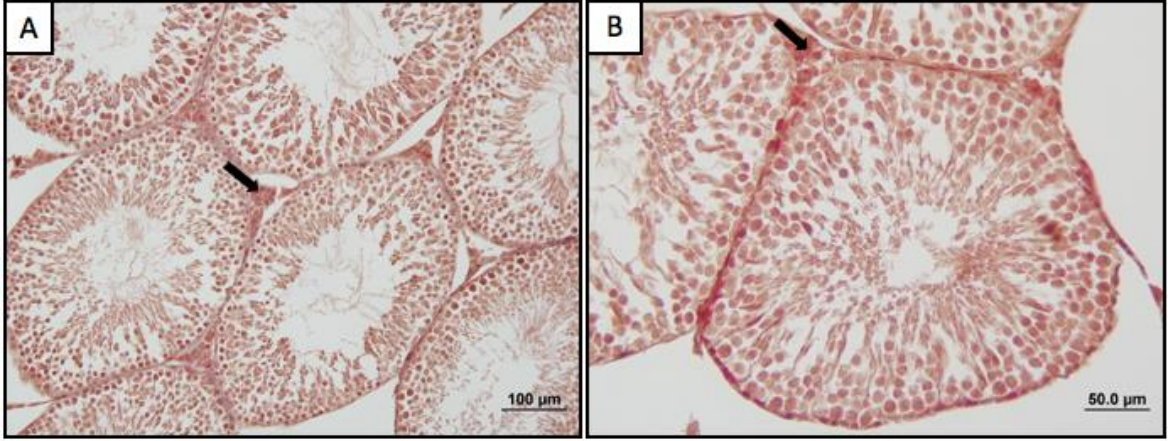
Şekil 58: Sham grubuna ait testis kesiti (Masson Trikrom). Seminifer tübüller arasında normal yapıda intersitisyel alan (siyah ok) gözlenmektedir. A, x20 B,x40



Şekil 59 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (Masson Trikrom). Seminifer tübüller arasında normal yapıda intersitisyel alan (siyah ok) gözlenmektedir. A, x20 B,x40



Şekil 60 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (Masson Trikrom). Seminifer tübüller arasındaki intersitisyel alanda bağ doku artışı (siyah ok) gösterilmektedir. A, x20 B,x40



Şekil 61 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (Masson Trikrom). Seminifer tübüller arasındaki normale yakın morfolojide intersitisyel alan (siyah ok) gözlenmektedir. A, x20 B,x40

4.4. Morfometrik Bulgular

4.4.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması

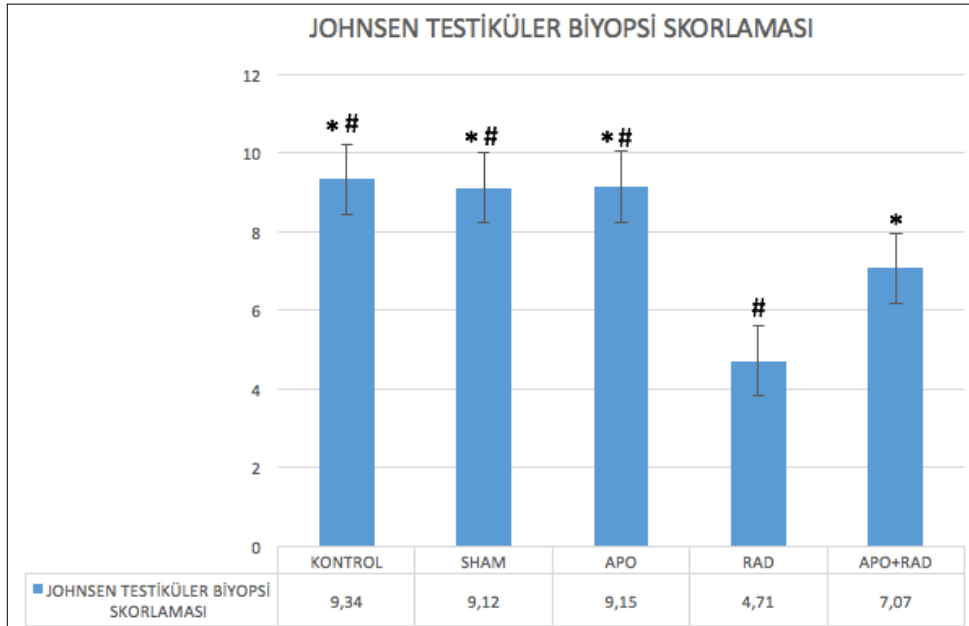
Hematoksilen-eozin boyama yöntemi ile boyanan testislere, seminifer tübül hasarını belirlemek için Johnsen testiküler biyopsi skoruması uygulandı.

Gruplardaki skor ortalamaları kontrol grubunda $9,34 \pm 0,07$, sham grubunda $9,12 \pm 0,08$, apocynin grubunda $9,15 \pm 0,04$, radyasyon grubunda $4,71 \pm 0,09$, apo+rad grubunda $7,07 \pm 0,06$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu, sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,093$, $p=0,061$). Kontrol grubu, radyasyon ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlam bir azalma tespit edildi ($p=0,002$, $p=0,001$).

Radyasyon grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0,002$, $p=0,002$). Radyasyon grubu apo+rad grubu ile karşılaştırıldığında ise apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p=0,001$).

Apo+rad grubu sham ve apo grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0,001$, $p=0,001$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Withney U) (Şekil 62)



Şekil 62 : Grupların Johnsen Testiküler Biyopsi skor ortalamaları

*; Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#; Apocynin+Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

4.4.2. Seminifer Tübül Çaplarının Değerlendirilmesi

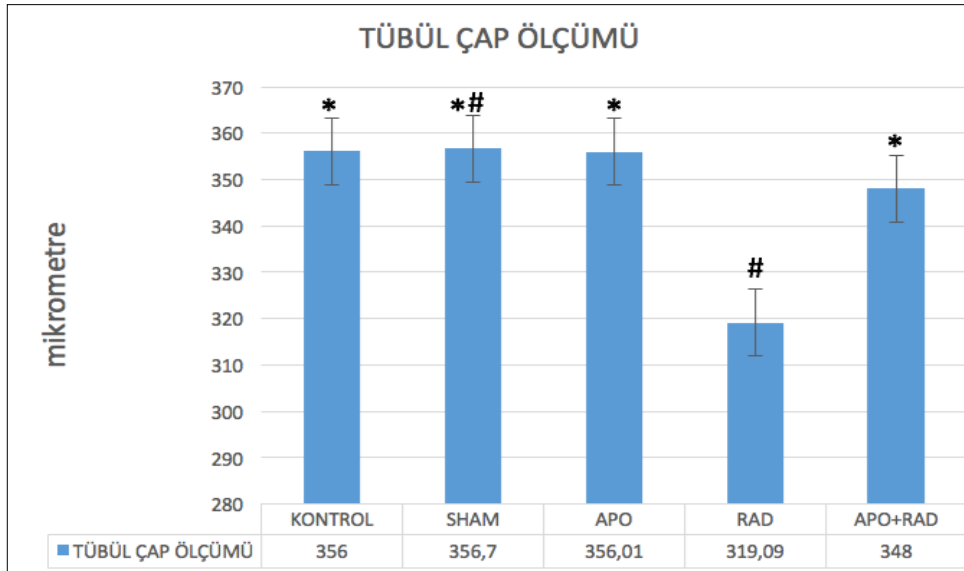
Hematoksilen-eozin boyama yöntemi ile boyanan testislerde, seminifer tübüllerin çap ölçümü değerlendirildi.

Gruplardaki tübül çap ortalamaları; kontrol grubunda $356,14 \pm 4,77$, sham grubunda $356,7 \pm 2,56$, apocynin grubunda $356,01 \pm 6,75$, radyasyon grubunda $319,09 \pm 6,53$, apo+rad grubunda $348 \pm 1,32$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu; sham, apo ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,749$, $p=0,848$, $p=0,109$). Kontrol grubu, radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında ise radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p=0,003$).

Radyasyon grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0,003$, $p=0,004$). Radyasyon grubu, apo+rad grubu ile karşılaştırıldığında ise apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p=0,003$).

Apo+rad grubu sham grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma varken, apo grubu ile karşılaştırıldığında ise azalma olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=0,025$, $p=0,654$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 63)



Şekil 63 : Gruplara ait seminifer tübül çap ortalamaları

*; Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#; Apocynin+Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

4.4.3. Seminifer Tübül Epitel Yüksekliğinin Değerlendirilmesi

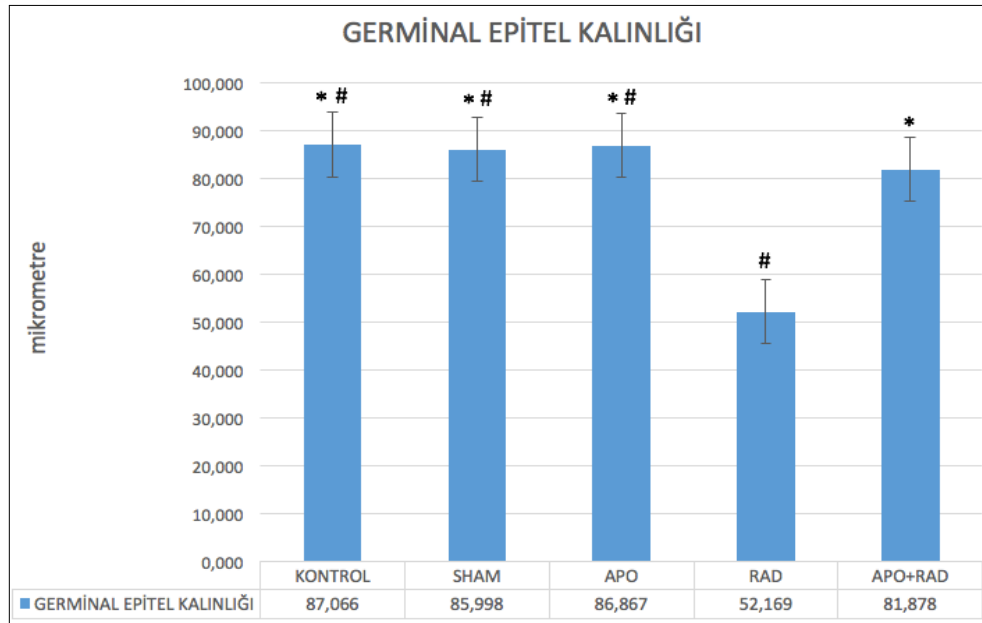
Hematoksilen-eozin boyama yöntemi ile boyanan testislerde, seminifer tübül epitel kalınlıkları değerlendirildi.

Gruplardaki seminifer tübül kalınlık ortalamaları; kontrol grubunda $87,06 \pm 0,38$, sham grubunda $85,99 \pm 0,41$, apocynin grubunda $86,86 \pm 0,21$, radyasyon grubunda $52,16 \pm 0,30$, apo+rad grubunda $81,87 \pm 0,58$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu, sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,142$, $p=0,749$). Kontrol grubu, radyasyon ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0,002$, $p=0,002$).

Radyasyon grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0,002$, $p=0,002$). Radyasyon grubu, apo+rad grubu ile karşılaştırıldığında ise apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p=0,002$).

Apo+rad grubu sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi. ($p=0,002$, $p=0,002$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Withney U) (Şekil 64)



Şekil 64 : Grupların germinal epitel kalınlık ortalamaları

*; Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#; Apocynin+Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

4.4.4. Bazal Membran Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

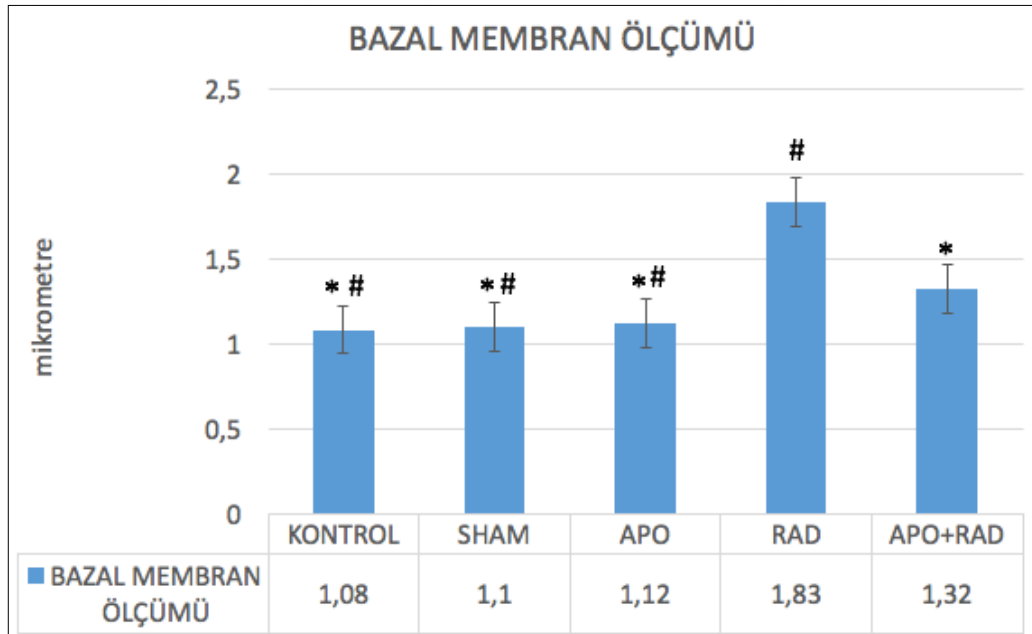
Periyodik Asid Schiff boyaması ile boyanan testis dokusundaki seminifer tübül bazal membranların kalınlıkları değerlendirildi.

Gruplardaki bazal membran kalınlık ortalamaları kontrol grubunda $1,08 \pm 0,06$, sham grubunda $1,10 \pm 0,02$, apocynin grubunda $1,12 \pm 0,01$, radyasyon grubunda $1,83 \pm 0,02$, apo+rad grubunda $1,32 \pm 0,02$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu, sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,848$, $p=0,654$). Kontrol grubu, radyasyon ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p=0,002$, $p=0,007$).

Radyasyon grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p=0,002$, $p=0,002$). Radyasyon grubu apo+rad grubu ile karşılaştırıldığında ise apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0,002$).

Apo+rad grubu sham ve apo grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p=0,002$, $p=0,002$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Withney U) (Şekil 65)



Şekil 65 : Gruplara ait bazal membran kalınlık ortalamaları

*; Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#; Apocynin+Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup($p<0,05$)

4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.5.1. TUNEL Boyama Bulguları

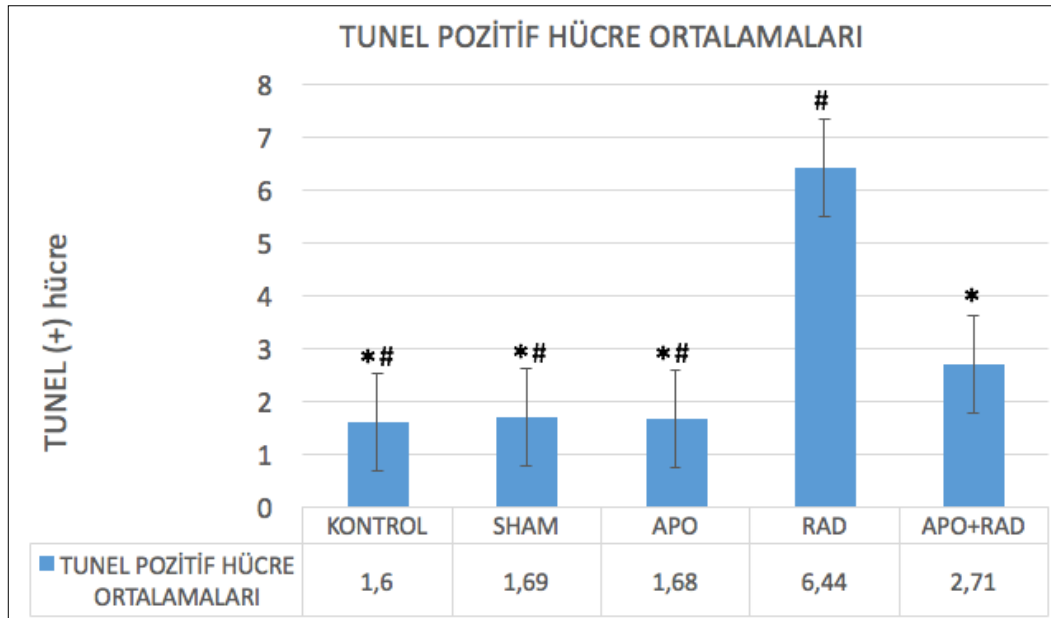
Apopitotik hücreleri belirlemek için TUNEL pozitif hücre sayımı yapıldı.

Gruplardaki TUNEL pozitif hücre sayı ortalamalar kontrol grubunda $1,60 \pm 0,05$, sham grubunda $1,69 \pm 0,02$, apocynin grubunda $1,68 \pm 0,02$, radyasyon grubunda $6,44 \pm 0,16$, apo+rad grubunda $2,71 \pm 0,18$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,186$, $p=0,209$). Kontrol grubu, radyasyon ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında ise radyasyon ve apo+rad gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p=0,001$, $p=0,001$).

Radyasyon grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p=0,001$, $p=0,001$). Radyasyon grubu, apo+rad grubu ile karşılaştırıldığında ise apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0,002$).

Apo+rad grubu sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artma gözlemlendi ($p=0,001$, $p=0,001$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Withney U) (Şekil 66)



Şekil 66 : Gruplara ait TUNEL pozitif hücre sayısı

*; Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#; Apocynin+Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

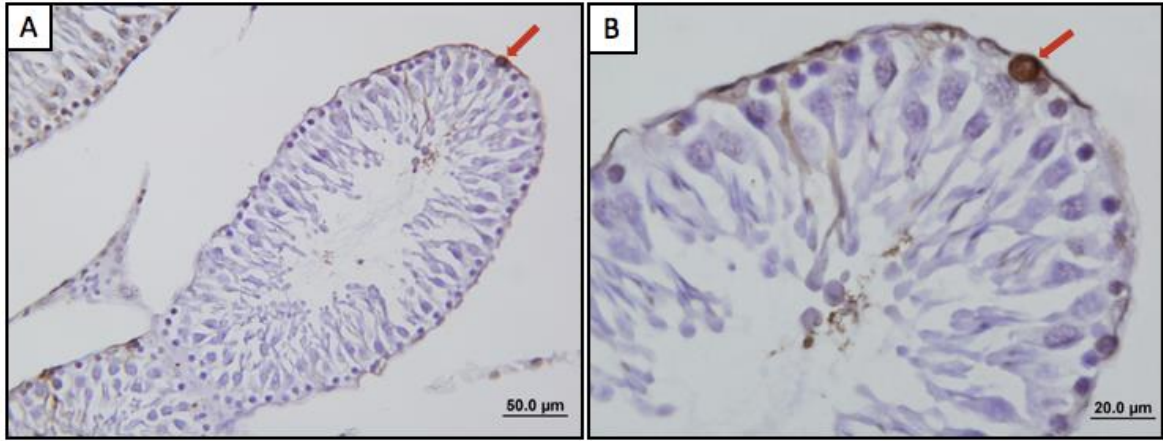
Kontrol grubu incelendiğinde seminifer tübüllerin normal yapıda olduğu ve çok az sayıda TUNEL pozitif hücre gözlemlendi (Şekil 67).

Sham grubu incelendiğinde normal morfolojiye sahip seminifer tübüller ve az sayıdaki TUNEL pozitif hücreler gözlemlendi (Şekil 68).

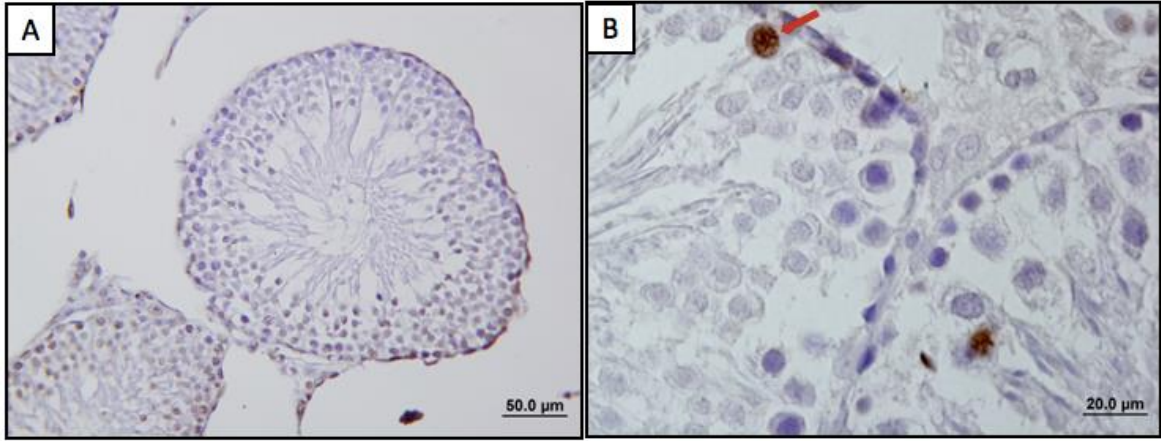
Apocynin grubu incelendiğinde düzgün yapıdaki seminifer tübüller ve kontrol grubuna benzer şekilde az sayıda TUNEL pozitif hücreler gözlemlendi (Şekil 69).

Radyasyon grubu incelendiğinde seminifer tübüllerin dejenere olduğu, spermatogenik seri hücrelerinde kayıplar ile birçok TUNEL pozitif hücre sayısında artış gözlemlendi. (Şekil 70).

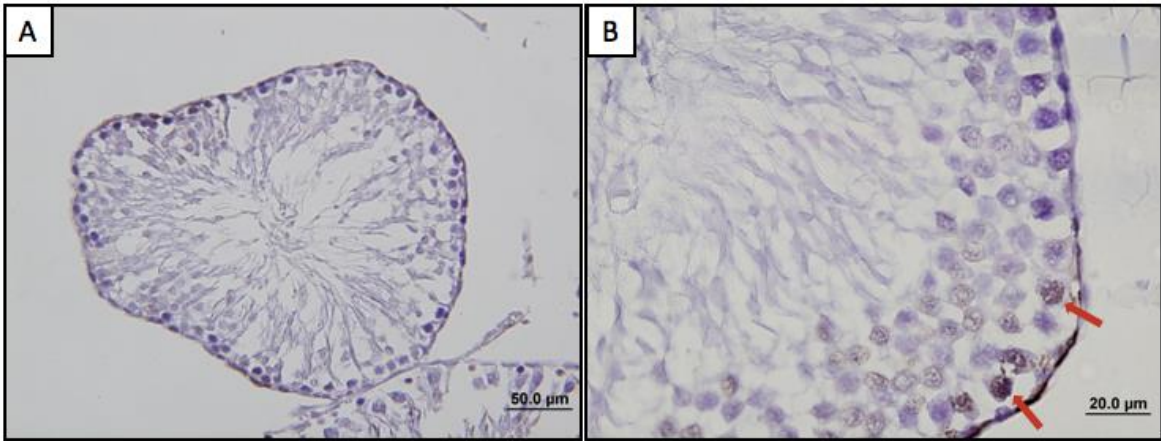
Apocynin+radyasyon grubu incelendiğinde ise kontrol grubuna benzer normal morfolojideki seminifer tübüller ile kontrol grubuna yakın sayıda TUNEL pozitif hücre gözlemlendi (Şekil 71).



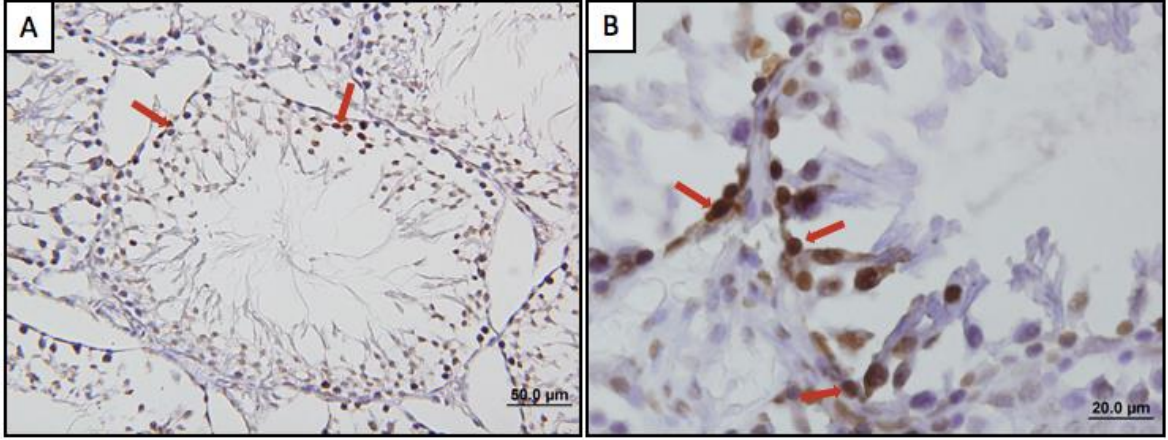
Şekil 67 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (TUNEL). Az sayıdaki TUNEL (+) hücreler (kırmızı ok). A,x40 Bx100



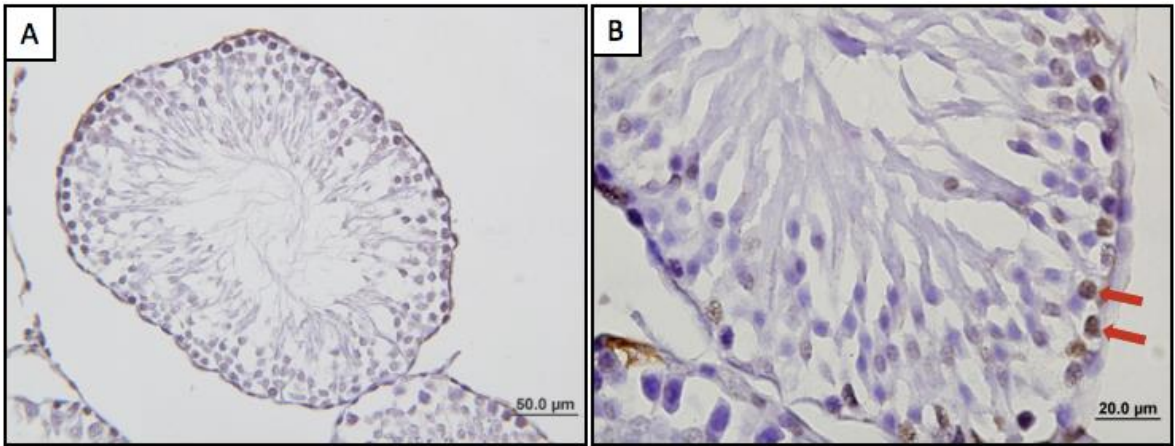
Şekil 68 : Sham grubuna ait testis kesiti (TUNEL). Az sayıdaki TUNEL (+) hücreler (kırmızı ok). A, x40, B, x100



Şekil 69 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (TUNEL). Az sayıdaki TUNEL (+) hücreler (kırmızı ok). A,x40, B, x100



Şekil 70 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (TUNEL). TUNEL (+) hücrelerde artış (kırmızı ok). A, x40, B, x100



Şekil 71 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (TUNEL). Az sayıdaki TUNEL (+) hücreler (kırmızı ok) gösterilmektedir. A, x40, B, x100

4.5.2. Aktive Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulgular

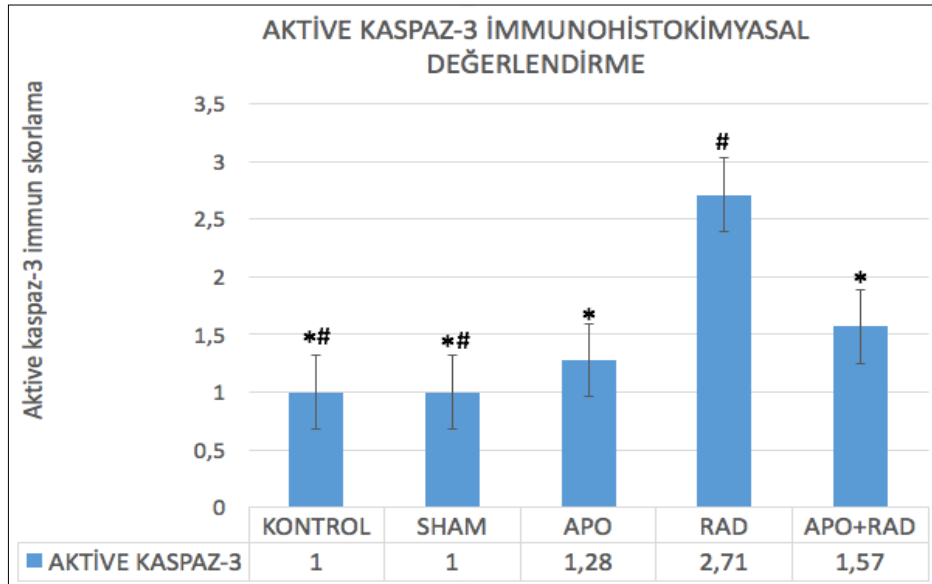
Apoptotik hücreleri belirlemek için immunohistokimyasal olarak aktive kaspaz-3 boyaması da yapıldı.

Gruplardaki ortalamalar kontrol grubunda $1,00 \pm 0,00$, sham grubunda $1,00 \pm 0,00$, apocynin grubunda $1,28 \pm 0,18$, radyasyon grubunda $2,71 \pm 0,18$, apo+rad grubunda $1,57 \pm 0,20$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=1,000$, $p=0,141$). Kontrol grubu, radyasyon ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında ise gruplarda istatistiksel olarak anlam bir artış tespit edildi ($p=0,001$, $p=0,023$).

Radyasyon grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p=0,001$, $p=0,002$). Radyasyon grubu, apo+rad grubu ile karşılaştırıldığında ise apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0,005$).

Apo+rad grubu sham grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0,023$). Apo+rad grubu apo grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,298$) (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Withney U) (Şekil 72)



Şekil 72 : Gruplara ait aktive kaspaz-3 immünreaktivite skorları

*; Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#; Apocynin+Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

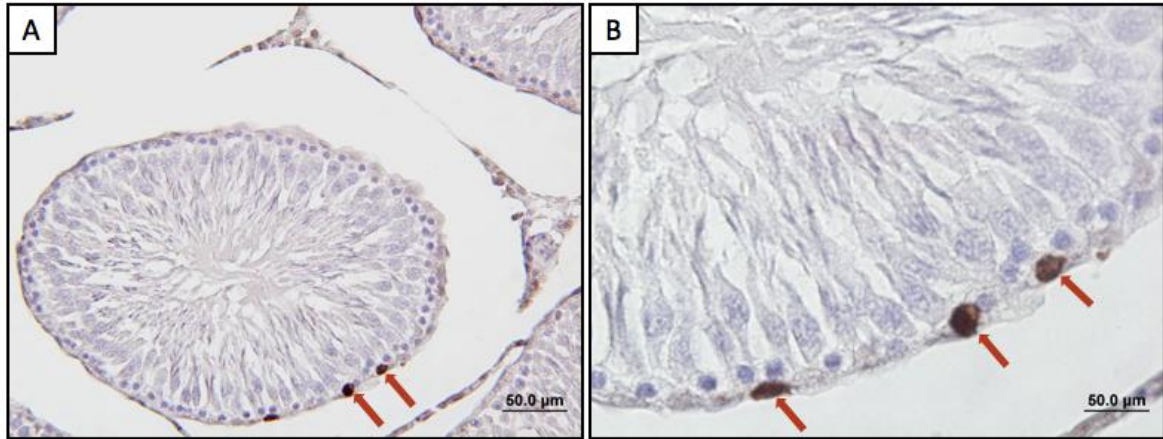
Kontrol grubu incelendiğinde normal morfolojiye sahip seminifer tübüller ile az sayıdaki aktive kaspaz-3 pozitif hücreler gözlemlendi (Şekil 73).

Sham grubu incelendiğinde düzgün yapıdaki seminifer tübüller ile az sayıdaki aktive kaspaz-3 pozitif hücreler gözlemlendi (Şekil 74).

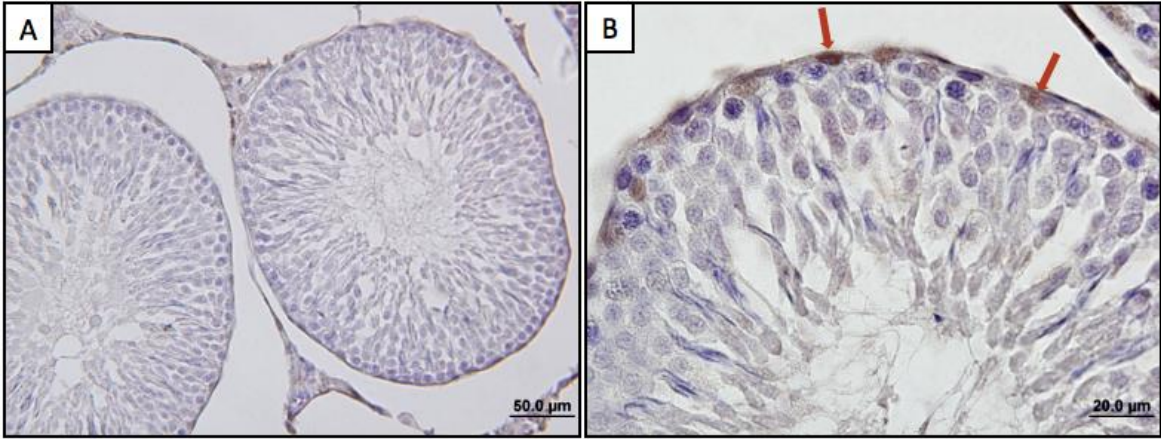
Apocynin grubu incelendiğinde normal yapıdaki seminifer tübüller ve az sayıdaki aktive kaspaz-3 pozitif hücreler gözlemlendi (Şekil 75).

Radyasyon grubu incelendiğinde dejenere olan seminifer tübüller ile tübüllerdeki birçok aktive kaspaz-3 pozitif hücreler saptandı (Şekil 76).

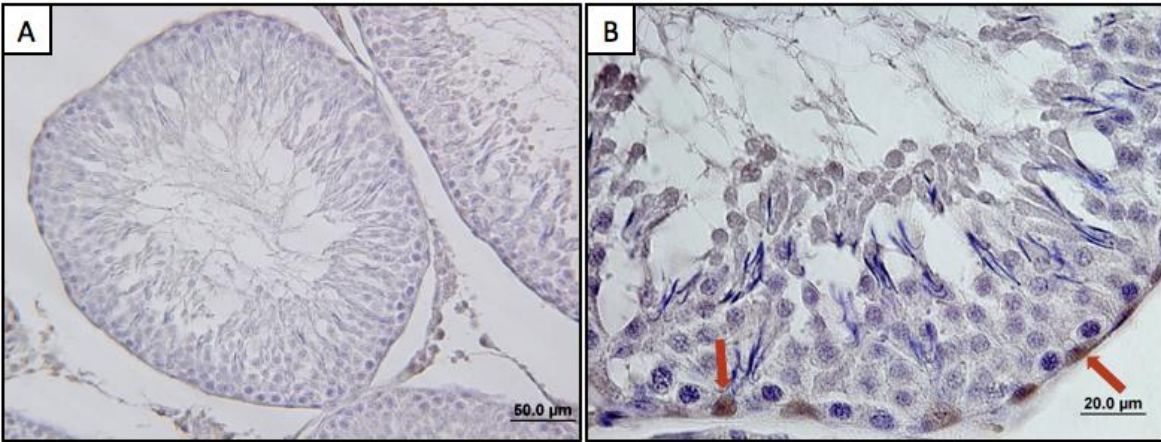
Apocynin+radyasyon grubu incelendiğinde ise normale yakın morfolojideki seminifer tübüllerde az sayıda aktive kaspaz-3 pozitif hücreler gözlemlendi (Şekil 77).



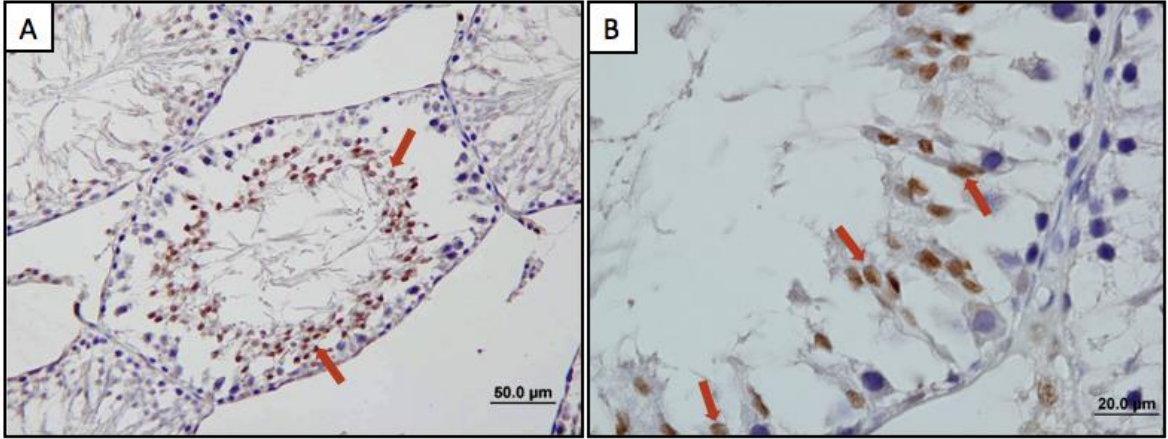
Şekil 73 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (Aktive kaspaz-3). Az sayıdaki aktive kaspaz-3 (+) hücreler (kırmızı ok). A, x40, B, x100



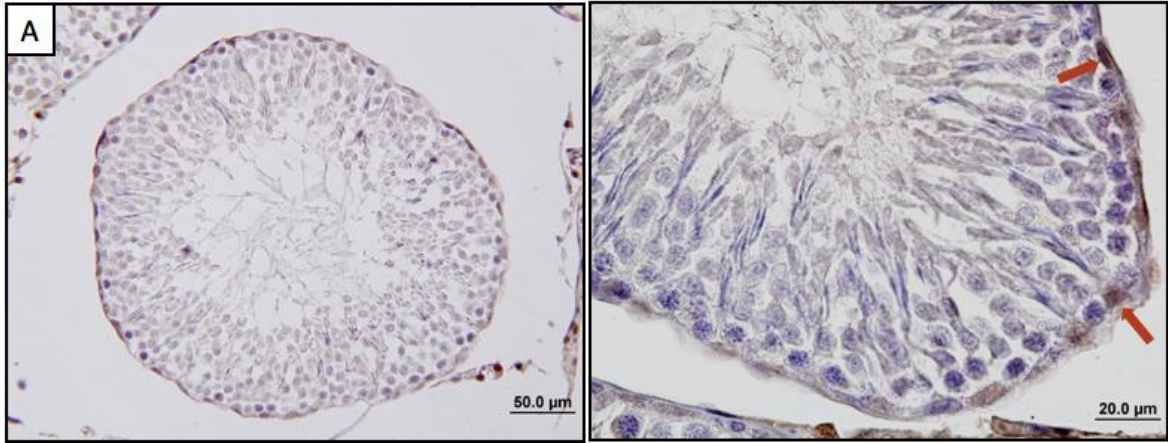
Şekil 74 : Sham grubuna ait testis kesiti (Aktive kaspaz-3). Az sayıdaki aktive kaspaz-3 (+) hücreler (kırmızı ok). A, x40, B, x100



Şekil 75 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (Aktive kaspaz-3). Az sayıdaki aktive kaspaz-3 (+) hücreler. A, x40, B, x100



Şekil 76 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (Aktive kaspaz-3). Tübüllerde meydana gelen aktive kaspaz-3 (+) hücrelerinde artış (kırmızı ok). A, x40, B, x100



Şekil 77 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (Aktive kaspaz-3). Az sayıdaki aktive kaspaz-3 (+) hücreler (kırmızı ok). A, x40, B, x100

4.5.3. ZO-1 İmmunohistokimyasal Bulguları

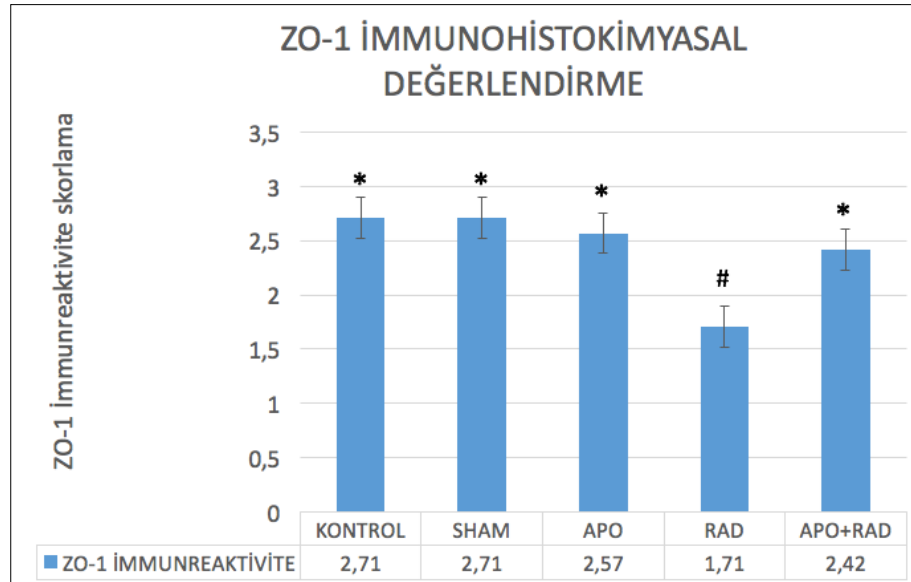
Hücreler arası sıkı bağlantıları incelemek amacıyla ZO-1 immunohistokimyasal boyama yapıldı.

Gruplardaki immunohistokimyasal skor ortalamaları kontrol grubunda $2,71 \pm 0,18$, sham grubunda $2,71 \pm 0,18$, apocynin grubunda $2,57 \pm 0,20$, radyasyon grubunda $1,71 \pm 0,18$, apo+rad grubunda $2,42 \pm 0,20$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu; sham, apo ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=1,000$, $p=0,591$, $p=0,298$). Kontrol grubu, radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında ise radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlam bir azalma tespit edildi ($p=0,006$).

Radyasyon grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0,006$, $p=0,015$). Radyasyon grubu, apo+rad grubu ile karşılaştırıldığında ise apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p=0,030$).

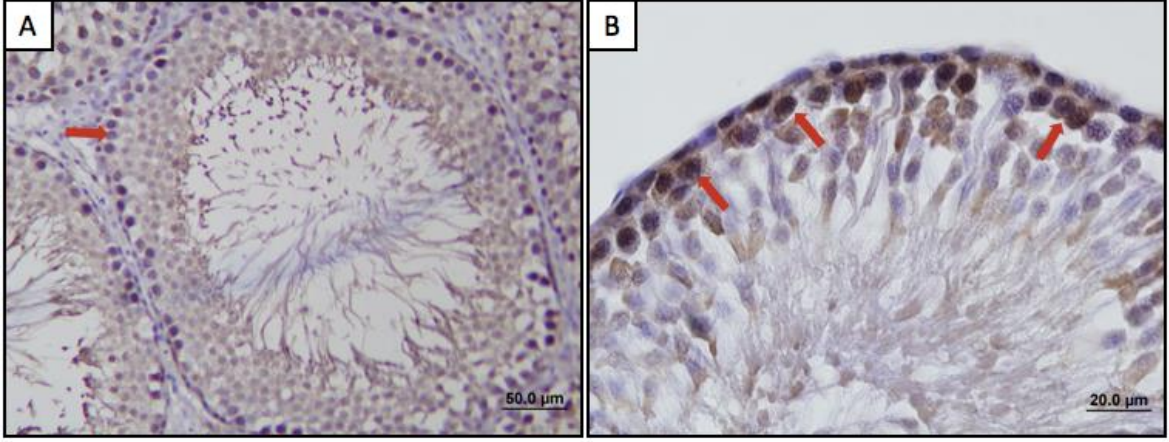
Apo+rad grubu sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,298$, $p=0,606$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Withney U) (Şekil 78)



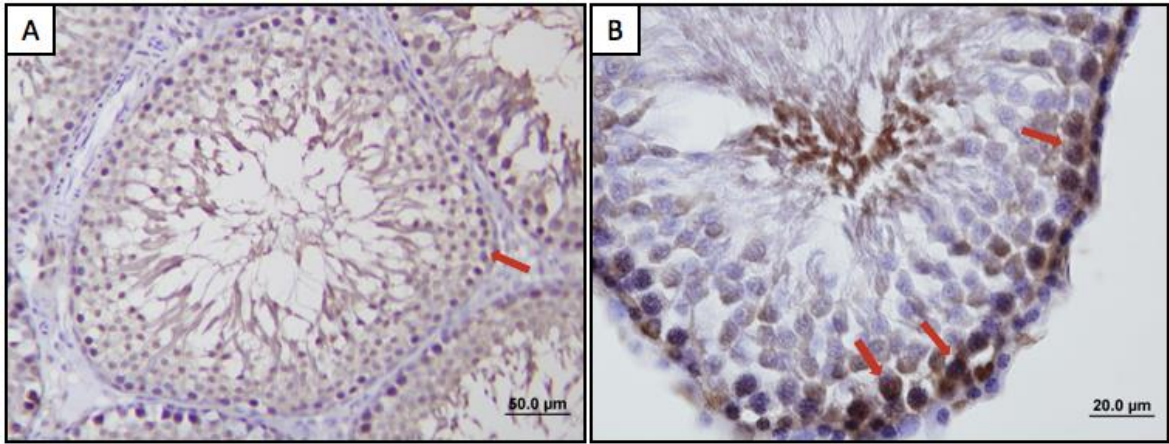
Şekil 78 : Gruplara ait ZO-1 immunreaktivite skorları

*; Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

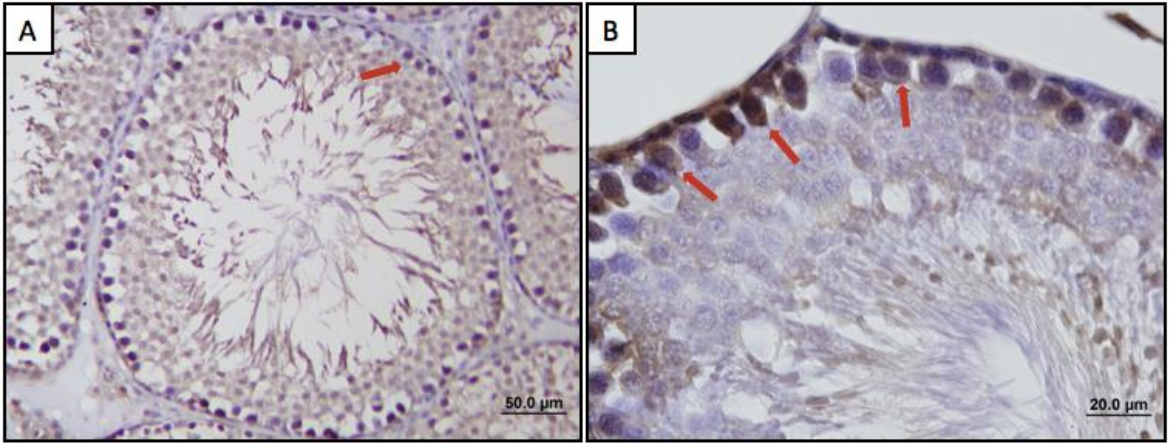
#; Apocynin+Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)



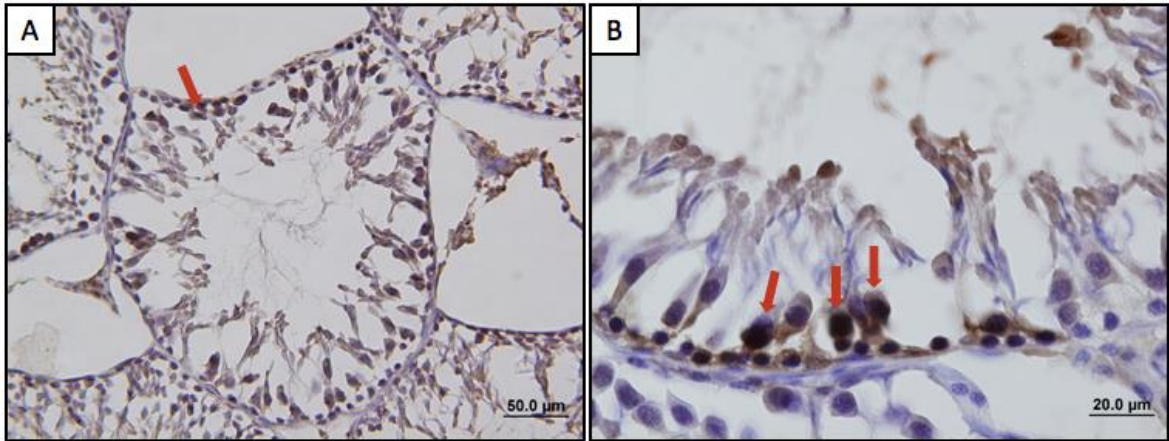
Şekil 79 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (ZO-1). ZO-1 immunreaktivitesi, ZO-1 immun pozitif hücreler (kırmızı ok). A, x40 B, x100



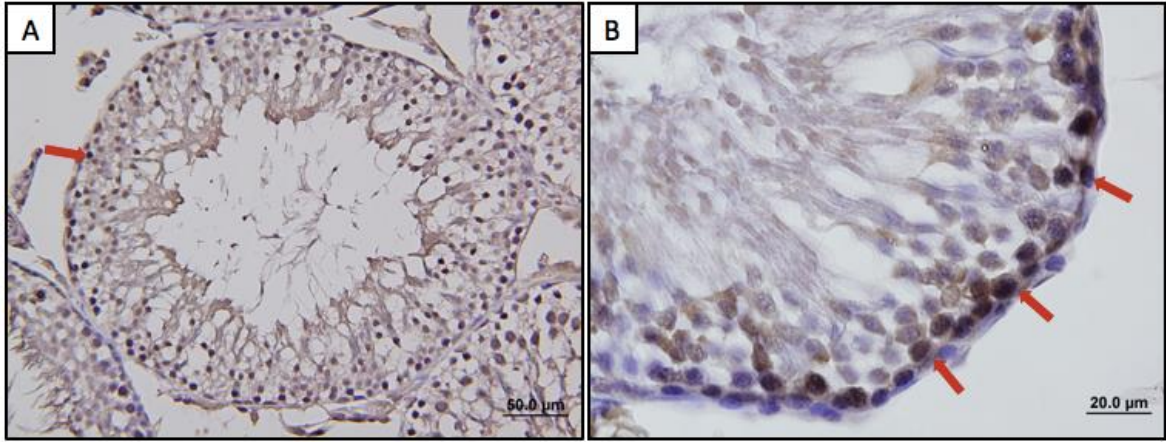
Şekil 80 : Sham grubuna ait testis kesiti (ZO-1). ZO-1 immunreaktivitesi, ZO-1 immun pozitif hücreler (kırmızı ok). A, x40 B, x100



Şekil 81 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (ZO-1). ZO-1 immunreaktivitesi, ZO-1 immun pozitif hücreler (kırmızı ok). A, x40 B, x100



Şekil 82 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (ZO-1). Seminifer tübüllerde ZO-1 immunreaktivitesinde azalma. ZO-1 immun pozitif hücreler (kırmızı ok). A, x40 B, x100



Şekil 83 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (ZO-1). Normal yoğunluktaki ZO-1 tutulumu. ZO-1 immun pozitif hücreler (kırmızı ok). A, x40 B, x100

4.5.4. Occludin İmmunohistokimyasal Bulgular

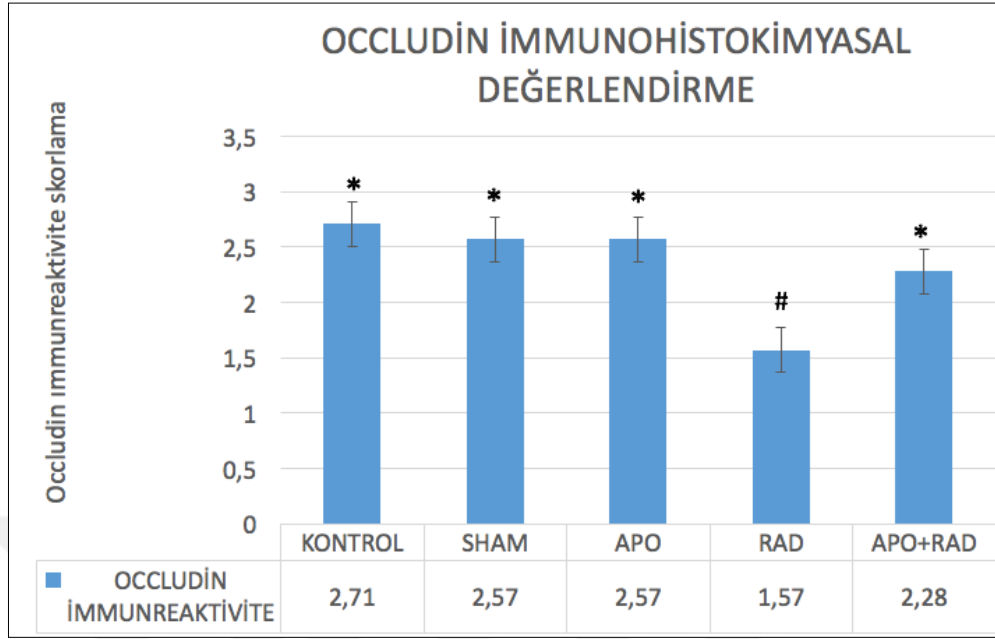
Hücreler arası sıkı bağlantıları incelemek amacıyla Occludin immunohistokimyasal boyama yapıldı.

Gruplardaki immunohistokimyasal skor ortalamalar kontrol grubunda $2,71 \pm 0,18$, sham grubunda $2,57 \pm 0,20$, apocynin grubunda $2,57 \pm 0,20$, radyasyon grubunda $1,57 \pm 0,20$, apo+rad grubunda $2,28 \pm 0,18$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu; sham, apo ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,591$, $p=0,591$, $p=0,122$). Kontrol grubu, radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında ise radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlam bir azalma tespit edildi ($p=0,005$).

Radyasyon grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0,010$, $p=0,010$). Radyasyon grubu, apo+rad grubu ile karşılaştırıldığında ise apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p=0,030$).

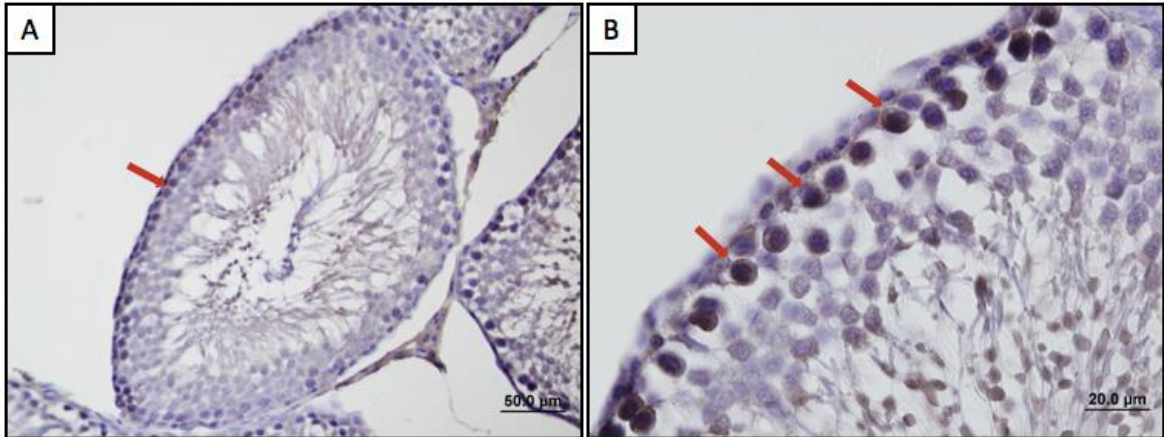
Apo+rad grubu sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,298$, $p=0,298$) (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Withney U) (Şekil 84)



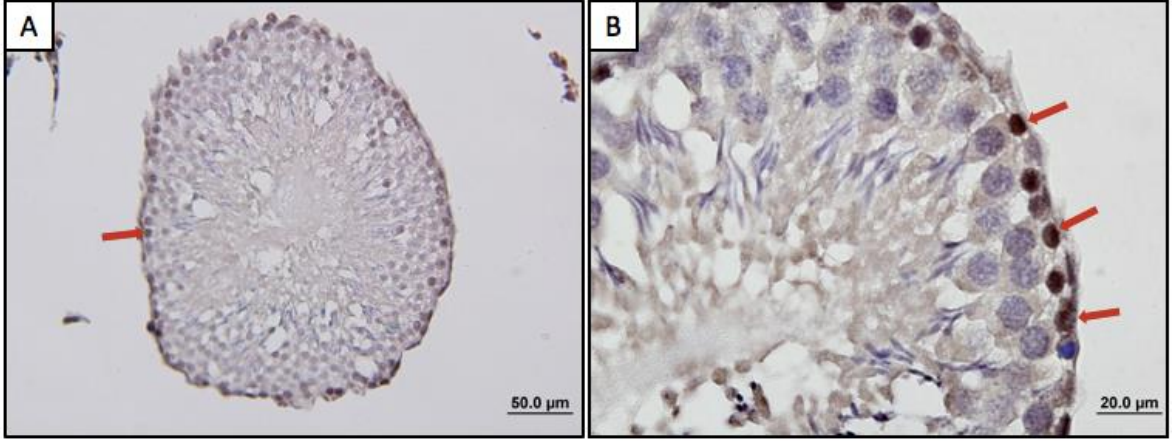
Şekil 84 : Gruplara ait occludin immunreaktivite skorları

*; Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p < 0,05$)

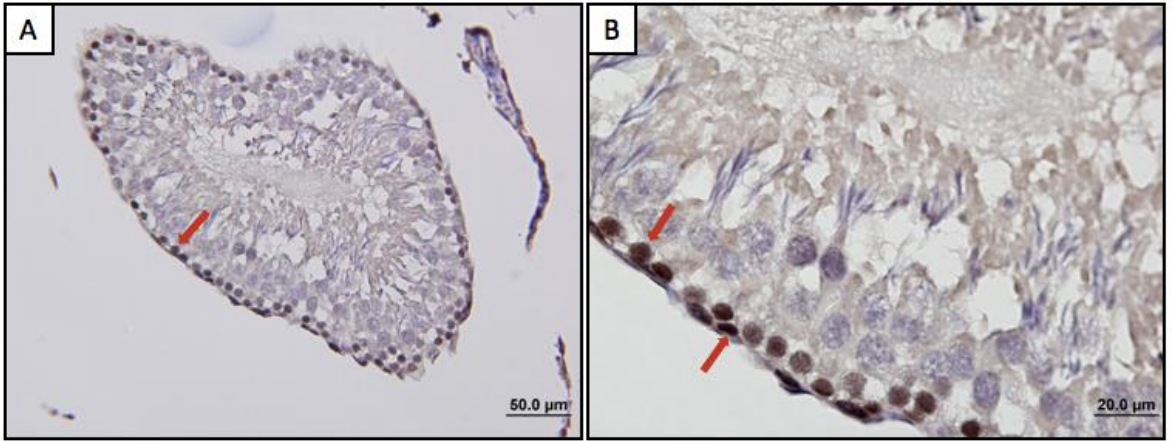
#; Apocynin+Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p < 0,05$)



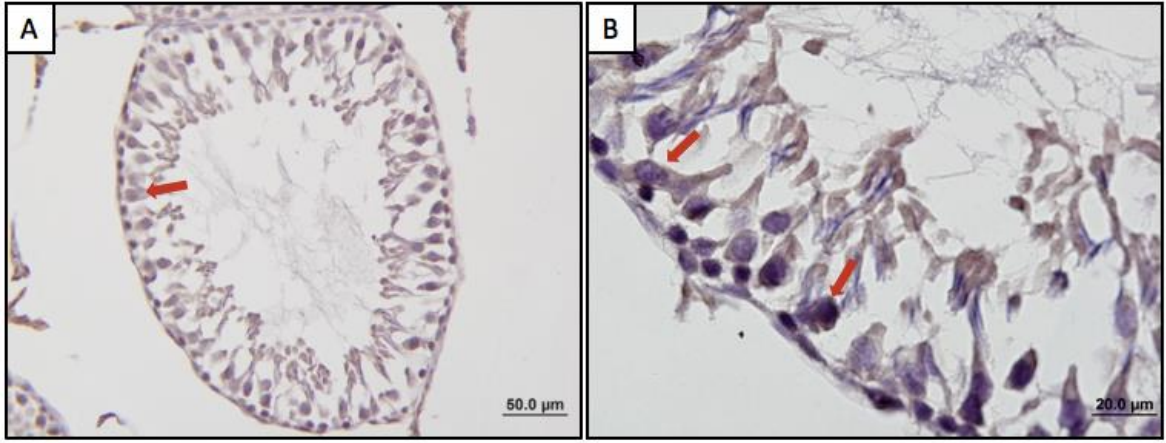
Şekil 85 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (Occludin). Occludin immunreaktivitesi, occludin immun pozitif hücreler (kırmızı ok). A, x40 B, x100



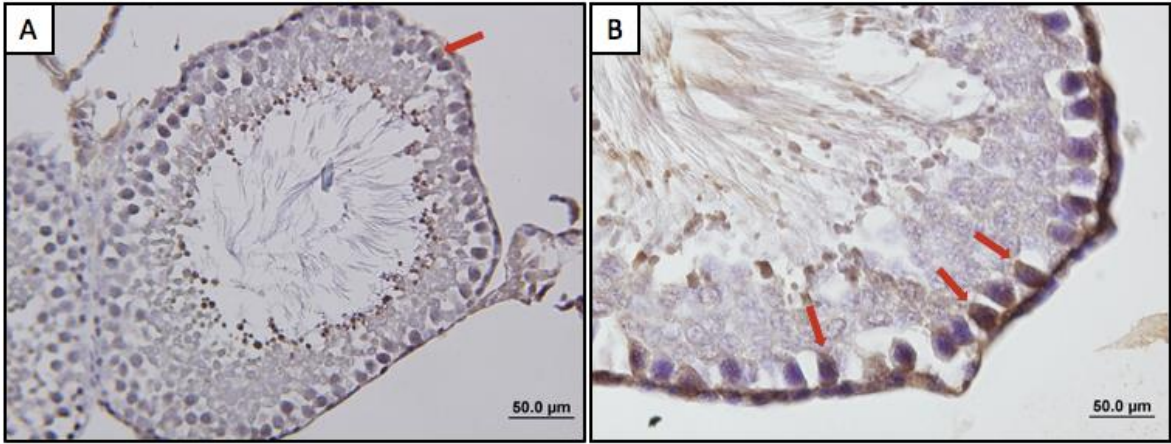
Şekil 86 : Sham grubuna ait testis kesiti (Occludin). Occludin immunreaktivitesi, occludin immun pozitif hücreler (kırmızı ok). A, x40 B, x100



Şekil 87 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (Occludin). Occludin immunreaktivitesi, occludin immun pozitif hücreler (kırmızı ok). A, x40 B, x100



Şekil 88 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (Occludin). Seminifer tübüllerde occludin immunreaktivitesinde azalma, occludin immun pozitif hücreler (kırmızı ok). A, x40 B, x100



Şekil 89 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (Occludin). Normal yoğunluktaki occludin tutulumu, occludin immun pozitif hücreler (kırmızı ok). A, x40 B, x100

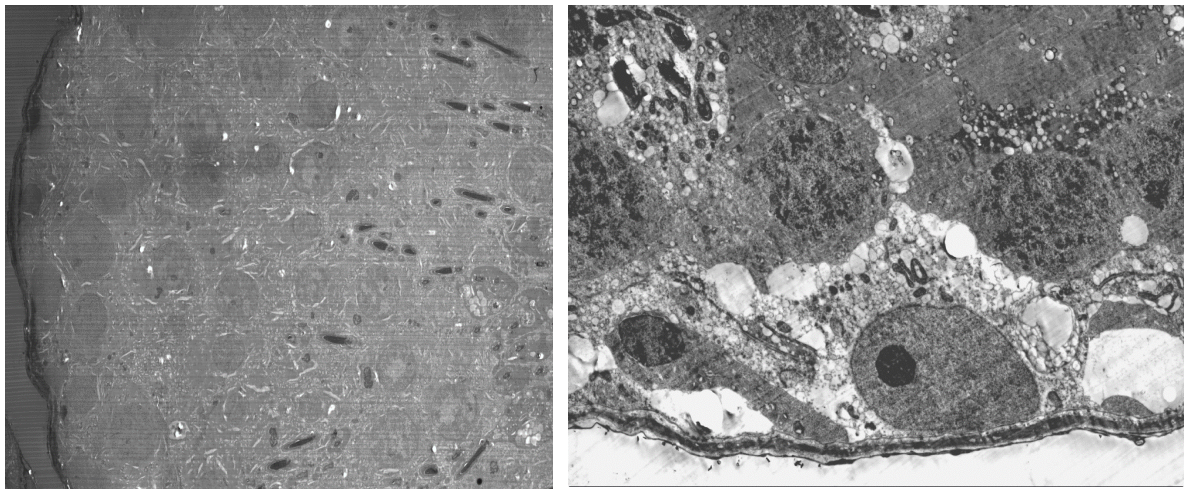
4.6. Elektron Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubuna ait elektron mikroskopik kesitler incelendiğinde normal morfolojiye sahip seminifer tübüllerde bazal membrandan lümeneye doğru sıralanmış spermatogenik seri hücreleri ve bazal membran kalınlığının normal kalınlıkta olduğu gözlemlendi. Hücreler arası sıkı bağlantıların intakt olduğu ve herhangi bir düzensizliğe rastlanmadığı görüldü (Şekil 90).

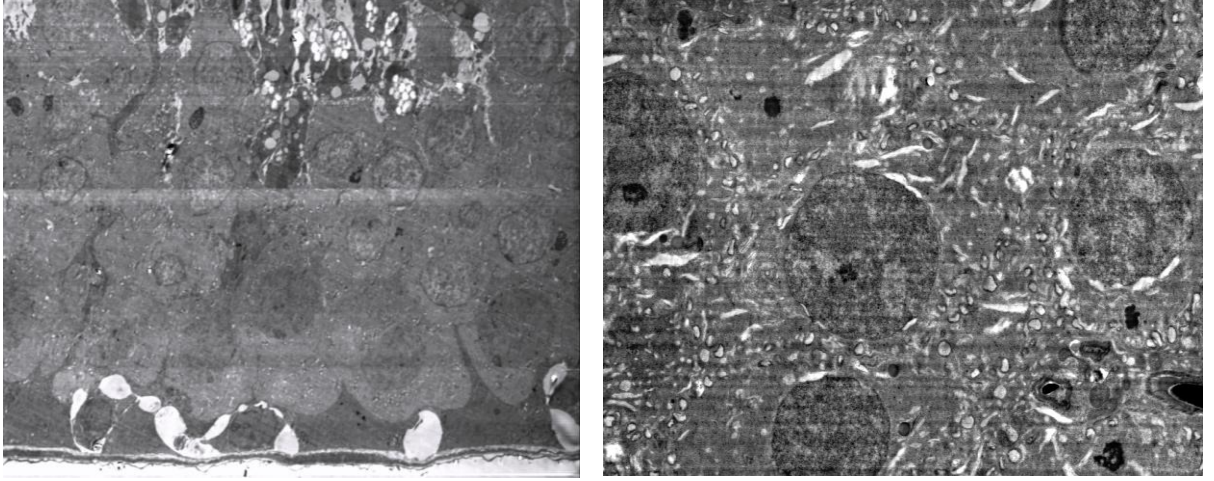
Sham ve apocynin gruplarına ait ince kesitler incelendiğinde kontrol grubuna benzer şekilde seminifer tübüller, bazal membran ve hücreler arası sıkı bağlantı komplekslerinin normal morfolojide olduğu gözlemlendi (Şekil 91) (Şekil 92).

Radyasyon grubuna ait ince kesitler incelendiğinde, dejenere olan seminifer tübüllerde germ hücre kayıpları, sertoli hücre sayısında azalma, nukleus, organel ve hücre membranlarında morfolojik bozukluklar gözlemlendi. Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında oluşan vakuoller ve lipid damlacıkları gözlenirken seminifer tübül bazal membran kalınlığında artış tespit edildi. Hücreler arası sıkı bağlantı komplekslerinde de yer yer düzensizlikler saptandı (Şekil 93).

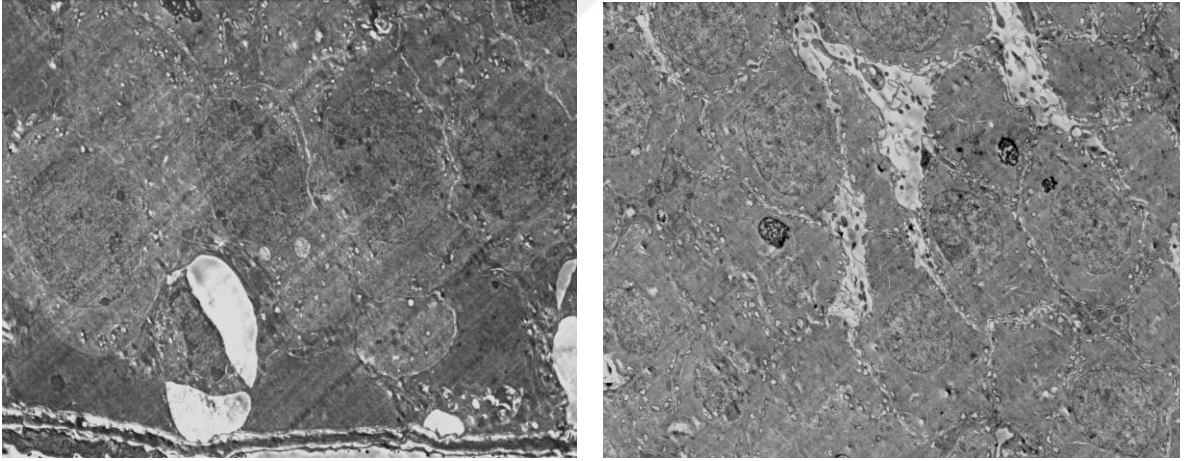
Apocynin+radyasyon grubuna ait ince kesitler incelendiğinde dejenere olmuş seminifer tübüllerin morfolojilerinin düzeldiği, sertoli hücrelerinin ve germ hücrelerinin nukleus, organel ve hücre membranlarının kontrol grubuna benzer morfolojide olduğu, bazal membranda hasar grubunda gözlenen düzensizlik ve kalınlaşmanın azaldığı ve hücreler arası sıkı bağlantı komplekslerinin hasar grubuna göre daha düzgün yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 94).



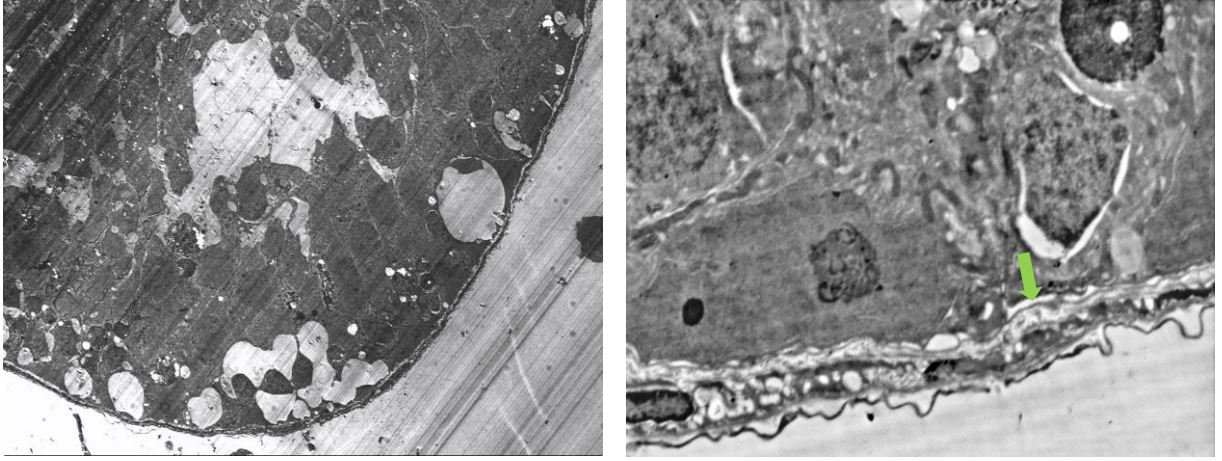
Şekil 90 : Kontrol grubuna ait testis kesiti (Uranil Asetat-Kurşun Sitrata). Bazal membran üzerine oturan spermatogenik seri hücreler.



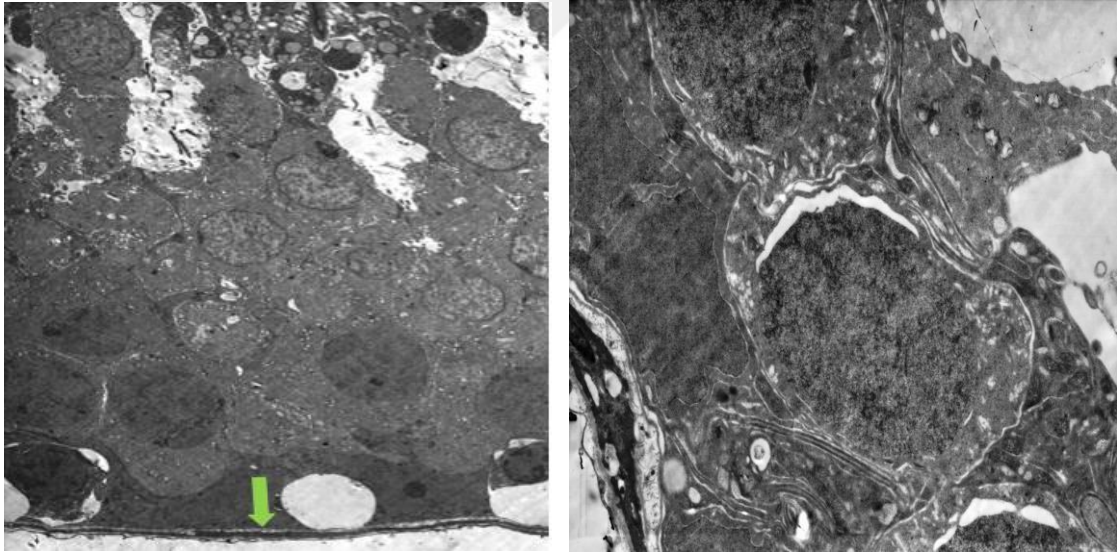
Şekil 91 : Sham grubuna ait testis kesiti (Uranil Asetat-Kurşun Sitrat). Bazal membran ve üzerine oturan spermatogenik seri hücreler.



Şekil 92 : Apocynin grubuna ait testis kesiti (Uranil Asetat-Kurşun Sitrat). Bazal membran üzerine oturan spermatogenik seri hücreler.



Şekil 93 : Radyasyon grubuna ait testis kesiti (Uranil Asetat-Kurşun Sitrata). Seminifer tübülde germ hücre kaybı, vakuolizasyon, bazal membranda düzensizlik ve kalınlığında artış (yeşil ok).



Şekil 94 : Apocynin+radyasyon grubuna ait testis kesiti (Uranil Asetat-Kurşun Sitrata). Seminifer tübülde normale yakın morfolojide spermatogenik seri hücreler ve normal kalınlıkta bazal membran (yeşil ok).

4.7. Biyokimyasal Bulgular

4.7.1. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Değerlendirilmesi

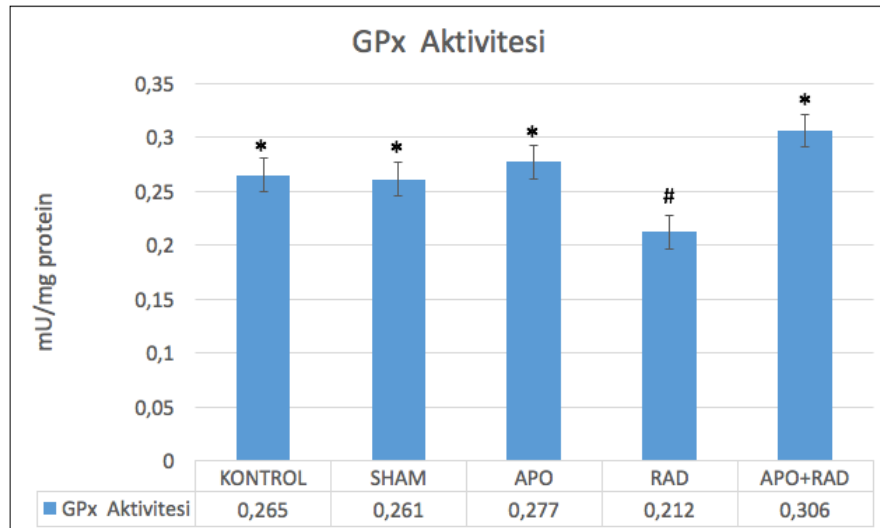
Dokulardaki GPx aktivitesi değerlendirildi.

Gruplardaki GPx ortalamaları kontrol grubunda $0,26\pm 0,01$ mU/mg protein, sham grubunda $0,26\pm 0,01$ mU/mg protein, apo grubunda $0,27\pm 0,02$ mU/mg protein, rad grubunda $0,21\pm 0,01$ mU/mg protein ve apo+rad grubunda $0,30\pm 0,03$ mU/mg protein olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu; sham, apo ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,949$, $p=0,655$, $p=0,565$). Kontrol grubu, radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında ise radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p=0,021$).

Radyasyon grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0,035$, $p=0,035$). Radyasyon grubu, apo+rad grubu ile karşılaştırıldığında ise apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p=0,013$).

Apo+rad grubu sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,277$, $p=1,000$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Withney U) (Şekil 95)



Şekil 95 : Gruplar arası GPx ortalamaları

*; Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#; Apocynin+Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

4.7.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Değerlendirilmesi

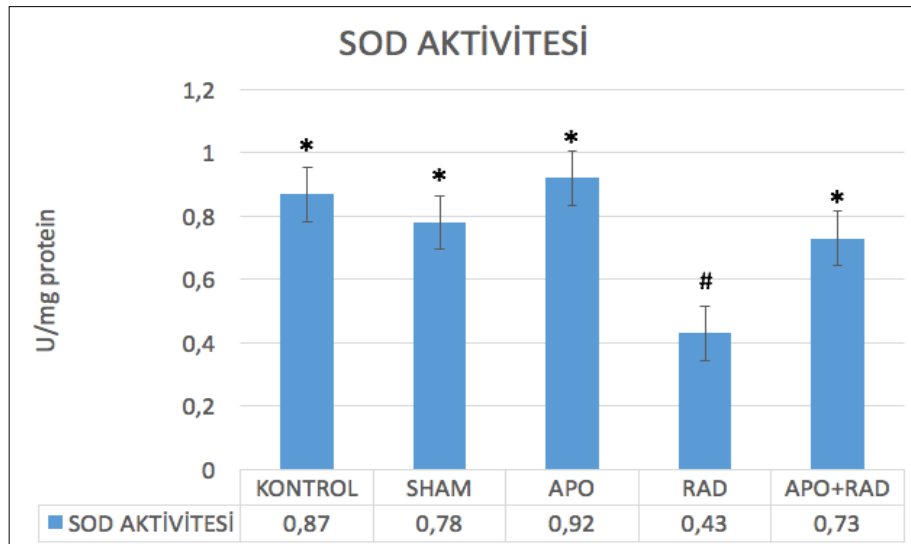
Süperoksit dismutaz aktivitesi doku homojenatlarında çalışıldı.

Gruplardaki SOD ortalamaları kontrol grubunda $0,87 \pm 0,13$ U/mg protein, sham grubunda $0,77 \pm 0,12$ U/mg protein, apo grubunda $0,92 \pm 0,12$ U/mg protein, rad grubunda $0,43 \pm 0,09$ U/mg protein ve apo+rad $0,73 \pm 0,06$ grubunda U/mg protein olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu; sham, apo ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,655$, $p=0,898$, $p=0,338$). Kontrol grubu, radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında ise radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlam bir azalma tespit edildi ($p=0,025$).

Radyasyon grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0,025$, $p=0,013$). Radyasyon grubu, apo+rad grubu ile karşılaştırıldığında ise apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p=0,035$).

Apo+rad grubu sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,749$, $p=0,338$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Withney U) (Şekil 96)



Şekil 96 : Gruplar arası SOD ortalamaları

*; Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#; Apocynin+Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

4.7.3. Malondialdehit (MDA) Seviyelerinin Değerlendirilmesi

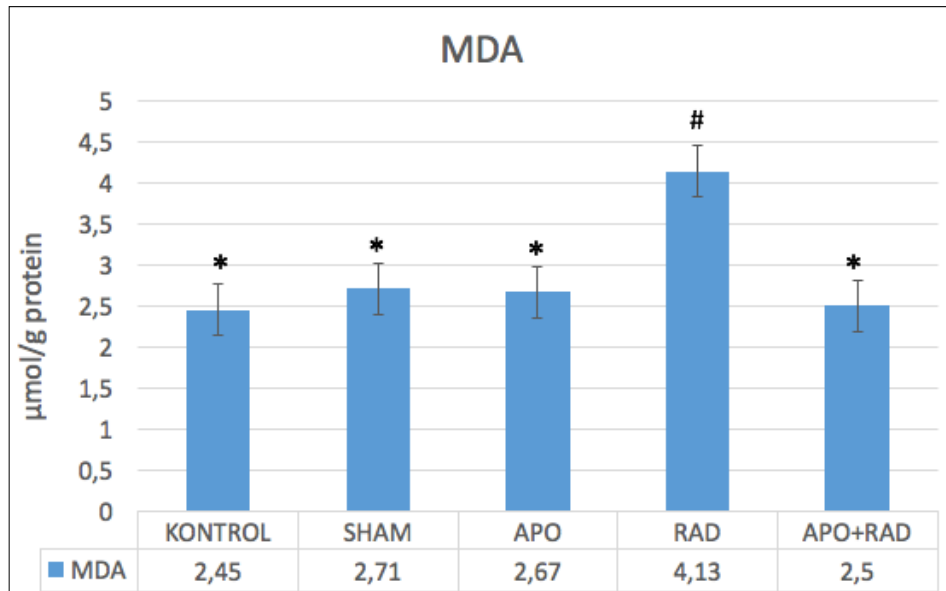
Testis dokusunda oksidatif stres seviyesini belirlemek için MDA seviyeleri ölçüldü.

Gruplardaki MDA ortalamaları kontrol grubunda $2,45 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/g}$ protein, sham grubunda $2,71 \pm 0,14$ $\mu\text{mol/g}$ protein, apo grubunda $2,66 \pm 0,15$ $\mu\text{mol/g}$ protein, rad grubunda $4,13 \pm 0,61$ $\mu\text{mol/g}$ protein ve apo+rad grubunda $2,5 \pm 0,36$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu; sham, apo ve apo+rad grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,406$, $p=0,482$, $p=0,848$). Kontrol grubu, radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında ise radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlam bir artış tespit edildi ($p=0,013$).

Radyasyon grubu; sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p=0,013$, $p=0,013$). Radyasyon grubu, apo+rad grubu ile karşılaştırıldığında ise apo+rad grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü ($p=0,048$).

Apo+rad grubu, sham ve apo grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,338$, $p=0,338$) (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Withney U) (Şekil 97)



Şekil 97 : Gruplar arası MDA ortalamaları

*; Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#; Apocynin+Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

5. TARTIŞMA

Testis, iyonize radyasyonun zararlı etkilerine en duyarlı dokulardan biridir. Düşük doz radyasyon, testisin önemli işlevsel bozukluğuna yol açabilir. İyonize radyasyon, normal hücreleri, özellikle de spermatogenik hücreler gibi hızlı proliferen olanları etkileyebilir ve testisin radyasyona bağlı hasarlanma duyarlılığı çoğunlukla radyasyon sonrası testis dokusunda hücre ölümüne yol açar (77).

Testisteki bu olumsuz olaylar, geçici veya kalıcı infertiliteye neden olabilen, spermatogenezde düşük sperm sayımı, anormal spermatozoada artış ve bozuk sperm fonksiyonu gibi birkaç anomalilik ile sonuçlanır (77).

Apocynin, Picrorhiza kurroa bitkisinden izole edilen, NADPH oksidaz aktivitesini inhibe eden ve ROS temizleme özelliğini gösteren güçlü bir antioksidandır (56). Apocynin, çeşitli hücre kültüründe ve hayvan çalışmalarında kanıtlanmış NADPH oksidazın (NOX) bir inhibitörüdür. Apocynin, NOX inhibisyonu yolu ile ROS'u azaltarak antioksidan etkisini gösterir. Aşırı ROS oluşumu oksidatif stres ve apoptotik hücre ölümünü artırarak klinik bozukluklara neden olur (78).

Tüm bu organlar dışında apocynin'in testiste de lipid peroksidasyonunu önleyici ve oksidatif hasarı azaltıcı etkileri bilinmektedir. Testiste çalışılan pek çok farklı modelde antioksidan etkileri saptanmıştır (14,47).

Güçlü bir antioksidan olan Apocynin'in çeşitli çalışmalarda radyoprotektan olarak kullanılarak radyasyon hasarını azaltıcı etkisi karaciğer, ince barsak, deri, göz gibi farklı organlar üzerinde gösterilmiştir (63–67).

Üreme organları, radyasyona en duyarlı organlar olup bunların radyosensitiviteleri farklı çalışmalarda incelenmiştir (6, 78, 79). Biz de çalışmamızda, radyasyonun neden olduğu testis hasarında apocynin'in etkilerini histokimyasal, immunohistokimyasal, elektron mikroskopik ve biyokimyasal düzeyde inceledik.

Çalışmamız sırasında her gruptaki deneklerin aynı günlerde olacak şekilde radyasyon öncesi ve sonrasında denek ağırlıkları ölçüldü. Literatürde Mansano ve ark.larının telmisartan ve losartanın radyasyona maruz kalmış testisteki etkileri üzerine yaptıkları çalışmada radyasyon uygulamasından sonra denek ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermişlerdir (79).

Ekici ve ark. radyoterapi ile indüklenen böbrek ve testis hasarına karşı aminoguanidinin yararlı etkileri üzerine yaptıkları çalışmada deney öncesi ve sonrası denek ağırlıklarını ölçtüklerinde bir fark olmadığını tespit etmişlerdir (81).

Ugras ve ark. düşük doz X ışınının zararlı etkilerinden Prunus armeniaca L (kayısı)'nin testisi koruması üzerine yaptıkları çalışmada denek ağırlıklarında anlamlı bir fark olmadığını saptanmıştır (82).

Bizim çalışmamızda da benzer şekilde kontrol grubu ile radyasyon grubu karşılaştırıldığında gruplar arası denek ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını görüldü.

Çalışmamızda her gruptaki deneklerde aynı günde olacak şekilde sakrifikasyon sonrası testis ağırlıkları ölçüldü. Topçu ve ark.larının radyasyon ile indüklenen seminifer tübül hasarının önlenmesinde L-carnitine'in koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmada radyasyon uygulaması sonrasında kontrol grubuna göre seminifer tübüllerde oluşan hücre kaybı ve deformasyona bağlı olarak testis ağırlıklarında azalma olduğunu göstermişlerdir (33).

Hussein ve ark. albino sıçanlarda X ışınıyla indüklenen erken ve akut testis hasarına karşı melatoninin radyoprotektif etkileri üzerine yaptıkları çalışmada X ışınıyla indüklenmiş testislerde istatistiksel olarak önemli derecede testis ağırlıklarının azaldığı gösterilmiştir (83).

Bizim çalışmamızda testis ağırlıkları ölçüldüğünde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

Çalışmamızda testis dokusuna radyasyon uygulanmasının etkilerini histolojik olarak incelemek amacıyla hematoksilen eozin boyaması yapıldı. Kanter ve ark.larının sıçanlarda testiküler radyasyon üzerine L-carnitine'nin antiapoptotik etkisi üzerine yaptıkları çalışmada kontrol grubunda testisin normal morfolojiye sahip olduğu, spermatid sayısının çok olduğu ve lümende spermlerin varlığını göstermişlerdir. Kontrol grubunun aksine radyasyon grubunda seminifer tübüllerde hücrelerin düzenlenişi bozulmuştur. Germinal epitelyal hücreler, birbirlerinden ve tübüler bazal membrandan ayrılmıştır. Ayrıca, germinal hücrelerin skuamasyonu ve bunun takiben epitelde düzensiz boşluklar oluştuğu ve spermatogenik seri hücrelerinin azaldığı gösterilmiştir. Lümendeki spermatozoa sayısında da önemli derecede azalma olduğu saptanmıştır (6).

Benzer olarak Mansano ve ark.larının telmisartan ve losartanın radyasyona maruz kalmış testisteki etkileri üzerine yaptıkları çalışmada kontrol grubunda testis dokusunun birçok seminifer tübüllerin varlığı ile normal ve düzenli histolojik organizasyonda olduğu gösterilmiştir. Aksine radyasyon grubunda iyonize radyasyonun zararlı etkisi ile önemli derecede disorganizasyon meydana geldiği, yapısal bozulmanın olduğu belirtilmiştir. Ek olarak, kontrol grubunda intersitisyel alanda leydig hücrelerinin kümeleşerek normal morfoloji sergiledikleri gösterilmiştir. Radyasyon grubunda ise seminifer tübüllerin atrofisine bağlı olarak dağınık halde leydig hücrelerinin varlığı ve vaskülarizasyonuna arttığı saptanmıştır (79).

Topçu ve ark. gamma ışını ile indüklenen seminifer tübül hasarına karşı l-karnitinin koruyucu etkileri üzerine yaptıkları çalışmada kontrol grubunda normal testis yapısının olduğu ve düzenli spermatogenik seri hücreler ile birlikte seminifer tübüler morfoloji sergilediği gösterilmiştir. Radyasyon grubunda germ hücrelerinin düzensizliği ve germinal epitelde vakuolizasyon saptanmıştır (33).

Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak kontrol grubunda seminifer tübüllerin normal morfolojiye yakın olduğu gösterildi. Seminifer tübül organizasyonunun düzenli, spermatogenik seriye ait hücrelerin düzgün sıralandığı saptandı. Radyasyon grubunda ise seminifer tübüllerdeki hücrelerin dökülerek düzensizlik meydana getirdiği saptandı. Seminifer tübül epitelinden bazal membran yapısının ayrıldığı tespit edildi. Tübül lümeninde de spermiyum sayısında kayıp olduğu gözlemlendi. Apo+rad grubunda ise seminifer tübüllerin kontrol grubuna yakın morfoloji sergilediği görüldü. Spermatogenik seri hücrelerin düzgün sıralandığı, bazal membran yapısının düzgün olduğu, intersitisyel alanda da kontrole yakın bir bağ doku saptandı.

Yapmış olduğumuz çalışmada testiste seminifer tübül organizasyonunu ve bazal membran yapısını göstermek amacıyla Periyodik Asit Schiff (PAS) boyaması yapıldı. Kanter ve ark.larının sıçanlarda testiküler radyasyon üzerine L-carnitine'nin antiapoptotik etkisi üzerine yaptıkları çalışmada kontrol grubunda düzenli yerleşimli germinal hücreler ile normal seminifer tübül morfolojisi izlenirken, radyasyon grubunda germinal hücre düzenlenişinde disorganizasyon, lümendeki spermatozoa sayısının az olduğu gösterilmiştir. Bazal membran yapısı incelendiğinde ise radyasyon grubunda kontrol grubuna benzer şekilde tübüler normal morfoji sergilediğini göstermişlerdir (6).

Topçu ve ark.larının radyasyon ile indüklenen seminifer tübül hasarının önlenmesinde L-carnitine'in koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmada kontrol grubunda spermatogenik seriye ait hücreleri ile birlikte düzgün seminifer tübüler morfolojisine sahip olduğu gösterilmiştir. Radyasyon grubunda ise germ hücrelerinin eksilerek disorganize olduğu, germinal hücrelerin deskuamasyonu, seminifer tübül morfolojisinin bozulduğu gösterilmiştir. Ayrıca radyasyon grubunda dejenere olan seminifer tübüllerin bazal membranında kalınlaşma olduğu da gösterilmiştir (33).

Bizim çalışmamızda ise kontrol grubunda bazal membran kalınlığı normal kalınlıkta iken radyasyon grubunda bazal membran kalınlığında artış tespit edildi. Apo+rad grubunda ise seminifer tübüllerin kontrol grubuna yakın morfoloji sergileyerek spermatogenik seri hücrelerin düzgün sıralandığı, bazal membran yapısının düzgün olduğu, intersitisyel alanda da kontrole yakın bir bağ doku saptandı.

Yapmış olduğumuz çalışmada bağ dokusu yapısını incelemek amacıyla Masson Trikrom boyaması yapıldı. Literatürde radyasyonun hasarının bağ dokusundaki etkilerini inceleyen çalışmasına rastlanmamıştır. Radyasyon hasarının bağ dokusundaki etkisi ilk kez bizim çalışmamızda incelenmiştir. Kontrol, sham ve apocynin gruplarında intersitisyel alanda normal bir bağ doku düzenlenişi gözlenirken radyasyon grubunda bağ dokusu artışı gözlemlendi. Apo+rad grubunda ise kontrol grubuna yakın bir bağ doku yapısı saptandı.

Çalışmamızda radyasyon uygulaması sonrası testis dokusunda meydana gelen morfometrik değişiklikleri incelemek amacıyla Johnsen's skorlaması, seminifer tübül çap ölçümü, seminifer tübül epitel yüksekliği ve bazal membran kalınlıkları incelendi.

Johnsen's skorlaması için, H&E boyaması ile seminifer tübüllerde skorlama yapılarak gruplar arasında karşılaştırma yapıldı.

Marzban ve ark.larının gamma ışınının testis dokusunda morfolojik parametreler ve immunohistokimyasal etkileri üzerine silymarinin radyoprotektif rolü üzerine yaptıkları çalışmada Johnsen's skorlamasında radyasyon grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğunu göstermişlerdir (84).

Ugras ve ark.nın zararlı X ışınına karşı testis dokusunda yaptıkları çalışmada radyasyon uygulanan deneklerde kontrol grubuna oranla Johnsen's skorlamasında azalma olduğu gösterilmiştir (82).

Buna paralel olarak bizim çalışmamızda da radyasyon grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı bir azalma saptandı. Apo+rad grubunda ise radyasyon grubuna göre anlamlı bir artış

görülürken kontrol, sham ve apo grupları ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü.

Morfometrik bulgular için seminifer tübül çapları her bir denekte ölçülerek değerlendirildi. Mansano ve ark.larının telmisartan ve losartanın radyasyona maruz kalmış testisteki etkileri üzerine yaptıkları çalışmada seminifer tübül çaplarında radyasyon grubunda kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir (79).

Marzban ve ark.larının silymarinin testis dokusunda radyasyon hasarına karşı koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmada seminifer tübül çap ölçümlerinde radyasyon grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir (84).

Topçu ve ark.larının gamma ışını ile indüklenen seminifer tübül hasarının önlenmesinde L-carnitine'in koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmada radyasyon grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak azaldığı belirtilmiştir (33).

Literatür ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da radyasyon grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında seminifer tübül çaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. Apo+rad grubunda ise radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı.

Seminifer tübül epitel yüksekliğini değerlendirmek amacıyla grupların epitel yükseklikleri ölçülerek karşılaştırma yapıldı. Marzban ve ark.larının gamma ışınının testis dokusunda morfolojik parametreler ve immunohistokimyasal etkileri üzerine silymarinin radyoprotektif rolü üzerine yaptıkları çalışmada radyasyon uygulanan grupta önemli derecede seminifer epitel yüksekliğinin kontrol grubuna oranla azaldığı saptanmıştır (84).

Mansano ve ark.larının telmisartan ve losartanın radyasyona maruz kalmış testisteki etkileri üzerine yaptıkları çalışmada seminifer epitel yüksekliklerini ölçtüklerinde radyasyon grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı gösterilmiştir (79).

Topçu ve ark.larının gamma ışını ile indüklenen seminifer tübül hasarının önlenmesinde L-carnitine'in koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmada seminifer tübül epitel yüksekliğinin radyasyon grubunda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak azaldığını tespit etmişlerdir (33).

Biz de çalışmamızda gruplar arası seminifer tübül epitel yüksekliklerini karşılaştırdığımızda literatür ile paralel olarak radyasyon grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede azalma olduğu saptandı. Apo+rad grubu ise radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi.

Çalışmamızda gruplar arası bazal membran kalınlıklarını değerlendirmek amacıyla PAS boyaması yapılarak ölçüm yapıldı. Kanter ve ark.larının sıçanlarda testiküler radyasyon üzerine L-carnitine'nin antiapoptotik etkisi üzerine yaptıkları çalışmada bazal membran yapısı incelendiğinde radyasyon grubunda kontrol grubuna benzer şekilde tübüler normal morfoji sergilediğini göstermişlerdir (6).

Topçu ve ark.larının radyasyon ile indüklenen seminifer tübül hasarının önlenmesinde L-carnitine'in koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmada radyasyon grubunda dejenere olan seminifer tübüllerin bazal membranında kalınlaşma olduğu da gösterilmiştir (33).

Biz de çalışmamızda gruplar arası bazal membran kalınlıklarını karşılaştırdığımızda radyasyon grubunda kontrol grubuna göre artış olduğu saptandı.

Radyasyon hasarı sonrası hücrelerde meydana gelebilecek DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi ve apoptotik hücrelerin belirlenmesi için immunohistokimyasal yöntemler ile değerlendirme yapıldı. Bunun için; TUNEL ve aktive kaspaz-3 immunreaktivitesi değerlendirildi.

Hücrelerde meydana gelen apoptozu saptamak amacıyla TUNEL boyaması yapıldı. Marzban ve ark.larının gamma ışının testis dokusunda morfolojik parametreler ve immunohistokimyasal etkileri üzerine silymarinin radyoprotektif rolü üzerine yaptıkları çalışmada immunohistokimyasal örneklerde kahverengi gözükten apoptotik hücrelerin ortalaması, radyasyon grubunda kontrol grubuna oranla önemli derecede daha fazla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kantitatif olarak radyasyon grubunda primer spermatositlerde apoptotik indeksin daha fazla olduğu gösterilmiştir (84).

Sheng ve ark.larının Poli (ADP-riboz) polimeraz aktivasyonu, kemirgenlerde senkroton radyasyonun X ışını ile indüklenen DNA hasarı üzerine yaptıkları çalışmada, 4 veya 40 Gy X ışınının testis dokusunda TUNEL sinyalinin önemli derecede arttırdığı saptanmıştır (85).

Kanter ve ark.larının sıçanlarda testiküler radyasyon üzerine L-carnitine'nin antiapoptotik etkisi üzerine yaptıkları çalışmada gruplar arası TUNEL pozitif hücre ortalamaları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda az tutulum varken radyasyon grubunda bu oranın daha fazla olduğu belirtilmiştir. Bu pozitif hücrelerin yaygın olarak spermatogonyalar olduğu da gösterilmiştir (6).

Jiang ve ark.larının sıçanlarda gamma ışını ile indüklenen testiküler hasara karşı hidrojenin koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmada kontrol grubunda az sayıdaki

seminifer germ hücrelerinde TUNEL pozitif hücre varken, radyasyon grubunda apoptotik germ hücre ekspresyonunun önemli derecede artış sergilediği gösterilmiştir (86).

Bizim çalışmamızda da elde ettiğimiz bulgularda, radyasyon grubunda kontrol grubuna göre TUNEL pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptandı.

Çalışmamızda apoptotik hücreleri saptamak amacıyla aktive kaspaz-3 immunohistokimya boyaması da yapıldı.

Sheng ve ark.larının Poli (ADP-riboz) polimeraz aktivasyonu, kemirgenlerde sinkroton radyasyonun X ışını ile indüklenen DNA hasarı üzerine yaptıkları çalışmada, 4 Gy doz verildiğinde X ışınının testis dokusunda kaspaz-3 artışını indüklediği gösterilmiştir (85).

Bizim çalışmamızda da aktive kaspaz-3 ekspresyonunun radyasyon grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışı gözlemlendi. Apo+rad grubu hasar grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir azalma saptandı.

Seminifer tübüllerde epitelyal sıkı bağlantılardan ZO-1 ve occludin çoklu integral membran proteinleri için immunohistokimyasal inceleme yapıldı.

Erkanlı Şentürk ve ark.larının sıçanlarda utero radyasyon ve postnatal hipertermide Zonula Occludens-1 ve Occludin dağılımı ve testis morfolojisindeki değişiklikler üzerine yaptıkları çalışmada kontrol grubunda ZO-1 ve occludin immunreaktivitesinde yoğun bir tutulum sergilerken, radyasyon grubunda ZO-1 ve occludinin immunolokalizasyonunda önemli derecede azalma olduğunu ve düzensiz yerleştiklerini gözlemlemişlerdir (11).

Zhang ve ark.larının sinkroton radyasyon X ışınının indüklediği hasara karşı kan testis bariyerinin antioksidan tarafından korunması üzerine yaptıkları çalışmada radyasyon sonrası 20. günde occludin'in kontrol grubuna göre daha düşük tutulum gösterdiği saptandı. Benzer şekilde ZO-1'in de radyasyon sonrası 10. günde artış gözlenirken 20. günde kontrol grubuna oranla belirgin bir azalma olduğu gösterilmiştir (9).

Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak ZO-1 ve occludin immunohistokimyasal boyama değerlendirmesinde, kontrol grubunda ZO-1 ve occludin immunreaktivitesinin iyi olduğu, radyasyon grubunda ise kontrol grubuna göre immunolokalizasyonlarında önemli derecede azalma olduğu ve düzensiz yerleştikleri saptandı.

Çalışmamızda, radyasyon hasarının testis dokusunun ultrastrüktürel yapısındaki etkisini incelemek amacıyla elektron mikroskopik düzeyde değerlendirme yapıldı.

Erkanlı Şentürk ve ark.larının sıçanlarda utero radyasyon ve postnatal hipertermide

Zonula Occludens-1 ve Occludin dağılımı ve testis morfolojisindeki değişiklikler üzerine yaptıkları çalışmada kontrol grubunda normal testis ultrastrüktürü ve bazal membran kalınlığı, düzenli sertoli hücre bağlantıları gösterilmiştir. Radyasyon grubunda ise bazal lamina kalınlaşması ve sitoplazmaya uzanan parmaklı uzantıların olduğu, sertoli hücrelerinin sitoplazmasında oluşan vakuoller, dejenere germ hücreleri, sıkı bağlantı komplekslerinde düzensizlik, spermatogenik seri hücrelerinde kayıp ve birçok apoptotik hücrelerin varlığı saptanmıştır (11).

Kanter ve ark. sıçanlarda testistiküler radyasyon üzerine L-carnitine'in antiapoptotik etkisi adlı çalışmalarında ultrastrüktürel incelemelerde kontrol grubunda seminifer tübüllerin normal morfolojiye sahip olduğu belirtilmiştir. Radyasyon grubunda ise radyasyon hasarı sonucu oluşan apoptozun sıklıkla spermatogonialarda meydana geldiği belirtilmiştir. Nükleer periferde nükleer kromatin yoğunlaşması ve sitoplazma ve nükleusun küçülmesine sahip apoptotik spermatogonialar gösterilmiştir. Hafif açılmış düz endoplazmik retikulum sisternası sertoli hücrelerin sitoplazmasında görüldüğü saptanmıştır (6).

Topçu ve ark.larının gamma ışını ile indüklenen seminifer tübül hasarının önlenmesinde L-carnitine'in koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmadaki ultrastrüktürel incelemelerde kontrol grubunun normal morfoloji sergilediği belirtilmiştir. Radyasyon grubunda düz endoplazmik retikulum sisternalarında dilatasyon, mitokondriyumlarda şişme, sertoli hücre sitoplazmalarının sayısının ve boyutunun artması ve sertoli hücre nükleus morfolojisinde düzensizlik, spermatidlerin nükleer morfolojisinde anormalite, germinal epitelde vakuolizasyon, seminifer tübül bazal membranında kıvrılma ve kalınlaşma olduğu gösterilmiştir.

Sawada ve ark. radyasyon uygulanan sıçan testisinin germ hücreleri için bazal lamina üretiminin elektron mikroskopik gözlemi üzerine yaptıkları çalışmada seminifer tübüllerin özellikle bazal kısımlarında sertoli hücreler arasındaki düzensiz vakuolar yapılar ve seminifer tübüllerin etrafındaki bazal laminanın sürekli fakat çok katmanlı bir yapıda olduğu gösterilmiştir (87).

Bizim alışmamızda da kontrol grubunda seminifer tübül organizasyonu ve bazal membran kalınlığı normal iken, radyasyon grubunda sertoli hücre sitoplazmasında meydana gelen vakuoller, sıkı bağlantı komplekslerinde düzensiz yerleşimler, bazal membran kalınlığında artış olduğu saptandı.

Yapmış olduğumuz çalışmada oksidatif stres, radyasyon ile indüklenen testis dokusunda biyokimyasal düzeyde GPx, SOD aktivitesi ve MDA düzeyleri değerlendirildi.

Ekici ve ark.larının aminoguanidinin radyoterapi ile indüklenen böbrek ve testis hasarına yararlı etkileri üzerine yaptıkları çalışmada testis dokusunda radyasyon grubunda kontrol grubuna göre GPx ve SOD aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı, MDA düzeyinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (81).

EL-Mesallamy ve ark. erkek sıçanlarda radyasyonun indüklediği testiküler hasarına karşı ferulik asidin koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmada radyasyon grubunda dokunun SOD aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede azaldığı, MDA (lipid peroksit içeriği) seviyesinin ise arttırdığı belirtilmiştir (80).

Bizim çalışmamızda da elde ettiğimiz sonuçlar literatürler ile paralellik göstererek radyasyon grubunda GPx ve SOD aktivitesi azalırken, MDA seviyesinin kontrol grubuna göre arttığı gösterildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatürde testiste oluşturulan radyasyon hasarına karşı Apocynin'in koruyucu etkilerini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Apocynin'in radyasyon hasarına karşı koruyucu etkisi histokimyasal, immunohistokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal olarak ilk kez bizim çalışmamızda incelenmiştir.

Çalışmadan elde edilen verilere göre apocynin uygulamasının radyasyon sonucu oluşan hasara karşı histokimyasal, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik düzeyde incelendiğinde doku hasarının azaldığı, immun pozitif hücre sayısının azaldığı görüldü. Hücreler arası sıkı bağlantı komplekslerinin kontrol grubuna benzer olduğu saptandı. Biyokimyasal olarak incelendiğinde ise GPx ve SOD düzeyinin arttığı, MDA seviyesinin azaldığı gözlemlendi.

Radyasyonun oluşturduğu testis hasarında, kuvvetli bir antioksidan olan Apocynin'in oluşan doku hasarını, apoptozu ve oksidatif stresi azaltarak olumlu koruyucu etkileri olduğu sonucuna varıldı.

Elde edilen bulguların daha sonra yapılacak olan çalışmalar için yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Çetin H. Tıbbi amaçlı X ışını uygulamalarında radyasyondan korunmak amacıyla kullanılan kurşunlu önlük malzemelerine alternatif olarak üretilen kurşunsuz örneklerin soğurma özelliklerinin incelenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi; 2011. 17-29 p.
2. Şenlik ZB. Ankara’da bir üniversite hastanesinde iyonlaştırıcı radyasyon kaynakları ile çalışan sağlık çalışanlarında iyonlaştırıcı radyasyonun olası sağlık etkilerinin belirlenmesi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi; 2010. 15-45 p.
3. Take G, Erdogan D, Helvacioğlu F, Göktas G, Ozbey G, Uluoğlu C, et al. Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes. *Brazilian J Med Biol Res.* 2009;42(7):621–8.
4. Bakar K. Nükleer tıp alanında çalışan personelin maruz kaldığı radyasyonun fiziksel dozimetri ile belirlenmesi ve radyasyonun insan sağlığı üzerindeki etkileri. Dumlupınar Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi; 2012. 90-92 p.
5. Abuelhija M, Weng CC, Shetty G, Meistrich ML. Rat models of post-irradiation recovery of spermatogenesis : interstrain differences. *Andrology.* 2014;1(2):206–15.
6. Kanter M, Topcu-Tarlacalisir Y, Parlar S. Antiapoptotic effect of l-carnitine on testicular irradiation in rats. *J Mol Histol.* 2010;41(2-3):121–8.
7. Tahamtan R, Monfared AS, Tahamtani Y, Tavassoli A. Radioprotective effect of melatonin on radiation-induced lung injury and lipid peroxidation in rats. *Cell J.* 2015;17(1):111–20.
8. Demirel C, Kilciksiz SC, Gurgul S, Erdal N. Inhibition of Radiation-Induced Oxidative Damage in the Lung Tissue: May Acetylsalicylic Acid Have a Positive Role? *Inflammation.* 2015;39(1):6–8.
9. Zhang T, Liu T, Shao J, Sheng C, Hong Y, Ying W, et al. Antioxidant protects blood-testis barrier against synchrotron radiation X-ray-induced disruption. *Spermatogenesis.* 2015;5(1):e1009313.
10. Ding J, Wang H, Wu Z-B, Zhao J, Zhang S, Li W. Protection of murine spermatogenesis against ionizing radiation-induced testicular injury by a green tea polyphenol. *Biol Reprod.* 2015;92(1):1–13.
11. Erkanli Şentürk G, Ersoy Canillioğlu Y, Umay C, Demiralp-Eksioglu E, Ercan F.

- Distribution of Zonula Occludens-1 and Occludin and alterations of testicular morphology after in utero radiation and postnatal hyperthermia in rats. *Int J Exp Pathol*. 2012;93(6):438–49.
12. Sharma M, Kaur T, Singla SK. Role of mitochondria and NADPH oxidase derived reactive oxygen species in hyperoxaluria induced nephrolithiasis: therapeutic intervention with combinatorial therapy of N-acetyl cysteine and Apocynin. *Mitochondrion*. Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society; 2016;27:15–24.
 13. Abdelmageed ME, El-Awady MS, Suddek GM. Apocynin ameliorates endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Int Immunopharmacol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;30:163–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.12.006>
 14. Li M, Liu Z, Zhuan L, Wang T, Guo S, Wang S, et al. Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats. 2013;47–52.
 15. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*. 12th ed. Solakoğlu S, Aytekin Y, editors. Nobel Tıp Kitabevleri; 2009. 418-433 p.
 16. Ross MH, Pawlina W. *Histoloji*. 6th editio. Baykal B, editor. Palme yayıncılık; 2014. 784-828 p.
 17. Gilbert SF. *Gelişim Biyolojisi*. 9th editio. Erkan M, İrez T, editors. Nobel Tıp Kitabevleri; 2013. 511-525 p.
 18. Widmaier E, Raff H. *Vander insan fizyolojisi*. 10th ed. Demirgören S, editor. Güven kitabevi; 2010. 657-668 p.
 19. Moore KL. *İnsan Embriyolojisi*. Nobel tıp . Dalçık H, Yıldırım M, editors. 2009.
 20. Kierszenbaum A, Tres L. *Histoloji ve hücre biyolojisi*. 3rd ed. Demir R, editor. Elsevier Saunders; 2006. 587-631 p.
 21. Erkek genital sistem histolojisi [Internet]. Available from: <https://www.dicle.edu.tr/Contents/01baef8f-7b2e-4395-afc0-3132c45538c9.pdf>
 22. Blue Histology-Male reproductive System [Internet]. Available from: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/MaleRepro/malerepro.htm>
 23. Salian S, Doshi T, Vanage G. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology*. 2009;265(1-2):56–67.
 24. Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev*. 2012;64(1):16–64.

25. No Title [Internet]. Available from: <https://www.extremetech.com/extreme/181746-scientists-turn-skin-cells-into-sperm-cells-but-raise-provocative-new-questions>
26. Spermatozoa Development [Internet]. Available from: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Spermatozoa_Development
27. Clermont Y, Lalli M, Makki Z. Light-microscopic histology atlas [Internet]. Available from: http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/html/mrs_32_E.html
28. The Male Urethra Anatomy [Internet]. Available from: <http://laser-prostate-robot.co.uk/urethral-stenosis/diagnostic-urethra/male-urethra-anatomy/>
29. Rühm W, Azizova TV, Bouffler SD, Little MP, Shore RE, Walsh L, et al. Dose-rate effects in radiation biology and radiation protection. *Ann ICRP*. 2016;45:262–75.
30. Chandra A, Lan S, Zhu J, Lin T, Zhang X, Siclari VA, et al. PTH prevents the adverse effects of focal radiation on bone architecture in young rats. *NIH Public Access*. 2007;52(5):817–30.
31. Şener G, Kabasakal L, Atasoy BM, Erzik C, Velioğlu-Öğünç A, Çetinel Ş, et al. Propylthiouracil-induced hypothyroidism protects ionizing radiation-induced multiple organ damage in rats. *J Endocrinol*. 2006;189(2):257–69.
32. Report D, Consultation FOR, Xxx IP, For P. *Annals of the ICRP*. 2011.
33. Topcu-Tarladacalisir Y, Kanter M, Uzal MC. Role of l-carnitine in the prevention of seminiferous tubules damage induced by gamma radiation: A light and electron microscopic study. *Arch Toxicol*. 2009;83(8):735–46.
34. Abuelhija M, Weng CC, Shetty G, Meistrich ML. Rat models of post-irradiation recovery of spermatogenesis: interstrain differences. *Andrology* [Internet]. 2013;1(2):206–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2047-2927.2012.00034.x>
35. Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar [Internet]. Available from: <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>
36. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYU Vet Fak Derg*. 2004;15:91–6.
37. Fenech M, Chang WP, Kirsch-volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. 2003;534:65–75.

38. Caner Ç, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk nefroloji Diyal ve Transplant Derg.* 1997;92–5.
39. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *YYÜ vet fak derg.* 2008;19(1):55–63.
40. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk kardiyol dern arş.* 2008;(36(2)):120–30.
41. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması [Internet]. 2011. p. 145–58. Available from: <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/25371>
42. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Biochem Sci.* 2001;26(1):61–6.
43. Strasser A, Connor LO, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 2000;(69):217–45.
44. Spierings DC, Vries EG De, Vellenga E, Heuvel FA Van Den, Koornstra J, Wesselling J, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(6):821–31.
45. Miller DK, Oelrichs CE, Sun GY, Simonyi A. Subchronic apocynin treatment attenuates methamphetamine-induced dopamine release and hyperactivity in rats. *Life Sci. Elsevier Inc.;* 2014;98(1):6–11.
46. Li Z, Wang Y. Effect of NADPH oxidase inhibitor-apocynin on the expression of Src renal ischemia / reperfusion injury in rats. *Elsevier Ireland Ltd;* 2015;2:1111–6.
47. Emre TŞ, Yüksel M, Özy N, Ercan F, Akbal C, Şimşek F, et al. Apocynin attenuates testicular ischemia – reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg.* 2015;50:1382–7.
48. Li M, Liu Z, Zhuan L, Wang T, Guo S, Wang S, et al. Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats. *Mol Med Rep.* 2013;7(1):47–52.
49. Abdelmageed ME, El-Awady MS, Suddek GM. Apocynin ameliorates endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Int Immunopharmacol. Elsevier B.V.;* 2016;30:163–70.
50. Abliz A, Chen C, Deng W, Wang W, Rongze S. NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin Attenuates PCB153-Induced Thyroid Injury in Rats. *Hindawi Publishing Corporation;* 2016;2016.
51. Article O. Leptin Attenuates the Contractile Function of Adult Rat Cardiomyocytes

- Involved in Oxidative Stress and Autophagy. 2016;723–30.
52. Hu B, Wu Y, Tong F, Liu J, Shen X, Shen R, et al. Apocynin alleviates renal ischemia / reperfusion injury through regulating the level of zinc and metallothionein. *Biol Trace Elem Res.* 2017;178(1):71–8.
 53. Ciarcia R, Damiano S, Florio A, Spagnuolo M, Zacchia E, Squillacioti C, et al. The protective effect of apocynin on cyclosporine A-induced hypertension and nephrotoxicity in rats. *J Cell Biochem.* 2015;1856(February):1848–56.
 54. El-naga RN. Apocynin protects against ethanol-induced gastric ulcer in rats by attenuating the upregulation of NADPH oxidases 1 and 4. *Chem Biol Interact.* Elsevier Ltd; 2015;242:317–26.
 55. Cagin YF, Erdogan A, Sahin N, Parlakpınar H, Atayan Y, Polat A, et al. Protective effects of apocynin on cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Arch Med Res.* Elsevier Inc; 2015;46(7):517–26.
 56. Gimenes R, Gimenes C, Rosa CM, Xavier NP, Campos DHS, Fernandes AAH, et al. Influence of apocynin on cardiac remodeling in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.* BioMed Central; 2018;17(1):15.
 57. Rosa CM, Gimenes R, Campos DHS, Guirado GN, Gimenes C, Fernandes AAH, et al. Apocynin influence on oxidative stress and cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats with diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.* BioMed Central; 2016;15(1):126.
 58. Choi BY, Jang BG, Kim JH, Lee BE, Sohn M, Song H, et al. Prevention of traumatic brain injury-induced neuronal death by inhibition of NADPH oxidase activation. *Brain Res.* Elsevier; 2012;1481:49–58.
 59. Feng Y, Cui C, Liu X, Wu Q, Hu F, Zhang H, et al. Protective role of apocynin via suppression of neuronal autophagy and TLR4/NF- κ B signaling pathway in a rat model of traumatic brain injury. *Neurochem Res.* Springer US; 2017;42(11):3296–309.
 60. Sun Y, Gong F, Yin J, Wang X, Wang X, Sun Q, et al. Therapeutic effect of apocynin through antioxidant activity and suppression of apoptosis and inflammation after spinal cord injury. *Exp Ther Med.* 2017;13(3):952–60.
 61. Abdelrahman RS. Protective effect of apocynin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2018;37(1):27–37.

62. Fuji S, Suzuki S, Naiki-Ito A, Kato H, Hayakawa M, Yamashita Y, et al. The NADPH oxidase inhibitor apocynin suppresses preneoplastic liver foci of rats. *Toxicol Pathol.* 2017;45(4):544–50.
63. Sun C, Wang Z, Liu Y, Liu Y. Carbon ion beams induce hepatoma cell death by NADPH oxidase-mediated mitochondrial damage. *J Cell Physiol.* 2013;229(April):100–7.
64. Cagin YF, Parlakpınar H, Polat A, Vardi N, Atayan Y, Erdogan MA, et al. The protective effects of apocynin on ionizing radiation-induced intestinal damage in rats. *Drug Dev Ind Pharm.* 2015;9045(April):1–8.
65. Wang H, Kochevar IE. Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF- β biosynthesis and activation in keratinocytes. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(1):890–7.
66. Mok S, Soo Y, Kim J. Short communication NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor- κ B in HaCaT human keratinocytes. *Biochimie.* 2004;86:425–9.
67. Roehlecke C, Schumann U, Ader M, Brunssen C, Bramke S, Morawietz H, et al. Stress reaction in outer segments of photoreceptors after blue light irradiation. *PLoS One.* 2013;8(9):1–12.
68. Zhang GL, Dai DZ, Zhang C, Dai Y. Apocynin and raisanberine alleviate intermittent hypoxia induced abnormal StAR and 3 β -HSD and low testosterone by suppressing endoplasmic reticulum stress and activated p66Shc in rat testes. *Reprod Toxicol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;36:60–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.12.002>
69. Ozbek O, Altintas R, Polat A, Vardi N, Parlakpınar H, Sagir M, et al. The protective effect of apocynin on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Urol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;193(4):1417–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2014.11.086>
70. Cagin YF, Parlakpınar H, Polat A, Vardi N. The protective effects of apocynin on ionizing radiation-induced intestinal damage in rats. *Drug Dev Ind Pharm.* 2015;9045(April):1–8.
71. Johnsen SG. Testicular biopsy score count-a method for registration of

- spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970;1(1):2–25.
72. Lee J, Kim J, Lee Y, Lee D, Song C, Cho Y, et al. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of testicular ischemia / reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg*. Elsevier Inc.; 2012;47(4):736–42.
73. Ozbal S, Ergur BU, Erbil G, Tekmen I, Bagrıyanık A, Cavdar Z. The effects of α - lipoic acid against testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Sci World J*. 2012;2012:1–8.
74. Ibáñez CA, Erthal RP, Ogo FM, Peres MNC, Vieira H, Conejo C, et al. A high fat diet during adolescence in male rats negatively programs reproductive and metabolic function which is partially ameliorated by exercise. *Front Physiol*. 2017;8(NOV):1–12.
75. Odaci E, Özyılmaz C. Exposure to a 900 MHz electromagnetic field for 1 hour a day over 30 days does change the histopathology and biochemistry of the rat testis. *Int J Radiat Biol*. 2015;91(7):547–54.
76. El-Sisi AE, El-Sayad ME, Abdelsalam NM. Protective effects of mirtazapine and chrysin on experimentally induced testicular damage in rats. *Biomed Pharmacother*. Elsevier; 2017;95(April):1059–66.
77. Lee W, Son Y, Jang H, Bae M, Kim J, Kang D, et al. Protective Effect of Administered Rolipram against Radiation-Induced Testicular Injury in Mice. *World J Mens Health*. 2015;33(1):20–9.
78. Tanriverdi LH, Parlakpınar H, Ozhan O, Ermis N, Polat A, Vardi N, et al. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin promotes myocardial antioxidant response and prevents isoproterenol-induced myocardial oxidative stress in rats. *Free Radic Res*. Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group; 2017;51(9-10):772–86.
79. da Silva Mansano N, Jorge IF, Chies AB, Viani GA, Spadella M. Effects of telmisartan and losartan on irradiated testes. *Life Sci*. 2018;194(August):157–67.
80. EL-Mesallamy HO, Gawish RA, Sallam A-AM, Fahmy HA, Nada A. Ferulic acid protects against radiation-induced testicular damage in male rats: impact on SIRT1 and PARP1. *Environ Sci Pollut Res*. Environmental Science and Pollution Research; 2017;6218–27.
81. Ekici K, Temelli O, Parlakpınar H, Samdancı E, Polat A, Beytur A, et al. Beneficial

- effects of aminoguanidine on radiotherapy-induced kidney and testis injury. *Andrologia*. 2015;48(6):683–92.
82. Ugras MY, Kurus M, Ates B, Soylemez H, Otlu A, Yilmaz I. *Prunus armeniaca* L (apricot) protects rat testes from detrimental effects of low-dose x-rays. *Nutr Res*. 2010;30(3):200–8.
83. 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*. 2006;87(3):237–50.
84. Marzban M, Anjamshoa M, Jafari P, Masoumi H, Ahadi R, Fatehi D. Effects of gamma rays on rat testis tissue according to the morphological parameters and immunohistochemistry: radioprotective role of silymarin. *Electron Physician*. 2017;9(6):4524–32.
85. Sheng C, Chen H, Wang B, Wang C, Lin L, Li Y, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase activation mediates synchrotron radiation X-ray-induced damage of rodent testes by exacerbating DNA damage and apoptotic changes. *Int J Radiat Biol*. 2014;90(7):580–6.
86. Jiang Z, Xu B, Yang M, Li Z, Zhang Y, Jiang D. Protection by hydrogen against gamma ray-induced testicular damage in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013;112(3):186–91.
87. Sawada H, Esaki M. Electron microscopic observation of ¹³⁷Cs-irradiated rat testis: Production of basal laminae for germ cells, despite their absence. *J Electron Microsc* (Tokyo). 2003;52(4):391–7.

8. EKLER

8.1. Ek-1 Etik Kurul Belgesi



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340. Inciraltı, İzmir-35 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 04/09/2016
Toplantı Tarihi : 26 Nisan 2016

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na

23/2016 Protokol No'lu: Anabilim Dalınız Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Seda ÖZBAL'ın yürütücüsü olduğu "Radyasyonun neden olduğu testis hasarında Apocynin'in etkilerinin histolojik olarak incelenmesi" isimli projede; Merve TATLI, Zahide ÇAVDAR, Cenk Umay, Cemre URAL ve Bekir Uğur ERGÜR'ün araştırmacı olduğu, 35 adet Wistar-Albino Susu kullanılacak projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof. Dr. Osman YILMAZ

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı



Prof. Dr. Ali Necati EÖKMEN
Başkan Vekili


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

Üye


Prof. Dr. Hatice Nur ÇELGÜN

Üye

Prof. Dr. Gülgün OKTAY
Üye (Topl. Katılmadı)


Prof. Dr. Güray KIRKIM

Üye

Doç. Dr. Meral KARAMAN
Üye (Topl. Katılmadı)

Doç. Dr. Pembe UYGUN KEŞKİNOĞLU
Üye (Topl. Katılmadı)


Doç. Dr. Tarkan ERTAY

Üye


Doç. Dr. Nermin Nüket BOÇMEN MAS

Üye

Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
Üye (Topl. Katılmadı)

Yard. Doç. Dr. Orhan KALEMÇİ
Üye (Topl. Katılmadı)


Zeynep KINAM

Üye


Vet. Hekim Adilin SERPEN

Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

8.2. Ek-2 Özgeçmiş



MERVE TATLI

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası 35413730916
Doğum Tarihi 03/06/1992
İletişim Adresi 19 Mayıs Mah. Öğretmen Haşım Çeken Cad. Tatlı Apt. No:19 K:3 D:6
Telefon (507) 620 45 00
E-posta mervetatli92@gmail.com
Web Adresi

Eğitim Bilgileri

01 Ocak 2015 - Şu Anda (3 yıl 6 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, HISTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (YL)

01 Eylül 2010 - 01 Haziran 2014 (3 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

01 Eylül 2006 - 01 Haziran 2010 (3 yıl 10 ay)
İSTEK VAKFI ÖZEL ATANUR OĞUZ OKULLARI, TÜRKİYE

Yabancı Dil Bilgileri

İSPANYOLCA (Okuma: Başlangıç, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Başlangıç)

İNGİLİZCE (Okuma: Orta, Yazma: Orta, Konuşma: Orta)

Ar-Ge Yetkinlik

Bildiriler

M. TATLI, S. ÖZBAL, Z. ÇAVDAR, C. UYAR, C. URAL & B. U. ERGÜR, Radyasyonun Neden Olduğu Testis Hasarında Apocynin'in Etkilerinin Histolojik Olarak İncelenmesi, Poster Sunumu, 14. Ulusal Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi, 10 Mayıs 2018, 13 Mayıs 2018.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0