



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU TESTİKÜLER DOKU
HASARI MODELİNDE SELENYUM L METİYONİN'İN
KORUYUCU ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hazırlayan

Dr. KUDRET ENSARİOĞLU BAKTİR

Danışman

Prof. Dr. OĞUZ GALİP YILDIZ

Tıpta Uzmanlık Tezi

KAYSERİ 2024



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU TESTİKÜLER DOKU
HASARI MODELİNDE SELENYUM L METİYONİN'İN
KORUYUCU ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tıpta Uzmanlık Tezi

Hazırlayan

Dr. KUDRET ENSARİOĞLU BAKTİR

Danışman

Prof. Dr. OĞUZ GALİP YILDIZ

**Bu Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TTU-2023-12485 Kodlu Proje ile Desteklenmiştir**

KAYSERİ 2024

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Kudret Ensarioğlu Baktır

İmza:



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca üstün bilgi, tecrübe ve deneyimlerinden yararlandığım, her soruma bilgeliğiyle yanıt veren, dürüstlüğüyle her zaman yol gösterici olan, bilim yolunda yolumuza ışık tutan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Prof. Dr. Oğuz Galip Yıldız hocam başta olmak üzere, AD öğretim elemanlarımız Prof. Dr. Celalettin Eroğlu, Öğr. Gör. Dr. Kadir Yaray, Öğr. Gör. Dr. Okan Orhan, Öğr. Gör. Dr. Mete Gündoğ, Öğr. Gör. Dr. Dicle Aslan'a, birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, ve yardımcı sağlık personeli arkadaşlarıma, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme, her zaman yanımda olup beni destekleyen, azimlendiren, cesaret veren kıymetli eşim Furkan Ali Baktır'a teşekkür ederim. Ayrıca ve özellikle tez sürecimde verilerin değerlendirilmesi, analizi aşamalarında desteği ve emeği çok büyük olan Histoloji Embriyoloji AD öğr üyesi Prof. Dr. Arzu Hanım Yay ve ekibine, sperm morfolojisi ve konsantrasyonu değerlendirmesini bizzat yapan Üroloji AD'dan Doç. Dr. Numan Baydilli hocalarıma teşekkür ederim.

Kudret Ensarioğlu Baktır

KAYSERİ 2024

ÖZET

Radyasyonun Neden Olduğu Testiküler Doku Hasarı Modelinde Selenyum L Metiyonin'in Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, radyasyon uygulanması ile testis dokusunda oluşturulan hasar üzerine Selenyum L Metiyonin'in radyoprotektif etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen 200-250 gr ağırlığında 16-24 haftalık Wistar albino türü 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Denekler 4 gruba randomize edildi. Grup 1 (n=10) Kontrol grubu; herhangi bir işlem yapılmadı sıçanlara, Grup 2 (n=10) Rad grubu; çalışmanın 2. günü 10 Gy radyoterapi uygulanan sıçanlar, Grup 3 (n=10) Sel grubu; 6 gün boyunca 4 mg/kg (intraperitoneal) Selenyum L Metiyonin uygulanan sıçanlar, Grup 4 (n=10) Rad+ Sel grubu; 6 gün boyunca 4 mg/kg Selenyum L Metiyonin ve çalışmanın 2. gününde Selenyum L Metiyoninden 30 dk sonra 10 Gy radyoterapi uygulanan sıçanlar olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Çalışmanın 7. Gününde gruplardaki sıçanlar işlem sonunda ksilazin (10 mg/kg canlı ağırlık intraperitoneal) ve ketamin (60 mg ketamin hidralklorür/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) ile genel anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi, doku örnekleri ve kanları biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmek üzere alındı.

Deney sonunda grupların testiküler histolojik analizi, seminifer tübül çapları, Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru, epididim sperm konsantrasyonu, epididim sperm motilitesi, protein ifadelerinin (MMP9, connexin43, mTOR, hsp70, PCNA ve StAR) immünohistokimya (ihc) analizi ve elisa analizi (Katalaz (CAT), Malondialdehit (MDA), Süperoksit dismutaz (SOD), Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), İnterlökin 6 (IL6) ve Transforme edici büyüme faktör-beta (TGF- β 1)) yapılarak değerlendirildi. Radyasyon uygulanan grupların testis dokularında, deforme olmuş anormal seminifer tübül yapıları yanı sıra, germinal hücre miktarında azalma ve lümene dökülmüş tübül epitel hücreleri görüldü. Radyasyon uygulanan grupta seminifer tübül çapları, Johnsen'in testiküler biyopsi skoru, epididim sperm motilitesi, Connexin43, HSP70, PCNA, StAR, CAT ve SOD düzeyinin azaldığı, TGFB1, IL6 ve MMP9 düzeyinin arttığı saptandı. Epididim sperm konsantrasyonu, MDA, TNF- α ve mTOR düzeyinde anlamlı farklılık yoktu.

Sonuç olarak radyasyon uygulaması, testis dokusunda histopatolojik değişikliklere neden olduğu ve radyoproteksiyon amacıyla verilen Selenyum L Metiyonin'in bu hasarların üzerinde anlamlı farklılık oluşturduğu (hücrel hasarı hafiflettiği) saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Selenyum L Metiyonin; Sıçan; Testis; Radyasyon

ABSTRACT

The Evaluation of the Protective Effect of Selenium L Methionine on Testicular Tissue Damage Induced by Radiation

This study aimed to investigate the radioprotective efficacy of Selenium L Methionine on damage induced in testicular tissue due to radiation exposure.

Forty male Wistar albino rats, weighing 200-250 grams and aged between 16-24 weeks, bred at the Experimental and Clinical Research Center (DEKAM) of Erciyes University, were used for this experiment. The subjects were randomized into four groups. Group 1 (n=10) served as the Control group, where no procedure was performed on the rats. Group 2 (n=10) was the Rad group, subjected to a 10 Gy radiotherapy on the second day of the study. Group 3 (n=10) was the Sel group, receiving 4 mg/kg Selenium L Methionine intraperitoneally for six days. Group 4 (n=10) was the Rad+Sel group, receiving 4 mg/kg Selenium L Methionine for six days and undergoing a 10 Gy radiotherapy 30 minutes after the second day's administration of Selenium L Methionine. Thus, four distinct groups were formed. On the 7th day of the study, rats in each group were euthanized under general anesthesia induced by xylazine (10 mg/kg body weight intraperitoneally) and ketamine (60 mg ketamine hydrochloride/kg body weight intraperitoneally), via cervical dislocation. Tissue samples and blood were collected for biochemical and histological examinations.

At the end of the experiment, testicular histological analysis of the groups was conducted, evaluating seminiferous tubule diameters, Johnsen Testicular Biopsy Score, epididymal sperm concentration, epididymal sperm motility, immunohistochemical analysis of protein expressions (MMP9, connexin43, mTOR, hsp70, PCNA, and StAR), and ELISA analysis (Catalase (CAT), Malondialdehyde (MDA), Superoxide dismutase (SOD), Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), Interleukin 6 (IL6), and Transforming growth factor-beta (TGF- β 1)). In the testicular tissues of the groups exposed to radiation, deformed abnormal seminiferous tubule structures were observed, along with a decrease in germ cell quantity and shed tubular epithelial cells. It was found that seminiferous tubule diameters, Johnsen's testicular biopsy score, epididymal sperm motility, Connexin43, HSP70, PCNA, StAR, CAT, and SOD levels decreased in the radiation-exposed group, while TGFB1, IL6, and MMP9 levels increased. There were no significant differences in epididymal sperm concentration, MDA, TNF- α , and mTOR levels.

In conclusion, radiation exposure caused histopathological changes in testicular tissue. Selenium L-Methionine administration with the aim of radioprotection performed, a statistically significant difference (mitigated) in these damages.

Key Words: Selenium L Methionine; Rat; Testis; Radiation

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TESTİSİN EMBRİYOLOJİSİ	3
2.1.1. Gonadların Gelişimi	3
2.1.2. Cinsiyetin Belirlenmesi	4
2.1.3. Testislerin Gelişimi	4
2.1.4. Genital Kanalların Gelişimi	5
2.1.5. Testislerin İnişi	6
2.2. TESTİSİN ANATOMİSİ	7
2.3. TESTİSİN HİSTOLOJİSİ	8
2.3.1. İnterstisyel Doku	9
2.3.2. Seminifer Tübüller	10
2.3.3. Testis İçi Genital Kanallar	17
2.3.4. Genital Boşaltım Kanalları	17
2.4. RADYOTERAPİ	18
2.5. SELENYUM L METİYONİN	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. KİMYASALLAR VE CİHAZLAR	23
3.2. HAYVANLAR	24
3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	24
3.4. SELENYUM L METİYONİN UYGULAMASI	25

3.5. RADYOTERAPİ UYGULAMASI.....	25
3.6. DOKU ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI.....	26
3.7. HİSTOKİMYASAL TEKNİKLER	27
3.7.1. Hematoksilen&Eozin Boyama (H&E)	27
3.7.2. Seminifer tübül çaplarının ölçümü.....	28
3.7.3. Germ Hücrelerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	28
3.7.4. İmmunohistokimya Boyama (IHC).....	30
3.8. ELISA METODU	31
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. HİSTOLOJİK ANALİZ	36
4.2. MORFOMETRİK BULGULAR	38
4.3. MMP9, CONNEXİN43, mTOR, HSP70, PCNA VE StAR PROTEİN İFADELERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYA (IHC) ANALİZ PROSEDÜRÜ	41
4.4. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERE AİT BULGULAR	47
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	72

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.7: Doku takibi aşamaları	27
Tablo 3.7.1: Hematoksilen&Eozin boyama aşamaları.....	28
Tablo 3.7.4: Testis kesitlerine IHC yönteminde uygulanan antikorlar ve oranları	31
Tablo 4.2.1: ÇAP Ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması	38
Tablo 4.2.2: JTBS ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması	39
Tablo 4.2.3: Sperm konsantrasyon ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması ..	39
Tablo 4.2.4: Sperm Motilite ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması	40
Tablo 4.3.1: Connexin43 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama	43
Tablo 4.3.2: MMP9 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama.....	44
Tablo 4.3.3: mTOR Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama.....	44
Tablo 4.3.4: HSP70 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama.....	45
Tablo 4.3.5: PCNA Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama	46
Tablo 4.3.6: StAR Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama	47
Tablo 4.4.1: CAT düzeyinde grupların kıyaslanması	47
Tablo 4.4.2: IL 6 düzeyinde grupların kıyaslanması	49
Tablo 4.4.3: MDA düzeyinde grupların kıyaslanması	50
Tablo 4.4.4: SOD düzeyinde grupların kıyaslanması	51
Tablo 4.4.5: TGF- β 1 düzeyinde grupların kıyaslanması	53
Tablo 4.4.6: TNF- α düzeyinde grupların kıyaslanması	54
Tablo 4.4.7.1: Kontrol Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması.....	56
Tablo 4.4.7.2: Rad Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması.....	57
Tablo 4.4.7.3: Sel Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması.....	58
Tablo 4.4.7.4: Rad+Sel Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: A: Üç haftalık embriyoda vitellus kesesi duvarında, allontoise yakın primordial germ hücreleri. B: Primordial germ hücrelerinin, göç yolu	4
Şekil 2.2: Erkek cinsiyetin farklanmasında gonadların rolü.....	5
Şekil 2.3: A: Sol testisin anatomik yapısı, B: Epididmis ve testisin vertikal kesiti,C: Testis kanallarının düzeni ve vas deferens'in oluşum şekli	8
Şekil 2.4: Testis ve genital kanallar	10
Şekil 2.5: Seminifer tübülün bir kısmının çevre dokular ile gösterilmesi	11
Şekil 2.6: Testis seminifer tübülleri ve intertistumun histolojik görüntüsü	12
Şekil 2.7: Spermatogenez	13
Şekil 2.8: Olgun spermatozoon	15
Şekil 2.9: Bir seminifer tübülde Sertoli hücrelerinin yerleşimi, birbirleri ile bağlantıları ve gelişimin farklı dönemlerindeki spermatojenik hücreleri gösteren çizim.....	16
Şekil 3.5: Deney hayvanlarının pelvik bölgesine radyoterapi uygulanması.....	26
Şekil 4.1: H & E boyama. A) Kontrol grubu. B) Rad grubu. C) Sel grubu. D) Rad+Sel grubu. TL: Tübüler Lümen, BM: Bazal membran, SC: Spermatogenic cell, LC:Leydig cell *:Deforme seminifer tübül yapıları	37
Şekil 4.2.1: Seminifer Tübül Çap ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması	38
Şekil 4.2.2: JTBS ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması.....	39
Şekil 4.2.3: Sperm konsantrasyon ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması	40
Şekil 4.2.4: Sperm Motilite ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması	41
Şekil 4.3: MMP9, Connexin43, mTOR, Hsp70, PCNA ve StAR antikorları ile boyanmış kesitlere ait mikroskopik görüntüler.....	42
Şekil 4.3.1: Connexin43 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama	43
Şekil 4.3.2: MMP9 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama	44
Şekil 4.3.3: mTOR Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama	45

Şekil 4.3.4: HSP70 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama	45
Şekil 4.3.5: PCNA Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama.....	46
Şekil 4.3.6: StAR Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama.....	47
Şekil 4.4.1.1: CAT düzeyinde grupların kıyaslanması	48
Şekil 4.4.1.2: CAT konsantrasyonu ng/ml	48
Şekil 4.4.2.1: IL-6 düzeyinde grupların kıyaslanması	49
Şekil 4.4.2.2: IL 6 konsantrasyonu ng/ml.....	49
Şekil 4.4.3.1: MDA düzeyinde grupların kıyaslanması	50
Şekil 4.4.3.2: MDA konsantrasyonu ng/ml	51
Şekil 4.4.4.1: SOD düzeyinde grupların kıyaslanması	52
Şekil 4.4.4.2: SOD konsantrasyonu ng/ml	52
Şekil 4.4.5.1: TGF- β 1 düzeyinde grupların kıyaslanması	53
Şekil 4.4.5.2: TGF- β 1 konsantrasyonu ng/ml.....	54
Şekil 4.4.6.1: TNF- α düzeyinde grupların kıyaslanması	55
Şekil 4.4.6.2: TNF- α konsantrasyonu ng/ml.....	55
Şekil 4.4.7.1: Kontrol Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması	56
Şekil 4.4.7.2: Rad Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması	57
Şekil 4.4.7.3: Sel Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması.....	58
Şekil 4.4.7.4: Rad+Sel Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

- A:** Arter
- AI:** Apoptotik İndeks
- AMH:** Anti Müllerian Hormon
- APUD:** Amine Precursor Uptake Decarboxylase
- BSA:** Bovine Serum Albümin
- BTB:** Kan testis bariyeri
- CAT:**Katalaz
- DNA:** Deoksiribonükleik Asit
- H&E:** Hematoksilen & Eozin
- HSP 70:** Isı şok proteini 70
- H₂O₂:** Hidrojen Peroksit
- İ6:** İnterlökin6
- IMRT:** Intensity Modulated Radiotherapy
- İnfertilite:** Kısırlık
- İ.P:** İntraperitoneal
- JTBS:** johnsen testiküler biyopsi skoru
- M:** Muscularis
- MAGUK:** Membrane-Associated Guanylate Kinase
- MDA:** Malondialdehit
- MMP9:** Matrix metalloproteinase 9
- mTOR:** Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
- MU:** Monitor Unit
- PBS:** Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
- PCNA:** Proliferatif hücre nükleer antijeni
- PFA:** Paraformaldehid
- RAD:** Radyoterapi
- Radyoprotektif ajan:** Radyasyona karşı koruyucu ajan
- Radyosensitif:** Radyasyona duyarlı
- SBRT:** Stereotaktik Vücut Radyoterapisi
- SEL:** Selenyum L Metiyonin

SER: Agranüler Endoplazmik Reticulum
SOD: Süperoksit dismutaz
SOR: Serbest Oksijen Radikalleri
StAR: Steroidojenik Akut Düzenleyici
SRS: Stereotaktik Radyocerrahi
SRY: Y Kromozomu Üzerindeki Cinsiyet Belirleyici Bölge
TAS: Total Antioksidan Seviye
TBF: Testis Belirleyici Faktör Geni
TEM: Transmission Electron Microskopu
TGF B1: Transforme edici büyüme faktör-beta1
TNF alfa: Tümör nekroz faktör alfa
TOS: Total Oksidan Seviye
TUNEL: Tdt-Dutp Nick-End-Labeling
VMAT: Volumetric Module Ark Terapi
ZO-1: Zonula Okludens-1

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Uluslararası kanser ajansına göre 2020 yılında dünya çapında tahminen 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kanser ölümü gerçekleşmiştir (1). Radyoterapi, kanser tedavisinin en eski tedavi biçimlerinden biridir. Radyosensitif özelliği olan testislerin radyasyondan etkilenmeleri eskiden beri bilimsel çalışmaların konusu olmuştur (2). Gonadal doku üzerindeki etkiler, seminifer epitelyumdaki radyoterapinin sitotoksik etkisine bağlanmıştır; farklılaşmada spermatogonia'nın ortadan kaldırılmasına ve spermatogenezin sonraki aşamalarında spermatojenik hücre sayılarında önemli bir azalmaya neden olur (3). Germinal epitel radyasyona bağlı yan etkiler yönünden ileri derecede duyarlıdır. Clifton ve ark. (4) testislerinin ışınlanmasını kabul eden gönüllü mahkûmlar üzerinde yapılan bir çalışmada, 0,11 Gy ve üzerindeki dozların sperm sayısında önemli bir baskılanmaya neden olduğunu, 3-5 Gy dozlarında ise kalıcı infertilitenin gözlemlendiğini gösterdi. Radyasyon hızlı çoğalan (mitotik indeksi yüksek) hücreleri daha şiddetli etkilemektedir. Spermatogonia testisin radyasyon duyarlılığı en yüksek olan hücresidir. Spermatogonialar radyasyon uygulamasından sonra hızla azalmaya başlarlar. Spermatogonia'nın yaşam süresi fertilité için önemli bir faktördür. İyonize radyasyon germinal hücrelerde disosiasyon ve deskuamasyona sebep olurlar (5). Erkek germ hücreleri radyasyona karşı son derece hassastır ve kısmi veya tüm vücut ışınlama sonrası infertilite yaygın bir sorun haline gelebilir (6). Apoptoz ve nekroz tedavi amacıyla kullanılan ya da kaza ile alınan radyasyon sonucunda da gözlenebilmektedir. Bu nedenle radyasyonun toksik etkilerini azaltmak için sentetik radyoprotektif ajanlar geliştirilmiştir (7). Kanser tedavisinin amacı tümörü ortadan kaldırmaktır. Radyoterapi veya kemoterapi gibi antineoplastik rejimler vücuttaki birçok sağlıklı doku için toksiktir. Bu toksik etkiler doz sınırlayıcı olarak tedavideki başarıyı azaltabilir. Ayrıca son 20 yılda iyi prognozlu, kanser tanısı

almış ve başarılı bir şekilde tedavi edilmiş olguların, geç yan etkileri daha büyük bir farkındalığa yol açmıştır (8). Normal doku toksisitelerini azaltmak için çeşitli radyoprotektif ajanlar önerilmiştir (9). Bu radyoprotektif ajanlar hastanın radyoterapiye toleransını artırmanın yanında; hayat kalitesini yükseltir, doz eskalasyonuna izin verir ve tedavi komplikasyonlarını azaltarak destekleyici bakım için gereken maliyetleri azaltabilir.

Testis kanserleri, prepubertal dönemde lenfoma tedavisi, alt batına radyoterapi gerektiren çeşitli kanserler ve hematolojik kanserler sebebiyle total vücut ışınlaması yapılan hastalarda, yaşamın sonraki dönemlerinde infertilite saptanmıştır. Sonuç olarak radyoterapinin infertilite gibi toksik etkilerini azaltmak için radyoprotektif ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı sıçanlarda radyasyon ile indüklenmiş testiküler doku hasarı modelinde Selenyum L Metiyoninin koruyucu etkisinin ortaya çıkarılmasıdır. Yapılan bu deneysel çalışma ile klinik açıdan radyoterapinin yol açabileceği infertilitenin önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİSİN EMBRİYOLOJİSİ

2.1.1. Gonadların Gelişimi

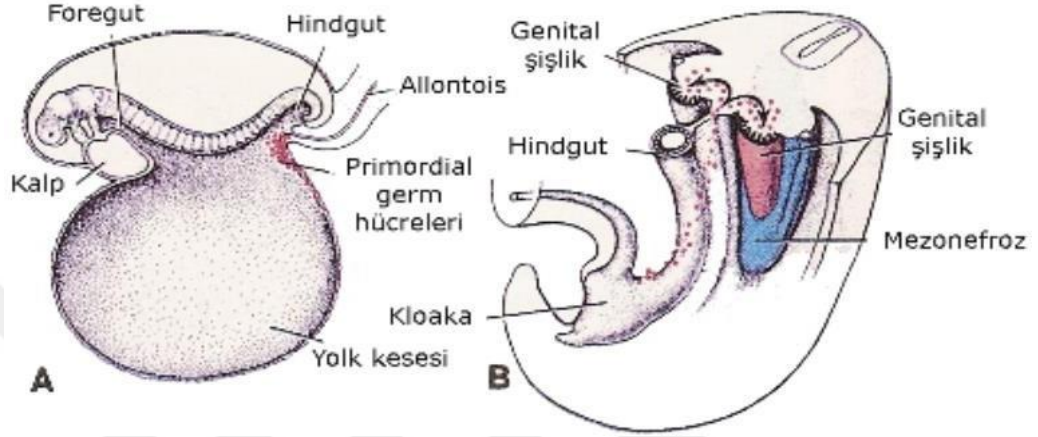
Dördüncü haftanın başında primordiyal germ hücreleri vitellus kesesi duvarında, endodermal hücreler arasında ortaya çıkar. Yaklaşık 10-100 adet primordiyal germ hücreleri, ameboid hareketler yaparak embriyonik gelişimin 4. ve 6.haftaları arasında gonadal bölgeye doğru göçü gerçekleştirirler. Yaklaşık olarak 10. torasik vertebra seviyesine civarında, ortalama 2500-5000 kadar primordiyal germ hücresi mezenşim içinde bulunur ve bir çift genital kabarıklık oluşturmak için, mezonefroz hücreleriyle birlikte sölomik örtü epitelinin hücrelerinin proliferasyonu için uyarırlar (şekil 2.1). Sölomik epitelyal kordonlar farklılaşmamış gonadın dışta korteks ve içte medulla bölgelerini meydana getirmek üzere, gonadal kabarıklığın mezenşimi içine doğru büyürler. Fetal gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar farklılaşmamış bir şekilde bulunur.

Testis belirleyici faktör (TBF) için gerekli olan SRY geni (Y kromozomu üzerinde bulunan, cinsiyet belirleyici bölge), erkek fenotipinin gelişimi için gerekli olan Y kromozomunun kısa kolunda yer almaktadır. Y kromozomu ile düzenlenen ve testiküler farklılığı sağlayan TBF etkisi altında embriyoda erkek bireyi oluşturmak üzere farklılaşmamış gonadın medullası testisi meydana getirir, korteksi ise dejenere olarak ortadan kaybolur (10,11).

2.1.2. Cinsiyetin Belirlenmesi

Döllenme tamamlandıktan sonra, embriyo XY kromozomuna sahip ise cinsiyet erkektir (12). Yedinci haftadan itibaren fenotipik cinsiyet farklılaşması başlar ve dış

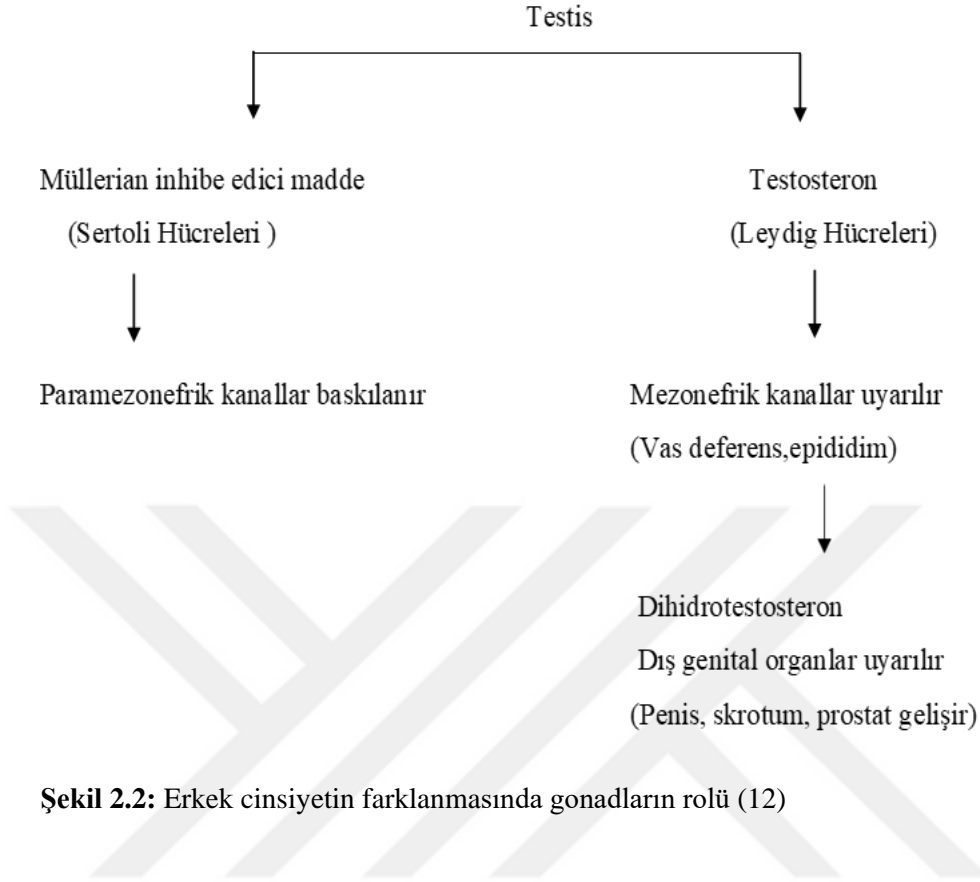
cinsel organın özellikleri on ikinci haftadan sonra tanınabilir duruma gelir. Gonadlarda başlayan fenotipik cinsel farklılaşma gelişimin yirminci haftasında tamamlanır (Şekil 2.2). Sonrasında ise dış genital primordiyaların ve genital duktusun gelişimi ile devam eder (13). Normal erkek cinsiyet gelişimini, fetal testisler tarafından üretilen antimüllerian hormon (AMH), dihidrotestosteron ve testosteron belirler (11).



Şekil 2.1: A: Üç haftalık embriyoda vitellus kesesi duvarında, allontoise yakın primordial germ hücreleri. B: Primordial germ hücrelerinin, göç yolu (12)

2.1.3. Testislerin Gelişimi

Testiküler farklılaşmayı sağlayan testis belirleyici faktör (TBF), Y kromozomunun üzerinde yer alan SRY geni tarafından düzenlenir (11). Farklılaşmamış stromal hücrelerdeki SRY'nin bir transkripsiyon faktörü olan SOX9'u indüklemesiyle, sertoli hücreleri farklılaşma için uyarılır (14). Gonodal kordonlar TBF faktörünün etkisi ile, seminifer kordonlara farklılaşır. Yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur ve kalın fibröz yapıda bir kapsül olan, tunica albuginea gelişir. Gonodal kordonların iç kısımları dallanıp anastomoz yaparak rete testisi, dış kısımları ise seminifer tübüleri meydana getirir (11). Puberteye kadar solid halde olan testis kordonları, puberteden itibaren lümenleri açılarak seminifer tübüllere farklılaşırlar. Seminifer tübüller kanalize yapıya farklılaştıktan sonra rete testis tübüleri ile birleşir ve duktuli efferenteslere girerler. Mezonefrik sistemin boşaltım kanalları olan bu efferent kanallar duktus deferens olarak bilinir ve rete testis ile Mezonefrik (Wolffian) kanalları bağlarlar (12). İntertisyel/Leydig hücreleri seminifer tübüller arasındaki mezodermden köken alırlar ve sekizinci haftadan sonra testosteron ve androstenedion salgılamaya başlarlar (11).



Şekil 2.2: Erkek cinsiyetin farklanmasında gonadların rolü (12)

2.1.4. Genital Kanalların Gelişimi

Genital sistem gelişimin beşinci ve altıncı haftaları arasında farklılaşmamıştır. Genital kanallar Mezonefrik (Wolffian) ve Paramezonefrik (Müllerian) olmak üzere iki çift olarak bulunmaktadır. Dişi üreme sisteminin gelişimi ve oluşumunda paramezonefrik kanallar, erkek üreme sisteminin gelişiminde ise mezonefrik kanallar etkili olmaktadır (15). Paramezonefrik kanallar, altıncı haftada hem erkek hem de dişi embriyolarda mezonefrik kanalların yan taraflarında oluşmaya başlar (13). Mezonefrik kanallar ise duktus deferens, seminal vezikül, epididim ve ejakülatör kanalı oluşturmaya devam ederken testisteki birkaç mezonefrik tübül ise testislerin eferent kanallarını oluşturur (11).

AMH Sertoli hücreleri tarafından üretilip salgılanır ve gelişimin altıncı ve yedinci haftaları arasında paramezonefrik kanalların dejenerasyonunu sağlar. Testosteron leydig hücreleri tarafından sekizinci haftada üretilip salgılanır ve hücrelerin içine girip kalabilir ya da dihidrotestosteron hormonuna dönüşebilir. Dihidrotestosteron erkek dış

genitallerinin farklılaşmasında etkiliyken, testosteron mezonefrik kanalların virilizasyonunu sağlar (12). Testosteronun etkisiyle bu dönemde, her bir mezonefrik kanalın proksimal kısımları kıvrıntılı hale gelerek duktus epididimisi meydana getirir. Mezonefrik kanallar dejenere olduğunda ise bu kanallardan bazıları kalıcıdır ve duktuli efferentesi oluştururlar. Bu duktuslar epididimise açılır, epididimisin distalinde mezonefrik kanala kalın düz kas tabakası eklenir ve duktus deferens oluşur (11).

2.1.5. Testislerin İnişi

Testisler, ikinci ayın sonunda mezonefroz karın arka duvarına ürogenital mezenter ile bağlı durumda bulunur. Bu bağlar Mezonefroz dejenere olduktan sonra, gonadın mezenteri haline gelir. Bu mezenterin kaudali ligament haline gelir ve kaudal genital ligament olarak adlandırılır. Ekstraselüler matriksten zengin, testisin kaudalinden çıkan, yoğun mezenşimal yapıya ise gubernakulum adı verilir (12). Gubernakulum yedi ve on ikinci haftalar arasında testislerin skrotuma inişine aracı olarak, testisin skrotum içine inmesini sağlar. Proessus vajinalisi oluşturmak için periton gubernakulum ile açığa çıkar ve testisler tunica vajinalis adı verilen kese oluşumuna katılır (13,16).

Gestasyonun yaklaşık on ikinci haftasında testisler inguinal bölgeye iner, yirmi sekizinci haftada inguinal kanaldan geçer, androjenler ve AMH gibi hormonların etkisiyle otuz üçüncü haftada skrotuma yerleşir (12). Yenidoğanların %3'ünden daha azında testisler skrotum içine inmemiş olabilir. İnmemiş testislerin çoğunun, doğumdan sonraki ilk üç ay içinde skrotuma inişi gerçekleşir. Testisler posterior abdominal duvar seviyesindeyken testiküler damarların oluşumu meydana gelir. Testisler skrotuma inişi sırasında, duktus deferens ve damarları da birlikte götürürler, daha sonra fasiyal uzantıları ile çevrilirler (11).

2.2. TESTİSİN ANATOMİSİ

Testisler (orcis) skrotum içerisinde oblik pozisyonda ve funiculus spermaticus'a asılmış şekilde bulunurlar. Her bir testis ortalama 10-14 gr ağırlığındadır. Testislerden

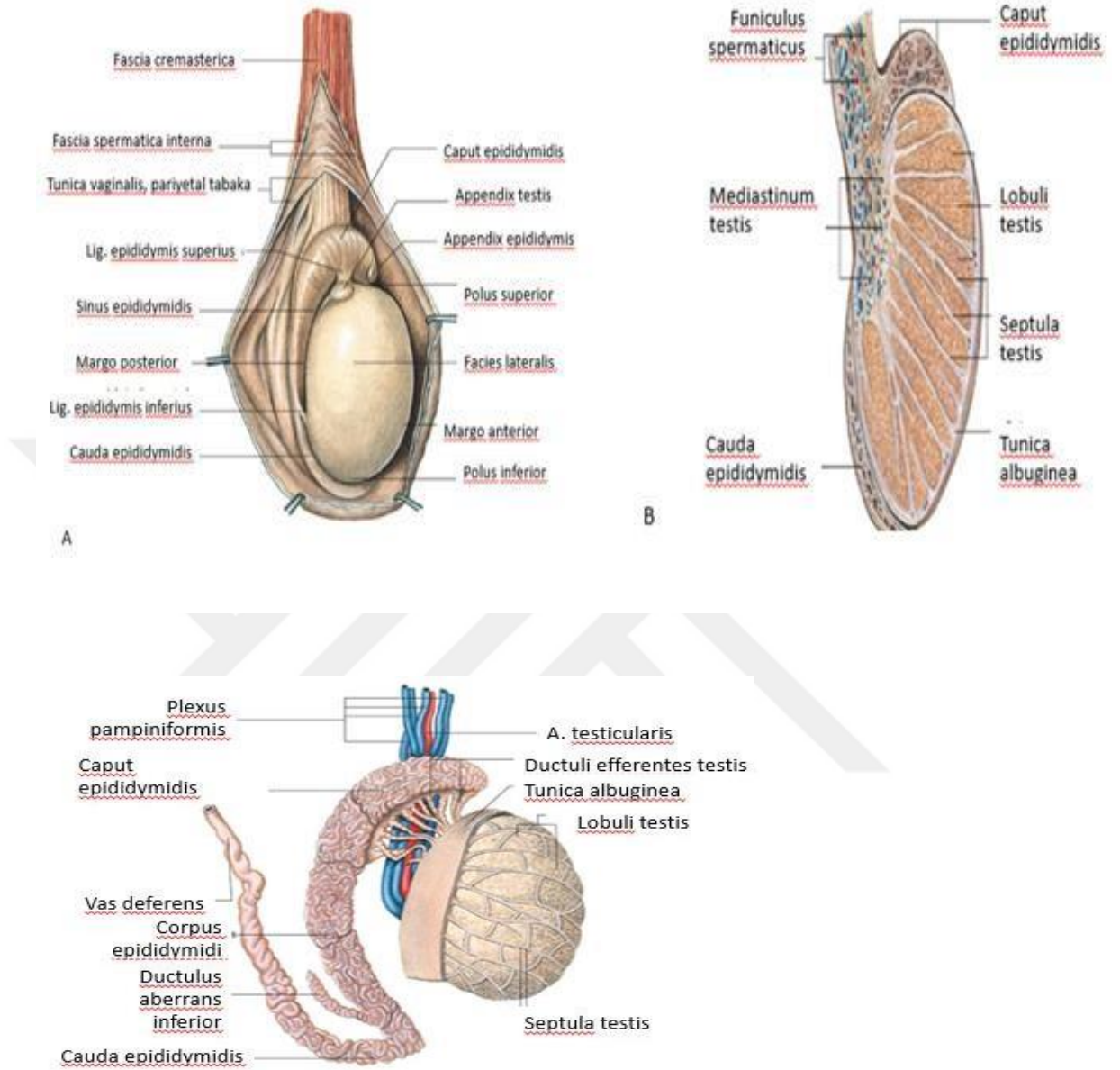
sol testis sağ testise göre genellikle 1 cm daha aşağıda yer alır. Yetişkin erkek bireylerde testisin uzunluğu 4-5 cm, geniŐliđi 2-3 cm ve kalınlığı 3 cm'dir. Testisler septum scroti aracılığıyla birbirlerinden ayrılır, lateralden mediale doğru tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosa tabakaları ile çevrili bir Şekilde bulunurlar (Şekil 2.3).

Tunica vaginalis (processus vaginalis'in distal ucu), lamina visceralis (epiorchium) ve lamina parietalis (periorchium) adlı iki yapraktan oluşur. Testisin n kısmını ve iki yüzünü lamina visceralis örterken; arka kısmın medial ve lateral taraflarında kendi üstüne kıvrılır ve lamina parietalis ile devam eder. Bu iki yaprak arasındaki boŐlukta az miktarda seröz bir sıvı yer alır.

A. renalis'lerin aŐađısında aorta'nın n tarafından sağ ve sol a. testicularis adlı bir çift arter ayrılır. Testis ve epididimis, abdominal aortanın dalı olan a.testicularis aracılığıyla beslenir. A. testicularis birden fazla dala ayrılır ve bu dallardan 2-4 tanesi ductus deferens boyunca uzanarak epididimis'i, tunica albuginea'nın arka tarafını delerek testise giren diğer dallar ise bu organı besler (17-19).

Testis ve epididimis içinde derin lenf damarları yer alırken, tunica vaginalis'in altında yüzeyel lenf damarları yer alır. Bu damarlar arcılığıyla funiculus spermaticus karın boŐluđuna geçerek, nodi aortici laterals ve nodi preaotici'ye açılır (18).

Testis otonom sinir sistemi tarafından kontrol altına alınmıştır. Sempatik innervasyonu damarların çevresindeki pleksuslar aracılığı ile yapılır ve medulla spinalis'in 10-11. torakal vertebra segmentlerinden kaynaklanır. Parasempatik innervasyonu ise a. testicularis'in etrafındaki pleksus testicularis tarafından yapılır (17,20).



Şekil 2.3: A: Sol testisin anatomik yapısı, B: Epididymis ve testisin vertikal kesiti, C: Testis kanallarının düzeni ve vas deferens'in oluşum şekli (21)

2.3.TESTİSİN HİSTOLOJİSİ

Testisler, embriyonik gelişimi, cinsel olgunlaşmayı ve üreme fonksiyonlarını etkileyen, skrotum içine yerleşmiş bir çift organdır. Testisler ekzokrin ve endokrin salgı yapabilen organlardır, iki yönlü görevi ise testosteron hormonunu ve spermatozoonun üretimini sağlamaktır. Androjenlerin üretimi testislerde gerçekleşir ve embriyoda erkek fetusun normal gelişimi için androjenler gereklidir (22).

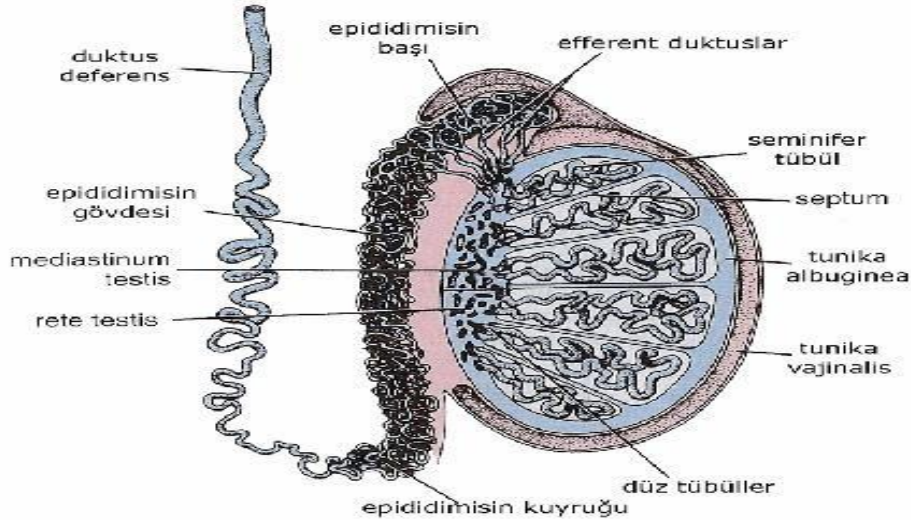
Testis tunica albuginea adı verilen bir kapsül ile sarılıdır. Tunica albuginea testisin arka kısmında kalınlaşarak mediastinum testis yapısını meydana getirir. Bu kısımdan bezin içine giren septumlar, bezi ortalama 250 piramidal bölmeyle ayırarak “lobuli testis” adlı yapıları oluşturur. Her bir lobül gevşek bağ dokusu ile sarılı olarak bulunan 1-4 adet seminifer tübülden oluşur (Şekil 2.4). Bu gevşek bağ dokusu içerisinde bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve Leydig hücreleri/İnterstisyel hücreler yer alır. İnterstisyel hücrelerde androjenlerin sentezi gerçekleşirken, seminifer tübüllerde ise germinal hücrelerin üretimi gerçekleşir (23).

2.3.1.İnterstisyel Doku

Seminifer tübüller arasında yer alan çok sayıda kan ve lenf damarı, sinir lifleri içeren gevşek bir bağ doku olan İnterstisyel bağ dokuyu meydana getirir. İnterstisyel bağ dokuda, bağ dokusunun esas hücreleri olan fibroblastlara ek olarak makrofajlar, mast hücreleri ve Leydig hücreleri olarak bilinen testosteron üreten hücreler yer alır (22).

Leydig hücreleri, bağ dokusu içerisinde tek tek ya da gruplar şeklinde görülebilen yuvarlak nükleuslu, yuvarlak şekilli, asidoflik sitoplazmasında agranüler endoplazmik retikulum (SER) ve çok sayıda lipid damlacığı barındıran hücrelerdir. Sitoplazmalarında çubuk şeklinde bir inklüzyon olan Reinke kristalleri ve lipofuksin pigmenti yer alır (22). Hipofiz bezinden salgılanan luteinleştirici hormonun (LH) uyarısı ile ve yapısında bulunan çok sayıdaki SER sayesinde testosteron hormonunu sentezleyip salgılayabilen endokrin hücrelerdir (23,24).

İnsan yaşamının farklı dönemlerinde Leydig hücrelerinin testosteron salgısı farklı etkiler meydana getirebilir. Testosteron ve diğer androjenler embriyoda erkek fetusun gonadlarının gelişmesi için gerekli iken, pubertede spermiyum üretiminin ve aksesuar bezlerin salgılarının başlaması için aynı zamanda ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişmesi için gereklidir. Yetişkinlerde ise spermatogenezin, ikincil cinsiyet karakterlerinin devam ettirilmesi ve bezlerin salgı aktiviteleri için gereklidir (22).



Şekil 2.4: Testis ve genital kanallar (23)

2.3.2.Seminifer Tübüller

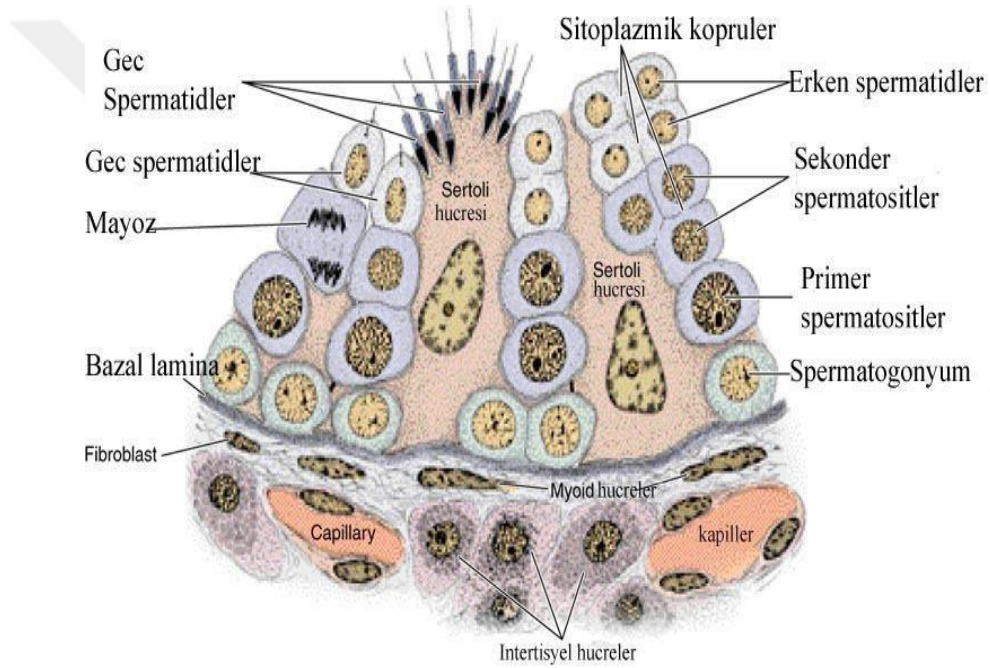
Spermatogenez olayı seminifer tübüller içerisinde meydana gelir. Her bir testiste ortalama 250-1000 civarında seminifer tübül yer alır. Her bir seminifer tübül yaklaşık olarak 150-250 µm kalınlığında ve 30- 70 cm boyundadır. Çevreleri yaygın kan damarı ile sarılı olan seminifer tübüllerinin toplam uzunluğu ortalama 250 m'dir. Tübüller kıvrımlıdır ve uçlarına doğru lümenleri daralarak düz tübüller (tubuli rekti) olarak isimlendirilen kısa segmentler halinde uzanır. Seminifer tübülleri "rete testis" adlı kanallardan oluşan bir labirente bu düz tübüller aracılığıyla bağlarlar. Rete testis kanalları anastomozuyla oluşan ortalama 10-20 adet duktuli defferentes ile epididimin baş kısmına bağlanırlar (22,25).

Seminifer tübüller, bazal lamina ve germinal (seminifer) epitelden meydana gelir. Fibröz bir bağ dokusu kılıfı ile sarılıdır. Birkaç fibroblast katmanından oluşan bu fibröz tabaka tunica propria olarak isimlendirilir. Düz kas özellikleri gösteren "miyoid hücreler" bazal laminaya yapışık olan en içteki katmanda bulunur (23).

2.3.2.1.Seminifer epitel ve spermatogenik hücreler:

Erişkin memeli testislerinde seminifer epitel; germ hücrelerini ve spermatogenik hücreleri destekleyen ve onları besleyen Sertoli hücrelerinden oluşan özel bir epiteldir (23,24).

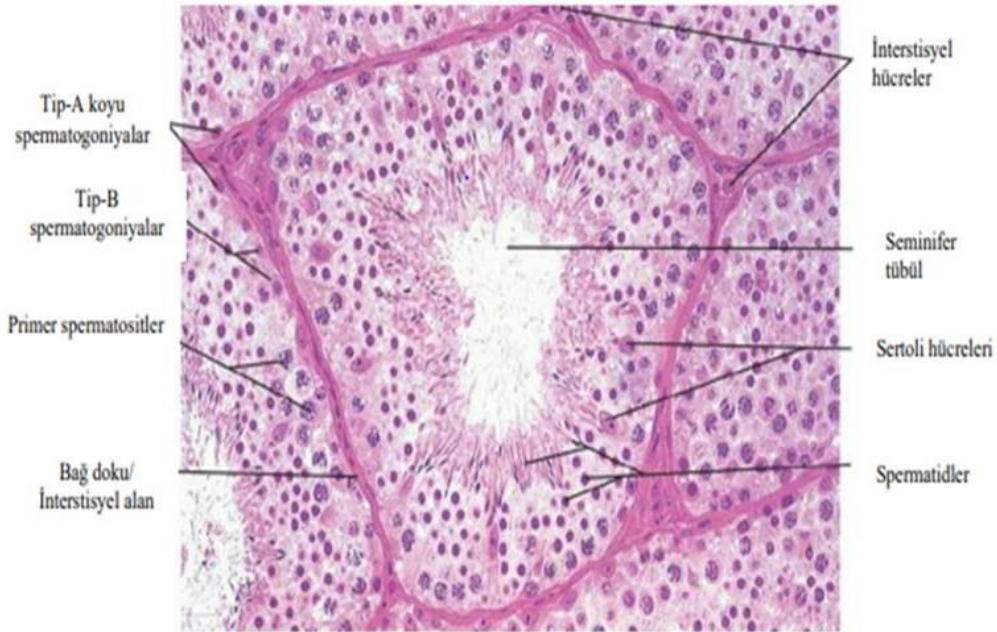
Spermatazoonların üretiminden, spermatogenez serisindeki 4-8 tabaka halinde düzenlenmiş olan hücreler sorumludur. Spermatogenez olarak adlandırılan bu süreçte mayoz ve mitoz bölünmeler görülür. Spermatogenez sonunda spermatidler haploid germ hücreleri olan spermatazoonlara farklılaşırlar. Seminifer epitelde spermatogenik hücreler, rastgele dağılım göstermez. Gelişimlerinin farklı dönemindeki hücreler birbirleriyle benzer bölgelerde gruplaşır ve hücreler olgunlaştıkça bazaldan lümene doğru dizilim gösterirler (Şekil 2.5). Hücreler yaklaşık iki aylık bir süreçte spermatid haline gelir (23).



Şekil 2.5: Semnifer tübülün bir kısmının çevre dokular ile gösterilmesi (23)

2.3.2.1.1.Spermatogenez: puberte öncesinde gonadotropinlerin artmasıyla spermatogenez süreci başlar. Bu süreç spermatisitogenez, mayoz ve spermioyogenezdir. Spermatisitogenezde spermatoğonyumlar primer spermatisitlere farklılaşır ve bu farklılaşma mitozdan ibarettir. Mayoz bölünmede primer spermatisitlerdeki diploid kromozom sayısı haploide düşer ve spermatidler oluşur. Spermioyogenezde ise spermatidler spermatazoonlara farklılaşır (Şekil 2.6) (25).

Spermatogenez, spermatogonyumların proliferasyonu ile başlar (22,23). Pubertede spermatogonyum hücrelerinin çoğalmaları mitoz bölünmeler ile başlar. Kök hücreler olarak A tipi spermatogonyumlar bölünmeyi sürdürebilir ya da devam eden mitoz bölünmeler boyunca farklılaşarak B tipi spermatogonyumlara dönüşürler. B tipi spermatogonyumlar 46 kromozomlu (44+XY) primer spermatositlere dönüşen öncül hücrelerdir. Primer spermatositler ise birinci mayoz bölünmenin profazına giderler ve bu süreç yaklaşık 22 gün sürer. Spermatogonik serinin en büyük hücreleri primer spermatositlerdir. Birinci mayoz bölünmenin ardından 23 kromozomlu (22+X veya 22+Y) sekonder spermatositler adlı yeni hücreler meydana gelir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi 23 kromozomlu iki hücre olan haploid sayıdaki spermatidlerin oluşmasıyla sonuçlanır (Şekil 2.7).

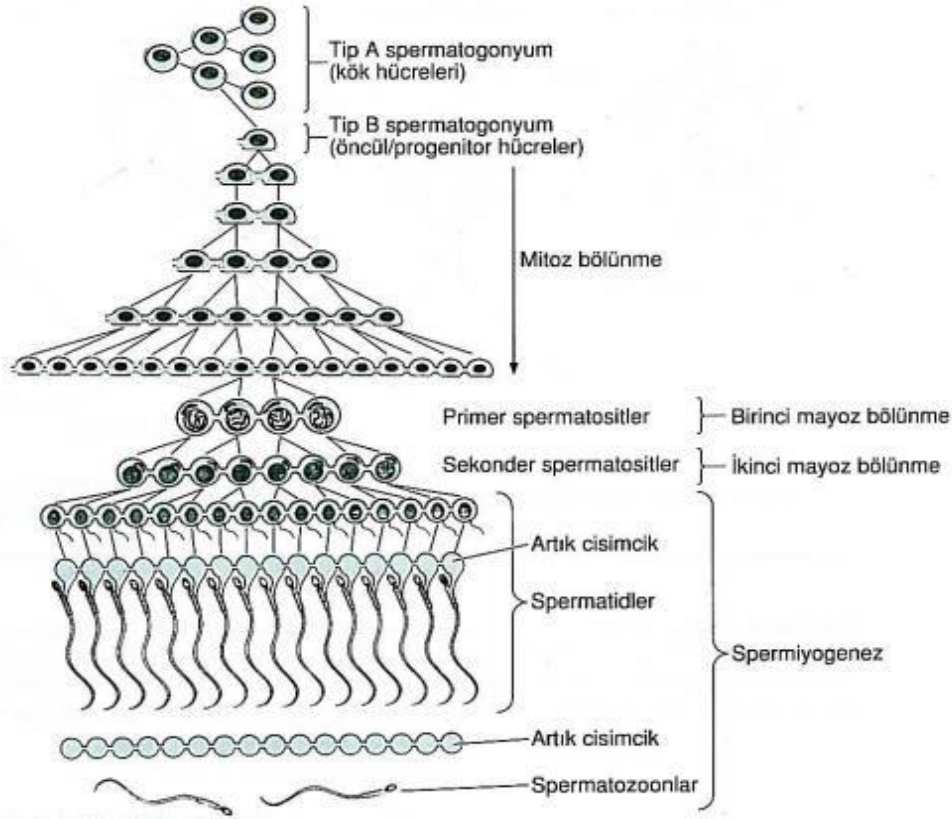


Şekil 2.6: Testis seminifer tübülleri ve intertistumun histolojik görüntüsü (28)

Spermatidler; seminifer tübül içerisindeki lümenin yakınlarında yerleşim gösterirler. Haploid spermatidler yaklaşık olarak 7-8 μm çaplı küçük boyutludur. Nükleusları yoğun kromatin bölgelerine sahiptir (23).

Erkek sıçanlarda spermatogenez, puberte döneminde görülür. Sıçanlarda spermatogenez ortalama 48-53 gün sürer ve germ hücrelerinden spermatozoonların

oluşumuna kadar uzanır. Germ hücreleri seminifer epitel içinde ilerler ve spermatogonyumlar mitoz bölünmeler geçirir. Yaşlı hücreler yerine genç hücrelerin gelmesi yaklaşık olarak 12-13 günde gerçekleşir (26,27).



Şekil 2.7: Spermatogenez (22)

2.3.2.1.2.Spermiyogenez: Bir farklılaşma olayıdır. Erken dönemde yuvarlak hücreler olan spermatidlerin, spermiyogenez ile değişime uğrayıp, kuyruklu ve bir ölçüde hareketli olan spermatozoonlara dönüşme sürecidir.Spermatogenezin son safhası spermiyogenezdir. Spermiyogenez süresince hücre bölünmesi gerçekleşmez (27,38). Spermiyogenez üç evrede tamamlanmaktadır. Bunlar; akrozom oluşumu, golgi fazı ve olgunlaşma fazıdır.

Golgi fazında; spermatid sitoplazması mitokondri, SER belirgin bir golgi kompleksi, bir çift sentriyol ve serbest ribozomlar içerirler. Golgi kompleksinde PAS pozitif küçük granüller olan “proakrozomal granüller” birikir. Bu granüller birleşerek zarla sınırlı akrozomal vezikülün içinde bulunan akrozomal granülü oluştururlar.

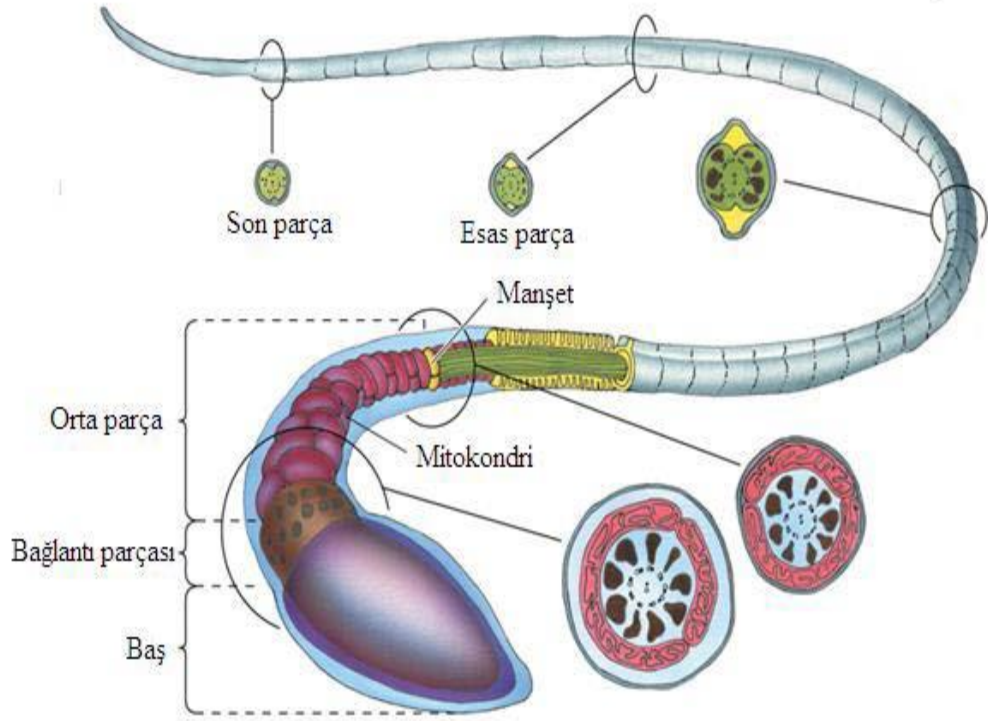
Sentriyoller göç ederek hücreyüzeyine yakın bir yere, akrozomun karşısına gelirler. Kamçı aksonemi oluşturmaya başlar, sentriyoller yeniden nukleusa doğru göç eder ve hareket ettikçe aksonemal bileşenleri çevresine sararlar.

Akrozomal fazda; akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan nukleusun ön yarısını kaplar, yayılır ve bu aşamadan sonra “akrozom” adını alır (23). Akrozom, oositin korona radyata ve zona pellusida tabakalarını aşabilmelerini sağlayan, hyaluronidaz, akrozin, lizozomal hidrolazlar ve proteazlar gibi enzimler içerir (29). Spermatogenezin bu safhasında spermatidler seminifer tübülün tabanına doğru yönelir, aksonem lümene doğru uzanır, nukleus uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Sentriyollerden biri kamçıyı oluşturur. Mitokondriler kamçının üst kısmı etrafında toplanarak “orta parça” adı verilen parçayı oluşturur.

Olgunlaşma fazında; Sitoplazması fazla olan bölüm boğumlanıp kopar ve Sertoli hücreleri tarafından sindirilir. Spermatidlerin birbirleri ile olan bağlantıları kaybolur ve Sertoli hücrelerinden ayrılan spermatidler lümene düşerler (23).

2.3.2.1.3 Spermin yapısı:

Olgun bir sperm esas olarak plazma zarı ile sarılı olan baş ve kuyruktan oluşur. Boyun bölgesi baş ve kuyruk kısımlarını birbirine bağlayan bir bağlantı parçası olarak ve bağımsız bir alan olarak değerlendirilmekte. Kuyruk kısmı; esas parça, orta parça ve son parça olmak üzere üç ana kısımdan oluşur (Şekil 2.8) (27). Baş kısmında; bir çift sentriyol yer alır.



Şekil 2.8: Olgun spermatozoon (Gartner Color Textbook Histoloji, 2th ed.'dan modifiye edilmiştir.)

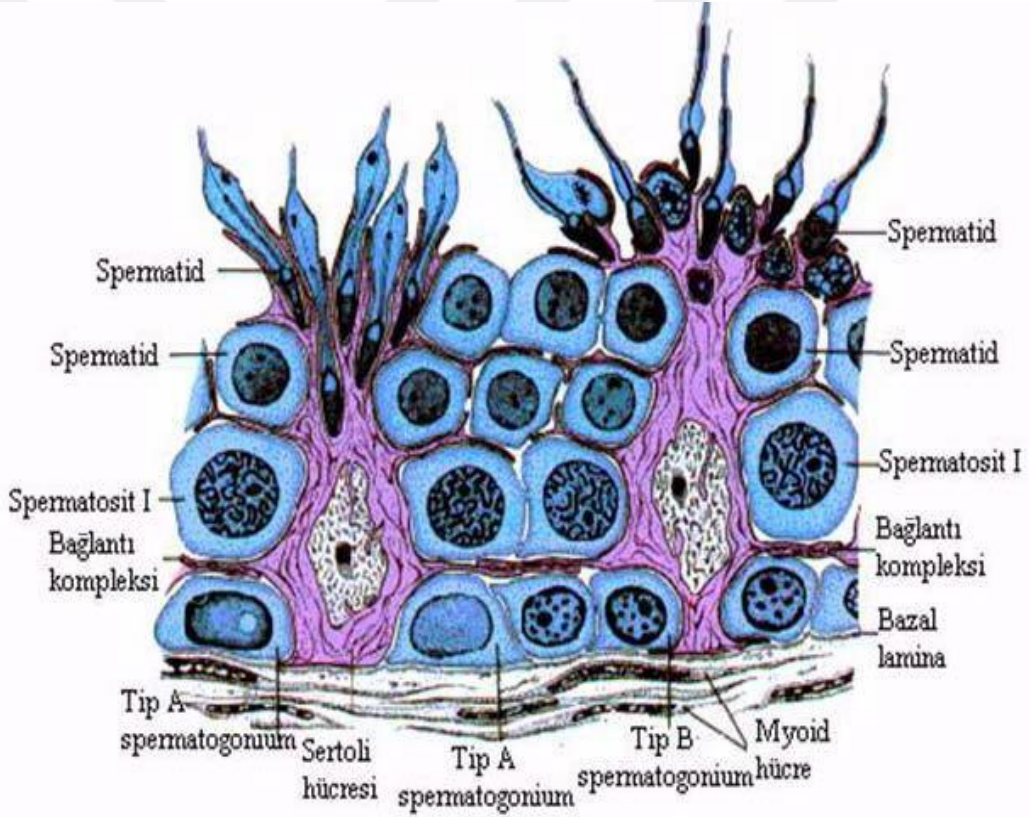
2.3.2.2. Sertoli hücreleri: Piramidal şekilli, tabanları ile bazal laminaya tutunan, tepe kısımları ile de seminifer tübülün lümenine uzanan hücrelerdir (şekil 2.9) Sertoli hücrelerinin bölünme yetenekleri yoktur (23).

Sertoli hücreleri organelden zengindir, golgi kompleksi, mitokondri, lizozom iyi gelişmiş granüler ve agranüler endoplazmik retikulum (GER ve SER), glikojen granülleri ve lipid damlaları içerir. Ökromatik çekirdeğe sahiptir (22,24).

Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılardan kan-testis bariyeri oluşur. Sertoli hücreleri mitoz, mayoz ve farklılaşma gibi germ hücrelerinin gelişimi ve olgunlaşması için gerekli olan uygun mikro çevreyi sağlar ve sitotoksik moleküllerden germ hücrelerini korur (30). Kan testis bariyerinin üzerindeki sertoli hücrelerinin üst ve lateral kenarlarındaki girintilere yerleşmiş spermatidler ve spermatositler bulunur (23).

Sertoli hücrelerinin görevleri;

- ✓ Spermiyogenezdeki fazlarda gelişimini ve spermatid sitoplazmasını tamamlayamamış spermatogenik hücreleri fagosite ederek elimine ederler.
- ✓ Spermatogenik hücreleri destekleyip, besler ve korurlar.
- ✓ Erkek fetüste Müllerian kanalların gerilemesini sağlayan AMH salınımını sağlar.
- ✓ Spermatozoonları besleyen ve de taşınmasını kolaylaştıran fruktozdan zengin bir sıvı salgırlar.
- ✓ Plazminojen aktivatörleri, transferin ve FSH salınımını baskılayan inhibin sentezlerler (22,23,25).



Şekil 2.9: Bir seminifer tübülde Sertoli hücrelerinin yerleşimi, birbirleri ile bağlantıları ve gelişimin farklı dönemlerindeki spermatogenik hücreleri gösteren çizim (Ross, Romrell, Histology A Text and Atlas'tan alıntılanmıştır.)

2.3.3. Testis İçi Genital Kanallar

Testis içerisinde yer alan genital kanallar tubuli rekti, rete testis ve duktuli efferentestir. Seminifer túbüllerden gelen spermatozoonlar ve sıvı bu kanallar aracılığıyla duktus epididimise taşınır.

Seminifer túbüller her iki uçtan “tubuli rekti” olarak bilinen düz túbüller aracılığıyla rete testise bağlanır (23).

Rete testis; düzensiz, tek katlı prizmatik veya kübik epitel ile döşeli, anastomozlaşan kanallardan oluşur (22). Rete testisten ortalama 10-20 adet duktuli efferent çıkar. Silyasız hücreler tarafından, seminifer túbüllerden salgılanan sıvının çoğu emilir. Titrek tüylü hücreler ve sıvı aktivitesi aracılığıyla spermatozoonlar epididime doğru ilerletilir. Duktuli efferentler birleşerek epididimin duktus epididimisini meydana getirir (23).

2.3.4. Genital Boşaltım Kanalları

Spermatozoonlar duktus epididimis, duktus deferens (vas deferens) ve üretra aracılığıyla penise iletilir. Duktus epididimis, ortalama 4-6 metre uzunluğunda tek ve kıvrımlı bir kanaldır. Duktus epididimis çevresindeki bağ dokusu ve kan damarları ile epididimisi oluşturur. Epididimis kanalı yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir, kanal duvarında bazal hücreler bulunur, apikal bölümünde ise lümeneye doğru uzanan hareketsiz steriosilyalı hücreler mevcuttur. Düz kas hücreleri, peristaltik kasılmalarla spermin kanallarda ilerlemesini sağlar ve vasküler yapıdan zengin bağ dokusu ile çevrelenmiş bir bazal membran üzerine otururlar. Spermatogenez boyunca oluşan artıkların sindirilmesine ve ortadan kaldırılmasına duktus epididimis epiteli katkı sağlar.

Epididimis, duktus (vas) deferens olarak adlandırılan bir kanal ile devam eder. Bu kanal ise prostatik üretraya açılır. Duktus deferens prostatik üretraya açılmadan önce genişleyerek ampullayı oluşturur. Seminal veziküller ise duktusa ampullanın son kısmında katılırlar ve prostatik üretraya açılırlar. Prostata giren duktus deferens segmenti ejakülatuar kanal olarak adlandırılır. Duktus deferensin mukozası ampulla

da dahil olmak üzere ejakülatuvar kanalın içine kadar devam eder, kas katmanı ise ampulladan sonra sonlanır (23)

2.4. RADYOTERAPİ

Radyoterapi (RT) kanser tedavisinde en çok kullanılan tedavi yöntemlerindedir. Başlıca eksternal ve internal (brakiterapi) olarak uygulanır. Kanser hastalarının yaklaşık %60'ına tedavilerinin herhangi bir aşamasında RT uygulanmaktadır (31). Radyoterapi kanser tedavisinde küratif (serviks, nazofarinks, prostat vs), adjuvant (meme, beyin, rektum vs) ve palyatif (kemik metastazları, beyin metastazları vs) amaçla etkili ve başarılı bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır.

Kanserin daha etkili ve daha güvenli tedavi edilmesi için yüksek doz RT'nin uygulanma tekniklerinin geliştirilmesi kanser araştırmalarında temel hedeflerden birini teşkil eder. RT'nin toksik etkilerinden (subletal) sağlıklı dokuları korumak ve tümörlü dokularda letal etkiyi artırmak için yeni uygulamalar öngörülmektedir (32,33). Abdominal-pelvik ışınlanma sağlıklı hücrede hasara yol açar. Oluşan bu hasar (subletal hasar) tamir edilirse hücre sel ölüm gerçekleşmez, edilmezse apoptoz ile sonuçlanır.

Radyoterapinin esas yöntemi kanserli hücreleri yok etmek için iyonize radyasyonun kullanılmasıdır. Ancak sadece hedeflenen organlar değil tedavi alanı içinde kalan birçok sağlıklı doku da bu ışımadan etkilenebilmektedir. Tümör tedavisinde sağlıklı dokuların tedavi alanına girmesi ile radyasyondan olumsuz etkilenmesi kaçınılmazdır (34,35). Yavaş bölünen hücrelere (mitotik indeksi düşük) oranla hızlı bölünen (mitotik indeksi yüksek) hücrelerin iyonize radyasyona duyarlılığı daha fazladır. Bu sebeple RT'nin akut etkisi hızlı bölünen hücrelerde, kronik etkisi ise yavaş bölünen hücrelerde ortaya çıkmaktadır (36).

İyonize radyasyon uygulanması sonucu dokuda meydana gelen serbest oksijen radikalleri (SOR), DNA'yı hasarı oluşturarak hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. İyonize radyasyonun bu zararlı etkileri, ortamda oluşan SOR'nin varlığından kaynaklanır. Hasar sonucu biriken SOR, lipid ve proteinler gibi makromoleküllere saldırır. İyonize radyasyon sonucu dokuda SOR seviyesinin yükselmesine bağlı olarak hidroksil (OH-) radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek doku hasarı ve apoptoza neden olabilir. Normal fizyolojik koşullarda, serbest radikal

oluşumu ile antioksidan savunma sistemi denge halindedir. Dokular, iyonize radyasyona maruz kaldıklarında bu dengenin serbest radikal tarafına kayması, lipid peroksidasyonuna yol açar. Hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısı bozulur, hücre içi enzimler inaktif hale gelir ve DNA hasarı oluşur. Organizmadaki tüm bu fonksiyonel ve yapısal değişiklikler, radyasyona bağlı oksidatif stresten kaynaklanmaktadır (37).

Dokuların oksijenlenme durumu, radyasyonun biyolojik etkinliğini belirleyen en önemli faktörlerdendir. İyi oksijenlenmiş hücreler radyasyona daha duyarlıdır.

Overgaard ve ark. yaptıkları bir çalışmada hamster hücrelerinin in vitro koşullarda oksijenli ve hipoksik koşullarda X-ışını etkisini incelenmiş ve hücrelerin canlı kalabilmesi için oksijenli ortamda uygulanması gereken dozun, hipoksik ortamda uygulanması gereken dozdan yaklaşık 3 kat daha az olduğu rapor edilmiştir (38).

DNA genetik bilgiyi taşıyan, nesiller boyu gen aktarımı sağlayan bir moleküldür.

DNA'nın fiziksel ve kimyasal yapısındaki etkileşime bağlı değişimler hasar olarak değerlendirilir. DNA üzerinde oluşan hasarlar DNA onarım sistemleri tarafından onarılır. Radyoterapiye bağlı hücre hasarının çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda ise hücre ölümü görülebilir (39). RT hasarının etkileri; gen ekspresyonları, mutasyonlar, kromozom sapmaları, genomik kararsızlıklar ve hücre ölümleri şeklinde görülebilir.

İyonize radyasyondan etkilenen DNA hasarının şiddeti; oksidatif stres yoğunluğu, toksik ara maddeleri metabolize eden savunma ve onarım mekanizmaları ile ilişkilidir.

Ayrıca iyonize radyasyondan kaynaklanan hasarın şiddetinin azaltılmasının farklı yolları (radyoprotektif ajanlar) bulunmaktadır (40).

Radyoterapinin terapötik özelliğine rağmen tümörlü dokunun veya hedef hacmin dışındaki sağlıklı doku ve organlar bu istenmeyen etkilere maruz kalmaktadır. Tümör kontrolü için gerekli olan yüksek doz radyasyon uygulamalarında sağlıklı dokular korunmaya çalışılmalıdır.

Günümüzde hücresel savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda radyoproteksiyon amaçlı antioksidan preparatlar Amifostin, Selenyum L Metiyonin vitamin takviyeleri (E vitamini), L-Carnitinin ve Melatonin gibi çeşitli kimyasal ajanlar uygulanmaktadır.

İyonize radyasyonun DNA molekülüne etkisi direkt ve/veya indirekt olarak gerçekleşir. Radyasyon etkisinin daha azı direkt etki ile oluşur ve DNA molekülünde yapısal hasar, fonksiyon kaybı ve sentez inhibisyonu oluşturabilir. Radyasyonun etkisinin çoğunluğu indirekt etki ile oluşur. İyonize radyasyonun etkisi ile su moleküllerinin iyonlaşması sonucu hidrojen, hidroksil radikali (OH⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi serbest oksijen radikalleri açığa çıkar (41). Serbest radikallerin DNA'yı etkilemesiyle kromozomda kırılmalar oluşur ve tamir edilmezse hücre apoptoza giderek ölür. İndirekt etkileşimde hasar daha belirgindir. Oksijen molekülü kalıcı radyasyon hasarı oluşumunda önemli bir role sahiptir. Yüksek moleküler oksijen varlığında tümör hücrelerine uygulanan iyonize radyasyon kalıcı DNA hasarı oluşturur. Kanser hücreleri üzerine kullanılan, iyonize X-ışınlarının hücre DNA'sına dolaylı etkisi ile su molekülleri parçalanır. Meydana gelen SOR ve farklı radyasyon doz hızları arasındaki ilişki literatürde henüz tam olarak açıklanamamıştır (38).

Radyasyonun indirekt etkisiyle oluşan serbest radikaller, ortamdaki oksijenle hızla reaksiyona girer ve oksijenden toksisitesi daha yüksek peroksit radikalleri oluşur (42). Onarım süreçlerinin yeterli olmadığı durumlarda serbest radikaller hücrelerde kalıcı hasar oluşturabilmektedir (43). Radyoterapide yüksek doz hızı ve enerjilere sahip X-ışınları uygulandığında, DNA hasarı daha çok indirekt yolla gerçekleşir. Serbest radikaller, moleküllerle çok kısa sürede reaksiyona girerek hücrelerde hasar oluşturabilmekte ve hücre ölümüne neden olabilmektedir. İyonize radyasyonun dokular üzerindeki hasar verici etkisi %60-70'inin OH⁻ radikalleri sebebiyle oluştuğu varsayılmaktadır (44-46).

TBI (Tüm Beden Işınlaması) kemik iliği nakli öncesinde hastanın kemik iliğinin hücrel aktivitesini baskılamayı ve bağışıklık sistemini suprese edip donör kemik iliğine yer açmayı ve çoğalabilmesine ortam sağlamayı amaçlayan, megavoltaj foton ışınları kullanılarak tüm bedene belirli doz protokolleriyle radyasyon uygulaması ile yapılan bir tedavi yöntemidir. TBI yetişkin ve çocuklarda Akut Lenfoblastik lösemi (ALL), Akut miyeloid Lösemi (AML), Kronik miyeloid lösemi (KML), Miyelodisplastik sendrom (MDS), Aplastik anemi gibi hastalıklarda ve nadiren de Nöroblastom, Ewing Sarkom, Multiple miyelom hastalıklarında uygulanmaktadır.

Modern RT cihazları ile, yoğunluk ayarlı radyoterapi IMRT (Intensity-modulated radiotherapy), VMAT (Volumetric modulated arc therapy), SBRT (Stereotactic body radiotherapy) ve stereotaktik radyocerrahi SRS (Stereotactic Radiosurgery) teknikleri kullanılarak tümörlü dokulara RT uygulanmaktadır.

2.5. SELENYUM L METİYONİN

Selenyum, hayvanlar ve insanlar için esansiyel eser elementlerdendir. Periyodik tabloda 4. periyot ve 6. grupta yer alır ve kükürtle benzer özellikler gösterir. Selenyum, biyolojik sistemlerde yaygın olarak organik formda (selenometiyonin ve selenosistin), aynı zamanda inorganik formlarda (selenik asit, selenyum tuzu ve selenyumdioksit) bulunur.

Selenyum L Metiyonin, insan ve hayvanlardaki selenyumun ana kimyasal formudur. Bitkilerdeki selenyumun %90' ı Selenyum L Metiyonin formunda bulunur (47). Selenyum L Metiyonin diyetle alımdan sonra intestinal metiyonin taşıyıcıları ile absorbe edilir ve vücuttaki metiyonin havuzuna girer. Bu havuzdaki Selenyum L Metiyoninlerin bir kısmı proteinlere metiyonin pozisyonundan katılır. Yüksek miktarda Selenyum L Metiyonin alımı dokularda Se birikmesine neden olur. Bu birikim SeM içeren proteinler vasıtası ile olur ve selenoproteinlerdeki Se miktarının kat kat üstündedir. Selenyum L Metiyonin' in diğer kısmı metiyonin siklusu ve trans-sülfürasyon yolu ile Selenosistein elde edilmesidir. Bu metabolik olaylar çoğunlukla karaciğerde gerçekleşir. Selenosistein, Selenyum metabolik yolağının giriş noktasında bulunur. Selenosistein liyaz, sisteinden sülfür analoglarını ayırır, selenit ve alanine katabolize eder. Doku homojenatlarında serbest Selenosistein çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Karaciğerdeki gama-liyaz aktivitesi ile Selenyum L Metiyonin, metil-selenola dönüştürülür. Bu aktivitenin biyolojik önemi bir sonraki aşamada metil selenolün demetilasyon ile selenide dönüşmesidir. Selenyum L Metiyonin'in biyolojik önemi unregüle selenyum havuzunu oluşturmasıdır. Düşük Selenyum durumunda proteinlerin içindeki Selenyum L Metiyonin spesifik Selenyum havuzuna geçer (48).

Serbest selenyum, süperoksit dismutaz (SOD), tioredoksin redüktaz (TR), glutatyon peroksidazlar (GPx) ve diğerleri gibi antioksidan enzimlerin uyarılmasında anahtar rol oynayan bir aminoasit olan selenosisteinin gelişimi için de kullanılabilir (49). Bu

antioksidan enzimler tarafından serbest radikallerin nötralizasyonuna ek olarak, metioninin kendisi kükürt yoluyla ROS'u temizleyebilir ve ayrıca bir metal şelatör görevi görebilir (50). Selenyum L Metiyonin, radyasyondan koruyucu etkiler gösteren güçlü bir antioksidandır. Son yıllarda, hayvan modellerinde Selenyum L Metiyonin adlı radyoprotektif ajanın akciğer, kalp, kemik, hematopoietik, gastrointestinal sistem ve böbrek gibi birçok doku üzerinde radyoprotektif etkisi gösterilmiştir (51-53).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KİMYASALLAR VE CİHAZLAR

- Seleno-L-Methionine S3132-100mg Sigma Aldrich
- Anti-PCNA Antibody (F-2) Santa Cruz Sc-25280
- Rat Interleukin 6(IL-6) Elisa Kit Sunredbio 201-11-0136
- Rat Tumor Necrosis Factor (Tnf)Elisa Kit Sunredbio 201-11-0765
- Rat Transforming Growth Factor β (Tgf- β) Elisa Kit Sunredbio 2 201-11-0779
- Rat Catalase (Cat)Elisa Kit Sunredbio 201-11-5106
- Rat Super Oxidase Dimutase(Sod)Elisa Kit Sunredbio 201-11-0169
- Rat Malondialchehyche(Mda)Elisa Kit Sunredbio 201-11-0157
- Apoptag® Fluorescein In Situ Apoptosis Millipore Sigma S7110
- Lam Kutusu-50 Lam Kapasiteli-Plastik Kilitli-Mavi Isolab
- Entellan New For Microscopy-500 Ml Merck
- Antibody Diluent Op Quanto 125ml Lab Vision™ 1250 Test Thermo
- Lamel No:1, 24x50 Mm, 100'lük Menteşe Kapaklı Kutuda-100 Ad. Superior
- Paraformaldehyde Emprove-1 Kg Merck
- Normal Goat Serum Abcam
- Boncuk Parafin Paraplast Bulk Tissue Embedding Med Leica
- Mikrotom Bıçağı Cut- S35
- Lam Pozitif Şarjlı 90° 72'lik Beyaz Pcl – Leica

3.2. HAYVANLAR

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen 200-250 gr ağırlığında ergin 16-24 haftalık Wistar albino türü 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ ve 12 saatlik aydınlık-karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlanarak yetiştirildi. Sıçanlar standart laboratuvar yemiyle beslendi. Çalışma süresince herhangi bir yiyecek ve su kısıtlaması yapılmadı. Yetiştirilen sıçanların ağırlıkları ölçüldü ve her kafeste 5 adet sıçan olacak şekilde denekler rastgele 4 gruba ayrıldı.

3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Grup 1 Kontrol grubu, 10 Sıçan

Bu gruptaki hayvanlara hiçbir işlem yapılmadı ve hiçbir tedavi verilmedi, çalışmanın 7. gününde gruptaki sıçanlar işlem sonunda ksilazin (10 mg/kg canlı ağırlık intraperitoneal) ve ketamin (60 mg ketamin hidralklorür/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) genel anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi, doku örnekleri ve kanları biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmek üzere alındı.

Grup 2 Radyasyon (Rad) grubu, 10 Sıçan

Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın 2.gününde ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) intraperitoneal uygulanarak, 10 Gy radyoterapi verildi. Çalışmanın 7. gününde gruptaki sıçanlar işlem sonunda ksilazin (10 mg/kg canlı ağırlık intraperitoneal) ve ketamin (60 mg ketamin hidralklorür/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) genel anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi, doku örnekleri ve kanları biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmek üzere alındı.

Grup 3 Selenyum L Metiyonin (Sel) grubu, 10 Sıçan

Bu gruptaki hayvanlara Selenyum L Metiyonin, 0,8 mg/ml konsantrasyonda distile suda çözündürüldü ve toplam altı gün 4 mg/kg dozunda Selenyum L Metiyonin intraperitoneal enjeksiyon ile verildi. Çalışmanın 7. gününde gruptaki sıçanlar işlem

sonunda ksilazin (10 mg/kg canlı ağırlık intraperitoneal) ve ketamin (60 mg ketamin hidrakerlorür/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) genel anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi, doku örnekleri ve kanları biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmek üzere alındı.

Grup 4 Radyasyon (Rad) + Selenyum L Metiyonin (Sel) grubu, 10 Sıçan

Bu gruptaki hayvanlara Selenyum Metiyonin 0,8 mg/ml konsantrasyonda distile suda çözüldürüldü ve toplam altı gün 4 mg/kg dozunda Selenyum L Metiyonin intraperitoneal enjeksiyon ile verildi. Çalışmanın 2. Günü sıçanlara Selenyum Metiyonin intraperitoneal verildikten 30 dk sonra ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) intraperitoneal uygulanarak 10 Gy radyoterapi verildi. Çalışmanın 7. gününde gruptaki sıçanlar işlem sonunda ksilazin (10 mg/kg canlı ağırlık intraperitoneal) ve ketamin (60 mg ketamin hidrakerlorür/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) genel anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi, doku örnekleri ve kanları biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmek üzere alındı.

3.4. SELENYUM L METİYONİN UYGULAMASI

Sigma Aldrich (ABD) 'dan satın alınan Selenyum L Metiyonin tozu, distile suda 0,8 mg/ml'lik bir konsantrasyon ile çözüldü. Grup 3(Sel) ve Grup 4(Rad+Sel)'de her sıçana birinci günden başlanarak ardışık olarak altı gün boyunca, radyoterapiden bir gün önce ve sonraki dört gün boyunca 4 mg/kg Selenyum L Metiyonin içeren çözelti intraperitoneal (IP) enjekte edildi. Radyoterapi gününde sıçanlara 30 dk öncesinde Selenyum L Metiyonin intraperitoneal (IP) enjekte edildi. Selenyum L Metiyonin'in bu dozu toksik olmayan bir doz olarak önceki bir çalışmaya dayanarak seçilmişti ve Selenyum L Metiyonin bu dozunun normal şartlarda radyasyonun dokular üzerindeki zararlı etkilerini iyileştirici bir ajan olduğu vurgulanmıştır (53).

3.5. RADYOTERAPİ UYGULAMASI

Radyoterapi cihazı olarak, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkoloji Anabilim Dalı Radyoterapi bölümünde bulunan Varian marka, DHX model lineer hızlandırıcı cihazı kullanıldı. Deneyin ikinci günü Grup 2(Rad) ve Grup 4(Rad+Sel) deki sıçanlara 60mg/kg/ip ketamin ve 10mg/kg/i.p. ksilazin ile ağırlıklarına göre

anestezi uygulandı ve supin pozisyonunda radyoterapi düzeneği üzerine 5 sıçan yan yana ve bacakları yanlara açılarak, kuyrukları ve bacakları bant ile sabitlenerek yerleştirildi. Deneş hayvanlarının pelvik bölgesine 40×40 cm² alan büyüklüğü kullanarak, cilt kaynak mesafesi (SSD) 100cm, 6MV iyonize X-ışınları kullanılarak 10 Gy tek fraksiyon radyoterapi uygulaması yapıldı (Resim 3.5). Radyoterapi uygulamasının ardından sıçanlar kafeslere yerleştirildi.

Bu dozda radyasyon M.kanter ve ark. (54) daha önceki bir çalışmasına dayanıyordu.



(Şekil 3.5) Rad ve Rad+Sel grubu deneş hayvanlarının pelvik bölgesine 10 Gy radyoterapi uygulanması

3.6. DOKU ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Deneş süresince, tüm uygulamalar günün aynı saatinde ve intraperitoneal olarak yapıldı.

Her enjeksiyondan bir gün önce sıçanların ağırlıkları hesaplandı ve bu işlem deneş sonuna kadar devam etti. Çalışmanın 7.gününde tüm sıçanlara ksilazin (10 mg/kg canlı ağırlık intraperitoneal) ve ketamin (60 mg ketamin hidrasklorür/kg canlı ağırlık, intraperitoneal) ile genel anestezi sağlandıktan sonra deneklerin abdominopelvik bölgeleri açılarak testis dokuları eksize edildi. Çalışmada uygulanan tüm prosedürler etik kurallara uygun şekilde gerçekleştirildi.

3.7. HİSTOKİMYASAL TEKNİKLER

Histolojik incelemeler için deney hayvanlarından alınan testis dokuları %10'luk formaldehit solüsyonu ile tespit edildi. 72 saat tespit işleminden sonra dokular doku takibi aşamalarından geçirilerek parafin ile bloklandı (Tablo 3.7). Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Testis kesitlerinde Hematoksilen-Eozin (H&E) ve immunohistokimyasal (IHC) boyamalar yapıldı. Histolojik değerlendirmeler için boyanan testis kesitleri ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) kullanılarak incelendi ve fotoğraflandırıldı.

Tablo 3.7. Doku takibi aşamaları.

1	Musluk suyu	1 saat	7	Absolü Alkol	1 saat
2	%50 Alkol	1 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
3	%70 Alkol	1 saat	9	Ksilen	30 dakika
4	%80 Alkol	1 saat	10	Ksilen	30 dakika
5	%96 Alkol	1 saat	11	Ksilen	45 dakika
6	Absolü Alkol	1 saat	12	Eriyik parafin (60 °C)	1 Gece

3.7.1. Hematoksilen&Eozin Boyama (H&E)

5 µm kalınlığında alınan testis kesitlerinde genel doku morfolojisinin histolojik incelemesi için H&E boyama tekniği kullanıldı. Alınan doku kesitleri deparafinizasyon işlemi için 67°C'lik etüvde 1 gece bekletildi ve ardından ksilene alındı. İlk olarak ksilen, devamında azalan etil alkol serisinden geçirilen kesitler H&E ile boyandı. Boyama işlemleri ardından yıkanan dokular tablo 3.7.1'de verildiği gibi sırasıyla artan etil alkol serisinden geçirildi ve ksilende 2 saat süre bekletildi. Son olarak entellan ile kapatılan preparatlar Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus Inc., Tokyo, Japonya) kullanılarak görüntülendi.

Tablo 3.7.1. Hematoksilen&Eozin boyama aşamaları

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (67 °C)	1 gece	14	Eozin	3-5 dk
2	Ksilen I	10 dk	15	Akarsu	1 dk
3	Ksilen II	10 dk	16	%50 Alkol	1 dk
4	Ksilen III	10 dk	17	%70 Alkol	1 dk
5	Absolu Alkol I	5 dk	18	%80 Alkol	1 dk
6	Absolu Alkol II	5 dk	19	%96 Alkol	1 dk
7	%96 Alkol	5 dk	20	Absolu Alkol I	1 dk
8	%80 Alkol	5 dk	21	Absolu Alkol II	2 dk
9	%70 Alkol	5 dk	22	Absolu Alkol III	2 dk
10	%50 Alkol	5 dk	23	Ksilen I	20 dk
11	Akarsu	2 dk	24	Ksilen II	20 dk
12	Hematoksilen	5-8 dk	25	Ksilen III	20 dk
13	Akarsu	5 dk	26	Kapatma	

3.7.2. Seminifer tübül çaplarının ölçümü

Deney gruplarında seminifer tübül çaplarını değerlendirmek için x200 büyütmede H&E ile boyanmış kesitler kullanıldı. Hasarın bir göstergesi olarak *Imagej software* yazılım programı (*Imagej, Bethesda, MD*) kullanılarak her sıçan için 10 farklı bölgede mikrometre cinsinden, ortalama seminifer tübül çapı (MSTD) ölçüldü (55).

3.7.3. Germ Hücrelerinin Kantitatif Değerlendirilmesi;

Spermatogenez derecesi subjektif bir değerlendirmedir. Çeşitli yöntemlerle hesaplanabilir ve semen analizindeki sperm sayısı ile iyi korelasyon gösterir. Bu amaçla çeşitli otörler tarafından aşağıdaki skorlama sistemleri geliştirilmiştir.

3.7.3.1. Johnsen Skoru, 1970 (Johnsen SG, 1970)

Bugün için rutin uygulamada en yaygın kullanılan skorlama sistemidir. H&E ile boyanmış kesitler kullanılarak, her hayvan için 30 tübül derecelendirildi ve her bir tübül testiküler seminifer tübüllerde spermatogonia, spermatozoid, spermatidler,

spermatozoa gibi germ hücre tiplerinin varlığına veya yokluğuna göre 1'den 10'a kadar bir puan verildi. Bu skorlamaya göre, daha yüksek bir Johnsen skoru daha iyi bir spermatogenez durumunu gösterirken, daha düşük bir skor daha şiddetli disfonksiyona işaret etmektedir. Her bir tübüler bölüme, aşağıda açıklandığı gibi olgunluk sırasına göre düzenlenmiş ana hücre tiplerinin varlığına veya yokluğuna göre 10'dan 1'e kadar bir puan verildi. Skor 1, tam hareketsizliğe sahip tübüller için epitelyal olgunlaşmanın düşünülmediği anlamına gelirken, Skor 10, maksimum aktiviteye sahip tübüller için tam epitelyal olgunlaşmanın dikkate alındığı anlamına gelmektedir (56).

10: Germinal epitel çok sıralı, çok sayıda spermatozoa var

9: Germinal epitel disorganize ve lümene doğru yığılma, spermatozoa var

8: Germinal epitel çok sıralı ancak lümeninde 10'dan az spermatozoa var

7: Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid var

6: Spermatozoa yok, spermatid 10'dan az

5: Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit var

4: Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit 5'ten az

3: Germ hücre olarak sadece spermatogonia var

2: Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi var

1: Seminifer tubulus içinde hiç hücre yok

3.7.3.2. Epididim Sperm Konsantrasyonu Ölçümü:

Epididimal sperm içeren süpernatanttan 10 μ L, paraformaldehit ve sodyum sitrat çözeltisinde bulunan 990 μ L'lik bir çözeltiyle seyreltildi. Yaklaşık 10 μ L'lik seyreltilmiş içerik bir hematositometreye (Neubauer odası) aktarıldı ve bu odada ışık mikroskopunda 400x büyütme ile incelendi. Pellet haline gelmiş hücreler odanın yüzeyinde sayıldı. Sperm konsantrasyonunun hesaplanması, sayılan hücrelerin ve hematositometre boyutlarının kullanılarak yapıldı ve sonuç, 10^6 sperm/mL cinsinden ifade edildi (57).

3.7.3.3. Epididim Sperm Morfolojisi Analizi:

Sperm morfolojisinin analizi için yaklaşık 20 µL sperm süspansiyonundan bir damla, mikroskop slaytlarına yerleştirilip yayıldı. Slaytlar kurutuldu ve eosin-nigrosin (1% eosin Y ve 5% nigrozine) ile boyandı. Kuruduktan sonra, slaytlar optik mikroskop (CX31, Olympus Optical of Brazil Ltda, São Paulo, Brezilya) ile 400x büyütmede incelendi. Her slayt başına 200 spermatozoon için farklılaştırılmış sayım yapıldı ve baş, orta kısım ve kuyrukta gözlemlenen değişiklikler not edildi. Sonuçlar, normal hücrelerin yüzdesi olarak ifade edildi (57).

3.7.4. İmmunohistokimya Boyama (IHC)

İmmunohistokimyasal boyama yönteminde 4 deney grubuna ait dokulardan polizin kaplı lamlara kesitler alınarak 6 farklı antikora karşı immün boyama yapıldı. Tüm antikolar için ortak IHC boyama kiti kullanıldı (UltraVision Detection System, Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU), LOT: PHLS790). Polizin kaplı lamlardaki testis kesitleri deparafinizasyon işlemi için 1 gece süre ile 67 °C'lik etüvde bekletildi. Ardından azalan alkol serisinden (absolü alkol, %96, %80, %70) geçirilen kesitler distile su (dH₂O) ile 2 defa 3'er dakika yıkayıp 12 dk %30'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edildi. Kesitler yıkama aşaması için PBS (Phosphat buffer saline)'e alındı ve 3 defa 5'er dakika yıkandı. Bir sonraki basamak için 1X konsantrasyon sitrat buffer içerisinde kesitler 10 dakika 350 °C mikrodalgada kaynatılıp, 10 dakika soğutuldu. Bu adım 2 kez tekrar edildi. Soğutma işleminin ardından kesitler tekrar PBS ile yıkandı. Yıkama dokulara kit içerisinde yer alan Ultra-V blok ile 10 dakika muamele edildi. 10 dakika sonunda kesitlere belirlenen antikolar tabloda verilen oranlarda antibadi dilüent solüsyonu (Antibody Diluent Reagent Solution, Ref: 003118) ile seyreltilerek uygulandı. (Tablo 3.7.4)

Tablo 3.7.4. Testis kesitlerine IHC yönteminde uygulanan antikorlar ve oranları

Antikor	Marka ve Kod	Oran
mTOR	cell signaling, mTOR(7C10), 2983S	1:100
PCNA	Bioss, bs-0754R	1:300
StAR	Bioss bs-3570R	1:600
MMP9	Bioss bs-4593R	1:400
Hsp70	Bioss, bs-0126R	1:500
Connexin43	elabscience lot: DQ0304	1:500

Antikor uygulanan kesitler 1 gece boyunca +4 °C’de bekletildi. +4 °C’den alınan kesitler öncelikle 45 dakika oda koşullarında bekletildi ve kesitlerin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Sonrasında kesitlere 10 dakika biotin (Biotinylated goat anti-polyvalent) ile muamele edildi. Ardından yıkanan kesitler sekonder antikor (streptavidin peroxidase) aşamasına alındı. Daha sonra, 10 dakika sekonder antikorda bekletildi ve 2 kez 5’er dk PBS ile yıkandı. Tüm kesitler DAB (Ultravision Detection System, Large Volume DAB Substrate System, LOT: HD36) ile 5 dakika muamele edildikten sonra, Gill hematoksilen (Hematoxylin Solution Gill III, SIGMA-ALDRICH, GHS332) ile 5 dakika zıt boyama yapıldı. Son olarak artan alkol serilerinden (%70, %80, %96, %100) geçirilen kesitler 30 dk ksilende bekletildi ve entellan ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX51 ışık mikroskobu kullanılarak görüntülendi. Boyama alanlarından ölçüm yapmak için her dokudan 40X objektifte rastgele beş farklı alandan fotoğraflar çekildi. Elde edilen mikroskopik fotoğraflardan immunreaktivite yoğunluğunun ölçümü Image J software programı kullanılarak yapıldı. Tüm veriler her antikor için ayrı olacak şekilde ölçüldü ve gruplararası karşılaştırma yapıldı (55).

3.8. ELISA METODU

3.8.1. Testis Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Biyokimyasal analizler için alınan testis dokularından homojenat hazırlamak için yaş ağırlıklar tartıldı ve soğukluğu muhafaza edilerek ependorf tüplere aktarıldı. Dokulara

fosfat tamponu (pH: 7,4) eklendi ve homojenizatörle 1000 rpm 'de homojenize edildi. Doku homojenatları 15000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) metodu kullanılarak Katalaz (CAT), Malondialdehit (MDA), Süperoksit dismutaz (SOD), Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), İnterlökin 6 (IL6) ve Transforme edici büyüme faktör-beta (TGF- β 1) analizleri için ayrıldı.

3.8.1.1.Katalaz (CAT)

Bostonchem marka ticari kiti kullanılarak çalışıldı (Rat CAT ELISA Kit Catalog no: BLS-5986Ra). Kit içerisinde çıkan 96'lık plate içindeki her bir kuyucuğa 100 μ l standart ve 100 μ l örnekler yüklendi ve 80 dakika 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Standartlar dahil bütün örneklerin üzerine 100 μ l Biotin-(CAT) Ab eklendi ve 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Bütün örneklerin üzerine 100 μ l HRP konjugete eklenerek 50 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Etüvde bekletilen plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı. 90 μ l TMB substrat eklendi ve tekrar 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Son olarak 50 μ l stop solution eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Thermo scientific (ABD) marka Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu.

3.8.1.2. Malondialdehit (MDA)

Bostonchem marka ticari kiti kullanılarak çalışıldı (Rat MDA ELISA Kit Catalog no: BLS-8612Ra). Kit içerisinde çıkan 96'lık plate içindeki her bir kuyucuğa 50 μ l standart, 50 μ l örnekler yüklendi ve 50 μ l Biotin-(MDA) Ab eklenerek 60 dakika 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Bütün örneklerin üzerine 100 μ l HRP konjugete eklenerek 60 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Etüvde bekletilen plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı. 90 μ l TMB substrat eklendi ve tekrar 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Son olarak 50 μ l stop

solution eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Thermo scientific (ABD) marka Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu.

3.8.1.3. Süperoksit dismutaz (SOD)

Bostonchem marka ticari kiti kullanılarak çalışıldı (Rat SOD ELISA Kit Catalog no: BLS-8178Ra). Kit içerisinde çıkan 96'lık plate içindeki her bir kuyucuğa 100 µl standart ve 100 µl örnekler yüklendi ve 80 dakika 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Standartlar dahil bütün örneklerin üzerine 100 µl Biotin-(SOD) Ab eklendi ve 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Bütün örneklerin üzerine 100 µl HRP konjugete eklenerek 50 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Etüvde bekletilen plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı. 90 µl TMB substrat eklendi ve tekrar 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Son olarak 50 µl stop solution eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Thermo scientific (ABD) marka Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu.

3.8.1.4. Transforme edici büyüme faktör-beta (TGF-β1)

Bostonchem marka ticari kiti kullanılarak çalışıldı (Rat TGF-β1 ELISA Kit Catalog no: BLS-2311Ra). Kit içerisinde çıkan 96'lık plate içindeki her bir kuyucuğa 100 µl standart ve 100 µl örnekler yüklendi ve 80 dakika 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Standartlar dahil bütün örneklerin üzerine 100 µl Biotin-(TGF-β1) Ab eklendi ve 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Bütün örneklerin üzerine 100 µl HRP konjugete eklenerek 50 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Etüvde bekletilen plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı. 90 µl TMB substrat eklendi ve tekrar 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Son olarak 50 µl stop solution eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Thermo scientific (ABD) marka Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu.

3.8.1.5. İnterlökin (IL6)

Bostonchem marka ticari kiti kullanılarak çalışıldı (Rat IL6 ELISA Kit Catalog no: BLS-1158Ra). Kit içerisinden çıkan 96'lık plate içindeki her bir kuyucuğa 100 µl standart ve 100 µl örnekler yüklendi ve 80 dakika 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Standartlar dahil bütün örneklerin üzerine 100 µl Biotin-(IL6) Ab eklendi ve 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Bütün örneklerin üzerine 100 µl HRP konjugete eklenerek 50 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Etüvde bekletilen plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı. 90 µl TMB substrat eklendi ve tekrar 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Son olarak 50 µl stop solution eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Thermo scientific (ABD) marka Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu.

3.8.1.6. Tümör nekroz faktör alfa (TNF-α)

Bostonchem marka ticari kiti kullanılarak çalışıldı (Rat TNF-α ELISA Kit Catalog no: BLS-1396Ra). Kit içerisinden çıkan 96'lık plate içindeki her bir kuyucuğa 100 µl standart ve 100 µl örnekler yüklendi ve 80 dakika 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Standartlar dahil bütün örneklerin üzerine 100 µl Biotin-(TNF-α) Ab eklendi ve 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Bütün örneklerin üzerine 100 µl HRP konjugete eklenerek 50 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Etüvde bekletilen plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı. 90 µl TMB substrat eklendi ve tekrar 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Son olarak 50 µl stop solution eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Thermo scientific (ABD) marka Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin analizi konusunda; Tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart sapma, değerleri ile verilmiştir. Çalışmada eliza ölçümlerindeki sayısının yüksek olmaması ve ölçümlerinin normallik varsayımlarını gerçekleştirmediği ve dağılımların parametrik olmadığından dolayı parametrik olmayan testler kullanılmıştır (K-S $p < 0,05$). Çalışma gruplarına göre ölçümlerin incelenmesi için *Kruskall Wallis* testi yapılmıştır. Farklılık yaratan grupların belirlenmesinde ise *Mann Whitney U* testi *bonfferoni* düzeltmesi yapılarak uygulanmıştır. Elisa sonuçlarında grafik gösterimlerinde Medyan değerleri baz alınmıştır. Diğer antikör düzeylerine göre çalışma gruplarında veri sayısının yüksek ve ölçümlerinin dağılımının normal dağılıma uyması nedeni ile normallik gösteren testler yapılmıştır (K-S $p < 0,05$). Çalışmada antikör düzeylerindeki gruplar arasındaki ölçümler için Varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Grup içi kıyaslamalardaki ise Tekrarlı varyans analizi (Faktöriyel ANOVA) testi yapılmıştır. Her iki analizde de farklı olan grupların belirlenmesinde Sidak ikili kıyaslama testi uygulanmıştır. Bu ölçümlerin grafiksel gösterimlerinde ise ortalama değerlere yer verilmiştir.

3.9.1. Kısaltmalar ve açıklamalar

n: Örneklem/gruptaki örneklem sayısı

%: Yüzde

X: Ortalama (aritmetik ortalama) $X \pm s.s.$ şeklinde verilir.

s.s.: Standart sapma (ortalamanın değişim aralığı)

μ : Medyan değeri, Medyan (ortanca) değeri parametrik olmayan testlerde tabloda verilmesi istenebilir.

Max-Min: En küçük ve en büyük değer

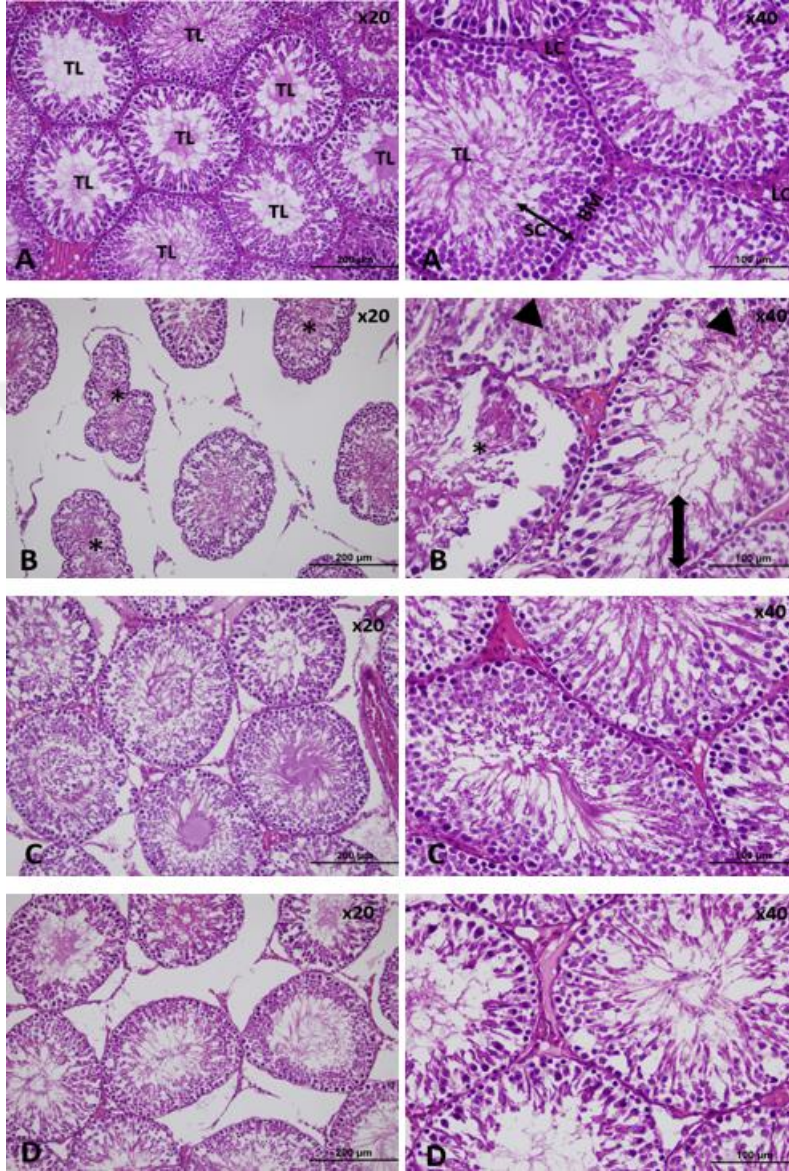
p: Anlamlılık düzeyi (p değeri 0,05 altında ise anlamlı ilişki var demektir. $P > 0,05$ durumunda ise anlamlı farklılık yok demektir. Tabloda p değeri üzerinde * işareti anlamlı farklılığı gösterir).

4. BULGULAR

4.1. HİSTOLOJİK ANALİZ

Kontrol grubundan alınan kesitlerde, ince bir bazal lamina ile çevrelenmiş seminifer tübüllerde spermatogonyum, primer ve sekonder spermatozoidler ile seminifer tübüllerdeki spermatidler dahil olmak üzere Radyasyon uygulanan gruplara göre daha fazla spermatojenik hücre içermekteydi. Kontrol kesitlerinde, sertoli hücreleri ve spermatogonyum hücrelerinden oluşan çok tabakalı bir epitel her bir tübül yapısında düzgün görünümündü. Küçük, koyu renkli boyanmış çekirdekleri ile spermatogonyum hücreleri bazal lamina üzerinde bulunuyordu. Primer spermatozoidler hemen bu hücrelerin üstünde büyük yuvarlak çekirdekleri ile ayırt ediliyordu. Spermatidler lümeneye yakın yerleşim göstermekteydi, seminifer tübül lümeninin içinde ise yoğun sperm hücreleri bulunmaktaydı. Spermatojenik hücre dizileri arasında Sertoli hücre yapısı, soluk sitoplazmalı ve görünür bazal, oval, soluk çekirdekleri ile ayırt edilebiliyordu. Leydig (interstisyel) hücreleri seminifer tübüller arasındaki interstisyel alanda tek tek ya da gruplar halinde yerleşmiş, asidofilik sitoplazmaya sahip, soluk yuvarlak çekirdekli hücreler olarak ayırt edildi. Genel olarak Kontrol grubu ve sadece Sel uygulanan gruplarda, düzenli seminifer tübül morfolojisine sahip normal testis histolojisi ve çeşitli farklılaşma seviyelerinde normal polariteye sahip spermatojenik hücreler gözlemlendi. Radyasyon uygulanan gruplara ait testis dokularında, deforme olmuş anormal seminifer tübül yapıları yanı sıra, germinal hücre miktarında azalma ve lümeneye dökülmüş tübül epitel hücreleri gibi patolojik bulgular ile testislerin histolojik mimarisi bozulmuştu. Rad+Sel ile Rad grubu karşılaştırıldığında, Rad+Sel grubunda tübüller epitelyumda daha az atrofik ve dejeneratif değişiklikler vardı. Bu deney grubunda, seminifer tübül lümeninde aktif spermatogenezin iyi bir şekilde

korunduğunu ve lümenlerinde çok sayıda spermin ve normal olarak organize olmuş spermatogonyal hücre katmanlarının varlığını gösterdi. Ayrıca, interstisyel doku normal yapıdaki kan damarlarını içeriyordu. (Şekil 4.1)



Şekil 4.1: Tüm deney gruplarında H&E ile boyanmış testis dokusu kesitlerinin ışık mikyografaları. (A) kontrol sıçanlarında normal seminifer tübül morfoloji; (B) radyoterapi sıçanlarında hasarlı testis yapısı (Rad grubu B'de, deforme olmuş seminifer tübül yapıları bir yıldız işaretiyle işaretlenmiştir, kalın ok düzensiz seminifer tübül epitelinin gösterir ve üçgen lümenine dökülen epitel hücrelerini gösterir); (C) Selenyum L Metiyonin (Sel) ile tedavi edilen sıçanlarda normal testis yapısı; (D) Rad grubuna kıyasla Rad+Sel grubu (radyoterapi alan ve Selenyum-L-Metiyonin ile tedavi edilen) sıçanlarında daha az atrofi ve dejeneratif değişikliklerle, normale yakın seminifer tübül morfolojisi. (Orijinal büyütme x20 ve x40). A) Kontrol grubu, B) Rad grubu, C) Sel grubu, D) Rad+Sel grubu, TL: Tübül Lümen, BM: Bazal membran, SC: spermatojenik hücre, LC: Leydig hücresi, H&E: Hematoksilen&Eozin

4.2. MORFOMETRİK BULGULAR

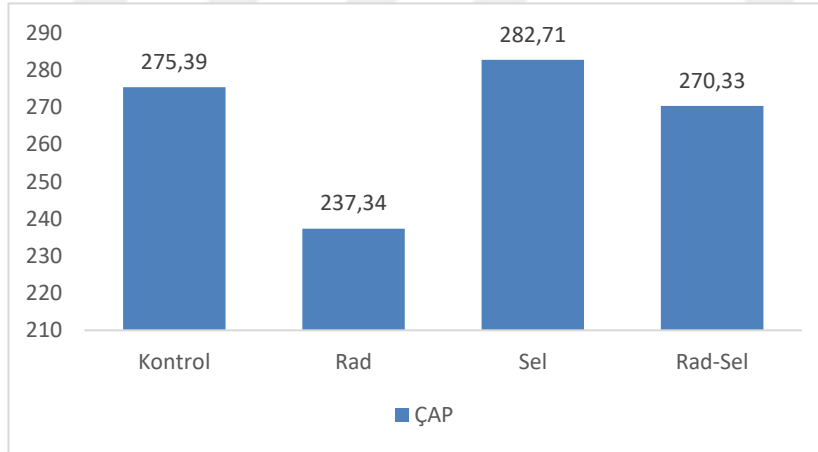
4.2.1. Seminifer Tübül Çapına Ait Bulgular

Seminifer tübül çap ölçümlerinin çalışma gruplarına göre anlamlı seviyede farklı olduğu tespit edilmiştir($p=0,01$). Rad grubunun seminifer tübül çap ölçümlerinin Kontrol, Sel ve Rad+Sel gruplarına göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu görülmüştür($p=0,01$). Sonuçlar Tablo 4.2.1 ve Şekil 4.2.1 de gösterilmiştir.

Tablo 4.2.1. Seminifer Tübül Çap Ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması

	Kontrol ¹	Rad ²	Sel ³	Rad+Sel ⁴	p	Fark
	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.		
Seminifer Tübül Çap	275,39±35,9	237,34±32,32	282,71±33,41	270,33±27,54	0,01*	2<1,3,4

**Varyans analizi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.2.1. Seminifer Tübül Çap ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması

4.2.2. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruna (JTBS) Ait Bulgular

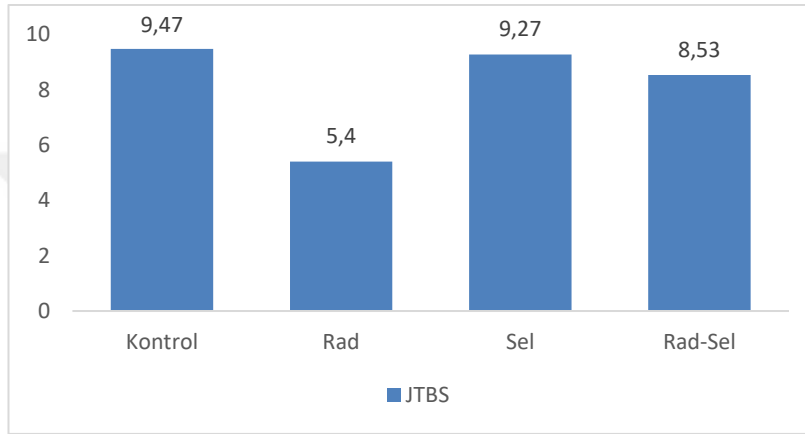
Deney gruplarına ait testis hasar değerlendirme JTBS ile hesaplandı. JTBS ölçümlerinin çalışma gruplarına göre anlamlı seviyede farklı olduğu tespit edilmiştir($p=0,01$). Rad grubunun JTBS ölçümlerinin kontrol, Sel ve Rad+Sel

gruplarına göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu görülmüştür(p=0,01). Sonuçlar Tablo 4.2.2 ve Şekil 4.2.2 de gösterilmiştir.

Tablo 4.2.2. JTBS ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması

	Kontrol ¹	Rad ²	Sel ³	Rad+Sel ⁴	p	Fark
	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.		
JTBS	9,47±0,68	5,4±1	9,27±0,78	8,53±1,07	0,01*	2<1,3,4

**Varyans analizi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.2.2. JTBS ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması

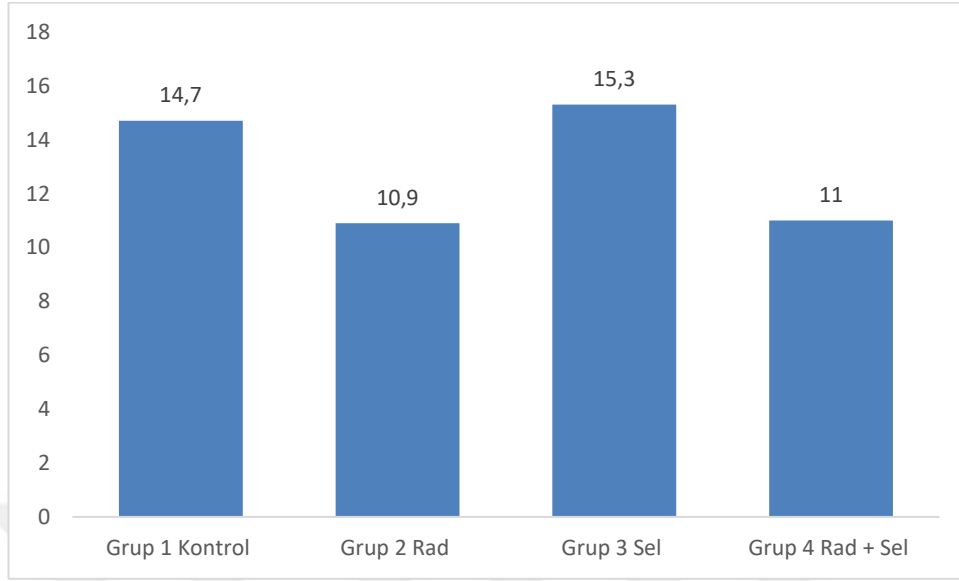
4.2.3. Epididim Sperm Konsantrasyonu Ölçümü:

Sperm epididim konsantrasyon ölçümlerinin çalışma gruplarına göre farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Kontrol, Rad, Sel ve Rad+Sel grubunun epididim sperm konsantrasyon ölçümlerinin anlamlı şekilde farklı olmadığı görülmüştür (p=0,16). Sonuçlar Tablo 4.2.3 ve Şekil 4.2.3 de gösterilmiştir.

Tablo 4.2.3: Epididim Sperm konsantrasyon ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması

Ölçüm	Grup	X±s.s.	μ	Max-Min	p
Epididim Sperm konsantrasyon	Kontrol ¹	14,7±3,13	15,00	8-18	0,16
	Rad ²	10,9±5,76	14,50	10-20	
	Sel ³	15,3±3,37	12,50	1-17	
	Rad+Sel ⁴	11±5,68	13,00	1-17	

** Kruskall Wallis testi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.2.3: Epididim Sperm konsantrasyon ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması

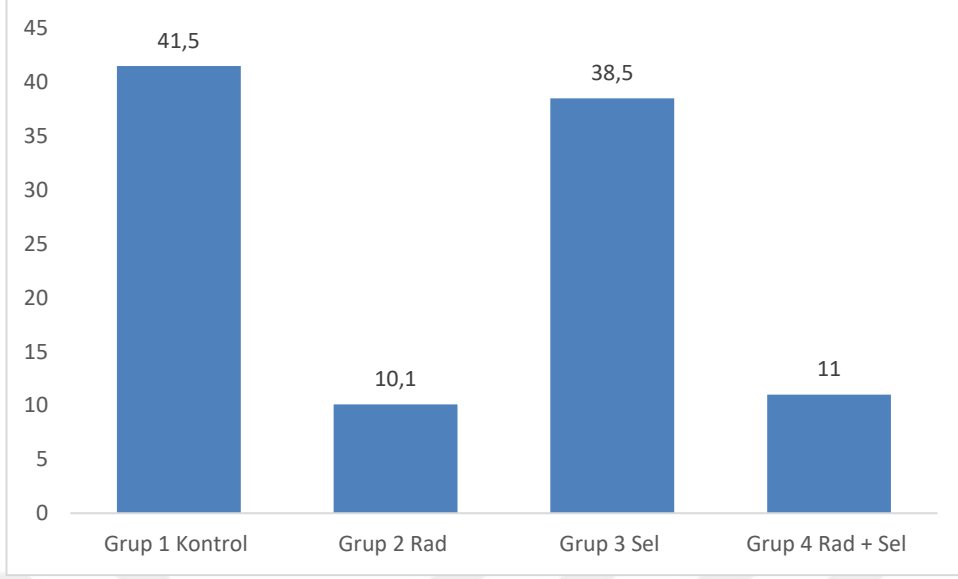
4.2.4. Epididim Sperm Morfolojisi Analizi

Çalışmada epididim sperm motilite grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p=0,01$). Çalışmada Kontrol ve Sel grubunun epididim sperm motilite ölçümlerinin Rad+Sel ve Rad gruplarına göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,01$). Sonuçlar Tablo 4.2.4 ve Şekil 4.2.4 de gösterilmiştir.

Tablo 4.2.4: Epididim Sperm Motilite ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması

Ölçüm	Grup	X±s.s.	μ	Max-Min	p	Fark
Epididim Sperm Motilite	Kontrol ¹	41,5±12,7	42,50	20-60	0,01*	4,2<3,1
	Rad ²	10,1±16,93	30,00	20-95		
	Sel ³	38,5±24,5	5,00	0-50		
	Rad+Sel ⁴	11±18,23	5,00	0-40		

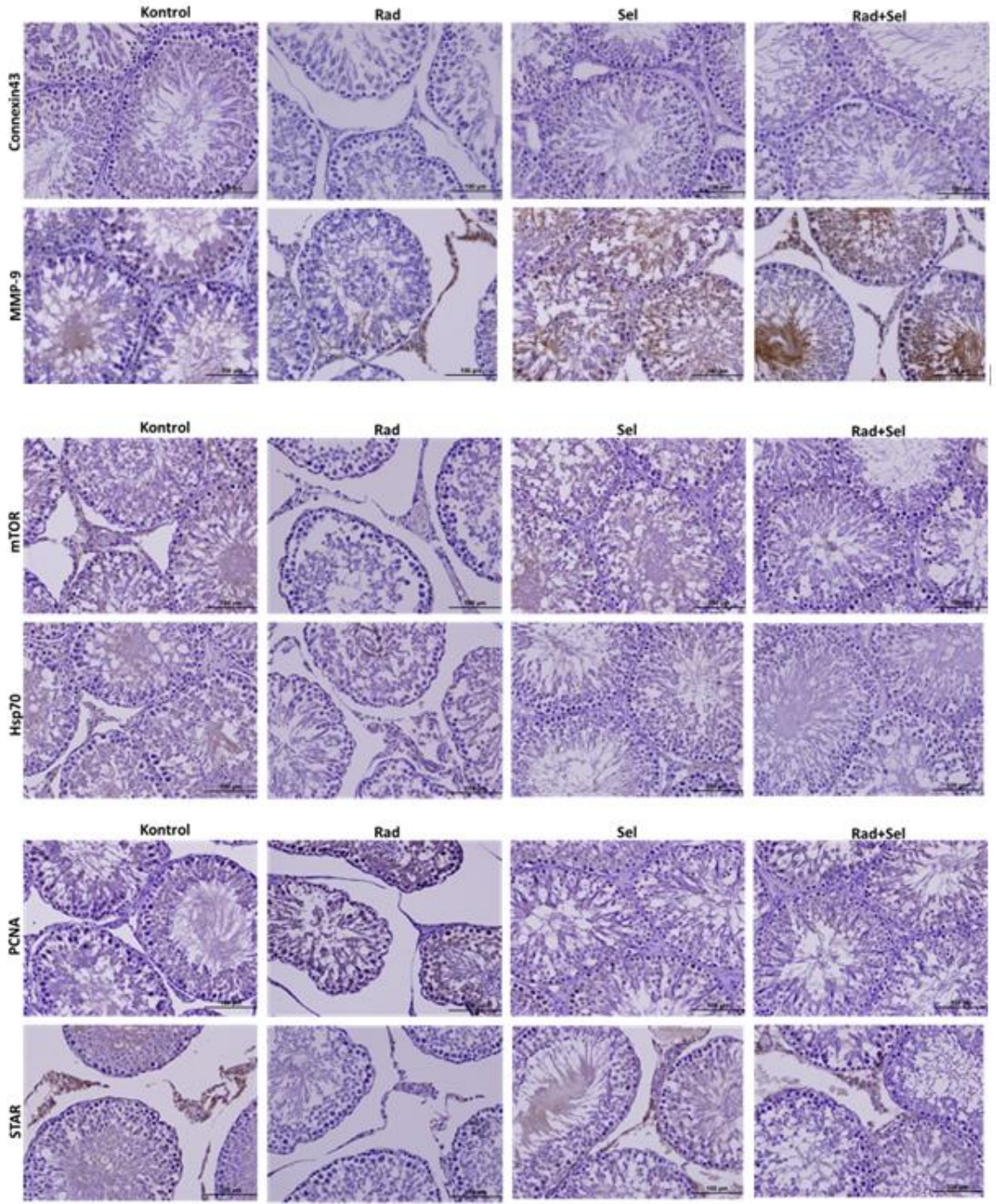
** Kruskall Wallis testi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.2.4: Epididim Sperm Motilite ölçümlerinin Gruplar Arasındaki Kıyaslaması

4.3. MMP9, CONNEXİN43, mTOR, HSP70, PCNA VE StAR PROTEİN İFADELERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYA (IHC) ANALİZ PROSEDÜRÜ

Çalışmada, radyoterapinin farklı belirteçler üzerindeki etkilerini belirlemek için immünohistokimya yöntemini kullanıldı. Tüm deney gruplarının testis dokusu kesitlerinde bölünmüş MMP9, Connexin43, mTOR, Hsp70, PCNA ve StAR antikorları ile boyanmış kesitlerin immünoreaktivitesini gösteren mikrograflar Şekil 4.3 'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3: Tüm deney gruplarının testis dokusu kesitlerinde bölünmüş MMP9, Connexin43, mTOR, Hsp70, PCNA ve StAR'n immünoreaktivitesini gösteren mikrograflar. (Orijinal büyütme x40)

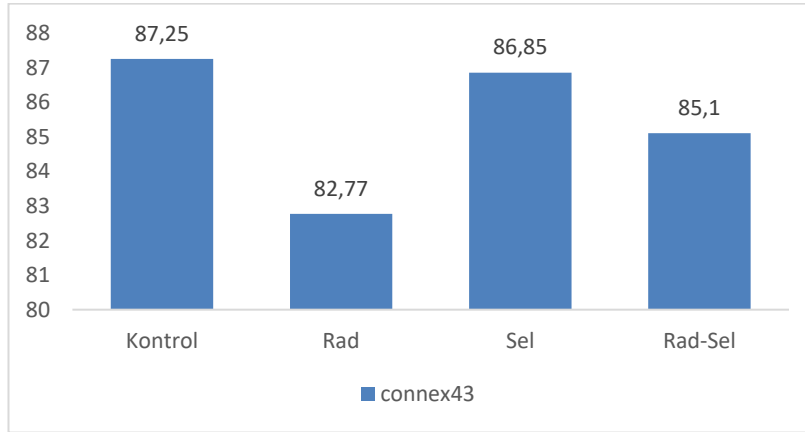
4.3.1. Connexin43 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

Connexin43 antikor düzeyinde grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir($p=0,01$). Rad grubunun Connexin43 antikorlarındaki ölçümlerinin kontrol, Sel ve Rad+Sel gruplarına göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu görülmüştür($p=0,01$). Sonuçlar Tablo 4.3.1 ve Şekil 4.3.1 de gösterilmiştir.

Tablo 4.3.1: Connexin43 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

Antikor	Kontrol ¹	Rad ²	Sel ³	Rad+Sel ⁴	p	Fark
	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.		
Connexin43	87,25±3,1	82,77±3,46	86,85±2,57	85,1±2,54	0,01*	2<1,3,4

**Varyans analizi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.3.1: Connexin43 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

4.3.2. MMP9 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

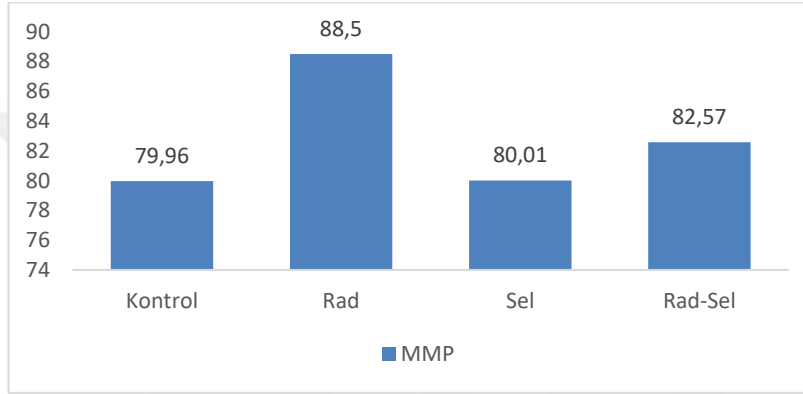
MMP9 antikor düzeyinde grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir($p=0,01$). Rad grubunun MMP9 antikorlarındaki ölçümlerinin kontrol,

Sel ve Rad+Sel gruplarına göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür(p=0,01). Sonuçlar Tablo 4.3.2 ve Şekil 4.3.2 de gösterilmiştir.

Tablo 4.3.2: MMP9 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

Antikor	Kontrol ¹	Rad ²	Sel ³	Rad+Sel ⁴	p	Fark
	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.		
MMP9	79,96±3,93	88,5±5,62	80,01±4,89	82,57±3,41	0,01*	2>1,3,4

**Varyans analizi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.3.2: MMP9 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

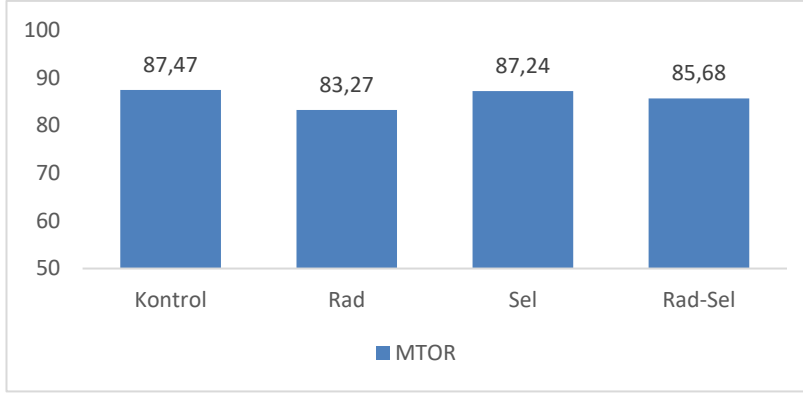
4.3.3. mTOR Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

mTOR antikor düzeyinde grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık göstermediği tespit edilmiştir (p=0,12). mTOR antikorlarındaki ölçümlerinin kontrol, Rad, Sel ve Rad+Sel gruplarındaki ölçümleri farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3.3 ve Şekil 4.3.3 de gösterilmiştir.

Tablo 4.3.3: mTOR Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

	Kontrol ¹	Rad ²	Sel ³	Rad+Sel ⁴	p	Fark
	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.		
mTOR	87,47±2,12	83,27±3,25	87,24±2,48	85,68±1,83	0,12	-

**Varyans analizi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.3.3: mTOR Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

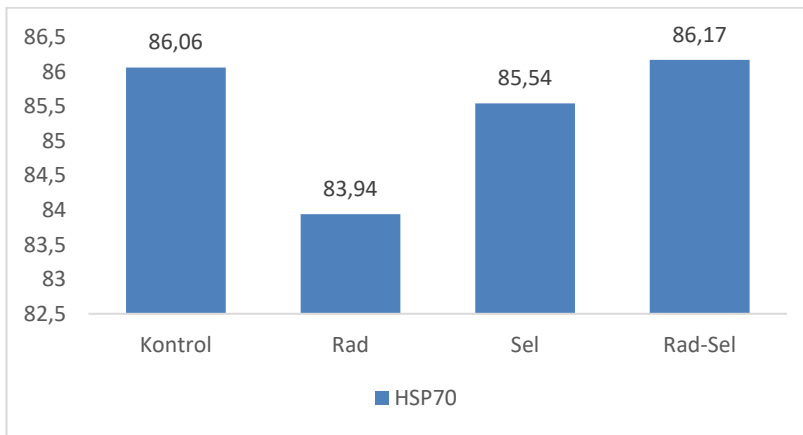
4.3.4. HSP70 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

HSP70 antikor düzeyinde grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p=0,01$). Rad grubunun HSP70 antikorlarındaki ölçümlerinin kontrol, Sel ve Rad+Sel gruplarına göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu görülmüştür ($p=0,01$). Sonuçlar Tablo 4.3.4 ve Şekil 4.3.4 de gösterilmiştir.

Tablo 4.3.4: HSP70 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

	Kontrol¹	Rad²	Sel³	Rad+Sel⁴	p	Fark
	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.		
HSP70	86,06±5,7	83,94±5,74	85,54±3,4	86,17±2,55	0,02*	2<1,3,4

**Varyans analizi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.3.4: HSP70 Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

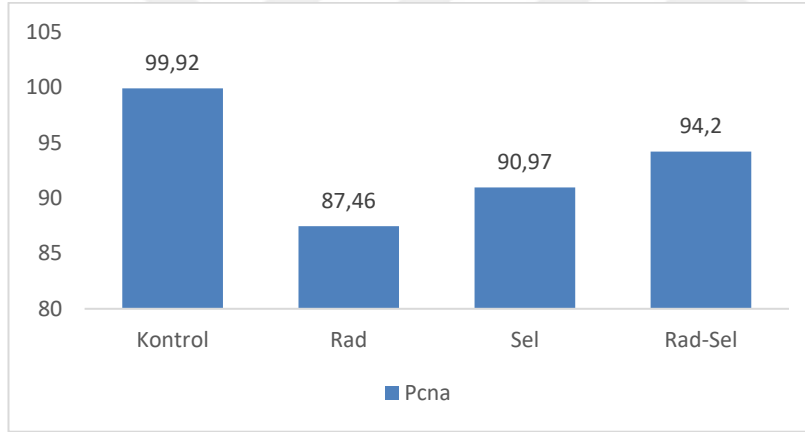
4.3.5. PCNA Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

PCNA antikor düzeyinde grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir(p=0,01). Kontrol grubunun PCNA antikorlarındaki ölçümlerinin Rad, Sel gruplarına göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür(p=0,01). Sonuçlar Tablo 4.3.5 ve Şekil 4.3.5 de gösterilmiştir.

Tablo 4.3.5: PCNA Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

	Kontrol¹	Rad²	Sel³	Rad+Sel⁴	p	Fark
	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.		
PCNA	99,92±10,83	87,46±8,24	90,97±5,92	94,2±13,01	0,01*	1>2,3

**Varyans analizi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.3.5: PCNA Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

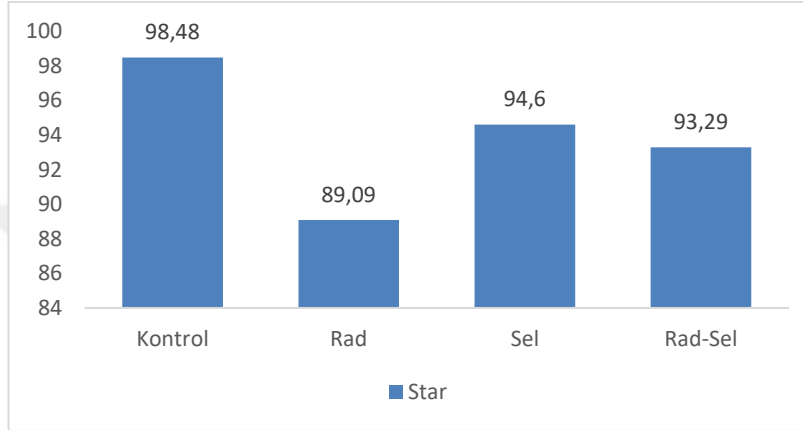
4.3.6. StAR Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

StAR antikor düzeyinde grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir(p=0,01). Kontrol grubunun StAR antikorlarındaki ölçümlerinin sadece Rad grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür(p=0,03). Sonuçlar Tablo 4.3.6 ve Şekil 4.3.6 de gösterilmiştir.

Tablo 4.3.6: StAR Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

	Kontrol ¹	Rad ²	Sel ³	Rad+Sel ⁴	p	Fark
	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.	X±s.s.		
StAR	98,48±5,49	89,09±10,26	94,6±7,87	93,29±6,93	0,03*	1>2

**Varyans analizi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.3.6: StAR Antikorundaki Gruplar Arasındaki Kıyaslama

4.4. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERE AİT BULGULAR

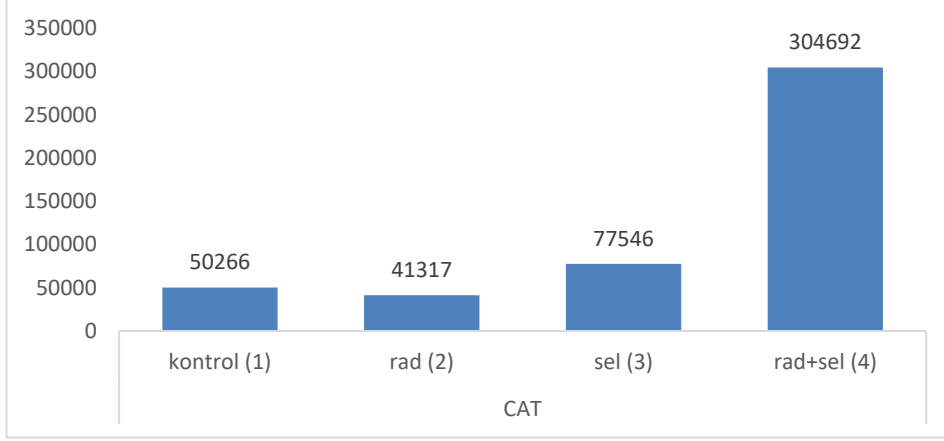
4.4.1. CAT düzeyinde grupların kıyaslanması

Çalışmada CAT kiti ile yapılan Elisa testi sonuçlarına göre yapılan biyokimyasal ölçümlerde grupların istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür (p=0,01). Çalışmada Rad+Sel grubunun CAT ölçümlerinin kontrol, Rad ve Sel gruplarında anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür(p=0,01). Sonuçlar Tablo 4.4.1 ve Şekil 4.4.1.1 de gösterilmiştir. Şekil 4.4.1.2 de ise CAT konsantrasyonu ng/ml gösterilmiştir.

Tablo 4.4.1: CAT düzeyinde grupların kıyaslanması

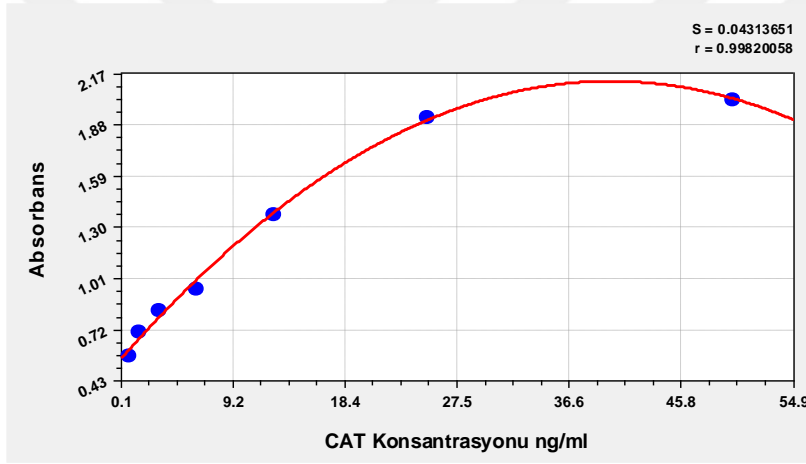
KİT	Grup	X±s.s.	μ	Max-Min	p	Fark
CAT	Kontrol (1)	47682,4±4781,32	50266	51301-40268	0,01*	4>3,2,1
	Rad (2)	78162,6±89380,27	41317	237871-33569		
	Sel (3)	184288,2±199776,77	77546	514793-41612		
	Rad+Sel (4)	273157,6±215454,08	304692	516771-46699		

** Kruskall Wallis testi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.4.1.1: CAT düzeyinde grupların kıyaslanması

*Medyan (μ) değerine göre alınmıştır



Şekil 4.4.1.2: CAT konsantrasyonu ng/ml

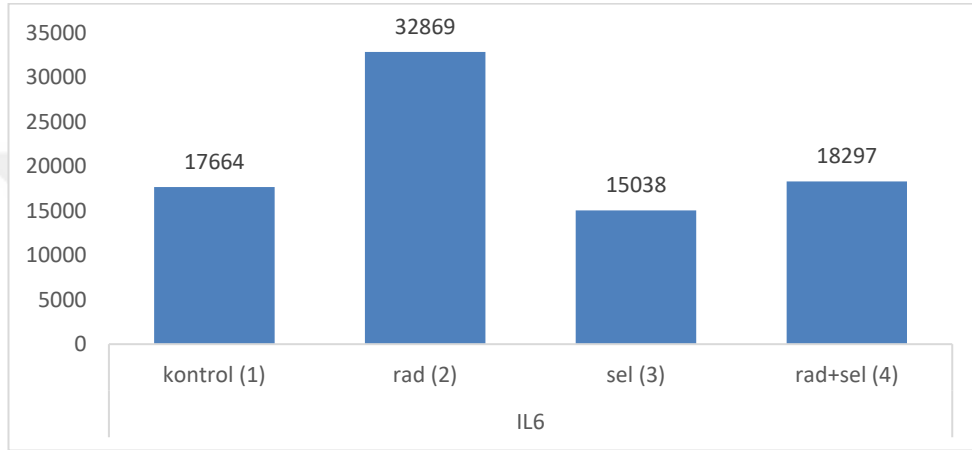
4.4.2. IL 6 düzeyinde grupların kıyaslanması

Çalışmada IL 6 kiti ile yapılan Elisa testi sonuçlarına göre yapılan biyokimyasal ölçümlerde grupların istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür ($p=0,01$). Çalışmada Rad grubunun IL6 ölçümlerinin kontrol, Rad+Sel ve Sel gruplarında anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür($p=0,01$). Sonuçlar Tablo 4.4.2 ve Şekil 4.4.2.1 de gösterilmiştir. Şekil 4.4.2.2 de ise IL 6 konsantrasyonu ng/ml gösterilmiştir.

Tablo 4.4.2: IL 6 düzeyinde grupların kıyaslanması

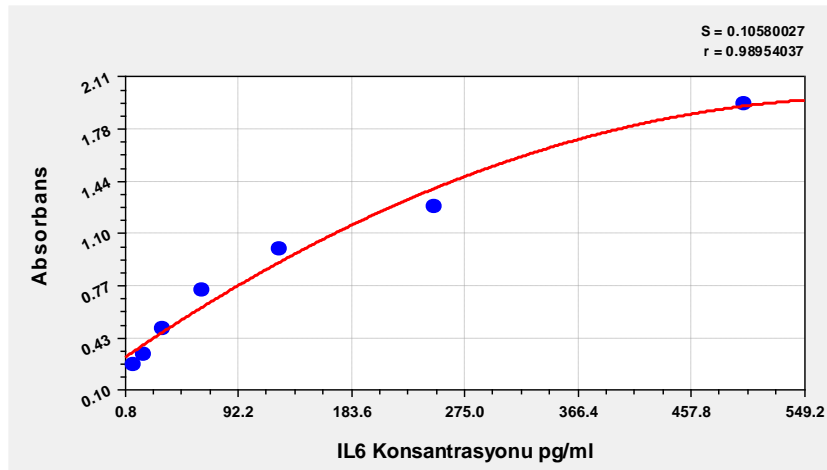
Düzyey	Grup	X±s.s.	μ	Max-Min	p	Fark
IL6	Kontrol (1)	17134,6±1808,42	17664	18819-14661	0,01*	2>1,3,4
	Rad (2)	31729,8±1964,39	32869	33255-28755		
	Sel (3)	15992,78±10840,61	15038	29826-18,92		
	Rad+Sel (4)	17653,6±2137,27	18297	19254-13936		

** Kruskal Wallis testi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.4.2.1: IL-6 düzeyinde grupların kıyaslanması

*Medyan (μ) değerine göre alınmıştır



Şekil 4.4.2.2.: IL 6 konsantrasyonu ng/ml

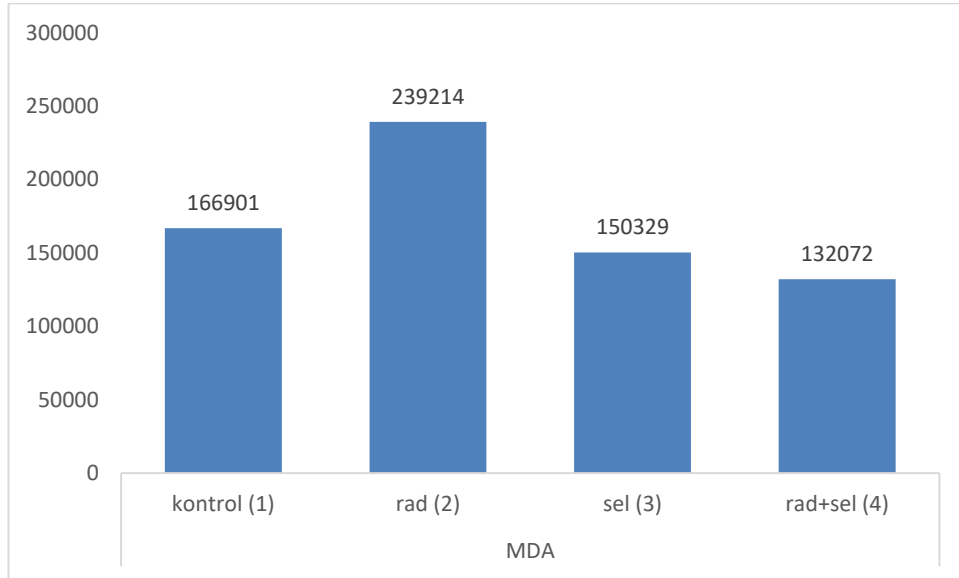
4.4.3. MDA düzeyinde grupların kıyaslanması

Çalışmada MDA kiti ile yapılan Elisa testi sonuçlarına göre yapılan biyokimyasal ölçümlerde grupların istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür ($p=0,27$). Çalışmada MDA kiti ile kontrol, Rad, Rad+Sel ve Sel gruplarında ölçümlerinin benzer seviyelerde olduğu görülmüştür. Sonuçlar Tablo 4.4.3 ve Şekil 4.4.3.1 de gösterilmiştir. Şekil 4.4.3.2 de ise MDA konsantrasyonu ng/ml gösterilmiştir.

Tablo 4.4.3: MDA düzeyinde grupların kıyaslanması

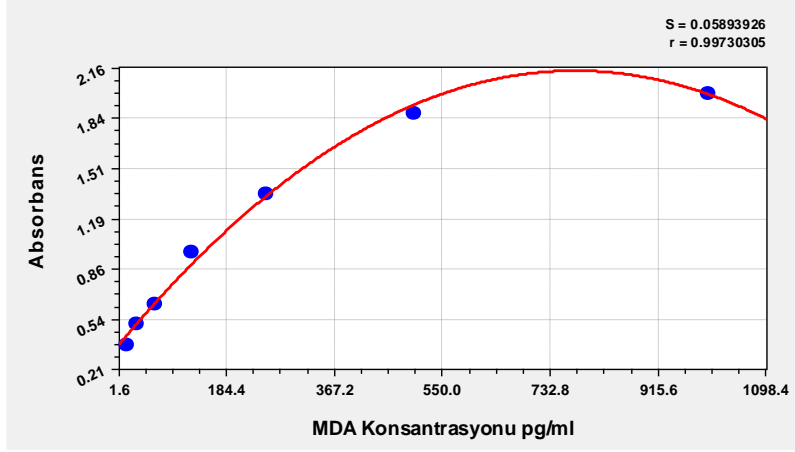
Düzye	Grup	$\bar{X}\pm s.s.$	μ	Max-Min	p
MDA	Kontrol (1)	393429,6 \pm 528663,46	166901	1338667-128652	0,27
	Rad (2)	229217 \pm 42395,34	239214	279218-176602	
	Sel (3)	125904,6 \pm 64894,97	150329	179218-15756	
	Rad+Sel (4)	98750,4 \pm 74547,96	132072	167215-13842	

** Kruskal Wallis testi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.4.3.1: MDA düzeyinde grupların kıyaslanması

*Medyan (μ) değerine göre alınmıştır



Şekil 4.4.3.2.: MDA konsantrasyonu ng/ml

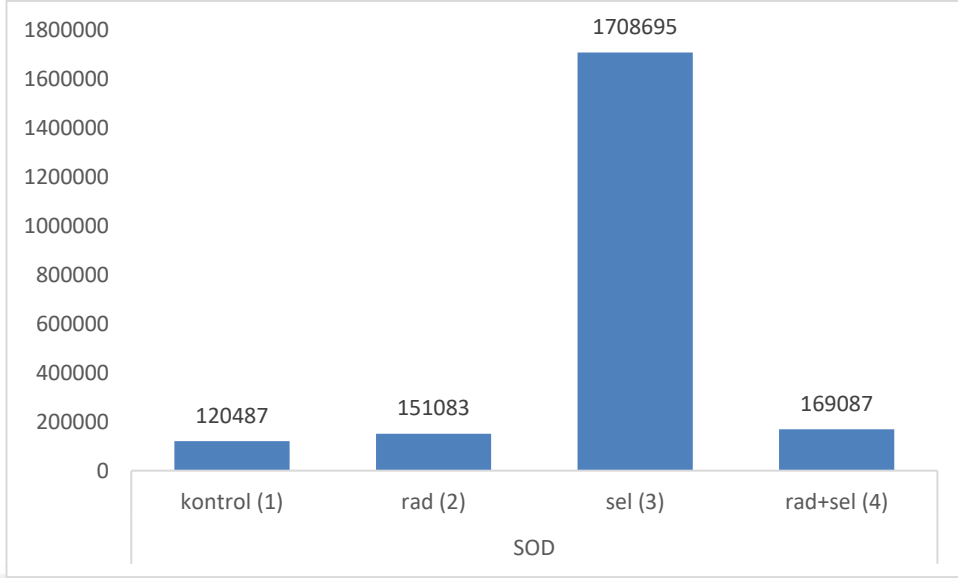
4.4.4 SOD düzeyinde grupların kıyaslanması

Çalışmada SOD kiti ile yapılan Elisa testi sonuçlarına göre yapılan biyokimyasal ölçümlerde grupların istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür ($p=0,01$). Çalışmada Sel grubunun SOD ölçümlerinin kontrol, Rad+Sel ve Rad gruplarında anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,01$). Sonuçlar Tablo 4.4.4 ve Şekil 4.4.4.1 de gösterilmiştir. Şekil 4.4.4.2 de ise SOD konsantrasyonu ng/ml gösterilmiştir.

Tablo 4.4.4: SOD düzeyinde grupların kıyaslanması

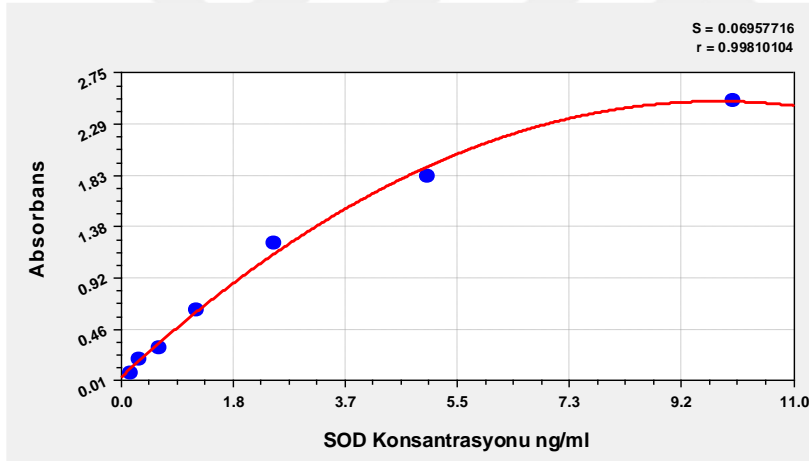
Düzyer	Grup	$\bar{X} \pm s.s.$	μ	Max-Min	p	Fark
	Kontrol (1)	99257 \pm 73925,25	120487	191437-19638		
	Rad (2)	378502 \pm 371442,44	151083	788045-57727		
SOD	Sel (3)	1405601,8 \pm 1248050,78	1708695	2738637-10526	0,01*	3>1,2,4
	Rad+Sel (4)	952703,2 \pm 1202928,12	169087	2749355-92261		

** Kruskall Wallis testi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.4.4.1: SOD düzeyinde grupların kıyaslanması

*Medyan (μ) değerine göre alınmıştır



Şekil 4.4.4.2.: SOD konsantrasyonu ng/ml

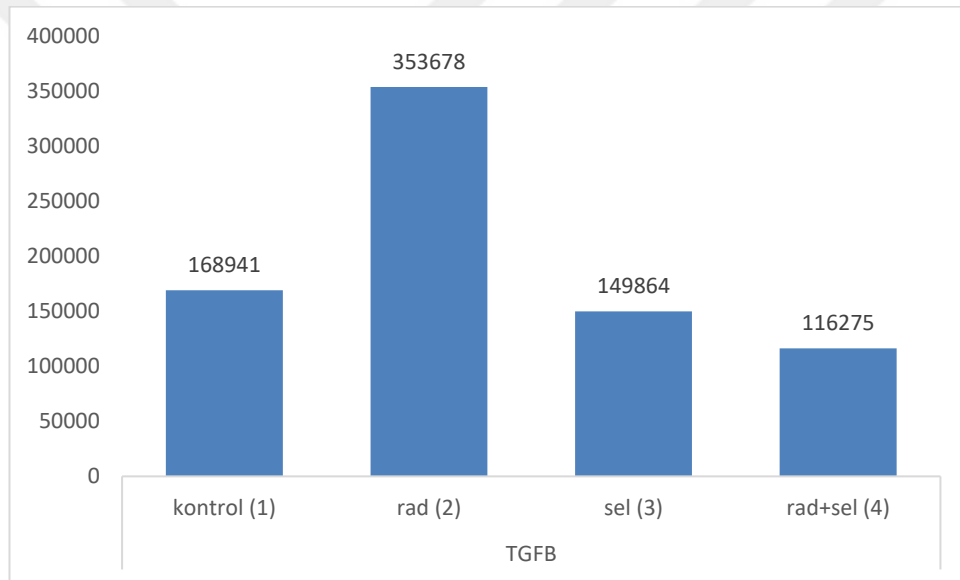
4.4.5. TGF- β 1 düzeyinde grupların kıyaslanması

Çalışmada TGF-B1 kiti ile yapılan Elisa testi sonuçlarına göre yapılan biyokimyasal ölçümlerde grupların istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür ($p=0,04$). Çalışmada Rad grubunun TGF-B1 ölçümlerinin Kontrol, Rad+Sel ve Sel gruplarında anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür($p=0,01$). Sonuçlar Tablo 4.4.5 ve Şekil 4.4.5.1 de gösterilmiştir. Şekil 4.4.5.2 de ise TGF-B1 konsantrasyonu ng/ml gösterilmiştir.

Tablo 4.4.5: TGF- β 1 düzeyinde grupların kıyaslanması

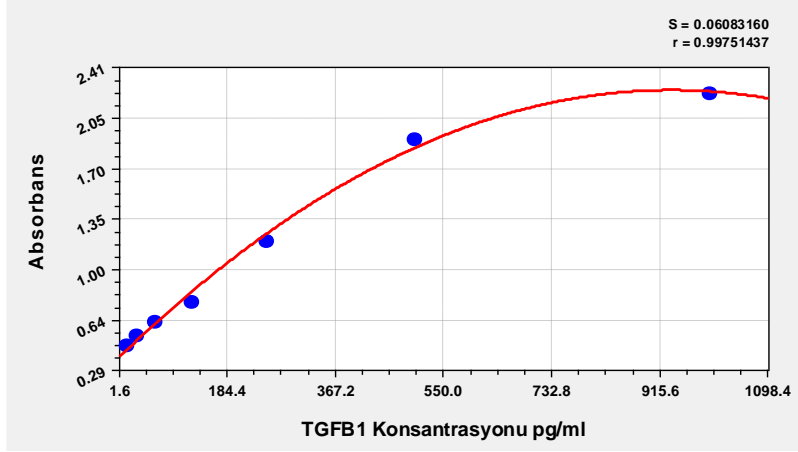
Düzye	Grup	X \pm s.s.	μ	Max-Min	p	Fark
TGF β 1	Kontrol (1)	144007,74 \pm 92456,04	168941	251424-226,72	0,04*	2>1,3,4
	Rad (2)	300221,49 \pm 170849,74	353678	429975-394,45		
	Sel (3)	167854,40 \pm 36268,58	149864	220673-136199		
	Rad+Sel (4)	109114,58 \pm 107486,38	116275	227182-218,57		

** Kruskall Wallis testi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.4.5.1: TGF- β 1 düzeyinde grupların kıyaslanması

*Medyan (μ) değerine göre alınmıştır



Şekil 4.4.5.2.: TGF- β 1 konsantrasyonu ng/ml

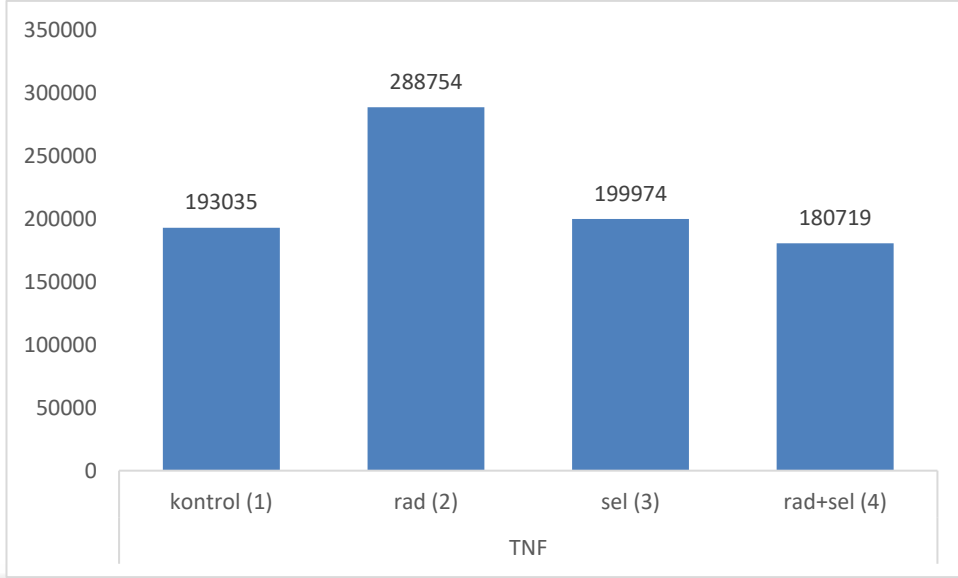
4.4.6. Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) düzeyinde grupların kıyaslanması

Çalışmada TNF- α kiti ile yapılan Elisa testi sonuçlarına göre yapılan biyokimyasal ölçümlerde grupların istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür ($p=0,44$). Çalışmada TNF- α kiti ile Kontrol, Rad, Rad+Sel ve Sel gruplarında ölçümlerinin benzer seviyelerde olduğu görülmüştür. Sonuçlar Tablo 4.4.6 ve Şekil 4.4.6.1 de gösterilmiştir. Şekil 4.4.6.2 de ise TNF- α konsantrasyonu ng/ml gösterilmiştir.

Tablo 4.4.6: TNF- α düzeyinde grupların kıyaslanması

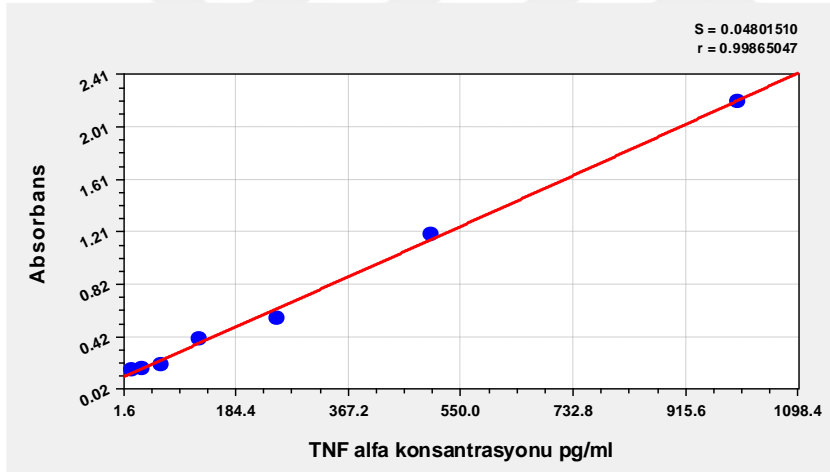
Düzye	Grup	X \pm s.s.	μ	Max-Min	p	Fark
TNF α	Kontrol (1)	186841 \pm 50612,69	193035	243143-107669	0,44	-
	Rad (2)	225866,79 \pm 133469,72	288754	324822-317,93		
	Sel (3)	199944,2 \pm 28416,8	199974	236477-170805		
	Rad+Sel (4)	166460,18 \pm 98040,59	180719	242375-236,91		

** Kruskal Wallis testi, *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık



Şekil 4.4.6.1: TNF- α düzeyinde grupların kıyaslanması

*Medyan (μ) değerine göre alınmıştır



Şekil 4.4.6.2.: TNF- α konsantrasyonu ng/ml

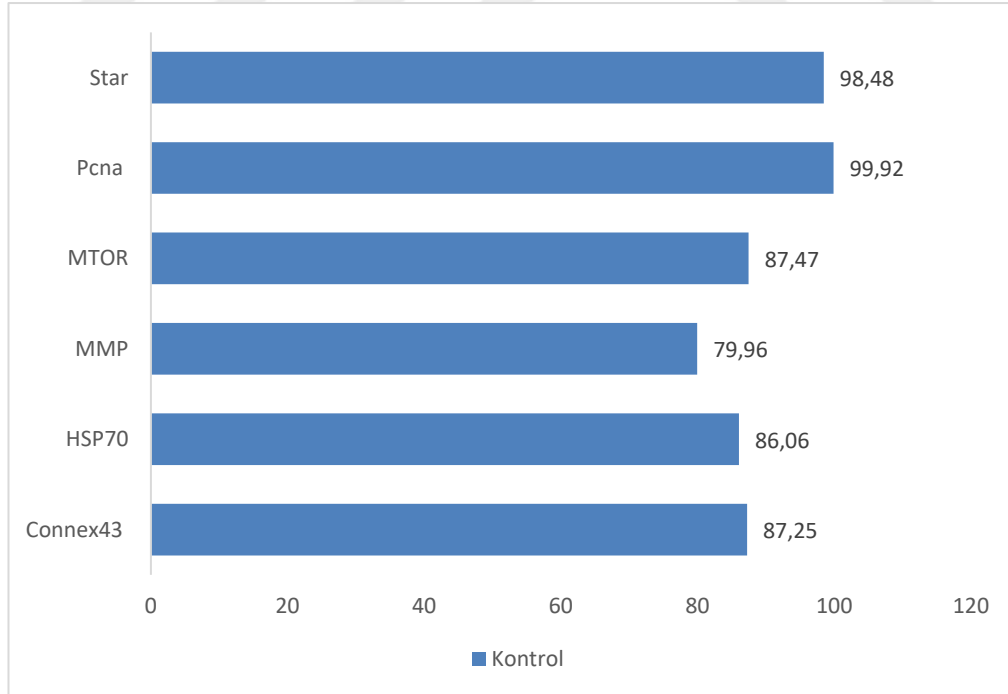
4.4.7. Grup içi kıyaslamalar

Tablo 4.4.7.1: Kontrol Grubu Ölçümlerinin Antikorlar Arasındaki Kıyaslaması

Düzyey	Kontrol	p	Fark
	X±s.s.		
Connexin 43 ¹	87,25±3,1		
HSP 70 ²	86,06±5,7		
MMP ³	79,96±3,93	0,01*	5,6>1,2,4>3
mTOR ⁴	87,47±2,12		
PCNA ⁵	99,92±10,83		
StAR ⁶	98,48±5,49		

**Tekrarlı varyans analizi*0,05 düzeyinde anlamlı farklılık

Kontrol Grubunun ölçümlerinin 6 farklı antikor düzeyindeki kıyaslamalarının anlamlı olarak farklı olduğu görülmüştür. PCNA ve StAR ölçümlerinin diğer tüm ölçümlerden yüksek düzeyde olduğu görülmüştür. Ayrıca MMP ölçümlerinin de Connexin43, HSP70, mTOR ölçümlerine göre daha düşük olduğu görülmüştür (p=0,01).



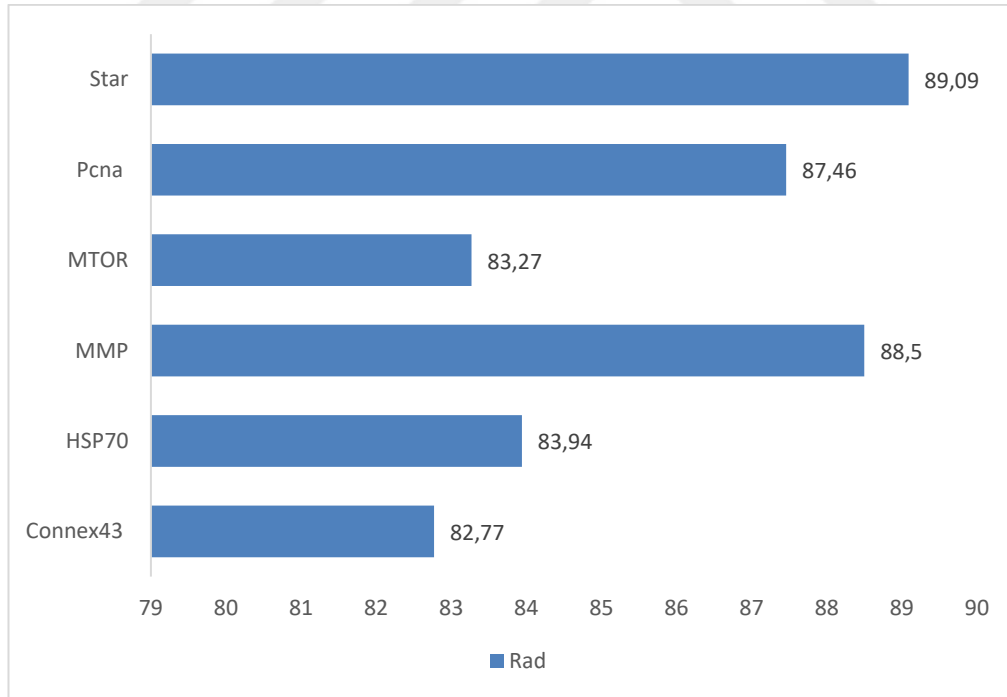
Şekil 4.4.7.1: Kontrol Grubu Ölçümlerinin Antikorlar Arasındaki Kıyaslaması

Tablo 4.4.7.2: Rad Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması

Düzyey	Rad X±s.s.	p	Fark
Connexin43 ¹	82,77±3,46		
HSP70 ²	83,94±5,74		
MMP ³	88,5±5,62	0,01*	1,2<3,5,6
mTOR ⁴	83,27±3,25		
PCNA ⁵	87,46±8,24		
StAR ⁶	89,09±10,26		

**Tekrarlı varyans analizi*0,05 düzeyinde anlamlı farklılık

Rad grubunun ölçümlerinin 6 farklı antikor düzeyindeki kıyaslamalarının anlamlı olarak farklı olduğu görülmüştür. MMP, PCNA ve StAR ölçümlerinin Connexin43, HSP70 ölçümlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür (p=0,01).



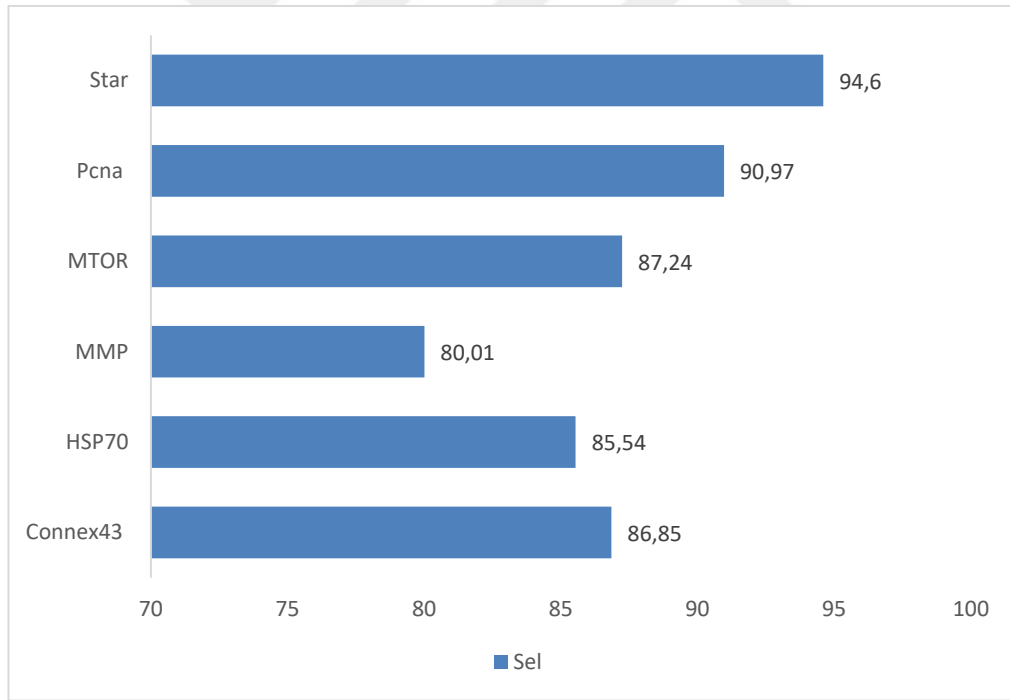
Şekil 4.4.7.2: Rad Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması

Tablo 4.4.7.3: Sel Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması

Düzyey	Sel	p	Fark
	X±s.s.		
Connexin43 ¹	86,85±2,57	0,01*	6>1,2,3,4
HSP70 ²	85,54±3,4		
MMP ³	80,01±4,89		
mTOR ⁴	87,24±2,48		
PCNA ⁵	90,97±5,92		
StAR ⁶	94,60±7,87		

**Tekrarlı varyans analizi*0,05 düzeyinde anlamlı farklılık

Sel grubunun ölçümlerinin 6 farklı antikor düzeyindeki kıyaslamalarının anlamlı olarak farklı olduğu görülmüştür. StAR ölçümlerinin Connexin43, HSP70, MMP, mTOR ölçümlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür (p=0,01).



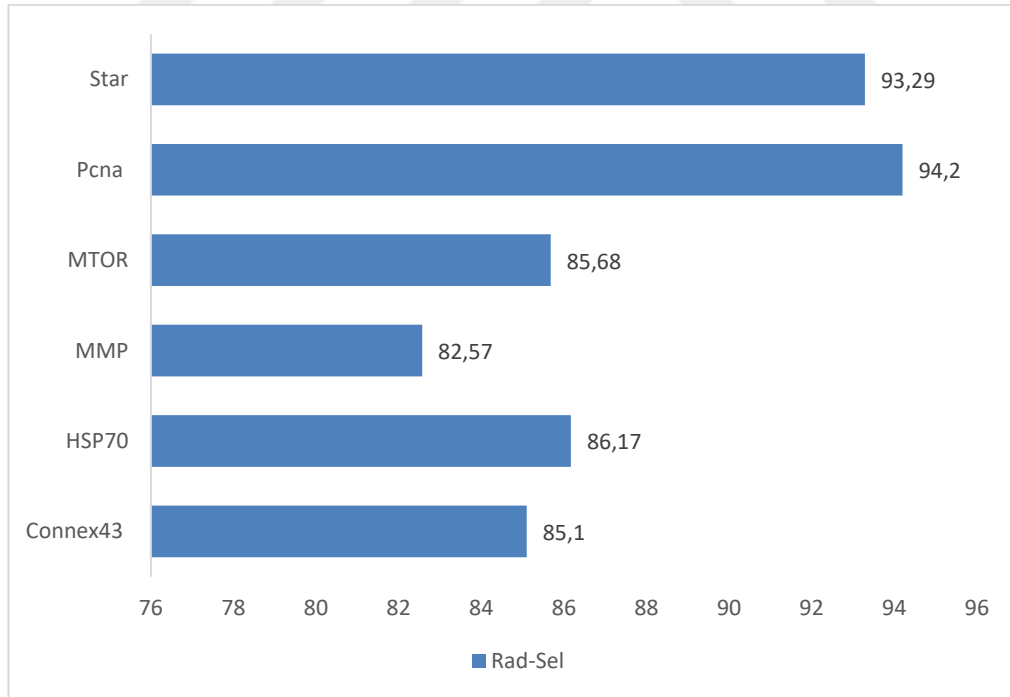
Şekil 4.4.7.3: Sel Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması

Tablo 4.4.7.4: Rad+Sel Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması

Düzyey	Rad+Sel	p	Fark
	X±s.s.		
Connexin43 ¹	85,10±2,54		
HSP70 ²	86,17±2,55		
MMP ³	82,57±3,41	0,01*	5,6>1,2,3,4
mTOR ⁴	85,68±1,83		
PCNA ⁵	94,2±13,01		
StAR ⁶	93,29±6,93		

**Tekrarlı varyans analizi*0,05 düzeyinde anlamlı farklılık

Rad+Sel grubunun ölçümlerinin 6 farklı antikor düzeyindeki kıyaslamalarının anlamlı olarak farklı olduğu görülmüştür. StAR ve PCNA ölçümlerinin Connexin43, HSP70, MMP, mTOR ölçümlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür (p=0,01).



Şekil 4.4.7.4: Rad+Sel Grubu Ölçümlerinin Antikor Arasındaki Kıyaslaması

5. TARTIŞMA

Uluslararası kanser ajansına göre 2020 yılında dünya çapında tahminen 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kanser ölümü gerçekleşmiştir (1). Radyoterapi, kanser tedavisinin en eski tedavi biçimlerinden biridir. Radyosensitif özelliği olan testislerin radyasyondan etkilenmeleri eskiden beri bilimsel çalışmaların konusu olmuştur (2). Gonadal doku üzerindeki etkiler, seminifer epitelyumdaki radyoterapinin sitotoksik etkisine bağlanmıştır; farklılaşmada spermatogonia'nın ortadan kaldırılmasına ve spermatogenezin sonraki aşamalarında spermatojenik hücre sayılarında önemli bir azalmaya neden olur (3). Germinal epitel radyasyona bağlı yan etkiler yönünden ileri derecede duyarlıdır. Testislerinin ışınlanmasını kabul eden gönüllü mahkûmlar üzerinde yapılan bir çalışma (Clifton ve ark.), 0,11 Gy ve üzerindeki dozların sperm sayısında önemli bir baskılanmaya neden olduğunu, 3-5 Gy dozlarında ise kalıcı infertilite gözlemlendiğini gösterdi (4). Radyasyon hızlı çoğalan (mitotik indeksi yüksek) hücreleri daha şiddetli etkilemektedir. Spermatogonia testisin radyasyon duyarlılığı en yüksek olan hücresidir. Spermatogonialar radyasyon uygulamasından sonra hızla azalmaya başlarlar. Spermatogonia'nın yaşam süresi fertilite için önemli bir faktördür. İyonize radyasyon germinal hücrelerde disosiasyon ve deskuamasyona sebep olurlar (5). Erkek germ hücreleri radyasyona karşı son derece hassastır ve kısmi veya tam vücut ışınlama sonrası infertilite yaygın bir sorun haline gelebilir (6). Apoptoz ve nekroz tedavi amacıyla kullanılan ya da kaza ile alınan radyasyon sonucunda da gözlenebilmektedir. Bu nedenle radyasyonun toksik etkilerini azaltmak için sentetik radyoprotektif ajanlar geliştirilmiştir (7). Kanser tedavisinin amacı tümörü ortadan kaldırmaktır. Radyoterapi veya kemoterapi gibi antineoplastik rejimler vücuttaki birçok sağlıklı doku için toksiktir. Bu toksik etkiler doz sınırlayıcı olarak tedavideki başarıyı azaltabilir. Ayrıca son 20 yılda iyi prognozlu, kanser tanısı almış ve başarılı bir şekilde tedavi edilmiş olguların, geç yan etkileri daha büyük bir

farkındalığa yol açmıştır (8). Normal doku toksisitelerini azaltmak için çeşitli radyoprotektif ajanlar önerilmiştir (9). Bu radyoprotektif ajanlar hastanın radyoterapiye toleransını artırmanın yanında; hayat kalitesini yükseltir, doz eskalasyonuna izin verir ve tedavi komplikasyonlarını azaltarak destekleyici bakım için gereken maliyetleri azaltabilir.

Jaimala ve ark. (58) farklı dozlarda radyasyona karşı farelerde Amifostin'nin spermatogonia üzerindeki koruyucu rolünü değerlendirdikleri çalışmada Amifostin'nin radyasyona karşı dikkate değer koruyucu potansiyelini gözlemlədiler. Tevfik Aktoz ve ark. (5) yaptığı çalışmada radyoterapiye radyoprotektif ajan olarak Amifostin ve L-Karnitinin ayrı ayrı gruplara eklenip histolojik olarak analiz edildiğinde Amifostin ve L-Karnitinin ışınlama ile birlikte uygulanması histopatolojik değişiklikleri ve spermatogenez hasarını azalttı ve spermatojenik hücrelerin tabakalaşmasında daha az düzensizlik görüldü. Ayrıca Amifostin ve L-Karnitinin tedavisinden sonra germinal epitelde çok çekirdekli dev hücrelerin ortaya çıkışı ve vakuolizasyonun da azaldığı gözlemlendi. Bizim çalışmamız sıçanlarda radyasyona karşı Selenyum L Metiyonin'nin, testislerde koruyucu rolünü araştıran ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Literatürde benzerine rastlanılmamıştır. Çalışmada dokular histolojik olarak incelendiğinde Kontrol grubundan alınan kesitlerde, ince bir bazal lamina ile çevrelenmiş seminifer tübüllerde spermatogonyum, primer ve sekonder spermatositler ile seminifer tübüllerdeki spermatidler dahil olmak üzere Radyasyon uygulanan gruplara göre daha fazla spermatojenik hücre içermekteydi. Kontrol kesitlerinde, sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerden oluşan çok tabakalı bir epitel her bir tübül yapısında düzgün görünümündü. Küçük, koyu renkli boyanmış çekirdekleri ile spermatogonyum hücreleri bazal lamina üzerinde bulunuyordu. Primer spermatositler hemen bu hücrelerin üstünde büyük yuvarlak çekirdekleri ile ayırt ediliyordu. Spermatidler lümeneye yakın yerleşim göstermekteydi, seminifer tübül lümeninin içinde ise yoğun sperm hücreleri bulunmaktaydı. Spermatojenik hücre dizileri arasında Sertoli hücre yapısı, soluk sitoplazmalı ve görünür bazal, oval, soluk çekirdekleri ile ayırt edilebiliyordu. Leydig (interstisyel) hücreleri seminifer tübüller arasındaki interstisyel alanda tek tek ya da gruplar halinde yerleşmiş, asidofilik stoplazmaya sahip, soluk yuvarlak çekirdekli hücreler olarak ayırt edildi. Genel olarak Kontrol grubu ve sadece Selenyum uygulanan gruplarda, düzenli seminifer tübül

morfolojisine sahip normal testis histolojisi ve çeşitli farklılaşma seviyelerinde normal polariteye sahip spermatojenik hücreler gözlemlendi. Radyasyon uygulanan gruplara ait testis dokularında, deforme olmuş anormal seminifer tübül yapıları yanı sıra, germinal hücre miktarında azalma ve lümene dökülmüş tübül epitel hücreleri gibi patolojik bulgular ile testislerin histolojik mimarisi bozulmuştu. Rad+Sel ile Rad grubu karşılaştırıldığında, Rad+Sel grubunda tübül epiteliumda daha az atrofik ve dejeneratif değişiklikler vardı. Bu deney grubunda, seminifer tübül lümeninde aktif spermatogenezin iyi bir şekilde korunduğunu ve lümenlerinde çok sayıda spermin ve normal olarak organize olmuş spermatogoniyal hücre katmanlarının varlığını gösterdi. Ayrıca, interstisyel doku normal yapıdaki kan damarlarını içeriyordu. Çalışma istatistiksel olarak incelendiğinde ise seminifer tübül çap ölçümlerinin çalışma gruplarına göre anlamlı seviyede farklı olduğu tespit edilmiştir ($p=0,01$). Rad grubunun seminifer tübül çap ölçümlerinin Kontrol, Sel ve Rad+Sel gruplarına göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu görülmüştür ($p=0,01$). JTBS ölçümlerinin çalışma gruplarına göre anlamlı seviyede farklı olduğu tespit edilmiştir ($p=0,01$). Rad grubunun JTBS ölçümlerinin kontrol, Sel ve Rad+Sel gruplarına göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu görülmüştür ($p=0,01$). Bu nedenle Selenyum L Metiyonin ön tedavisinin spermatogenez üzerinde radyoprotektif etkileri olduğunu ve epitelyal olgunlaşmayı koruduğunu gözlemledik. Selenyum L Metiyonin tedavisi ile histopatolojik değişikliklerin azaldığını ve spermatogenez hasarının azaldığını saptadık.

Bu çalışmada epididimden alınan spermleri konsantrasyon ve motilite açısından istatistiksel olarak incelediğimizde; Kontrol, Rad, Sel ve Rad+Sel grubunun epididim sperm konsantrasyon ölçümlerinin anlamlı şekilde farklı olmadığı görülmüştür ($p=0,16$). Kontrol ve Sel grubunun epididim sperm motilite ölçümlerinin ise Rad+Sel ve Rad gruplarına göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,01$). Ratlarda spermatogonyumdan spermatozoa oluşumu yaklaşık 48 günde tamamlanmaktadır. Radyasyon uygulamasından 5 gün sonra sakrifiye edilen ratlarda, gruplar arası epididim sperm konsantrasyonunda anlamlı bir farklılık olmaması beklenen bir sonuçtu, radyasyon verilen iki grupta (Rad ve Rad+Sel) ise motilitenin düşük olması radyasyonun toksik etkilerini göstermektedir. Sel grubu ile Kontrol grubu arasında herhangi bir farklılık olmaması Selenyumun bu dozunun toksik olmadığını da işaret etmektedir.

Organizmada oksidanlar ile antioksidanlar arasında bir denge bulunur. İyonize radyasyonun dokular üzerindeki etkisi çeşitli çalışmalarda oksidatif strese sebep olabileceği ve bu durumda oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine değişebileceği düşünülmektedir (59). Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden SOD, CAT gibi antioksidanları üretmektedir.

Radyoprotektif ajanlar arasında Selenyum L Metiyonin, Selenyum ve Metioninden oluşan güçlü bir antioksidandır. Glutasyon ve diğer antioksidan enzimlerin uyarılması yoluyla hücrel antioksidan savunmasında yer alır. Serbest selenyum, süperoksit dismutaz (SOD), tioredoksin redüktaz (TR), glutasyon peroksidazlar (GPx) ve diğerleri gibi antioksidan enzimlerin uyarılmasında anahtar rol oynayan bir aminoasit olan selenosisteinin gelişimi için de kullanılabilir (49). Bu antioksidan enzimler tarafından serbest radikallerin nötralizasyonuna ek olarak, metioninin kendisi kükürt yoluyla ROS'u temizleyebilir ve ayrıca bir metal şelatör görevi görebilir (50). Testis kanserleri, prepubertal dönemde lenfoma tedavisi, alt batına radyoterapi gerektiren çeşitli kanserler ve hematolojik kanserler sebebiyle tüm beden ışınlanması (TBI) yapılan hastalarda, yaşamın sonraki dönemlerinde sıklıkla rastlanan infertilite geç yan etkilerdendir. Radyoterapinin infertilite gibi toksik etkilerini azaltmak için radyoprotektiflere ihtiyaç duyulmaktadır. Selenyum L Metiyonin adlı radyoprotektif ajanın akciğer, kalp, kemik, hematopoietik, gastrointestinal sistem ve böbrek gibi birçok doku üzerinde radyoprotektif etkisi gösterilmiştir, fakat testis üzerinde bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır (51-53). Bu çalışmanın amacı sıçanlarda Radyasyon ile indüklenmiş testiküler doku hasarı modelinde Selenyum L Metiyoninin koruyucu etkisinin ortaya çıkarılmasıdır. Bu sayede, bu deneysel çalışmanın, klinik açıdan radyoterapinin yol açabileceği geç yan etkilerden infertilitenin önüne geçilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda Kontrol ile Sel grubu kıyaslanarak Selenyum L Metiyoninin testiküler doku üzerinde toksik bir etki bırakıp bırakmadığı da saptanmış olacaktır. K. Ekici ve ark. (60) yaptığı çalışmada radyoterapiye radyoprotektif ajan olarak Aminoguanidinin tedavisi eklendiğinde SOD, CAT seviyesi anlamlı olarak artmıştır. Nadia Z Şaban ve ark. (61) yaptığı çalışmada da radyoterapiye radyoprotektif ajan olarak hesperidin tedavisi eklendiğinde SOD, CAT seviyesi anlamlı olarak artmıştır. Bizim çalışmamızda ise CAT kiti ile yapılan Elisa testi sonuçlarına göre

yapılan biyokimyasal ölçümlerde grupların istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür ($p=0,01$). CAT kiti ile yapılan Elisa testi sonuçlarına göre yapılan biyokimyasal ölçümlerde Rad+Sel grubunun ölçümlerinin Kontrol, Rad ve Sel gruplarına göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,01$). Radyoterapiye Selenyum L Metiyonin eklenmesi bir antioksidan olan CAT'i ciddi bir şekilde artırmıştır. Böylece Rad+Sel grubundaki iyonize radyasyon oksidatif strese sebep olarak, serbest radikallerin doku üzerindeki zararlı etkilerini Selenyum L Metiyonin aracılığıyla sınırlayıp, koruyucu etki göstermiştir. Çalışmada SOD kiti ile yapılan Elisa testi sonuçlarına göre biyokimyasal ölçümlerde ise Sel grubunun süperoksit dismutaz (SOD) ölçümlerinin kontrol, Rad+Sel ve Rad gruplarında anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,01$). Bir antioksidan olan Selenyum L Metiyonin'in süperoksit dismutaz (SOD)'ı arttırması beklenen bir etkiydi fakat çalışmada Rad+Sel grubunda anlamlı bir farklılık bulunamadı.

Serbest radikaller; hücrelerin protein, lipid, DNA, karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederek yapılarının bozulmasına ve canlı organizmalarda lipid peroksidasyonuna neden olurlar (62,63). Malondialdehit (MDA), hücre lipidlerinin okside edilerek yapılarının bozulması sonucu oluşan ana metabolittir ve lipid peroksidasyonunun bir indeksi olarak kabul edilmektedir (64). Bizim çalışmamızda MDA kiti ile yapılan Elisa testi sonuçlarına göre biyokimyasal ölçümlerde grupların istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0,27$). Çalışmada MDA kiti ile kontrol, Rad, Rad+Sel ve Sel gruplarında ölçümlerinin benzer seviyelerde olduğu saptanmıştır.

Testis, interstisyel bölgesinde makrofajların belirgin varlığı nedeniyle immün ayrıcalıklı bir organdır (65). Akut radyasyon hasarı tüm vücut veya parsiyel vücut yüksek doz ışınlamalardan sonra meydana gelir. Radyoterapi sonrası TNF alfa, IL-6 gibi sitokinlerde artış oluşmaktadır. Bu sitokinlerin artışında proinflamasyonda rol almaktadır. IL-6 inflamasyonun başlamasındaki mekanizmalardan sorumlu tutulan proinflamatuvar sitokindir. IL-6'nın artması ile oluşan sinyal yolları vasıtasıyla, TNF-alfa artmakta ve böylece inflamasyon daha da şiddetlenmektedir. (66,67). IL-6 aynı zamanda Sertoli hücrelerinin ve germ hücrelerinin fonksiyonunun sürdürülmesinde önemli bir role sahiptir, IL-6 Sertoli hücresi kan testis bariyerinin

(BTB) bütünlüğünü bozabilir, ayrıca IL-6, BTB'yi oluşturan proteinlerin bozulmasını ve ERK-MAPK yolunu geciktirerek BTB'nin dinamiklerini düzenlemektedir (68). ME Amer ve ark. (69) yaptığı çalışmada radyoterapi testis dokusunda IL6'yı belirgin bir şekilde artırdığı gözlenmiştir. Radyoterapiye radyoprotektif ajan olarak Melatonin eklenmesinin proinflatuar sitokin artışını durdurduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise tek doz (10 Gy) radyasyon uygulanan Rad grubunun IL6 ölçümlerinin Kontrol, Rad+Sel ve Sel gruplarında anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu gözlenmiştir (p=0,01). Radyoterapiye Selenyum L Metiyonin eklenmesi proinflatuar bir sitokin olan ve BTB'nin bütünlüğünü bozan IL6'nın azalmasına sebep olmuştur. Fakat çalışmada TNF kiti ile yapılan Elisa testi sonuçlarına göre yapılan biyokimyasal ölçümlerde grupların istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görülmüştür (p=0,44). TNF- α kiti ile Kontrol, Rad, Rad+Sel ve Sel gruplarında ölçümlerinin benzer seviyelerde olduğu aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir.

Emerit ve ark. (70) yaptığı bir çalışmada Çernobil felaketinden sağ kurtulanlarda maruziyetten 20 yıl sonra serum TGF- β seviyesinin arttığı doğrulandı.

Birçok çalışma, TGF- β sinyallesinin testiküler steroidogenezde yer aldığını ve LH/hCG reseptör ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. Bununla birlikte, birincil Leydig hücrelerinin TGF- β 1 tedavisi, hCG ile uyarılan testosteronun yanı sıra cAMP ile indüklenen testosteron üretimini de azaltmıştır (71-73). Eunsook Parkı ve ark. (74) yaptığı bir çalışmada TGF- β 1 sinyallesinin, Nur77 transkripsiyon faktörü ile çapraz bağlantı yoluyla steroidojenik genlerin ekspresyonunu baskıladığını ve bunun Leydig hücrelerinde testosteron üretiminin azalmasına yol açtığı gösterildi. Riham Süleyman Said ve ark. (75) yaptığı çalışmada 10 Gy radyoterapiye alfa-lipoik asit eklenmesi TGF- β seviyesini azaltarak radyoterapinin negatif etkilerini hafifletmiştir. Bizim çalışmamızda ise TGF-B1 kiti ile yapılan Elisa testi sonuçlarına göre yapılan biyokimyasal ölçümlerde grupların istatistiksel olarak farklı olduğu gözlenmiştir (p=0,04). Çalışmada Rad grubunun TGF-B1 ölçümlerinin Kontrol, Rad+Sel ve Sel gruplarında anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu gözlenmiştir (p=0,01). Radyoterapiye Selenyum L Metiyonin eklenmesi steroidojenik genlerin ekspresyonunu baskılayan ve Leydig hücrelerinde testosteron üretiminin azalmasına

yol açan TGF-B1'in azalmasına sebep olarak radyoterapinin negatif etkilerini hafiflettiği gözlenmiştir.

Spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesinin, luteinize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormonu (FSH) içeren fonksiyonel bir hipotalamo-hipofiz sisteminin yanı sıra parakrin sinyaller aracılığıyla aracılık edilen lokal kontrollerin de gerektiği bilinmektedir. Doğrudan temasa bağlı bağlantı yolları dahil olmak üzere lokal testis içi hücre-hücre etkileşimleri, yalnızca memeli spermatogenezinin düzenlenmesinde değil aynı zamanda erkek fenotipinin korunması için de gereklidir (76). Kan-testis bariyeri (BTB) bu hücre-hücre temasları, hücre yapısının ana bileşenleri olan anchoring junctionlar (kaderin-katenin, nektin, integrin vb. gibi) ve tight junctionları (okludin, claudins, Zonula oklüdens vb. gibi) barındıran özel proteinlerden oluşur. Testiste ve erkek genital kanalında (epididim, seminal vezikül, prostat, korpus kavernozum) bulunan üçüncü bir bağlantı sınıfı, gap junctionlar ve bunların kurucu proteinleri olan konneksinlerle (Cxs) ilgilidir (77,78). Testiste, Sertoli hücreleri arasındaki ve Sertoli ile germ hücreleri arasındaki Connexin43'ün Sertoli ve germ hücresi çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalması için gerekli olduğuna dair ikna edici kanıtlar mevcuttur (79,80). Bu özelliklere ek olarak, son veriler connexin 43 tabanlı gap junctionlarının da BTB bütünlüğünün kontrolünde rol oynadığını ileri sürmüştür (81-84). Bizim çalışmamızda Connexin43 antikor düzeyinde grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir(p=0,01). Rad grubunun Connexin43 antikorlarındaki ölçümlerinin Kontrol, Sel ve Rad+Sel gruplarına göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu görülmüştür(p=0,01). Literatürde radyasyonun testiste Connexin43'ü azalttığına dair herhangi bir veri bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda radyasyonun Connexin43'ü azaltığının saptanması literatüre bir ilk olarak geçecektir. Radyoterapiye Selenyum L Metiyonin eklenmesi Sertoli ve germ hücresi çoğalmasını, farklılaşmasını ve BTB bütünlüğünün kontrolünü sağlayan Connexin43'ün azalmasını engellemiştir, Selenyum L Metiyonin'in bu etkisi de literatürde bir ilk olarak rastlanacaktır.

Stres tepkisi ve programlanmış hücre ölümü, stresli uyaranlara verilen hücresel reaksiyonlardır. Isı şok proteinleri (HSP'ler), moleküler ağırlıklarına göre ailelere bölünebilen bir grup stres proteinidir. Testiste çok sayıda HSP tanımlanmış ve

karakterize edilmiştir ve bunların üremedeki rolü/rolleri daha fazla ilgi görmektedir (85). Bunların arasında HSP70 ailesi, yapısal olarak eksprese edilen 73 kDa formunu (HSP73, Hsc70 veya ısı şoku kökenli olarak da bilinir) ve stresle indüklenebilir 72 kDa formunu (HSP72, Hsp70 olarak da bilinir) içerir. Fizyolojik koşullar altında HSP73, yeni sentezlenen proteinlerin uygun şekilde katlanmasına, birleştirilmesine ve hücreler arası trafiğine yardımcı olan moleküler bir şaperon görevi görür (86). Stresli uyarılara yanıt olarak HSP72 uyarılır ve hücrel onarım ve koruyucu mekanizmalara dahil olur (87). Ek olarak, HSP70'in değişen ekspresyonu erkek infertilitenin patogeneziyle ilişkilendirilmiştir (88,89). Erkek üremesi açısından, HSP'ler spermatogenez için gereklidir ve testis homeostazisinde önemli bir rol oynarlar (85). Literatürde radyasyonun testiste Hsp70'i azalttığına dair herhangi bir veri bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda radyasyonun Hsp70'i azalttığına dair saptanması literatüre bir ilk olarak geçecektir. Çalışmamızda HSP70 antikor düzeyinde grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir(p=0,01). Rad grubunun HSP70 antikorlarındaki ölçümlerinin Kontrol, Sel ve Rad+Sel gruplarına göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu görülmüştür(p=0,01). Radyoterapiye Selenyum L Metiyonin eklenmesi spermatogenez için gerekli olan ve testis homeostazisinde rol oynayan HSP70 in azalmasını engellemiştir, Selenyum L Metiyonin'in bu etkisi de literatürde bir ilk olarak rastlanacaktır.

MMP ailesine ait olan Matrix metalloproteinase 9 (MMP9), ekstrasellüler matrikste bozunma ve remodeling dinamik dengesinin düzenlenmesine katılır. Siu MK ve ark. (90) yaptığı bir çalışmada, MMP9'un artan ekspresyonunun ve aktivitesinin, occludin proteinin ekspresyonunu azaltarak sıçan testisindeki Sertoli hücresinin tight junction (TJ) bariyer düzeneğini bozduğunu gösterdi. Qiu L ve ark. (91) yaptığı bir çalışmada ise, MMP9'un ekspresyonunun ve aktivitesinin, activating transcription factor 2'nin (ATF2) fosforilasyonu yoluyla p38 MAPK tarafından aktive edilebileceğini, bunun da ZO-1, occludin ve claudin-11'in bozulmasına yol açarak sonuçta BTB bütünlüğünü yok ettiğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise MMP9 antikor düzeyinde grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir(p=0,01). Rad grubunun MMP9 antikorlarındaki ölçümlerinin Kontrol, Sel ve Rad+Sel gruplarına göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür (p=0,01). Literatürde radyasyonun testiste MMP9'u arttırdığına dair herhangi bir veri

bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda radyasyonun MMP9'u arttırmasının saptanması literatüre bir ilk olarak geçecektir. Radyoterapi testislerde toksik etki göstererek MMP9'un artışına; BTB nin bütünlüğünün ve de Sertoli hücresinin tight junction (TJ) bariyer düzeneğinin bozulmasına sebep olmuştur. Radyoterapiye Selenyum L Metiyonin eklenmesi MMP9 artışını engelleyerek BTB nin bütünlüğünün ve Sertoli hücresinin tight junction (TJ) bariyer düzeneğinin bozulmasını engellemiştir, Selenyum L Metiyonin'in bu etkisi de literatürde bir ilk olarak rastlanacaktır.

Jesus TT ve ark. (92) yaptığı çalışmada mTOR'un sertoli hücrelerinde glikoz tüketimini ve redoks dengesini kontrol ettiğini göstermiştir; bu da spermatogenezin beslenme desteğinde bu yolağın doğrudan rol oynadığını vurgulamaktadır. Bizim çalışmamızda mTOR antikor düzeyinde grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık göstermediği tespit edilmiştir (p=0,12). mTOR antikorlarındaki ölçümlerinin kontrol, Rad, Sel ve Rad+Sel gruplarındaki ölçümleri farklılık göstermediği tespit edilmiştir.

Spermatogenez, spermatogonia'nın testiste sürekli mitoz, mayoz bölünme ve hücre farklılaşması yoluyla olgun spermatozoaya dönüştüğü karmaşık bir süreçtir (93,94). Spermatojenik hücreler, spermatogenez sırasında fizyolojik öneme sahip olarak sıklıkla çoğalır, sürekli gelişir ve farklılaşır. Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA), testislerde spermatogonia'nın proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynar (95-97). PCNA, bir hücre döngüsü düzenleyici protein belirteci olarak, DNA sentezi ile yakından ilişkilidir ve hücre çoğalmasının başlatılmasında rol oynar (98). PCNA sadece DNA replikasyonunda değil aynı zamanda kromozom rekombinasyonunda, DNA metilasyonunda, nükleik asit metabolizmasında ve RNA transkripsiyonunda da rol oynar (99,100). Hücrelerdeki DNA replikasyonu genellikle hücre proliferasyonunu gösterir ve PCNA sentezi nedeniyle durgun hücrelerde düşüktür ve hücre döngüsü sırasında dalgalanır (100); bu nedenle PCNA ekspresyonu değişiklikleri, hücre proliferasyonunu değerlendirmek için bir işaretleyici olarak kullanılır. Şahanşah ve ark. (101) yaptığı çalışmaya göre melatonin ön tedavisi, ışınlamanın neden olduğu DNA hasarına yanıt olarak PCNA proteininin ekspresyonunu arttırdı. ME Amer ve ark. (102) yaptığı çalışma, ışınlanmış sıçanlarda spermatogonia ve primer spermatositlerde PCNA ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını ortaya çıkardı; bu,

çoğalma aktivitesinin ve spermatogenezin azaldığını gösteriyor. Bu bulgular, ışınlanmış sıçanların testislerinin seminifer tübüllerinde sperm yokluğunu, sekonder spermatositin sperme geçişinin tamamlanmamış olmasından kaynaklanabileceğini açıklayabilir. Kontrol ve Radyoterapiye Melatonin eklenmesi ile tedavi edilen sıçanların testislerinde PCNA pozitif hücreler güçlü bir şekilde tespit edildi; bu, Melatonin'nin PCNA reaktivitesini iyileştirdiğini ve ışınlama sonrası proliferasyon aktivitesini eski haline getirdiğini gösteriyordu (102). Bizim çalışmamızda ise PCNA antikoru düzeyinde grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p=0,01$). Kontrol grubunun PCNA antikoru düzeyindeki ölçümlerinin Rad, Sel gruplarına göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,01$). Kontrol grubu ile Rad+Sel grubu arasında anlamlı bir farklılık yoktu. Radyasyona Selenyum L Metiyonin eklenmesi testislerde spermatogonia'nın proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan PCNA'nın korunmasına yardımcı olmuştur.

Steroid hormonları farklı olmalarına rağmen ortak bir öncü substrat olan kolesterolden sentezlenirler. Dolayısıyla steroidogenez, steroid hormon biyosentezinde hız sınırlayıcı adım olarak kabul edilen Steroidojenik Akut Düzenleyici (StAR) protein tarafından kolesterolün mitokondriyal membran boyunca taşınmasıyla başlar (103,104). Daha sonra kolesterol, *sitokrom P450* aracılığıyla pregnenolon'a dönüştürülür ; pregnenolon sitozole yayılır ve düz endoplazmik retikulumda *3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz* ile progesterona ve ardından androstenediona dönüştürülür. Daha sonra *17 β -hidroksisteroid dehidrojenaz* ise androstenedionun steroidojenik sürecin son ana ürünü olan testosterona dönüşümünü katalize eder. Testosteron *5 α -redüktaz* ile daha güçlü bir androjen olan *5 α -dihidrotestosterona* veya *sitokrom P450 aromataz* ile *17 β -estradiol*e dönüştürülebilir (105,106). Fare Leydig hücrelerinde StAR'ın aşırı ekspresyonunun bazal steroidojenik oranını arttırdığı Svehnikov K ve ark. (107) tarafından bildirilmiştir. Steroid hormon biyosentezinde hız sınırlayıcı adım olan StAR'ın azalması androjen üretimini azaltacağından, spermatogenez de azaltacağı beklenir. Bizim çalışmamızda StAR antikoru düzeyinde grupların ölçümlerinin anlamlı seviyede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p=0,01$). Kontrol grubunun StAR antikoru düzeyindeki ölçümlerinin sadece Rad grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0,03$). Radyasyon StAR'ı azaltarak steroid hormon sentezinde hız sınırlayıcı olarak rol almıştır.

Literatürde radyasyonun testiste StAR'ı azaltarak steroid hormon sentezinde hız sınırlayıcı olarak rol oynadığına dair herhangi bir veri bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda radyasyonun StAR'ı azalttığı saptanması literatüre bir ilk olarak geçecektir. İstatistik sonuçlarına göre Kontrol grubu ile Rad+Sel grubu arasında anlamlı bir farklılık yoktu. Radyoterapiye Selenyum L Metiyonin eklenmesi ile StAR'ın azalmasını engelleyerek spermatogenezin azalmasının önüne geçilmiştir. Aynı zamanda Kontrol grubuyla Sel grubunun arasında anlamlı farklılık olmaması Selenyum L Metiyonin'in toksik bir etki yaratmadığını da düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Radyasyon birçok organ ve doku üzerinde yan etki bakımından toksik olduğu gibi. radyosensitif organlar arasında başta gelen organlardan olan testisler üzerinde düşük dozlarda bile şiddetli histopatolojik değişikliklere yol açmaktadır. Selenyum L Metiyonin adlı radyoprotektif ajanın akciğer, kalp, kemik, hematopoietik, gastrointestinal sistem ve böbrek gibi birçok doku üzerinde radyoprotektif etkisinin saptanmıştır. Bizim çalışmamızda Selenyum L Metiyonin'in testis dokusunda oluşan radyasyon hasarı üzerinde de protektif etkisi olduğu gösterilmiştir.

Selenyum L Metiyonin'in radyoprotektif özelliği göz önüne alındığında, radyasyon tedavisini almak durumunda kalan, testis kanserleri, prepubertal dönemde lenfoma tedavisi, alt batına radyoterapi gerektiren çeşitli kanserler ve hematolojik kanserler sebebiyle tüm beden ışınlanması (TBI) yapılan hastalarda radyasyonun infertilite gibi toksik etkilerini azaltmak için radyoprotektif ajan olarak başlanabileceği kanısına varıldı. Bu kanaatin güçlenmesi ve netleşmesi için daha büyük serili başkaca çalışmalara da ihtiyaç bulunmaktadır.

7.KAYNAKLAR

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
2. Shalet SM. Effect of irradiation treatment on gonadal function in men treated for germ cell cancer. *Eur Urol.* 1993;23(1):148-51; discussion 152. doi: 10.1159/000474584. PMID: 8386642.
3. 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 Aug;83(8):735-46. doi: 10.1007/s00204-008-0382-y. Epub 2008 Nov 18. PMID: 19015832.
4. Clifton DK, Bremner WJ. 1983. The effect of testicular x-irradiation on spermatogenesis in man. A comparison with the mouse. *J Androl.* 4:387–392.
5. Aktoz T, Caloglu M, Yurut-Caloglu V, Yalcin O, Aydogdu N, Nurlu D, Arda E, Inci O. Histopathological and biochemical comparisons of the protective effects of amifostine and l-carnitine against radiation-induced acute testicular toxicity in rats. *Andrologia.* 2017 Nov;49(9). doi: 10.1111/and.12754. Epub 2016 Dec 21. PMID: 28000945.
6. Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril.* 2013 Nov;100(5):1180-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.08.010. Epub 2013 Sep 4. PMID: 24012199; PMCID: PMC3826884.
7. Rainaldi G, Ferrante A, Indovina PL, Santini MT. 2003. Induction of apoptosis or necrosis by ionizing radiation is dose-dependent in MG-63 osteosarcoma multicellular spheroids. *Anticancer Res.* 23:2505–2518.
8. Andrieu MN, Kurtman C, Hicsonmez A, Ozbilgin K, Eser E, Erdemli E. In vivo study to evaluate the protective effects of amifostine on radiation-induced damage of testis tissue. *Oncology.* 2005;69(1):44-51. doi: 10.1159/000087475. Epub 2005 Aug 12. PMID: 16103734.

9. Links M, Lewis C. Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs*. 1999 Mar;57(3):293-308. doi: 10.2165/00003495-199957030-00003. PMID: 10193684.
10. Kierszenbaum, A.L. (2020). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. İstanbul: Palme Yayıncılık.
11. Moore, K.L, Persaud, T.V.N, Torchia M.G. (2015). *Before We are born Essentials of Embryology and Birth Defects*. (9th Ed.). Elsevier.
12. Sadler, T.W. (2012). *Langman Medikal Embriyoloji*. (12th Ed.). Lippincott Williams and Wilkins.
13. Dudek, R.W. (2014). *Embryology*. (6th Ed.). Lippincott Williams and Wilkins.
14. Carlson, B.M. (2019). *Human Embryology and Developmental Biology*. (6th Ed.). Elsevier Saunders.
15. Saija A, Tomaino A, Trombetta D, Pellegrino ML, Tita B, Caruso S, Castelli F. Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. *Eur J Pharm Biopharm*. 2002 Mar;53(2):209-15. doi: 10.1016/s0939-6411(01)00239-9. PMID: 11880005.
16. Schoenwolf, G.C., Bleyl, S.B., Brauer, P.R. (2020). *Larsen's Human Embryology*. (6th Ed.). Elsevier.
17. Arıncı, K., Elhan, A. (2016). *Anatomi*. (6. Baskı). Ankara Güneş Tıp Kitabevi.
18. Sancak, B. C.M. (2015). *Fonksiyonel Anatomi*. (9. Baskı). ODTÜ Yayıncılık.
19. Özbağ, D. (2019). *"İnsan" Anatomi*. İstanbul Tıp Kitabevi.
20. Moore, K.L., Dalley., A.F., Agur, A.M.R. (2018). *Clinically Oriented Anatomy*. (8th Ed.). Wolters Kluwer Health.
21. Putz, R., Pabst, R. (2006). *Sobotta-Atlas of Human Anatomy: Head, Neck, Upper Limb, Thorax, Abdomen, Pelvis, Lower Limb; Two-volume set*. Elsevier
22. Eşrefoğlu, M. (2016). *Genel Histoloji*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi
23. Mescher, A.L. (2018). *Junqueira Temel Histoloji Atlas Kitap*. (15. Baskı) İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
24. Ross, M.H., Pawlina, W. (2013). *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. İstanbul: Palme Yayıncılık.
25. Gartner, L.P., Hiatt, J.L. (2016). *Hücre Biyolojisi ve Histoloji*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi
26. Hess RA. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol Reprod*. 1990 Sep;43(3):525-42. doi: 10.1095/biolreprod43.3.525. PMID: 2271734.
27. Songur A, Karateke H, Tosun M, Gönül Y, Turamanlar O (2016). Ratlarda postnatal dönemde testis dokusu ile kan testis bariyerinin gelişiminin histomorfometrik ve immunohistokimyasal değerlendirilmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi*. 17,52-59.

28. Eroschenko, V.P. (2013). *DiFiore Histoloji Atlası*. İstanbul: Palme Yayıncılık.
29. Müftüoğlu, S., Kaymaz, F., Atilla P. (Ed.) (2009). *Netter Temel Histoloji*. İstanbul: Güneş Tıp Kitapevleri
30. Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod*. 2011 May;84(5):851-8. doi: 10.1095/biolreprod.110.087452. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21209417; PMCID: PMC4574632.
31. Cox, JD, Ang. K.K. (2010). *Radiation Oncology: Rational Technique, Results*. (9th Ed.). Dolores Meloni.
32. Jezek P, Hlavatá L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Dec;37(12):2478-503. doi: 10.1016/j.biocel.2005.05.013. Epub 2005 Aug 1. PMID: 16103002.
33. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1995 Jan;35(1-2):21-39. doi: 10.1080/10408399509527683. PMID: 7748477.
34. Akdemir N. (Ed.). (2021). *İç hastalıkları ve hemşirelik bakımı*. Akademisyen Kitabevi.
35. Ertem G, Kalkım A, Bulut S, Sevil Ü. (2009). Radyoterapi Alan Hastaların Evde Bakım Gereksinimleri ve Yaşam Kaliteleri. *Maltepe Üniversitesi Hemşirelik Bilim ve Sanatı Dergisi*. 2(2), 4–12.
36. Çelik, A. S. (2014). Radyoterapi sonucu gelişen yan etkiler ve hemşirelik yaklaşımı. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(3), 933-947.
37. Aras S, Efendioğlu M, Wulamujiang A, Ozkanli SS, Keleş MS, Tanzer İO. Radioprotective effect of melatonin against radiotherapy-induced cerebral cortex and cerebellum damage in rat. *Int J Radiat Biol*. 2021;97(3):348-355. doi: 10.1080/09553002.2021.1864047. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33320758.
38. Overgaard J, Horsman MR. Modification of Hypoxia-Induced Radioresistance in Tumors by the Use of Oxygen and Sensitizers. *Semin Radiat Oncol*. 1996 Jan;6(1):10-21. doi: 10.1053/SRAO0060010. PMID: 10717158.
39. Fidan, A.F. (2008). DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektrofrezisi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 41-52.
40. Karbownik M, Reiter RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000 Oct;225(1):9-22. doi: 10.1177/153537020022500102. PMID: 10998194.
41. Von Sonntag C. (2006). *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair: A chemical Perspective*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
42. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001. Epub 2006 Aug 4. PMID: 16978905.

43. Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 1994 Jan;65(1):27-33. doi: 10.1080/09553009414550041. PMID: 7905906.
44. Citrin D, Cotrim AP, Hyodo F, Baum BJ, Krishna MC, Mitchell JB. Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. *Oncologist.* 2010;15(4):360-71. doi: 10.1634/theoncologist.2009-S104. PMID: 20413641; PMCID: PMC3076305.
45. Denham JW, Hauer-Jensen M, Peters LJ. Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001 Aug 1;50(5):1105-6. doi: 10.1016/s0360-3016(01)01556-5. PMID: 11483318.
46. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* 2003 Sep;4(9):529-36. doi: 10.1016/s1470-2045(03)01191-4. PMID: 12965273.
47. Cubadda F, Aureli F, Ciardullo S, D'Amato M, Raggi A, Acharya R, Reddy RA, Prakash NT. Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain. *J Agric Food Chem.* 2010 Feb 24;58(4):2295-301. doi: 10.1021/jf903004a. PMID: 20102199.
48. Burk RF, Hill KE. Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:109-34. doi: 10.1146/annurev-nutr-071714-034250. Epub 2015 May 13. PMID: 25974694.
49. Stýblo M, Walton FS, Harmon AW, Sheridan PA, Beck MA. Activation of superoxide dismutase in selenium-deficient mice infected with influenza virus. *J Trace Elem Med Biol.* 2007;21(1):52-62. doi: 10.1016/j.jtemb.2006.11.001. Epub 2007 Jan 8. PMID: 17317526.
50. Bourdon E, Loreau N, Lagrost L, Blache D. Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin. *Free Radic Res.* 2005 Jan;39(1):15-20. doi: 10.1080/10715760400024935. PMID: 15875807.
51. Kolivand S, Amini P, Saffar H, Rezapoor S, Najafi M, Motevaseli E, Nouruzi F, Shabeeb D, Elejo Musa A. Selenium-L-methionine modulates radiation injury and Duox1 and Duox2 upregulation in rat's heart tissues. *J Cardiovasc Thorac Res.* 2019;11(2):121-126. doi: 10.15171/jcvtr.2019.21. Epub 2019 Jun 27. PMID: 31384406; PMCID: PMC6669428.
52. Bagheri H, Rezapour S, Najafi M, Motevaseli E, Shekarchi B, Cheki M, Mozdarani H. Protection Against Radiation-Induced Micronuclei in Rat Bone Marrow Erythrocytes by Curcumin and Selenium L-Methionine. *Iran J Med Sci.* 2018 Nov;43(6):645-652. PMID: 30510341; PMCID: PMC6230935.
53. Amini P, Kolivand S, Saffar H, Rezapoor S, Motevaseli E, Najafi M, Nouruzi F, Shabeeb D, Musa AE. Protective Effect of Selenium-L-methionine on Radiation-induced Acute Pneumonitis and Lung Fibrosis in Rat. *Curr Clin Pharmacol.* 2019;14(2):157-164. doi: 10.2174/1574884714666181214101917. PMID: 30556505; PMCID: PMC7040518.

54. Kanter M, Topcu-Tarladacalisir Y, Parlar S. Antiapoptotic effect of L-carnitine on testicular irradiation in rats. *J Mol Histol.* 2010 Apr;41(2-3):121-8. doi: 10.1007/s10735-010-9267-5. Epub 2010 May 6. PMID: 20446105.
55. Goktepe O, Onder GO, Cetindag E, Bitgen N, Cengiz Mat O, Alisan Suna P, Tufan E, Yalcin B, Baran M, Oz Gergin O, Yay A. The effect of different doses of nonylphenol on the blood-testicular barrier integrity, hormone level, and DNA damage in the testes of rats. *Food Chem Toxicol.* 2023 Jul;177:113816. doi: 10.1016/j.fct.2023.113816. Epub 2023 May 9. PMID: 37164249.
56. Johnsen SG: Testicular biopsy score countda method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970; 1: 2.
57. Badkoobeh P, Parivar K, Kalantar SM, Hosseini SD, Salabat A. Effect of nano-zinc oxide on doxorubicin- induced oxidative stress and sperm disorders in adult male Wistar rats. *Iran J Reprod Med.* 2013 May;11(5):355-64. PMID: 24639766; PMCID: PMC3941413.
58. Jaimala, Bhartiya HC, Pareek BP. Effects of S-2(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid (WR-2721) on the sensitivity of mouse spermatogonia A to radiation. *Acta Radiol Oncol.* 1984;23(1):65-8. doi: 10.3109/02841868409135988. PMID: 6328891.
59. Cakmak Karaer I, Simsek G, Yildiz A, Vardi N, Polat A, Tanbek K, Gurocak S, Parlakpınar H. Melatonin's protective effect on the salivary gland against ionized radiation damage in rats. *J Oral Pathol Med.* 2016 Jul;45(6):444-9. doi: 10.1111/jop.12386. Epub 2016 Jan 12. PMID: 26757153.
60. Ekici K, Temelli O, Parlakpınar H, Samdancı E, Polat A, Beytur A, Tanbek K, Ekici C, Dursun IH. Beneficial effects of aminoguanidine on radiotherapy-induced kidney and testis injury. *Andrologia.* 2016 Aug;48(6):683-92. doi: 10.1111/and.12500. Epub 2015 Nov 27. PMID: 26610736.
61. Shaban NZ, Ahmed Zahran AM, El-Rashidy FH, Abdo Kodous AS. Protective role of hesperidin against γ -radiation-induced oxidative stress and apoptosis in rat testis. *J Biol Res (Thessalon).* 2017 Mar 1;24:5. doi: 10.1186/s40709-017-0059-x. PMID: 28265554; PMCID: PMC5333452.
62. El-Sokkary GH, Nafady AA, Shabash EH. Melatonin administration ameliorates cadmium-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of rat. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2010 Mar;73(3):456-63. doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.09.014. Epub 2009 Nov 12. PMID: 19913298.
63. Aydoğdu N, Erbaş H, Kaymak K. Taurin, melatonin ve n-asetilsisteinin kadmiyuma bağlı akciğer hasarındaki antioksidan etkileri. *Trakya Univ Tip Fak Derg* 2007; 24: 43-8.
64. Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999 Feb 1;154(3):256-63. doi: 10.1006/taap.1998.8586. PMID: 9931285.

65. Potter SJ, DeFalco T. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. *Reproduction*. 2017 Apr;153(4):R151-R162. doi: 10.1530/REP-16-0588. Epub 2017 Jan 23. PMID: 28115580; PMCID: PMC5326597.
66. Li WG, Gavrilu D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL, McCormick ML, Sigmund CD, Tang C, Weintraub NL. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation*. 2004 May 11;109(18):2221-6. doi: 10.1161/01.CIR.0000127956.43874.F2. Epub 2004 Apr 26. PMID: 15117840.
67. Jacob A, Shah KG, Wu R, Wang P. Ghrelin as a novel therapy for radiation combined injury. *Mol Med*. 2010 Mar;16(3-4):137-43. doi: 10.2119/molmed.2009.00154. Epub 2010 Jan 19. PMID: 20101281; PMCID: PMC2810163.
68. Zhang H, Yin Y, Wang G, Liu Z, Liu L, Sun F. Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells. *Sci Rep*. 2014 Mar 3;4:4260. doi: 10.1038/srep04260. PMID: 24584780; PMCID: PMC3939460.
69. Amer ME, Othman AI, Abozaid HM, El-Missiry MA. Utility of melatonin in mitigating ionizing radiation-induced testis injury through synergistic interdependence of its biological properties. *Biol Res*. 2022 Nov 4;55(1):33. doi: 10.1186/s40659-022-00401-6. Erratum in: *Biol Res*. 2023 Jul 12;56(1):39. PMID: 36333811; PMCID: PMC9636653.
70. Emerit I, Quastel M, Goldsmith J, Merkin L, Levy A, Cernjavski L, Alaoui-Youssefi A, Pogossian A, Riklis E. Clastogenic factors in the plasma of children exposed at Chernobyl. *Mutat Res*. 1997 Jan 3;373(1):47-54. doi: 10.1016/s0027-5107(96)00187-x. PMID: 9015152.
71. Le Roy C, Lejeune H, Chuzel F, Saez JM, Langlois D. Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999 Apr-Jun;69(1-6):379-84. doi: 10.1016/s0960-0760(99)00075-8. PMID: 10419015.
72. Lin T, Blaisdell J, Haskell JF. Transforming growth factor-beta inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987 Jul 31;146(2):387-94. doi: 10.1016/0006-291x(87)90541-9. PMID: 3039976.
73. Morera AM, Cochet C, Keramidis M, Chauvin MA, de Peretti E, Benahmed M. Direct regulating effects of transforming growth factor beta on the Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *J Steroid Biochem*. 1988;30(1-6):443-7. doi: 10.1016/0022-4731(88)90139-2. PMID: 3164434.
74. Park E, Song CH, Park JI, Ahn RS, Choi HS, Ko C, Lee K. Transforming growth factor- β 1 signaling represses testicular steroidogenesis through cross-talk with orphan nuclear receptor Nur77. *PLoS One*. 2014 Aug 20;9(8):e104812. doi: 10.1371/journal.pone.0104812. PMID: 25140527; PMCID: PMC4139307.
75. Said RS, Mohamed HA, Kassem DH. Alpha-lipoic acid effectively attenuates ionizing radiation-mediated testicular dysfunction in rats: Crosstalk of NF- κ B, TGF- β , and PPAR- γ pathways. *Toxicology*. 2020 Sep;442:152536. doi: 10.1016/j.tox.2020.152536. Epub 2020 Jul 7. PMID: 32649955.

76. Pointis G, Segretain D. Role of connexin-based gap junction channels in testis. *Trends Endocrinol Metab.* 2005 Sep;16(7):300-6. doi: 10.1016/j.tem.2005.07.001. PMID: 16054834.
77. Pointis G, Fiorini C, Defamie N, Segretain D. Gap junctional communication in the male reproductive system. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Dec 20;1719(1-2):102-16. doi: 10.1016/j.bbamem.2005.09.017. Epub 2005 Oct 17. PMID: 16259941.
78. Pointis G, Gilleron J, Carette D, Segretain D. Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010 May 27;365(1546):1607-20. doi: 10.1098/rstb.2009.0114. PMID: 20403873; PMCID: PMC2871914.
79. Gilleron J, Carette D, Durand P, Pointis G, Segretain D. Connexin 43 a potential regulator of cell proliferation and apoptosis within the seminiferous epithelium. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Jun;41(6):1381-90. doi: 10.1016/j.biocel.2008.12.008. Epub 2008 Dec 24. PMID: 19136074.
80. Sridharan S, Simon L, Meling DD, Cyr DG, Gutstein DE, Fishman GI, Guillou F, Cooke PS. Proliferation of adult sertoli cells following conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biol Reprod.* 2007 May;76(5):804-12. doi: 10.1095/biolreprod.106.059212. Epub 2007 Jan 17. PMID: 17229929.
81. Carette D, Weider K, Gilleron J, Giese S, Dompierre J, Bergmann M, Brehm R, Denizot JP, Segretain D, Pointis G. Major involvement of connexin 43 in seminiferous epithelial junction dynamics and male fertility. *Dev Biol.* 2010 Oct 1;346(1):54-67. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.07.014. Epub 2010 Jul 22. PMID: 20655897.
82. Li MW, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood-testis barrier dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 23;106(25):10213-8. doi: 10.1073/pnas.0901700106. Epub 2009 Jun 9. PMID: 19509333; PMCID: PMC2700929.
83. Li MW, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 19;107(42):17998-8003. doi: 10.1073/pnas.1007047107. Epub 2010 Oct 4. PMID: 20921394; PMCID: PMC2964254.
84. Cheng CY, Wong EW, Lie PP, Li MW, Su L, Siu ER, Yan HH, Mannu J, Mathur PP, Bonanomi M, Silvestrini B, Mruk DD. Environmental toxicants and male reproductive function. *Spermatogenesis.* 2011 Jan;1(1):2-13. doi: 10.4161/spmg.1.1.13971. PMID: 21866273; PMCID: PMC3158642.
85. Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS. The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update.* 2000 Mar-Apr;6(2):149-59. doi: 10.1093/humupd/6.2.149. PMID: 10782573.
86. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science.* 1990 May 18;248(4957):850-4. doi: 10.1126/science.2188360. PMID: 2188360.

87. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2000 Oct;20(19):7146-59. doi: 10.1128/MCB.20.19.7146-7159.2000. PMID: 10982831; PMCID: PMC86268.
88. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 16;93(8):3264-8. doi: 10.1073/pnas.93.8.3264. PMID: 8622925; PMCID: PMC39594.
89. Feng HL, Sandlow JI, Sparks AE. Decreased expression of the heat shock protein hsp70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility. *Fertil Steril.* 2001 Dec;76(6):1136-9. doi: 10.1016/s0015-0282(01)02892-8. PMID: 11730740.
90. Siu MK, Lee WM, Cheng CY. The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor- α , gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. *Endocrinology.* 2003 Jan;144(1):371-87. doi: 10.1210/en.2002-220786. PMID: 12488366.
91. Qiu L, Qian Y, Liu Z, Wang C, Qu J, Wang X, Wang S. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) disrupts blood-testis barrier by down-regulating junction proteins via p38 MAPK/ATF2/MMP9 signaling pathway. *Toxicology.* 2016 Dec 12;373:1-12. doi: 10.1016/j.tox.2016.11.003. Epub 2016 Nov 3. PMID: 27818224.
92. Jesus TT, Oliveira PF, Silva J, Barros A, Ferreira R, Sousa M, Cheng CY, Silva BM, Alves MG. Mammalian target of rapamycin controls glucose consumption and redox balance in human Sertoli cells. *Fertil Steril.* 2016 Mar;105(3):825-833.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.11.032. Epub 2015 Dec 14. PMID: 26698679; PMCID: PMC4845725.
93. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev.* 2016 Jan;96(1):1-17. doi: 10.1152/physrev.00013.2015. PMID: 26537427; PMCID: PMC4698398.
94. Yao C, Liu Y, Sun M, Niu M, Yuan Q, Hai Y, Guo Y, Chen Z, Hou J, Liu Y, He Z. MicroRNAs and DNA methylation as epigenetic regulators of mitosis, meiosis and spermiogenesis. *Reproduction.* 2015 Jul;150(1):R25-34. doi: 10.1530/REP-14-0643. Epub 2015 Apr 7. PMID: 25852155.
95. Angelopoulou R, Balla M, Lavranos G, Chalikias M, Kitsos C, Baka S, Kittas C. Evaluation of immunohistochemical markers of germ cells' proliferation in the developing rat testis: a comparative study. *Tissue Cell.* 2008 Feb;40(1):43-50. doi: 10.1016/j.tice.2007.09.004. Epub 2007 Oct 29. PMID: 18028970.
96. Steger K, Aleithe I, Behre H, Bergmann M. The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod.* 1998 Mar;4(3):227-33. doi: 10.1093/molehr/4.3.227. PMID: 9570268.
97. Wrobel KH, Bickel D, Kujat R. Immunohistochemical study of seminiferous epithelium in adult bovine testis using monoclonal antibodies against Ki-67 protein

and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Cell Tissue Res.* 1996 Feb;283(2):191-201. doi: 10.1007/s004410050529. PMID: 8593648.

98. Park JM, Yang SW, Yu KR, Ka SH, Lee SW, Seol JH, Jeon YJ, Chung CH. Modification of PCNA by ISG15 plays a crucial role in termination of error-prone translesion DNA synthesis. *Mol Cell.* 2014 May 22;54(4):626-38. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.031. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24768535.

99. Kubota T, Nishimura K, Kanemaki MT, Donaldson AD. The Elg1 replication factor C-like complex functions in PCNA unloading during DNA replication. *Mol Cell.* 2013 Apr 25;50(2):273-80. doi: 10.1016/j.molcel.2013.02.012. Epub 2013 Mar 14. PMID: 23499004.

100. De Biasio A, de Opakua AI, Mortuza GB, Molina R, Cordeiro TN, Castillo F, Villate M, Merino N, Delgado S, Gil-Cartón D, Luque I, Diercks T, Bernadó P, Montoya G, Blanco FJ. Structure of p15(PAF)-PCNA complex and implications for clamp sliding during DNA replication and repair. *Nat Commun.* 2015 Mar 12;6:6439. doi: 10.1038/ncomms7439. PMID: 25762514.

101. Khan S, Adhikari JS, Rizvi MA, Chaudhury NK. Radioprotective potential of melatonin against ⁶⁰Co γ -ray-induced testicular injury in male C57BL/6 mice. *J Biomed Sci.* 2015 Jul 24;22(1):61. doi: 10.1186/s12929-015-0156-9. Erratum in: *J Biomed Sci.* 2022 Nov 2;29(1):91. PMID: 26205951; PMCID: PMC4514449.

102. Amer ME, Othman AI, Abozaid HM, El-Missiry MA. Utility of melatonin in mitigating ionizing radiation-induced testis injury through synergistic interdependence of its biological properties. *Biol Res.* 2022 Nov 4;55(1):33. doi: 10.1186/s40659-022-00401-6. Erratum in: *Biol Res.* 2023 Jul 12;56(1):39. PMID: 36333811; PMCID: PMC9636653.

103. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol.* 2000 Mar;164(3):247-53. doi: 10.1677/joe.0.1640247. PMID: 10694364.

104. Stocco DM. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:193-213. doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.193. PMID: 11181954.

105. Vilchis F, Enriquez J, Queipo G, Pérez-Palacios G, Chávez B. Steroid 5 alpha-reductase activity in the Harderian glands of male and female Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Gen Comp Endocrinol.* 1994 Nov;96(2):298-308. doi: 10.1006/gcen.1994.1185. PMID: 7851730.

106. Ramos L, Chávez B, Vilchis F. Cloning and differential expression of steroid 5 alpha-reductase type 1 (*Srd5a1*) and type 2 (*Srd5a2*) from the Harderian glands of hamsters. *Gen Comp Endocrinol.* 2010 Apr 1;166(2):388-95. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.12.010. Epub 2009 Dec 16. PMID: 20018190.

107. Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colón E, Svechnikova I, Söder O. Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr.* 2010;73(2):93-101. doi: 10.1159/000277141. Epub 2010 Feb 9. PMID: 20190545.