



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇAN TESTİSİNDE MELATONİNİN
RADYOTERAPİ HASARINA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ESRA ERDEM

**TEZ DANIŐMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ TANSEL SAPMAZ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ
OCAK/2023**

İTHAF

“Tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen sevgili eşim Emre’ye, varlıklarıyla bana güç veren çocuklarım Mehmet Kerem ve Ahmet Selim’e ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca ilgisini eksik etmeyen, destek veren sözleriyle çalışma azmimi arttıran, engin bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Tansel SAPMAZ'a, tezimin birçok aşamasında yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nın kıymetli hocaları Dr. Öğr. Üyesi Esra ÇIKLER ve Dr. Öğr. Üyesi Halime Tuba CANBAZ'a,

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren, deneklerimize radyoterapi uygulama sürecini birlikte yürüttüğümüz SBÜ Hamidiye SHMYO Öğretim Üyesi Doç. Dr. Serhat ARAS'a, deneylerin biyokimyasal analizlerine katkı sağlayan SBÜ Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Eray Metin GÜLER'e, bulgularımızın istatistiksel analizlerini değerlendiren SBÜ Hamidiye SHMYO Öğretim Elemanı Öğr. Gör. Dr. Kürşat Nuri BAYDİLİ'ye, Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde floresan mikroskop görüntülemeleri için çalışmamıza destek olan Dr. Öğr. Üyesi Gamze Yeşilay'a,

Tez çalışmamın başından sonuna kadar destek olan, tüm bilgi ve deneyimlerini paylaşan SBÜ UTF Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Araş. Gör. Kübra ŞEVGİN'e, SBÜ Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Araş. Gör. Sude TOPKARAOĞLU'na ve Kübra BAŞOL'a, deneysel aşamalarda destek olan Dr. Öğr. Üyesi Emine KIZILAY'a, Muhammetnur TEKAYEV'a ve Fatma GÜMÜŞKAYA'ya,

Hamidiye Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nın değerli hocaları Vet. Hekim Dr. Cumaali DEMİRTAŞ ve Ali Fuat KAPLAN'a, Hamidiye Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü yöneticileri ve memurlarına, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli yöneticileri ve personellerine,

Hayatım boyunca her zaman desteğini hissettiğim sevgili anneme, babama ve abime, tez sürecimde en büyük fedakarlığı gösteren sevgili eşime, canım evlatlarım Mehmet Kerem ve Ahmet Selim'e sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
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	3
2.1.3. Testislerin Gelişimi	4
2.1.4. Genital Kanalların Gelişimi.....	5
2.1.5. Testislerin İnişİ	6
2.2. TESTİSİN ANATOMİSİ.....	6
2.3. TESTİSİN HİSTOLOJİSİ.....	8
2.3.1. İnterstisyel Doku	8
2.3.2. Seminifer Tübüller.....	9
2.3.3. Testis İçi Genital Kanallar	14
2.3.4. Genital Boşaltım Kanalları	15
2.3.5. Kan-Testis Bariyeri ve Sıkı Bağlantılar	16
2.4. ZONULA OKLUDENS-1	19
2.5. LEKTİN	19
2.6. RADYOTERAPİ.....	20
2.6.1. Kanser ve Radyoterapi	20
2.6.2. Moleküler Oksijenin Varlığı ve Radyasyon	20
2.6.3. Radyoterapi ve DNA Hasarı.....	21
2.6.4. Radyoterapi ve Serbest Radikaller	22
2.6.5. Radyoterapi ve FFF Teknolojisi	23

2.7. APOPTOZ.....	23
2.8. MELATONİN	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. GEREÇ.....	26
3.1.1. Kimyasal Malzemeler.....	26
3.1.2. Cihazlar.....	26
3.1.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	27
3.2. YÖNTEM.....	28
3.2.1 Deneklerin Seçimi ve Deney Gruplarının Oluşturulması.....	28
3.2.2. Melatonin Uygulaması	30
3.2.3. Radyoterapi Uygulaması	30
3.2.4. Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması	31
3.2.5. Örneklerin Histolojik Analizleri.....	33
3.2.6. Örneklerin Biyokimyasal Analizleri.....	39
3.2.7. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
4.1. MORFOMETRİK BULGULAR	41
4.2. MORFOLOJİK BULGULAR.....	42
4.2.1. Işık Mikroskopik Bulgular	42
4.2.2. Floresan Mikroskop Bulguları.....	52
4.3. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERE AİT BULGULAR	59
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR	78
EKLER.....	88

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Deneklerin gruplarının ağırlıklarının belirlenmesi.....	29
Tablo 3.2: Doku takibi basamakları.....	33
Tablo 3.3: H&E Boyama Basamakları	34
Tablo 3.4: Johnsen Testisküler Biyopsi Skorlaması	35
Tablo 3.5: TUNEL boyama basamakları.....	38
Tablo 4.1: Deney gruplarının morfometrik verilerinin ortalama ve standart sapma değerleri	41
Tablo 4.2: Deney gruplarında JTBS ortalama ve standart sapma değeri.....	47
Tablo 4.3: Deney grupları arasında apoptotik yüzde verileri (%) verilerinin karşılaştırılması.....	48
Tablo 4.4: ZO-1 ve Lectin PNA antikorunun gruplar arasındaki H- SKOR değerleri	53
Tablo 4.5: ZO-1 ve Lectin PNA immünofloresan boyanma dereceleri. (+): zayıf, (++): orta, (+++): güçlü.....	53
Tablo 4.6: Serum ve testiküler doku TAS, TOS ve OSI değerlerine ait ortalama ve standart sapma değerleri	59
Tablo 4.7: Deney grupları arasında doku TAS değerlerinin karşılaştırılması	60
Tablo 4.8: Deney grupları arasında doku TOS değerlerinin karşılaştırılması	60
Tablo 4.9: Deney grupları arasında doku OSI değerlerinin karşılaştırılması	61
Tablo 4.10: Deney grupları arasında serum TAS değerlerinin karşılaştırılması	62
Tablo 4.11: Deney grupları arasında serum TOS değerlerinin karşılaştırılması	62
Tablo 4.12: Deney grupları arasında serum OSI değerlerinin karşılaştırılması.....	63

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: Epididimis ve testisin vertikal kesiti,	7
Şekil 2.4: Testis ve genital kanallar.....	9
Şekil 2.5: Seminifer tübülün bir kısmının çevre dokular ile gösterilmesi.....	10
Şekil 2.6: Testis seminifer tübüleri ve intertistumun histolojik görüntüsü	11
Şekil 2.7: Spermatogenez	12
Şekil 2.8: Spermin yapısı.....	13
Şekil 2.9: Seminifer epiteldeki sıkı bağlantı yapıları	17
Şekil 2.10: Sertoli hücre duvarındaki sıkı bağlantılar ve aktinle olan ilişkileri	18

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: Bolus malzemesi yerleştirilen deneklere radyoterapi uygulanması.....	31
Resim 3.2: Sıçanın supin pozisyonda sabitlenmesi	32
Resim 3.3: Testis dokusunun cerrahi olarak çıkarılması	32
Resim 4.1: G1 (Kontrol) grubu testis dokusu ışık mikroskobu görüntüsü	43
Resim 4.2: G2 (DDHR) ve G3 (DDHR+MEL) gruplarında testis dokusu ışık mikroskobu	44
Resim 4.3: G4 (YDHR) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarında testis dokusu ışık mikroskobu görüntüleri.....	45
Resim 4.4: Bütün deney gruplarına ait testis dokularının ışık mikroskobu görüntüleri.	46
Resim 4.5: G1 (Kontrol) grubunda TUNEL pozitif (+) germ hücresinin ışık mikroskobu görüntüsü	48
Resim 4.6: G2 (DDHR) ve G3 (DDHR+MEL) gruplarında TUNEL pozitif (+) germ hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri	49
Resim 4.7: G4 (YDHR) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarında TUNEL pozitif (+) germ hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri	50
Resim 4.8: Bütün deney gruplarına ait testis dokularında TUNEL pozitif (+) germ hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri	51
Resim 4.9: G1 (Kontrol) grubu testis dokusunda ZO-1 ve Lectin PNA antikorlarının floresan mikroskop görüntüleri.....	54
Resim 4.10: G1 (Kontrol) grubu testis dokusunda ZO-1 ve Lectin PNA antikorlarının floresan mikroskop görüntüsü	54
Resim 4.11: G2 (DDHR) (A), G3 (DDHR+MEL) (B) gruplarında ZO-1 ve Lectin PNA antikorlarının floresan mikroskop görüntüleri.....	55
Resim 4.12: G4 (YDHR) (A), G5 (YDHR+MEL) (B) gruplarında ZO-1 ve Lectin PNA (antikorlarının floresan mikroskop görüntüleri.....	56
Resim 4.13: ZO-1 ve Lectin PNA antikorlarının floresan mikroskop görüntüleri	57
Resim 4.14: ZO-1 ve Lectin PNA antikorlarının floresan mikroskop görüntüleri	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Arteria
AI	: Apoptotik İndeks
AMH	: Anti Müllerian Hormon
APUD	: Amine Precursor Uptake Decarboxylase
BSA	: Bovine Serum Albümin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FF	: Flattening Filter
FFF	: Flattening Filter Free
H&E	: Hematoksilen & Eozin
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IMRT	: Intensity-Modulated Radiotherapy
İ.P	: İntraperitoneal
M	: Muscularis
MAGUK	: Membrane-Associated Guanylate Kinase
MU	: Monitor Unit
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PFA	: Paraformaldehid
RT	: Radyoterapi
SBRT	: Stereotactic Body Radiotherapy
SER	: Agranüler Endoplazmik Reticulum
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
SRS	: Stereotactic Radiosurgery
SRY	: Y Kromozomu Üzerindeki Cinsiyet Belirleyici Bölge
TAS	: Total Antioksidan Seviye
TBF	: Testis Belirleyici Faktör Geni
TEM	: Transmission Electron Microscope
TOS	: Total Oksidan Seviye
TUNEL	: Tdt-Dutp Nick-End-Labeling
VMAT	: Volumetric Modulated Arc Therapy
ZO-1	: Zonula Okludens-1

SIÇAN TESTİSİNDE MELATONİNİN RADYOTERAPİ HASARINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Sıçanlarda düşük ve yüksek doz hızlı radyoterapinin neden olduğu akut testis hasarına karşı melatoninin radyokoruyucu etkisinin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: 12 haftalık 40 erişkin erkek sıçan 5 gruba ayrıldı (n=8). Grup 1 (Kontrol) sıçanlarına hiçbir işlem uygulanmadı. Grup 2 (Düşük doz hızlı radyoterapi (DDHR) grubu) ve Grup 4 (Yüksek doz hızlı radyoterapi (YDHR) grubu) sıçanlarının abdominopelvik bölgelerine tek doz 8 Gy radyoterapi sırasıyla, 400 MU/min ve 1400 MU/min doz hızlarında uygulandı. Grup 3 (Düşük doz hızlı radyoterapi + Melatonin (DDHR+MEL) grubu) ve Grup 5 (Yüksek doz hızlı radyoterapi + Melatonin (YDHR+MEL) grubu) sıçanlarına tek doz 8 Gy radyoterapi sırasıyla, 400 MU/min ve 1400 MU/min doz hızlarında uygulanıp, radyoterapiden 15 dakika önce sıçanlara 50mg/kg/intraperitoneal melatonin verildi. Radyoterapiden 48 saat sonra sakrifikasyon yapıldı. Testis dokularının histolojik ve biyokimyasal analizleri yapıldı.

Bulgular: Yalnız radyoterapi uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde ($p<0,001^*$); Johnsen skoru ve doku antioksidan değerleri düşerken, doku oksidan değerleri ve apoptotik veriler arttı. Radyoterapi ile birlikte melatonin uygulanan gruplarda; seminifer tübül epitellerinde ve bazal membranda düzensizlik, spermatogenik seri hücrelerinin ve spermatozoonların sayısında azalma, vakuolizasyon ve apoptoz gibi bulgular hafifti. Ayrıca ZO-1 ve Lectin, DDHR+MEL ve YDHR+MEL gruplarında, DDHR ve YDHR gruplarına göre daha belirgin gözlemlendi.

Sonuç: Melatoninin düşük ve yüksek doz hızlı radyoterapinin yol açtığı testis hasarının önlenmesinde faydalı olduğu gösterilmiştir. Ancak radyoterapinin bu iki doz hızı arasında, testis hasarı ve melatoninin etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

Anahtar Kelimeler: Floresan mikroskop; Melatonin; Radyoterapi; Testis; TUNEL

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MELATONIN ON RADIOTHERAPY DAMAGE IN RAT TESTIS

ABSTRACT

Aim: To examine the radioprotective effect of melatonin against acute testicular damage caused by low and high dose rate radiotherapy in rats.

Materials and Methods: 40 adult male rats, 12 week old, were divided into 5 groups (n=8). No procedures were performed on Group 1 (Control) rats. A single dose of 8 Gy radiotherapy was applied to the abdominopelvic regions of Group 2 (Low dose rate radiotherapy (LDRR) group) and Group 4 (High dose rate radiotherapy (HDRR) group) rats at dose rates of 400 MU/min and 1400 MU/min, respectively. Single dose 8 Gy radiotherapy was administered to Group 3 (Low dose rate radiotherapy + Melatonin (LDRR+MEL) group) and Group 5 (High-dose rate radiotherapy + Melatonin (HDRR+MEL) group) rats at dose rates of 400 MU/min and 1400 MU/min, respectively. 50 mg/kg/intraperitoneal melatonin was given to rats 15 minutes before radiotherapy. Sacrification was performed 48 hours after radiotherapy. Histological and biochemical analyzes of testicular tissues were performed.

Results: In the radiotherapy-only groups, the Johnsen score and tissue antioxidant values decreased significantly compared to the control group ($p < 0.001^*$), while the tissue oxidant values and apoptotic data increased. Irregularity in the seminiferous tubule epithelium and basement membrane, decrease in the number of spermatogenic series cells and spermatozoa, vacuolization and apoptosis were mild in the groups that received melatonin together with radiotherapy. In addition, ZO-1 and Lectin were observed more prominently in the LDRR+MEL and HDRR+MEL groups compared to LDRR and HDRR groups.

Conclusion: There is no significant difference between these two dose rates of radiotherapy in terms of testicular damage and the effect of melatonin. Melatonin may be useful in preventing testicular damage caused by low and high dose rate radiotherapy.

Key Words: Fluorescence microscope; Melatonin; Radiotherapy; Testis; TUNEL

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hasta sağ kalımını ve yaşam kalitesini azaltan hastalıklardan biridir. Kanser tedavisinde genel olarak cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi (RT) uygulamaları koordineli olarak planlanmaktadır. RT ya tek başına ya da cerrahi ve kemoterapi ile uygulanan bir tedavi yöntemidir. Tüm kanser hastalarının %50-60'ında tedavi sürecinin bir parçası olarak kullanılır. Özellikle abdominopelvik kanserlerin tedavisinde modern radyoterapi tekniklerinin kullanılması büyük önem taşımaktadır (1).

Testis kanseri 15-35 yaş aralığındaki erkeklerde en sık rastlanılan kanser türüdür. Erkeklerde, tüm kanserlerin %1'ini oluşturmaktadır (2). İleri evre olgularda dahi %80'lere ulaşan başarı oranları ile tedavi edilebilen kanser türlerindedir (3,4). Özellikle birinci evre testis kanseri tedavisinde RT başarısı %100'leri bulmaktadır (5). Testis kanserinde, RT ile tedavi sonrası sağ kalım süresi uzamakta ve yaşam kalitesi artmaktadır (6).

RT'nin en büyük avantajlarından biri, lokal etkisi ile tümör büyümesini engellemesidir. Ancak prosedür aynı zamanda tedavi edici özellikte olmasına rağmen ışınlamaya maruz kalan sağlıklı dokular üzerinde olumsuz etkilere sebep olabilmektedir (7,8). Yüksek radyasyon dozlarının kullanıldığı modern radyoterapi teknikleri ile tümör bölgesine letal doz kontrollü ve kesin bir şekilde verilirken hedeflenen hacmin dışında kalan sağlıklı dokuda oluşabilecek hasarlar azaltılarak tedavi edilmektedir. Bu nedenle modern RT tekniklerinin temel amacı, hedeflenen hücreleri yok ederken etrafındaki sağlıklı yapıları korumaktır (6,9).

Spermatogenez, uzun, karmaşık ve hassas bir süreçtir. Sitotoksik üreme ajanlarına maruz kalmak, germ hücrelerine farklı aşamalarda zarar verebilir (10). İyonize radyasyonun spermatogenezini azalttığı, çeşitli hormonların üretimini değiştirdiği ve kısırlığa neden olduğu bilinmektedir (6). Çalışmalar, RT etkisiyle özellikle spermatogonyal kök hücre kayıplarına bağlı kalıcı infertilitenin oluşabileceğini göstermiştir (11).

Biyolojik bir ortamda geçen iyonize radyasyon ile canlılar arasındaki etkileşimler ve bunların sonuçları literatürde tartışılmaktadır. İyonize X ışınlarının biyolojik etkileri, hücrelerdeki moleküler yapıların bozulmasıyla ortaya çıkmaktadır.

Hücredeki tüm yapılar, iyonize radyasyondan zarar görebilmekle beraber en çok Deoksiribonükleik Asit (DNA) etkilenmektedir. İyonize X ışınlarının düşük dozları bile Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) üreterek DNA, lipid ve protein membran hasarına yol açabilmektedir (12-14).

Antioksidanların, SOR'un neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri bilinmektedir. Antioksidanlar süpürücü etkisi ile RT'nin sebep olduğu DNA hasarlarını azaltma potansiyeline sahiptir. SOR ile antioksidanlar arasında bir denge bulunmaktadır. Bu dengenin korunması, organizmanın hayati fonksiyonlarını devam ettirmesi açısından önemlidir (15). Melatonin günümüzde kullanılan en güçlü antioksidandır (16). Hidrofilik özelliği sayesinde kan-beyin bariyerini kolayca geçmektedir ve subsellüler kompartmanların tümüne hızla diffüze olabilmektedir (17).

Bu tez çalışmasının amacı; erişkin erkek sıçan modellerinin abdominopelvik bölgelerine düşük ve yüksek doz hızlarında tek doz olarak uygulanan iyonize X ışınlarının testis dokusunda oluşturduğu erken dönem hasara karşı ideal doz hızını ve melatoninin radyokoruyucu etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

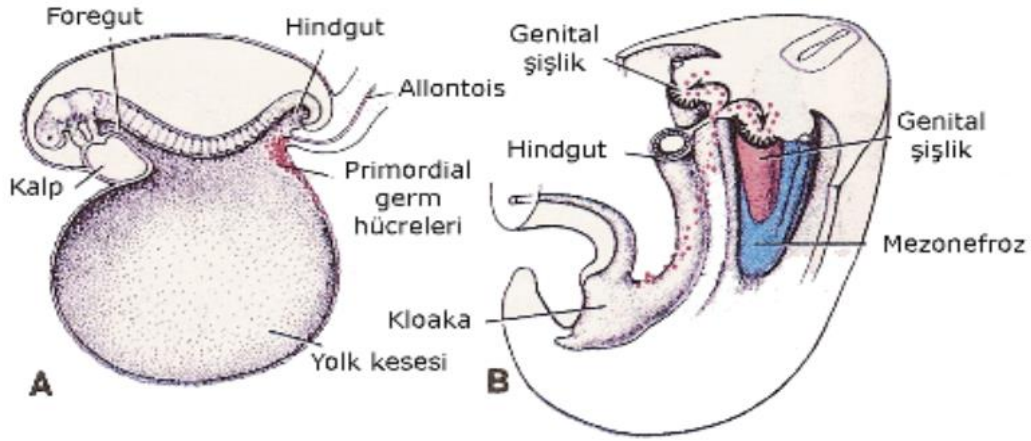
2.1. TESTİSİN EMBRİYOLOJİSİ

2.1.1. Gonadların Gelişimi

Primordiyal germ hücreleri vitellus kesesi duvarında, dördüncü haftanın başında endodermal hücreler arasında ortaya çıkar. Yaklaşık 10-100 adet primordiyal germ hücresi, embriyonik gelişimin dördüncü ve altıncı haftaları arasında ameboid hareketler yaparak gonadal bölgeye doğru göç ederler. 10. torasik vertebra seviyesine yakın alanda, mezenşim içinde yaklaşık 2500-5000 kadar primordiyal germ hücresi bulunur ve bir çift genital kabarıklık oluşturmak için, mezonefroz hücreleriyle sölomik örtü epitelinin hücrelerinin proliferasyonu için uyarırlar (Şekil 2.1). Farklılaşmamış gonadın dışta korteks ve içte medulla bölgelerini oluşturmak üzere sölomik epitelyal kordonlar, gonadal kabarıklığın mezenşimi içine doğru büyürler. Gonadlar fetal gelişimin yedinci haftasına kadar farklılaşmamıştır. Testis belirleyici faktör (TBF) için gerekli olan SRY geni (Y kromozomu üzerindeki cinsiyet belirleyici bölge), erkek fenotipinin gelişimi için gerekli olan Y kromozomunun kısa kolunda bulunmaktadır. Y kromozomu ile düzenlenen ve testiküler farklılığı sağlayan TBF etkisi altında embriyoda erkek bireyi oluşturmak üzere farklılaşmamış gonadın korteksi dejenere olur ve medullası ise testisi oluşturur (18,19).

2.1.2. Cinsiyetin Belirlenmesi

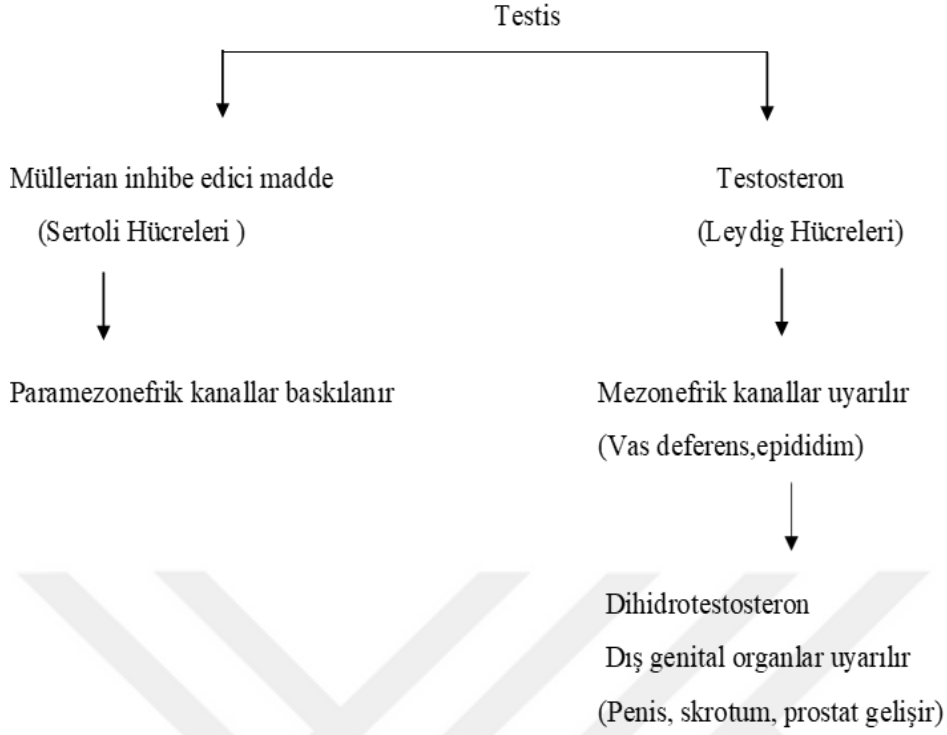
Döllenme sonrası, embriyo XY kromozomuna sahip ise cinsiyet erkektir (20). Fenotipik cinsiyet farklılaşması yedinci haftadan itibaren başlar ve dış cinsel organın özellikleri on ikinci haftadan sonra tanınabilir duruma gelir. Fenotipik cinsel farklılaşma önce gonadlarda başlar ve gelişimin yirminci haftasında tamamlanır (Şekil 2.2). Dış genital primordiyaların ve genital duktusun gelişimi ile devam eder (21). Normal erkek cinsiyet gelişimini, fetal testisler tarafından üretilen dihidrotestosteron, testosteron ve antimüllerian hormon (AMH) belirlemektedir (19).



Şekil 2.1: A: Üç haftalık embriyoda vitellus kesesi duvarında, allontoise yakın primordial germ hücreleri. B: Primordial germ hücrelerinin, göç yolu (20)

2.1.3. Testislerin Gelişimi

Testis belirleyici faktör (TBF), Y kromozomu tarafından düzenlenir ve testiküler farklılaşmayı sağlar. Farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişiminde, TBF için SRY geninin etkisi görülmektedir (19). Farklılaşmamış stromal hücrelerin, SRY'nin bir transkripsiyon faktörü olan SOX9'u indüklemesiyle, sertoli hücreleri farklılaşma için uyarılır (22). TBF faktörün etkisi ile gonodal kordonlar, seminifer kordonlara farklılaşır. Kalın fibröz yapıda bir kapsül olan, tunica albuginea gelişir ve yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Gonodal kordonların dış kısımları seminifer tübülleri, iç kısımları ise dallanıp anastomoz yaparak rete testisi oluşturur (19). Testis kordonları puberteye kadar solid halde iken puberteden sonra lümenleri açılarak seminifer tübüllere farklılaşırlar. Seminifer tübüller kanalize olduktan sonra rete testis tübülleri ile birleşir ve duktuli efferenteslere girerler. Mezonefrik sistemin boşaltım tübülleri olan bu efferent kanallar duktus deferens olarak bilinir ve rete testis ile Mezonefrik (Wolffian) kanalları bağlar (20). İntertisyel/Leydig hücreleri seminifer tübüller arasındaki mezodermden köken alırlar ve sekizinci hafta itibariyle testosteron ve androstenedion salgılamaya başlarlar (19).



Şekil 2.2: Erkek cinsiyetin farklılaşmasında gonadların rolü (20)

2.1.4. Genital Kanalların Gelişimi

Gelişimin beşinci ve altıncı haftaları arasında genital sistem farklılaşmamıştır. Mezonefrik (Wolffian) ve Paramezonefrik (Müllerian) olmak üzere genital kanallar iki çift olarak bulunmaktadır. Erkek üreme sisteminin gelişiminde mezonefrik kanallar, dişi üreme sisteminin gelişiminde ise paramezonefrik kanallar etkilidir (17). Paramezonefrik kanallar, altıncı haftada hem dişi hem erkek embriyolarda mezonefrik kanalların lateralinde oluşmaya başlar (21). Mezonefrik kanallar ise epididim, duktus deferens, seminal vezikül ve ejakülatör kanalı oluşturmaya devam ederken testisteki birkaç mezonefrik tübül, testislerin eferent kanallarını oluşturur (19).

Gelişimin altıncı ve yedinci haftaları arasında paramezonefrik kanalların gerilemesini sağlayan AMH Sertoli hücreleri tarafından salgılanır. Leydig hücrelerinin sekizinci haftada salgıladıkları testosteron ise hücrelerin içine girip kalabilir ya da dihidrotestosteron hormonuna dönüşebilir. Testosteron, mezonefrik kanalların virilizasyonunu sağlarken dihidrotestosteron, erkek dış genitallerinin farklılaşmasında etkilidir (20). Bu dönemde testosteronun etkisiyle, her bir mezonefrik kanalın proksimal kısımları kıvrıntılı hale gelerek duktus epididimisi oluşturur. Mezonefrik kanallar

dejenere olduğunda da bu kanallardan bazıları kalıcıdır ve duktuli efferentesi oluştururlar. Epididimise açılan bu duktuslar, epididimin distalinde mezonefrik kanala kalın düz kas tabakası katılır ve duktus deferens oluşur (19).

2.1.5. Testislerin İnişi

Testisler, mezonefroz karın arka duvarına ikinci ayın sonunda ürogenital mezenter ile bağlı durumdadır. Mezonefroz dejenere olduktan sonra bu bağlar, gonadın mezenteri haline gelir. Ligament haline gelen bu mezenterin kaudali, kaudal genital ligamet adını alır. Testisin kaudalinden çıkan, ekstraselüler matriksten zengin yoğun mezenşimal yapıya ise gubernakulum adı verilir (20). Yedi ve on ikinci haftalar arasında testislerin skrotuma inişine rehberlik eden gubernakulum, testisi skrotum içinde sabitler. Proessus vajinalisi oluşturmak için periton gubernakulum ile açığa çıkar ve testisler tunica vajinalis adı verilen kese oluşumuna katılır (21,23). Testisler gestasyonun yaklaşık on ikinci haftasında inguinal bölgeye gelir, yirmi sekizinci haftada inguinal kanaldan geçer ve otuz üçüncü haftada androjenler ve AMH gibi hormonların etkisiyle skrotuma ulaşır (20). Skrotuma ulaşan testisler, inguinal kanal ve spermatik kord etrafında kasılır. Yenidoğanların %3'ünden daha azında testisler skrotum içine bulunmayabilir. Doğumdan sonraki ilk üç ay içinde inmemiş testislerin çoğu skrotuma iner. Testiküler damarların oluşumu, testisler posterior abdominal duvar seviyesindeyken gerçekleşir. Skrotuma inişi sırasında organlar, duktus deferensi ve damarları da birlikte taşınırlar daha sonra fasiyal uzantıları ile sarılırlar (19).

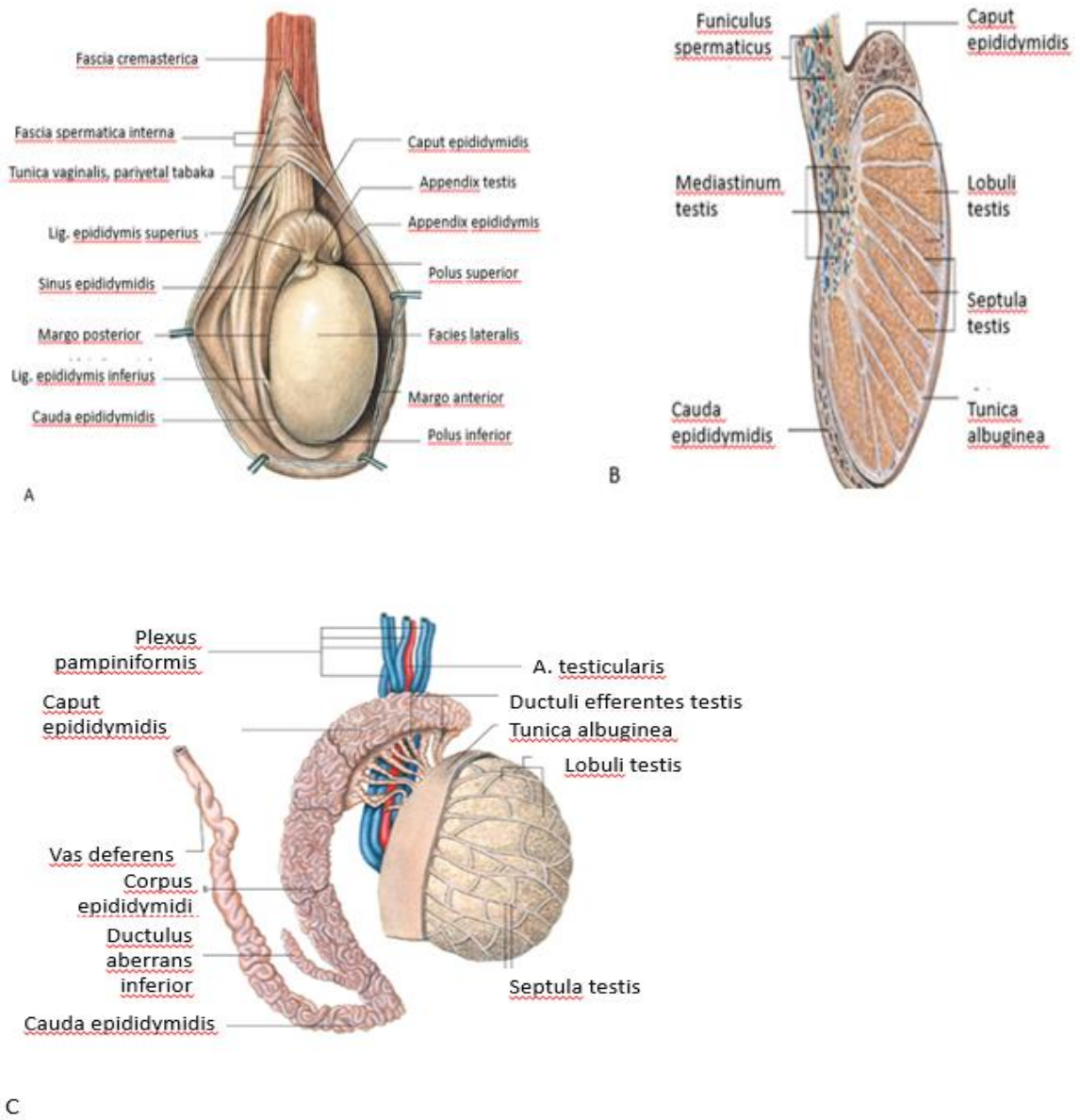
2.2. TESTİSİN ANATOMİSİ

Skrotum içerisinde oblik pozisyonda bulunan testisler (orcis), funiculus spermaticus'a asılı olarak bulunurlar. Her biri yaklaşık 10-14 gr olan testislerden sol testis sağ testise göre genellikle 1 cm daha aşağıda bulunmaktadır. Yetişkin erkeklerde uzunluğu 4-5 cm, genişliği 2-3 cm ve kalınlığı 3 cm'dir. Septum scroti ile birbirlerinden ayrılan testisler, lateralden mediale doğru tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosa tabakaları ile sarılırlar (Şekil 2.3).

Processus vaginalis'in distal ucu olan tunica vaginalis, lamina visceralis (epiorchium) ve lamina parietalis (periorchium) olmak üzere iki yapraktan oluşur. Lamina visceralis, testisin ön kenarlarını ve iki yüzünü örterken; arka kenarın medial ve

lateral taraflarında kendi üstüne kıvrılır ve lamina parietalis ile devam eder. Bu iki yaprak arasındaki boşlukta az miktarda seröz bir sıvı bulunur.

Sağ ve sol a. testicularis, a. renalis'lerin biraz aşağısında aorta'nın ön yüzünden ayrılan bir çift arterdir. Testis ve epididimis, aorta abdominalis'in dalı olan a.testicularis'ten beslenir. A. testicularis birçok dala ayrılır ve bu dallardan 2-4 tanesi ductus deferens boyunca uzanarak epididimis'i, tunica albuginea'nın arka kısmını delerek testise giren diğer dallar ise bu organı besler (24-26).



Şekil 2.3: A: Sol testisin anatomik yapısı, B: Epididimis ve testisin vertikal kesiti, C: Testis kanallarının düzeni ve vas deferens'in oluşum şekli (27)

Tunica vaginalis'in altında yüzeysel lenf damarları bulunurken, testis ve epididimis içinde derin lenf damarları bulunur. Bu damarlar ile funiculus spermaticus karın boşluğuna geçer ve nodi aortici laterals ve nodi preaotici'ye açılır (25).

Testis otonom sinir sistemi tarafından kontrol edilir. Sempatik innervasyonu medulla spinalis'in 10-11. torakal vertebra segmentlerinden kaynaklanır, damarların çevresindeki pleksuslar aracılığı ile gelir. Parasempatik innervasyonu ise a. testicularis'in etrafındaki pleksus testicularis tarafından yapılır (24,28).

2.3. TESTİSİN HİSTOLOJİSİ

Testisler, embriyonik gelişimi, cinsel olgunlaşmayı ve üreme fonksiyonlarını etkileyen bir çift, skrotum içine yerleşmiş olan organlardır. Ekzokrin ve endokrin salgı yapabilen testislerin iki yönlü görevi testosteron hormonunu ve spermatozoonu üretmektir. Testislerde üretilen androjenler, embriyoda erkek fetusun normal gelişimi için gereklidir (29).

Her bir testis tunica albuginea adı verilen bir kapsül ile çevrilidir. Tunica albuginea testisin arka kısmında kalınlaşarak mediastinum testis yapısını oluşturur. Bu kısımdan bezin içine giren septumlar, bezi testiküler "lobuli testis" adı verilen yaklaşık 250 piramidal bölme ayırır. Her bir lobül gevşek bağ dokusu ile sarılı olan 1-4 adet seminifer tübülden oluşur (Şekil 2.4). Bu gevşek bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve Leydig hücreleri/İnterstisyel hücreler vardır. Seminifer tübüllerde germinal hücrelerin üretimi interstisyel hücrelerde ise androjenlerin sentezi gerçekleşir (30).

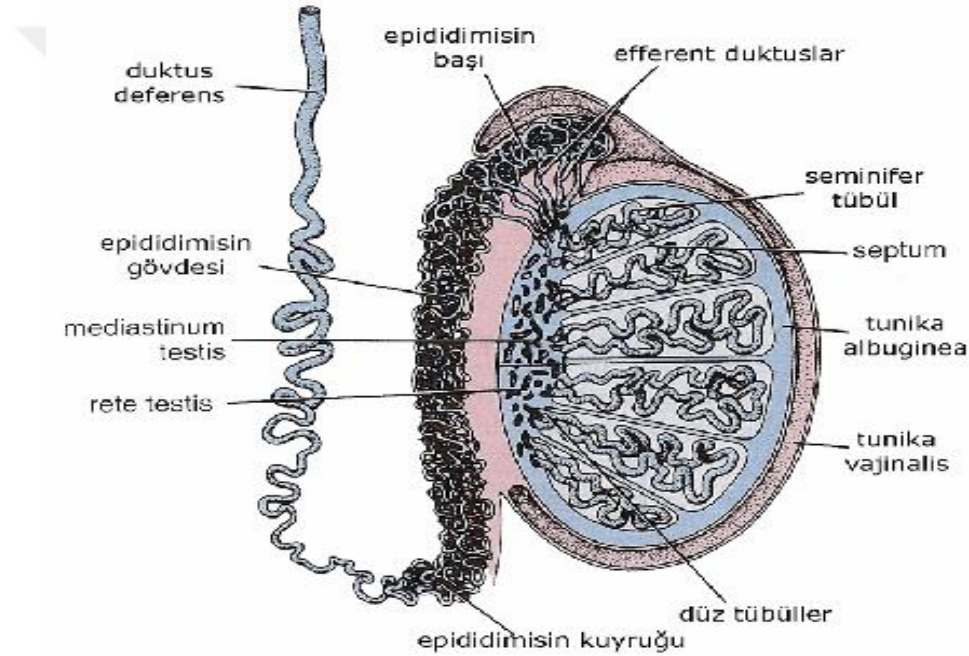
2.3.1. İnterstisyel Doku

İnterstisyel bağ doku seminifer tübüller arasında yer alan çok sayıda kan ve lenf damarı, sinir lifleri içeren gevşek bir bağ dokusudur. Bu dokuda bağ dokusunun esas hücreleri olan fibroblastlara ek olarak makrofajlar, mast hücreleri ve Leydig hücreleri olarak bilinen testosteron üreten hücreler bulunur (29).

Leydig hücreleri, bağ dokusu içerisinde tek tek ya da gruplar şeklinde görülebilen, yuvarlak şekilli, yuvarlak nükleuslu, asidoflik sitoplazmasında çok sayıda lipid damlacığı ve agranüler endoplazmik retikulum (SER) bulunduran hücrelerdir. Sitoplazmalarında lipofuksin pigmenti ve çubuk şeklinde bir inklüzyon olan Reinke kristalleri bulunur (29). Yapısında bulunan çok sayıdaki SER sayesinde ve hipofiz

bezinden salgılanan luteinleştirici hormonun (LH) uyarısı ile testosteron hormonunu sentezleyip salgılayabilen endokrin hücrelerdir (30,31).

Leydig hücrelerinin testosteron salgısı, insan yaşamının çeşitli dönemlerinde farklı etkiler gösterebilir. Testosteron ve diğer androjenler embriyoda erkek fetusun gonadlarının gelişmesi için gerekli iken, pubertede spermium üretiminin ve aksesuar bezlerin salgılarının başlaması için aynı zamanda ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişmesi için gereklidir. Yetişkinlerde ise spermatogenezin, bezlerin salgı aktivitelerinin ve ikincil cinsiyet karakterlerinin sürdürülmesi için gereklidir (29).



Şekil 2.4: Testis ve genital kanallar (30)

2.3.2. Seminifer Tübüller

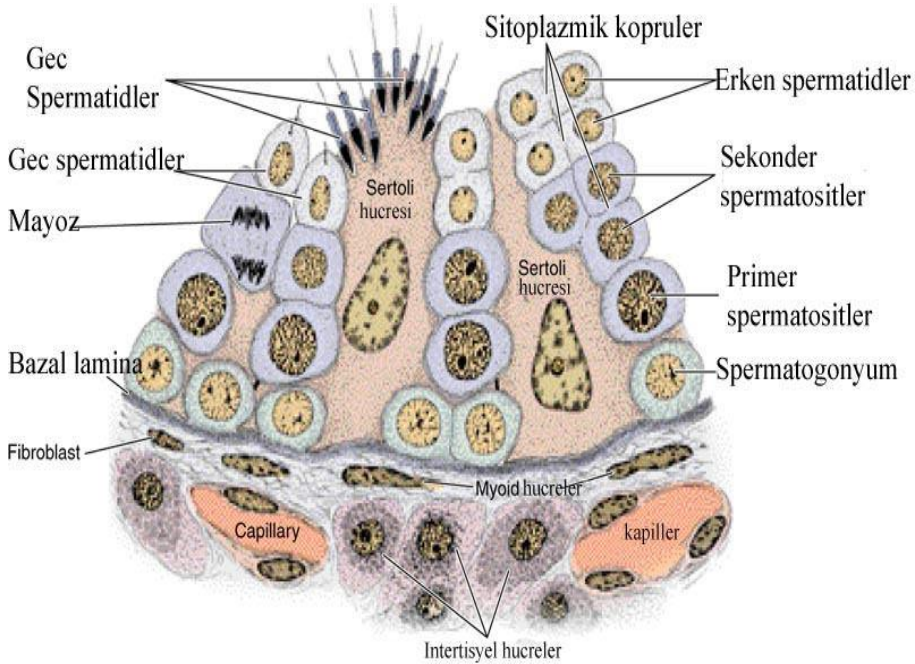
Seminifer tübüller içerisinde spermatogenez olayı gerçekleşir. Her bir testiste 250-1000 civarında seminifer tübül bulunur. Her bir seminifer tübül yaklaşık olarak 30-70 cm uzunluğunda, 150-250 µm kalınlığındadır. Etrafları yaygın kan damarı ile çevrili olan testis tübüllerinin toplam uzunluğu yaklaşık 250 m'dir. Tübüller kıvrımlıdır ve uçlarına doğru lümeni daralarak düz tübüller (tubuli rekti) olarak adlandırılan kısa segmentler halinde uzanır. Bu düz tübüller, seminifer tübülleri "rete testis" adı verilen

kanallardan oluşan bir labirente bağlarlar. Rete testis kanalları anastomoz yaparak, yaklaşık 10-20 adet duktuli deferentes ile epididimin baş kısmına bağlanırlar (29,32).

Fibröz bir bağ dokusu kılıfı ile kaplı seminifer tübüller, bazal lamina ve germinal (seminifer) epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran bu fibröz tabaka tunica propria olarak adlandırılır ve birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri gösteren “miyoid hücreler” içerir (30).

2.3.2.1. Seminifer epitel ve spermatogenik hücreler: Erişkin memeli testislerinde seminifer epitel; spermatogenik hücreler ve germ hücrelerini destekleyen ve onları besleyen Sertoli hücrelerinden oluşan özel bir epiteldir (30,31).

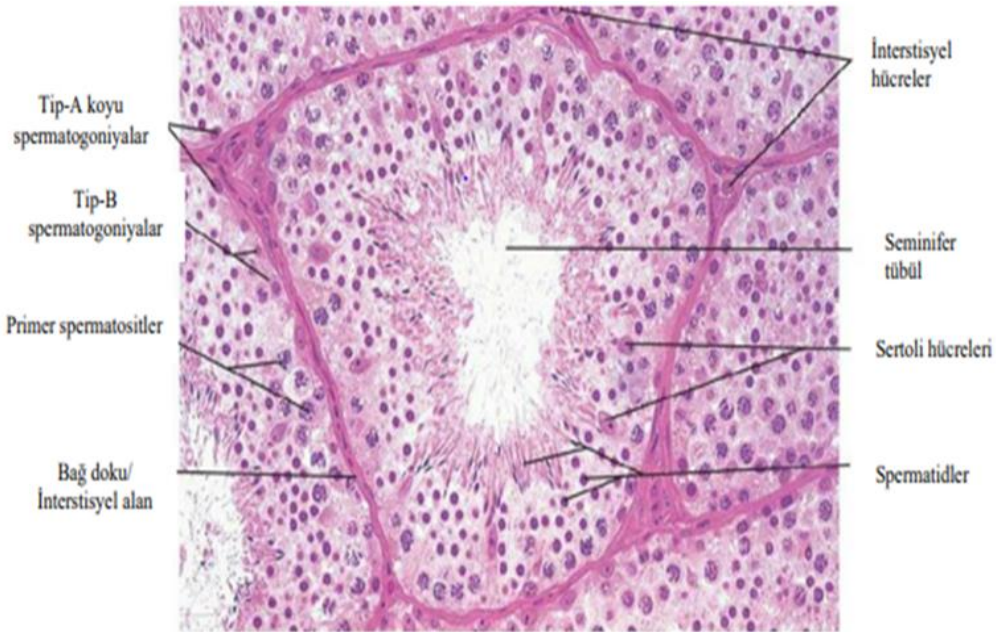
Spermatogenez serisinde 4-8 tabaka halinde düzenlenmiş olan hücreler, spermatazoonları üretmekle görevlidir. Spermatogenez olarak adlandırılan bu süreçte mitoz ve mayoz bölünmeler görülür. Bu süreç sonunda spermatidler haploid germ hücreleri olan spermatazoonlara farklılaşırlar. Spermatogenik hücreler, seminifer epitelde rastgele dağılım göstermez. Gelişimlerinin farklı dönemindeki hücreler birbirleriyle benzer bölgelerde gruplaşır ve hücreler olgunlaştıkça bazaldan lümene doğru dizilim gösterirler (Şekil 2.5). Hücrelerin spermatid aşamasına gelmesi ise yaklaşık iki aylık bir süreyi kapsamaktadır (30).



Şekil 2.5: Seminifer tübülün bir kısmının çevre dokular ile gösterilmesi (30)

2.3.2.1.1. Spermatogenez: Gonadotropinlerin puberte öncesinde artmasıyla spermatogenez süreci başlar. Bu süreç spermatositogenez, mayoz ve spermiyogenezdir. Mitoz bölünmelerden ibaret olan spermatositogenezde spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşır. Mayozda primer spermatositlerdeki diploid kromozom sayısı haploide düşer, spermatidler oluşur. Spermiyogenezde ise spermatidler spermatozoonlara farklılaşır (Şekil 2.6) (32).

Spermatogenez, bazal laminanın üstünde yer alan ve diploid hücreler olan spermatogonyumların proliferasyonu ile başlar (29,30). Pubertede spermatogonyum hücrelerinin çoğalmaları mitoz bölünmeler ile başlar. A tipi spermatogonyumlar kök hücreler olarak 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. Bu hücreler oluşuktan hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profazına giderler ve bu süreç yaklaşık 22 gün sürer. Primer spermatositler spermatogenik serinin en büyük hücreleridir. Birinci mayoz bölünmenin ardından sekonder spermatositler olarak bilinen 23 kromozomlu (22+X veya 22+Y) yeni hücreler meydana gelir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi 23 kromozomlu iki hücre olan haploid sayıdaki spermatidlerin oluşmasıyla sonuçlanır (Şekil 2.7).

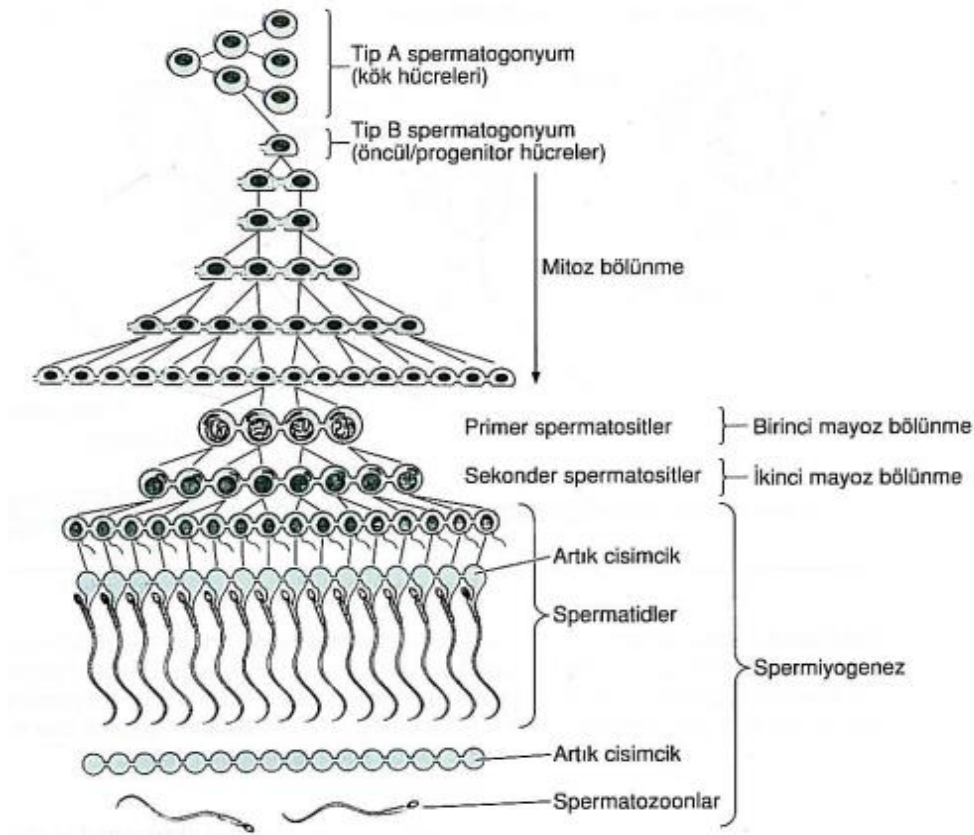


Şekil 2.6: Testis seminifer tübülleri ve intertistumun histolojik görüntüsü (35)

Spermatidler; seminifer tübül içerisinde lümenin yakınlarında yerleşim gösterirler. Haploid spermatidler küçük boyutlu ve 7-8 µm çaplıdır. Yoğun kromatin bölgelerine sahip nukleustan oluşur (30).

Erkek sıçanlarda spermatogenez, puberte döneminde görülür. Sıçanlarda spermatogenez, germ hücrelerinden spermatozoonların oluşumuna kadar uzanır ve ortalama 48-53 gün sürer. Germ hücreleri seminifer epitel içinde ilerler ve spermatogonyumlar mitoz bölünmeler geçirir. 12-13 günde yaşlı hücreler yerine genç hücreler gelir (33,34).

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. Spermiyogenez spermatogenezin son safhasıdır. Spermiyogenez süresince hücre bölünmesi gerçekleşmez (18,29). Spermiyogenez üç evrede tamamlanmaktadır. Bunlar; golgi fazı, akrozom oluşumu ve olgunlaşma fazıdır.



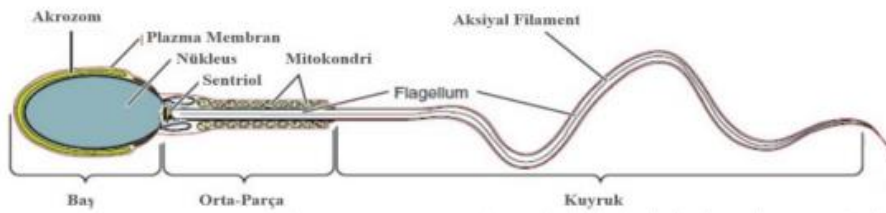
Şekil 2.7: Spermatogenez (29)

Golgi fazında; spermatidin sitoplazması belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, SER ve serbest ribozomlar içerirler. Golgi kompleksinde “proakrozomal granüller” olarak bilinen PAS pozitif küçük granüller birikir. Bu granüller birleşerek zarla sınırlı akrozomal vezikülün içinde bulunan akrozomal granülü oluştururlar. Akrozomun karşısına sentriyoller göç ederek hücre yüzeyine yakın bir yere 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 ve yayılır ve bu aşamadan sonra “akrozom” adını alır (30). Akrozom, oositin korona radiyata ve zona pellusida tabakalarını aşabilmelerini sağlayan, hyaluronidaz, akrozin, lizozomal hidrolazlar ve proteazlar gibi enzimler içerir (36). Spermatogenezin bu safhasında seminifer tübülün tabanına doğru spermatidler 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; sitoplazma miktarı azalır. Sitoplazması fazla olan bölüm boğumlanıp kopar, Sertoli hücreleri tarafından sindirilir. Spermatidlerin birbirleri ile olan bağlantıları kaybolur ve Sertoli hücrelerinden ayrılan spermatidler lümene düşerler (30).

2.3.2.1.3 Spermin yapısı: Olgun bir sperm esas olarak baş ve kuyruktan oluşur ve bu kısımlar bir plazma zarı ile sarılıdır. Boyun bölgesi bağımsız bir alan olarak değerlendirilmekte, baş ve kuyruk kısımlarını birbirine bağlayan bir bağlantı parçası olarak işlev görmektedir. Baş kısmında; bir çift sentriyol yer alır. Kuyruk kısmı; orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç ana kısımdan oluşur (Şekil 2.8) (18).



Şekil 2.8: Spermin yapısı (37)

2.3.2.2. Sertoli hücreleri: Bazal laminaya tabanları ile tutunan, tepe kısımları ile de seminifer tübülün lümenine uzanan piramidal şekilli hücrelerdir. Spermatogenik hücrelerden farklı olarak bölünme yetenekleri yoktur (30).

Organelden zengin olan Sertoli hücreleri iyi gelişmiş granüler ve agranüler endoplazmik retikulum (GER ve SER), golgi kompleksi, mitokondri, lizozom, lipid damlaları ve glikojen granülleri içerir. Çekirdekleri ökromatik ve yerleşimleri ise değişkendir. Sitoplazmalarında lipitlerin kullanımında görevli olabileceği düşünülen Charcot-Böttcher adı verilen inklüzyonlar bulunur (29,31).

Kan-testis bariyeri Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılardan oluşur. Görevi germ hücrelerinin gelişimi (mitoz, mayoz ve farklılaşma) ve olgunlaşması için gerekli olan uygun mikro çevreyi oluşturmak ve germ hücrelerini sitotoksik moleküllerden korumaktır (38). Kan testis bariyeri, erkek üreme hücrelerini kan yolu ile gelen zararlı maddelere karşı korur (29). Bariyerin üzerinde Sertoli hücrelerinin yan ve üst kenarlarındaki girintilere yerleşmiş spermatositler ve spermatidler bulunur. Spermatidlerin kuyrukları geliştikçe, Sertoli hücrelerinin üst kısımlarından saçaklar halinde görülürler (30).

Sertoli hücrelerinin görevleri;

- Spermatogenik hücreleri destekler, korur ve beslerler.
- Spermiyogenezdeki fazla spermatid sitoplazmasını ve gelişimlerini tamamlamamış spermatogenik hücreleri fagosite ederek ortadan kaldırırlar.
- Seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan, spermatozoonların taşınmasını kolaylaştıran ve onları besleyen fruktozdan zengin bir sıvı salgırlarlar.
- FSH salınımını baskılayan inhibin, plazminojen aktivatörleri ve transferrin sentezlerler.
- AMH salgılayarak erkek fetüste Müllerian kanalların gerilemesini sağlarlar (29,30,32).

2.3.3. Testis İçi Genital Kanallar

Testis içi genital kanallar tubuli rekti, rete testis ve duktuli efferentestir. Seminifer tübüllerden gelen sıvı ve spermatozoonlar bu kanallar ile duktus epididimise taşınır.

Seminifer túbüllerin büyük bir kısmı sarmal biçiminde kıvrılmıştır ve her iki uçtan “tubuli rekti” olarak bilinen düz túbüllerle rete testise bağlanırlar. Bu túbüllerin başlangıç kısmında spermatogenetik hücreler giderek ortadan kaybolur. Túbül duvarı sadece Sertoli hücrelerinden ibarettir. Bu başlangıç bölümü, düzensiz sıkı bağ dokusu kılıfı ile desteklenen ve prizmatik epitel hücrelerini içeren ana kısım ile devam eder (30).

Rete testis; tek katlı kübik veya prizmatik epitel ile döşeli, düzensiz, anastomozlaşan kanallardan oluşur. Epitel hücreleri bir tek apikal silyum ve birkaç adet mikrovillus içerirler. Bol miktarda kan damarı içeren mediyastinumun bağ dokusu epitelin yaslandığı bazal membranı sarmaktadır (29).

Rete testisten 10-20 arası duktuli efferentes çıkar. Duktuli efferenteslerin, epididim yönüne doğru hareket eden titretilmiş tüylü hücreler ile değişimli olarak titretilmiş tüy bulunmayan izoprizmatik hücre gruplarından oluşan bir epitel vardır. Seminifer túbüllerden salgılanan sıvının çoğu silyasız hücreler tarafından emilir. Titretilmiş tüylü hücreler ve sıvı aktivitesi ile spermatozoonlar epididime doğru süpürülür. Duktuli efferentes birleşerek epididimin duktus epididimisini oluşturur (30).

2.3.4. Genital Boşaltım Kanalları

Duktus epididimis, duktus deferens (vas deferens) ve üretra spermatozoonları penise ileten kanallardır. Duktus epididimis, tek ve kıvrımlı, yaklaşık 4-6 metre uzunluğunda bir kanaldır. Kanalın çevresi bağ dokusu ve kan damarları ile epididimisi oluşturur. Epididimis kanalı, kanal duvarında bazal hücreler, apikal bölümünde ise lümenine doğru uzanan hareketsiz sterosilyalı hücrelerden oluşan yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Bu hücreler, peristaltik kasılmalarla spermin kanallarda ilerlemesini sağlayan düz kas hücreleri içerirler ve damarlardan zengin bağ dokusu ile çevrelenmiş bir bazal membran üzerine otururlar. Ayrıca duktus epididimis epitel spermatozoon boyunca oluşan artıkların sindirilmesine ve ortadan kaldırılmasına katılır.

Epididimis, duvarı kalın bir kas tabakasından oluşan duktus (vas) deferens olarak adlandırılan bir kanal ile devam eder. Bu düz kanal prostatik üretraya açılır. Çoğunlukla sterosilyalara sahip yalancı çok katlı prizmatik epitel ile örtülüdür. Lamina propria, elastik liflerden zengin bir bağ dokusu katmanını oluştururken kalın kas tabakası ortalarında yer alan sirküler bir katmanla birbirinden ayrılan iç ve dış

katmanlardan oluşmuştur. Düz kaslardan oluşmuş bu kalın katman, ejakülasyon sırasında spermatozoonların fıskırmasını sağlayan güçlü peristaltik kasılmaları oluşturur.

Spermatik kordonun bir kısmını duktus deferens oluşturur ve pampiniform pleksus, testiküler arter ve sinirleri içerir. Duktus deferens prostata girmeden önce genişleyerek ampullayı oluşturur. Bu alanda kalınlaşan epitel kıvrımlı hale gelir. Seminal veziküller ampullanın son kısmında duktusa katılırlar ve duktus deferens prostata girer ve prostatik üretraya açılır. Prostata giren bu segment ejakülatuar kanal olarak adlandırılır. Duktus deferensin mukoza katmanı ampulla boyunca ejakülatuar kanalın içine kadar devam eder, kas katmanı ise ampulladan sonra biter (30).

2.3.5. Kan-Testis Bariyeri ve Sıkı Bağlantılar

Yan yana bulunan Sertoli hücreleri, seminifer tübül tabanına yakın yan-alt seviyedeki sıkı bağlantılarla birbirlerine tutunarak kan-testis bariyerini oluştururlar (18,32,39-41). Spermatogonyumlar, bu bariyerin altında yer alan bazal bölmede bulunurlar. Spermatogenez esnasında, spermatogonyumların bölünmesiyle oluşan bazı hücreler bağlantı noktalarını geçip, bariyerin adluminal bölümüne ulaşırlar (29,30). Bu bariyer seminifer epitelde amino asit, iyon, protein ve karbonhidrat birlikteliği için fizyolojik bir kompartman oluşturulması bakımından gereklidir. Bu sebeple, seminifer tübüllerdeki ve boşaltım kanallarındaki sıvının içeriği, testiküler lenften ve kan plazmasından farklıdır (31). Kan testis bariyeri fiziksel bariyer olarak moleküllerin giriş çıkışlarını kontrol etmek için fizyolojik bileşenlere ve germ hücrelerini korumak için ise immunolojik bileşenlere sahiptir. Kan-testis bariyerine ait anatomik, immunolojik ve fizyolojik bileşenler birlikte bariyerin işlevsel yapı kazanmasında önemli rol oynamaktadır (42).

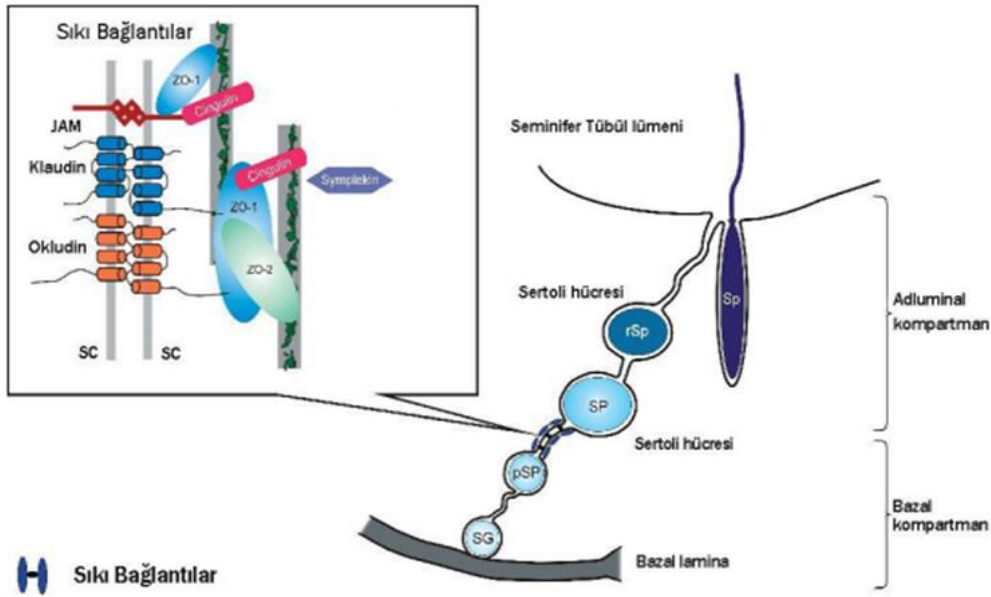
Memelilerin testislerinde bulunan kan-testis bariyeri, yapısal olarak kan-beyin bariyeri ve kan-retina bariyeri gibi sıkı bağlantılar (TJ=Tight Junction), tutundurucu bağlantılar (AJ= Adherence Junction) ve oluklu bağlantılardan (GJ= Gap Junctions) (43) meydana gelir (39,44).

İki hücrenin karşılıklı zarlarında lateral olarak yerleşmiş olan simetrik kompleks protein yapılar hücre bağlantıları olarak tanımlanır.

Bu bağlantılar şunlardır;

- Sıkı bağlantılar
- Tutundurucu bağlantılar
- Oluklu bağlantılar
- Dezmozom

Hücrelerin doku ve organları oluştururken birbirlerine tutunmaları özel bağlantılar ile gerçekleşir. Sıkı bağlantılar bunlardan biridir ve komşu hücreler arasında hücreler arası bariyer görevi gören ve sinyallerin iletilmesini sağlayan zar farklılaşmalarıdır (43). Komşu hücrelerin hücre zarlarının bitişik oldukları yerde bu yapılar hücreler arası bölgeyi tamamen tıkarlar (39).



Şekil 2.9: Seminifer epiteldeki sıkı bağlantı yapıları (39)

Yapısal olarak sıkı bağlantılar iki moleküler bölgeye ayrılabilir;

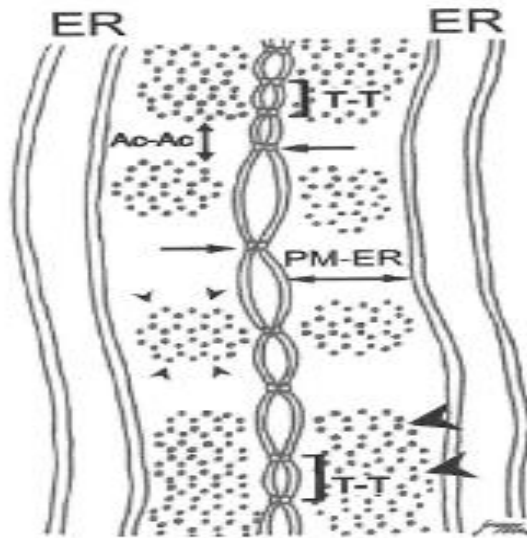
Transmembran bölge: Okludin, klaudin multigene ailesi ve bağlantı adezyon moleküllerini içeren bu bölgede komşu hücreler zardaki moleküllerle birbirlerine

tutunarak yapışırlar. Hücre zarına bağlı proteinler olan okludin ve klaudinler zarın bariyer özelliğini ortaya koyar (46).

Plak bölgesi: MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) zonula okludens-1 (ZO-1), zonula okludens-2 (ZO-2) ve zonula okludens-3 (ZO-3),’ü kapsayan bu bölge, transmembrane proteinlerini hücre iskeletine bağlayan geçiş moleküllerini içerir (39).

TEM (Transmission Electron Microscope) çalışmalarında, sıkı bağlantı moleküllerinin, komşu hücrelerin hücre zarları arasında bir dizi bağlantı noktası oluşturduğu (47) ve fetal yaşam sırasında Sertoli hücreleri arasında meydana geldikleri gözlenmiştir (48).

Seminifer epitelde bulunan sıkı bağlantılar, membrana en yakın yerleşimiyle ile diğer sıkı bağlantılardan farklıdır. Testislerde bulunan sıkı bağlantı bölgesi, periferel membran proteinler dizisi ve üç farklı integral membran proteinler dizisini içerir. Bu sıkı bağlantı proteinleri; zonula okludens çeşitleri olan, ZO-1, ZO-2, okludin, klaudindir (Şekil 2.9). Spermatogenetik hücreler, tüm aşamalarında Sertoli hücrelerinin bu bağlantıları sayesinde lümeneye doğru göç ederler (49). Sertoli hücre bağlantıları yapısal olarak 3 elemandan oluşur. Bunlar; komşu iki hücre arasındaki membran kaynaşmaları, aktin flaman, aktin-endoplazmik retikulum ağı ve diğer iskelet elemanlarıdır (Şekil2.10).



Şekil 2.10: Sertoli hücre duvarındaki sıkı bağlantılar ve aktinle olan ilişkileri (51)

Genel olarak sıkı bağlantılar, endotel ve epitel hücrelerindeki bağlantı komplekslerinin lümenine bakan en uç bölgesinde bulunurlar. Burada yer alan bu sıkı bağlantılar polarize epiteldeki çözelti, su ve immün moleküllerin hücreler arasında hareketi için bir bariyer oluşturur. Aynı zamanda plazma zarının üst kısmından alt kısmına doğru asimetrik yapının devamlılığı sağlanır (18,50).

2.4. ZONULA OKLUDENS-1

Bir sıkı bağlantı proteini olan ZO-1, zonula okludens proteinleri (ZO-1, ZO-2 ve ZO-3) ailesinin bir üyesidir. İlk olarak 1986'da Stevenson ve Goodenough tarafından kemirgen karaciğerinde büyütülmüş bir monoklonal antikor kullanılarak karaciğer homojenatlarındaki sıkı bağlantıdan zengin membran fraksiyonlarında, 225 kD'lik bir polipeptidi tanımak için izole edilmiştir. "Zonula" terimi bağlantının bir band şeklinde hücreyi tamamen sardığını ifade ederken, "okludens" terimi ise zarların hücreler arası alanı kapatacak şekilde birbiriyle kaynaşmış olduğunu belirtir (52).

Zonula okludens sıkı bağlantıların en yüzeyde olanıdır ve ağa benzeri bir yapı oluşturarak katlanma ve kıvrılma gösterirler. Esas işlevi oldukça sıkı bir tutunma meydana getirerek epitel hücreleri arasından her iki yöne doğru madde geçişini engellemektir (42). 225 kDa periferel membran proteini olan ZO-1 insanlarda TJP1 (Tight Junction Protein 1) geni tarafından kodlanmakta ve sıkı bağlantı plağının ana omurgasını oluşturmaktadır (53,54). Aktin filamentlerine doğrudan bağlı olan ZO-1 sıkı bağlantı transmembran proteinlerini aktin hücre iskeletine sabitler (50,55).

2.5. LEKTİN

Lektinler, protein ya da glikoprotein yapısındaki biyomoleküllerdir. Genellikle şekerlere spesifik olarak bağlanabilirler. Glikokonjugatları, oligosakkaritleri çöktüren ve hücreleri aglutine eden lektinler; hastalıkların, normal ve patolojik dokular arasındaki değişikliklerin tespitinde kullanılırlar (56). Glikoprotein sentezini, hücre adezyonunu ve kan protein seviyelerini düzenleyen lektinlerin doğal bağışıklık sisteminde önemli rol oynarlar (57).

Lektinler, glikokonjugatların şeker kalıntıları için özel bir bağlanma özelliğine sahiptir. Bu nedenle çeşitli doku ve organlardaki glikokonjugatların dağılımını araştırmak için histokimyasal reaktifler olarak kullanılırlar (58,59). Testis dokusuna Lektin'in histokimyasal olarak uygulanmasıyla, akrozom oluşumu sırasında bir dizi

glikosilasyon süreci oluşur. Farklı türlerdeki testis dokularında spermatogenik seride, Sertoli ve Leydig hücrelerinin bağlanmalarında farklı lektin modelleri vardır (60). Spermatojenik hücreler, sıçan (60,62), fare (62), sığır (64,65), keçi (66), kır faresi (67) ve insan (62,68,69) gibi birçok memeli türünde lektin histokimyasal çalışmalar ile incelenmiştir.

2.6. RADYOTERAPİ

2.6.1. Kanser ve Radyoterapi

RT, kanser tedavisinde en çok başvurulan tedavi yöntemlerinden biridir. Kanser hastalarının yaklaşık %60'ına tedavilerinin belirli aşamasında RT uygulanmaktadır (70). Kanserin daha etkili ve güvenli bir şekilde tedavi edilmesi için yüksek dozlarda RT'nin uygulanması kanser araştırmalarında temel hedeflerinden biridir. RT'nin toksik etkilerinden sağlıklı dokuları koruma ve tümörlü dokularda letal etkisini artırıcı yeni uygulamalar öngörülmektedir (71,72).

Abdominal ya da pelvik ışınlama sonrası hücrede hasar oluşur. Oluşan bu hasar tamir edilirse hücre yaşamına devam eder edilmezse apoptoz gerçekleşebilir. Radyoterapinin esas amacı kanserli hücreleri yok etmek için iyonize radyasyonun kullanılmasıdır. Ancak sadece hedeflenen organlar değil tedavi alanı içinde kalan birçok sağlıklı dokular da bu ışımadan etkilenebilmektedir. Tümör tedavisinde sağlam dokuların da tedavi alanına girmesi ve radyasyondan olumsuz etkilenmesi kaçınılmazdır (73,74). Yavaş bölünen hücrelere kıyasla hızlı bölünen hücrelerin genellikle iyonize radyasyona duyarlılığı daha fazladır. Bu sebeple RT'nin akut etkisi hızlı bölünen hücrelerde, kronik etkisi ise yavaş bölünen hücrelerde ortaya çıkmaktadır (75).

2.6.2. Moleküler Oksijenin Varlığı ve Radyasyon

İyonize radyasyon sonucu dokuda meydana gelen serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. İyonize radyasyon bu zararlı etkileri, etkilenen hücrelerden salınan SOR'un üretilmesinden 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 yaralanmalarına ve

apoptoza neden olabilir. Normal fizyolojik koşullarda, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi denge halindedir. Dokular, RT gibi 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 inaktifleşir ve DNA hasarı oluşur. Organizmadaki tüm bu fonksiyonel ve yapısal değişiklikler, radyasyona bağlı oksidatif stresten kaynaklanmaktadır (9).

Dokuların oksijenlenme durumu, radyasyonun biyolojik etkinliğini belirleyen en önemli faktörlerdendir. İyi oksijenlenmiş hücreler radyasyondan daha fazla etkilenir. Yapılan 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 (76). Dolayısıyla, ışınlama sırasında moleküler oksijenin varlığı, sistemi radyasyona karşı duyarlı kılmakla beraber radyobiyolojik yanıtın oluşması için gerekli ışınlama dozunu da azaltmaktadır.

2.6.3. Radyoterapi ve DNA Hasarı

DNA genetik bilgiyi taşıyarak, nesiller boyu aktarımı sağlayan bir moleküldür. DNA'nın fiziksel ve kimyasal yapısındaki değişimler hasar olarak bilinmektedir. DNA onarım sistemleri tarafından DNA üzerinde oluşan hasar onarılır. Radyoterapiye bağlı hücre hasarının çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda ise hücre ölümü görülebilir (77).

RT hasarının etkileri arasında; gen ekspresyonları, mutasyonlar, kromozom sapmaları, genomik kararsızlıklar ve hücre ölümleri sayılabilir. Yüksek dozda radyasyona maruz kalma akut etkilere sebep olabilir. Yüksek dozlarda tüm vücuda uygulanan radyasyon sonucu hücreler hasara uğrar özellikle hassas hücreler ölür. Organ ve sistemlerde de buna bağlı olarak çeşitli hastalıklar gelişebilir. Semptomlar radyasyon dozu ve maruz kalma süresine göre değişebilir (78).

İyonize radyasyondan etkilenen DNA hasarının miktarı; oksidatif stres yoğunluğu, toksik ara maddeleri metabolize eden savunma ve içsel onarım mekanizmaları ile ilişkilidir. Ayrıca iyonize radyasyondan kaynaklanan hasarın azaltılmasının farklı yolları bulunmaktadır (79).

2.6.4. Radyoterapi ve Serbest Radikaller

Radyoterapinin tedavi edici özelliğine rağmen tümörlü dokunun herhangi bir parçası olmayan ve hedef hacmin dışındaki sağlıklı doku ve organlar bu istenmeyen ışıklardan önemli miktarda etkilenmektedir. Daha yüksek dozlarda daha iyi tümör kontrolü elde etmek için sağlıklı dokular istenmeyen radyasyon hasarlarına karşı korunmalıdır. Hücreler, savunma sistemini aktive ederek hasar gören bu etkilerle mücadele etmeye çalışır. Ancak, günümüzde savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda radyokoruyucu amaçlı antioksidan bitkisel ilaçlar, vitamin takviyeleri ve melatonin gibi çeşitli kimyasal ajanlar uygulanmaktadır.

İyonize radyasyonun DNA molekülüne etkisi direkt ve/veya indirekt olarak gerçekleşir. Radyasyon etkisinin üçte biri direkt etki ile oluşur ve DNA molekülünde yapısal hasar, fonksiyon kaybı ve sentez inhibisyonu oluşturabilir. Radyasyonun etkisinin üçte ikisi de indirekt etki ile oluşur. İyonize radyasyonun etkisi ile su moleküllerinin iyonlaşması sonucu hidrojen, hidroksil radikali (OH^\cdot), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest oksijen radikalleri açığa çıkar (80). 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 serbest oksijen radikalleri ve farklı radyasyon doz hızları arasındaki ilişki literatürde henüz tam olarak açıklanamamıştır (76).

Radyoterapi eksternal bir tedavi yöntemidir. Dolayısıyla sadece hedef dokular üzerinde değil aynı zamanda çevredeki sağlıklı dokular üzerinde de inflamatuvar etkiye sebep olur. Bu dokularda lökosit infiltrasyonu olur ve radyasyonla indüklenen lipid peroksidasyonu sonucunda serbest radikaller oluşur (81-83). Radyasyonun indirekt etkisiyle oluşan serbest radikaller, ortamdaki oksijenle hızla reaksiyona girer ve oksijenden toksisitesi yüksek peroksit radikalleri oluşur (84). Onarım süreçlerinin yeterli olmadığı durumlarda serbest radikaller hücrelerde kalıcı hasar oluşturabilmektedir (85). 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 (86-88).

2.6.5. Radyoterapi ve FFF Teknolojisi

Gelişen teknolojiye bağlı olarak RT cihazlarında düzleştirici filtrenin olduğu Flatening Filter (FF) standart lineer hızlandırıcı cihazlarının yerine; günümüzde düzleştirici filtrenin kullanılmadığı Flatening Filter Free (FFF) tabanlı modern radyoterapi cihazları üretilmiştir (89,90). FFF tabanlı radyoterapi cihazlarında yüksek ani doz hızı seçeneği kullanılarak FF tabanlı konvansiyonel RT cihazlarına göre üç-dört kat fazla maksimum doz hızları elde edilmektedir. FFF teknolojisi sayesinde ani yüksek doz hızlarının elde edilmesiyle birlikte uzun tedavi sürelerinin kısalması, alan dışı dozların azalması ve saçılan radyasyonun az olması sebebiyle çevre sağlıklı dokulardaki ikincil kanser riskinin azalması bu tedavi tekniğini üstün kılmıştır. Modern RT cihaz teknolojisinde, FFF tabanlı yoğunluk ayarlı radyoterapi IMRT (Intensity-modulated radiotherapy), hacim ayarlı arc-terapi VMAT (Volumetric modulated arc therapy), SBRT (Stereotactic body radiotherapy) ve stereotaktik radyocerrahi SRS (Stereotactic Radiosurgery) teknikleri kullanılarak tümörlü dokulara RT işlemi sıklıkla uygulanmaktadır. SRS ve SBRT tedavi tekniklerinde tek doz ya da fraksiyon başına büyük dozlar kullanılır ve radyoterapi işlemi kısa sürede tamamlanır. Fakat, kliniklerde kullanılan bu büyük dozlar, aynı zamanda ışınlanma sürelerinin önemli ölçüde artmasıyla sonuçlanır. SBRT, VMAT ve IMRT gibi radyoterapi tedavi tekniklerinde FFF yüksek ani doz hızı ışınlarının kullanılması ile uzun tedavi süreleri büyük ölçüde kısalmaktadır (9). Fakat bu dozimetrik avantajlara rağmen farklı kanser doku ve sağlıklı kritik organlar, yüksek ani doz hızına sahip iyonize X-ışınlarına maruz kaldığı zaman klinik doz hızı etkisinin radyobiyolojik sonuçları hakkında yeterli in vivo çalışmalar mevcut değildir.

2.7. APOPTOZ

Apoptoz organizmada hasara uğramış ya da görevini tamamlamış hücrelerin diğer hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırıldığı bir süreçtir. Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz genetik olarak kontrol edilebilir, enerjiye gereksinim duyar ve homeostazı korur. Dokulardaki hücrelerin devamını sağlamak, gelişim ve yaşlanma için homeostatik bir mekanizma görevini yapan apoptoz, aynı zamanda zararlı

ajanlar ya da hastalık nedeniyle hücreler zarar gördüğü zaman immün savunma reaksiyonları gibi bir mekanizma olarak da oluşabilmektedir (91). Değişik hücre ve doku tiplerinde oluşabilecek apoptoz biyokimyasal ve morfolojik seyri ile kompleks bir olgudur (92,93). Özellikle kanser ile ilişkili olan apoptozda, kaspazlar olarak isimlendirilen bir grup sistein proteazların aktivasyonunu kapsar ve bu süreç çoğunlukla enerji gerektirir (94). Hücreyi apoptozdan koruyan proteinleri inaktive eden veya ortadan kaldıran bir protein grubu olan kaspazlar, apoptozu inhibe eden negatif regülatörleri de yıkarak hücre ölümünü tetiklemektedirler (91).

Radyasyona maruz kalma sonucu oluşan apoptoz çeşitli hayvan deneylerinde ve hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir. Radyasyonun apoptozu indükleyerek etki ettiği bilinmekte ve apoptozun hızlı artış gösterdiği durumlarda radyoduyarlılığın yüksek olduğu düşünülmektedir (95). Normal testiküler olaylarda spermatogenez sırasında oluşan SOR'un testis fonksiyonlarının ve testiküler apoptozisin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (96,97)

Apoptozun saptanmasında; morfolojik görüntüleme, biyokimyasal, immunolojik ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. İmmünohistokimyasal yöntemlerden biri TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transpherase (Tdt)- mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) biotin nick end-labelling) yöntemidir (98-100). TUNEL metoduyla parafin bloklar, donmuş kesitler ve kültürü yapılmış hücrelerde apoptozun varlığı saptanabilir (101). Bu yöntem ile sadece apoptoza uğramış hücre çekirdekleri boyanır ve DNA kırıklarının in situ olarak belirlenmesi sağlanır. TUNEL yöntemine ait bulgular flow sitometri yöntemi, floresan ve ışık mikroskobu ile değerlendirilir (102).

2.8. MELATONİN

Melatonin epifiz bezinin pinealosit hücreleri tarafından salgılanan güçlü antioksidan özelliği olan bir hormondur. Uyku-uyanıklık sikluslarının regülasyonunda etkili olan melatonin antioksidan aktivitesi dışında, anti-inflamatuvar özellikler, anti-kanserojen etki oluşturma, kardiyovasküler koruma, bağışıklığı artırma, diyabete ve obeziteye karşı koruma, nöroprotektif ve yaşlanma önleyici aktivite gibi birçok biyoaktivite sergiler (103,104). Melatonin aynı zamanda kemik iliği hücreleri, over, lens, adrenal bezler, böbrek, timus, tiroid, plasenta dokularında, mast hücreleri gibi nöroendokrin karakterde olmayan hücrelerde ve eozinofilik lökositlerde, safra kanalı ve

gastrointestinal sisteminden de salgılanmaktadır (105). Son yıllarda özellikle diffüz nöroendokrin sistemin bir parçası olarak kabul edilen APUD (Amine Precursor Uptake Decarboxylase) hücrelerinde ve gastrointestinal kanaldaki enterokromaffin hücrelerinde de melatonin sentezi yapıldığı ifade edilmiştir (106).

İyonize radyasyon ile kanser tedavilerinde iyileştirme sürecini arttırmanın bir yolu, antitümöral etkinliği değiştirmeksizin sağlıklı dokuları radyasyon hasarından koruyan hücre koruyucu ajanların kullanılmasıdır (107). Antioksidanların süpürücü etki, bastırıcı etki, onarıcı etki ve zincir kırıcı etki olmak üzere birçok etki mekanizmaları vardır (108). Son on yılda yapılan bilimsel çalışmalar melatoninin, hidroksil radikalini süpürme ve radyokoruyucu yeteneğini ortaya koymuştur (109).

Tüm antioksidanlar karşılaştırıldığında melatoninin en güçlü serbest radikal temizleyici olduğu görülmüştür (110). Melatonin, seksüel aktivite ve üreme fonksiyonları, immun yanıt, yaşlanma süreci, ısı regülasyonu ve tümör büyümesi gibi fizyolojik süreçlerde de görev almaktadır (111). Melatonin lipofilik özelliği sayesinde hücrenin tüm organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilir. Böylece antioksidan etkisi hücrenin geniş bir alanına etki etmektedir (112).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

- Melatonin (Sigma, M5250-250MG)
- TUNEL kiti (Abcam, HRP-DAP (ab206386))
- DAP çekirdek boyası (Sigma, D9542)
- ZO-1 Monoclonal Antibody (ZO1-1A12)
- Lectin PNA PNA Conjugates (L-32459)
- Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa 488) (ab150113)
- Proteinase K, recombinant, PCR grade (EO0491)
- Ketamin (Keta- Control)
- Rompun (XYLAZINBIO %2) (bioveta)
- Etanol (ISOLAB)
- Ksilen (ISOLAB)
- Parafin
- Hematoksilen (Bio-optica)
- Eozin (Bio-Optica)
- Entellan (MERCK M10796)
- Phosphate Buffer Saline(PBS)-Fosfat Tamponlu salin
- Tris-Buffer Saline (TBS)
- Citrat Buffer (Diapath Hk3400617)
- Methanol (Sigma)
- Hidrojen Peroksit (H₂O₂) (Sigma18304)
- PBS Blocking Buffer with BSA Premixed Powder (Biobasic SB0626)

3.1.2. Cihazlar

- Radyoterapi Lineer hızlandırıcı cihazı (Linac -Varian- Trilogy)
- Radyoterapi doz kalibrasyon ekipmanları
- Doku Takip Cihazı (Thermo, Runcorn, WA7 1TA, UK)

- Su Banyosu (Maxotech)
- Mikrotom (Thermo)
- Işık Mikroskobu (Zeiss)
- Düdüklü tencere (Simbo)
- Floresan Mikroskop (Leica DMI8S)
- Parafin Dispenser (Maxotech)
- Doku Homojenizatörü (Qiagen)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-30)
- Hassas Terazî (Radwag)
- Etüv (Elektro-mag)
- Vorteks (Wisd Vortex Mixer VM-10)
- Mikropipetler (Eppendorf research)
- Buzdolabı (+4°C) (Vestel)
- Derin Dondurucu (-80°C) (VIP ECO)
- Multi-mode Reader (BioTek Instruments, ABD)

3.1.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

❖ %4 Paraformaldehit (pH:7.4)

- Paraformaldehit.....40 gr
- Distile su.....1000 ml
- 0.2M Fosfat Buffer (pH:7.4)500 ml
- 1N NaOH

❖ Sitrat Tamponu (pH:6)

- Sodyum Sitrat.....1ml
- Distile su10 ml

❖ %3 H₂O₂

- H₂O₂ (%34.5-36.5)1ml
- Metanol.....11 ml

❖ BSA

- BSA.....4.06 g
- Ultra distile su.....100 ml

❖ TBS (pH:7.6)

10 X TBS için;

- Tris.....0,24 gr
- NaCl.....0,88gr
- Distile su.....9 ml

1 X TBS için;

- 10 X TBS.....2 ml
- Distile su.....18ml

❖ Proteinase K

- Proteinase K.....1 µl
- Distile su.....99 µl
- TdT Enzim.....1 µl

3.2. YÖNTEM

Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (SBÜ-Hamidiye HADYEK) tarafından 25.12.2020 tarihli ve 07 sayılı toplantıda 01 karar numarası ile etik olarak uygun bulunmuştur. Deney hayvanları, kimyasal ve tıbbi malzemeler SBÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından 2021/078 numaralı proje ile desteklenmiştir. Çalışmamızda sıçanlara cerrahi işlemler, SBÜ Hamidiye Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda uygulanmıştır. Sıçanların radyoterapi uygulamaları SBÜ Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Radyoterapi Bölümünde gerçekleştirilmiştir. Sıçanlardan alınan doku örneklerinin histolojik takip işlemleri SBÜ Hamidiye Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarında yapılmıştır. Sıçanlardan alınan kan ve doku örneklerinin biyokimyasal analizleri SBÜ Hamidiye Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Laboratuvarında çalışılmıştır. Floresan mikroskop görüntülemeleri SBÜ Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi (DETAUM)'da bulunan Floresan Mikroskobu Laboratuvarında yapılmıştır.

3.2.1 Deneklerin Seçimi ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada 12 haftalık 200-250 gram ağırlığında Sprague-Dawley cinsi 40 adet erişkin erkek sıçan kullanıldı. Tüm sıçanlar deneye başlanmadan önce rastgele gruplara ayrıldı ve tartıldı (Tablo 3.1.). Sıçanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık

periyoduna sahip ortamda uygun kafeslerde 21-22 °C sıcaklıkta, barındırılıp musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi.

Tablo 3.1: Deneklerin gruplarının ağırlıklarının belirlenmesi

Grup	En az ve en çok ağırlık değeri (g)	Ortalama ağırlık (g)
G1 (Kontrol)	215-239	227
G2 (DDHR)	224-242	233
G3 (DDHR+ MEL)	221-241	231
G4 (YDHR)	218-250	234
G5 (YDHR+ MEL)	200-248	224

Çalışmada kullanılan denekler, deneyin başlangıcında rastgele her grupta 8 sıçan (n=8) olacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

- Grup 1 Kontrol grubu;
Rastgele seçilen sıçanlara hiçbir işlem uygulanmayıp, diğer sıçanlar ile aynı ortamda tutuldu.
- Grup 2 Düşük doz hızlı radyoterapi (DDHR) grubu;
Sıçanların abdominopelvik bölgelerine tek doz olarak (8Gy) ve düşük doz hızlı (400 MU/min) RT uygulandı.
- Grup 3 Düşük doz hızlı radyoterapi (DDHR) +Melatonin (MEL) grubu;
Sıçanlara radyoterapiden 15dk önce 50mg/kg/i.p melatonin verilerek, abdominopelvik bölgelerine tek doz olarak (8Gy) ve düşük doz hızlı 400 MU/min RT uygulandı.
- Grup 4 Yüksek doz hızlı radyoterapi (YDHR) grubu;
Sıçanların abdominopelvik bölgelerine tek doz olarak (8Gy) ve yüksek doz hızlı (1400 MU/min) RT uygulandı.
- Grup 5 Yüksek doz hızlı radyoterapi (YDHR) +Melatonin (MEL) grubu;
Sıçanlara radyoterapiden 15dk önce 50mg/kg/i.p melatonin verilerek,

abdominopelvik bölgelerine tek doz olarak (8Gy) ve yüksek doz hızlı (1400 MU/min) RT uygulandı (113).

3.2.2. Melatonin Uygulaması

G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) tedavi gruplarına radyoterapiden 15dk önce 50mg/kg/i.p Melatonin (%1'lik etanol ve serum fizyolojik karışımında) uygulandı. Bu ışığa duyarlı çözelti ışık geçirmeyen bir kap içerisinde serin ortamda hazırlanıp ve her sıçana 1ml i.p. olarak uygulandı (114).

3.2.3. Radyoterapi Uygulaması

Radyoterapi cihazı olarak, SBÜ Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Radyoterapi bölümünde bulunan Varian marka, Trilogy model lineer hızlandırıcı cihazı kullanıldı. G1 (Kontrol) grubundaki sıçanlar hariç diğer dört gruptaki sıçanlara 80 mg/kg/ip ketamin ve 20 mg/kg/i.p. xylazine ile ağırlıklarına göre anestezi uygulandı ve sırtüstü pozisyonunda RT düzeneği üzerine yerleştirildi. Deney hayvanlarının abdominopelvik bölgesine, cilt kaynak mesafesi (SSD) 100cm, 6MV iyonize X-ışınları, farklı doz hızlarında (düşük doz hızı 400MU/min ve yüksek doz hızı 1400MU/min) RT uygulaması yapıldı (Resim 3.1).

Doz derinliğine bağlı olarak, maksimum doz bölgesini testis dokusunda tutmak için abdominopelvik bölgeye 10mm doku eşdeğeri bolus malzemesi yerleştirildi. Ayrıca, 6MV iyonize X-ışını için doz maksimum noktası (Dmax), deri yüzeyinden 1.6cm derinlikte hesaplandı. RT uygulamasından önce cihazın doz verimliliği (doz output), 1MU=1cGy olacak şekilde doz kalibrasyonu yapıldı.



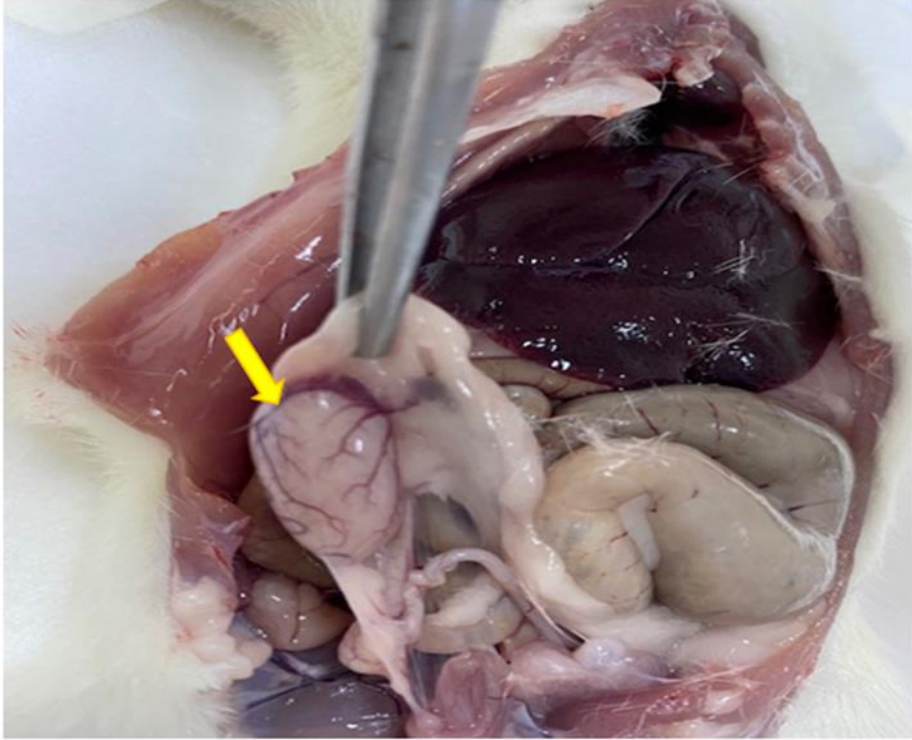
Resim 3.1: Bolus malzemesi yerleştirilen deneklere radyoterapi uygulanması

3.2.4. Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması

RT uygulamalarından 48 saat sonra tüm sıçanlara ketamin (80 mg/kg) + ksilazin (20 mg/kg) verilerek anestezi uygulandı ve eksanguinasyon (kalpten kan alma) yöntemi ile sakrifiye edildi (Resim 3.2). Intrakardiyak kan örnekleri pıhtı aktivatörlü jelli biyokimya tüplerine alınarak 3000 g x10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Alınan serum ve sağ testis dokuları Total Antioksidan Seviye (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS) biyokimyasal analizlerini yapmak üzere -80°C’de saklandı. Histolojik incelemeler için sol testis dokuları %4’lük paraformaldehit fiksatifine alındı (Resim 3.3).



Resim 3.2: Sıçanın supin pozisyonda sabitlenmesi



Resim 3.3: Testis dokusunun (sarı ok) cerrahi olarak çıkarılması

3.2.5. Örneklerin Histolojik Analizleri

3.2.5.1. Doku takibi: Histolojik incelemeler için sol testis dokuları %4'lük paraformaldehit solüsyonunda +4 °C'de 24 saat fikse edildi. Dehidrasyon ve şeffaflandırma basamaklarını takiben parafin bloklara gömüldü. İşlem basamakları Tablo 3.2 'de ayrıntılı olarak gösterildi.

Tablo 3.2: Doku takibi basamakları

Yapılan işlem	Kullanılan madde	İşlem süresi
Tespit	%4'lük Paraformaldehit	24 saat
	%70'lik Etanol	1 saat
Dehidrasyon	%80'lik Etanol	1 saat
	%96'lik Etanol	1 saat
	%96'lik Etanol	1 saat
	Absolü Alkol	1 saat
Şeffaflandırma	Alkol-Ksilen Karışımı	Yarım saat
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
Emdirme	Parafin-Ksilen Karışımı	Yarım saat
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	-

3.2.5.2. Hematoksilen & Eozin boyama yöntemi: Parafin bloklar haline getirilen testis dokularından mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve su banyosuna (40°C) aktararak kırışıklıkları giderildi. Lamlara alınan kesitler incelenmek üzere Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama yöntemiyle boyandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: H&E Boyama Basamakları

Yapılan işlem	Kullanılan madde/cihaz	İşlem süresi
Fiziksel Deparafinizasyon	60° C'de Etüvde	1 saat
Kimyasal Deparafinizasyon	Ksilen	15 dakika
	Ksilen	15 dakika
Rehidrasyon	%96'lik Etanol	5 dakika
	%80'lik Etanol	5 dakika
	%70'lik Etanol	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	2 dakika
Yıkama	Temiz musluk suyu dolu beher	10 kez daldırma - çıkarma
Boyama	Eozin	1 dakika
Yıkama	Temiz musluk suyu dolu beher	10 kez daldırma- çıkarma
Dehidrasyon	%70'lik Ethanol	10 kez daldırma- çıkarma
	%80'lik Ethanol	10 kez daldırma - çıkarma
	%96'lik Ethanol	10 kez daldırma - çıkarma

Tablo 3.3 (devam)

	Absolü Alkol	10 kez daldırma - çıkarma
Şeffaflandırma	Ksilen	15 dakika
Kapama	Entellan	-

Boyanmış olan testis dokusu kesitleri dijital fotoğraf makinesi ataçmanlı (Axiocam) Zeiss marka ışık mikroskopuyla fotoğrafları çekilerek randomize kör olarak incelendi. Morfometrik, morfolojik değerlendirmeler ve Johnsen Testisküler Biyopsi Skorlamaları (JTBS) yapıldı.

Morfometrik ölçümler (seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve bazal membran kalınlığı) ve seminifer tübüllerdeki hasarın belirlenmesi için JTBS yapıldı. Rastgele seçilmiş her gruptan 8 farklı preparatta 20'şer tübül incelendi (Tablo 3.4). Her grup için ayrı ayrı 160 adet tübül değerlendirilerek istatistiksel analiz yapıldı (115).

Morfolojik olarak; seminifer tübüllerin ve interstisyel bağ dokusunun kontrol grubuna göre kıyaslamaları yapılarak değerlendirildi.

Tablo 3.4: Johnsen Testisküler Biyopsi Skorlaması (116)

Johnsen Skoru	Tanımlama
1	Seminifer tübül kesitinde hiçbir hücre yok
2	Germ hücresi yok sadece Sertoli hücresi var
3	Germ hücresi olarak sadece spermatogonyumlar var
4	Spermatozoa ve spermatid yok, az sayıda (5/tübül) spermatosit var
5	Spermatozoa ve spermatid yok fakat fazla sayıda spermatosit var

Tablo 3.4 (devam)

6	Spermatozoa yok, az sayıda spermatid var (5/tübül) var
7	Spermatozoa yok fakat çok sayıda spermatid var
8	Lümeninde az sayıda spermatozoa (5/tübül) var
9	Germinal epitel düzensiz ve lümenine doğru yayılmış, çok sayıda spermatozoa var
10	Germinal epitel çok sıralı, tübül lümeni açık, çok sayıda spermatozoanın görüldüğü spermatogenez var

3.2.5.3. İmmünofloresan boyama yöntemi: Testis dokularında kan-testis bariyerindeki sıkı bağlantılarda bulunan ZO-1 proteininin, germinal epitel hücrelerindeki ve sperm akrozomlarındaki bazı glikokonjugatların Lectin PNA antikoru ile immüno lokalizasyonlarını belirlemek amacıyla immünofloresan boyama yöntemi kullanıldı. İmmünofloresan boyama için 5 µm kalınlığında alınan kesitler etüvde (60°C) 1 gece deparafinize edildi.

- ❖ Deparafinize olan kesitler sırasıyla aşağıdaki serilerden geçirildi.;
- Ksilen 15 dk
- Ksilen 15 dk
- %96'lık etanol 5 dk
- %80'lik etanol 5 dk
- %70'lik etanol 5dk
- Distile su 10 dk
- PBS 10 dk
- ❖ Sitrat tamponuna (pH 6.0) alınan testis dokuları buhar basınçlı (düdüklü) tencere içinde 14 dk kaynatıldı. Bu işlem sonunda dokular aynı tampon içinde oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.
- ❖ PBS ile 10 dk yıkandı.
- ❖ Kesitler kurutularak dokuların etrafı pap pen ile sınırlandırıldı.
- ❖ Dokular %3 H₂O₂ ile endojen peroksidaz aktivitesinin yok edilmesi için oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- ❖ PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı.

- ❖ %3 PBS Blocking BSA karışımı damlatılan dokular oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- ❖ Primer ZO-1 antikoru PBS ile 1:500 oranında dilüe edilerek dokulara damlatıldı ve +4⁰C’de nemli ortamda 1 gece inkübe edildi.
- ❖ PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı.
- ❖ Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa 488) sekonder antikoru PBS ile 1:500 oranında dilüe edilerek dokulara damlatıldı ve folyo ile kapatılmış güneş ışığına maruz kalmayan bir ortamda 2 saat 37⁰C’de inkübe edildi.
- ❖ PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı.
- ❖ Lectin PNA PNA Conjugates antikoru PBS ile 1:500 oranında dilüe edilerek dokulara damlatıldı ve folyo ile kapatılmış güneş ışığına maruz kalmayan bir ortamda 2 saat 37⁰C’de inkübe edildi.
- ❖ PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı.
 - Dokular DAPI içeren kapama medyumu (PBS ve Gliserol içeren solüsyon) ile kapatıldı, etrafları şeffaf oje ile sabitlendi.
 - Kesitleri alınıp, immün floresan boyaması tamamlanan dokuların dijital fotoğraf makinesi eklentili Leica DMI8S floresan mikroskop ile fotoğrafları çekildi.
 - Her gruptan rastgele seçilen en az 8 alan iki histolog tarafından bağımsız olarak değerlendirildi. Boyama derecesine göre yarı kantitatif Histolojik-Skor (H-SKOR) denklemi kullanılmıştır. H-SKOR= $\pi (i+1)$ denklemine göre; denklemdeki i, spesifik boyanmanın yoğunluğunu göstermektedir. i: 1, 2 ve 3 (sırasıyla, zayıf, orta ve güçlü) değerlerini alabilmektedir. π ise, %0 ile %100 arasında değişen yoğunlukta boyanmış hücrelerin yüzdesini göstermektedir.
- Her kesit için boyanma derecesi;
 - 0: Boyanma yok
 - +1: Zayıf boyanma
 - +2: Orta boyanma
 - +3: Güçlü boyanma olarak değerlendirilerek immün floresan boyanma skorlaması yapıldı ve elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi (117-119).

3.2.5.4. TUNEL boyama yöntemi: Apoptoza uğramış testis hücrelerindeki DNA fragmantasyonlarını tespit etmek için TUNEL (TdT-dUTP nick-end-labelling) yöntemi kullanıldı. TUNEL boyama için 5 µm kalınlığında alınan ve etüvde (60°C) 1 gece deparafinize edilen kesitlere “TUNEL Assay Apoptosis Detection Kit” protokolü uygulandı (Tablo 3.5.). Boyanan kesitler Zeiss marka ışık mikroskopuyla incelenerek fotoğrafları çekildi. Her örneğe ait kesitlerde 10 farklı alan seçilerek apoptotik hücreler ve normal hücreler sayıldı. Daha sonra yüzdelik oran “(apoptotik hücre x100) /normal hücre” formülüne göre hesaplanarak istatistiksel analizi yapıldı (120).

Tablo 3.5: TUNEL boyama basamakları

Seri	Uygulama süresi
Ksilen	15 dk
Ksilen	15 dk
%96'lık etanol	5 dk
%80'lik etanol	5 dk
%70'lik etanol	5dk
1 X TBS	5 dk
Proteinase K Solüsyonu	20 dk
1 X TBS	5 dk
%3 H ₂ O ₂	5 dk
1 X TBS	5 dk
TdT Dengeleme Tamponu	30 dk
TdT Enzim+TdT İşaretleme	90 dk
1 X TBS	5 dk
Durdurma Tamponu	5 dk
1 X TBS	5 dk
Bloklama Tamponu	10 dk
25X Conjugate Bloklama Tamponu	30 dk
1 X TBS	5 dk

Tablo 3.5 (devam)

DAP Solüsyonu	15 dk
Distile su ile yıkama	1 kez daldırma çıkarma
Metil Yeşili	2 dk
% 100 Etanol	3 kez daldırma çıkarma
% 100 Etanol	3 kez daldırma çıkarma
Ksilen	3 kez daldırma çıkarma
Entellan ile kapama	

3.2.6. Örneklerin Biyokimyasal Analizleri

Biyokimyasal parametreler serumda ve dokuların homojenizasyonundan elde edilen süpernatantta analiz edildi. Dokularda bakılan tüm parametreler protein sonuçlarına göre normalize edildi.

3.2.6.1. Doku homojenizasyonu: Alınan doku örnekleri 1 mg kadar tartıldı ve örnekler 1:10 oranında 1xPBS eklendikten sonra seramik bilyeler ile homojenize edildi. Homojenat +4°C'de 10,000 x g'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantları başka bir tüpe ayrıldı. Dokuların homojenizasyonu ile elde edilen süpernatantın total protein düzeyi Bradford yöntemi ile tayin edildi (121).

3.2.6.2. Total Antioksidan Seviye (TAS): Örneklerin total antioksidan seviyesi Erel ve ark. geliştirdiği kolorimetrik yöntemle ölçüldü (122). Yöntemin temel prensibi, antioksidanların varlığında koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalininin, renksiz ABTS formuna indirgenmesine dayanmaktadır. Standart olarak mM askorbik asit kullanıldı. Serum için sonuçlar mmol Askorbik Asit Ekvivalent / mL, doku için ise mmol Askorbik Asit Ekvivalent / mL mg protein olarak ifade edildi.

3.2.6.3. Total Oksidan Seviye (TOS): Total oksidan seviyesi, örnekteki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside edip bu ferrik iyonların asidik ortamda ksilenol turuncusu ile renkli bir kompleks oluşturma esasına dayanan Erel ve ark. geliştirdiği yöntemle fotometrik olarak ölçüldü (123). Standart

olarak H₂O₂ kullanıldı. Serum için sonuçlar µmol H₂O₂ Ekivalent / mL, doku için ise µmol H₂O₂ Ekivalent / mL mg protein olarak ifade edildi.

3.2.6.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ): Örneklerin oksidatif stres indeksleri total oksidan seviyenin, total antioksidan seviyeye oranı şeklinde matematiksel denklemler ile hesaplandı (124). Serum için oksidatif stres indeksi Arbitrary Unit (AU), doku için ise AU mg protein olarak ifade edildi.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS 25 paket programı ile yapıldı. Nicel değişkenler için aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri sunuldu. İki den çok kategori içeren nitel değişkenlerle nicel değişkenler arasındaki karşılaştırmalarda tek yönlü ANOVA kullanıldı. Tek yönlü ANOVA sonucunda anlamlı farklılık bulunması durumunda post-hoc yöntemlerden LSD testi ile kategoriler karşılaştırıldı. Tip I hata oranı 0,05 olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. MORFOMETRİK BULGULAR

Deney gruplarına ait morfometrik ölçüm sonuçları (seminifer tübül çapı, bazal membran kalınlığı ve germinal epitel kalınlığı) ortalama ve standart sapma olarak Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Seminifer tübül çaplarında yapılan ölçümlere göre yalnız RT uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen bu iki grubun seminifer tübül çapının G1 (Kontrol), G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu saptandı ($p < 0,001^*$).

Bazal membran kalınlıklarının ölçümlerine göre RT ile birlikte melatonin uygulanan G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarında bazal membran kalınlığının G1 (Kontrol) grubuna kıyasla azalmış olduğu ($p < 0,001$) ve bu iki grubun arasında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi. G4 (YDHR) grubunda bazal membran kalınlığının G2 (DDHR) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkla azaldığı saptandı ($p < 0,001^*$).

Tablo 4.1: Deney gruplarının morfometrik verilerinin ortalama ve standart sapma değerleri

	Seminifer tübül çapı (μm)	Bazal membran kalınlığı (μm)	Germinal epitel (μm)
Kontrol (G1)	339,8±35,26	6,5±0,64	111,93±14,98
DDHR (G2)	362,59±47,43	2,2±0,76	122,78±21,72
DDHR+MEL (G3)	345,86±42,44	3,79±0,63	107,56±12,78
YDHR (G4)	364,39±50,38	1,91±1,69	119,84±20,56
YDHR+MEL (G5)	344,79±32,52	3,49±1,13	106,96±18,59
F	7,669	168,18	25,207
p	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Farklılık	G2,G4 > G1,G3,G5	G1> G3,G5 > G2 > G4	G2,G4> G1,G3,G5

Germinal epitel kalınlığının yalnız RT uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarında en yüksek olduğu, G1 (Kontrol), G3 (DDHR+MEL) G5 (YDHR+MEL) gruplarında ise bu kalınlığın azaldığı görüldü ($p<0,001^*$). G1 (Kontrol), G3 (DDHR+MEL) G5 (YDHR+MEL) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

4.2. MORFOLOJİK BULGULAR

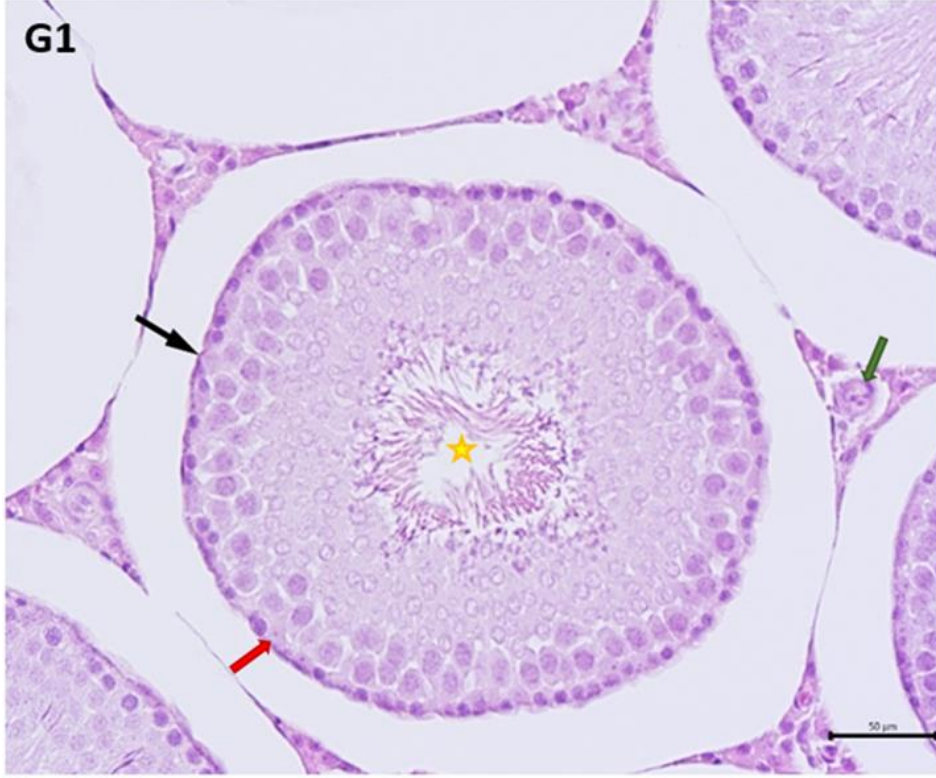
4.2.1. Işıık Mikroskobik Bulgular

Deney gruplarına ait testis dokularının histolojik kesitleri incelendiğinde aşığıdaki bulgular elde edildi;

G1 (Kontrol) grubunda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmadı; seminifer tübüller, spermatogenik seriye ait hücreler normal yapıda izlendi. İnterstisyel bağ dokusu ve interstisyel alandaki Leydig hücreleri normal olarak izlendi. G1 (Kontrol) grubuna ait ışık mikroskobu görüntüleri Resim 4.1’de gösterilmiştir.

G2 (DDHR) grubunda; bazal membranda düzensizlikler, seminifer tübüllerin germinal epitelinde düzgün olmayan yapılanma ve spermatogenik seri hücrelerinin sayısında azalma, yer yer vakuolizasyon, tübül lümenindeki spermatozoonların sayıca azalması, interstisyel alanda açılmalar ve yer yer kopmalara eşlik eden morfolojik bozulmalar görüldü. G2 (DDHR) grubuna ait histopatolojik bulgular Resim.4.2.’de gösterilmiştir.

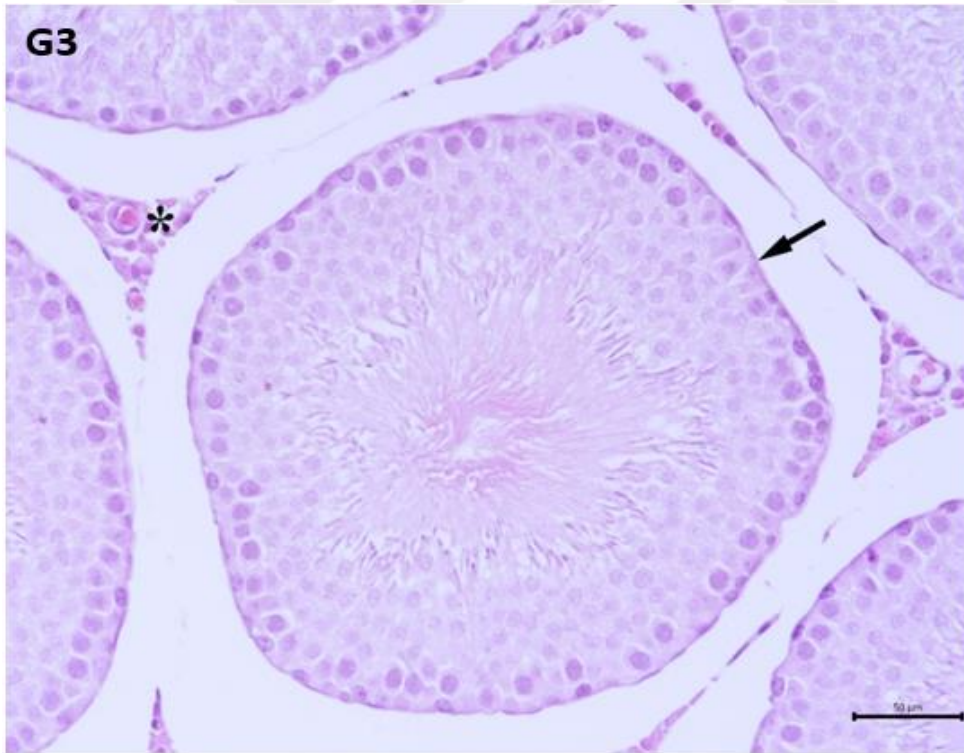
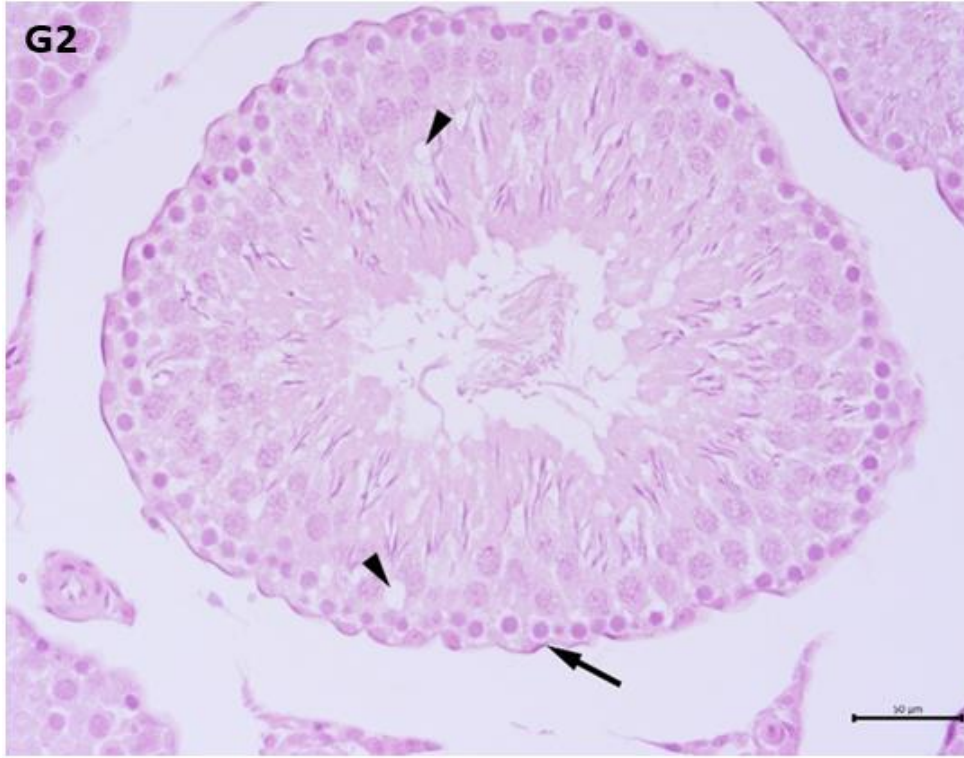
G3 (DDHR+MEL) grubunda; histolojik kesitlerin morfolojik yapısının G1 (Kontrol) grubuna benzer olduğu ve G2 (DDHR) grubuna kıyasla histopatolojik bulguların daha hafif olduğu görüldü. G2 (DDHR) grubu ile karşılaştırıldığında G3 (DDHR+MEL) grubunda bazal membran ve germinal epitel yapısında düzelmeler ve vakuolizasyon oranında azalma, interstisyel alandaki açılmalarda azalma olduğu ancak yer yer kopmaların devam ettiği görüldü. G3 (DDHR+MEL) grubuna ait histopatolojik bulgular Resim 4.2’de gösterilmiştir.



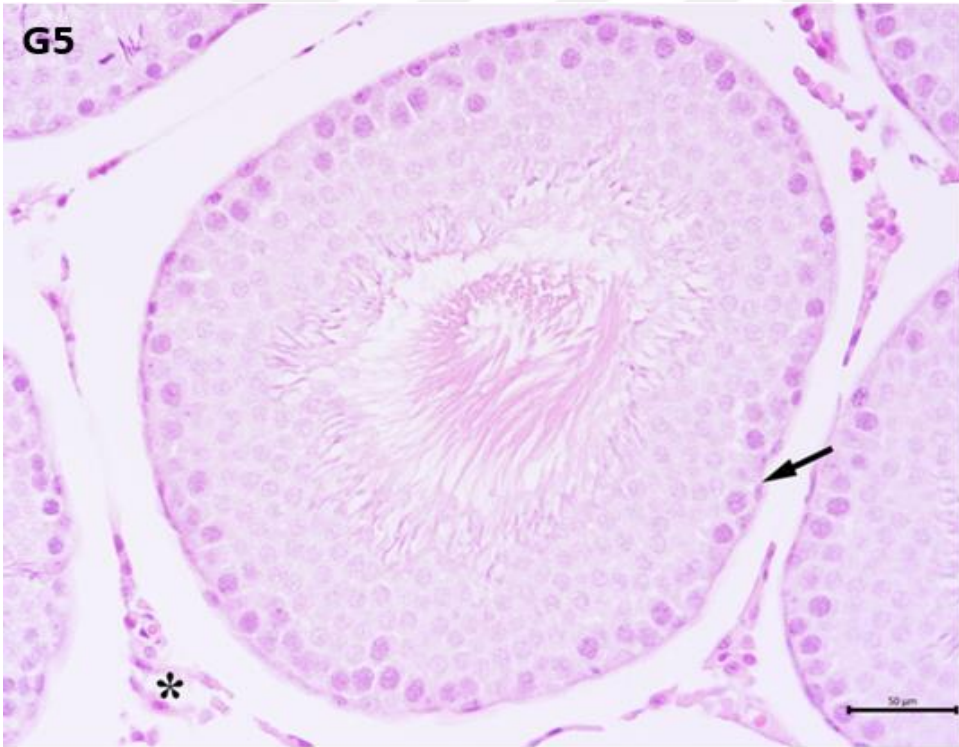
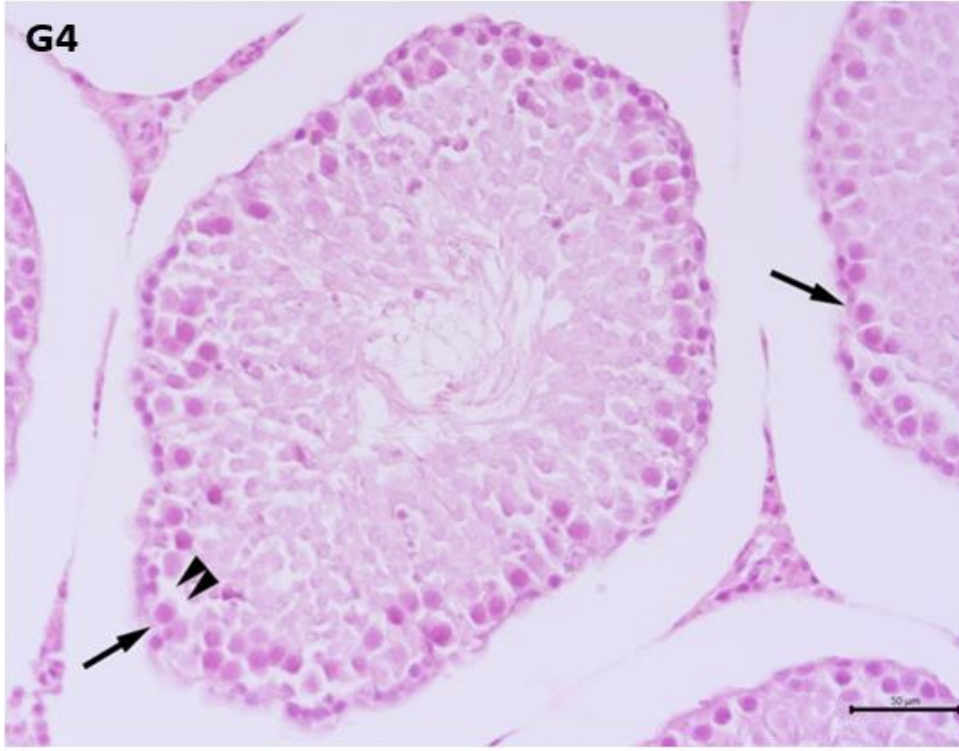
Resim 4.1: G1 (Kontrol) grubu testis dokusu ışık mikroskobu görüntüsü. Sarı yıldız: normal morfoloji gösteren seminifer tübül lümeni, kırmızı ok: Sertoli hücresi, yeşil ok: Leyding hücresi, siyah ok: bazal membran (Bar: 50 µm, H&E)

G4 (YDHR) grubunda; bazal membranda düzensizlikler ve ayrılmalar, seminifer tübüllerin germinal epitelinde düzgün olmayan yapılanma ve spermatogenik seri hücrelerinin sayısında azalma, vakuolizasyonda artış, tübül lümeninde sayıca azalan spermatogenik hücreler, intertisyel alanda yer yer kopmalar görüldü. G4 (YDHR) grubuna ait histopatolojik bulgular Resim 4.3'te gösterilmiştir.

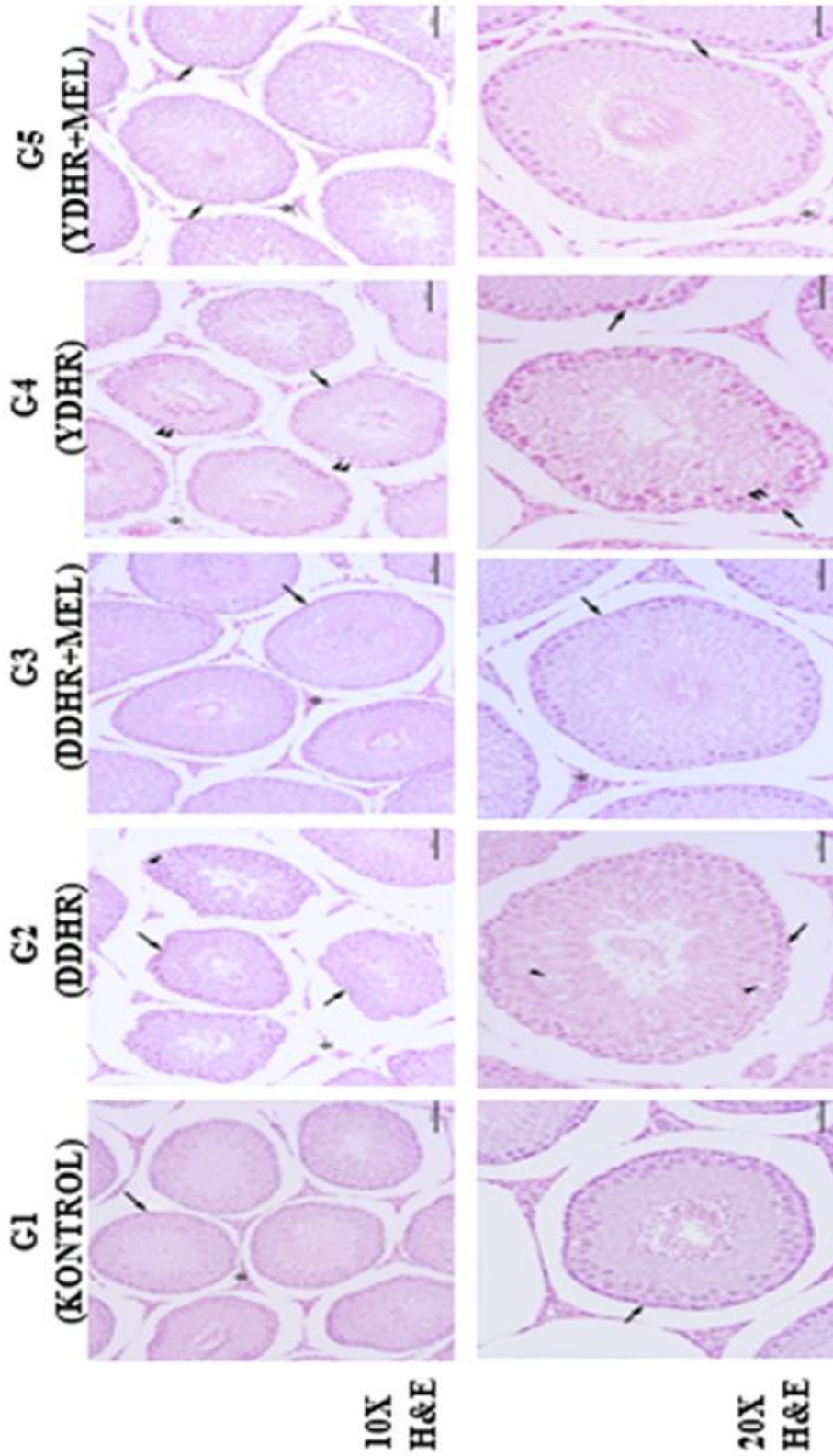
G5 (YDHR+MEL) grubunda; histopatolojik bulguların G4 (YDHR) grubuna göre daha az oranda seyrettiği, lümendeki sperm sayısının daha fazla olduğu, germinal epitelde artan spermatogenik seri hücreleri ve daha düzenli germinal epitelin varlığı görüldü. Bazal membranda kopmalar ve yer yer vakuolizasyon görüldü. G5 (YDHR+MEL) grubuna ait histopatolojik bulgular Resim 4.3'te gösterilmiştir. Tüm deney gruplarına ait testis dokularının ışık mikroskobu görüntüleri Resim 4.4'te karşılaştırılmıştır.



Resim 4.2: G2 (DDHR) ve G3 (DDHR+MEL) gruplarında testis dokusu ışık mikroskobu görüntüleri. Siyah ok: bazal membran, siyah ok başı: vakuolizasyon, siyah yıldız: interstisyel alan (Bar: 50 µm, H&E)



Resim 4.3: G4 (YDHR) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarında testis dokusu ışık mikroskobu görüntüleri. Siyah ok: bazal membran, siyah çift ok başı: germinal epitelde ayrılmalar, siyah yıldız: interstisyel alan (Bar: 50 µm, H&E)



Resim 4.4: Bütün deney gruplarına ait testis dokularının ışık mikroskobu görüntüleri. Siyah ok: bazal membran, siyah ok başı: vakuolizasyon, siyah çift ok başı: germinal epitelde ayrılımlar, siyah yıldız: interstisyel alan (Bar 50 μm ve 100 μm , H&E)

Germinal epitel hücrelerinin JTBS ait veriler karşılaştırıldığında (Tablo 4.2) G1 (Kontrol) grubunun JTBS'nin en yüksek olduğu saptandı. G1 (Kontrol) grubu ile kıyaslandığında, RT ile birlikte melatonin uygulanan G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarının (kendi aralarında anlamlı fark olmamakla birlikte) JTBS'nin azaldığı görüldü ($p<0,001^*$). Yalnız RT uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) grupları arasında (kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla birlikte) diğer gruplara göre JTBS en düşüktü ($p<0,001^*$).

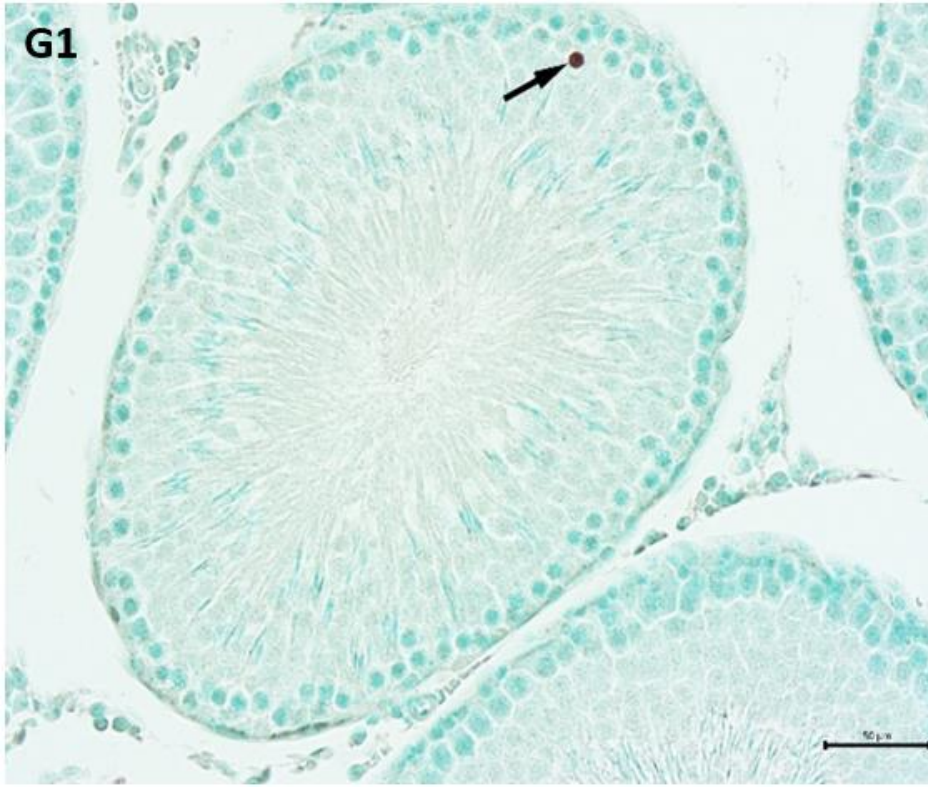
Tablo 4.2: Deney gruplarında JTBS ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	Johnson Skoru
Kontrol (G1)	9,23±0,42
DDHR (G2)	7,41±0,86
DDHR+MEL (G3)	8,01±0,94
YDHR (G4)	7,51±0,69
YDHR+MEL (G5)	7,88±0,9
F	46,157
p	<0,001*
Farklılık	G1> G3,G5 > G2, G4

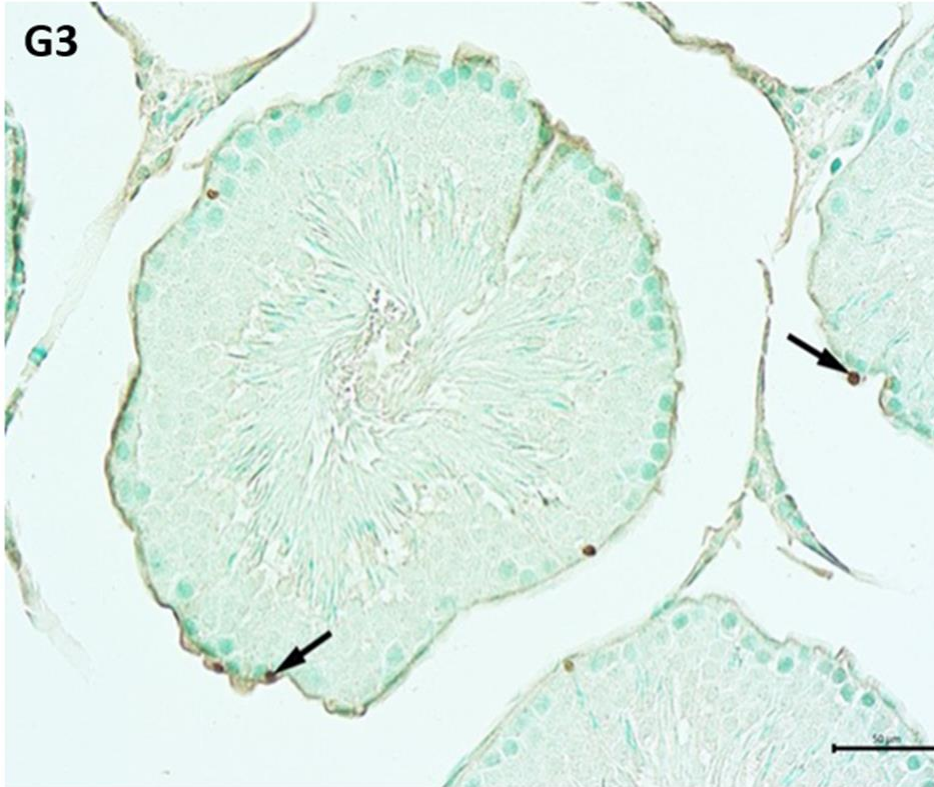
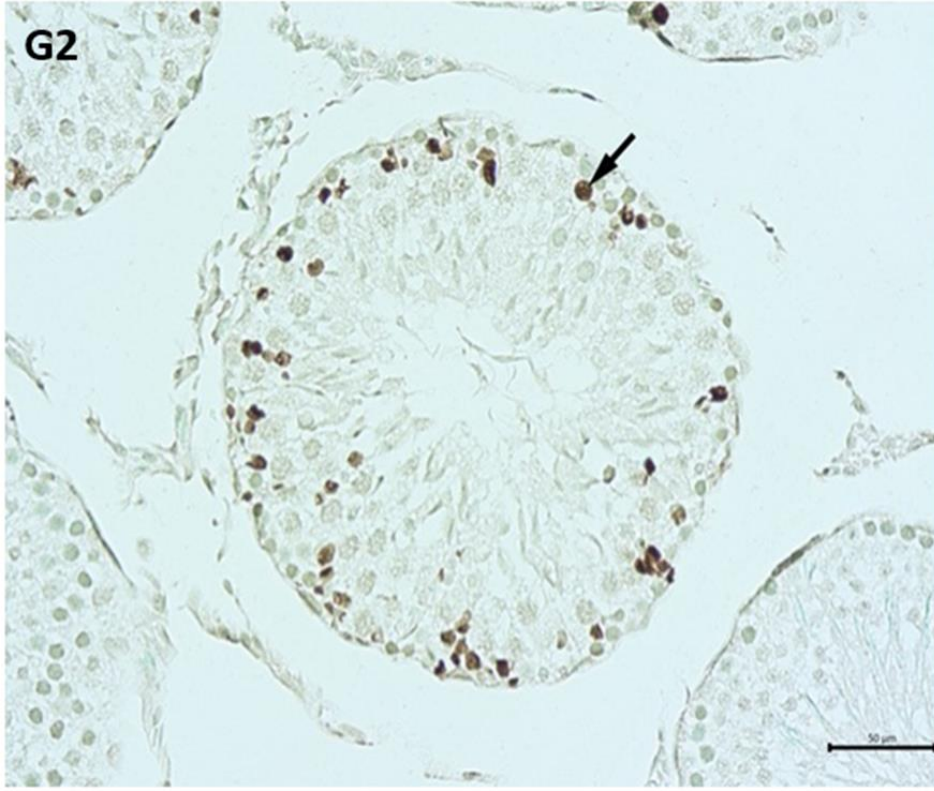
TUNEL boyama sonucu elde edilen apoptotik hücrelerin yüzde olarak verileri karşılaştırıldığında, Yalnız RT uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarının en yüksek değerde olduğu ve bu iki grup arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi. Apoptotik yüzde değerinin sırasıyla RT ile birlikte melatonin uygulanan G5 (YDHR+MEL), G3 (DDHR+MEL) ve G1 (Kontrol) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p<0,001^*$) (Tablo 4.3). Tüm gruplara ait TUNEL pozitif hücrelerin görüntüleri Resim 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.3: Deney grupları arasında apoptotik yüzde verileri (%) verilerinin karşılaştırılması

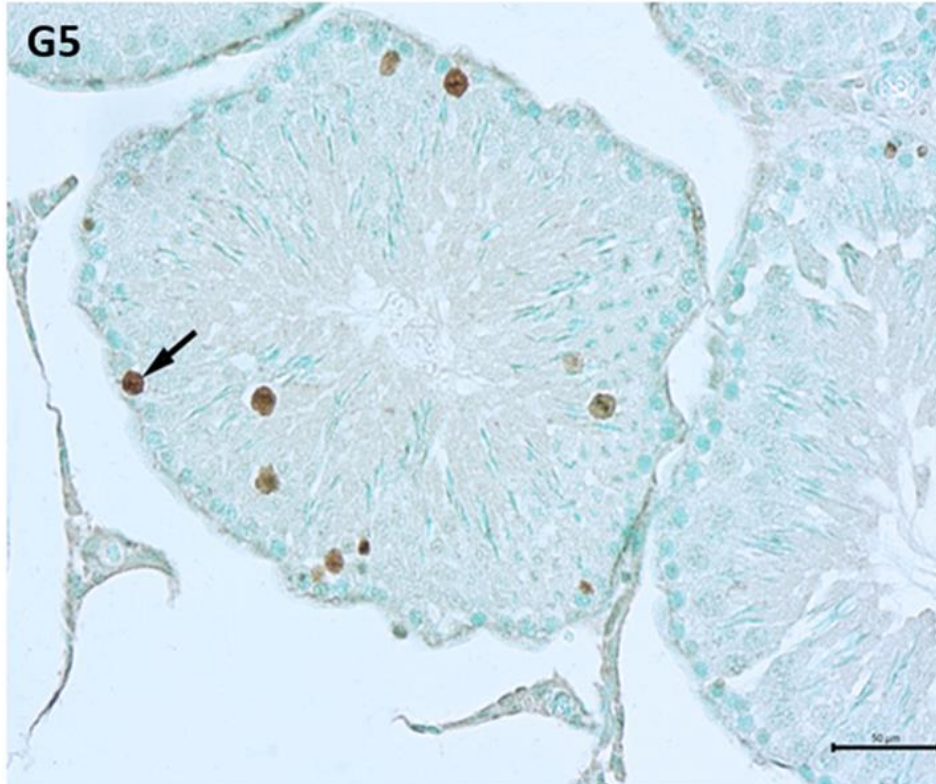
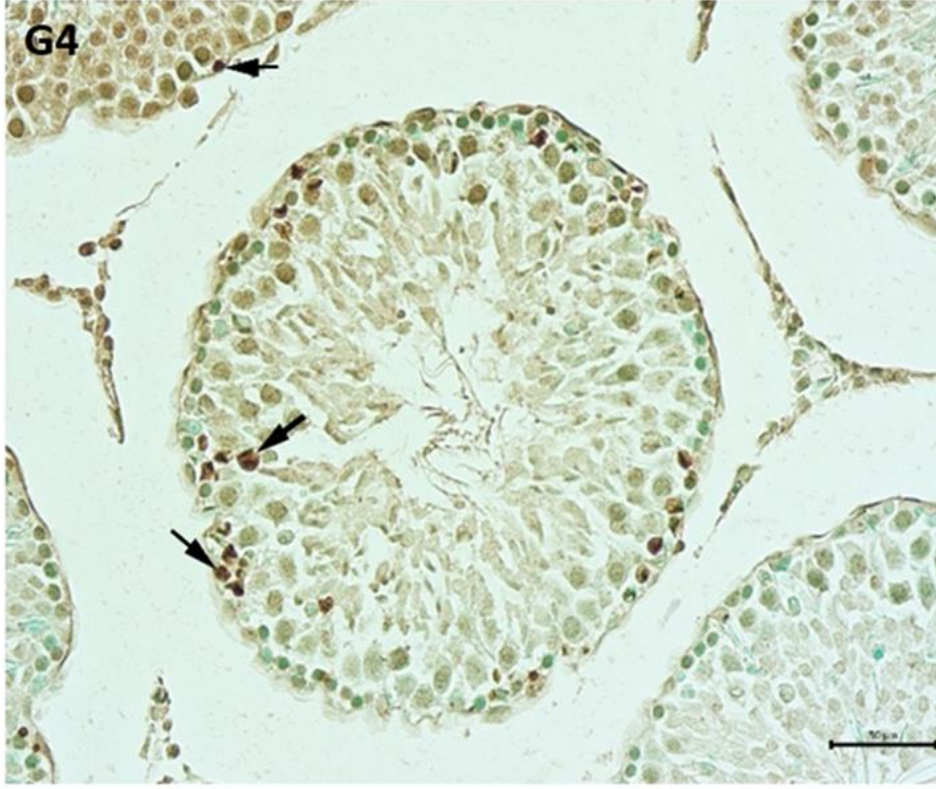
Gruplar	TUNEL
Kontrol (G1)	1,67±0,96
DDHR (G2)	5,9±5,39
DDHR+MEL (G3)	3,98±4,8
YDHR (G4)	5,91±6
YDHR+MEL (G5)	4,81±4,96
F	29,257
p	<0,001*
Farklılık	G2,G4 >G5 >G3 >G1



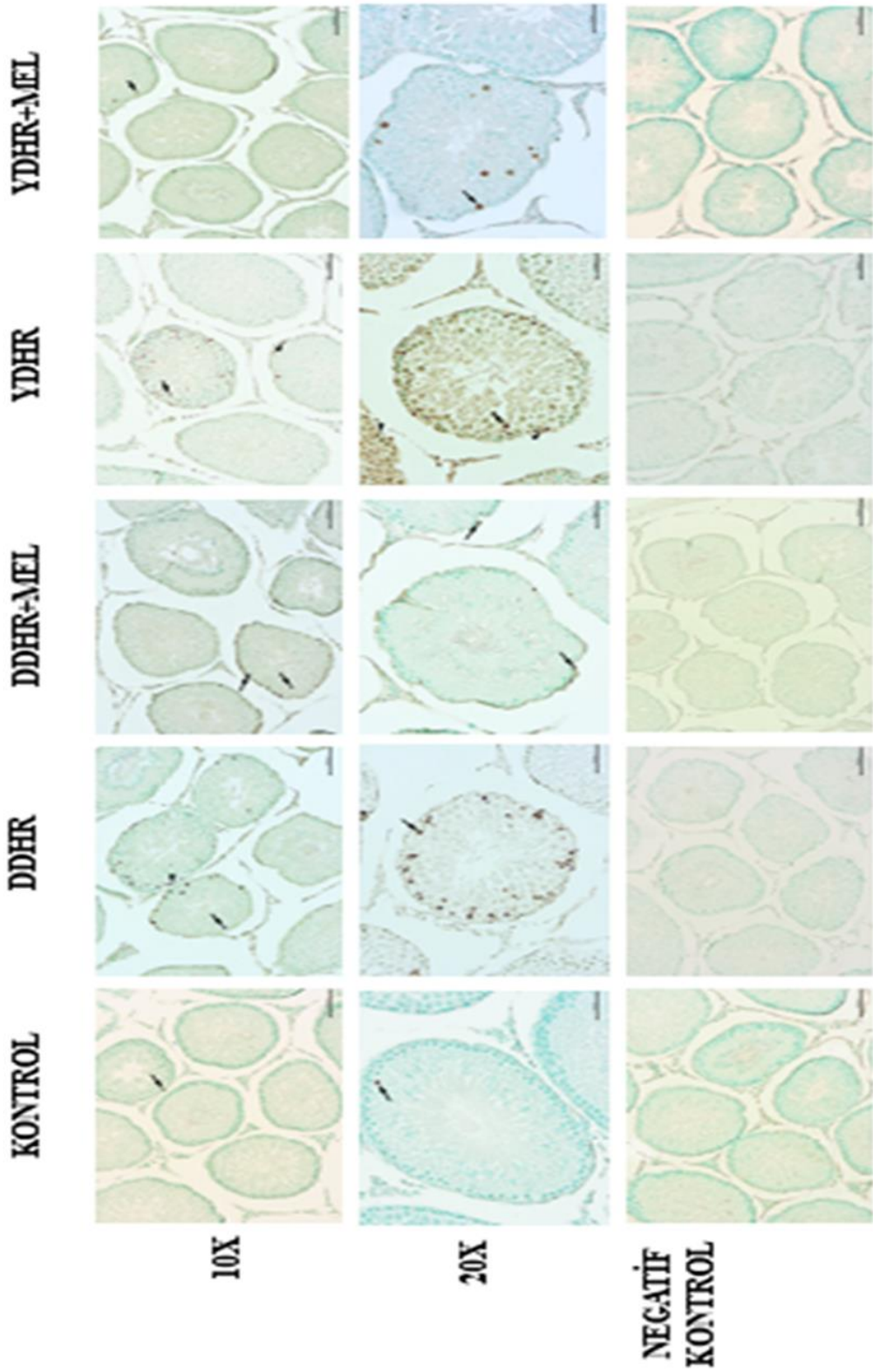
Resim 4.5: G1 (Kontrol) grubunda TUNEL pozitif (+) germ hücresinin (siyah ok) ışık mikroskobu görüntüsü (Bar 50μm, TUNEL)



Resim 4.6: G2 (DDHR) ve G3 (DDHR+MEL) gruplarında TUNEL pozitif (+) germ hücrelerinin (siyah ok) ışık mikroskobu görüntüleri (Bar 50µm, TUNEL)



Resim 4.7: G4 (YDHR) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarında TUNEL pozitif (+) germ hücrelerinin (siyah ok) ışık mikroskobu görüntüleri (Bar 50µm, TUNEL)



Resim 4.8: Bütün deney gruplarına ait testis dokularında TUNEL pozitif (+) germ hücrelerinin (siyah ok) ışık mikroskobu görüntüleri (Bar 50µm ve 100 µm, TUNEL)

4.2.2. Floresan Mikroskop Bulguları

Normal seminifer tübül epitelinde, Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar kan-testis bariyerinin ana bileşenini oluşturur. RT bağlı olarak kan-testis bariyerinin morfolojik ve/veya fonksiyonel olarak değişip değişmediğini belirlemek için sıkı bağlantı proteini olan ZO-1 ekspresyonu ve dağılım paterni anti ZO-1 antikoru ile germinal epitel hücrelerindeki ve sperm akrozomlarındaki glikokonjugatların ise Lectin PNA antikoru ile lokalizasyonu immünfloresan boyama yöntemiyle incelendi.

ZO-1 immünolokalizasyonu seminifer epitelin bazal membranında izlendi. G1 (Kontrol) grubunda ZO-1 pozitif alanlar izlenirken boyama şiddetinin diğer gruplara kıyasla daha yoğun olduğu görüldü ($p<0.001^*$). Yalnız RT uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarında gruplar arası anlamlı fark olmamakla birlikte germinal hücre kayıplarının olduğu bölgelerde ZO-1 pozitif alanların zayıflayarak azaldığı, bazı bölgelerde ise hiç görülmediği saptandı. Bu gruplarda azalmış olan ZO-1 ekspresyonunun RT ile birlikte melatonin uygulanan G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarında anlamlı farkla arttığı ve G1 (Kontrol) grubuna yakın olduğu görüldü ($p<0.001^*$) (Tablo 4.4).

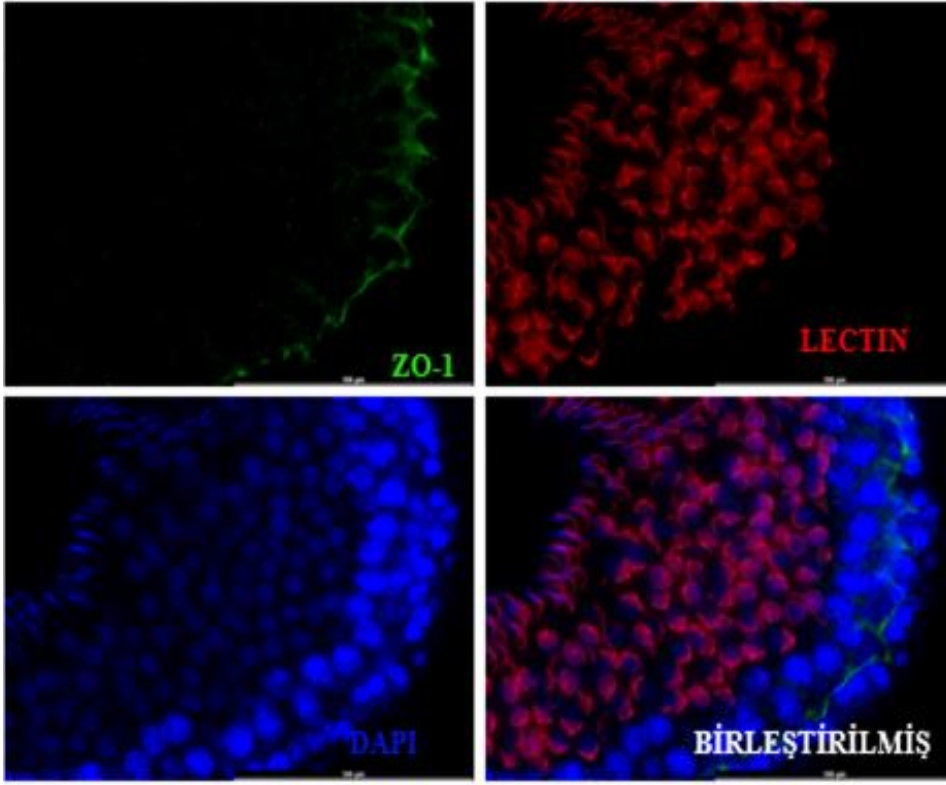
Lectin PNA ekspresyonu germinal epitel hücrelerinde seminifer tübül lümenine doğru artarak izlendi. G1 (Kontrol) grubunda Lectin PNA immünolokalizasyonu daha yoğun izlenirken bu yoğunluğun yalnız RT uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarında seminifer tübüllerin bütünlüğü bozulmuş kısımlarında bulunan spermatogenik seri hücrelerinde anlamlı farkla azaldığı ($p<0.001^*$), RT ile birlikte melatonin uygulanan G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL), gruplarında ise tekrar istatistiksel düzeyde anlamlı farkla artmış olduğu görüldü ($p<0.001$) (Tablo 4.5). Tüm gruplara ait floresan görüntüler Resim 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4: ZO-1 ve Lectin PNA antikorunun gruplar arasındaki H- SKOR değerleri

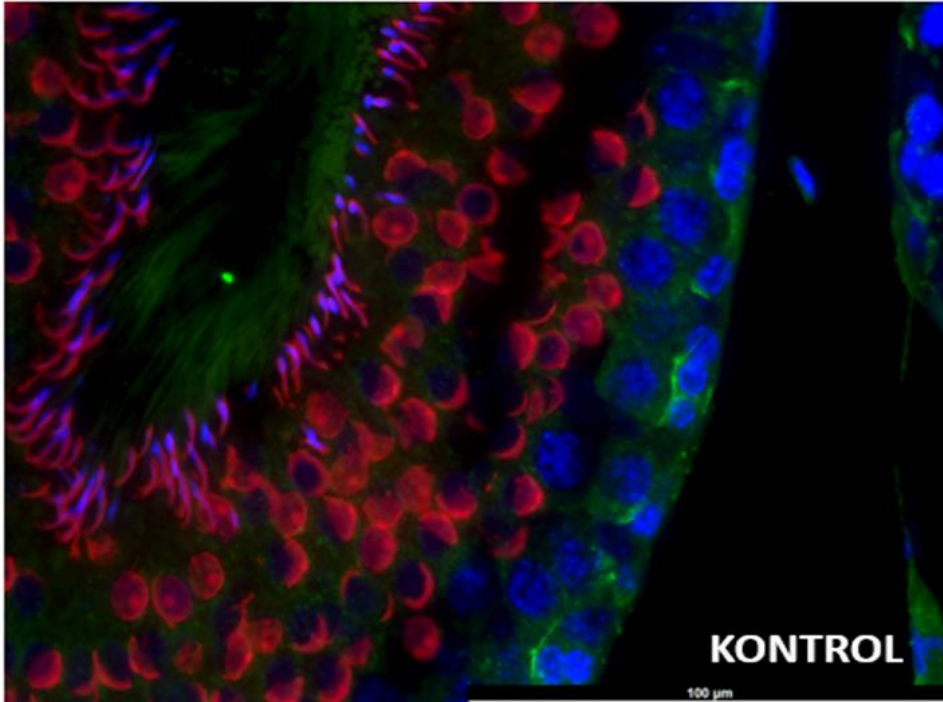
Gruplar	ZO-1	Lectin PNA
Kontrol (G1)	2,63±0,52	3±0
DDHR (G2)	1,25±0,46	1,25±0,71
DDHR+MEL (G3)	2,25±0,71	2,5±0,53
YDHR (G4)	1,5±0,53	1±0,53
YDHR+MEL (G5)	2,38±0,74	2,25±0,46
F	7,721	22,361
P	<0,001*	<0,001*
Farklılık	G1> G3,G5> G2,G4	G1,G3> G5> G2,G4

Tablo 4.5: ZO-1 ve Lectin PNA immünofloresan boyanma dereceleri. (+): zayıf, (++):
orta, (+++): güçlü

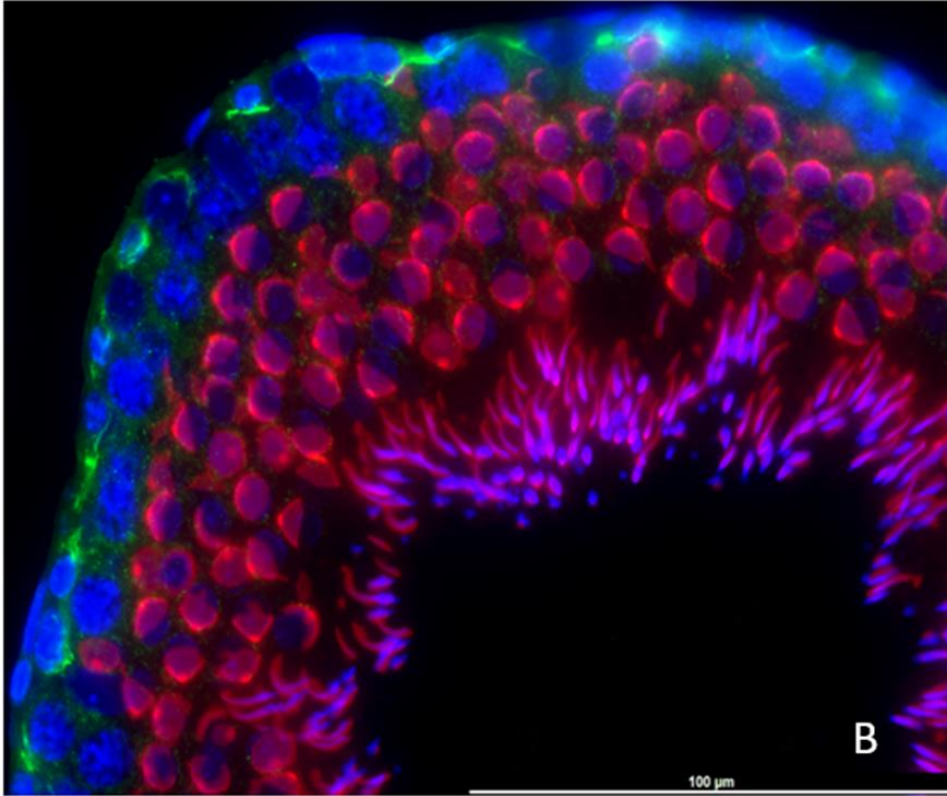
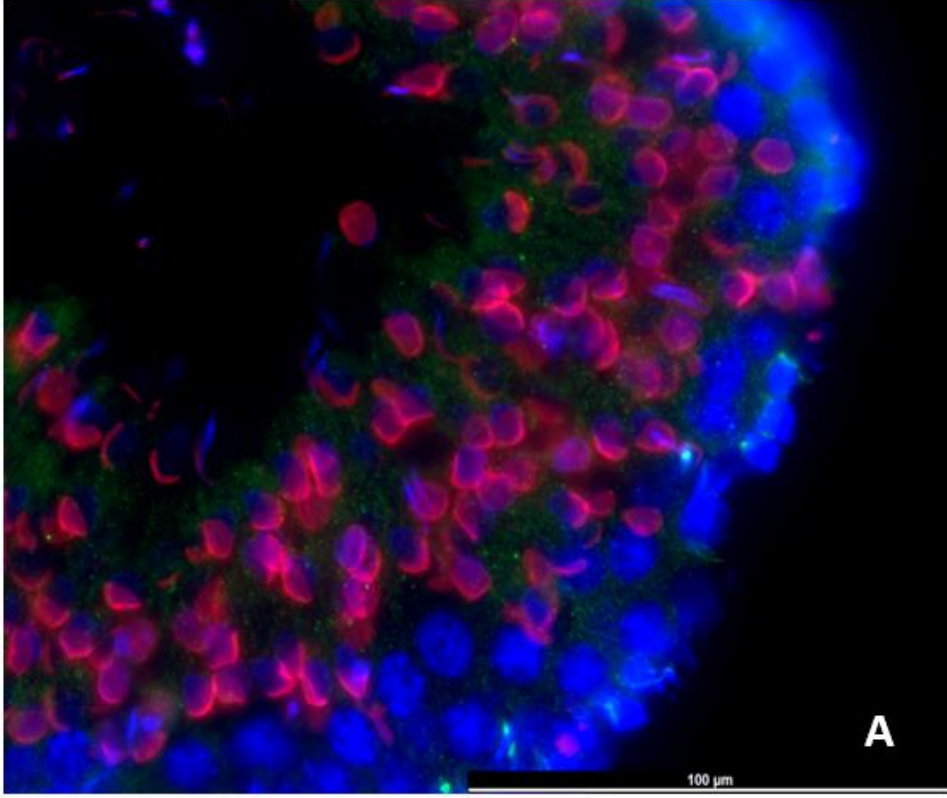
Gruplar	ZO-1	Lectin PNA
Kontrol (G1)	+++	+++
DDHR (G2)	+	+
DDHR+MEL (G3)	++	+++
YDHR (G4)	+	+
YDHR+MEL (G5)	++	++



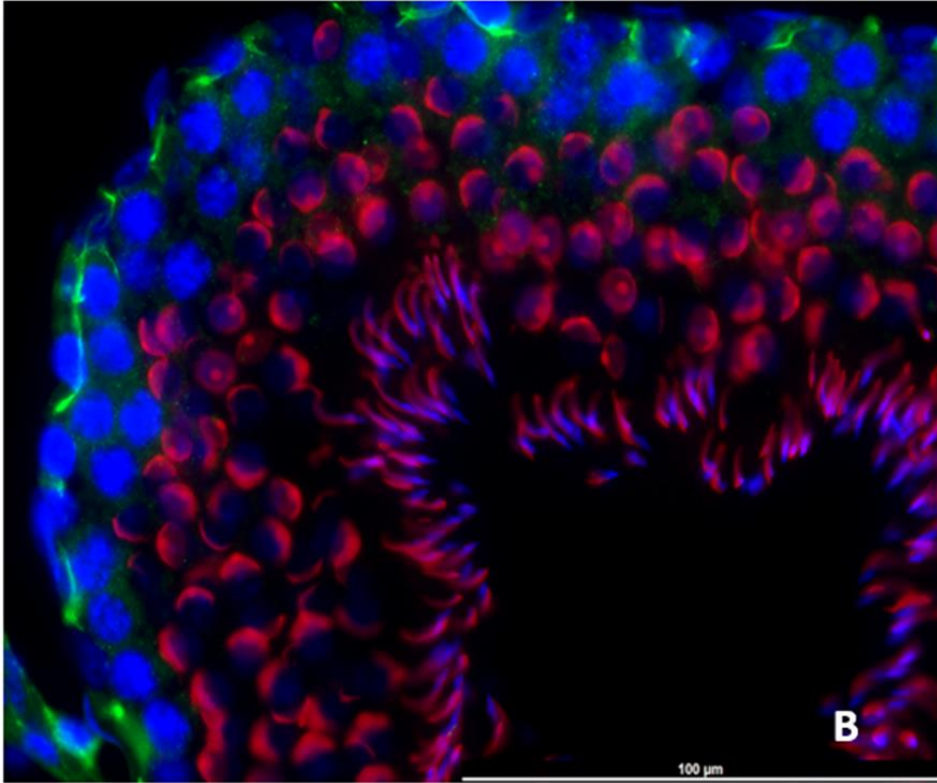
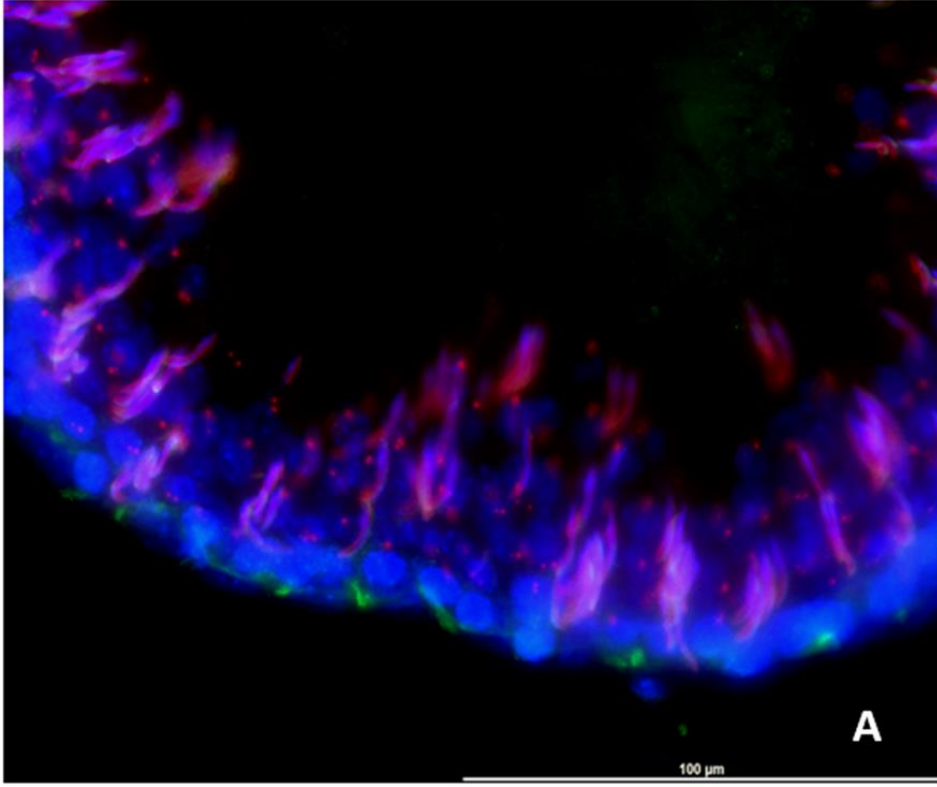
Resim 4.9: G1 (Kontrol) grubu testis dokusunda ZO-1 (yeşil) ve Lectin PNA (kırmızı) antikorlarının floresan mikroskop görüntüleri (Bar 100 μ m, 63X)



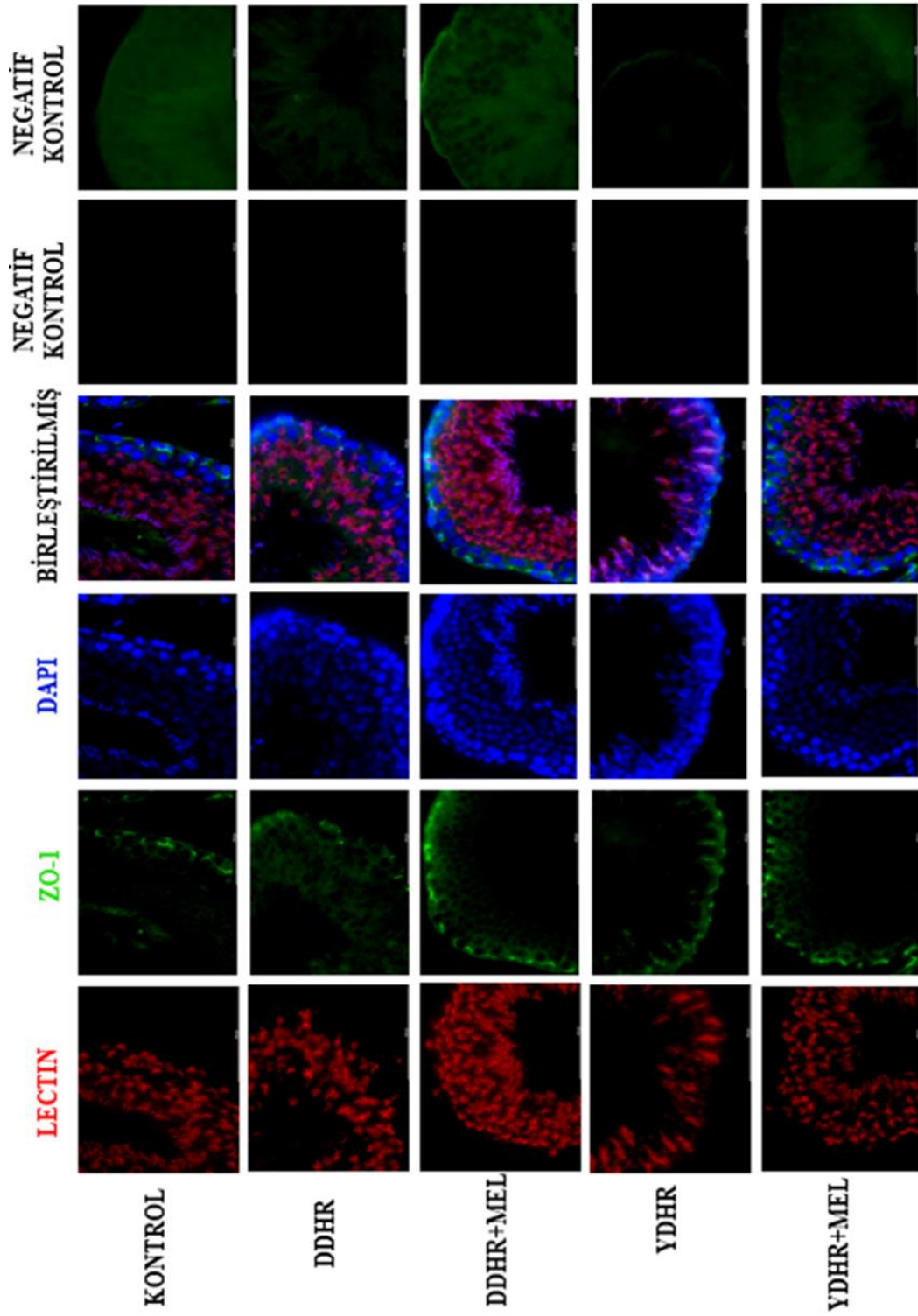
Resim 4.10: G1 (Kontrol) grubu testis dokusunda ZO-1 (yeşil) ve Lectin PNA (kırmızı) antikorlarının floresan mikroskop görüntüsü (Bar 100 μ m, 63X)



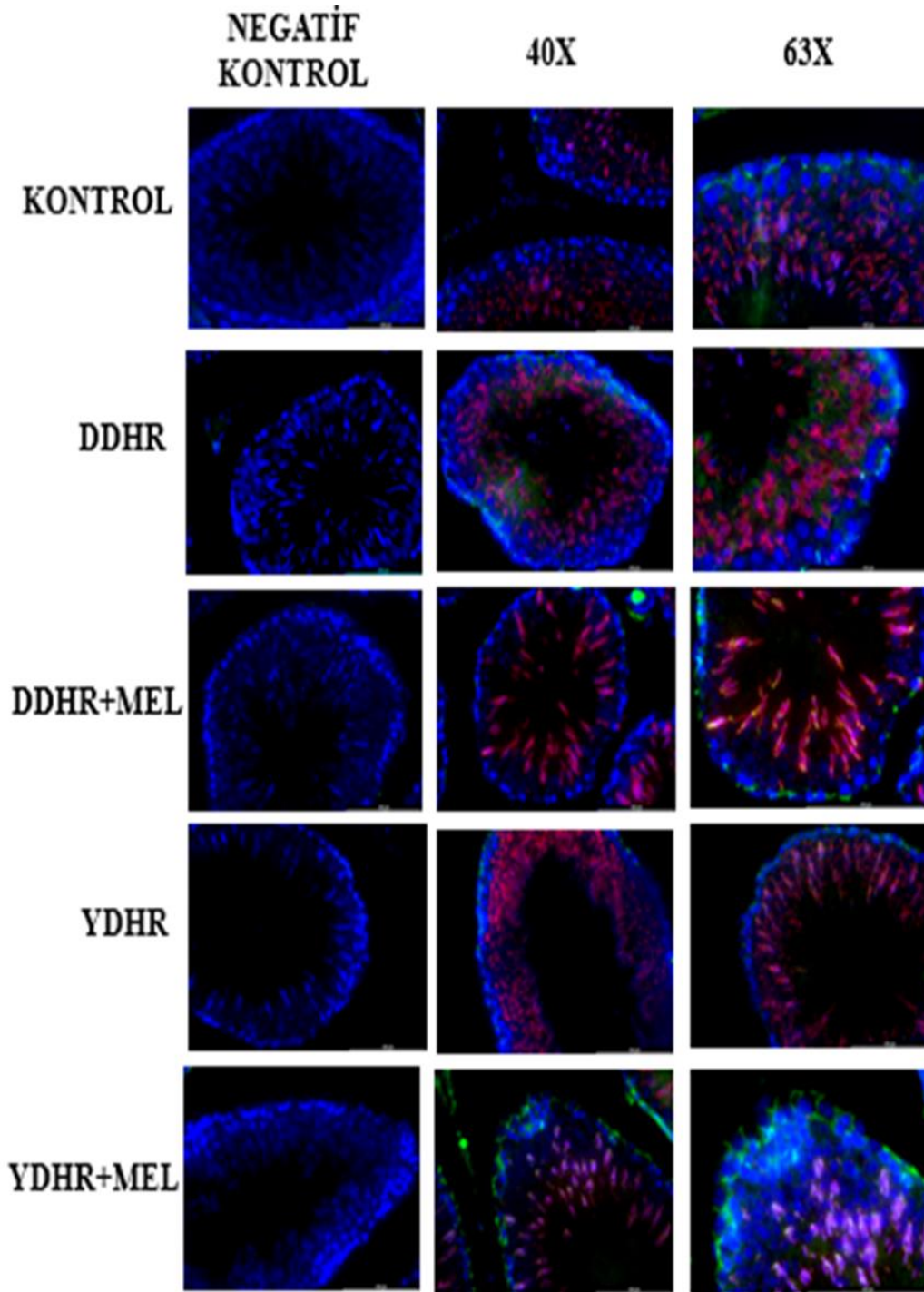
Resim 4.11: G2 (DDHR) (A), G3 (DDHR+MEL) (B) gruplarında ZO-1 (yeşil) ve Lectin PNA (kırmızı) antikorlarının floresan mikroskop görüntüleri (Bar 100 µm, 63X)



Resim 4.12: G4 (YDHR) (A), G5 (YDHR+MEL) (B) gruplarında ZO-1 (yeşil) ve Lectin PNA (kırmızı) antikorlarının floresan mikroskop görüntüleri (Bar 100 µm, 63X)



Resim 4.13: ZO-1 (yeşil) ve Lectin PNA (kırmızı) antikorlarının floresan mikroskop görüntüleri (40X, 63X)



Resim 4.14: ZO-1 (yeşil) ve Lectin PNA (kırmızı) antikorlarının floresan mikroskop görüntüleri (40X, 63X)

4.3. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERE AİT BULGULAR

Deney gruplarına ait testis dokuları ve kan serumlarından elde edilen TAS, TOS ve OSI değerleri, ortalama ve standart sapma olarak sunulmuştur (Tablo 4.6).

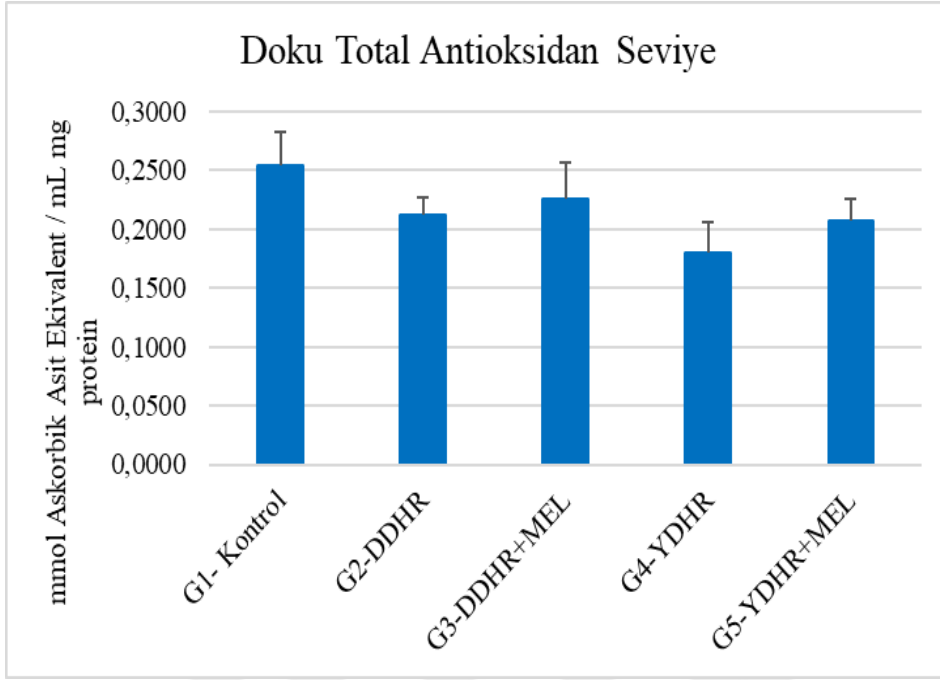
Tablo 4.6: Serum ve testiküler doku TAS, TOS ve OSI değerlerine ait ortalama ve standart sapma değerleri

	G1 Kontrol	G2 DDHR	G3 DDHR+ MEL	G4 YDHR	G5 YDHR+ MEL	F	p	Farklılık
Doku TAS (mmol / ml, mg rotein)	0,25±0,02	0,21±0,02	0,23±0,03	0,18±0,03	0,21±0,02	11,608	<0,001*	G1,G3 > G2,G4,G5
Doku TOS (µmol / ml mg rotein)	0,17±0,01	0,24±0,04	0,23±0,04	0,27±0,04	0,21±0,04	7,93	<0,001*	G2,G4 > G1,G3,G5
Doku OSI /AU	0,68±0,07	1,13±0,16	1,04±0,18	1,55±0,35	1,02±0,17	17,8	<0,001*	G4> G2,G3> G1,G5
Serum TAS (µmol / ml, mg rotein)	1,42±0,13	1,24±0,18	1,3±0,27	0,66±0,16	0,89±0,15	23,751	<0,001*	G1,G2,G3 > G4,G5
Serum TOS (µmol / ml mg rotein)	17,24±1,28	20,34±0,79	19,9±0,96	21,21±1,46	18,81±1,38	13,025	<0,001*	G2,G3,G4 > G1,G5
Serum OSI /AU	12,53±1,32	16,76±2,58	15,98±3,61	34,79±12,52	21,72±4,44	15,339	<0,001*	G4 > G1,G2, G3,G5

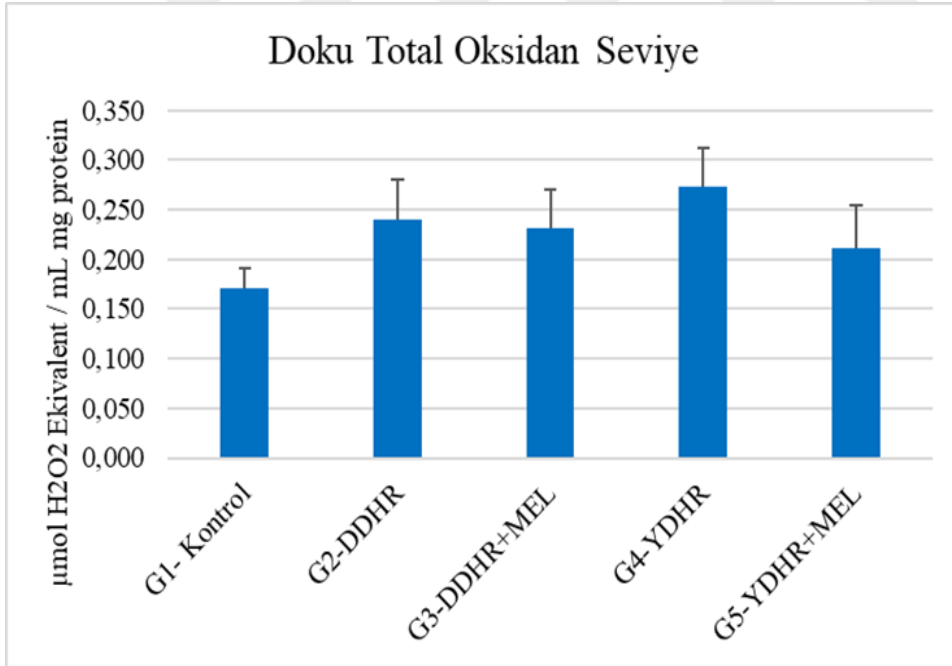
Testis dokularındaki TAS düzeyleri gruplar arasında kıyaslandığında; G1 (Kontrol) ve G3 (DDHR+MEL) grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmezken bu grupların TAS düzeylerinin G2 (DDHR), G4 (YDHR) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görüldü (p <0,001*) (Tablo 4.7).

Doku TOS seviyeleri karşılaştırıldığında; G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ve bu grupların TOS değerlerinin G1 (Kontrol), G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (p <0,001*) (Tablo 4.8).

Tablo 4.7: Deney grupları arasında doku TAS değerlerinin karşılaştırılması

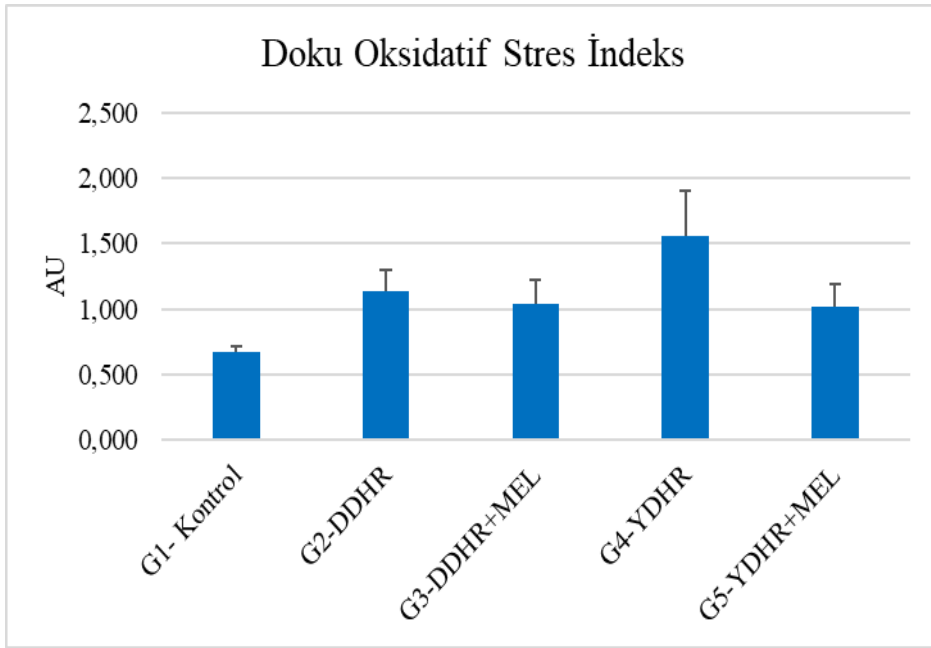


Tablo 4.8: Deney grupları arasında doku TOS değerlerinin karşılaştırılması



Doku OSI değerlerine bakıldığında; bu değer G4 (YDHR) grubunda anlamlı düzeyde en yüksek, G1 (Kontrol) ve G5 (YDHR+MEL) grubunda ise en düşük değerde olduğu görüldü. G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) grupları ve G4 (YDHR) ve G5 (YDHR+MEL) grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,001^*$) (Tablo 4.9).

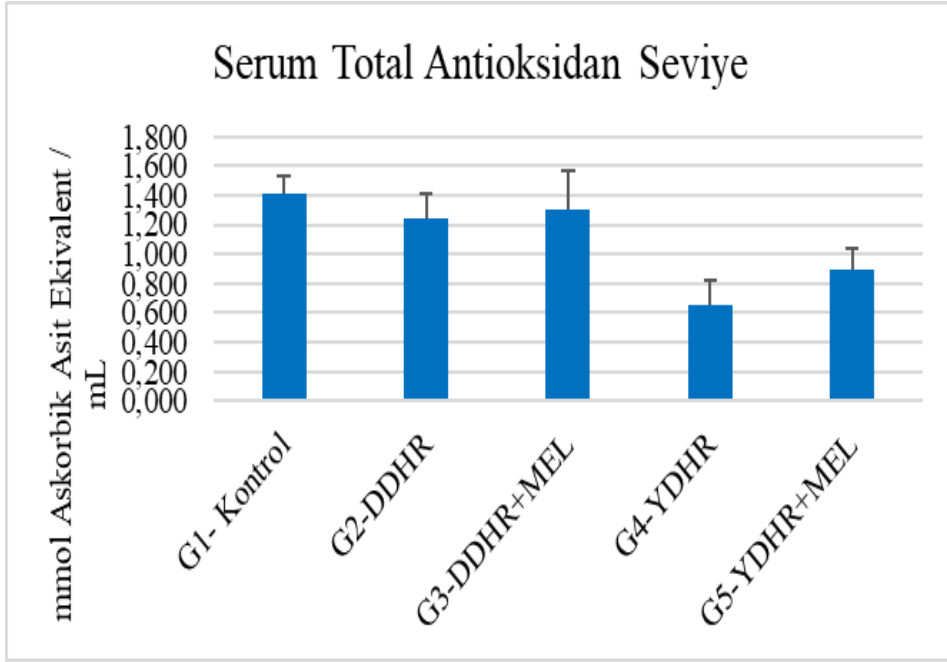
Tablo 4.9: Deney grupları arasında doku OSI değerlerinin karşılaştırılması



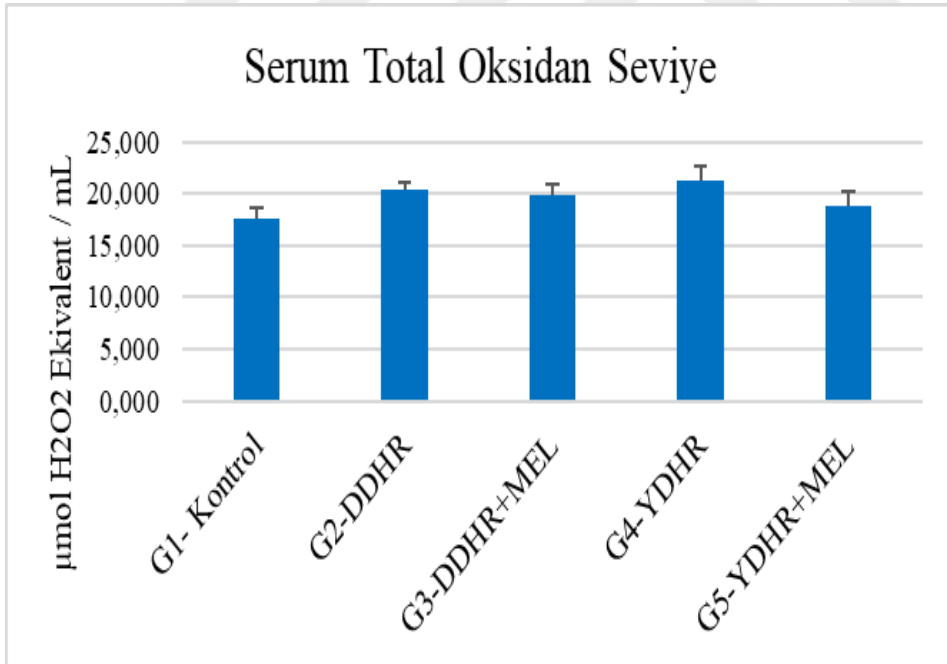
Serum TAS düzeyleri gruplar arasında kıyaslandığında; G1 (Kontrol), G2 (DDHR) ve G3 (DDHR+MEL) gruplarının değerleri G4 (YDHR) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p < 0,001^*$) (Tablo 10).

Serum TOS değerleri karşılaştırıldığında; (G2) DDHR, G3 (DDHR+MEL) ve G4 (YDHR) gruplarının değerleri G1 (Kontrol) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p < 0,001^*$) (Tablo 11).

Tablo 4.10: Deney grupları arasında serum TAS değerlerinin karşılaştırılması

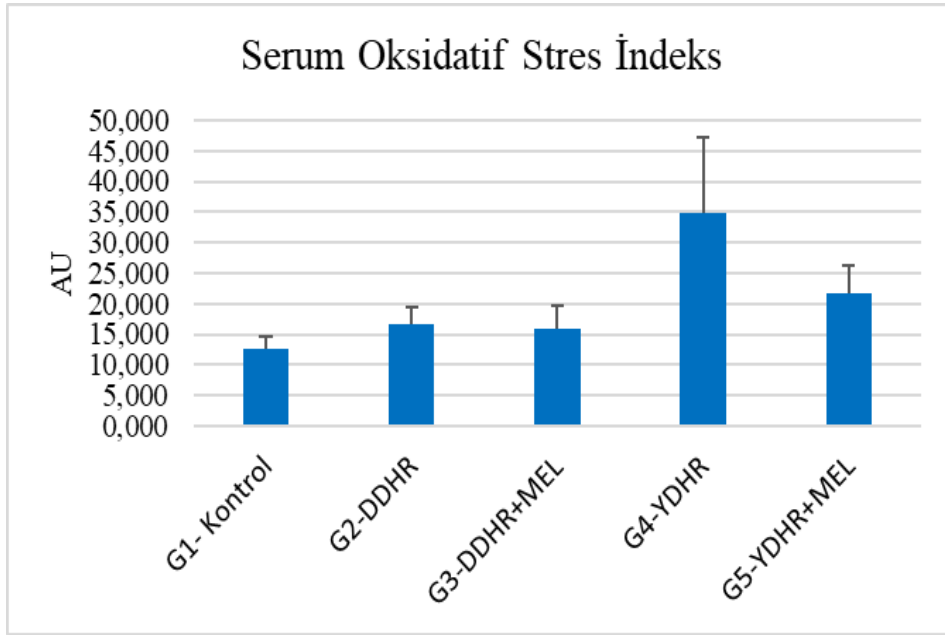


Tablo 4.11: Deney grupları arasında serum TOS değerlerinin karşılaştırılması



Serum OSI seviyeleri değerlendirildiğinde; G4 (YDHR) grubunun değerinin diğer gruplardan istatistiksel olarak yüksek olduğu görüldü ($p < 0,001^*$) (Tablo 12).

Tablo 4.12: Deney grupları arasında serum OSI değerlerinin karşılaştırılması



5. TARTIŞMA

Testis kanserlerinin tedavisinde modern radyoterapi teknikleri kullanılmaktadır. Tedavide öncelik RT olmasına rağmen, iyonize radyasyonun neden olduğu testis hasarı erkek hastalarda olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir (125). RT uygulamalarında tümörlü dokunun yok edilmesi kadar sağlıklı dokunun korunması da önemlidir. RT kliniklerinde tercih edilen, yeni bir kullanım yöntemi olarak “FFF ani yüksek doz hızları metodu” dört kata kadar doz hızı artışına olanak sağlayarak uzun tedavi sürelerini azaltmaktadır (9,126). Ancak, bu doz hızlarının testis dokularındaki fiziksel etkileri sonucu oluşan hücre hasarının radyobiyojik açıdan değerlendirilmesi ve oluşabilecek hasara karşı radyokoruyucuların etkileri literatürde tam olarak ortaya konulmamıştır (125). Yüksek enerjili iyonize X-ışınları kullanılarak, sıçanların abdominopelvik bölgelerine tek doz olarak verilen düşük ve yüksek doz hızlarındaki radyoterapi uygulamasının çevre sağlıklı dokulardaki oluşabilecek radyasyona bağlı doku hasarının ve bu hasarın onarılmasında melatoninin etkinliğinin incelenmesi bakımından değerlendirildiğinde çalışmamız bir ilktir.

FF ve FFF ışınlarının kanser ve sağlıklı hücreler üzerindeki radyobiyojik etkilerine ilişkin çalışmalar literatürde mevcuttur (127,128). Lasio ve ark. düşük doz hızlı iyonize radyasyonun sağlıklı dokularda ve kanser hücrelerinde sağ kalımı etkilediğini göstermişlerdir (129). Sorensen ve ark. ise çalışmalarında, farklı in-vitro hücre hatları kullanılarak FF ve FFF ışınlarının akut etkilerinin hücre sağ kalımı üzerinde etkili olmadığını tespit etmişlerdir (128). Kanser hücre sağkalımı üzerine yapılan bir başka çalışmada farklı doz hızlarında 5 Gy ve 10 Gy akciğer fibroblast hücre hattı ve glioblastoma hücre hattı ışınlanmıştır. 10 Gy ışınlamanın 5 Gy ışınlamaya kıyasla hücre sağkalımında daha etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca FFF ışınlarının hücre sağkalımında radyobiyojik etkisinde, doz hızının ışınlama süresine göre daha önemli bir parametre olduğu açıklanmıştır (130). King ve ark. DU-145 prostat ve H460 akciğer hücre hatlarına FFF teknolojisi ile 6MV iyonize X-ışınlarını kullanarak, hücre sağ kalımının iki hücre hattında da FFF hızına bağlı olmadığını kanıtlamışlardır (131). Bir başka çalışmada ise; Verbakal ve ark. FFF yüksek doz hızı ve FF konvansiyonel doz hızı ışınlamalarında hücre sağ kalımlarını astrocytoma D384, glioma T98 ve akciğer karsinom SW1573 hücre hatlarında karşılaştırmışlardır. FF 6MV enerji 600MU/min ve FFF 10MV enerji 2400MU/min doz hızlarında radyasyon verdikleri tüm

hücre hatlarında hem FF hem de FFF yüksek doz hızlarında sağ kalım açısından anlamlı fark gözlemediklerini belirtmişlerdir (127). Fogliata ve ark. da yaptıkları birçok çalışmada FF ve FFF ışınları arasında doz planı kalitesinde önemli bir fark olmadığını ileri sürmüşlerdir (132). Ling ve ark. radyoterapi süresince doz hızları ile total ışınlama sürelerinin hücre sağ kalımını etkilediğini belirtmiş, doz hızını etkileyen parametrelerin, serbest oksijen radikallerine, subletal hasarların tedavi sürelerine ve radyasyona maruz kalan dokulardaki farklılıklara bağlı olduğunu da vurgulamışlardır (133). Yapılan tüm bu çalışmalarda FFF yüksek ani doz hızlarının, farklı tümör hücre hatlarına uygulanarak tümör hücre sağ kalımı üzerinde radyobiyojik olarak önemli bir dozimetrik parametre olup olmadığı araştırılmıştır. Belirtilen bu sonuçlar arasındaki farklılıklarda, tercih edilen dozimetrik standardizasyonun ve kullanılan hücre hatlarının radyo duyarlılıklarının farklı olduğunu söyleyebiliriz. Bu çalışmalarda sunulan sonuçlar, FF ve FFF ışınlarının in vitro hücre kültürlerinin sağ kalımı üzerine olan etkilerine katkı sağlamasına rağmen FFF klinik doz hızı etkisinin, in-vivo radyobiyojik sonuçları hakkındaki belirsizlik devam etmektedir. RT'nin düşük ve yüksek doz hızlarının sadece hücre hatlarında değil, aynı zamanda sıçanların testis dokusunda radyasyona bağlı akut dönem hasarlarını inceleyen bilimsel bir çalışmaya rastlamadığımız için bu tez çalışmasının literatüre bu yönde katkı sağlamasını amaçlamaktayız.

Çalışmamızda; sıçanların abdominopelvik bölgelerine tek doz (8 Gy) olarak, G2 (DDHR) grubuna düşük doz hızlı (400 MU/min) ve G4 (YDHR) grubuna yüksek doz hızlı (1400 MU/min) radyoterapi uyguladık. G1 (Kontrol) grubu ile karşılaştırdığımızda, yalnız RT uygulanan bu iki deney grubunun testiküler dokularında RT'ye bağlı akut hasarların oluştuğunu ve oluşan bu hasarın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gözlemledik ($p<0.001^*$). Ayrıca G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) grupları arasında doz hızına bağlı histolojik ve biyokimyasal değerler bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığını gördük. Bulgularımız önceki çalışmalar (125-131) ile uyumluydu.

RT, radyoduyarlı tümörler üzerine olumlu etkilerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. RT'de hedef dokularda terapötik etkilerin oluşması kadar çevre dokulardaki olumsuz etkilerin önlenmesi amaçlanır (125). İyonize radyasyona bağlı testis hasarında, seminifer tübül atrofiği görülürken, sperm miktarı ve kalitesi düşer, bu da geçici veya kalıcı kısırlığa neden olur (134). Hücreyi oluşturan yapılardan çekirdek

ve özellikle de bölünme halindeki kromozomlar, radyasyona karşı çok duyarlıdır. İyonize radyasyon ya doğrudan DNA zincirlerini kırarak hücreyi hasara uğratar ya da içinden geçtiği ortamdaki suyu iyonlaştırarak hidroksil molekülleri ve peroksitler oluşturarak dolaylı hasar oluşturur (135). Organizmada oksidanlar ile antioksidanlar arasında bir denge bulunur. İyonize radyasyonun dokular üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılmasına rağmen, çeşitli çalışmalarda oksidatif strese sebep olabileceği ve bu durumda oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine değişebileceği düşünülmektedir (136-138). Oksidatif strese bağlı olarak hücre ve dokulara zarar veren SOR ortaya çıkmaktadır (139,140) Buna bağlı olarak SOR; DNA, protein ve lipidlerin oksidasyonuna neden olmaktadır (141). Çağın ve ark. sıçanlara tek doz abdominal iyonize radyasyon uyguladıkları çalışmalarında, kontrol grubu ile radyasyon grubu arasında TAS değerinde anlamlı düzeyde fark bulmamakla birlikte TOS ve OSI parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğunu göstermişlerdir (1). Çıkman ve ark. yapmış oldukları çalışmada sıçanlara uygulanan 5 Gy RT sonrasında TOS ve OSI değerlerinin arttığını, TAS değerinin ise azaldığını tespit etmiştir (142). Biz de çalışmamızda; tek doz olarak uyguladığımız düşük ve yüksek doz hızlı ışınların neden olduğu oksidatif stres seviyeleri ile antioksidan olarak kullandığımız melatoninin SOR'un zararlı etkileri üzerindeki etkinliğini TAS, TOS ve OSI parametrelerini kullanılarak inceledik. Düşük ve yüksek doz hızlı radyoterapi uygulanan gruplarda G1 (Kontrol) grubuna göre doku TAS değeri anlamlı olarak azalmış düzeydeydi ($p<0.001^*$). Serum TAS değerinin ise G4 (YDHR) grubunda G2 (DDHR) ve G1 (Kontrol) grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış olduğunu saptadık ($p<0.001^*$). Bulgularımıza göre; doku TAS değeri bakımından yalnız iyonize radyasyon uygulanan gruplar arasında anlamlı farkın olmadığını, serum TAS değeri bakımından anlamlı düzeyde fark olduğunu tespit ettik ($p<0.001^*$). Doku ve serum TOS değerinin yalnız iyonize radyasyon uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarında G1 (Kontrol) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseldiğini gözlemledik ($p<0.001^*$). Bu değerdeki yükselmeye radyoterapiye bağlı artan SOR'un oksidatif stresi artırarak lipid peroksidasyon düzeyini olumsuz yönde etkilediğini düşünmekteyiz. G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) grupları arasında doku TOS değerinde istatistiksel anlamda bir fark olmadığını tespit ettik. Oksidatif stresin yeni ve önemli bir indeksi olan OSI değeri; serum ve doku parametreleri bakımından G4 (YDHR) grubunda G1 (Kontrol) ve G2 (DDHR) ve gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı

bir farkla artış göstermekteydi ($p<0.001^*$). Bu bulgular dikkate alındığında RT'nin bir sonucu olarak üretilen SOR'un, TAS, TOS değerlerini etkilediğini bu değerlerin serum ve dokuda farklılık gösterebileceğini tespit ettik. Tek doz olarak düşük ve yüksek doz hızlı radyoterapi uygulayarak testis dokusunda erken dönem elde ettiğimiz radyobiyolojik sonuçlarımız daha önce yapılan çalışmalar ile uyumluydu (143).

Pelvik kanserleri için uygulanan abdominopelvik ışınlama sadece tümör bölgesini değil aynı zamanda sağlıklı organları da etkilemektedir. Radyoduyarlı bir organ olan testisi iyonize radyasyon hasarına karşı korumak hayati önem taşımaktadır (144,145). İyonize radyasyonun yan etkileri hücrel fonksiyon bozukluğuna yol açıp, erkek üreme sisteminde sperm sayısının düşmesine, sperm morfolojisinin bozulmasına ve spermatogonyum serisindeki hücrelerin apoptozuna neden olabilmektedir (146). Spermatogenez; seminifer tübüllerde bulunan spermatogonyumların mitoz ve mayoz bölünmeler geçirerek spermatozoonlara farkedildiği kompleks bir süreçtir. Bu sistem yüksek oranda radyoduyarlı hücreler içerir. Bu sebeple karın ve pelvis RT uygulaması sırasında iyonize radyasyonun toksik etkileri için hedef olabilmektedir (147). Bu süreçte rol oynayan spermatogonyumlar radyasyona karşı oldukça duyarlıdır. 0,1 Gy gibi düşük doz radyasyon uygulamalarında dahi hücrel hasarın başladığı bildirilmiştir (148). Yapılan çalışmalarda, iyonize radyasyona maruz kalan testis dokularında spermatogenez hücrelerinde azalmanın ve germinal epitel duvarında incelmeye olduğu belirtilmiştir (149-153). Yapılan daha önceki çalışmalarda ise, erkek üreme sistemine uygulanan 3 Gy iyonize radyasyonun spermatogonyumları tamamen öldürdüğü ve kalıcı infertiliteye neden olduğu (154) genellikle spermatozoonlar ve spermatozoonların ışınlamaya daha az duyarlı olduğu belirtilmiştir (155,156). Shalet yaptığı çalışma ile testise düşük dozlarda uygulanan direk ışınlamanın germinal epitelini etkileyebileceğini, daha büyük dozlarda uygulanan ışınların ise kalıcı aspermiye neden olabileceğini ifade etmiştir (157). Schally ve ark. skrotal radyoterapi uygulanan hasta erkeklerde spermatogenezin bozulduğunu, uygulanan doz oranına göre kısa ya da uzun süreli hatta kalıcı infertilite oluştuğunu belirtmişlerdir (158). Ahmad ve Agarwal testislerdeki hasarın iyonize radyasyonun dozu ve süresi ile doğru orantılı olduğunu ifade etmiştir. Düşük doz ışınlamanın sperm sayısını azaltmasına rağmen, orta ve yüksek doz ışınlamanın sperm sayısında uzun süreli kayıplara hatta azospermiye neden olabileceğini vurgulamıştır (159). Yapılan çalışmalarda, 2 Gy iyonize radyasyonun spermatogenez, seminifer tübüller, bazal lamina ve Leydig hücrelerinde büyük hasara neden olduğunu vurgulanmıştır. Ayrıca,

iyonize radyasyonun sayı, motilite gibi bazı sperm parametrelerini ve sperm canlılığını azalttığını, sperm kromatin yoğunlaşmasını arttırdığını ve sağlıklı spermatogenez indeksi olarak Johnsen skorunu, ortalama seminifer tübül çapını ve seminifer epitel kalınlığını azalttığı tespit edilmiştir (146,160). Biz de çalışmamızda, tek doz olarak düşük ve yüksek doz hızlı radyoterapi uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarında çeşitli tipte morfolojik hasarların meydana geldiğini, G1 (Kontrol) grubunda görülen normal seminifer tübül yapısının bozulduğunu gözlemledik. Seminifer tübüllerin bazal membranında yer yer kopmalar ve dejenerasyon izledik. Germinal epiteldeki spermatogenik seride dejenerasyon ve tübül lümenindeki spermatoozonların sayısında azalma, vakuolizasyonda artış, intertisyel alanda yer yer kopmalar, düzensizlikler ve bozulmalar tespit ettik. Bulgularımız diğer çalışmalar ile uyumluydu (146-159).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre; RT'nin, seminifer tübül çapı, bazal membran kalınlığı ve germinal epitel kalınlığını G1 (Kontrol) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farkla azalttığını tespit ettik. Bununla birlikte bazal membran kalınlığının G4 (YDHR) grubunda, G2 (DDHR) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkla daha inceldiğini gözlemledik. Akpolat ve ark. da bizim çalışmamızda olduğu gibi radyasyona bağlı olarak seminifer tübül çaplarının belirgin bir şekilde azaldığını ve germinal epitelin de inceldiğini gözlemlemişlerdir (148). Topçu ve ark. sıçanlarda radyoterapiye bağlı testis hasarını incelemişlerdir, iyonize radyasyon uygulanan gruplarda JTBS'nin kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu saptamışlardır (153). Bir başka çalışmada da radyasyonun sıçan testis dokusundaki hasarına karşı resveratrolün etkisi incelenmiş ve radyoterapi uygulanan gruplarda JTBS'nin Kontrol grubuna göre düşük olduğu gözlemlenmiştir (161). Amiri ve ark 6 Gy RT uyguladıkları sıçanlarda, iyonize radyasyonun, seminifer tübül çapında, germinal epitel kalınlığında ve JTBS azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir (162). Akpolat ve ark. çalışmalarında iyonize radyasyon uyguladıkları grupları diğer gruplarla kıyaslandıklarında, iyonize radyasyona bağlı olarak Johnsen skorunun anlamlı düzeyde azalmış olduğunu, seminifer tübül çaplarının belirgin bir şekilde azaldığını ve seminifer epitelin de belirgin düzeyde inceldiğini tespit etmişlerdir (148). Biz de çalışmamızda diğer çalışmalarla uyumlu olarak JTBS'nin radyoterapi uygulanan gruplarda, Kontrol grubuna göre daha düşük olduğu sonucunu saptadık ($p < 0.001^*$). Çalışmamızda ayrıca

G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) grupları arasında JTBS bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığını tespit ettik.

Normal koşullar altında hücrenin hipoksi altında yaşaması ve oksidatif stres koşullarında dahi organizmanın bütünlüğünün korunarak yaşamını devam ettirmesi apoptoz ile sağlanır (163). Hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki dengenin bozulması spermatogenezi bozar. Spermatogenezin bozulması ise erkek infertilitesine sebep olabilir (164). İyonize radyasyonun neden olduğu DNA hasarı, doğrudan veya apoptoz yoluyla hücre ölümüne, mutasyonların indüklenmesine ve DNA sentezinin inhibisyonuna yol açabilir (165). Luchetti ve ark. iyonize radyasyon uygulamalarında serbest radikallerin oluşmasında apoptoz da dahil olmak üzere hücreyi ölüme götüren birçok zincirleme olayın geliştiğini tespit etmişlerdir (166). Huang ve ark. iyonize radyasyon ile indüklenen germ hücre kaybının esas olarak apoptoz aracılığıyla gerçekleştiğini ve sırasıyla spermatogonyumların ve spermatogonyal kök hücrelerin apoptoza en duyarlı hücreler olduğunu vurgulamışlardır (125). Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda RT'ye bağlı testis hasarının önlenmesinde amifostinin etkisi araştırılmıştır. Apoptozu belirlemek için TUNEL metodu kullanılmış ve 6 Gy RT uygulaması sonrasında RT gruplarında oldukça yüksek apoptoz saptanmıştır (167). Biz de çalışmamızda tek doz olarak uygulanan farklı doz hızlarındaki iyonize radyasyonun akut etkilerine bağlı DNA kırıklarının in situ olarak belirlenmesini sağlayan TUNEL yöntemi ile dokulardaki apoptotik boyanma yüzdelerini hesapladık. Radyasyonun direkt etki ile oluşturduğu DNA hasarı ve indirekt serbest radikaller üzerinden meydana getirdiği hücre hasarında apoptotik hücreleri TUNEL yöntemi ile değerlendirdik. G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarının apoptotik boyanma yüzdelerinin G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farkla daha yüksek olduğunu tespit ettik. RT ile birlikte melatonin uygulanan G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarının apoptotik boyanma yüzdelerinin G1 (Kontrol) grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p < 0.001^*$). Yapmış olduğumuz çalışmada; iyonize radyasyonun testis dokusunda oluşturduğu hasara bağlı olarak serbest radikallerin arttığını, melatonin uygulanan gruplarda ise bu hasarın azaldığını gözlemledik.

Organizmalar serbest radikallerin neden olduğu hasarlardan hücreyi korumak için bazı savunma sistemleri geliştirirler. Hücreyi serbest radikallerin bu zararlı

etkilerinden korumak için de antioksidan sistemleri devreye sokarlar (168). Kanserin iyonize radyasyon ile tedavisinde terapötik etkiyi arttırmanın bir yolu, dokuları radyasyon hasarından koruyan ajanların kullanılmasıdır. Çalışmaların birçoğunda birkaç hücrekoruyucu ajanın, radyasyonun zararlı etkilerinin azaltılmasındaki etkinliği araştırılmıştır. Bu ajanlardan biri, radyoterapiye bağlı gelişen serbest radikallere karşı temizleyici etkisi olduğu bilinen melatonindir (169). Hanahan ve Weinberg kanser gelişiminin apoptotik aksaklıklardan kaynaklandığını belirtirken (170), Winczyk ve ark. ise melatoninin kanser gelişimini önleyici aktivitesinin olduğunu öne sürmüşlerdir (171). Melatonin'in beyin, retina, böbrek, karaciğer, deri ve insan spermiumunda lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu bir antioksidan olduğu bilinmektedir (172-174). Güçlü antioksidan özelliğinin yanı sıra melatoninin radyokoruyucu etkisi olduğu da bilinmektedir. Önceki çalışmalarda, sıçanlarda ince bağırsak, akciğer ve testiste iyonize radyasyona karşı melatoninin etkileri araştırılmıştır (165,175-179). Bunun yanında, tükürük bezleri (136), mesane (180) gibi vücudun çeşitli organlarında da radyoterapiye bağlı doku hasarını önlemek için melatonin uygulanmıştır (78). Yapılan bir çalışmada ışınlamadan 30 dakika önce uygulanan 100mg/kg/i.p melatoninin sıçanlarda veya farelerde iyonize radyasyonun neden olduğu testis hasarını hafiflettiği vurgulanmıştır (144). Deng ve ark. melatoninin Sertoli hücrelerinde ısının neden olduğu oksidatif stresi ve apoptozu azalttığını belirtmişlerdir (181). Heidarizadi ve ark. melatoninin testisi, radyasyona bağlı oksidatif hasara karşı koruyabildiğini, sperm kalitesini iyileştirebildiğini ifade etmişlerdir (182). Khan ve ark. melatoninin tedavisinin gama ışımına maruz kalmış farelerin testislerinde y-ışınlarının neden olduğu lipid peroksidasyonunu, total antioksidan kapasiteyi hafiflettiğini ve DNA ipliklerinin kopmasını engellediğini ve seminifer tübülde spermatogenik hücre kaybını azalttığını tespit etmişlerdir (144). Yapılan çalışmalarda melatoninin tedavisinin, testis fonksiyonunu ve histolojik yapısını iyileştirdiğini, sperm sayısı ve sağkalımını, enzim aktivitesini arttırdığını, lipid peroksidasyonunu azalttığı belirtilmiştir (182).

İyonize radyasyon kaynaklı spermatogenez hasarının iyileştirilmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bununla birlikte, iyonize radyasyon ve antioksidanlar arasındaki ilişki henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. Antioksidanların türü ve tedavi süresine göre; sperm sayısını, hareketliliğini, morfolojisini ve DNA hasarlarını iyileştirici etkisinin olduğu ortaya konulmaktadır (146). Doğal bir antioksidan olan melatoninin RT ile indüklenen testis hasarına karşı akut radyokoruyucu etkilerine karşı

yapılan çalışmalar yeterli değildir. Bu nedenle bu çalışmada, testis dokusunda FF düşük ve FFF yüksek ani doz hızlarının akut etkilerine karşı melatonin kullanarak, bu etkileri en aza indirmeyi amaçladık. Elde ettiğimiz sonuçlara göre; RT ile birlikte melatonin uygulanan G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarında, yalnız RT uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarına kıyasla histopatolojik bulguların azaldığını gözlemledik. Düşük doz hızlı RT' ye karşı melatonin etkisini incelediğimizde; G3 (DDHR+MEL) grubunda G2 (DDHR) grubuna kıyasla bazal membran ve germinal epitel yapısında düzelmelerin olduğu, vakuolizasyon oranında ve intertisyel alandaki açılmalarda azalmaların olduğu ancak yer yer kopmaların devam ettiğini tespit ettik. Melatoninin yüksek doz hızlı RT 'ye karşı etkisini incelediğimizde ise; G5 (YDHR+MEL) grubunda G4 (YDHR) grubuna göre lümendeki sperm sayısının daha fazla olduğunu, germinal epitelde artan spermatogenik seri hücrelerinin ve daha düzenli germinal epitelin varlığını gördük. Bazal membranda kopmalar ve yer yer vakuolizasyon izledik. Çok sayıda çalışma melatoninin kanser hücrelerinde proliferasyonu azalttığını ve apoptotik hücre ölümünü artırdığını göstermiştir (183-185). Bu veriler güçlü ve çok yönlü bir antioksidan olan melatoninin immün sistem için uyarıcı, serbest radikaller için ise süpürücü etkisi olduğunu kanıtlamaktadır (109). Melatonin lipofilik ve hidrofilik özelliği ile hücredeki en etkili antioksidanlardan olduğu bilinmektedir (165). Yalçınkaya ve ark. melatoninin, serbest radikal önleyici özelliğiyle iyonize radyasyonun DNA'da yaptığı hasarın önlenebileceğini belirtmiştir (186). Çalışmalarda, iyonize radyasyona maruz kalmadan önce melatonin uygulanmasının sıçan testisinde apoptozu azalttığı öne sürülmüştür (147). Biz de çalışmamızda, melatoninin oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkisi sayesinde RT kaynaklı hücre hasarını azaltabileceğini ve melatoninin radyokoruyucu etkisini elde ettiğimiz biyokimyasal ve histolojik bulgular ile saptadık. Bulgularımıza göre yalnız RT uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarında RT'ye bağlı görülen morfolojik hasarın RT ile birlikte melatonin uygulanan G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarda melatoninin etkisi ile azaldığını gözlemledik. DNA kırıklarının gösterilmesi amacıyla uyguladığımız TUNEL metoduna göre apoptotik hücrelerin yüzdelerini belirledik. TUNEL bulgularımıza göre; RT ile birlikte melatonin uygulanan gruplarında yalnız RT uygulanan gruplara kıyasla apoptotik yüzde değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğunu tespit ettik ($p < 0.001^*$). Tajabadi ve ark. melatoninin fare spermatogenezi üzerindeki

radikallerin etkisini inceledikleri çalışmalarında RT ile düşüş gösteren JTBS'nin melatonin uygulaması ile tekrar yükseldiğini, RT ile kalınlaşan bazal membranın ise RT ve melatonin verilen gruplarda bu kalınlaşmanın azaldığını tespit etmişlerdir (148). Biz de çalışmamızda, yalnız RT uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarına kıyasla RT ile birlikte melatonin uygulanan G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarında JTBS'nin anlamlı farkla yükseldiğini saptadık ($p<0.001^*$). Bazal membran kalınlıklarının Tajabadi ve ark. (148) aksine G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarında RT etkisiyle incelendiğini, incelmış olan bazal membranların RT ile birlikte melatonin uygulanan G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarında tekrar kalınlaştığını saptadık ($p<0.001^*$). RT etkisiyle artmış olan seminifer tübül çapı ve germinal epitelin de melatoninin etkisiyle azalarak kontrol grubuna yakın değerlerde ölçüldüğünü tespit ettik ($p<0.001^*$).

Klinik ve deneysel çalışmalar iyonize radyasyonun testis dokusunda oksidatif strese bağlı hasara neden olduğu ve normal spermatogenetik süreç, proliferasyon ve farklılaşma üzerinde zararlı etkileri olduğunu göstermiştir (187,188). Karaer ve ark. radyoterapinin neden olduğu tükürük bezi hasarında, melatoninin TOS ve OSI gibi oksidatif stres değerlerini azalttığını ve histopatolojik bulguları da iyileştirdiğini belirtmiştir (136). Dündar ve ark. da laringeal radyoterapi uygulanan ratlarda melatoninin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında doku TAS ve TOS parametrelerini değerlendirmişlerdir. RT uygulanan ve melatonin verilen gruplarda sadece RT uygulanan gruplara göre TAS değerinin arttığını, TOS değerinin ise azaldığını tespit etmişlerdir (189). Bizim çalışmamızda da sıçanlara uygulanan radyoterapiye bağlı olarak melatonin uygulanan gruplarda doku TOS değerindeki artışın, ışınlamadan 15dk önce melatoninin uygulamasıyla sadece RT uygulanan gruplara göre azaldığını gördük. Başka bir ifadeyle melatonin uygulamasının, serbest radikallerin etkisini bastırarak ve oksidatif stresi azaltarak radyasyonun neden olduğu hasarları azalttığını ve böylece dokunun normal yapısını korumaya yardımcı olduğunu söyleyebiliriz. Doku TAS değerini G3 (DDHR+MEL) grubunda G2 (DDHR) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulduk ($p<0.001^*$). Bu değer G4 (YDHR) ve G5 (YDHR+MEL) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gördük. Bu sonuçlara göre doku TAS değeri; düşük doz hızlı radyoterapi ve melatonin uygulanan grupta kontrol grubuna yakın bulunurken diğer gruplarda düşüktü. Serum TAS değeri bakımından ise, yalnız RT uygulanan gruplar ile RT ile birlikte melatonin

uygulanan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Doku TOS değerinin, yalnız iyonize radyasyon uygulanan gruplarda, iyonize radyasyon ile birlikte melatonin uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu saptadık ($p<0.001^*$). Serum TOS değerinde ise G2 (DDHR) ve G3 (DDHR+MEL) grupları arasında anlamlı düzeyde fark yoktu. G4 (YDHR) grubunun serum TOS değerinin G5 (YDHR+MEL) grubuna göre anlamlı farkla yüksek olduğu tespit ettik. Doku ve serum OSI değerleri bakımından incelediğimizde, G4 (YDHR) grubunun G5 (YDHR+MEL) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu ($p<0.001^*$), G2 (DDHR) ve G3(DDHR+MEL) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığını gördük.

ZO-1, membranla ilişkili guanozin monofosfat kinaz ailesinin bir üyesidir ve testiste Sertoli hücre bağlantı kompleksleri arasında yerleşim gösterir. Sertoli hücreleri, immünolojik bir bariyer olarak görev yapan kan-testis bariyerini oluşturur. Kan testis bariyerini seminifer tübül epitelinde farklı moleküllerin giriş çıkışının düzenlemesi, germ hücrelerinin hareketi, gelişimi ve farklılaşması için mikro çevre oluşturur (34,190). Bu bariyerinin bozulması infertiliteye sebep olur (191). Sertoli hücreleri arasında bulunan sıkı bağlantıların kan testis bariyerinin ana bileşeni olduğu kabul edilmektedir (192). Seminifer epitelde, ZO-1, kan-testis bariyeri seviyesinde immünohistokimyasal olarak güçlü boyanmalar gösterir (193,194). Altun ve ark. azospermik olgularda Sertoli hücrelerinde ZO-1 protein ekspresyonunun azalmasının spermatogenezin bozulmasında rol oynayan faktörlerden biri olabileceğini ve sıkı bağlantıların spermatogenezdeki önemini vurgulamışlardır (195). Kopera ve ark. Adjudin ve kan testis bariyer dinamikleri üzerine bir in vitro çalışma yapmışlardır. Adjudin'in 30 günlük sıçan yavrularında ZO-1'in immüno lokalizasyonunu olumsuz etkilediğini, seminifer tübüllerin çevresinden uzakta tübül lümenine doğru eksprese olduğunu belirtmişlerdir (196). Karakaya ve ark. Pentilentetrazol vererek oluşturdukları epilepsi modelinde timokinonun testis hasarı üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ZO-1 antikorunun Sertoli hücrelerinin bazolateral bölgesindeki spermatogenik hücrelerde immünreaktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Epilepsi oluşturulan gruptaki azalan ZO-1 immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun timokinon ile tedavi edilen grupta artmış olduğunu belirtmişlerdir (197). Biz de çalışmamızda, immunfloresan yöntemiyle kan-testis bariyerindeki sıkı bağlantılarda, ZO-1 ekspresyonunun G1 (Kontrol) grubunda daha yoğun lokalize olduğunu gördük.

Yalnız RT uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarında germinal hücre kayıplarının olduğu bölgelerde ZO-1 pozitif alanların zayıflayarak azaldığını saptadık. G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarında azalmış olan ZO-1 ekspresyonunun RT ile birlikte melatonin uygulanan G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL) gruplarında tekrar arttığını ve immünreaktivitesinin G1 (Kontrol) grubuna yakın olduğunu tespit ettik.

Lektinler, farklı şeker kalıntıları içeren glikoproteinlerin histokimyasal gösterimi için yararlı belirteçler olarak; hücre biyolojisi, biyokimya ve immünoloji gibi bilim alanlarında yaygın olarak kullanılır (198). Çözeltilerde polisakkarit ve glikoprotein molekülleri arasında çapraz bağlanmalar oluşturarak çökelmelerine sebep olurlar (199). Lektinlerin histokimyasal olarak gösterilmesi ile spermatogenezin spesifik aşamalarının belirlenmesi, spermatogenik hücre tiplerinin tanımlanmasını sağlar. Wakayama ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada, bir timidin analogu olan 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) için işaretleyici bir protein olan Lectin PNA'nın, spermatogenik hücre tiplerinin, özellikle spermatogonyumun BrdU ile işaretlendiğini kesin olarak belirlemek için gerekli olduğunu vurgulamışlardır (200). Sharon, yapmış olduğu çalışmada lektinlerin insan ve tavşan eritrosit membranlarının dış yüzeyine bağlandığını ve oligosakkaritlerin, ökaryotik hücrelerin plazma membranında asimetrik bir şekilde dağıldığını tespit etmiştir (201). Jung ve ark. optimum koşullarda in vitro spermatogenezi sağlamak için hücre kültürü ile yapmış oldukları çalışmalarında, C57 hücre hattında testis dokularında spermatogenezden kaynaklanan Lectin PNA pozitif spermatidler tespit etmişlerdir (202). Büyükyıldırım ve ark. kıvırcık cüce koşın cinsi kanatlı testislerindeki bazı glikokonjugatların lektin PNA histokimyasal yöntemlerle belirledikleri çalışmalarında, bazal lamina ve Leydig hücrelerinde çok güçlü reaksiyon tespit ederken, spermatogonyum, primer spermatosit ve geç dönem spermatidlerde orta yoğunlukta, sekonder spermatosit, erken dönem spermatid ve Sertoli hücrelerinde ise zayıf PNA, peritübüler hücrelerde ise reaksiyon gözlemediklerini belirtmişlerdir (56). Arya ve Pertula fare, gine domuzu, çöl faresi ve kunduz testisinde farklı şeker kalıntılılarına sahip glikoproteinlerin dağılımını ortaya çıkarmak için lektin ile işaretlemişlerdir. Lektinlerin testiste Sertoli hücre uzantıları, Leydig hücreleri, tübüler bazal membran, sitoplazma, akrozom ve olgunlaşan spermatidlerin plazma membranında farklı yoğunluklarda boyanma gösterdiklerini ifade etmişlerdir. Bu boyanmaların akrozomal gelişim sırasında, glikoprotein bileşenlerinin kademeli olarak lektinlerle karakteristik

işaretlendiğini ve Sertoli hücre uzantılarındaki boyanmanın, spermatozoa salınımı ile bağlantılı döngüsel bir değişiklik sergilediğini belirtmişlerdir (203). Akrozomun, asit fosfataz, akrosin ve hiyalüronidaz gibi döllenme için gerekli olan birkaç enzim içerdiği kompleks sakkaritlerle yakından ilişkili olduğu, iyi bilinmektedir (58). Söderström ve ark. Lectin PNA'nın özellikle akrozom oluşumunun başlangıcından itibaren geç spermiyogeneze kadar gelişimini sürdüren spermatidlerin akrozomunu boyadığını gözlemlemişlerdir (204). Bu çalışmada PNA Lektin kullanılarak, sıçan testis dokusundaki spermatogenik serinin immünfloresan yöntemiyle işaretlenerek gösterilmesi amaçlandı. Germinal epitel hücrelerindeki Lectin PNA immüno lokalizasyonunun seminifer tübül lümenine doğru yoğunluğunun arttığı gözlemlendi. RT uygulanan G2 (DDHR) ve G4 (YDHR) gruplarında seminifer tübüllerin bütünlüğünün bozulduğu, spermatogenik seri hücrelerinin G1 (Kontrol) grubuna göre yoğunluğunun azaldığı, RT ile birlikte melatonin uygulanan G3 (DDHR+MEL) ve G5 (YDHR+MEL), gruplarında ise tekrar artmış olduğu gözlemlendi.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda;

1. Tek doz olarak radyoterapi uygulanan düşük ve yüksek doz hızlı radyoterapi grupları arasında histopatolojik bulgular ve biyokimyasal parametreler bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı,
2. TUNEL reaksiyonu ile belirtilen DNA fragmantasyon oranının radyoterapi uygulanan düşük ve yüksek doz hızlı radyoterapi gruplarında artmış olduğu, radyoterapi ile birlikte melatonin uygulanan düşük ve yüksek doz hızlı radyoterapi gruplarında tekrar azaldığı, melatoninin bu apoptoz oranını düşürdüğü,
3. Radyoterapinin etkisi ile artan seminifer tübül çapının, radyoterapi ile birlikte melatonin uygulanan gruplarda anlamlı olarak azaldığını ($p<0.001^*$),
4. Radyoterapi uygulanan gruplarda bazal membran kalınlıklarının azaldığını, radyoterapi ile birlikte melatonin uygulanan gruplarda azalmış olan bu membran kalınlıklarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu,
5. Radyoterapinin etkisiyle artmış olan germinal epitel kalınlıklarının, radyoterapi ile birlikte melatonin uygulamasıyla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı,
6. Radyoterapi bağlı testis hasarında melatoninin radyokoruyucu etkisi ile azalan ZO-1 ekspresyonunun artmış olduğu,
7. Lectin PNA ekspresyonunun radyoterapiye bağlı testis hasarında melatonin uygulamasıyla artmış olduğunu,
8. Testis histolojisinde radyoterapinin doku bütünlüğünü bozduğu, melatonin ise oluşan hasar üzerinde iyileştirme etkisi gösterdiği,
9. Radyoterapinin doku TAS değerini düşürdüğünü, melatoninin ise düşük doz hızlı radyoterapi ve melatonin uygulanan grupta anlamlı derecede iyileştirici etkisi olduğu ($p<0.001^*$),
10. Radyoterapi uygulaması ile doku TOS değerinin arttığı, radyoterapi ile birlikte melatonin uygulanan gruplarda bu değer istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını gözlemledik.

Sonuç olarak tek doz olarak uygulanan, düşük ve yüksek doz hızlı radyoterapinin histolojik ve biyokimyasal düzeyde yol açtığı akut hasarlara karşı melatoninin radyokoruyucu etkiye sahip olduğunu saptadık.

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda;

1. Melatonin, oksidatif stres ve DNA hasarlarına karşı güçlü bir antioksidan olarak işlev görmektedir. Melatonin, radyoterapi süresince testis hasarlarını önlemek için radyoterapiye ek olarak uygulanabilecek güvenli bir antioksidan olabilir.
2. Melatonin düşük ve yüksek doz hızlı radyasyonun sitotoksik etkilerine karşı sıçan testis dokusunda radyokorurucu olarak kullanılabilir.
3. FFF tekniği ile radyoterapi tedavi kararı alınmadan önce sağlıklı doku ve hücrelerin maruz kalacağı radyasyon göz önünde bulundurularak, sadece fiziksel radyoterapi dozunun değil aynı zamanda oluşacak radyobiyojik yanıtın da hesaba katılması gerektiğini düşünmekteyiz.
4. Çalışmamız, FF ve FFF ışınlarının in vitro hücre kültürlerinin sağ kalımı üzerine olan etkilerine katkı sağlamasıyla birlikte FFF klinik doz hızı etkisinin, in-vivo radyobiyojik sonuçları hakkındaki belirsizlik halen sürmektedir.
5. Çalışmamız radyoterapinin onkoloji alanında kullanımının olumlu etkilerini arttırmada, tedaviye melatonin eklenebileceğini düşündürmektedir.
6. Klinik FFF ani yüksek doz hızlarının, kanser ve sağlıklı dokular üzerinde etkisini araştırmak için daha fazla deneysel ve klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Çağın, Y. F., Parlakpınar, H., Polat, A., Vardi, N., Atayan, Y., Erdogan, M. A., Ekici, K., Yildiz, A., Sarihan, M. E., Aladag, H. (2016). The protective effects of apocynin on ionizing radiation-induced intestinal damage in rats. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(2), 317–324.
2. Voyvoda, N., Voyvoda, B., Çamurdan, Ö. (2017). The role of imaging in testicular cancer diagnosis, staging and follow-up. *Üroonkoloji Bülteni*, 16(2), 51–56.
3. Krege, S. (2017). Diagnosis, treatment, and follow-up of testicular cancer. *Der Urologe, Asug A*. 56(12), 1623–1636.
4. Singhera, M., Lees, K., Huddart, R., Horwich, A. (2012). Minimizing toxicity in early-stage testicular cancer treatment. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 12(2), 185–193.
5. Mirimanoff, R.O. (2003). Radiotherapy of testicular seminoma: Changes over the past 10 years. *Cancer Radiotherapie: Journal de La Societe Francaise de Radiotherapie Oncologique*, 7(1), 70s–77s.
6. Cordelli, N., Itoh, M., Sakabe, K. (2019). Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis: The role of testicular immunology. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 957.
7. Jung, J. H., Jung, J., Kim, S. K., Woo, S. H., Kang, K. M., Jeong, B.K., Jung, M. H., Kim, J. H., Hahm, J. R. (2014). Alpha lipoic acid attenuates radiation-induced thyroid injury in rats. *Plos One*, 9(11), e112253.
8. Aziz, N. M. (2007). Cancer survivorship research: State of knowledge, challenges and opportunities. *Acta Oncologica*, 46(4), 417–432.
9. Aras, S., Efendioğlu, M., Wulamujiang, A., Şeyma Özkanlı, S., Keleş, M.S., Oğuz Tanzer, İ. (2020). Radioprotective effect of melatonin against radiotherapy-induced cerebral cortex and cerebellum damage in rat. *International Journal of Radiation Biology*, 97(3), 348-355.
10. Cordelli, E., Fresegna, A. M., Leter, G., Eleuteri, P., Spanò, M., Villani, P. (2003). Evaluation of dna damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular x irradiation. *Radiation Research*, 160(4), 443–451.
11. Talebpour Amiri F, Hamzeh M, Naeimi RA, Ghasemi A, Hosseinimehr SJ. (2018). Radioprotective effect of atorvastatin against ionizing radiation-induced nephrotoxicity in mice. *International Journal Radial Biology*, 94(2):106-113.
12. Cooke, M. S., Olinski, R., Evans, M. D. (2006). Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *In Clinica Chimica Acta*, 365(1–2), 30–49.
13. Takahashi, Y., Teshima, T., Kawaguchi, N., Hamada, Y., Mori, S., Madachi, A., Ikeda, S., Mizuno, H., Ogata, T., Nojima, K., Furusawa, Y., Matsuura, N. (2003). Heavy ion irradiation inhibits in vitro angiogenesis even at sublethal dose 1. *Cancer Research*, 63, 4253-4257.
14. Gülle, K., Akpolat, M., Öz, Z.S., Bakkal, B.K., Araslı, M., Köktürk, F. (2017). İyonize radyasyona maruz kalmış sıçan ovaryumunda gelişmekte olan foliküllerde morfolojik değişiklikler üzerine l-karnitinin koruyucu etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 8(1), 33-37.
15. Smith, T. A., Kirkpatrick, D. R., Smith, S., Smith, T. K., Pearson, T., Kailasam, A., Herrmann, K. Z., Schubert, J., Agrawal, D. K. (2017). Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 232.
16. Reiter, R. J., Tan, D. X., Korkmaz, A., Rosales-Corral, S. A. (2014). Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Human Reproduction Update*, 20(2), 293–307.
17. Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pellegrino, M. L., Tita, B., Caruso, S., Castelli, F. (2002). Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 53(2),209–215.
18. Kierszenbaum, A.L. (2020). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. İstanbul: Palme Yayıncılık.
19. Moore, K.L., Persaud, T.V.N., Torchia, M.G. (2015). *Before We are born Essentials of Embryology and Birth Defects*. (9th Ed.). Elsevier.
20. Sadler, T.W. (2012). *Langman Medikal Embriyoloji*. (12th Ed.). Lippincott Williams and Wilkins.
21. Dudek, R.W. (2014). *Embryology*. (6th Ed.). Lipincott Williams and Wilkins.
22. Carlson, B.M. (2019). *Human Embryology and Developmental Biology*. (6th Ed.). Elsevier Saunders.

23. Schoenwolf, G.C., Bleyl, S.B., Brauer, P.R. (2020). *Larsen's Human Embryology*. (6th Ed.). Elsevier.
24. Arıncı, K., Elhan, A. (2016). *Anatomi*. (6. Baskı). Ankara Güneş Tıp Kitabevi.
25. Sancak, B. C.M. (2015). *Fonksiyonel Anatomi*. (9. Baskı). ODTÜ Yayıncılık.
26. Özbağ, D. (2019). "*İnsan*" *Anatomi*. İstanbul Tıp Kitabevi.
27. Putz, R., Pabst, R. (2006). *Sobotta-Atlas of Human Anatomy: Head, Neck, Upper Limb, Thorax, Abdomen, Pelvis, Lower Limb; Two-volume set*. Elsevier.
28. Moore, K.L., Dalley, A.F., Agur, A.M.R. (2018). *Clinically Oriented Anatomy*. (8th Ed.). Wolters Kluwer Health.
29. Eşrefoğlu, M. (2016). *Genel Histoloji*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.
30. Mescher, A.L. (2018). *Junqueira Temel Histoloji Atlası*. (15. Baskı) İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
31. Ross, M.H., Pawlina, W. (2013). *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. İstanbul: Palme Yayıncılık.
32. Gartner, L.P., Hiatt, J.L. (2016). *Hücre Biyolojisi ve Histoloji*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.
33. Hess, R. A. (1990). 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. *Biology of Reproduction*, 43(3), 525–542.
34. 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.
35. Eroschenko, V.P. (2013). *DiFiore Histoloji Atlası*. İstanbul: Palme Yayıncılık.
36. Müftüoğlu, S., Kaymaz, F., Atilla P. (Ed.) (2009). *Netter Temel Histoloji*. İstanbul: Güneş Tıp Kitapevleri.
37. Betts, J.G., Desaix, P., Johnson E., J.J.E. (2017). *Anatomy and Physiology*. OpenStax.
38. Mita, P., Hinton, B. T., Dufour, J. M. (2011). The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *In Biology of Reproduction*, 84 (5) 851–858.
39. Fink, C., Weigel, R., Hembes, T., Lauke-Wettwer, H., Kliesch, S., Bergmann, M., Brehm, R. H. (2006). Altered expression of ZO-1 and ZO-2 in sertoli cells and loss of blood-testis barrier integrity in testicular carcinoma in situ. *Neoplasia*, 8(12), 1019–1027.
40. Pelletier, R. M., Okawara, Y., Vitale, M. L., Anderson, J. M. (1997). Differential distribution of the tight-junction-associated protein ZO-1 isoforms α^+ and α^- in guinea pig sertoli cells: A possible association with F-actin and G-actin. *Biology of Reproduction*, 57(2), 367–376.
41. Wiebe, J. P., Kowalik, A., Gallardi, R. L., Egeler, O., Clubb, B. H. (2000). Glycerol Disrupts Tight Junction-Associated Actin Microfilaments, Occludin, and Microtubules in Sertoli Cells. *In Journal of Andrology*. 21(5), 625–635.
42. Kolbaşı, B. (2014). Post-Natal Sıçan Testisinde Sertoli Hücrelerinin Arasındaki Sıkı Bağlantıların Gelişme Gününün İmmunohistokimyasal Ve Elektron Mikroskopik Olarak Gösterilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
43. Cheng, C. Y., Mruk, D. D. (2002). Cell junction dynamics in the testis: sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Journal Physiology*, 82: 825-874.
44. Yan, H. H. N., (Cheng, Y. (2005). Blood–testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors. *Proceedings of the National Academy of the Science United States of Amerika*, 102(33). 11722–1172.
45. Özkara, G., Öztürk, O., Yılmaz Aydoğan, H. (2020). Kanser ve Metastaz: Hücre Adezyon Molekülleri ve Hücreler Arası Bağlantıların Önemi. *Experimed*, 38–48.
46. Musch, M. W., Walsh-Reitz, M. M., Chang, E. B. (2006). Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(2), 222–231.
47. Mitic, L. L., Van Itallie, C. M., Anderson, J. M. (2000). Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions I. Tight junction structure and function: Lessons from mutant animals and proteins. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(2), 250–254.
48. Oke, B. O., Suarez-Quian, C. A. (1993). Localization of Secretory, Membrane-Associated and Cytoskeletal Proteins in Rat Testis Using an Improved Immunocytochemical Protocol That Employs Polyester Wax 1. *Biology of Reproduction*, 48(3), 621–631.

49. Bartles, J. R., Wierda, A., Zheng, L. (1996). Identification and characterization of espin, an actin-binding protein localized to the F-actin-rich junctional plaques of Sertoli cell ectoplasmic specializations. *Journal of Cell Science*, 109(6), 1229–1239.
50. Wittchen, E. S., Haskins, J., Stevenson, B. R. (1999). Protein Interactions at the Tight Junction. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 35179–35185.
51. Parreira, G. G., Melo, R. C. N., Russell, L. D. (2002). Relationship of Sertoli-Sertoli Tight Junctions to Ectoplasmic Specialization in Conventional and En Face Views. *Biology of Reproduction*, 67(4), 1232–1241.
52. Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., Goodenough, D. A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *The Journal of Cell Biology*, 103(3), 755–766.
53. Mohandas, T. K., Chen, X.N., Rowe, L. B., Birkenmeier, E. H., Fanning, A. S., Anderson, J. M., Korenberg, J. R. (1995). Localization of the Tight Junction Protein Gene TJP1 to Human Chromosome 15q13, Distal to the Prader-Willi/Angelman Region, and to Mouse Chromosome 7. *Genomics*, 30(3), 594–597.
54. Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M. (1999). Structural and signalling molecules come together at tight junctions. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(5), 628–633.
55. Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., Anderson, J. M. (1998). The Tight Junction Protein ZO-1 Establishes a Link between the Transmembrane Protein Occludin and the Actin Cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29745–29753.
56. Büyükyıldırım, Ş., Çınar, K. (2016). Kıvrıkcık Cüce Koşın (*Gallus gallus*) Testisindeki Bazı Glikokonjugatların Lektin Histokimyasal Olarak Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2), 176-181.
57. Maverakis, E., Kim, K., Shimoda, M., Gershwin, M. E., Patel, F., Wilken, R., Raychaudhuri, S., Ruhaak, L. R., Lebrilla, C. B. (2015). Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review. *Journal of Autoimmunity*, 57, 1–13.
58. Arenas, Madrid, Bethencourt, Fraile, Paniagua. (1998). Lectin histochemistry of the human testis. *International Journal of Andrology*, 21(6), 332–342.
59. Damjanov, I. (1987). Lectin cytochemistry and histochemistry. *Laboratory Investigatio*, 57, 5-20.
60. Martínez-Hernández, J., Seco-Rovira, V., Beltrán-Frutos, E., Ferrer, C., Serrano-Sánchez, M. I., Pastor, L. M. (2019). Lectin-binding pattern of glycoconjugates during spontaneous testicular recrudescence in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) after exposure to short photoperiod. *Andrologia*, 51(1), e13148.
61. Arya, M., Vanha-Perttula, T. (2009). Distribution of Lectin Binding in Rat Testis and Epididymis. *Andrologia*, 16(6), 495–508.
62. Malmi, R., Kallajoki, M., Suominen, J. (2009). Distribution of Glycoconjugates in Human Testis A Histochemical Study Using Fluorescein- and Rhodamine-conjugated Lectins. *Andrologia*, 19(3), 322–332.
63. Lee, M.-C., Damjanov, I. (1984). Anatomic distribution of lectin-binding sites in mouse testis and epididymis. *Differentiation*, 27(1–3), 74–81.
64. Arya, M., Vanha-Perttula, T. (1985). Lectin-binding Pattern of Bull Testis and Epididymis. *Journal of Andrology*, 6(4), 230–242.
65. C. Ertl K.H. Wrobel. (1992). Distribution of sugar residues in the bovine testis during postnatal ontogenesis demonstrated with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *Springer-Verlag*, 97(2), 161–171.
66. Kurohmaru, M., Kanai, Y., Hayashi, Y. (1991). Lectin-Binding Patterns in the Spermatogenic Cells of the Shiba Goat Testis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 53(5), 893–897.
67. Kurohmaru, Maeda, S., Suda, A., Hondo, E., Ogawa, K. Endo, H., Kimura, J., Yamada, J., Rerkamnuaychoke, W., Chungsamarnyart, N., Hayashi, Y., Nishida, T. (1996). An ultrastructural and lectin-histochemical study on the seminiferous epithelium of the common tree shrew (*Tupaia glis*). *Journal of Anatomy*, 189(1) 87–95.
68. Lee, M.C., Damjanov, I. (1985). Lectin binding sites on human sperm and spermatogenic cells. *The Anatomical Record*, 212(3), 282–287.
69. Wollina, U., Schreiber, G., Zollmann, C., Hipler, C., Günther, E. (2009). Lectin-Binding Sites in Normal Human Testis/Lektinbindungsstellen normaler humaner Hoden. *Andrologia*, 21(2), 127–130.
70. Cox, JD, Ang. K.K. (2010). *Radiation Oncology: Rational Technique, Results*. (9th Ed.). Dolores Meloni.
71. Jezek, P. Hlavata, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37, 2478-2503.

72. Thomas, M. J. (1995). The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(1-2), 21-39.
73. Akdemir, N. (Ed.). (2021). *İç hastalıkları ve hemşirelik bakımı*. Akademisyen Kitabevi.
74. 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.
75. Çelik, A. S. (2014). Radyoterapi sonucu gelişen yan etkiler ve hemşirelik yaklaşımı. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(3), 933-947.
76. Overgaard, J., Horsman, M. R. (1996). Modification of hypoxia-induced radioresistance in tumors by the use of oxygen and sensitizers. *Seminars in Radiation Oncology*, 6(1), 10-21.
77. Fidan, A.F. (2008). DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 41-52.
78. Shirazi, A., Ghobadi, G., Ghazi-Khansari, M. (2007). A Radiobiological Review on Melatonin: A Novel Radioprotector. *Journal of Radiation Research*, 48(4), 263-272.
79. Karbownik, M., Reiter, R. J. (2008). Antioxidative Effects of Melatonin in Protection Against Cellular Damage Caused by Ionizing Radiation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 225(1), 9-22.
80. Von Sonntag, C. (2006). Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair: A chemical Perspective, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
81. Elmas, Ç., Erdoğan, D., Göktaş, G., Uluoğlu, C., Güney, Y., Özbey, G., Hiçsönmez, A., Yücel, B., Özkan, S., Şener, D. (2013). İyonize Radyasyon Uygulaması Yapılmış Rat Pineal Bezi Üzerinde Melatoninin Koruyucu Etkisi Var mıdır? Kronobiyolojik ve Elektron Mikroskopik Çalışma. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 19(1): 153-160.
82. Mansour, H. (2006). Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. *Pharmacological Research*, 54(3), 165-171.
83. Sonmez, O. F., Odacı, E., Bas, O., Kaplan, S. (2010). Purkinje cell number decreases in the adult female rat cerebellum following exposure to 900MHz electromagnetic field. *Brain Research*, 1356, 95-101.
84. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44-84.
85. Riley, P. A. (1994). Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 65(1), 27-33.
86. Citrin, D., Cotrim, A. P., Hyodo, F., Baum, B. J., Krishna, M. C., Mitchell, J. B. (2010). Radioprotectors and Mitigators of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *The Oncologist*, 15(4), 360-371.
87. Denham, J. W., Hauer-Jensen, M., Peters, L. J. (2001). Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury? *International Journal of Radiation Oncology, Biology Physics*, 50(5), 1105-1106.
88. Stone, H. B., Coleman, C. N., Anscher, M. S., McBride, W. H. (2003). Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *The Lancet Oncology*, 4(9), 529-536.
89. Karan, T., Moiseenko, V., Gill, B., Horwood, R., Kyle, A., Minchinton, A. I. (2013). Radiobiological effects of altering dose rate in filter-free photon beams. *Physics in Medicine and Biology*, 58(4), 1075-1082.
90. Oktaria, S., Lerch, M. L. F., Rosenfeld, A. B., Tehei, M., Corde, S. (2017). In vitro investigation of the dose-rate effect on the biological effectiveness of megavoltage X-ray radiation doses. *Applied Radiation and Isotopes*, 128, 114-119.
91. Gedikli, S. (2013). Melatoninin Mcf-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun Ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pcr), Mtt Hücre Canlılık Testi Ve İmmünotokimya Yöntemleriyle Araştırılması. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
92. Wyllie, A. H. (1987). Cell Death. *In Cytology and Cell Physiology*, 755-785.
93. Zakeri, Z., Bursch, W., Tenniswood, M., Lockshin, R. A. (1995). Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death and Differentiation*, 2(2), 87-96.
94. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
95. Kamer, S., Yalman, D., Özşaran, Z., Haydaroğlu, A., Özdemir, N., Özşaran, A. A. (2006). Lokal ileri evre serviks kanserlerinde radikal radyoterapi sırasında Bcl-2 apoptotik indeksinde gözlenen değişiklikler. *İzmir Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi*, 16(2), 71-77.

96. Chen, H., Zuo, Y., Deng, Y. (2001). Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 913(1–2), 387–395.
97. Garcia-Nino, W. R., Zazueta, C. (2015). Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacological Research*, 97, 84–103.
98. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 119(3), 493–501.
99. Kressel, M., Groscurth, P. (1994). Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell and Tissue Research*, 278(3), 549–556.
100. Yılmaz İ. (2005). Erişkin Ratlarda Deneysel Varikozel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yükselmesi Ve Yükselmiş Olan Apoptozisin Varikoselektomi Sonrası Gerileme Düzeyi Ve Süresinin TUNEL Yöntemi İle Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.
101. Ulukaya E. (2008). Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.
102. Li, X., Darzynkiewicz, Z. (1995). Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. *Cell Proliferation*, 28(11), 571–579.
103. Galano, A., Tan, D. X., Reiter, R. J. (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination. *Journal of Pineal Research*, 51(1), 1–16.
104. Meng, X., Li, Y., Li, S., Zhou, Y., Gan, R.-Y., Xu, D.-P., Li, H.-B. (2017). Dietary Sources and Bioactivities of Melatonin. *Nutrients*, 9(4), 367.
105. Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G. G., AcuñaCastroviejo, D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 18(1), 1–11.
106. Sadeu, J. C., & Foster, W. G. (2011). Effect of in vitro exposure to benzo[a]pyrene, a component of cigarette smoke, on folliculogenesis, steroidogenesis and oocyte nuclear maturation. *Reproductive Toxicology*, 31(4), 402–408.
107. Çelik, K. Ö., Aras, A., Tuğan, D., Hekimgil, M., Yalman, D., Esassolak, M., Haydaroğlu, A. (2004). Sıçan germ hücrelerinde radyasyona bağlı apoptoz ve amifostin ile ilişkisi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 24(2), 142-146.
108. Undeger U, Giray B, Zorlu AF, Oge K, Baçaran N. (2004). Protective effects of melatonin on the ionizing radiation induced DNA damage in the rat brain. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(5):379-84.
109. Vijayalaxmi, Thomas, C. R., Reiter, R. J., Herman, T. S. (2002). Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(10), 2575–2601.
110. Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pellegrino, M. L., Tita, B., Caruso, S., Castelli, F. (2002). Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 53(2), 209–215.
111. Mohammadghasemi, F., Jahromi, S. K., Hajizadeh, H., Homafar, M. A., Saadat, N. (2012). The protective effects of exogenous melatonin on nicotine-induced changes in mouse ovarian follicles. *Journal of reproduction and infertility*, 13(3), 143.
112. Leblebici Altındağ, Ö., Take Kaplanoğlu, G., Sirav Aral, B., Seymen, C. M. (2017). Cep Telefonu Radyasyonunda Melatonin'in Testis Dokusunda Olası Koruyucu Etkisi. *Dicle Tıp Dergisi*, 44(1), 71–71.
113. Özen, A., Taştekin, E., Çakma, S., Parlar, Ş., Kürkçü, N., Süt, N., Uzal, C. (2013). Comparison of protective effect of melatonin and amifostine on acute renal damage caused by ionizing radiation. *Uluslararası Klinik Araştırmalar Dergisi*. 1(2):67-70.
114. Pikalova, L., Legeza, V. I., Ivanov, M. B., Zhakovko, E. B. (2011). Experimental study of cytoprotective effect of melatonin in radiation exposure. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 152(1), 76-79.
115. Balcıoğlu, E., Göktepe, E., Cantürk, F., Yakan, B., Özdamar, S. (2017). Erişkin Sıçanlarda Paklitaksel Kaynaklı Testis Hasarında Kurkumin'in Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
116. Johnsen, S. G. (1970). Testicular Biopsy Score Count – A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Hormone Research in Paediatrics*, 1(1), 2–25.

117. Çirpanlı, T., Akercan, F., Terek, M.C., Özçakır, H.T., Giray, G., Karadadaş, N. (2008). Preeklampsi Hastalarının Plasentalarında İmmünohistokimya Metodu İle VEGEF, EGF-R Ve TGF- α Bakışı. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*, 5(1): 40- 5.
118. Mahmoud, H., Mahmoud, O., Layasadat, K., Naeim, A. (2009). Dexamethasone effects on Bax expression in the mouse testicular germ cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 47(2), 237-241.
119. Kıyak, N. (2020). Resveratrolün Hepatoselüler Karsinom Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Ve Antiproliferatif Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
120. Gonçalves, R. J. S., Cavalcante, A. Y. P., Gouveia, B. B., Lins, T. L. B., Barberino, R. S., Menezes, V. G., Barros, V. R. P., Macedo, T. J. S., Figueiredo, J. R., Matos, M. H. T. (2015). Lower apoptosis rate in ovine preantral follicles from ovaries stored in supplemented preservation media. *Zygote*, 23(6), 943–950.
121. Kruger, N. J. (2009). *The Protein Protocols Handbook* (John M. Walker, Ed.; 3rd Ed.). Humana Press.
122. Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277–285.
123. Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103–1111.
124. Erel, O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry*, 37(2), 112–119.
125. Huang, Z., Peng, R., Yu, H., Chen, Z., Wang, S., Wang, Z., Dong, S., Li, W., Jiang, Q., Li, F., Li, Q. (2022). Dimethyl Sulfoxide Attenuates Radiation-Induced Testicular Injury through Facilitating DNA Double-Strand Break Repair. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 9137812.
126. Hara, T., Tominaga, M., Yajyu, K., Kouzaki, R., Hanyu, A., Yamada, H., Sasaki, M., Azane, S., Uto, Y. (2018). Effect of dose rate on antitumor activity in hypoxic cells by using flattening filter free beams. *International Journal of Radiation Research*, 16(2), 197–205.
127. Verbakel, W. F. A. R., van den Berg, J., Slotman, B. J., Sminia, P. (2013). Comparable cell survival between high dose rate flattening filter free and conventional dose rate irradiation. *Acta Oncologica*, 52(3), 652–657.
128. Sorensen, B. S., Vestergaard, A., Overgaard, J., Præstegaard, L. H. (2011). Dependence of cell survival on instantaneous dose rate of a linear accelerator. *Radiotherapy and Oncology*, 101(1), 223–225.
129. Lasio, G., Guerrero, M., Goetz, W., Lima, F., Baulch, J. E. (2014). Effect of varying dose-per-pulse and average dose rate in X-ray beam irradiation on cultured cell survival. *Radiation and Environmental Biophysics*, 53(4), 671–676.
130. Lohse, I., Lang, S., Hrbacek, J., Scheidegger, S., Bodis, S., Macedo, N. S., Feng, J., Lütolf, U. M., Zaugg, K. (2011). Effect of high dose per pulse flattening filter-free beams on cancer cell survival. *Radiotherapy and Oncology*, 101(1), 226–232.
131. King, R. B., Hyland, W. B., Cole, A. J., Butterworth, K. T., McMahon, S. J., Redmond, K. M., Trainer, C., Prise, K. M., McGarry, C. K., Hounsell, A. R. (2013). An in vitro study of the radiobiological effects of flattening filter free radiotherapy treatments. *Physics in Medicine and Biology*, 58(5), N83–N94.
132. Fogliata, A., Fleckenstein, J., Schneider, F., Pachoud, M., Ghandour, S., Krauss, H., Reggiori, G., Stravato, A., Lohr, F., Scorsetti, M., Cozzi, L. (2015). Flattening filter free beams from TrueBeam and Versa HD units: Evaluation of the parameters for quality assurance. *Medical Physics*, 43(1), 205–212.
133. Ling, C. C., Gerweck, L. E., Zaider, M., Yorke, E. (2010). Dose-rate effects in external beam radiotherapy redux. *Radiotherapy and Oncology*, 95(3), 261–268.
134. Singh, V. K., Seed, T. M. (2017). A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: Part I. Radiation sub-syndromes, animal models and FDA-approved countermeasures. *International Journal of Radiation Biology*, 93(9), 851–869.
135. Kandilcik, S. (2010). Radyasyona Bağlı Serbest Radikal Hasarının İncelenmesi. Eczacılık Fakültesi Bitirme Ödevi. Eczacılık Fakültesi.
136. Cakmak Karaer, I., Simsek, G., Yildiz, A., Vardi, N., Polat, A., Tanbek, K., Gurocak, S., Parlakpınar, H. (2016). Melatonin's protective effect on the salivary gland against ionized radiation damage in rats. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 45(6), 444–449.

137. Orhon, Z. N., Uzal, C., Kanter, M., Erboğa, M., Demiroğlu, M. (2016). Protective effects of *Nigella sativa* on gamma radiation-induced jejunal mucosal damage in rats. *Pathology. Research and Practice*, 212(5), 437–443.
138. Özer, M. A., Polat, N., Özen, S., Parlakpınar, H., Ekici, K., Polat, A., Vardı, N., Tanbek, K., Yıldız, A. (2017). Effects of molsidomine on retinopathy and oxidative stress induced by radiotherapy in rat eyes. *Current Eye Research*, 42(5), 803–809.
139. Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36(1), 1–9.
140. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Muñoz-Hoyos A. (1997). Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci*. 60(25), 2255-2271.
141. Kale, A., Pişkin, Ö., Baş, Y., Aydın, B. G., Can, M., Elmas, Ö., Büyükuysal, Ç. (2018). Neuroprotective effects of Quercetin on radiation-induced brain injury in rats. *Journal of Radiation Research*, 59(4), 404–410.
142. Cıkman, O., Ozkan, A., Aras, A. B., Soylemez, O., Alkis, H., Taysi, S., Karaayvaz, M. (2014). Radioprotective Effects of *Nigella Sativa* Oil Against Oxidative Stress in Liver Tissue of Rats Exposed to Total Head Irradiation. *Journal of Investigative Surgery*, 27(5), 262–266.
143. Aras, S., Tanzer, I. O., Karacavus, S., Sayir, N., Erdem, E., Hacimustafaoglu, F., Erdogan, C. E., Sapmaz, T., İkizceli, T., Pence, H. H., Baydili, K. N., Katmer, T. (2021). Radioprotective effect of melatonin against flattening filter-free irradiation-induced rat parotid gland damage. *Radiation Effects and Defects in Solids*, 176(7–8), 621–637.
144. Khan, S., Adhikari, J. S., Rizvi, M. A., Chaudhury, N. K. (2015). Radioprotective potential of melatonin against ⁶⁰Co γ -ray-induced testicular injury in male C57BL/6 mice. *Journal of Biomedical Science*, 22(1), 61.
145. He, Y., Zhang, Y., Li, H., Zhang, H., Li, Z., Xiao, L., Hu, J., Ma, Y., Zhang, Q., Zhao, X. (2018). Comparative Profiling of MicroRNAs Reveals the Underlying Toxicological Mechanism in Mice Testis Following Carbon Ion Radiation. *Dose-Response*, 16(2), 1-12.
146. Abedpour, N., Zeinali, A., Karimipour, M., Pourheidar, B., Farjah, G. H., Abak, A., Shoorei, H. (2022). Protective effects of chlorogenic acid against ionizing radiation-induced testicular toxicity. *Heliyon*, 8(10), e10798.
147. Tajabadi, E., Javadi, A., Azar, N.A., Najafi, M., Shirazi, A., Shabeeb, D., Musa, A.E. (2020). Radioprotective effect of a combination of melatonin and metformin on mice spermatogenesis: A histological study. *Int Journal Reprod Biomed*, 21;18(12):1073-1080.
148. Akpolat, M., Kamat, B., Gülle, K., Bakkal, B. H. (2018). Skrotal Radyoterapide Curcuminin Profilaktik Kullanımı Testis Dokusunda PARP-1 İmmünreaktivitesini ve Spermatogenezi Nasıl Etkiler? *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 25(4), 370-384.
149. Ahmed, M. M., Ibrahim, Z. S., Alkafafy, M., El-Shazly, S. A. (2014). L-Carnitine protects against testicular dysfunction caused by gamma irradiation in mice. *Acta Histochemica*, 116(6), 1046–1055.
150. Ji, H.-J., Wang, D.-M., Wu, Y.-P., Niu, Y.-Y., Jia, L.-L., Liu, B.-W., Feng, Q.-J., Feng, M.-L. (2016). Wuzi Yanzong pill, a Chinese polyherbal formula, alleviates testicular damage in mice induced by ionizing radiation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 509.
151. Naeimi, R. A., Talebpour Amiri, F., Khalatbary, A. R., Ghasemi, A., Zargari, M., Ghesemi, M., Hosseinimehr, S. J. (2017). Atorvastatin mitigates testicular injuries induced by ionizing radiation in mice. *Reproductive Toxicology*, 72, 115–121.
152. Shaban, N. Z., Ahmed Zahran, A. M., El-Rashidy, F. H., Abdo Kodous, A. S. (2017). Protective role of hesperidin against γ -radiation-induced oxidative stress and apoptosis in rat testis. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 24(1), 5.
153. Topcu, A., Mercantepe, F., Rakici, S., Tunkaya, L., Uydu, H. A., Mercantepe, T. (2019). An investigation of the effects of N-acetylcysteine on radiotherapy-induced testicular injury in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(2), 147–157.
154. Van Beek, M. E., Davids, J. A. G., De Rooij, D. G. (1986). Variation in the sensitivity of the mouse spermatogonial stem cell population to fission neutron irradiation during the cycle of the seminiferous epithelium. *Radiation Research*, 108(3), 282.
155. Ekici, K., Temelli, O., Parlakpınar, H., Samdancı, E., Polat, A., Beytur, A., Tanbek, K., Ekici, C., Dursun, I. H. (2016). Beneficial effects of aminoguanidine on radiotherapy-induced kidney and testis injury. *Andrologia*, 48(6), 683–692.

156. Gao, S., Zhao, Z., Wu, R., Zeng, Y., Zhang, Z., Miao, J., Yuan, Z. (2017). Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves radiation-induced heart injury through DNA damage repair in rat model. *Radiation and Environmental Biophysics*, 56(1), 63–77.
157. Shalet, S. M. (1993). Effect of Irradiation Treatment on Gonadal Function in Men Treated for Germ Cell Cancer. *European Urology*, 23(1), 148–152.
158. Schally, A.V., Paz Bouza, J.I., Schlosser, J.V., Karashima, T., Debeljuk, L., Gandle, B., Sampson, M. (1987). Protective effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone against x-radiation-induced testicular damage in rats. *Proc. Natl. Acad.*, 84(3): 851-855.
159. Ahmad, G., Agarwal, A. (2017). Ionizing Radiation and Male Fertility. In *Male Infertility Springer India*.185–196.
160. Chuai, Y., Gao, F., Li, B., Zhao, L., Qian, L., Cao, F., Wang, L., Sun, X., Cui, J., Cai, J. (2012). Hydrogen-rich saline attenuates radiation-induced male germ cell loss in mice through reducing hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*, 442(1), 49–56.
161. Şener, T., Atasoy, B.M., Çevik, Ö., Çilingir Kaya, Ö.T. (2021). Effects of resveratrol against scattered radiation-induced testicular damage in rats. *Turkish Journal of Biochemistry*, 46(4),425-433.
162. Amiri, F. T., Raeispour, M., Farzipour, S., Hosseinimehr, S. J. (2022). Radioprotective Effect of Febuxostat Against Testicular Damage Induced by Ionizing Radiation in Mice. *Current Radiopharmaceuticals*, 15(2), 134–140.
163. Wenger RH. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*.16(10), 1151-1162.
164. Sakkas, D., Seli, E., Bizzaro, D., Tarozzi, N., Manicardi, GC. (2003). Abnormal spermatozoa in the ejaculate: Abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*. 7(4):428-32.
165. Take, G., Erdogan, D., Helvacioğlu, F., Göktas, G., Ozbey, G., Uluoğlu, C., Yücel, B., Guney, Y., Hicsonmez, A., Ozkan, S. (2009). Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(7), 621–628.
166. Luchetti, F., Canonico, B., Curci, R., Battistelli, M., Mannello, F., Papa, S., Falcieri, E. (2006). Melatonin prevents apoptosis induced by UV-B treatment in U937 cell line. *Journal of Pineal Research*, 40 (2), 158-167.
167. Gezer A. (2015). Radyoterapi Uygulanan Ratlarda Testis Hasarının Önlenmesinde Amifostininin Rolü. Yüksek Lisans Tezi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
168. Mates, J.M. (2000). Effects Of Antioxidant Enzymes In The Molecular Control Of Reactive Oxygen Species Toxicology. *Toxicology*. 16;153(1-3):83-104.
169. Aras, S., Tanzer, İ.O., Can, Ü., Sümer, E., Baydili, K.N. (2021). The role of melatonin on acute thyroid damage induced by high dose rate X-ray in head and neck radiotherapy. *Radiation Physics and Chemistry*. 179.
170. Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
171. Winczyk, K., Pawlikowski, M., Lawnicka, H., Kunert-Radek, J., Spadoni, G., Tarzia, G., Karasek, M. (2002). Effects Of Melatonin And Melatonin Receptors Ligand N-[(4-Methoxy-1H-İndol-2-Yl) Methyl]Propanamide On Murine Colon 38 Cancer Growth In Vitro And In Vivo. *Neuro Endocrinology Letters*, 23(1), 50–54.
172. Oktem, F., Ozguner, F., Mollaoglu, H., Koyu, A., Uz, E. (2005). Oxidative damage in the kidney induced by 900-MHz-emitted mobile phone: protection by melatonin. *Archives of Medical Research*, 36(4), 350–355.
173. Ozguner, F., Aydin, G., Mollaoglu, H., Gökalp, O., Koyu, A., Cesur, G. (2004). Prevention of mobile phone induced skin tissue changes by melatonin in rat: An experimental study. *Toxicology and Industrial Health*, 20(6–10), 133–139.
174. Ozguner, F., Oktem, F., Armagan, A., Yilmaz, R., Koyu, A., Demirel, R., Vural, H., Uz, E. (2005). Comparative analysis of the protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on mobile phone-induced renal impairment in rat. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 276(1–2), 31–37.
175. Mansour, H. (2006). Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. *Pharmacological Research*, 54(3), 165–171.
176. Guney, Y., Hicsonmez, A., Uluoğlu, C., Guney, H. Z., Ozel Turkcü, U., Take, G., Yucel, B., Caglar, G., Bilgihan, A., Erdogan, D., Nalca Andrieu, M., Kurtman, C., Zengil, H. (2007). Melatonin

- prevents inflammation and oxidative stress caused by abdominopelvic and total body irradiation of rat small intestine. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(10), 1305–1314.
177. Vijayalaxmi, Reiter, R. J., Tan, D.-X., Herman, T. S., Thomas, C. R. (2004). Melatonin as a radioprotective agent: A review. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 59(3), 639–653.
178. Arıcıgil, M., Dündar, M. A., Yücel, A., Eryılmaz, M. A., Aktan, M., Alan, M. A., Fındık, S., Kılınc, İ. (2017). Melatonin prevents possible radiotherapy-induced thyroid injury. *International Journal of Radiation Biology*, 93(12), 1350–1356.
179. Elmas, Ç., Erdoğan, D., Gökteş, G., Uluoğlu, C., Güney, Y., Özbey, G., Hiçsönmez, A., Yücel, B., Özkan, S., Şener, D. (2013). İyonize radyasyon uygulaması yapılmış rat pineal bezi üzerinde melatoninin koruyucu etkisi var mıdır? Kronobiyolojik Ve Elektronik Mikroskopik Çalışma. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1), 153-160.
180. Sener, G., Atasoy, B. M., Ersoy, Y., Arbak, S., Sengoz, M., Yegen, B., (2004). Melatonin protects against ionizing radiation-induced oxidative damage in corpus cavernosum and urinary bladder in rats. *Journal Of Pineal Research*, 37(4), 241-246.
181. Deng, C., Zhang, J., Huo, Y., Xue, H., Wang, W., Zhang, J., Wang, X. (2022). Melatonin alleviates the heat stress-induced impairment of Sertoli cells by reprogramming glucose metabolism. *Journal of Pineal Research*, 73(3).
182. Heidarizadi, S., Rashidi, Z., Jalili, C., Gholami, M. (2022). Overview of biological effects of melatonin on testis: A review. *Andrologia*, e14597.
183. K., Kiefer, T. L., Spriggs, L. L., & Hill, S. M. (2000). Pathways through which a regimen of melatonin and retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 61(3), 229–239.
184. Wenzel, U., Nickel, A., Daniel, H. (2005). Melatonin potentiates flavone-induced apoptosis in human colon cancer cells by increasing the level of glycolytic end products. *International Journal of Cancer*, 116(2), 236–242.
185. Sainz, R. M., Mayo, J. C., Rodriguez, C., Tan, D. X., Lopez-Burillo, S., Reiter, R. J. (2003). Melatonin and cell death: Differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(7), 1407–1426.
186. Yalçınkaya, F. R., Ardiçoğlu, A., İlhan, N., Uğur, İ. Baltacı, A. K. K. (2009). Radyasyon Hasarının Testis ve Böbreklerdeki Malonyldialdehit Düzeyi (MDA) Üzerine Etkisi ve Melatonin ile Önlenmesi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2 (1), 14-17.
187. Smina, T. P., Maurya, D. K., Devasagayam, T. P. A., Janardhanan, K. K. (2015). Protection of radiation induced DNA and membrane damages by total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst. *Chemico-Biological Interactions*, 233, 1–7.
188. Gao, S., Zhao, Z., Wu, R., Zeng, Y., Zhang, Z., Miao, J., Yuan, Z. (2017). Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves radiation-induced heart injury through DNA damage repair in rat model. *Radiation and Environmental Biophysics*, 56(1), 63–77.
189. Dündar, G., Günaydın, Ö., Yazıcı, G., Kurtulan, O., Ögüş, E., Şahin, İ. (2022). Investigation of the protective effects of intraperitoneal melatonin in rats receiving laryngeal radiotherapy. *Auris Nasus Larynx*. 18(15).
190. Karacaoğlu, E. (2015). T-2 Toksininin Kan-Testis Bariyeri Üzerine Etkisinin Serw3 Hücre Hattında Araştırılması. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı.
191. Xu, J., Anuar, F., Mohamed Ali, S., Ng, M. Y., Phua, D. C. Y., Hunziker, W. (2009). Zonula Occludens-2 Is Critical for Blood–Testis Barrier Integrity and Male Fertility. *Molecular Biology of the Cell*, 20(20), 4268–4277.
192. McCabe, M. J., Tarulli, G. A., Meachem, S. J., Robertson, D. M., Smooker, P. M., Stanton, P. G. (2010). Gonadotropins regulate rat testicular tight junctions in vivo. *Endocrinology*, 151(6), 2911–2922.
193. Zou, P., Yang, F., Ding, Y., Zhang, D., Liu, Y., Zhang, J., Wu, D., Wang, Y. (2022). Lipopolysaccharide downregulates the expression of ZO-1 protein through the Akt pathway. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 774.
194. Hammami I, Nahdi A, Atig F, El May A, El May MV. (2016). Garlic (*Allium sativum*) feeding impairs Sertoli cell junctional proteins in male Wistar rat testis: Microscopy study. *Andrologia*. 48(10), 1281-1288.
195. Altun, A., Canillioğlu, Y. E., Ünsal, E., Karabulut, S., Hürdağ, C. (2021). Ultrastructural examination of testicular tissues and evaluation of ZO-1 protein levels obtained from azoospermic cases. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 38(3), 272–276.

196. Kopera, I. A., Su, L., Bilińska, B., Cheng, C. Y., Mruk, D. D. (2009). An in Vivo Study on Adjudin and Blood-Testis Barrier Dynamics. *Endocrinology*, 150(10), 4724–4733.
197. Karakaya, F. B., Yavuz, M., Sirvanci, S. (2021). Histological analysis of the effects of thymoquinone on testicular damage in pentylenetetrazole-induced temporal lobe epilepsy model. *Andrologia*, 53(10).
198. Scillitani, G., Zizza, S., Liquori, G. E., Ferri, D. (2007). Lectin histochemistry of gastrointestinal glycoconjugates in the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774). *Acta Histochemica*, 109(5), 347–357.
199. Perçin, I. (2006). Soya fasulyesinden (*Glycine max*) lektin izolasyonu, saflaştırılması ve elektroforetik karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Ana Bilim Dalı.
200. Wakayama, T., Nakata, H., Kumchanteuk, T., Gewaily, M. S., Iseki, S. (2015). Identification of 5-Bromo-2'-Deoxyuridine-Labeled Cells during Mouse Spermatogenesis by Heat-Induced Antigen Retrieval in Lectin Staining and Immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 63(3), 190–205.
201. Sharon, N. (2007). Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2753–2764.
202. Jung, M. S., Kim, B. J., Lee, Y. A., Kim, K. J., Kim, Y. H., Kang, H. G., Ryu, B. Y. (2015). In vitro Spermatogenesis through Testis Tissue Culture in Rodents. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12, 37-45.
203. Arya, M., Vanha-Perttula, T. (1986). Comparison of lectin-staining pattern in testis and epididymis of gerbil, guinea pig, mouse, and nutria. *American Journal of Anatomy*, 175(4), 449–469.
204. Söderström, K. O., Malmi, R., Karjalainen, K. (1984). Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. *Histochemistry*, 80(6), 575–579.

