

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



RADYASYONA MARUZ KALAN
RATLARDA ELLAJİK ASİDİN TESTİS
DOKUSUNDAKİ ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kamile Esin TAŞDEMİR

2017

ONAY SAYFASI

Fırat Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Histoloji - Embriyoloji

..... Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr.

Enver Ozan


Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Enver Ozan 

Prof. Dr. Nigör Vardı 

Prof. Dr. Neriman Gökbuğ 

.....

.....

.....

.....



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı *Kamile Esin TAŞDEMİR*
Tarih *27.07.17*
İmza *[Signature]*

Danışman
Anabilim Dalı
ELAZIĞ

İTHAF SAYFASI

Sevgili aileme...



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince tecrübelerinden faydalandığım, değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. İ. Enver OZAN 'a, tezimin değerlendirme aşamasında ilgi, öneri ve yardımlarından dolayı tez projesi yardımcı yürütücü hocam Yrd. Doç. Dr. Gonca OZAN' a,

Eğitimim süresince beni yönlendiren, iyi niyetleriyle her zaman destek olan ve her an bilgi birikimlerinden faydalandığım Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri sayın Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK'e, Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU 'na, Prof. Dr. D. Özlem DABAK'a ve Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, ayrıca tezimin deneysel kısmına destek olan Medikal Park Hastanesi Radyasyon Onkolojisi birimi sayın hocam Uzm. Dr. İhsan Karşlıoğlu, Fizik Y. Müh. Özgür Gürel ve Radyasyon Onkoloji birimi çalışma ekibine,

Tez çalışmamda yardımcı olarak katkıda bulunan Arş. Gör. Nalan KAYA, Bio. Osman Fatih YILMAZ ile yüksek lisans arkadaşım Songül AY YILMAZ'a

Tezime sağladığı finansmandan ötürü Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP) 'ne,

Son olarak yaşamım boyunca desteklerini hiç esirgemeyen aileme, eşime ve canım oğlum Yiğithan'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
İTHAF SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
RADYASYONA MARUZ KALAN RATLARDA ELLAJİK ASİDİN TESTİS	
DOKUSUNDAKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ	1
1. ÖZET	1
THE EXAMINATION OF EFFECT OF ELLAGIC ACID ON	
TESTICULAR TISSUES OF RATS EXPOSED TO RADIATION	4
2. ABSTRACT.....	4
3. GİRİŞ.....	7
3.1.TESTİS.....	7
3.1.1. Testis Anatomisi.....	7

3.1.2. Testis Embriyolojisi.....	12
3.1.3. Testis Fizyolojisi	15
3.1.4. Testis Histolojisi.....	17
3.1.4.1 İnterstisyel Doku.....	17
3.1.4.2.Testisler.....	17
3.1.4.3. Seminifer Tübüller.....	18
3.1.4.4.Spermatogenez.....	19
3.1.4.5.Spermiyogenez.....	20
3.1.4.6. Sertoli hücreleri.....	20
3.1.4.7. Kan testis bariyeri	22
3.1.4.8. Leydig Hücreleri	23
3.2.RADYASYON.....	23
3.2.1. İyonize radyasyon.....	24
3.2.2. Radyasyon birimleri	26
3.2.3. İyonlaştırıcı radyasyonun tarihi süreci	26
3.2.4. Radyasyonun testis dokusu üzerinde etkileri	27
3.2.5. Radyasyon hasarında serbest radikallerin rolü	28
3.3. Serbest radikaller.....	29

3.3.1.Artmış Reaktif Oksijen Partiküllerinin Zararları.....	30
3.4.Apoptozis	32
3.5.Antioksidanlar	33
3.6. Fenolik Fitokimyasallar	35
3.6.1. Ellajik Asit.....	36
3.6.2 Ellajik asidin Antioksidatif Etkisi	37
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
4.1. Deney Hayvanları Beslenmesi ve Barındırılması	39
4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	41
4.3. Deney düzeneği ve radyasyonun verilmesi.....	42
4.4. Doku Örneklerini Alınması.....	42
4.5. Histolojik Değerlendirmeler.....	43
4.6. TUNEL Metodu	45
4.8. Biyokimyasal Analizler.....	47
4.8.1. Testis dokusunda malondialdehit düzeyinin tayini	47
4.8.2. Testis dokusunda katalaz aktivitesinin tayini	48
4.8.3. Testis dokusunda glutatyon düzeyinin tayini	48
4.8.4. Testis dokusu Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin tayini	49

4.9. İstatistiksel Analiz.....	50
5.BULGULAR.....	51
5.1. Histolojik Değerlendirmeler.....	51
5.2. TUNEL Bulguları.....	59
5.3. Biyokimyasal Analizler.....	63
6 . TARTIŞMA	65
7. KAYNAKLAR	71
8. ÖZGEÇMİŞ	79

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Ratlara verilen pelet yemin bileşimi.....	40
Tablo 2:Histolojik takip işlem basamakları.	44
Tablo 3: TUNEL boyaması işlem basamakları.....	46
Tablo 4: Histolojik değerlendirmelere ait histoskor tablosu.....	52
Tablo 5: Apoptotik indeks (%)..	63
Tablo 6: Grupların testis dokusu MDA, GSH düzeyleri ve SOD, CAT aktivitesi ...	64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Testisin anatomik görünümü.	11
Şekil 2: Rat testis anatomisi.....	12
Şekil 3: Primordiyal germ hücrelerinin göçü ve gonadal farklılık	14
Şekil 4: Spermatogenezin hormonal kontrolü	16
Şekil 5: Testisin histolojik görünümü	18
Şekil 6: Radyasyon	24
Şekil 7: Antioksidanların sınıflandırılması	33
Şekil 8: Ellajik asidin kimyasal yapısı	37
Şekil 9: Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli (↔) ve normal spermatogenez (★). H&E x 200..	53
Şekil 10: Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül bazal membranı (→) ve interstisyel alan (⇒) PAS x200.	53
Şekil 11: Radyasyon grubu. Seminifer tübül germinal epitelinde vakualizasyon (➤) H&E x200.....	54
Şekil 12: Radyasyon grubu. Seminifer tübül germinal epitelinde vakualizasyon (➤), seminifer tübül germinal epiteli kalınlığında azalma (⇒) ve interstisyel alanda ödem (Δ). H&E x200.....	54

Şekil 13: Radyasyon grubu. Seminifer tübül germinal epitelinde vakualizasyon (►) ve vasküler konjesyon (◊). H&E x200.....	55
Şekil 14: Radyasyon grubu. İnterstisyel alanda ödem (Δ) PAS x200..	55
Şekil 15: Radyasyon + EA grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli (↔), ve normal görünümlü seminifer tübül bazal membranı (→). H&E x200.	56
Şekil 16: Radyasyon + EA grubu. Normal spermatogenez (★) H&E x 200.....	56
Şekil 17: Radyasyon + EA grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli (↔) ve interstisyel alanda azalmış ödem (Δ) PAS x200.	57
Şekil 18: EA grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli (↔) ve normal spermatogenez (★). H&E x200.	57
Şekil 19: EA grubu. Normal görünümlü interstisyel alan (→) ve normal spermatogenez (★). PAS x200.....	58
Şekil 20: Mısırözü yağı grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli (↔) ve normal görünümlü interstisyel alan (→) H&E x200.....	58
Şekil 21: Mısırözü yağı grubu. Normal spermatogenez (★). PAS x200.....	59
Şekil 22: Kontrol grubu. TUNEL pozitif hücre (→). x 400	60
Şekil 23: Radyasyon grubu. TUNEL pozitif hücre (→). x400	60
Şekil 24: Radyasyon + EA grubu. Az sayıda TUNEL pozitif hücre (→). x400.	61
Şekil 25: EA grubu. Az sayıda TUNEL pozitif hücre (→). x400	61

Şekil 26: Mısırözü yağı grubu. Az sayıda TUNEL pozitif hücre (→). x400 62

Şekil 27: Negatif kontrol. TUNEL pozitif hücre görülmemekte TUNEL x100. 62



KISALTMALAR LİSTESİ

ABP	: Androjen bağlayıcı protein
AEC	: 3-Amino-9-ethyl carbazole
AMH	: Anti-Müllerian hormon
CO	: Karbon monoksit
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EA	: Ellajik asit
FSH	: Follikül stimüle edici hormon
GSH-Rd	: Glutasyon redüktaz
GnRH	: Gonadotropin serbestleyici hormon
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyon
H&E	: Hematoksilen- Eozin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
LH	: Luteinizan hormon
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat- hidrojen
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PBS	: Phosphate buffered saline

RNS : Reaktif nitrojen türleri

ROS : Reaktif oksijen türleri

SOD : Süperoksit dismutaz

TBA : Tiobarbitürik asit

TBF : Testis belirleyici faktörü

TUNEL :Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling

EGCG : Epigallokatechin-3-0-gallate

OH : Hidroksil radikali

Rd : Rad

Gy : Gray

MDA : Malondialdehit

AI : Apoptotik indeks

SOX9 :Transkripsiyon faktörü

NBT : Nitroblue tetrazolium

RADYASYONA MARUZ KALAN RATLARDA ELLAJİK ASİDİN TESTİS DOKUSUNDAKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

1. ÖZET

Biyolojik materyallerin ışınlanmasının, hızla reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına neden olur. Radyasyon nedenli erkek infertilitesinin patogeneğinde oksidatif stresin rol oynadığı bilinmektedir. Oksidatif stresi yok etmenin stratejilerden biri, seminal plazmanın süpürücü kapasitesini arttırmaktır.

Ellajik asit nar, çilek, böğürtlen, ahududu ve üzüm gibi birçok bitkide bulunan ve dokuları oksidatif hasara karşı koruması ile tanınan polifenolik antioksidan bir bileşiktir.

Bu çalışmada radyasyona maruz kalan ratlarda ellajik asidin testis dokusundaki etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmada 8 haftalık ortalama 180-200 gr ağırlığında 30 adet Spraque-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar grup I (kontrol), grup II (radyasyon), grup III (radyasyon+ellajik asit), grup IV (ellajik asit), grup V (mısırözü yağı) olmak üzere rastgele 5 gruba ayrıldı. Grup II ve grup III 'deki ratların tamamına, çalışmanın ilk gününde, tek doz 8 Gy'lik radyasyon, hastane ortamında deneyimli personel tarafından uygulandı. Grup III ve grup IV'deki ratlara çalışmanın ikinci

gününden itibaren 7 hafta boyunca mısırözü yağında çözündürülmüş 12 mg/kg dozunda ellajik asit gün aşırı oral gavaj yoluyla verilmiştir.

Deney süresi sonunda tüm gruptaki ratlar xylazine – ketamin anestezisi altında dekapite edildi. Testis preparatları H&E ve PAS boyası ile boyandı. Ayrıca TUNEL metodu uygulandı. Testis dokuları ile biyokimyasal analizler yapıldı.

Histolojik değerlendirmelerde radyasyona maruz bırakılan gruba ait kesitlerde seminifer tübül germinal epitelinde önemli derecede dejenerasyon, vasküler konjesyon, atrofik tübüller, interstisyel alanda ödem ve bazı tübüllerin lümenlerine dökülmüş immatür hücreler tespit edildi. Radyasyon ile birlikte ellajik asit uygulanan grupta ise; testis dokusunda germinal epitel dejenerasyonunda, vasküler konjesyonda, interstisyel ödemde belirgin iyileşmeler gözlemlendi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon gruplarında TUNEL pozitif hücrelerde anlamlı bir artış vardı. Radyasyon + ellajik asit grubunda ise, TUNEL pozitif hücre sayısının kontrol grubu ile benzer olduğu belirlendi.

Malondialdehit düzeylerinin ve katalaz aktivitesinin kontrol grubuna göre radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı, radyasyon + ellajik asit uygulamasının ise malondialdehit seviyesini ve katalaz aktivitesini azalttığı tespit edildi.

Süperoksitdismutaz aktivitesi ve glutatyon düzeylerinin; kontrol grubuna göre radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulundu. Radyasyon + ellajik asit grubunda ise radyasyon grubuna kıyasla süperoksitdismutaz aktivitesinin arttığı, glutatyon düzeyinin daha da azaldığı tespit edildi.

Sonuç olarak bu çalışmada, radyasyona maruz kalmanın testisi etkileyerek hasar verdiği tespit edildi. Radyasyon maruziyetine karşı koruyucu amaçla kullanılan ellajik asidin ise; antioksidan özelliği sayesinde, radyasyonun oluşturduğu olumsuz etkileri belirgin biçimde azalttığı gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Radyasyon, ellajik asit, testis, histoloji, immünohistokimya.

THE EXAMINATION OF EFFECT OF ELLAGIC ACID ON TESTICULAR TISSUES OF RATS EXPOSED TO RADIATION

2. ABSTRACT

Irradiation of biological materials is known to cause rapid increase in concentration of reactive oxygen species (ROS). Oxidative stress has been shown to play role in pathogenesis of radiation-associated male infertility. One strategy to eliminate oxidative stress is to enhance the sweeping capacity of the seminal plasma.

Ellagic acid, found in many plants including pomegranate, strawberry, blackberry, raspberry and grape, is a polyphenolic antioxidant famously known for its ability to protect tissues against oxidative damage.

The present study aims to investigate the effect of ellagic acid on testis tissue in rats exposed to radiation.

The study was conducted on 30 Sprague-Dawley rats that were 8 weeks old and had an average weight of 180-200 gr. The rats were randomly assigned to 5 groups as Group I (control), Group II (radiation), Group III (radiation + ellagic acid), Group IV (ellagic acid), and Group V (corn oil). In Group II and III, all rats were exposed to a single dose 8 Gy radiation on the first day of the study, in hospital setting by experienced personnel. In Group III and IV, all rats received ellagic acid in the dose of 12 mg/kg, dissolved in corn oil, administered via oral

gavage every other day for 7 weeks period starting from the second day of the study.

At the end of the experiment, rats in all groups were decapitated under xylasine-ketamine anesthesia. Testis specimens were stained with hematoxylin-eosin and PAS dyes. Additionally, TUNEL method was applied. Biochemical analyses were performed on testis tissues.

Histological examinations of the sections in the group exposed to radiation showed significant degree of degeneration in the germinal epithelium of the seminiferous tubuli, vascular congestion, atrophic tubuli, interstitial edema and immature cell shedding into the lumen of some tubuli. In the group that received ellagic acid following radiation, there was profound improvement in the germinal epithelium degeneration, vascular congestion and interstitial edema.

In comparison to the control group, radiation groups showed significant increase in TUNEL-positive cells. The number of TUNEL-positive cells was similar in radiation + ellagic acid group and the control group.

Malondialdehyde levels and catalase activity were significantly increased in the radiation group compared to the control group, while radiation + ellagic acid application resulted in decreased malondialdehyde level and catalase activity.

Superoxide dismutase (SOD) activity and glutathione level were significantly reduced in the radiation group compared to the control group.

Compared to the radiation group, radiation + ellagic acid group showed increased SOD activity and further reduced glutathione level.

In conclusion, radiation exposure causes damage in the testis tissue. Due to its antioxidant properties, ellagic acid administration following radiation exposure resulted in profound improvements in the adverse effects caused by radiation.

Key words: Radiation, ellagic acid, testis, histology, immunohistochemistry



3. GİRİŞ

3.1.TESTİS

3.1.1. Testis Anatomisi

Testis (orchis): Funiculus spermaticus'a asılı kalan testis'ler, sağı sollu bir çift olup, scrotum'un içerisine yerleşmişlerdir. İnsanlarda testislerin büyüklüğü yaklaşık olarak 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve 10-15 g ağırlığındadırlar. Karın arka duvarında peritoneum'un arkasında gelişirler.

Yapısı: testis lamina visceralis, tunika vasculosa ve tunika albuginea olmak üzere üç tabaka ile sarılmıştır.

Lamina visceralis (epiorchium), epididymis'in büyük kısmı ile arka kenarının medial bölümü hariç, testisi örter ve bu iki oluşumu birbirine bağlar. Testis ve epididymis'in arka kenarlarından, lamina parietalis olarak fascia spermatica interna'nın iç yüzüne geçer. Epididymis'in baş kısmını testis'in üst ucuna bağlayan tunica vaginalis bölümüne lig. epididymidis superius, kuyruk kısmını testis'in alt ucuna bağlayan tunica vaginalis bölümüne ise lig. Epididymidis inferius denilmektedir.

Lamia parietalis (periorchium), peritoneum'un fascia spermatica interna'yi döşeyen kısmıdır. Funiculus spermaticus'un ön ve iç kısmında yukarıya doğru biraz uzar. Bu nedenle lamina visceralis'den daha geniştir. Lamina parietalis'in iç yüzü düzdür ve mezotel ile kaplanmıştır.

Saccus vaginalis'in oblitere olan üst bölümü, genellikle gevşek bağ dokusu içinde bir kordon şeklinde görülür. Bazen karın boşluğunu döşeyen peritonu, tunica vaginalis testis'e bağlayan bir bant şeklinde görülür. Bazen de yavaş yavaş kaybolurlar. Bazen oblitere olmaz ve bunun sonucu olarak, karın boşluğu ile cavum scroti birbirleriyle bağlantılı olurlar.

Tunica albuginea: Testis'i saran mavimsi beyaz renkli, sıkı yapılı fibröz bir tabakadır. Bu tabakayı oluşturan beyaz fibröz demetler, farklı yönlerde uzanarak birbiri içine girer. Tunica albuginea'yı, arka kenarı hariç olmak üzere, dıştan tunica vaginalis testis'in lamina visceralis'i (epiorchium) örter. Peritonun bulunmadığı arka kenara epididymis tutunur ve buradan testis'in damar ve sinirleri girip çıkarlar. Tunica albuginea, arka kenarda testis'in içine doğru kalın ve vertikal yarım bir bölme şeklinde uzantı gönderir. Bu bölmeye mediastinum testis denir.

Mediastinum testis (corpus highmori): Yarım bölme şeklindeki bu yapı, testis'in üst ucundan alt ucuna kadar uzanır ve yukarı kısmı daha geniştir. Mediastinum testis'ten çıkan bölmeler, testis'i saran tunica albuginea'ya tutunur. Septula testis denilen bu bölmeler testis'i piramit şeklinde boşluklara ayırırlar.

Tabanı perifere, tepesi ise mediastinum testis'e bakan bu boşluklarda tubuli seminiferi contorti ve tubuli seminiferi rekti denilen t p şeklinde bezler yer alır. Mediastinum testis' den damarlar ve kanallar girip çıkar ( ekil 1).

Tunica vasculosa: Tunika albuginea'nın iç kısmında yer alan damar a ıdır. Damarlar arasını gevşek ba  dokusu oluşturur. Tunika vasculosa, Tunika albuginea'nın i  yüzünü ve tüm bölmelerin yüzlerini d  erler. Böylece, testis'in içindeki tüm lobuli testis'i de sarmı  olurlar.

Tunika albuginea ve septula testis'ler arasındaki boşluklarda uzun tüplerin oluşturduğu bez kümeleri bulunur. Sayıları 200-300 arasında değişen ve lobuli testis denilen bu bez kümelerinin büyüklükleri, bulundukları yere göre farklıdır. Testis'in ortasında bulunanlar daha büyük ve uzundurlar. Piramit şeklinde olan lobuli testis'lerin alt kısımları perifere, üst kısımları ise mediastinum testis'e yönelmiştir. Her bir lop uk, 1 ila 3 veya daha fazla küçük tüpler şeklindeki bezden oluşmuştur. Kıvrıntılı seyrinden dolayı bu tüplere tubuli seminiferi contorti denilmektedir. Bu tüpler k r bir uçla ba lar ve tüpler arasında gevşek ba  dokusu bulunur. Bu tüplerin, yaklaşık olarak sayısı 400-600 (bir testiste), uzunlukları 70 ila 80 cm, çapları da 0,1 ila 0,3 mm kadardır. Lop ukların mediastinum testis'e bakan tepe kısımlarında bu boruların seyri gittikçe d zle ir ve birbirleriyle kayna arak sayıları 20 ila 30 'a kadar iner. Tubuli seminiferi recti denilen tüplerin, çapları da genişleyerek 0,5 mm olurlar. Tubuli seminiferi recti'ler

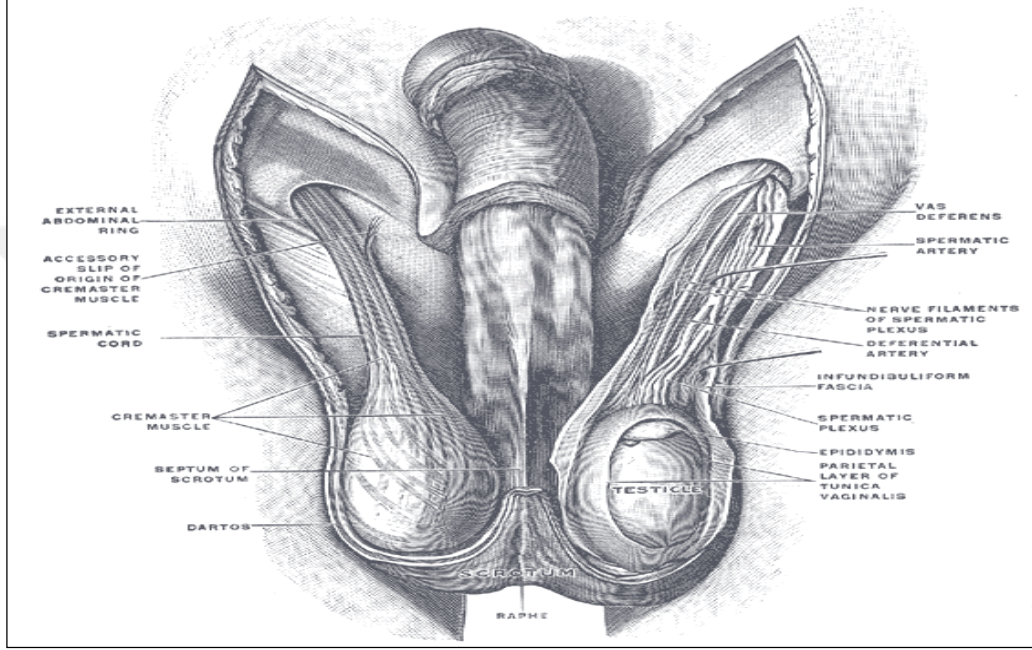
mediastinum testis'in fibröz dokusu içine girerek arkaya ve yukarıya doğru uzanırlar. Bu kanallar seyri esnasında birbirleriyle birleşerek rete testis (haller ağı) denilen ağı oluşturur. Ductuli efferentes testis'e dönüşen bu kanallar, testis'in arka kenarının üst kısmında, tunica albuginea'yi delerek dışarı çıkarlar. Dışarı çıkan kanallar önce düz olarak uzanır, daha sonra kalınlaşarak kıvrıntılı bir seyirle lopçukları oluşturur. Lobuli coni epididymidis denilen bu lopçukların yükseklikleri ortalama 1 cm dir. Bunların üst kısımları testis'e, alt kısımları ise epididymis'e bakarlar. Her bir lopçuk açıldığı zaman boyu 15-20 cm'yi bulan tek bir kanaldan oluştuğu görülür (Bazen 1 ila 3 veya daha fazla kanaldan oluşabilir). Ductuli efferentes testis'ler ductus epididymidis denilen kanala açılıp başlangıç kısmını oluşturur. Açıldığı zaman yaklaşık 6 m uzunluğunda olan ductus epididymidis, testis'in arka kenarında kümeler oluşturarak corpus epididymidis ve cauda epididymidis'i oluştururlar. Epididymis 'in kıvrımlarını gevşek bağ dokusu, birbirine bağlar. Epididymis'de, spermiumlar depo edilir ve olgunlaşmasının son safhasını tamamlarlar.

Arterleri: Testis ile epididymis, aorta'nin dalı olan a. testicularis'den beslenirler.

Venleri: Testis ile epididymis'in venleri, funiculus spermaticus'u ağ şeklinde saran plexus pampiniformis'i oluşturduktan sonra birbirleriyle birleşerek

v. Testicularis'i oluşturur. Daha sonra sol taraftaki v. renalis sinistra'ya açılırken sağ taraftaki ise v. cava inferior'a açılır.

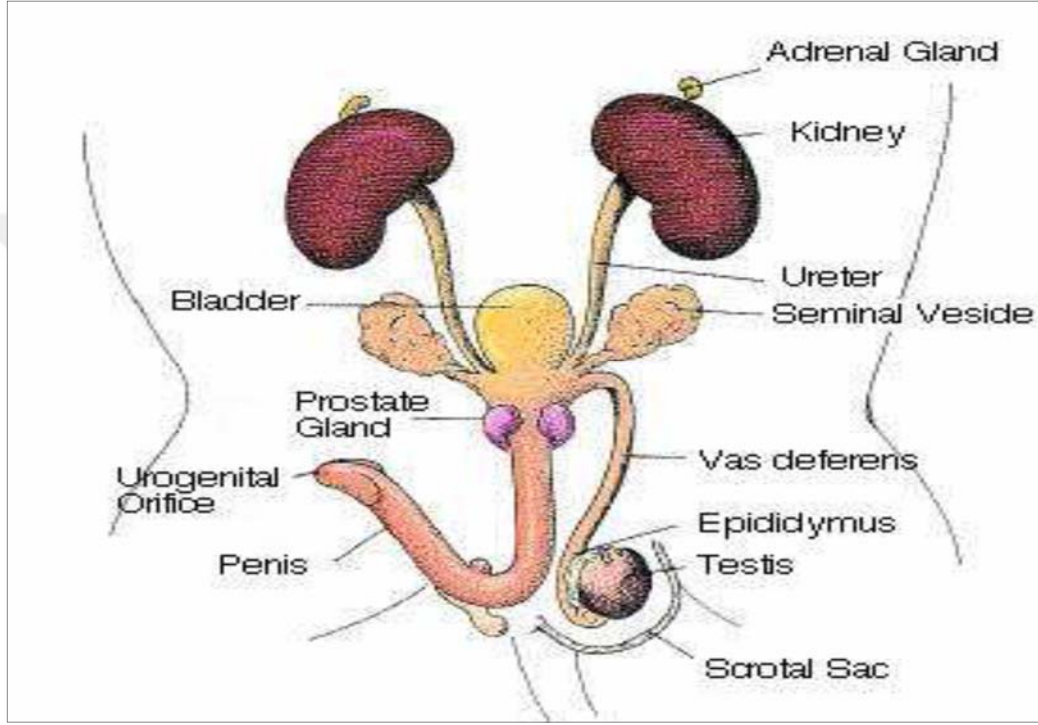
Lenfatik drenaj: Derin ve yüzeysel olmak üzere iki grupta toplanırlar (1).



Şekil 1. Testisin anatomik görünümü (2).

Rat ürogenital anatomisi insan ile benzer yapı ve organlardan oluşmaktadır. Rat sisteminin en önemli organı skrotal kese içine yerleşmiş testislerdir. Rat epididimi testisin ön yüzeyinde yumak şeklinde bulunan tüplü bir organdır. Epididimden itibaren devam eden tüp vas deferens adını alır ve üretraya açılır. Rat idrar torbasının her iki yanında bulunan kahverengi yumru şeklindeki bezler ise veziküla seminalis adını alır. İdrar torbasının altında üretrayı kısmen saran prostat ve veziküla seminalis semen olarak adlandırılan sıvının yapımında rol oynar (Şekil 2).

İnsan ve rat parankim dokusu birbirine benzer olup, septula testis denilen ince fibröz bölmelerle piramit şekilli lobüli testis'lere ayrılır (3).



Şekil 2: Rat testis anatomisi (4).

3.1.2. Testis Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti, fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmakla birlikte gonadların erkek veya dişi özellikleri ancak 7. haftadan sonra görülebilmektedir. Gonadlar başlangıçta, genital ya da gonadal şişkinlikler adı verilen kölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş

uzunlamasına şişlikler şeklinde oluşur. Gelişimin 6. haftasına kadar ki sürede germ hücreleri, genital kıvrımların içerisinde belirmez (5).

Primordiyal germ hücreleri, 4. haftanın başında umbilikal kese duvarında, allantoisin baş kısmına yakın endodermal hücreler arasında görülmektedir.

Primordiyal germ hücreleri embriyonun katlanması sırasında, arka barsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler. Altıncı haftada primordiyal germ hücreleri, mezenşim içersine girer ve gonadal kordonlara dahil olurlar (Şekil 3).

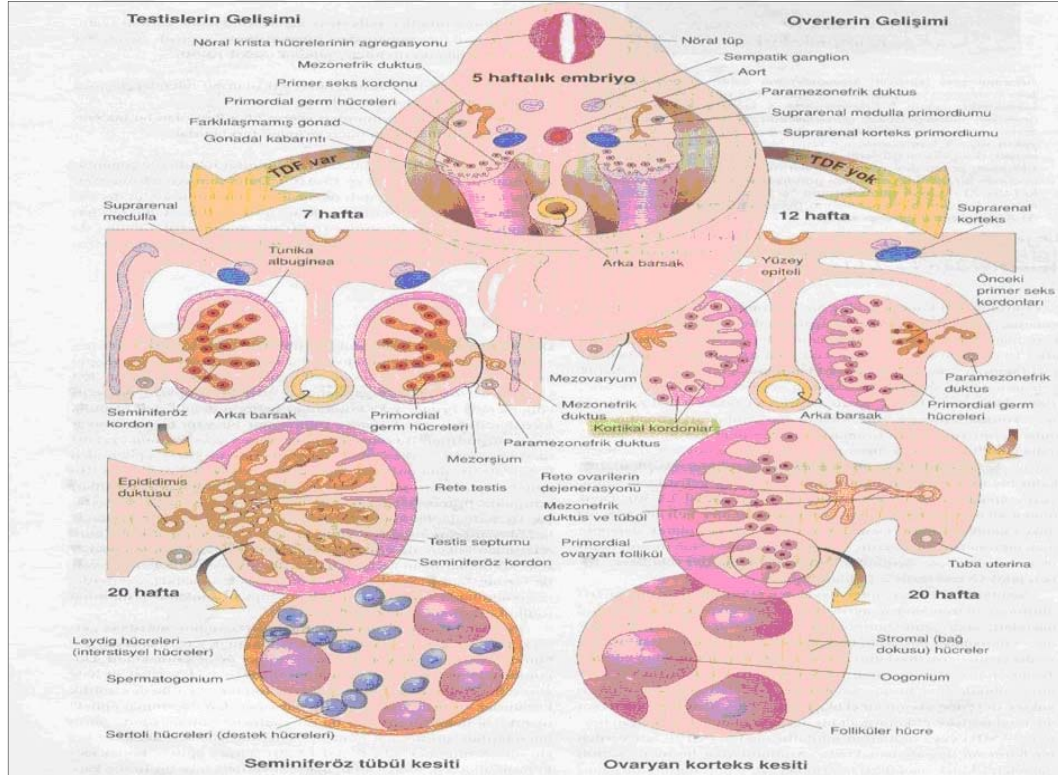
Testis belirleyici faktör (TBF) için SRY geni farklanmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar fonksiyonu görmektedir. Transkripsiyon faktörü SOX9'da testiküler farklılaşma için gereklidir. Testis belirleyici faktör, gonadal kordonları uyarmasıyla farklanmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına neden olur ve uyarılan kordonlar dallanarak birbirleriyle anastomoz yapar. Böylece rete testis oluşur.

Tunica albuginea'nın gelişimi, testis gelişimi için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis dejenere olan mezonefroza ayrılır. Seminiferöz kordonlar, seminiferöz tübüllere oradan tubuli rekti ve rete testise farklanırlar.

Seminiferöz tübüller, interstisyel alandaki hücreleri oluşturan mezenşim ile ayrılmışlardır. Sekizinci haftadan itibaren salgılanan Leydig hücreleri, androjenik hormonları –testosteron ve androstenedione, mezonefrik kanalların ve dış

genitallerin maskülin olarak farklanmasını uyarırlar. Sertoli hücreleri tarafından salgılanan Anti Müllerian Hormon (AMH) uterus ve tuba uterinalara farklanan paramezonefrik (müllerian) kanalların gelişimini baskılar. Bu hormonun salgılanması puberteye kadar devam eder. Seminiferöz tübüller, puberteye kadar lümen oluşturmaz ancak puberteden itibaren lümen gelişir.

Fetal testiste seminifer tübüllerde çoğunluğu sertoli hücreleri oluşur. Daha sonra fetal testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyini saran mezoteli oluşturur. Rete testis, ductuli efferentes'i oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam ederek ductus epididymis'i oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar (6).



Şekil 3: Primordiyal germ hücrelerinin göçü ve gonadal farklılık (7).

3.1.3. Testis Fizyolojisi

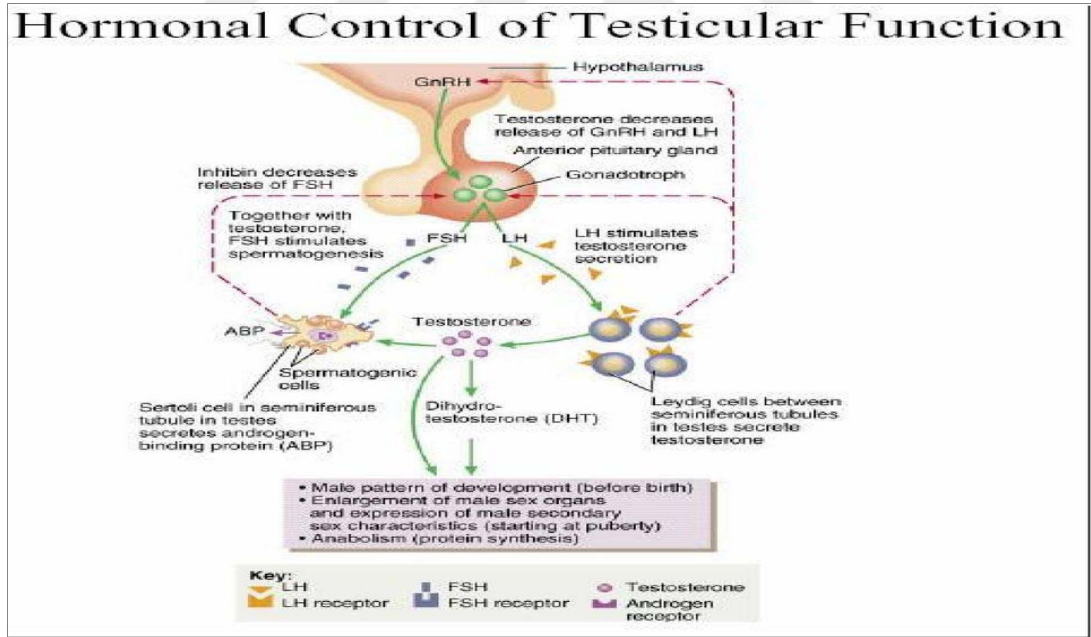
Seminifer tübüllerin i  yüzeylerinin iki yada    tabakasinda bulunan spermatogonyumlar, puberteden itibaren mitoz bölünmeler geçirerek sürekli olarak proliferasyon gösterir. Daha sonra spermatogonyumlar, değişik basamaklardan geçerek spermleri oluşturur. Bu olaya spermatogenez denir ve hormonların etkisinde gerçekleşir.

Erkek ve kadın her iki cinstede cinsel işlevlerin kontrolü, büyük oranda hipotalamustan salgılanan gonadotropin serbestleyici hormon (GnRH) ile sağlanır. Bu hormon  n hipofiz bezini uyarak gonadotropik hormon olan luteinizan hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) salgılanmasını sa lar. LH, testislerden testosteron salgılanmasını uyarır. FSH ise özellikle spermatogenezi başlatır.

Testosteron; testislerde intersitisyel alanda yerleşim gösteren leydig hücrelerinden salgılanan bir hormon olup, sperm yapımının ilk aşaması olan testisin germinal hücrelerinin büyümesi ve bölünmeleri için gereklidir. Testosteron salgılanması negatif geri bildirim ile ba lar. Salgılanan testosteron hormonu, bir süre sonra ön hipofiz bezini uyarak LH ve FSH üretimini baskılar, böylece LH ve FSH'nın miktarındaki azalmaya bağlı olarak testislerde üretilen testosteron hormonu miktarı da azaltılmış olur.

Folikül stimüle edici hormon, seminifer tübüllerde bulunan sertoli hücrelerine, özgül FSH reseptörleri aracılığıyla bağlanır ve bu bağlanma ile buradaki hücrelerin büyümesine ve spermatogenez için gerekli olan maddelerin üretilmesine neden olurlar.

Spermatogenezin hızlı artışı ile sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin hormonu, ön hipofiz bezini uyararak FSH salgısını baskırlar (Şekil 4). Spermatogenezin az olduğu durumda ise ön hipofiz bezinden FSH salgısı artar ve yeniden spermatogenez artmaya başlar (8).



Şekil 4: Spermatogenezin hormonal kontrolü (9).

3.1.4. Testis Histolojisi

3.1.4.1 İnterstisyel Doku

Testis dokusunun yaklaşık %25-30'luk kısmını oluşturur. İntertübüler bölgede leydig hücreleri, makrofajlar, mast hücreleri, lenfatikler, sinirler, kan damarları yer alır. Ergenlikte ortaya çıkan leydig hücreleri; merkez konumlu, tek, yuvarlak bir çekirdeğe sahip olup testosteron üretimi yapan hücrelerdir. Testosteron, kolesterolden süretilen, sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumlu erkeklik hormonudur. Testosteron lüteinizan hormon kontrolünde salgılanır. Plazmada testosteronun yaklaşık %65'i androjen bağlayıcı proteine, %33'ü ise albumine bağlı olarak bulunur (10).

3.1.4.2. Testisler

Testisler çift oluşumlu olup ekzokrin ve endokrin salgıları olan bir bez niteliğindedir. Ekzokrin ürünü cinsiyet hücresidir. Endokrin ürünü intertisyel leydig hücreleri tarafından yapılan testosteron'dur. Testis, 4,5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde ve 3 cm'de kalınlıkta bir organdır. Testis'i dıştan örten kalın bir fibröz örtü olan tunika albuginea organın içine bağdokusu bölmeleri gönderir ve lobulusları oluşturur. Testis lobulusu, 1-4 kıvrıntılı borucuklar taşır ve lobulus ucunda borucuk düzleşir tubuli rekti'yi oluşturur ve bunu rete testis izler (11).

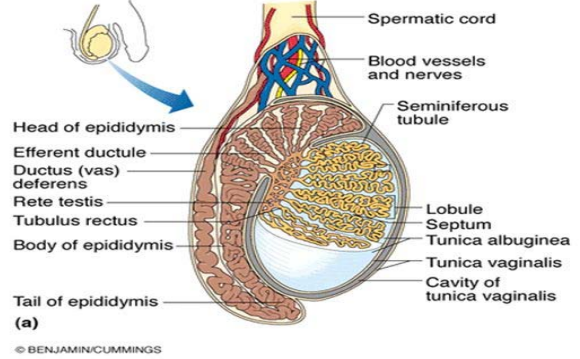
Testisin yapısı

Seminifer tübüller

- Sertoli hücreleri
- Germ hücreleri

İnterstisyel aralık

- Kan damarları
- Leydig hücreleri



12

Şekil 5: Testisin histolojik görünümü (12).

3.1.4.3. Seminifer Tübüller

İnsanda kama şeklinde yaklaşık 250 adet lobül oluşur. Lobüller içinde seminifer tübüller bulunur (13). Karmaşık yapıda olan seminifer tübüller çok katlı epitel ile döşelidir ve çapları yaklaşık olarak 150-250µm, boyları ise 30-70 cm'dir. Tübüller uçlara doğru lümeni daralarak düz tübüleri veya tubuli rekti 'de denilen kısa segmentler şeklinde uzanır. Rete testis, seminifer epitelyumun ürünlerini toplayan kanallar ağıdır ve bu kanallar ortalama 10-20 adet duktuli eferentes ile epididiminin baş tarafına bağlanır (14, 15). Seminifer tübül iki belirgin hücre popülasyonu içeren özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli

merkezi bir lümenden oluşur. Somatik sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler).

Seminifer tübülleri ayrı bir bağ dokusu, kasılabilir yassı miyoid hücrelerinden oluşan bir tabaka ve bir bazal membran çevreler. Ritmik kasılma aktivitelerinden sorumlu olan miyoid hücreler hareketsiz spermleri rete testise iletir. Spermler ileri hareketlilik özelliğini epididimal kanaldan geçtikten sonra kazanırlar (13, 14).

3.1.4.4.Spermatogenez

Spermatogenez; folikül stimulan hormon ile lüteinizan hormonunun kontrolündedir. Lüteinizan hormon, leydig hücrelerini uyarak testosteron üretimini sağlar. Folikül stimulan hormon ise sertoli hücrelerini uyarak siklik adenozin monofosfat üretimini hızlandırır. Bu sayede androjen bağlayıcı protein salgısı artar ve testosteronu bağlayarak seminifer tübül lümenine taşır.

Spermatogenez olayı testosteron ile uyarılırken, östrojen ya da progesteron hormonlarıyla inhibe edilir (16, 17).

Spermatogenez, spermin üretim aşamasıdır. Pubertede mitoz bölünmeler geçirerek çoğalmaya başlar. Bu aşamada hücreler iki yol izler. A tipi spermatogoniumlar kök hücre olarak bölünmeye başlar ve yeni hücre oluşur. B tipi spermatogoniumlar farklılaşarak primer spermatositlere dönüşür. Spermatogenezin en büyük hücreleri olan primer spermatositler birinci mayoz

bölünmeden sonra sekonder spermatosit adını alır. İkinci mayoz bölünme sonucunda 23 kromozom içeren spermatit adını alan hücre oluşur ve spermatogenez sonlanır. Spermatogonya kök hücrelerin erkek fertilitesinde önemli etkileye sahip olup sessiz hücrelerdir ve kanser terapisine, radyasyon ışınlanmasına oldukça dirençlidirler. Spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler kanser terapisine ve radyasyon ışınlanmasına duyarlıdır. Kök hücreleri Radyoterapi veya antikanser kemoterapisinin sonlandırılmasının ardından spermatogenik süreci yeniden oluşturabilirler (15).

3.1.4.5. Spermiyogenez

Spermiyogenez, sperm oluşumunun son aşamasıdır. Bu aşamada hücre bölünmesi olmaz. Sperm olgunlaşması için gerekli olan karmaşık bir süreçtir. Spermatitlerden farklılaşan spermier seminifer tübül lümenine bırakılır (14).

3.1.4.6. Sertoli hücreleri

Seminifer tübüllerin çoğunluğunu oluşturan sertoli hücreleri puberteden sonra yaklaşık %10'unu oluşturur. Seminifer hücreler bazal laminadan, lümenine doğru uzanan prizmatik hücrelerdir ve tübüller arası boşluk ve seminifer tübül lümeni arasında köprü hücreler olarak görev yaparlar (13). Testislerin işlevi açısından sertoli hücreleri çok önemli bir yere sahiptir. Sertoli hücrelerin alt

kısımları bazal laminaya tutunur, üst kısımları çoğunlukla seminifer tübülün lümenine uzanır. Spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda yan uzantı nedeniyle sertoli hücrelerinin sınırları ışık mikroskopunda iyi belirlenmez. Yan yana bulunan sertoli hücreleri, hücrenin alt yan yüzlerinde engelleyici sıkı bağlantılarla birbirlerine tutunarak kan-testis bariyerini oluştururlar. Spermatogonyumlar, bu bariyerin altında yer alan bazal bölmede yerleşmiştir. Spermatagenez sırasında, spermatogonyumların bölünmesi sonucu oluşan bazı hücreler bu bağlantı noktalarından bir şekilde geçerek bariyerin üzerinde yer alan adluminal bölmeye ulaşırlar. Bölünme sonucu bariyerin üzerinde oluşan spermatositler ve spermatidler sertoli hücrelerinin üst ve yan kenarlarındaki derin girintilere yerleşmiştir (14).

Sertoli Hücrelerinin Fonksiyonları;

- Gelişmekte olan spermatogenik hücreleri beslemek, korumak ve desteklemek.
- Spermiyogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan artık cisimcikleri fagositoz ile elimine etmek.
- Olgun spermatidlerin kasılmalarla, spermiyasyon adı verilen bir süreç, seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak.
- Seminifer tübül lümenine protein ve iyondan zengin bir sıvı salgılamak.

Sertoli hücreleri folikül stimüle edici hormon (FSH) uyarımına cevap verirler. FSH androjen-bağlayıcı protein (ABP) sentezini ve sekresyonunu düzenler. ABP testosteron ve dihidrotestosteron androjenlerine yüksek bağlanma afinitesinde olan bir salgısal proteindir.

Sertoli hücreleri inhibin ve aktivin alt ünitelerini salgırlar. İnhibin FSH üzerine negatif feedback gösterirken, aktivin ise FSH salınımı üzerine pozitif feedback bir etki gösterir (13,15).

3.1.4.7. Kan testis bariyeri

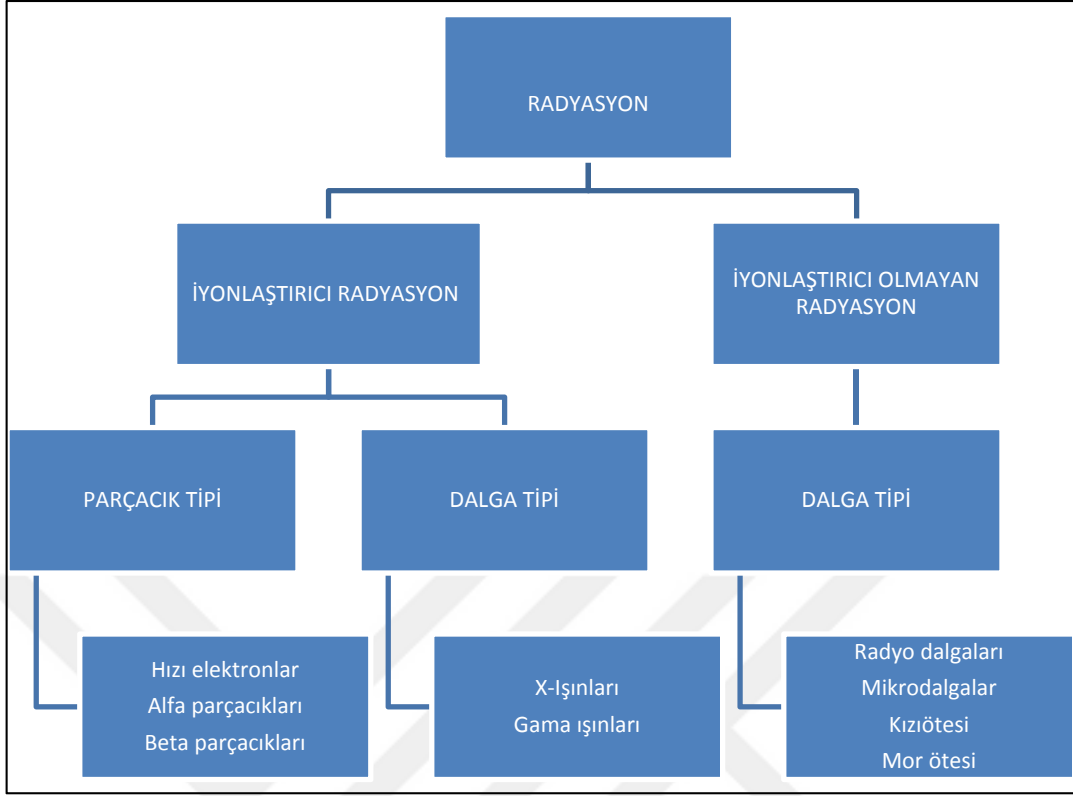
Komşu sertoli hücrelerinin sitoplazmaları, tıkayıcı sıkı bağlantılar ile birbirlerine bağlanır ve her bir seminifer tübülü bazal kompartman ve adlüminal kompartmana ayıran kan-testis bariyerini oluşturur. Bu bariyer sayesinde spermatogenez ile oluşan bu spermiler, plazma proteinleri ile kan kaynaklı antikorlardan uzaklaştırılır. Spermatogenik hücreler, vücut tarafından yabancı madde olarak tanınır ve buna karşı immün yanıt oluşturulur. Bu şekilde kan testis bariyeri, kişinin kendi spermine karşı otoimmün yanıt oluşturarak antikor oluşumunu engeller. Sonuçta spermatogenezin bozularak sterilitenin ortaya çıkışı engellenmiş olur (18).

3.1.4.8. Leydig Hücreleri

Seminifer tübüllerin arasındaki bölgelerde yer alan leydig hücreleri testosteron salgılayan önemli hücrelerdendir. Hücre yüzeyleri mikrovillus bakımından oldukça zengin bir yapıya sahiptir. Sahip olduğu organel ve inklüzyonların çoğu testosteron sentezini ve salgısını düzenlerler. Leydig hücreleri tarafından sentezlenen testosteron mikrovillüsler tarafından yüzey alanı artırılmış hücre zarından difüzyon ile geçerek hızla dolaşımda yer alan steroid bağlayıcı proteinlere bağlanırlar (13).

3.2. RADYASYON

Radyasyon, yüksek hızdaki partiküllerin ve elektromanyetik dalgaların enerjisi olarak bilinir. (20). İyonize radyasyon (X- ışınları, gama, alfa ve beta ışınları, kozmik ışınlar ve nötronlar), iyonize olmayan radyasyon (UV, kızılötesi, radyo dalgaları, mikrodalgalar) şekilde tanımlanır (21) (Şekil 6).



Şekil 6: Radyasyon (19).

3.2.1. İyonize radyasyon

İyonlaşma, radyasyon ışınlamasına maruz kalan madde de veya tüm canlıların vücudunda meydana gelebilir (22).

Kütleli yapıya sahip olan partiküller radyasyon ve elektromanyetik radyasyon olmak üzere iki kısma ayrılır. Alfa ve beta partikülleri, proton, elektron ve nötronlar partiküler iyonize radyasyonu oluşturur. X ve γ ışınları ise, elektromanyetik radyasyonu oluşturur (20, 23).

Radyasyon kaynakları:

- ALFA: Kağıt veya cildimiz tarafından absorbe edilir.

- BETA: Metal İnce bir tabaka tarafından absorbe edilir.

- GAMA: Beton ve kurşun gibi yoğun malzemeler tarafından absorbe edilir.

- NÖTRON: Parafin, su, beton gibi hidrojen zengin ortamlarda absorbe edilir. İyonize radyasyonlar canlıları biyolojik olarak etkilemesi için sahip oldukları enerjinin, hücre ve dokular tarafından emilmesi gerekir.

İyonlaştırıcı radyasyonların canlıda oluşturduğu etkileri üç kademe oluşur. İlk kademesi olan fiziksel kademe, iyonize radyasyon enerjisinin canlı dokuya geçişi sonrasında, dokunun sahip olduğu atom ve moleküllerde iyonlaşma ve uyarılma ile başlar. İkinci kademe olan kimyasal kademe ise, hasara uğramış atom ve moleküller, diğer hücre yapısı ile etkileşime girerek serbest radikalleri oluşturur. Radyasyon ışınlaması sonucu oluşan bu tür değişiklikler, son kademe olan biyolojik kademeyi meydana getirir. Çeşitli hasarlara neden olan enzimatik reaksiyonlar bu kademe meydana gelir. İyonize radyasyon, hücre içi moleküllerde genetik materyal olan kromozomlarda hasar oluştururlar. Tamir edilemeyen genetik hasarlar sonucu, hücre ölümünü başlatarak metabolik değişiklikleri ortaya çıkarır. Bu etkisi nedeniyle iyonize radyasyonlar, kanser hastalığının tedavisinde kullanılır (20, 24).

3.2.2. Radyasyon birimleri

1-Aktivite (A):

2-Işınlama Dozu (J):

3-Soğrulma (Absorblama) Doz Birimi (D): İyonlaşma dozu sadece X ve

Gamma ışınlarının havadan geçerken soğrulan dozu ölçmek için tanımlanmaktadır. Yüksek enerjili ışınlamaların bir maddeden geçerken soğrulan enerjisinin ölçümün yetersiz kalmıştır. Yetersizlik sonucunda bağımsız yeni bir birime (Gray) ihtiyaç duyulmuştur. 1 Gy, ışınlanan maddenin 1 kg' ına 1 Joule'lük enerji veren radyasyonu tanımlamaktadır. Eski birim Rad (rd) ise ışınlanan maddenin 1 kg' ına 10^{-2} Joule'lük enerji veren radyasyon miktarıdır. $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J / kg} = 10^{-2} \text{ rad}$

4-Doz Eşdeğer birimi (H): (25).

3.2.3. İyonlaştırıcı radyasyonun tarihi süreci

Radyasyonla tanışmamız 1895 yıllarında Wilhelm Conrad Roentgen'in kendi adıyla anılan ışınları keşfetmesiyle başlamıştır ancak zararları çok sonraları ortaya çıkmıştır. Antoine Henri Becquerel 1896 yılında ise uranyum tuzlarının da benzer özellik gösteren ışınlar olduğunu buldu ve bu olaya radyoaktiflik adını verdi. Radyoaktif ışınlarının varlıkları 1898 yılında kanıtlamıştır. İki Nobel ödüllü ilk bilim insanı olan Marie Sklodowska Curie, radyumun da bu ışınlar gibi

insanlar üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilecek eği anlaşıldı. New Jersey’de 1920’li tarihlerde fosforlu saat imalatında çalışan işçiler, boyamada kullandıkları fırçaları her radyumlu boyaya batırdıktan sonra, fırçaların uçlarını dudaklarıyla sivriltilip mineleri boyuyorlardı ve böylece her defasında bir miktar radyumu almaları i radyasyonla karşı karşıya oldukları anlamına geliyordu. Bir süre sonra i ışınlanma sonucunda kemik iliği hasarı gelişmiş ve anemiden ölümler meydana gelmiştir. (26).

3.2.4. Radyasyonun testis dokusu üzerinde etkileri

Testisler, antikanser ajanlar ve radyasyon gibi gonadotoksiklere karşı oldukça hassastırlar (27). Radyasyon insanlarda uzun süreli maruziyeti sonucu azospermiye neden olur (28). Radyasyonun, erkek infertilitesi üzerindeki etkilerini üç şekilde ortaya çıkar.

Bunlar; radyasyon kazalarına maruziyet, deneysel çalışmalar ve radyoterapi ışınlama durumlarıdır (29).

Testisler; seminifer tübüller ve leydig hücreleri ile interstisyel alandan oluşmaktadır. Seminifer tübüller içerisinde ise germinal hücreler ile sertoli hücreleri yer alır. Germinal hücreler aktif şekilde bölünen farklılaşmış spermatogonyumlar olup sitotoksik ajanlara oldukça hassastırlar. Buna karşın

spermatit ve spermier ise oldukça drenlidirler. leydig ve sertoli hücreleri ise en drenli hücreler olup, sitotoksik terapi sırasında hayatta kalırlar. (20,30).

İnsan ve ratlarda radyasyona ışınlaması sonucu spermatogonyum hasarı, olgunlaşma- tüketim proesine yol açar (31-33). İnsan ve ratlarda, radyasyon ışınlaması sonrası yaşayan tip A spermatogonyumların gelişimini bozarak, spermatogenezin inhibe edilmesine ve hiç spermin olmamasına sebep olduğunu gösteren deliller mevcuttur(27). Testislerde oluşan hasarlar ve onarım dereceleri, uygulanan doza bağlıdır. Düşük dozlarda onarım olsada, yüksek dozlarda onarım olmamaktadır. Testislerde radyasyon ışınlaması sonrasında oluşan negatif etki kısırlığa sebep olmaktadır. 5-6 Gy'lik doz aralığı sürekli, 2,5 Gy'lik doz aralığı ise ortalama bir yıllık geii kısırlığa neden olduğu bilinmektedir.

Radyasyon ışınlamasının sperm hareketlerinin azaltarak yumurtayı dölleme yetenegini de azaldığı bildirilmiş (20, 32, 34).

3.2.5. Radyasyon hasarında serbest radikallerin rolü

Radyasyon ışınlamasının ikinci kademesi olan kimyasal kademedede görülen serbest radikaller, iyonların veya uyarılmış moleküllerin ayrılmaları sonucunda oluşur (20, 35).

Canlılar yaklaşık % 70-90 oranında su içerir. ışınlanmadan sonra radyasyon enerjisi su molekülleri tarafından emilir ve sonucunda pozitif yüklü bir

iyon ve serbest bir elektron oluşur. Olayı izleyen sekonder reaksiyonlar ile serbest radikaller açığa çıkar. Kendi aralarında oluşturdıkları tepkime ile toksik molekülleri oluşur. İndirek etkisi Hidroliz sonucu ortaya çıkan serbest radikaller ile oluşan radyasyon etkisidir, direkt etkisini ise radyasyon enerjisinin su molekülleri yerine biyolojik moleküllere geçişi sonucunda biyoradikallerin oluşma söz konusudur. Canlı vücudunun büyük bir kısmı su içerdiğinden radyasyon hasarlarının büyük oranda indirekt yoldan meydana geldiği kabul edilir. X ve γ radyasyonların etkileri indirekt yolla meydana gelmektedir (20, 36-39).

3.3. Serbest radikaller

Atom bir çekirdek ve çevresinde bulunan değişik sayıda elektronlardan oluşmaktadır. Bu elektronlar, orbital adı verilen yörüngelerde hareket etmektedir. Her orbitalde yerleşik iki elektron, kendi eksenini etrafında birbirine zıt yönde dönmektedirler.

Oksijen molekülünün atom numarası 8 elektron sayısını vermektedir. Bu molekülün aynı yöne dönen iki elektrona sahip 2p orbitali önem taşımaktadır. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron bir orbitalden bir diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönde döndüğünde singlet oksijen oluşmaktadır. Orbitallerden birine veya ikisine ters dönüşlü bir veya ters dönüşlü iki elektron

yerleştirilmesi ile radikal elde edilmektedir. Doğal oksijen molekülünde çeşitli oksidan molekülleri meydana gelmektedir (40).

Kimyasal bileşikler, elementler aralarında oluşturdukları kimyasal bağ ile meydana gelir. Kimyasal bağlar negatif yüklü elektronlarla çevrelenmiş ve bu elektronlara kararlılık kazandırır. Eğer elektron eşlenmiş ise kararlı eşlenmemiş ise molekül kararsız duruma geçer. Bir ya da daha fazla sayıda eşlenmemiş elektrona sahip element veya bileşiklere “serbest radikaller” denir. Serbest radikallerdeki eşitlenmemiş elektronlar kararlı duruma geçmek için kararlı bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürür. Serbest radikaller son derece reaktif moleküller olup oksidatif strese sebep veren maddelerdir (41). Oksidatif stres hücrede lipitlere, proteinlere, enzimlere, karbonhidratlara ve DNA’ya zarar verir. DNA moleküllerine, enzimlere ve proteinlere bağlanarak proteinlerin parçalanması sonucunda hücre büyük zarar görür (42).

3.3.1. Artmış Reaktif Oksijen Partiküllerinin Zararları

- Hücre membranı, organellerdeki lipid ve protein yapısını bozarlar,
- Hücre içindeki faydalı enzimleri etkisizleştirirler,
- DNA'yı tahrip ederler,
- Mitokondrilerde bulunan oksijenli solunumu bozarlar,

- Litik enzimleri aktive ederler,
- Hücrenin potasyum kaybını arttırırlar,
- Trombosit agregasyonunu arttırırlar,
- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar,
- Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar (43).

Hastalıkların oluşumunda ROS karşı savunma zayıf olursa oksidatif hasarın artışıyla hücrede tahribatlar meydana gelir. Bu durumda dışarıdan alınan bu antioksidanlar oksidatif stresin oluşturduğu hasarları azaltmakta kullanılmaktadır. Epigallocatechin-3-o-gallate (EGCG), likopen, quersetin, genistein, ellagik asit, ubikinon ve indole-3-karbinol, askorbik asit, vitamin E önemli antioksidanlar olarak bilinir. Bu maddeler hastalıkların engellenmesi için de kullanılmaktadır (44).

Serbest radikaller başlıca üç şekilde oluşabilmektedir. Bir molekülü oluşturan kovalent bağın homolitik kopması sonucu eşlenmiş elektronlardan herbirinin ayrı parçada kalması ile meydana gelebilmektedir. Bir molekülün elektron kaybetmesi sonucu oluşabilmektedir. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile elde edilebilmektedir (46).

Yaşam için gerekli olan oksijen molekülü, aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin oluşmasına da neden olmaktadır. Metabolizma sonrası oluşan yan ürünler

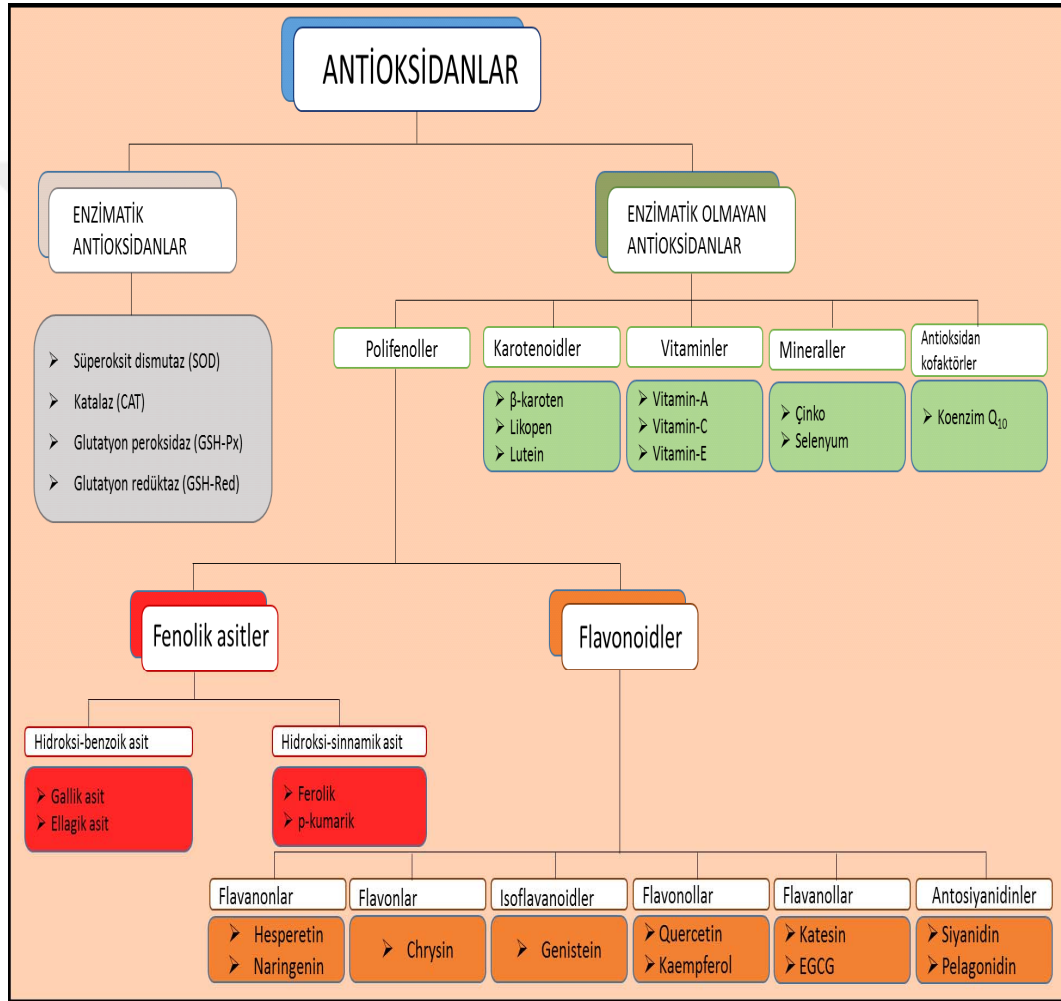
süperoksit anyonları (O_2^- , $O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) gibi mutajenlerin oluşmasına neden olur. Yüksek miktardaki ROS'lar; membran proteinleri, membran lipitleri, mitokondriyal ve nükleer DNA ile etkileşerek sperm üretimi ve kalitesini olumsuz yönde etkiler (45, 46).

3.4. Apoptozis

19. yüzyılın ortalarından itibaren çok hücreli organizmalarda özellikle embriyogenez gibi çok önemli fizyolojik olayların temelinde apoptozis adı verilen hücre ölümünün var olduğu bilinmiştir (47, 48). Yunanca'dan köken alan apoptozis terimi kelime anlamı itibariyle dökülme ya da düşme anlamına gelmektedir. Organizmanın yaşam döngüsü devamı için bu süreç oldukça gereklidir. Apoptozis; patolojik ve fizyolojik şartlarda dokulardaki hücre popülasyonlarının korunmasında, çok hücreli organizmaların gelişiminde aktif olarak rol oynar (49). Çevresel kimyasalların çoğu hormonal olarak aktif olup, doğrudan endokrin sistemi etkileyerek üreme sistemi üzerine olumsuz etkiler yapar (50,51). Spermatogenez esnasında oluşan ROS'lar, testislerdeki apoptozisin düzenlenmesinde yer alırlar (52). Testiküler apoptozis, spermatogenez süresince devamlı olarak gerçekleşir. Bu düzenleyici süreçte hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yollar rol oynar (53,54).

3.5. Antioksidanlar

Antioksidanlar, hücreleri serbest radikaller olarak bilinen stabil olmayan moleküllere karşı koruyan maddelerdir (Şekil 7). Serbest radikallerle etkileşip onları stabilize hale getirerek neden olabilecekleri hasarları engeller (55).



Şekil 7: Antioksidanların sınıflandırılması (56).

Oksidasyon tepkimeleri yaşam için elzem olsa da aynı zamanda hücreler açısından oldukça tehlikelidir. Bu nedenle canlılar farklı antioksidanlardan oluşan oldukça kompleks antioksidan koruma sistemlerine sahiptir. Antioksidanların

seviyesindeki düşüş ya da antioksidan enzimlerin aktivitesinin baskılanması hücrel hasara ve hücre ölümüne yol açan oksidatif stres oluşumuna neden olur (57).

Antioksidanlar Gutteridge ve Halliwell'in tanımına göre 3 kategoriye ayrılır: primer antioksidanlar, sekonder antioksidanlar ve tersiyer antioksidanlar (58).

Antioksidanlar iki büyük grupta sınıflandırılır. Bunlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardır. Bu antioksidanların bazıları metabolizmada sentezlenen maddelerdir. Bunlar enzimler ve enzim kofaktörlerdir. Enzimatik olmayan antioksidanların kaynağı ise diyetlerdir. Diyet antioksidantları çeşitli sınıflara ayrılır. Bunlar içerisinde en önemli olanlar polifenollardır. Polifenollar genel olarak fenolik asitler ve flavonoidler olarak ayrılır. Diğer diyet antioksidanları içerisinde de vitaminler, karotenoidler, organosülfüral bileşikler ve minareler bulunmaktadır.

Enzimatik antioksidanlar doğrudan ya da dolaylı yoldan ROS'lara karşı savunmaya katkıda bulunurlar. CAT, SOD, GSH-Px ve GSH-Rd bunlara örnektir. Non-enzimatik antioksidanlardan GSH, vitamin E ve vitamin C, ROS ve RNS'leri süpürücü; ürik asit ise plazma, albumin, N-asetilsistein ve melatonindeki peroksinitritleri süpürücü olarak işlev görür (59, 60).

3.6. Fenolik Fitokimyasallar

Fenolik bileşenler ya da diğer bir deyişle fenolik fitokimyasallar bitki orijinli sekonder metabolitler olup, doğadaki besin kaynaklarının en bol bulunan çeşitlerinden biridir. Bu fenolik metabolitler, bitkileri biyolojik ve çevresel strese karşı koruyarak işlev görürler. Ayrıca bakteriyel veya fungal enfeksiyon gibi patojenik olaylara cevaben de sentezlenirler (61, 62).

Ellajik asit (EA) gibi fitokimyasallar özellikle sebze ve meyvelerin önemli bileşenleri olup, sağlık üzerine yararlı etkilerini kanser, karaciğer hastalıkları ve vasküler hastalıklar gibi oksidasyon ile ilişkili hastalıklar üzerine gösterirler. Fitokimyasalların biyolojik fonksiyonlarını hem doğrudan bir antioksidan gibi davranarak hem de hücrel antioksidan enzim sistemlerini uyararak gösterdikleri ve bu şekilde oksidatif stresin negatif etkilerine karşı mücadele ettikleri düşünülmektedir. Yapılarındaki fenolik halka ve hidroksil bileşenlerinden dolayı efektif antioksidanlar gibi fonksiyon görerek serbest elektronları yok edebilirler.

Elde edilen kanıtlar biyolojik sistemlerde patojenitenin uyarılmasından serbest radikal kaynaklı oksidatif stresin önemli derecede sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Hücrel sistemlerde oksidatif stres için akla gelen ilk mekanizma reaktif oksijen türlerinin oluşumudur. Hücrelerde bu reaktif oksijen türlerinin hızlıca yok edilmesini sağlayan birçok antioksidan sistemlerinin olduğu

bilinmektedir. Endojen antioksidan enzimler, GSH ve diğer doku tiyolleri gibi çok sayıda endojen antioksidan faktörler, hem proteinleri, koenzim Q, bilirubin ve üratlar, çeşitli besin içerikleri (ilk olarak vitaminler ve fenolik fitokimyasallar) reaktif oksijen türlerine karşı biyolojik koruma sistemlerini oluşturur (63, 64).

Fenolik fitokimyasalların oksidatif stres kaynaklı hastalıklar üzerindeki etkileri tam olarak aydınlatılmamıştır. Ancak bu hastalıklar üzerindeki pozitif etkilerini GSH, askorbat, SOD, CAT kaynaklı antioksidan koruma cevabını güçlendirerek gerçekleştirdikleri düşünülmektedir.

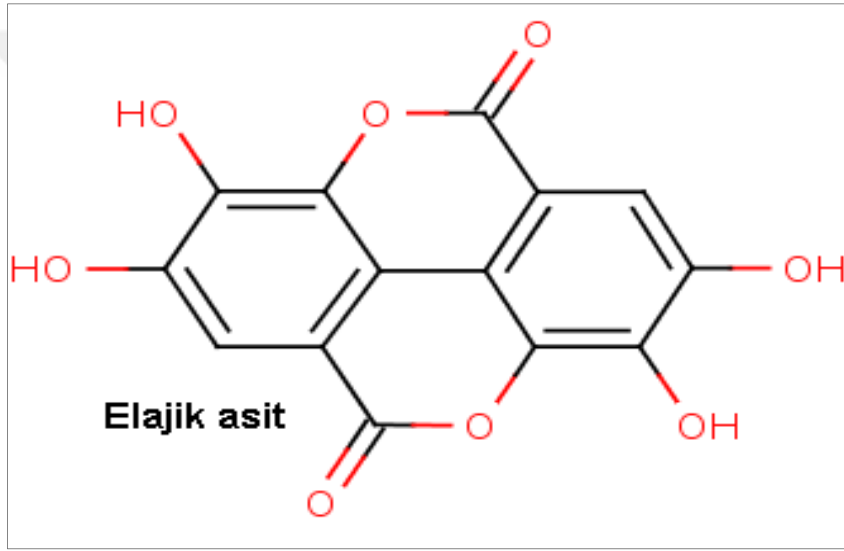
Epidemiyolojik veriler sebze ve meyveden zengin diyetle beslenen populasyonlarda kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi kronik hastalıkların insidansının daha düşük olduğunu ortaya koymaktadır (65, 66).

3.6.1. Ellajik Asit

Ellajik asit (2,3,7,8-tetrahydroxy[1]-benzopyranol[5,4,3-cde]benzopyran-5,10-dione) başta kırmızı meyveler olmak üzere çeşitli bitki türlerinde bulunan fenolik bir lakton bileşiğidir (Şekil 8). 1831 yılında Braconnot tarafından keşfedilmiştir (67). Moleküler ağırlığı $302.197 \text{ g mol}^{-1}$ olup, oldukça termostabil bir moleküldür (69). Bitki hücre duvarlarının ve hücre membranlarının yapısal bir bileşeni olarak “ellajitanninler” de denilen suda çözünabilir tanninler biçiminde bulunur.

Ellajitanninler glukozun ellajik asitli esterleridir. Hidroliz oldukları zaman EA'yı oluştururlar. Nar, çilek, ahududu, kıızılcık ve üzümde EA konsantrasyonu oldukça yüksektir (70, 71).

Fenolik bileşiklerin multiple hidroksil gruplarından özellikle 3',4'-o-dihidroksi grupları LDL oksidasyonuna karşı en etkili antoksidanlar olarak tespit edilmiştir (72).



Şekil 8: Ellajik asidin kimyasal yapısı (68).

3.6.2 Ellajik asidin Antioksidatif Etkisi

Ellajik asit reaktif oksijen türlerine karşı süpürücü aktivite gösterir. Yapısındaki fonksiyonel dört tane hidroksil ve iki tane lakton grupları sayesinde $O_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot}$, H_2O_2 ve $ONOO^{\cdot}$ radikallerini ortadan kaldırabilir (73, 74). Ayrıca GSH sentaz, glutamat-sistein ligaz katalitik alt ünitesi ve glutamat-sistein ligaz

düzenleyici alt ünitesinin regülasyonu ile GSH seviyesini artırır. Bunu yanı sıra SOD, CAT, GSH-Px ve GSH-S-transferaz enzimlerinin oluşumlarını indükler (75, 76). Bu sayede çeşitli patolojik durumların ana sebeplerinden olan oksidatif strese karşı antioksidan cevabı güçlendirerek hücrel koruma sağlar.

Ellagik asidin koruma mekanizması DNA'ya bağlandığı yerlerde, kanserojenin DNA'ya bağlanma süresince kanserojen metabolitlerinin aktivitesini durdurarak kanserojen olayında kiritik bir önem taşır. Ayrıca Ellagik asit ve quersetin'le yapılan çalışmada lipid peroksidasyonlarında mikrosomal proteinlerine bağlanan bu fenolik maddelerin serbest radikallere karşı savunma yaptığı belirtilmiştir (77).

Bu çalışmada, radyasyonun erkek üreme sağlığı üzerine olan zararlı etkileri ve ellajik asitin muhtemel koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 06/05/2015 tarih ve 2015/08 sayılı 94 no'lu kararı gereğince etik yönden uygun bulunup, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM), Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarları ve Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı. Çalışma bütçesinin tamamı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)'nin TF. 16.07 proje no'lu kararı gereğince karşılandı.

4.1. Deney Hayvanları Beslenmesi ve Barındırılması

Çalışmada kullanılan ve ağırlıkları ortalama 180-200 gr olan 30 adet 8 haftalık erişkin Sprague-Dawley cinsi erkek ratlar, FÜDAM biriminden temin edildi. Ratlar deney süresince bulundukları ortalama sıcaklığı 21 ± 1 arasında sabit tutularak 12 saat (07:00-19:00) aydınlık, 12 saat (19:00-07:00) karanlık foto periyodunda barındırıldı. Ratlar Elazığ Yem Sanayi A.Ş.Yem Fabrikası'nda pelet şeklinde özel olarak hazırlanmış rat yemleriyle beslendi. Yemlerin bileşimi tablo 1'de gösterildi. Tüm hayvanlara standart rat yemi verilerek ad bilitum su ve

yiyecek alımları sağlandı. Yemleri çelik kaplarda, günlük çeşme suyu ise paslanmaz çelik bilyeli cam biberonlarda verilmiştir. Ratların deney süresince bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Tablo 1: Ratlara verilen pelet yemin bileşimi.

Madde adı (%)	Miktarı
Buğday	15
Mısır	10
Arpa	27
Kepek	8
Soya	29,4
Balık unu	8
Tuz	0,6
Kavimix VM23-Z	0,2
Methionin*	0,2
DCP**	1,6

* 1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0,006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth., 0,32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca bulunur.

** % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur.

4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada kullanılan 30 adet rat, tartımları yapıldıktan sonra her grupta 6 adet rat olacak şekilde rastgele 5 gruba ayrıldı.

Kontrol grubu (Grup I): Bu gruptaki ratlara herhangi bir işlem uygulanmadı.

Radyasyon grubu (Grup II): Bu gruptaki ratlara çalışmanın ilk günde hastane ortamında deneyimli personeller tarafından tek doz 8 Gy'lık radyasyon scrotal bölgeye uygulandı.

Radyasyon + EA grubu (Grup III): Çalışmanın ilk günü radyasyon alan bu gruptaki ratlara, ilaveten ikinci gününden itibaren gün aşırı 7 hafta boyunca EA (A15722 Lot: 10176718, Ellagic acid hydrate, Alfa Aesar, Germany) 12 mg/kg dozunda mısırözü yağında çözdürölmüş şekilde oral gavaj yoluyla verildi.

EA grubu (Grup IV) : Bu gruptaki ratlara, çalışmanın ikinci gününden itibaren gün aşırı 12 mg/kg dozunda mısırözü yağında çözdürölmüş EA oral gavaj yoluyla verildi.

Mısırözü yağı grubu (Grup V): Bu gruptaki ratlara ise ellajik asidi çözmede kullanılan miktarda mısırözü yağı gün aşırı oral gavaj yoluyla verildi.

Deney süresi boyunca tüm ratlar, her hafta düzenli olarak tartılarak olası kilo değişimleri takip edildi. Ayrıca FÜDAM'daki deney hayvanları ünitesinde

bulunan diğ er çalışmalara ait deney hayvanlarının radyasyondan etkilenmemesi için radyasyon alımından sonraki 1 gün ayrı bir odada barındırıldılar ve radyasyon uygulanmasında kullanılan kafesler değiştirildi.

4.3. Deney düzeneği ve radyasyonun verilmesi

Grup IV (radyasyon + EA) ve grup V (radyasyon)'deki ratlara ayrı bir kafes ayarlandı ve radyasyon verilecek birime o şekilde taşındı. Tüm ratlar eter anestezi altında 30x20 ebatlarında hazırlanan karton mukavvaya yerleştirildi ve radyasyon verilmek üzere hazır hale getirildi. Uyutulan ratlar hastane ortamında deneyimli personeller ile scrotum bölgeye hedef alınacak şekilde tek doz 8 Gy'lık radyasyon verildi. İşlem sonrası FÜBAP'a getirilen ratlar ayrı bir odaya alındı ve kafesleri değiştirildi.

4.4. Doku  rneklerinin Alınması

Deney süresi sonunda tüm gruptaki ratlar, ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) anestezi altında dekapite edildi ve ardından ratların testis dokuları çıkarılarak diğ er dokulardan arındırıldı. Bu dokular histopatolojik ve histokimyasal çalışmalar için Bouin's solüsyonuna konuldu. Ayrıca ratlardan

biyokimyasal analizler için doku örneğide alındı. Testis dokusu örnekleri daha sonra çalışılmak üzere -20 ⁰C’ de saklandı.

4.5. Histolojik Değerlendirmeler

Testis dokuları Bouin’s solüsyonunda yaklaşık 8 saat boyunca tespit edildikten sonra sırasıyla % 50’lik, % 60’lık ve % 70’lik etil alkol solüsyonlarında yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Dehidratasyondan sonra ksilolde parlatılıp parafine (P3558-1kg Sigma-Aldrich Paraplast Embedding Media, U.S.A) gömüldü. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığındaki kesitler rodajlı ve polilizinli lamlara alındı. Hazırlanan preparatlar Hematoksilen- Eozin (H&E) boyası, Periyodik Asit Schiff (PAS) boyası ile boyandı. Işık mikroskopunda (Novel N-800M x20) incelenip fotoğraflandı.

Tablo 2:Histolojik takip işlem basamakları.

SIRA	İŞLEM	SÜRE
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1.5 saat
3	% 96 Alkol	30 dakika
4	% 96 Alkol	30 dakika
5	% 100 Alkol	30 dakika
6	% 100 Alkol	30 dakika
7	Alkol + Ksilol	15 dakika
8	Ksilol I	10 dakika
9	Ksilol II	20 dakika
10	Yumuşak parafin + Ksilol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 saat
12	Yumuşak parafin – Sert parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat
14	Gömme	

4.6. TUNEL Metodu

Soğutulan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Pozitif kontrol için meme dokusu, negatif kontrol için doku üzerine Tdt enzimi yerine Reaction Buffer kullanılarak diğer basamaklarda herhangi bir değişiklik yapılmadı.

Kit içeriğinde belirtilen (Lot No: 2470976, ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore) ve Tablo 3' de gösterilen terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling (TUNEL) boyama işlemleri uygulanarak apoptozise giden hücreler belirlendi.

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenip, değerlendirildi ve fotoğraflandı. Değerlendirmede kahverengi çekirdek boyaması gösteren hücreler apoptotik hücreler, Harris hematoxilen ile maviye boyanmış çekirdekler gösteren hücreler normal olarak kabul edildi.

Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanıp istatistiksel analizleri yapılmıştır.

Tablo 3: TUNEL boyaması işlem basamakları.

SIRA	İŞLEM	SÜRE
1	60°C etüv	Bir gece
2	Ksilol	3x15 dakika
3	% 100, % 96, % 80, % 70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1: 500 dilüsyondaki Proteinaz K solüsyonu	7 dakika
7	PBS	3x5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı	5 dakika
9	PBS	3x5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	6 dakika
11	Çalışma solüsyonu (% 77 µl Reaction Buffer + % 33 TdT Enzyme)	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (1 ml) +Distile su (34 ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3x5 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3x5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilen	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.	

4.8. Biyokimyasal Analizler

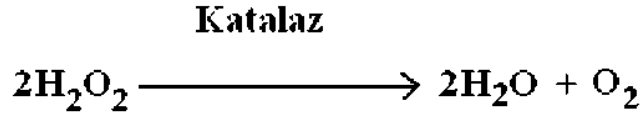
Dekapitasyondan hemen sonra eksize edilen testis dokuları serum fizyolojik ile yıkanıp -20 °C’de çalışma gününe kadar muhafaza edildi. % 1.15’lik KCl ile 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılarak homojenize edildi. Daha sonra, 3500rpm’de 15 dakika santrifüj edilecek ve süpernatantlarda malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve protein tayini yapıldı. MDA düzeyi Placer, GSH düzeyi Chavan, CAT aktivitesi Aebi, SOD aktivitesi Sun ve protein tayini Lowry metodlarına göre yapıldı.

4.8.1. Testis dokusunda malondialdehit düzeyinin tayini

MDA (malondialdehit), biyolojik sistemde lipidlerin oksidasyonu sonucunda oluşmaktadır (78). Dokuda MDA tayini Placer metoduna göre yapıldı (79). Bu metodun temeli lipid peroksidasyonu sonucu oluşan aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiobarbitürik asit (TBA)’in reaksiyonuna girmesine dayanmaktadır. Reaksiyon sonucunda pembe renkli bir kompleks oluşmasıyla beraber çözeltinin absorbansı 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür ve lipid peroksidasyonunun derecesi saptanır. Bu metoda göre dokudaki MDA düzeyi nmol/g doku olarak hesaplanır.

4.8.2. Testis dokusunda katalaz aktivitesinin tayini

CAT enzimleri, hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene çevirerek metabolize etmektedir. CAT'ın birçok hastalıkta patolojik şartlarda oluşan oksidatif strese karşı en önemli enzimlerden biri olduğu görülür (80). Dokuda CAT aktivitesinin ölçümü Aebi metoduna göre yapıldı (81). Katalaz aşağıdaki tepkimeye göre H_2O_2 'in yıkımını katalize eder.



H_2O_2 'in CAT tarafından yıkım hızı, H_2O_2 'in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Testis dokusu için spesifik aktivite k / g protein olarak hesaplandı.

4.8.3. Testis dokusunda glutatyon düzeyinin tayini

Doku örnekleri tartılarak % 1.15'lik KCl içinde 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilir, 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda GSH tayini yapılır.

Prensip: GSH düzey tayini için Chavan ve ark.'nın yöntemine göre tayin edildi (82). Bu metod 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoik asit eklendiğinde sülfidril gruplarının oldukça stabil sarı renk oluşturması temeline dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir. Testis dokusundaki GSH düzeyi $\mu\text{mol/g}$ protein olarak hesaplandı.

4.8.4. Testis dokusu Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin tayini

Doku örnekleri iki filtre kağıdı arasında suyu alındıktan sonra tartılarak % 1.15'lik KCl içinde 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilir, 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda SOD tayini yapılır.

Prensip: Bu metotta SOD aktivite ölçümü ksantin oksidaz - ksantin sistemi ile üretilen süperoksit radikalının nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgeyerek renk oluşması esasına dayanmıştır. Bu şekilde üretilen süperoksit radikalının NBT'u indirgemesi 560 nm'de maksimum absorban veren mavi renkli formazon oluşumu ile sonlanır. SOD aktivitesi Ü/g protein olarak hesaplandı (83).

4.9. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programında yapılmıştır. Sunulan veriler ortalama $\pm$ standart sapma değerleri olarak sunuldu. $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Normal dağılım gösteren çoklu grupların aralarındaki farklılıkları test etmek için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) uygulandı. İkili karşılaştırmalar için ise Post-hoc Tukey testi kullanıldı.

5. BULGULAR

5.1. Histolojik Değerlendirmeler

Kontrol grubuna (grup I) ait ratların testis dokuları incelendiğinde seminifer tübüllerin germinal epiteli ile bazal membranları ve interstisyel alan normal yapıda izlendi (Şekil 9, 10).

Radyasyona maruz bırakılan grup II' ye ait kesitlerde seminifer tübül germinal epitelinde önemli derecede vakualizasyon, vasküler konjesyon, atrofik tübüller, interstisyel alanda ödem tespit edildi (Şekil 11, 12, 13, 14).

Grup IV (Şekil 18, 19) ve grup V (Şekil 20, 21)'deki kesitler ise kontrol grubu ile benzerdi.

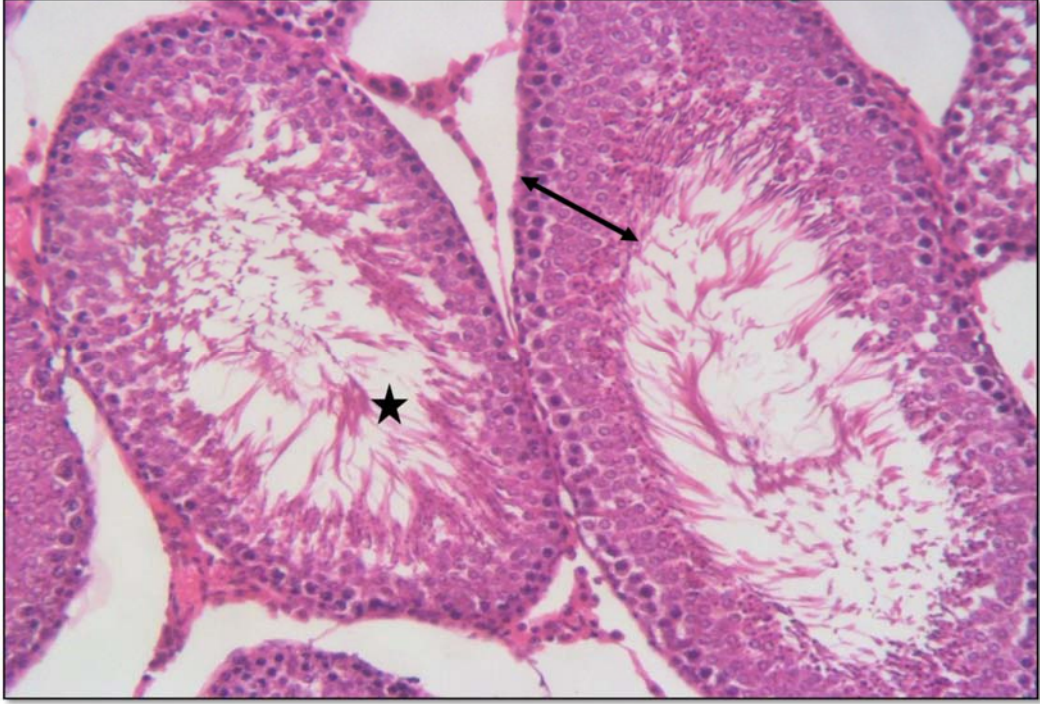
Radyasyon ile birlikte EA uygulanan grup III' te ise kontrol grubuna benzer şekilde normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli ve normal spermatogenez izlendi. Germinal epitelde vakualizasyon, vasküler konjesyonda, interstisyel ödemde belirgin iyileşme gözlemlendi (Şekil 15, 16, 17).

Tüm gruplardaki ratlara ait kesitler incelenerek bu bulgulara göre histoskor çıkarıldı. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Kontrol grubu ve radyasyon grubu ile kıyaslanarak istatistiksel açıdan anlamlı bulunan değerler işaretlendi (Tablo 4).

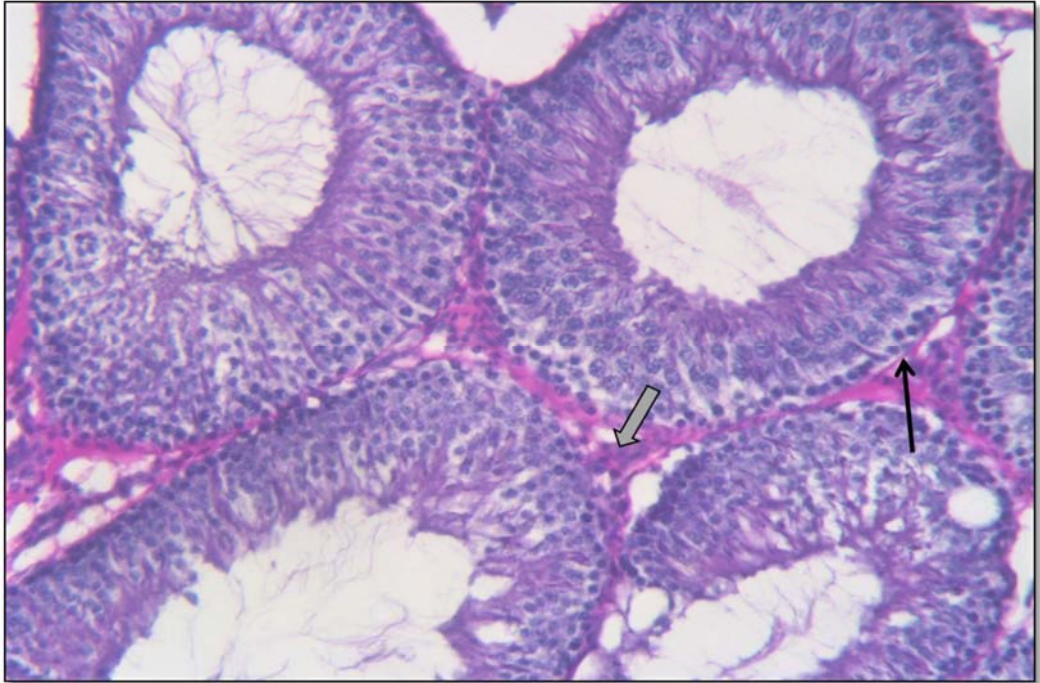
Tablo 4: Histolojik değerlendirmelere ait histoskor tablosu.

Gruplar	Konjesyon	Seminifer túbül değenerasyonu	Lümendeki sperm yoğunluğu	Atrofik túbül	İntersitisyel ödem
Kontrol	0,66±0,51 ^b	0,66±0,51 ^b	3,33±0,81 ^b	0,50±0,83 ^b	1,00±0,63 ^b
Radyasyon	3,16±0,40 ^a	3,66±0,51 ^a	0,33±0,51 ^a	2,16±0,75 ^a	3,66±0,51 ^a
Radyasyon + EA	1,33±0,51 ^b	0,83±0,75 ^b	2,83±0,75 ^b	1,00±0,63 ^b	1,83±0,75 ^b
EA	0,83±0,40 ^b	1,16±0,75 ^b	3,00±0,63 ^b	0,50±0,54 ^b	1,33±0,51 ^b
Mısırózü yağı	1,00±0,63 ^b	0,66±0,51 ^b	3,00±0,63 ^b	0,66±0,51 ^b	1,33±0,51 ^b

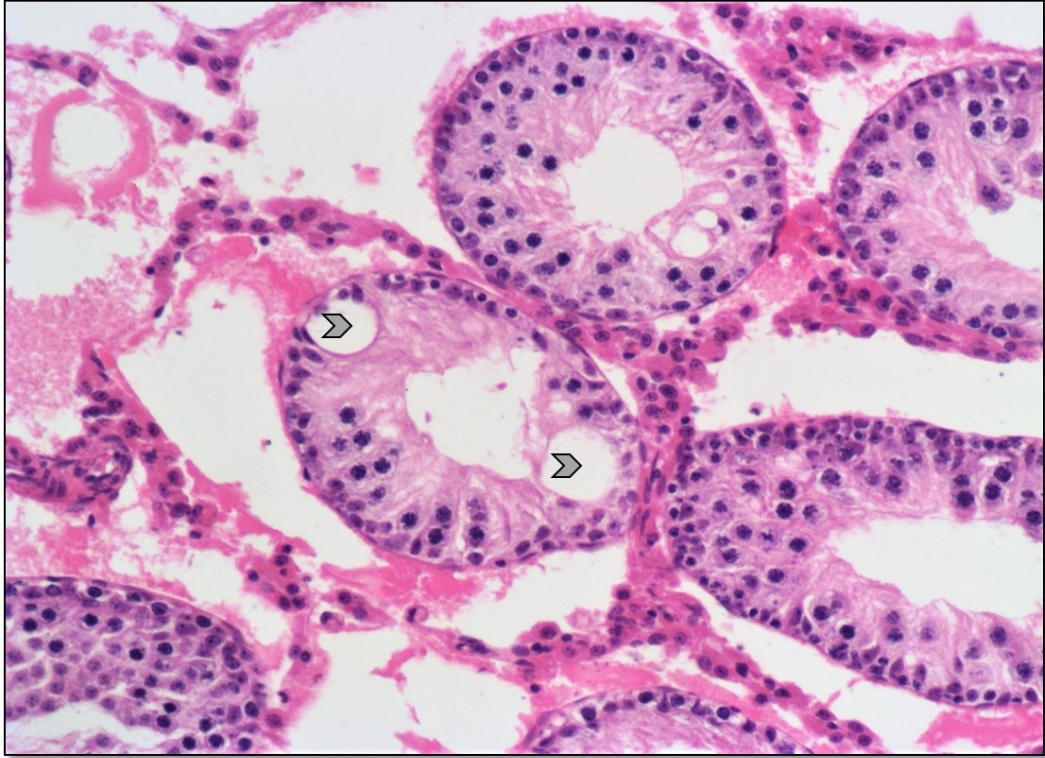
Değerler; ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a:Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, b:Radyasyon grubuna göre karşılaştırıldığında (p<0.05).



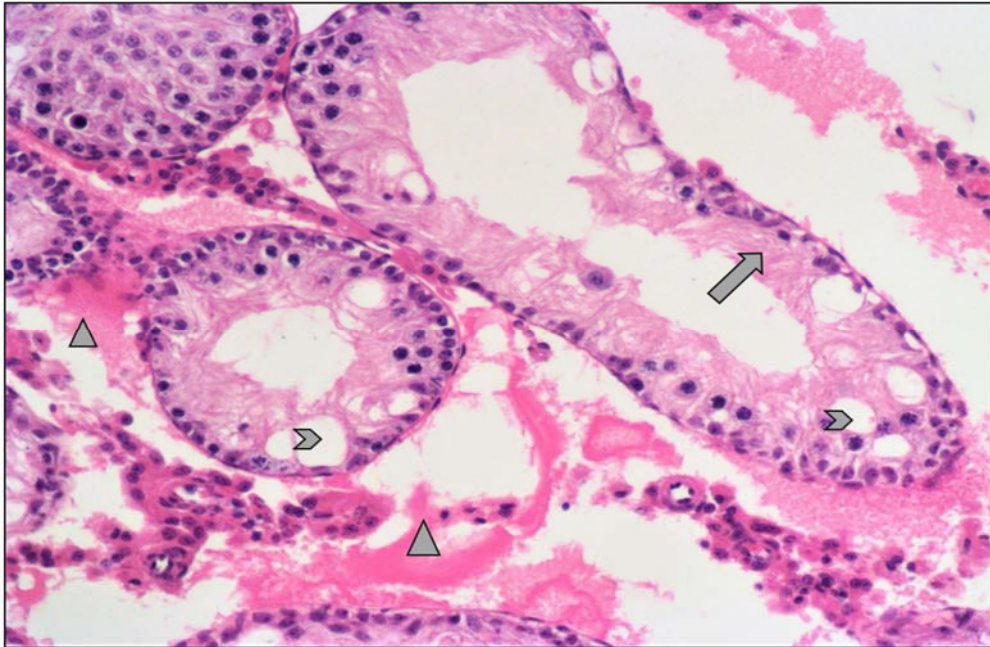
Şekil 9: Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli ($\leftrightarrow$) ve normal spermatogenez ($\star$). H&E x 200.



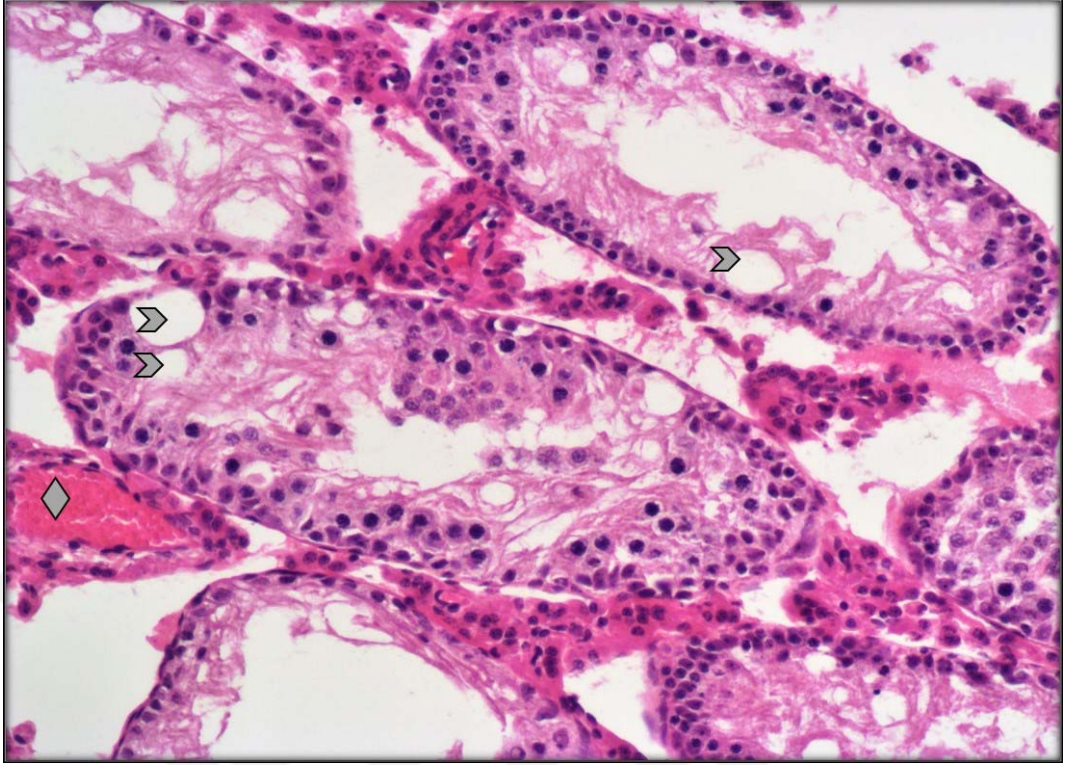
Şekil 10: Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül bazal membranı ($\rightarrow$) ve interstisyel alan ($\Rightarrow$) PAS x200.



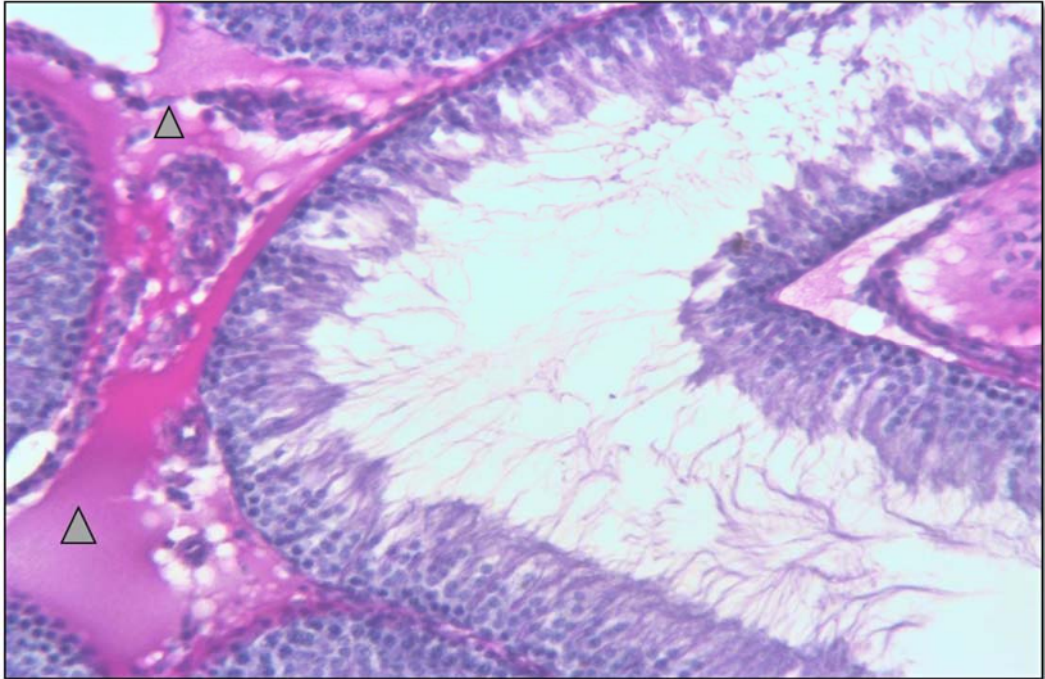
Şekil 11: Radyasyon grubu. Seminifer tübül germinal epitelinde vakualizasyon (➤) H&E x200.



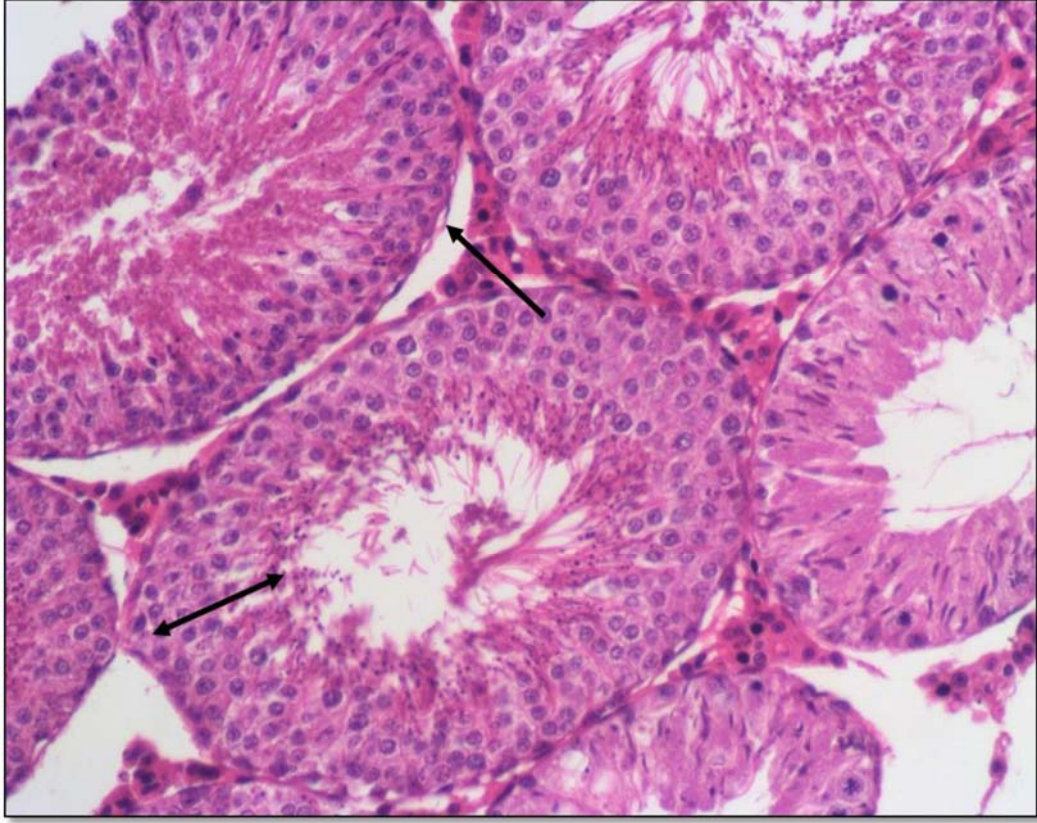
Şekil 12: Radyasyon grubu. Seminifer tübül germinal epitelinde vakualizasyon (➤), seminifer tübül germinal epitel kalınlığında azalma (⇨) ve interstisyel alanda ödem (Δ). H&E x200.



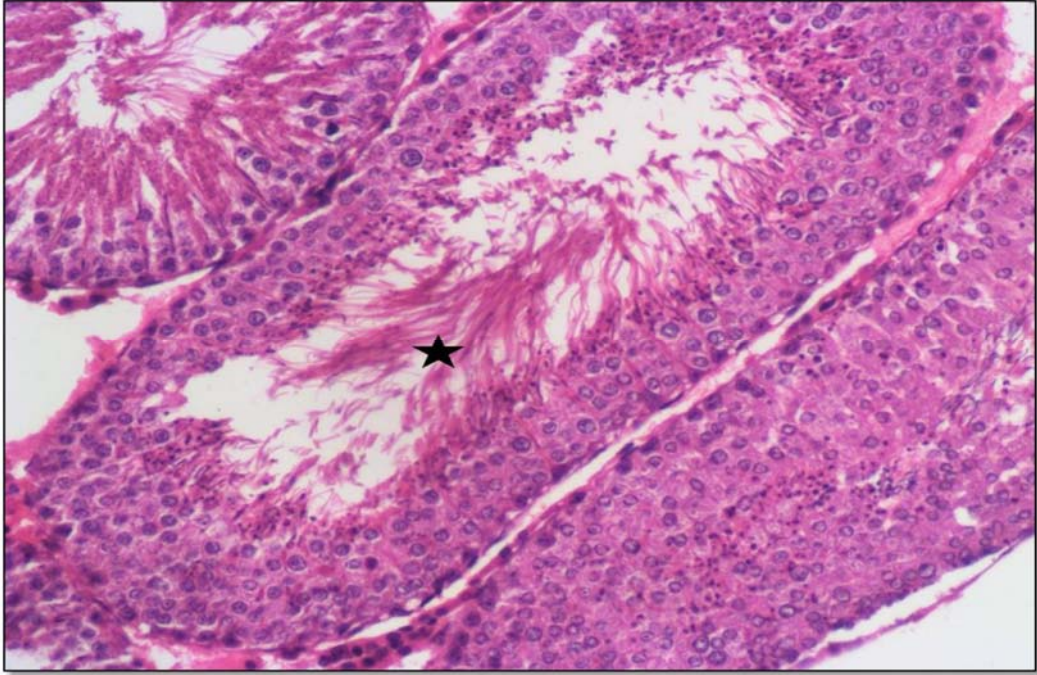
Şekil 13: Radyasyon grubu. Seminifer tübül germinal epitelinde vakualizasyon (➤) ve vasküler konjesyon (◊). H&E x200.



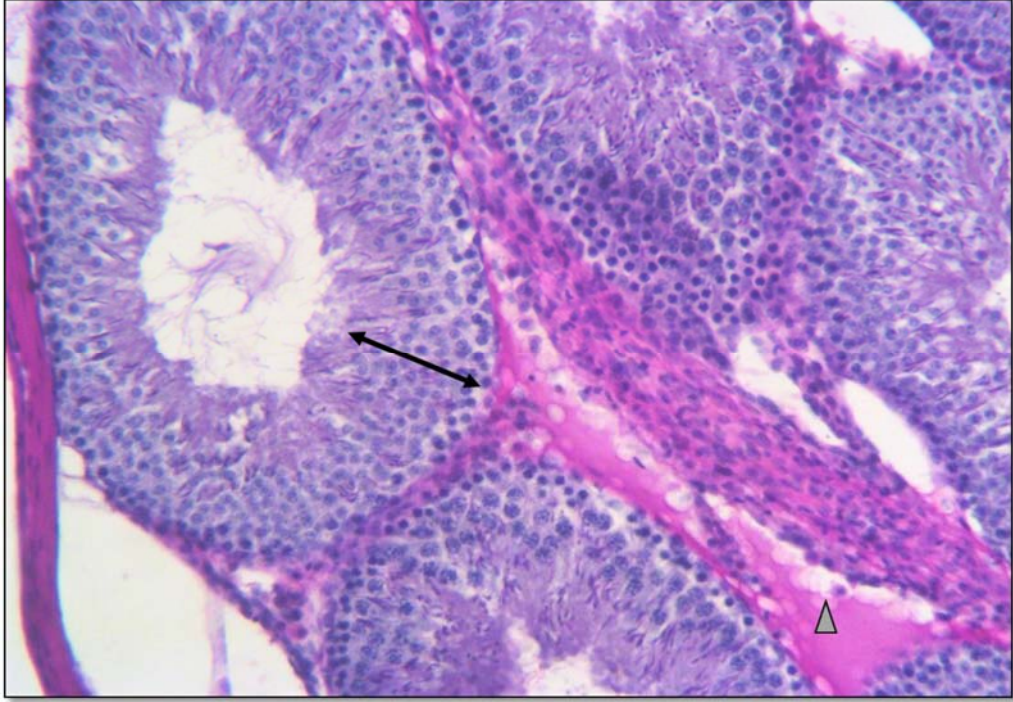
Şekil 14: Radyasyon grubu. İnterstisyel alanda ödem (Δ) PAS x200.



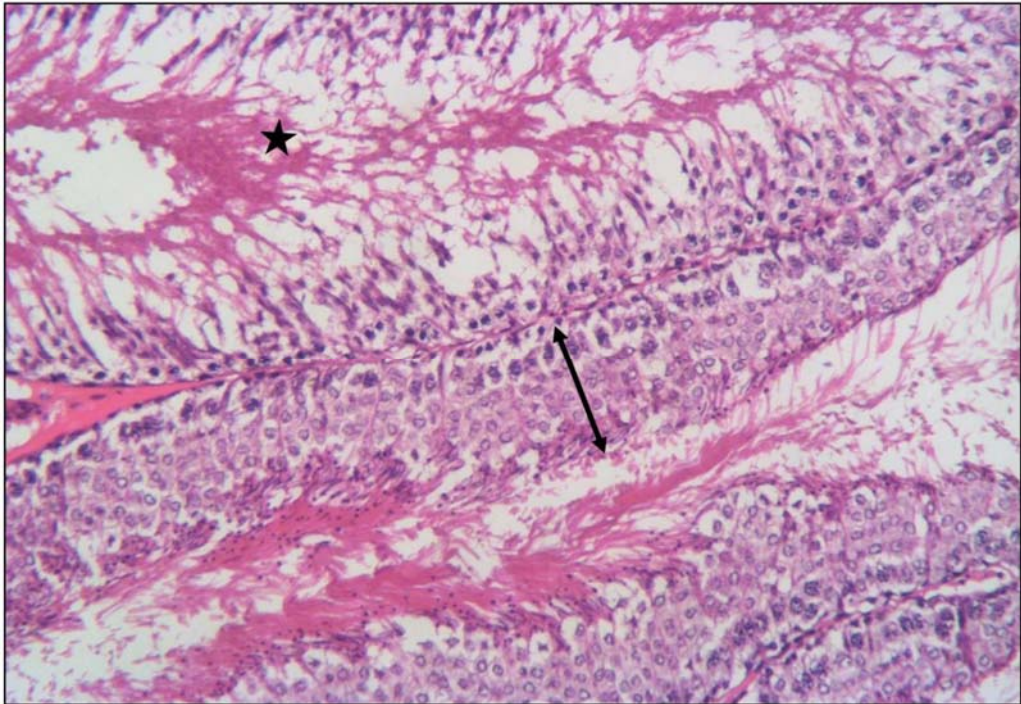
Şekil 15: Radyasyon + EA grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli ($\leftrightarrow$), ve normal görünümlü seminifer tübül bazal membranı ($\rightarrow$). H&E x200.



Şekil 16: Radyasyon + EA grubu. Normal spermatogenez (★) H&E x 200



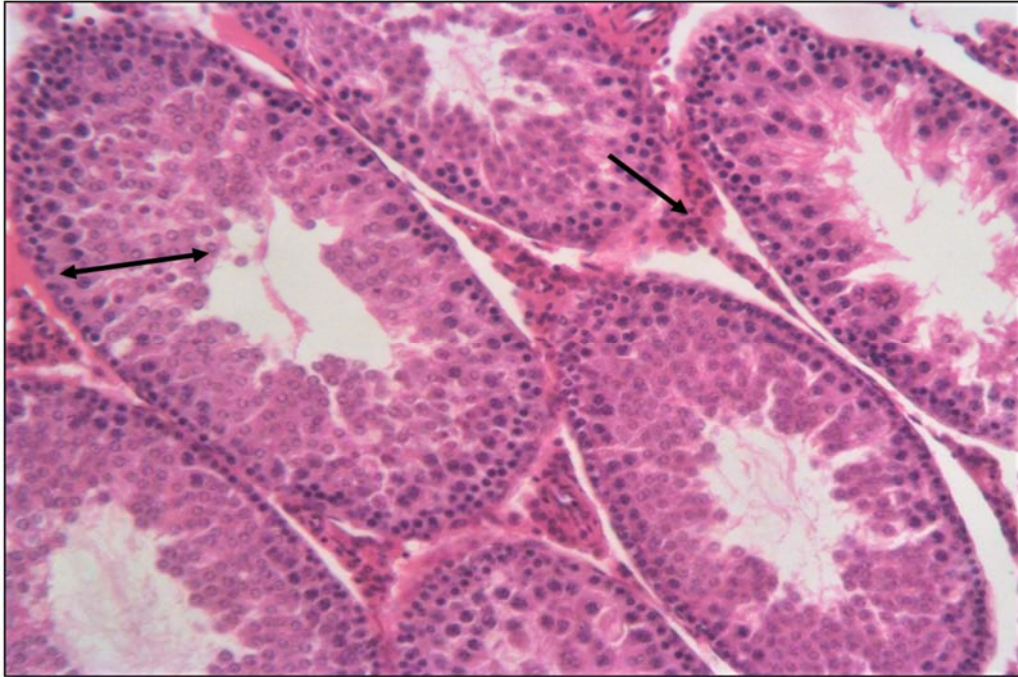
Şekil 17: Radyasyon + EA grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli ($\leftrightarrow$) ve interstisyel alanda azalmış ödem (Δ) PAS x200.



Şekil 18: EA grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli ($\leftrightarrow$) ve normal spermatogenez ($\star$). H&E x200.



Şekil 19: EA grubu. Normal görünümlü interstisyel alan (→) ve normal spermatogenez (★). PAS x200.



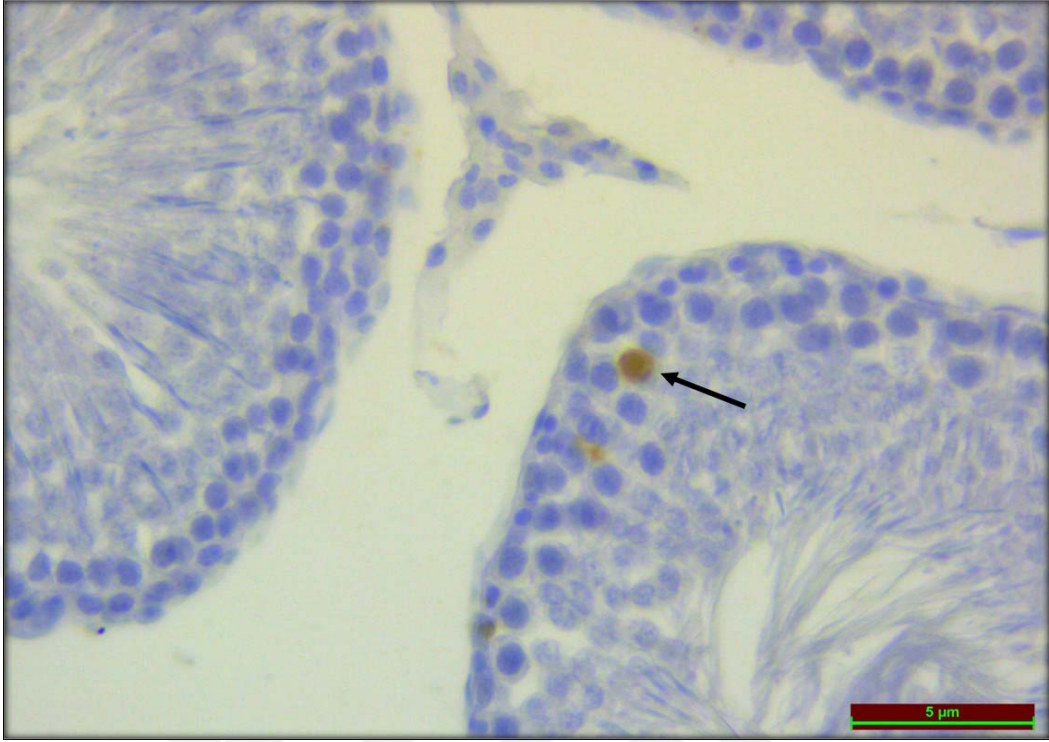
Şekil 20: Mısırozü yağı grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli (↔) ve normal görünümlü interstisyel alan (→) H&E x200.



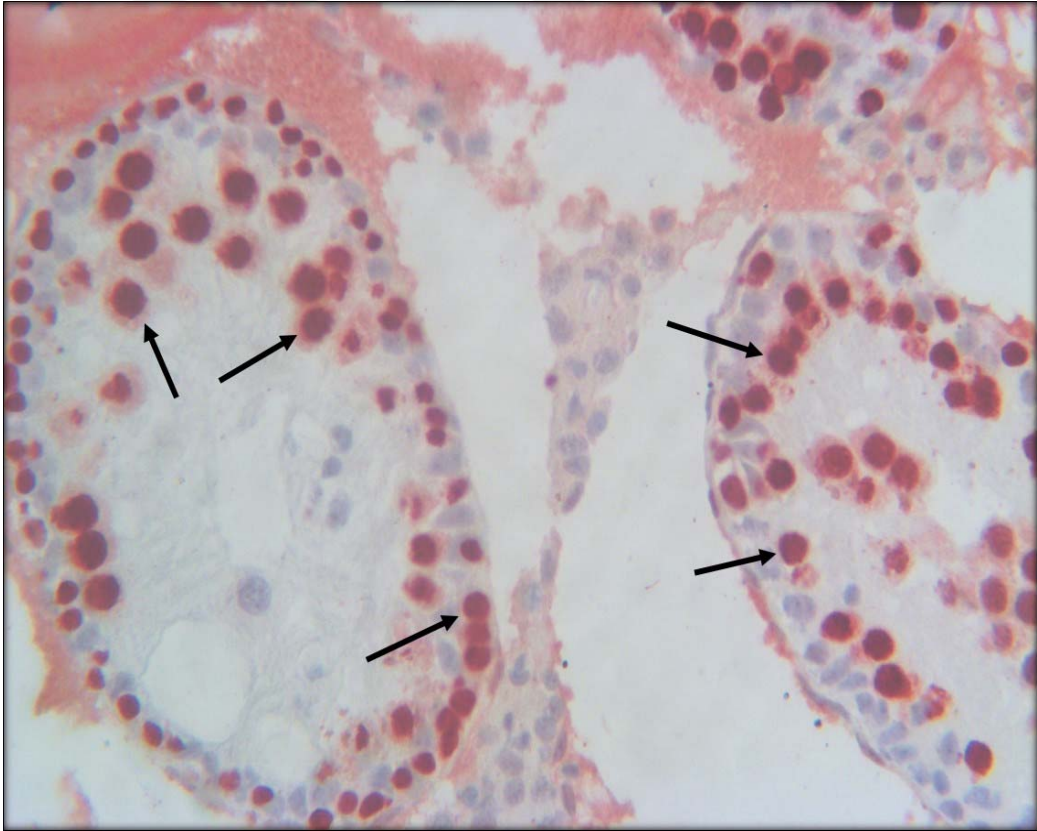
Şekil 21: Mısırözü yağı grubu. Normal spermatogenez (★). PAS x200.

5.2. TUNEL Bulguları

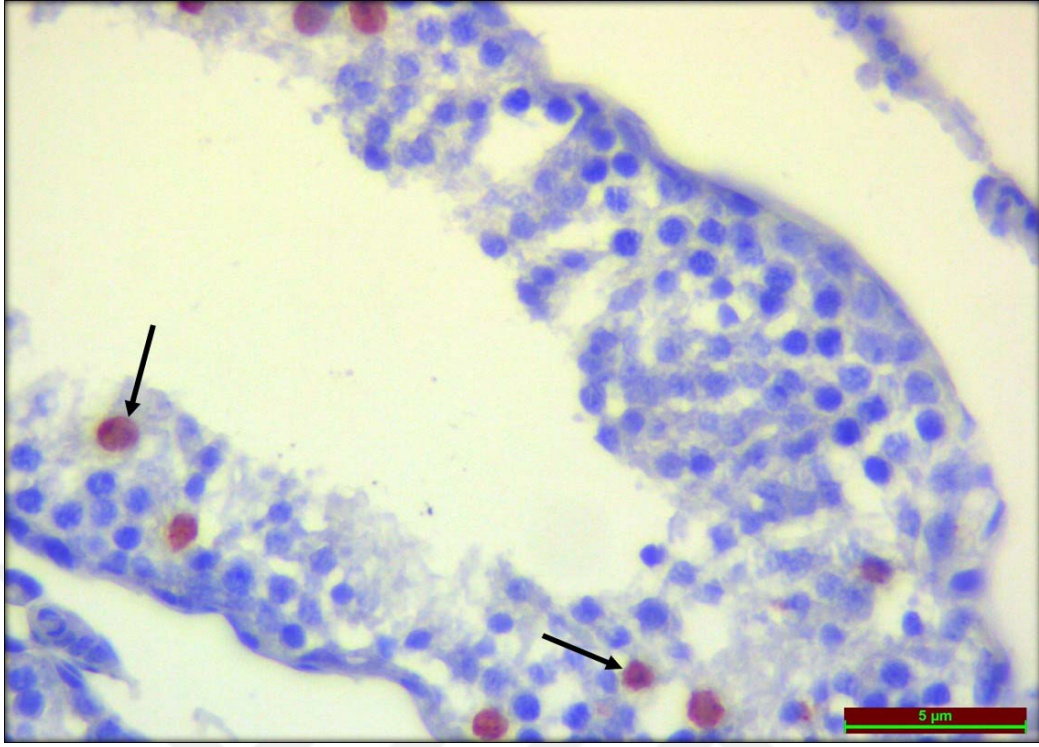
Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği testis dokusunda spermatogenik seri hücrelerinde gözlemlendi. TUNEL pozitifliği; kontrol grubu ve radyasyon + EA grubunda benzerdi (Şekil 22, 24). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon grubunda anlamlı bir artış vardı (Şekil 23). ($p < 0.05$). Negatif kontrolde ise TUNEL pozitifliğine rastlanmadı (Şekil 27). Apoptotik indeks tablo 5’de verilmiştir.



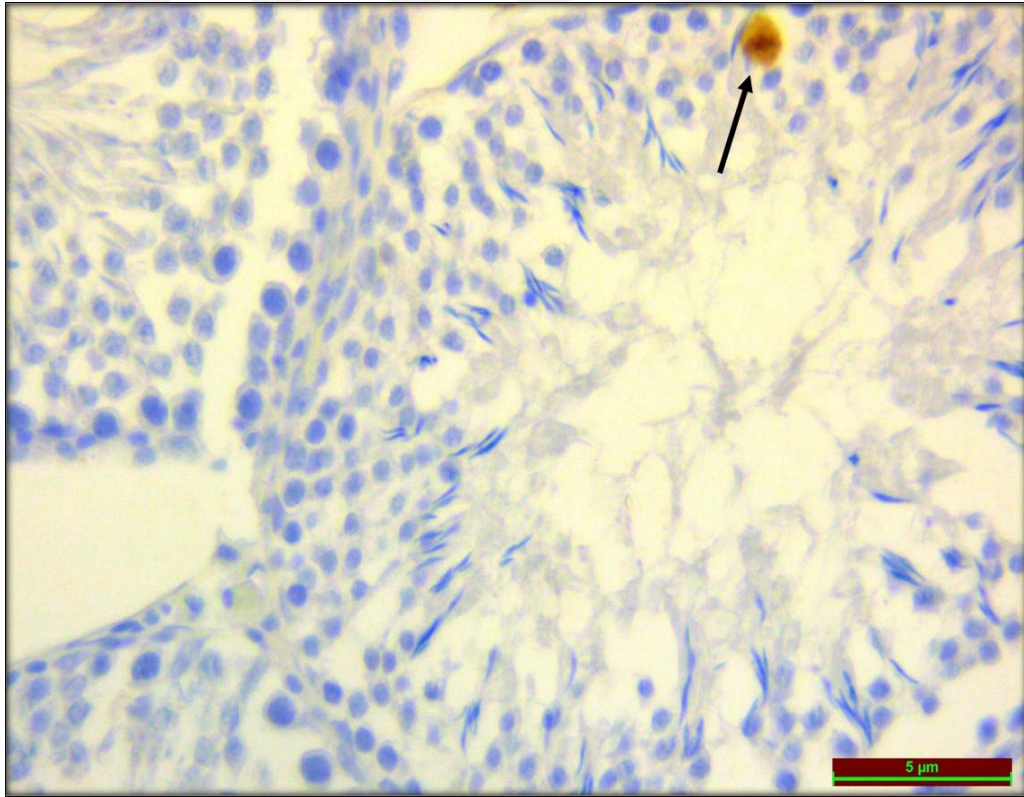
Şekil 22: Kontrol grubu. TUNEL pozitif hücre (→). x 400



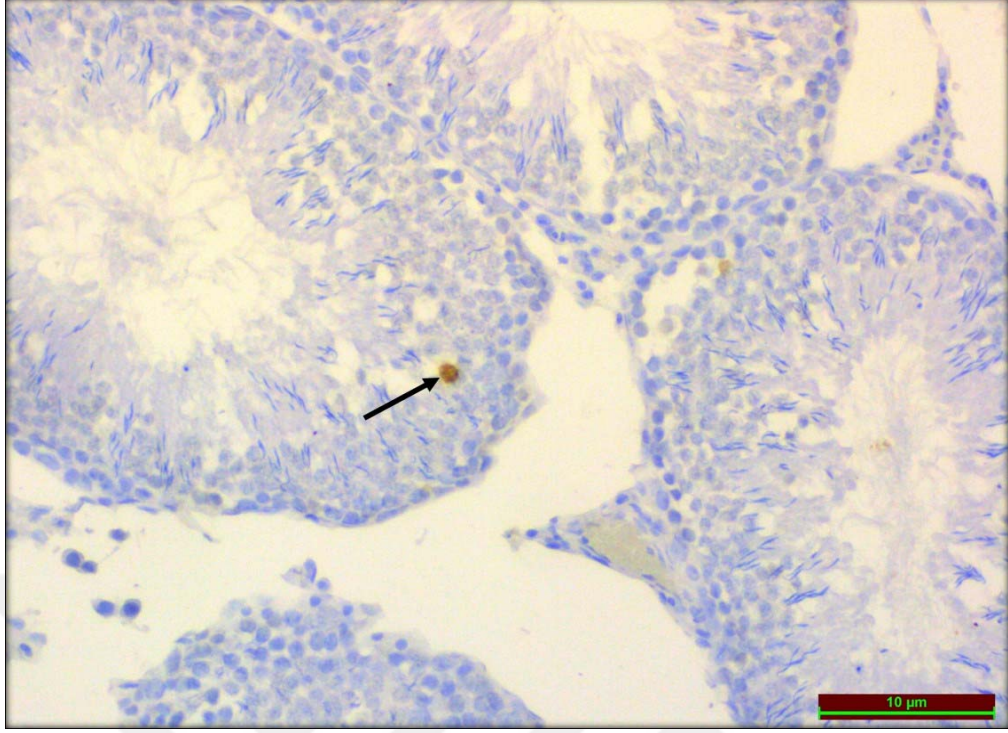
Şekil 23: Radyasyon grubu. TUNEL pozitif hücre (→). x400.



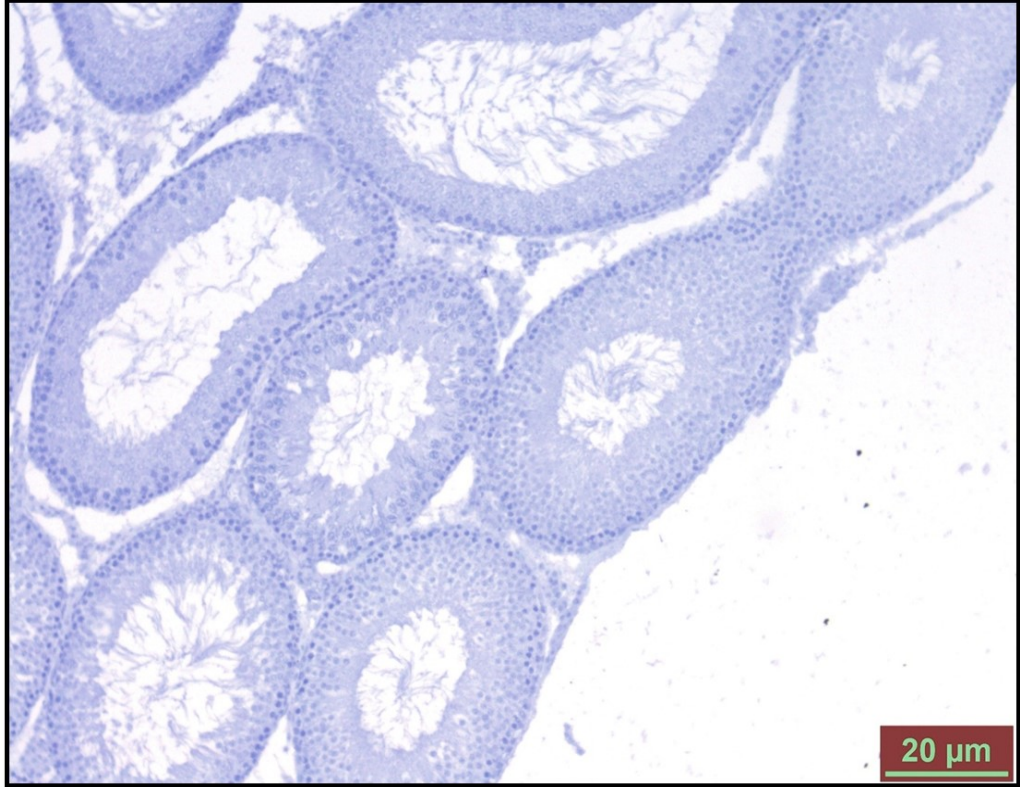
Şekil 24: Radyasyon + EA grubu. Az sayıda TUNEL pozitif hücre (→). x400.



Şekil 25: EA grubu. Az sayıda TUNEL pozitif hücre (→). x400



Şekil 26: Mısırözü yağı grubu. Az sayıda TUNEL pozitif hücre (→). x400



Şekil 27: Negatif kontrol. TUNEL pozitif hücre görülmemekte TUNEL x100.

Tablo 5: Apoptotik indeks (%).

GRUP	APOPTOTİK İNDEKS (%)
Kontrol	1.83 ± 0.75
Radyasyon	21.5 ± 2.94 ^a
Radyasyon + EA	10.33 ± 1.63 ^{ab}
EA	2.16 ± 0.40 ^a
Mısırozü yağı	2.66 ± 1.63 ^b

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a:Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, b:Tütün dumanı grubuna göre karşılaştırıldığında, (p<0.05).

5.3. Biyokimyasal Analizler

Grupların testis dokusu MDA ve GSH düzeyleri ile CAT ve SOD aktiviteleri Tablo 6’da verilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeylerinin radyasyon grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (p<0.001). Radyasyon + EA grubunda ise radyasyon grubuna kıyasla bir azalma saptandı (p<0.001).

Bununla birlikte kontrol grubuna göre radyasyon grubunda antioksidan savunma sisteminin enzimlerinden olan CAT aktivitesinin anlamlı düzeyde arttığı (p<0.001), SOD aktivitesinin ise anlamlı düzeyde azaldığı (p<0.001) belirlendi. Radyasyon ile ellajik asit grubunda ise radyasyon grubuna göre CAT aktivitesinin anlamsız olarak daha da azaldığı, SOD aktivitesinin ise arttığı (p<0.001) saptandı.

GSH düzeylerinin; kontrol grubuna göre radyasyon ve radyasyon ile birlikte EA uygulanan gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi ($p < 0.001$). Radyasyon+EA grubu katalaz aktivitesi en düşük bulundu.

Tablo 6: Grupların testis dokusu MDA, GSH düzeyleri ve SOD, CAT aktivitesi

GRUPLAR	MDA (nmol/g doku)	CAT (k/g protein)	GSH (nmol/g doku)	SOD (ü/g protein)
Kontrol	6,777±0,174 ^b	5,493±0,589 ^b	150,781±3,807 ^b	159,8731±1,7310 ^b
Radyasyon	13,852±0,248 ^a	10,863±0,737 ^a	94,160±5,759 ^a	136,4373±1,5282 ^a
Radyasyon + EA	10,264±1,980 ^{ab}	9,809±0,438 ^a	92,144±4,925 ^a	153,103±4,129 ^b
EA	7,057±0,318 ^b	4,540±0,282 ^b	174,981±4,836 ^{ab}	166,386±5,4691 ^b
Mısırozü yağı	7,202±1,668 ^b	5,448±0,487 ^b	150,005±4,278 ^{ab}	159,037±2,024 ^b
p değeri	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, b: Radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0.001$).

6 . TARTIŞMA

Günümüzde, insanlar çeşitli nedenlerle radyasyona maruz kaldıkları zaman biyolojik sonuçların ne olacağı konusunda endişeye kapılırlar (84). Radyasyona maruz kalması sonucunda biyolojik bir risk faktörü oluşur. Bu riski ortadan kaldırmak için, radyasyonun biyolojik etkilerini öğrenmeli ve bu etkilerden korunmalıdır (20).

İyonize radyasyonun biyolojik bir etki oluşturabilmesi için sahip oldukları enerjinin, canlıyı oluşturan hücre ve dokular tarafından absorbe edilmesi ve dokularda dağılması gerekmektedir.

Canlılar yaklaşık % 70-90 oranında su içerir. Işınlanmadan sonra radyasyon enerjisi su molekülleri tarafından emilir ve sonucunda pozitif yüklü bir iyon ve serbest bir elektron oluşur. Olayı izleyen sekonder reaksiyonlar ile serbest radikaller açığa çıkar. Kendi aralarında oluşturdukları tepkime ile toksik molekülleri oluşur. İndirek etkisi hidroliz sonucu ortaya çıkan serbest radikaller ile oluşan radyasyon etkisidir, direkt etkisini ise radyasyon enerjisinin su molekülleri yerine biyolojik moleküllere geçişi sonucunda biyoradikallerin oluşma söz konusudur. Canlı vücudunun büyük bir kısmı su içerdiğinden radyasyon hasarlarının büyük oranda indirekt yoldan meydana geldiği kabul edilir.

X ve ȳ radyasyonların etkileri indirekt yolla meydana gelmektedir (20, 36-39). 5-6 Gy dozundaki radyasyon maruziyeti testislerde küçölme ve yumuşama ile birlikte infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (20). Deney hayvanlarında yapılan bazı çalışmalarda radyasyon ışınlamanın, testis ağırlığında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (30, 32).

Morfolojik çalışmalarda ise radyasyon ışınlamasından sonra spermatogenezin durduğu, germinal hücre desquamasyonu ve vakuolizasyonu ile birlikte çok çekirdekli dev hücrelerin ortaya çıktığı görölmüştür (85-34).

Aynı zamanda radyasyon ışınlamasının testis dokusunda atrofiye yol açtığı bilinmektedir (30, 86).

Yapılan bir çalışmada 10, 25 ve 63 Gy skrotal bölgeye yapılan radyasyon ışınlamasından sonra seminifer tübüllerde dev hücrelerin varlığına rastlanmıştır (87). Bansal ve ark.(34) 10 Gy dozunda, radyasyon ışınlamadan sonra 2. ve 4. haftalarda gözlenen çok çekirdekli dev hücrelerin, spermatidlerin kümelenmesinden dolayı ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Taş M. ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, 2 Gy dozunda uygulanan radyasyonun rat genital organ ağırlığı, spermatolojik özellikler ve histolojik parametreler üzerinde birtakım olumsuz değışiklikler meydana getirdiğı tespit edilmiştir (88).

Bu çalışmada da, literatüre uyumlu olarak radyasyona maruz bırakılan gruptaki ratların testis dokusunda; seminifer túbül germinal epitelinde vakualizasyon, vasküler konjesyon ve interstisyel alanda ödem tespit edildi.

Radyasyon ile birlikte EA uygulanan gruptaki ratların testis dokusunda ise literatür ile uyumlu olarak kontrol grubuna yakın görünömlü seminifer túbül germinal epiteli ve normal spermatogenez izlendi. Seminifer túbül bazal membran ayrılmalarında azalma, germinal epitel dejenerasyonunda, vasküler konjesyonda ve interstisyel ödemde belirgin şekilde iyileşmeler gözlemlendi.

Radyasyon, aşırı ROS üretimi aracılığı ile testis dokusunda apoptozise neden olur. Apoptozis, biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerle kendini gösteren ökaryotik bir hücre ölümüdür. (89- 92).

elik Ö.K. ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 2 Gy radyasyon verilmesinden 10 hafta sonra bile her iki çalışma gurubunda da yoğun apoptotik yanıtlar gözlenmiştir (93).

Başka bir çalışmada 10Gy'lık ısınlama sonrasında seminifer túbüllerde spermatogenezin durduğu ve büyük ölçüde germ hücrelerinden yoksun atrofik túbüllerin varlığı, atrofik túbüllerde ortaya çıkan vakuolizasyonlar ve spermatitlerin oluşturduğu dev hücreler gözlenmiştir (94).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, radyasyon gruplarında TUNEL pozitif hücrelerde anlamlı bir artış vardı. Radyasyon + ellajik asit grubunda ise, TUNEL pozitif hücre sayısının kontrol grubu ile benzer olduğu belirlendi.

Çeribaşı A.O. ve ark.'nın yapmış olduğu diğer bir çalışmada siklofosfamid (CP) uygulamasının MDA, GSH düzeyleri ve CAT ve SOD aktiviteleri ile testiküler histopatolojik değişimleri üzerine tedavi olarak kullanılan EA ve likopenin etkileri araştırılmıştır. Uygulanan CP'in sperm plazma MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa, SOD aktivitesinde azalmaya bunun yanısıra seminifer tübül çaplarında azalmaya, germinal hücre tabakasında kalınlaşmaya ve testiküler dokuda dejenerasyon, nekroz, immatur germ hücreleri ve atrofi gibi bozukluklara neden olduğu gözlenmiştir (95). Kaya İ. ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ise piridin intoksikasyonunda paraoksonaz 1 (PON 1) aktivitesi, oksidatif stres indeksi (OSİ), total antioksidan seviyeleri (TAS) ve total oksidan (TOS) seviyeleri üzerine EA etkisi araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan 28 erkek swiss albino cinsi farelerde piridin uygulanmasının PO1 aktivitesi ve TAS'ı azalttığı, OSİ ve TOS ise önemli oranda arttırdığı saptanmıştır. Tedavi olarak kullanılan EA'nın meydana gelen bu değişimleri normale yakın tutup oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiği ileri sürülmüştür (96). Fareler 10 Gy radyasyon ışınlamasına maruz kaldıklarında MDA seviyesinin anlamlı derecede

arttığı GSH, SOD ve katalaz oranlarının da anlamlı derecede azaldığı Das ve ark. tarafından ortaya konmuştur (97).

Klinikte sık kullanılan radyasyon ışınlamasının ROS gibi oksidan moleküllerinin seviyesinde artışa yol açtığı ve GSH, SOD ve CAT gibi antioksidanların seviyelerinde azalmaya neden olduğu Srinivasan ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada ortaya konmuştur. Sonuçta iyonize radyasyon maruziyeti ile dokularda oksidan stresin arttığı ve antioksidan enzimlerin azaldığı bilinmektedir. (98).

Bu çalışmada da 8 Gy'lik dozda uygulanan radyasyonun MDA düzeylerinin ve CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı, radyasyon + EA grubunda ise MDA düzeylerinin ve CAT aktivitesini azalttığı tespit edildi. SOD aktivitesi ve GSH düzeylerinin; kontrol grubuna göre radyasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulundu. Radyasyon + EA grubunda ise radyasyon grubuna kıyasla SOD aktivitesinin arttığı, GSH düzeyinin daha da azaldığı tespit edildi.

Radyasyon, reaktif oksijen türlerinin ve inflamatuvar mediatörlerin üretimine neden olarak testiküler hasara yol açmaktadır. Organizmada prooksidan ve antioksidanlar arasındaki dengesizlikte reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi söz konusu olmaktadır. Diğer taraftan spermatogenezisin sağlıklı bir şekilde

devam edebilmesi için endojen antioksidan defans sistemi gereklidir. Böylece antioksidan ajanlar, radyasyonun yol açtığı testiküler hasarı kısıtlayabilirler (99-103).

Bu çalışmada da radyasyonun serbest oksijen türlerinin ve inflamatuvar mediatörlerin aşırı üretimine yol açarak testis hasarına yol açtığını düşünmekteyiz. Antioksidan özelliğinin yüksek olduğu bilinen ellajik asidin ise radyasyonun yol açtığı testiküler hasarı endojen antioksidan defans sistemini destekleyerek azalttığını söyleyebiliriz.

Sonuç olarak çalışmamızın bulguları birlikte değerlendirildiklerinde radyasyona maruz bırakılan rat testis dokusunda oksidatif hasara yol açarak infertilite gibi ciddi üreme problemlerine yol açabileceği görüldü. Güçlü antioksidan özelliği bilinen ve beslenmede yaygın olarak tüketilen, özellikle kırmızı meyvelerin yapısında bulunan ellajik asidin, radyasyon hasarına karşı ciddi anlamda koruyucu bir etkisi olduğu tespit edildi. Bu anlamda çalışmamızda radyasyona karşı koruyucu önlemler alınmasının son derece önemli olduğu sonucuna varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 1. Cilt, 4. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2006.
2. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Testis> 26.04.2017
3. Erkoçak A. Özel Histoloji. 3.baskı. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi. 1980.
4. http://www.biologycorner.com/bio3/rat_urogenital.html 26.04.2016.
5. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Başaklar AC. (Çeviren). 6. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık, 1990; 257
6. Moore KL. Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Dalcık H (Çevirenler). 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2002; 263-265.
7. http://www.histoloji.hacettepe.edu.tr/ekler/ppt/genital_gelisme.ppt 26.04.2016.
8. Hall JE. Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji. Yegen B (Çeviren). 12. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2013; 973-984.
9. Tip.uludag.edu.tr/temel-tip-bilimleri/fizyoloji/ders-notlari/erkek-ureme.pdf 26.04.2016
10. Koh PO, Kim MO. Ethanol exposure decreases cell proliferation and increases apoptosis in rat testes. J Vet Med Sci. 2006; 68(10): 1013-7
11. Erben T. Histoloji 2. Baskı İstanbul: Beta basım yayım dağıtım. 1985; 418-427.
12. Tip.uludag.edu.tr/temel-tip-bilimleri/fizyoloji/ders-notlari/erkek-ureme.pdf 26.04.2016.
13. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter temel histoloji, (Çev: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P.) Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri. 2009; 385.
14. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Solakoğlu S, Aytekin Y (Çevirenler). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 2009; 418-427.
15. Kierszenbaum AL. Histoloji ve hücre biyolojisi (Çeviren: Demir R.). Ankara: Palme Yayıncılık.. 2006; 459-467.
16. El-Sokkary GH. Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration on the testis of adult male rat. Neuro Endocrinol Lett. 2001; 22 (2): 93-9.
17. Koh PO, Kim MO. Ethanol exposure decreases cell proliferation and increases apoptosis in rat testes. J Vet Med Sci. 2006; 68(10): 1013-7.
18. Eroschenko VP. Di Fiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle, (Çeviren: Demir R.). Ankara: Palme Yayıncılık. 2013; 479.

19. www.cygm.gov.tr/cygm/files/guncelbelgeler/radyasyon_olcum_sunum.pdf
26.04.2016
20. Özalkan A. Temel Radyobioloji. 1.Basım. İstanbul: Haliç Üniversitesi Yayınları,2001; 1-218.
21. Parlar Ş, Alev E. “Radyasyon Güvenliği El Kitabı” Trakya 2009.
22. Karayılanoğlu T, Yaren H, Radyasyon ve insan sağlığı üzerine etkileri, TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 2005.
23. Algüneş Ç. Radyasyon Biyofiziği.1. Basım. Edirne: Trakya Üniversitesi Yayınları No: 51. 2002; 59-62.
24. Steel GG. The Significance of Radiobiology for Radiotherapy. In; Steel GG (Ed.). Basic Clinical Radiobiology. New York: Co-published in the USA by Oxford University Press; 1997: p.1-7.
25. Ertuğrul Yılmaz, Radyasyondan korunma, HDM Kalite Kontrol Teknolojileri.
26. Daşdağ S. İyonlaştırıcı radyasyonlar ve kanser. Dicle tıp dergisi. 2010; 37(2): 177-185.
27. Shetty G, Weng CC, Bolden-Tiller OU, Huhtaniemi I, Handelsman DJ, Meistrich ML. Effects of medroxyprogesterone and estradiol on the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. Endocrinology 2004; 145: 4461-9.
28. Meistrich ML, Wilson G, Huhtaniemi I. Hormonal treatment after cytotoxic therapy stimulates recovery of spermatogenesis. Cancer Res 1999; 59: 3557-60.
29. Ash P. The influence of radiation on fertility in man. Br J Radiol 1980; 53: 2718.
30. Shetty G, Meistrich ML. Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. J Natl Cancer Inst Monogr 2005; 34: 36-9.
31. Jégou B, Pineau C, Velez de la Calle JF, Touzalin AM, Bardin CW, Cheng CY. Germ cell control of testin production is inverse to that of other Sertoli cell products. Endocrinology 1993; 132: 2557-62.
32. Jagetia GC, Jyothi P, Krishnamurthy H. Effect of vindesine sulfate on the radiationinduced alterations in mouse spermatogenesis: a flow cytometric evaluation. Mutat Res 1998; 398: 163-74.
33. Peltola V, Parvinen M, Huhtaniemi I, Kulmala J, Ahotupa M. Comparison of effects of 0.5 and 3.0 Gy X-irradiation on lipid peroxidation and antioxidant enzyme function in rat testis and liver. J Androl 1993; 14: 267-74.

34. Bansal MR, Kaul A, Tewari M, Nehru B. Spermatogenesis and epididymal sperm after scrotal gamma irradiation in adult rats. *Reprod Toxicol* 1990; 4: 321-4.
35. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001; 8: 851-62.
36. Kocer I, Taysi S, Ertekin MV, Karslioglu I, Gepdiremen A, Sezen O et al. The effect of L-carnitine in the prevention of ionizing radiation-induced cataracts: a rat model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245: 588-94.
37. Mansour HH. Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. *Pharmacol Res* 2006; 54: 165-71.
38. Robbins MEC, Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation late normal tissue injury: a review. *Int J Radiat Biol* 2004; 80(4): 251-9.
39. Murley JS, Kataoka Y, Weydert CJ, Oberley LW, Grdina DJ. Delayed radioprotection by nuclear transcription factor KB-mediated induction of manganese superoxide dismutase in human microvascular endothelial cells after exposure to the free radical scavenger WR1065. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1004-16.
40. Onat T, Emerk K. *Temel Biyokimya*. İzmir: Bassaray Basımevi. 1997.
41. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidant, *Exp. Physiol.* 1997; 82: 291-295.
42. Becman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998; 78: 547-581.
43. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology Association.* 1997; 3-4: 92-95.
44. Gilgun-sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology.* 2001; 40: 959-975.
45. Morte MI, Rodrigues AM, Soares D, et al. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. *Anim Reprod Sci* 2008; 106: 36-47.
46. Yeni D, Gundogan M, Cigerci IH, et al. Seasonal variation of oxidative stress parameters in ram seminal plasma. *J Anim Vet Adv* 2010; 9: 49-55.

47. Gluecksmann A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews* 1951; 26: 59-86.
48. Lockshin RA and Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 545-550.
49. Leist M, and Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternativemechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2001; 2: 589-598.
50. Daston GP, Gooch JW, Breslin WJ, et al. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. *Reprod Toxicol* 1997; 11: 465-481.
51. Cravedi JP, Zalko D, Savouret JF et al. The concept of endocrine disruption and humanhealth. *Med Sci* 2007; 23: 198-204.
52. Erkkila K, Pentikainen V, Wikstrom M, Parvinen M, Dunkel L. Partial oxygen pressureand mitochondrial permeability transition affect germ cell apoptosis in the human testis. *JClin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4253-4259.
53. Tripathi R, Mishra DP, Shaha C. Male germ cell development: turning on the apoptoticpathways. *J Reprod Immunol* 2009; 83: 31-35.
54. Moreno RD, Lizama C, Urzua N, Vergara SP, Reyes JG. Caspase activation throughout thefirst wave of spermatogenesis in the rat. *Cell Tissue Res* 2006; 325: 533-540.
55. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 1997; 82(2): 291-295.
56. Jacob, R.A., The Integrated Antioxidant System. *Nutr Res* 1995; 15: 755-76.
57. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007; 297(8): 842-857.
58. Singh RP, Khanna R, Kaw JL, et al. Comparative effect of benzanthrone and 3-bromobenzanthrone on hepatic xenobiotic metabolism and anti-oxidative defense system in guinea pigs. *Arch Toxicol* 2003; 77: 94-99.
59. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 300: 535-543.
60. Liu R.H., , Potential synergy of phytochemicals in cancer prevent: mechanims of action, *J. Nutr.* 2004; 134: 3479-3485.

61. Mann J. Secondary Metabolism. Oxford Chemistry Series, Oxford: Clarendon Press, 1978.
62. Crozier A, Burns J, Aziz AA. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: Measurements and bioavailability. Biol. Res. 2000; 33: 79–88.
63. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. Front Biosci. 1999; 4: 339–345.
64. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Radic. Biol. Med. 2001; 31: 1287–1312.
65. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. Nutr. Cancer. 1992; 18: 1–29.
66. Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA. Plant polyphenols: Are they the new magic bullet? Proc. Nutr. Soc. 2003; 62: 599–603.
67. Malini P, Kanchana G, Rajadurai M. Antidiabetic efficacy of ellagic acid in streptozotocin induced diabetes mellitus in albino wistar rats, Asian J. Pharm. Clin. Res. 2011; 4: 127–128.
68. Yılmaz B, Usta C. Nar'ın (*Punica granatum*) terapötik etkileri. Türk Aile Hek Derg 2010; 14: 146-153.
69. García-Nino WR, Zazueta C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. Pharmacological Research. 2015; 97: 84–103.
70. Marwan AG, Nagel CW. Characterization of cranberry benzoates and their antimicrobial properties. J. Food Sci. 1986; 51: 1069–1070.
71. Chen H, Zuo Y, Deng Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by highperformance liquid chromatography. J. Chromatogr. A. 2001; 13: 387–395.
72. Anne S. Meyer, Heinonen, M., Edwin, N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation, Food Chemistry, Vol. 61, No. 1/2, pp. 1998; 71-75.
73. Venkatesan P, Rao MN. Structure-activity relationships for the inhibition of lipid peroxidation and the scavenging of free radicals by synthetic symmetrical curcumin analogues, J. Pharm. Pharmacol. 2000; 52: 1123–1128.

74. Nugroho A, Rhim TJ, Choi MY, et al. Simultaneous analysis and peroxynitrite-scavenging activity of galloylated flavonoid glycosides and ellagic acid in *Euphorbia supina*, Arch. Pharm. Res. 2014; 37: 890–898, <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-013-0307-z>
75. Hseu YC, Chou CW, Senthil KJ, et al. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes, Food Chem. Toxicol. 2012; 50: 1245–1255, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.020>.
76. ATSDR. Toxicological profile for carbon tetrachloride, U.S. Department of Health and Human services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005.
77. Khanduja, K.L., Gandhi, R.K., Pathania, V. And Syal, N., Prevention of NNitrosodiethylamine- induced Lung Tumorigenesis by Ellagic Acid and Quercetin in Mice, Food and Chemical Toxicology. 1999; 37: 313-318.
78. Vatter, D.A., Randhir, R., Shetty, K., Cranberry phenolics-mediated antioxidant enzyme response in oxidatively stressed porcine muscle Process, Biochemistry. 2005, 40: 2225-2238.
79. Placer ZA, Cushmann LL, Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation (as malondialdehyde) in biochemical systems. Analytical Biochemistry 1966; 16: 359-364.
80. Yılmaz S, Temizer Ozan, S. Meme Kanseri Hastalarda Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki, Türk Biyokimya Dergisi 2003; 28(4): 252-256.
81. Aebi H. Catalase. In: H.U. Bergmeyer (Ed.), Methods In Enzymatic Analysis, Academic Press New York: 1983; 276-286.
82. Chavan, S., Sava, L., Saxena, V., Pillai, S., Sontakke, A., Ingole, D. Reduced glutathione: Importance of specimen collection. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2005; 20(1): 150-152.
83. Sun Y, Oberley WL, and Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem. 1988; 34(3): 497-500.
84. Türkkani A. Gamma ışınlaşmasının testis seminifer tübülleri üzerindeki etkisinin ışık mikroskobu düzeyinde incelenmesi (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2001.

85. Hussein MR, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait A, Adly MA, Abdelraheem MH. Morphological evaluation of the radioprotective effects of melatonin against x-ray-induced early and acute testis damage in Albino rats: animal model. *Int J Exp Path* 2006; 87: 237-50.
86. Kangasniemi M, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Failure of spermatogenesis to recover despite the presence of A spermatogonia in the irradiated LBNF1 rat. *Biol Reprod* 1996; 54: 1200-8.
87. Ban Y, Komatsu T, Kemi M, Inagaki S, Nakatsuka T, Matsumoto H. Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats. *Exp Anim* 1995; 44(4): 315-22. 36
88. Muzaffer taş ve ark. "Protective Role of Vitamin C on Sperm Characteristics and Testicular Damage in Rats Exposed to Radiation" *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2014; 20(1): 59-64
89. Simon B, Lee SJ, Partridge AH, Runowicz CD. Preserving fertility after cancer. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 211-28.
90. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 80: 531-5.
91. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 331-45.
92. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasmamembrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2000; 15: 1338-44.
93. Çelik Ö, Aras A, Tuğın D, Hekimgil D, Yalman D, Esassolak M, Haydaroğlu A, "Sıçan Germ Hücrelerinde Radyasyona Bağlı Apoptoz Ve Amifostin İle İlişkisi" *Türkiye klinikleri tıp bilimleri dergisi*. 2004; 24 (2): 142-6.
94. Topçu Y. İyonize radyasyonun neden olduğu testis seminifer tübül hasarına karşı L-karnitinin koruyucu etkisinin ışık ve elektron mikroskopik düzeylerde icelenmesi (tez). *Trakya: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi*; 2001.
95. Çeribaşı A, Türk G, Sönmez M, Sakin F, Ateşşahin Ahmet, "Toxic Effect of Cyclophosphamide on Sperm Morphology, Testicular Histology and Blood Oxidant-

Antioxidant Balance, and Protective Roles of Lycopene and Ellagic Acid” Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2010; 107: 730–736.

96. Kaya İ, Deveci H, Karapehlivan M, Kükürt A. Piridin ve ellagik asit uygulanan farelerde oksidatif stres indeksinin araştırılması. *Avrasya Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2015; 31(3): 148-151. <http://dergipark.gov.tr/eurasianjvetsci/issue/24801/262022>.
97. Das U, Manna K, Sinha M, et al. Role of ferulic acid in the amelioration of ionizing radiation induced inflammation: a murine model. *PLoS One* 2014; 22: 97599.
98. Srinivasan M, Devipriya N, Kalpana KB, et al. Lycopene: an antioxidant and radioprotector against Gamma radiation-induced cellular damages in cultured human lymphocytes, *Toxicology* 2009; 262: 439.
99. Zhao W, Robbins ME. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications. *Curr. Med. Chem* 2009; 16: 130-143.
100. Kim JH, Jenrow KA, Brown SL. Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. *Radiat. Oncol. J.* 2014; 32: 103–115.
101. Khan S, Adhikari JS, Rizvi MA, Chaudhury NK. Radioprotective potential of melatonin against ⁶⁰Co γ- ray-induced testicular injury in male C57BL/6 mice. *J Biomed Sci.* 2015; 22(1): 1.
102. Chen H, Liu J, Luo L, Baig MU, Kim JM, Zirkin BR. Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol.* 2005; 40(8-9): 728-36.
103. Take G, Erdogan D, Helvacioğlu F, Göktas G, Ozbey G, Uluoglu C, Yücel B, Guney Y, Hicsonmez A, Ozkan S. Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42(7): 621-8.

8. ÖZGEÇMİŞ

17 Temmuz 1987 tarihinde Amasya Merzifon ilçesinde doğdum. 2004 yılında Gümüşhacıköy Lisesi'nden mezun olup 2006 Elazığ Sağlık Yüksekokulu Ebelik Bölümü'nü kazandım. 2010 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 2012 yılı güz döneminde Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Programı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

