



**T.C.**  
**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIRMIZI LED IŞIĞIN**  
**YAŞLI VE ERİŞKİN RATLARDA**  
**TESTİS HİSTOLOJİSİ VE SPERM PARAMETRELERİ**  
**ÜZERİNE OLASI TERAPÖTİK ETKİLERİ**

**Dr. Mert Evirgen**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. İbrahim Atilla ARIDOĞAN**

**ADANA-2025**



**T.C.**  
**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIRMIZI LED IŞIĞIN**  
**YAŞLI VE ERİŞKİN RATLARDA**  
**TESTİS HİSTOLOJİSİ VE SPERM PARAMETRELERİ**  
**ÜZERİNE OLASI TERAPÖTİK ETKİLERİ**

**Dr. Mert Evirgen**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. İbrahim Atilla ARIDOĞAN**

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından  
TTU-2025-17888 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ADANA-2025**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecim boyunca bilgi, birikim ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan ve bana örnek olan çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İbrahim Atilla ARIDOĞAN'a

Tez çalışmamın her aşamasında ilgi, destek ve özverisini esirgemeyen; bilgi birikimi, naifliği ve akademik yaklaşımıyla bu süreci benim için hem öğretici hem de ilham verici kılan Dr. Öğr. Üyesi Gülfıdan COŞKUN'a ve Prof. Dr. Sait POLAT başta olmak üzere Çukurova Üniversitesi Histoloji Anabilim Dalının değerli doktorlarına,

İhtisas eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle yetişmeme katkı sağlayan, hekimlik vizyonumu şekillendiren değerli hocalarım Prof. Dr. Nihat SATAR'a, Prof. Dr. Yıldırım BAYAZIT'a, Prof. Dr. Erkan DEMİR'e, Prof. Dr. Volkan İZOL'e, Doç. Dr. Mutlu DEĞER'e, Dr. Öğr. Üyesi Nebil AKDOĞAN'a, Dr. Öğr. Üyesi İsmail Önder YILMAZ'a ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Gürkan ARIKAN'a

Asistanlık sürecim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, dayanışmalarıyla ve dostluklarıyla bu zor yolculuğu anlamlı kılan beraber güldüğüm beraber emek verdiğim başta tüm değerli asistan arkadaşlarıma; kliniğimizde emek veren, özveriyle çalışan tüm hemşire ve personel ekip arkadaşlarıma

Tezimin istatistiksel analiz aşamasındaki katkıları için Arş. Gör. Püren Sevinç YÜCEL'e, biyokimyasal süreçlerdeki destekleri için Arş. Gör. Dr. Yusuf DÖĞÜŞ'e, Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik bölümünden çalışmama destek veren ve zenginlik katan Prof. Dr. Nazım AKSAKER'e, ayrıca SABİDAM biriminde görev yapan tüm değerli personel ile hayvan çalışmaları sürecinde özveriyle bana yardımcı olan veteriner hekim arkadaşlarıma

Hayatımın her döneminde olduğu gibi uzmanlık sürecimde de desteğini, sevgisini ve güvenini her zaman arkamda hissettiğim, tüm zorluklarda yanımda duran değerli ailem Erdal Evirgen, Mükerrerem Evirgen, Esila Evirgen ve tüm Evirgen ailesine, beni kendi evlatları gibi bağrılarına basan, ikinci ailem olarak gördüğüm, sevgileri ve destekleriyle her zaman güç veren Ahmet Şengezer, Müfide Şengezer ve tüm Şengezer ailesine  
Ve son olarak...

Hayat yolculuğunda en büyük şansım olan, ömrümü adadığım, sevgisi, sabrı, nezaketi ve desteğiyle her zaman yanımda olan canım eşim Yasemin Şengezer Evirgen'e

bu süreçte attığım her adımda bana güç verdiğin, varlığınla hayatımı güzelleştirdiğin için teşekkür ederim.

Dr. Mert Evirgen



## İÇİNDEKİLER

|                                                              |      |
|--------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR .....                                               | I    |
| İÇİNDEKİLER .....                                            | III  |
| TABLO LİSTESİ .....                                          | V    |
| ŞEKİL LİSTESİ .....                                          | VI   |
| RESİM LİSTESİ .....                                          | VII  |
| GRAFİK LİSTESİ .....                                         | VIII |
| KISALTMALAR .....                                            | IX   |
| ÖZET .....                                                   | XI   |
| ABSTRACT .....                                               | XII  |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ .....                                       | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                      | 2    |
| 2.1. Erkek Üreme Sistemi Anatomisi .....                     | 2    |
| 2.1.1. Penis .....                                           | 2    |
| 2.1.2. Skrotum .....                                         | 3    |
| 2.1.3. Testis Anatomisi .....                                | 4    |
| 2.1.3.1. Kan-Testis Bariyeri .....                           | 4    |
| 2.1.4. Epididim .....                                        | 6    |
| 2.1.5. Vaz Deferens .....                                    | 6    |
| 2.1.6. Seminal Veziküller .....                              | 7    |
| 2.2. Erkek Üreme Sistemi Histolojisi .....                   | 7    |
| 2.2.1. Testis .....                                          | 7    |
| 2.2.1.1. Seminifer Tübüller .....                            | 7    |
| 2.2.1.1.1. Spermatogenez .....                               | 8    |
| 2.2.1.1.2. Spermiyogenez .....                               | 9    |
| 2.2.1.2. Sertoli Hücreleri .....                             | 9    |
| 2.2.1.3. Leydig Hücreleri .....                              | 9    |
| 2.2.2. Epididimis .....                                      | 10   |
| 2.2.3. Duktus Deferens .....                                 | 10   |
| 2.2.4. Seminal Vezikül .....                                 | 11   |
| 2.2.5. Prostat .....                                         | 11   |
| 2.2.6. Bulboüretral Bezler .....                             | 11   |
| 2.2.7. Penis .....                                           | 11   |
| 2.3. Erkek Üreme Sisteminin Endokrin Kontrolü .....          | 12   |
| 2.3.1. Hipotalamo-Hipofiz-Testis Aksı .....                  | 12   |
| 2.3.1.1. Hipotalamustan Salgılanan Hormonlar .....           | 13   |
| 2.3.1.2. Hipofizden Salgılanan Hormonlar .....               | 14   |
| 2.3.1.2.1. FSH ve LH .....                                   | 14   |
| 2.3.1.3. Testisten Salgılanan Hormonlar .....                | 15   |
| 2.3.1.3.1. Testosteron .....                                 | 16   |
| 2.3.2. Melatoninin ve Erkek Üreme Sistemi ile İlişkisi ..... | 18   |
| 2.3.2.1. Melatonin Sentez, Dağılımı ve Metabolizması .....   | 18   |
| 2.3.2.2. Melatonin Fizyolojik Etkileri .....                 | 19   |
| 2.3.2.3. Melatoninin Testisler Üzerine Etkileri .....        | 20   |
| 2.4. İnsan Semen Analizi .....                               | 22   |
| 2.4.1. Örneklerin Toplanması .....                           | 22   |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.2. Örneklerin Makroskopik İncelemesi.....                                | 23 |
| 2.4.3. Mikroskopik İnceleme .....                                            | 23 |
| 2.4.4.. Sperm Sayısı ve Konsantrasyonu.....                                  | 24 |
| 2.4.5. Sperm Morfolojisi .....                                               | 25 |
| 2.4.6.. Sperm Canlılığı ve Hareketliliği .....                               | 27 |
| 2.5. Işık Yayan Diyot (LED) .....                                            | 28 |
| 2.5.1. LED Işığın Sağlık Alanında Kullanımı .....                            | 29 |
| 2.5.2. LED Işığın Testosteron ve Sirkadiyen Ritimle İlişkisi .....           | 30 |
| 2.5.2.1. Erkek Üreme Sistemi Sirkadiyen Ritim Genleri.....                   | 31 |
| 2.5.2.1.1. BMAL1 .....                                                       | 32 |
| 2.5.2.1.2 CLOCK .....                                                        | 32 |
| 2.5.2.1.3 PER1 & PER2 .....                                                  | 32 |
| 2.5.2.1.4 Klinik ve Deneysel Sonuçlar.....                                   | 32 |
| 2.5.3. LED Işığın Sperm Hücreleri Üzerine Etkileri .....                     | 33 |
| 2.5.3.1. Dalga Boylarına Göre LED Işıkların Etkileri .....                   | 33 |
| 2.5.3.2. Sperm DNA Bütünlüğü ve Akrozom Reaksiyonu Üzerine Etkileri.....     | 34 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM.....                                                      | 35 |
| 3.1. Deney Hayvanları .....                                                  | 35 |
| 3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....                                    | 35 |
| 3.3. Kırmızı LED Işık Maruziyeti.....                                        | 36 |
| 3.4. Anestezi, Analjezi ile Kan ve Histopatolojik Numunelerin Alınması ..... | 38 |
| 3.5. Testis doku örneklerinin ışık mikroskopik incelemesi .....              | 39 |
| 3.6. Testis Doku Kesitlerinde Histomorfometrik Analizler .....               | 40 |
| 3.7. Sperm Parametreleri .....                                               | 40 |
| 3.8. Testis Doku Kesitlerinde İmmünohistokimyasal Analizler .....            | 41 |
| 3.9. Testis Doku Kesitlerinde İmmünohistokimyasal Skorlama.....              | 42 |
| 3.10. Elektron Mikroskopi Yöntemleri.....                                    | 42 |
| 3.11. Biyokimyasal Analiz.....                                               | 43 |
| 3.12. İstatistiksel Analiz.....                                              | 44 |
| 4. BULGULAR.....                                                             | 45 |
| 4.1. Işık Mikroskopik Bulgular .....                                         | 45 |
| 4.2. Histomorfometrik Bulgular .....                                         | 47 |
| 4.3. Sperm Sayısı ve Sperm Morfolojisi Bulguları.....                        | 48 |
| 4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular.....                                       | 51 |
| 4.4.1. PCNA İmmünreaktivitesi .....                                          | 51 |
| 4.4.2. 3 $\beta$ -HSD İmmünreaktivitesi .....                                | 52 |
| 4.4.3. BMAL1 İmmünohistokimyasal Bulguları.....                              | 54 |
| 4.5. Elektron Mikroskopik Bulgular .....                                     | 55 |
| 4.6. Biyokimyasal Bulgular .....                                             | 60 |
| 5. TARTIŞMA.....                                                             | 66 |
| 6. SONUÇ.....                                                                | 74 |
| 7. KAYNAKLAR .....                                                           | 76 |

## TABLO LİSTESİ

| Tablo no                                                                       | Tablo no |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Tablo 1.</b> Semen Analizi Alt Referans Limitleri <sup>67</sup> .....       | 25       |
| <b>Tablo 2.</b> Testis Dokusu Işık Mikroskopik Doku Takip İşlemi .....         | 40       |
| <b>Tablo 3.</b> Elektron Mikroskopik Doku Takibinde Dehidratasyon İşlemi ..... | 42       |
| <b>Tablo 4.</b> Elektron Mikroskopik Doku Takibinde Şeffaflandırma İşlemi..... | 43       |
| <b>Tablo 5.</b> Histomorfometrik Bulguların Dağılımı.....                      | 48       |
| <b>Tablo 6.</b> Sperm Parametrelerinin Dağılımı .....                          | 50       |
| <b>Tablo 7.</b> 3β-HSD Pozitif Hücre Sayısının Dağılımı.....                   | 54       |
| <b>Tablo 8.</b> Biyokimyasal Parametrelerin Dağılımı.....                      | 60       |



## ŞEKİL LİSTESİ

| Şekil no                                                                                                              | Sayfa no |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Şekil 1. Penis Anatomisi .....                                                                                        | 3        |
| Şekil 2. Testis Anatomisi .....                                                                                       | 4        |
| Şekil 3. Kan-Testis Bariyeri.....                                                                                     | 6        |
| Şekil 4. Spermatogenez Döngüsü.....                                                                                   | 8        |
| Şekil 5. Epididimis Bölümleri (A) ve Hücreleri (B) .....                                                              | 10       |
| Şekil 6. Penis Histolojik Kesiti.....                                                                                 | 12       |
| Şekil 7. Hipotalamo-Hipofiz-Testis Aksı.....                                                                          | 13       |
| Şekil 8. Erkeklerde Yaşa Göre Ortalama Serum Testosteron Seviyeleri .....                                             | 16       |
| Şekil 9. Melatoninin Testiküler Steroid Hormonlar Üzerine Etkileri.....                                               | 21       |
| Şekil 10. Spermin Yapısal Özellikleri <sup>7</sup> .....                                                              | 26       |
| Şekil 11. Morfolojik ve Fonksiyonel Açıdan Yeterli (Sol) ve Yetersiz (Sağ) Özellikler<br>Taşıyan Spermatozoalar ..... | 27       |
| Şekil 12. Doğal ışık ile LED ışık arasındaki spektral farklılık.....                                                  | 29       |
| Şekil 13. Erkek Üreme Sisteminde Sirkadiyen Ritim .....                                                               | 33       |



## RESİM LİSTESİ

| Resim no                                                                                             | Resim no |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Resim 1.</b> Deney Düzenğinde Kırmızı LED Aydınlatma Koşullarında Barındırılan Sıçanlar.....      | 37       |
| <b>Resim 2.</b> Deney Hayvanlarında Kan Örneklerinin Alınması ve Bilateral Orşiektomi İşlemleri..... | 39       |
| <b>Resim 3.</b> Ratlardan Çıkarılan Testis ve Epididimis Örnekleri .....                             | 41       |
| <b>Resim 4.</b> Testis Doku Kesitlerinin Işık Mikroskopik Görünümü, H&E. Bar=100µm...                | 47       |
| <b>Resim 5.</b> Sperm Morfoloji Değerlendirmesi .....                                                | 51       |
| <b>Resim 6.</b> Testis Doku Kesitlerinde PCNA İmmünreaktivitesi Bar=50 µm.....                       | 52       |
| <b>Resim 7.</b> Testis Doku Kesitlerinde 3β-HSD İmmünreaktivitesi Bar=50 µm.....                     | 53       |
| <b>Resim 8.</b> Testis Doku Kesitlerinde BMAL1 İmmünreaktivitesi Bar=50 µm.....                      | 55       |
| <b>Resim 9.</b> G1 Grubu Testislerin Elektron Mikroskopi İncelemesi .....                            | 57       |
| <b>Resim 10.</b> G2 Grubu Testislerin Elektron Mikroskopi İncelemesi .....                           | 58       |
| <b>Resim 11.</b> G3 Grubu Testislerin Elektron Mikroskopi İncelemesi.....                            | 59       |
| <b>Resim 12.</b> G4 Grubu Testislerin Elektron Mikroskopi İncelemesi .....                           | 60       |

## GRAFİK LİSTESİ

| Grafik no                                                                                    | Grafik no |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Grafik 1.</b> Deneyde Kullanılan LED'in Optik Tayfı. ....                                 | 37        |
| <b>Grafik 2.</b> Ortalama Sperm Sayısının Gruplar Arasındaki Dağılımı.....                   | 49        |
| <b>Grafik 3.</b> Ortalama Sperm Motilitesinin Gruplara Göre Dağılımı .....                   | 50        |
| <b>Grafik 4.</b> Ortalama 3 $\beta$ -HSD Pozitif Hücre Sayısının Gruplara Göre Dağılımı..... | 54        |
| <b>Grafik 5.</b> Ortalama Melatonin değerinin gruplar arasındaki dağılımı .....              | 61        |
| <b>Grafik 6.</b> Ortalama GPX1 değerinin gruplar arasındaki dağılımı.....                    | 62        |
| <b>Grafik 7.</b> Ortalama Testosteron değerinin gruplar arasındaki dağılımı .....            | 63        |
| <b>Grafik 8.</b> Ortalama SOD değerinin gruplar arasındaki dağılımı.....                     | 63        |
| <b>Grafik 9.</b> Ortalama LH değerinin gruplar arasındaki dağılımı .....                     | 64        |
| <b>Grafik 10.</b> Ortalama MDA değerinin gruplar arasındaki dağılımı .....                   | 65        |

## KISALTMALAR

|                                   |                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>3<math>\beta</math>-HSD</b>    | : 3 Beta-Hidroksisteroid Dehidrogenaz                     |
| <b>ABP</b>                        | : Androjen Bağlayıcı Protein                              |
| <b>AMH</b>                        | : Mülleryan İnhibe Edici Hormon                           |
| <b>BMAL1</b>                      | : Brain and Muscle ARNT-Like 1                            |
| <b>CO<sub>2</sub></b>             | : Karbondioksit                                           |
| <b>DHT</b>                        | : Dihidrotestosteron                                      |
| <b>DSÖ</b>                        | : Dünya Sağlık Örgütü                                     |
| <b>EDTA</b>                       | : Etilendiamintetraasetik asit                            |
| <b>FDA</b>                        | : ABD Gıda ve İlaç Dairesi                                |
| <b>FSH</b>                        | : Folikül Uyarıcı Hormon                                  |
| <b>GABA</b>                       | : Gama Amino Bütirik Asit                                 |
| <b>GnRH</b>                       | : Gonadotropin Salgılatıcı Hormon                         |
| <b>GPX1</b>                       | : Glutasyon Peroksidaz-1                                  |
| <b>H&amp;E</b>                    | : Hemotoksilen-Eozin                                      |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : Hidrojen Peroksit                                       |
| <b>KTB</b>                        | : Kan-Testis Bariyeri                                     |
| <b>LED</b>                        | : Light Emitting Diode                                    |
| <b>LH</b>                         | : Luteinize Edici Hormon                                  |
| <b>LLLT</b>                       | : Düşük Seviyeli Işık/Lazer Terapisi                      |
| <b>lm</b>                         | : Lümen                                                   |
| <b>lx</b>                         | : Lüks                                                    |
| <b>MDA</b>                        | : Malonaldehit                                            |
| <b>NIR</b>                        | : Kızılötesi                                              |
| <b>nm</b>                         | : Nanometre                                               |
| <b>NO</b>                         | : Nitrik Oksit                                            |
| <b>PCNA</b>                       | : Proliferating Cell Nuclear Antigen                      |
| <b>ROR<math>\alpha</math></b>     | : Retinoik Asit Reseptör $\alpha$                         |
| <b>ROS</b>                        | : Reaktif Oksijen Türleri                                 |
| <b>SABİDAM</b>                    | : Sağlık Bilimleri Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi |
| <b>SER</b>                        | : Agranüler Endoplazmik Retikulum                         |

**SHBG** : Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin

**SOD** : Süperoksit Dismutaz

**UV** : Ultraviyole

**µm** : Mikrometre



## ÖZET

### Kırmızı Led Işığın Yaşlı Ve Erişkin Ratlarda Testis Histolojisi Ve Sperm Parametreleri Üzerine Olası Terapötik Etkileri

**Giriş ve Amaç:** Testisler, erkek üreme sisteminin en temel organları arasında yer almakta olup, sperm üretimi ve erkek cinsiyet hormonlarının sentezinden sorumludur. Yaşlanmayla birlikte testis dokusunda seminifer epitelde incelme, tübül çapında azalma, testosteron seviyelerinde düşüş ve sperm parametrelerinde belirgin bozulma ortaya çıkmaktadır. Fotobiyomodülasyon temelli non-invaziv uygulamaların son yıllarda çeşitli dokular üzerinde düzenleyici ve rejeneratif etkilere sahip olabileceği gösterilmiş olsa da, kırmızı LED ışığının testiküler yapı ve sperm kalitesi üzerindeki etkilerini yaşa göre karşılaştırmalı olarak değerlendiren çalışma sayısı sınırlıdır. Bu çalışmada, kırmızı LED ışığının erişkin ve yaşlı ratlarda testis histolojisi ve sperm parametreleri üzerine olası düzenleyici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı sonrası (24.04.2025/karar no:1) 24 erkek Wistar-Albino sıçan kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada ağırlıklarına ve yaşlarına göre erişkin ve yaşlı erkek Wistar-Albino sıçanlardan oluşan her grupta 6 adet sıçan bulunan dört grup kullanılmıştır: Erişkin kontrol (G1), erişkin LED (G2), yaşlı kontrol (G3) ve yaşlı LED (G4). Tüm sıçanlar standart laboratuvar koşullarında 12 saat aydınlık–12 saat karanlık döngüsünde 30 gün boyunca barındırılmıştır. LED gruplarında kırmızı LED ışığı (2835 SMD Şerit Led; 4.8 W/620-750 nm/ 155 lm) sıçan kafeslerinin 20 cm üzerine yerleştirilip her gün aynı protokole göre uygulanmıştır. Deney sonunda alınan testis doku örnekleri histomorfometrik ve immünohistokimyasal açıdan değerlendirilmiş, alınan kan örneklerinden de biyokimyasal parametreler ölçülmüştür. İstatistik analizleri SPSS 20.0 programında gerçekleştirilmiş ve  $p<0,05$  önemli kabul edilmiştir.

**Bulgular:** Gruplar arasında SOD ( $p=0,272$ ), GPX1 ( $p=0,001$ ), Melatonin ( $p=0,102$ ), LH ( $p=0,267$ ) biyokimyasal değerlerinde anlamlı fark bulunmamıştır. Testosteron ( $p<0,001$ ) ve MDA ( $p<0,001$ ) düzeyleri açısından G1–G2 ve G3–G4 grupları arasında anlamlı farklılıklar saptandı. Histolojik değerlendirmelerde ise seminifer tübül epitel kalınlığı ( $p<0,001$ ), sperm sayısı ( $p<0,001$ ) ve sperm motilitesi ( $p<0,001$ ) bakımından gruplar arasında anlamlı farklar belirlendi. Özellikle G4 grubunda elde edilen olumlu bulguların, G3 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. İmmünohistokimyasal olarak incelenen PCNA, BMAL1, 3 $\beta$ -HSD immünreaktivitesinde de G4 grubunda G3 grubuna kıyasla anlamlı farklar bulundu ( $p<0,05$ ). G2 grubunda ise sayısal olarak olumlu bir artış tespit edilse de istatistiksel bir fark bulunamadı.

**Sonuç:** Bu çalışma kırmızı LED ışığının testiküler yapı ve sperm parametreleri üzerinde iyileştirici etkiler oluşturabileceğini göstermektedir. Özellikle yaşlı sıçanlarda ortaya çıkan sonuçlar kırmızı LED terapisinin yaşlanmaya bağlı testiküler dejenerasyonun azaltılmasında potansiyel bir non-invaziv yaklaşım olabileceğini göstermektedir. Ancak daha geniş örneklemli ve moleküler düzeyde desteklenen çalışmalarla mekanizmanın ayrıntılı şekilde ortaya konması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kırmızı LED ışık, Fotobiyomodülasyon, Testis histolojisi, Sperm parametreleri, Yaşlanma, Sıçan

## ABSTRACT

### Potential Therapeutic Effects of Red Led Light on Testicular Histology and Sperm Parameters in Aged and Adult Rats

**Introduction and Aim:** The testes are among the most essential organs of the male reproductive system, responsible for sperm production and the synthesis of male sex hormones. Aging is associated with thinning of the seminiferous epithelium, decreased tubular diameter, reduced testosterone levels, and significant deterioration in sperm parameters. Although non-invasive photobiomodulation-based applications have recently been shown to exert regulatory and regenerative effects on various tissues, the number of studies comparatively evaluating the effects of red LED light on testicular structure and sperm quality across different age groups remains limited. This study aimed to investigate the potential regulatory effects of red LED light on testicular histology and sperm parameters in adult and aged rats.

**Materials and Methods:** Following approval from the Çukurova University Local Ethics Committee for Animal Experiments (24.04.2025/decision no: 1), 24 male Wistar–Albino rats were used. The study consisted of four groups, each containing six rats classified by age and body weight: adult control (G1), adult LED (G2), aged control (G3), and aged LED (G4). All rats were housed under standard laboratory conditions with a 12-hour light–12-hour dark cycle for 30 days. In LED groups, red LED light (2835 SMD Strip LED; 4.8 W/620–750 nm/155 lm) was placed 20 cm above the cages and applied daily according to a fixed protocol. Testis tissue samples collected at the end of the experiment were evaluated histomorphometrically and immunohistochemically, while biochemical parameters were measured from blood samples. Statistical analyses were performed using SPSS 20.0 software, with  $p < 0.05$  considered significant.

**Results:** No significant differences were found among the groups in terms of the biochemical parameters SOD ( $p = 0.272$ ), GPX1 ( $p = 0.001$ ), melatonin ( $p = 0.102$ ) and LH ( $p = 0.267$ ). Significant differences were observed between the G1–G2 and G3–G4 groups with respect to testosterone ( $p < 0.001$ ) and MDA ( $p < 0.001$ ) levels. Histological evaluations revealed significant differences among the groups in terms of seminiferous tubule epithelial thickness ( $p < 0.001$ ), sperm count ( $p < 0.001$ ), and sperm motility ( $p < 0.001$ ). In particular, the positive findings observed in the G4 group were found to be statistically significant compared with the G3 group. Immunohistochemical analysis of PCNA, BMAL1, and 3 $\beta$ -HSD immunoreactivity also demonstrated significant differences in the G4 group compared with the G3 group ( $p < 0.05$ ). Although a numerically positive increase was detected in the G2 group, no statistically significant difference was found. **Conclusion:** This study demonstrates that red LED light may exert beneficial effects on testicular structure and sperm parameters. The findings, particularly in aged rats, suggest that red LED therapy could represent a potential non-invasive approach to mitigating age-related testicular degeneration. However, studies with larger sample sizes and more extensive molecular analyses are needed to elucidate the underlying mechanisms in detail.

**Keywords:** Red LED light, Photobiomodulation, Testicular histology, Sperm parameters, Aging, Rat

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Testisler, erkek üreme sisteminin en temel organları arasında yer almakta olup, sperm üretimi ve erkek cinsiyet hormonlarının sentezinden sorumludur. Bu hormonlar arasında yer alan testosteron, hem cinsel işlevlerin devamı hem de spermatogenez sürecinin sağlıklı bir şekilde yürütülmesi açısından kritik öneme sahiptir. Ancak yaşlanma süreciyle birlikte testiküler fonksiyonlarda azalma, testosteron düzeylerinde düşüş ve buna bağlı olarak sperm kalitesinde bozulmalar görülmektedir.<sup>1</sup>

Son dönemde, düşük maliyetli ve invaziv olmayan tedavi yaklaşımlarına olan ilgi artmış, özellikle ışık temelli biyofiziksel uygulamalar bu alanda dikkat çekmiştir. LED (Light Emitting Diode) teknolojisiyle yapılan bazı deneysel çalışmalar, hücresel yenilenme ve hormon üretimi üzerinde olumlu etkiler sağlayabileceğini göstermiştir.<sup>2</sup> Özellikle kırmızı LED ışığın, bazı hücre tiplerinde metabolik aktiviteyi artırarak rejeneratif süreçleri desteklediği belirtilmiştir.<sup>3</sup> Buna rağmen, LED ışığın testiküler yapı ve sperm parametreleri üzerindeki doğrudan etkilerini yaşa göre karşılaştırmalı olarak in vivo koşullarda araştıran yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, kırmızı LED ışığının yaşlı ve erişkin sıçanlarda testis dokusu ile sperm kalitesi üzerine olası düzenleyici etkileri araştırılarak, fotobiyomodülasyon temelli tedavilerin erkek üreme sağlığına katkısı değerlendirilecek, testiküler yapı ve sperm kalitesi üzerindeki biyolojik etkileri araştırılacaktır. Araştırma kapsamında testis dokusunun histolojik ve immünohistokimyasal özellikleri, testosteron düzeyi ve çeşitli sperm parametreleri karşılaştırmalı olarak incelenecektir.

Çalışma sonucunda elde edilecek veriler, yaşlanmaya bağlı testiküler bozulmaların tedavisinde yeni ve invaziv olmayan bir yaklaşım olarak kırmızı LED ışık uygulamasının potansiyelini ortaya koymayı hedeflemektedir. Bu bağlamda, hem temel bilimsel bilgiye katkı sağlanması hem de gelecekte geliştirilecek klinik uygulamalara altyapı oluşturulması amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Erkek Üreme Sistemi Anatomisi

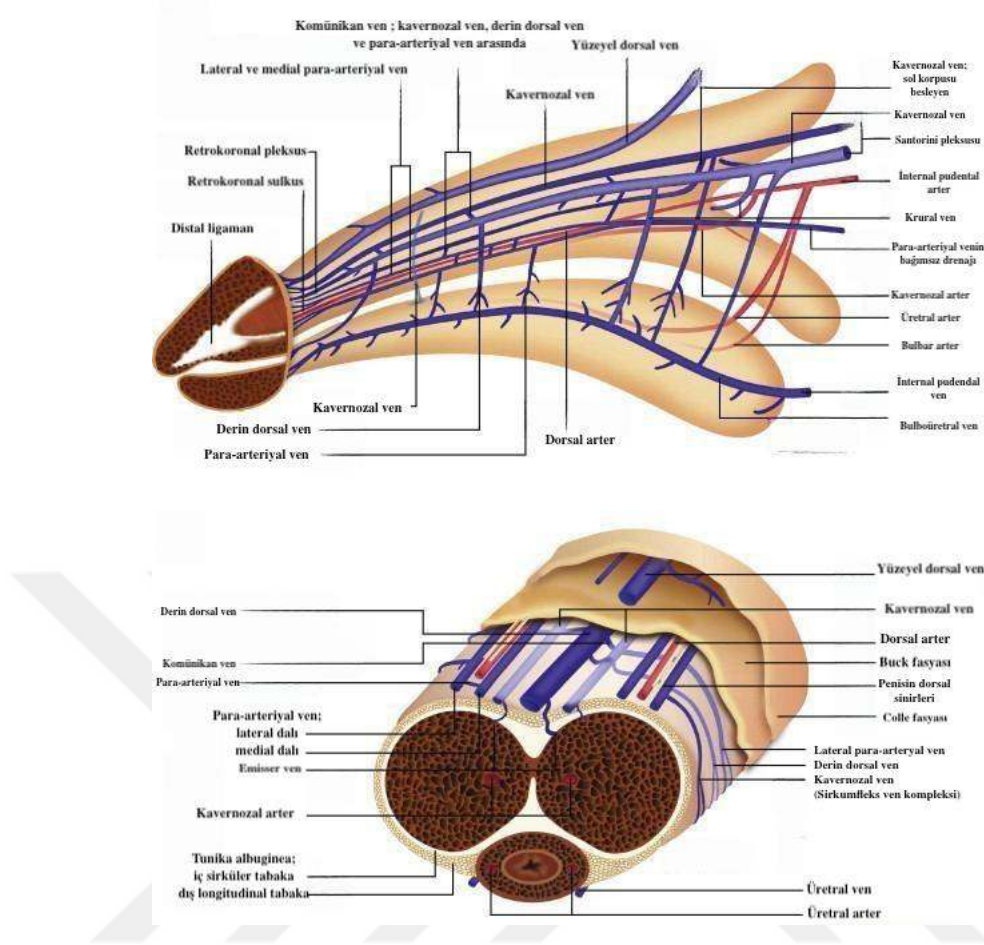
Erkek üreme sistemi, dış ve iç genital organlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Dış genital yapıların başlıcaları penis ve skrotumdan oluşurken; iç genital organlar testisler, epididim, duktus deferens, seminal veziküller, prostat bezi, bulboüretal bezler ve ejakülatör kanallardır.

#### 2.1.1. Penis

Penis; radiks (kök) ve korpus (gövde) olmak üzere iki anatomik bölüme ayrılır. Bu yapı, ligamentum fundiforme ve ligamentum süspensoryum aracılığıyla karın ön duvarına tutunur. Radiks penis; bulbus penis ve krus penis bölümlerinden oluşur. Korpus penis, çift korpus kavernoza ve tek korpus spongiyozumdan meydana gelir. Bu erektil yapılar, içten dışa doğru sırasıyla tunika albuginea ve fasya penis profunda (Buck fasyası) ile sarılmıştır. Distal uçta, korpus spongiyozum genişleyerek glans penis yapısını oluşturur. Penisin katmanları dıştan içe doğru; cilt, dartos tabakası, buck fasyası ve tunika albuginea şeklinde sıralanır.<sup>4</sup> (Şekil 1)<sup>5</sup>

Penisin cilt bölgesi eksternal pudendal arterin dallarıyla beslenirken, derin dokular internal pudendal arterin devamı olan penil arterin kolları ile kanlanır. Bu arter; bulboüretal, kavernoza ve dorsal penil arterlere ayrılır. Kavernoza arter, doğrudan korpus kavernoza, bulboüretal arter ise korpus spongiyozumu besler. Dorsal arter, penisin dorsal yüzeyine yayılım gösterir.<sup>5</sup>





Şekil 1. Penis Anatomisi<sup>5</sup>

### 2.1.2. Skrotum

Skrotum, sperm üretimi için ideal olan vücut sıcaklığından 2–4°C daha düşük bir ortam sağlar. Orta hattaki rafe adı verilen fibröz septum, skrotumu iki bölmeye ayırır. Soğuk ortamda termoregülasyonu sağlayan iki temel kas vardır: yüzeysel dartos kası; deride kırışıklık oluşturur ve kremaster kası; testisleri yukarı çeker. Skrotum katmanları dıştan içe doğru şu şekilde sıralanır:

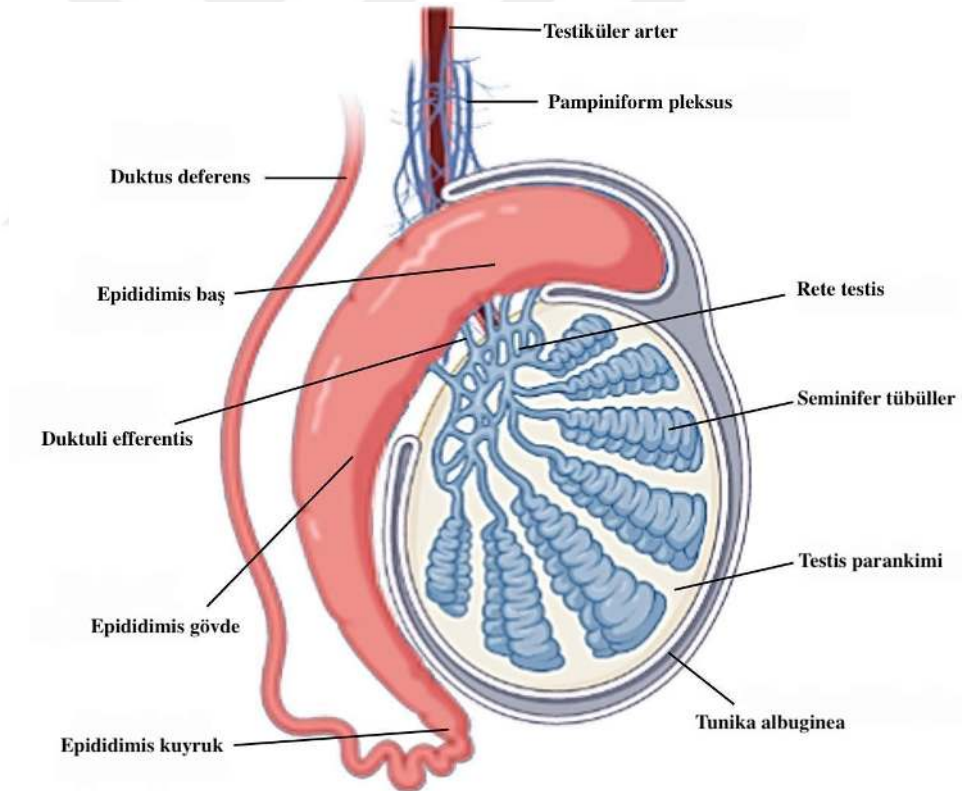
- Deri,
- Tunika dartos,
- Fasya spermatika eksterna,
- Fasya kremaster,
- Muskulus kremaster,
- Fasya spermatika interna,

- Tunika vajinalisin pariyetal yaprağı<sup>6</sup>

### 2.1.3. Testis Anatomisi

Sağlıklı bir erkekte testis hacmi ortalama 15–25 cc olup uzunluğu 4.5–5.1 cm'dir. Embriyolojik gelişim sırasında testisler, Y kromozomu üzerindeki SRY geni aracılığıyla farklılaşır. Leydig hücreleri testosteron, Sertoli hücreleri ise Mülleryan inhibe edici hormon (AMH) üretir. Bu hormonlar, erkek iç genital yapıların gelişimini yönlendirir.<sup>7</sup>

Testis dıştan içe doğru dört kapsül tabakasıyla çevrilidir: tunika vajinalis, tunika visseralis, tunika albuginea ve tunika vasküloza. Testislerin içi yaklaşık 800–1000 seminifer tübül içerir. Bu tübüller spermatozoa üretiminin gerçekleştiği mikroskopik kanallardır. Tübüller, rete testise, oradan da duktuli efferentes aracılığıyla epididime bağlanır. Epididimden sonra sperm, duktus deferens yoluyla taşınır.<sup>8</sup> (Şekil 2)<sup>9</sup>



Şekil 2. Testis Anatomisi<sup>9</sup>

#### 2.1.3.1. Kan-Testis Bariyeri

Kan-testis bariyeri (KTB), testisteki seminifer tübüllerde gelişen sperm hücrelerini hem fiziksel etkilerden hem de bağışıklık sisteminin olası tepkilerinden

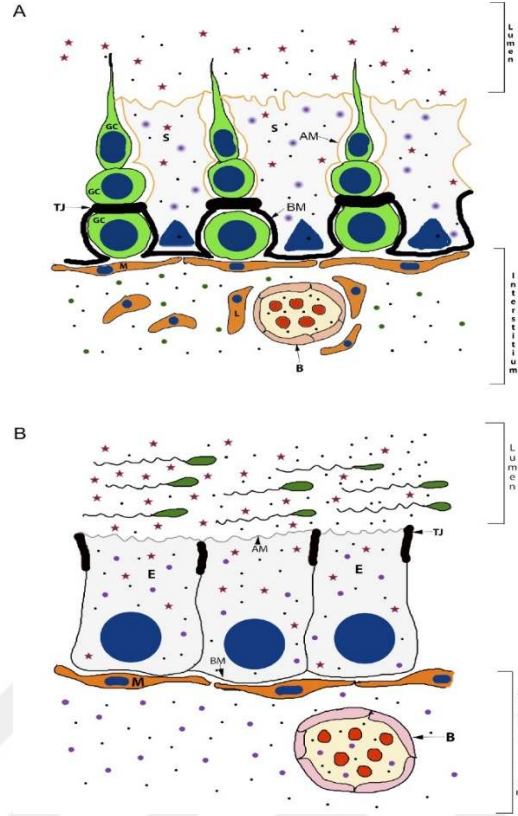
korumak amacıyla oluşmuş, oldukça özgün bir yapıdır. Bu bariyer yalnızca hücreler arası sıkı bağlantılardan ibaret değildir; yapısal, işlevsel ve bağışıklıkla ilişkili çeşitli hücresel bileşenlerin bütüncül katkısıyla etkinliğini sürdürür.<sup>10</sup>

KTB' nin temelini oluşturan Sertoli hücreleri, birbirlerine sıkı bağlantılar ile bağlanarak seminifer epiteli ikiye ayırır. Bu yapı sayesinde, gelişmekte olan germ hücreleri, kan dolaşımındaki yabancı moleküllerden izole edilir. Klaudin-11 ve okludin gibi bağlantı proteinleri, bu izolasyonda önemli rol oynar. Ayrıca Sertoli hücreleri arasında yer alan aralıklı bağlantı ve adezyon bağlantıları, hücreler arası iletişimi ve koordinasyonu sağlar.<sup>11</sup> (Şekil 3)<sup>12</sup>

Bu bariyer, yalnızca fiziksel bir sınır değil, aynı zamanda maddelerin geçişini düzenleyen bir fizyolojik sistem olarak da işlev görür. Sertoli hücrelerinin bazolateral ve apikal yüzeylerinde bulunan taşıyıcı proteinler ve kanallar, tübül içi ortamın içeriğini belirleyerek germ hücrelerinin sağlıklı gelişimini destekler.<sup>12</sup>

KTB aynı zamanda bir bağışıklık koruma alanı oluşturur. Testise özgü antijenlerin bağışıklık sistemiyle temasını sınırlandırarak otoimmün yanıtların önüne geçer. Sertoli hücrelerinin salgıladığı bazı düzenleyici moleküller de bu bağışıklık dengesini destekler.<sup>13</sup>

Sonuç olarak, KTB'nin işleyişi; hücreler arası bağlantılar, madde geçiş kontrolü ve bağışıklık düzenlemesi gibi farklı düzeylerde birbiriyle uyumlu çalışan hücresel mekanizmalarla sağlanır. Bu sayede testis içinde sperm gelişimi için gerekli olan istikrarlı ve korunaklı bir ortam oluşturulur.<sup>12</sup>



**Şekil 3. Kan-Testis Bariyeri<sup>12</sup>**

(AM: apikal membran; B: kan damarı; BM: bazal membran; E: epididimal epitelyal hücre; GC: germ hücre; L: Leydig hücre; M: myoid hücre; S: Sertoli hücre; TJ: sıkı bağlantı.)

#### 2.1.4. Epididim

Epididim, spermatozoaların matürasyon ve depolanmasından sorumlu uzun ve kıvrımlı bir kanaldır. Kaput (baş), korpus (gövde) ve kauda (kuyruk) olmak üzere üç anatomik bölümden oluşur. Duktuli efferentes, rete testisten çıkarak epididim başında birleşir ve epididim kanalını oluşturur. Epididim, spermatozoaların taşınması ve olgunlaşmasını sağlayan düz kas kasılmalarına sahiptir. Ayrıca motilite ve fertilite kapasitelerini artırıcı proteinleri sentezleyerek seminal sıvıya katkıda bulunur.<sup>14</sup>

#### 2.1.5. Vaz Deferens

Yaklaşık 45 cm uzunluğundaki vaz deferens, epididimin kuyruk bölgesinden başlayarak mesane arkasındaki seminal veziküllerle birleşerek ejakülatör kanalları oluşturur. Vaz deferens, embriyolojik olarak mezonefrik kanaldan gelişir ve iç yapısı ampulla ve vazal segment olmak üzere iki bölüme ayrılır. Vasküler beslenmesi deferensiyal arterle, venöz dönüşü ise hipogastrik ven ile sağlanır.<sup>15</sup>

### **2.1.6. Seminal Veziküller**

Seminal veziküller, birer salgı bezi olmakla beraber Wolf kanalının kaudal ucundaki genişlemelerden gelişerek, ejakülatör kanallara açılırlar. Spermli, proteinler, fruktoz ve çeşitli enzimlerle desteklerler. Total ejakülat hacminin %46–80'ini oluştururlar. Seminal vezikül salgısının çeşitli görevleri olmakla beraber; sperm aglütinasyonunu önlediği, sperm plazma membranını stabilize ettiği, sperm kaybını azaltmak için koagulum oluşturduğu ve kadın üreme sisteminde düz kas aktivitesini uyararak lenfositik reaksiyonları inhibe ettiği bilinmektedir.<sup>16</sup>

## **2.2. Erkek Üreme Sistemi Histolojisi**

Testis, epididimis, duktus deferens, seminal vezikül, prostat ve penisten oluşan erkek ürogenital sistemi oldukça kompleks bir histolojik yapıya sahiptir.

### **2.2.1. Testis**

Testis skrotum içerisinde yerleşen ve aynı zamanda endokrin fonksiyonlara da sahip bir organdır. Etrafında tunika albuginea tabakası tarafından sarılan testisin ana elemanlarını Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve seminifer tübüller oluşturmaktadır. Tunika albuginea tabakasından testisin merkezine doğru fibröz uzantılar mevcuttur. Bu fibröz uzantılar testisi lobüle hale getirir ve yaklaşık 250 lobül bulunur. Bu lobüllerin her birinde 1 ile 4 arası sayılarda spermatozoa üretiminden sorumlu seminifer tübüller bulunur. Ayrıca seminifer tübüllerin etrafında gevşek bağ dokusunu oluşturan Leydig hücreleri ve bu hücrelerle beraber yoğun kan ve lenf damarları da bulunmaktadır.<sup>17</sup>

#### **2.2.1.1. Seminifer Tübüller**

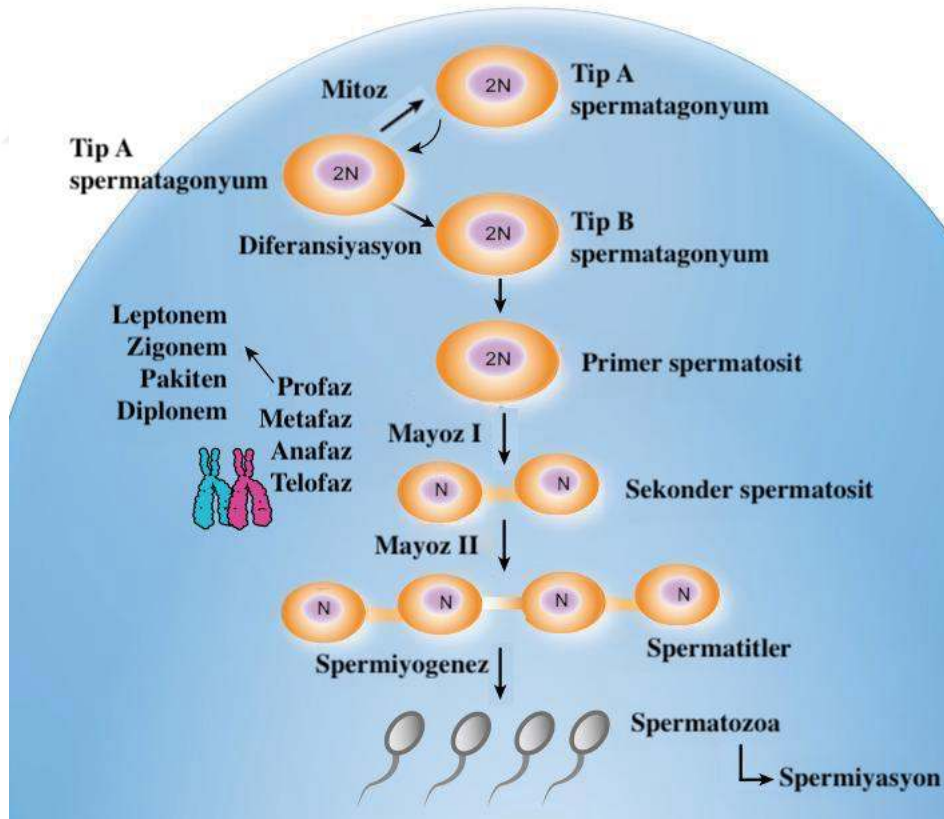
Testis dokusunun yaklaşık %80-90'ını oluşturan ve üremeden sorumlu spermatozoa üretim merkezi olan hücresel yapıdır. Her bir testiste 250-1000 arasında seminifer tübül bulunur. Kıvrımlı yapısı sayesinde yaklaşık 30-70 cm uzunluklara ulaşabilir.<sup>17</sup> Tübüllerin lümeni son kısımlarına doğru daralarak düzleşme eğilimindedir. Bu yapılar tubuli rekti ismi verilmekte olup mediastinum testis içerisindeki rete testislere açılmaktadırlar. Rete testisler de kendi aralarında birleşerek duktus efferentislere bağlanıp kaput epididimise açılmaktadırlar.<sup>18</sup>

Seminifer tübüllerin ana histolojik yapısını spermatogonik hücreler ve bu hücrelerin arasında destek hücre konumunda bulunan Sertoli hücrelerinden oluşmaktadır.<sup>17</sup>

Seminifer tübüllerde, spermatozoa üretimi spermatogenez ve spermiyogenez aşamaları ile gerçekleşir.

#### 2.2.1.1.1. Spermatogenez

Spermatogonyumların spermatozoalara dönüştüğü süreç olarak adlandırılabilir. Puberte sonrası spermatogonyumlar mitoz bölünme ile çoğalmaya başlar. Olgunlaşma sürecinin ardından 46 kromozomlu primer spermatositlere dönüşürler ( $46 + XY$ ). Primer spermatositler mayoz bölünmeye girerek 23 kromozomlu sekonder spermatositleri oluştururlar. Sekonder spermatositler ise 2. mayoz bölünmeye girerek spermatitleri oluştururlar. Tüm bu süreçte, mayoz bölünme öncesinde krossing-over denilen genetik materyal aktarımı gerçekleşir ve genetik çeşitlilik sağlanmış olur.<sup>19</sup> (Şekil 4)<sup>20</sup>



Şekil 4. Spermatogenez Döngüsü<sup>20</sup>

#### **2.2.1.1.2 Spermiyogenez**

Spermatogenez sonrası oluşan spermatitlerin spermatozoaya dönüştüğü sürece spermiyogenez denir. Bu süreçte herhangi bir bölünme gerçekleşmezken olgunlaşma süreci görülür. Spermiyogenez spermatitlerin yapısının oldukça değiştiği 3 fazdan oluşur (golgi, akrozomal, olgunlaşma). Süreç boyunca spermatitler Sertoli hücrelerinin bazal membranına tutunarak olgunlaşırlar ve spermiyogenezi tamamlarlar.<sup>21</sup>

Spermatogonyumdan başlayan süreç spermatazoa oluşmasına kadar yaklaşık 64 gün sürer. Seminifer tübüllerde gerçekleşen bu döngü, her bir seminifer tübül içerisinde farklı aşamalarda olabilir.<sup>21</sup>

#### **2.2.1.2. Sertoli Hücreleri**

Seminifer tübüllerdeki hücreleri sararak destek sağlayan ve primidal şekliyle bazal membrandan tübül lümenine uzanan hücrelerdir. Sağlam yapıları sayesinde dış etkilere karşı oldukça dayanıklıdır.<sup>17</sup>

Destek görevlerinin yanında aralarındaki sıkı bağlantılar sayesinde KTB yapısında da bulunurlar. (Şekil 3)<sup>12</sup>

Sertoli hücreleri endokrin ve sekresyon fonksiyonları da bulunmaktadır. Androjen bağlayıcı protein (ABP), inhibin ve AMH salgırlar. Testosteronu estradiyole çevirirler. ABP seminifer tübüllerde testosteron konsantrasyonunu arttırarak sperm oluşumuna katkı sağlamaktadır. ABP salınımı, FSH ve testosteron ile kontrol mekanizması aracılığı ile kontrol edilir. Endokrin fonksiyonları hipofizer FSH ile kontrol edilen Sertoli hücreleri, inhibin salgılayarak FSH salınımını inhibe eder ve FSH döngüsünde rol oynar. Embriyojenik gelişim sırasında AMH salgılayarak, müllerian kanalların gerilemesini sağlar.<sup>21</sup>

#### **2.2.1.3. Leydig Hücreleri**

Leydig hücreleri lipid damlacıklardan zengin stoplazma ve merkezi nükleus ile karakterize hücrelerdir. Esas görevleri testosteron salgılamak olan bu hücreler, salgılanan tüm testosteronun yaklaşık %95'ini sentezler. Testosteron üretimi endoplazmik retikulum ve mitokondride bulunan enzimlerce gerçekleşir. Leydig hücrelerinin hormonal kontrolü ise LH aracılığı ile olmaktadır. Dolaşımda artan LH seviyeleri, Leydig hücrelerinden

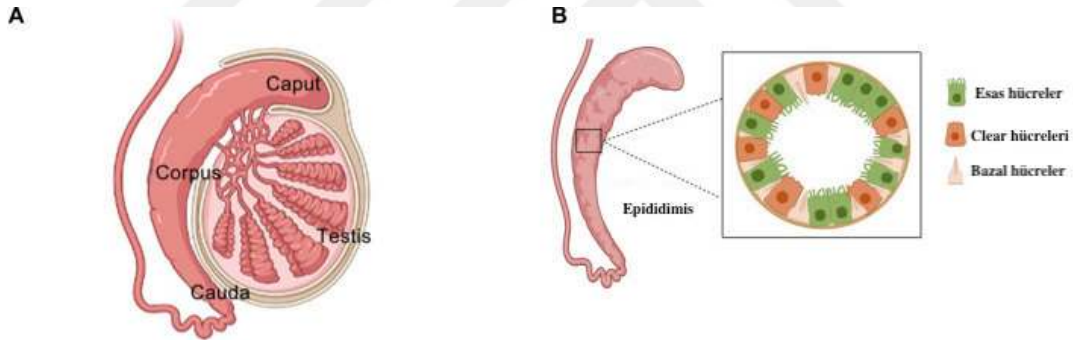


testosteron üretimini indüklerken, salgılanan testosteron LH salınımı üzerinde negatif geri besleme etkisi gösterir.<sup>22</sup>

### 2.2.2 Epididimis

Epididimis testis üst pol posterolateralinde bulunan, yaklaşık uzunluğu 7-8 cm civarı olan yarım ay şekilli bir yapıdır. Baş, gövde ve kuyruk şeklinde üç kısımdan oluşur. Baş kısmında duktus epididimis ve rete testis arasını bağlayan duktuli efferentesler, gövde ve kuyruk kısmında ise duktus epididimis bulunur (Şekil 5).<sup>23</sup> Genel olarak çok katlı yalancı epitel ile döşelidir.<sup>21</sup>

Spermin olgunlaştığı ve hareket kabiliyeti kazandığı bölgedir. Epididimisin kıvrımlı ve uzun kanalında ilerleyen spermler matürasyonlarını tamamlarlar. Epididimiste esas ve bazal hücreler bulunur. Esas hücrelerde salgılanan çeşitli glikoproteinler sperm matürasyonuna yardımcı olur. Ayrıca Sertoli hücrelerinden salgılanan sıvılar emilir ve dejenere sperm de yine bu bölgede fagosite edilerek yok edilirler.<sup>21</sup>



Şekil 5. Epididimis Bölümleri (A) ve Hücreleri (B)<sup>23</sup>

### 2.2.3. Duktus Deferens

Duktus deferens epididimisten sonra başlar, spermatik kord ile abdomene girer ve mesane seviyesinde genişleyerek ampulla denilen bir yapıya dönüşür. Ampulla, seminal vezikül ile birleştiğinde ortaya duktus ejakülatoryus ortaya çıkar ve prostatik üretraya açılarak sonlanır.<sup>17</sup>

Ejakülasyon sırasında nöral uyarı sonrası tüm düz kaslar ritmik ve şiddetli bir şekilde kasılarak sperm duktus epididimisten, çok katlı prizmatik epitel ile döşeli duktus



deferense, oradan da yardımcı salgı bezlerinin salgıları ile birleşerek semen adı altında prostatik üretradan atılırlar.<sup>24</sup>

Duktus deferens çevresinde kalın bir tabaka iç ve dış longitudinal kaslardan oluşur. Bu tabaka sayesinde güçlü peristaltik kasılmalar ile duktus deferens spermilerin transportunda görev alır.<sup>17</sup>

#### **2.2.4 Seminal Vezikül**

Mesane arka duvarında, prostat komşuluğunda bulunan bu yardımcı üreme bezleri, semen sıvısının yaklaşık %70 kısmını oluşturur. Salgı yapan yüzey alanını arttırmak için kıvrımlı yapıda olan bu bezlerin mukozası yalancı çok katlı epitelle döşenmiş durumdadır. Salgıları spermier için en önemli enerji kaynağı olan fruktozdan oldukça zengindir. Seminal veziküllerin salgılama fonksiyonları testosteronun hormonal kontrolü altındadır.<sup>17</sup>

#### **2.2.5. Prostat**

30-50 arası tübüloalveolar bezden oluşan bu yapı silindirik ya da kübik yalancı çok katlı epitel ile döşenmiştir. Epitelin çevresini ise fibromusküler bir stroma sarar. Prostat bezi anatomik olarak santral zon, periferik zon, transizyonel zon ve anterior fibroelastik stromadan oluşur. Prostat bezi ejakülatı destekleyen bir prostat sıvısı üretir.<sup>25</sup>

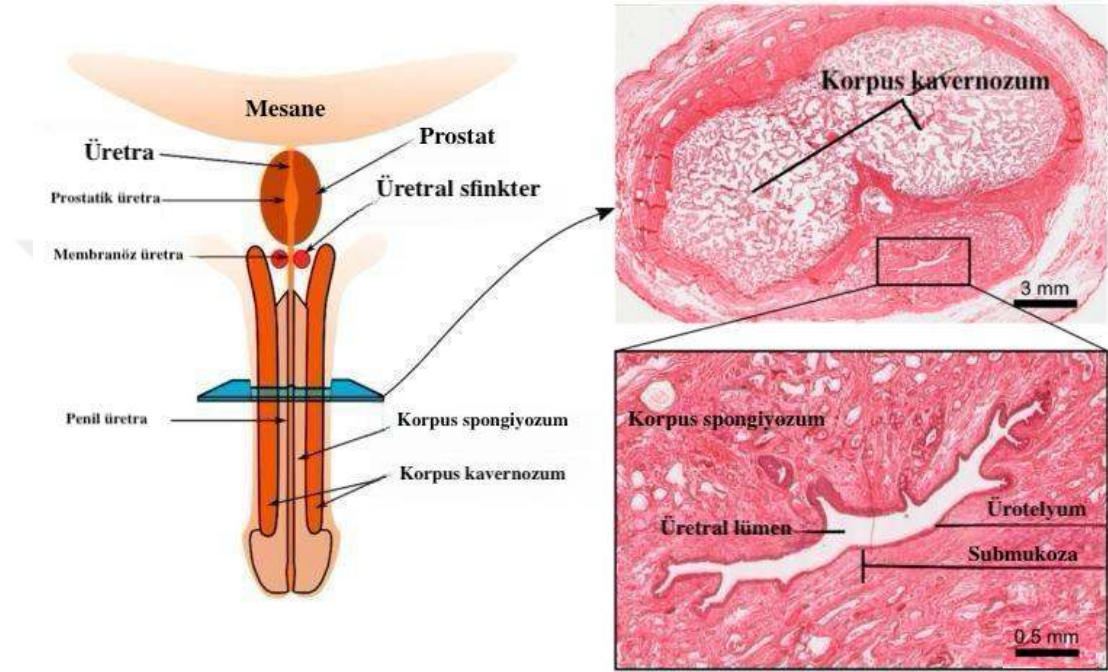
#### **2.2.6. Bulboüretral Bezler**

Membranöz üretra seviyesinde üretraya açılan bir çift salgı bezi olan bu yapının görevi berrak renkli bir mukus salgılayarak, ilişki sırasında penil üretranın kayganlaşmasını sağlamaktır. Tübüloalveolar bir yapısı olan bu bezler diğer salgı bezleri ile de benzer şekilde tek katlı silindirik epitel ile döşelidir.<sup>17</sup>

#### **2.2.7. Penis**

Eretil bir organ olan penis iki adet korpus kavernozum ve içerisinde üretra da bulunan bir adet korpus spongiyozum yapısından oluşmaktadır. Dorsalde yan yana iki adet kavernozum yapısını ventralde spongiyozum ile birleştiren fibroelastik yapıda bir tunika albuginea tabakası bulunur (Şekil 6).<sup>26</sup>

Korpus kavernozum endotel ile döşeli birbiri ile çok sayıda bağlantısı olan venöz boşluklardan oluşmaktadır. Bu boşluklar ince bir düz kas tabakası ile çevrilidir. Gevşek halde bulunan peniste sempatik sistem etkisi ile düz kaslar kasılı, damarlardan kan akışı minimaldir. Cinsel uyarı ile birlikte parasempatik sistem aktive olur. Düz kaslar gevşer ve damarlar dilate olarak içleri kan dolar. Venöz dönüş durur, rijit ereksiyon sağlanır.<sup>21</sup>



Şekil 6. Penis Histolojik Kesiti<sup>26</sup>

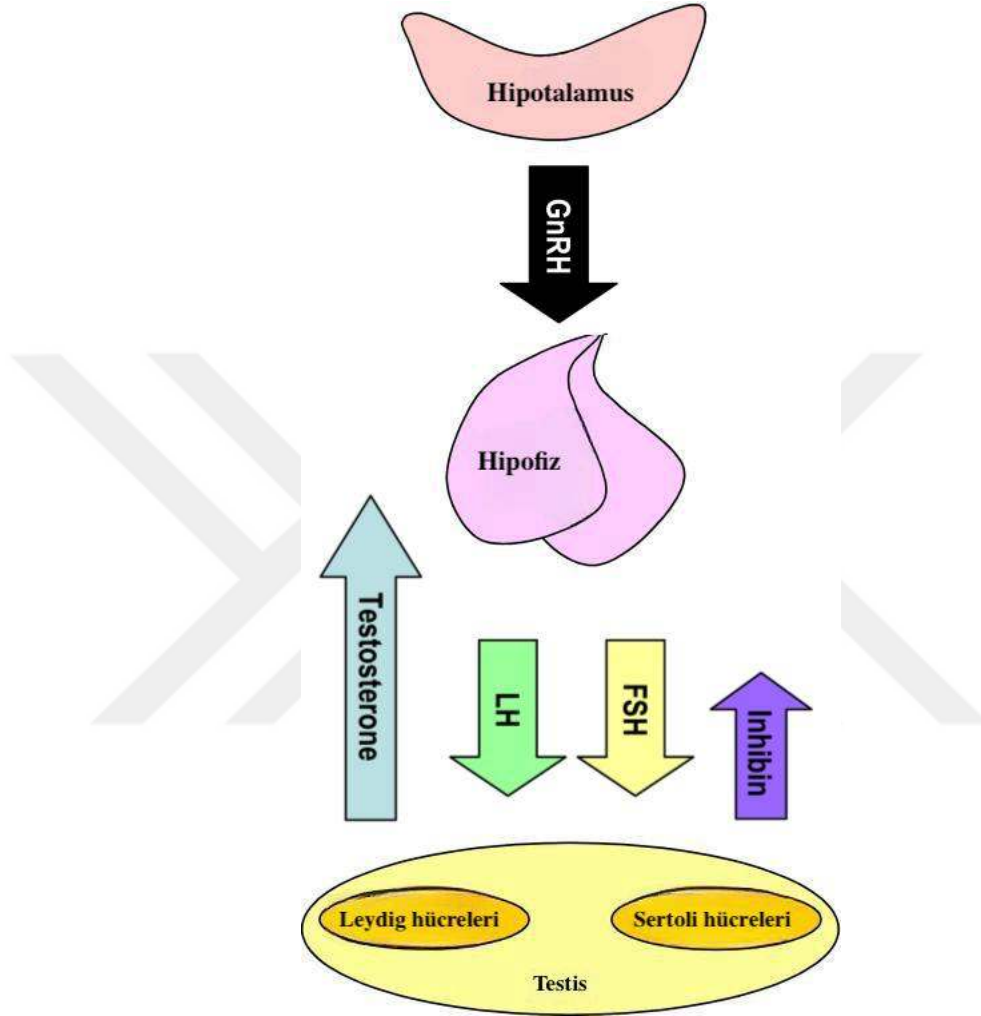
### 2.3 Erkek Üreme Sisteminin Endokrin Kontrolü

Üreme sistemi fonksiyonlarını yerine getirmesi ve gelişimi açısından endokrin kontrol altındadır. Bu endokrin kontrolü sağlayan organlar ve bu organlardan salgılanan hormonlar birbiri ile ilişki halinde çalışırlar. Ürogenital sistemin endokrin kontrolünü hipotalamus, hipofiz ve testisten oluşan bir aks kontrol eder.<sup>27</sup>

#### 2.3.1. Hipotalomo-Hipofiz-Testis Aksı

Erkek üreme organlarının gelişimi, puberte, seksüel fonksiyonlar ve eylemlerin yönetimi gibi vücutta önemli genitoüriner olaylar bu aks tarafından yönetilir. Aksın başlangıcında yer alan hipotalamus ve hipofiz tarafından ayrıca büyüme hormonu salgılanması, tiroid hormonlarının kontrolü, adrenal korteks üzerine de etkiler göstererek vücutta çeşitli görevlerde yer alırlar.<sup>27</sup> Aks gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH),

lütinize edici hormon (LH), follikül uyarıcı hormon (FSH), ve gonadal steroidlerden oluşur (Şekil 7).<sup>28</sup> Üreme hormonlarının serum seviyesinin dinamik dengeleri, kapalı döngü bir geri besleme mekanizması aracılığı ile kontrol edilir.<sup>29</sup>



Şekil 7. Hipotalamo-Hipofiz-Testis Aksı<sup>28</sup>

#### 2.3.1.1. Hipotalamustan Salgılanan Hormonlar

Hipotalamustan salgılanan GnRH, 10 aminoasitli yapıda bir peptiddir. Hipotalamusun arkuat nükleus bölümünde bulunur. Hipotalamik nöronlardan pulsatil bir şekilde salgılanır. 1-3 saatte bir, toplamda birkaç dakika süre ile sekresyona uğrar. Bu pulsasyonun frekansı, hipofizden salgılanacak LH ve FSH salınım oranını düzenler.<sup>27</sup>

Vücuttaki tüm afferent ve efferent sinirsel uyarılar hipotalamus ile ilişkilidir. Bu nedenle hipotalamustan GnRH salgılanmasına pozitif ve negatif yönde etki eden birçok faktör bulunmaktadır. GnRH üzerine inhibe edici etkisi olduğu bilinen, glutamattan

sentezlenen gama amino bütirik asit (GABA) enjeksiyonu sonrası dişi sıçanlarda LH artışının bloke edildiği yapılan bir çalışmada gözlenmiştir.<sup>30</sup> GABA bu etkisini preoptik alanda bulunan GnRH mRNA seviyelerini baskılayarak yaptığı ortaya koyulmuştur.<sup>31</sup> Testosteronun da GnRH üzerine negatif geri besleme etkisi yine GABA üzerinden gerçekleşmektedir. Hipotalamik çekirdeklerde yoğun oranda bulunan glutamat ise GnRH salınımını uyarır. Bu etkisini iyonotropik ve metabotropik reseptörler aracılığı ile gösterir.<sup>27</sup> Arkuat nükleus ve beyin sapında nöronları bulunan diğer peptidlerden olan nöropeptid Y ve kisspeptin de GnRH salınımını arttırıcı yönde etki yaparlar. Kisspeptinlerin bu pozitif etkisinin puberte başlangıcındaki tetikleyici mekanizmaların önemli bir parçası olduğu düşünülmektedir.<sup>32</sup> Yapılan bir çalışmada kemirgenlerde arkuat nükleusta bulunan kisspeptin nöronlarının GnRH salınımı üzerinde negatif geri besleme etkisi gösterdikleri, anteroventral periventriküler çekirdekteki nöronların pozitif geri besleme etkisi gösterdikleri şeklinde güçlü kanıtlar mevcuttur.<sup>33</sup>

GnRH nöronları ayrıca opioid reseptörleri de bulundurmaktadırlar. Eroin ve opioid bağımlılığı olan erkeklerde hipogonadizm, azalmış gonodotropin seviyeleri ve gonadal steroidlerin düşüklüğü bu mekanizma ile açıklanmaktadır.<sup>34</sup>

GnRH ön hipofize etki ederek, gonadotropilerden FSH ve LH salınımını düzenler.

#### **2.3.1.2. Hipofizden Salgılanan Hormonlar**

Hipofiz beyin tabanında sella tursica adı verilen bir yapı içerisinde bulunan yaklaşık bir cm boyutunda salgı bezidir. Fizyolojik olarak nörohipofiz ve adenohipofiz adı verilen iki bölüme ayrılır. Nörohipofiz embriyolojik olarak hipotalamusun devamı gibi görünmektedir. Hipofizin bu kısmından antidiüretik hormon ve oksitosin adında iki önemli hormon salgılanır. Anterior hipofiz ise embriyolojik olarak Rathke kesesi adı verilen farinks epitelinden köken alır. 5 farklı hücre tipinden oluşan bu bölümde; büyüme hormonu salgılayan somatotroplar, adrenokortikotropin salgılayan kortikotroplar, tiroid uyarıcı hormon salgılayan tirotroplar, gonadotropin salgılayan gonadotroplar, prolaktin salgılayan laktotroplar bulunur.<sup>27</sup>

##### **2.3.1.2.1. FSH ve LH**

Salgılanması GnRH ve testis hormonları tarafından düzenlenen FSH ve LH glikoprotein yapısında hormonlardır. Gonadların gelişimi ve matürasyonunda önemli rol

oyunlar. Gonadotrop hücrelerden sentezlenir ve GnRH ile uyarılınca kadar salgı hücrelerinde depolanırlar. Ancak moleküllerin bir kısmı salgı granüllerinde depolanmadan yapısal olarak salgılanır, bu özellik FSH'da daha fazla görülmektedir.<sup>35</sup>

FSH yarılanma ömrü 120-180 dk iken, LH yarılanma ömrü 20 dakika civarındadır. Her iki hormon da GnRH pulsatil salgılanması ile salgılanmasının yanında yarılanma ömürlerindeki fark ve FSH'nin yapısal olarak salgılanması sebebiyle, FSH'nin LH'den farklı olarak daha az pulsatil ritim göstermesine sebep olmaktadır. Gün içerisinde LH %50-70 arasında dalgalanma gösterirken, FSH %5-10 civarı dalgalanma gösterir. Bu durum hormon ölçümünü etkilemekte ve FSH için tek kan örneği yeterli olmakla beraber, LH için 20 dakika ara ile sabah alınmış ardışık 3 kan ölçümü gerekmektedir.<sup>36</sup>

GnRH tarafından gonadotropinlerin salgılanmasına testosteronun negatif geri besleme etkisi mevcuttur. Ayrıca hipotalamusta opioid nöronlardan peptidlerin salgılanmasını da uyararak GnRH üzerinde de negatif geri besleme etkisini gösterir. Bu etkileri sebebiyle hipofizin GnRH'ye olan tepkisi azalır ve plazma LH seviyesinde düşme meydana gelir.<sup>37</sup>

Testosteron periferik dokularda ve beyinde aromataz ile östradiyole çevrilir. Östrojenler GnRH salınım frekansında ve hipofiz yanıtında negatif etki göstererek LH seviyelerini düşürür. Erkeklerde LH seviyesinin birincil öneme sahip düzenleyicinin dolaşımdaki östrojen olduğu belirlenmiştir.<sup>37</sup> Yapılan bir çalışmada hipotiroidili erkeklerde testosteron seviyelerinin düşmesine rağmen, LH ve östrojen seviyelerinin değişmediği gösterilmiştir. Östrojenin FSH üzerindeki etkisi ise FSH pulsasyonundan ziyade FSH yarı ömrünü azaltmak suretiyle gerçekleşmektedir.<sup>38</sup>

Testislerden salgılanan aktivin ve inhibin hormonlarının da gonadotropinler üzerinde düzenleyici etkisi bulunmaktadır. Sertoli hücreleri tarafından üretilen inhibin, yalnızca hipofiz hücreleri üzerinde etkili olarak seçici olarak FSH seviyelerini baskılamaktadır. Aktivinin ise FSH sentezini uyarıcı etkisi bulunmaktadır.<sup>39</sup>

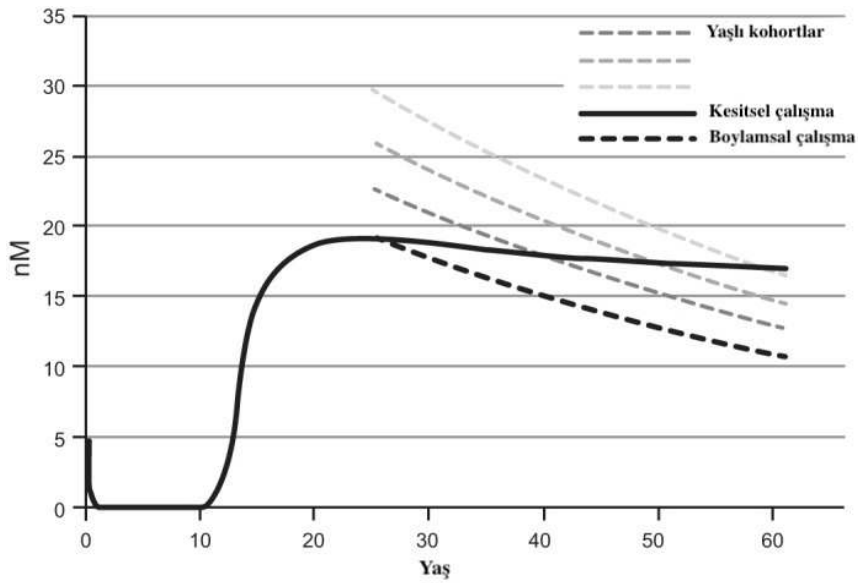
### **2.3.1.3. Testisten Salgılanan Hormonlar**

Testisten salgılanan en önemli hormon Testosterondur. Hedef dokularda 5 $\alpha$  redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona (DHT) dönüşür. Ayrıca testiste az miktarda androstenedion ve dehidroepiandrosteron gibi diğer androjenler de sentezlenir. DHT oluşumu total testosteron metabolizmasının %6-8 ini oluşturur. Testosteron/DHT oranı

plazmada 1:20 olarak tespit edilmiştir.<sup>40</sup> Ayrıca Leydig hücrelerinden çok az miktarlarda östrojen üretimi de görülürken testiste aktivin ve inhibin hormonlarının da üretildiği belirlenmiştir.<sup>41</sup>

#### 2.3.1.3.1. Testosteron

Steroid yapıda olan testosteron, insan organizmasında başlıca androjen olarak görev yapar ve erkek cinsiyetine özgü biyolojik özelliklerin gelişiminde merkezi bir rol üstlenir. Erkek fetüste androjen salınımı, gebeliğin yaklaşık 9–10. haftalarında testisler ve adrenal bezlerden başlar; hormon düzeyleri gebeliğin 12 ila 18. haftaları arasında belirgin bir artış göstererek doruğa ulaşır. Doğumu takiben, yaşamın ikinci ayı civarında testosteron düzeylerinde geçici bir yükselme daha gözlenmektedir.<sup>42</sup> Bu hormonal değişimler doğrultusunda, erkek fetüsün dış genital yapıları ve diğer cinsiyet karakteristikleri gelişir. Ergenliğe geçiş döneminde ise testosteron, cinsel olgunlaşmanın başlaması ve sürdürülmesi açısından belirleyici bir faktördür. Hormon düzeyleri genellikle bireyin 20’li yaşlarının başlarında en yüksek seviyelere ulaşır.<sup>43</sup> Bu dönemi kısa süreli bir denge evresi izler ve ardından yaşla birlikte kademeli bir düşüş eğilimi başlar (Şekil 8).<sup>44</sup>



Şekil 8. Erkeklerde Yaşa Göre Ortalama Serum Testosteron Seviyeleri<sup>44</sup>

Vücuttaki toplam testosteronun %95'i Leydig hücrelerinde üretilirken, kalan kısım adrenal glandlarda üretilir. Testosteronun yalnızca %1-2 kısmı dolaşımda serbest

bulunur. Geri kalan testosteron çeşitli yüksek kapasiteli protein bağlanma bölgelerine bağlanmakla birlikte büyük bir çoğunluk seks hormonu bağlayıcı globuline (SHBG) bağlanır. Bazı klinik durumlar ve özellikle de yaşlanma SHBG seviyelerinde değişime yol açarak dolaşımdaki toplam testosteron seviyesinin değişmesine sebep olur.<sup>45</sup>

Sağlıklı ve yetişkin bir erkek bireyde ortalama günde 5-10 mg testosteron salgılanabilir. Testosteron plazma konsantrasyonu gün içinde değişiklik göstermekle birlikte sabah saatlerinde akşam saatlerine kıyasla daha yüksektir. Bu sebeple testosteron seviyelerine sabah 07.00 ile 11.00 arasında bakılmalıdır.<sup>46</sup>

Hem endojen testosteron hem de onun öncül bileşikler ile farmakolojik olarak kullanılan benzer steroid yapılı ajanlar ağırlıklı olarak karaciğerde metabolize edilmektedir. Testosteronun karaciğerdeki ilk dönüşüm aşaması, androstenediona çevrilmesidir. Bu ara ürün, daha sonra androsteron ve devamında etiyokholanolon gibi metabolitlere dönüşür. Söz konusu üç metabolit, yapılarında 17-keto grubu bulundurmaları nedeniyle 17-ketosteroid olarak sınıflandırılır. Bu bileşikler ile vücutta aktif halde bulunan az miktardaki serbest testosteron, karaciğer hücrelerinde glukuronik ya da sülfürik asit ile konjugasyon reaksiyonlarına girer. Konjugat formları daha sonra esas olarak böbrekler aracılığıyla idrarla atılırken, küçük bir kısmı safra yoluyla dışkıya geçerek vücuttan uzaklaştırılır. İdrarla dışarı atılan 17-ketosteroidlerin yaklaşık %30'u testiküler kökenli testosterondan oluşmakta, geri kalan %70'lik kısmı ise adrenal bez kaynaklı androjen metabolitlerinden oluşmaktadır.<sup>47</sup>

Testosteronun vücutta metabolik klirens hızı günlük ortalama 1000 litre civarındadır. Bu yüksek klirens oranı, hormonun plazmadaki biyolojik yarılanma süresinin oldukça kısa olmasına, yani yaklaşık 10–20 dakika arasında değişmesine yol açar. Günlük üretilen testosteron ile, serumda yaklaşık  $611 \pm 186$  ng/dl düzeyinde bir konsantrasyon oluşur. Genç erişkin erkeklerde bu hormonun fizyolojik sınırları genellikle 300 ile 1000 ng/dl (10,4–34,7 nmol/L) aralığında kabul edilmektedir.<sup>48</sup>

Testosteron, androlojik etkilerinin ötesinde birçok dokuya yönelik anabolik ve düzenleyici etki göstermektedir. Bu hormonun fizyolojik etkileri arasında eritropoetin salınımını artırarak kemik iliğinde eritrosit üretimini desteklemesi ve kas yapısının korunmasında görev alan azot tutulumu sağlaması öne çıkar.<sup>49</sup> Ayrıca testosteron, kemik dokusunda osteoblastik aktiviteyi uyarırken osteoklastik yıkımı baskılayarak kemik mineral yoğunluğunu artırıcı yönde etki eder.<sup>50</sup>

Otoimmün romatizmal hastalık süreçlerinde inflamatuvar yanıtı hafifletici etkileri olduğu gösterilmiştir. Karaciğerde ise protein sentezini destekleyen anabolik etkileriyle ön plana çıkar. Nöropsikiyatrik düzeyde, testosteronun kendine güveni artırdığı, anksiyete ve depresyon belirtilerini azalttığı, böylece ruh halini dengeleyici bir rol üstlendiği bildirilmektedir. Kognitif işlevlerde iyileşme sağladığına ve libidoyu desteklediğine dair veriler de mevcuttur. Ayrıca gece ereksiyonları ve daha az belirgin olarak istemli ereksiyonların sürdürülebilirliğinde katkısı olduğu bilinmektedir.<sup>51</sup>

Pozitif azot dengesine katkıda bulunarak vücut ağırlığında artışa yol açabilir. Bunun yanı sıra, kalsiyum, sodyum, potasyum, fosfat, sülfat ve klorür gibi minerallerin idrarla atılımını azaltarak kemik bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur.<sup>50</sup>

Hipotalamo-Hipofiz-Testis aksında meydana gelen herhangi bir bozukluk erkek infertilitesinde ve cinsel sağlığında önemli sorunlara yol açabilir.

### **2.3.2 Melatonin ve Erkek Üreme Sistemi ile İlişkisi**

Melatonin insanlarda gece boyunca pineal bez tarafından sentezlenen ve geceleyin plazma düzeylerinde belirgin artış gösteren bir nörohormon ve güçlü bir antioksidandır. Lityum-lipofilik yapısı sayesinde hücre zarlarını kolaylıkla geçer; bu yapı, hem sirkadiyen ritmi düzenleme hem de antioksidan işlevsel görevlerini yerine getirmesini sağlar, ayrıca bazı genler ve reseptörler aracılığı ile erkek üreme sistemi ve testosteron üzerine etkiler gösterir.<sup>52</sup>

#### **2.3.2.1. Melatonin Sentez, Dağılımı ve Metabolizması**

Sentez süreci, amino asit triptofanın alınmasıyla başlar ve serotonin üzerinden devam eder. Serotonin, önce arylalkylamin N-acetyltransferaz enzimi aracılığıyla N-acetylserotonin'e dönüştürülür, ardından acetylserotonin O-methyltransferaz ile melatonine metillenir. Sentezin başlatılmasında ışık-karanlık döngüsü kritik rol oynar; göz retinasından gelen ışık bilgisi, süprakiazmatik nükleus üzerinden sempatik yolak aracılığıyla epifize iletilir. Karanlıkta artan sempatik aktiviteyle noradrenalin salınımı olur ve pinealositler üzerinden cAMP seviyeleri artarak arylalkylamin N-acetyltransferaz aktivasyonu sağlanır. Aydınlıkta ise bu sinyal iletimi baskılanır ve melatonin sentezi durur.<sup>53</sup>



Melatonin salındıktan sonra hem lokal etkiler gösterir hem de sistemik dolaşıma geçer. Lipofilik yapısı sayesinde kan-beyin bariyerini ve hücre zarlarını kolayca aşabilir. Salınımın ardından karaciğerde hidroksilasyon ve konjugasyon yoluyla hızlı şekilde metabolize edilir; ana metaboliti olan 6-sülfatoksimelatonin idrarla atılır. Bu metabolit, melatonin salınımının indirekt bir göstergesi olarak kullanılır ve pik salınımını yaklaşık 2 saat gecikmeli yansıtır. Plazma melatonin düzeyleri bireyler arası farklılık göstermekle birlikte geceleyin 50–120 pg/mL aralığında seyredebilir, gündüz ise 10 pg/mL altına düşer. Salınım profili genellikle gece 21:00 civarında başlar, 02:00–04:00 arasında zirve yapar ve sabah 07:00'ye doğru baskılanır.<sup>54</sup>

Melatonin yalnızca pineal bezde değil, ekstrapineal birçok dokuda da lokal olarak sentezlenebilir. Retina, gastrointestinal sistem, kemik iliği, cilt ve özellikle mitokondrilerde de melatonin sentezi mümkündür.<sup>55</sup>

#### **2.3.2.2. Melatonin Fizyolojik Etkileri**

Melatonin etkilerini büyük ölçüde MT<sub>1</sub> ve MT<sub>2</sub> adını taşıyan G-protein-bağlı reseptörleri üzerinden gerçekleştirir. Her iki reseptör de süprakiazmatik nükleus gibi merkezi saat bölgelerinde bulunurken periferde de yaygındır. MT<sub>1</sub> reseptörü, adenil siklazı inhibe ederek cAMP seviyelerini düşürür; ayrıca fosfolipaz C ve iyon kanalları aracılığıyla hücre içi sinyalizasyonu modüle eder. MT<sub>2</sub> reseptörü de adenil ve guanil siklazları inhibe ederek hem cAMP hem cGMP düşüşüne neden olur; fosfolipaz C üzerinden PKC aktivasyonuna yol açar. Bu reseptörlerin yapısal olarak benzer olmalarına rağmen, ligant bağlanma ceplerine dair farklılıkları, REM ve NREM uyku fazlarının ayrı ayrı kontrol edilmesini sağlar. MT<sub>1</sub>, REM uykusunun düzenlenmesinde baskın rol oynarken, MT<sub>2</sub> ise NREM süresini artırarak uyku yapısını şekillendirir.<sup>56</sup>

Bunların ötesinde melatonin, reseptör bağımsız olarak güçlü antioksidan etkilere sahiptir. Hücresel düzeyde hem direkt radikal süpürücü olarak hidroksil ve süperoksit gibi reaktif oksijen türevlerini nötralize eder, hem de süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırarak indirekt etki gösterir.<sup>57</sup> Melatonin, endokrin sistem üzerinde de etkilidir. Hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini düzenleyerek mevsimsel üreme döngülerini kontrol eder ve gonadotropin salgılanmasını etkiler. Metabolik hormonların salınımını modüle ederek enerji

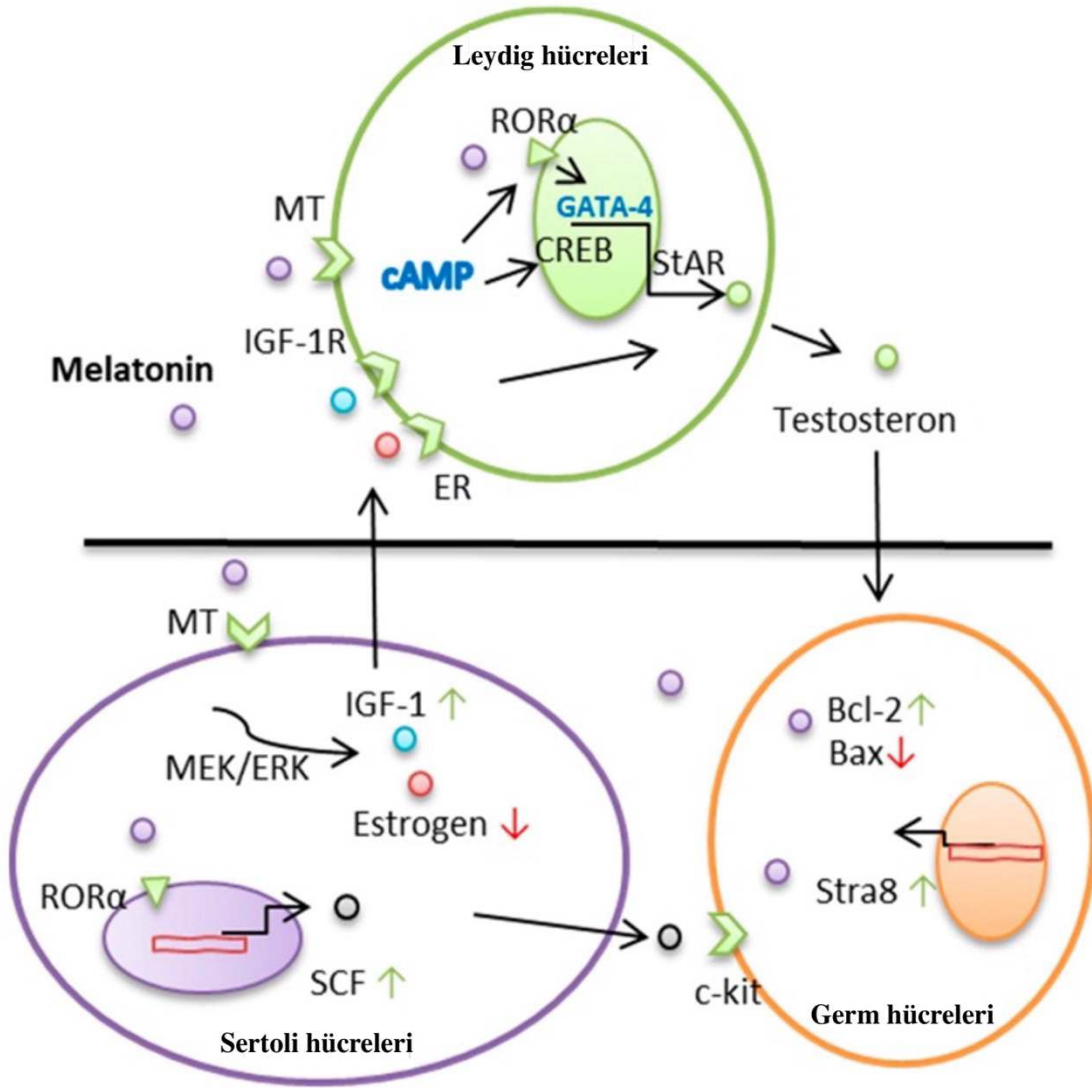
homeostazına katkıda bulunur. Kemik metabolizmasında da osteoblast ve osteoklast aktivitesini düzenleyerek kemik yoğunluğunu artırıcı etkiler gösterir.<sup>58</sup>

### **2.3.2.3. Melatoninin Testisler Üzerine Etkileri**

Lipofilik ve hidrofilik yapısı sayesinde kan testis bariyerini aşarak doğrudan Leydig ve Sertoli hücrelerine etki edebilmekte, bu hücrelerdeki reseptörleri aracılığıyla hücrel sinyalleme yollarını düzenlemektedir. Özellikle melatonin reseptörleri MT1 ve MT2'nin yanı sıra nükleer reseptörlerden ROR $\alpha$  üzerinden de etkisini göstererek, testosteron sentezi gibi steroidogenez süreçlerini modüle etmektedir.<sup>59</sup>

Leydig hücrelerinde testosteron üretimi, LH stimülasyonu ile aktive edilen steroidogenez yolları aracılığıyla gerçekleşmektedir. Melatonin, bu hücrelerde GATA4 ve StAR gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu etkileyerek testosteron üretimini baskılayabilir ya da uyarabilir. TM3 Leydig hücreleri ile yapılan bir in vitro çalışmada, melatonin uygulaması hücre proliferasyonunu ve testosteronla ilişkili genlerin (GATA4, ROR $\alpha$ ) ekspresyonunu baskılamıştır. Aynı çalışmada melatoninin tek başına kullanıldığında hücre proliferasyon oranını azaltırken, yeşil LED ışık ve özellikle fibrin bazlı 3D iskele ile kombine edildiğinde bu olumsuz etkinin hafifletildiği bildirilmiştir.<sup>60</sup>

Melatoninin Sertoli hücreleri üzerindeki etkileri ise daha çok dolaylıdır. Sertoli hücreleri tarafından salgılanan IGF-1 ve SCF gibi faktörler aracılığıyla Leydig hücre fonksiyonlarını düzenlerken, melatonin bu parakrin faktörlerin üretimini de artırmaktadır. Ayrıca aromataz enziminin aktivitesini baskılayarak östrojen sentezini azaltmakta ve testisteki androjenik ortamı desteklemektedir. Bu bağlamda, melatoninin testiküler mikroçevreyi yeniden yapılandırarak testosteron biyoyararlanımını dolaylı yoldan artırabileceği öne sürülmektedir. Gen ekspresyonu düzeyinde, melatoninin hücre döngüsü üzerinde de belirgin etkileri olduğu görülmektedir (Şekil 9).<sup>61</sup> Özellikle PCNA, CDC2 ve CYCLIN D1 gibi proliferasyonla ilişkili genlerin ekspresyonu 3D iskele ortamında artarken; melatonin uygulaması bu artışı baskılamıştır. Diğer yandan, hücre döngüsünü durduran CDKN1B geninin ekspresyonu melatonin ile artmıştır. Ancak bu baskılayıcı etki, 3D fibrin scaffold ile hafifletilmiş, kombinasyon gruplarında proliferatif genlerin tekrar yükseldiği gösterilmiştir.<sup>60</sup>



**Şekil 9. Melatoninin Testiküler Steroid Hormonlar Üzerine Etkileri<sup>61</sup>**

Erkek fertilitesinde önemli bir belirleyici olan sperm üretimi, büyük ölçüde testosteron düzeyine bağlı olarak gerçekleşir. Melatonin bu süreci hem doğrudan testosteron sentezini etkileyerek, hem de Sertoli hücre metabolizmasını düzenleyerek spermatogenezi destekleyebilir. Klinik gözlemler de bu deneysel bulguları destekler niteliktedir.<sup>62</sup> İnfertil erkek bireylerde hem serum hem de seminal plazma melatonin düzeylerinin anlamlı şekilde düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca melatoninin antioksidan etkileri, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu sperm DNA hasarını azaltarak sperm kalitesini artırma potansiyeline sahiptir.<sup>63</sup> Bu bağlamda, melatoninin erkek infertilitesinde destekleyici ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

## 2.4 İnsan Semen Analizi

Semen analizi, erkek fertilitésinin değeriendirilmesinde temel tanı yöntemlerinden biridir. Özellikle infertilite nedeniyle başvuran bireylerde, ejakülatın laboratuvar koşullarında uygun tekniklerle incelenmesi, tanı sürecine önemli katkılar sağlar. Bununla birlikte, azospermi saptanan olgularda, yalnızca semen analizi ile bireyin fertil ya da infertil olduğunun belirlenmesi mümkün olamamaktadır. Semen analizi, sperm hücrelerinin sayısı ve fonksiyonel özelliklerinin yanı sıra seminal plazma ve sperm dışı hücre içeriklerinin de değeriendirilmesine olanak tanır.<sup>64</sup>

Ejakülasyon sırasında semen; testislerde üretilip epididimlerde depolanan spermatozoaların, prostat, seminal vezikül, bulboüretral bezler ve az miktarda epididim kaynaklı salgılarla karışması sonucunda oluşan kompleks bir sıvıdır.<sup>65</sup>

Semen örneklerinin değeriendirilmesinde öne çıkan başlıca iki ölçülebilir parametre bulunmaktadır:

- Toplam spermatozoa sayısı, testiküler spermatogenezin varlığına ve posttestiküler kanal sisteminin geçirgenliğine işaret eder.
- Toplam semen hacmi, başlıca prostat ve seminal vezikül kaynaklı olmak üzere aksesuar bezlerin sekresyon fonksiyonlarının değeriendirilmesinde kullanılır.

Bunlara ek olarak, spermatozoaların vitalite (canlılık), motilite (hareket kabiliyeti) ve morfoloji (yapısal bütünlük) gibi fonksiyonel parametreleri ile ejakülatın biyokimyasal içeriği, üreme potansiyelinin belirlenmesinde önemlidir.<sup>65</sup>

### 2.4.1 Örneklerin Toplanması

Semen örneği, analizden önce minimum 72 saatlik cinsel perhiz sonrası, tercihen özel olarak ayrılmış bir odada mastürbasyon yöntemiyle ve steril, geniş ağızlı plastik bir kaba alınmalıdır. Örnek alımı sırasında prezervatif veya kayganlaştırıcı gibi kontaminasyon yaratabilecek materyaller kullanılmamalıdır. Örneğin laboratuvara ulaştırılması sırasında sıcaklık değişimlerine maruz kalmaması adına 37°C'lik bir ortamda bekletilmesi önerilir. Numunenin tamamının alınması önem arz eder; eksik alınan örneklerde ikinci bir numunenin sağlanması gerekebilir.<sup>66</sup>

#### 2.4.2 Örneklerin Makroskopik İncelemesi

Ejakülasyon sonrası, semen örneği ilk 15–30 dakika içinde likefaksiyon sürecine girer. Bu sürecin ardından analiz yapılmalıdır. Gözlemlenen parametreler arasında hacim, viskozite, pH ve renk yer alır. Eğer bu süre 60 dakikayı aşarsa, sekresyonel bir bozukluk veya enzimatik yetersizlik gibi patolojik nedenlerden şüphelenilmelidir. Sağlıklı bireylerde ejakülat, opak ve gri-beyaz tonlarında olup homojen özellik gösterir. Örnekte pembe ya da kırmızı renk hakimse hematospermi söz konusu olabilir. Sarı renkli örnekler çoğunlukla lökosit varlığına ya da uzamış ejakülasyon perhizine işaret ederken; açık ve şeffaf renkteki semen, düşük sperm yoğunluğunu düşündürülebilir.<sup>67</sup>

Hacim ölçümü, örnek uygun bir steril kaba alındıktan sonra hassas bir enjektör veya dereceli pipet ile mililitre cinsinden yapılır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 yılında yayımladığı kriterlere göre, normal bir semen hacmi  $\geq 1.5$  mL olmalıdır.<sup>67</sup> Bu değer altındaki hacimler seminal vezikül hipofonksiyonu, ejakülasyon kanal tıkanıklığı veya prematür ejakülasyon gibi durumların belirtisi olabilir. Buna karşılık, hacmin 6 mL'nin üzerine çıkması inflamasyon, stres kaynaklı sempatik aktivite artışı veya prostatik hiperplazi gibi olgularla ilişkili olabilir.<sup>66</sup>

Semenin pH değeri de önemli bir fizyolojik parametredir. Normal aralık genellikle 7.2 ile 8.0 arasında değişmektedir. pH'ın bu değerden düşük olması ejakülasyon kanalında tıkanıklık veya asidik prostat sıvısı baskınlığını düşündürürken; alkali pH değerleri, enfeksiyon varlığına işaret edebilir.<sup>67</sup>

#### 2.4.3 Mikroskopik İnceleme

Taze ejakülat örneklerinin boyasız preparatlarının incelenmesinde faz kontrast mikroskopu kullanılması önerilmektedir. İlk mikroskopik değerlendirme, numunenin toplam x100 büyütme altında genel bir taramaya tabi tutulmasıyla gerçekleştirilir. Bu ilk gözlem sırasında aşağıdaki bulgular değerlendirilebilir:

- Mukus filamentlerinin mevcudiyeti, sperm dışı hücresel elemanlar; epitel hücreleri, lökositler, immatür germ hücreleri ile izole halde gözlenen sperm başları ya da kuyrukları.
- Sperm hücrelerinin birbirine yapışarak oluşturduğu agregasyon ve aglütinasyon. Aglütinasyon, özellikle hareketli spermatozoaların spesifik

bölgelerinden birbirlerine yapışması durumunu ifade eder. Bu yapışma; sperm hücrelerinin baş-kuyruk, kuyruk-kuyruğa ya da karışık şekillerde (örneğin baş-baş, orta parça-kuyruk gibi) birleşmeleri şeklinde olabilir.

Ardından preparat, daha detaylı inceleme amacıyla x200 ila x400 büyütmelemlerde yeniden değerlendirilmelidir:

- Sperm motilitesi (hareketliliği) nitel ve nicel olarak gözlemlenir,
- Sperm konsantrasyonunun doğru belirlenebilmesi için uygun seyreltme oranı saptanır.<sup>67</sup>

#### **2.4.4. Sperm Sayısı ve Konsantrasyonu**

Ejakülatta yer alan toplam sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu, hem gebeliğin gerçekleşme süresiyle hem de gebelik oranlarıyla anlamlı şekilde ilişkilidir. Bu iki parametre, erkek fertilitésinin belirlenmesinde önemli göstergeler arasında yer alır.<sup>68</sup> Ancak sperm konsantrasyonu ile toplam sperm sayısı terimleri sıklıkla karıştırılsa da birbirlerinin yerine kullanılamaz, zira tanımsal olarak farklı kavramları ifade ederler. Sperm konsantrasyonu, bir mililitre ejakülatta bulunan spermatozoa miktarını gösterir. Bu değer, sperm sayısının, spermleri içeren semen hacmine oranıdır. Buna karşılık, toplam sperm sayısı, tüm ejakulat hacminde yer alan toplam spermatozoa miktarını ifade eder ve konsantrasyon ile semen hacminin çarpılması ile elde edilir.<sup>69</sup>

Sperm konsantrasyonuna göre:

- Azospermi: 0
- Şiddetli oligospermi:  $<1 \times 10^6/\text{ml}$
- Orta derecede oligospermi:  $1-5 \times 10^6/\text{ml}$
- Hafif oligospermi:  $5-20 \times 10^6/\text{ml}$
- Normospermi:  $>15 \times 10^6/\text{ml}$  şeklinde terminoloji kullanılır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) referanslarına göre, sperm konsantrasyonu için alt sınır değer  $15 \times 10^6/\text{ml}$ , total sperm sayısı içinse  $39 \times 10^6$  olarak kabul edilmektedir (Tablo

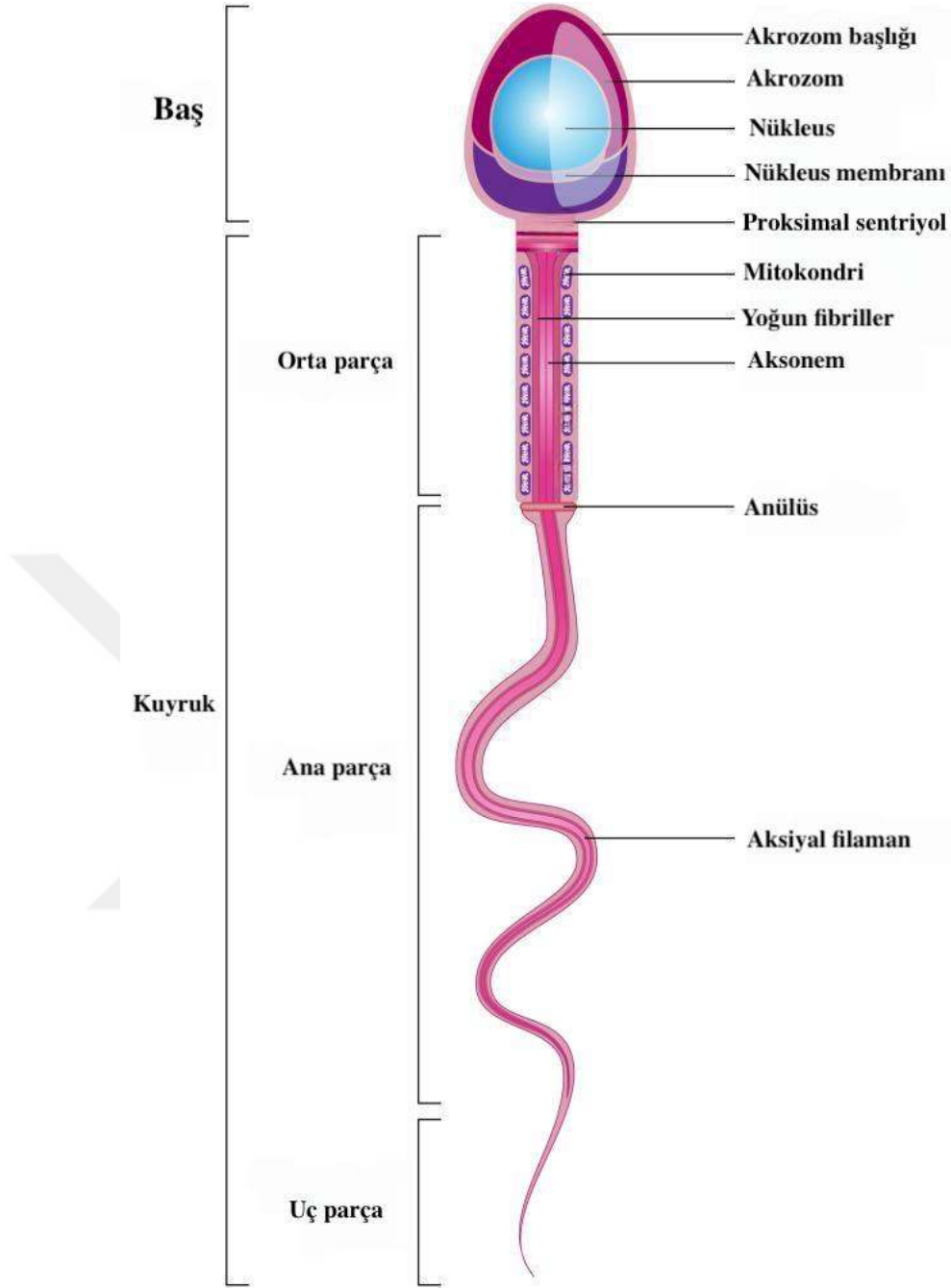
1). Bu değerlerin altındaki sonuçlar, genellikle fertilit e üzerinde olumsuz etkilere işaret edebilir.<sup>67</sup>

**Tablo 1. Semen Analizi Alt Referans Limitleri<sup>67</sup>**

| Parametre                                               | Alt referans limit (95% CI) |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Semen hacmi (mL)                                        | 1.5 (1.4–1.7)               |
| Toplam sperm sayısı (10 <sup>6</sup> per ejaculate)     | 39 (33–46)                  |
| Sperm yoğunluğu (10 <sup>6</sup> per mL)                | 15 (12–16)                  |
| Toplam motilite (PR+NP, %)                              | 40 (38–42)                  |
| Progresif motilite (PR, %)                              | 32 (31–34)                  |
| Canlılık (yaşayan spermatozoa, %)                       | 58 (55–63)                  |
| Sperm morfolojisi (normal form, %)                      | 4 (3.0–4.0)                 |
| Diğer değerler                                          |                             |
| pH                                                      | ≥ 7.2                       |
| Peroksidaz-pozitif lökositler (10 <sup>6</sup> per mL)  | < 1.0                       |
| MAR testi (partikül bağlı hareketli sperm hücreleri, %) | < 50                        |
|  mmunobead testi (%)                                    | < 50                        |
| Seminal  inko ( mol/ejaculate)                          | ≥ 2.4                       |
| Seminal fruktoz ( mol/ejaculate)                        | ≥ 13                        |
| Seminal nötral glukozidaz (mU/ejaculate)                | ≥ 20                        |

#### 2.4.5 Sperm Morfolojisi

Sperm h creti; baş, boyun, orta parça, ana parça ve son parça olmak üzere beş temel anatomik bölgeden oluşur. Bir spermatozoanın morfolojik olarak normal kabul edilebilmesi için baş ve kuyruk bölgelerinin yapısal açıdan normal olması gereklidir. Sperm başı, düzenli sınırlı, düzgün konturlu ve tipik olarak oval formda olmalıdır (şekil 10).<sup>70</sup> Ayrıca, baş bölgesinin yaklaşık %40–70’lik kısmını kapsayan, belirgin bir akrozom yapısı gözlenmelidir. Orta parça, sperm başı uzunluğuna yakın, ince, silindirik yapıda ve düzgün sınırlı olmalıdır. Bu segmentin ekseni, sperm başının ekseniyle aynı hizada olacak biçimde yerleşmelidir. Devamında yer alan ana parça, ortalama 45 mikrometre uzunluğunda, orta parçadan daha ince ve tüm uzunluğu boyunca homojen kalınlıkta olmalıdır.<sup>71</sup>

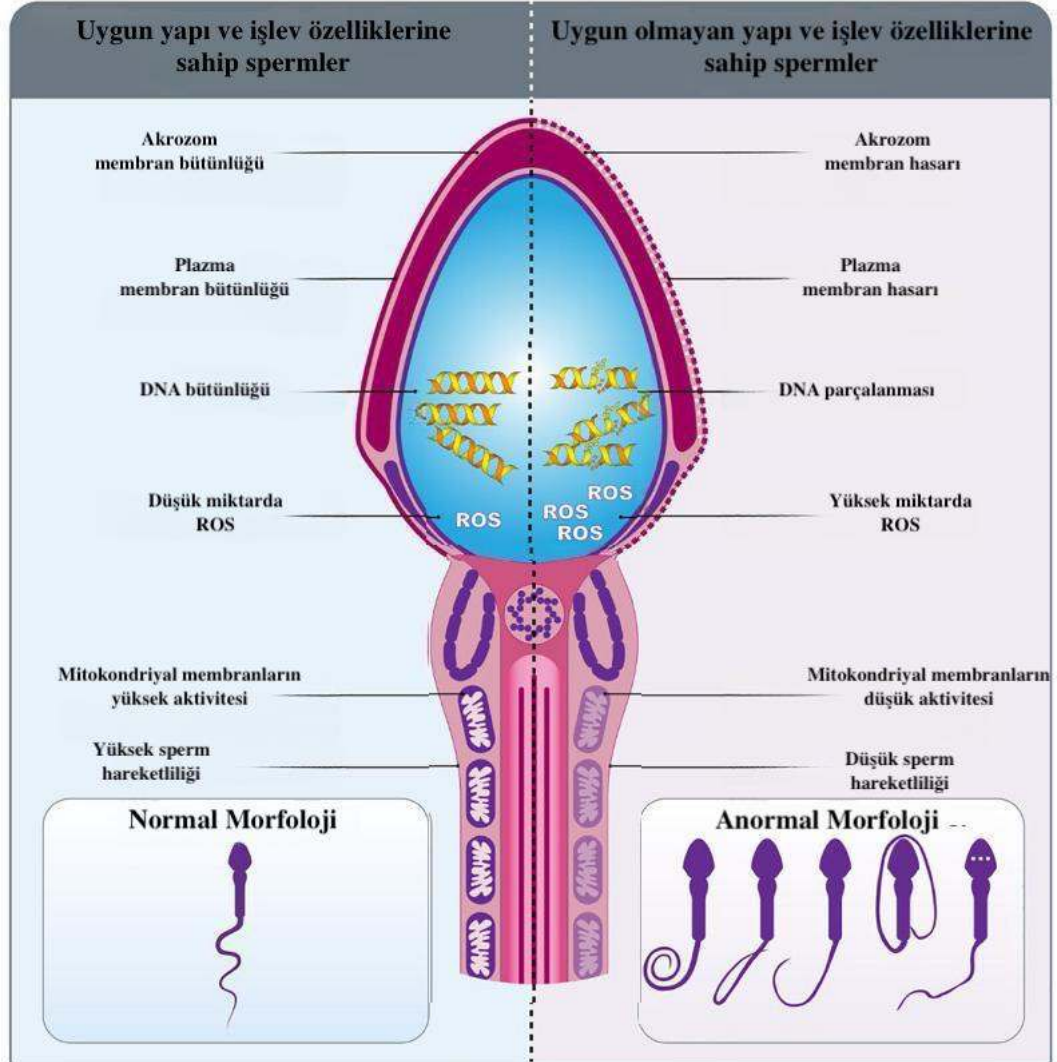


Şekil 10. Spermin Yapısal Özellikleri<sup>70</sup>

İnsan ejakülatında, doğal olarak morfolojik açıdan farklılık gösteren sperm hücreleri bulunabilir. Fonksiyonel açıdan tatmin edici kabul edilen spermatozoalarda; akrozom membran bütünlüğü, plazma membran bütünlüğü, DNA yapısal bütünlüğü, düşük düzeyde ROS, yüksek mitokondriyal membran aktivitesi, iyi motilite ve normal morfoloji gibi parametreler gözlemlenir. Buna karşılık, fonksiyonel açıdan yetersiz spermatozoalarda; akrozom membran hasarı, plazma membranı hasarı, DNA



fragmentasyonu, yüksek düzeyde ROS varlığı, mitokondriyal membran aktivitesinde azalma, düşük sperm hareketliliği ve morfolojik bozukluklar dikkat çeker (Şekil 11).<sup>70</sup>



Şekil 11. Morfolojik ve Fonksiyonel Açından Yeterli (Sol) ve Yetersiz (Sağ) Özellikler Taşıyan Spermatozoalar<sup>70</sup>

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre, normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinin oranı için alt referans sınırı %4 olarak belirlenmiştir. Bu değerin altındaki oranlar, fertilite açısından dikkatle değerlendirilmelidir.<sup>67</sup>

#### 2.4.6. Sperm Canlılığı ve Hareketliliği

Sperm canlılığı, genellikle hücre membran bütünlüğü üzerinden değerlendirilen ve numunenin genel kalitesine ilişkin önemli bilgiler sağlayan bir parametredir. Bu

ölçüm, tüm semen örneklerinde yapılabilir olmakla birlikte, özellikle ileri doğru hareketlilik oranı %40'ın altında olan olgularda daha da kritik hâle gelir. Çünkü hareketsiz spermatozoaların tümünün ölü olmadığını, bazılarının yalnızca hareket yetisini kaybettiğini göstermek açısından vitalite testi tanısal değere sahiptir. Bu test aynı zamanda, motilite analizinin doğruluğunu denetleyen tamamlayıcı bir yöntem işlevi görür; zira nekrotik hücre oranı, hareketsiz sperm oranını aşmamalıdır.<sup>67</sup> Vitalite açısından referans alt sınır, membran bütünlüğü korunmuş (canlı) spermatozoalar için %58 olarak belirlenmiştir. Öte yandan, canlı ancak hareket yetisi olmayan spermatozoaların yüksek oranda bulunması, çoğu zaman kuyruk yapısında mevcut olabilecek yapısal bozukluklara işaret edebilir.<sup>70</sup>

Sperm hareketliliğinin değerlendirilmesinde ise, her sperm hücresi için aşağıdaki üçlü sınıflandırma sistemi önerilmektedir:

**İleri hareketlilik (Progresif motilite; PR):** Spermatozoanın, hızdan bağımsız olarak düz bir çizgide ya da geniş daireler çizerek aktif biçimde ilerlemesi.

**Yerinde hareketlilik (Nonprogresif motilite; NP):** Spermatozoanın ileri yönlü hareket etmemesine rağmen sınırlı düzeyde hareket göstermesi; örneğin küçük daireler çizerek yüzmesi, yalnızca kamçı hareketi göstermesi veya baş kısmının zorlukla yer değiştirmesi.

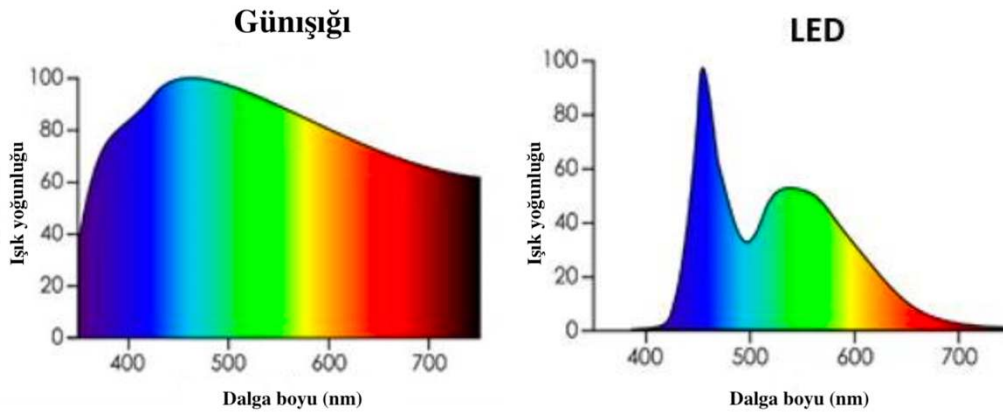
**Hareketsizlik (İmmotilite; IM):** Spermatozoanın hiçbir hareket göstermemesi.

Toplam hareketliliği değerlendirmek amacıyla, progresif (PR) ve nonprogresif (NP) hareketlilik oranlarının toplamı esas alınır. Bu toplam hareketlilik için alt referans değeri %40 olarak belirlenmiştir. Sadece ileri hareketlilik açısından bakıldığında ise, alt referans sınırı %32'dir.<sup>67</sup>

## 2.5. Işık Yayan Diyot (LED)

LED (Light Emitting Diode – Işık Yayan Diyot) ışıkları, yarı iletken bir diyot aracılığıyla iletilen elektrik enerjisinin, belirli ve dar bir spektruma sahip ışığa dönüştürülmesi esasına dayanır.<sup>72</sup> LED ışıklar üzerine ilk bilimsel çalışma 1907 yılında yayımlanmış olup, kızılötesi LED ışığını konu almıştır. Ancak uzun süre boyunca pratikte kullanım alanı bulamamıştır. 1962 yılında Nick Holonyak Jr. tarafından geliştirilen ilk işlevsel LED ile birlikte bu teknoloji kullanılabilir hale gelmiştir. Geleneksel aydınlatma

sistemleri olan floresan ve halojen lambaların, yüksek düzeyde enerji tüketmesine rağmen fotosentetik aktiviteye katkısı sınırlı kalmaktadır. Buna karşın LED aydınlatma sistemleri; uzun vadede daha ekonomik olmaları, daha az ısı üretmeleri sayesinde enerji verimliliği sağlamaları, uzun ömürlü ve dayanıklı olmaları, ışık yoğunluğu ve dalga boylarının daha hassas kontrolüne olanak tanınmaları gibi birçok avantaj sunmaktadır.<sup>72</sup> Farklı spektrumlarda üretilebilme yetenekleri sayesinde LED'ler, ultraviyole (UV) ışıklardan görünür ışığa ve kızılötesi (NIR) bant genişliğine kadar uzanan geniş bir dalga boyu aralığında (yaklaşık 247–1300 nm) çalışabilmektedir (Şekil 12).<sup>73</sup>



Şekil 12. Doğal ışık ile LED ışık arasındaki spektral farklılık

### 2.5.1. LED Işığın Sağlık Alanında Kullanımı

1990'lı yıllarda, ABD Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi (NASA), uzay tıbbı programı kapsamında çok dar spektrumda ışık yayabilen ilk LED'leri geliştirmiştir. Bu LED'ler kullanılarak yapılan çalışmalar, belirli dalga boylarındaki ışığın bitki büyümesini hızlandırabildiğini ortaya koymuştur. Bu bulguların ardından, yüksek deniz basıncı altında görev yapan denizaltı komandolarında ve sıfır yerçekimli ortamlarda bulunan astronotlarda görülen yara iyileşmesindeki gecikmeler nedeniyle, NASA LED ışığın yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırmaya yönelmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda bu tedavi yaklaşımından olumlu sonuçlar elde edilmiş ve bu gelişmeler, LED teknolojisinin tıpta kullanımının önünü açmıştır.<sup>74</sup> LED terapisi, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından insanlar için “önemsiz riskli” bir prosedür olarak onaylanmıştır. Bunu izleyen süreçte, LED ışığın farklı dalga boylarında biyolojik etkiler oluşturabildiği gösterilmiş ve bu teknoloji çeşitli klinik alanlarda uygulanmaya başlamıştır.<sup>75</sup>

Günümüzde LED'ler; hafif ve orta derecede akne vulgaris, cilt gençleştirme, yara iyileşmesi, sedef hastalığı, skuamöz hücreli karsinoma in situ (Bowen hastalığı), bazal hücreli karsinom ve aktinik keratoz gibi dermatolojik endikasyonlardan, ağrı yönetimine ve fotodinamik terapide ışık kaynağı olarak cilt kanseri tedavisine kadar geniş bir yelpazede kullanılmaktadır.<sup>76</sup> LED tedavisinin klinik etkileri, hücre içi ATP üretiminin artışı, oksidatif stresin düzenlenmesi, kollajen sentezinde değişimler, anjiyogenezisin desteklenmesi ve kan akışının artırılması gibi mekanizmalarla açıklanmaktadır.<sup>77</sup> LED terapileri genellikle tek bir spesifik dalga boyuna sahip ışık kullanır ve bu dalga boyu çoğunlukla ışığın rengi ile tanımlanır. Klinik uygulamalarda en yaygın kullanılan LED modaliteleri kırmızı ve mavi ışıklardır. Özellikle LED fotobiyomodülasyon, düşük maliyetli ve termal etkisi olmayan ışık temelli tedaviler arasında en güncel yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir.<sup>78</sup>

### **2.5.2. LED Işığın Testosteron ve Sirkadiyen Ritimle İlişkisi**

Sirkadiyen ritim, organizmaların yaklaşık 24 saatlik döngülerle gerçekleşen biyolojik aktivitelerini yöneten bir iç zamanlayıcıdır. Bu ritim, merkezi olarak hipotalamusta yer alan süprakiazmatik çekirdek tarafından düzenlenmekte ve ışık, özellikle görsel yol üzerinden bu sistemin senkronizasyonunda temel rol oynamaktadır. Testosteron gibi cinsiyet hormonları da bu sirkadiyen döngülere bağlı olarak salgılanmaktadır ve üretiminde ışık maruziyeti önemli bir dışsal faktör olarak öne çıkmaktadır.<sup>79</sup>

LED teknolojisinin yaygınlaşmasıyla birlikte, insan gözüne ve beyin fonksiyonlarına ulaşan ışık spektrumları da değişmiştir. Özellikle mavi spektrumda (450–470 nm dalga boyu) yoğunlaşan LED ışığı, melatonin salgısını baskılayarak sirkadiyen ritmin dengesini bozmakta ve dolaylı yoldan testiküler steroidogenez üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır.<sup>80</sup> Melatonin, süprakiazmatik çekirdekten gelen sinyallere yanıt olarak pineal bezden salgılanan ve sirkadiyen ritmin stabilitesini sağlayan önemli bir hormondur. Bu hormon aynı zamanda GnRH üzerindeki inhibisyonu da hipotalamo-hipofiz-gonadal aks üzerinde düzenleyici etkiye sahiptir.<sup>81</sup> Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, özellikle gece saatlerinde maruz kalınan mavi LED ışığının melatonin düzeylerini anlamlı ölçüde düşürdüğünü ve bunun sonucunda testosteron düzeylerinde azalma, testis ağırlığında küçülme ve spermatogenezin baskılanması gibi bulguların

ortaya çıktığını göstermektedir.<sup>82</sup> Benzer şekilde, BMAL1 (Brain and Muscle ARNT-Like 1) gibi saat genlerinin ekspresyonunun da LED ışık ile değiştirilebildiği, bu durumun testosteron sentezi ile doğrudan ilişkili olduğu saptanmıştır. Nitekim BMAL1'in baskılanması, Leydig hücrelerinde steroidogenezle ilişkili genlerin (örneğin StAR, CYP11A1) ekspresyonunu azaltmakta ve serum testosteron düzeyini düşürmektedir.<sup>83</sup>

İnsanlarda yapılan epidemiyolojik gözlemler de bu biyolojik etkileşimleri desteklemektedir. Özellikle kapalı ortamlarda ve düşük ışık şiddetinde çalışan bireylerde, sirkadiyen düzensizlikler ve azalmış testosteron seviyeleri bildirilmiştir. 2023 yılında yayınlanan bir çalışmada, günde 4 saatten fazla bodrum katında çalışan bireylerde serum testosteron düzeylerinin %15 oranında daha düşük olduğu saptanmıştır.<sup>84</sup> Bazı çalışmalar fotobiyomodülasyon terapisinde kullanılan düşük doz kırmızı LED ışığın (620–660 nm dalga boyu), Leydig hücre aktivitesini ve testosteron üretimini artırabileceğini göstermektedir. Bu terapötik etkinin mitokondriyal aktivitenin uyarılması ve ATP üretiminin artışıyla ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Ancak bu faydalı etkinin yalnızca belirli enerji yoğunluklarında ve sürelerde ortaya çıktığı, yüksek doz veya uzun süreli maruziyetin ise ters etki yapabileceği bildirilmiştir.<sup>85</sup>

Sonuç olarak, LED ışık maruziyeti ile testosteron üretimi arasındaki ilişki, ışığın dalga boyu, yoğunluğu ve maruz kalınan süreye bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Mavi spektrumlu LED ışığın sirkadiyen ritmi bozarak testosteron üretimini olumsuz etkilediği, buna karşılık düşük düzeyde kırmızı ışığın terapötik etkiler sağlayabileceği anlaşılmaktadır.

#### **2.5.2.1. Erkek Üreme Sistemi Sirkadiyen Ritim Genleri**

Sirkadiyen ritim, organizmanın içsel biyolojik saatini belirlerken, özellikle BMAL1, CLOCK, PER1, PER2 gibi çekirdek saat genleri vasıtasıyla hem merkezi hem de periferik dokulardaki fonksiyonları koordine etmektedir. Bu genlerin erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri yaygın olarak incelenmekte olup, azalması ya da mutasyona uğraması halinde testosteron üretimi, spermatogenez ve fertilite üzerinde belirgin bozulmalara yol açmaktadır.<sup>86 87</sup>

#### **2.5.2.1.1. BMAL1**

BMAL1 tüm bu sistemin ana transkripsiyon faktörlerinden biridir. Farelerde Bmal1 geninin knock-out modeli, erkek bireylerde infertilite, düşük testosteron ve yüksek LH seviyeleriyle karakterize edilmiştir. Bu durum, Leydig hücrelerinde steroidogenez yolunun bozulduğunu göstermektedir.<sup>86</sup> Keçi Leydig hücrelerinde yapılan güncel bir hücre modeli çalışması, BMAL1'in StAR, HSD3B2, SF1, GATA4 gibi steroidogeneze ilişkin genleri regüle ederek testosteron sentezini doğrudan etkilediğini ortaya koymuştur.<sup>88</sup>

#### **2.5.2.1.2 CLOCK**

CLOCK geni, BMAL1 ile heterodimer oluşturur ve PER/CRY gibi negatif dönüt genlerini aktive eder. CLOCK geninde mutasyonlar, ritmin süre ve amplitüde kısmında bozulmaya neden olarak hormon salınımında düzensizliklere yol açabilir.<sup>83</sup>

#### **2.5.2.1.3 PER1 & PER2**

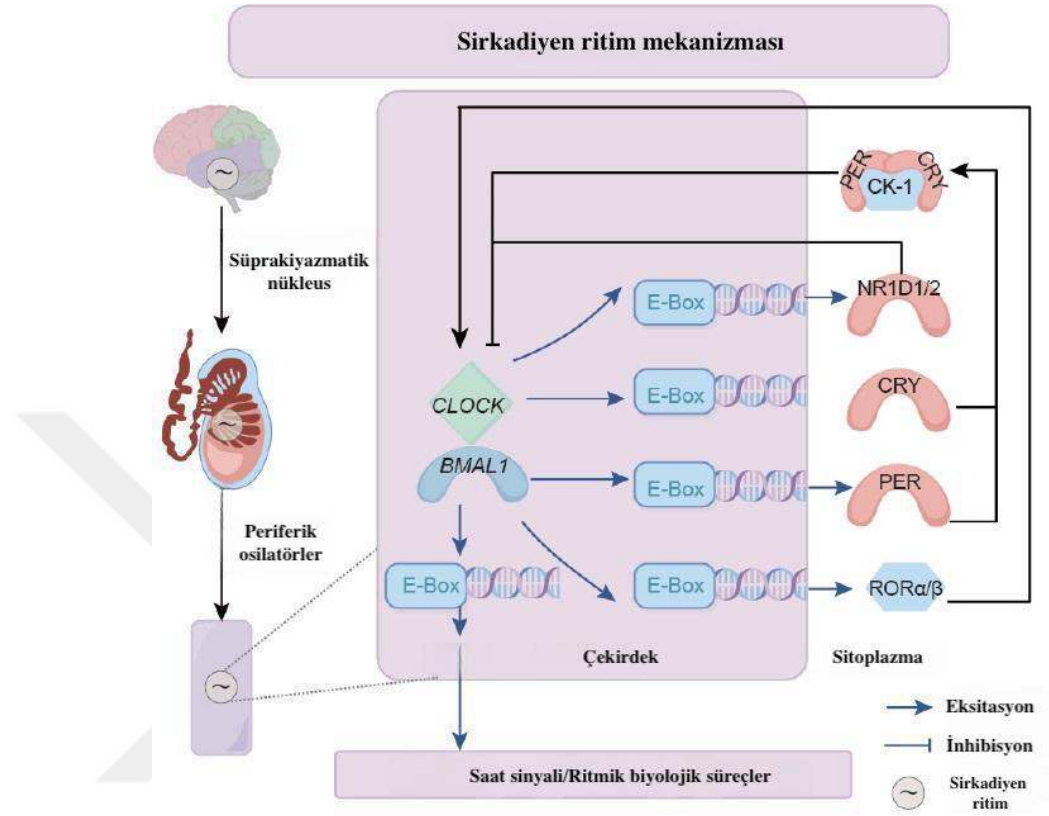
PER1 ve PER2 ise negatif dönüt döngüsünün bir parçası olarak kritik rol oynar. Testiste ifadeleri, CLOCK-BMAL1 kompleksi tarafından sağlanan ritmik transkripsiyonla düzenlenir. Bu genlerdeki bozulmalar, sirkadiyen ritmi bozmakla beraber, spermatogenez ve testosteron üretiminde de aksamalara neden olur.<sup>87</sup>

#### **2.5.2.1.4 Klinik ve Deneysel Sonuçlar**

Farelerde Bmal1 ve Clock genlerinde manipülasyon yapıldığında hem hormon salınımı hem de fertilite üzerinde olumsuz etkiler gözlemlenmiştir.<sup>83</sup> İnsanlarda yapılan gözlemsel çalışmalarda da gece-gündüz döngüsünün bozulması (örneğin vardiyalı çalışma), semen kalitesi, sperm motilitesi ve testosteron düzeylerinde düşüşe yol açmıştır. Bu olgu, sirkadiyen gen fonksiyonlarının erkek fertilitesi üzerindeki klinik önemde etkilerini ortaya koymaktadır.<sup>89</sup>

Erkek üreme sistemi üzerinde sirkadiyen ritm genlerinin tümü (özellikle BMAL1 → CLOCK → PER/CRY yolu), periferde testiküler steroidogenez ve spermatogenez üzerinde rol oynamaktadır (Şekil 13).<sup>87</sup> BMAL1 genlerinin silinmesi, CLOCK mutasyonları veya PER1/2 düzensizliği gibi faktörler, hormonal dengenin bozulmasına, testosteron seviyelerinin düşmesine ve sperm kalitesinde azalmaya neden olmaktadır.<sup>83</sup>

Bu durum, aydınlatma, çevresel stres ve genetik yapı gibi dışsal etkenlerin biyolojik saati bozarak erkek fertilitesi olumsuz etkileyebilir.<sup>90</sup>



Şekil 13. Erkek Üreme Sisteminde Sirkadiyen Ritim<sup>87</sup>

### 2.5.3. LED Işığın Sperm Hücreleri Üzerine Etkileri

LED ışık teknolojisi, farklı dalga boylarında biyolojik sistemler üzerinde hem yararlı hem de zararlı etkiler gösterebilen bir ışık kaynağıdır. Sperm hücreleri gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip ve ışığa duyarlı hücrelerde, LED ışığın dalga boyu ve maruz kalma süresi doğrudan fertilité parametrelerini etkileyebilmektedir. Bu etkiler özellikle sperm hareketliliği, morfolojisi, konsantrasyonu, mitokondriyal fonksiyon, DNA bütünlüğü ve akrozom reaksiyonu üzerinden gözlenmektedir.<sup>82</sup>

#### 2.5.3.1. Dalga Boylarına Göre LED Işıkların Etkileri

Mavi LED ışığı (470 nm), yüksek enerjili ve kısa dalga boyludur. Bu spektrumda uzun süreli maruziyet; testis dokusunda histolojik hasara, sperm sayısında düşüşe ve DNA bütünlüğünün bozulmasına neden olmuştur.<sup>82</sup> Prepubertal sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, mavi ışığa maruz kalan gruplarda sperm hareketliliği belirgin şekilde azalmış,

testis ağırlığı küçülmüş ve melatonin düzeylerinde baskılanma gözlemlenmiştir.<sup>82</sup> Benzer şekilde, Dandarawi horozlarında yapılan başka bir deneyde, yeşil ve mavi LED ışığa maruz kalan gruplarda toplam sperm sayısı, hızlı ilerleyen sperm yüzdesi, eğri doğrusal hız, ortalama yol hızı ve düz doğrusal hız gibi parametrelerde anlamlı azalmalar kaydedilmiştir.<sup>91</sup>

Kırmızı (620–660 nm) ve kızılötesi LED ışığı, düşük dozlarda uygulandığında fotobiyomodülasyon etkisiyle sperm parametrelerini iyileştirebilmektedir. Asthenozoospermik erkeklerde yapılan kontrollü bir çalışmada, 470 nm ve 660 nm LED ışığıyla tedavi edilen gruplarda hızlı ilerleyen sperm oranının %11.8'den %16.3'e çıktığı; hareketsiz sperm oranının %72.5'ten %66.7'ye düştüğü bildirilmiştir.<sup>85</sup> Domuz sperminde yapılan uygulamalarda ise kırmızı LED ışık uygulamasının mitokondriyal membran potansiyelini artırdığı, sperm hareketliliğini ve akrozom bütünlüğünü iyileştirdiği tespit edilmiştir.<sup>92</sup>

#### **2.5.3.2. Sperm DNA Bütünlüğü ve Akrozom Reaksiyonu Üzerine Etkileri**

Kırmızı ve kızılötesi ışığın DNA bütünlüğü üzerinde zararlı bir etkisi olmadığı, aksine sperm DNA fragmentasyonunu azaltabildiği belirtilmiştir. Ayrıca ışık tedavisi, akrozom reaksiyonunu da desteklemekte, bu da sperm hücresinin yumurtaya penetrasyon kapasitesini artırmaktadır.<sup>93</sup> TUNEL ve Comet testleriyle doğrulanan çalışmalarda, mavi LED ışığına uzun süreli maruziyetin sperm DNA'sında hasara ve apoptoz oranlarında artışa neden olduğu gösterilmiştir.<sup>82</sup> Bu etkilerin temelinde, LED ışığın mitokondrideki fotoreseptör proteinleri (örneğin sitokrom C oksidaz) uyararak ATP üretimini artırması, reaktif oksijen türlerini (ROS) düzenlemesi ve nitrik oksit (NO) sentezini uyarması yer almaktadır. Bu biyokimyasal yollar sperm motilitesi, membran bütünlüğü ve enerji metabolizmasını doğrudan etkilemektedir.<sup>94</sup>



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanları

Bu araştırma, deneysel, prospektif ve randomize bir çalışma olup, Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 24.04.2025 tarihinde yapılan toplantıda 1 numaralı karar ile etik onay almıştır.

Projede Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (SABİDAM)' den temin edilen, 24 adet Wistar albino türü erişkin ve yaşlı erkek sıçanlar kullanıldı. Denekler kontrollü oda koşullarında ( $22 \pm 1$  °C ve 12 saatlik gece/gündüz siklusu) tutuldu ve 30 günlük deney süresi boyunca (uygulama öncesi hariç) su ve yeme ulaşması konusunda herhangi bir kısıtlamaya gidilmedi. Ayrıca, çalışmada özel bir diyet uygulanmayıp standart sıçan pelletleri verildi. Standart yaşam koşullarını sağlamak, hayvan refahını korumak ve deneysel sonuçları olumsuz etkileyebilecek stres faktörlerini en aza indirmek amacıyla hayvanlar, her kafeste 4 sıçan olacak şekilde toplam 6 kafeste barındırıldı. Böylece hayvanların yem ve suya engelsiz şekilde ulaşabilmesi, hareket alanlarının yeterli olması, sosyal etkileşimlerinin sürdürülmesi ve aşırı kalabalıktan kaynaklanabilecek stres, agresyon ya da yaralanma risklerinin önlenmesi hedeflendi. Bireyler, karışmayı önlemek ve bireysel verilerin takibini sağlamak üzere renk kodlu tüy boyası ile tekil olarak işaretlendi; yem ve suya erişim garanti edildi ve kafes başına hayvan yoğunluğu 4'te sabitlendi.

#### 3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada SABİDAM'den temin edilen ağırlıkları 350 ( $\pm 50$ ) gr erişkin 12 adet, 400 ( $\pm 50$ ) gr yaşlı 12 adet, toplamda 24 adet erkek, Wistar-Albino cinsi erişkin ve yaşlı sıçan kullanıldı. Temin edilen 24 adet sıçan deneysel amaç ve hedeflere ulaşmak için yaşlarına göre rastgele her bir grupta 6 sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı;

Grup 1 (G1): Normal koşullarda yaşatılan erişkin erkek sıçanlar (n=6). Bu gruptaki hayvanlar standart gece/gündüz siklusunda bırakılmıştır.

Grup 2 (G2): Kırmızı LED ışığa maruz bırakılan erişkin erkek sıçanlar (n=6). Bu gruptaki hayvanlar 12 saat kırmızı LED ışık altında, 12 saat karanlıkta bırakılmıştır. (Aydınlık süresi 08:00-20:00; karanlık süresi 20:00-08:00)

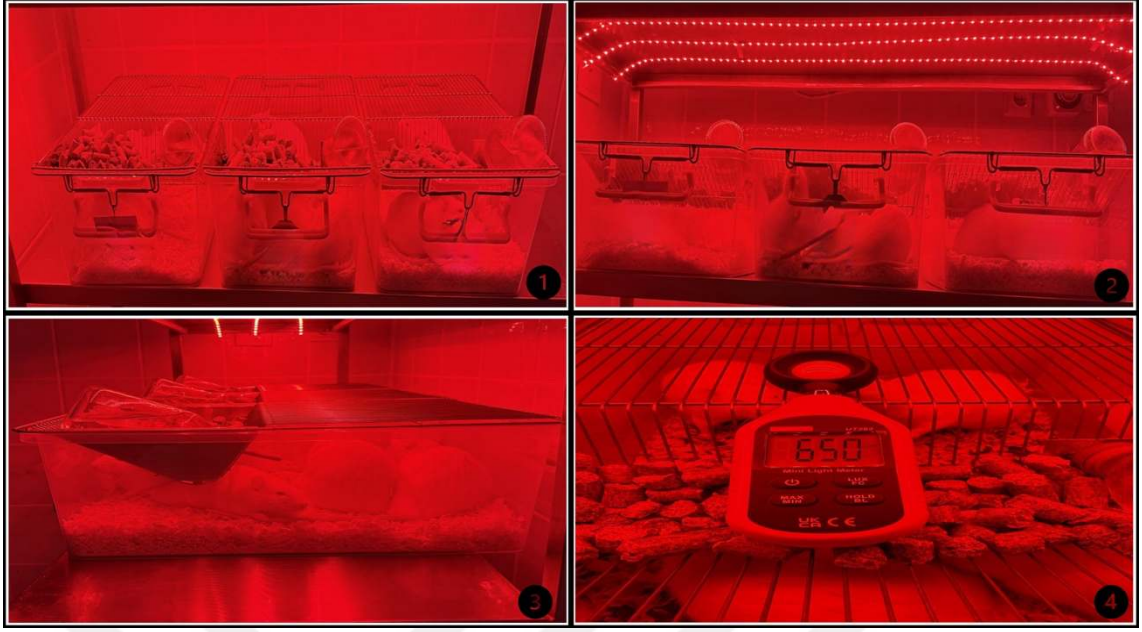
Grup 3 (G3): Normal koşullarda yaşatılan yaşlı erkek sıçanlar (n=6). Bu gruptaki hayvanlar standart gece/gündüz siklusunda bırakılmıştır.

Grup 4 (G4): Kırmızı LED ışığa maruz bırakılan yaşlı erkek sıçanlar (n=6). Bu gruptaki hayvanlar 12 saat kırmızı LED ışık altında, 12 saat karanlıkta bırakılmıştır. (Aydınlık süresi 08:00-20:00; karanlık süresi 20:00-08:00)

30 günlük süreç sonunda deneklerden alınan testis doku örnekleri ve serum örnekleri, ışık-elektron mikroskopik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelendi. Ardından denekler kurifiye edildi.

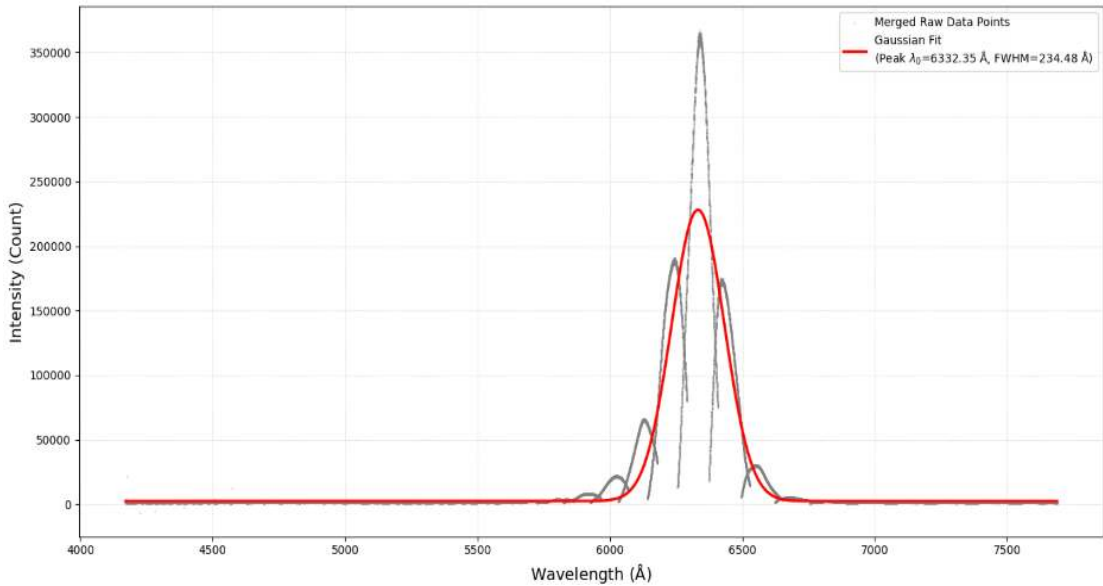
### 3.3. Kırmızı LED Işık Maruziyeti

Deney boyunca (30 gün) kırmızı LED ışığı grubundaki hayvanlar, kırmızı LED aydınlatma şeridi ( 2835 SMD şerit Led; 4.8 W/620-750 nm/ 155 lm) ile kafes etrafı aydınlatılacak şekilde, kontrol grubundaki hayvanlar gün ışığı ile aydınlatılacak şekilde; havalandırılmalı sıçan yetiştirme kafeslerinde (40 × 30 × 20 cm) tutuldu. Deney düzeneğinde, LED ışık kaynağı sıçanların melatonin konsantrasyonlarını yükseltecek ancak retina hasarına neden olmayacak bir ışınım seviyesinde kullanılmıştır.<sup>82-95</sup> Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Fizik bölümünde hazırlanan 120 cm uzunluğunda 3 adet şerit LED, sıçan yetiştirme kafeslerinin koyulduğı raya 10 cm aralıklarla monte edildi. Deney düzeneğinde kırmızı LED ışık kaynağı, her sıçan kafesinin merkezinin yaklaşık 20 cm üzerine yerleştirilmiştir (Resim 1). Sıçanların barındığı kafesin tüm alanındaki ışık şiddeti, bir lüksmetre ile ölçölmüş ve aynı seviyeye ayarlanmış, kafes boyunca 650±30 lüks/1 m olacak şekilde sabitlenmiştir. Altı saatlik aralıklarla (08:00, 14:00, 20:00, 02:00) yapılan ölçömlerde ışık şiddeti; aydınlık döngüde 650±30 lx, karanlık döngüde 0 lx ölçölmüştür. Deney başlamadan önce, LED ışığın tayfsal dağılımı için spektrofotometre ölçömleri yapılmıştır. Pik dalga boyunun 620 nm (Full width at half maximum-fwhm=20nm) olduğı ölçölmüştür. Tayfin diğeri alanlarında herhangi bir ışıma gözlenmemiştir.



**Resim 1. Deney Düzenğinde Kırmızı LED Aydınlatma Koşullarında Barındırılan Sıçanlar**  
 (1-Havalandırılmalı kafeslerde kırmızı LED şerit ışık ile sağlanan deney ortamı; 2- Kafesler üzerinde kırmızı LED şerit ışık kaynağı; 3- Kafeslerin yandan görünümü; 4- Kafes düzeyinde ışık şiddetinin lüksmetre ile ölçümü;  $650 \pm 30$  lx).

Deneylerde kullanılan LED lambanın optik tayfı, Ankara Üniversitesi Kreiken Gözlemevi'nde bulunan Whoppschel tayfçeker kullanılarak, 2 saniyelik poz süresi ve 15.000 çözünürlük ile elde edilmiştir. Elde edilen tayf Grafik 1'de sunulmuştur.



**Grafik 1. Deneyde Kullanılan LED'in Optik Tayfı.**  
 (Gri çizgiler farklı orderlardan alınan ölçümleri, kırmızı çizgi ise tayfa uydurulan Gauss uyum modelini göstermektedir.)

Grafik 1’de görüldüğü üzere tayfin yalnızca optik bölgenin kırmızı kısmında, beklenildiği gibi belirgin bir pik tespit edilmiştir. Tayfa uygulanan Gauss uyumu sonucunda pik merkezi 6332.3 Å olarak belirlenmiştir.

#### **3.4. Anestezi, Analjezi ile Kan ve Histopatolojik Numunelerin Alınması**

Çalışmada 30 günlük deney sonunda tüm deney hayvanlarının ağırlıkları yeniden ölçüldü ve ardından ratlara intraperitoneal yolla 20 mg/kg dozunda trankizilan ve 50 mg/kg dozunda ketamin tek seferlik dozlar halinde verilerek anestezi altına alındı. Biyokimyasal analiz amacıyla, sıçanlardan intrakardiyak yaklaşık 5-10 cc kan örnekleri alındı ve bu örnekler EDTA’lı mor ve jel içeren biyokimya sarı tüplere aktarıldı. Daha sonra santrifüj işlemi uygulandı ve serumlar mikropipet kullanılarak çekilip eppendorf tüplerine aktarıldı. Bu tüpler daha sonra -20 °C’de muhafaza edildi. Bütün sıçanlara batın orta hat insizyonu yapılarak bilateral orşiektomi yapıldı (Resim 2). Testis ve epididimis dokuları bütünlükleri bozulmadan, ikiye bölünerek %10’luk formalin solüsyonunda fıkse edildi. Makroskopik olarak belirgin değişiklik görülmedi. Sonrasında tüm sıçanlar servikal dislokasyon yöntemiyle ötenaziye tabi tutuldu.



**Resim 2. Deney Hayvanlarında Kan Örneklerinin Alınması ve Bilateral Orşiektomi İşlemleri**  
(1- Anestezi sonrası cerrahi pozisyonda sabitlenen sıçan; 2- İntrakardiyak kan örneği alınması; 3- Batın orta hat insizyonu sonrası abdominal organların görünümü; 4- Testis ve epididimis dokularının çıkarılması.)

### 3.5. Testis doku örneklerinin ışık mikroskopik incelemesi

Deneklerden alınan testis doku örnekleri, %10'luk nötral formalin içerisinde alınıp, oda ısısında 72 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra formalinin uzaklaştırılması için dokular su ile yıkandı ve Leica TP 1020 Ototeknikon cihazı ile Tablo 2'de belirtilen doku takip yöntemi uygulandı. Beş µm kalınlığında histolojik kesitler alınıp, Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyanacak ve Olympus BX53 ışık mikroskopunda incelendi. Bloklardan ayrıca immünohistokimyasal incelemeler için de doku kesitleri alınıp, uygun yöntemlerle hazırlandı.

**Tablo 2. Testis Dokusu Işık Mikroskopik Doku Takip İşlemi**

|                  |                    |                  |
|------------------|--------------------|------------------|
| Oda sıcaklığında | Nötral formalin    | 30 dakika        |
| Oda sıcaklığında | %70'lik etil alkol | 1 saat           |
| Oda sıcaklığında | %80'lik etil alkol | 1 saat           |
| Oda sıcaklığında | %90'lik etil alkol | 1 saat 30 dakika |
| Oda sıcaklığında | Saf alkol          | 1 saat           |
| Oda sıcaklığında | Saf alkol          | 1 saat           |
| Oda sıcaklığında | Saf alkol          | 1 saat 30 dakika |
| Oda sıcaklığında | Saf alkol+ksilol   | 1 saat           |
| Oda sıcaklığında | Ksilol             | 1 saat           |
| Oda sıcaklığında | Ksilol             | 1 saat 30 dakika |
| 60°C'de          | Parafin            | 1 saat           |
| 60°C'de          | Parafin            | 1 saat 30 dakika |

### **3.6. Testis Doku Kesitlerinde Histomorfometrik Analizler**

Testis doku bloklarından, alınan ışık mikroskopik kesitler Olympus BX53 (Tokyo-Japonya) ışık mikroskopunda incelenirken mikroskoba bağlı Bioquant Omega II software analiz programı kullanılarak, seminiferöz tübül çapı ve seminiferöz tübül epitel kalınlıkları hesaplandı ve uygun istatistiksel yöntemle değerlendirildi.

### **3.7. Sperm Parametreleri**

Deneyin son günü testis diseksiyonu sırasında çıkarılan kauda epididim, DMEM ortamında parçalandıktan sonra 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edildi. Thoma lamı üzerinde sperm motilitesi ve sayısı değerlendirildikten sonra, Diff Quick boyama yöntemiyle x40 büyütmede en az 200 spermde morfolojik değerlendirme yapıldı. (Resim 3).



**Resim 3. Ratlardan Çıkarılan Testis ve Epididimis Örnekleri**

### **3.8. Testis Doku Kesitlerinde İmmünohistokimyasal Analizler**

Testis doku kesitlerinde Leydig hücre belirteci 3 $\beta$ HSD, proliferatif hücre belirteci PCNA ve sirkadiyen ritim belirteci Bmal1 seviyelerinin belirlenmesi için doku bloklarından elde edilen histolojik kesitler, polilizin kaplı lamalar üzerine alındı. 60 °C’de etüvde ksilol içerisinde 1 gece deparafinize edilen doku kesitleri, oda ısısında ksilol serilerinden geçirilerek, derecesi giderek azalan alkol serileri içerisinde hidrate edilip, distile su içerisine alındı. Kesitler daha sonra, sitrat solüsyonu (pH:6) içerisine alınarak 95°C’lik su banyosunda, 30 dakika süreyle tutularak antijenlerin açığa çıkarılması işlemi gerçekleştirildi. Oda ısısında 45 dk soğutulan kesitler, distile suda yıkanarak ardından %3’lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) içerisine alındı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’te yaklaşık 10 dk kadar bekletildikten sonra, kesitler, saf su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesite nonspesifik bağlanmayı engellemek amacıyla blocking damlatıldı ve oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra kesitler, saf su ve fosfat tamponundan geçirildi. Daha sonra doku kesitlerine belirtilen primer antikörler ayrı ayrı damlatıldı. Primer antikör damlatılan tüm kesitler +4°C’de, nemli ortamda bir gece bekletildi. Negatif kontrol için alınan kesitlere primer antikörler yerine, tampon solüsyonu damlatıldı. Primer antikörle muamele edilip 1 gece +4°C’de ve ardından 1 saat oda ısısında bekletilen kesitler, daha sonra distile su ve PBS’den geçirilerek üzerlerine Biotin damlatılarak 15 dk süreyle oda ısısında tutuldu. 15 dk sonra distile su ve PBS’de yıkanan kesitlerin etrafı kurulanıp Avidin damlatılarak, 20 dakika süreyle oda ısısında bekletildi. Distile su ve PBS’den geçirilen kesitlere, aminoetilkarbozol (AEC) solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika süre ile bekletildi. Daha sonra çeşme suyu içerisinde yıkanacak doku kesitleri, zıt boyama



için hematoksilen ile boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler, çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı kapama maddesi damlatılarak dokular lamel ile kapatıldı, Olympus BX53 ışık mikroskobu (Japonya) ile incelendi.

### 3.9. Testis Doku Kesitlerinde İmmünohistokimyasal Skorlama

Testiste Leydig hücre sayısı, pozitif hücre yüzdesine göre kantitatif olarak değerlendirildi. 40'lık objektifte rastgele seçilen 10 alanda 3βHSD pozitif hücreler sayıldı ve uygun istatistiksel yöntemle değerlendirildi.

### 3.10. Elektron Mikroskopi Yöntemleri

Elektron mikroskobik değerlendirme için deneklerden alınan testis doku parçaları, Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 5 lik glutaraldehit solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra üzerinde birkaç damla glutaraldehit olan dişçi mumuyla kaplı petri üzerinde jilet yardımıyla 1 mm<sup>3</sup> lük parçalara ayrıldı. Doku parçaları tekrar glutaraldehit solüsyonuna alınarak 3 saat kadar tespit edildi. Böylece dokular glutaraldehit ile toplam 4 saat tespit edilmiş oldu. Daha sonra dokular Millonig fosfat tamponunda iki defa 10'ar dk çalkalandı ve ardından Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1 lik osmium tetraoksit (OsO<sub>4</sub>) solüsyonu ile ikinci defa tespit edildi. İki saatlik osmium tetraoksit tespitinden sonra dokular fosfat tamponu ile iki kez 10'ar dakika yıkandı. Daha sonra dokular, Tablo 3'de belirtilen sıraya göre derecesi giderek artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi.

**Tablo 3. Elektron Mikroskobik Doku Takibinde Dehidratasyon İşlemi**

|                     |      |           |
|---------------------|------|-----------|
| %50'lik etil alkol  | +4°C | 15 dakika |
| %70'lik etil alkol  | +4°C | 15 dakika |
| %86'lık etil alkol  | +4°C | 15 dakika |
| %96'lık etil alkol  | +4°C | 15 dakika |
| %100'lük etil alkol | +4°C | 15 dakika |
| %100'lük etil alkol | +4°C | 15 dakika |

Buraya kadar olan işlemler +4°C'de gerçekleştirilecektir. Daha sonra Tablo 4'de belirtilen işlemler oda ısısında gerçekleştirilecektir.



**Tablo 4. Elektron Mikroskopik Doku Takibinde Şeffaflandırma İşlemi**

|                  |                  |           |
|------------------|------------------|-----------|
| %100 Etil alkol  | Oda sıcaklığında | 15 dakika |
| Propilen oksitte | Oda sıcaklığında | 15 dakika |
| Propilen oksitte | Oda sıcaklığında | 15 dakika |

Dehidratasyon ve şeffaflandırma işlemleri tamamlandıktan sonra, doku parçaları 1 hacim propilen oksit ve 1 hacim rezin'den (gömme materyali) oluşturulan karışım içerisinde 2'ser defa 30'ar dakika süreyle bekletildi. Bu işlemlerden sonra doku parçaları taze hazırlanmış rezin içerisine alınarak 1 gece boyunca rotatorda döndürülerek karıştırıldı ve rezinin doku parçaları içerisine daha iyi nüfuz etmesi sağlandı. Ertesi gün rotatordan alınan doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak Beem kapsüllere gömüldü 60°C etüvde 48 saat polimerize edildi. Daha sonra bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan Ultracut S ultramikrotomu ile 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı ve doku bloklarında uygun alanların seçimi yapıldı. Belirlenen alanlardan ultramikrotom ile 50 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere alınarak %70'lik etil alkolde hazırlanan doymuş uranil asetat ile Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler JEOL-JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu (Japonya) ile incelendi.

### **3.11. Biyokimyasal Analiz**

Rat Testesteron (Finetest marka ELİSA kiti Catalog No: ER1462), Rat SOD (Finetest marka ELİSA kiti Catalog No: ER1950), Rat GPX1 (Finetest marka ELİSA kiti Catalog No: ER0274), Rat MDA (Finetest marka ELİSA kiti Catalog No: ER1878), Rat LH (Finetest marka ELİSA kiti Catalog No: ER1123), Rat Melatonin (Elabscience marka ELİSA kiti Catalog No: E-EL-R0031) düzeyleri enzime bağlı immünosorbent deneyi (ELİSA) ile kit protokollerine uygun şekilde ölçülmüştür. Standartların kit prosedürüne göre seri şekilde dilüsyonu yapıldı. Her kit için belirlenen standart ve örnek kuyucuğuna kit prosedürüne uygun miktarda örnek standartlar ve örnekler eklendi. 37°C'de belirlenen prosedüre uygun olarak inkübasyon yapıldı. Daha sonra aspirasyon ve yıkama işlemi yapıldı. Her kuyucuğa 100 µL biyotin antikor çalışma solüsyonu eklendi. 5 kez yıkama ve aspirasyon yapıldı. 37°C'de 60 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra HRP-

Streptavidin konjugat, 100 µL her kuyucuğa eklendi. 60 dakika 37°C’ de inkübasyona bırakıldı. 5 kez aspirasyon ve yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra TMB Substrat solüsyonundan 90 µL eklendi. 15 dakika karanlıkta 37°C’de inkübasyon yapıldı. Son olarak 50 µL stop solüsyonu eklendi. Hemen 450 nm’de okundu. Rat Testesteron, SOD, GPX1, MDA, LH, Melatonin konsantrasyonları bulundu. Sonuçlar dilüsyon kat sayısı ile çarpılarak konsantrasyonları bulundu.

### **3.12. İstatistiksel Analiz**

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümler ise ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve çeyrekler arası açıklık) olarak özetlendi. Sayısal ölçümlerin normal dağılım varsayımını sağlayıp sağlamadığı Shapiro Wilk testi ile test edildi. İki den fazla grubun sayısal ölçümlerinin genel karşılaştırılmasında varsayımların sağlanması durumunda Tek Yönlü Varyans Analizi, varsayımların sağlanmaması durumunda ise Kruskal Wallis testi kullanıldı. Bu karşılaştırmalarda anlamlı bulunan durumlar için grupların ikili karşılaştırmalarında varsayımların sağlanması durumunda grup içi varyansların homojen olup olmamasına göre Bonferroni veya Games&Howell testleri kullanıldı. Grupların ikili karşılaştırmalarında varsayımların sağlanmaması durumunda ise Bonferroni düzeltmesi yapılmış Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

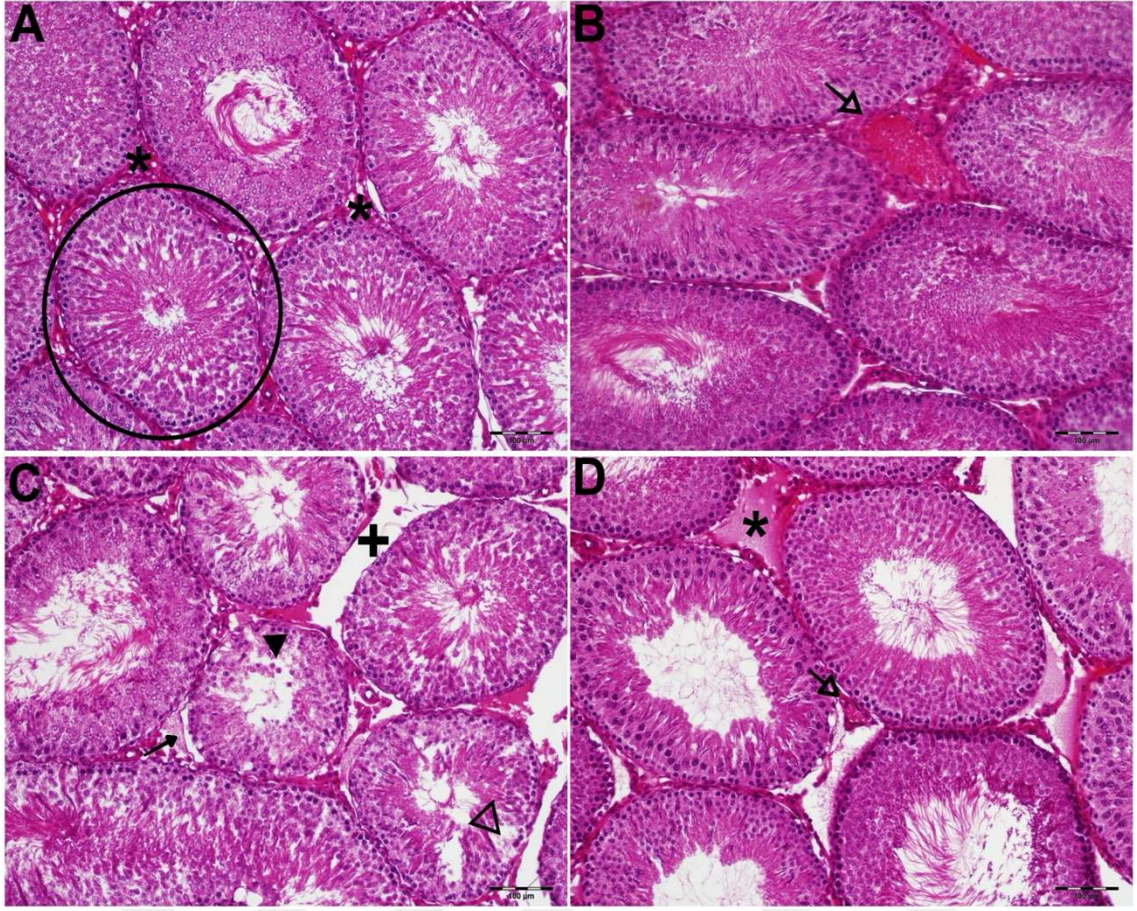
Normal koşullarda yaşatılan erişkin erkek sıçanların (G1) testis kesitlerinin H&E boyamasında seminiferöz tübüller ve interstisyel alan normal histolojik yapıdaydı. Seminiferöz tübüller yuvarlak veya oval konturde olup düzenli bir bazal membran ile çevriliydi ve tübül epiteli lümene doğru spermatojenik hücrelerin normal gelişim evrelerini içermekteydi. Tübül epitelinde spermatogonyumlar bazale yakın, primer ve sekonder spermatositler daha üst tabakalarda, lümene yakın konumda yuvarlak ve uzamış çekirdeğe sahip spermatidler ile lümende serbest spermatozoonlar bulunmaktaydı. Spermatojenik hücrelerin arasında yer alan Sertoli hücrelerinin belirgin oval veya üçgen şekilli çekirdekleri de bazal membrana oturmaktaydı. Tübüller arasındaki interstisyel alanda bağ dokusu hücreleri ve kan damarları ile birlikte eozinofilik sitoplazmalı, yuvarlak-oval çekirdekli normal yoğunlukta kümeler halinde yerleşmiş Leydig hücreleri yer almaktaydı. Genel olarak erişkin sıçan testisinde seminiferöz tübüllerin yapısal bütünlüğünün ve spermatogenezin aktif ve düzenli olduğu değerlendirildi (Resim 4A).

Kırmızı LED ışığa maruz bırakılan erişkin erkek sıçanların (G2) testis kesitlerinin H&E boyamasında seminiferöz tübül epitelinin genel organizasyonunun büyük ölçüde korunduğu dikkati çekti. Tübüller arasındaki interstisyel alanda ise Leydig hücre kümelenmesinin daha belirgin olduğu gözlemlendi. Ayrıca interstisyel alanda yer alan kan damarlarında belirgin dilatasyon ve konjesyon mevcuttu. Bu bulguların, LED ışığının testiküler mikrosirkülasyon ve damar permeabilitesi üzerindeki olası etkilerinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (Resim 4B).

Normal koşullarda yaşatılan yaşlı erkek sıçanların (G3) testis kesitlerinin H&E boyamasında seminiferöz tübüllerin çaplarında belirgin azalma ve konturlarında düzensizlik izlendi. Birçok tübülde tübül epitel kalınlığının azaldığı ve tübül lümeninde az sayıda spermatozoon bulunduğu gözlemlendi. Bazı tübüllerde hücre diziliminde düzensizlik ve lümene dökülmüş immatür hücrelere bağlı olarak tübül lümeninde yer yer vakuole alanlar dikkati çekti. Seminiferöz tübüllerin bazal membranlarında yer yer ayrılmalar mevcuttu. Tübüllerdeki büzüşmeye bağlı olarak interstisyel alanın genişlediği ve Leydig hücrelerinin sayıca ve dağılım açısından düzensiz bir görünüm sergilediği

belirlendi. Bu değişikliklerin, yaşı sıçan testisinde yaşılanmaya bağlı gelişen; belirgin testiküler atrofi, azalan spermatogenez ve interstisyel fibrozis ile uyumlu olduğu şeklinde değerlendirildi (Resim 4C).

Kırmızı LED ışığa maruz bırakılan yaşı erkek sıçanların (G4) testis kesitlerinin H&E boyamasında, G3 grubuna kıyasla seminiferöz tübüllerin daha düzenli hâle geldiği ve tübül epitel kalınlığının belirgin ölçüde düzeldiği izlendi. Tübül lümenlerinde daha fazla sayıda spermatid ve spermatozoonun bulunması, spermatogenezin kısmen toparlandığını düşündürdü. Buna karşın interstisyel alandaki kısmi ödeme bağlı intertübüler mesafedeki genişlemenin devam ettiği belirlendi. Ayrıca kan damarlarında dilatasyon ve konjesyonun ortaya çıktığı görüldü. Bu bulgular, kırmızı LED uygulamasının yaşı sıçan testisinde seminiferöz tübül yapısını ve spermatogenezini kısmen iyileştirici etkiler gösterebileceğini; ancak aynı zamanda testiküler mikrosirkülasyon ve damar permeabilitesi etkileyerek interstisyel ödem ile damar dilatasyonu/konjesyonu şeklinde değişiklikler oluşturabileceğini düşündürmektedir (Şekil 4D).



**Resim 4. Testis Doku Kesitlerinin Işık Mikroskopik Görünümü, H&E. Bar=100µm.**

(A: G1 grubuna ait testis doku kesitlerinde normal yapıda seminiferöz tübüller (daire) ve interstisyum (\*) görülmektedir, B: G2 grubuna ait testis doku kesitlerinde normal yapıdaki seminiferöz tübüllerin arasındaki interstisyel alanda yer alan kan damarlarında dilatasyon ve konjesyon (ok) izlenmektedir, C: G3 grubuna ait testis doku kesitlerinde tübül lümeninde immatür hücreler (üçgen) ve tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş üçgen) ile yer yer tübül epiteli ve bazal membran arasında ayrılmalar (ok) gözlenmektedir. İnterstisyel alanda genişlemeler (+) görülmektedir, D: G4 grubuna ait testis doku kesitlerinde normal yapıda seminiferöz tübüllerin arasında interstisyel genişlemeler (\*) ve kan damarlarında dilatasyon ve konjesyon (içi boş ok) izlenmektedir.)

#### 4.2. Histomorfometrik Bulgular

Histomorfometrik değerlendirmeler sonucunda, G1 grubunda ortalama seminiferöz tübüllerin epitel kalınlığı ( $112,9 \pm 9,3 \mu\text{m}$ ) ve tübül çaplarının ( $317,2 \pm 22,6 \mu\text{m}$ ) normal fizyolojik sınırlar içinde olduğu görüldü. G2 grupta tübül çaplarının, G1 ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark sergilemediği belirlendi ( $p > 0,05$ ). Tübül epitel kalınlığının ise G2 grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu ( $p < 0,05$ ). Diğer taraftan G3 grubunda ise seminiferöz tübül epitel kalınlığı ve tübül çaplarının gerileyerek G2 ve G1 gruplarına göre anlamlı şekilde azaldığı izlendi ( $p < 0,05$ ). G4 grupta ise bu değerlerin G3 grubuna göre anlamlı şekilde arttığı ( $p < 0,001$ ) ve G1

grubunun değerlerine yaklaştığı dikkati çekti. LED uygulamasının yaşlı testisteki tübüler atrofiyi histomorfometrik olarak belirgin ölçüde düzelttiği düşünüldü. (Tablo 5).

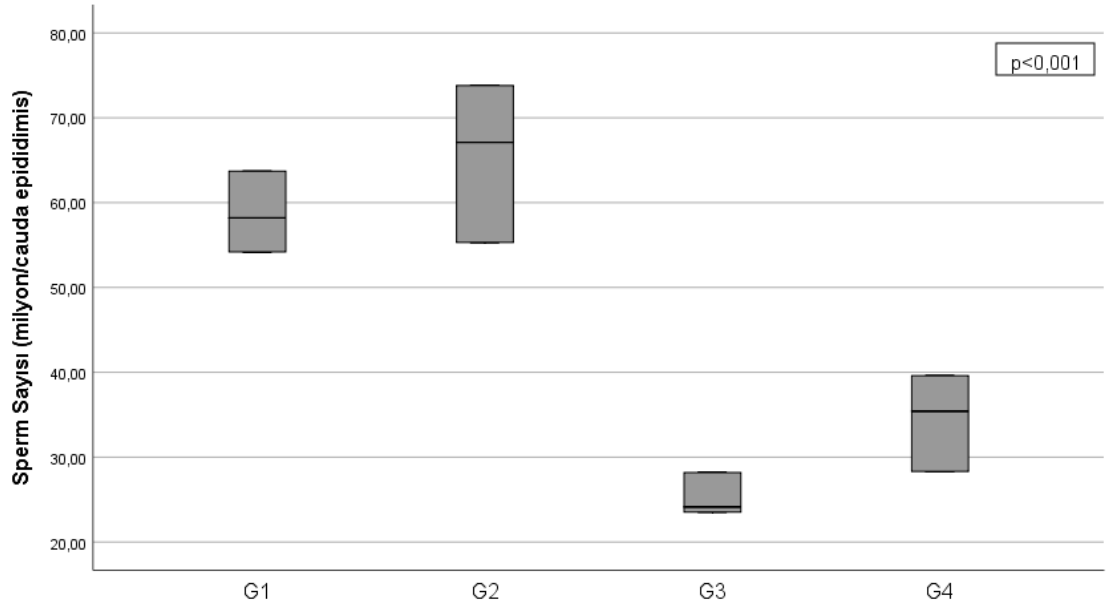
**Tablo 5. Histomorfometrik Bulguların Dağılımı**

|                                             | G1<br>(n=6)                   | G2<br>(n=6)                   | G3<br>(n=6)                   | G4<br>(n=6)      | p      |
|---------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|--------|
| Tübül Epitel Kalınlığı<br>( $\mu\text{m}$ ) | 112,9 $\pm$ 9,3 <sup>b</sup>  | 120,4 $\pm$ 12,6 <sup>b</sup> | 61,2 $\pm$ 13,8 <sup>c</sup>  | 105,2 $\pm$ 2,3  | <0,001 |
| Tübül Çapı<br>( $\mu\text{m}$ )             | 317,2 $\pm$ 22,6 <sup>b</sup> | 302,2 $\pm$ 44,8              | 269,9 $\pm$ 14,3 <sup>c</sup> | 310,6 $\pm$ 15,8 | 0,033  |

<sup>a</sup> G2 ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , <sup>b</sup> G3 ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , <sup>c</sup> G4 ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ . Veriler ortalama $\pm$ standart sapma veya medyan(çeyrekler arası açıklık) olarak özetlenmiştir.

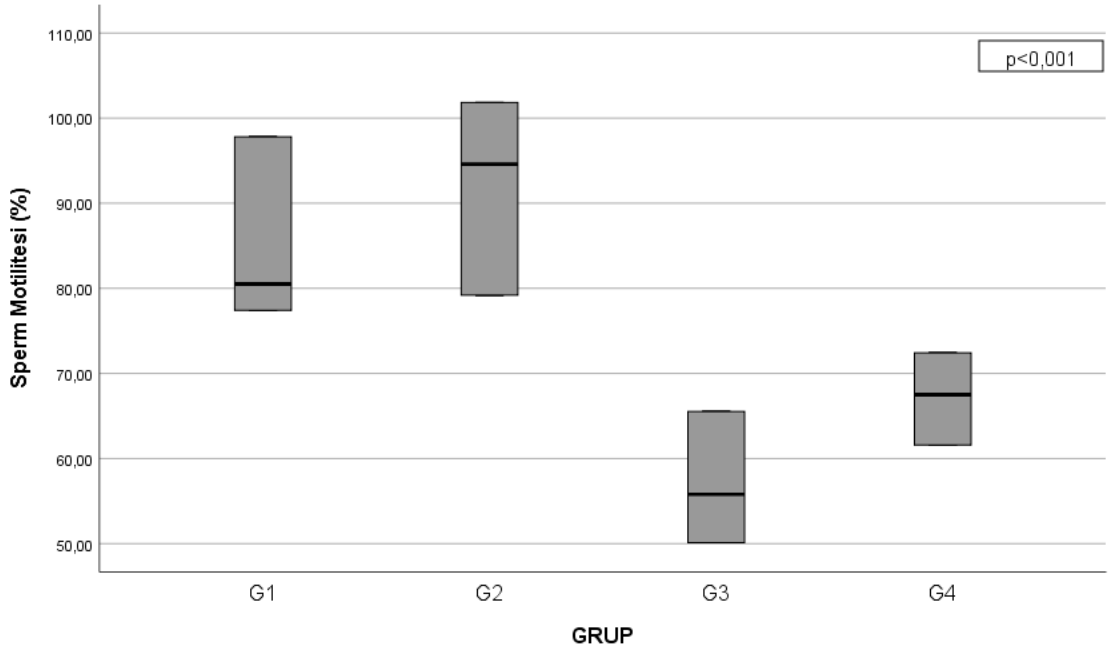
#### 4.3. Sperm Sayısı ve Sperm Morfolojisi Bulguları

G1 grubunda sperm sayısının (58,2(54,2-63,7) (milyon/cauda epididimis)) yüksek ve fizyolojik sınırlar içinde olduğu izlendi. G3 grubunda ise toplam sperm sayısının (24,1(23,5-28,2) (milyon/cauda epididimis)) belirgin şekilde azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ( $p<0,001$ ). Buna karşılık G4 grubunda sperm sayısının (35,4(28,3-39,6) (milyon/cauda epididimis)), G3 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği ( $p<0,05$ ), ancak G1 grubunun seviyesine tam olarak ulaşamadığı belirlendi (Grafik 2) (Tablo 6).



**Grafik 2. Ortalama Sperm Sayısının Gruplar Arasındaki Dağılımı**

Ortalama sperm motilitesi açısından da tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık mevcuttur ( $p<0,001$ ). G1 grubunda motilite 80,5 (77,4–97,8) % olarak belirlenirken, G2 grubunda motilite düzeylerinin 94,6 (79,2–101,8) % ile en yüksek değere ulaştığı görüldü. Buna karşılık G3 grubunda sperm motilitesi G1 ve G2 grubuna göre belirgin şekilde düşerek 55,8 (20,1–65,5) % olarak ölçüldü. G4 grubunda ise motilite değerleri 67,5 (61,6–72,4) olup G3'e kıyasla anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Analizler, G1 ve G2 grubundaki motilite değerlerinin G3 grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu ( $p<0,05$ ), ayrıca G2 grubunun G4 grubuna göre daha yüksek motiliteye sahip olduğunu gösterdi (Grafik 3) (Tablo 6)



**Grafik 3. Ortalama Sperm Motilitesinin Gruplara Göre Dağılımı**

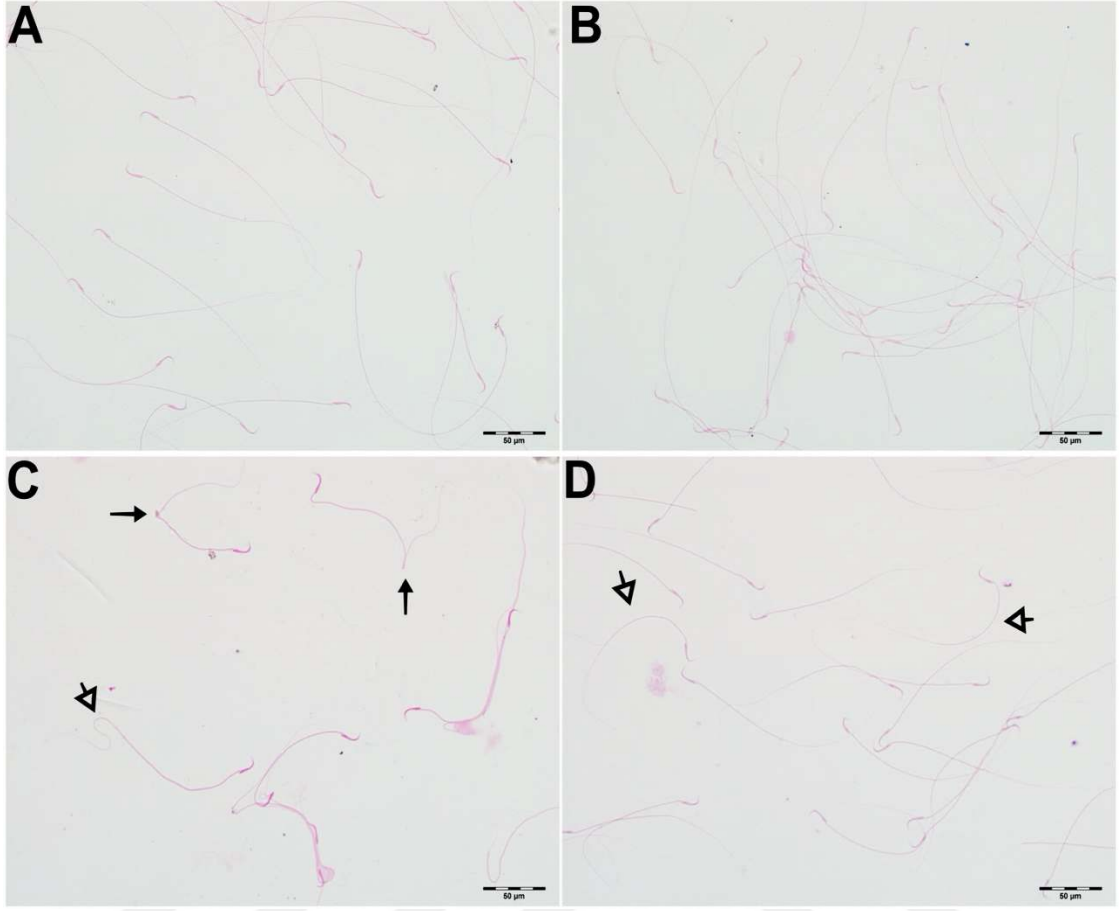
**Tablo 6. Sperm Parametrelerinin Dağılımı**

|                                              | G1<br>(n=6)                      | G2<br>(n=6)                       | G3<br>(n=6)         | G4<br>(n=6)         | p      |
|----------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|--------|
| Sperm Sayısı<br>(milyon/cauda<br>epididimis) | 58,2(54,2-<br>63,7) <sup>b</sup> | 67,1(55,3-<br>73,8) <sup>b</sup>  | 24,1(23,5-<br>28,2) | 35,4(28,3-<br>39,6) | <0,001 |
| Sperm Motilitesi<br>(%)                      | 80,5(77,4-<br>97,8) <sup>b</sup> | 94,6(79,2-<br>101,8) <sup>b</sup> | 55,8(20,1-<br>65,5) | 67,5-61,6-<br>72,4) | <0,001 |

<sup>a</sup> G2 ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>b</sup> G3 ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>c</sup> G4 ile karşılaştırıldığında p<0,05. Veriler ortalama±standart sapma veya medyan(çeyrekler arası açıklık) olarak özetlenmiştir.

G1 grubu ve G2 grubunda normal morfolojiye sahip sperm oranının yüksek olup, kuyruk anomalilerinin sınırlı düzeyde kaldığı gözlemlendi (Resim 5A-5B). G3 grubunda ise normal morfolojideki sperm oranının azaldığı, özellikle kuyruk kıvrılması/bükülmesi ve kuyruk kırığı gibi kuyruk anomalilerinin belirgin şekilde arttığı saptandı (Resim 5C). G4 grupta, G3 grubuna göre normal morfolojideki sperm oranında kısmi bir artış gözlenmiş olsa da, kuyruk anomalilerinin tamamen düzelmediği ve özellikle hafif ve orta dereceli kuyruk kıvrılmalarının devamlılık gösterdiği izlendi (Resim 5D).





**Resim 5. Sperm Morfoloji Değerlendirmesi**

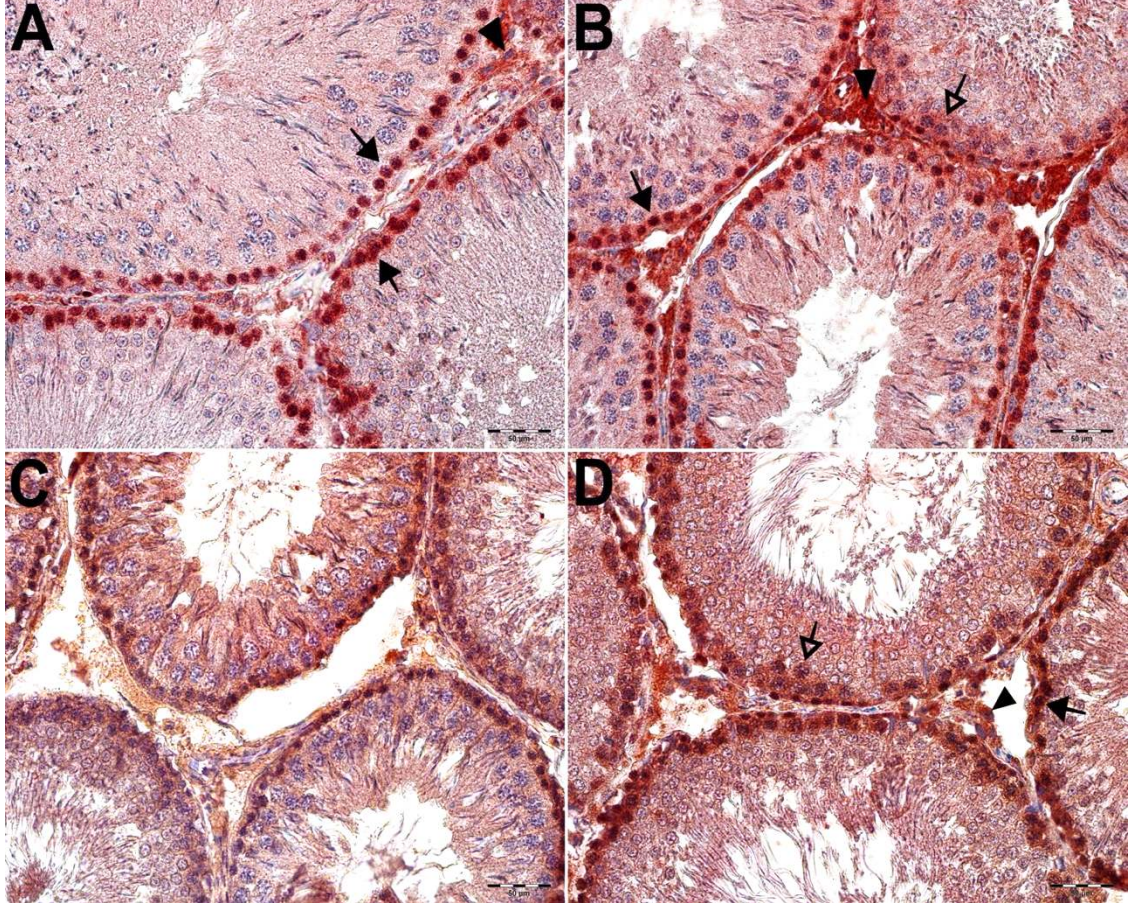
(A: G1 grubundaki deneklere ait normal yapıda baş ve kuyruk kısmına sahip spermatozoalar izlenmektedir, B: G2 grubundaki deneklere ait normal morfolojide spermatozoalar görülmektedir, C: G3 grubundaki deneklere ait spermatozoalarda kuyruk kıvrılması/bükülmesi (içi boş ok) ve kuyruk kırığı (ok) anomalileri izlenmektedir, D: G4 grubuna ait deneklerde kuyruk kıvrılması/bükülmesi anomalisi (içi boş ok) görülmektedir.)

#### 4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

##### 4.4.1. PCNA İmmünreaktivitesi

G1 grubunda DNA onarımı ve proliferatif hücre belirteci PCNA immünreaktivitesi, seminiferöz tübüllerin germinal epitelinde özellikle spermatogonyumlarda yoğun pozitiflik şeklinde izlenirken, minimal seviyede Leydig hücrelerinde de eksprese olduğu görüldü. G2 grupta ise spermatogonyumlar ve yer yer bazı primer spermatositlerde; ayrıca normalde puberteden sonra proliferasyon yeteneği sınırlı olan Leydig hücrelerinde de belirgin PCNA immünreaktivitesi izlendi. G3 grubunda bazal membrana oturan proliferatif hücre dizisi olan spermatogonyumlardaki azalmanın etkisiyle, seminiferöz tübüllerde PCNA pozitifliğinde belirgin bir azalma ile birlikte yaşlanmaya bağlı azalan Leydig hücre sayısı ve fonksiyonu nedeniyle de Leydig

hücrelerinde herhangi bir PCNA immünreaktivitesi gözlenmedi. G4 grupta ise PCNA pozitif hücre sayısının yeniden arttığı; boyanmanın hem bazale yakın germ hücrelerinde hem de Leydig hücrelerinde yoğunlaştığı ve G3 grubuna göre belirgin bir düzelmenin gerçekleştiği dikkati çekti (Resim 6).



**Resim 6. Testis Doku Kesitlerinde PCNA İmmünreaktivitesi Bar=50 µm.**

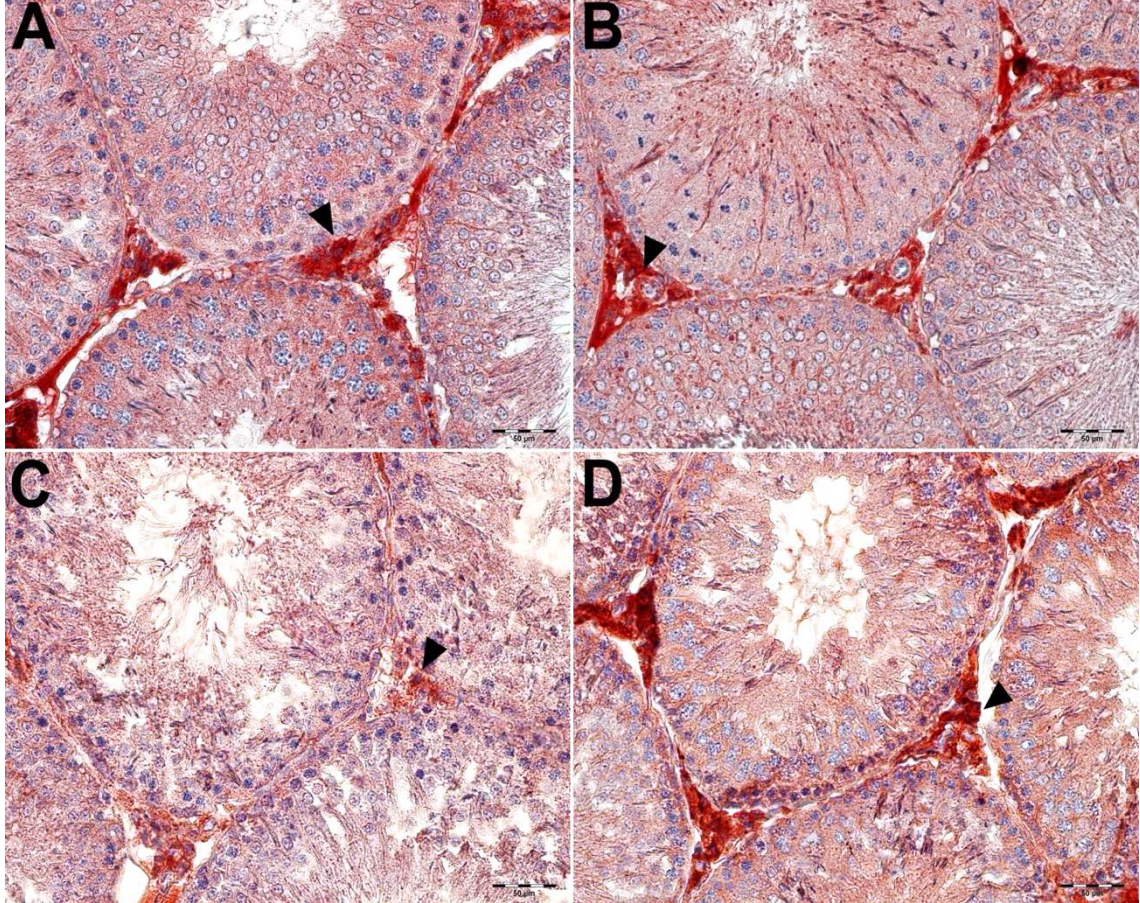
(A: G1 grubunda PCNA pozitifliği spermatogonyumlarda (ok) belirgin, Leydig hücrelerinde (ok başı) ise zayıf düzeyde izlenmektedir, B: Kırmızı LED uygulanan erişkin grupta PCNA pozitifliği spermatogonyumlar (ok), primer spermatoisitler (içi boş ok) ve interstisyal alandaki Leydig hücrelerinde (ok başı) belirgin şekilde yüksektir, C) G3 grubunda PCNA pozitifliği seminiferöz tübüllerde ve interstisyal alanda belirgin şekilde düşüktür, D: G4 grupta PCNA pozitifliğinin spermatogonyumlar (ok), primer spermatoisitler (içi boş ok) ve interstisyal alandaki Leydig hücrelerinde (ok başı) belirgin şekilde arttığı görülmektedir.)

#### **4.4.2. 3β-HSD İmmünreaktivitesi**

G1 grubunda Leydig hücre belirteci 3β-HSD immünreaktivitesi, interstisyal alandaki Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında kuvvetli ve yaygın boyanma şeklinde gözlemlendi. G2 grupta da 3β-HSD pozitifliğinin dağılım ve şiddetinin yüksek olduğu dikkati çekti. G3 grubunda Leydig hücrelerindeki 3β-HSD immün boyanması anlamlı şekilde



düşük iken, G4 grupta ise 3 $\beta$ -HSD ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı görüldü. Bu durum, kırmızı LED uygulamasının erişkin dönemde steroidogenez artışına neden olmakla birlikte, yaşlı döneminde de steroidogenez kapasitesinde kısmi toparlanma sağladığının bir göstergesidir (Resim 7).



**Resim 7. Testis Doku Kesitlerinde 3 $\beta$ -HSD İmmünreaktivitesi Bar=50  $\mu$ m.**

(A: G1 grubunda 3 $\beta$ -HSD pozitifliği interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde (ok başı) yüksek düzeyde izlenmektedir, B: G2 grubunda 3 $\beta$ -HSD pozitifliği interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde (ok başı) belirgin şekilde yüksektir, C: G3 grubunda 3 $\beta$ -HSD pozitifliği interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde (ok başı) belirgin şekilde düşüktür, D: G4 grubunda 3 $\beta$ -HSD pozitifliğinin interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde (ok başı) belirgin şekilde arttığı görülmektedir.)

Ayrıca ortalama pozitif boyanan 3 $\beta$ -HSD hücre sayısı açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulundu ( $p<0,001$ ). G1 grubunda ortalama pozitif hücre sayısı  $24,8\pm5,7$  iken, G2 grubunda bu değer  $28,2\pm4,0$  olarak ölçüldü ve anlamlı farklılık saptanmadı. G3 grubunda pozitif hücre sayısı belirgin şekilde azalarak  $7,8\pm2,5$  düzeyine indi ve G1, G2 gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha düşük bulundu ( $p<0,05$ ). G4 grubunda ise hücre sayısı  $20,2\pm3,8$  olup G3 grubuna göre anlamlı bir artış gösterdi

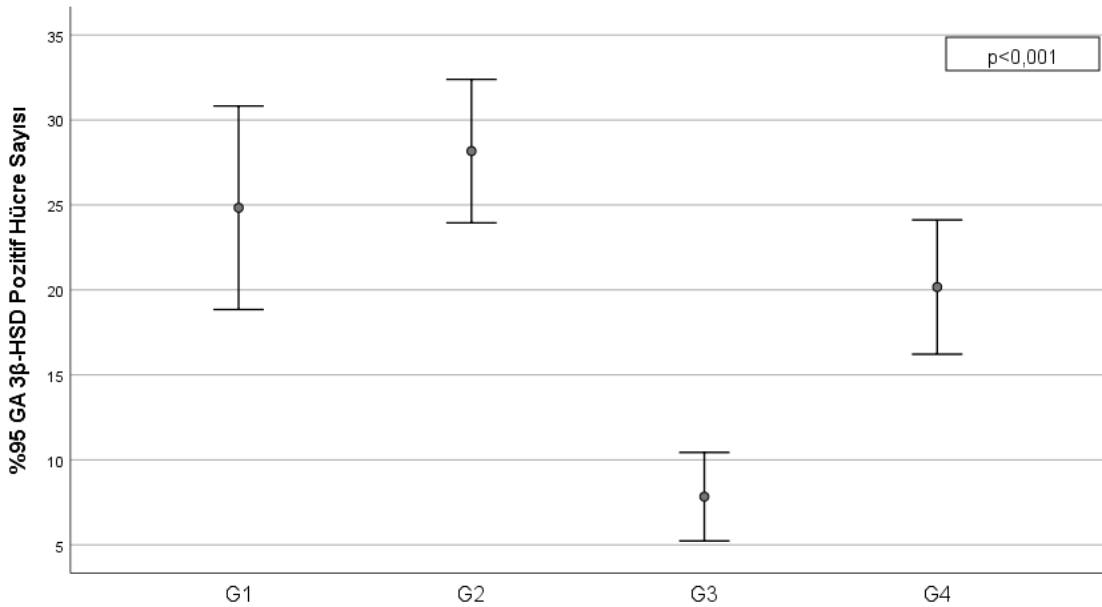
( $p<0,05$ ) ve ayrıca sayısal olarak G1 ve G2 gruplarına yaklaştığı görüldü (Grafik 4) (Tablo 7).

**Tablo 7. 3 $\beta$ -HSD Pozitif Hücre Sayısının Dağılımı**

|                                           | G1<br>(n=6)                 | G2<br>(n=6)                 | G3<br>(n=6)                | G4<br>(n=6)    | p      |
|-------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------|--------|
| 3 $\beta$ -HSD<br>Pozitif Hücre<br>Sayısı | 24,8 $\pm$ 5,7 <sup>b</sup> | 28,2 $\pm$ 4,0 <sup>b</sup> | 7,8 $\pm$ 2,5 <sup>c</sup> | 20,2 $\pm$ 3,8 | <0,001 |

<sup>a</sup> G2 ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , <sup>b</sup> G3 ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ , <sup>c</sup> G4 ile karşılaştırıldığında  $p<0,05$ .

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma veya medyan(çeyrekler arası açıklık) olarak özetlenmiştir.



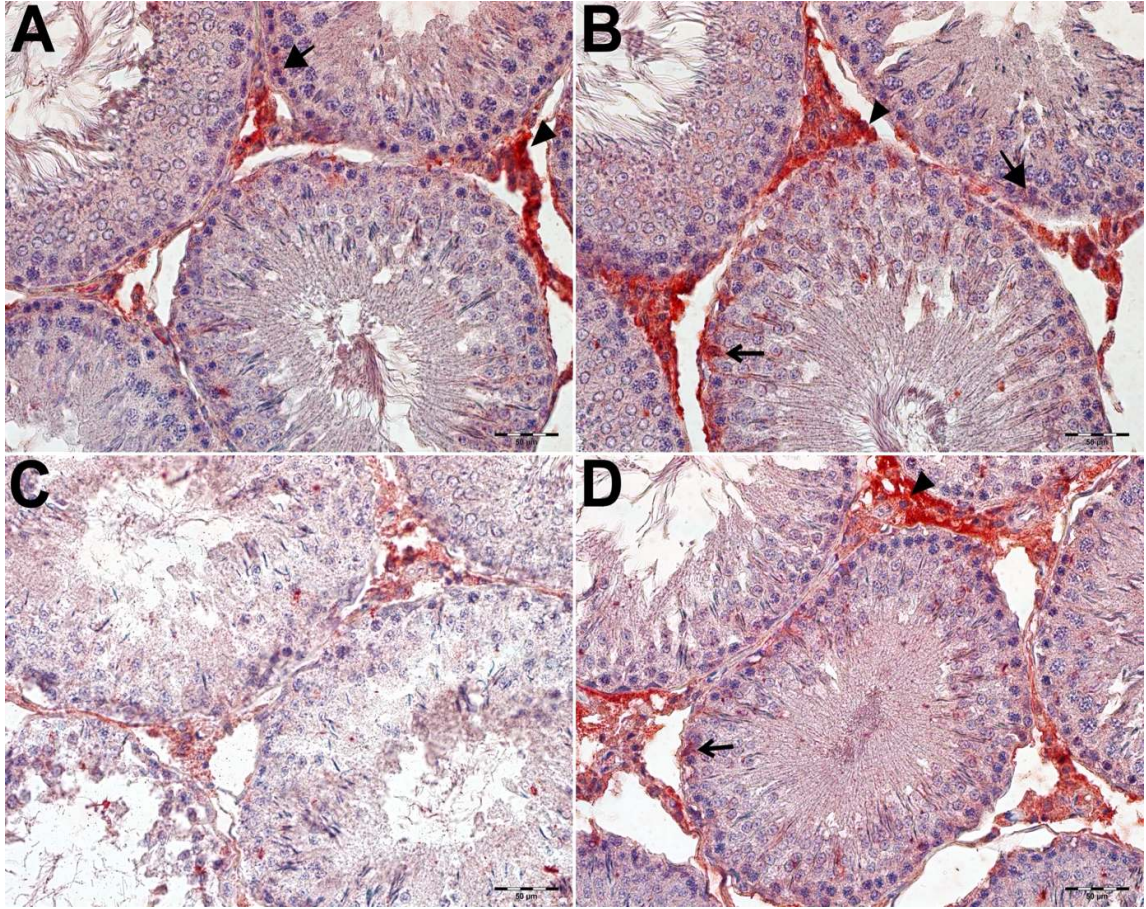
**Grafik 4. Ortalama 3 $\beta$ -HSD Pozitif Hücre Sayısının Gruplara Göre Dağılımı**

#### 4.4.3. BMAL1 İmmünohistokimyasal Bulguları

G1 grubunda sirkadiyen ritimle ilişkili transkripsiyon faktörü BMAL1 immünreaktivitesi, seminiferöz tübüllerde özellikle spermatogonyum ve Sertoli hücrelerinde düşük seviyede iken, interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde yüksek düzeyde boyanma şeklinde gözlemlendi. G2 grupta BMAL1 boyanma şiddetinin ise hem Sertoli hücrelerinde, hem de Leydig hücrelerinde arttığı dikkati çekti. G3 grubunda hem tübül epitelinde, hem de Leydig hücrelerinde BMAL1 pozitifliğinin belirgin şekilde



azaldığı, boyanmanın düzensiz ve daha zayıf hale geldiği izlendi. G4 grupta ise BMAL1 ekspresyonunun seminiferöz tübül epitelinde özellikle Sertoli hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde yeniden artış gösterdiği görüldü. Bu bulgular, yaşlı testiste kırmızı LED uygulamasının, sirkadiyen ritim geni ile ilişkili düzenleyici mekanizmaları ve dolaylı olarak da Sertoli hücre fonksiyonlarını ve steroidogenezi destekleyebileceğini göstermektedir (Resim 8).



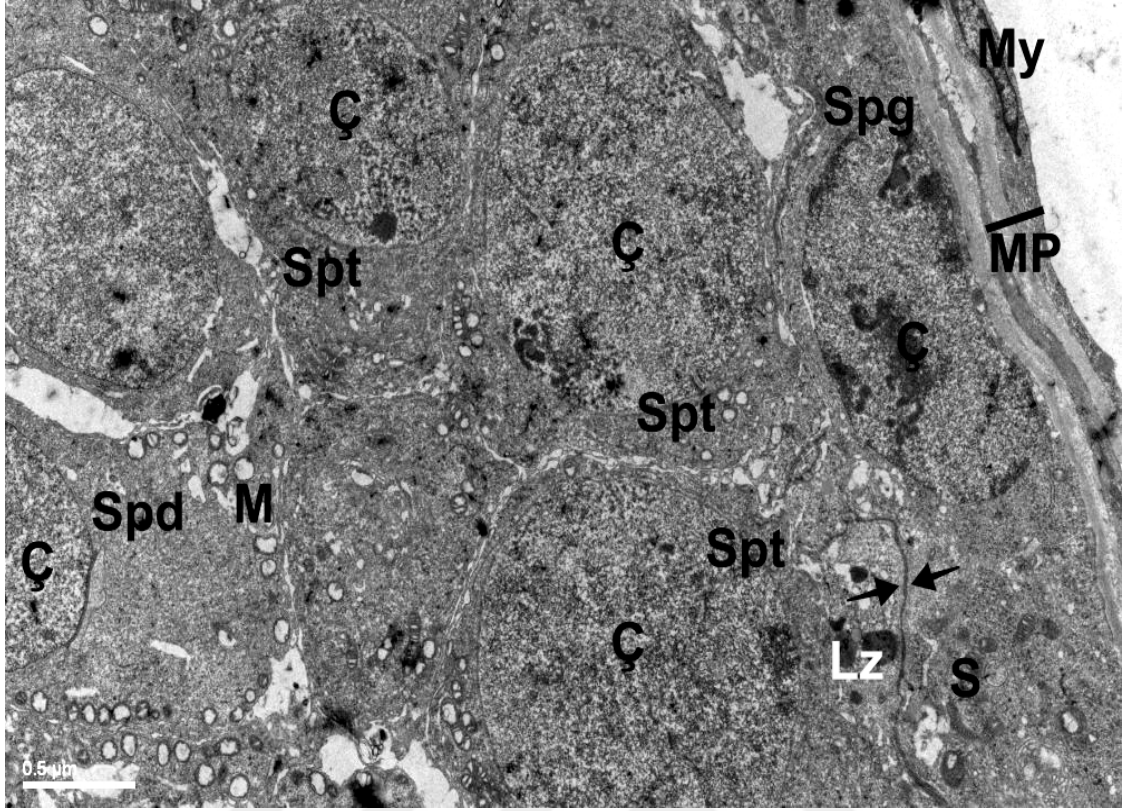
**Resim 8. Testis Doku Kesitlerinde BMAL1 İmmünreaktivitesi Bar=50 µm.**

(A: G1 grubunda BMAL1 pozitifliği spermatogonyumlarda (ok) düşük, Leydig hücrelerinde (ok başı) ise yüksek düzeyde izlenmektedir, B: G2 grubunda BMAL1 pozitifliği spermatogonyumlarda (ok) düşük iken, Sertoli hücreleri (ince ok) ve interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde (ok başı) belirgin şekilde yüksektir, C: G3 grubunda BMAL1 pozitifliği seminiferöz tübüllerde ve interstisyel alanda belirgin şekilde düşüktür, D: G4 grubunda BMAL1 pozitifliğinin Sertoli hücreleri (ince ok) ve interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde (ok başı) belirgin şekilde arttığı görülmektedir.)

#### **4.5. Elektron Mikroskopik Bulgular**

G1 grubuna ait testis doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde, seminiferöz tübül duvarının bütünlüğünü koruduğu, dıştan bazal lamina, miyoid hücreler ve kollajen liflerden oluşan düzenli yapıda membrana propria ile çevrelendiği görüldü.

Miyoid hücrelerin yassı şekilli çekirdeklerinin periferik kromatin içermekte olup sitoplazmalarında ise az sayıda mitokondri ve mikropinositotik veziküllerin yer aldığı görüldü. Seminiferöz tübül epitelinde spermatojenik hücreler ve Sertoli hücrelerinden oluşmaktaydı. Tübül duvarında bazal lamina üzerine oturan spermatogonyumlar ile geniş sitoplazmalı oval çekirdeğe sahip primer spermatositler ve lümene yakın yerleşim gösteren küçük spermatidler bulunmaktaydı. Tübül lümeninde ise uzun, iğ şekilli çekirdekleri ile karakterize spermatozoonlar yer almaktaydı. Ayrıca spermatojenik hücreler arasında sitoplazmik köprüler mevcuttu. Spermatojenik hücreler dışında bazal lamina üzerine oturan bir diğer hücre grubu ise Sertoli hücreleriydi. Geniş sitoplazmalı ve oval, ince granüllü ökromatin içeren, yer yer belirgin heterokromatin adacıkları bulunan çekirdeklere sahip Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında iyi gelişmiş agranüler endoplazmik retikulum (SER), tübüler tip mitokondriyonların, belirgin Golgi kompleksi, lizozomlar ile lipid damlacıklarının yer aldığı görüldü. Komşu Sertoli hücrelerinin bazal ve adluminal uzantıları arasında kan-testis bariyerini oluşturan sıkı bağlantı (tight junction) komplekslerinin bulunduğu belirlendi. Genel olarak seminiferöz epitel organizasyonunun, hücreler arası ilişkilerin ve organel morfolojisinin normal erişkin testise özgü ultrastrüktürel özellikleri koruduğu değerlendirildi (Resim 9).

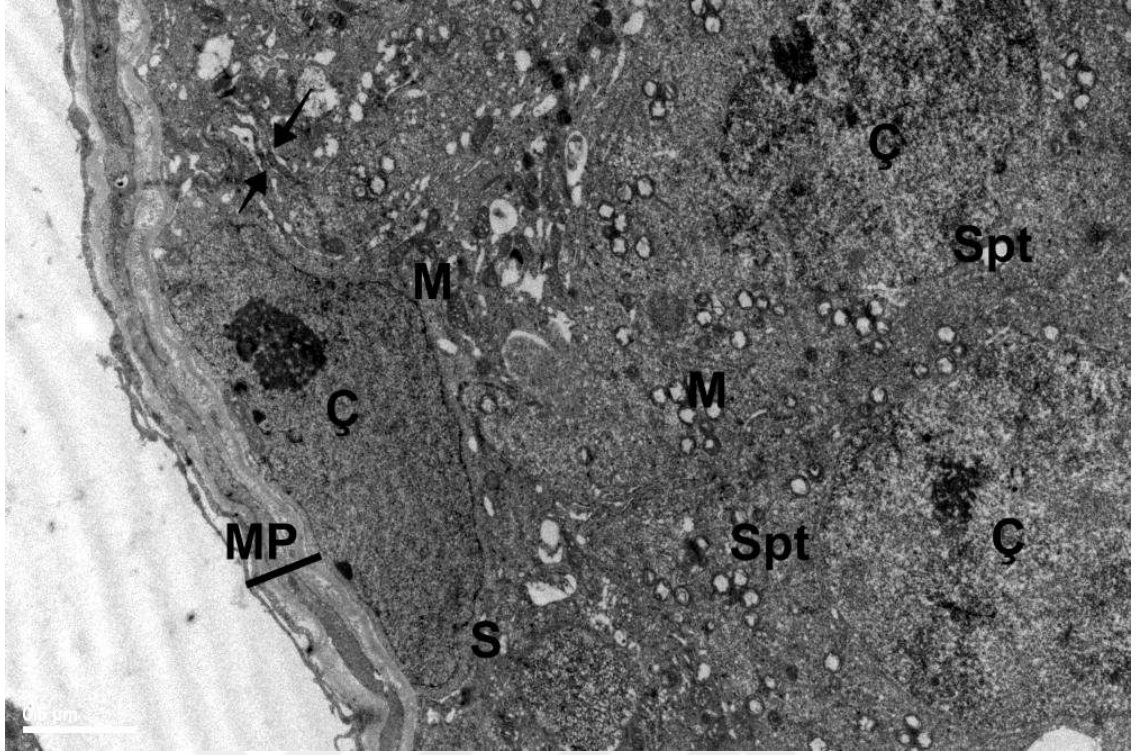


**Resim 9. G1 Grubu Testislerin Elektron Mikroskopi İncelemesi**

(Normal görünümde membrana propria (MP), Sertoli hücresi (S), Spermatogonyum (Spg), Spermatosit (Spt), erken Spermatid (Spd) ve kan-testis bariyeri (oklar) görülmektedir. Miyoid hücre (My), Çekirdek (Ç), Mitokondriyon (M), Lizozom (Lz). Bar=0.5 µm.)

G2 grubuna ait testis doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde de seminiferöz tübülleri çevreleyen membrana proprianın bütünlüğünü koruduğu, tübül epitelinde yer alan tüm spermatojenik hücreler ile Sertoli hücreleri ve Sertoli hücreleri arasındaki kan-testis bariyerinin kontrol grubuna benzer nitelikte olduğu görüldü (Resim 10).



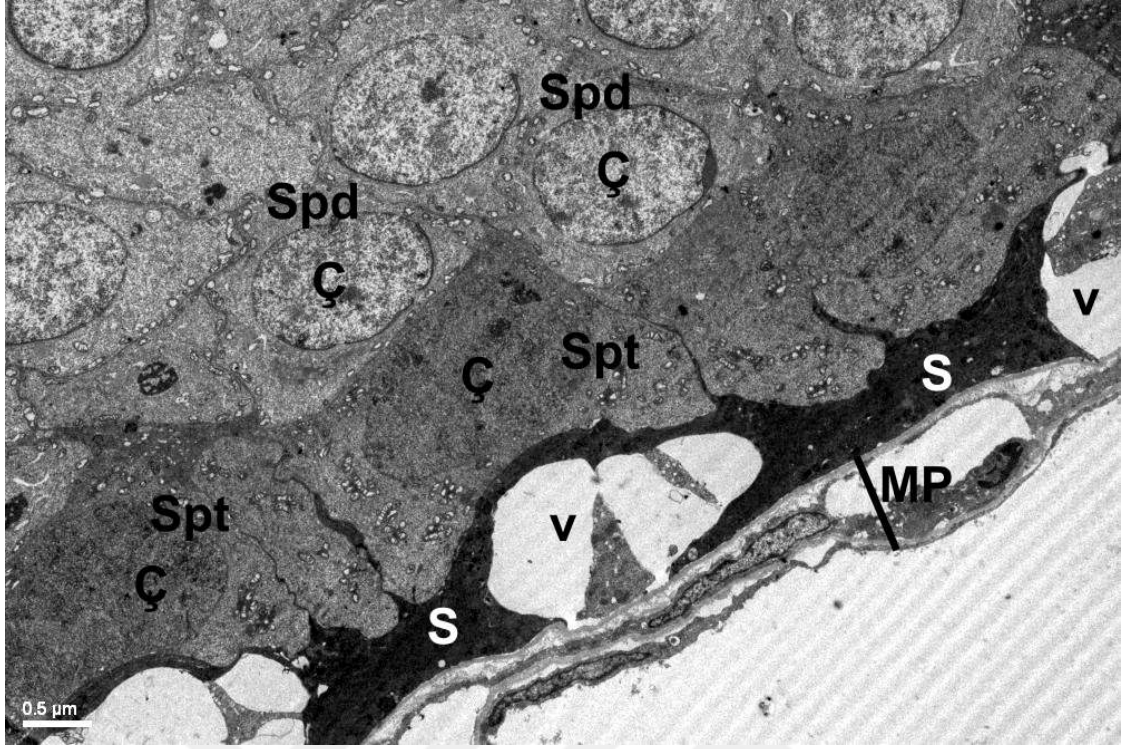


**Resim 10. G2 Grubu Testislerin Elektron Mikroskopi İncelemesi**

(Normal morfolojide membrana propria (MP) ile çevrili seminiferöz tübül epitelinde Sertoli hücresi (S), Spermatosit (Spt) ve kan-testis bariyeri (oklar) intaktı. Çekirdek (Ç), Mitokondriyon (M). Bar=0.5 µm.)

G3 testis doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde, seminiferöz tübüleri çevreleyen membrana proprianın nispeten kalınlaştığı ve düzensizleştiği görüldü. Ayrıca yer yer bazal lamina ve peritübüler miyoid hücreler arasında ayrılmaların meydana geldiği izlendi. Sertoli hücrelerinde yaşlanma bulguları ile uyumlu olarak sitoplazmalarında yaygın elektron dansite artışı, geniş ve düzensiz sınırlı vakuoller, değişen boyutlarda lizozomlar ve rezidüel cisimciklere benzeyen elektron yoğun yapılar gözlemlendi. Spermatosit ve spermatidler nispeten normal morfolojilerini korurken, bazal kompartımanda yer alan spermatogonyumlarda belirgin azalma tespit edildi (Resim 11).

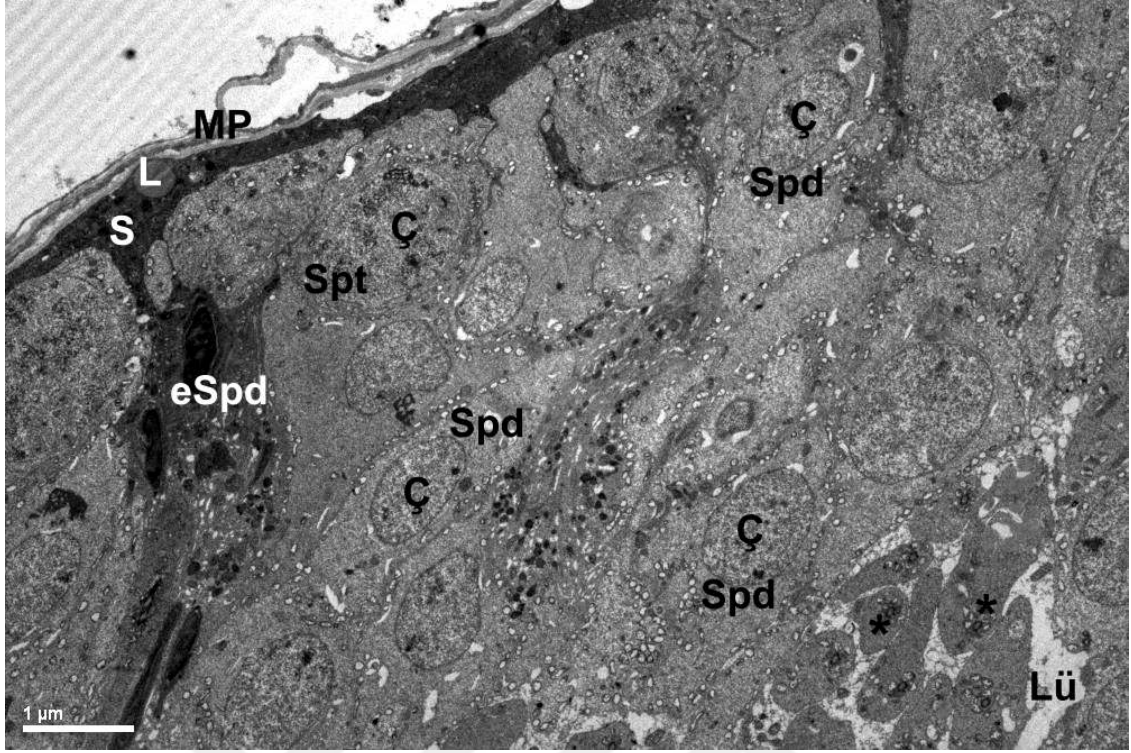




**Resim 11. G3 Grubu Testislerin Elektron Mikroskopi İncelemesi**

(Düzensiz görünümde membrana propriada (MP) ayrılmalar, Sertoli hücre sitoplazmasında (S) elektron densite artışı ve geniş vakuolize alanlar (v) izlenmektedir. Spermatosit (Spt), Spermatid (Spd), Çekirdek (Ç). Bar=0.5 µm.)

G4 grubundaki deneklerin testis doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde ise, membrana propriadaki düzensizlik ve yer yer ayrılmaların büyük ölçüde devam ettiği belirlendi. Ayrıca Sertoli hücrelerinde sitoplazmik elektron densite artışının sürdüğü, ancak G3 grubuna göre geniş vakuolize alanların belirgin biçimde azaldığı, sitoplazmanın daha homojen görünümlü olduğu dikkati çekti. Sertoli hücre sitoplazmasında artmış sayıda lizozom ve rezidüel cisimciklerin varlığı, devam eden fagositik aktivite ve kısmi dejenerasyon bulguları olarak değerlendirildi. Tübül epiteli içinde lümene doğru uzanan geç ve uzamış spermatidlerin sayısının arttığı, ancak bu spermatidlerin bir kısmının bazal-lüminal eksene göre anormal yönelim gösterdiği tespit edildi. Genel olarak, kırmızı LED ışık uygulanan yaşlı grupta Sertoli hücrelerindeki belirgin vakuolizasyonun azalmasına rağmen, membrana propria düzensizlikleri ve spermatogeneze ait organizasyon bozukluklarının kısmen devam ettiği ultrastrüktürel olarak izlendi (Resim 12).



**Resim 12. G4 Grubu Testislerin Elektron Mikroskopi İncelemesi**

(Membrana propriada (MP) ayrılmalar, Sertoli hücre sitoplazmasında (S) elektron densite artışı ve anormal seviyede uzamış spermatidlerin (eSpd) varlığı izlenmektedir. Spermatosit (Spt), Spermatid (Spd), uzamış Spermatid kuyrukları (\*), Çekirdek (Ç), Lizozom (Lz), Lipid (L), tübül lümen (Lü). Bar=1 µm.)

#### 4.6. Biyokimyasal Bulgular

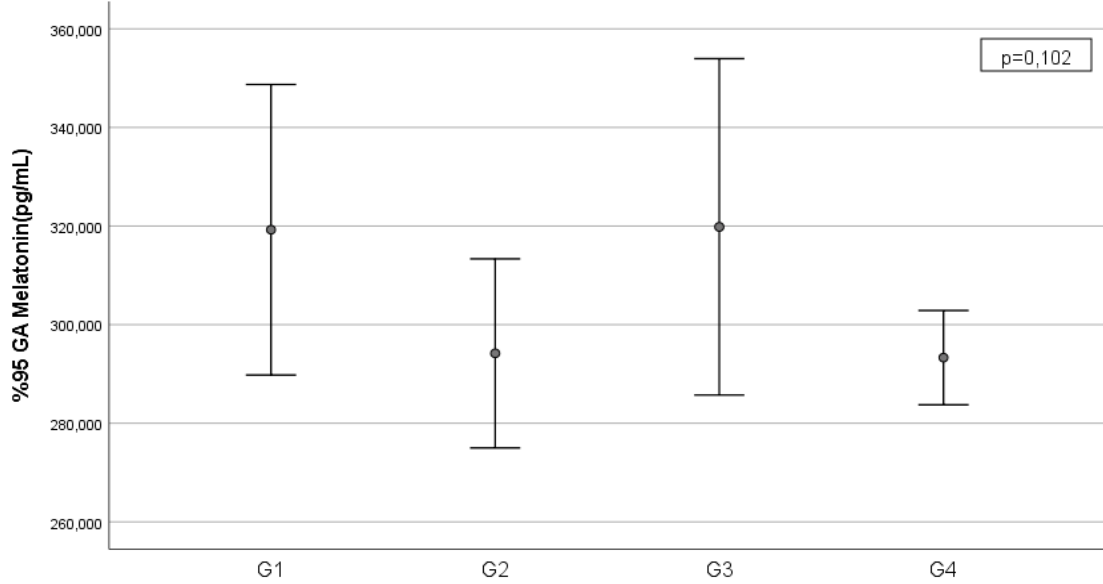
Biyokimyasal parametrelerin analizinde bazı gruplar arası anlamlı farklar gözlenmiştir (Tablo 8)

**Tablo 8. Biyokimyasal Parametrelerin Dağılımı**

|                    | <b>G1<br/>(n=6)</b>   | <b>G2<br/>(n=6)</b>            | <b>G3<br/>(n=6)</b>   | <b>G4<br/>(n=6)</b> | <b>p</b> |
|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------|----------|
| <b>Melatonin</b>   | 319,3±28,1            | 294,2±18,3                     | 319,8±32,5            | 293,3±9,1           | 0,102    |
| <b>GPX1</b>        | 118,4(114,0-124,2)    | 103,6(80,5-108,6) <sup>b</sup> | 139,5(135,9-164,9)    | 122,2(109,5-136,1)  | 0,001    |
| <b>Testosteron</b> | 31,4±1,9 <sup>b</sup> | 33,8±1,1 <sup>b,c</sup>        | 27,7±1,3 <sup>c</sup> | 30,6±0,7            | <0,001   |
| <b>SOD</b>         | 0,9±0,5               | 0,7±0,1                        | 1,0±0,2               | 0,8±0,2             | 0,272    |
| <b>LH</b>          | 7,0±0,9               | 7,5±0,6                        | 7,5±0,3               | 7,7±0,5             | 0,267    |
| <b>MDA</b>         | 67,8±9,7 <sup>c</sup> | 56,7±6,9 <sup>c</sup>          | 54,8±3,2 <sup>c</sup> | 42,6±2,3            | <0,001   |

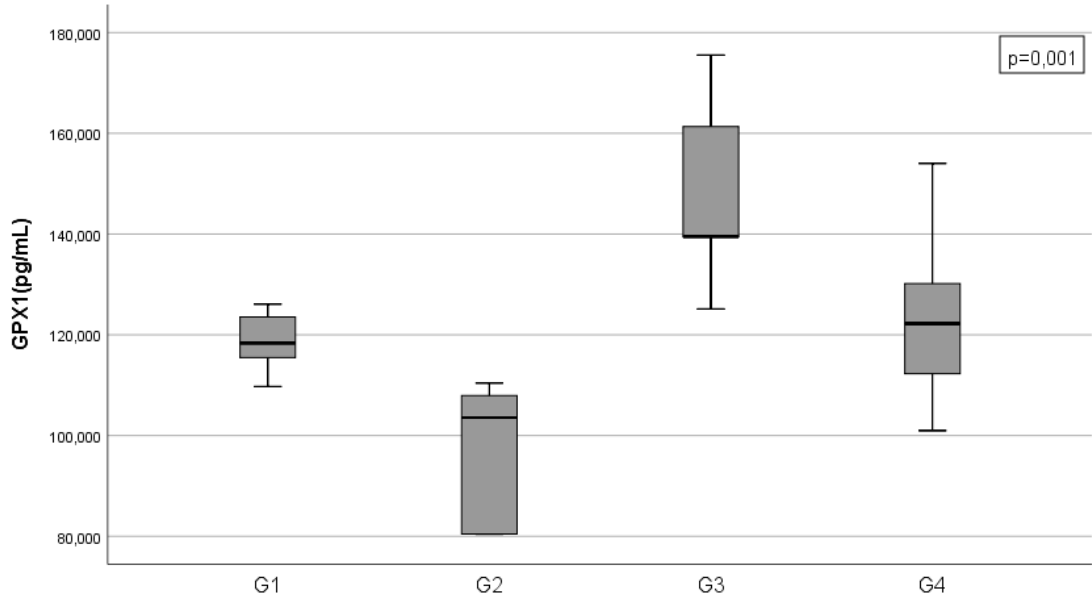
<sup>a</sup> G2 ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>b</sup> G3 ile karşılaştırıldığında p<0,05, <sup>c</sup> G4 ile karşılaştırıldığında p<0,05. Veriler ortalama±standart sapma veya medyan(çeyrekler arası açıklık) olarak özetlenmiştir.

Ortalama Melatonin değeri gruplar arası benzer ölçülmüş olup istatistiksel olarak da anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p=0,102$ ) (Tablo 8) (Grafik 5).



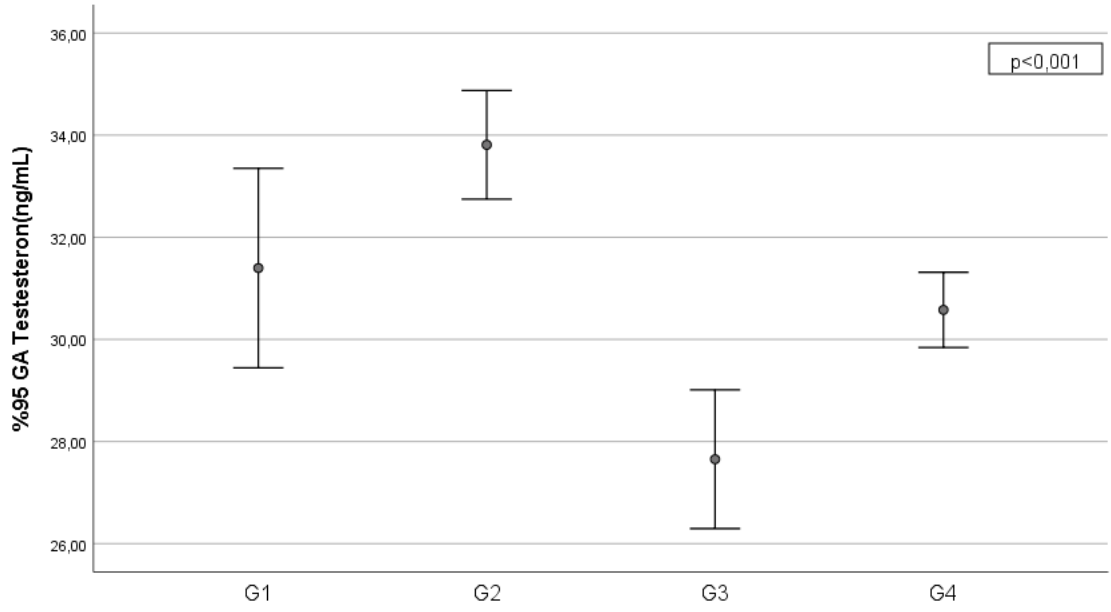
**Grafik 5. Ortalama Melatonin değerinin gruplar arasındaki dağılımı**

Ortalama GPX1 değeri G1 (118,4(114,0-124,2) pg/ml) ve G4 (122,2(109,5-136,1) pg/ml) grupları arasında sayısal olarak benzer ölçülmüş olup, G2 (103,6(80,5-108,6) pg/ml) grubunda daha düşük ölçülmüştür. G2 grubu ve G3 grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmış ( $p<0,05$ ) olsa da tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p=0,001$ ) (Tablo 8) (Grafik 6)



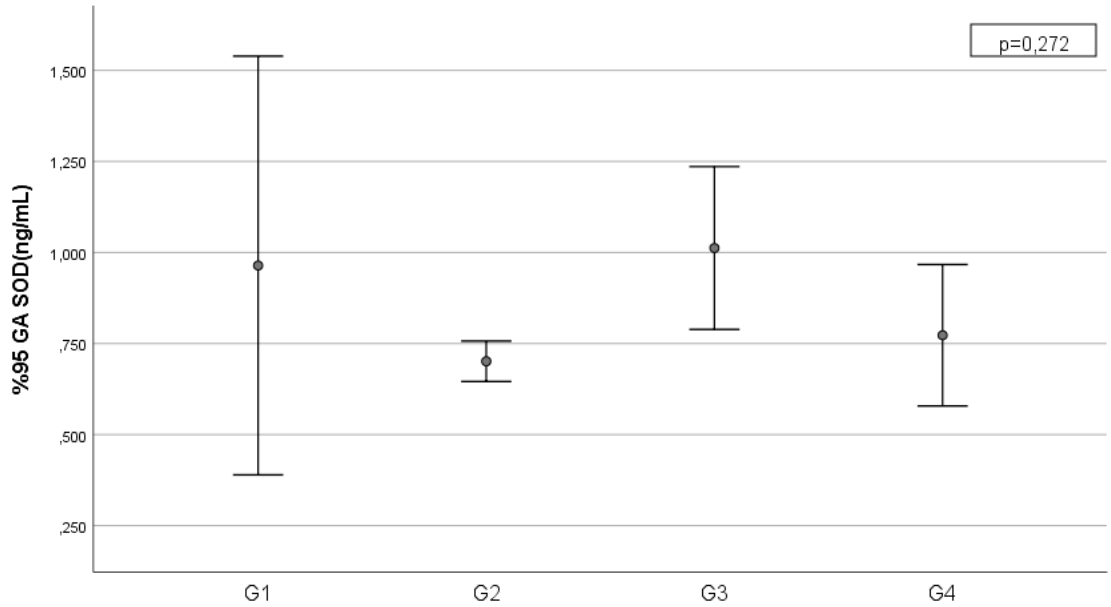
**Grafik 6. Ortalama GPX1 değerinin gruplar arasındaki dağılımı**

Ortalama Testosteron düzeyleri ise anlamlı farklılık sergilemiştir ( $p < 0.001$ ). En düşük testosteron G3 grubunda ölçülmüş ( $27,7 \pm 1,3$  ng/mL) ve G3 grubunun testosteron değeri, diğer tüm gruplardan anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). G2 grubu en yüksek ortalamaya sahip olup ( $33,8 \pm 1,1$  ng/mL), G1 ve G3 gruplarına göre anlamlı derecede yüksek testosteron düzeyi göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Ayrıca G1 grubuna benzer olmakla beraber, G4 grubunun ortalama testosteron düzeyi ( $30,6 \pm 1,7$  ng/mL), G3 grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Grafik 7) (Tablo 8)



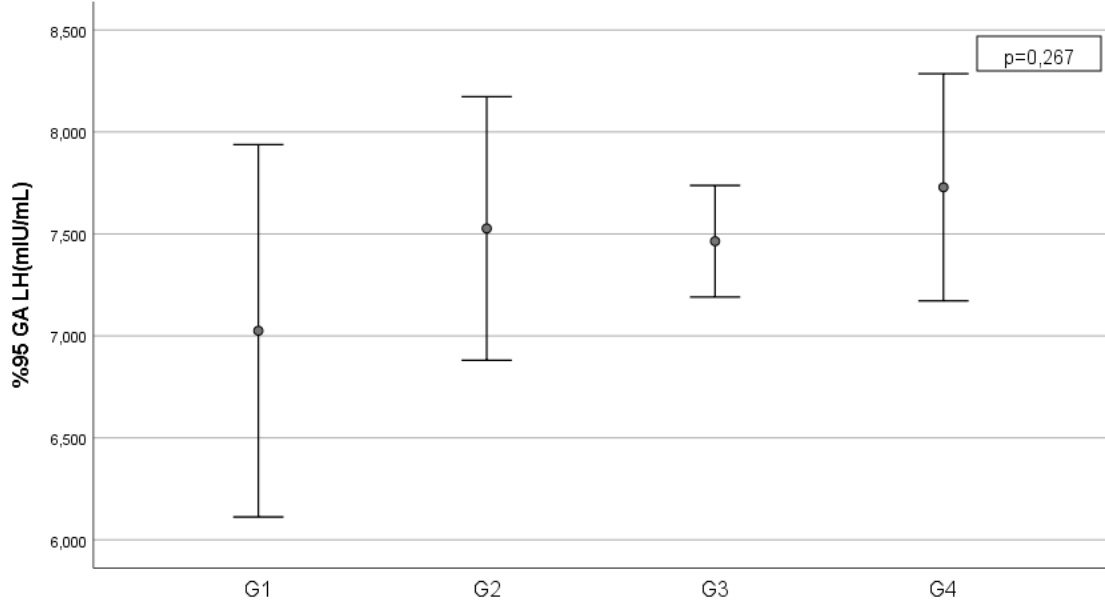
**Grafik 7. Ortalama Testosteron değerinin gruplar arasındaki dağılımı**

Ortalama SOD düzeyleri G2 ( $0,7 \pm 0,1$  ng/ml) ve G4 ( $0,8 \pm 0,2$  ng/ml) gruplarında sayısal olarak daha düşük olmasına karşın, gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.272$ ) (Grafik 8) (Tablo 8).



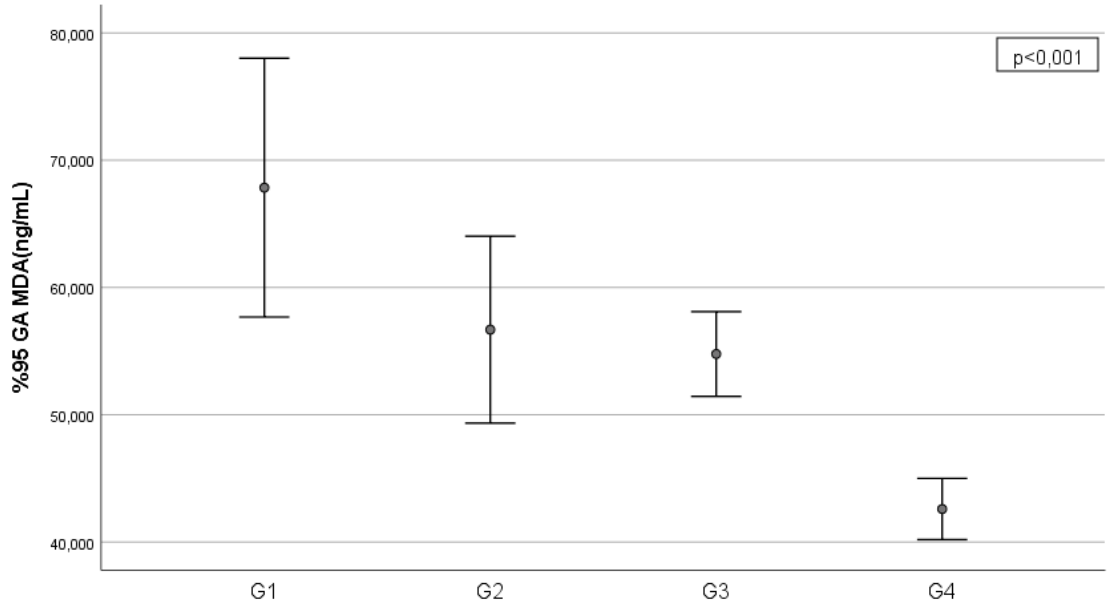
**Grafik 8. Ortalama SOD değerinin gruplar arasındaki dağılımı**

Ortalama LH hormon düzeyleri de gruplar arasında benzer olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ölçülmemiştir ( $p=0,267$ ) (Grafik 9) (Tablo 8)



**Grafik 9. Ortalama LH değerinin gruplar arasındaki dağılımı**

Ortalama MDA düzeyleri bakımından da gruplar arası anlamlı fark vardır ( $p<0.01$ ). G4 grubunda MDA değeri belirgin şekilde düşüktür ( $42,6 \pm 2,3$  ng/mL) ve G4, G1–G3 gruplarının her birinden anlamlı derecede daha düşük MDA seviyesine sahiptir ( $p<0.05$ ). G1 grubunda MDA düzeyi en yüksek ( $67,8 \pm 9,7$  ng/mL) ölçülmüş olup, G2 grubu düzeyleri G1 grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Grafik 10) (Tablo 8).



**Grafik 10.** Ortalama MDA değerinin gruplar arasındaki dağılımı

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada kırmızı LED ışık maruziyetinin yaşlı ve erişkin sıçan testisleri kapsamlı biçimde değerlendirilerek olası terapötik etkileri saptanmaya çalışıldı. Deney sonunda kan ve testis doku örnekleri alınarak, testislerin immunhistokimyasal (3 $\beta$ -HSD, PCNA, BMAL1), elektron mikroskopik, histomorfometrik (Tübül epitel kalınlığı, tübül çapı, sperm sayısı, sperm morfolojisi, sperm motilitesi) bulguları ve biyokimyasal (Melatonin, GPX1, testosteron, SOD, LH, MDA) parametreleri incelendi.

Işık mikroskopisi ve elektron mikroskopisi sonuçları incelendiğinde G1 ve G2 grubundaki sıçanların testislerinde genel olarak yapısal bütünlüğün korunduğu ve spermatogenezin aktif ve düzenli şekilde devam ettiği belirlenmiştir. G3 grubundaki sıçanların testislerinde ise yaşlanmaya bağlı olarak azalan spermatogenez ve interstisyel fibrozis görülmüş ve literatür ile uyumlu bulunmuştur <sup>96,97</sup>. G4 grubundaki sıçanlarda ise G3 grubuna kıyasla seminifer tübül yapısında ve spermatogenez aşamalarında kısmen iyileşme olduğu görüldü. Bu durum yaşlı grupta LED ışığın terapötik etkilerinin erişkin gruba kıyasla daha fazla görüldüğünü göstermektedir. Ayrıca her iki LED ışık grubu olan G2 ve G4 gruplarında kan damarlarında dilatasyon ve konjesyon, interstisyel alanda ise ödem görüldü. Uğurlu ve arkadaşlarının (2023) çalışmasında, mavi ışık verilen prepubertal ratların testislerinde de kılcal dilatasyon ve ödemin arttığı, testis interstisyel bölgesinde önemli vazodilatasyona neden olduğunu ve bazal membran bütünlüğünü tehlikeye attığını gösterdi. Bu bulguların maruziyet süresinin artmasıyla daha da kötüleştiği sonucuna varıldı.<sup>82</sup> Ortaya çıkan sonuçlar, LED ışığının dalga boyu farketmeksizin testiküler mikrosirkülasyon ve damar permeabilitesi üzerindeki olası etkilerinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Sağlıklı seminifer tübüllerde epitel tabakası, düzenli bir şekilde sıralanmış gelişim evrelerindeki germ hücrelerinden oluşur. Yaşlanmayla birlikte bu düzen bozulur; germ hücre sayısı ve katman sayısı azalarak epitel kalınlığı ve tübül çapı azalır.<sup>98</sup> Hussein ve arkadaşlarının (2020) yaptığı çalışmada yaşlı rat testislerinde saptanan ultrastrüktürel değişiklikler; bazal membran civarında genişlemiş boşluklar ve komşu Sertoli hücrelerinde belirgin vakuoller şeklindedir. Bu bulgular yaşla birlikte bazal spermatogonyum kaybı ve Sertoli hücre harabiyeti sonucunda seminifer tübül epitel bütünlüğünün zayıfladığını göstermiştir. <sup>96</sup> Çalışmamızda G3 grubunda ortalama tübül



epitel kalınlığı ( $61,2 \pm 13,8 \mu\text{m}$ ), erişkin gruba kıyasla literatürle uyumlu olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). G4 grubunda ise tübül epitel kalınlığında ve tübül çapında G3 grubuna kıyasla anlamlı şekilde artış saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Erişkin gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamış olmakla beraber ortaya çıkan sonuç; kırmızı LED ışığın, işlevini kaybetmeye başlamış olan hücrelerde daha etkili bir tedavi yöntemi olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda PCNA immünreaktivitesi ile de yukarıdaki bulgular doğrulanmıştır. G3 grubunda PCNA pozitif hücre sayısı belirgin derecede düşük iken, G4 grubunda epitelde yeniden güçlü PCNA pozitifliği saptanmıştır. G2 grubunda spermatogonyumlar ve yer yer bazı primer spermatositlerde; ayrıca normalde puberteden sonra proliferasyon yeteneği sınırlı olan Leydig hücrelerinde<sup>99</sup> de G1 grubuna göre belirgin PCNA immünreaktivitesi izlendi. Özellikle spermatogonyal hücrelerde, primer spermatositlerde ve Leydig hücrelerinde dahi artmış PCNA immünreaktivitesi kırmızı LED ışığın testiste mitotik aktiviteyi ve dolayısıyla germinal epitel yenilenmesini teşvik ettiğini göstermektedir. Nitekim Aqajanpor ve arkadaşlarının (2025) yaptığı çalışmada da busulfan ile oligospermi oluşturulan farelerde düşük doz lazer tedavisinin PCNA ve Stra8 gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde artırdığını, spermatogenik hücre sayısını ve testis dokusunun hacmini iyileştirdiğini bildirilmiştir.<sup>100</sup> Ni ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada da Toksik bir ajan ile hasarlanan ve proliferasyon tetiklenen erişkin rat testisinde, Leydig hücrelerinde PCNA immünreaktivitesi ölçülmüş ve erişkin testiste rejenerasyon sırasında Leydig hücrelerinde PCNA pozitifliği görülebileceği saptanmıştır.<sup>101</sup>

Literatürde erkek infertilitesinde çeşitli non-invaziv biyofiziksel tedaviler incelenmiş; özellikle düşük seviyeli ışık/lazer terapisi (LLLT), laboratuvar ve hayvan modellerinde sperm parametreleri (motilite, sayısal/fonksiyonel sperm oranı) ve bazı spermatogenez göstergelerinde iyileşme sağlamıştır.<sup>85,102,103</sup> Eghbaldoost ve arkadaşlarının (2023) yaptığı sistematik bir derlemede düşük seviyeli ışık tedavisinin spermatogenezi artırabileceği bildirilmiştir.<sup>104</sup> Bir çalışmada da insan asthenozoospermik semen örneklerinde kırmızı ışık ile yapılan fotobiyomodülasyon uygulamaları, sperm motilitesini anlamlı biçimde artırmış ve immotil sperm yüzdesini düşürmüştür.<sup>85</sup> Çalışmamızda tüm gruplar arasında sperm sayısı ve motilitesi arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p < 0,001$ ) (Tablo 6). Yaşlılığa bağlı olarak G3 grubunda ortalama sperm sayısı ( $24,1(23,5-28,2)$ ) belirgin şekilde düşük bulundu. Erişkin grup seviyelerine tam

olarak yaklaşamasa da LED ışık maruziyeti bulunan G4 grubunda ise G3 grubuna göre anlamlı şekilde artmış bulundu ( $p<0,05$ ). G1 ve G2 grupları karşılaştırıldığında yine LED ışık maruziyeti ile ortalama sperm sayısının anlamlı şekilde arttığı görüldü ( $p<0,05$ ). Yeste ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada, domuz spermleri üzerinde yapılan in-vitro bir deneyde kırmızı renk ve dalga boyunda LED ışığı uygulamasının sperm motilitesini ve akrozom bütünlüğünü belirgin biçimde iyileştirdiği, mitokondriyal membran potansiyelini artırdığı rapor edilmiştir. Bu bulgular, kırmızı LED ışık maruziyetinin temelinde enerji metabolizmasını yükselterek sperm hücre fonksiyonlarını iyileştirdiğini göstermektedir.<sup>3</sup> Çalışmamızda sperm motilitesi verileri de incelendiğinde yine tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar görülmüş olup ( $p<0,001$ ), LED ışık alan gruplarda almayanlara göre anlamlı artışlar tespit edilmiştir. G4 grubunda, G3 grubuna kıyasla anlamlı artış görüldü ( $p<0,05$ ), ancak sayısal olarak erişkin gruplardaki seviyelere ulaşamadı. Literatürle uyumlu bir şekilde LED ışık alan sıçanlarda ortalama sperm sayısı ve sperm motilitesinde artış görüldü. Bu etki yaşlı sıçan spermlerinde daha fazla görülmesine rağmen, yine de erişkin gruptaki verilere yaklaşamamıştır. Spermlerin morfolojileri incelendiğinde anomalisi (kuyruk kıvrılma, bükülme, kırılma) olan spermlerin yaşlı gruplarda daha fazla olduğu LED ışık maruziyeti ile normal morfolojideki spermlerde kısmi artışlar görülmüş olsa da özellikle yaşlı grupta kuyruk anomalilerinin tamamen düzelmediği görülmüştür. Azar ve Çoban'ın çalışmasında (2023) 14 hafta boyunca sıçanlara beyaz ve mavi LED ışık uygulandı. Mavi LED grubu sıçanlarda melatonin düzeyleri belirgin şekilde düştü ve sperm motilitesi azaldı. Hem mavi hem de beyaz LED ışığa maruz kalan gruplarda testis dokusunda ödem, interstisyel alanda hiperemi, spermatosit dejenerasyonu ve seminifer tübül duvarında incelme gibi olumsuz histopatolojik değişimler gözlemlendi; son 2 haftada verilen Nesfatin-1 hormonu bu hasarın bir kısmını azalttı.<sup>80</sup> Öte yandan LED ışık dalga boyundaki ve ışık rengindeki farklar da testis histolojisi ve sperm parametreleri üzerinde farklı etkilerin görüldüğü çalışmalar bildirilmiş. Örneğin bir çalışmada 16 haftalık 75 horoz, 20 hafta boyunca beş farklı LED ışık renginde (kırmızı, sarı, yeşil, mavi, beyaz) ışıklandırmaya maruz bırakıldı. Yeşil ışık altında büyütülen horozlarda testis gelişimi belirgin şekilde geriledi ve semen kalite parametrelerinin çoğu olumsuz etkilendi. Kırmızı ışık altındaki horozlar, tüm diğer gruplardan anlamlı derecede daha yüksek toplam ve

progresif sperm motilitesi, sperm yoğunluğu ve hız sergiledi; sarı ışık grubu sonuçları da kırmızıya benzer şekilde iyiydi.<sup>91</sup>

Memelilerde LED ışığının testis histolojisine etkisini inceleyen çalışma sayısı çok sınırlıdır; mevcut çalışmalar daha çok LED veya lazer kaynaklı fotobiyomodülasyonun in vitro sperm motilitesi ve hasarlı testiste iyileştirici etkileri üzerine odaklanmaktadır. Mevcut literatürdeki ve çalışmamızdaki verilere dayanarak kırmızı LED ışığının doğru koşullarda kullanılmasının erkek üreme fonksiyonu üzerinde terapötik potansiyel taşıdığı anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, optimum fayda için maruziyet dozu ve süresi iyi ayarlanmalıdır. Aşırı maruziyet durumlarında sperm DNA bütünlüğünün bozulabileceği ve spermatogenezin baskılanabileceği unutulmamalıdır.<sup>82</sup> Çalışmamızda kullanılan LED ışık şiddeti aydınlık döngüde ortalama  $650 \pm 30$  lx ölçülmüş olup, ışığın optik tayfı optik bölgenin kırmızı kısmında, beklenildiği gibi belirgin bir pik tespit edilmiştir. Tayfa uygulanan Gauss uyumu sonucunda pik merkezi  $6332.3 \text{ \AA}$  olarak belirlendi. Bu dozda ışık maruziyetinde testislerde yapısal bozulma meydana gelmemiş ancak testiküler mikrosirkülasyonun artmaya başlaması ve interstisyel ödem bulgularının görülmesi daha yüksek dozlarda ve uzun süreli maruziyette bazal membran bütünlüğünde bozulmalara yol açabileceğini göstermektedir.

Testisin interstisyel dokusundaki Leydig hücreleri yaşlanma ile belirgin yapısal ve fonksiyonel değişiklikler geçirir. Deneysel rat çalışmalarında, yaşlı testislerde Leydig hücre sitoplazmalarında belirgin vakuolizasyon ve lipid birikimi tanımlanmıştır.<sup>105</sup> Yaşlanan erkeklerde steroidogenezde görevli ana enzimlerin (StAR, CYP11A1,  $3\beta$ -HSD, CYP17A1) ekspresyonu ve aktivitesi azalır. Wang ve arkadaşlarının çalışmasında (2017) Leydig hücrelerinde sayısal değişiklikler görülebilse de, steroidogenik aktivitenin temel belirteçlerinden biri olan  $3\beta$ -HSD immünoreaktivitesinin yaşlı rat testisinde belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir.<sup>106</sup> Çalışmamızda da literatürle benzer şekilde yaşlı gruplarda  $3\beta$ -HSD immünoreaktivitesi düşük bulundu. LED ışık alan erişkin grupta, kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmasa da sayısal olarak ortalama  $3\beta$ -HSD pozitif hücre sayısı ( $28,2 \pm 4,0$ ) artmış görüldü. LED ışık alan yaşlı grupta ise anlamlı bir artış görüldü ( $p < 0,05$ ). Elde edilen sonuçlar, kırmızı LED ışık uygulamasının erişkin dönemde steroidogenez üzerinde kısmi uyarıcı bir etki oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Steroidogenezde hız kısıtlayıcı basamaklardan biri olan 3 $\beta$ -HSD enziminin Leydig hücrelerinde artmış immünoreaktivitesi, bu hücrelerin steroid sentez kapasitesinin yükseldiğinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Nitekim çalışmamızda G4 grubunda saptanan 3 $\beta$ -HSD pozitif hücrelerdeki belirgin artış, Leydig hücre aktivitesindeki yükselme ile uyumlu bulunmuş; bunu destekler şekilde biyokimyasal analizlerde testosteron düzeylerinin de anlamlı derecede artmış olması, hücresel düzeydeki bu değişimin fonksiyonel karşılığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, literatürde Leydig hücre fonksiyonunun 3 $\beta$ -HSD ekspresyonu ile paralellik gösterdiğini ve testosteron biyosentezinin bu enzimatik artışla doğrudan ilişkili olduğunu bildiren çalışmalarla da uyumludur.<sup>107,108,109</sup>

Testis, beyin ve karaciğer gibi kendi intrinsik sirkadiyen ritmine sahiptir. Bu saat mekanizmasının temel elemanlarından biri transkripsiyon faktörü olan BMAL1'dir.<sup>110</sup> Leydig hücrelerinde StAR, CYP11A1, CYP17A1, 3 $\beta$ -HSD gibi kritik steroidogenez genlerinin ekspresyonunu sirkadiyen ritme göre ayarlar.<sup>111,112</sup> BMAL1, CLOCK ile birlikte çalışarak sirkadiyen gen ekspresyon döngülerini düzenler.<sup>113</sup> Bir çalışmada keçi Leydig hücrelerinin sirkadiyen ritimle ilişkisi incelenmiş; testosteron üretiminin sirkadiyen ritim genlerinden BMAL1'in steroidogenezle ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek testosteron üretimini kontrol ettiği gösterilmiştir. Özellikle StAR ve 3 $\beta$ -HSD protein seviyeleri BMAL1'in varlığına bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir.<sup>88</sup> Çalışmamızda da BMAL1 ekspresyonu incelenmiş; kontrol grubuna kıyasla LED ışık alan erişkin grupta, boyanma şiddetinin hem Leydig hücrelerinde hem de Sertoli hücrelerinde arttığı dikkat çekmiştir. Ayrıca yaşlı LED ışık grubunda da benzer etkiler görülmüş olup, yaşlılıkla azalan BMAL1 ekspresyonunun seminiferöz tübül epitelinde özellikle Sertoli hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde yeniden artış gösterdiği görüldü. Elde edilen sonuçlar, kırmızı LED ışık maruziyetinin testiste sirkadiyen ritim genlerine bağlı düzenleyici mekanizmaları modüle edebildiğini ve bunun da Sertoli hücre performansı ve steroid üretim süreçlerinde iyileşmeye katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Yu ve arkadaşlarının (2018) yaptığı bir derlemeye göre melatonin, hem lipofilik hem de hidrofilik özelliklere sahip epifiz bezinin majör salgı ürünüdür ve kan-testis bariyerini geçerek testis hücrelerine girebilir. MT1, MT2 ve çok çeşitli memeli hücre tiplerinde tanımlanmış olan retinoid asit reseptörüyle ilişkili ROR $\alpha$  dahil olmak üzere

birkaç spesifik reseptör aracılığıyla etki eder. MT1 ve MT2, cAMP sinyal iletim kaskadlarını düzenleyerek testosteron sentezini düzenlemek için G-proteiniyle birleşir. Melatonin, aromataz enziminin aktivitesini inhibe ederek östrojen sentezini azaltır ve testosteron üretimini artırır.<sup>61</sup> Çalışmamızda biyokimyasal parametreler incelendiğinde gruplar arasında ortalama melatonin seviyelerinde anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0,102$ ). Buna karşın testosteron seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık mevcuttu ( $p<0.001$ ). G2 grubunda, G1 grubuna kıyasla ortalama testosteron seviyelerinin anlamlı şekilde arttığı görüldü ( $p<0.05$ ). G4 grubunda, G3 grubuna kıyasla anlamlı bir artış görülse de erişkin gruptaki ortalama testosteron seviyelerine ulaşamamıştır. Yine testosteron sentezinde görevli bir hormon olan LH ölçümlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ( $p=0,267$ ). Her ne kadar melatonin ve LH düzeylerine ilişkin sonuçlarımız literatürde bildirilen eğilimlerle tam olarak uyum göstermese de testosteron konsantrasyonundaki anlamlı artış dikkat çekicidir. Bu bulgu, kırmızı LED ışığının klasik hormonal düzenleyicilerden bağımsız olarak farklı bir sinyal iletim yolu veya özgül bir reseptör aracılığıyla Leydig hücrelerinde steroidogenez sürecini uyarabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla, ışık temelli uyarıların testiküler hücresel yanıtları modüle eden alternatif mekanizmalar üzerinden etkili olabileceği olasıdır ve bu durum gelecekteki çalışmalarla daha ayrıntılı olarak aydınlatılmasını gerektirmektedir. Azar ve Çoban'ın çalışmasında (2023) mavi LED ışığa maruz kalan ratlarda serum melatonin düzeylerinin anlamlı derecede düştüğü tespit edilmiştir. Mavi LED ışığa maruz kalan hayvanlarda, özellikle de karanlık faz sırasında, sirkadiyen ritmin bozulduğu ve melatonin salgısının baskılandığı görülmüştür.<sup>80</sup> Çalışmamızda kırmızı LED ışık uygulanan gruplarda melatonin seviyelerinde anlamlı bir artış görülmesine de, düşme olmaması sebebiyle sirkadiyen ritmin korunduğu düşünülmektedir.

Erkek infertilitesinde ve deneysel testis hasarı modellerinde, reaktif oksijen türleri ile antioksidan savunma arasındaki dengenin bozulmasının hem spermatogenez hem de testiküler hücre fonksiyonları üzerinde belirleyici olduğu gösterilmiştir. Bir metaanalizde, infertil erkeklerde seminal plazmada oksidatif stresin arttığını, bunun da çoğunlukla antioksidan savunma kapasitesindeki azalma ile ilişkili olduğunu bildirilmiştir.<sup>114</sup> Bu çerçevede GPX1, SOD ve MDA en sık kullanılan biyokimyasal göstergeler arasında yer almaktadır.

Glutasyon peroksidaz, testis ve semen düzeyinde hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksitleri detoksifiye ederek membran lipidlerini oksidatif hasardan koruyan temel antioksidan enzimlerden biridir. Crisol ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2012) infertil erkeklerde seminal GPX1 aktivitesinin, DSÖ kriterlerine göre oligozoospermi, asthenozoospermi ve teratozoospermi varlığında anlamlı olarak azaldığı gösterilmiş, açıklanamayan infertilite olgularında da GPX1 aktivitesi ve glutasyon düzeylerinin bozulduğu; bunun sperm fonksiyon kaybı ve artmış lipid peroksidasyonu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir.<sup>115</sup> Çalışmamızda ortalama GPX1 seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Sayısal olarak en yüksek ortalama GPX1 seviyesi G3 grubunda (139,5(135,9-164,9)) ölçülmüş olup bulgular literatür ile uyumlu değildir.

SOD, süperoksit anyonunu daha az reaktif türlere dönüştüren ve hem testiste hem de seminal plazmada bulunan temel enzimatik antioksidanlardandır. Seminal plazma SOD aktivitesinin sperm konsantrasyonu ve total motilite ile pozitif, sperm DNA fragmentasyonu ile ise negatif korelasyon gösterdiği geniş hasta serilerinde ortaya konmuştur.<sup>116,117</sup> Çalışmamızda ise ortalama SOD seviyeleri benzer bulunmuş olup gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0,272$ ).

MDA ise doğrudan bir serbest radikal değil, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda oluşan bir lipid peroksidasyon son ürünüdür ve oksidatif hasarın en sık kullanılan göstergelerinden biridir. Collodel ve arkadaşlarının çalışmasında (2015) MDA düzeylerinin artmış olduğu gruplarda sperm motilitesinin azaldığı, morfolojik bozuklukların ve DNA hasarının arttığı, yani MDA düzeylerinin hem lipid peroksidasyonunun hem de fonksiyonel bozulmanın biyobelirteci olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir.<sup>118</sup> Bu çalışmada özellikle G4 grubunda diğer gruplara göre ortalama MDA seviyelerinin anlamlı bir şekilde düşük olduğu saptandı ( $p<0,05$ ). G2 grubunda da G1 grubuna kıyasla anlamlı bir azalma ( $p<0,05$ ) tespit edildi. Ancak yaşlı gruplarda erişkin gruplara kıyasla daha düşük ortalama MDA seviyeleri saptanmış ve bu bulgunun literatürle uyumlu olmadığı görülmüştür.

Çalışmamızda biyokimyasal parametrelerde ortaya çıkan bu sonuç, kırmızı LED uygulamasının testiküler oksidatif savunma sistemini belirgin biçimde aktive etmediğini veya uygulamanın süresi, şiddeti ya da yaşlı testis fizyolojisi nedeniyle antioksidan yanıtın sınırlı kalmış olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca histomorfometrik ve immünohistokimyasal parametrelerdeki olumlu sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde,

biyokimyasal parametrelerdeki anlamlı değişikliklerin henüz kliniğe yansımamış olabileceği ihtimalini de düşündürmektedir. Bu perspektiften bakıldığında, kırmızı LED uygulaması ile SOD ve GPX1 enzimlerini belirgin biçimde uyarmasa da, MDA seviyelerindeki anlamlı sonuçlar; testiküler dokudaki lipid peroksidasyonunun azalarak oksidatif ortamda kısmi bir iyileşme sağlamış olabileceğini göstermektedir.



## 6. SONUÇ

Biyofizik alanındaki hızlı gelişmeler ve non-invaziv tedavi yaklaşımları modern tıpta giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Çalışmamızda da söz konusu yenilikçi yaklaşımların testis fizyolojisine uyarlanmasına yönelik bilimsel bir zemin sağlamak amaçlanmıştır. Histolojik, immünohistokimyasal, fonksiyonel ve biyokimyasal bulguların birlikte değerlendirilmesi LED ışığın testiküler biyoloji üzerindeki etkilerini anlamaya yönelik bütüncül bir model ortaya koymuştur. Erişkin ve yaşlı sıçan gruplarının karşılaştırılması, kırmızı LED ışığın yaşlanmaya bağlı testiküler değişiklikler üzerindeki etkilerinin daha kapsamlı biçimde anlaşılmasına olanak tanımıştır. Ayrıca literatürde kırmızı LED ışığın in-vivo koşullarda testis dokusu ve sperm üzerindeki terapötik etkilerini yaşlanma modeli bağlamında inceleyen başka bir çalışmanın bulunmaması sebebiyle de literatürde yapılmış ilk çalışma olacaktır.

Kırmızı LED ışığın, testis dokusunda rejeneratif bir yanıtı uyardığına işaret eden çok sayıda bulgu elde edilmiştir. Histolojik analizler, LED uygulamasının seminifer tübül epitelinde iyileşme ve genel spermatogenez kalitesinde artış ile ilişkili olduğunu göstermiştir. İmmünohistokimyasal belirteçlerdeki (BMAL1, PCNA ve 3 $\beta$ -HSD) artış da bu yapısal iyileşmeyi destekler niteliktedir. LED uygulaması sperm sayısı ve motilitesinde artışa yol açmış olup, bu durum yaşlı grupta daha dikkat çekicidir. Sonuç olarak bu bulgular yaşlanmaya bağlı olarak azalan rejenerasyon kapasitesinin uygun biyofiziksel uyaranlarla yeniden harekete geçirilebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca LED uygulaması testosteron düzeylerinde anlamlı bir artış ile ilişkili bulunmuştur. Bu yönleriyle çalışma, LED ışık uygulamalarının testiküler biyoloji alanındaki gelecek araştırmalara temel oluşturabilecek niteliktedir.

Ancak çalışmamızın bazı metodolojik ve tasarımsal sınırlılıkları bulunmaktadır. LED ışık uygulamasının yalnızca tek bir doz, dalga boyu ve süre protokolü ile değerlendirilmiş olması, farklı ışık parametrelerinin potansiyel etkilerinin araştırılamamasına sebep olmuştur. Çalışma kısa dönemli bir değerlendirme sunduğundan LED ışığın testiküler yapı ve fonksiyon üzerindeki uzun dönem etkileri de belirlenememiştir. Ayrıca melatonin, LH gibi testosteron seviyesini düzenleyen biyokimyasal parametrelerde anlamlı düzeyde değişiklik saptanmamış olması, LED uygulamasının erken dönemde biyokimyasal yanıtıdan ziyade histolojik ve moleküler



düzeyde etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca ışığın doku içine penetrasyonu veya testis içinde dağılımının ölçülememiş olması, etkinin biyofiziksel mekanizmasının tam olarak ortaya konmasını sınırlamaktadır. Fertilitiyi doğrudan değerlendiren çiftleşme verilerinin bulunmaması elde edilen olumlu sonuçların, üremeye ve infertiliteye olan fonksiyonel katkıları açısından yorum yapmayı güçleştirmektedir. Bu nedenle gelecekte daha geniş örneklemli, farklı ışık parametrelerini de içeren ve uzun dönemli çalışmalar gereklidir.



## 7. KAYNAKLAR

1. **Alavi B, Shojaei M, Haghpanah T, et al:** Improved cell proliferation and testosterone secretion following exposure of TM3 Leydig cells to three-dimensional scaffold and light emitting diode. *Andrologia* **2022**; 54: e14593.
2. **Vladimirovich Moskvina S and Ivanovich Apolikhin O:** Effectiveness of low level laser therapy for treating male infertility. *Biomedicine (Taipei)* 8: 7.
3. **Yeste M, Codony F, Estrada E, et al:** Specific LED-based red light photo-stimulation procedures improve overall sperm function and reproductive performance of boar ejaculates. *Sci Rep* **2016**; 6: 22569.
4. **Alp T:** VF. Erkek seksüel disfonksiyonu. Nobel Kitabevi. **2000**; 31–8.
5. **Molodysky E, Liu S-P, Huang S-J, et al:** Penile vascular surgery for treating erectile dysfunction: Current role and future direction. *Arab J Urol* **2013**; 11: 254–266.
6. **Jacob S:** Human anatomy: a clinically-orientated approach: an illustrated colour text. Edinburgh New York: Churchill Livingstone/Elsevier; **2007**.
7. **O'Shaughnessy PJ and Fowler PA:** Development of the human fetal testis. *Annales d'Endocrinologie* **2014**; 75: 48–53.
8. **Silber S:** Fundamentals of Male Infertility. Cham: Springer; **2018**.
9. **Horvath-Pereira B de O, Almeida GHDR, Silva Júnior LN da, et al:** Biomaterials for Testicular Bioengineering: How far have we come and where do we have to go? *Front. Endocrinol.* **2023**; 14.
10. **Mruk DD and Cheng CY:** The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev* **2015**; 36: 564–591.
11. **Cheng CY and Mruk DD:** Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development. *Physiological Reviews* **2002**; 82: 825–874.
12. **Mital P, Hinton BT and Dufour JM:** The Blood-Testis and Blood-Epididymis Barriers Are More than Just Their Tight Junctions. *Biol Reprod* **2011**; 84: 851–858.
13. **Fijak M and Meinhardt A:** The testis in immune privilege. *Immunological Reviews* **2006**; 213: 66–81.
14. **Jones R, Brown CR, Von Glós KI, et al:** Hormonal regulation of protein synthesis in the rat epididymis. Characterization of androgen-dependent and testicular fluid-dependent proteins. *Biochem J* **1980**; 188: 667–676.
15. **Chillón M, Casals T, Mercier B, et al:** Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* **1995**; 332: 1475–1480.
16. **Brewster SF:** The development and differentiation of human seminal vesicles. *J Anat* **1985**; 143: 45–55.
17. **Ross MH:** Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology. Baltimore, MD : Lippincott Williams & Wilkins; **2006**.

18. **Charny CW, Conston AS and Meranze DR:** Testicular developmental histology. *Ann N Y Acad Sci* **1952**; 55: 597–608.
19. **Suede SH, Malik A and Sapra A:** Histology, Spermatogenesis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2025.
20. **Gui Y and Yuan S:** Epigenetic regulations in mammalian spermatogenesis: RNA-m6A modification and beyond. *Cell Mol Life Sci* **2021**; 78: 4893–4905.
21. **Junquiera LC, Carneiro J and Kelley RO:** Basic Histology. 10th ed. New York, McGraw-Hill **2003**.
22. **Payne AH and Hardy MP:** The leydig cell in health and disease. Totowa: Humana press; **2007**.
23. **Liu M-M, Feng X-L, Qi C, et al:** The significance of single-cell transcriptome analysis in epididymis research. *Front Cell Dev Biol* **2024**; 12: 1357370.
24. **Nistal M, Santamaría L and Paniagua R:** The ampulla of the ductus deferens in man: morphological and ultrastructural aspects. *J Anat* **1992**; 180 ( Pt 1): 97–104.
25. **Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AW, et al eds:** Campbell-Walsh urology. Eleventh edition. Philadelphia, PA: Elsevier; **2016**.
26. **Abbas TO, Yalcin HC and Pennisi CP:** From Acellular Matrices to Smart Polymers: Degradable Scaffolds that are Transforming the Shape of Urethral Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* **2019**; 20: 1763.
27. **Hall JE and Hall ME:** Guyton and Hall textbook of medical physiology. 14th edition. Philadelphia, PA: Elsevier; **2021**.
28. **Sitzmann BD, Urbanski HF and Ottinger MA:** Aging in male primates: reproductive decline, effects of calorie restriction and future research potential. *Age (Dordr)* **2008**; 30: 157–168.
29. **Rance NE, Young WS and McMullen NT:** Topography of neurons expressing luteinizing hormone-releasing hormone gene transcripts in the human hypothalamus and basal forebrain. *J Comp Neurol* **1994**; 339: 573–586.
30. **Adler BA and Crowley WR:** Evidence for gamma-aminobutyric acid modulation of ovarian hormonal effects on luteinizing hormone secretion and hypothalamic catecholamine activity in the female rat. *Endocrinology* **1986**; 118: 91–97.
31. **Bergen HT, Hejtmancik JF and Pfaff DW:** Effects of gamma-aminobutyric acid receptor agonists and antagonist on LHRH-synthesizing neurons as detected by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Exp Brain Res* **1991**; 87: 46–56.
32. **Kafa İM and Eyigör Ö:** Kisspeptins and Kisspeptin Neurons: Effects on Reproductive System and Hypothalamic Localizations. *Uludağ Tıp Derg* **2011**; 37: 53–60.
33. **Smith JT, Clifton DK and Steiner RA:** Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* **2006**; 131: 623–630.
34. **Katz N and Mazer NA:** The impact of opioids on the endocrine system. *Clin J Pain* **2009**; 25: 170–175.
35. **Nieschlag E, Behre HM and Nieschlag S eds:** Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction. 3rd ed. 2010. Berlin, Heidelberg: Springer; **2010**.

36. **Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW, et al:** Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology* **1996**; 125: 133–141.
37. **Hayes FJ, Seminara SB, Decruz S, et al:** Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**; 85: 3027–3035.
38. **Kumar A, Mohanty BP and Rani L:** **Secretion of testicular steroids and gonadotrophins in** hypothyroidism. *Andrologia* **2007**; 39: 253–260.
39. **Corrigan AZ, Bilezikjian LM, Carroll RS, et al:** Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinology* **1991**; 128: 1682–1684.
40. **Rochira V and Carani C:** Aromatase deficiency in men: A clinical perspective. *Nat Rev Endocrinol* **2009**; 5: 559–568.
41. **Ying SY:** Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* **1988**; 9: 267–293.
42. **Ewing LL, Davis JC and Zirkin BR:** Regulation of testicular function: a spatial and temporal view. *Int Rev Physiol* **1980**; 22: 41–115.
43. **Kadioğlu A, Atan A and Özgök İ:** Yaşlanan erkekte geç başlayan hipogonadizm. Tanı, tedavi ve takip kılavuzu. **2005**.
44. **Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, et al:** Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev* **2016**; 96: 55–97.
45. **Rosner W, Vesper H, Endocrine Society, et al:** Toward excellence in testosterone testing: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* **2010**; 95: 4542–4548.
46. **Miller WL and Auchus RJ:** The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 2011; 32: 81–151.
47. **Swerdloff RS, Wang C and Bhasin S:** Developments in the control of testicular function. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **1992**; 6: 451–483.
48. **Nankin HR and Calkins JH:** Decreased bioavailable testosterone in aging normal and impotent men. *J Clin Endocrinol Metab* **1986**; 63: 1418–1420.
49. **Bachman E, Travison TG, Basaria S, et al:** Testosterone Induces Erythrocytosis via Increased Erythropoietin and Suppressed Hepcidin: Evidence for a New Erythropoietin/Hemoglobin Set Point. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **2014**; 69: 725–735.
50. **Snyder PJ, Peachey H, Hannoush P, et al:** Effect of testosterone treatment on bone mineral density in men over 65 years of age. *J Clin Endocrinol Metab* **1999**; 84: 1966–1972.
51. **Wang C, Swerdloff RS, Iranmanesh A, et al:** Transdermal testosterone gel improves sexual function, mood, muscle strength, and body composition parameters in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**; 85: 2839–2853.
52. **Boiko DI, Shkodina AD, Hasan MM, et al:** Melatonergic Receptors (Mt1/Mt2) as a Potential Additional Target of Novel Drugs for Depression. *Neurochem Res* **2022**; 47: 2909–2924.
53. **Klein DC:** Arylalkylamine N-acetyltransferase: “the Timezyme.” *J Biol Chem* **2007**; 282: 4233–4237.

54. **Reiter RJ:** Melatonin: clinical relevance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **2003**; 17: 273–285.
55. **Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, et al:** Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* **2012**; 351: 152–166.
56. **Gobbi G and Comai S:** Differential Function of Melatonin MT1 and MT2 Receptors in REM and NREM Sleep. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2019**; 10: 87.
57. **Reiter RJ, Rosales-Corral S, Tan DX, et al:** Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cell Mol Life Sci* **2017**; 74: 3863–3881.
58. **Yang K, Qiu X, Cao L, et al:** The role of melatonin in the development of postmenopausal osteoporosis. *Front Pharmacol* **2022**; 13: 975181.
59. **Deng S-L, Zhang Y, Yu K, et al:** Melatonin up-regulates the expression of the GATA-4 transcription factor and increases testosterone secretion from Leydig cells through ROR $\alpha$  signaling in an in vitro goat spermatogonial stem cell differentiation culture system. *Oncotarget* **2017**; 8: 110592–110605.
60. **Alavi B, Shojaei M, Haghpanah T, et al:** Improved cell proliferation and testosterone secretion following exposure of TM3 Leydig cells to three-dimensional scaffold and light emitting diode. *Andrologia* **2022**; 54: e14593.
61. **Yu K, Deng S-L, Sun T-C, et al:** Melatonin Regulates the Synthesis of Steroid Hormones on Male Reproduction: A Review. *Molecules* **2018**; 23: 447.
62. **Yang M, Guan S, Tao J, et al:** Melatonin promotes male reproductive performance and increases testosterone synthesis in mammalian Leydig cells†. *Biol Reprod* **2021**; 104: 1322–1336.
63. **Galano A, Tan D-X and Reiter RJ:** Melatonin: A Versatile Protector against Oxidative DNA Damage. *Molecules* **2018**; 23: 530.
64. **Jarow JP, Espeland MA and Lipshultz LI:** Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* **1989**; 142: 62–65.
65. **Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, et al:** Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* **2001**; 345: 1388–1393.
66. **Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, et al:** Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum Reprod* **2006**; 21: 760–765.
67. **Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, et al:** World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* **2010**; 16: 231–245.
68. **Slama R, Eustache F, Ducot B, et al:** Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* **2002**; 17: 503–515.
69. **Larsen L, Scheike T, Jensen TK, et al:** Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod* **2000**; 15: 1562–1567.
70. **Alves MBR, Celeghini ECC and Belleannée C:** From Sperm Motility to Sperm-Borne microRNA Signatures: New Approaches to Predict Male Fertility Potential. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2020**; 8: 791.

71. **Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, et al:** Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod* **2001**; 16: 1165–1171.
72. **Singh S:** Basics of Light Emitting diodes, Characterizations and Applications.
73. **Cidral-Filho F j., Martins D f., Moré A o. o., et al:** Light-emitting diode therapy induces analgesia and decreases spinal cord and sciatic nerve tumour necrosis factor- $\alpha$  levels after sciatic nerve crush in mice. *European Journal of Pain* **2013**; 17: 1193–1204.
74. **Whelan HT, Smits RL, Buchman EV, et al:** Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg* **2001**; 19: 305–314.
75. **Anders JJ, Lanzafame RJ and Arany PR:** Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy. *Photomed Laser Surg* **2015**; 33: 183–184.
76. **Kim W-S and Calderhead RG:** Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? *Laser Ther* **2011**; 20: 205–215.
77. **Feehan J, Burrows SP, Cornelius L, et al:** Therapeutic applications of polarized light: Tissue healing and immunomodulatory effects. *Maturitas* **2018**; 116: 11–17.
78. **Jagdeo J, Austin E, Mamalis A, et al:** Light-emitting diodes in dermatology: A systematic review of randomized controlled trials. *Lasers Surg Med* **2018**; 50: 613–628.
79. **Czeisler CA, Duffy JF, Shanahan TL, et al:** Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science* **1999**; 284: 2177–2181.
80. **Chekani Azar S and Sabuncuoğlu Çoban N:** Nesfatin-1 protects the reproductive health of male Sprague Dawley rats exposed to blue and white LED lights. *Sci Rep* **2023**; 13: 19962.
81. **Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, et al:** Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update* **2014**; 20: 293–307.
82. **Uğurlu AK, Bideci A, Demirel AM, et al:** Is blue light exposure a cause of precocious puberty in male rats? *Front Endocrinol (Lausanne)* **2023**; 14: 1190445.
83. **Jiang Y, Li S, Xu W, et al:** Critical Roles of the Circadian Transcription Factor BMAL1 in Reproductive Endocrinology and Fertility. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2022**; 13: 818272.
84. **Yin X-L, Li X-X, Shi J-L, et al:** Changes in testosterone levels after inadequate solar light. *Asian J Surg* **2023**; 46: 2861–2862.
85. **Ban Frangez H, Frangez I, Verdenik I, et al:** Photobiomodulation with light-emitting diodes improves sperm motility in men with asthenozoospermia. *Lasers Med Sci* **2015**; 30: 235–240.
86. **Alvarez JD, Hansen A, Ord T, et al:** The circadian clock protein BMAL1 is necessary for fertility and proper testosterone production in mice. *J Biol Rhythms* **2008**; 23: 26–36.
87. **Ning G, Li B-N, Wu H, et al:** Regulation of testosterone synthesis by circadian clock genes and its research progress in male diseases. *Asian J Androl* **2025**.
88. **Xiao Y, Zhao L, Li W, et al:** Circadian clock gene BMAL1 controls testosterone production by regulating steroidogenesis-related gene transcription in goat Leydig cells. *J Cell Physiol* **2021**; 236: 6706–6725.

89. **Li T, Bai Y, Jiang Y, et al:** Potential Effect of the Circadian Clock on Erectile Dysfunction. *Aging Dis* **2022**; 13: 8–23.
90. **Liu PY:** Light pollution: time to consider testicular effects. *Front Toxicol* **2024**; 6: 1481385.
91. **Sayed M and Galal Abdelfattah M:** Effect of Light-Emitting Diode (LED) Light Color on Testicular Growth, Circulating Testosterone Concentration and Sperm Quality in Dandarawi Roosters. *EPSJ* **2018**.
92. **Yeste M, Castillo-Martín M, Bonet S, et al:** Impact of light irradiation on preservation and function of mammalian spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **2018**; 194: 19–32.
93. **Parvin A, Erabi G, Saboohi Tasooji MR, et al:** The effects of photobiomodulation on the improvement of sperm parameters: A review study. *Photochem Photobiol* **2024**; 100: 1713–1739.
94. **Gabel CP, Carroll J and Harrison K:** Sperm motility is enhanced by Low Level Laser and Light Emitting Diode photobiomodulation with a dose-dependent response and differential effects in fresh and frozen samples. *Laser Ther* **2018**; 27: 131–136.
95. **Rea MS, Figueiro MG, Bullough JD, et al:** A model of phototransduction by the human circadian system. *Brain Res Brain Res Rev* **2005**; 50: 213–228.
96. **Hussein SM, El-Fadaly AB, Metawea AG, et al:** Aging changes of the testis in albino rat: light, electron microscopic, morphometric, immunohistochemical and biochemical study. *Folia Morphol (Warsz)* **2020**; 79: 503–515.
97. **Paniagua R, Nistal M, Sáez FJ, et al:** Ultrastructure of the aging human testis. *J Electron Microsc Tech* **1991**; 19: 241–260.
98. **Zhou J and Dong Q:** Testicular aging: mechanism, management and future therapy. *Experimental Cell Research* **2025**; 449: 114603.
99. **Geigerseder C, Doepner R, Thalhammer A, et al:** Stimulation of TM3 Leydig cell proliferation via GABAA receptors: A new role for testicular GABA. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **2004**; 2: 13.
100. **Aqajanpor F, Kondori BJ, Asadi MH, et al:** Photobiomodulation is more effective than long-term scrotal hyperthermia in improving testis tissue and spermatogenesis in mice with busulfan-induced azoospermia. *Clin Exp Reprod Med* **2025**; 52: 283–294.
101. **Ni C, Fang Y, Chen X, et al:** Stem Leydig cell regeneration in the adult rat testis is inhibited after a short-term triphenyltin exposure. *Toxicology Letters* **2019**; 306: 80–89.
102. **Soltani R, Abbaszadeh H-A, Nazarian H, et al:** The Impact of Photobiomodulation Therapy on Enhancing Spermatogenesis and Blood-Testis Barrier Integrity in Adult Male Mice Subjected to Scrotal Hyperthermia. *J Lasers Med Sci* **2024**; 15: e43.
103. **Ahmed R, Hamdy O, Elattar S, et al:** Improving human sperm motility via red and near-infrared laser irradiation: in-vitro study. *Photochem Photobiol Sci* **2024**; 23: 377–385.
104. **Eghbaldoost A, Salehi Mashhadsari SP, Ghadirzadeh E, et al:** Therapeutic Effects of Low-Level Laser on Male Infertility: A Systematic Review. *J Lasers Med Sci* **2023**; 14: e36.
105. **Zhu W-B, Zhao H-B, Wang G-Z, et al:** The effects of testicular aging on Leydig cells and the application of stem cells in restoring Leydig cells function. *Reprod Biol Endocrinol* **2025**; 23: 147.

106. **Wang Y, Chen F, Ye L, et al:** Steroidogenesis in Leydig Cells: Effects of Aging and Environmental Factors. *Reproduction* **2017**; 154: R111–R122.
107. **Zirkin BR and Tenover JL:** Aging and declining testosterone: past, present, and hopes for the future. *J Androl* **2012**; 33: 1111–1118.
108. **Payne AH and Youngblood GL:** Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod* **1995**; 52: 217–225.
109. **Chen H, Ge R-S and Zirkin BR:** Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol* **2009**; 306: 9–16.
110. **Wang Y, Chen M, Xu J, et al:** Core clock gene *Bmal1* deprivation impairs steroidogenesis in mice luteinized follicle cells. *Reproduction* **2020**; 160: 955–967.
111. **Alvarez JD, Hansen A, Ord T, et al:** The circadian clock protein BMAL1 is necessary for fertility and proper testosterone production in mice. *J Biol Rhythms* **2008**; 23: 26–36.
112. **LaVoie HA and King SR:** Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp Biol Med (Maywood)* **2009**; 234: 880–907.
113. **Travicic DZ, Miljkovic D, Andric SA, et al:** Circadian disruption impairs Leydig cell maturation and reproductive development in male rats. *Reprod Biol Endocrinol* **2025**; 23: 104.
114. **Huang C, Cao X, Pang D, et al:** Is male infertility associated with increased oxidative stress in seminal plasma? A-meta analysis. *Oncotarget* **2018**; 9: 24494–24513.
115. **Crisol L, Matorras R, Aspichueta F, et al:** Glutathione peroxidase activity in seminal plasma and its relationship to classical sperm parameters and in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* **2012**; 97: 852–857.
116. **Yan L, Liu J, Wu S, et al:** Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism. *J Assist Reprod Genet* **2014**; 31: 549–554.
117. **Rhouma MB, Bahri H, Khalifa MB, et al:** Oxidative stress and its correlation with sperm parameters in different semen quality groups. *Clin Exp Reprod Med* **2025**.
118. **Collodel G, Moretti E, Micheli L, et al:** Semen characteristics and malondialdehyde levels in men with different reproductive problems. *Andrology* **2015**; 3: 280–286.