

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN MODELİNDE
KÜÇÜK GTPAZ'LARIN
İYONLAŞTIRICI RADYASYON
HASARLARINDAKİ ROLÜ**

YAŞAR AYSUN MANİSALIGİL

MEDİKAL FİZİK

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2020

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2014970171

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN MODELİNDE
KÜÇÜK GTPAZ'LARIN
İYONLAŞTIRICI RADYASYON
HASARLARINDAKİ ROLÜ**

MEDİKAL FİZİK

DOKTORA TEZİ

Y.AYSUN MANİSALIGİL

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Ayşegül YURT

II. Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Mukaddes GÜMÜŞTEKİN

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2017.KB.SAG.050 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU. HSI.PhD-2014970171

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
Özet	i
Abstract.....	ii
1 Giriş ve Amaç.....	3
2 Genel Bilgiler	5
2.1 Radyasyon	5
2.1.1 Doğal Radyasyon	6
2.1.2 Yapay Radyasyon.....	6
2.2 Radyasyon Tipleri	6
2.2.1 İyonlaştırıcı Radyasyon.....	7
2.2.2 İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyon	7
2.3 Radyasyon Dozu ve Birimleri.....	7
2.4 Radyasyonun Biyolojik Etkileri.....	9
2.5 Radyasyon ve Reaktif Oksijen Türleri.....	10
2.6 Radyasyon ve Apoptozis.....	11
2.7 Küçük GTPaz Ailesi	11
2.7.1 Rho GTPaz Ailesi.....	11
2.7.2 RhoA	12
2.7.3 Rac1.....	13
2.7.4 Cdc42.....	13
3 Gereç ve Yöntem.....	14
3.1 Araştırmanın Tipi	14
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	14
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	14

3.4	Çalışma Materyali ve Protokoller	14
3.4.1	Çalışmada kullanılan deney hayvanları.....	14
3.4.2	Radyasyon Uygulaması.....	14
3.4.3	Örneklerin Toplanması.....	15
3.4.4	Araştırmanın Deney Grupları.....	16
3.4.5	Deneyden Çıkarılma Kriterleri.....	16
3.5	Araştırmanın Değişkenleri	17
3.6	Veri toplama araçları.....	17
3.6.1	Histolojik İncelemeler	18
3.6.1.1	Testis dokusu için rutin ışık mikroskopik doku takibi protokolü.....	18
3.6.1.2	Johnsen Testiküler Hasar Skorlaması.....	19
3.6.1.3	Kemik doku ve kemik iliğinin histolojik olarak incelenmesi.....	20
3.6.1.4	İmmünohistokimyasal İncelemeler.....	20
3.6.1.5	İmmünohistokimyasal Skorum (H-skoru)	20
3.6.2	Biyokimyasal Analizler	21
3.6.2.1	Doku Homojenatlarının Hazırlanması.....	21
3.6.2.2	Rac1 ve RhoA aktivasyon deneyleri	21
3.6.2.3	Hücre içi ROS Düzeyinin Belirlenmesi	22
3.6.2.4	Malondialdehit (MDA) düzeyinin belirlenmesi	23
3.6.2.5	Süperoksit dismutaz (SOD) aktivite düzeyinin belirlenmesi	23
3.6.2.6	Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	24
3.7	Araştırma Planı ve Takvimi	26
3.8	Verilerin değerlendirilmesi	27
3.9	Araştırmanın sınırlılıkları.....	27
3.10	Etik Kurul Onayı	27
4	Bulgular.....	28
4.1	Sıçanların Ağırlıkları.....	28
4.2	Histolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme Sonuçları	28
4.2.1	Testis Dokusu	28

4.2.1.1	Testis doku hasarı	28
4.2.1.2	Apoptozis.....	32
4.2.1.3	Rac1 Ekspresyonu ve Aktivasyonu	33
4.2.1.4	RhoA Ekspresyonu ve Aktivasyonu.....	36
4.2.2	Kemik İliği Dokusu	38
4.3	Biyokimyasal Analiz Sonuçları	39
4.3.1	Radyasyonun testis dokusunda Hücre İçi ROS	39
4.3.2	Radyasyonun serum ve testis dokusunda MDA düzeyine etkisi.....	41
4.3.3	Radyasyonun serum ve testis dokusunda SOD düzeyine etkisi	42
5	Tartışma.....	45
6	Sonuç ve Öneriler.....	52
7	Kaynaklar	53
8	Ekler	57

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Radyasyon Birimleri	8
Tablo 2. Araştırmanın deney grupları.....	16
Tablo 3. Araştırmamızda kullanılan laboratuvar ve donanım	17
Tablo 4. Araştırmamızda kullanılan sarf malzemeler	18
Tablo 5. Johnsen Skorlaması.....	19
Tablo 6. Deney gruplarındaki sıçanların ağırlıkları ve sayıları	28
Tablo 7. Deney gruplarındaki sıçanların testis dokusuna ait Johnsen Skoru ve Tübül Çapı ölçümü sonuçları	29
Tablo 8. Deney gruplarındaki sıçanların testis dokusuna ait aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal analiz sonuçları	32
Tablo 9. Deney gruplarındaki sıçanların testis dokusuna ait Rac1 ekspresyonu ve Rac1-GTP analiz sonuçları	34
Tablo 10. Deney gruplarındaki sıçanların testis dokusuna ait RhoA ekspresyonu ve RhoA-GTP sonuçları	37
Tablo 11. Deney gruplarındaki sıçanların Hücre içi ROS analiz sonuçları.....	40
Tablo 12. Deney gruplarındaki sıçanların MDA analizi sonuçları.....	41
Tablo 13. Deney gruplarındaki sıçanların SOD analizi sonuçları.....	43

SEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Elektromanyetik Spektrum.....	5
Şekil 2. Dünyadaki radyasyon dağılımı.....	6
Şekil 3. Radyasyon tipleri.....	7
Şekil 4. Radyasyonun direk ve indirek etkileri.....	10
Şekil 5. Rho GTPaz aktivitesinin kontrolü.....	12
Şekil 6. Sıçanların ışınlanması	15
Şekil 7. Hücre içi ROS yönteminin prensibi	22
Şekil 8. Hücre içi ROS standart eğrisi.....	22
Şekil 9. MDA analizinin prensibi	23
Şekil 10. SOD aktivasyonu yönteminin prensibi	24
Şekil 11. SOD aktivitesi standart eğrisi.....	24
Şekil 12. BCA yönteminin prensibi.....	25
Şekil 13. MDA analizi (1) ve hücre içi ROS (2) için BCA standart eğrileri.....	25
Şekil 14. Araştırma planı.....	26
Şekil 15. Deney gruplarının testis dokusuna ait kesitlerinin mikroskopik görüntüleri..	30
Şekil 16. Deney gruplarının testis dokusuna ait kesitlerinin mikroskopik görüntüleri	30
Şekil 17. Deney gruplarının testis dokusuna ait Johnsen skoru sonuçları.....	31
Şekil 18. Deney gruplarının testis dokusuna ait Tübül çapı ölçümleri.....	31
Şekil 19. Deney gruplarının testis dokusuna ait kesitlerinin aktif kaspaz-3 İHK mikroskopik görüntüleri	33
Şekil 20. Deney gruplarına ait testis dokusuna ait aktif kaspaz-3 İHK analiz sonuçları.....	33
Şekil 21. Deney gruplarının testis dokusuna ait kesitlerinin Rac1 İHK mikroskopik görüntüleri	35
Şekil 22. Deney gruplarına ait testis dokusuna ait Rac1 ekspresyonu İHK analiz sonuçları... ..	35
Şekil 23. Deney gruplarına ait testis dokusu Rac1 aktivasyon analizi sonuçları.	36
Şekil 24. Deney gruplarının testis dokusuna ait kesitlerinin RhoA İHK mikroskopik görüntüleri	37
Şekil 25. Deney gruplarına ait testis dokusuna ait RhoA ekspresyonu İHK analiz sonuçları.. ..	38
Şekil 26. Deney gruplarına ait testis dokusu RhoA aktivasyon analizi sonuçları.	38
Şekil 27. Deney gruplarının kemik iliği dokusuna ait kesitlerinin H&E ve Aktif Kaspaz3, Rac1 ve RhoA İHK mikroskopik görüntüleri.....	39
Şekil 28. Deney gruplarına ait hücre içi ROS analizi sonuçları	40
Şekil 29. Deney gruplarına ait serum MDA analizi sonuçları.....	42

Şekil 30. Deney gruplarına ait testis dokusu MDA analizi sonuçları.....	42
Şekil 31. Deney gruplarına ait serum SOD analizi sonuçları	44
Şekil 32. Deney gruplarına ait testis SOD analizi sonuçları	44



KISALTMALAR

ROS	Reactive Oxygen Species, Reaktif Oksijen Türleri
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate1, Ras ilişkili C3 botulinum toksin substratı1
RhoA	Ras Homolog Family Member A, Ras homoloğu Ailesi A
Cdc42	Cell Division Cycle 42, Hücre Bölünme Siklüsü 42
İHK	İmmünohistokimyasal
SOD	Süperoksit dismutaz
MDA	Malondialdehit
UNSCEAR	United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, Atom Radyasyonunun Etkilerine İlişkin Birleşmiş Milletler Bilim Komitesi
ICRP	International Commission on Radiological Protection, Uluslararası Radyolojik Koruma Komisyonu
SI	Uluslararası Birim Sistemi
R	Röntgen
D	Soğrulan Doz
Gy	Gray
Rad	Radiation Absorbed Dose, Absorbe edilen radyasyon dozu
Sv	Sievert
Rem	Röntgen equivalent man, İnsan eşdeğer doz
RNS	Reactive Nitrogen Species, Reaktif azot türleri
GTP	Guanozin trifosfat
GDP	Guanozin difosfat
Ras	Rat Sarkoma Virüs
Arf	ADP Ribozilasyon Faktörü
Rab	Ras-like Protein From Rat Brain, Ras Benzeri Proteini

GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor, Guanin nükleotid değişim faktörü
GAP	GTPaz Aktive Eden Protein
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor, Guanin nükleotid ayırıştırma inhibitörü
ROCK	Rho Kinase
PAK	P21 ile Aktive Edilen Kinaz
ARLAB	Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı
Kİ	Kemik İliği
H&E	Hematoksilen-Eozin
MT	Masson Trikrom
PBS	Phosphate Buffered Saline, Fosfat tamponlu tuz
XO	Ksantin Oksidaz
BCA	Biçinkonik Asit

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin planlama, yapım ve değerlendirme aşamalarında katkılarından dolayı tez danışmanlarım Doç. Dr. Ayşegül YURT ve Prof. Dr. Mukaddes GÜMÜŞTEKİN'e,
Biyokimyasal analizlerinin yapılmasına katkı sağlayan Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR ve Ar. Gör. Cemre URAL'a,
Histolojik ve immünohistokimyasal analizlerinin yapılmasına katkı sağlayan Doç. Dr. Serap Cilaker MICİLİ'ye,
Laboratuvar hayvanlarına yönelik işlemlerde katkı sağlayan Prof. Dr. Osman YILMAZ'a
Eğitimimdeki katkılarından dolayı Medikal Fizik Ana Bilim Dalı öğretim üyelerine,
TEŞEKKÜR EDERİM.



SIÇAN MODELİNDE KÜÇÜK GTPAZ'LARIN İYONLAŞTIRICI RADYASYON HASARLARINDAKİ ROLÜ

Y.Aysun Manisalıgil, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Medikal Fizik Anabilim Dalı, İzmir

ÖZET

Amaç: İyonlaştırıcı radyasyonun canlılar üzerindeki erken ve geç dönemdeki etkilerinin başında reaktif oksijen (ROS) türlerinin oluşumu, apoptozis ve DNA hasarı gelmektedir. Hücre içi ROS oluşumu ve apoptozis mekanizmalarında rol alan küçük GTPaz'lar; Rac1, RhoA ve Cdc42'dir. Bu çalışmada; testis ve kemik iliği dokularında oluşan radyasyona bağlı hasarda, küçük GTPaz'ların rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Kontrol grubu hariç sıçanlara, 3 farklı dozda (0,02 Gy; 0,1 Gy; 5 Gy) tüm vücut radyasyon ışınlaması yapılmıştır. Radyasyon uygulanmasından sonra 2. saat, 24. saat ve 7. günde testis ve kemik iliği dokuları çıkartılmıştır. Testis ve kemik iliği doku hasarı histolojik yöntemler ile Rac1 ve RhoA ekspresyonları immünohistokimyasal (İHK) boyama ile analiz edilmiştir. Apoptozis, aktif kaspaz-3 ekspresyonunun İHK boyaması ile değerlendirilmiştir. Testis dokusundaki ROS'u değerlendirmek için; hücre içi ROS, süperoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehit (MDA) ile Rac1 ve RhoA aktivasyon analizleri biyokimyasal yöntemler kullanılarak yapılmıştır.

Bulgular: Radyasyon uygulanan tüm gruplarda, zamana ve doza bağlı testis dokusunda hasar ve apoptozis artışı saptandı. Radyasyon gruplarında doza ve zamana bağlı olarak; Rac1 ekspresyonları kontrol grubuna göre azalırken, RhoA ekspresyonları da artış göstermiştir. Ayrıca, radyasyon gruplarında, kontrol grubuna göre hücre içi ROS ve MDA düzeylerinin arttığı, SOD düzeylerinin ise azaldığı saptandı.

Sonuç: Radyasyona bağlı testis hasarında küçük GTPaz'ların rolü olabileceğini ve Rac1 ve RhoA'nın testis hasarını arttırıcı etkisinin en azından bir kısmını hücre içi ROS oluşumu ve lipid peroksidasyonunu arttırarak gerçekleştirebileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Sözcükler: Apoptozis, İyonlaştırıcı radyasyon, Küçük GTPaz, NADPH oksidaz, Reaktif oksijen türleri (ROS), Radyasyon hasarı.

THE ROLE OF SMALL GTPASES IN IONIZING RADIATION DAMAGE IN RAT MODEL

**Y.Aysun Manisalıgil, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences,
Department of Medical Physics, Izmir**

ABSTRACT

Objective: Acute and late effects of ionizing radiation on living organisms are mainly known as the generation of reactive oxygen species (ROS), apoptosis and DNA damage. The small GTPases, which are Rac1, RhoA, and Cdc42, are involved in intracellular ROS formation and apoptosis mechanisms. In this study, it was aimed to investigate the role of small GTPases involved in radiation-induced damage to testes and bone marrow tissues.

Methods: Whole body irradiation was applied to the rats at 3 different doses (0.02 Gy; 0.1 Gy; 5 Gy) except the control group. Testicular and bone marrow tissues were removed at 2 hours, 24 hours and 7 days after radiation exposure. Testicular and bone marrow tissue damage was analyzed by histological methods and Rac1 and RhoA expressions by immunohistochemical (IHC) staining. Apoptosis was assessed by IHC staining of active caspase-3 expression. In order to evaluate ROS in testicular tissue, intracellular ROS, superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) analyses were performed using biochemical methods. Rac1 and RhoA activation were analyzed by biochemical methods.

Results: Testicular tissue damage and increased apoptosis were detected in all irradiated groups, depending on time and dose. Depending on the dose and time in the all radiation groups, Rac1 expressions decreased compared to the control group and RhoA expressions increased. In addition, it was found that intracellular ROS and MDA levels increased and SOD levels decreased in the all radiation groups compared to the control group.

Conclusion: It has been suggested that small GTPases may have a role in radiation-induced testicular damage. It has been suggested that Rac1 and RhoA may have some of the effect of increasing testicular damage by increasing intracellular ROS generation and lipid peroxidation.

Key Words: Apoptosis, Ionizing radiation, Small GTPase, NADPH oxidase, Reactive oxygen species (ROS), Radiation damage

1 Giriş ve Amaç

İyonlaştırıcı radyasyon; çeşitli radyolojik görüntüleme uygulamalarında ve kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tanı ve tedavi sırasında hastaya uygulanacak radyasyon dozunun mümkün olduğunca az tutulması ve radyasyondan koruyucu önlemler alınmasına rağmen; hastada radyasyona bağlı hasarların oluşma olasılığı bulunmaktadır. İyonlaştırıcı radyasyonun canlılar üzerinde erken ve geç dönemdeki etkilerinin başında; DNA hasarı, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve apoptozis gelmektedir. İyonlaştırıcı radyasyona maruz kalan hücrelerde etkilenme şekline bağlı olarak farklı moleküler ve sinyal ileti yolları üzerinden etkiler meydana gelir (1). Bu moleküler değişiklikler, genel olarak çift iplik kırılmaları, kromozom anomalileri, mikronükleus ve nükleoplazmik köprülerin oluşması ve/veya strese duyarlı genlerin upregülasyonu ile saptanan genomik instabilitedir (2).

Günümüze kadar hücre içinde sadece çekirdeğin radyasyona duyarlı olduğu ve hücrenin geri kalanının radyasyondan etkilenmediği fikri yaygındı. Hücre içi molekülleri hedefleyen ve sinyal mekanizmalarını araştıran çalışmaların artması ile hücrelerin radyasyona yanıtının farklı düzeylerde ortaya çıkabileceğini savunan yeni görüşler ortaya çıkmıştır (1, 3, 4). Tıbbi görüntüleme ve tedavi yöntemlerinde, tetkikin ya da tedavinin amacına göre hastaya verilen radyasyon dozları da farklılık gösterir. Radyolojik görüntülemede direk grafi, mamografi gibi düşük dozda radyasyon içeren tetkikler olduğu gibi, anjiyografi, bilgisayarlı tomografi ve bununla birlikte tedavide de yüksek doz uygulamaları yapılmaktadır. Yüksek radyasyon dozları sonrasında oluşabilecek etkiler hakkında, düşük dozlara göre daha fazla bilgiye sahibiz. Japonya'daki atom bombası sonrasında yapılan epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler, radyasyon maruziyeti ile karsinogenez arasındaki nedensel ilişki hakkında önemli kanıtlar sağlamıştır (5). Ancak düşük dozlar için doz ve kanser insidansı arasındaki nedensellik üzerinde halen tartışmalar devam etmektedir (6).

GTPaz ailesi; hücre büyümesi, hücre iskeletinin yeniden yapılanması, protein kinaz aktivasyonu, ROS oluşumu ve endotel geçirgenliğin düzenlenmesi gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylarda görev alır. Küçük GTPaz RhoA, endotelial geçirgenliği artırıcı etkileri bilinmekle birlikte, Rac1 ve Cdc42 moleküllerinin endotelial disfonksiyon tamir mekanizmalarındaki rolü bilinmemektedir (7). Bunun yanı sıra, Rac1 molekülünün; hücre döngüsü, hücre-hücre adezyonu, aktin bağlantılı motilite ve epitelial farklılaşma gibi görevleri de vardır. Rac1 molekülünün oksidatif stres ve apoptozisin arttığı patolojik durumlarda

ekspresyonu ve/veya aktivitesinin arttığı pek çok dokuda gösterilmiştir (8, 9). Küçük GTPaz'ların özellikle de Rac1 molekülünün; NADPH oksidaz enziminin alt birimi olarak serbest radikal oluşumu ve apoptozisteki rolleri nedeni ile radyasyona bağlı hasarlar oluşmasında rolü olabileceği düşünülmektedir.

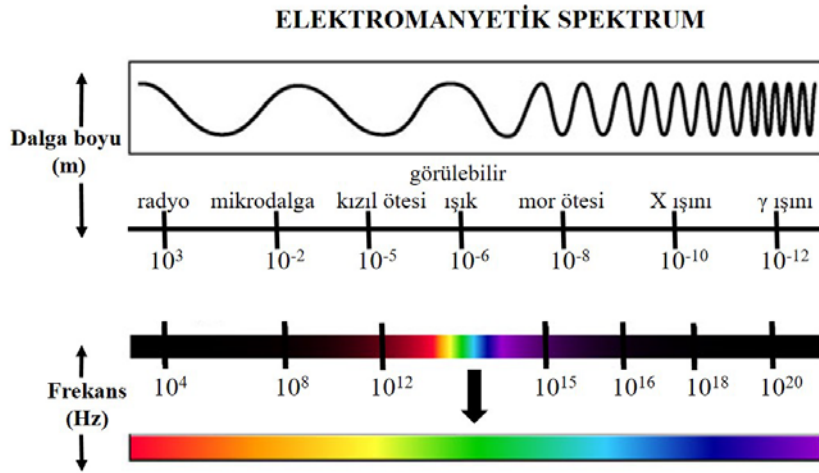
Çalışmamızda, tıbbi görüntüleme ve tedavi yöntemlerinde kullanılan radyasyon dozlarına karşılık gelebilecek radyasyon dozlarının (düşük, orta ve yüksek) farklı dokular üzerindeki erken ve geç dönemdeki olası etki mekanizmalarında GTPaz'ların rolünü araştırmayı amaçladık.



2 Genel Bilgiler

2.1 Radyasyon

Radyasyon, elektromanyetik dalga veya parçacıklar biçimindeki enerji yayılması veya aktarımıdır. Elektromanyetik dalgalar; çok düşük enerjiden (radyo dalgaları, mikrodalgalar, görülebilen ışınlar) çok yüksek enerjiye (X ve gama ışınları) kadar geniş bir spektruma sahiptirler (Şekil 1). Radyasyon; doğal ya da yapay yollarla oluşabilir; doğada bulunan radyoaktif çekirdeklerin bozunması ile oluşan radyasyon background radyasyona katkı sağlarken X ışını tüpünde meydana getirilen radyasyon başta sağlık olmak üzere sanayide birçok alanda çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır.



Şekil 1. Elektromanyetik Spektrum

Günlük hayatımızda sürekli olarak çeşitli şekillerde radyasyona maruz kalıyoruz. Bu radyasyon maruziyetinin %80'i doğal kaynaklar ve % 20'si de yapay kaynaklar (özellikle tıpta kullanılan radyasyon uygulamaları) aracılığı ile olmaktadır. Radyasyon maruziyetini kategorize etmenin bir başka yolu da ışınlamanın nasıl olduğu ile ilgilidir. Radyoaktif maddeler ve radyasyon, vücudumuzu dışardan veya içeriden (yiyecek, içecekler ve inhalasyon yoluyla) ıslayabilir. Genel olarak iç ve dış maruz kalma dozlarının yaklaşık olarak aynı olduğu kabul edilir (Şekil 2) (10).



Şekil 2. Dünyadaki radyasyon dağılımı (10)

2.1.1 Doğal Radyasyon

Dünya üzerinde, evrenden gelen kozmik ışınlar ve yerkürede bulunan doğal radyoaktif maddelerden yayılan radyasyon bulunmaktadır. Tüm canlılar, varoluşlarından bu yana sürekli olarak doğal radyasyonla iç içe yaşamaktadır. Atomik Radyasyonun Etkilerine İlişkin Birleşmiş Milletler Bilim Komitesi (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, UNSCEAR) tarafından 2000 yılında yayınlanan raporda; doğal yollar ile alınan ortalama yıllık etkin doz değerinin 2,4 mSv civarında olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, bazı ülkelerde bu miktarın 10 mSv'in üzerinde olabileceği de eklenmiştir (10). Doğal radyasyon kaynakları; kozmik ışınlar ve dünyanın oluşumundan itibaren yerkabuğunda bulunan doğal olarak bulunan radyoizotoplar ve radon gazıdır.

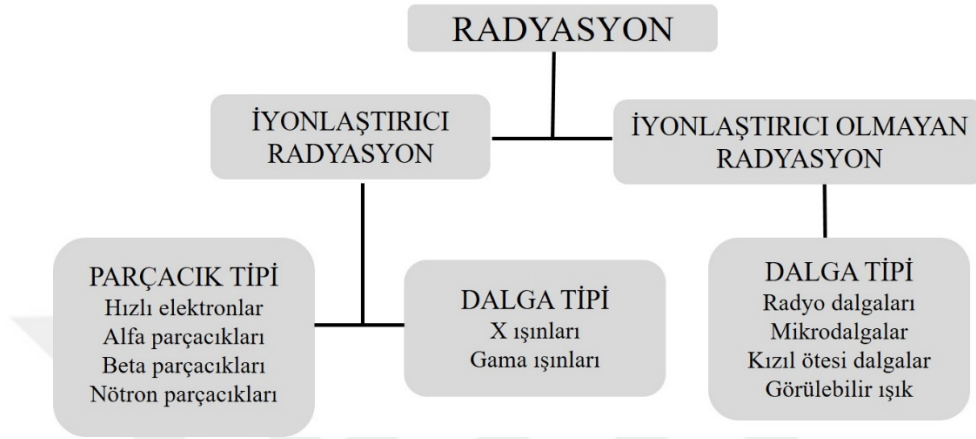
2.1.2 Yapay Radyasyon

Doğal ya da yapay yollar ile radyoaktif çekirdeklerin bozunması ya da X ışını tüpü ile elde edilen radyasyon yapay radyasyon olarak adlandırılır. En büyük kullanım alanı hastalıkların tanı ve tedavisi amacıyla yapılan tıbbi uygulamalardır. Bununla birlikte; nükleer güç santrallerinde enerji üretimi, endüstri ve sanayi alanında ürünlerin kalite kontrol işlemlerinde, gıdaların sterilizasyonu amacıyla da yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.2 Radyasyon Tipleri

Radyasyon, madde üzerinde oluşturduğu etkilere göre iyonlaştırıcı olan ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olmak iki gruba ayrılır (Şekil 3). Yüksek enerjili kozmik ışınlar, X ve gama ışınları iyonlaştırıcı radyasyon iken kızılötesi ışık, morötesi ışık, görünür ışık, radyo dalgaları

ve mikrodalgalar iyonlaştırıcı olmayan radyasyondur (11). Radyasyonun canlılar üzerinde zararlı etkileri olmasına rağmen X ve gama ışınları hastalıkların tanı ve tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (12).



Şekil 3. Radyasyon tipleri

2.2.1 İyonlaştırıcı Radyasyon

Farklı radyasyon tipleri madde ile karşılaştıklarında maddede kimyasal bağları kırabilecek, atomlardan veya moleküllerden elektron kopararak iyonizasyon oluşturacak etkiye sahiptir. Bu tip radyasyona iyonlaştırıcı radyasyon adı verilir. Alfa, beta ve nötron gibi parçacık tipindeki ve yüksek enerjili morötesi ışınlar, gama ve X ışınlarını içeren dalga tipindeki radyasyonlar iyonize edici özelliğe sahiptirler.

2.2.2 İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyon

Radyo dalgaları, infrared, görünür ışık gibi düşük enerjili elektromanyetik radyasyonlar iyonlaştırıcı özelliğe sahip değildir.

2.3 Radyasyon Dozu ve Birimleri

Radyasyona maruz kalan organizmaların aldıkları dozlarla ve oluşabilecek risklerle ilgili nicel değerlendirmeler yapabilmek, radyasyondan kaynaklanan etkinin bir ölçütü olan doz ile risk arasındaki bağlantıyı kurabilmek için dozimetrik nicelikler gereklidir. Uluslararası Radyolojik Koruma Komisyonu (International Commission on Radiological Protection, ICRP); radyasyondan koruma standartları, mevzuat, yönergeler, programlar ve uygulamalar gibi uluslararası kullanılan radyolojik koruma niceliklerini geliştirir (13). Radyasyondan korunma

niceliklerini üç ayrı gruba ayırmıştır:

1. Fiziksel ve ölçülebilir miktarlar (absorbe edilen doz, havadaki foton ışınlama değeri, hava kerma)
2. Türetilmiş miktarları (eşdeğer doz, etkin doz ve doz eşdeğeri; direkt olarak ölçülemezler ancak hesaplamalar ile belirlenir)
3. Bilimsel komite tarafından belirlenen değerler (radyasyon ağırlık faktörleri, doku ağırlık faktörleri ve primer ve ikincil sekonder doz limitleri gibi).

İşinlama dozu (ekspojur, $x=dQ/dm$); fotonlar tarafından serbest bırakılan bütün elektronlar (nötron ve pozitron) havada tamamen durdurulduğunda, havada oluşan aynı işaretli iyonların toplam yükünü tanımlar. Uluslararası Birim Sistemi (SI)'nde ekspojurun tanımı birim kilogram başına yük miktarıdır(C/kg). Özel birimi röntgen (R)'dir (Tablo1).

Tablo 1. Radyasyon Birimleri

Radyasyon Niceliği	Konvansiyonel Birim	SI Birimi	Aralarındaki ilişki
İşinlama Dozu (Havadaki radyasyon)	Röntgen $2.58.10^{-4}$ C/kg	NA (Air Kerma) Coulomb/kg	$1C/kg=3876$ R $1R= 2.58.10^{-4}$ C/kg
Soğurulan Doz (Depolanan enerji)	Rad 10^{-2} Joule/kg	Gray Joule/kg	$1Rad= 1cGy$ $1Gy= 100$ Rad
Doz Eşdeğeri (Biyolojik etki)	$Rem= Rad \times W_R$	Sievert $Gy \times W_R$	$1 Rem=0,01$ Sv $1 Sv= 100$ Rem
Radyoaktivite	Curie(Ci) $3,7 \times 10^{10}$ sn ⁻¹	Becquerel (Bq) sn ⁻¹	$1 Ci=3,7 \times 10^{10}$ Bq $1Ci= 37$ GBq

Soğurulan doz (D), iyonize radyasyon tarafından üretilen biyolojik etkilerin bir ölçüsü olup radyasyona maruz kalan bir materyalin birim kütlesinde depo edilen enerjidir. SI birim sisteminde soğurulan doz birimi Gray (Gy)'dır. Gray, bir kilogram dokuda soğurulan bir Joule'lik

enerji bir Gray' e eşittir. Özel birimi ise rad (radiation absorbed dose)'dır. Eşdeğer doz; soğurulan dozun radyasyon ağırlık faktörü ile çarpılarak düzeltilmesiyle bulunan radyasyonun tipine bağlı olarak doku veya organdaki biyolojik etkilerin dikkate alındığı bir doz birimidir. SI birim sisteminde birimi Sievert (Sv)'dir. 1Sv; 1Gy'lik x veya gama ışını ile aynı biyolojik etkiyi meydana getiren bir radyasyon miktarı olarak tanımlanır. Eşdeğer dozun özel birimi; Rem (Röntgen Equivalent Man)'dir (Tablo1). Etkin dozu; bütün doku ve organların aldığı dozu belirlemek için tanımlanır ve eşdeğer dozun, her doku ve organın doku ağırlık faktörleri ile çarpılması sonucunda elde edilen dozların toplamıdır (14).

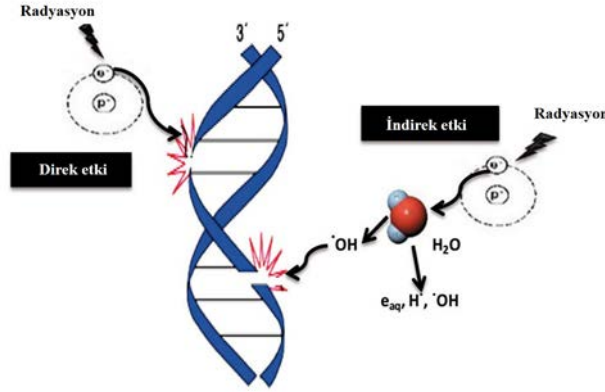
2.4 Radyasyonun Biyolojik Etkileri

Biyolojik sistemlerde maruz kalınan radyasyonun tipi, dozu ve/veya doz hızı maruz kalan vücut bölgesinde oluşabilecek radyasyon hasarını belirler (3). İyonize radyasyonun meydana getirdiği hasarlar öncelikle hücre düzeyinde başlayarak tüm organizmayı etkileyebilir. Bu etkilerin başında; DNA hasarı ve buna bağlı oluşan kontrolsüz hücre çoğalması ve/veya hücre ölümü ve serbest radikallerin oluşumu gelmektedir (1, 15). Radyasyona maruz kalan dokunun hücre yapısı ve proliferasyon hızına bağlı olarak oluşabilecek hasar, dokular arasında farklılık gösterir (16). Radyasyonun doku düzeyindeki etkilerinin başında; deri lezyonları, katarakt oluşumu, kemik iliğinin etkilenmesi sonucu oluşan hematolojik değişiklikler ve infertiliteye neden olabilecek düzeyde gonadal hücre hasarı bulunmaktadır. Canlı organizmadaki organ ve dokuların hangi dozlarda ve hangi düzeyde etkilendikleri ICRP tarafından belirlenmiştir (16).

İyonize radyasyonun etkileri stokastik ve deterministik etkiler olarak iki farklı şekilde ortaya çıkabilir. Stokastik etkiler; alınan dozdan bağımsız, çok düşük dozlarda bile ortaya çıkabilen, ne zaman ve ne şekilde olacağı öngörülemeyen etkilerdir. Stokastik etkilerin oluşma olasılığının arttığı doz değeri (100 mGy) eşik değer olarak kabul edilir (16). Deterministik etkiler ise yüksek doz maruziyetlerinde oluşan aniden ortaya çıkabilen ve organizmada büyük hasarlara neden olabilecek sonuçlar meydana getirir. İyonlaştırıcı radyasyon maruziyetinin yönetimi ve kontrolü, deterministik etkilerin oluşmaması ve stokastik etkilerin oluşturabileceği risklerin en az düzeyde görülebilmesidir.

İyonlaştırıcı radyasyon hücreyi direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde etkiler (Şekil 4) (3, 16). Direkt ve indirekt etkiler farklı enerji seviyelerindeki foton veya parçacıkların kinetik enerjilerini hücredeki moleküllere aktarmasına dayanır. Yüksek enerji seviyelerinde oluşan direkt etki, hücreyi oluşturan moleküler yapıları bozarak kimyasal veya biyolojik değişiklikler

meydana getirebilir. Düşük enerji seviyelerindeki radyasyon tipleri de suyun hidrolizi sonucu ROS oluşturarak hücreyi indirek olarak etkiler. Radyasyona bağlı direkt ve indirekt etkiler, çeşitli biyokimyasal ve moleküler sinyal yollarını aktive eder veya kalıcı fizyolojik değişiklikler meydana getirebilir hücre ölümüne neden olabilir (3, 17). İndirek etki düşük enerji seviyelerindeki foton veya parçacıkların kinetik enerjilerini hücredeki moleküllere aktarmasına dayanır (15).



Şekil 4. Radyasyonun direk ve indirek etkileri (18)

2.5 Radyasyon ve Reaktif Oksijen Türleri

Hücrede açığa çıkan ROS, radyasyonun indirek etkilerini oluşturarak çeşitli hücresel mekanizmaları aktive eder. İyonlaştırıcı radyasyon maruziyeti, 10^{-12} sn içinde hızlıca suyu hidrolize ederek ROS oluşumuna neden olur. Açığa çıkan süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) ve peroksinitroz asit ($ONOOH$) gibi reaktif azot türleri (Reactive Nitrogen Species, RNS); DNA'ya ve hücredeki diğer bölümlerine zarar verir (19, 20). DNA, ROS kaynaklı hasara karşı savunmasızdır; tek ve çift zincirli kırıkları, tek nükleotid hasarlar, DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağlantılarına neden olur (19). İyonize radyasyon, NADPH ve oksijeni süperoksit (O_2^-) ve hidrojen iyonuna dönüştüren NADPH oksidaz ekspresyonunu indükler (20, 21). Hücreler, oksidatif stres ile karşılaştığında antioksidan savunma mekanizmalarını aktive eder. Öncelikle glutatyon, askorbat, melatonin gibi endojen antioksidanlar oluşan serbest radikalleri nötralize ederler. Daha sonra da oksidatif stres, detoksifiye edici enzimler (SOD, GPx, Glutatyon S-transferaz) ile giderilir (20). Oksidatif stres, mitokondriyal bozulmaya yol açarak elektron taşıma zincirinde bozulmaya ve oksidatif fosforilasyona neden olur. Mitokondriyal membran boyunca lipid taşınması etkilenecek lipid oksidasyonu ve peroksidasyonu nedeniyle membran hasarına neden olur (19).

2.6 Radyasyon ve Apoptozis

Apoptozis; sitoplazmanın küçülmesi, plazma zarının bozulması, kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma ile karakterize programlanmış bir hücre ölümüdür (22). Apoptozis hücre dışı uyaranlarla ve hücre içinde de mitokondri üzerinden iki farklı yolla uyarılır. Her iki mekanizmada da kaspaz (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) proteinleri aktifleşerek proteolitik süreçleri başlatır, ardından DNA parçalanması ve apoptozis gerçekleşir (3). İyonlaştırıcı radyasyon hücrede; direk, indirek etkileşim yoluyla ve ayrıca oksidatif stres aracılığı ile apoptoze yol açar. Sıçanlara 800 cGy, X ışını verildikten 11 gün sonra lökositlerde apoptoze yol açtığı bildirilmiştir (23). Sıçanlarda yapılmış bir çalışmada, 10 Gy gama ışını maruziyeti sonrasında kaspaz3 ekspresyonunun arttığını rapor edilmiştir (24).

2.7 Küçük GTPaz Ailesi

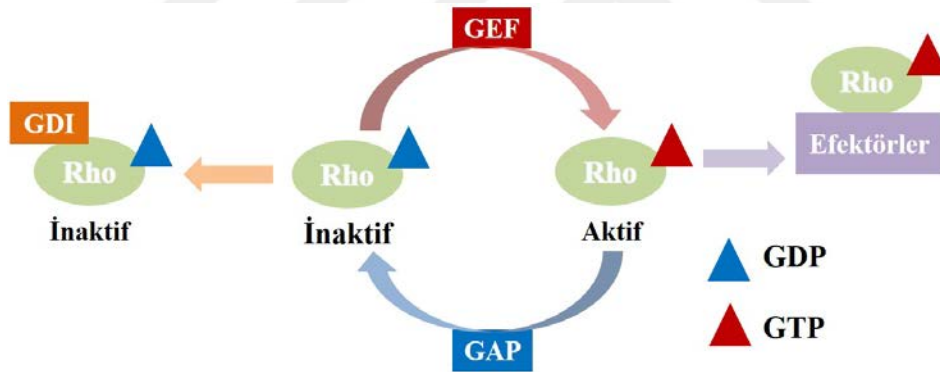
Küçük G proteinleri 20-40 kDa molekül ağırlığında monomerik yapıda GTP bağlayıcı proteinlerdir (25). Küçük GTPaz'lar, guanozin trifosfat'ın (GTP) guanozin difosfat'a (GDP) hidrolizini katalize ederler. Hem GDP/GTP bağlama, hem de GTPaz aktivitelerine sahip olduklarından, "küçük GTPaz" olarak da adlandırılırlar. En iyi bilinen üyeleri olan Ras GTPaz'lar hücre büyümesi, hücre farklılaşması, hücre göçü ve lipid veziküllerinin hareketini düzenlemede önemli rol oynarlar (26). Ras süper ailesi; yapılarına ve işlevlerine göre ailelere ve alt ailelere ayrılır. Beş ana aile; Ras, Rho, Ran, Rab ve Arf GTPaz'lardır (27). Çeşitli hücrel sinyal ileti yollarında rol alan küçük G proteinlerini konu alan çalışmalar halen devam etmektedir. En çok bilinen işlevleri; Ras proteinlerinin gen ifadesinden sorumlu olduğu, Rho ailesi üyelerinin (Rho, Rac, Cdc42) hem hücre iskeletinin yeniden yapılanmasını hem de gen ifadesini düzenlediğidir. Rab ve Sar1/Arf ailesi üyeleri hücre içi vezikül trafiğini, Ran ailesi üyeleri de, G1, S ve G2 fazları sırasında nükleositol plazmik transportu ve M fazındaki mikrotübül organizasyonunu düzenlemektedir (25, 27, 28).

2.7.1 Rho GTPaz Ailesi

Rho (Ras homolog gen) ailesi üyelerinin insan genomunda 20 gen tarafından kodlandığı bilinmektedir. Rho, Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate), Cdc42 (cell division cycle 42), RhoD, RhoE, TC10 bunlardan bazılarıdır. Rho (RhoA, RhoB ve RhoC), Rac (Rac1, Rac2 ve Rac3) ve Cdc42 daha detaylı çalışılan üyelerdir (25, 29). Rho ailesi proteinleri ilk olarak mayalarda keşfedilmiştir ve Rac1 ve Cdc42 moleküllerinin aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenerek tomurcuklanma işlevinde yer aldığını gösterilmiştir (30). Memeli hücrelerinde

Rho/Rac/Cdc42 proteinlerinin, hücre dışı sinyaller ile aktifleşerek hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde birincil olarak rol aldığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra; gen ifadesi, hücre polaritesi, morfogenez, hücre göçü, apoptozis, vezikül trafiği gibi çeşitli hücresel işlevlerin düzenlenmesinde de rol alır. Rho GTPaz'lar genellikle hücre tipine özgü olarak ve/veya uyarana bağlı ekspresyon gösterirler (31).

Rho GTPaz'lar; GTP'ye bağlı olduğunda aktif, GDP'ye bağlı olduğunda da inaktif olurlar (Şekil 5). GTPaz aktivitesi, guanin nükleotid değişim faktörü (Guanine nucleotide Exchange Factor, GEF) adı verilen proteinler, GTPaz aktive edici proteinler (GTPase-activating protein, GAP) ve guanin nükleotid ayrıştırma inhibitörü (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor, GDI) ile kontrol edilir. GEF proteinleri, GDP'nin serbest bırakılmasını ve GTP'nin bağlanmasını kolaylaştırarak Rho GTPaz'ları aktif hale getirir. GAP proteinleri de, bağlı GTP moleküllerini hidrolize ederek GTP'ye bağlı formdan GDP'ye bağlı forma hızlı bir şekilde değişmelerini sağlar. GDI proteinleri ise, bazı Rho proteinleri üzerindeki C-terminal gruplara bağlanarak inaktif durumda kalmalarını sağlar (25, 28).



Şekil 5. Rho GTPaz aktivitesinin kontrolü (28)

2.7.2 RhoA

Memelilerde Rho proteinleri; RhoA, RhoB ve RhoC olarak; %88 oranında da benzer aminoasitlerde oluşan 3 izoformu bulunmaktadır. Üç izoformunu da Rho Kinase (ROCK) gibi benzer efektör proteinleri bağlanırlar (32). Trombosit agregasyonu, lenfosit ve fibroblast adezyonu, hücre motilitesi, kasılma ve sitokinez gibi aktin hücre iskeletine bağımlı birçok hücresel süreçte rol alırlar (25). Rho-GTPaz'lardan Rac1 ve Cdc42 endotelial bariyer fonksiyonunda da rol alırken, RhoA kasılmaya bağlı endotelial geçirgenliği indükler. RhoA molekülü, efektör proteinleri (ROCK1 ve ROCK2) aracılığıyla hücre döngüsünün ilerlemesi,

hücre göçü, endotelial geçirgenlik, F-aktin stres lifi oluşumu ve aktomiyosin bazlı kontraksiyonda rol alır (32).

2.7.3 *Rac1*

Memelilerde, ilk olarak Rac proteinlerinin işlevi açıklığa kavuşturulmuştur. GTP-Rac1'in, diğer iki sitozolik proteine (p47phox, p67phox) ek olarak, fagositik hücrelerde NADPH oksidaz aktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (25). Rac1 molekülü aracılık ettiği hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, hücre adezyonu ve göçü sinyal ileti mekanizmaları, erken embriyonik dönem için çok önemlidir. Fareler üzerinde yapılan çalışmada Rac1 geninin susturulmasının, gastrulasyon defektleri olduğu ve mezodermal hücrelerdeki apoptozis sonucu embriyonik dönemde ölüm ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (33, 34). İnsan kanserli dokularında Rac1'in hiperaktivasyonu, aşırı ekspresyonu, düzensiz yıkımı ve/veya hücre içindeki lokalizasyonun bozulması yaygın olarak görülmektedir. Rac1'i aktive eden GEF moleküllerinin ekspresyonu veya aktivitesinin artması da metastatik fenotip ve ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir (34). Rac1, pek çok spesifik efektör molekül ile etkileşir ve çeşitli fizyolojik sonuçları olan çok sayıda sinyal ileti yolağının aktivasyonuna neden olur. Rac1 efektör proteinleri arasında ilk bulunanlar, PAK (p21 ile aktive edilen kinaz) ailesidir. PAK, Rac1'e GTP aracılığıyla bağlanarak PAK kinaz aktivitesini güçlü bir şekilde uyarır ve hücre iskeleti dinamikleri, adezyon ve gen transkripsiyonuna yol açar (35).

2.7.4 *Cdc42*

Cdc42 proteini yapı ve işlev olarak Rac proteinlerin benzerlik gösterirler. İlk olarak mayalarda Rac/Cdc42 proteinlerinin hücre iskeletinin yeniden yapılandırılmasındaki işlevi gösterilmiştir. Cdc42, mayada yeni çıkan tomurcuk bölgesinde tanımlanmıştır (25). Fibroblastlarda Rac proteinleri, lamellipodia ve membran kıvrımlarının oluşumunu ve sonrasında stres lifi oluşumunu düzenlerken, Cdc42 proteinlerinin öncelikle hücre çevresinde filopodia oluşumunda önemli bir rol oynadığı sonrasında lamellipodia ve membran kıvrımlarının oluşumunu ve sonrasında stres lifi oluşumuna katıldığı saptanmıştır (36). Cdc42, antijen sunucu hücrelerde, hem aktin hem de mikrotübüllerin polimerizasyonunda rol oynamaktadır (37). Bugüne kadar, Cdc42 ve Rac proteinlerinin birkaç efektörü tanımlanmıştır. Bu proteinlerin birçoğu hem Rac hem de Cdc42 proteinleri için ortaktır. Bunlar arasında en iyi bilinenin PAK'dır.

3 Gereç ve Yöntem

3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırmamız tanımlayıcı ve deneysel niteliktedir.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmamızın radyasyon uygulaması dışındaki deney hayvanları ile ilgili süreçler (barınma, kan alınması, sakrifikasyon ve dokuların çıkarılması) Mayıs - Haziran 2018 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'na ait laboratuvarlarda yapıldı. Sıçanlara düşük doz radyasyon uygulamaları Dokuz Eylül Üniversitesi Radyoloji Anabilim Dalı'nda, orta ve yüksek doz radyasyon uygulaması da Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Alınan kan örnekleri santrifüj edilerek serumlar ayrıldı ve analize kadar Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) saklandı. Çıkarılan dokuların ve serumların biyokimyasal analizleri ARLAB'da, dokulara ait histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler ise Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmamız insan üzerinde yapılmamıştır.

3.4 Çalışma Materyali ve Protokoller

Araştırmamız; sıçanlar üzerinde 3 farklı dozda (düşük, orta, yüksek) radyasyon uygulaması sonrasında biyokimyasal, histolojik ve immünohistokimyasal deney protokollerini içermektedir.

3.4.1 Çalışmada kullanılan deney hayvanları

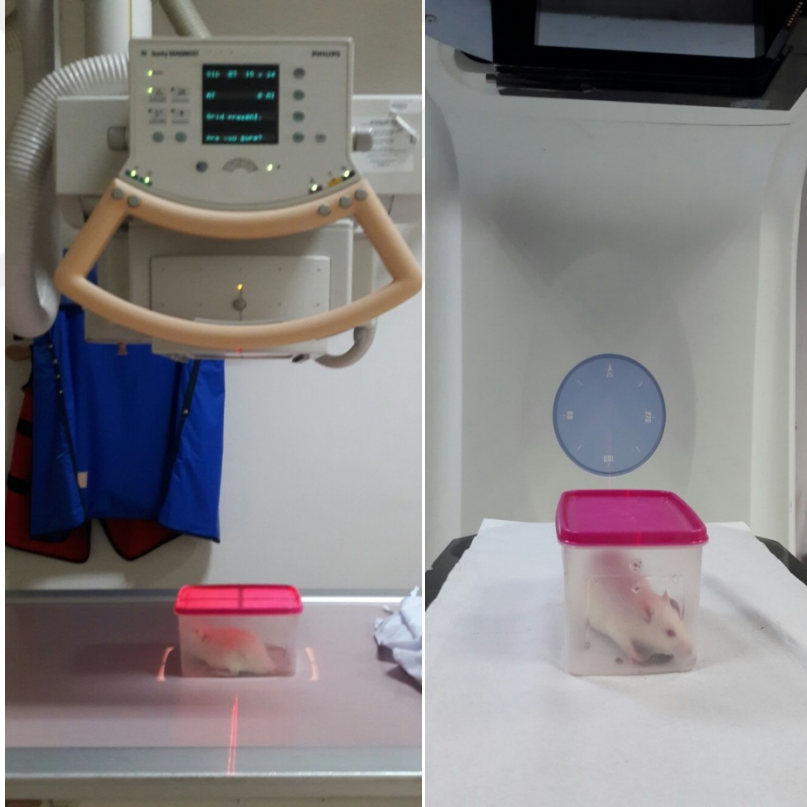
Çalışmamızda 7-8 haftalık, 250 ± 20 g, erkek Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Tüm hayvanlar; yem yeme ve su içme serbestliğinde, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusunda, ortam sıcaklığının $22 \pm 2^\circ\text{C}$ olduğu laboratuvar koşullarında barındırıldı.

3.4.2 Radyasyon Uygulaması

Sıçanlara düşük doz (0,02 Gy) radyasyon uygulaması, Radyoloji Anabilim Dalı'ndaki dijital röntgen cihazında (Tele Diagnost, PHILIPS, Amsterdam, Netherlands) yapıldı. Yirmi

mGy (0,02 Gy) doz için gerekli ışınlama parametreleri belirlemede iyon odası (RTI, R100, Möln dal, Sweden) kullanıldı. Sıçanlar radyasyonu kolayca geçirebilen ve doz azaltım değerleri göz önünde bulundurulan, 13x18x10cm boyutlarındaki plastik kabın içerisine yerleştirildi (Şekil 6). Kolimasyon alanı 13x18 cm, cilt kaynak mesafesi (Skin Source Distance, SSD) 83 cm ayarlanarak, 133 kV, 300 mA ve 0.5 sn parametreleri ile ışınlama yapıldı.

Orta (0,1 Gy) ve yüksek (5 Gy) doz radyasyon uygulamaları da Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'ndaki lineer hızlandırıcı cihazı (Siemens Primus, Erlangen, Germany) ile gerçekleştirildi. Işınlama sırasında her sıçan ışınlama kabına alınarak; kolimasyon alanı 13x18 cm, SSD 83 cm ayarlandı. Işınlama için 6 megavolt (MV) enerjili, 300 MU/dk doz hızındaki X ışınları 100 mGy için 10 Monitor Unit (MU), 5 Gy için 500 MU olarak kullanıldı.



Şekil 6. Sıçanların ışınlanması

3.4.3 Örneklerin Toplanması

Radyasyon uygulamasından sonra sıçanlar Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'na getirilerek deney protokolüne uygun olarak 2, 24 saat ve 7 gün barındırıldı. Belirlenen sürelerle uygun olarak eter ile sakrifiye edildikten hemen sonra Vena Cava Caudalis'ten kan

örnekleri alındı. Sağ testis ve sağ femur dokuları, histopatolojik ve immunhistokimyasal boyamalar için %10 formol içine alındı. Sol testis, karaciğer ve dalak dokuları hızlıca sıvı nitrojen içine alınarak -80°C’de biyokimyasal analizler için saklandı. Testis dokusu bu çalışma kapsamında, diğer dokular daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere saklandı.

3.4.4 Araştırmanın Deney Grupları

Her gruba ait denek sayısı 6 olan çalışmamızın deney grupları (Tablo 2) aşağıdaki gibidir:

Kontrol grubu: Sıçanlar hiçbir işlem yapılmadan,

Düşük doz radyasyon: Sıçanlar 0,02 Gy radyasyon uygulamasından sonra,

Orta doz radyasyon: Sıçanlar 0,1 Gy radyasyon uygulamasından sonra,

Yüksek doz radyasyon: Sıçanlar 5 Gy radyasyon uygulamasından sonra kurban edilerek kan ve doku örnekleri alınmıştır.

Tablo 2. Araştırmanın deney grupları

DENEY GRUPLARI			
kontrol grubu (n=6)	2. saat düşük doz radyasyon (n=6)	2. saat orta doz radyasyon (n=6)	2. saat yüksek doz radyasyon (n=6)
	24. saat düşük doz radyasyon (n=6)	24. saat orta doz radyasyon (n=6)	24. saat yüksek doz radyasyon (n=6)
	7. gün düşük doz radyasyon (n=6)	7. gün orta doz radyasyon (n=6)	7. gün yüksek doz radyasyon (n=6)

3.4.5 Deneyden Çıkarılma Kriterleri

Hayvanların başlangıç ve deney sırasındaki ağırlıkları kaydedilmiştir. Günde iki kez sulukları ve yemleri kontrol edilerek ve kafes temizlikleri yapıldı. Bu süre içinde vücut ağırlığının %15’inden fazlasını kaybeden, dehidratasyon ya da enfeksiyon tespit edilen fareler

deneyden çıkarılması planlandı. Ancak deneyler sırasında sıçanlarda, deney gruplarından çıkarılması gereken bulgular oluşmadı.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

- **Bağımsız Değişkenler:** Araştırmamızın bağımsız değişkeni sıçanlara uyguladığımız radyasyon dozudur. Aynı zamanda sıçanlara ait özellikler (7-8 haftalık, 250 ± 20 g, erkek, Wistar albino) de bağımsız değişkenlerdir.

- **Bağımlı Değişkenler:** Araştırmamızın bağımlı değişkenleri; radyasyon uygulaması sonrasında oluşan testis ve kemik iliği (Kİ) dokularındaki histolojik hasar, Rac1 ve RhoA ekspresyonları, apoptozis oranı, ROS oluşumunu değerlendirmek için yapılan biyokimyasal analizler (süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA)), testis dokusundaki aktif Rac1, aktif RhoA ve hücre içi ROS düzeyleridir.

3.6 Veri toplama araçları

Araştırmamızda kullandığımız cihazlar Tablo 3, sarf malzemeler de Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Araştırmamızda kullanılan laboratuvar ve donanım

Adı	Marka	Model	Yeri
Radyolojik Görüntüleme Cihazı	Philips	Tele Diagnost	Radyoloji A D
İyon odası (Dedektör)	RTI	R 100	Medikal Fizik A D
Lineer hızlandırıcı	Siemens	Primus	Radyasyon Onkolojisi A D
Mikrotom	Leica	RM 2255	Histoloji ve Embriyoloji A D
Işık mikroskobu	Olympus	DP70	Histoloji ve Embriyoloji A D
Doku homojenizasyon cihazı	Qiagen	Tissue Lyser II	ARLAB
Elisa plak okuyucu	Biotek	Synergy HT,KC4	ARLAB
HPLC cihazı	Shimadzu	VP Series	ARLAB

Tablo 4. Araştırmamızda kullanılan sarf malzemeler

Adı	Firma	Lot Numarası	Ülke
Intracellular ROS Assay Kit	Invitrogen	STA-342 OxiSelect™	San Diego, USA
Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit	Biovision	K335-100	Milpitas, CA USA
BCA Protein Assay Kit II	Biovision	K813-2500	Milpitas, CA USA
Rac1 G-LISA Activation Assay	Cytoskeleton	BK128	Denver, CO
RhoA G-LISA Activation Assay Kit	Cytoskeleton	BK124	Denver, CO
Masson trikrom kit	GBL	5022	İstanbul, Türkiye
Trypsin 125 ml	Thermo	TA-125-TR	Pittsburgh, PA
Histostain plus kit	Life tech	859043	Camarillo, CA USA
Rho A primer antikor	Novus	NB100-91273	Abingdon, UK
Rac 1, primer antikor	Novus	NB100-91266	Abingdon, UK
Caspase-3 Antikor- (active/cleaved)	Novus	NB100-56113	Abingdon, UK
DAB Substrate	Roche	11718096001	Indianapolis, USA
EDTA Buffer	Thermo	AP-9004-500	Fremont, CA USA
Hematoksilen	Biooptica	34-P129/25	Milano, Italy
Eozin	Biooptica	34-P132/100	Milano, Italy

3.6.1 Histolojik İncelemeler

Sakrifiye edilen sıçanların sağ testis ve sol femur dokularını çıkartarak; %10'luk formaldehit içine alındı.

3.6.1.1 Testis dokusu için rutin ışık mikroskopik doku takibi protokolü

Sakrifikasyon sonrası histolojik inceleme için alınan testis dokuları %10'luk tamponlu formaldehit ile tespit edildi. Rutin histolojik takip aşamalarından sonra dokular parafine

gömüldü. Işık mikroskopik inceleme için rotary mikrotom ile (Leica RM-2255, Köln, Germany) 5µm kalınlığında alınan kesitler hematoksilin-eozin (H&E) ve bağ doku boyası olan Masson trikrom (MT) ile boyandı. Histolojik değişiklikler açısından ışık mikroskop ile (Olympus BH2, Tokyo, Japan) değerlendirildi ve digital kamera ile (DP71, Olympus, Japan) görüntüleri alındı.

3.6.1.2 Johnsen Testiküler Hasar Skorlaması

Johnsen Tübül Biopsi Skoru, spermatogenezin kantitatif şekilde değerlendirilmesi için kullanıldı. Bu skor, testis hasarının oluşma aşamalarında tübüldeki hücre dağılımının belli bir sırayla ve progresif şekilde yok olması temeline dayanır. Çalışmamızda, her deneğe ait kesitten ortalama 30 adet tübül çapı ölçüldü ve bulunan değerlerin ortalaması alınarak tübül biyopsi skoru elde edildi. Değerlendirme kriterleri Tablo 5'te gösterildiği gibi belirlendi.

Tablo 5. Johnsen Skorlaması

Skor 1	Tübül kesitlerde germ hücresi veya sertoli hücresi yok
Skor 2	Germ hücresi hiç yok, sertoli hücresi mevcut
Skor 3	Sadece spermatogonia mevcut
Skor 4	Sperm hücresi ve spermatid yok, 5'den az spermatosit var
Skor 5	Sperm hücresi ve spermatid yok, spermatosit var
Skor 6	Sperm hücresi yok, 10'dan az spermatid var(5-10'dan az)
Skor 7	Sperm hücresi yok, spermatid var
Skor 8	Sadece birkaç spermatozoa hücresi var (5-10'dan az)
Skor 9	Çok sayıda spermatozoa var ancak spermatogenezis disorganize
Skor 10	Matur sperm hücresi ile birlikte tam bir spermatogenez

3.6.1.3 Kemik doku ve kemik iliğinin histolojik olarak incelenmesi

Femurdan elde edilen kemik doku örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit ile tespit edildi. Ardından dekalsifiye olana kadar yaklaşık 8 hafta süre ile haftada bir kez EDTA solüsyonu değişimi yapıldı ve dekalsifiye olduktan sonra rutin histolojik takip aşamalarından sonra dokular parafine gömüldü. Işık mikroskopu ile inceleme için 5µm kalınlığında alınan kesitler hematoksilen-eozin ile boyandı ve histolojik değişiklikler açısından değerlendirildi.

3.6.1.4 İmmünohistokimyasal İncelemeler

Testis ve kemik iliğinin parafin bloklarından lizinli lamlara alınan kesitler, deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkandı. Antigen retrieval işlemi için 15 dakika 0,1M sitrat tamponu (pH 6,0) (Cat No.AP-9003-125 Labvision) içerisinde aktive kaspaz-3 için mikrodalga fırında ısıtılarak; Rac1 ve Rho-A için de tripsin ile muamele edildi. Oda ısısına geldikten sonra PBS ile yıkanarak Rac1 (NB100-91266), Rho-A (NB100-91273, Novus), Aktive Kaspaz-3(NB100-56112) primer antikoları kullanılarak 1 gece boyunca +4 °C'de inkube edildi. Ertesi gün PBS ile yıkanan kesitler sekonder antikor (Invitrogen, Histostain-Plus Kit Broad Spectrum, 85–9043) ile muamele edildi ve 3'-diaminobenzidine (DAB, 1718096, Roche) kromojeni ile boyanıp görünür hale getirildi. Mayer's hematoksilen ile boyaması yapıldı. Alkol ve ksilol banyolarından geçirildikten sonra entellan ile kapatılarak, ışık mikroskopunda (Olympus BH2) incelendi ve gruplar karşılaştırıldı.

3.6.1.5 İmmunohistokimyasal Skoring (H-skoru)

İmmunohistokimyasal boyama yoğunluğu H-skoru ile değerlendirildi. İmmün boyanma yoğunluğu, 0 (boyanma yok), 1 (zayıf boyanma), 2 (orta yoğunlukta boyanma) ve 3 (şiddeti boyanma) şeklinde değerlendirildi. H-skoru aşağıdaki formülü ile hesaplandı.

$$H\text{-skoru} = \sum P_i (i + 1)$$

P_i: %0 dan %100 e kadarki her boyama yoğunluğunun yüzdesi, i: 0, 1, 2, 3 şeklindeki boyama yoğunluğu olarak tanımlandı. Her preparatta beş farklı alan, mikroskopik olarak değerlendirildi ve ortalamaları alındı (38).

3.6.2 *Biyokimyasal Analizler*

Sıçanlardan alınan kan örnekleri, 1500 rpm'de 20 dk. santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Elde edilen serumlar -20°C'de saklanarak tüm örnekler aynı anda analiz edildi. ROS oluşumunu değerlendirmek amacıyla serumda SOD ve MDA analizleri yapıldı. Testis dokusunda; MDA, hücre içi ROS, aktif Rac1 ve RhoA miktarlarına yönelik analizler yapıldı.

3.6.2.1 *Doku Homojenatlarının Hazırlanması*

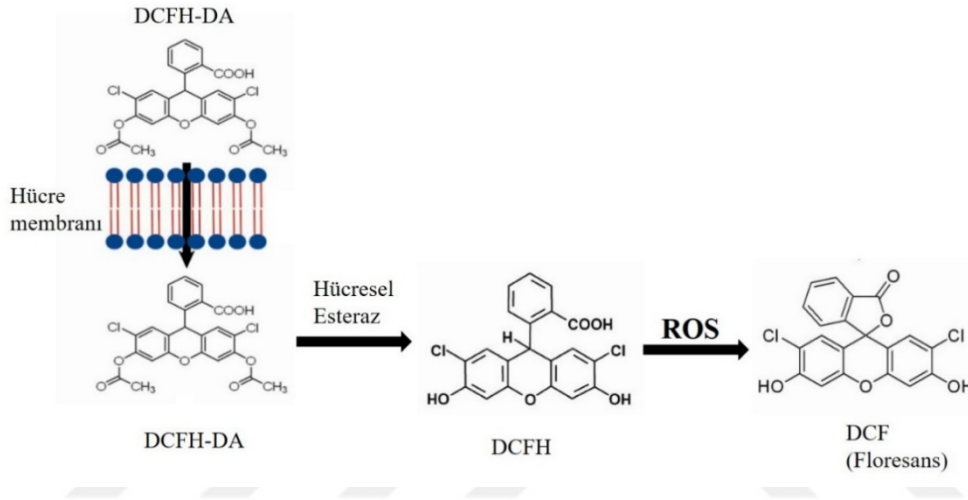
Dokular, analiz koşullarına göre uygun homojenizasyon tamponu ile 1:8 oranında (w/v) Tissue Lyser cihazı kullanılarak homojenize edildi. MDA ve hücre içi ROS analizleri için; 250 mM sukroz, 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA ve proteaz kokteyl inhibitörü içeren tampon kullanıldı. Rac1 ve RhoA aktivasyon deneyleri için 4°C'de fosfat tamponu (10 mM PBS, pH 7.4, 140 mM NaCl, 3 mM KCl) kullanıldı. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantlar ependorflara alınarak -80°C'de saklandı.

3.6.2.2 *Rac1 ve RhoA aktivasyon deneyleri*

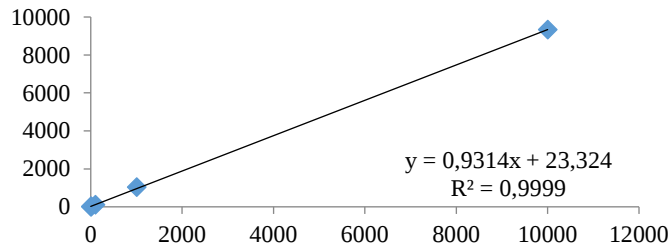
Dokulardan hazırladığımız homejenatlarda, Rac1 (Rac1 G-LISA Activation Assay, Cytoskeleton, BK128) ve RhoA (RhoA G-LISA Activation Assay, Cytoskeleton, BK124) aktivasyonları kolorimetrik temelli G-LISA yöntemi ile çalışıldı. Yöntemin prensibi, GTP bağlı (aktif) Rac1 ve RhoA bağlayıcı proteinler ile yakalandıktan sonra aktif olmayan G-proteinlerin ortamdan uzaklaştırılması temeline dayanır. Öncelikle dokulardan aldığımız örneklerin içinde 0,4-2 mg/ml protein konsantrasyonu ayarlayabilmek için lizis solüsyonu ekleyerek 600 nm'de absorbensları okundu. Çıkan sonuçlara göre kullanacağımız miktarlarını belirlediğimiz örnekler 96 kuyucuklu plakaya +4°C'de pipetlendi. Üzerlerine Rac1 ve RhoA için bağlayıcı proteinler eklenerek +4°C'de, 300 rpm'de, 30 dk mikropate karıştırıcıda inkübe edildi. İki kez yıkama solüsyonu ile yıkadıktan sonra antijen solüsyonu ekledikten 2 dk sonra 3 kez daha yıkama solüsyonu ile yıkandı. Üzerine anti-RhoA veya anti-Rac1 primer antikoru ekleyerek; oda sıcaklığında, 300 rpm'de 45 dk mikropate karıştırıcıda inkübe edildi. Üç kez yıkama işleminden sonra sekonder antikor ile aynı inkübasyon ve yıkama işlemi gerçekleştirildi. Üzerine HRP solüsyonu ekleyerek örnekleri ışıktan koruyarak 37°C'de, Rac1 için 20dk, RhoA için 15 dk inkübe ettikten sonra üzerlerine durdurma solüsyonu eklendi ve absorbenslar 490 nm'de okundu. Örnekler içindeki aktif Rac1 ve RhoA oranları belirlendi.

3.6.2.3 Hücre içi ROS Düzeyinin Belirlenmesi

Hücre içindeki hidroksil, peroksil veya diğer reaktif oksijen türlerinin aktivitesini ölçmek amacıyla Intracellular ROS Assay Kit (STA-342, OxiSelect™) kullanıldı. Hücre zarından geçebilen 2',7'-Diklorodihidrofloresin diasetat (DCFH-DA) kullanılır. Yöntemin prensibi; DCFH-DA hücrelere girerek ve hücresel esteraazlar ile floresan olmayan 2',7'-Diklorodihidroflüoresin'e (DCFH) deasetile edilmesidir. DCFH, hücre içi ROS ile hızlıca okside olarak yüksek oranda floresan özellik gösteren 2',7'-Diklorodihidrofloresine (DCF) dönüşür (Şekil 7).



Şekil 7. Hücre içi ROS yönteminin prensibi



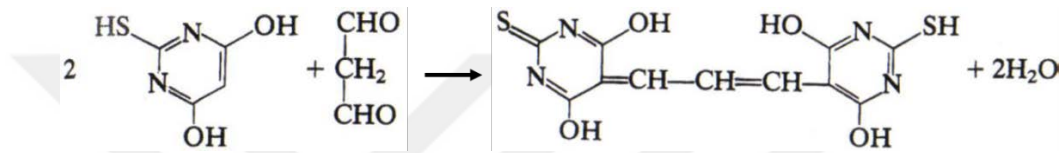
Şekil 8. Hücre içi ROS standart eğrisi

ROS'u belirlemek için doksan altı kuyucuklu plaka üzerine önceden konsantrasyonlarını bildiğimiz ve seri dilüsyon ile hazırladığımız standartlar ve testis dokusundan hazırladığımız homojenat örnekleri pipetlendi. Üzerine DCFH-DA çözeltisi ekleyerek, 37°C'de 60 dakika inkübe edilen örnekleri üzerine hidrojen peroksit (H_2O_2) eklendi. Sonrasında 480 nm eksitasyon

/530 nm emisyon dalga boyunda floresan plak okuyucuda absorbanlar okunarak standart eğri hazırlandı (Şekil 8). Sonuçlar nM/mg olarak ifade edildi.

3.6.2.4 Malondialdehit (MDA) düzeyinin belirlenmesi

Serum ve testis dokusunda MDA düzeyi tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanıldı. Yöntemin prensibi, lipid hidroperoksitleri asit katalizi ile MDA'ya parçalanarak, iki molekül tiyobarbitürik asit (TBA) ve bir molekül MDA'nın oluşturduğu kompleksin floresans dedektör ile tespit edilmesidir (Şekil 9).

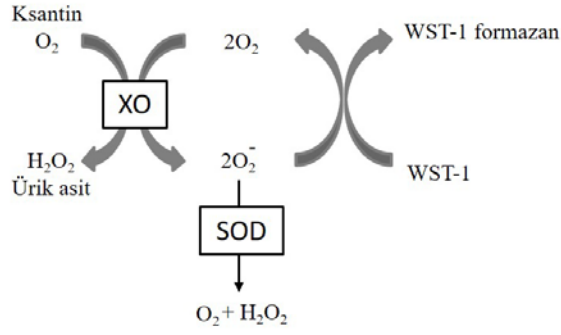


Şekil 9. MDA analizinin prensibi

Örnekler ve standartlar deney tüpüne alınarak sırasıyla; saf su, BHT, SDS, TBA eklenerek 95°C'de 1 saat inkübe edildi. Reaksiyon buz üzerinde durdurulduktan sonra üzerine saf su ve butanol:piridin (15:1) eklenerek 1dakika vortekslendi. Organik faz ayrıldıktan sonra üst fazlar ependorfa alınarak 10000 rpm 10 dk santrifüj edildi. 150-4.6 mm, C18 100-5 (Macherey-Nagel) özelliklere sahip kolonda mobil faz olarak 10 mM, %30 metanol içeren fosfat tampon (pH 7) kullanılarak, ultraviyole detektörün dalga boyu 532 nm'ye, floresan detektörün eksitasyon dalga boyu 515 nm'ye, emisyon dalga boyu ise 553 nm'ye ayarlandı. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanılarak, doku MDA değerleri mmol/mg, serumda ise µmol/L olarak ifade edildi.

3.6.2.5 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivite düzeyinin belirlenmesi

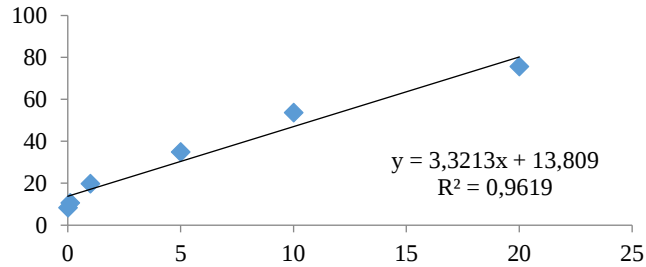
Araştırmamızda kolorimetrik temelli Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivite kiti (Biovision, K335-100) kullanıldı. Kitin çalışma prensibi süperoksit anyonunun SOD ile inhibisyonuna dayanır. WST-1, süperoksit anyonuyla indirgendiğinde suda çözünür bir formazan boyası bırakan bir moleküldür. Süperoksit anyonunu indirgenmesi, ksantin oksidaz (XO) aktivitesi ile doğrusal olarak ilişkilidir ve SOD ile inhibe edilir (Şekil 10).



Şekil 10. SOD aktivasyonu yönteminin prensibi

Doksan altı kuyucuklu plaka üzerine önceden konsantrasyonlarını bildiğimiz ve seri dilüsyon ile hazırladığımız standartlar ve serum örnekleri pipetlendi. Üzerine WST solüsyonu eklendi, sonrasında enzim çalışma solüsyonu eklenerek 37°C’de 20 dakika inkübe edildi. Ölçümler 450 nm’de mikropate okuyucu (BioTek, Synergy HT, KC4) ile spektrofotometrik olarak yapıldı. Aşağıdaki formül kullanılarak standart eğri hazırlandı (Şekil 11) ve sonuçlar hesaplandı. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

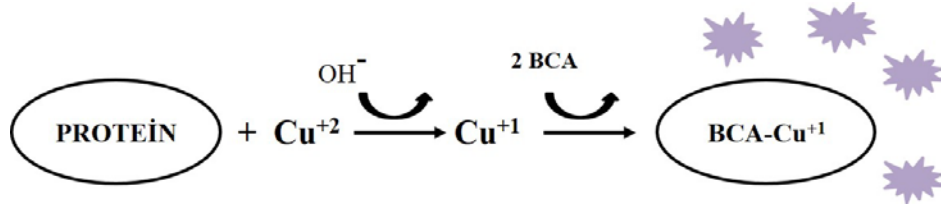
$$SOD \text{ aktivitesi (\% inhibisyon oranı)} = \frac{(A_{k\ddot{o}r1} - A_{k\ddot{o}r3}) - (A_{\ddot{o}rnek} - A_{k\ddot{o}r2})}{(A_{k\ddot{o}r1} - A_{k\ddot{o}r3})} \times 100 = U/mg$$



Şekil 11. SOD aktivitesi standart eğrisi

3.6.2.6 Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

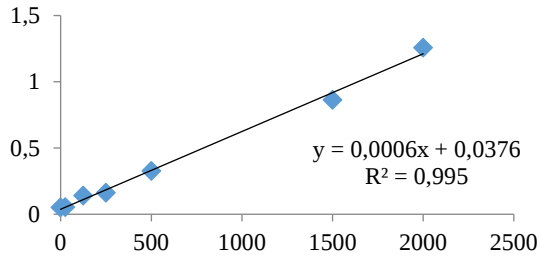
Testis dokusundaki protein analizi, biçinkonik asit (BCA) içeren bir kit (BCA Protein Assay Kit II, Biovision, K813-2500) ile yapıldı. BCA yönteminin çalışma prensibi; alkalik bir ortamda protein ile bakır iyonunun (Cu^{+2}) indirgenmesi ile mor renkli Cu^{+1} -BCA bileşiği oluşturmasıdır (Şekil 12).



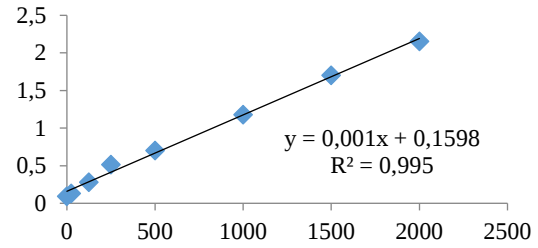
Şekil 12. BCA yönteminin prensibi

Doksan altı kuyucuklu plaka üzerine önceden konsantrasyonlarını bildiğimiz ve seri dilüsyon ile hazırladığımız standartlar ve testis dokusundan hazırladığımız homojenat örnekleri pipetlendi. Üzerine BCA eklenerek 30 saniye karıştırıldıktan sonra 37°C 30 dakika ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Absorbanslar 562 nm'de mikropate okuyucu (BioTek, Synergy HT, KC4) spektrofotometre ile ölçüldü. Aşağıdaki formül kullanılarak standart eğri hazırlandı (Şekil 13) ve protein miktarları hesaplandı.

$$\text{Protein konsantrasyonu: } C = DX = \text{Dilüsyon faktörü} \times \frac{(Y - b)}{a} = \mu\text{g/ml}$$



(1)

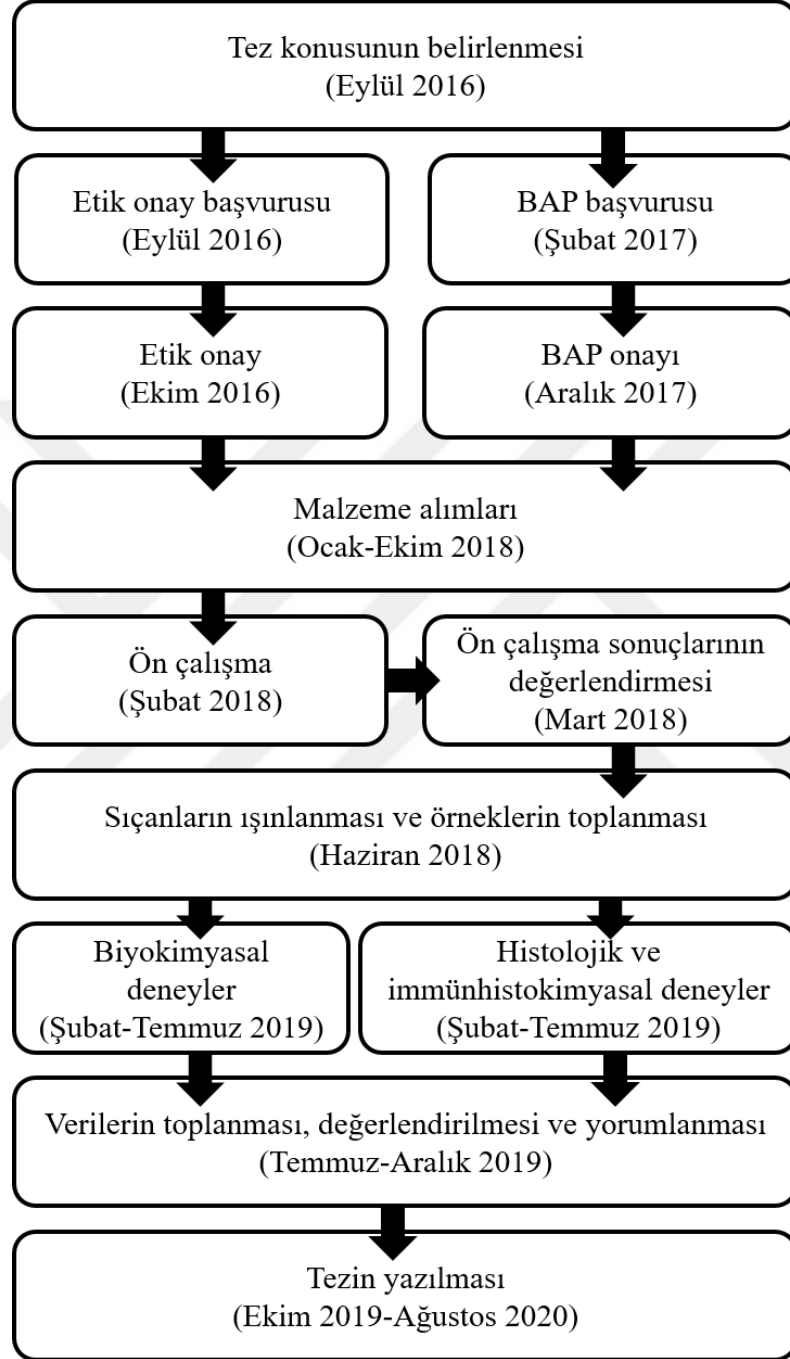


(2)

Şekil 13. MDA analizi (1) ve hücre içi ROS (2) için BCA standart eğrileri

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırmamızın hazırlık aşamasından tamamlanana kadar yapılan çalışmalar, tarihleri ile birlikte Şekil 14’te gösterilmiştir.



Şekil 14. Araştırma planı

3.8 Verilerin değerlendirilmesi

Farklı gruplar arasındaki parametrik değerlerin karşılaştırılması için varyans analizi (ANOVA) ve gruplar arasındaki farkın anlamlılık testi için Bonferroni testi uygulandı. Gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Çalışma verilerini istatistiksel analizi, SPSS 15 (Statistical Package for the Social Sciences 15) programı ile gerçekleştirildi. Çalışmadaki tüm değerler, ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. İstatistiksel olarak anlamlılık $p < 0.05$ olarak gözetildi.

3.9 Araştırmanın sınırlılıkları

- Araştırma kapsamında radyasyona hassas olduğu bilinen, testis ve kemik iliği dokuları ile çalışıldı. Başlangıçta araştırma kapsamına aldığımız, radyasyona hassasiyet dereceleri farklı olan başka dokular, maliyet planlaması aşamasında çıkarıldı. Ancak sonra çalışmak üzere çıkardığımız karaciğer ve dalak dokuları saklandı.
- Araştırmada kullandığımız deney hayvanı sayısını ve maliyeti arttırmamak için, Rac1 ve RhoA moleküllerin inhibisyonu sonrasındaki durum değerlendirilemedi.

3.10 Etik Kurul Onayı

"Sıçan Modelinde Küçük GTPaz'ların İyonlaştırıcı Radyasyon Hasarlarındaki Rolü" isimli araştırmamız için 04.10.2016 tarihinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 45/2016 protokol numarası ile onay alındı (Ek 1).

4 **Bulgular**

4.1 **Sıçanların Ağırlıkları**

Araştırmamızda kullandığımız sıçanların deneye başlangıç, bitiş ağırlıklarının ortalamaları ve sayıları Tablo 6'da gösterilmiştir. Yedinci gün değerlendirmeye aldığımız gruplarda kilo kayıpları saptandı, ancak bu değer ağırlıklarının %15' inden fazla olmadığı için deney devam edildi.

Tablo 6. Deney gruplarındaki sıçanların ağırlıkları ve sayıları

Gruplar	Başlangıç Ağırlığı*(g)	Bitiş Ağırlığı*(g)	N
Kontrol	253,50 ± 5,4	-	6
Düşük doz (2 saat)	263,66 ± 8,2	263,66 ± 8,2	6
Düşük doz (24 saat)	286,83 ± 17,4	288,72 ± 14,2	6
Düşük doz (7gün)	308,50 ± 4,7	284,83 ± 5,8	6
Orta doz (2 saat)	330,50 ± 7,7	330,50 ± 7,5	6
Orta doz (24 saat)	303,20 ± 16,2	304,00 ± 15,9	6
Orta doz (7gün)	340,83 ± 3,1	321,50 ± 4,8	6
Yüksek doz (2 saat)	331,34 ± 6,5	331,34 ± 6,5	6
Yüksek doz (24 saat)	290,50 ± 2,8	289,50 ± 21,5	6
Yüksek doz (7gün)	341,33 ± 11,6	322,83 ± 6,0	6

* Ortalama değer ± standart hata

4.2 **Histolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme Sonuçları**

4.2.1 **Testis Dokusu**

4.2.1.1 **Testis doku hasarı**

Araştırmamızda kullandığımız sıçanların testis dokusu hasarına ait Johnsen skoru ve tübül çapı ölçümleri Tablo 7'de, testis dokusuna ait H&E ve MT boyama mikroskopik görüntüler Şekil 15 ve Şekil 16'da, istatistiksel analiz sonuçlarına ait grafikler de Şekil 17 ve Şekil 18'de gösterilmiştir. H&E ile boyanan preparatlar (incelendiğinde kontrol grubunda; testis dokusunun seminifer tübül bazal membranının sağlam yapıda olduğu, seminifer tübül epitelinde tüm spermatogenik seri hücrelerinin bulunduğu ve interstisyel alanın normal yapıda olduğu gözlemlendi. İnterstisyel alanda eozinofilik sitoplazmalı ve eksantrik nükleusları ile leyding hücreleri belirlendi ve damar yapılarının normal olduğu gözlemlendi. Dokular ışık mikroskopunda

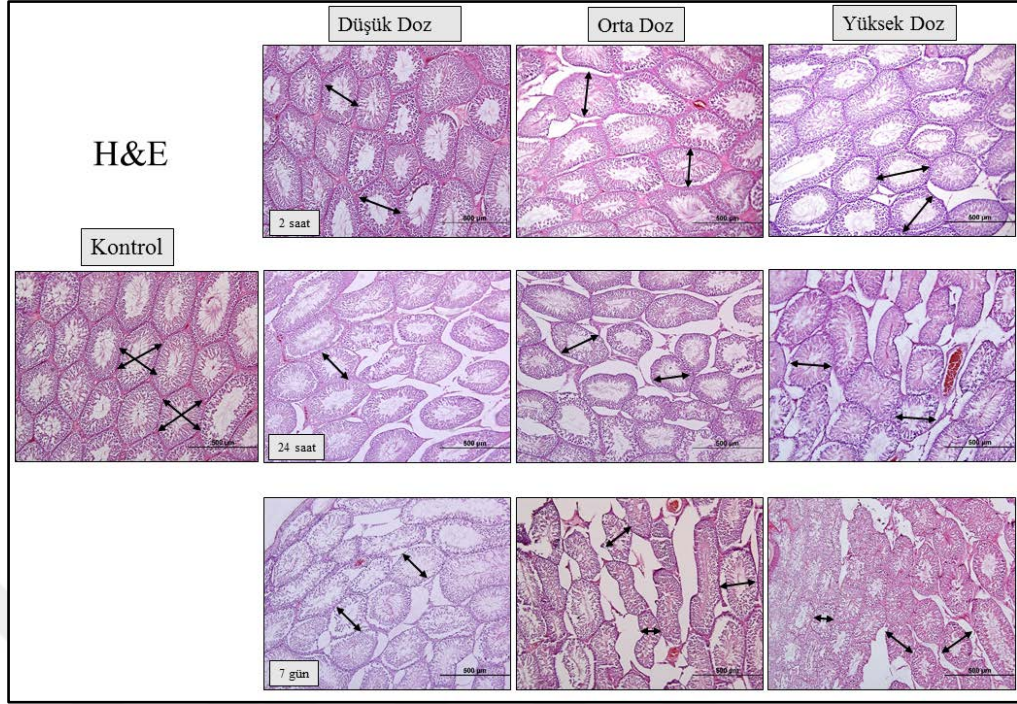
incelendiğinde; seminer tübül epitelinde düzensizleşme, epitel hücrelerinde dökülme, atrofik tübül sayısında artış gözlemlendi (Şekil 15). Testis dokusu interstisyel alanını değerlendirmek için yapılan MT boyamada gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir (Şekil 16). Radyasyon uygulanan gruplarda testis dokusundaki hasarın, zamana ve doza bağlı arttığı gözlemlendi (Şekil 17). Düşük, orta ve yüksek doz gruplarında 24. saat ve 7. gündeki Johnsen skoru; kontrol, 2. saat gruplarına göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.005$). Ayrıca yüksek doz gruplarında; 2. saat grubundaki Johnsen skoru kontrole göre, 7. gün grubundaki skor 2. ve 24. saat gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$) (Şekil 17A). İkinci saat gruplarında; yüksek doz grubu, kontrol ve düşük doz gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$). Johnsen skoru, 24. saat ve 7. gün gruplarında; düşük, orta ve yüksek doz grupları kontrol grubuna göre azalmıştır. ($p<0.005$) (Şekil 17B).

Her üç doz (düşük, orta ve yüksek) grubundaki 7.gün seminifer tübül çapı; kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$). Bunun yanı sıra orta doz grubundaki 7. gün seminifer tübül çapı 24. saat ($p<0.005$); düşük doz gruplarındaki seminifer tübül çapı da 2. ve 24. saat ölçümlerine göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.005$) (Şekil 18A). Seminifer tübül çapının, 2. ve 24. saat gruplarındaki her üç doza ait (düşük, orta ve yüksek doz) seminifer tübül ölçümleri kontrole göre azalma göstermiştir, ancak anlamlılık bulunmamıştır. Yedinci gündeki düşük, orta ve yüksek doz gruplarındaki seminifer tübül çapı; kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$) (Şekil 18B). Deney sonuçlarımız testis hasarının yüksek dozlarda ve zamana bağlı arttığını göstermektedir.

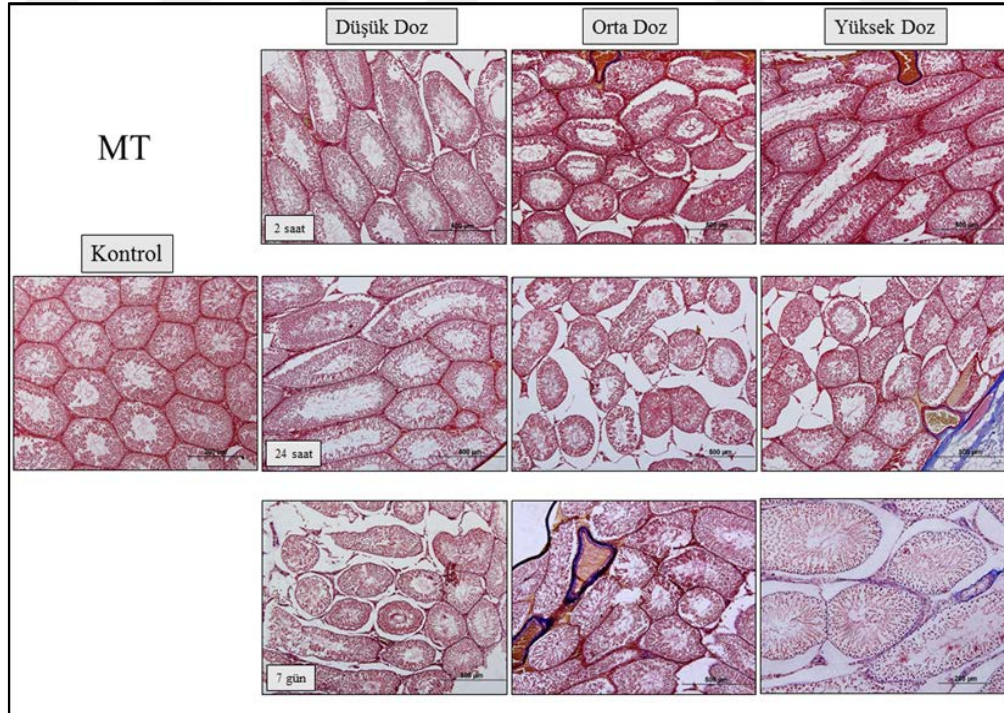
Tablo 7. Deney gruplarındaki sıçanların testis dokusuna ait Johnsen Skoru ve Tübül Çapı ölçümü sonuçları

Gruplar	Johnson Skoru	Tübül Çapı (μm)	N
Kontrol	9,33 $\pm$ 0,2	256,20 $\pm$ 9,1	6
Düşük doz (2 saat)	9,17 $\pm$ 0,17	251,33 $\pm$ 6,1	6
Düşük doz (24 saat)	8,17 $\pm$ 0,17	250,20 $\pm$ 7,9	6
Düşük doz (7gün)	7,50 $\pm$ 0,22	218,54 $\pm$ 5,1	6
Orta doz (2 saat)	8,67 $\pm$ 0,21	242,63 $\pm$ 5,1	6
Orta doz (24 saat)	8,00 $\pm$ 0,26	248,04 $\pm$ 4,3	6
Orta doz (7gün)	6,67 $\pm$ 0,33	219,84 $\pm$ 7,0	6
Yüksek doz (2 saat)	8,33 $\pm$ 0,21	248,48 $\pm$ 6,5	6
Yüksek doz (24 saat)	7,67 $\pm$ 0,21	232,42 $\pm$ 6,8	6
Yüksek doz (7gün)	6,83 $\pm$ 0,31	226,54 $\pm$ 8,1	6

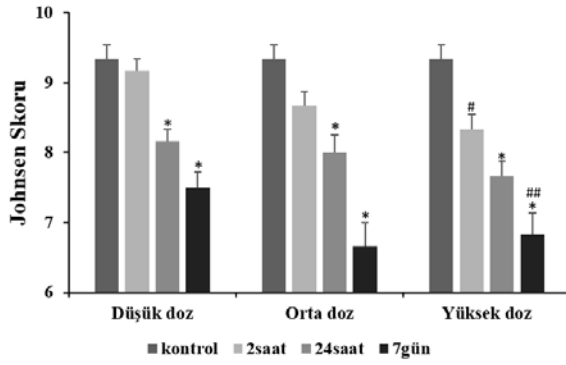
* Ortalama değer $\pm$ standart hata



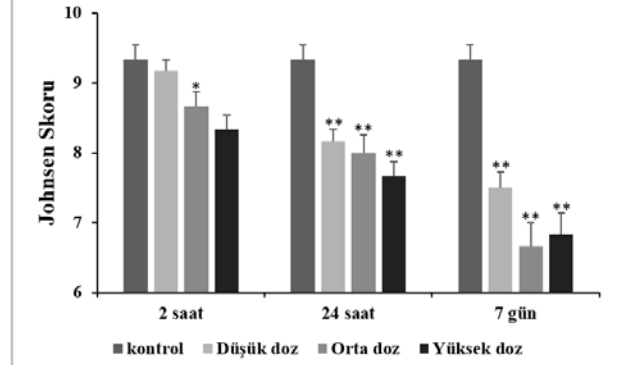
Şekil 15. Deney gruplarının testis dokusuna ait kesitlerinin mikroskopik görüntüleri (Hematoksilen&Eozin; x20 görüntüler). Çift yönlü oklar seminifer tübül çaplarını göstermektedir.



Şekil 16. Deney gruplarının testis dokusuna ait kesitlerinin mikroskopik görüntüleri (Masson trikrom; x20 görüntüler) Gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

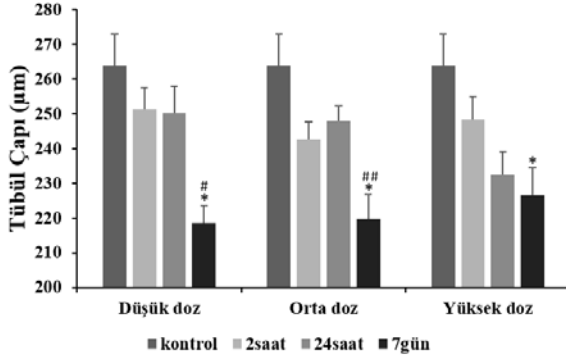


A

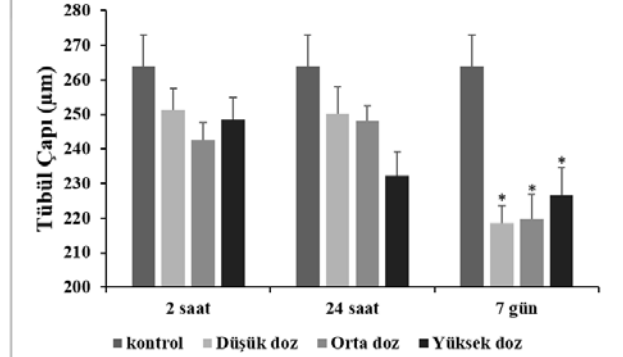


B

Şekil 17. Deney gruplarının testis dokusuna ait Johnsen skoru sonuçlarının doz (A) ve zaman (B) grafikleri sonuçları. A: *: 24.saat ve 7.gün gruplarındaki Johnsen skoru, kontrol, 2.saat gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$), #: Yüksek dozda 2.saat grubundaki Johnsen skoru, kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$), ##: Yüksek dozda 7.gün grubundaki Johnsen skoru; 2. ve 24.saat gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$). B: *: 2. saatte yüksek doz grubu; kontrol ve düşük doz gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$), **: 24. saat ve 7. günde düşük, orta ve yüksek doz grupları; kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$).



A



B

Şekil 18. Deney gruplarının testis dokusuna ait Tübül çapı ölçümlerinin doz (A) ve zaman (B) grafikleri sonuçları. A: *: 7.gün gruplarındaki tübül çapı, kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$), #: Düşük doz 7.gün grubundaki tübül çapı, 2 ve 24. saat gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$), ##: Orta dozda 7.gün grubundaki tübül çapı, 24. saat grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$). B: *: 7. günde düşük, orta ve yüksek doz grupları; kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$).

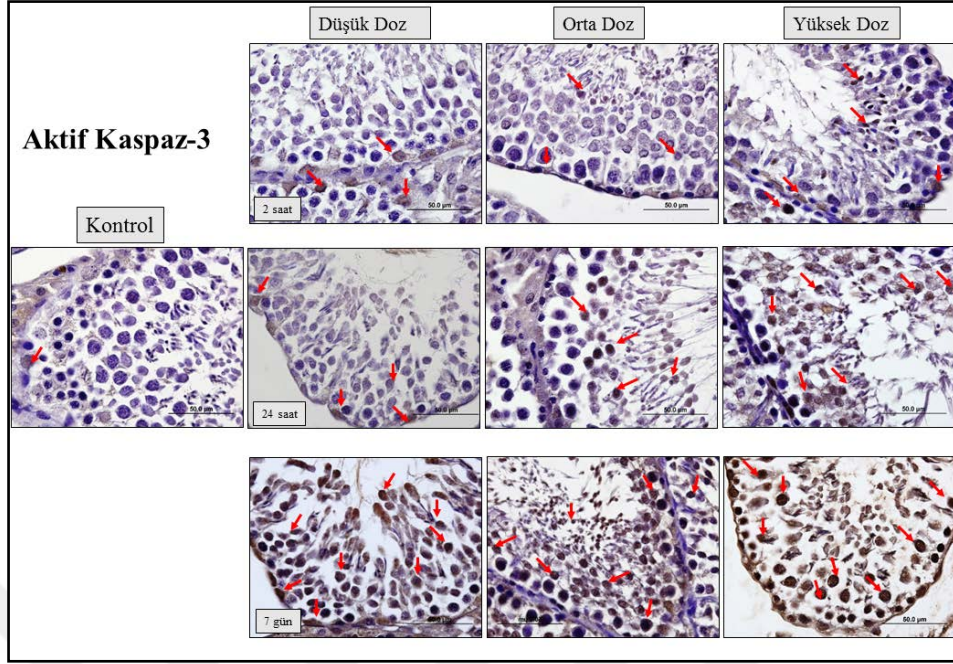
4.2.1.2 Apoptozis

Araştırmamızda kullandığımız sıçanların testis dokusundaki aktif kaspaz-3 H-skoru sonuçlarına ait değerler Tablo 8’de, İHK mikroskopik görüntüleri Şekil 19’da, istatistiksel analiz sonuçları da Şekil 20’de gösterilmiştir. Deney gruplarındaki apoptozisin; doza ve zamana bağlı olarak arttığını saptadık. Her üç dozdaki (düşük, orta ve yüksek) 24.saat gruplarındaki aktif kaspaz-3 ekspresyonu, kontrol ve 2. saat gruplarına göre; 7. gün gruplarındaki aktif kaspaz-3 kontrol, 2. ve 24. saat gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$). Ayrıca orta ve yüksek dozlarda 2. saat gruplarındaki aktif kaspaz-3 de kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.005$) (Şekil 20A). Her üç zamana (2. ve 24. saat, 7. gün) ait değerlendirmede; orta ve yüksek doz gruplarındaki aktif kaspaz-3, kontrol ve düşük doz gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$). Yirmi dördüncü saat ve 7. günde düşük doz gruplarındaki aktif kaspaz-3 kontrol grubuna göre; 2. saat yüksek doz gruplarındaki aktif kaspaz-3 de orta doz grubuna göre artmıştır ($p<0.005$). Yedinci gün orta doz gruplarındaki aktif kaspaz-3; yüksek doz grubuna göre artmıştır. ($p<0.005$) (Şekil 20B).

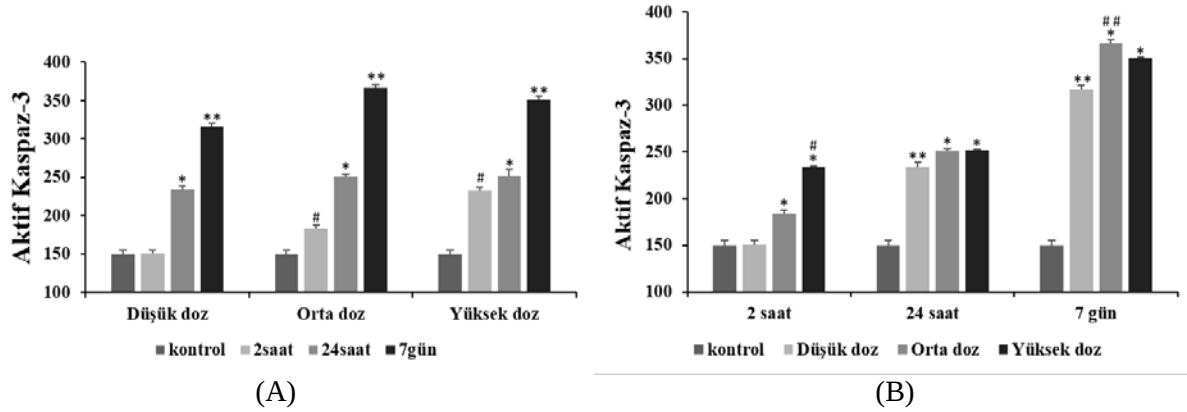
Tablo 8. Deney gruplarındaki sıçanların testis dokusuna ait aktif kaspaz-3 İHK analiz sonuçları

Gruplar	Aktif Kaspaz-3	N
Kontrol	149,83 ± 4,8	6
Düşük doz (2 saat)	150,50 ± 4,3	6
Düşük doz (24 saat)	233,67 ± 5,6	6
Düşük doz (7gün)	316,50 ± 4,3	6
Orta doz (2 saat)	183,33 ± 4,2	6
Orta doz (24 saat)	250,83 ± 3,1	6
Orta doz (7gün)	366,50 ± 4,3	6
Yüksek doz (2 saat)	233,33 ± 3,3	6
Yüksek doz (24 saat)	251,83 ± 8,7	6
Yüksek doz (7gün)	350,67 ± 4,9	6

* Ortalama değer ± standart hata



Şekil 19. Deney gruplarının testis dokusuna ait kesitlerinin aktif kaspaz-3 İHK mikroskopik görüntüleri (x100) Kırmızı oklar apoptotik hücreleri göstermektedir.



Şekil 20. Deney gruplarına ait testis dokusuna ait aktif kaspaz-3 İHK analiz sonuçlarının doz (A) ve zaman (B) grafikleri. A: *: 24.saat grupları, kontrol ve 2. saat gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$), **: 7.gün grupları, kontrol, 2 ve 24. saat gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$), #: Orta ve yüksek dozda 2.saat grubu, kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.005$). B: *: Orta ve yüksek doz grupları; kontrol ve düşük doz gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$), #: 2. saatte yüksek doz grubu; orta doz grubuna göre artmıştır ($p<0.005$), **: 24. saat ve 7. günde düşük doz grubu; kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.005$), ###: 7. günde orta doz grubu; yüksek doz gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$).

4.2.1.3 Rac1 Ekspresyonu ve Aktivasyonu

Araştırmamızda kullandığımız sıçanların testis dokusundaki Rac1 ekspresyonu ve Rac1 aktivasyonuna ait sonuçlar Tablo 9'da, İHK mikroskopik görüntüleri Şekil 21'de istatistiksel analiz sonuçlarına ait grafikler de Şekil 22 ve Şekil 23'te gösterilmiştir.

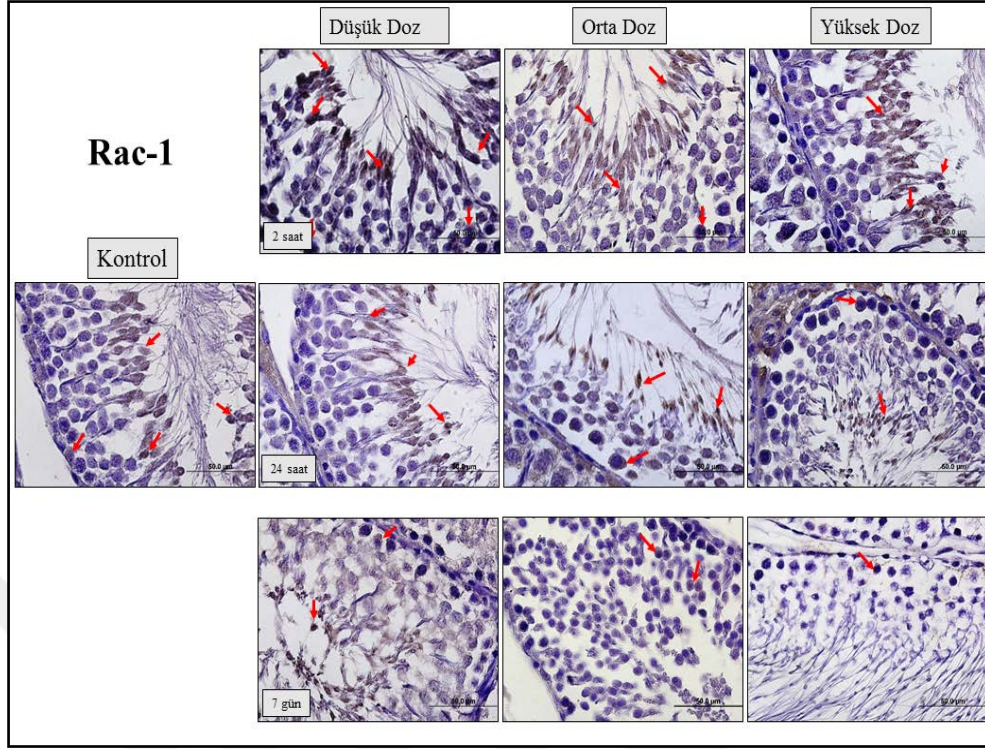
Rac1 ekspresyonu; orta ve yüksek dozda 24. saat grupları hariç doza ve zamana bağımlı olarak azalma eğilimindedir. Her üç dozda (düşük, orta ve yüksek); tüm gruplardaki Rac1 ekspresyonu, kontrol grubuna göre ve 7. gün gruplarındaki Rac1 ekspresyonu da, 2. ve 24. saat gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$) (Şekil 22A). Ayrıca orta ve yüksek dozlarda 2. saat grubundaki Rac1 ekspresyonu 24. saat gruplarına göre, düşük doz 24. saat grubundaki Rac1 ekspresyonu da 2. saat grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$) (Şekil 22A). İkinci saat ve 7. günde; orta doz gruplarındaki Rac1 ekspresyonu düşük doz gruplarına göre, yüksek doz gruplarındaki Rac1 ekspresyonu da düşük ve orta doz gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$) (Şekil 22B). Yirmi dördüncü saatte de, düşük ve yüksek doz gruplarındaki Rac1 ekspresyonu orta doz gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$).

Düşük doz (2. ve 24. saat, 7. gün) gruplarındaki Rac1-GTP, kontrol grubuna göre artmıştır. Orta doz gruplarında 7. gün grubu, yüksek doz gruplarında da 2. saat ve 7. gün gruplarındaki Rac1-GTP kontrole göre artmış ancak anlamlılık gözlenmemiştir. Sadece yüksek doz 7. gün grubundaki Rac1-GTP, 24. saat değerine göre artmıştır ($p<0.005$) (Şekil 23A). Yedinci gün (düşük, orta ve yüksek doz) gruplarındaki Rac1-GTP, doza bağlı bir artış göstermiştir ancak anlamlılık bulunmamaktadır (Şekil 23B).

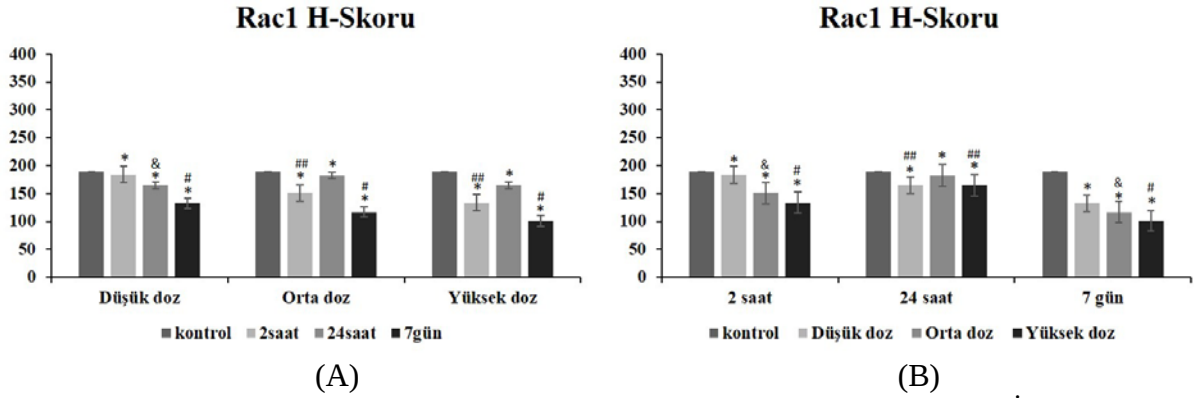
Tablo 9. Deney gruplarındaki sıçanların testis dokusuna ait Rac1 ekspresyonu ve Rac1-GTP analiz sonuçları

Gruplar	Rac1 H-Skor	Rac1-GTP*	N
Kontrol	190,00 ± 5,8	0,570 ± 0,02	6
Düşük doz (2 saat)	183,83 ± 6,0	0,584 ± 0,02	6
Düşük doz (24 saat)	164,83 ± 4,8	0,601 ± 0,02	6
Düşük doz (7gün)	132,50 ± 6,2	0,587 ± 0,01	6
Orta doz (2 saat)	151,00 ± 5,8	0,552 ± 0,03	6
Orta doz (24 saat)	182,33 ± 7,1	0,546 ± 0,02	6
Orta doz (7gün)	116,50 ± 4,3	0,587 ± 0,05	6
Yüksek doz (2 saat)	133,67 ± 4,9	0,598 ± 0,03	6
Yüksek doz (24 saat)	164,83 ± 4,8	0,562 ± 0,03	6
Yüksek doz (7gün)	100,83 ± 4,8	0,682 ± 0,03	6

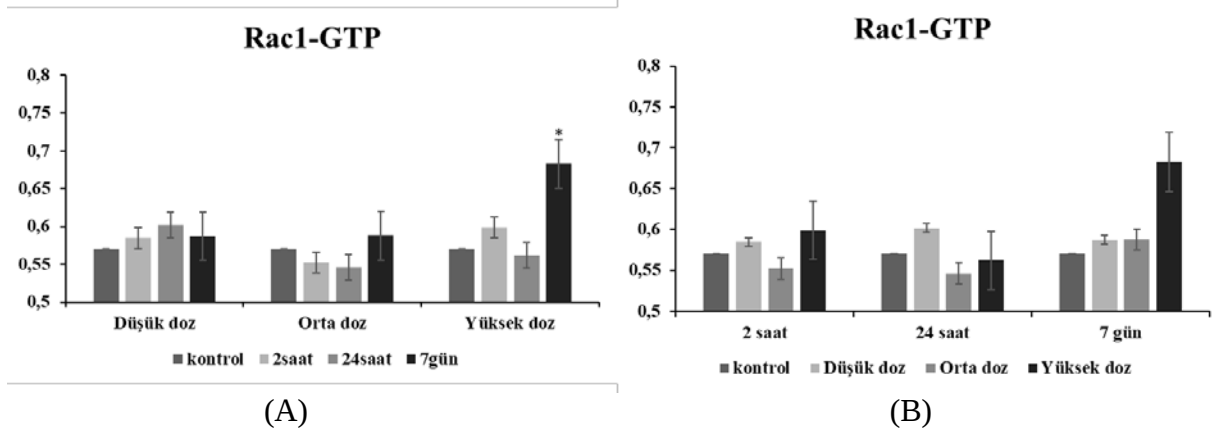
* Ortalama değer ± standart hata



Şekil 21. Deney gruplarının testis dokusuna ait kesitlerinin Rac1 İHK mikroskobik görüntüleri (x100) Kırmızı oklar Rac1(+) hücreleri göstermektedir.



Şekil 22. Deney gruplarına ait testis dokusuna ait Rac1 ekspresyonu İHK analiz sonuçlarının doz (A) ve zaman (B) grafikleri. A: *: Tüm gruplar, kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$), &: Düşük doz 24.saat grubu, 2. saat grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$), #: 7. gün grupları, 2. ve 24. saat gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$), ##: Orta ve yüksek dozlarda 2.saat grubu, 24. saat gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$). B: *: Tüm gruplar, kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$), &: 2. saat ve 7. günde orta doz grupları, düşük doz gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$), #: 2. saat ve 7. günde yüksek doz grupları; düşük ve orta doz gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$), ##: 24. saatte düşük ve yüksek doz grupları, orta doz gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$).



Şekil 23. Deney gruplarına ait testis dokusu Rac1 aktivasyon analizi sonuçlarının doz (A) ve zaman (B) grafikleri. A: *: Yüksek dozda 7.gün grubu, 24.saat grubuna göre artmıştır ($p<0.005$). B: Gruplar arasında anlamlı farklılık yoktur.

4.2.1.4 RhoA Ekspresyonu ve Aktivasyonu

Araştırmamızda kullandığımız sıçanların testis dokusundaki RhoA ekspresyonu ve RhoA aktivasyonuna ait sonuçlar Tablo 10'da, İHK mikroskopik görüntüleri Şekil 24'te, istatistiksel analiz sonuçlarına ait grafikler de Şekil 25 ve Şekil 26'da gösterilmiştir.

Tüm gruplardaki RhoA ekspresyonu, kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.005$). Her üç dozda (düşük, orta ve yüksek); 24. saat gruplarındaki RhoA ekspresyonu 2. saat gruplarına göre, 7. gün gruplarındaki RhoA ekspresyonu da 2 ve 24. saat gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$) (Şekil 25A). İkinci saat ve 7. günde orta ve yüksek doz gruplarındaki RhoA ekspresyonu düşük doz grubuna göre ve 2. saatte yüksek doz gruplarındaki RhoA ekspresyonu orta doz grubuna göre artmıştır ($p<0.005$). Yirmi dördüncü saatte düşük ve yüksek doz gruplarındaki RhoA ekspresyonu da orta doz grubuna göre artmıştır ($p<0.005$) (Şekil 25B).

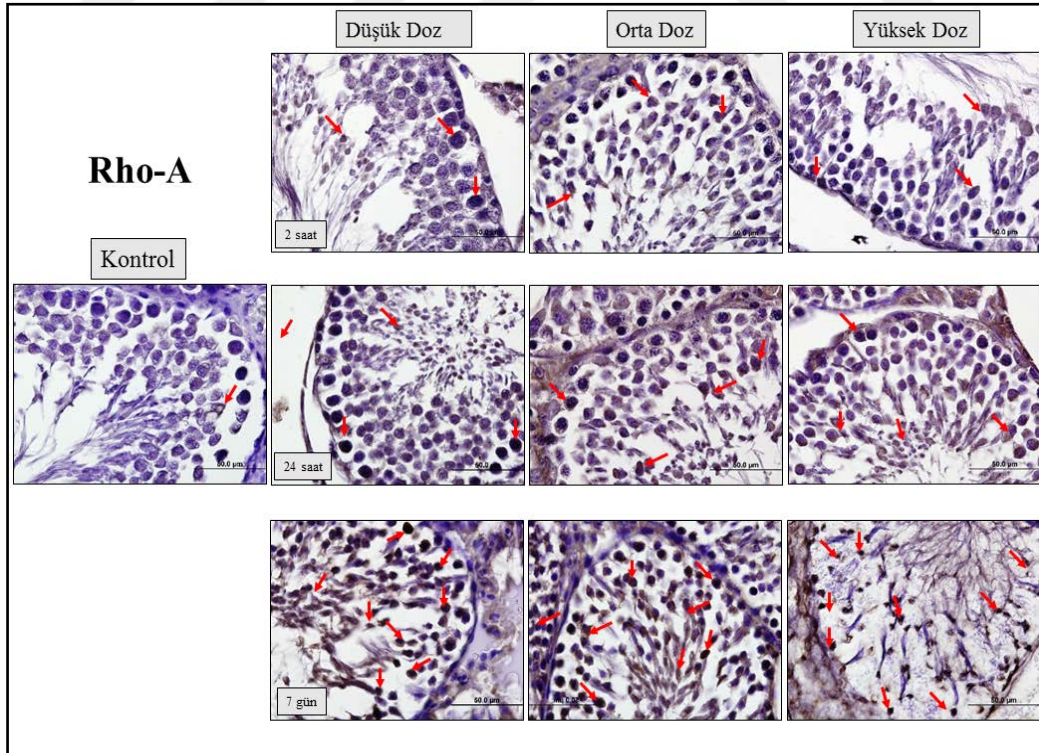
RhoA-GTP, tüm deney gruplarında benzer pattern göstermiş ve kontrol grubuna göre artmıştır. Düşük ve orta dozlarda 7.gün gruplarındaki RhoA-GTP; kontrol, 2 ve 24.saat gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$) (Şekil 26A). Yüksek doz gruplarında, gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. İkinci, 24. saat ve 7. gün gruplarındaki RhoA-GTP benzer şekilde; düşük ve orta dozlarda doza bağlı artmış, yüksek dozlarda azalmıştır. Yedinci gün

düşük ve orta doz gruplarındaki RhoA-GTP; kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0.005$) (Şekil 26B).

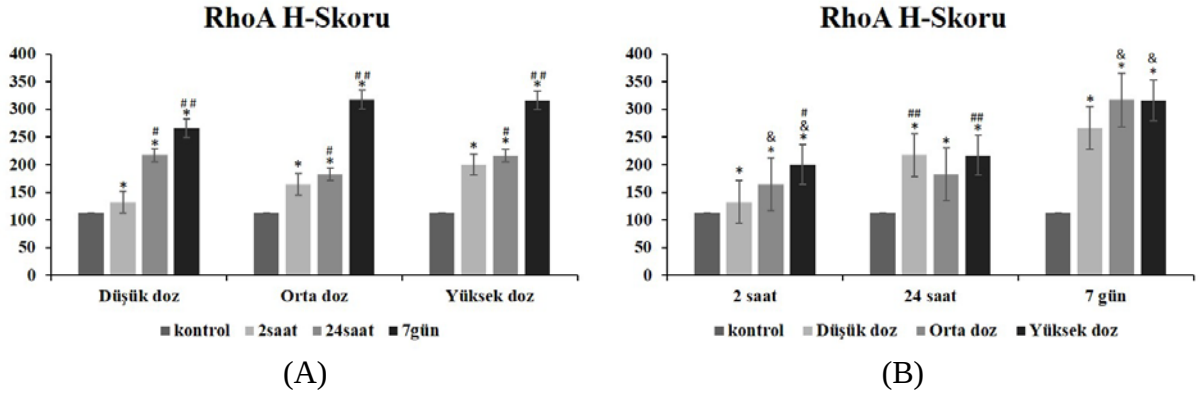
Tablo 10. Deney gruplarındaki sıçanların testis dokusuna ait RhoA ekspresyonu ve RhoA-GTP sonuçları

Gruplar	RhoA H-Skor*	RhoA-GTP*	N
Kontrol	112,33 ± 6,7	0,304 ± 0,05	6
Düşük doz (2 saat)	133,00 ± 3,7	0,337 ± 0,06	6
Düşük doz (24 saat)	217,50 ± 4,3	0,355 ± 0,03	6
Düşük doz (7gün)	266,50 ± 4,3	0,754 ± 0,11	6
Orta doz (2 saat)	164,83 ± 4,8	0,459 ± 0,03	6
Orta doz (24 saat)	183,33 ± 4,2	0,466 ± 0,03	6
Orta doz (7gün)	317,50 ± 4,3	0,868 ± 0,09	6
Yüksek doz (2 saat)	200,50 ± 4,3	0,396 ± 0,03	6
Yüksek doz (24 saat)	217,17 ± 3,1	0,408 ± 0,07	6
Yüksek doz (7gün)	316,33 ± 4,9	0,564 ± 0,09	6

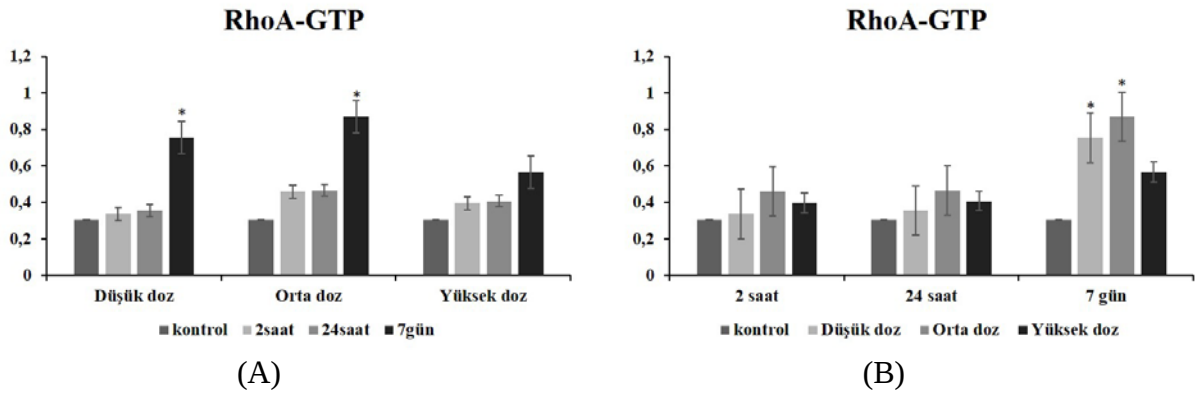
* Ortalama değer ± standart hata



Şekil 24. Deney gruplarının testis dokusuna ait kesitlerinin RhoA İHK mikroskopik görüntüleri (x100) Kırmızı oklar RhoA(+) hücreleri göstermektedir.



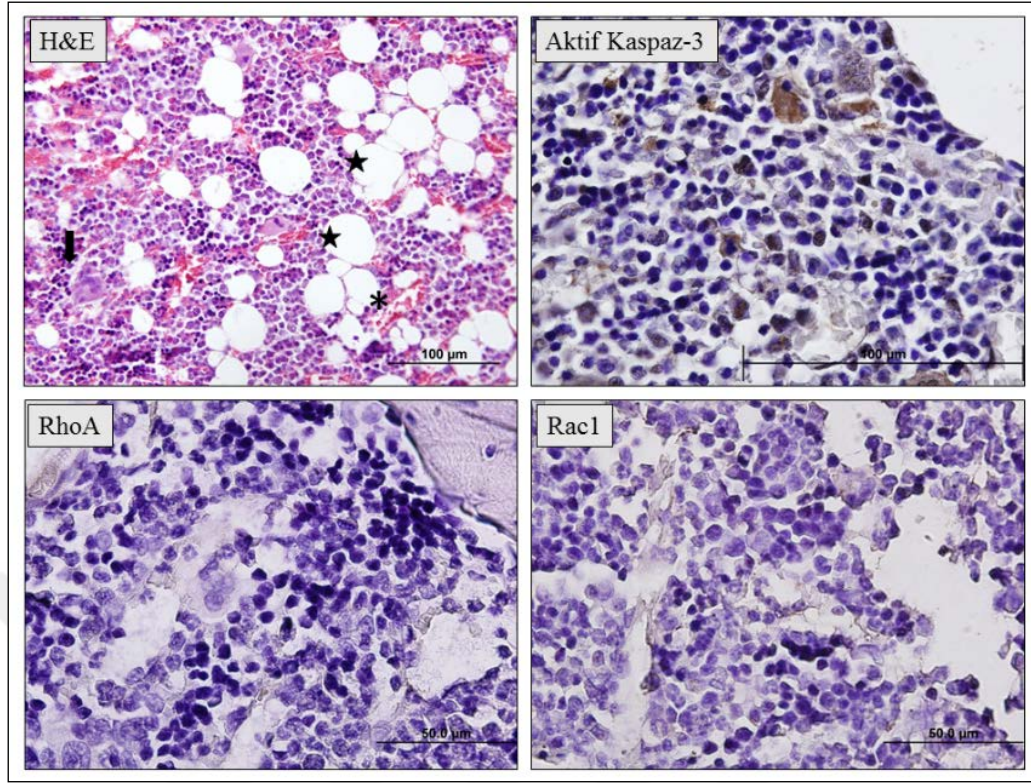
Şekil 25. Deney gruplarına ait testis dokusuna ait RhoA ekspresyonu İHK analiz sonuçlarının doz (A) ve zaman (B) grafikleri. A: *: Tüm gruplar, kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.005$), #: 24. saat grupları, 2. saat gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$), ##: 7. gün grupları, 2 ve 24. saat gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$). B: *: Tüm gruplar, kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.005$), &: 2. ve 24. saatte orta ve yüksek doz grupları, düşük doz grubuna göre artmıştır ($p<0.005$), #: 2. saatte yüksek doz grubu, orta doz grubuna göre artmıştır ($p<0.005$), ##: 24. saatte düşük ve yüksek doz grupları, orta doz grubuna göre artmıştır ($p<0.005$).



Şekil 26. Deney gruplarına ait testis dokusu RhoA aktivasyon analizi sonuçlarının doz (A) ve zaman (B) grafikleri. A: *: Düşük ve orta dozda 7.gün grupları, kontrol, 2 ve 24.saat gruplarına göre artmıştır ($p>0.005$). B: *: 7. günde düşük ve orta doz grupları; kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.005$).

4.2.2 Kemik İliği Dokusu

Kemik iliği dokuları incelendiğinde H&E boyamasında gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmedi. Dokuda kan damarları, kan damarlarının özelleşmiş birimleri olan sinuzoid yapıları, gelişimin farklı aşamalarındaki kan hücreleri ve onları destekleyen adventisyal hücreler ile megakaryosit hücreleri gözlemlendi (Şekil 27). Kemik iliğinin aktif kaspaz-3, RhoA ve Rac1 İHK boyamalarında da gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi (Şekil 27).



Şekil 27. Deney gruplarının kemik iliği dokusuna ait kesitlerinin H&E ve Aktif Kaspaz3, Rac1 ve RhoA İHK mikroskopik görüntüleri (x20) Ok: Megakaryosit hücresi, Yıldız: Yağ hücresi, *:Sinuzoid

4.3 Biyokimyasal Analiz Sonuçları

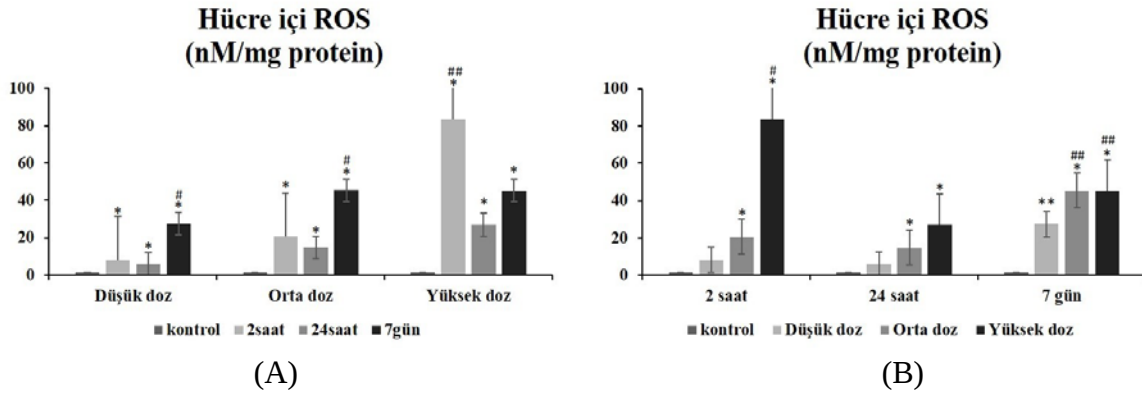
4.3.1 Radyasyonun testis dokusunda Hücre İçi ROS

Araştırmamızda kullandığımız sıçanların hücre içi ROS düzeyleri Tablo 11’de, istatistiksel analiz sonuçlarına ait grafikler de Şekil 28’de gösterilmiştir. Her doz grubundaki hücre içi ROS düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir ($p<0.005$) (Şekil 28A). Düşük ve orta dozlarda 7.gün gruplarındaki hücre içi ROS, 2 ve 24. saat gruplarına göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0.005$). Yüksek dozda 2. saat grubundaki hücre içi ROS, 24. saat ve 7.gün gruplarına göre anlamlıdır ($p<0.005$). İkinci ve 24. saat ile 7. günde orta ve yüksek doz gruplarındaki hücre içi ROS; kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.005$). Ayrıca 2. saatte yüksek doz grubundaki hücre içi ROS, düşük ve orta doz gruplarına göre de artmıştır ($p<0.005$). Yedinci günde; düşük doz grubundaki hücre içi ROS kontrol grubuna göre, orta ve yüksek doz gruplarındaki hücre içi ROS da düşük doz grubuna göre artmıştır ($p<0.005$) (Şekil 28B).

Tablo 11. Deney gruplarındaki sıçanların Hücre içi ROS analiz sonuçları

Gruplar	Hücre içi ROS* (Testis, nM/mg)	N
Kontrol	1,388 ± 0,21	6
Düşük doz (2 saat)	7,999 ± 0,68	6
Düşük doz (24 saat)	5,898 ± 0,84	6
Düşük doz (7gün)	27,343 ± 0,91	6
Orta doz (2 saat)	20,487 ± 1,35	6
Orta doz (24 saat)	14,681 ± 2,09	6
Orta doz (7gün)	45,306 ± 3,23	6
Yüksek doz (2 saat)	83,716 ± 6,29	6
Yüksek doz (24 saat)	26,842 ± 5,45	6
Yüksek doz (7gün)	45,211 ± 3,42	6

* Ortalama değer ± standart hata



Şekil 28. Deney gruplarına ait hücre içi ROS analizi sonuçlarının doz (A) ve zaman (B) grafikleri. A: *: Tüm gruplar kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.005$), #: Düşük ve orta dozda 7.gün grupları, 2 ve 24.saat gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$), ##: Yüksek dozda 2.saat grubu; 24 saat ve 7.gün gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$). B: *: Orta ve yüksek doz grupları; kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.005$), #: 2. saatte yüksek doz grubu, düşük ve orta doz gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$), **: 7. günde düşük doz grubu, kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.005$), ##: 7. günde orta ve yüksek doz grupları; düşük doz grubuna göre artmıştır ($p<0.005$).

4.3.2 Radyasyonun serum ve testis dokusunda MDA düzeyine etkisi

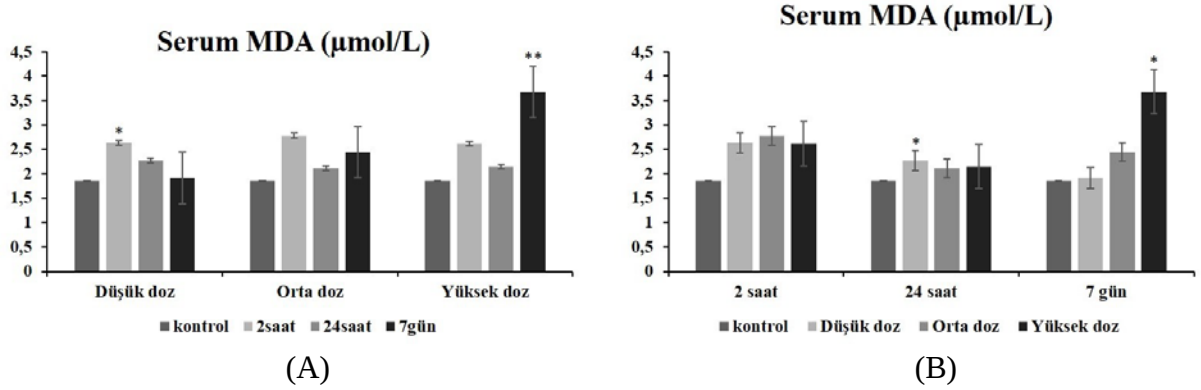
Araştırmamızda kullandığımız sıçanların serum ve testis dokusu MDA düzeyleri Tablo 12’de, istatistiksel analiz sonuçlarına ait grafikler de Şekil 29 ve Şekil 30’da gösterilmiştir. Tüm deney gruplarındaki serum MDA düzeyleri kontrol grubuna göre artmıştır, ancak anlamlılık düşük doz 2. saat ve yüksek doz 7. gün gruplarındadır ($p<0.005$). Ayrıca; düşük dozda 2. saat grubundaki serum MDA 7. gün grubuna göre, yüksek dozda 7. gün grubundaki serum MDA da 24. saat grubuna göre artmıştır ($p<0.005$) (Şekil 29A). Yirmi dördüncü saatte gruplarında düşük doz grubundaki serum MDA, kontrole göre; 7. gün gruplarında ise yüksek doz grubundaki serum MDA kontrol, düşük, orta ve yüksek doz gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$) (Şekil 29B).

Testis dokusundaki MDA, her üç doz grubunda da farklı pattern göstermiştir. Düşük doz gruplarında 24. saat grubundaki MDA, kontrol ve 7.gün gruplarına göre; yüksek doz gruplarında 7. gün grubundaki MDA, kontrol ve 24.saat gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$) (Şekil 30A). İkinci ve 24. saat gruplarındaki (düşük, orta ve yüksek doz) MDA düzeyleri arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Yedinci günde yüksek doz grubundaki MDA; kontrol, düşük, orta ve yüksek doz gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$) (Şekil 30B). Serum ve testis dokusundaki MDA yüksek dozlarda ve 7. günde görülmesi, radyasyonun kronik etkileri arasında lipid peroksidasyonu olduğunu düşündürebilir.

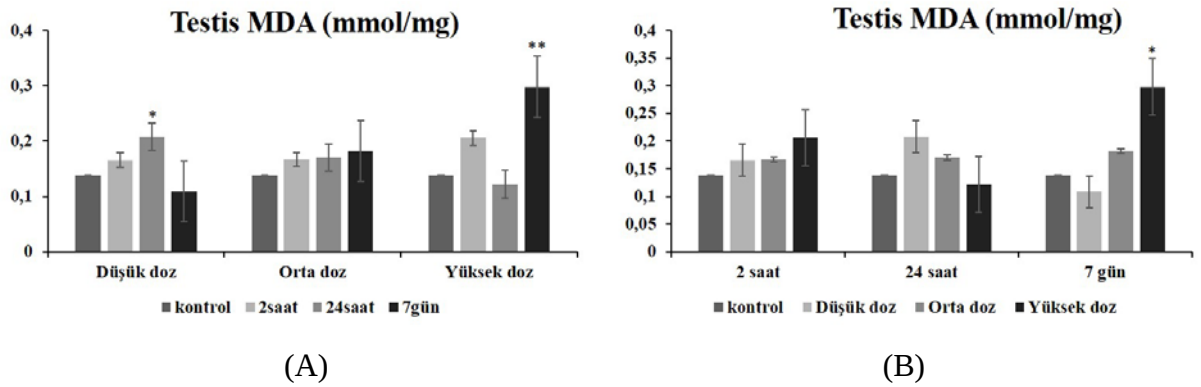
Tablo 12. Deney gruplarındaki sıçanların MDA analizi sonuçları

Gruplar	MDA* (Testis, mmol/mg)	MDA* (Serum, μ mol/L)	N
Kontrol	0,138 $\pm$ 0,01	1,859 $\pm$ 0,13	6
Düşük doz (2 saat)	0,165 $\pm$ 0,02	2,630 $\pm$ 0,14	6
Düşük doz (24 saat)	0,207 $\pm$ 0,02	2,271 $\pm$ 0,08	6
Düşük doz (7gün)	0,108 $\pm$ 0,01	1,914 $\pm$ 0,06	6
Orta doz (2 saat)	0,166 $\pm$ 0,01	2,779 $\pm$ 0,43	6
Orta doz (24 saat)	0,170 $\pm$ 0,03	2,114 $\pm$ 0,04	6
Orta doz (7gün)	0,182 $\pm$ 0,03	2,448 $\pm$ 0,16	6
Yüksek doz (2 saat)	0,205 $\pm$ 0,04	2,617 $\pm$ 0,49	6
Yüksek doz (24 saat)	0,121 $\pm$ 0,02	2,150 $\pm$ 0,11	6
Yüksek doz (7gün)	0,297 $\pm$ 0,03	3,681 $\pm$ 0,48	6

* Ortalama değer $\pm$ standart hata



Şekil 29. Deney gruplarına ait serum MDA analizi sonuçlarının doz (A) ve zaman (B) grafikleri. A: *: Düşük dozda 2.saat grubu, kontrol ve 7.gün gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$), **: Yüksek dozda 7.gün grubu, kontrol ve 24.saat gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$). B: *: 24. saatte düşük doz grubu; kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.005$), **: 7. günde yüksek doz grubu; kontrol, düşük, orta ve yüksek doz gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$).



Şekil 30. Deney gruplarına ait testis dokusu MDA analizi sonuçlarının doz (A) ve zaman (B) grafikleri. A: *: Düşük dozda 24.saat grubu, kontrol ve 7.gün gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$), **: Yüksek dozda 7.gün grubu, kontrol ve 24.saat gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$). B: *: 7. günde yüksek doz grubu; kontrol, düşük, orta ve yüksek doz gruplarına göre artmıştır ($p<0.005$).

4.3.3 Radyasyonun serum ve testis dokusunda SOD düzeyine etkisi

Araştırmamızda kullandığımız sıçanların serum ve testis dokusu SOD düzeyleri Tablo 13'te, istatistiksel analiz sonuçlarına ait grafikler de Şekil 31 ve Şekil 32'de gösterilmiştir. Serum SOD değerleri her doz grubunda benzer özellik göstermiştir. Her üç grupta da (düşük, orta ve yüksek doz) 7. gün gruplarındaki serum SOD; kontrol, 2 ve 24.saat gruplarına göre anlamlı azalma saptanmıştır ($p<0.005$) (Şekil 31A). İkinci ve 24. saat gruplarındaki serum SOD

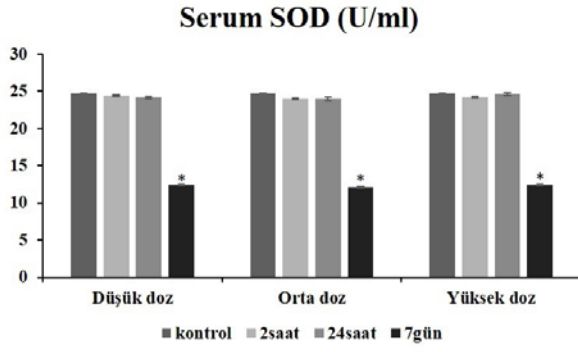
düzeyleri arasında anlamlı farklılık gözlenmezken; 7. günde her üç doz (düşük, orta ve yüksek) gruplarındaki serum SOD, kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$)(Şekil 31B).

Testis dokusundaki SOD değerleri; her üç doz ve zamanda kontrol grubuna göre azalmıştır. Orta dozda 2. saat ve 7. gün gruplarındaki SOD ile yüksek dozda 24. saat ve 7. gün gruplarındaki SOD düzeyindeki azalmalar (kontrol grubuna göre) anlamlıdır ($p<0.005$) (Şekil 32A). İkinci saat ve 7. günde orta doz gruplarındaki SOD ile 24. saat ve 7. günde yüksek doz gruplarındaki SOD düzeyleri, kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$)(Şekil 32B).

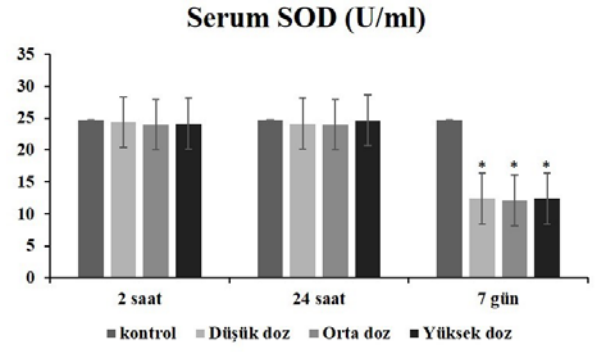
Tablo 13. Deney gruplarındaki sıçanların SOD analizi sonuçları

Gruplar	SOD* (Testis, U/mg)	SOD* (Serum, U/ml)	N
Kontrol	2,296 ± 0,48	24,684 ± 0,19	6
Düşük doz (2 saat)	1,380 ± 0,55	24,385 ± 0,15	6
Düşük doz (24 saat)	1,520 ± 0,10	24,155 ± 0,14	6
Düşük doz (7gün)	1,508 ± 0,18	12,392 ± 0,18	6
Orta doz (2 saat)	0,924 ± 0,18	23,994 ± 0,19	6
Orta doz (24 saat)	1,455 ± 0,05	23,971 ± 0,17	6
Orta doz (7gün)	1,261 ± 0,20	12,116 ± 0,18	6
Yüksek doz (2 saat)	1,730 ± 0,11	24,155 ± 0,10	6
Yüksek doz (24 saat)	1,165 ± 0,11	24,615 ± 0,203	6
Yüksek doz (7gün)	0,988 ± 0,07	12,415 ± 0,15	6

* Ortalama değer ± standart hata

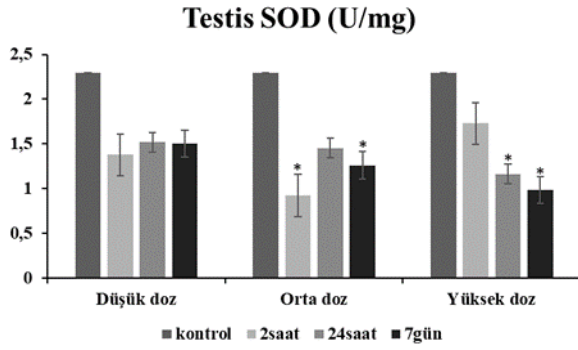


(A)

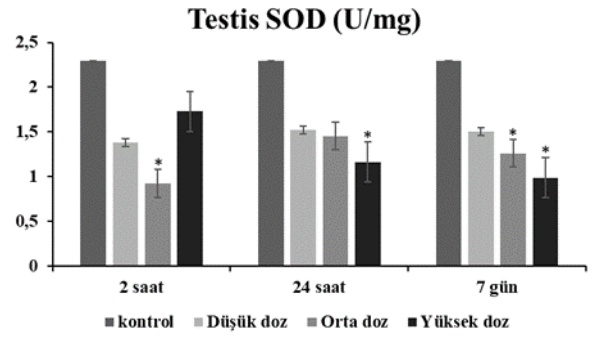


(B)

Şekil 31. Deney gruplarına ait serum SOD analizi sonuçlarının doz (A) ve zaman (B) grafikleri. A: *: Düşük orta ve yüksek dozda 7.gün grupları, kontrol, 2 ve 24.saat gruplarına göre azalmıştır ($p<0.005$). B: *: 7.gün düşük orta ve yüksek doz grupları, kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$).



(A)



(B)

Şekil 32. Deney gruplarına ait testis SOD analizi sonuçlarının doz (A) ve zaman (B) grafikleri. A: *: Orta dozda 2.saat ve 7. gün, yüksek dozda 24.saat ve 7.gün grupları kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$). B: *: 2.saat ve 7. günde orta doz, 24.saat ve 7.günde yüksek doz grupları kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.005$).

5 **Tartışma**

Canlı organizmada bulunan her hücre tipi iyonize radyasyon ile karşılaştığında; radyasyon dozu, hücre tipi ve hücrenin proliferasyon özelliğine bağlı olarak farklı şekillerde yanıt verebilir. İyonize radyasyon nedeniyle oluşan doku hasarları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir, ancak moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (2, 15). Dokular ve organların radyasyona karşı duyarlılıkları farklıdır (3, 39). Kemik iliği, testis ve tiroid gibi dokular radyasyona duyarlı; kemik, santral sinir sistemi, kas gibi dokular ise daha az duyarlı dokulardır. Çalışmamızda; radyasyona hassas testis ve Kİ dokularında, iyonlaştırıcı radyasyonun meydana getirdiği erken ve geç dönemdeki etkilerin oluşum mekanizmasında küçük GTPazların (Rac1 ve RhoA) rolünü araştırdık.

Pelvik bölgeye ait iyonlaştırıcı radyasyon içeren tetkik ve tedavilerde testis dokusu direkt olarak ışınlanır ya da saçılan radyasyon nedeniyle zarar görür. Çalışmamızda radyasyona bağlı testisteki hasarı, Johnsen tübüler biopsi skoru ve seminifer tübül çapı ölçümü ile değerlendirdik. İyonlatırıcı radyasyon, testis dokusunda reproduktif süreci etkiler, uzun dönemde de infertiliteye neden olabilir (40, 41). Radyasyonun etkilerini araştıran deneysel çalışmalar, doğal olarak daha çok hücre kültürü ve deney hayvanları üzerinde yapılmıştır. Ancak 1960-1970 yılları arasında insanlarda yapılmış (toplam 67 gönüllü) bir çalışmada; testislere 0.08 Gy ve 6 Gy arasında değişen dozlarda radyasyon uygulaması sonrasında, 0.1 Gy dozunda sperm sayısında azalma, 3-5 Gy dozunda ise kalıcı sterilite gözlemlendiği bildirilmiştir. Gönüllülerin sperm sayısının radyasyon maruziyeti öncesi sayıya ulaşması; 1 Gy altındaki dozlarda 9-18 ay, 2 Gy-3 Gy arasındaki dozlarda 30 ay, 4 Gy-6 Gy arasındaki dozlarda daha uzun sürede olduğu rapor edilmiştir (42).

Deneysel çalışmalarda radyasyona bağlı testis hasarını göstermek için genellikle yüksek dozlarda radyasyon uygulandığı görülmektedir (40-43). Düşük dozda (<1 Gy) radyasyonun etkilerini gösteren çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (44, 45). Pek çok çalışmada kullanılan radyasyon dozu radyoterapi uygulamalarına karşılık gelebilecek yüksek dozlardır (1-10 Gy) ve doz arttıkça testis hasarının arttığı da gösterilmiştir (40-43). Bir çalışmada, 2 Gy tüm vücut ışınlaması sonrası 7. günde, fare testis dokusunda Johnsen skorunun anlamlı olarak azaldığı ve apoptozisin arttığı gösterilmiştir (43). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre; 7. günde her üç doz grubunda da, Johnsen skoru anlamlı olarak azalmıştır. Bu bulgu radyasyonun, geç dönemde düşük dozlarda bile spermatogenezi etkileyebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, testis hasarını belirlemek için aynı zamanda spermatogenezin gerçekleştiği yer olan seminifer tübül çapı ölçümleri de yapıldı. Seminifer tübül epitelinde düzensizleşme, epitel hücrelerinde dökülme ve atrofik tübül sayısında artış gözlemlendi. Özellikle geç dönemde tüm doz gruplarında seminifer tübül çaplarında anlamlı olarak azalma olduğu saptandı. Fare testis dokusunda 0.02, 0.2 ve 2 Gy radyasyon verildikten 24 saat ve 9 gün sonra seminifer tübül çapı ölçümü yapılan bir çalışmada; her iki zaman değerlendirmesinde de sadece 2 Gy dozunda kontrole göre anlamlı azalma olduğu gösterilmiştir (44). Bizim çalışmamızda 24. saatte her üç doz grubuna ait tübül çapları azalmış, ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır. Yedinci günde ise her üç doz grubundaki azalmaların anlamlı olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda, tüm dozlarda testis hasarının (Johnsen skoru ve tübül çapı ölçümlerindeki azalmanın) erken dönemde başladığı ve 7. günde en fazla olduğu görülmektedir. Bu bulgu diğer çalışmalar ile uyumlu olarak testis hasarının doza ve zamana bağlı olarak arttığını desteklemektedir. Radyasyona bağlı testis hasarında, doza ve zamana bağlı gelişen değişikliklere, hücre içi hangi moleküllerin aracılık ettiğinin tespit edilmesi, gelişen değişikliklerin kalıcı olmadan (kalıcı sterilite) önlenmesi için etkili tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayabilmesi açısından çok önemlidir.

Radyasyona bağlı hasar mekanizmaların başında hücre içi serbest radikallerin artması ve apoptozis gelir. Biz de çalışmamızda bu iki mekanizmadan sorumlu olabilecek küçük GTPaz'ların radyasyona bağlı hasar oluşmasında rolü olup olmadığını ortaya koymaya amaçladık. Küçük GTPaz'ların radyasyon ile ilişkisini değerlendiren çalışmaların çoğu, tümör dokusunda radyoterapinin etkisini değerlendiren çalışmalardır. Küçük GTPaz'ların birçok tümör tipinde ekspresyonlarının ve aktivitelerinin arttığı bilinmesine rağmen, radyoterapinin etkisindeki rolleri hala tartışmalıdır (46). Bildiğimiz kadarıyla, normal sağlıklı testis dokusunda radyasyon uygulaması sonrası gelişen hasarda küçük GTPaz'ların rolünü araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Sağlıklı kişilerin radyasyona maruz kalması sonrasında oluşabilecek testis hasarında rolü olan hücre içi mekanizmaların ve bunlarda rol oynayan moleküllerin gösterilebilmesi, testis hasarına bağlı gelişebilecek infertilite gibi sorunların önlenmesinde katkı sağlayacaktır.

Küçük GTPaz'ların (RhoA, Rac1 ve Cdc42) dokulardaki fonksiyonları göz önünde bulundurulduğunda; çoğu zaman Rac1 ve Cdc42'nin aynı yönde, RhoA'nın ise ters yönde çalıştığı görülmektedir. *C. elegans* ve memelilerde yapılan genetik ve biyokimyasal çalışmalar, RhoA ve Rac1'in, efferositoz sırasında hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde zıt yönde rol

oynadığını ortaya koymuştur (47, 48). Sıçan testis dokusundan hazırlanan primer hücre kültüründe yapılmış bir çalışmada; hücrelerde Rac1 ve RhoA proteinlerinin bulunduğu, Sertoli hücrelerinde Rac1 ekspresyonunun RhoA ekspresyonundan daha fazla olduğu gösterilmiştir (49). Biz de bu çalışma ile uyumlu olarak, kontrol grubunda Rac1 ekspresyonunun, RhoA ekspresyonuna göre daha fazla olduğunu saptandı. Radyasyon uygulanan gruplarda ise, radyasyon dozu ve maruziyet sonrasındaki süre arttıkça; Rac1 ekspresyonunun azaldığını, RhoA ekspresyonunun da arttığı saptandı. Rac1'in ekspresyonunu ve aktivasyonunu değerlendirdiğimizde ise düşük, orta ve yüksek doz 7. gün gruplarında; Rac1 ekspresyonunun kontrole göre belirgin bir şekilde azalırken, Rac1 aktivasyonunun da sadece yüksek dozda anlamlı olmak üzere bütün dozlarda arttığını belirledik. Bu da radyasyona bağlı hasarda Rac1'in etkisinin daha çok geç dönemde olduğu/belirginleştiğini düşündürmektedir.

Canlı organizmada radyasyona bağlı oluşan patolojilerde RhoA molekülünün rolünü araştıran çalışmalar, daha çok endotel hücrelerde ya da kanserli dokularda yapılmıştır. Serviks kanseri (HeLa) hücre hattında yapılan bir çalışmada 0,5- 5- 15 Gy gama ışını ile ışılandıktan 24 saat sonra RhoA aktivitesinin arttığı ve HeLa hücrelerinin radyasyona hassasiyetini arttırdığı rapor edilmiştir (50). Bizim çalışmamızda bu çalışma ile uyumlu olan sadece bir grubumuz (5 Gy, yüksek doz grubu) bulunmasına rağmen, tüm radyasyon dozlarında 24. saat RhoA aktivasyonunun kontrole göre anlamlı olmasa da arttığını belirledik. Ayrıca, RhoA ekspresyonlarının tüm gruplarda, doza ve zamana bağlı olarak arttığını gözlemledik. Rousseau ve arkadaşlarının endotel hücrelerinde yaptığı bir çalışmada da; 15 Gy X ışını ile ışınlamadan 10 dk. sonrasında, fokal adezyon için gerekli olan stres liflerinin RhoA aktivasyonuna bağlı olarak arttığını göstermişlerdir (51). Daha önce yapılan bu çalışmalarda verilen dozlar, değerlendirme zamanları ve incelenen dokular, çalışmamızla birebir örtüşmese de, radyasyon maruziyetinden sonra RhoA aktivitesinin arttığı görülmektedir (50-52). Biz de çalışmamızda testis dokusunda tüm radyasyon dozlarında RhoA aktivitesinin özellikle 7. günde kontrole göre arttığını gösterdik.

Küçük GTPaz'ların birçok dokuda ve birçok fizyolojik/ patolojik süreçte bir denge içinde hareket ettiği (bezen aynı yönde bazen zıt yönde) bilinmektedir (48, 53). Testis dokusu primer hücre kültüründe Rac1 ve RhoA dengesinin araştırıldığı tek bir çalışmada, Sertoli hücrelerinde Rac1 ekspresyonunun RhoA ekspresyonundan daha fazla olduğu bildirilmiştir (49). Çalışmamızda; *in vivo* olarak tüm vücut ışınlaması sonrasında testis dokusunda gelişen hasarda, Rac1 ve RhoA'nın ekspresyon ve aktivasyonları eş zamanlı olarak değerlendirilmiştir ve bu

yönüyle, radyasyona bağlı testis hasarında Rac1 ve RhoA arasındaki dengeyi araştıran ilk çalışmadır. Sıçan süperior mezenterik arter hücrelerinde hemorajik şok sonrasında Rac1/RhoA dengesini araştıran bir çalışmada; erken dönemde RhoA aktivitesinin arttığı, Rac1 aktivitesinin azaldığı, geç dönemde ise RhoA aktivitesi azalırken, Rac1 aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (52). Her ne kadar hemorajik şok ve radyasyon hasarı birebir benzer mekanizmalar üzerinden gitmese de; apoptozis ve oksidatif stres oluşması her ikisinde de ortak görülmektedir. Bizim çalışmamızda da radyasyon uygulaması sonrasında, Rac1 ve RhoA aktivitesinin birbirine ters yönde olduğu özellikle de 7. günde dozla bağlı olarak; Rac1 aktivitesi artarken, RhoA aktivitesinin de azaldığı görülmektedir.

Radyasyona bağlı gelişen hücresel olaylardan birisi de apoptozistir. Radyasyona maruz kalan germ hücrelerinde oksidatif stres ve apoptozis ve bunun sonucunda da infertilite ortaya çıkabilir (54). Sıçan testis dokusunda 10 Gy radyasyon ile ışınlamadan 5 gün sonra, aktif kaspaz-3 ekspresyonunun kontrol grubuna göre arttığı bildirilmiştir (24). Wang ve arkadaşları; farelerde 5 Gy ışınlamadan 7 gün sonra testis dokusunda apoptotik hücre oranının kontrole göre arttığını rapor etmişlerdir (43). Bizim çalışmamızda sadece 5 Gy ışınlamada değil tüm dozlardaki (düşük, orta ve yüksek) apoptozis, kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Bununla birlikte farelere uygulanan 25-200 mGy arasındaki X ışınının, testis dokusunda p53 ekspresyonunu arttırarak apoptozisi arttırdığı ve en yüksek artışın da 75 mGy ışınlamada ve 12. ile 18. saatlerde olduğu gösterilmiştir (55). Çalışmamızdaki orta (0,1 Gy) ve yüksek (5 Gy) doz gruplarında; 2. saatten itibaren saptadığımız apoptozis değerlerinin birbirine yakın olması, bu çalışmayı desteklemektedir. Apoptozis her üç doz grubunda da (düşük, orta ve yüksek), zamana bağlı artış göstermiştir.

Rac1, RhoA ve Cdc42'nin; bazen apoptotik, bazen de antiapoptotik süreçlerde etkili olduğu bildirilmiştir (53, 56). Küçük GTPaz'ların apoptozisteki rolünü araştıran bir çalışmada, ATDC5 fare kondrosit hücre hattında yapılan çalışmada Rac1 ve Cdc42 proteinlerinin aşırı ekspresyonunun apoptozisi arttırıcı, RhoA aşırı ekspresyonunun ise apoptozisi azaltıcı bir etki gösterdiği bildirilmiştir (57). Bizim çalışmamızda ise; RhoA ekspresyonu ve aktivasyonu, her üç doz grubunda da Aktif kaspaz-3 değerlerinde olduğu gibi zamana bağlı artış göstermiştir. Çalışmamızda Aktif Kaspaz-3 ekspresyonun arttığı durumlarda RhoA ekspresyonlarını artmış, Rac1 ekspresyonlarının da azalmış olduğunu gördük. Özellikle 7. günlerde küçük GTPaz'ların aktivasyonlarına baktığımızda ise; aktif kaspaz-3 ekspresyonunun arttığı düşük ve orta dozlarda RhoA aktivasyonunun Rac1'e göre daha belirgin şekilde arttığını, yüksek dozda ise tam tersi

olarak Rac1 aktivasyonunun daha fazla arttığını gözlemledik. Endotel hücrelerinde; 15 Gy ile ışılandıktan 18 saat sonrasında, RhoA/ROCK yolağının radyasyona bağlı apoptozis üzerinde etkisi olmadığı rapor edilmiştir (51). Bizim çalışmamızdaki yüksek doz grubumuzda uygulanan radyasyon dozu (5 Gy) bu çalışmadakinden çok daha düşük olmasına rağmen, RhoA aktivasyonun, düşük ve orta dozlardaki aktivasyona göre daha düşük olması belki de bu çalışma ile uyumlu olarak radyasyon dozu arttıkça Rho aktivitesindeki artışın azaldığını düşündürtebilir. Bu sonuçlar da küçük GTPaz RhoA'nın radyasyona bağlı testis hasarındaki rolünün radyasyon dozuna bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini desteklemektedir.

Radyasyona bağlı hasar mekanizmalardan biri de hücre içi serbest radikallerin artması ve oksidan/antioksidan dengenin bozulmasıdır (26, 27). Fare testis dokusu ve GC-1 hücre hattında yapılan bir çalışmada; 4 Gy radyasyon verildikten 7 gün sonra hücre içi ROS ve MDA düzeyi anlamlı olarak azalmıştır (28). Bizim çalışmamızda da 5 Gy radyasyon verilen yüksek doz grubunda bile 2. saatte hücre içi ROS çok fazla artarken, ilginç olarak 7. günde bu çalışma ile uyumlu olarak hücre içi ROS'un anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Literatürde testis dokusunda farklı radyasyon dozları uygulanarak erken ve geç dönemde ROS oluşumunu araştıran bir *in vivo* çalışma bildirilmemiştir. Burada sunulan çalışmalardan farklı olarak testis dokusu dışında RAW264.7 hücrelerinde yapılan 2 Gy'lik ışınlamadan yarım saat sonra ROS oluşumunun başladığı gösterilmiştir (29). Bu bağlamda her üç doz grubunda da saptadığımız, erken dönemdeki ROS bulgumuz bu çalışma ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda radyasyona bağlı oluşan oksidatif stresi değerlendirmek için testis dokusunda hücre içi ROS ile birlikte; serum ve testis dokusunda MDA ve SOD analizlerini de yaptık. Bu konuda çalışan araştırmacılar, serum değerlerinin pek çok faktörden etkilenmesi nedeniyle bu parametrelerin dokudaki değerlerini çalışmayı tercih etmişlerdir. Biz dokuda oksidatif stresle oluşan MDA ve SOD'daki değişikliklerin serum değerlerine yansıyor yansımadığını da göstermek istedik. Testiste radyasyonun oluşturduğu hasarda lipid peroksidasyonunun arttığı, buna bağlı olarak da MDA değerlerinin arttığını gösteren çok sayıda literatür bulunmaktadır (21, 30). Farelerde 4 Gy radyasyon uygulamasından 7 gün sonra, testis dokusunda ROS'un, serumda da 8-OHdG (8-hidroksi deoksiguanozin) ve MDA'nın anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (28). Bizim çalışmamızda da serum ve testis dokusundaki MDA; yüksek doz gruplarında 7. günde artmıştır. Farelere 0.02, 0.2 ve 2 Gy tüm vücut ışınlama yapılan bir çalışmada 24. saat ve 9. günde testis dokusunda MDA ve SOD analizleri yapılmış; MDA düzeyindeki artışın ve SOD düzeyindeki azalmanın sadece 2 Gy ışınlamada anlamlı

olduğu rapor edilmiştir (8). Shaban ve arkadaşları; sıçanlara 8 Gy radyasyon uygulamasından 7 gün sonra testis dokusunda MDA düzeyinin arttığını ve SOD düzeyinin de azaldığını bildirmiştir (31). Biz de çalışmamızda, testis dokusu MDA düzeylerinin tüm radyasyon dozlarında erken dönemde (2.saat) bile istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrole göre arttığını ve Shaban ve arkadaşlarının çalışması ile uyumlu olarak, MDA düzeylerinin yüksek doz (5 Gy) radyasyon uygulamasından sonraki 7. günde anlamlı olarak arttığını saptadık.

Çalışmamızda, tüm gruplardaki testis SOD değerlerinin kontrol grubuna göre azalmış olması, radyasyona bağlı hasarda antioksidan kapasitenin azaldığını ya da yetersiz kaldığını düşündürmektedir. Sıçanlara 5 Gy radyasyon uyguladıktan 7 gün sonra, testis dokusu SOD düzeyinin anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (32). Bu çalışmaya benzer şekilde bizim çalışmamızdaki yüksek doz gruplarındaki testis dokusu SOD değerleri sadece 7. günde değil, 24. saatte de anlamlı olarak azalmıştır. Farelerde yapılan başka bir çalışmada 10 Gy ışınlamadan 4 hafta sonrasında serum MDA düzeyinin arttığı, SOD düzeyinin de azaldığı bildirilmiştir (33). Bizim çalışmamıza ait serum SOD düzeyleri; dozdan bağımsız olarak, 2. ve 24. saatlerde kontrole göre değişiklik göstermemiş ancak 7. günde anlamlı olarak azalmıştır.

Çalışmamızdaki tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, radyasyona bağlı testis hasarında oksidatif stresin arttığı ve antioksidan kapasitenin azaldığını saptadık. Özellikle yüksek doz gruplarında elde edilen hücre içi ROS, MDA ve Rac1 aktivasyonuna ait veriler benzer şekilde; 2. saatte artmış, 24. saatte azalarak 7. günde tekrar artmıştır. Bu bulgular da radyasyona bağlı testis hasarında, NADPH oksidaz enziminin alt birimi olan Rac1'in rolü olabileceğini ve Rac1'in testis hasarını artırıcı etkisini de hücre içi ROS oluşumu ve lipid peroksidasyonunu artırarak gerçekleştirebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda testis dokusuyla birlikte radyasyona hassas olduğu bilinen Kİ dokusunu da inceledik. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada; 0.5 Gy, 2.5 Gy, 5 Gy, 25 Gy ve 100 Gy radyasyon maruziyetinden 14 gün sonra; 2.5 Gy ve altındaki dozlarda anlamlı bir değişiklik izlenmezken, 5 Gy ve 25 Gy arasında Kİ hücrelerinde hücre canlılığı ve alt ekstremitelerde kemik gelişiminin %50 oranında azaldığı rapor edilmiştir (58). Matsuyama ve arkadaşları sıçanlara 5 Gy tüm vücut ışınlaması yapıldıktan 3 gün sonra Kİ dokusunda megakaryosit hücre sayısının azaldığını ve apoptozisin 3 saat sonra anlamlı olarak arttığını, 24. saatte de kontrolle aynı seviyede olduğunu bildirmişlerdir (59). Bizim çalışmamızda 2. ve 24. saatlerdeki apoptozis ile ilgili sonuçlarımız; (değerlendirme saatinin 3. saatten farklı olsa da) bu çalışma ile benzerlik

göstermektedir. Farelerde kemik iliğinden aspire edilerek hazırlanmış hücre kültürü çalışmasında, Rac1'in osteoklastogenez sırasında aktin düzenlenmesinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (60). Kemik iliğinden üretilmiş mezenkimal kök hücrelerinde hücre hareketliliği ve osteosarkom gelişiminde Rac1 ve RhoA'nın rolü olabileceği rapor edilmiştir (61). Kemik iliğinde bu moleküllerin bulunduğu dair çalışmalar olmasına rağmen, radyasyon sonrasında bu dokuda gelişen hasarda, küçük GTPaz'ların ekspresyonu ve aktivasyonundaki değişimlere ait bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu açıdan bir ilktir, ancak radyasyona bağlı olarak Kİ dokusunda doza ve zamana bağlı olarak Rac1 ve RhoA ekspresyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık saptayamadık.

Şimdiye kadar yapılan *in vivo* çalışmalarda, genellikle yüksek radyasyon dozları tercih edilmiştir (24, 40, 62). Deneysel modelimizi oluştururken; düşük, orta ve yüksek dozlarda erken ve geç dönem etkileri araştırmayı hedefledik. Belirlediğimiz doz ve zaman değerleri diğer çalışmalar ile tam örtüşmemesi, değerlendirmede güçlük yaratmasının yanında çalışmamızın özgün tarafını oluşturmaktadır. Çalışmamızda radyolojik tetkiklerde alınabilecek doza karşılık gelen 0,02 Gy dozundaki (düşük doz) radyasyonun, testis dokusundaki hasarı ve oksidatif stresi, 2. saat gibi erken bir dönemde başlatabileceğini gösterdik. Aynı şekilde Rac1 ekspresyonunun erken dönemde (2. saat) azalırken RhoA ekspresyonunun da artmaya başladığı ve buna ek olarak Rac1 ve RhoA aktivasyonlarının da artmaya başladığı da görülmektedir. Dolayısıyla bizim çalışmamız, düşük doz radyasyonun bile testiste hasara neden olduğunu ve bu hasara küçük GTPaz'ların aracılık edebileceğini ve bunlar arasındaki dengenin özellikle radyasyon dozu ve zamanına bağlı değişebileceğini düşündürmektedir. Küçük GTPaz'ların radyasyon hasarı oluşturan etkilerinin en azından bir kısmının hücre içi ROS artışına ve apoptozis üzerindeki etkilerine bağlı olabileceğini gösteren ilk çalışmadır. Ancak küçük GTPazların radyasyona bağlı testis hasarındaki etkilerini doğrudan (direk) gösterecek deneysel tasarımlara ihtiyaç vardır. Bu nedenle Rac1 ve RhoA yollarının aktive ve/veya inhibe edildiği koşullarda, bu deneylerin tekrar edilmesi gerekmektedir. Buradan elde edilecek veriler sonrasında, özellikle genç hastalarda infertiliteye neden olabilen radyasyona bağlı testis hasarını önlemek için Rac1, RhoA gibi küçük GTPaz'ları hedefleyen tedaviler umut vadedebilir.

6 **Sonuç ve Öneriler**

- Çalışmamızda testis dokusunda radyasyona bağlı oluşan; doku hasarı, apoptozis, oksidatif stresi, Rac1 ve RhoA moleküllerinin ekspresyonu ve aktivasyonunu üç farklı doz ve zamanda değerlendirdik. Radyasyona bağlı hasarda doz ve zamana bağlı değişikliklerin yanı sıra, oluşum mekanizmalarında Rac1 ve RhoA gibi küçük GTPaz'ların rolü olup olmadığını araştırdık. Bu yönleri ile çalışmamız, testis dokusunda radyasyon uygulaması sonrasında Rac1 ve RhoA moleküllerinin ekspresyonu ve aktivasyonunu inceleyen ilk çalışmadır.
- Radyasyon uygulanan gruplarda testis dokusunda hasarın doza ve zamana bağlı olarak arttığını histolojik olarak gösterdik.
- Radyasyonun, testis dokusunda doza ve zamana bağlı olarak apoptozisi ve oksidatif stresi arttığını gösterdik.
- Testis dokusunda doza ve zamana bağlı olarak; testis hasarı, apoptozis ve oksidatif stresin artışı ile Rac1 ve RhoA aktivasyonları da artış göstermiştir. Ancak Rac1 ve RhoA dengesi tüm doz gruplarında aynı değişimleri göstermemiştir. Elde ettiğimiz bulguları desteklemek için, Rac1 ve RhoA yollarının aktive ve inhibe edildiği koşullarda radyasyona bağlı testis hasarını değerlendirecek çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Testis dokusundan farklı olarak Kİ dokusunda; radyasyona bağlı hasar, apoptozis ve Rac1 ile RhoA ekspresyonlarında gruplar arası anlamlı fark gözlenmemiştir.
- Sonuçlarımız, radyasyona bağlı testis hasarında küçük GTPaz'ların rolü olabileceğini ve tıbbi uygulamalar nedeni ile radyasyona maruz kalan genç erkek hastalarda testis hasarı nedeni ile oluşabilecek infertilitenin önlenmesinde küçük GTPaz'ları hedef alan tedavilerin umut verici olabileceğini ve daha ileri çalışmalara gerek olduğunu düşündürmektedir.

7 **Kaynaklar**

1. Pouget JP, Georgakilas AG, Ravanat JL. Targeted and Off-Target (Bystander and Abscopal) Effects of Radiation Therapy: Redox Mechanisms and Risk/Benefit Analysis. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29(15):1447-87.
2. Shimura N, Kojima S. The Lowest Radiation Dose Having Molecular Changes in the Living Body. *Dose-Response*. 2018;16(2).
3. Panganiban RA, Snow AL, Day RM. Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14(8):15931-58.
4. Pannkuk EL, Laiakis EC, Singh VK, Fornace AJ. Lipidomic Signatures of Nonhuman Primates with Radiation-Induced Hematopoietic Syndrome. *Sci Rep*. 2017;7(1):9777.
5. Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A, Kasagi F, Soda M, Grant EJ, et al. Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950-2003: an overview of cancer and noncancer diseases. *Radiat Res*. 2012;177(3):229-43.
6. Mavragani IV, Nikitaki Z, Souli MP, Aziz A, Nowsheen S, Aziz K, et al. Complex DNA Damage: A Route to Radiation-Induced Genomic Instability and Carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2017;9(7).
7. Yuan SY, Rigor RR. Regulation of Endothelial Barrier Function. *Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease*. San Rafael (CA)2010.
8. Pervaiz S, Cao J, Chao OS, Chin YY, Clement MV. Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells. *Oncogene*. 2001;20(43):6263-8.
9. Boehm JE, Chaika OV, Lewis RE. Rac-dependent anti-apoptotic signaling by the insulin receptor cytoplasmic domain. *J Biol Chem*. 1999;274(40):28632-6.
10. Charles M. UNSCEAR report 2000: sources and effects of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. *J Radiol Prot*. 2001;21(1):83-6.
11. International Atomic Energy Agency DoPIV. Radiation, people and the environment. International Atomic Energy Agency (IAEA): IAEA; 2004. Contract No.: INIS-XA--703.
12. Averbek D, Candeias S, Chandna S, Foray N, Friedl AA, Haghdoost S, et al. Establishing mechanisms affecting the individual response to ionizing radiation. *International journal of radiation biology*. 2020;96(3):297-323.
13. Fisher DR, Fahey FH. Appropriate Use of Effective Dose in Radiation Protection and Risk Assessment. *Health Phys*. 2017;113(2):102-9.
14. International Commission on Radiation U, Measurements. Report 85: Fundamental quantities and units for ionizing radiation. *J ICRU*. 2011;11(1):1-31.
15. Hatzi VI, Laskaratou DA, Mavragani IV, Nikitaki Z, Mangelis A, Panayiotidis MI, et al. Non-targeted radiation effects in vivo: a critical glance of the future in radiobiology. *Cancer Lett*. 2015;356(1):34-42.
16. Authors on behalf of I, Stewart FA, Akleyev AV, Hauer-Jensen M, Hendry JH, Kleiman NJ, et al. ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects

of radiation in normal tissues and organs--threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Ann ICRP*. 2012;41(1-2):1-322.

17. Kadhim M, Salomaa S, Wright E, Hildebrandt G, Belyakov OV, Prise KM, et al. Non-targeted effects of ionising radiation--implications for low dose risk. *Mutat Res*. 2013;752(2):84-98.

18. Quinones O. Effect of the gamma radiation and common antioxidants on some aspects of osteoblast differentiation during the formation of bone tissue in an in-vivo model. 2015.

19. Menon SS, Uppal M, Randhawa S, Cheema MS, Aghdam N, Usala RL, et al. Radiation Metabolomics: Current Status and Future Directions. *Front Oncol*. 2016;6:20.

20. Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdui CM. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(2):260-92.

21. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(4):1620-4.

22. Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B. Cell Death Mechanisms and Their Implications in Toxicology. *Toxicological Sciences*. 2011;119(1):3-19.

23. Toklu HZ, Sehirli O, Ozyurt H, Mayadagli AA, Eksioglu-Demiralp E, Cetinel S, et al. Punica granatum peel extract protects against ionizing radiation-induced enteritis and leukocyte apoptosis in rats. *J Radiat Res*. 2009;50(4):345-53.

24. Said RS, Mohamed HA, Kamal MM. Coenzyme Q10 mitigates ionizing radiation-induced testicular damage in rats through inhibition of oxidative stress and mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Toxicology and applied pharmacology*. 2019;383:114780.

25. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 2001;81(1):153-208.

26. Zhou X, Herbst-Robinson KJ, Zhang J. Visualizing Dynamic Activities of Signaling Enzymes Using Genetically Encodable FRET-Based Biosensors: From Designs to Applications. *Method Enzymol*. 2012;504:317-40.

27. Goitre L, Trapani E, Trabalzini L, Retta SF. The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets. *Methods Mol Biol*. 2014;1120:1-18.

28. Chi X, Wang S, Huang Y, Stamnes M, Chen JL. Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):7089-108.

29. Svensmark JH, Brakebusch C. Rho GTPases in cancer: friend or foe? *Oncogene*. 2019.

30. Yamochi W, Tanaka K, Nonaka H, Maeda A, Musha T, Takai Y. Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 1994;125(5):1077-93.

31. Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*. 2007;29(4):356-70.

32. Pronk MCA, van Bezu JSM, van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VWM, Hordijk PL. RhoA, RhoB and RhoC differentially regulate endothelial barrier function. *Small GTPases*. 2019;10(6):466-84.

33. Sugihara K, Nakatsuji N, Nakamura K, Nakao K, Hashimoto R, Otani H, et al. Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene*. 1998;17(26):3427-33.
34. De P, Aske JC, Dey N. RAC1 Takes the Lead in Solid Tumors. *Cells*. 2019;8(5).
35. Frost JA, Xu S, Hutchison MR, Marcus S, Cobb MH. Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(7):3707-13.
36. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995;81(1):53-62.
37. Stowers L, Yelon D, Berg LJ, Chant J. Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(11):5027-31.
38. Ozbilgin K, Karaca F, Turan A, Kose C, Vatansever S, Ozcakil T. The higher heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) in missed abortion. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*. 2015;54(1):13-8.
39. Guerci AM, Dulout FN, Grillo CA, Seoane AI. Differential response of two cell lines sequentially irradiated with low X-ray doses. *Int J Radiat Biol*. 2005;81(5):367-72.
40. De Felice F, Marchetti C, Marampon F, Casciulli G, Muzii L, Tombolini V. Radiation effects on male fertility. *Andrology*. 2019;7(1):2-7.
41. McBride WH, Schaue D. Radiation-induced tissue damage and response. *The Journal of pathology*. 2020.
42. Ash P. The influence of radiation on fertility in man. *Br J Radiol*. 1980;53(628):271-8.
43. Wang A, Wang L, Lu X, Wang Y, Chen X, Shi Z, et al. A Chinese herbal prescription Yiqi Jiedu decoction attenuates irradiation induced testis injury in mice. *Biomed Pharmacother*. 2020;123:109804.
44. Gong EJ, Shin IS, Son TG, Yang K, Heo K, Kim JS. Low-dose-rate radiation exposure leads to testicular damage with decreases in DNMT1 and HDAC1 in the murine testis. *Journal of radiation research*. 2014;55(1):54-60.
45. Liu Z, Cao K, Liao Z, Chen Y, Lei X, Wei Q, et al. Monophosphoryl lipid A alleviated radiation-induced testicular injury through TLR4-dependent exosomes. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2020.
46. Zeng RJ, Zheng CW, Chen WX, Xu LY, Li EM. Rho GTPases in cancer radiotherapy and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2020.
47. Kim SY, Kim S, Bae DJ, Park SY, Lee GY, Park GM, et al. Coordinated balance of Rac1 and RhoA plays key roles in determining phagocytic appetite. *PLoS One*. 2017;12(4):e0174603.
48. Leverrier Y, Ridley AJ. Requirement for Rho GTPases and PI 3-kinases during apoptotic cell phagocytosis by macrophages. *Curr Biol*. 2001;11(3):195-9.

49. Freeman EA, Jani P, Millette CE. Expression and potential function of Rho family small G proteins in cells of the mammalian seminiferous epithelium. *Cell Commun Adhes.* 2002;9(4):189-204.
50. Osaki JH, Espinha G, Magalhaes YT, Forti FL. Modulation of RhoA GTPase Activity Sensitizes Human Cervix Carcinoma Cells to gamma-Radiation by Attenuating DNA Repair Pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:6012642.
51. Rousseau M, Gaugler MH, Rodallec A, Bonnaud S, Paris F, Corre I. RhoA GTPase regulates radiation-induced alterations in endothelial cell adhesion and migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;414(4):750-5.
52. Li T, Fang Y, Yang G, Xu J, Zhu Y, Liu L. Effects of the balance in activity of RhoA and Rac1 on the shock-induced biphasic change of vascular reactivity in rats. *Ann Surg.* 2011;253(1):185-93.
53. Velaithan R, Kang J, Hirpara JL, Loh T, Goh BC, Le Bras M, et al. The small GTPase Rac1 is a novel binding partner of Bcl-2 and stabilizes its antiapoptotic activity. *Blood.* 2011;117(23):6214-26.
54. Ko EY, Sabanegh ES, Jr., Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertility and sterility.* 2014;102(6):1518-27.
55. Liu G, Gong P, Zhao H, Wang Z, Gong S, Cai L. Effect of low-level radiation on the death of male germ cells. *Radiat Res.* 2006;165(4):379-89.
56. Takakura A, Miyoshi J, Ishizaki H, Tanaka M, Togawa A, Nishizawa Y, et al. Involvement of a small GTP-binding protein (G protein) regulator, small G protein GDP dissociation stimulator, in antiapoptotic cell survival signaling. *Molecular biology of the cell.* 2000;11(5):1875-86.
57. Wang G, Beier F. Rac1/Cdc42 and RhoA GTPases antagonistically regulate chondrocyte proliferation, hypertrophy, and apoptosis. *J Bone Miner Res.* 2005;20(6):1022-31.
58. Lu Y, Tang G, Lin H, Lin X, Jiang L, Yang GY, et al. A biosafety evaluation of synchrotron radiation X-ray to skin and bone marrow: single dose irradiation study of rats and macaques. *Int J Radiat Biol.* 2017;93(6):637-45.
59. Matsuu-Matsuyama M, Shichijo K, Tsuchiya T, Kondo H, Miura S, Matsuda K, et al. Protective effects of a cystine and theanine mixture against acute radiation injury in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2020;78:103395.
60. Wang Y, Lebowitz D, Sun C, Thang H, Grynpas MD, Glogauer M. Identifying the relative contributions of Rac1 and Rac2 to osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* 2008;23(2):260-70.
61. Pietrovito L, Leo A, Gori V, Lulli M, Parri M, Becherucci V, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote invasiveness and transendothelial migration of osteosarcoma cells via a mesenchymal to amoeboid transition. *Mol Oncol.* 2018;12(5):659-76.
62. Shaban NZ, Ahmed Zahran AM, El-Rashidy FH, Abdo Kodous AS. Protective role of hesperidin against gamma-radiation-induced oxidative stress and apoptosis in rat testis. *J Biol Res (Thessalon).* 2017;24:5.

8 Ekler

Ek 1. 04 Ekim 2016 toplantı tarihli 45/2016 Protokol No'lu Etik Kurul onayı

20 Şubat 2018 toplantı tarihli 45/2016 Protokol No'lu Etik Kurul onayı

28Ağustos 2019 toplantı tarihli 45/2016 Protokol No'lu Etik Kurul onayı

Ek 2. Akademik Özgeçmiş Formu



Ek 1.



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 01/18/2016
Toplantı Tarihi : 04 Ekim 2016

Sayın, Yard.Doç.Dr.Ayşegül YURT
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

45/2016 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Sıçan modelinde küçük GTPaz'ların İyonlaştırıcı radyasyon hasarlarındaki rolü" isimli; Aysun Manisalıgil, Mukaddes Gümüştekin, Aslı Çelik, Zahide Çavdar, Cemre Ural, Serap Cilaker Mıcılı, Gizem Şişman'ın araştırmacı olduğu 60 (Gruplardaki hayvan sayısı 6'ya düşürülerek) adet Wistar rat'ın verildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Safiye AKTAS
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye (Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Gülün OKTAY

Prof.Dr.Güney KORKIM

Doç.Dr.Nermin DURMUS

Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU

Doç.Dr.Türkan ERTAY

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS

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

Yard.Doç.Dr.Örhan KALEMCİ

Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Adnan SERPEN

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

Gündem No/Toplantı No/Yıl : 01/04/2018
Toplantı Tarihi : 20 Şubat 2018

Sayın, Yard.Doç.Dr.Ayşegül YURT
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

45/2016 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "İyonlaştırıcı radyasyon hasarlarında küçük GTPaz'ların rolü" isimli; Aysun Manisalıgil, Mukaddes Gümüştekin, Zahide Çavdar, Cemre Ural, Serap Cilaker Mıcılı, Osman Yılmaz, Gizem Şişman'ın araştırmacı olduğu 60 adet Wistar rat'ın verildiği, uygulanmasında etik açıdan sakınca bulunmayan projede; gönderilen belgeler incelenerek, Aslı Çelikin projeden ayrılarak, Osman Yılmaz'ın projeye araştırmacı olarak dahil edilmesi hususunda bilgi edinilmiştir.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

Prof.Dr.Ali Nécati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ,
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye (Topl.Katılmadı)

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

Prof.Dr.Gökay KIRKIM

Prof.Dr.Türkay ERTAY
Üye

Prof.Dr.Pembe UYGUN/KEŞKİNOĞLU

Prof.Dr.Nergiz DURMUŞ
Üye (Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye

Doç.Dr.Orhan KALEMÇİ

Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Adnan ŞERPEN

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin başvuru formunda **bold** karakter kullanılarak incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

Cemre Ural, Serap Cilaker Mıcılı, Osman Yılmaz, Gizem Şişman'ın araştırmacı olduğu 60 adet Wistar rat'ın verildiği, uygulanmasında etik açıdan sakınca bulunmayan projede; gönderilen belgeler incelenerek bilgi edinilmiştir ve karaciğer, dalak ve kalan testis, kemik iliği dokularının kullanımına onay verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı
(Topl.Katılamadı-Araştırmacı)

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr.Hatice Nur OLGUN
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Prof.Dr.Günay KIRKIM
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Nergiz DURMUŞ
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman

Prof.Dr.Gamze ÇAPA KAYA
Üye

Prof.Dr.Semra KOÇTURK
Üye

Prof.Dr.Çetin PEKÇETİN
Üye

Doc.Dr.Sefa KURT

Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Adnan SERPEN

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

Ek 2.

ÖZGEÇMİŞ

Yaşar Aysun MANİSALIGİL

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

Öğrenim Bilgileri

15 Eylül 2011 - 21 Ocak 2015 (3 yıl 5 ay)

Yüksek Lisans, Tezli Program, Dokuz Eylül Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp (YL) (Tezli)

Diploma Numarası: 201500246

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.15 / 4.0

06 Eylül 1989 - 10 Eylül 1993 (4 yıl 1 ay)

Lisans, Anadal/Normal Öğretim, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp
Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler Pr.

Diploma Numarası: 120

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 63.53 / 100.0

İşyeri Bilgileri

27 Ocak 2008 - Şu Anda (12 yıl 9 ay) (Tam Zamanlı)Öğretim
Görevlisi,

01 Ocak 1994 - 01 Ocak 2007 (13 yıl 1 ay) (Tam Zamanlı)
UZMAN, UZMAN, DİGER (Dokuz Eylül Üniversitesi)

Yabancı Dil Bilgileri

İngilizce (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Türkçe (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Anahtar Kelimeler Radyasyon Etkileri
Sinyal Molekülleri
Tıbbi Görüntüleme

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

Y. A. MANISALIGIL, S. CILAKER MIÇILI, S. KIZILDAG, A. ÇELİK, H. A. BAGRIYANIK & M. GÜMÜSTEKİN, Assessment of Rac1 and β -PAK Expressions in a Mouse Model for Contrast-Induced Nephropathy , Journal of Basic and Clinical Health Sciences, 2020, 2458-8938, 2020, 4, 230-236.

G. KILINÇ, A. YURT, Y. A. MANISALIGIL & S. KIZILDAG, SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK YÜKSEK OKULU ÖĞRENCİLERİNİN AGIZ DIS SAĞLIĞI KONUSUNDA BİLGİLERİ, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 2018, 1300-9044.

Y. A. MANISALIGIL & A. YURT, İyonlaştırıcı Radyasyonun Hücresel ve Moleküler Düzeydeki Etkileri, Düzce Tıp Fakültesi Dergisi, 2018, 1307-671X, 20, 2, 50-53.

Bildiriler

Y. A. MANISALIGIL, A. YURT, M. GÜMÜSTEKİN, Z. ÇAVDAR, C. URAL, S. CILAKER MIÇILI & G. SISMAN, Radyasyonun Oksidatif Stres ve Apoptozis Üzerindeki Etkilerinde Rac1 Molekülünün Rolü, Sözlü Sunum, 17.Ulusal Medikal Fizik Kongresi, 18 Ekim 2019, 19 Ekim 2019.

G. KILINÇ, A. YURT, Y. A. MANISALIGIL & S. KIZILDAG, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Öğrencilerinin Agız Dis Sağlığı Konusunda Bilgileri, Sözlü Sunum, TDB 24. uluslararası dişhekimliği kongresi, 27 Eylül 2018, 30 Eylül 2018.

Y. A. MANISALIGIL & A. YURT, Effects of Ionizing Radiation Cellular and Molecular Approaches, Sözlü Sunum, 2nd. Congress on Radiation Protection with International Participation,, 23 Kasım 2017, 25 Kasım 2017, 39 - null.

Y. A. MANISALIGIL, S. CILAKER MIÇILI, S. KIZILDAG, A. ÇELİK, H. A. BAGRIYANIK & M. GÜMÜSTEKİN, Evaluation Of Rac1 Expression in Radiocontrast Induced Nephropathy in Mouse

Model, Elektronik, V.International Congress of Molecular Medicine, 20 Mayıs 2015, 22 Mayıs 2015.

Y. A. MANISALIGİL, S. KIZILDAG, S. CILAKER MIÇILI, A. ÇELİK, M. E. GÜNELİ & M. GÜMÜSTEKİN, Rac1 Inhibitor Eht1864 Improved Radiocontrast Induced Nephropathy in Mouse Model, Elektronik, V.International Congress of Molecular Medicine, 20 Mayıs 2015, 22 Mayıs 2015.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARASTIRMACI, Sıçan Modelinde Küçük GTPaz'ların İyonlaştırıcı Radyasyon Hasarlarındaki Rolü, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARASTIRMACI, Sıçanlarda Radyokontrast Madde Nefropatisini Önlemede Montelukast'ın NF-kB, NOX4 ve p22 phox Ekspresyonu Aracılı Etkisi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARASTIRMACI, Radyokontrast Madde Enjeksiyonu Sonrası Gelişen Nefropatilerde Apoptoz Ve Rac1 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Mayıs 2013, 01 Aralık 2015.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARASTIRMACI, Duyarlı Plak Görüntülemeye MRG, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, 01 Haziran 2008, 01 Haziran 2009.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARASTIRMACI, KAMU VE ÖZEL RADYOLOJİ MERKEZLERİNİN RADYOLOJİ TEKNİKLERİNDEN BEKLENTİLERİNİN SAPTANMASI, Yürütülen Kuruluş: KURULUS GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 01 Eylül 2007, 01 Ocak 2009.