T. C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL TESTİS TORSİYONU MODELİNE *CERATONİA SİLİQUA* ETKİSİNİN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Dr. Şahika YARDIM

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Haziran 2024
İSTANBUL

T. C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DENEYSEL TESTİS TORSİYONU MODELİNE *CERATONİA SİLİQUA* ETKİSİNİN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Dr. Şahika YARDIM

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ünal USLU

İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Elif KERVANCIOĞLU DEMİRCİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Haziran 2024
İSTANBUL

ONAY

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda asistan hekim olan Dr. Şahika YARDIM'ın hazırladığı ve jüri önünde savunduğu "DENEYSEL TESTİS TORSİYONU MODELİNE CERATONİA SİLİQUA ETKİSİNİN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI" başlıklı uzmanlık tezi başarılı kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ **İMZA**

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ünal USLU
(Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı) ……
(İstanbul Medeniyet Üniversitesi)

Üyeler
Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU
(Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı) ……
(İstanbul Üniversitesi)

Dr. Öğr. Üyesi Dr. Gülnaz KERVANCIOĞLU
(Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı) ……
(İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi)

Tarih: …. / 06 / 2024

YAZAR BİLDİRİMİ

"DENEYSEL TESTİS TORSİYONU MODELİNE *CERATONİA SİLİQUA* ETKİSİNİN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI" başlıklı uzmanlık tezinde Dr. Şahika YARDIM;

- Bu tezin kabulünden önce nerede ve ne kadarının yayınlandığını "Bilgilendirme" bölümünde belirtmiştir.
- Tezin hazırlanmasında katkısı olanları "Bilgilendirme" bölümünde eksiksiz olarak belirtmiştir.
- Bu tez ile ilgili çıkar çatışması olup olmadığını "Bilgilendirme" bölümünde belirtmiştir.
- Tez içerisinde başkalarının yayınlanmış veya yayınlanmamış çalışmalarından yapılan alıntılar için gerekli kaynakları açıkça belirtmiştir.
- Tez içerisinde başka kaynaklardan kopyalanmış olan kısımları tırnak içerisine alarak ve izin alınan kaynağı belirterek kullanmıştır.

Haziran, 2024 Dr. Şahika YARDIM

İmza: _____

BİLGİLENDİRME

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesinde hazırladığım bu uzmanlık tezinin kendi tarafımdan ve kendi sözcüklerimle yazılmış orijinal bir çalışma olduğunu ve bu tezde;

- Bu tezin hazırlanması sürecinde elde edilen veriler ile herhangi bir yerde sunum veya yayın yapılmamıştır.
- Bu tezin hazırlanmasında tez danışmanım Prof. Dr. Ünal Uslu, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu ve ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Elif Kervancıoğlu Demirci katkıda bulunmuştur.
- Bu çalışmada adı geçen ilaç, tıbbi cihaz ve laboratuvar malzemelerinin üreticileri ile bir çıkar ilişkim yoktur.
- Bu çalışmaya ait herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39543

Dr. Şahika YARDIM

TEŞEKKÜR

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na başladığım ilk günden itibaren desteğini hissettiğim, değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Ünal Uslu'ya

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden itibaren desteğini hissettiğim, bilgisine hayran olduğum, bizler için en iyisini isteyen, her sorunumda gönül rahatlığıyla fikrine başvurabildiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu'na,

Histoloji bilgimin temellerini atan, tecrübelerini hem akademik hem de sosyal açıdan gelişmem amacıyla benimle paylaşan, tez çalışmam sırasında önüme çıkan zorlukları birlikte aştığım değerli hocam ve danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif Kervancıoğlu Demirci'ye,

Eğitim süresince bana tecrübelerini aktararak destek olan Sayın Prof. Dr. Sibel Köktürk, Sayın Doç. Dr. Tuğba Kotil, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Ekiz Yılmaz'a

Tanıdığım için kendimi çok şanslı hissettiğim, hayatım boyunca arkadaşım olarak kalacak sevgili asistan arkadaşlarım Dr. Erva Seviç Yılmaz, Dr. Merve Keskin ve Msc. Fatma Beyza Sağ'a,

Uzmanlığa başladığım ilk günden itibaren kendi zamanından ve işinden feragat edip tecrübelerini paylaşan, gelecek için önerilerini esirgemeyen, öğrendiğim birçok şeyi kendisine borçlu olduğum Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hasan Serdar Mutlu'ya

Ne zaman kendimi kötü hissetsem bana desteğe koşan, güzel enerjileriyle beni ayağa kaldıran, sohbetlerine doyamadığım Dr. Serpil Telci, Msc. İlkay Özdemir, Msc. Sibel Doğan'a

Bu süreçte tanıdığım için çok memnun olduğum, şu an farklı yerlerde olsalar da desteklerini hep hissettiğim Dr. Feride Özdemir, Dr. Emel Usta, Dr. Aslı Erdoğan'a

Teknik desteğini benden esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarıyla ilgili tecrübesine sıklıkla başvurduğum kürsümüzün çok değerli, tecrübeli emekli teknisyeni Selahattin Ünal'a,

Elektron mikroskobu ile ilgili her şeyi bana öğreten, tezimde benden desteklerini esirgemeyen Ebru Akyön, Fadime Aktar ve Funda Onar'a,

Ne zaman desteklerine ihtiyacım olsa yardımıma koşan Gülcan Öztürk Altan, Arif Çoruk ve Alaaddin Taş'a

ÜYTE eğitimimde teorik ve pratik bilgilerini benle paylaşıp gelişmemi sağlayan Sayın Dr. Sibel Bulgurcuoğlu Kuran ve çok değerli arkadaşlarım Ayşe Altun, Kübra Nur Uzun ve Çiğdem Çelik'e,

İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Doç. Dr. Murat Dursun'a, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan değerli hocalarım Doç. Dr. Fatih Aydın, Prof. Dr. Canan Küçükgergin ve asistan arkadaşım Dr. İlayda Sözmen'e, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'na tezime verdikleri katkılardan dolayı,

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji ailesine,

Her zaman arkamda duran, zor zamanlarımda en büyük destekçilerim olan, onlara sahip olduğum için dünyanın en şanslı insanı hissettiğim sevgili ailem Mithat, Lerzan ve Mehmet Efe Yardım'a

Teşekkür ederim.

Dr. Şahika YARDIM

İÇİNDEKİLER

ONAY ..... **i**
YAZAR BİLDİRİMİ ..... **ii**
BİLGİLENDİRME ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **vi**
KISALTMALAR LİSTESİ ..... **ix**
TABLO LİSTESİ ..... **xi**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xxii**
ABSTRACT ..... **xxiv**
1. GİRİŞ ve AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. TESTİS ANATOMİSİ 4
2.2. TESTİS HİSTOLOJİSİ 5
2.2.1. Seminifer Tübüller 6
2.2.2. Spermatogenez 7
2.2.2.1. Spermatogonyal faz 7
2.2.2.2. Spermatosit fazı 7
2.2.2.3. Spermatid fazı (spermiyogenez) 8
2.2.3. Olgun Spermin Yapısı 10
2.2.4. Sertoli Hücreleri 11
2.2.5. Leydig Hücreleri 13
2.3. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ 13
2.3.1. Moleküler Kontrol 16
2.3.2. Testislerin İnişi 16
2.4. TESTİS TORSİYONU 19
2.5. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI 22
2.5.1. Oksidatif Stres 23
2.5.2. Apoptoz 24
2.5.3. İskemik Hasar ve HIF-1α 25
2.5.4. Makrofajlar ve İnflamatuar Yanıt 25

2.6. CERATONİA SİLİQUA 26
2.6.1. C. siliqua ve Erkek Üreme Sistemi 28
3. GEREÇ VE YÖNTEM 30
3.1. HAYVAN DENEYİ UYGULAMALARI 30
3.2. IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME 36
3.2.1. Histokimyasal Boyama 37
3.2.2.1. Hematoksilen-Eozin 37
3.2.2.2. Masson trikrom 38
3.2.2. İmmünohistokimyasal Boyama 39
3.2.2.1. Primer antikor uygulaması 40
3.2.2.1.1. Kaspaz-3 40
3.2.1.1.2. HIF-1α 40
3.2.1.1.3. CD68 40
3.2.1.1.4. SOD 40
3.2.1.1.5. Katalaz 40
3.3. ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELEME 40
3.4. BİYOKİMYASAL İNCELEME 41
3.4.1. Doku ve Kan Örneklerinin Hazırlanması 41
3.4.2. Doku Homojenizasyonu 41
3.4.3. Biyokimyasal Analizler 42
3.4.3.1. Glutatyon (GSH) düzeylerinin ölçümü 42
3.4.3.2. Malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçümü 43
3.4.3.3. ROS 43
3.4.3.4. AOPP 43
3.4.3.5. FRAP 44
3.4.4. ELISA Yöntemi 45
3.4.4.1. Testosteron 45
3.4.4.2. İnhibin B 45
3.4.4.3. AMH 45
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 46
3.6. ŞEMATİK TASARIM 46
4. BULGULAR 47
4.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR 47
4.1.1. Hematoksilen-Eozin 47

4.1.2. Masson-Trikrom 56
4.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR 60
4.2.1. Apoptoz Değerlendirmesi 60
4.2.2. İskemik Hasar Değerlendirmesi 65
4.2.3. İnflamasyon Değerlendirmesi 69
4.2.4. Antioksidan Gücün Değerlendirmesi 72
4.2.4.1. SOD 72
4.2.4.2. Katalaz 77
4.3. ELEKTRON MİKROSKOBU BULGULARI 81
4.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR 103
4.4.1. GSH 103
4.4.2. MDA 104
4.4.3. ROS 105
4.4.4. AOPP 106
4.4.5. FRAP 107
4.4.6. Testosteron 108
4.4.7. İnhibin-B 109
4.4.8. AMH 110
5. TARTIŞMA 112
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 118
KAYNAKLAR 119
EKLER 126
EK 1: ETİK KURUL KARARI 126
EK 2: İNTİHAL RAPORU 128

KISALTMALAR LİSTESİ

μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
nm	Nanometre
AMH	Anti-Mülleriyan Hormon
AOPP	İleri oksidasyon protein ürünü
CGRP	Kalsitonin geni ilişkili peptid
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DHH	Desert hedgehog
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent deneyi
FGF-9	Fibroblast büyüme faktörü-9
FRAP	Demir azaltıcı oksidan güç
FSH	Folikül Stimülan Hormon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSH	Glutatyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H_2S	Hidrojen Sülfür
hcg	İnsan koryonik gonadotropin
HCl	Hidroklorik asit
HIF	Hipoksi ile indüklenebilir faktör
HOCl	Hipoklorik asit
Insl-3	İnsülin-like peptid 3
IQR	Çeyrekler açıklığı
İ/R	İskemi-Reperfüzyon
İÜ HADYEK	İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
LH	Luteinize edici hormon
Lhx-1	Lim homeobox geni 1
LIF	Lösemi inhibe edici faktör
MDA	Malondialdehit
MIF	Mülleryan inhibe edici faktör
OH-	Hidroksil radikali
PBS	Fosfat tamponlu salin

ROS.....	Reaktif oksijen türleri
SF1	Steroidogenezis faktörü 1
SOD	Süperoksit dismutaz
SOX-9	SRY box 9
SRY.....	Seks belirleyici bölge
TGF-ß	Transforme edici büyüme faktörü beta
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme fakt

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: *C.siliqua*'nın Kimyasal İçeriği (97) 27
Tablo 3.1: Deney Grupları ve Uygulanan İşlemler 32
Tablo 3.2: Modifiye Johnsen Skorlama Sistemi 38
Tablo 3.3: GSH ölçümü için kör, standart ve deney gruplarının hazırlanması 42
Tablo 4.1: GSH seviyeleri 103
Tablo 4.2: MDA seviyeleri 104
Tablo 4.3: ROS seviyeleri 105
Tablo 4.4: AOPP seviyeleri 106
Tablo 4.5: FRAP seviyeleri 107
Tablo 4.6: Serum testosteron seviyeleri 108
Tablo 4.7: Serum İnhibin-B seviyeleri 109
Tablo 4.8: Serum AMH seviyeleri 110

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: İskemi/Reperfüzyon hasarı ve *C.siliqua'*nın beklenen etkisi. İ/R hasarının fizyopatolojisi şematize edilmiştir. *C.siliqua'*nın anti-apoptotik, anti-oksidan etkileri olabileceği, vazodilatasyona sebep olabileceği ve hormon parametrelerinde de testis fonksiyonu üzerindeki koruyucu etkisiyle iyileşme sağlayabileceği düşünülmüştür. 2

Şekil 2.1: Testis Anatomisi. Testisin sagittal kesitinin şematik gösteriminde genital kanal sistemleri görülebilmektedir (1). 6

Şekil 2.2: Spermatogenik Hücreler. Spermatogenik hücrelerin ardışık nesilleri şematize edilmiştir (1). 10

Şekil 2.3: Olgun Sperm Yapısı. Solda spermatozoon bölümleri şematize edilmiştir. Sperm başı, orta parçası ve esas parçasının özellikleri sağda detaylandırılmıştır (1). 11

Şekil 2.4: Primordiyal germ hücrelerinin göçü. Primordiyal germ hücrelerinin umblikal kese duvarından göçünün şematik gösterimidir. Gonadal kabartıların yeri (B), primordiyal germ hücrelerinin gelişen gonadal kabartılara göçü (C), gonadal kordonlar (D), farklanmış gonadlar ve paramezonefrik kanallar görülmektedir (2). 11

Şekil 2.5 : İnguinal kanalların oluşumu ve testislerin inişi. Testislerin inmeden önceki yeri (A), Prosessus vajinalisle birlikte testislerin inguinal kanala girişi (B ve C), testisin inişten sonraki yerleşimi (D), yenidoğanda testislerin konumu ve prosesus vajinalisin sapı aracılığıyla periton boşluğuna bağlı oluşu (E) ve 1 aylık infantta prosesus vajinalis sapının kapandıktan sonraki durumu ve karın duvarından uzayan tabakaların spermatik kordu sarması (F) şematize edilmiştir (2). 19

Şekil 3.1: Deney Tasarımı. Deney grupları ve gruplara uygulanan işlemler şematize edilmiştir. 1 haftalık hayvan deneyleri sürecinden sonra alınan doku ve kan örnekleriyle yapılan işlemler şekilde belirtilmiştir. (Biorender) 30

Şekil 3.2: Torsiyon İşlemi. Sıçanlara anestezi altındayken supin pozisyon verilmiş (A), midskrotal kesi açıldıktan sonra testin ve spermatik kord serbestleştirilmiştir (B), Spermatik kord 7200 döndürülerek torsiyon modeli uygulanmıştır (C ve D) 30

Şekil 3.3: Torsiyon İşlemi Sonrası Derinin Kapatılması. Torsiyon modeli oluşturulduktan sonra detorsiyona kadar geçecek olan sürede modelin devamlılığını sağlamak amacıyla torsiyone testis primer sütürle sabitleştirilmiş (A ve B), skrotum derisi kapatılmıştır (C ve D). 34

Şekil 3.4: Detorsiyon öncesi testisler. Detorsiyondan önce makroskopik olarak testisler hemorajik, nekrotik, koyu renkli izlenebildi. 35

Şekil 3.5: Kontrol ve İ/R Grubu Testisleri. Solda İ/R grubuna sağda ise kontrol grubuna ait çıkartılan testisler izlenmektedir. İ/R grubuna ait testisler koyu kırmızı renkte, hemorajik görülebildi. Kontrol grubuna ait testisler ise daha açık renkte, fizyolojik izlenebildi. 36

Şekil 4.1: Kontrol grubunun histolojik yapısı. Kontrol gruplarına ait testisler normal testiküler morfoloji göstermektedir. Spermatogenik seri hücrelerinin tamamının görüldüğü seminifer tübüllerin (asteriks) organizasyonu normaldir ve interstisyel hücreler (ok) seçilebilmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 10X. Ölçek 100 µm. 48

Şekil 4.2: Kontrol grubuna ait seminifer tübül kesiti. Sertoli hücreleri (uzun siyah ok), spermatogonyumlar (kısa siyah ok), spermatositler (kırmızı ok), erken spermatidler (mavi ok) ve geç spermatidler (yeşil ok) ile spermler (sarı ok) seçilebilmektedir. Leydig hücreleri (turuncu ok) interstisyel alanda bulunmaktadır. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 48

Şekil 4.3: C. siliqua grubunun genel histolojik yapısı. Normal testis yapısı izlenmektedir. Spermatogonyumlardan sperme kadar tüm spermatogenik seri hücrelerinin gözlenebildiği normal morfolojide seminifer tübüller (asteriks) ve interstisyel alanda bulunan Leydig hücreleri (ok başı) seçilebilmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 10X. Ölçek 100 µm. 49

Şekil 4.4: C. siliqua grubuna ait seminifer tübül kesiti. Spermatogonyumlar (siyah ok), spermatositler (kırmızı ok), spermatidler (mavi ok) ve olgun spermler (sarı ok) seçilebilmektedir. Tübüller morfolojik olarak normal görünümdedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 49

Şekil 4.5: İ/R grubunun genel histolojik yapısı. Germinal epitel atrofisine uğramış boş seminifer tübül (asteriks), dejenere germ hücrelerin formu olan çok çekirdekli dev hücreler (siyah ok), vakuol (yeşil ok) oluşumu, spermatogenik hücrelerin organizasyonunun bozulması ve tübül içine dökülmesi (mavi ok) izlenmektedir. Tübüllerde epitel ve tübül duvarı ayrışması görülmektedir (kırmızı ok). Hematoksilen-Eozin. Objektif 10X. Ölçek 100 µm. 50

Şekil 4.6: İ/R grubunda nekrotik seminifer tübüller. Seminifer tübüllerde normal spermatogenik hücre dizilimi izlenememektedir. Tübüllerin bir kısmı nekrotik görünümdedir (asteriks). Tübüllerde dev hücre oluşumu izlenmektedir (mavi ok). Tübüllerde seminifer tübül epiteli, tübül duvarından ayrılmıştır (siyah ok). Tübüller arası boşluk artmış, ödemli görünüm mevcuttur. Hematoksilen-Eozin. Objektif 10X. Ölçek 100 µm. 50

Şekil 4.7: Nekrotik seminifer tübüle ait kesit. Hipereozinofilik görünümdeki testis nekroza uğramıştır (asteriks). Spermatogenik seri hücreleri tübülün üst kısmı hariç tübülün geri kalanında seçilememektedir. Nekrotik tübül ve komşu seminifer tübüller normal morfoloji göstermemektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 51

Şekil 4.8: İ/R grubunda vakuol oluşumu ve dev hücreler. Boş tübüllerde spermatogenik seri hücre organizasyonu bozulmuş, sayıca azalmıştır. Dev hücre oluşumu izlenmektedir (siyah kısa ok) (A). Tübüllerde yaygın vakuol oluşumu (siyah uzun ok) ve dev hücreler (siyah kısa ok) gözlenmektedir (B). Hematoksilen-Eozin. Objektifler A:10X B:40X. Ölçekler A:100 µm B:50 µm 52

Şekil 4.9: Dev hücreler. Çok çekirdekli dev hücreler iskemi-reperfüzyon hasarı gruplarında sık görülmektedir (siyah ok). Spermatogonyumların (yeşil ok) ve spermatositlerin (mavi ok) seçilebildiği tübüller mevcuttur. Spermatidlere ve olgun spermlere rastlanılmamaktadır. Vakuol oluşumu izlenmektedir (kırmızı ok). Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 53

Şekil 4.10: İ/R grubuna ait seminifer tübül kesitinde piknotik çekirdekli hücreler, vakuol ve apoptotik cisimler. İskemi-reperfüzyon hasarına uğramış seminifer tübüllerde yer yer piknotik çekirdekli hücrelere (siyah ok) ve apoptotik cisimlere (kırmızı ok) rastlanmaktadır. İmmatür germ hücrelerinin lümen içine döküldüğü atipik lümen görünümü mevcuttur (asteriks). Vakuol oluşumu gözlenmektedir (mavi ok). Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 53

Şekil 4.11: İ/R grubunda konjesyona uğramış kan damarı. İ/R grubunda yer yer kan damarlarında ağır konjesyon izlenmektedir (kırmızı ok). Tübüllerde Sertoli hücreleri (siyah kısa ok), spermatogonyumlar (siyah uzun ok) ve az sayıda spermatosit (mavi ok) gözlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm 54

Şekil 4.12: İ/R+C.siliqua grubunun histolojik görünümü. Spermatogenik seri hücrelerinden spermatositlerin ve olgun spermlerin seçilebildiği tübüller mevcuttur (siyah asteriks). Tübüllerin bir kısmında immatür germ hücrelerinin lümene döküldüğü atipik görünümdedir (kırmızı asteriks). Spermatogenik seri hücrelerinin seçilemediği atrofik seminifer tübüller İ/R grubuna kıyasla sayıca az da olsa seçilebilmektedir (mavi asteriks). Hematoksilen-Eozin. Objektif 10X. Ölçek 100 µm. 54

Şekil 4.13: İ/R+C.siliqua grubuna ait seminifer tübül kesitleri. Farklı iki seminifer tübül kesitinde de Sertoli hücreleri (siyah uzun ok), spermatogonyumlar (siyah kısa ok), spermatositler (mavi ok) spermatidler (yeşil ok) ve olgun spermler (sarı ok) seçilebilmektedir. Her iki tübülün de organizasyonu normal yapıdadır (asteriks). Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm. 55

Şekil 4.14: Grupların Johnsen skorlarının karşılaştırılması. Anlamlı farklılık düzeyi (****) gösterilmektedir. Değerler ortalama ve SD (standart deviasyon) olarak verilmiştir. (****: $p<0.0001$) 56

Şekil 4.15: Kontrol grubu. Kontrol grubuna ait kesitte çok nadir ve hafif boyanmış seminifer tübül duvarı gözlenmektedir. Kontrol testisleri normal testiküler morfolojidedir (asteriks). Masson-Trikrom. Objektif 10X. Ölçek 100 µm.... 57

Şekil 4.16: Kontrol grubu seminifer tübülü. Kontrol grubuna ait seminifer tübül kesitinden seminifer tübül yapısı, hücrelerin organizasyonu seçilmektedir. Tübül epitelinde çok hafif boyanma mevcuttur (ok). Masson-Trikrom. Objektif 40X. Ölçek 50 µm 57

Şekil 4.17: C. siliqua grubu. Testis kapsülünün boyandığı izlenmektedir (mavi ok). Yer yer tübül duvarında yeşil boyanmalar gözlense de istatistiksel olarak anlamlı değildir. Tübüller normal morfolojidedir (asteriks). Masson-Trikrom. Objektif 10X. Ölçek 100 µm..... 58

Şekil 4.18: İ/R grubu. Tübüllerin organizasyonu bozulmuştur. Neredeyse bütün tübül duvarları fibrotiktir (siyah ok). Bazı tübüllerin tamamında fibrosiz mevcuttur (asteriks). Tübül duvarlarında ayrışma mevcuttur (mavi ok). Masson-Trikrom. Objektif 10X. Ölçek 100 µm. 58

Şekil 4.19: İ/R+C.siliqua grubu. Tübül yapıları ve organizasyonu hasar grubuna kıyasla kontrole yakındır. Yer yer dev hücreler (kırmızı) seçilmektedir. Tübül duvarlarında yeşil boyalı fibrosiz alanları azdır (siyah ok). Masson-Trikrom. Objektif 10X. Ölçek 100 µm..... 59

Şekil 4.20: Masson-Trikrom fibrosiz skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (**) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak verilmiştir. (*: $p<0.01$) ... 59

Şekil 4.21: Kontrol grubunda Kaspaz-3 boyanması. Kontrol grubuna ait testislerin bir kısmında kaspaz-3 boyanması izlenmemiştir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm 60

Şekil 4.22: Kontrol grubunda apoptoz. Kontrol grubuna ait testislerin bir kısmında ise spermatogonyumlarda (ok) hafif kaspaz-3 boyanması izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm 61

Şekil 4.23: C.siliqua grubunda Kaspaz-3 boyanması. İnterstisyel alanda ve tübüllerde pozitif boyanma izlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm 61

Şekil 4.24: İ/R grubunda Kaspaz-3 boyanması. İ/R grubunda seminer tübüllerde (asteriks) güçlü kaspaz-3 boyanması izlenmektedir. Ancak interstisyel alanda (siyah ok) pozitif kaspaz-3 boyaması gözlenmemiştir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm..... 62

Şekil 4.25: İ/R grubunda Kaspaz-3 boyanan hücreler. Leydig hücreleri (siyah ok) az sayıda testiste pozitif boyanmıştır (A): Spermatogonyumlar (kırmızı ok) kaspaz-3 ile güçlü boyanmışlardır (B). DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm 63

Şekil 4.26: İ/R+C.siliqua grubunda Kaspaz-3 boyanması. İnterstisyel alanda ve seminifer tübüllerde yoğun kaspaz-3 boyanması izlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm 64

Şekil 4.27: İ/R+C.siliqua grubunda apoptoz. Spermatogonyumlarda (siyah ok) ve spermatidlerde (yeşil ok) kaspaz-3 boyanması izlenmektedir ancak spermatositlerde (mavi ok) boyanma görülmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm 64

Şekil 4.28: Kaspaz-3 skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) ve (**) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (*: $p<0.05$; **: $p<0.01$) 65

Şekil 4.29: Kontrol grubunda HIF-1α. Seminifer tübüllerde spermatogonyumlarda hafif boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm 66

Şekil 4.30: Kontrol grubunda HIF-1α pozitif boyanan hücreler. Spermatogonyumlar (siyah ok) ve spermatositler (mavi ok) HIF-1α ile pozitif boyanmaktadır. İnterstisyel alanda pozitif boyanmış hücreler (yeşil ok) izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm 66

Şekil 4.31: C.siliqua grubunda HIF-1α boyanması. Spermatogonyumlar (siyah ok) ve spermatositler (mavi ok) pozitif boyanmaktadır. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm 67

Şekil 4.32: İ/R grubunda HIF-1α boyanması. Seminifer tübüllerde spermatogonyumlar (siyah ok) ve spermatositler (mavi ok) pozitif boyanmıştır; ancak interstisyel alanda boyanma gözlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm 67

Şekil 4.33: İ/R grubunda HIF-1α boyanması. İnterstisyel alanda (yeşil ok) boyanan hücrelerin izlendiği örnekler mevcuttur. Spermatogonyumlarda (siyah ok) ve spermatositlerde (mavi ok) boyanma izlenmektedir. Objektifler 40X Ölçekler 50 µm 68

Şekil 4.34: İ/R+C.siliqua grubunda HIF-1α boyanması. Spermatogonyumlar (siyah ok) ve spermatositler (mavi ok) HIF-1α ile pozitif boyanmaktadır. İnterstisyel alanda boyanma izlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm 68

Şekil 4.35: HIF-1α skorlaması. Gruplar arası anlamlı farklılık saptanmamıştır. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. 69

Şekil 4.36: Kontrol grubu interstisyel alanda CD68 immünohistokimyasal boyanma. İnterstisyel alan makrofaj infiltrasyonu açısından değerlendirildiğinde CD68 pozitif boyanma mevcuttur (ok). DAB-Hematoksilen. Objektif: 40X. Ölçek 50 µm 70

Şekil 4.37: C. siliqua grubunda CD68 immünohistokimyasal boyaması. İnterstisyel alanda pozitif boyanan az sayıda hücre tespit edilmiştir. DAB-Hematoksilen. Objektif: 40X. Ölçek 50 µm..... 70

Şekil 4.38: İ/R grubu grubu interstisyel alanda CD68 immünohistokimyasal boyanma. İnterstisyel alan makrofaj infiltrasyonu açısından değerlendirildiğinde yoğun CD68 pozitif boyanma mevcuttur (ok). DAB-Hematoksilen. Objektif: 40X. Ölçek 50 µm..... 71

Şekil 4.39: İ/R+C.siliqua grubu interstisyel alanda CD68 immünohistokimyasal boyanma. İnterstisyel alanda yer yer pozitif boyanmış hücreler seçilmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif: 40X. Ölçek 50 µm 71

Şekil 4.40: CD68 + Hücre Sayımı. Anlamlı farklılık düzeyi (**) ve (***) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (**: $p<0.01$, ***: $p<0.001$) 72

Şekil 4.41: Kontrol grubunda SOD. Seminifer tübüllerde yaygın pozitif boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm 73

Şekil 4.42: Kontrol grubunda SOD. Spermatogonyumlar (siyah ok), spermatositler (mavi ok) güçlü; spermatidler (yeşil ok) hafif olarak SOD ile pozitif boyanma göstermektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm 73

Şekil 4.43: C.siliqua grubunda SOD. Boyanma özelliği kontrol grubuyla benzerlik göstermektedir. Seminifer tübüller SOD ile güçlü boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm 74

Şekil 4.44: İ/R grubunda SOD. Lümen içine dökülmüş immatür germ hücrelerinde ve interstisyel alanda immünreaktivite gözlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm 74

Şekil 4.45: İ/R grubunda SOD. Spermatositlerde (siyah ok) ve lümen içine dökülmüş immatür germ hücrelerinde (mavi ok) hafif boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm..... 75

Şekil 4.46: İ/R+C.siliqua grubunda SOD. Seminifer tübüllerde ve interstisyel alanda SOD ile yoğun boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm 75

Şekil 4.47: İ/R+C.siliqua grubunda SOD. Spermatogonyumlar (siyah ok), spermatositler (mavi ok) ve spermatidler (yeşil ok) pozitif olarak SOD ile boyanmıştır. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm..... 76

Şekil 4.48: SOD skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) ve (**) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (*: $p<0.05$; **: $p<0.01$)... 76

Şekil 4.49: Kontrol grubunda Katalaz. İnterstisyel alanda (ok başı), spermatogonyumlarda (ok) katalaz ile pozitif boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm..... 77

Şekil 4.50: Kontrol grubunda Katalaz. Spermatogonyumlar (siyah ok) ve spermatositler (mavi ok) Katalaz ile pozitif boyanmaktadırlar. Spermatidlerde (yeşil ok) hafif boyanma izlenmektedir. İnterstisyel alanda (ok başı) katalaz ile immünreaktivite görülmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm 78

Şekil 4.51: C. Siliqua grubunda Katalaz. Spermatogonyumlar ve spermatositler pozitif boyanmaktadır (siyah ok). Olgun spermlerde (kırmızı ok) boyanma izlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm 78

Şekil 4.52: İ/R grubunda Katalaz. Seminifer tübüllerde ve interstisyel alanda boyanma izlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm 79

Şekil 4.53: İ/R grubunda Katalaz. Spermatogonyumlarda hafif boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm 79

Şekil 4.54: İ/R+C.siliqua grubunda Katalaz. İnterstisyel alanda (mavi ok) ve spermatogonyumlarda (siyah ok) güçlü boyanma izlenmektedir. Nadir sayıda gözlenen dev hücrelerde (yeşil ok) boyanma izlenmemiştir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm 80

Şekil 4.55: İ/R+C.siliqua grubunda Katalaz. Sertoli hücrelerinde (siyah ok) ve spermatositlerde (kırmızı ok) boyanma gözlenmemektedir. Spermatogonyumlar (mavi ok) ve spermatidler (yeşil ok) katalaz ile güçlü boyanmaktadırlar. Dev hücrede (sarı ok), hafif immünreaktivite izlenmektedir. İnterstisyel alanda da boyanma görülmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm 80

Şekil 4.56: Katalaz skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (*: $p<0.05$) 81

Şekil 4.57: Kontrol grubunda spermatogonyum ve sperm başının TEM görüntüsü. Bazal membran üzerine oturmuş spermatogonyum hücresi (Sg) ve sperm başı (kırmızı ok) izlenmektedir (A). İki spermatogonyum hücresi ve aralarındaki bağlantı kompleksleri (ok) görülmektedir (B). Büyütme 7500X 82

Şekil 4.58: Kontrol grubunda Sertoli hücresi ve normal yapılı mitokondri. Mitokondri (m) ve hücreler arası bağlantı kompleksleri görülmektedir (A). Sertoli hücresinin bazal membrana yakın konumlanmış büyük çekirdeği (S) ve normal yapıda mitokondri (m) izlenmektedir. Büyütme 10000X 83

Şekil 4.59: Kontrol grubunda spermatogenik seri hücreleri. Spermatid çekirdeği etrafında birikmeye başlayan akrozom (kırmızı ok), gelişmekte olan sperm boynunu çevreleyen mitokondriyonlar (siyah ok) ve sperm başı (ok başı) izlenmektedir (A ve B). Yuvarlak büyük çekirdekli ve spermatogenik serinin en büyük hücrelerinden spermatosit (Ss) görülmektedir (B).

Büyütme 7500X..... 84

Şekil 4.60: Kontrol grubunda spermatosit ve spermatidler. Normal morfolojide bir spermatosit (Ss) ve sperm hücre başları (kırmızı ok) izlenmektedir (A). Kep fazına girmiş, çekirdek etrafında akrozomal granüllerin (ok) birikmeye başladığı spermatid hücreleri görülmektedir (asteriks) (B). Büyütmeler A:7500X B:3000X..... 85

Şekil 4.61: Kontrol ve C.siliqua gruplarında Leydig hücreleri. Kontrol grubunun interstisyel alanında görülen normal morfolojide Leydig hücresi (ok) ve damar yapısı (asteriks) görülmektedir (A). C. siliqua grubuna ait görüntüde kontrol grubu ile benzer morfolojiye sahip Leydig hücreleri izlenmektedir (B). Büyütmeler A:3000X B:4000X 86

Şekil 4.62: C.siliqua grubunda spermatogenik seri hücreleri. Spermatogonyumlar (Sg), spermatositler (Ss) ve sperm başları (dikdörtgen) izlenmektedir. Büyütme:4000X 87

Şekil 4.63: C.siliqua grubunda elonge spermatid ve lümene bırakılan spermatozoa. Çekirdek etrafında akrozom yapısının oluşmakta olduğu elonge spermatidler (ok) ve Sertoli hücresine ait mitokondri izlenmektedir (A). Seminifer tübül lümenine bırakılan spermatozoa görülmektedir (B). Büyütme A:7500X B:4000X..... 88

Şekil 4.64: C.siliqua grubunda kep fazı. Çekirdeğin etrafında akrozomun birikmeye başladığı kep fazına giren spermatidler izlenmektedir (ok) Büyütme:4000X 89

Şekil 4.65: C. siliqua grubunda spermatogenik seri hücreleri ve gelişmekte olan sperm. Spermatogonyum (Sg) ve spermatosit (Ss) hücreleri izlenmektedir (A). Sperm boynunda mitokondri (ok) ve kep fazına girmiş spermatidler (St) görülmektedir (B). Büyütmeler A:5000X B: 4000X..... 90

Şekil 4.66: İ/R grubunda dev hücrelerin TEM görüntüsü. Multinükleer dev hücrelerle özellik kazanan hasar izlenmektedir (asteriks). Kep fazına benzer çekirdek etrafında akrozomal granül birikimi görülmektedir (B). Büyütme: 4000X ... 91

Şekil 4.67: İ/R grubunda dev hücre ve ödemli hücre. İki çekirdekli dev hücre (ok) ve ödemli büyük hücre (asteriks) izlenmektedir. Büyütme: 4000X..... 92

Şekil 4.68: Sertoli hücresinde vakuol ve ödemli hücreler. Apoptotik hücre (ok) ve Sertoli hücresinde vakuolize görünüm (dikdörtgen) izlenmektedir (A). Spermatogenik seri hücrelerde ödem (asteriks) ve hücreler arası ödem (siyah ok) görülmektedir (B). Büyütme: 3000X 93

Şekil 4.69: İ/R grubunda apoptoz. Apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir. Apoptotik bleblerin oluşmaya başladığı görülmektedir (A). Kromatoliz (ok) ve ödem izlenmektedir (B). Büyütme A:7500X B: 4000X..... 94

Şekil 4.70: İ/R grubunda vakuolizasyon. Kromatini düzgün kondanse olmamış, vakuolize sperm hücresi izlenmektedir (A). Vakuolize sitoplazmalı, hasarlı hücreler görülmektedir (B). Büyütme: A:6000X B:7500X 95

Şekil 4.71: İ/R grubunun TEM görüntüsü. Kromatin kondansasyonu hasarlı hücreler (asteriks), apoptotik hücreler (siyah ok) izlenmektedir (A): Hücrelerin sitoplazmasında ödem görünümü ve apoptotik hücreler (ok) yaygın izlenmektedir (B). Büyütme:5000X 96

Şekil 4.72: İ/R grubunda mitokondri TEM görüntüsü. Mitokondri kristalarında silinme oluşan Sertoli hücreleri izlenmektedir (ok) Büyütme A:20000X B:6000X 97

Şekil 4.73: İ/R grubunda makrofaj. İnterstisyal alanda makrofaj (ok) izlenmektedir. Büyütme: 6000X 98

Şekil 4.74: İ/R grubunda Leydig hücresi TEM görüntüsü. Vakuolize Leydig hücresi (Lc) ve interstisyel alanda fibrin yapısı (ok) izlenmektedir. Büyütme:5000X 98

Şekil 4.75: İ/R+C.siliqua grubunda spermatogenik seri hücreleri. Kontrol grubuna benzer yapı özelliklerine sahip spermatogonyumlar (Sg), spermatositler (Ss) ve spermatidler (St) izlenmektedir. Büyütme:2500X 99

Şekil 4.76: İ/R+C.siliqua grubunda spermatidlerin TEM görüntüsü. Elonge spermatid (ok) görülmektedir (A). Spermatid çekirdeklerinin etrafında akrozom (ok) oluşmaya başlamıştır (B). Büyütme: 4000X 100

Şekil 4.77: İ/R+C.siliqua grubunda spermlerin TEM görüntüsü. Sperm kuyrukları oluşmaya başlamıştır (dikdörtgen) ve sperm başları izlenmektedir (ok). Büyütmeler A:6000X B:4000X 101

Şekil 4.78: İ/R+C.siliqua grubunda sperm baş ve kuyruk yapıları. Sperm başları (dikdörtgen) ve sperm kuyrukları (ok) izlenmektedir. Büyütme: 4000X..... 102

Şekil 4.79: İ/R+C.siliqua grubuna ait mitokondri TEM görüntüsü. Mitokondri kristası seçilmektedir (ok). Yer yer kristada silinmeler izlenen hasarlı mitokondri de bulunmaktadır (dikdörtgen). Büyütme:15000X 102

Şekil 4.80: İ/R+C.siliqua grubuna ait Leydig hücrelerinin TEM görüntüsü. Normal morfolojiye sahip Leydig hücresi (Lc) izlenmektedir. Büyütme:4000X 103

Şekil 4.81: Gruplar arası GSH seviyelerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) ve (***) olarak gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak verilmiştir. (*: $p<0.05$; ***: $p<0.001$) 104

Şekil 4.82: Gruplar arası MDA seviyelerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık düzeyi (***) olarak gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak verilmiştir. (***: $p<0.001$) 105

Şekil 4.83: Gruplar arası ROS seviyelerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) ve (***) olarak gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak verilmiştir. (*: p<0.05; ***: p<0.001) 106

Şekil 4.84: Gruplar arası AOPP seviyelerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık saptanmamıştır. Değerler medyan ve IQR olarak verilmiştir. 107

Şekil 4.85: Gruplar arası FRAP seviyelerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık düzeyi (*), (**) ve (***) olarak gösterilmektedir. Değerler ortalama ve SD olarak verilmiştir. (*: p<0.05; **:p<0.01; ***: p<0.001) 108

Şekil 4.86: Gruplar arası serum testosteron düzeylerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık saptanmamıştır. Değerler ortalama ve SD olarak verilmiştir. 109

Şekil 4.87: Gruplar arası serum İnhibin-B düzeylerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) ve (**) olarak gösterilmektedir. Değerler ortalama ve SD olarak verilmiştir. (*: p<0.05; **: p<0.01) 110

Şekil 4.88: Gruplar arası serum AMH düzeylerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık saptanmamıştır. Değerler medyan ve IQR olarak verilmiştir. 111

ÖZET

DENEYSEL TESTİS TORSİYONU MODELİNE *CERATONİA SİLİQUA* ETKİSİNİN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Testis torsiyonu genellikle adolesanlarda ortaya çıkan, testiküler fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilen bir ürolojik acildir. Cerrahi müdahaleyle detorsiyone edilen testislerde reperfüzyona bağlı hasar ortaya çıkabilmektedir. Torsiyon sırasında arteriyel kan akımının bozulması sonucu iskemik hasar oluşurken; detorsiyondan sonra reperfüzyon sağlanır ancak artan serbest oksijen radikalleri dokuda oksidatif hasar oluşturur. *C.siliqua'*nın çeşitli infertilite modeli uygulanan sıçanlarda sperm sayısında artışa, hormonal parametrelerde düzelmeye neden olduğu, oksidatif stresi azalttığı bilinmektedir. Çalışmamızın amacı *C.siliqua* destek tedavisinin iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisini araştırmaktır.

8 haftalık Wistar albino sıçanlar kontrol (n=7), C.siliqua enjeksiyonu yapılan grup (n=7), testis torsiyon/detorsiyon modeli ile hasar oluşturulan grup (n=7) ve hasarı sonrası 1 hafta intraperitoneal *C.siliqua* enjeksiyonu uygulanan grup (n=7) olarak 4 gruba ayrılmıştır. 1 hafta sonra sakrifiye edilen hayvanların testisleri ışık mikroskobik, geçirimli elektron mikroskobik incelemeler için takip edilmiş ve biyokimyasal incelemelerde kullanılmıştır. Morfolojik inceleme için Hematoksilen-Eozin ve Masson-Trikrom boyamaları yapılıp Johnsen skoru yapılmıştır. İmmünohistokimyasal yöntemle CD68, kaspaz-3, HIF-1α, SOD ve Katalaz antikorları ile işaretlenip, semikantitatif ve kantitatif yöntemlerle değerlendirilmiştir. TEM ile ultrastrüktürel inceleme yapılmıştır. Dokuda GSH, MDA, ROS, AOPP ve FRAP ölçülmüş; serum örneklerinde ELISA yöntemiyle testosteron, AMH ve inhibin-B düzeyleri belirlenmiştir.

Işık mikroskobu ile histopatolojik değerlendirmede İ/R grubunda izlenen apoptotik, nekrotik değişikliklerin İ/R+C.siliqua grubunda daha az olduğu görüldü. İ/R+C.siliqua grubunun morfolojisinin İ/R grubuna göre daha iyi korunduğu bulundu ($p<0.0001$). İ/R

grubundaki apoptoz, *C.siliqua* tedavisi alan gruptan daha fazlaydı (p= 0.0390). Antioksidan enzimlerden SOD ve Katalazın immünohistokimya boyamalarında İ/R grubunda düşük bulunan ekspresyon seviyelerinin tedavi alan grupta daha yüksek olduğu saptandı (p=0.0385, p=0.0490). Ultrastrüktürel olarak İ/R grubunda mitokondri kristalarının silindiği, hücreler arası ödem ve hücrelerde vakuolizasyon olduğu, interstisyel alanda makrofaj, eritrosit varlığı izlendi ve Leydig hücre hasarı görüldü. İ/R+C.siliqua grubunda mitokondri kristalarının korunduğu, genel yapının ve Leydig hücre yapısının kontrole yakın olduğu izlendi. Biyokimyasal incelemede İ/R grubuna kıyasla İ/R+C.siliqua grubunda GSH ve FRAP seviyeleri anlamlı olarak yüksekti (p=0.0254, p<0.0001), ROS seviyeleri düşüktü (p=0.0463). Serum inhibin-B seviyeleri İ/R grubunda kontrole göre azdı (p=0.0018); ancak tedavi ile anlamlı fark saptanmadı (p=0.8288).

C.siliqua İ/R kaynaklı yapısal ve ince yapısal hasarı azaltmıştır. Apoptoz *C.siliqua* tedavisinden sonra daha az gözlenmiş; oksidatif stresi gösteren belirteçlerden SOD, Katalaz, GSH, FRAP'ta fark izlenmiştir. *C.siliqua'*nın testosteron ve diğer hormonlar üzerine etkisi saptanmamıştır ancak Leydig hücre hasarında tedavi ve hasar grubu arasında fark ince yapısal olarak görülmüştür. *C.siliqua'*nın içeriğindeki flavonoidler ve polifenollerin tedavi edici etkisi gelecekteki çalışmaların konusu olarak düşünülebilir. *C.siliqua'*nın sıçan modelinde iskemi/reperfüzyon hasarına karşı etkin olduğu bulunmuş, insanda ileri çalışmaların denenebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, *C. siliqua*, Oksidatif stres, Reperfüzyon hasarı, Spermatogenik seri hücreler, Testis torsiyonu, Testis.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CERATONIA SILIQUA ON THE EXPERIMENTAL TESTICULAR TORSION MODEL BY LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPY

Testicular torsion is a urological emergency that usually occurs in adolescents and has the risk of resulting in loss of testicular function. Damage due to reperfusion may occur in testicles detorsioned by surgical intervention. While ischemia-induced damage occurs as a result of disruption of arterial blood flow during twisting; reperfusion was achieved after detorsion, but increased free oxygen radicals cause oxidative damage to the tissue. It has been reported that *C.siliqua* causes an increase in sperm parameters, improve hormone levels and decrease oxidative stress in infertility models of rat. The aim of our study is to investigate the protective effect of *C.siliqua* against ischemia/reperfusion (I/R) injury. 8-week-old Wistar albino rats were divided into four groups as follows: control (n=7), group injected with *C. siliqua* only (n=7), group damaged by testicular torsion/detorsion model (n=7) and group that received IP *C.siliqua* injection for a week after T/D model(n=7). Animals were sacrificed after 1 week and their testes were followed for light microscope, transmission electron microscope and used for biochemical examinations. Hematoxylin-Eosin and Masson-Trichrome stainings were performed, and morphological examination and Johnsen score were performed. Immunohistochemically Caspase-3, HIF-1α, CD68, SOD and Catalase antibodies were marked and evaluated semiquantitatively and quantitatively. Ultrastructural evaluations were made with TEM. For biochemical examinations, GSH, MDA, ROS, AOPP and FRAP were examined in the tissue; testosterone, AMH and inhibin-B levels were determined in serum samples by ELISA method. In histopathological evaluation by light microscopy, apoptotic and necrotic changes observed in the I/R group were observed to be less in the I/R+C.siliqua group. It was found that the morphology of the I/R+C.siliqua group was better preserved than the I/R group ($p<0.0001$). Apoptosis in the I/R group was higher than in the group receiving *C.siliqua* treatment ($p = 0.0390$).). In immunohistochemistry staining of antioxidant enzymes SOD and Catalase, it was

determined that the expression levels, which were low in the I/R group, were higher in the treatment group ($p = 0.0385$, $p = 0.0490$, respectively). Ultrastructurally, in the I/R group, mitochondrial crista were erased, intercellular edema and vacuolization were observed, the presence of macrophages and erythrocytes in the interstitial area was observed, and Leydig cell damage was seen. It was noticed that in the I/R+C.siliqua group, mitochondrial cristae were preserved and the general structure and Leydig cell structure were close to the control In biochemical examination, GSH and FRAP levels were significantly higher in the I/R+C.siliqua group compared to the I/R group ($p=0.0254$, $p<0.0001$, respectively) and ROS levels were lower ($p=0.0463$). Serum inhibin-B levels were lower in the I/R group compared to the control ($p = 0.0018$); however, no significant difference was detected with treatment ($p = 0.8288$). *C.siliqua* reduced I/R-induced structural and ultrastructural damage. Apoptosis was observed less after *C.siliqua* treatment; differences were observed in SOD, Catalase, GSH and FRAP, which are markers indicating oxidative stress. The effect of C.siliqua on testosterone and other hormones was not determined but Leydig cell damage difference was seen ultrastructurally between I/R and I/R+C.siliqua groups. The therapeutic effects of flavonoids and polyphenols contained in C.siliqua can be considered as the subject of future studies. It was found that C.siliqua was effective against I/R injury in the rat model, and it was concluded that further studies could be tried in humans.

Key Words: Apoptosis, *C.siliqua*, Oxidative stress, Reperfusion injury, Spermatogenic series cells, Testicular torsion, Testis.

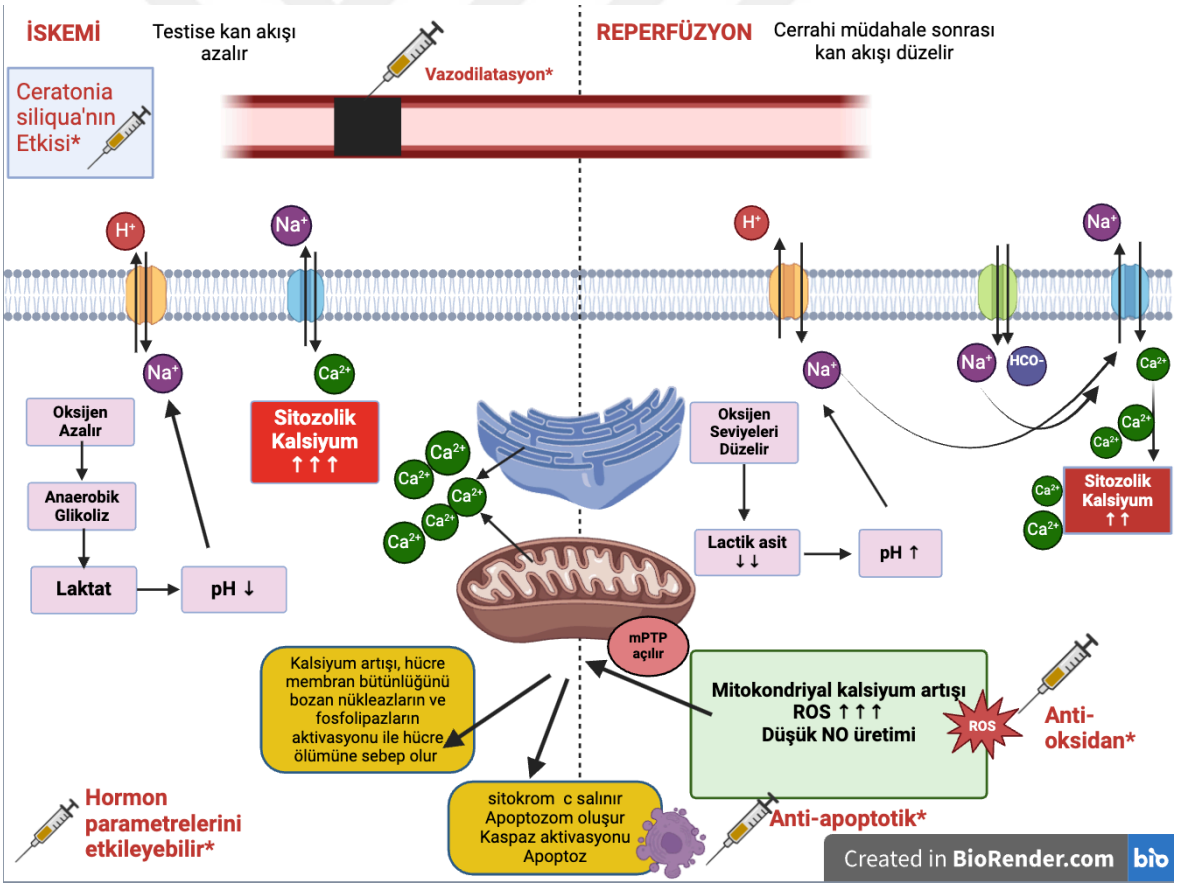
1. GİRİŞ ve AMAÇ

Ağrı ve ödem belirtileriyle ortaya çıkan bir ürolojik acil olan testis torsiyonu, spermatik kordun kendi etrafında dönmesi sonucunda testisin kanlanmasının bozulduğu; geç kalındığı durumlarda testiküler fonksiyonun kaybıyla sonuçlanan böylelikle hastaların infertilite ile karşı karşıya kalabileceği bir patolojidir (3, 4).

Testis torsiyonu her yaş grubunda görülebilmektedir. Erken çocukluk ve ergenlik döneminde insidans daha yüksektir. Görülme sıklığı, 18 yaşından küçük 100.000 erkekte yaklaşık 3.8'dir (5, 6). Torsiyon sonucu bozulan kan akımı nedeniyle testiste iskemik hasar oluşurken, reperfüzyon ile hasarın şiddeti daha da artar (5, 7). Yapılan çalışmalarda iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası seminifer tübül epitelinde germ hücre kaybı ve epitel bütünlüğünde bozulma olduğu bildirilmiştir (4, 5). Testis hasarının derecesi, spermatik kordun rotasyon derecesi ve süresiyle ilişkilidir (5, 8). Bu nedenle, testis torsiyonu sebebiyle gerçekleşen başvurularda acil cerrahi müdahale çok önemlidir. Semptomların başlamasını takip eden ilk 6 saat içinde cerrahi işlem uygulanan hastaların %90-100'ünün testisleri kurtarılabilir (8). Torsiyonun derecesine bağlı olarak, 6-12 saat içinde tedavi edilen olgularda %20-50, 12-24 saat içinde tedavi edilen olgularda ise %0-10 oranında testisler kurtarılabilir (3). Ancak başarılı bir cerrahi müdahaleye rağmen hastaların %40-60'ında testis atrofisi ve infertilite ilerleyen yıllarda gözlenmektedir (9).

Testiste detorsiyon ile reoksijenasyonun sağlanması hayati önem taşır; fakat kan akımının yeniden sağlanması reoksijenasyon hasarına yol açar. Ortamdaki reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı ve nötrofil aktivasyonu ile karakterize inflamatuar yanıt bu hasardan sorumludur. Testisler yoğun çoklu doymamış yağ asidi içeriklerinden dolayı ROS'a oldukça duyarlıdır. ROS sperm üretimini ve kalitesini düşürür; protein denatürasyonu, lipid peroksidasyonu, endotel ve DNA hasarı gibi zararlara sebep olur. Testis detorsiyonu sonucu erkek üreme sistemi üzerinde meydana gelen hasarı en aza indirmek için hipotermi uygulaması, tunika albuginea insizyonu, kimyasal ilaçlar ve bitki ekstraktları, PRP gibi farklı yaklaşımların denendiği birçok çalışma yapılmıştır (6). Günümüzde, klinikte kullanılmak üzere rutin bir medikal tedavi için henüz fikir birliği sağlanamamıştır ve bu nedenle uygun bir ajana hala ihtiyaç vardır (6, 10).

*Ceratonia siliqua (*Keçiboynuzu, Fabaceae) Akdeniz ülkelerinde yetiştirilen, yaprak dökmeyen bir ağaçtır (10). Flavonoidler, polifenoller gibi yüksek miktarda antioksidan bileşiklere ve güçlü bir radikal süpürücü aktiviteye sahiptir (11). Ayrıca anti-bakteriyel, anti-diyabetik, kanser önleyici etkileri bulunmaktadır. *Ceratonia siliqua;* busulfan kemoterapisi kaynaklı infertil farelerde sperm kalitesi, biyokimyasal parametreler, germinal epitel kalınlığı ve testosteron seviyelerinde iyileşme sağlamıştır (10). Doksurubisin verilen sıçanlarda yapılan bir çalışmada, *Ceratonia siliqua* verilen grupta testis ağırlığı, Leydig hücre sayısı, spermatogonyum, spermatosit, spermatid, testosteron seviyelerinde anlamlı bir yükselme olduğu gösterilmiştir. Bu durumun *Ceratonia siliqua'nın* antioksidan ve antiapoptotik özelliğinden kaynaklandığı hipotezi oluşturulmuştur (12). Daha önce kemoterapötiklerin sebep olduğu hasara karşı etkinliği gösterilmiş olan *Ceratonia siliqua'*nın testis torsiyonunun patogenezindeki aşamaların birçoğuna etki edeceğini ve iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarını azaltacağını düşünülebilir ve araştırılması gerekmektedir.



Şekil 1.1: İskemi/Reperfüzyon hasarı ve *C.siliqua'*nın beklenen etkisi. İ/R hasarının fizyopatolojisi şematize edilmiştir. *C.siliqua'*nın anti-apoptotik, anti-oksidan etkileri olabileceği, vazodilatasyona sebep olabileceği ve hormon parametrelerinde de testis fonksiyonu üzerindeki koruyucu etkisiyle iyileşme sağlayabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmanın amacı; insanlarda genç erişkinlerde görülen testis torsiyonuna benzer şekilde genç erişkin sıçanlarda literatürdeki standart yöntemle testis torsiyonu oluşturularak detorsiyon öncesi verilen *Ceratonia siliqua* ekstresinin testis hasarını engelleyici etkisini araştırmaktır. Testis torsiyonunun tedavisi olan acil cerrahi müdahaleye ek olarak yeni bir medikal ajanın klinik kullanım için alternatif olarak belirlenmesinin, cerrahiye zaman kazandırmak ve geç kalınan durumlarda olası geri dönüşü olmayan etkileri geciktirmek açısından önemi bulunmaktadır. Rutinde kolay uygulanabilecek ve rahat erişilebilecek, maliyeti uygun bir tedavi eki seçeneğinin kliniğe ve literatüre kazandırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİS ANATOMİSİ

Uzunluğu 3-5 cm, genişliği 2-3 cm olan testisler skrotumda yerleşim gösteren erkek üreme organıdır. En dışta tunika vajinalisin visseral yaprağı, ortada kollajen ve düz kas içeren tunika albuginea ve içte de vasküler yapılardan zengin tunika vasküloza olmak üzere 3 tabaka ile sarılıdır (13). Testisi çevreleyen peritoneal bir kese olan tunika vajinalisin pariyetal ve visseral olmak üzere iki tabakası bulunur. Bu tabakalar arasında bir miktar seröz yapıda sıvı mevcuttur. Sperm ve testosteron üretiminde görevli olan testisler spermatik kord ile skrotumda asılıdır (14). Testisler, alt uçlarından da gubernakulum kalıntısı olan skrotal ligament ile sabitleştirilmiştir. Sol testis, sağ testise kıyasla daha aşağı yerleşimlidir (13).

Testisin beslenmesinde görev alan sağ ve sol testiküler arterler; abdominal aortanın anterolateralinden, renal arterlerin altından çıkar. Üreterleri ve dış iliak arteri geçerek derin inguinal halkadan girerler. Yüzeyel inguinal halkadan çıktıktan sonra testislere spermatik kord içinde ulaşırlar. Testiküler arter vücutta en düşük basınca sahip arterlerden biridir (14). Testiküler arter testis kan akımının yaklaşık 2/3'ünü sağlamaktadır. Testis orta polünün posteriorunda testise girer ve alt polde deferansiyel ve kremasterik arterlerle; üst polde ise deferensiyel arterle anastomoz yapar. Testis kan akımının 1/6'sını karşılayan kremasterik arter eksternal iliak arterin bir dalı olan inferior epigastrik arterden çıkar. Esas olarak tunika vajinalisin beslenmesinden sorumludur. Deferensiyel arter, internal iliak arterin bir dalı olan inferior vezikal arterden köken alır. Testis dışında esas olarak vas deferens ve epididimisin arteriyel beslenmesinde görev alır (15).

Testis ve epididimisten çıkan venöz damarlar, ağ yapısı oluştururlar. 8-12 damardan oluşan bu ağ pampiniform venöz pleksus adını almaktadır. Bu venöz pleksus testiküler arterin de etrafını sarmaktadır. Damar yapılarının bu şekilde konumlanması testisin termoregülasyonuna katkı sağlamaktadır. Pampiniform pleksus, spermatik kord içinde inguinal kanaldan geçerek abdomene çıkar. Abdomende sağ ve sol testiküler venleri oluşturur. Sağ ve sol taraflı testislerin venöz drenajında farklılık bulunmaktadır. Sağ testisten pampiniform pleksusla toplanan venöz kan sağ testiküler vene drene olur. Sağ testiküler ven de inferior vena cavaya dökülmektedir. Sol testiste ise venöz kan sol renal vene açılan sol

testiküler vene drene olmaktadır (14). Kremasterik ven, deferensiyel ven ve gubernakular ven de testis venöz drenajına katkıda bulunan venlerdendir (16).

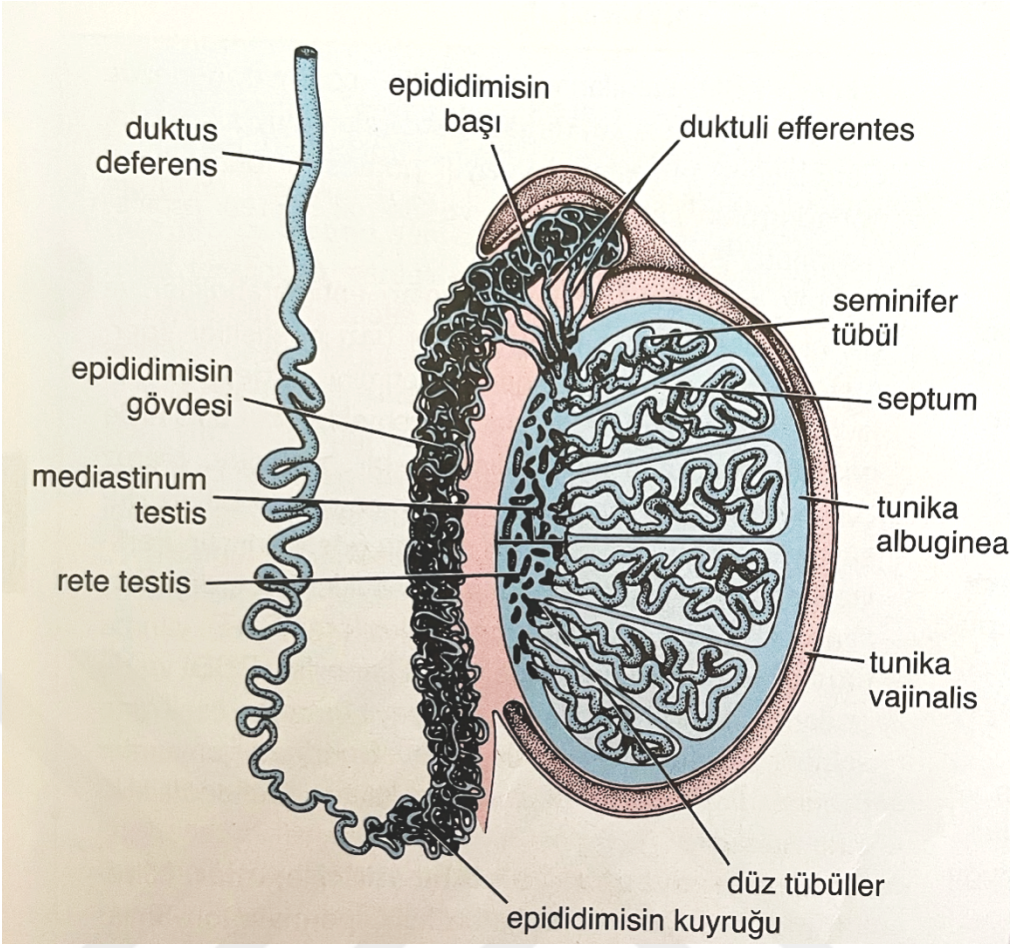
Testisin lenfatik drenajı sağ ve sol lomber ile preaortik lenf düğümlerine yaklaşık olarak LI-LII seviyesinde gerçekleşmektedir (17).

Testiküler arter etrafında bulunan testtiküler pleksus T10-T11 segmentinden sempatetik lifleri, visseral afferent lifleri ve vagal parasempatetik lifleri içermektedir (14). Bu lifler testiküler arteri takip ederek testise ulaşırlar. Torasik ve splanknik sinirlerin çıktığı T5-T12 seviyesi ağrı iletimiyle ilgili spinal kord seviyesidir. Genitofemoral sinirin genital dalı kremaster kasını innerve eder. İlioinguinal sinir ise penis kökünün derisi ile skrotum üst kısmını innerve eder (18).

2.2. TESTİS HİSTOLOJİSİ

Vücudun dışında yer alan skrotum içerisinde bulunan oval şekilli bir organ olan testis, tunika albuginea adı verilen kalın bağ dokusundan bir kapsüller çevrilidir (1, 19). Testisler anterior abdominal duvarın devamlılığında skrotum içine uzanan muskulofasiyel kesenin ucunda asılı olarak bulunur. Spermatik kord ile abdominal duvara bağlı bulunan testisler skrotal ligamentler de skrotuma bağlanmışlardır (1). Testisi çevreleyen kapsül, testis arka yüzünden kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Kan damarları, lenf damarları ve genital boşaltım kanalları testis içine giriş-çıkışlarını mediastinumdan gerçekleştirir. Kapsülden testis içine doğru giren bağ dokusu uzantıları septum adını alır ve testisi 250-300 adet lobüllere ayırır (20). Her lobül sayıları 1-4 arası olan seminifer tübüllerden ve tübüllerin arasında interstisyum adını verdiğimiz bağ dokusu yapısındaki stromada bulunan Leydig hücrelerinden oluşur (19).

34°C sperm üretimi için gerekli olan sıcaklıktır. Bu sıcaklığın skrotumda korunması için çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Testisin kanlanmasını sağlayan abdominal aortanın bir dalı olan testiküler arter, testisten toplanan kanı içeren pampiniform venöz pleksusla çevrelenmiştir. Kan damarlarının anatomik olarak bu şekilde düzenlenmesi karşılıklı ısı değişimine olanak verir; venöz pleksus arterdeki daha sıcak kanın testise girmeden soğutulmasını sağlar. Skrotumdan terleme ile de ısı kaybı gerçekleşir. Spermatik kordda bulunan, lifleri internal oblik kastan kaynaklanan kremaster kaslarının kasılmasıyla testisler vücuda yaklaştırılır; gevşemesiyle de testisler vücuttan uzaklaştırılır. Sıcaklık düştüğünde de skrotumdaki ince düz kas yaprağı olan dartos kası kontraksiyona uğrar. Bu mekanizmalar da testis sıcaklık kontrolü için önemlidir (1, 19).



Şekil 2.1: Testis Anatomisi. Testisin sagittal kesitinin şematik gösteriminde genital kanal sistemleri görülebilmektedir (1).

2.2.1. Seminifer Tübüller

Testisler günde ortalama $2x10^8$ sayıda sperm üreten sayıları 250-1000 arasında değişiklik gösteren seminifer tübüllerden oluşmaktadır. Seminifer tübül çapı yaklaşık 150-250 μm, uzunluğu ise 20-70 cm arasında değişkenlik göstermektedir. Bir testisteki tübülleri uç uca eklediğimizde yaklaşık uzunluğu 250 metredir (19). Seminifer tübüllerin uçları mediastinuma yakındır. Bu kısımda tübüller kısa ve düz olduğundan düz tübül adını alır. Mediastinum içinde bulunan rete testise ile devam eder. Rete testis de duktuli efferentes ve epididimise üretilen spermlerin geçişi için bağlantı sağlar (1, 19).

Seminifer tübül epiteli özelleşmiş çok katlı epiteldir; germinal epitel olarak adlandırılır. Tunika propriya adı verilen peritübüler doku tabakasında 3-5 sıra halinde bulunan miyoid hücreler ve kollajen fibriller bulunur. Miyoid hücreler bol miktarda aktin filament içermeleri sebebiyle düz kas benzeri özellik gösterirler. Bu hücrelerin ritmik kasılmalarıyla oluşan peristaltik dalgalar, üretilen spermatozoa ile testiküler sıvının seminifer tübüllerden boşaltım kanallarına iletimini sağlar (21). Yaşlılarda tunika propriya

tabakası kalınlaşır, sperm üretim hızı düşer ve seminifer tübül boyutlarında azalma meydana gelir (1).

Germinal epiteli oluşturan iki tip hücre bulunmaktadır.

1. Sertoli hücreleri: Büyük ve bölünmeyen hücrelerdir. Gelişmekte olan sperm öncü hücrelerine mekanik ve metabolik destek sağlarlar.
2. Spermatogenik seri hücreleri: Yaklaşık 10 hafta süren döngüde öncül hücrelerden olgun sperm hücreleri oluşur. Kök hücrelerin mitoz ve mayoz bölünmelerinin gerçekleştiği spermatogenez aşaması ve spermatidlerin olgun spermlere farklılaşması olan spermiyogenez adı verilen iki aşama sonucunda haploid erkek germ hücresi oluşmuş olur (19).

2.2.2. Spermatogenez

Spermatogonyumdan sperm gelişimine spermatogenez adı verilir. Üç faz altında incelenebilir.

2.2.2.1. Spermatogonyal faz

Kök hücrelerin bölündüğü fazdır. Hücreler mitoz bölünerek hem kendi yerlerine geçecek olan hem de sperm üretimi için diğer fazlara devam edecek olan hücreleri oluşturur (1). Progenitör hücre olan spermatogonyumların bölünmesi ile spermatogenez başlar. Spermatogonyumlar küçük ve yuvarlak hücrelerdir. Bazal membranın üstünde yer alırlar. Sertoli hücreleri ile yakın ilişki halindedirler. Spermatogonyum şeklindeki ve boyanma özelliklerindeki farklılıklar aracılığıyla farklı evrelerdeki spermatogonyumlar tanımlanır (19). Tip A koyu spermatogonyumlar kök hücre özelliği gösterirler. Yoğun bazofilik, oval nükleuslu hücrelerdir. Mitoz bölünme sonrasında kendileri gibi kök hücre kalacak olan hücreleri veya tip A açık spermatogonyumları üretirler. Tip A açık spermatogonyumlar sperm üretimini başlatacak olan hücrelerdir. Arka arkaya geçirdikleri mitoz bölünmeyle sayılarını arttırıp Tip B spermatogonyumlara farklılaşırlar. Tip B spermatogonyumlar kromatini yoğunlaşmış, yuvarlak çekirdekli hücrelerdir (1).

2.2.2.2. Spermatosit fazı

Tip B spermatogonyumlar bir mitoz bölünme geçirir ve büyüyerek ökromatik çekirdekli primer spermatositleri oluşturacak olan iki hücreyi meydana getirir. Primer spermatositler spermatogenik seri hücreleri arasında en büyük olanlardır (1, 19). Spermatosit fazında mayoz bölünmeyle primer spermatositlerden spermatidler oluşacak, kromozom sayısı ve DNA miktarı azalacaktır.

Primer spermatosit mayoz bölünmeye girmeden önce DNA'sını replike eder. Bunun sonucunda normal sayıda kromozom (2n) ve iki katı miktarda DNA (4d) bulundururlar. Mayoz I sonunda kromozom sayısı ve DNA miktarı yarıya düşürülür (n/2d); sekonder spermatositler üretilir. Mayoz II sonunda ise haploid (1n) sayıda kromozom içeren ve her kromozomda tek kromatid (1d) olan spermatidler oluşmuş olur (1).

Mayoz I sırasında dört kromatidden oluşan ve tetrad olarak adlandırılan homolog kromozomlar arasında crossing-over adı verilen genetik materyal değişimi olur. Genetik çeşitliliğin sağlanmasında önemli bir basamaktır. Spermatositlerden üretilen dört spermatid de birbirinden farklı genetik materyal içerir. Homolog kromozomların ayrılarak hücrenin farklı kutuplarına hareket etmesi de rastgele gerçekleşir. Bu düzen de genetik çeşitliliğe katkı sağlayan bir başka etmendir (1).

Birinci mayotik bölünme sonu oluşan sekonder spermatositler interfazda kısa süre kalıp hızlıca ikinci mayoz bölünmeye girdiklerinden testis preparatlarında görülmeleri zordur. Mayoz II'nin tamamlanması ile haploid hücreler olan spermatidler meydana gelir (19). Yuvarlak ve açık renkli çekirdekleriyle erken spermatidler; silindirik şekilli yoğun çekirdekleri ile ayırt edilen geç spermatidler olarak iki farklı tipte görülebilirler (20).

2.2.2.3. Spermatid fazı (spermiyogenez)

Spermatidlerin oluşmasından spermatogonyumların son bölünmesine kadar yaklaşık 2 aylık bir süre geçer. Bu süre boyunca çeşitli hücresel olaylar ve değişiklikler gerçekleşerek spermatidler olgun spermlere farklılaşır. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Hücreler spermatogenezde olduğu gibi spermiyogenez sürecinde de Sertoli hücresinin membranına özel bağlantılarla tutunmuş haldedir.

Spermiyogenez sürecinde gerçekleşen olaylar: Akrozom oluşumu, çekirdek yoğunlaşması ve uzaması, flagellum gelişimi, sitoplazmanın büyük kısmının kaybolmasıdır. Sürecin sonunda olgun spermatozoon oluşmuş olur. Spermlerin; Sertoli hücre yüzeyinden tübül lümenine bırakılmasıyla süreç tamamlanır (19).

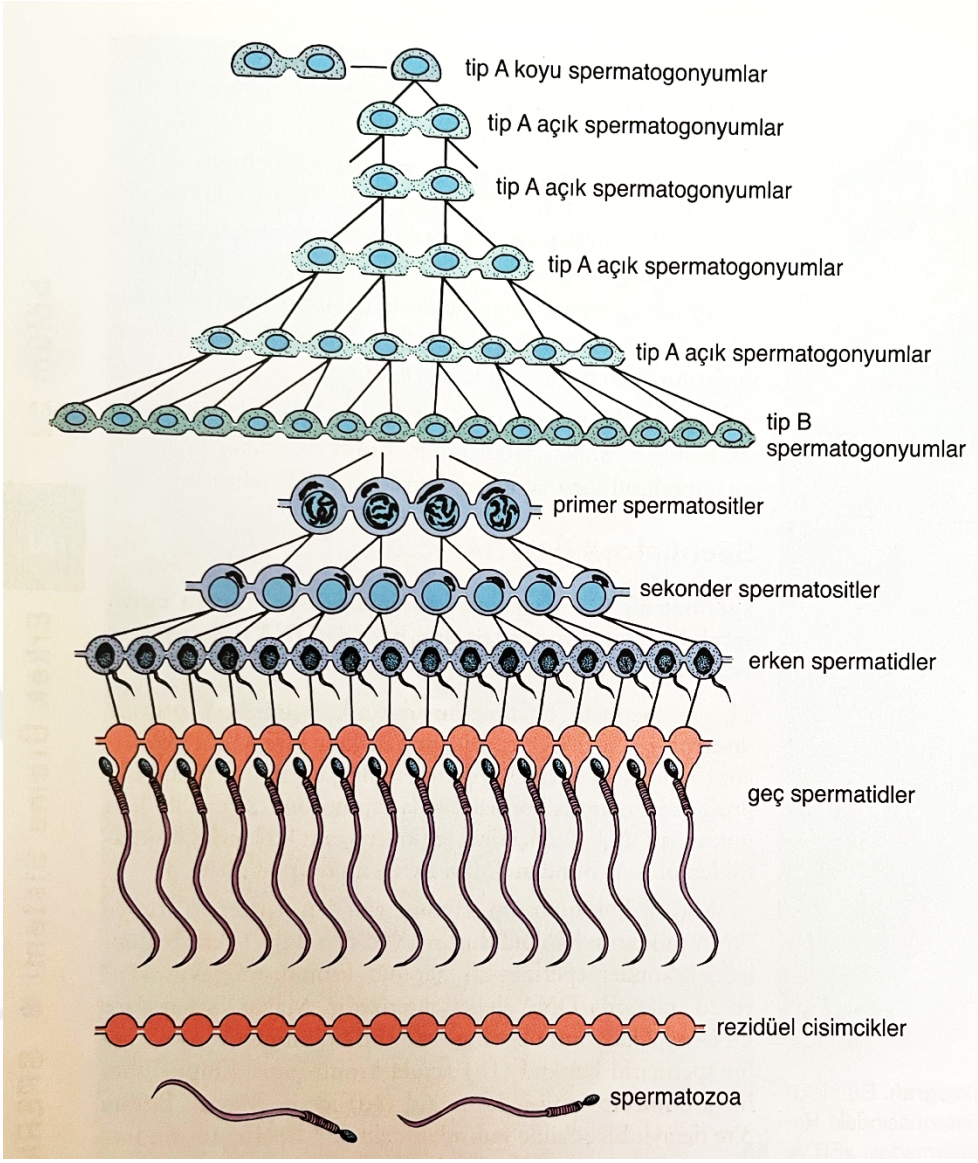
Spermiyogenez 4 evreye ayrılmıştır:

1. Golgi Fazı: Golgi kompleksinden gelen hidrolitik enzimler içeren proakrozomal veziküller birleşerek çekirdeğin bir ucunda tek katlı bir zarla sınırlı akrozomal başlığı oluştururlar. Akrozomal vezikülün bulunduğu konum spermin ön kutbunu belirler. Sentriyoller arka kutba giderek plazma membranıyla dik açı yapar. Sentriyollerden biri flagella aksonemini oluşturmaya başlar.
2. Kep Fazı: Akrozomal başlık çekirdeğin yarısını kaplayacak şekilde yayılır.

Oluşan bu yeni şekle akrozomal kep adı verilir. Nükleus içeriği de bu fazda yoğunlaşır.

3. Akrozom fazı: Gelişmekte olan spermin başı Sertoli hücresine gömülüdür. Aksonemi ise tübül lümenine doğru uzanmaktadır. Hücre çekirdeği yoğunlaşarak uzar ve yassılaşır. Flagellum gelişimini başlatmış olan sentriyoller, çekirdeğin arka yüzüne geri taşınır ve çekirdekteki oluğa tutunur. Modifiye olarak gelişmekte olan spermin boyun bölgesini oluştururlar. Nükleus ve flagellumu birleştirdiği için bağlantı parçası da denmektedir. Kuyruk olarak gelişen flagellumun proksimalinde de mitokondriyonların birikmesiyle sperm kuyruğunun orta parça adı verilen bölgesi oluşur. Orta parçada spermin hareketi için gerekli ATP üretimi gerçekleşir. Orta parçanın distalinde fibröz kılıf, kuyruğun esas parçasını çevreler. Fibröz kılıfın dışında kalan en distaldeki kısma ise son parça adı verilir.
4. Olgunlaşma Fazı: Hücreler arası köprülerin kaybolduğu, fazlalık olan sitoplazmanın artık cisim olarak atıldığı evredir. Rezidüel cisimcik de denen artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Olgunlaşmış ancak işlevi ve hareketi olmayan sperm tübül lümenine atılır. Sperm hücreleri hareketini epididimiste kazanır (1, 19).

Hücre bölünmesinin son aşaması olan sitoplazmik bölünme sadece kök hücre görevi olan tip A koyu spermatogonyumlarda gerçekleşir. Diğer spermatogenik hücrelerde hücre bölünmeleri ve sperme farklılaşma sürecinde hücreler arası köprüler bulunmaktadır. Bu bağlantılar; mitoz ve mayoz bölünmeler sırasında hücreler arası haberleşmenin gerçekleşmesini, hücrelerde meydana gelen bölünme ve farklılaşmaların uyumlu ilerlemesini sağlar. Spermiyogenezin olgunlaşma fazında spermatozoonlar epitelden serbestleşirken bu bağlantılar kopar, hücresel köprüler kaybolur. Karakteristik olan bu hücresel köprüler rezidüel cisimlerde kalmaya devam eder (1, 19).

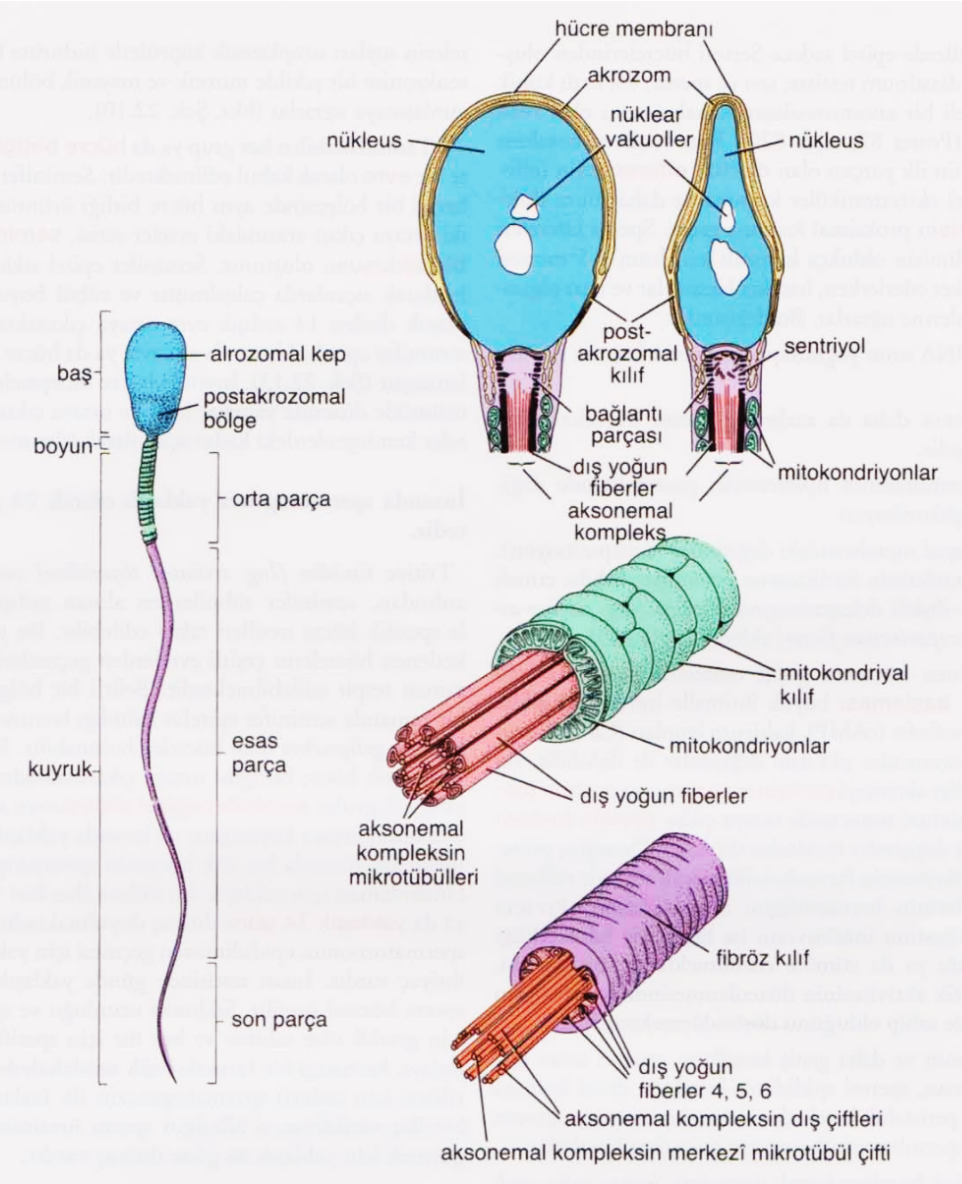


Şekil 2.2: Spermatogenik Hücreler. Spermatogenik hücrelerin ardışık nesilleri şematize edilmiştir (1).

2.2.3. Olgun Spermin Yapısı

İnsan sperminin boyu yaklaşık 60 μm uzunluğunda, yassı ve sivri sperm başının boyutları 4,5x3x1 μm'dir. Akrozomal kepte hyaluronidaz, asit fosfataz, nöraminidaz ve akrozin bulunur. Akrozomal enzimler, sperm oosit pellusidasını delerken görev alır. Spermin oosite temas etmesiyle bu enzimlerin salınması akrozomal reaksiyonun ilk aşamasıdır. Bu reaksiyon sayesinde oosite başka spermlerin penetrasyonunun önüne geçilir.

En kısa parçası olan boyun sentriyolleri içerir. Sperm kuyruğu üç bölümden oluşur. Orta parçada mitokondriyonlar bulunur. Yaklaşık 40 μm uzunluğundaki esas parça aksonomel kompleks ve fibröz kılıfı içerir. Son parça ise sadece aksonemal kompleksi içeren 5 μm'lik bölümdür (1).



Şekil 2.3: Olgun Sperm Yapısı. Solda spermatozoon bölümleri şematize edilmiştir. Sperm başı, orta parçası ve esas parçasının özellikleri sağda detaylandırılmıştır (1).

2.2.4. Sertoli Hücreleri

Uzun prizmatik epitel hücreleri olan Sertoli hücreleri seminifer tübül bazal laminasından lümene kadar uzanan hücrelerdir. Spermatogenik seri hücrelerinin tamamı Sertoli hücreleri ile ilişkili olarak bulunur. Sertoli hücreleri, spermatogenik seri hücrelerinin yüzeyine tutundukları destek hücreleridir. Sertoli hücre çekirdeği tipik olarak oval veya üçgen şeklindedir ve ökromatik olarak boyanır. Çekirdekçikleri belirgindir. Sitoplazmasında bol granülsüz az miktarda ise granüllü endoplazmik retikulum, gelişmiş Golgi kompleksi, fazla sayıda mitokondri, lizozom, lipid damlacıkları, glikojen granülleri ve filamentler bulunur. İnsanda, Sertoli hücrelerinin bazalinde inklüzyon cisimcikleri (Charcot-Böttcer) görülür (1).

Sertoli hücreleri puberteden önce seminifer tübüllerde sayıca en baskın hücrelerken, puberteden sonra seminifer tübüldeki hücrelerin %10'unu oluştururlar. Puberteden sonra bölünme özelliklerini yitirirler.

Komşu Sertoli hücreleri birbirlerine özel bağlantı kompleksleriyle bağlanır. Bu bağlantı kompleksleri iki sitoplazmik komponentle karakterizedir: Hücre bağlantı bölgesinde plazma membranına paralel yassılaşmış düz endoplazmik retikulum sisternası uzanır. Düz endoplazmik retikulum sisternası ile plazma membranı arasında aktin filament demetleri bulunur. Sertoli hücresi ile spermatidler arası da benzer bir bağlantı kompleksi bulunmakla birlikte sıkı bağlantılar yoktur. Sertoli hücrelerinin kendi arasında oluklu bağlantılar, spermatogenik seri hücreleri ile arasında desmozom benzeri bağlantılar ve Sertoli hücresiyle bazal lamina arasında hemidesmozomlar bulunur (19, 22).

Sertoli hücrelerinin kendi arasındaki bağlantı kompleksi, seminifer tübülleri bazal ve adluminal adını verdiğimiz iki bölmeye ayırır. Bazal kompartmanda spermatogonyumlar ile erken primer spermatositler bulunur. Olgun spermatositler ve spermatidler bağlantı kompleksinin luminal tarafında yer alır. Tip B spermatogonyumlardan mitozla üretilen erken spermatositlerin bağlantı kompleksinden geçerek luminal kompartmana hareketlenmesi gerekmektedir. Mayoz ve spermiyogenez luminal kompartmanda gerçekleşmektedir (1).

Sertoli hücrelerinin önemli görevlerinden biri sıkı bağlantılar ile fiziksel kompartmanlaşmaya ek olarak kan testis bariyerini oluşturmaktır. Plazma proteinleri ve dolaşımdaki antikorlar tübüllerin içine giremez. Sertoli hücrelerinin salgısı seminifer tübüllerde yüksek konsantrasyonlardadır ve spermatogenik seri hücreler için gerekli olan mikroçevre bu sayede sağlanmış olur. Bu bariyerin en önemli görevi spermatogenik hücreleri vücudun otoimmün saldırısından korumaktır. Haploid germ hücreleri genetik olarak farklı olduğundan ve immün sistem tarafından hedef olma potansiyeli taşıdığından bu bariyerle izole edilmesi önemlidir (1, 19, 21).

Sertoli hücrelerinin ekzokrin ve endokrin salgı görevi de bulunur. Spermlerin seminifer tübül boyunca ilerlemesini kolaylaştıracak proteinler, laktat ve iyonlardan zengin sıvı dışında androjen bağlayıcı protein, inhibin, aktivin gibi faktörler de salgılamaktadır (20). Androjen bağlayıcı protein testosteron konsantrasyonunun seminifer tübül luminal kompartmanında yoğunlaşmasını sağlar. İnhibin, anteriyor hipofizden folikül stimulan hormon (FSH) salgılanmasını inhibe etmekle görevlidir. Aktivin ise inhibinle antagonistik olarak çalışmakta; FSH salınımını arttıran etki göstermektedir. Sertoli hücrelerinden Müllerian-inhibe edici faktör (MIF), plazminojeni aktif plazmine çeviren plazminojen

aktivatör, demir transport proteini olan transferrin ve bakır taşıyıcı protein olan seruloplazmin de sentezlenir (19, 20).

2.2.5. Leydig Hücreleri

Seminifer tübüllerin arasını kaplayan, fibroblast, kan damarları, lenf damarları içeren gevşek bağ dokusu bulunmaktadır. Ergenlikle birlikte interstisyel alanda; merkezi çekirdekli, yağ damlacıkları içeren, eozinofilik, poligonal hücreler olan Leydig hücreleri gelişir. Ayırt edici özellik olarak lipofuskin pigmenti ve Reinke kristalleri adı verilen sitoplazmik çubuk şekilli kristaller içerirler. Steroid salgılayan hücreler olduğundan granülsüz endoplazmik retikulum sayısı fazladır (1, 19).

Leydig hücreleri başlıca testosteron üretiminden sorumludur. Erken fetal dönemde bu salgı üretimi başlar çünkü testosteron embriyonik gelişim için gereklidir. Testosteron ve diğer androjenler erkek fetusta normal gonad gelişimi için gereklilik gösterir. Leydig hücreleri erkek fetusun farklılaşmasında görev aldıktan sonra fetal hayatın 5. ayı itibariyle inaktifleşir. Doğum sonrası testosteron seviyeleri en düşük noktaya ulaşmış olur. Neonatal testis kök hücrelerinden Leydig hücrelerinin gelişmesiyle ve pubertede gonadotropik stimülasyonla yeniden testosteron salgılamaya başlar. Yaşamın sonuna kadar fizyolojik koşullarda aktif kalmaya devam eder (1, 23).

Testosteron, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonunun sağlanması içi gerekli olan bir hormondur. Puberte ile testosteron salgısı ve sperm üretimi başlatılır. Aynı zamanda testosteron yardımcı bezlerden salgıların üretilmesi ve ikincil seks karakterlerinin gelişiminden sorumludur (1).

2.3. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ

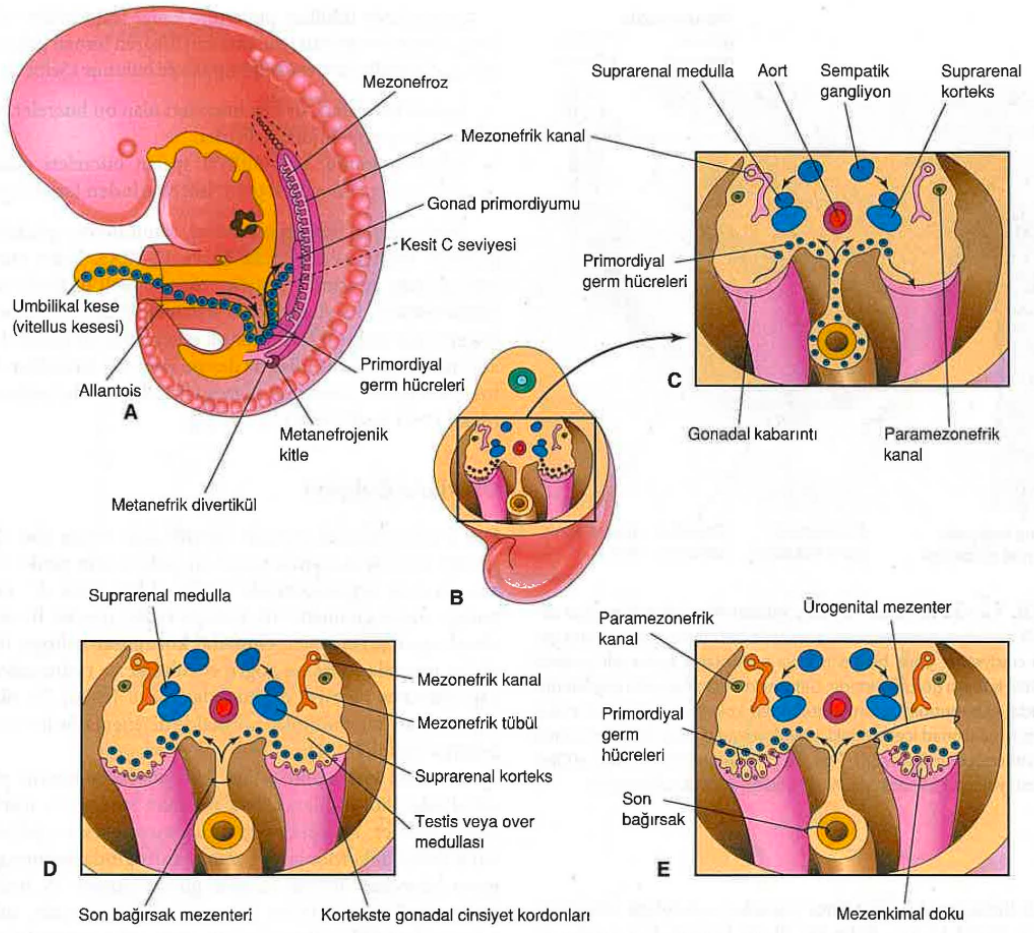
Oositin sperm ile döllenmesinden sonra embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti belirlenmiş olsa da morfolojik olarak genital gelişimin başlaması 7. haftadan önce gerçekleşmez. 7. haftadan önce embriyo incelendiğinde erkek veya dişi olduğu farklılaşma olmadığından anlaşılamaz. Bu dönem seksüel gelişimin farklanmamış evresi olarak adlandırılır (2).

Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar;

- Primordiyal germ hücreleri
- Posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel
- Embriyonik bağ dokusu olan mezotel altındaki mezenşim

Gonadal gelişimin başlangıcı 5. haftada olur. Mezonefroz medialindeki mezotelde kalınlaşma meydana gelir. Epitelin proliferasyonu ve altında bulunan mezenşimin yoğunlaşması ile ortaya çıkan kabarıklığa gonadal kabartı adı verilir. Gelişimin 6. haftasına kadar germ hücreleri gonadal kabartılarda bulunmaz (2, 24).

Primordiyal germ hücreleri epiblasttan köken almaktadır. Primitif çizgi boyunca göç ederek yolk kesesinin allontoise yakın duvarında bulunan endoderm hücrelerinin arasına 3. haftada yerleşirler. 4. haftada son barsak mezenteri dorsali boyunca ilerlerler. 5. hafta başında primitif gonadlara gelirler. 6. hafta itibariyle gonadal kabartıları işgal ederler. Germ hücreleri göç sırasında birbirlerine sitoplazmik uzantılarla bağlıdır (24). Lösemi inhibe edici faktör (LIF) ve Steel faktör (Steel) ile uyarılmaları sonucunda mitoz bölünmeyle sayılarını arttırırlar. İnsanda yaklaşık 1000-2000 sayıda primitif germ hücresi gonad taslaklarına girer (25). Göç sırasında hücreler apoptozdan Nanos-3 proteini ile korunurlar (26). Primitf germ hücrelerinin gonadal kabartılara ulaşmadığı durumda, gonadların gelişmesi mümkün değildir. Bu hücrelerin gonadların farklılaşması üzerine indükleyici etkisi bulunmaktadır (24).



Şekil 2.4: Primordiyal germ hücrelerinin göçü. Primordiyal germ hücrelerinin umblikal kese duvarından göçünün şematik gösterimidir. Gonadal kabartıların yeri (B), primordiyal germ hücrelerinin gelişen gonadal kabartılara göçü (C), gonadal kordonlar (D), farklanmış gonadlar ve paramezonefrik kanallar görülmektedir (2).

Erkeklerde, gonadda bulunan sitokrom P450 enzimlerinden Cyp26b1'in etkisiyle mezonefroz kaynaklı retinoik asit katabolize edilir. Retinoik asitin germ hücrelerini mayoza sokma etkisi önlenmiş olur. Nanos-2'nin de antimayotik etkisi bulunmaktadır. Bu sayede primitif germ hücrelerinin mayoza girmesi önlenir (26).

Y kromozomu kısa kolu üzerinde bulunan testis belirleyici fakötürü (TBF) kodlayan SRY geni farklanmamış gonadın testis olarak gelişiminde kilit rol oynar (2, 24). Epitel hücrelerinin prolifere olup medulla derinliklerin ilerleyip mezenşim içine gömülmesiyle oluşan primitif seks kordonları testisi oluşturma amacıyla, SRY geninin etkisiyle medullanın derinliklerine doğru uzar. Kordonların hilusa doğru ağ yapacak şekilde dallanması ve anastomoz yapmasıyla da rete testis oluşmuş olur (24). Transkripsiyon faktörlerinden Sox-9 farklılaşma için gereklidir. Gonad dışta bir korteks içte bir medulladan oluşmaktadır. XY kromozomu varlığında medulla testise farklanırken korteks ise gerileyerek dejenere olur (2).

Gonadal kordonların (seminiferöz kordonlar) tunika albugineanın gelişmesiyle yüzey epiteli ile olan bağlantısı kopar. Fibröz kapsül olan tunika albugineanın gelişimi testiküler gelişim için önem taşır. Testis genişlemesiyle birlikte dejenere olan mezonefrozdan ayrılır. Kendi mezenteri mezorsiyumda asılı kalır. Seminiferöz kordonlar farklanarak seminifer tübüllere, düz tübüllere ve rete testise dönüşür (2). Dördüncü ayda at nalı şeklini alan testis kordonlarının uçları rete testisler ile devamlılık gösterir. Bu dönemde testis kordonları primitif germ hücreleri ve Sertoli hücrelerinden meydana gelmektedir (24).

İnterstisyel hücreler olan Leydig hücreleri gonadal kabartıların mezenşiminden köken alır. Leydig hücreleri, testis kordonlarının arasında bulunmaktadır. Sertoli hücreleri desert hedgehog (DHH) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü sinyalleriyle Leydig hücrelerine farklılaşmayı uyarır (26). Sekizinci hafta itibariyle Leydig hücreleri androjenik hormonları salgılamaya başlar. Salgılanan testosteron, androstenedion mezonefrik kanalların ve dış genital organların erkek cinsiyet yönünde farklılaşmasını uyarır (2, 24). Leydig hücreleri, 17-18. hafta itibariyle belirsizleşir, tekrar ortaya çıkmaları puberte döneminde olur (25).

Sertoli hücreleri tarafından salınan Anti-Mülleriyan hormon (AMH) uterus ve tuba uterinaya farklanan paramezonefrik (mülleriyan) kanal gelişimini baskılar (2).

Seminifer tübüller puberteden önce solid yapıdadır. Puberteden itibaren seminifer tübüllerde lümen oluşumu başlar. Kanalize olup rete testisle birleşen seminifer tübüller duktuli efferenteslere girerler. Duktuli efferentes sonradan duktus deferens adını alacak olan mezonefrik kanallarla rete testis bağlantısını kurmuş olurlar (24).

2.3.1. Moleküler Kontrol

Testis gelişiminde temel etkisi olan SRY geni; testislere farklılaşmayı Sox-9 otozomal geni ile düzenler. Konsantrasyonu belirli seviyelere ulaşan SRY, stromal hücrelerin kısa sürede Sertoli hücrelerine farklılaşmasını sağlayan Sox-9 ekspresyonunu uyarır. AMH geninin ekspresyonu üzerinde Sox-9'un etkisi olduğu bilinmektedir. Wnt-4 baskılanarak ovaryum oluşumunun önüne geçilir. SRY ve Sox-9, Fibroblast büyüme faktörü-9 (FGF9) sentezini başlatır (25). FGF9, kemotaktik etki göstererek mezonferik kanal tübüllerinin gonadal sırtı penetre edebilmesini sağlamaktadır. Bu penetrasyonun gerçekleşmediği durumda testis gelişimi devam edemez (24).

SRY ve Sox-9 sinyallerinin hedefe zamanında ulaşması kritik öneme sahiptir. Zamanlamada meydana gelen gecikme; germ hücrelerinin mayoza girmesine, gonadın merkezinde testis iki kutbunda overler olmak üzere ovotestisin oluşumuna neden olur (26).

SRY, steroidogenezis faktörü 1 (SF1) yapımını uyararak Sertoli ve Leydig hücrelerinin farklılaşmasını sağlar. SF1 gonadlarda somatik hücrelerde yer alır (26). SF1 ve Sox-9, AMH miktarını arttırarak paramezonefreik kanalların gerilemesini sağlar. SF1; Leydig hücreleri üzerine etkisiyle testosteron sentezi için görevli enzimlerle ilgili genleri aktifleştirir (24).

Gonadların gelişmesinde erken evrelerde görevli olan önemli bir gen de Lim homeobox geni 1'dir (Lhx-1). Yokluğu gonadların gelişmemesiyle sonuçlanır (26). Lim homeobox geni 2 de fetal testis germ hücreleri tarafından eksprese edilir. Kaybı durumunda tübüler organizasyon bozulur (27). Lhx9 ise genital kabartılarda somatik hücre proliferasyonu ve Leydig hücrelerinde testosteron üretiminin kontrolü için gereklidir (28).

2.3.2. Testislerin İnişi

Yaklaşık 26. haftada retroperitoneal olarak posterior abdominal duvardan derin inguinal halkaya doğru inen testislerin hareketi büyük oranda bağıldır. Abdomenin kranial parçasının kaudal parçasından uzaklaşmasına bağlıdır. Fetal pelvisin genişlemesi ve embriyo boyutlarında meydana gelen artış bu pozisyonel değişiklikte rol oynar. Testislerin skrotuma inişlerinin arkasında yatan sebeplerle ilgili bilgi az olsa da fetal testisler tarafından üretilen testosteron ile bu durumun kontrol edildiği düşünülmektedir. Testislerle skrotum arasında bağı sağlayan gubernakulumun da bu iniş esnasında rehberlik yaptığı kabul görür. Abdomende iç organların büyümesiyle birlikte ortaya çıkan basınç artışının da sürece katkı sağladığı düşünülmektedir. Androjenler ve AMH gibi hormonlar da testisin inişi üzerinde etkilidir (2).

Testisler karın boşluğuna kranial asıcı ligamentle kranialinden tutunur. Mezonefroz dejenere olduktan sonra ekstraselüler matriksten zengin mezenşimal bir yapı olan gubernakulum adlı ligament gonadların alt uçlarından aşağı yönlü uzanır. Anterior abdominal duvarda gelecekte inguinal kanalın oluşacağı bölgeden oblik olarak geçen gubernakulum kaudalde labioskrotal şişkinlikerin iç yüzeyine yapışır. Labioskrotal şişkinlikler gelecekte skrotuma dönüşecek yapılardır.

Testislerin genişlemesi, kranial asıcı ligamentin gerilemesi sonucunda inişten önce testislerin diyafragma ile bağlantısı zayıflar (25). Leydig hücrelerinden salınan insülin-like peptid 3 (Insl-3) aktivitesiyle testisler inguinal halka seviyesine gelir (26). Insl-3'ün gubernakulumun büyüyüp şişmesinden sorumlu olduğu; testislerin inguinal kanalın iç halkasında konumlandırılıp kanaldan aktarılmasını sağladığı gösterilmiştir (29). Bu dönem transabdominal iniş dönemi olarak adlandırılır. Gubernakulum rehberliğinde testosteron etkisiyle skrotuma iniş tamamlanır. Bu dönem de transinguinal iniş dönemi adını alır (25). Transinguinal iniş döneminde androjenlerin etkili olduğu bilinmektedir (29, 30). Insl-3'ün androjenlerden bağımsız olarak gubernakulum gelişimini indüklediği; kranial asıcı ligamentin regresyonunun ise androjen aracılı olup Insl-3'ten bağımsız olarak gerçekleştiği bildirilmiştir (31). Androjen ve Insl-3 salgılayan Leydig hücreleri; ilk trimester boyunca plasentadan gelen insan koryonik gonadotropin (hCG) ile, sonrasında ise fetüs ön hipofizi kaynaklı luteinize edici hormon (LH) ile uyarılır. Farelerde yapılan çalışmalarda, transinguinal iniş sürecinde androjenlerin gubernakulum üzerindeki etkisini genitofemoral sinir ve nörotransmitteri kalsitonin geni ilişkili peptid (CGRP) ile gösterdiği bulunmuştur. Fareler ve insanlar arasında testis transiguinal inişinde zamanlama ve süreç farklılıkları da göz önünde bulundurulmaktadır ve insanlarda CGRP'nin etkisi henüz kanıtlanmamıştır (32). Karın ön duvarı, inguinal ligament medialinin üstünde yer alan 4 cm uzunluğundaki inguinal kanaldan geçerek skrotuma inerler. Derin halkadan kanala giren testisler, yüzeyel halkadan kanalı terk ederler. Testislerin inguinal bölgeye gelmesi 12. hafta, inguinal kanaldan geçişi 28. hafta, skrotuma ulaşmaları da 33. hafta gerçekleşmektedir (24).

Testisler skrotumdaki pozisyonlarını aldıktan sonra inguinal kanal spermatik kord etrafında kasılır. Term doğumlarda %97 oranında testisler skrotuma inmiştir. Doğumdan sonraki ilk 3 ay içerisinde inmemiş testislerin büyük çoğunluğu da inişi tamamlar.

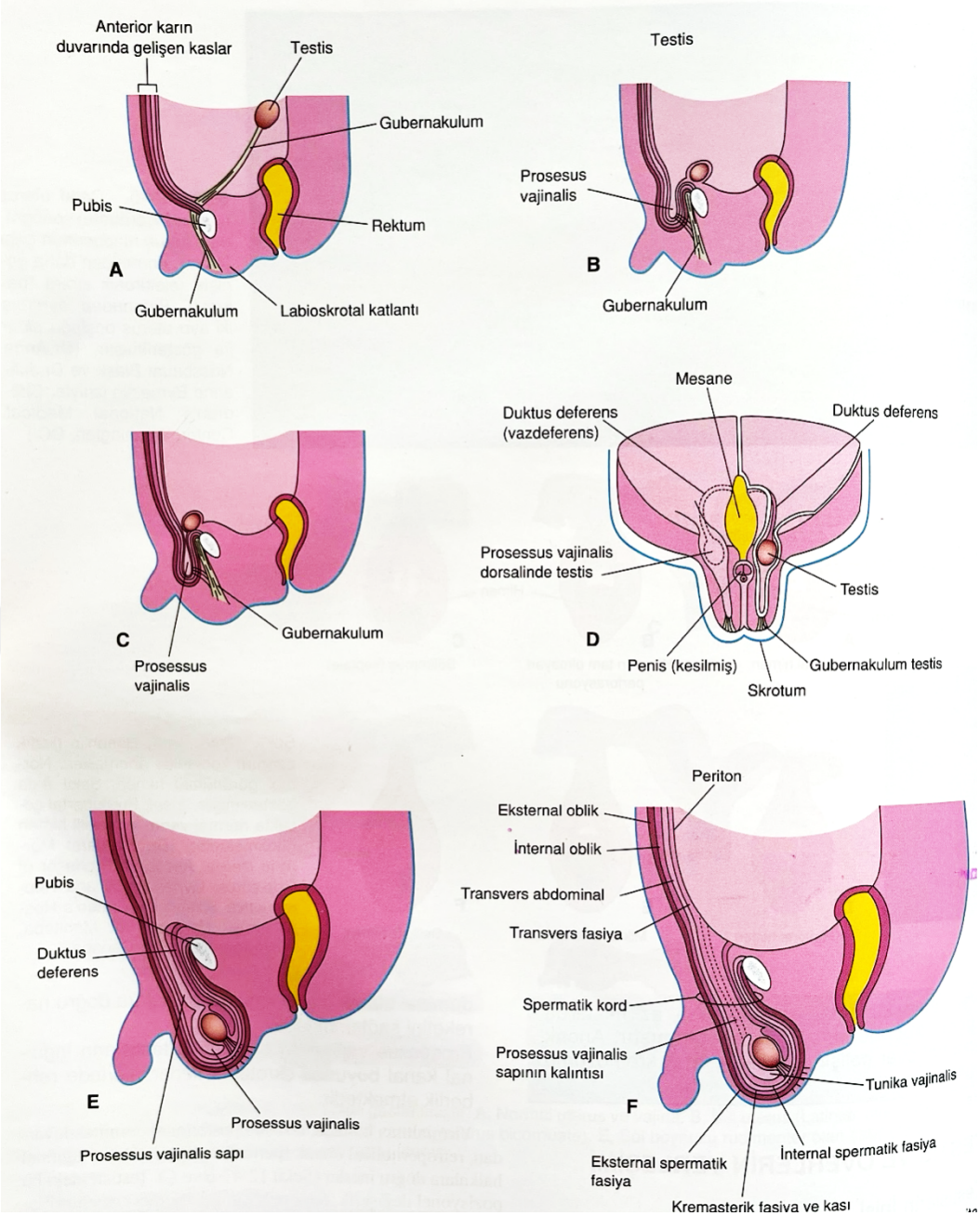
Testiküler damarlar, testislerin posterior karın duvarı seviyesindeyken oluşur. Testislerin inişi sırasında duktus deferens ve damar yapıları da birlikte taşınır (2).

İnguinal kanallar gelişim sırasında intraabdominal yerleşim gösteren testislerin skrotuma inişlerinde yol oluştururlar. Seksüel gelişimin farklanmamış evresinde her iki cinsiyette de inguinal kanal gelişimi olur.

Gubernakulumun ventralinde gelişmekte olan vajinal proses cep yapısında periton evajinasyonudur. Gubernakulumun oluşturduğu karın duvarı yolu boyunca bir şişkinlik oluşturur. Prosesus vajinalisin bağlayıcı sapı oblitere olup tunika vajinalis adı verilen bir peritoneal kese olarak kalır. Testisi saran tabaka tunika vajinalisin visseral tabakası, peritoneal kesenin diğer kısımlarına tunika vajinalisin pariyetal tabakası denir. Vajinal prosesin taşıdığı karın duvarı uzantıları inguinal kanal duvarını yapar. Bu tabakalar ek olarak spermatik kord ve testis yüzeyel tabakalarını da oluşturur (2, 24).

Musküler ve fasiyel tabakalarıyla skrotal şişliğe ilerleyen vajinal proses inguinal kanalı meydana getirir. Testis ve duktus deferensi saran fasiyal tabakalar şöyledir:

- Transversalis fasyanın uzantısı: İç (internal) spermatik fasya
- İnternal oblik kas ve uzantıları: Kremastrik kas ve fasyası
- Eksternal oblik aponevroz uzantıları: Eksternal spermatik fasya (1).



Şekil 2.5 : İnguinal kanalların oluşumu ve testislerin inişi. Testislerin inmeden önceki yeri (A), Prosessus vajinalisle birlikte testislerin inguinal kanala girişi (B ve C), testisin inişten sonraki yerleşimi (D), yenidoğanda testislerin konumu ve prosesus vajinalisin sapı aracılığıyla periton boşluğuna bağlı oluşu (E) ve 1 aylık infantta prosesus vajinalis sapının kapandıktan sonraki durumu ve karın duvarından uzayan tabakaların spermatik kordu sarması (F) şematize edilmiştir (2).

2.4. TESTİS TORSİYONU

Spermatik kordun kendi etrafında dönmesiyle testisin arteriyel beslenmesinin engellenmesi, venöz drenajın bozulması ve testiste kanın göllenmesi sonucu ortaya çıkan bir patolojidir. Yetişkin dönem de dahil olmak üzere erkeklerde gözlenebilen bu patolojinin temelinde fiziksel travma ya da tunika vajinalis içinde anormal hareketli testislerin

bulunması yatabilir (20, 33-35). Yılda her 18 yaş altı 100000 erkekten 3.8'inde görülen bu patolojide erken tanı ve tedavi testis kaybını engellemekte kritik öneme sahiptir (36-38).

Testis torsiyonu klinikte nadiren karşılaşılan ürolojik acillerden biridir. Eğer düzeltilmezse ağır vasküler konjesyon ya da infarkt ile sonuçlanabilmektedir. İskemi derecesi, torsiyon süresine ve spermatik kordun dönme derecesine bağlıdır. Dönme derecesi 180°'den 720°'ye kadar farklılık gösterebilir (36, 39). Yapılan araştırmalarda germ hücrelerinin iskemiden oldukça fazla etkilendiği; testosteron üretiminden sorumlu Leydig hücrelerinin iskemiye daha dirençli olduğu ortaya konmuştur (40, 41). İki tip torsiyon vardır. Doğumdan önce ya da doğumdan sonra ilk 30 gün içinde ortaya çıkan neonatal torsiyonun etiyolojisi tam olarak açıklanamamaktadır (42). Prenatal testis torsiyonun testislerin abdominal kaviteden skrotuma inişi sırasında ortaya çıktığı düşünülmektedir (43). Doğumun zor olduğu veya uzun sürdüğü term bebeklerde riskin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (44). Yenidoğan döneminde testis torsiyonu ekstravajinaldir. Tunika vajinalis ve spermatik kordun bükülmesiyle ortaya çıkar. Torsiyonun intrauterin mi doğum sonrası mı ortaya çıktığı ayrımı önem taşır. Doğum öncesi ortaya çıkmış olan testisin kurtarılma imkânı neredeyse yokken; doğum sonrası ekstravajinal torsiyonun kurtarılma oranları %44'e çıkmaktadır (43, 45). Adolesanlarda görülen yetişkin tip testis torsiyonu tipik olarak şiddetli ağrı ile ortaya çıkar. Torsiyon tunika içindeki spermatik kordun bükülmesiyle ortaya çıktığından intravajinaldir. İntravajinal torsiyonlarla klinikte daha sık karşılaşılmaktadır (%90). Tunika vajinalisin testislere anormal fiksasyonu, testislerin tunika içinde çan tokmağına benzer şekilde asılı durması ile karakterize "Clapper-bell" deformitesi intravajinal torsiyonun en önemli nedenlerindendir. Deformite sonucunda spermatik kord hareketlerle, kremasterik kasın kontraksiyonuyla torsiyona yatkın olmaktadır. Testis eklerinin bağlantısında zayıflık, hipermobil testis, gelişmemiş gubernakulum, skrotal operasyon öyküsü, hiperaktif kremaster refleksi de torsiyona sebep olabilen diğer faktörlerdendir (37, 46, 47).

Doğum öncesi torsiyonu olan bir yenidoğanda ilk bulgular skrotal duvara sabit, hassasiyet olmayan, sert bir testis ve renksiz bir skrotumdur. Doğum sonrası ortaya çıkan torsiyonda ise skrotal muayenede eritem, şişlik gibi sonradan ortaya çıkmış bulgulara ve hassas testise rastlanmaktadır. Kurtarılamayacağı düşünülen bir doğum öncesi testis torsiyonu vakasında karşı taraf testisinde ortaya çıkabilecek testis torsiyonunun önüne geçilebilmesi için kontralateral orşiyopeksi uygulanır. Doğum sonrası ortaya çıkan testis torsiyonu vakalarında müdahale yetişkin tip vakalarla benzerdir. Etkilenen testisin kurtarılma oranının düşük olduğu hasta yakınlarıyla paylaşılmalıdır (37, 45).

Testis torsiyonu, çocuklarda akut skrotal ağrıların %10-15'ini oluşturur (37). %4-8'inde travma öyküsü olsa da hastaların büyük çoğunluğunda tanımlanabilir bir tetikleyici faktör bulunmamaktadır (38). Bilateral testis torsiyonu olan hastalarda aile öyküsü olduğunu öneren meta analizler mevcuttur (48). Akut skrotal ağrıyla başvuran her prepubertal ve genç erişkin hastada aksi ispat edilene kadar testis torsiyonu düşünülmelidir. Akut skrotal ağrı ayırıcı tanısında testis torsiyonu, travma, epididimit, orşit, varikosel, idiyopatik skrotal ödem ve apendiks testis torsiyonu yer alır. Apendiks testis torsiyonu testis üst kısmında yer alan müllerian kanal kalıntısıdır. Apendiks testis torsiyonu, testis üst kutbunda mavi renk değişikliği ve hassas nodül varlığıyla karakterize "mavi nokta işareti" bulgusuyla teşhis edilebilir (49). Skrotal travma öyküsü sonrası ağrı bir saatten fazla sürüyorsa travmaya bağlı testis torsiyonu düşünülmelidir. İpsilateral kremasterik refleks alınamadığında testis torsiyonu için kesin bir işaret olarak düşünülmelidir (36, 48). Uyluğun medialine vurulduğunda ya da sıkıştırıldığında kremaster kasın kasılmasına bağlı olarak testisin 0.5 cm hareket etmesidir. Bu refleksin yapılan bir çalışmada, 225 erkek çocuk arasında 30 aydan büyük olanların hepsinde; küçük olanların ise yarısından azında mevcut olduğu bulunmuştur (50). Yapılan başka çalışmalarla kremasterik refleks kaybının testis torsiyonuna %99 oranında duyarlı olduğu gösterilse de istisna vakalar da bulunmaktadır (11, 51, 52). Bulantı, kusma, ateş gibi nonspesifik sistemik bulgular da eşlik edebilir (37, 53). Fizik muayeneden torsiyonu düşündüren bulgulardan biri de enine uzanmış testistir. Tanıyı doğrulamak için doppler ultrasanografi kullanılabilir (14). Fizik muayene ve anamnez sonucunda testis torsiyonu tanısını kuvvetle düşündüren hastalarda görüntüleme yöntemlerine bakılmaksızın acil cerrahi yoluna gidilmelidir. Duyarlılığı %88.9 spesifitesi %98.8 olan Doppler ultrasonografi testis perfüzyonunu, boyutunu, şeklini gösterebilen ameliyat öncesi tanı aracıdır. Tanının şüpheli olduğu durumlarda başvurulmalıdır (37, 54, 55). Teknesyum 99m perteknetat kullanılan sintigrafi testis torsiyonunda %100 duyarlılığa sahiptir (56). İskemik testiste radyoaktif maddenin iletimi azalır, inflamasyon ya da enfeksiyonda ise artan perfüzyon vardır. Sintigrafi daha duyarlı olsa da ultrasona ulaşım hızlı ve kolay olduğundan ultrason tercih edilmelidir (57).

Hastaların 6 saat içinde acil cerrahiye alınması gerekir (42, 58). Yapılan bir çalışmada altı saatten kısa bir sürede müdahale edildiğinde testislerin kurtarılma oranı %90 olarak bulunmuştur. Detorsiyona kadar geçen süre 12 saat olduğunda bu oran %50'ye, 24 saat sonra %10'un altına düşmektedir (34, 49). Etkilenen testisin canlı kabul edildiği durumlarda testisler skrotuma kalıcı olarak sabitlenir ve orşiopeksi yapılır (36, 37). Manuel detorsiyon ilk olarak 1893 yılında tanımlanmıştır. Cerrahi müdahaleye kadar geçecek olan sürede zaman kazandırma amacıyla kullanılabilir (48). Sırtüstü yatan hastada kitap açar gibi

bir hareketle testisi orta hattan uzağa döndürülür. Lokal anestezi veya sedasyon altında bu müdahale yapılabilir. Başarılı olunduğundan ağrıda ciddi bir azalma görülür (36). Testis nekrotik görünüyorsa orşiektomi yapılır. Literatürde orşiektomi oranları %39 ile %71 arasında farklılık göstermektedir. Canlı olmayan testisin çıkartılması anti-sperm antikorlarının üretiminin engellenip kontralateral testis zararının önüne geçilmesi açısından da anahtar rol görür (48). Yaş ve kesin tedaviye kadar geçen sürenin uzaması orşiektomi risk faktörleridir. Etkilenen testise yapılan müdahaleden bağımsız olarak karşı taraf testise orşiopeksi yapılmalıdır (30, 37, 48). Tedavi sonrası infertilitenin ortaya çıkması günümüzde de önemli bir sorun olarak görülmektedir. Bir çalışmada sperm hareketliliğinin orşiektomi yapılan hastalarda orşiopeksi yapılanlara göre daha yüksek bulunmuş; endokrin seviyeleri ve anti-sperm antikorları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (48). Yapılan çalışmalarda testis torsiyonu sonrasında endokrin fonksiyonların etkilenmediği; ancak fertilitenin ciddi oranda etkilendiği ortaya konmuştur. Sperm hareketinin azaldığı, morfolojisinin bozulduğu çalışmalarda saptanmıştır (59).

Deneysel model oluşturulurken testis torsiyonunun derecesi ve süresi ayarlanabilmektedir. Testis torsiyon modelini oluşturmak için farklı modeller literatürde tanımlanmıştır (58). Yapılan çalışmalarda 720°'lik torsiyonda kan akışının kesildiği ve tam bir iskemi durumunun ortaya konulduğu bildirilmiştir (60). Bir başka çalışmada da histopatolojik nekrotik değişikliklerin sıçan testisinde 2. saat itibariyle ortaya çıktığı, iskemi süresinin uzatılmasının değişiklikleri arttırmadığı bildirilmiştir (61). Bu nedenlerle çalışmada 720° ve 2 saatlik testis torsion/detorsiyon modeli uygulanmıştır. Reperfüzyon hasarını değerlendirmek için de literatürde farklı bekleme süreleri tanımlanmıştır (41, 60).

2.5. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

Testis torsiyonunun ana fizyopatolojik sonucu iskemi-reperfüzyon hasarıdır (62). Spermatik kordun bükülmesi ile doku önce iskemik hale gelir; detorsiyon sonrası kan akımının yeniden sağlanmasıyla reperfüzyon durumu ortaya çıkar. Arteriyel kan akımının engellenmesiyle hipoksi oluşur ve mitokondride ATP üretimi azalır. ATP'nin azalmasıyla hücrelerde ATP bağımlı sodyum-potasyum pompaları çalışamaz ve iyon dengesizliğine bağlı hücrelerde şişme, meydana gelir. ATP bağımlı pompayla hücre içi ve dışı dengesi sağlanan kalsiyum (Ca^{+2}) da iskemiden etkilenir. İntraselüler Ca^{+2} artışı ile proteolitik enzimlerin aktifleşmesi, ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılması ve protein sentezinin azalması durumları ortaya çıkar (42).

Reperfüzyon ile kan akımının tekrar sağlanması sonucunda doku tekrar oksijen kaynağına ulaşmış olur ancak serbest oksijen radikalleri üretimi de artış gösterir çünkü iskemik hücrelerde antioksidan ajanlar azalmış durumdadır. İskemi-reperfüzyon hasarı dokuda nötrofillerin varlığı; reaktif oksijen türlerinin (ROS), proinflamatuar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin üretimi, lipid peroksidasyonu, apoptozu içerir (39). Süperoksit anyonlar (O^-), hidroksil radikalleri (OH^-), hipoklorik asit (HOCl) hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROS'lar; endotel disfonksiyonunu, DNA hasarını arttıran ve lokal inflamatuar süreci başlatan oksidatif stresi tetikler. Oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasında bir denge bulunmaktadır. Reperfüzyon sonrası oksijenin ani artışı aşırı miktarda ROS üretimine sebep olur ve biriken ROS hücrelerde protein, lipid ve DNA yapılarına zarar verir (63-65).

2.5.1. Oksidatif Stres

Peroksinitrit, peroksit, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları gibi ROS'lar patojenlerin öldürülmesinde ve hücre sinyal yollarında görev alan metabolik süreçlerde üretilen maddelerdir. Biyolojik makromoleküllere zarar verebilme özellikleri bulunmaktadır. Bu oksidatif stres durumu antioksidan moleküller ve enzimlerle engellenebilmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarı durumunda ROS üretimi antioksidan kapasiteyi aşabilmektedir (39).

İskemi sebepli ATP katabolizması sonucu pürinlerin birikimi, ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümü ile süperoksit üretimi ortaya çıkar. Bu değişiklikler hücrede plazma membranı hasarına ve hücre iskeletinde zarara sebep olur. Reperfüzyon ile aerobik metabolizma için gerekli olan oksijen hücrelere sağlanmış olur. Ksantin oksidaz, oksijen ile reaksiyona girerek hipoksantinden ksantin ve ürik asit oluşumuna sebep olur. Bu reaksiyon sırasında süperoksit iyonu ve hidrojen peroksit de ortaya çıkarak oksidatif stresi daha da şiddetlendirir (63). Oksijenin varlığıyla birlikte hücrede ROS üretimi artar; bu durum DNA hasarı, endotel hasarı ve germinal hücrelerde apoptoz ile sonuçlanır. İskemi reperfüzyon hasarı; mitokondriyonlarda fazla süperoksit üretimi ile karakterizedir (33, 39).

ROS ayrıca hücre ve mitokondri membranında lipidlerin peroksidasyonuna sebep olur. Bunun sonucunda membran geçirgenliğinde hasar ortaya çıkar ve hücre bütünlüğü bozulmuş olur. ROS sebebiyle hücre membranında bulunan kolesterol ve yağ asitlerindeki doymamış bağlar peroksidasyona uğrar. Lipid peroksitleri yıkıldığında malondialdehit (MDA) oluşur. MDA üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile ortaya çıkar. MDA bir oksidatif stres göstergesidir. Bu molekül; proteinlerin amino gruplarına, nükleik asitlere bağlanarak toksik etki gösterebilmektedir (42, 66).

Oksidatif stres sonucu artan ROS, polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) hasarlı dokuda birikmesine; inflamasyonun ortaya çıkıp doku hasarı meydana gelmesine sebep olmaktadır. Dokuya ulaşan PMNL'ler miyeloperoksidaz (MPO), elastaz, proteaz, kollejenaz gibi enzim içerikleriyle dokuda daha fazla radikal oluşmasına ve hasarın artmasına sebep olurlar (42).

Oksidatif hasara karşı savunmada görev alan maddelere antioksidan maddeler denir. Hücrelerde antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olabilir. Endojen antioksidanlar enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere ikiye ayrılır. Glutatyon redüktaz, glutatyon transferaz, sitokrom oksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz enzimatik antioksidanlara örnektir. Süperoksit dismutaz, hücre içinde süperoksit radikalini oksijen ve hidrojen peroksite döndürerek süperoksit seviyelerini azaltır (67, 68). Glutatyon (GSH), hidrojen peroksitle reaksiyona girerek yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşür. Bu reaksiyonda görevli olan glutatyon peroskidazdır (69). Katalaz ise peroksizomlarda bulunan, hidrojen peroksitin su ve oksijene parçalanmasında görev alan enzimdir (70). Albumin, ürik asit, alfa tokoferol non-enzimatik antioksidanlardandır. Vitamin C, vitamin E, asetilsistein gibi moleküller de eksojen antioksidanlar arasında yer alır (71). Oksidanların artması ve antioksidanların azalması ya da dengenin sağlanamaması durumunda aradaki denge oksidatif durum lehine kayar ve oksidatif stres durumu ortaya çıkar (72).

Proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP), oksidatif stres nedeniyle oluşan protein oksidasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkar. Hipoklöröz asitin (HOCl) plazma proteinleri tarafından tüketilmesi ve oksidatif hasarın ortaya çıkmasıyla üretildiklerinden oksidatif stres seviyesini ölçen bir belirteç olarak kullanılmaktadır (73). Demir iyonu indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) demirin indirgenme kapasitesine bakılarak antioksidanların toplam miktarını anlamayı sağlayan bir yöntemdir. Dokularda antioksidan kapasiteyi tayin edebilmek için etkili yöntemlerden biridir (74).

2.5.2. Apoptoz

İskemi-reperfüzyon hasarı sonucunda inflamatuar mediatörler ve toksik maddelerin etkisiyle nekroz meydana geldiği uzun yıllar temel düşünce olmuş; ancak germ hücrelerinde apoptotik yolakların aktive olup programlı hücre ölümünün olabileceği bilgisi günümüzde kabul görmektedir (39, 62, 75). Kaspazlar, apoptoz sürecinde görev alan sistein proteaz ailesi enzimleridir. İnaktif olarak sentezlenip çeşitli yolaklarla aktifleşir ve apopotozda görev alırlar (76). Apoptoz ekstrinsik ve intrinsik yolaktan oluşmaktadır. Ekstrinsik yolak, ölüm sinyallerinin reseptörlere bağlanmasıyla başlar. Ölüm-indükleyici-sinyal-kompleksi ile kaspaz-8 aktive olur ve aktif kaspaz-8 hücreyi intrensek apoptoza yönlendirir (77). İntrinsik

yolak İ/R, toksik maddeler, oksidatif stres gibi nedenlerle uyarılan Bcl-2 protein ailesinden Bax ve Bak'ın indüklenmesi ve mitokondriyal membran geçirgenliğinin artıp proapoptotik proteinlerin salınması ile karakterizedir (75). Sitokrom c sitoplazmaya salınıp kaspaz aktivasyonunu gerçekleştirdiğinde apoptotik hücre ölümü tetiklenir. Kaspaz-3 hem intrinsik hem de ekstrinsik yolakta görev alan kaspaz proteinidir (78, 79).

2.5.3. İskemik Hasar ve HIF-1α

Hipoksi ile indüklenebilir faktörler (HIF) hipoksiye karşı homeostatik transkripsiyonel yanıtların temel düzenleyicisidir. HIF-1α 100'den fazla hipoksiye duyarlı genin regülasyonunda görev alan transkripsiyon faktörüdür. HIF-1α'nın regüle ettiği bu genler iskemiye karşı apoptotik cevabı, metabolik adaptasyonu, eritropoezi, anjiyogenezi, hücre büyümesi ve diferansiasyonunu düzenler (39). HIF-1α'nın Leydig hücreleri tarafından da eksprese edildiği ve oksijen açığına göre apoptotik ya da antiapoptotik etkileri olabileceği bilinmektedir. (80).

2.5.4. Makrofajlar ve İnflamatuar Yanıt

Testislerin organa spesifik immünolojik durumları vardır. Enfeksiyonlara karşı korunmada ve otoimmün reaksiyonu engellemek üzere ayrıcalıklara sahiptirler. İnterstisyel bölgede bulunan makrofajlar bu açıdan önemlidir (81). Mononükleer fagositik hücrelerden olan makrofajlar dokularda bulunurlar. Görevleri gelen sinyallere göre doku bütünlüğünü korumaktır (82). Testiste bulunan makrofajların doku onarımında görev aldığı da bilinmektedir (83). Dokularda antijen sunmakla ve inflamatuar cevapla ilgili görevleri olan makrofajlar, testiste ise daha çok immünsupresif görev üstlenmektedir. Ancak orşit gibi patolojik inflamatuar durumlarda dolaşımda bulunan makrofajların dokuyu infiltre etmesi spermatogeneze hasar vermektedir (81). T/D sonrası makrofaj yanıtının araştırıldığı bir çalışmada ise CD68 pozitif makrofaj sayısının hasarla birlikte arttığı izlenmiştir (84).

İskemi-reperfüzyon hasarının etkilerinden korumak amacıyla çeşitli ajanlar denenmiştir. Kullanılan bu ajanların anti-inflamatuar, antioksidan özellikleri bulunmaktadır. Hayvan deneyleriyle etkinliği araştırılan bu ajanlarda karşılaşılan en önemli güçlük bu tedavilerin bir veya birkaçını klinik kullanıma kazandırmaktır (39). Fosfodiesteraz kullanımı ile ilgili elde edilen sonuçlar karışıktır. İntraperitoneal vardenafil kullanımı ile MDA seviyeleri ve hücre hasarı azalmıştır (85). Ancak yapılan başka bir çalışmada vardenafilin histopatolojik değişiklikleri kötüleştirdiği ve koruyucu etkisinin olmadığı ortaya konmuştur (86). Sıçanlarda düşük doz sildenafil kullanımı ile glutatyon seviyeleri, katalaz ve glutatyon peroksidaz seviyeleri düşmüştür (87). Trapidilin'in ise testis torsiyonu sonrası uzun dönem

histolojik hasarı azalttığı ortaya konmuştur (88). Antioksidan özelliği olan vitamin C ve E kullanımı da çeşitli çalışmalarla araştırılmıştır. Dopamin ve vitamin C'nin testis hasarına karşı birlikte kullanıldığı bir çalışmada MDA seviyelerinde azalma olduğu görülmüştür (89). Hidrofilik vitamin E olan Raxofelast'ın sıçan testislerinde iskemi-reperfüzyon hasarına karşı kullanıldığı bir çalışmada oksidatif stresin azaldığı, olumlu morfolojik değişikliklerin ortaya çıktığı görülmüştür (90). Epifiz tarafından üretilen bir hormon olan melatoninin testis torsiyonu sonrası sıçanlarda histopatolojiyi iyileştirdiği, Johnsen skorunu arttırdığı ve anormal sperm oranını azalttığı rapor edilmiştir (91). Çeşitli bitki ekstraktlarının kullanımı da araştırılmıştır. P. Ginseng'in iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu ortaya çıkaran testiküler disfonksiyonu onardığı (92); N. Sativa'nın lipid peroksidasyonunu önlediği (93), G. Biloba'nın MDA ve NO seviyelerini düşürüp iskemi-reperfüzyonun histopatolojik etkilerini azalttığı ortaya konmuştur (93).

2.6. CERATONİA SİLİQUA

Fabaceae familyasına ait, genelde Akdeniz bölgesinde yetiştirilen, yaprak dökmeyen bir ağaç olan *Ceratonia siliqua.* kabuk ve tohumdan oluşmaktadır (94). Tohumu günümüzde ilaç ve kozmetikte sıkça kullanılmaktadır. Keçiboynuzu tohumu proantosiyanidin, ellagitannin ve gallotannin gibi flavonoidlerin kompleks polimerleri açısından zengindir. Bu madddelerin hastalıklara karşı etkisi bilindiğinden farmakolojide sıkça kullanılmakta, serbest radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu bilgisi de göz önünde bulundurulmaktadır (95). Yapılan çalışmalarda *Ceratonia siliqua*'nın antioksidan, antitümoral ve antibakteriyel etkiler başta olmak üzere çeşitli aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Bitkinin farklı bölümlerinin farklı amaçlarla kullanımı bulunmaktadır. Yaprakları halk arasında sindirim sistemine ait rahatsızlıklarda kullanılabilmekte; kabukları da sindirim ve solunum sistemine ait rahatsızlıklarda tercih edilmekte; analjezik etkileri bulunmaktadır (94, 96)

Ceratonia siliqua kabuk ekstraktlarının fitokimyasal incelemesinde polifenollerin, tananlerin, flavonoidlerin ve sterollerin varlığı gösterilmiştir. Polifenoller (fenolik bileşikler, flavonodiler) serbest radikallerin nötrleştirilmesinde, peroksitlerin ayrıştırılmasında görev alan; redoks özelliği sayesinde antioksidan aktivitesi gösterebilen bileşiklerdir. *Ceratonia siliqua*'nın içeriğinde bulunan bu bileşiklerle bitkinin antiinflamatuar ve antioksidan etkileri olduğu ortaya konmuştur. Proinflamatuar molekülleri hedefleyerek inhibe edebildikleri bilinmektedir (96). Süperoksit anyonu, hidroksil radikali vb. serbest radikalleri temizleme kapasitesi de bulunmaktadır (11).

Tablo 2.1: *C.siliqua'*nın Kimyasal İçeriği (97)

Fenoller	Rezorsinol, vanilin, hidrokinon
Fenolik Asitler	Sinnamik asit, gallik asit, kumarik asit, tannik asit
Flavonoidler	Mirisetin, Kuersetin, Lökoantosiyanidin

Yapılan bir çalışmada *Ceratonia siliqua*'nın CAT ve SOD2 gen ekspresyonlarını etkileyerek ve kolorektal karsinom ile ilişkili ROS'un detoksifikasyonuyla, HT29 kolon karsinomu ve LT97 kolon adenom hücrelerinin büyümesini engellediği bulunmuştur. *Ceratonia siliqua*'nın çeşitli etkilerinin araştırıldığı aynı çalışmada içerdiği flavonoidler gibi fenolik bileşikler sayesinde *Ceratonia siliqua*'nın prostoglandinler üzerinden analjezik etkisi olduğu da bildirilmiştir (94).

*Ceratonia siliqua'*nın ethanolle indüklenip oksidatif stres modeli oluşturulmuş sıçanlarda antioksidan rolü ve hepatoprotektif etkisi araştırılmıştır. *Ceratonia siliqua* ile tedavi edilen grupta karaciğer fonksiyonlarını gösteren serum ALT, LDH düzeylerinde anlamlı derecede düşüş görülmüştür. Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri de bu grupta azalma göstermiştir. *Ceratonia siliqua* uygulanan grupta GPx gibi antioksidan enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu grupta ayrıca GST aktivitesinde azalma, SOD aktivitesinde artış tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda *Ceratonia siliqua* tohumlarının antioksidan özelliği sayesinde etanolle oluşturulan oksidatif strese karşı savunmada etkili olabileceği bulunmuştur (95).

Ceratonia siliqua, yüksek miktarlarda bir fenolik asit olan gallik asit içeriğine sahiptir. Flavonid olan myricetin, naringenin ve kaempferol içeriği de *Ceratonia siliqua*'ya; kaspaz bağımlı programlanmış hücre ölümü ve hücre döngüsünün durmasını aktive ederek anti-kanser özelliği göstermesini sağlar. MCF7 meme kanseri hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmada; *Ceratonia siliqua* meyvesinden elde edilen ekstraktların; kanser hücrelerinde kaspaz bağımlı ve bağımsız apoptozu uyardığı, kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellediği gösterilmiştir (98).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada *C. siliqua* ekstraktının bronkodilasyon potansiyeli gösterilmiştir. Alfa adrenoreseptörler aracılığıyla vazodilatör ve hipotansif etkileri olduğu da aynı çalışmada ortaya konmuştur. Solunum ve kardiyovasküler hastalıklar için kullanımı konusunda daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu söylenmektedir (99).

2.6.1. *C. siliqua* ve Erkek Üreme Sistemi

Farelere Busulfan uygulayarak infertilite modeli oluşturulan ve *C. siliqua*'nın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Testosteron seviyesi tedavi uygulanan grupta yüksek bulunmuş, Katalaz ve SOD seviyeleri yükselmiş, MDA seviyeleri düşmüş, germinal epitel kalınlığı artmış olarak saptanmıştır (10).

Çalışmalarda *C. siliqua*'nın semen parametreleri üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Antioksidan özelliği sayesinde sperm kalitesini arttırabildiği, testosteron seviyesini arttırarak spermatogenik hücreleri ve Sertoli hücreleri üzerine pozitif etki göstererek erkeklerde spermatogenezi desteklediği düşünülmektedir. Yapılan çalışmada, 12 hafta boyunca *Ceratonia siliqua* desteği alan infertil erkeklerde normal sperm sayısında artış gözlenmiştir. Bu tedaviyi alan hastalarda testosteron seviyelerinde artış da bulunmuştur. Bu artışın Leydig hücrelerine ve testosteron biyosentezi üzerine direkt etkisi sayesinde olduğu bildirilmiştir. İçeriğindeki gamma-linolenik asit ve alfa-linolenik asit sayesinde PGE2 üretimi mümkündür. PGE2'nin siklik adenozin monofosfat üretimini tetiklediği bunun da testosteron üretimini indükleyebileceği bilinmektedir (100). Başka bir çalışmada, infertil erkeklere 90 gün boyunca *C. siliqua* destek tedavisi verilmiş; sonuçlarda sperm konsantrasyonu ve hareketliliği açısından semen parametrelerinin önemli ölçüde iyileştirdiği görülmüştür. Erkek infertilitesi sebebiyle çocuk sahibi olamayan çiftlerden %17'sinin *C. siliqua* tedavisi sonrasında spontan gebelik elde ettiği çalışmada bildirilmiştir (11).

C. siliqua'nın erkek infertilitesi ve sperm parametreleri üzerindeki olumlu etkisinin nedenleri tam olarak aydınlatılmış değildir. Etkisi genel olarak sahip olduğu antioksidan kapasiteyle ilişkilendirilmektedir.

Hayvan çalışmalarında bu bitkinin ekstratının cAMP seviyelerini arttırdığı, sıçan testis steroidogenezinden yer alan enzimlerin aktivitesi üzerinde olumlu etki yaptığı gösterilmiştir. Leydig hücreleri üzerindeki etkisi ve testosteron seviyelerini arttırdığı; steroidogenez ve spermatogenez süreçleri üzerinde etili olduğu ortaya konmuştur (10).

Organ transplantasyonu sonrasında, nefrotik sendrom tedavisinde kullanılan immunsupresif bir ajan olan Siklofosfamitid'in spermatogenez üzerinde yan etkileri olduğu bilinmektedir. İlacın uzun süreli kullanımı sonrasında ROS üretimi artmaktadır. Leydig hücrelerinde meydana gelen oksidatif hasar sebebiyle testosteron aktivitesi azalmakta, Sertoli hücrelerinde apoptoz meydana gelmektedir. Yapılan bir çalışmada, Siklofosfamid ile birlikte *C. siliqua* verilen sıçanlarda spermatogenez indeksinde, sperm sayısı ile hareketliliğinde ve serum testosteron seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca serum MDA düzeyini azaltarak toplam antioksidan kapasiteyi arttırdığı bulunmuştur (101).

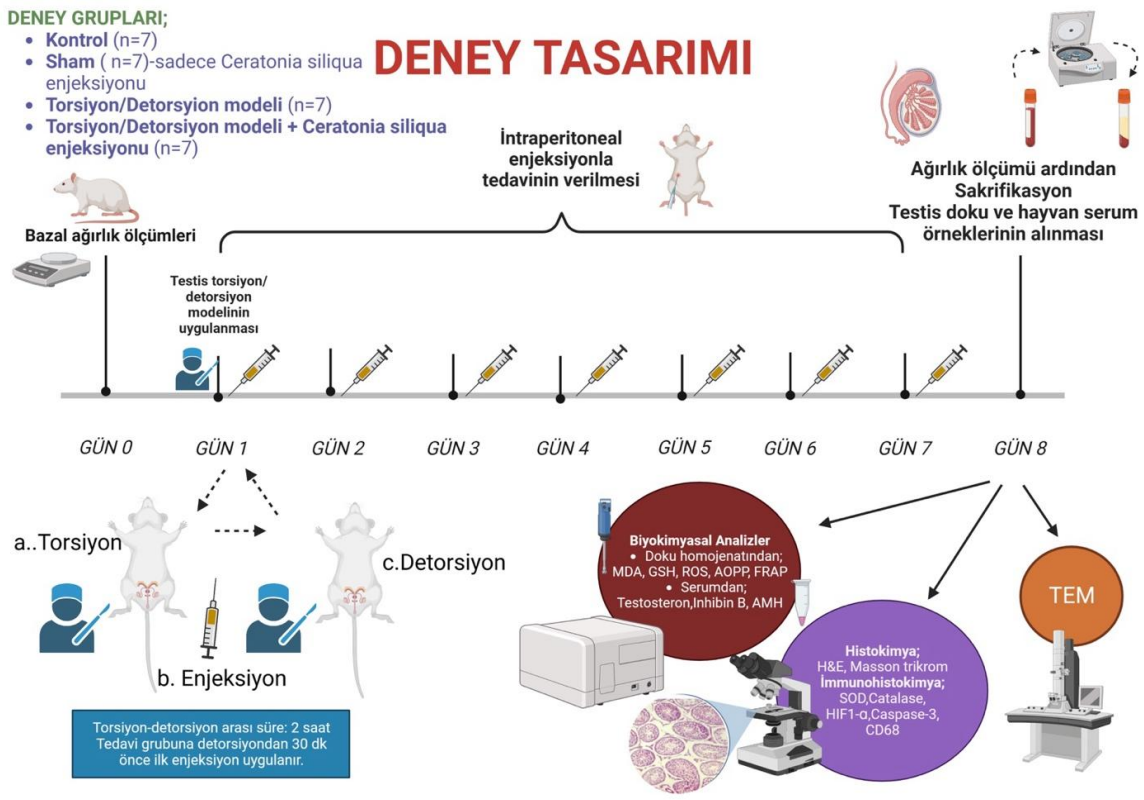
Sperm kriyoprezervasyonu kemoterapi ve radyoterapiden önce, bazı ameliyatlar ve hastalıklar sebebiyle doğurganlığın korunması amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Vitrifikasyon yöntemi sıklıkla tercih edilen metottur ancak mitokondri, plazma membranı ve hücrenin genetik bütünlüğü üzerine zararlı olabilmektedir. Bunun önüne geçebilmek amacıyla dondurma ortamına çeşitli faktörler eklenerek sonuçlar değerlendirilmektedir. *C. siliqua*'nın da vitrifikasyonun zararını önleyebilme kapasitesinin incelendiği çalışmada, sperm ileri hareketi üzerine, sperm morfolojisi, canlılığı üzerine anlamlı ölçüde olumlu etkisi olduğu bulunmuştur. Erkeklerde sperm kromatin yoğunlaşmasını iyileştirdiği de gözlenmiştir (102). Başka bir çalışmada da sperm dondurma medyumuna *C. siliqua* eklenmesi sonucunda ROS ve MDA seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı, sperm ileri hareketliliğinin, morfolojisinin ve canlılığının da anlamlı oranda iyileştirildiği sonuçları bildirilmiştir (103).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HAYVAN DENEYİ UYGULAMALARI

Hayvan deneyleri, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (İÜ HADYEK) 19.08.2022 tarihli toplantısında aldığı 2022/28 sayılı izniyle gerçekleştirilmiştir.

Genç-erişkin 8 haftalık, 300-400 gram ağırlığında 28 adet erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanlarının gruplandırılıp sayısının belirlenmesi aşamasında önceki çalışmalar değerlendirmeye alınmıştır (58). Deney süresinde sıçanlar; 22-24°C'de, 12 saatlik gündüz-gece periyotlarında standart pellet yem ve su ile normal beslenmeleri devam edecek şekilde kafeslerinde tutuldular.



Şekil 3.1: Deney Tasarımı. Deney grupları ve gruplara uygulanan işlemler şematize edilmiştir. 1 haftalık hayvan deneyleri sürecinden sonra alınan doku ve kan örnekleriyle yapılan işlemler şekilde belirtilmiştir. (Biorender)

Deney hayvanları 4 gruba, her grupta 7 sıçan olacak şekilde ayrılmıştır. Gruplar ve gruplara uygulanacak işlemler şu şekildedir:

Grup-1: Kontrol Grubu: Herhangi bir işlem yapılmayan sıçanlardan oluşan kontrol grubudur. Bu gruptaki sıçanlara 40 mg/kg ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı Lambert, İstanbul, Türkiye) ve 4 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) ile anestezi uygulanmıştır. Sıçanların sakrifikasyonundan sonra midskrotal insizyon yapılmış, her iki testis de histopatolojik ve biyokimyasal çalışmalar için alınmıştır.

Grup-2: *C. siliqua* Grubu: Bu gruptaki sıçanlara iskemi/reperfüzyon (İ/R) modeli uygulanmamıştır. İlk gün intraperitoneal olarak 500 mg/kg *Ceratonia siliqua* L. (Keçiboynuzu, Fabaceae) ekstresi enjekte edilmiştir. 1 hafta boyunca her gün intraperitoneal enjeksiyona aynı dozda devam edilmiştir. 1 hafta sonra sakrifikasyon yapılmış, her iki testis de histopatolojik ve biyokimyasal çalışmalar için alınmıştır.

Grup-3: İ/R Grubu: Bu grup İ/R modeli yapılıp tedavi uygulanmayan gruptur. Cerrahi girişim öncesinde sağlıklı sıçanlara intraperitoneal olarak 40 mg/kg ketamin ve 4 mg/kg ksilazin hidroklorid uygulanarak genel anestezi sağlanmıştır. Gerekliliğinde anestezi devamlılığını sürdürmek üzere aynı ilaçlar dozu %50 azaltılarak kullanılmıştır. Anestezi uygulaması sonrasında, sıçanlara supin pozisyon verilerek stabilizasyonu sağlanmıştır (Şekil 3.1 A). Skrotal bölge %10'luk povidon iyot solüsyonu ile temizlenmiştir. Ardından sıçanlara midhemiskrotal insizyon yapılarak bilateral testisler ve spermatik kord serbestleştirilerek insizyon dışına alınmıştır (Şekil 3.1 B). Torsiyon modeli planlanan gruptaki sıçanlarda önce sol testis, kord elemanları ile sonrasında hemen sağ testis ve kord elemanlarının longitudinal aksı boyunca saat yönünde olacak şekilde 720° döndürülerek deneysel testis torsiyonu modeli oluşturulmuştur (Şekil 3.1 C-D). Testisler 6/0 propilen sütür ile skrotum iç yüzeyine fikse edilmiştir (Şekil 3.2 A-B). Bu grupta, 2 saatlik torsiyonun sonunda detorsiyon işlemi yapılmıştır (Şekil 3.3). Detorsiyon sonrası testisler anatomik pozisyonunda olacak şekilde yerleştirilip cilt kapatılmıştır (58). 1 hafta sonra sakrifikasyon gerçekleştirilmiş, her iki testis de histopatolojik ve biyokimyasal çalışmalar için alınmıştır. (Şekil 3.4)

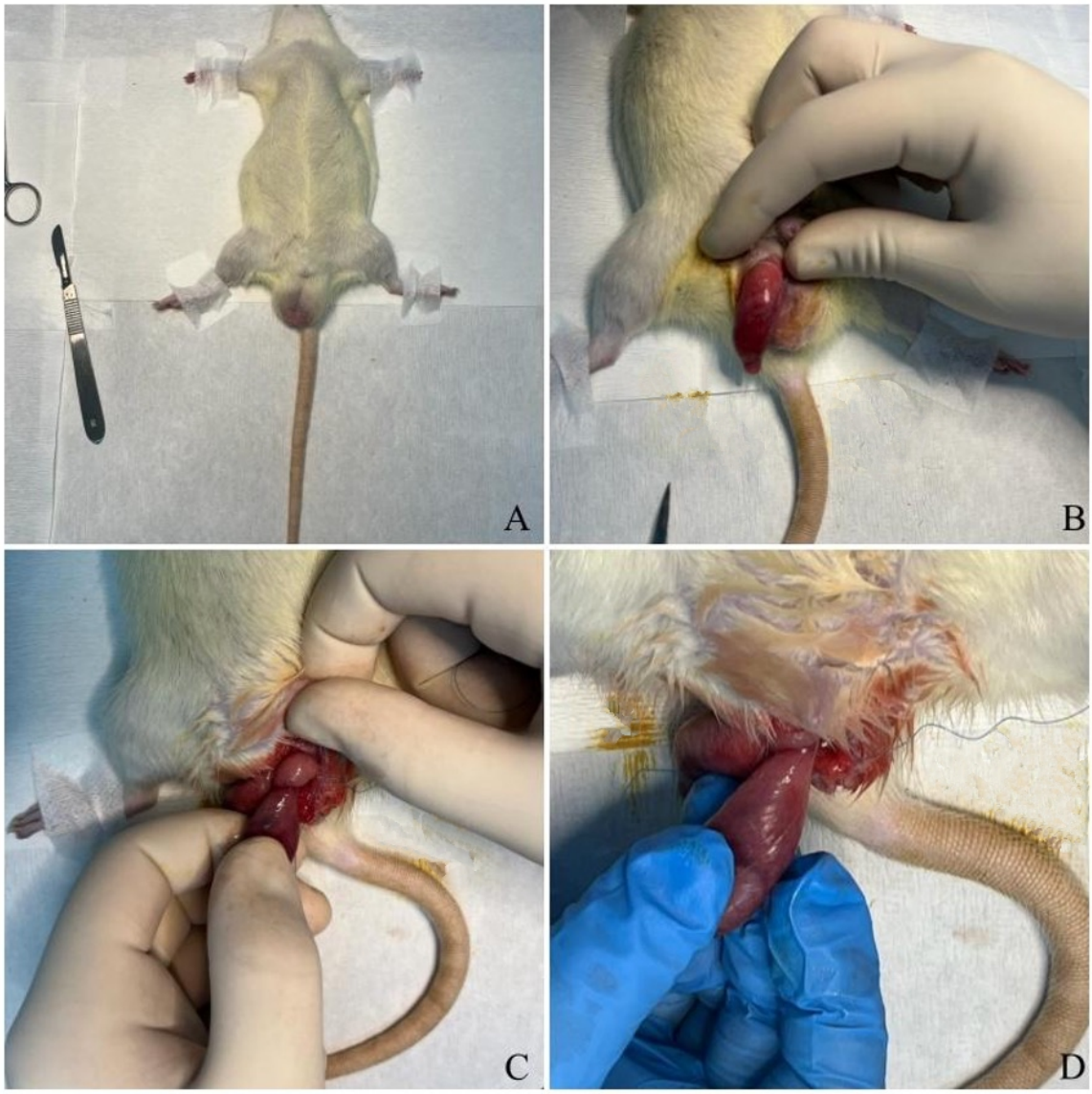
Grup-4: İ/R+C.siliqua Grubu: Grup-3'te anlatılan şekilde testis torsiyonu modeli oluşturulmuş, detorsiyondan 30 dakika önce 500 mg/kg *Ceratonia siliqua* ekstresi intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir. 2. saatin sonunda detorsiyone edilen dokuda reperfüzyon sağlanmış; detorsiyon sonrası testisler anatomik pozisyonunda olacak şekilde yerleştirilip cilt kapatılmıştır. 1 hafta boyunca intraperitoneal enjeksiyona aynı dozlarda devam edilmiştir. İşlemden 1 hafta sonra sakrifikasyon yapılmış, her iki testis de histopatolojik ve biyokimyasal çalışmalar için alınmıştır.

Tablo 3.1: Deney Grupları ve Uygulanan İşlemler

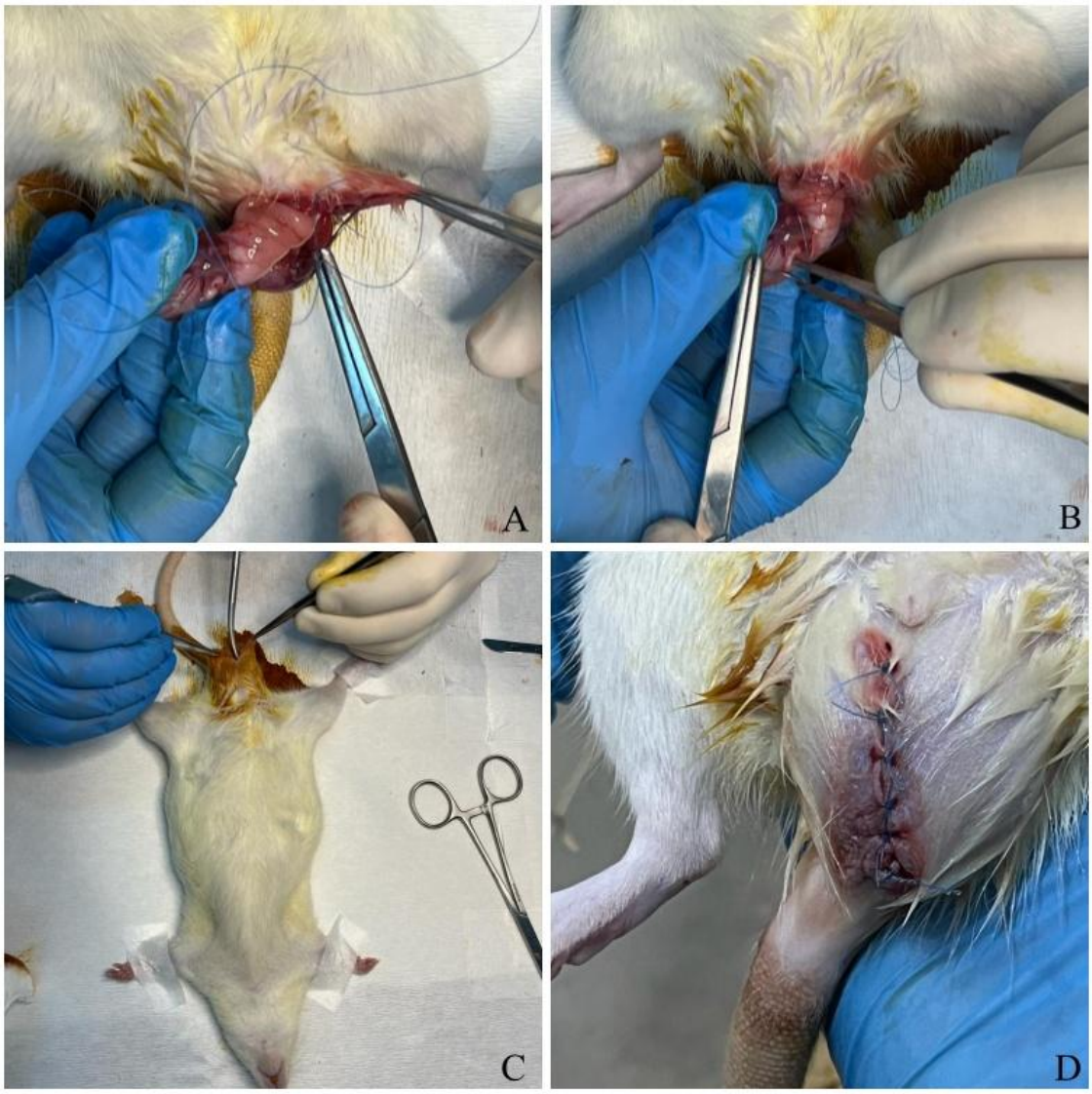
Deney Grubu	Yapılan İşlem	Gruptaki Sıçan Sayısı
Grup-1: Kontrol	Kontrol	7
Grup-2: *Ceratonia siliqua*	1 hafta IP 500 mg/kg *Ceratonia siliqua* L enjeksiyonu	7
Grup-3: İ/R	720° 2 saat torsiyon	7
Grup-4: İ/R+C.siliqua	720° 2 saat torsiyon, reperfüzyondan 30 dk önce IP 500 mg/kg *Ceratonia siliqua* L enjeksiyonu + 1 hafta IP 500 mg/kg *Ceratonia siliqua* L enjeksiyonu	7

Tüm gruplardaki sıçanlardan, sakrifikasyon günü intrakardiyak kan örnekleri alınmıştır.

Ceratonia siliqua ekstresi ticari ürün olarak alınmıştır (Meysüt,Türkiye; MS071020). %10 dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözdürülüp %90 serum fizyolojik ile dilüe edilmiştir (103, 104). Taze hazırlanan solüsyona, 0.40 mikronluk porlarla filtrasyon işlemi uygulanmış ve IP olarak sıçanlara enjekte edilmiştir.

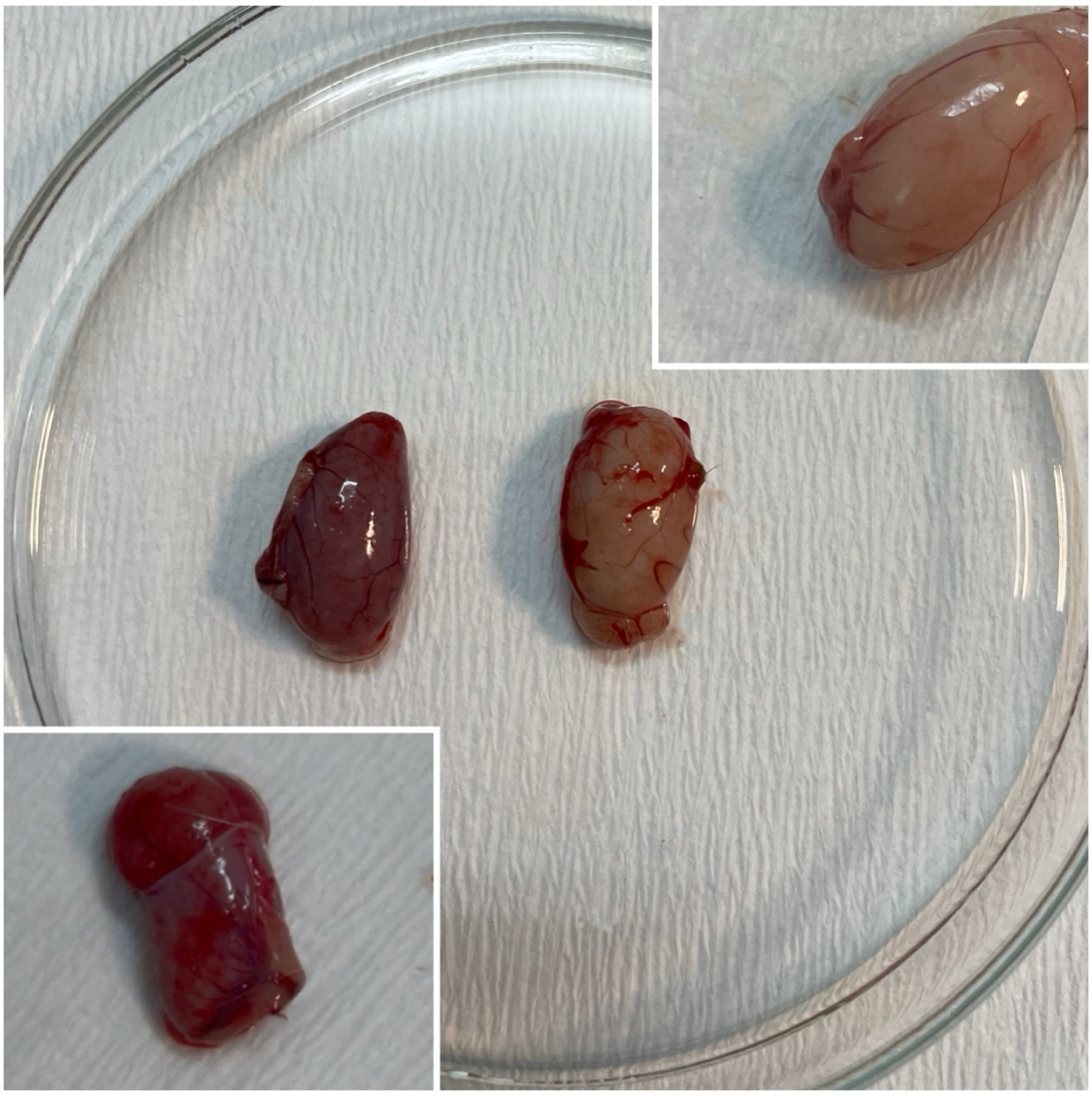


Şekil 3.2: Torsiyon İşlemi. Sıçanlara anestezi altındayken supin pozisyon verilmiş (A), midskrotal kesi açıldıktan sonra testis ve spermatik kord serbestleştirilmiştir (B). Spermatik kord 720° döndürülerek torsiyon modeli uygulanmıştır (C ve D).



Şekil 3.3: Torsiyon İşlemi Sonrası Derinin Kapatılması. Torsiyon modeli oluşturulduktan sonra detorsiyona kadar geçecek olan sürede modelin devamlılığını sağlamak amacıyla torsiyone testis primer sütürle sabitleştirilmiş (A ve B), skrotum derisi kapatılmıştır (C ve D).

Şekil 3.4: Detorsiyon öncesi testisler. Detorsiyondan önce makroskopik olarak testisler hemorajik, nekrotik, koyu renkli izlenebildi.



Şekil 3.5: Kontrol ve İ/R Grubu Testisleri. Solda İ/R grubuna sağda ise kontrol grubuna ait çıkartılan testisler izlenmektedir. İ/R grubuna ait testisler koyu kırmızı renkte, hemorajik görülebildi. Kontrol grubuna ait testisler ise daha açık renkte, fizyolojik izlenebildi.

3.2. IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME

Testis dokularının takibi, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Işık Mikroskobu Laboratuvarında manuel olarak yapıldı. Işık mikroskobu ile incelenecek testis doku örnekleri parafin kasetlere yerleştirilip gruplarına göre etiketlendi. Testislerin bir yarısı %10 nötral tamponlu formalin pH:6-7 içinde en az 24 saat olacak şekilde tespit edildi. Doku örnekleri sırasıyla %70 Etanol 1 saat (2 kez), %90 Etanol 1 saat (2 kez) , %96 Etanol 1 saat (2 kez), %100 Etanol 1 saat (2 kez), Toluen (15 dakika), Parafin I 1saat, Parafin II 3 saat bekletildi. Testislerin diğer yarısı ise Bouin fiksatifi ile 48 saat fikse edildi. Daha sonrasında %70 alkol ile yıkandı. 1 gece %70 alkolde bekletildi. Ertesi gün sırasıyla artan alkol serilerinden geçirildi.

Kesit yüzeyine uygun olacak şekilde gömme işlemi tamamlandı ve parafin blok haline getirildi. Doku örneklerinden anabilim dalımız ışık mikroskobu laboratuvarında bulunan Leica RM22555 Rotary Mikrotom ile 3 µm kalınlığında kesitler alındı. Bouin ile fikse ediken doku kesitleri histokimyasal boyama için rodajlı lamlara, %10 nötral tamponlu formalinle fikse edilen doku kesitleri immünohistokimyasal boyama için pozitif şarjlı lamlara alındı.

3.2.1. Histokimyasal Boyama

3 µm kalınlığındaki testis doku kesitleri histokimyasal boyama işlemleri öncesinde; 56°C'de etüvde 1 gece bekletildi. Deparafinizasyonun tamamlanması için toluene alındı. Kesitler, sırasıyla azalan alkol serisinden (%100, %96, %90, %70) geçirildikten sonra distile suya indirildi ve histokimyasal boyama işlemleri başlatıldı. Görüntüler Zeiss Primostar 3 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Almanya) ile fotoğraflandı. Boyamaların gruplar arası karşılaştırılması ve skorlanması, iki araştırmacı tarafından çift kör olarak yapıldı.

3.2.2.1. Hematoksilen-Eozin

Testis dokularındaki iskemi-reperfüzyon hasarının histolojik düzeyde tespit etmek için Boin ile fikse edilmiş dokulardan alınan kesitler rutin hematoksilen-eozin protokolüne göre boyandı. Distile suya indirilen kesitler taze olarak süzülmüş Ehrlich Hematoksilen boyasında 5 dakika bekletildi. Nükleusların boyandığı ışık mikroskobu ile gözlendikten sonra dokular çeşme suyuna alındı. Çeşme suyu altında 15 dakika yıkanan dokular Eozin boyasında 1 dakika bekletildi. Distile suya alınan doku kesitleri dehidratasyon işlemi için sırasıyla yükselen alkol serilerinden ((%70, %90, %96, %100) geçirildi ve toluene alındı. Toluende 30 dakika bekletilen dokular entellan (Merck KGaA, Almanya) kullanılarak lamel ile kapatıldı.

Hasarın seminifer tübül epiteline olan etkileri, testislerdeki histolojik hasar analizi için modifiye Johnsen skorlama kriterleri referans alınarak kantitatif değerlendirme yapıldı. Bu amaçla yapılan histolojik analizler rastgele numaralandırma şeklinde kör çalışma olarak gerçekleştirildi. Her gruptaki sıçanlara ait kesitler ve her kesitte 40 adet seminifer tübül değerlendirildi. Modifiye Johnsen skorlama sistemine göre ortalama skor hesaplandı (105, 106).

Tablo 3.2: Modifiye Johnsen Skorlama Sistemi

Grade 1	Seminifer tübüller içinde hiçbir hücre yoktur.
Grade 2	Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücreleri vardır.
Grade 3	Germ hücreleri olarak sadece spermatogonyumlar vardır.
Grade 4	Spermatozoa ve spermatid yok, az sayıda spermatosit vardır.
Grade 5	Spermatozoa yok, spermatid yok, fazlaca spermatosit mevcuttur.
Grade 6	Spermatozoa yok, az sayıda (10'dan az) spermatid mevcuttur.
Grade 7	Spermatozoa yok, farklanma işareti olmaksızın fazla sayıda spermatid vardır.
Grade 8	Olgun spermatozoa olmaksızın geç spermatidler mevcuttur.
Grade 9	Germinal epitel çok sıralı ve disorganize, spermatogenezis hafifçe bozulmuş, çok sayıda spermatid, az sayıda spermatozoa var.
Grade 10	Germinal epitel çok sıralı ve organize olup çok sayıda spermatozoa var, tam spermatogenez mevcuttur.

3.2.2.2. Masson trikrom

Boin ile fikse edilmiş dokulardan alınan kesitlerde rutin Masson trikrom histolojik boyama protokolü izlendi. Distile suya indirilen dokular Weigert Hematoksilende 3 dakika bekletildi. Nükleus boyanması ışık mikroskobu altında gözlendikten sonra çeşme suyu altında 10 dakika bekletildi. Fuksinli ponzada 3 dakika bekletilen dokular sırasıyla distile su ve asetik asite daldırıldıktan sonra Orange-G'ye alındı. Orange-G'de 3 dakika bekletilen dokular tekrar distile su ve asetik asite daldırıldı. Taze hazırlanmış light green boyasında 5 dakika bekletilen dokular önce asetik asite daldırıldı, sonrasında yükselen alkol serilerinden (%96-%100) geçirilerek toluene alındı. Toluende 30 dakika bekletilen dokular entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

Fibrozis skorlaması için boyanmış kesitler semikantitatif olarak boyanma miktarlarına göre skorlandı. Skorlama, iki histolog tarafından çift kör olacak şekilde yapıldı. Puanlama, her bir kriter için 0-3 aralığında (hasar yok, hafif, orta, ağır) hesaplandı (107).

3.2.2. İmmünohistokimyasal Boyama

Pozitif şarjlı lam üzerine alınan 3 µm kalınlığındaki kesitler işlem öncesi, antijenik aktivasyon için, bir gece boyunca 37ºC'deki etüvde bekletildi. Ertesi gün, 56ºC'deki etüvde 1 saat bekletilen doku kesitleri, 30'ar dakika olacak şekilde iki kez toluen ile muamele edildi. Deparafinizasyon işlemi tamamlandıktan sonra her biri 5 dakika olacak şekilde azalan alkol serisinden (%100, %96, %90, %70) geçirilen doku kesitleri distile suya indirildi ve sonrasında dokuda var olan peroksidaz aktivitesini baskılamak için %3 hidrojen peroksit-metanol solüsyonunda 10 dakika karanlıkta bekletildi. Sonra, fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı.

Antijen geri kazanımı için, formalin fiksasyonu ile maskelenen antijenik bölgelerin açığa çıkarılması amacıyla doku örnekleri sitrat tamponu (pH: 6.0) içinde, mikrodalga kullanılarak yüksek güçte 3 kez kaynatıldı ve inkübe edildi. Daha sonra, PBS ile yıkandı.

Nonspesifik bağlanmayı önlemek için bloklama solüsyonu (Ultra V Block (TA-125-UB), UltraVision™ Large Volume Detection System) ile 10 dakika muamele edildi. Primer antikor uygulaması gece boyunca +4 ºC'de yapıldı. Sonra, PBS ile yıkandı.

Antijenin iki aşamada indirekt olarak işaretlenebilmesi için ikincil bir antikor kullanılarak (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (TP-125-BN), UltraVision™ Large Volume Detection System) 15 dakika muamele edildi. Daha sonra, PBS ile yıkandı.

Antijen-antikor bağlanmasını görselleştirmek için Streptavidin Peroksidaz (TS-125-HR), UltraVision™ Large Volume Detection System) solüsyonunda 15 dakika bekletilerek primer ve sekonder antikorlara enzim etiketleri eklendi. Sonrasında PBS ile yıkandı.

Gösterilmek istenen antijen yapıları 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (TA-125-HD, DAB Chromogen & Substrate system, LAB VISION) kromojeni kullanılarak renklendirildi. Daha sonra, distile su ile çalkalandı. Ehrlich Hematoksilen içinde 3 dakika bekletilerek karşıt boyama tamamlandı ve mikroskop altında kontrol edildi. Sonra, çeşme suyunda çalkalandı. Preparatlar, %96 ve %100 alkolde hızlı bir şekilde dehidre edildi ve kapatılana kadar tolüende bekletildi. Son olarak, preparatlar kromojene uygun kapatıcı kullanılarak (Entellan Merck KGaA, Almanya) lamellerle kapatıldı ve karanlıkta saklandı.

Antikorlara yönelik boyanma ve hasarın incelenmesi ışık mikroskobu altında gerçekleştirildi. Görüntüler Zeiss Primostar 3 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Almanya) ile fotoğraflandı. Boyamaların gruplar arası karşılaştırılması; kaspaz, HIF-1α,SOD ve katalaz için 40 adet tübül semikantitatif yöntemle değerlendirildi (108). CD68 pozitif boyanan hücreler x40 büyütmede 20 alanda sayıldı (109, 110).

3.2.2.1. Primer antikor uygulaması

3.2.2.1.1. Kaspaz-3

Apoptoz hücre ölüm yolağının göstergesi olarak intrensek ve ekstrensek mekanizmada ortak rol oynayan ayrışmış kaspaz-3 proteininin tespiti için monoklonal kaspaz-3 antikoru (Catalog No: 43-7800, Invitrogen, USA) 1:100 dilüsyonda gece boyunca +4 ºC'de bekletilmiştir.

3.2.1.1.2. HIF-1α

Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1alfa (HIF-1-α) ekspresyonunu göstermek için monoklonal HIF-1α antikoru (sc-13515, Santa Cruz, USA) 1:100 dilüsyonda gece boyunca +4 ºC'de bekletilmiştir.

3.2.1.1.3. CD68

Doku makrofajları tarafından eksprese edilen CD68 proteinin ekspresyonunu incelemek amacıyla poliklonal Anti-CD68 antikoru (ab25212, Abcam, ABD) 1:200 dilüsyonda gece boyunca +4 ºC'de bekletilmiştir.

3.2.1.1.4. SOD

Oksidatif strese karşı temel antioksidan enzimlerden biri olan süperoksit dismutaz (SOD) ekspresyonunu göstermek amacıyla poliklonal SOD-1 antikoru (sc-11407, Santa Cruz, USA) 1:100 dilüsyonda gece boyunca +4 ºC'de bekletilmiştir.

3.2.1.1.5. Katalaz

Oksidatif strese karşı temel antioksidan enzimlerden biri olan katalaz (CAT) ekspresyonunu göstermek amacıyla poliklonal katalaz antikoru (sc-50508, Santa Cruz, USA) 1:100 dilüsyonda gece boyunca +4 ºC'de bekletilmiştir.

3.3. ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELEME

Dokuların takibi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Elektron Mikroskobu Laboratuvarında yapılmıştır. Doku takip cihazı (Leica EM TP, Almanya) kullanılmıştır.

En fazla 1 mm^3 büyüklüğünde alınan testis doku örnekleri %2,5 gluteraldehit ile hazırlanmış fiksatifte 4 saat süreyle +4ºC'de bekletildi. 4. Saatin sonunda örnekler çeker ocak altında fosfat tamponlu salin çözeltisine alındı. Doku takibi işlemine başlandı. +4ºC'de

%1'lik osmik asitle 1 saat muamele edilen doku örnekleri, PBS ile yıkandı. Ardından +4ºC'de %1'lik uranil asetatta 1 saat bekletildi. PBS ile tekrar yıkandı. Oda ısısında karıştırılarak, sırasıyla yükselen alkol serisinden (%70, %90, %96, %100) geçirildi ve 10 dakika süreyle geçiş maddesi olan propilen oksit ile muamele edildi. Daha sonra değişen oranlarda (1:1, 1:3) propilen oksit epon karışımlarında 1'er saat bekletildi. Saf eponda 1 saat bekletilen dokular kapsüllere gömüldü. 60ºC etüve konan doku örneği içeren kapsüller 18 saatte polimerize edildi. Polimerleşen ve blok haline getirilen doku örneklerinde, blok trim cihazı (Leica, EM TRIM2, Almanya) kullanılarak, kesit yüzeyi açıldı. Elmas bıçaklar yardımıyla ultramikrotom (Leica, EMUC7, Almanya) kullanılarak ince (60 nm kalınlığında) kesitler alındı. Su havuzuna düşen kesitler, bakır gridler üzerine aktarılıp kapalı petriler içinde kurutuldu. Dokular elektron mikroskobu (Jem 1011, JEOL, ABD) ile inceleme için hazır hale getirildi.

İnceleme sırasında kontrol, C. siliqua, İ/R ve İ/R+C.siliqua grupları arasındaki karşılaştırma, iki araştırmacı tarafından gözlemsel olarak yapıldı. Hücrelerin genel morfolojisi ve hücre içi meydana gelen değişikliklerle incelendi.

3.4. BİYOKİMYASAL İNCELEME

Tüm Biyokimyasal analizler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı.

3.4.1. Doku ve Kan Örneklerinin Hazırlanması

Sıçanlardan alınan intrakardiyak kan örnekleri sarı kapaklı, jel separatörlü biyokimya tüplerine alınıp 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Serumlar ependorflara aktarılıp analize kadar -80 °C'de saklandı. Çıkarılan testis dokuları biyokimyasal analizler için -80°C'de saklandı.

3.4.2. Doku Homojenizasyonu

-80°C'de bekletilen dokular analiz günü 0.250 gr olacak şekilde tartıldı ve ependorflara alındı. 2.5 ml KCl eklenerek %10'luk homojenatlar hazırlandı. Homojenitazörle dokular parçalandı.

3.4.3. Biyokimyasal Analizler

3.4.3.1. Glutatyon (GSH) düzeylerinin ölçümü

Prensip; Ellman ayracının (5,5' ditiobis-2 nitro benzoik asit: DTNB) sülfidril grupları tarafından indirgenmesi sonucunda 1 mol -SH grubu başına 1 mol 2-nitro-5-tiyobenzoik (TNB) asit oluşturmasına dayanmaktadır. Oluşan son sarı renkli ürün spektrofotometrik olarak 412 nm'de absorbans verir.

Ayıraçlar

1. Proteinsizleştirme Çözeltisi: 4.1 gr g-metafosforik asit, 500 mg Na_2EDTA ve 72 gr NaCl 250 mL distile suda çözüldü.
2. 0.3 M Na_2HPO_4: 4.3 gr Na_2HPO_4 tartılır, 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.
3. Ellman Ayracı: 4 mg DTNB 10 ml %1'lik sodyum sitrat içinde çözülür.
4. 0.1 mg/ml GSH Standardı
5. %1'lik Sodyum Sitrat

Tablo 3.3: GSH ölçümü için kör, standart ve deney gruplarının hazırlanması

	Kör	Std1	Std2	Deney
Distile Su (μl)	125	125	250	
KCl (μl)	375	375	250	375
Proteinsizleştirme Çözeltisi (μl)	750	750	750	750
Homojenat (μl)				125

İşlem: Tabloda verildiği şekilde elde edilen solüsyonlar 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası elde edilen kör, standart 1 ve 2, deney gruplarından toplanan supernatantlar mikroplaka kuyucuklarına 50 μl pipetlendi. Üzerlerine 200 μl Na_2HPO_4 ve 50 μl Ellman ayıracı konularak 412 nm'de spektrofotometre cihazında (Spektrofotometre (Ultrospec 2000 / Pharmacia Biotech) okundu. Hesaplamalar ekstinksiyon katsayısı (13600 M^{-1} cm^{-1}) ve standart kullanılarak μmol/ml cinsinde ifade edildi.

3.4.3.2. Malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçümü

Prensip; Lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA'nın tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucunda oluşan renk spektrofotometrik olarak 535 nm'de absorbans verir.

Buege-Aust Ayracı: 375 mg TBA üzerine 15 ml %100'lük trikloroasetik asit (TCA) ve 2.1 ml konsantre hidroklorik asit (HCl) eklenip distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

İşlem: Doku homojenatı 600 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatanttan 250 μl alındı ve üzerine 500 μl Buege ayracı tüplere eklendi. Tüplerin ağızların misketle kapatılıp 15 dakika kaynar su banyosuna alındı. Kaynar su banyosu sonrası tüpler 600g'de oda ısısında 10 dakika santrifüj edildi. 300 μl üst fazdan alınıp platelere pipetlendi. Spektrofotometre cihazında (Spektrofotometre (Ultrospec 2000 / Pharmacia Biotech) 535 nm'de okundu. Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı (ε=1,56x10-5 M-1 cm-1) ve standardın absorbansı değerlendirilerek hesaplandı. Hesaplamalar sonrasında sonuçlar nmol/ml cinsinden ifade edildi.

3.4.3.3. ROS

Reaktif oksijen türleri (ROS) ölçümünün prensibi; 2,7-diklorodihidrofloresein diasetatın (DCFH-DA) esterazlar ile 2,7-dihidrofloresein (DCFH)'e dönüşmesi ve oluşan bu ürünün ortamdaki ROS tarafından floresans veren 2,7-diklorofloresein (DCF)'e oksitlenmesine dayanır.

İşlem: 600 g'de, 10 dakika santrifüjlenmiş homojenattan 200 μl siyah Elisa platelerine pipetlendi. Deney grubuna 10 μl DCFI-DA eklendi; kör grubu oluşturmak için rastgele seçilen örneklere 10 μl distile su eklendi. Absorbansları 485 nm'de okundu (Spektrofotometre (Ultrospec 2000 / Pharmacia Biotech). RFU birimiyle ROS düzeyleri belirtildi.

3.4.3.4. AOPP

Başlıca ditrizon içeren çapraz bağlı protein ürünleri olan ileri oksidasyon protein ürünleri (advanced oxidation protein product: AOPP) tayini için doku homojenat örneklerinin sitrik asit içeren asit ortamda verdiği absorbansları 340 nm'de okundu. Sonuçlar kloramin T ile potasyum iyodürün (KI) oksidasyonuyla oluşan triiyodit ile standardize edilerek karşılaştırıldı.

Ayıraçlar

0,2 M sitrik asit taze (2,1 g-50 ml dH2O)

1,16 M KI taze (1,92 g-10 ml dH2O)

Kloramin-T stok standardı (100 mM): 227,6 mg Kloramin-T 10 ml'de çözüldü. Sonrasında 0,2 M sitrik asitle sulandırıldı. 25,50 ve 100 μM'lık çalışma standartları hazırlandı.

İşlem: Homojenattan 40 μl ve sitrik asitten 160 μl kuyucuklara eklenerek deney grupları oluşturuldu. 190 μl sitrik asit ve 10 μl KI içeren kuyucuklar (kör), 170 μl Kloramin-T (25,50 ve 100 μM'lık çalışma standartları) ve 10 μl KI içeren (standart) kuyucukları da hazırlandı ve kör gruba karşı deney ve standartların absorbansı 340 nm'de UV plate ile okundu (Spektrofotometre (Ultrospec 2000 / Pharmacia Biotech). Kör ve standart ortalamaları alınıp hesaplamalar yapıldıktan sonra nmol/mg protein olarak AOPP seviyeleri ifade edildi.

3.4.3.5. FRAP

Antioksidan aktivite (ferric reducing antioxidant power: FRAP) ölçümü prensibi, serumdaki antioksidan maddelerin Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirgeme prensibine dayanır.

Ayıraçlar

300 mm ph:3.6 Asetat Tamponu: 310 mg sodyum asetat, 1,16 ml asetik asit ile karıştırılır. 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

10 mM 2,4,6 tripridril-S-triozin 40mM HCl: 31,2 mg TPTZ 10 mL 40 mM HCl'de çözülür.

20 mM $FeCl_3.6H_2O$: 54 mg $FeCl_3.6H_2O$ 10 mL distile suda çözülür.

Çalışma Ayracı: 10 ml asetat tamponu+1 ml TPTZ+1 ml $FeCl_3$ oranında karıştırılarak hazırlanır.

Askorbik Asit 1 mM: 17,6 mg askorbik asit 100 mL distile suda çözülür.

İşlem: 200 μl çalışma ayracı ve 10 μl homojenat kuyucuklara eklendi. Ayrıca 10 μl 1mM askorbik asit ve 200 μl çalışma ayracı içeren kuyucuklar da hazırlandı. 37°C'de 4 dakika beklendikten sonra 593 nm'de verdikleri absorbans okundu. 1 mM askorbik asitin FRAP değeri 2000 olarak kabul edildi ve sonuçlar karşılaştırılarak nmol/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.4.4. ELISA Yöntemi

ELISA yöntemiyle sıçanlardan alınan serum örneklerinde testosteron, inhibin B ve AMH düzeyleri belirlendi.

3.4.4.1. Testosteron

Serumdaki testosteron seviyesinin ölçümü için yarışmalı ELISA test kiti kullanıldı. (Elabscience QuickKey pro Rat T(Testosterone) ELISA Kit Catalog No: E-OSEL_R0003) Kuyucuklara 50 μl numune üzerine 50 μl HRP bağlı antikorlu çalışma solüsyonu eklenip 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Yıkama işleminden (ELISA plak yıkama sistemi (ESW 300 Medispec, US)) sonra 90 μl substrat reagent eklendi ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Her kuyuya 50 μl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Renk değişikliği 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Mikroplaka spektrofotometre (Biotech, UK)). Standart grafiğinden faydalanılarak örneklerdeki testosteron düzeyi belirlendi. Elde edilen sonuçlardan testosteron düzeyi ng/ml birimi olarak verildi.

3.4.4.2. İnhibin B

Serumdaki inhibin B seviyesinin ölçümü için sandwich ELISA test kiti kullanıldı. (ElabScience Rat INHB (İnhibin B) ELISA Kit Catalog NO: E-EL-R1027) Rat İnhibin B antikoru ile önceden kaplanmış monoklonal antikor enzim kuyusuna 100 μl numuneler eklendi ve 90 dakika 37°C'de inkübe edildi. Biyotinle etiketlenmiş İnhibin B antikoru eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Aspirasyon ve yıkama işlemleri (ELISA plak yıkama sistemi (ESW 300 Medispec, US)) sonrasında 100 μl HRP Konjugat solüsyonu ile 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Tekrar aspirasyon ve yıkama işlemleri gerçekleştirildi. 90 μl substrat reagent eklendi ve 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. 50 μl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Renk değişikliği 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Mikroplaka spektrofotometre (Biotech, UK)). Standart grafiğinden faydalanılarak örneklerdeki İnhibin B düzeyi belirlendi. Elde edilen sonuçlardan İnhibin B düzeyi pg/ml birimi olarak verildi.

3.4.4.3. AMH

Serumdaki AMH seviyesinin ölçümü için sandwich ELISA test kiti kullanıldı. (ElabScience Rat AMH (Anti-Mullerian Hormone) ELISA Kit Catalog No: E-EL-R3022) Rat AMH antikoru ile önceden kaplanmış monoklonal antikor enzim kuyusuna 100 μl 15 kat sulandırılımış serum örnekleri eklendi ve 90 dakika 37°C'de inkübe edildi. Biyotinle etiketlenmiş AMH antikoru eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildi.Aspirasyon ve yıkama

işlemleri (ELISA plak yıkama sistemi (ESW 300 Medispec, US)) sonrasında 100 μl HRP Konjugat solüsyonu ile 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Tekrar aspirasyon ve yıkama işlemleri gerçekleştirildi. 90 μl substrat reagent eklendi ve 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. 50 μl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Renk değişikliği 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Mikroplaka spektrofotometre (Biotech, UK)). Standart grafiğinden faydalanılarak örneklerdeki AMH düzeyi belirlendi. Elde edilen sonuçlarda AMH düzeyi pg/ml birimi olarak verildi.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Elde edilen tüm sayısal verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılım gösteren verilerde parametrik test olarak bağımsız gruplarda tek yönlü ANOVA (post hoc Tukey) testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen verilerde Kruskal Wallis testi uygulandı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım gösteren veri grupları ortalama ± standart sapma; normal dağılım göstermeyen veri grupları medyan ve çeyrekler açıklığı (IQR) olarak ifade edildi. Normal dağılım göstermeyen karşılaştırmalar Whiskers-Tukey grafikleri ile gösterildi. İstatistiksel analiz için İstanbul Üniversitesi lisanslı programı Graphpad Prism 10.0.1 (GraphPad Software, San Diego, USA) kullanıldı.

3.6. ŞEMATİK TASARIM

Şekil 1.1 ve Şekil 3.1 görsel tasarım aracı Biorender (Toronto, Kanada) ile ücretsiz sürüm dahilinde hazırlandı.

4. BULGULAR

4.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

4.1.1. Hematoksilen-Eozin

Kontrol grubuna ait testisler normal testiküler morfolojide gözlendi (Şekil 4.1). Tübüllerde spermatogenik seri hücrelerinin tamamı seçilebildi, olgun spermler izlenebildi (Şekil 4.2).

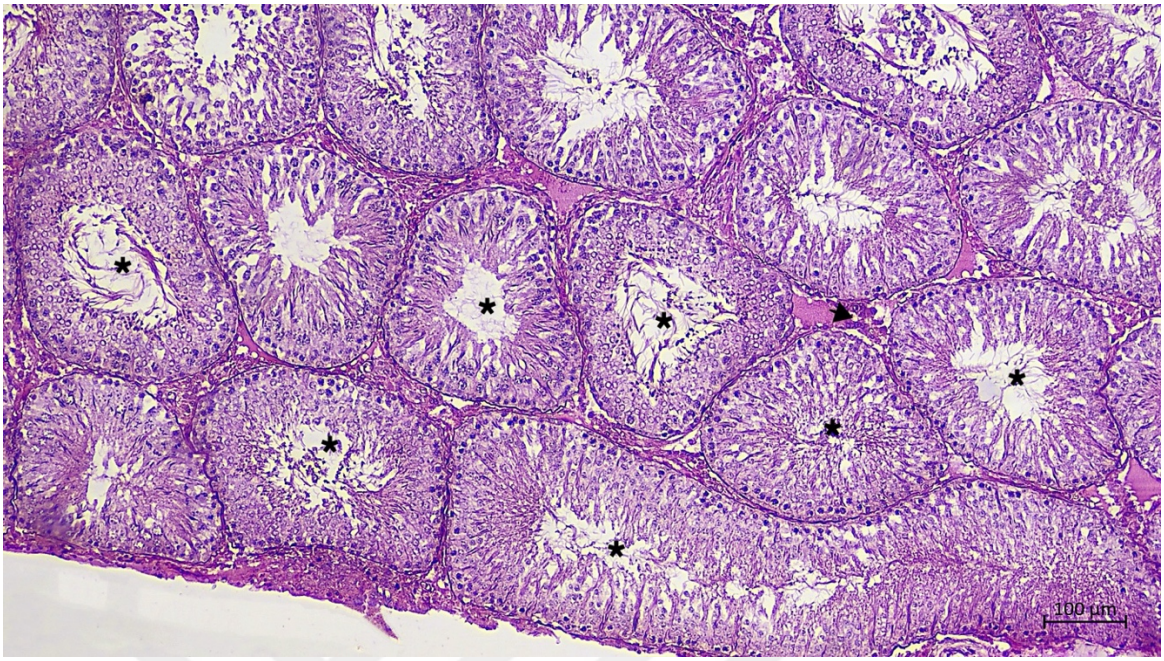
C.siliqua grubuna ait testislerde spermatogernik seri hücrelerinin seçilebildiği, morfolojinin korunduğu seminifer tübüller gözlendi (Şekil 4.3, Şekil 4.4)

İ/R grubuna ait testislerde germinal epitelin atrofisi görüldü (Şekil 4.5). Germinal epitel atrofisine uğramış seminifer tübüller germ hücrelerinden yoksun; sadece Sertoli hücreleriyle kaplıydı. Dejenere germ hücre formu olan, çok çekirdekli dev hücreler de İ/R grubuna ait testis seminifer tübüllerinde izlenebildi (Şekil 4.5, Şekil 4.8). Spermatogenik hücrelerin organizasyonunun bozulduğu ve immatür germ hücrelerinin lümen içine döküldüğü gözlendi (Şekil 4.5). Seminifer tübül epitelinde bozulmalar, ayrışmalar izlendi (Şekil 4.5). Bazı seminifer tübüllerde nekrotik değişiklikler mevcuttu (Şekil 4.6). Germ hücrelerinin ve Sertoli hücrelerinin hücre ölümüne gidişler uyumlu şekilde hipereozinofilik boyandığı gözlenebildi (Şekil 4.7). Hücreler arası vakuol oluşumu izlendi (Şekil 4.8, Şekil 4.9. Şekil 4.10). Tübüllerde piknotik çekirdekli hücreler ve apoptotik cisimler görüldü (Şekil 4.10). İ/R grubunda yer yer kan damarlarında konjesyon izlenebildi (Şekil 4.11).

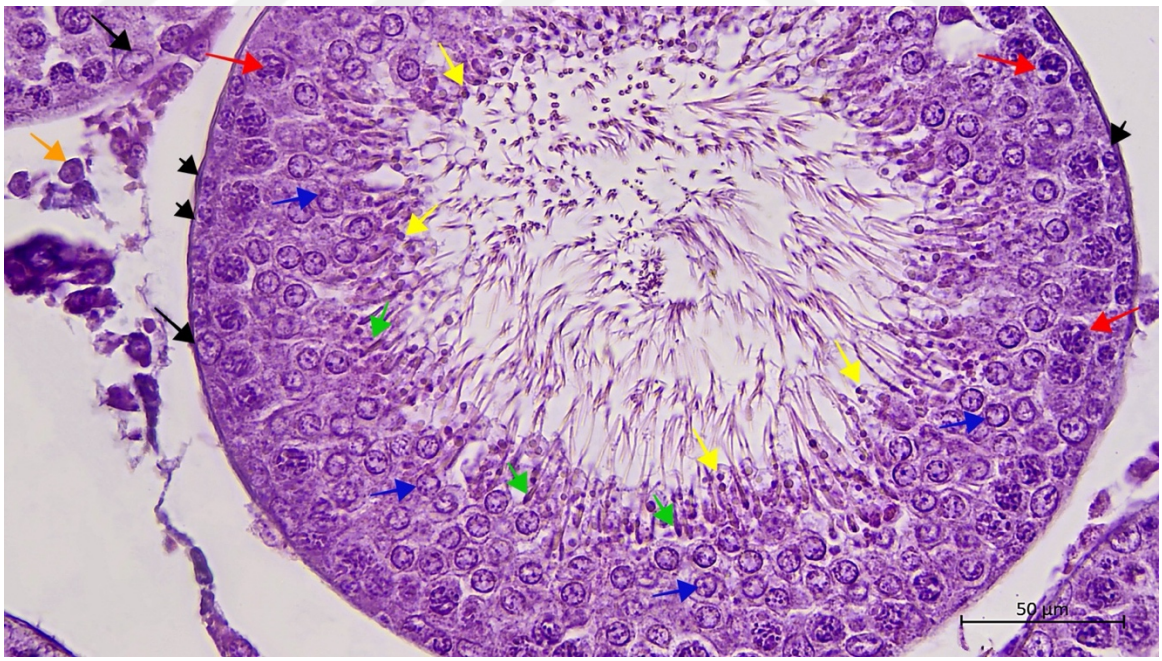
İ/R+C.siliqua grubunda ise seminifer tübül morfolojisi tübüllerin bir kısmında normaldi. Spermatogenik seri hücrelerinin tamamı izlenebildi (Şekil 4.13). Tübüllerin bir kısmında ise atipik lümen görünümü, yer yer vakuolizasyon görüldü. Spermatogenik seri hücrelerinin tamamının izlenemediği tübüller hasar grubuna kıyasla sayıca azdı (Şekil 4.12).

Tübüllerin sayısal değerlendirilmesi için Johnsen skorlaması yapıldı. Gruplar arası fark anlamlıydı ($p<0.0001$). Değerler normal dağılım gösterdi. Kontrol ve C. Siliqua grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.5$). İ/R grubundaki hasar, kontrol ve C.siliqua gruplarından fazlaydı ($p<0.0001$, $p<0.0001$). İ/R+C.siliqua grubundaki hasar, İ/R grubundan

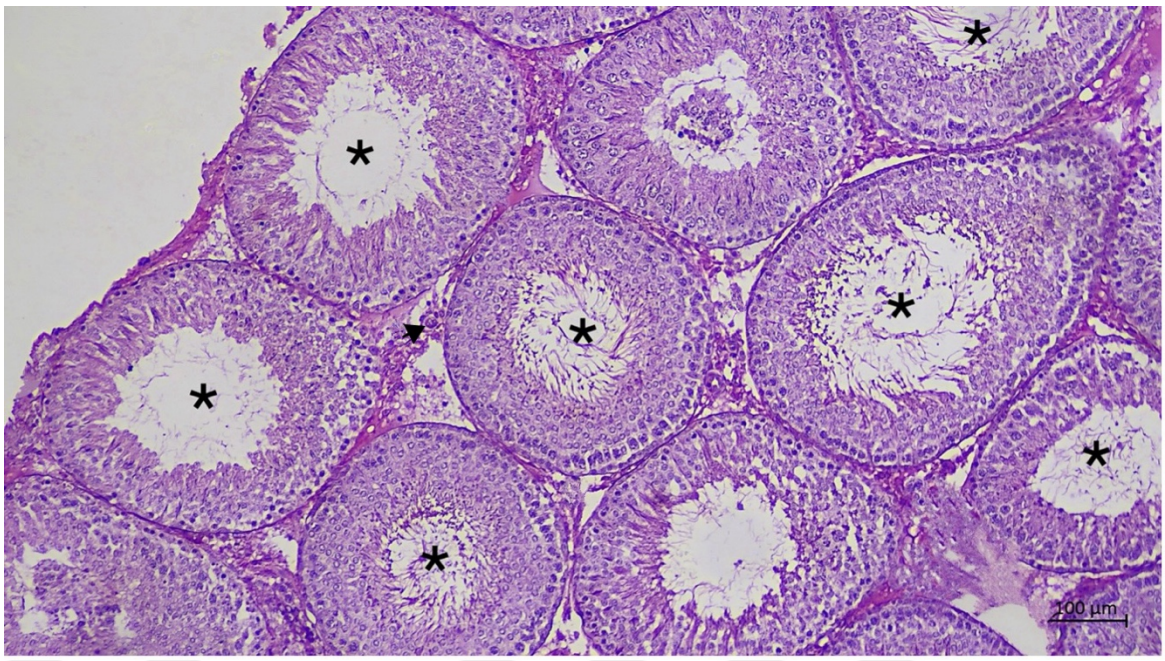
azdı ($p<0.0001$). İ/R+C.siliqua grubuyla kontrol ($p<0.0001$) ve C. Siliqua ($p<0.0001$) grupları arasında fark anlamlıydı.



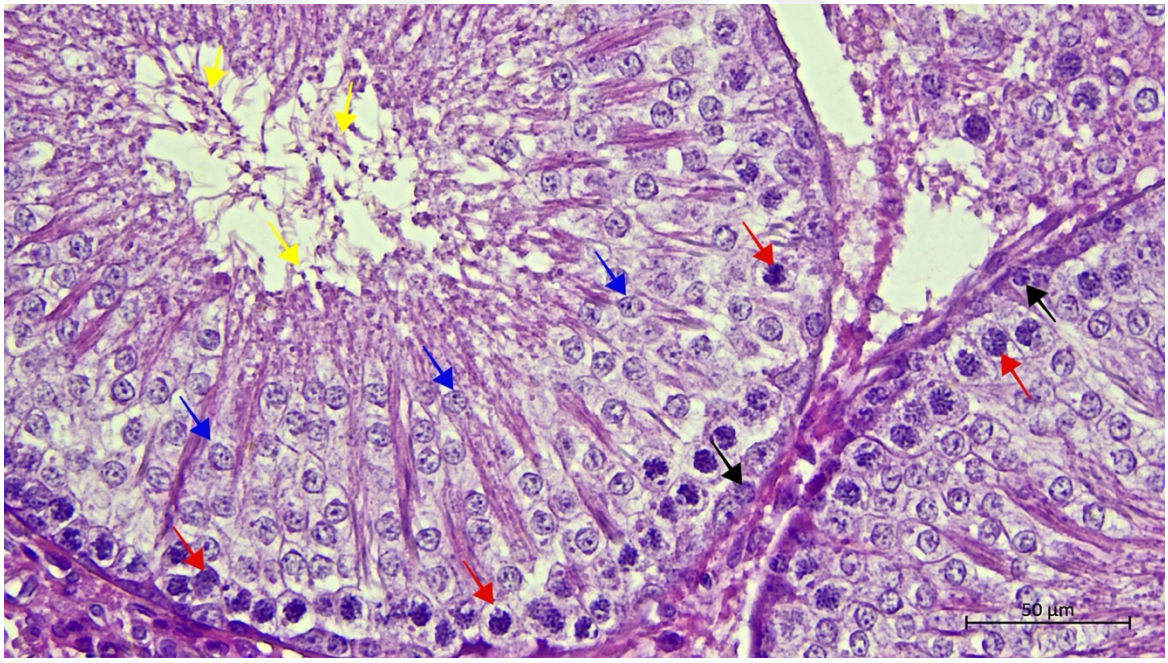
Şekil 4.1: Kontrol grubunun histolojik yapısı. Kontrol gruplarına ait testisler normal testiküler morfoloji göstermektedir. Spermatogenik seri hücrelerinin tamamının görüldüğü seminifer tübüllerin (asteriks) organizasyonu normaldir ve interstisyel hücreler (ok) seçilebilmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 10X. Ölçek 100 µm.



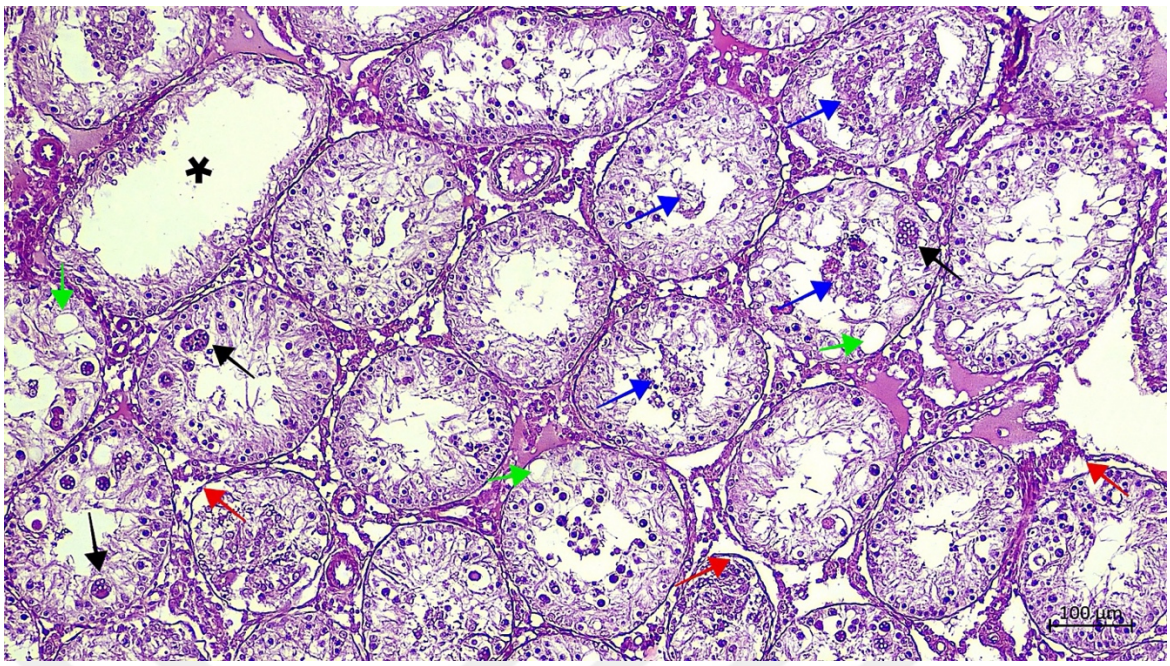
Şekil 4.2: Kontrol grubuna ait seminifer tübül kesiti. Sertoli hücreleri (uzun siyah ok), spermatogonyumlar (kısa siyah ok), spermatositler (kırmızı ok), erken spermatidler (mavi ok) ve geç spermatidler (yeşil ok) ile spermler (sarı ok) seçilebilmektedir. Leydig hücreleri (turuncu ok) interstisyel alanda bulunmaktadır. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.



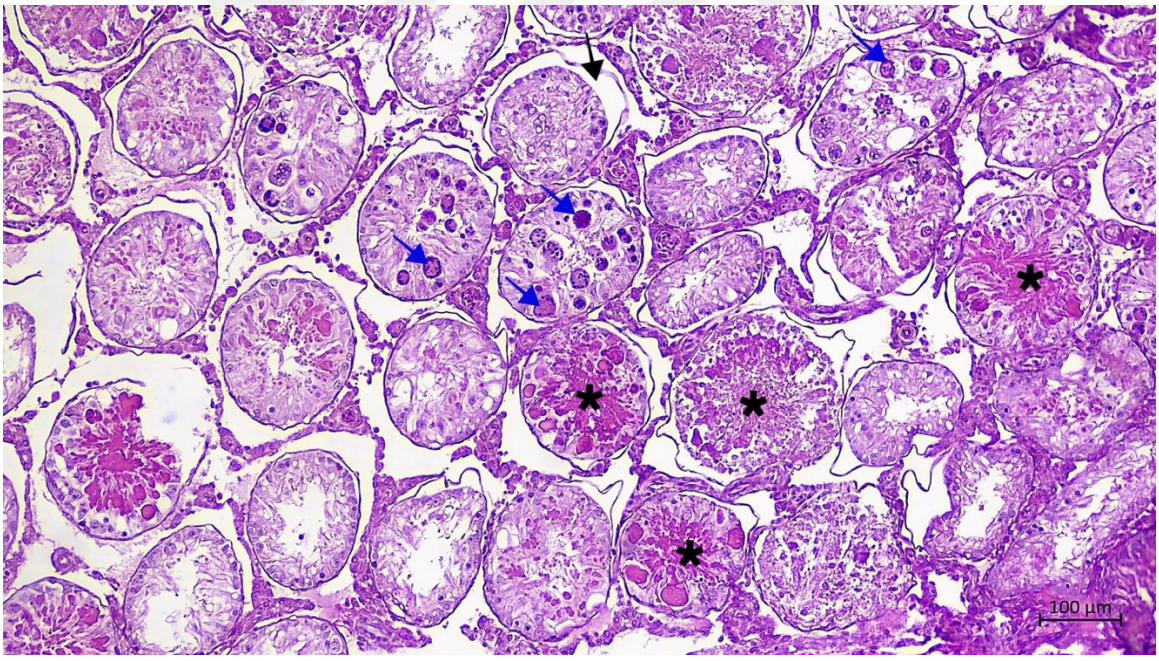
Şekil 4.3: **C. siliqua grubunun genel histolojik yapısı. Normal testis yapısı izlenmektedir. Spermatogonyumlardan sperme kadar tüm spermatogenik seri hücrelerinin gözlenebildiği normal morfolojide seminifer tübüller (asteriks) ve interstisyel alanda bulunan Leydig hücreleri (ok başı) seçilebilmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 10X. Ölçek 100 µm.**



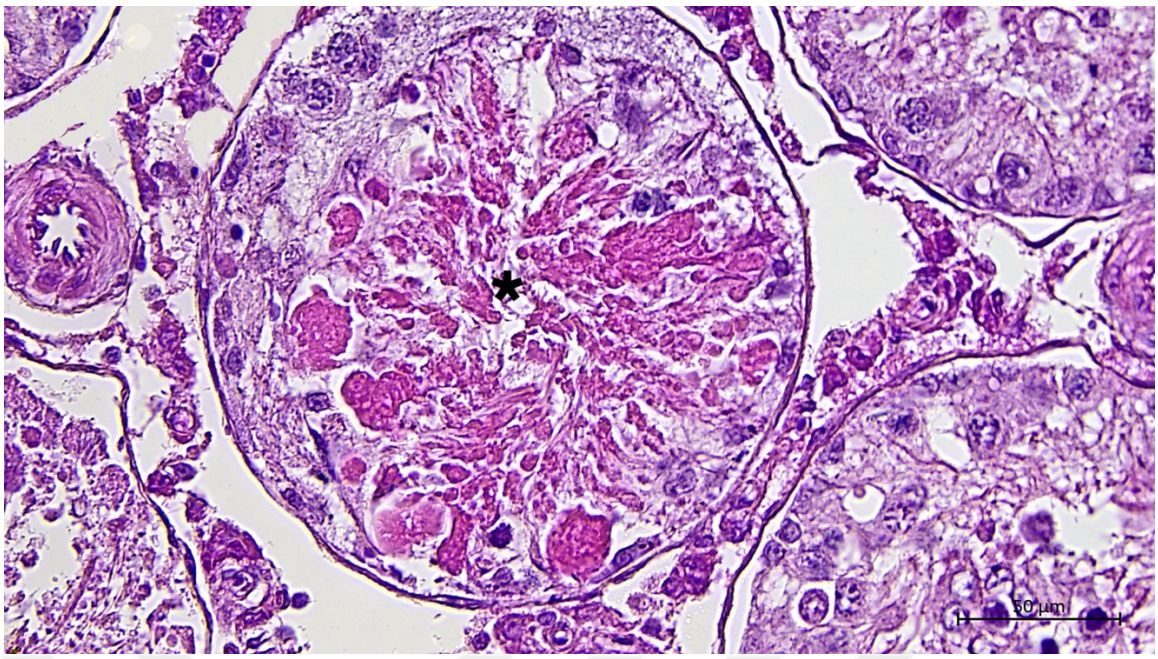
Şekil 4.4: **C. siliqua grubuna ait seminifer tübül kesiti. Spermatogonyumlar (siyah ok), spermatositler (kırmızı ok), spermatidler (mavi ok) ve olgun spermler (sarı ok) seçilebilmektedir. Tübüller morfolojik olarak normal görünümdedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.**



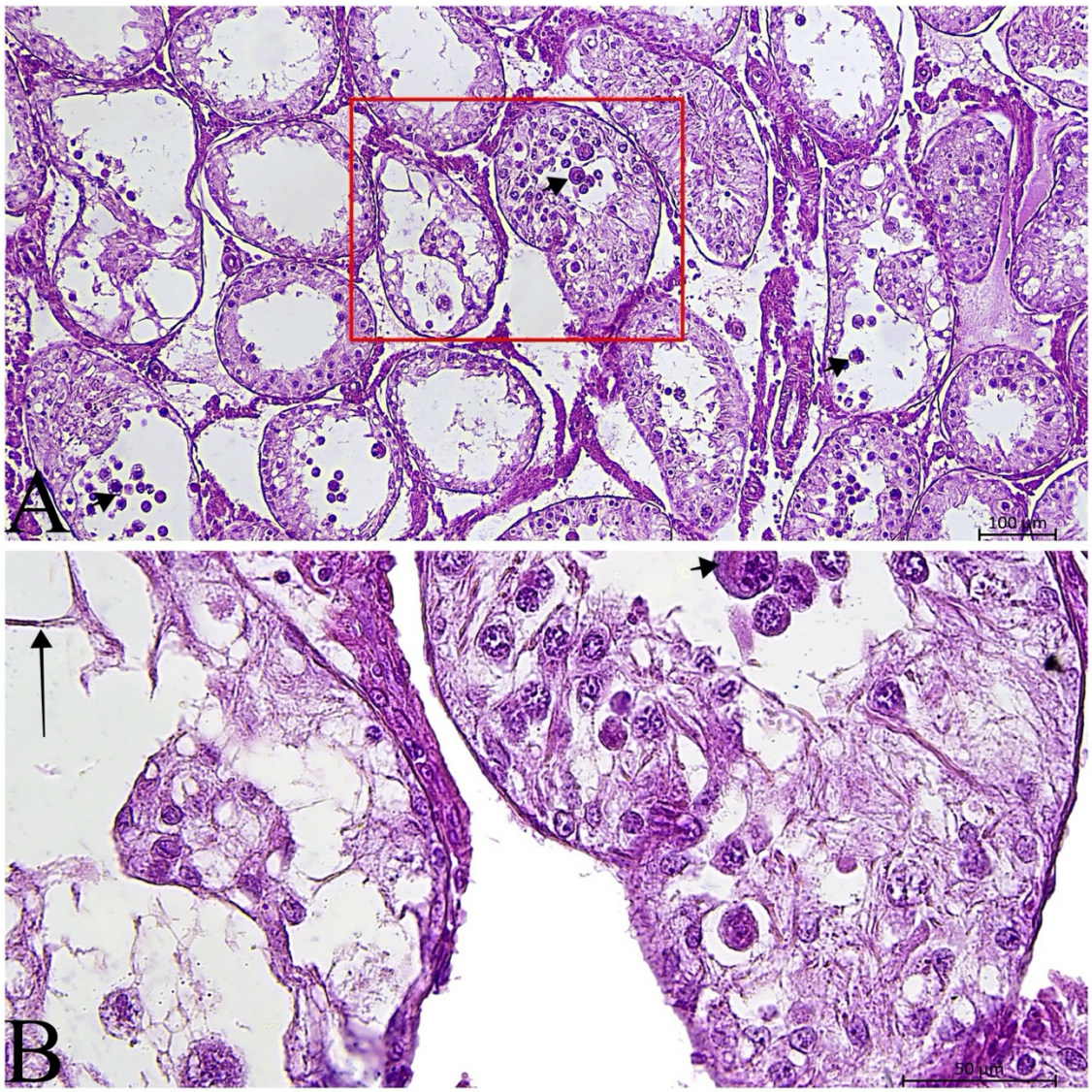
Şekil 4.5: **İ/R grubunun genel histolojik yapısı. Germinal epitel atrofisine uğramış boş seminifer tübül (asteriks), dejenere germ hücrelerin formu olan çok çekirdekli dev hücreler (siyah ok), vakuol (yeşil ok) oluşumu, spermatogenik hücrelerin organizasyonunun bozulması ve tübül içine dökülmesi (mavi ok) izlenmektedir. Tübüllerde epitel ve tübül duvarı ayrışması görülmektedir (kırmızı ok). Hematoksilen-Eozin. Objektif 10X. Ölçek 100 µm.**



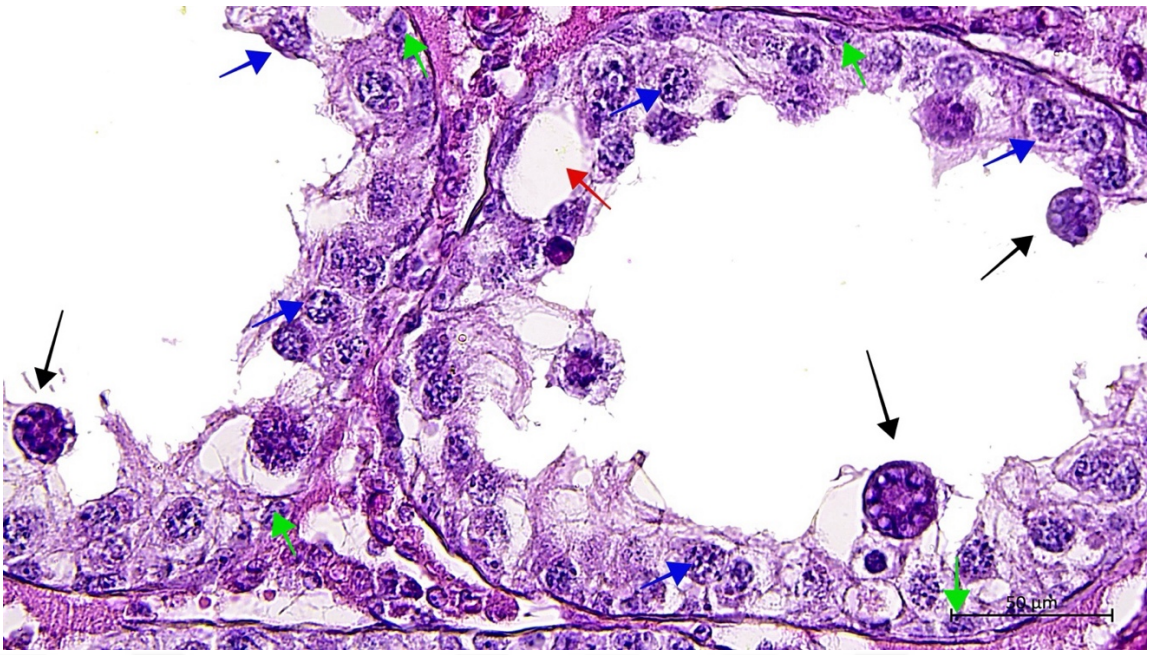
Şekil 4.6: **İ/R grubunda nekrotik seminifer tübüller. Seminifer tübüllerde normal spermatogenik hücre dizilimi izlenememektedir. Tübüllerin bir kısmı nekrotik görünümdedir (asteriks). Tübüllerde dev hücre oluşumu izlenmektedir (mavi ok). Tübüllerde seminifer tübül epiteli, tübül duvarından ayrılmıştır (siyah ok). Tübüller arası boşluk artmış, ödemli görünüm mevcuttur. Hematoksilen-Eozin. Objektif 10X. Ölçek 100 µm.**



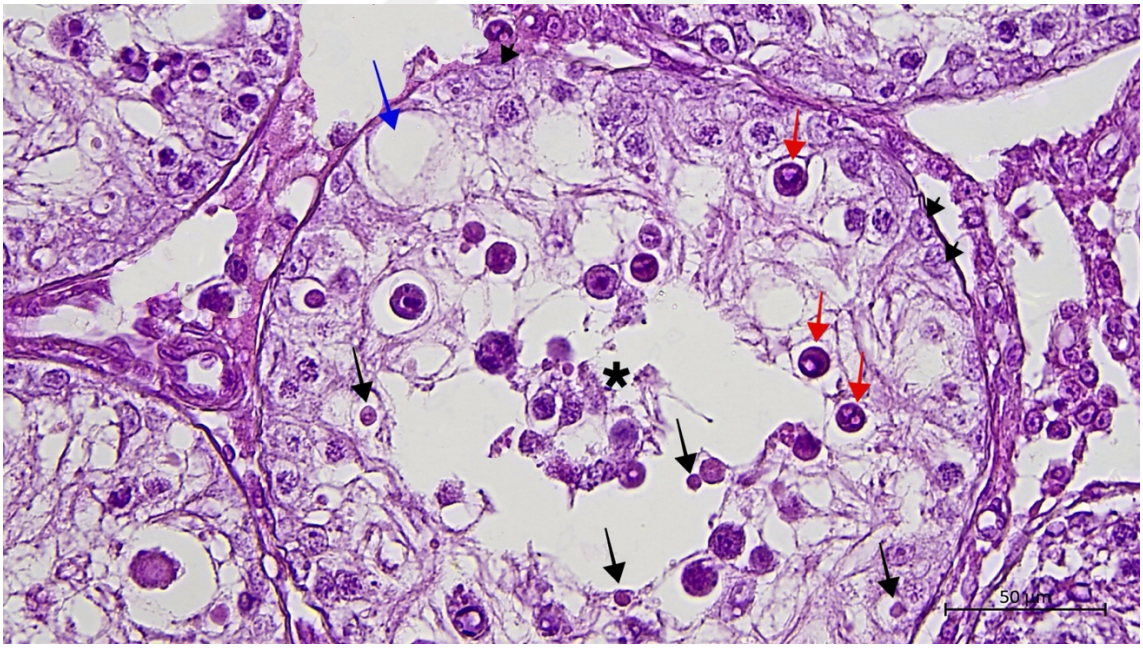
Şekil 4.7: Nekrotik seminifer tübüle ait kesit. Hipereozinofilik görünümdeki testis nekroza uğramıştır (asteriks). Spermatogenik seri hücreleri tübülün üst kısmı hariç tübülün geri kalanında seçilememektedir. Nekrotik tübül ve komşu seminifer tübüller normal morfoloji göstermemektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.



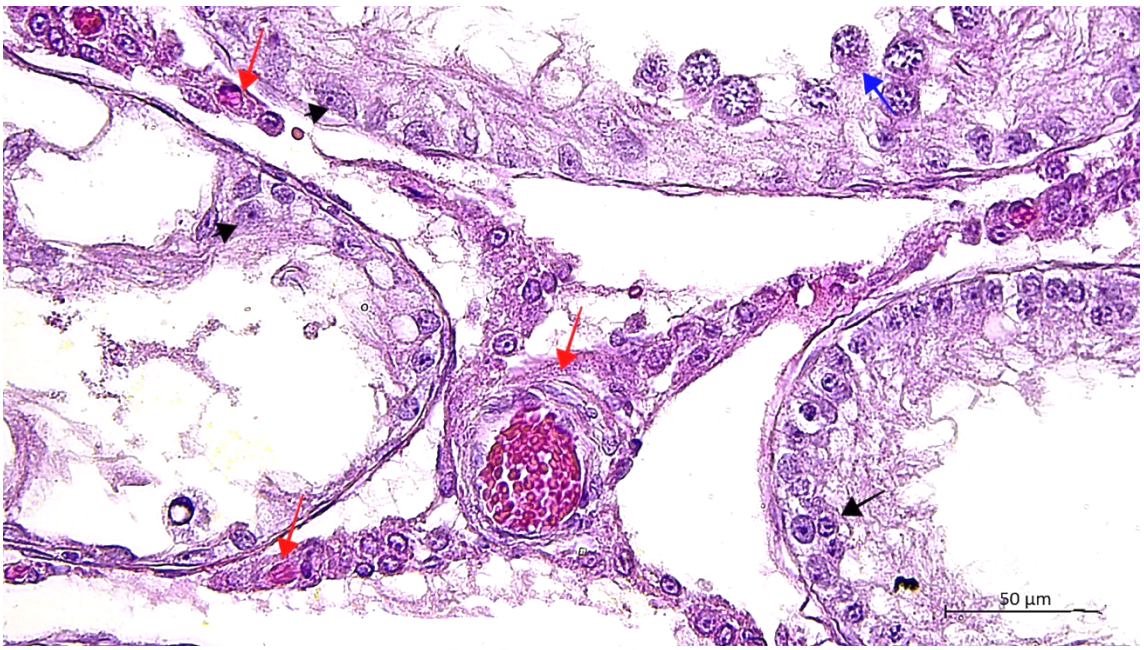
Şekil 4.8: **İ/R grubunda vakuol oluşumu ve dev hücreler. Boş tübüllerde spermatogenik seri hücre organizasyonu bozulmuş, sayıca azalmıştır. Dev hücre oluşumu izlenmektedir (siyah kısa ok) (A). Tübüllerde yaygın vakuol oluşumu (siyah uzun ok) ve dev hücreler (siyah kısa ok) gözlenmektedir (B). Hematoksilen-Eozin. Objektifler A:10X B:40X. Ölçekler A:100 µm B:50 µm**



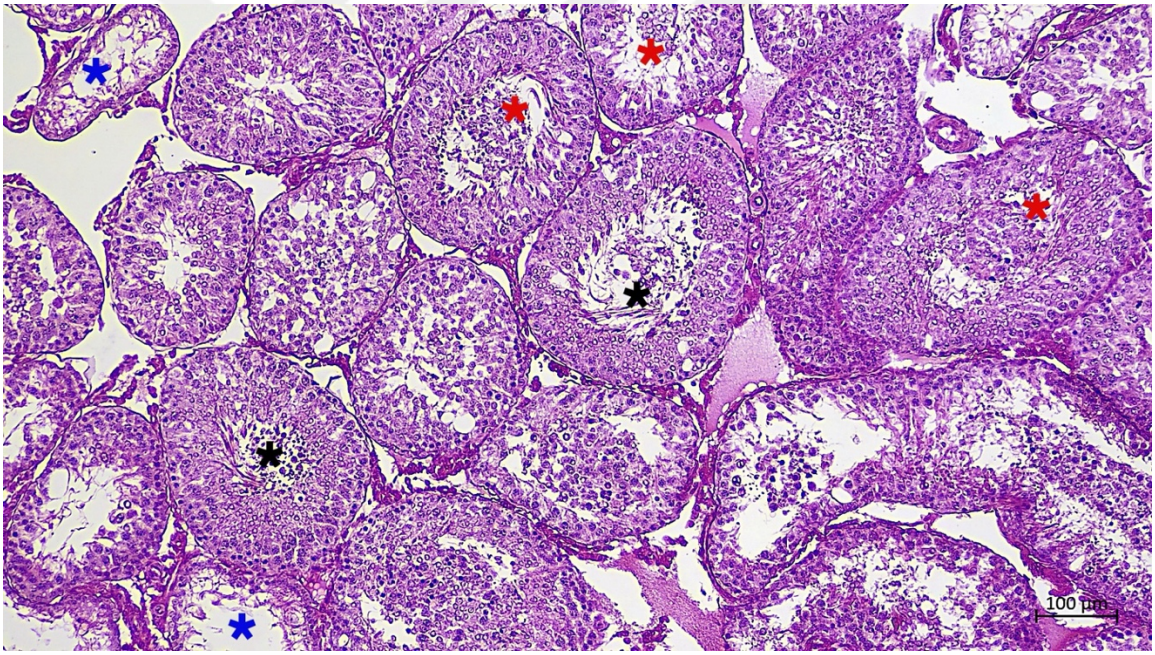
Şekil 4.9: **Dev hücreler. Çok çekirdekli dev hücreler iskemi-reperfüzyon hasarı gruplarında sık görülmektedir (siyah ok). Spermatogonyumların (yeşil ok) ve spermatositlerin (mavi ok) seçilebildiği tübüller mevcuttur. Spermatidlere ve olgun spermlere rastlanılmamaktadır. Vakuol oluşumu izlenmektedir (kırmızı ok). Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.**



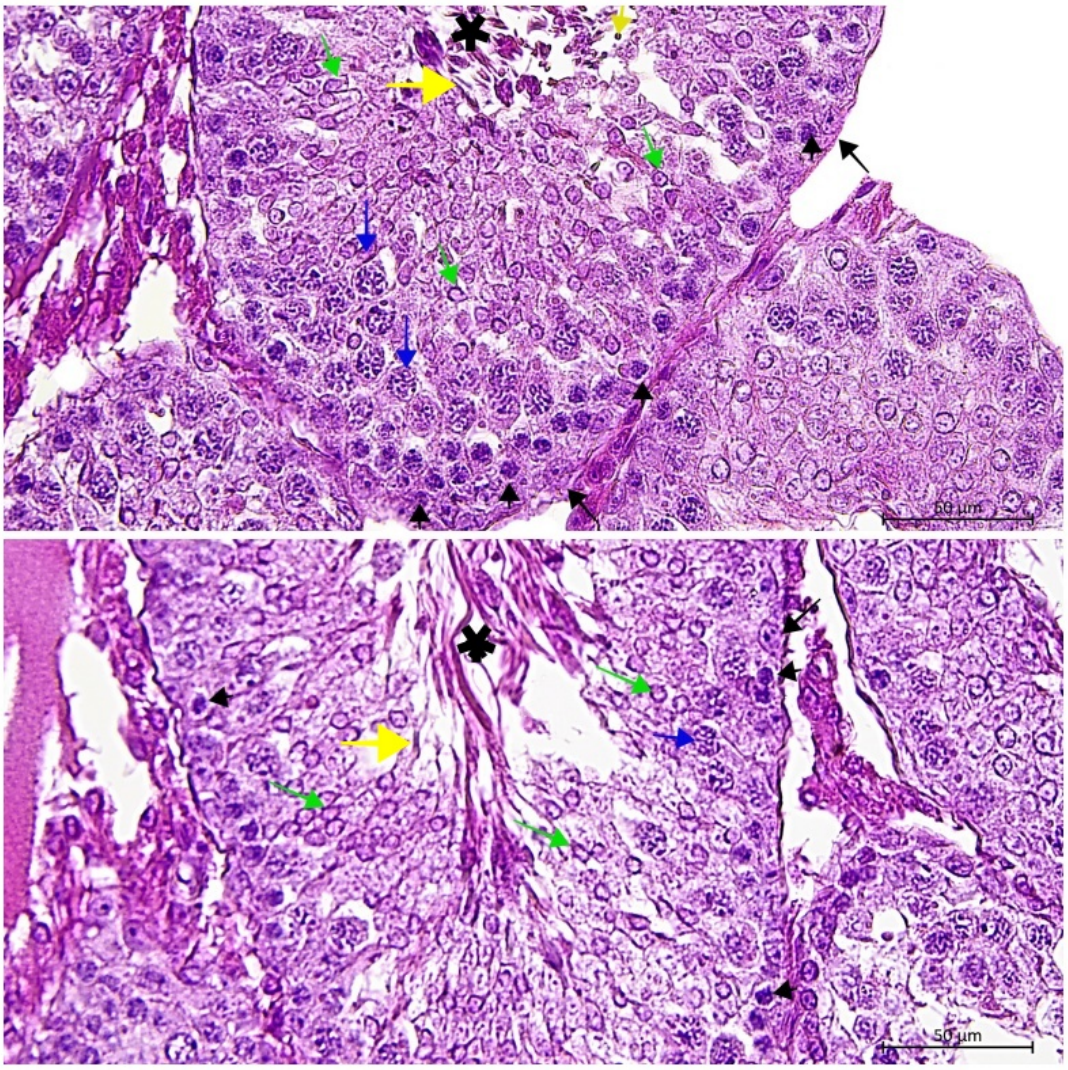
Şekil 4.10: **İ/R grubuna ait seminifer tübül kesitinde piknotik çekirdekli hücreler, vakuol ve apoptotik cisimler. İskemi-reperfüzyon hasarına uğramış seminifer tübüllerde yer yer piknotik çekirdekli hücrelere (siyah ok) ve apoptotik cisimlere (kırmızı ok) rastlanmaktadır. İmmatür germ hücrelerinin lümen içine döküldüğü atipik lümen görünümü mevcuttur (asteriks). Vakuol oluşumu gözlenmektedir (mavi ok). Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm.**



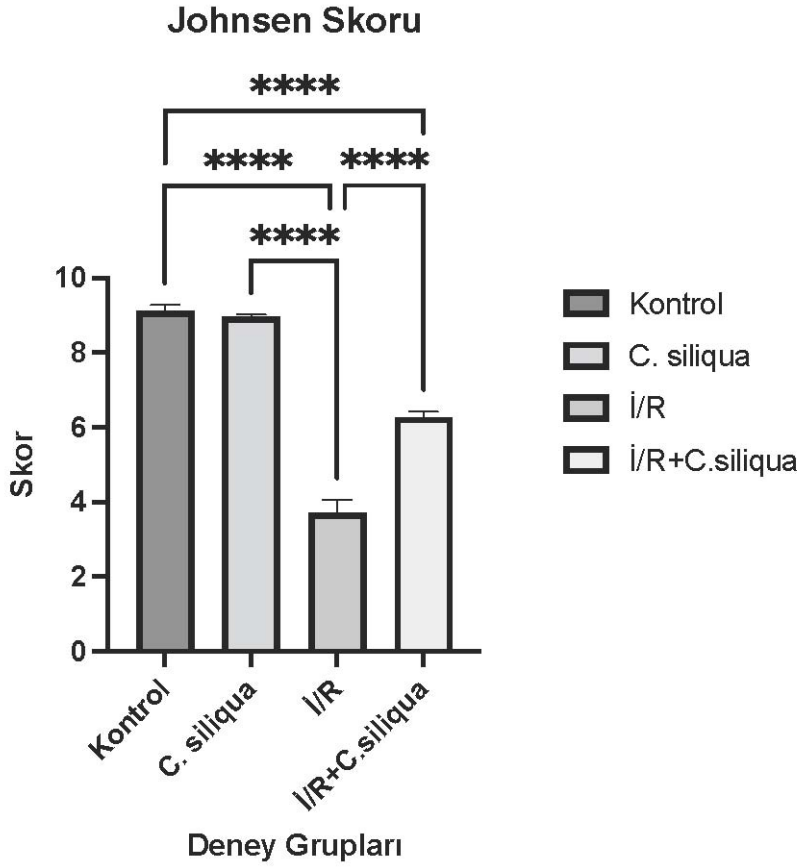
Şekil 4.11: İ/R grubunda konjesyona uğramış kan damarı. İ/R grubunda yer yer kan damarlarında ağır konjesyon izlenmektedir (kırmızı ok). Tübüllerde Sertoli hücreleri (siyah kısa ok), spermatogonyumlar (siyah uzun ok) ve az sayıda spermatosit (mavi ok) gözlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm



Şekil 4.12: İ/R+C.siliqua grubunun histolojik görünümü. Spermatogenik seri hücrelerinden spermatositlerin ve olgun spermlerin seçilebildiği tübüller mevcuttur (siyah asteriks). Tübüllerin bir kısmında immatür germ hücrelerinin lümene döküldüğü atipik görünümdedir (kırmızı asteriks). Spermatogenik seri hücrelerinin seçilemediği atrofik seminifer tübüller İ/R grubuna kıyasla sayıca az da olsa seçilebilmektedir (mavi asteriks). Hematoksilen-Eozin. Objektif 10X. Ölçek 100 µm.



Şekil 4.13: İ/R+C.siliqua grubuna ait seminifer tübül kesitleri. Farklı iki seminifer tübül kesitinde de Sertoli hücreleri (siyah uzun ok), spermatogonyumlar (siyah kısa ok), spermatositler (mavi ok) spermatidler (yeşil ok) ve olgun spermler (sarı ok) seçilebilmektedir. Her iki tübülün de organizasyonu normal yapıdadır (asteriks). Hematoksilen-Eozin. Objektif 40X. Ölçek 50 µm



Şekil 4.14: Grupların Johnsen skorlarının karşılaştırılması. Anlamlı farklılık düzeyi (****) gösterilmektedir. Değerler ortalama ve SD (standart deviasyon) olarak verilmiştir. (**: p<0.0001)**

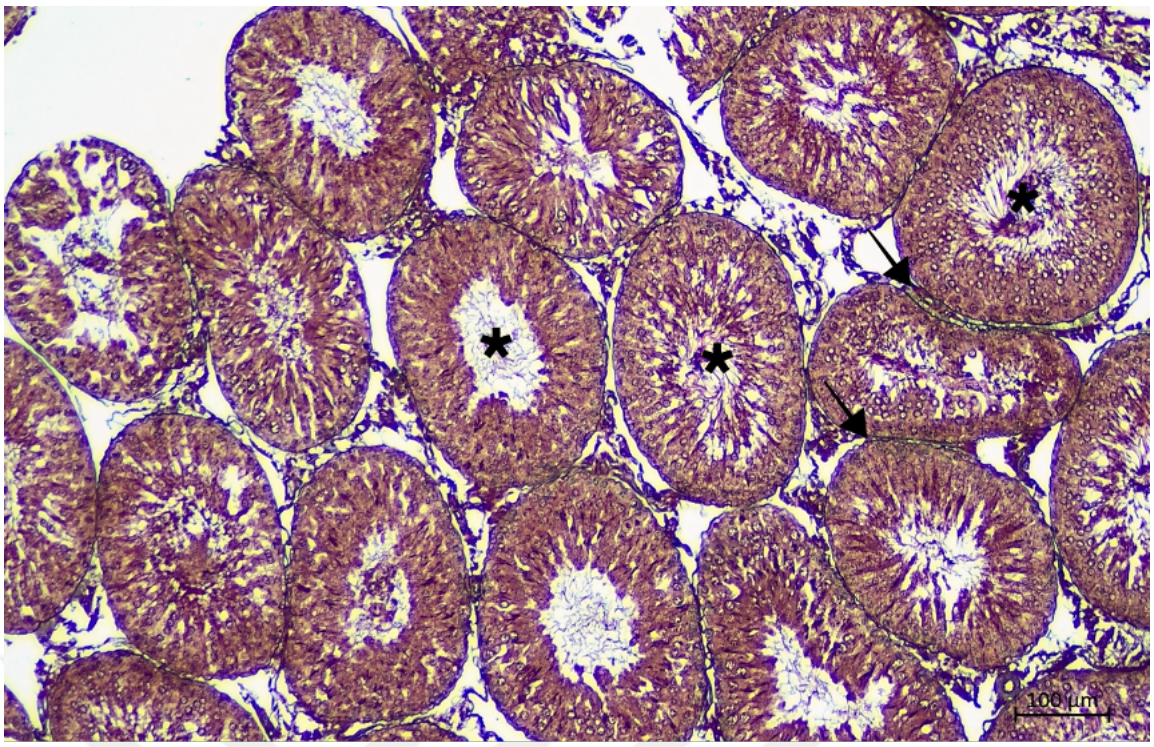
4.1.2. Masson-Trikrom

Testisler fibrozis açısından incelendiğinde kontrol ve C.siliqua gruplarında anlamlı sonuçlar bulunamadı. Her iki grupta da yer yer çok hafif seminifer tübül duvarında bağ dokusu alanlarının boyandığı izlendi (Şekil 4.15, Şekil 4.17). Kontrol grubuna ait seminifer tübül kesiti incelendiğinde normal tübül morfolojisi ve hücre organizasyonu gözlendi (Şekil 4.16).

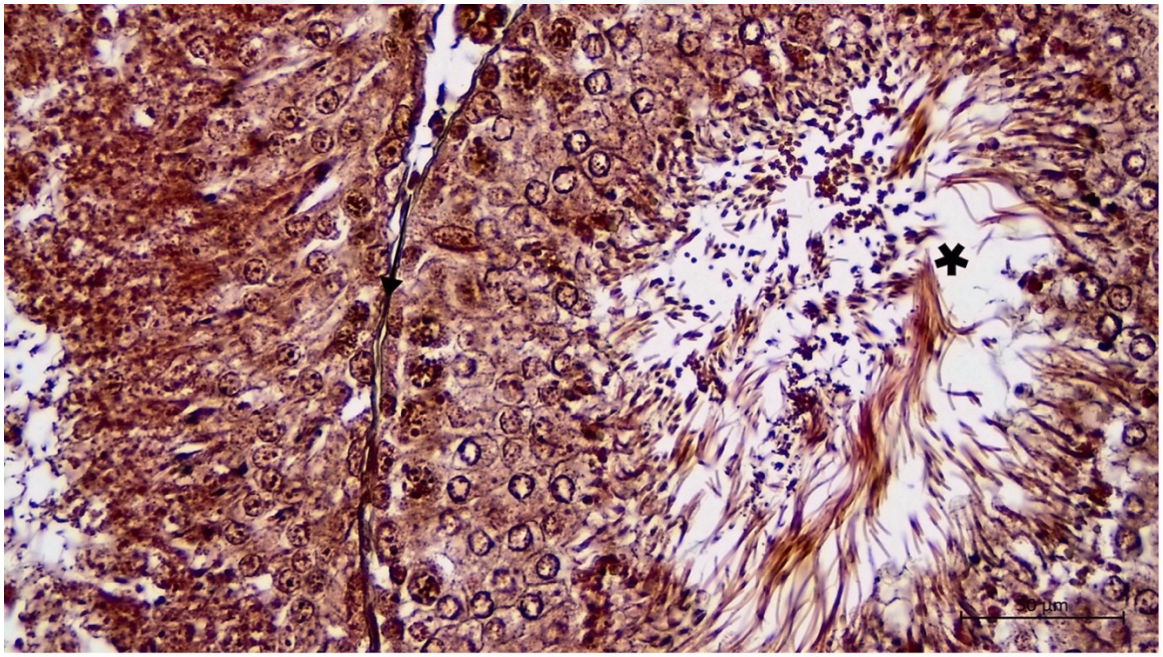
İ/R grubuna ait testisler incelendiğinde neredeyse tübüllerin büyük kısmında tübül duvarında fibrozise uyumlu boyanma gözlendi. İ/R grubuna ait seminifer tübüllerin bir kısmında tübüllerde yaygın fibrozis izlendi (Şekil 4.18).

İ/R+C.siliqua grubu incelendiğinde tübül duvarlarında yer yer fibrozisle uyumlu boyanma mevcuttu ancak hasar grubundaki gibi şiddetli değildi (Şekil 4.19).

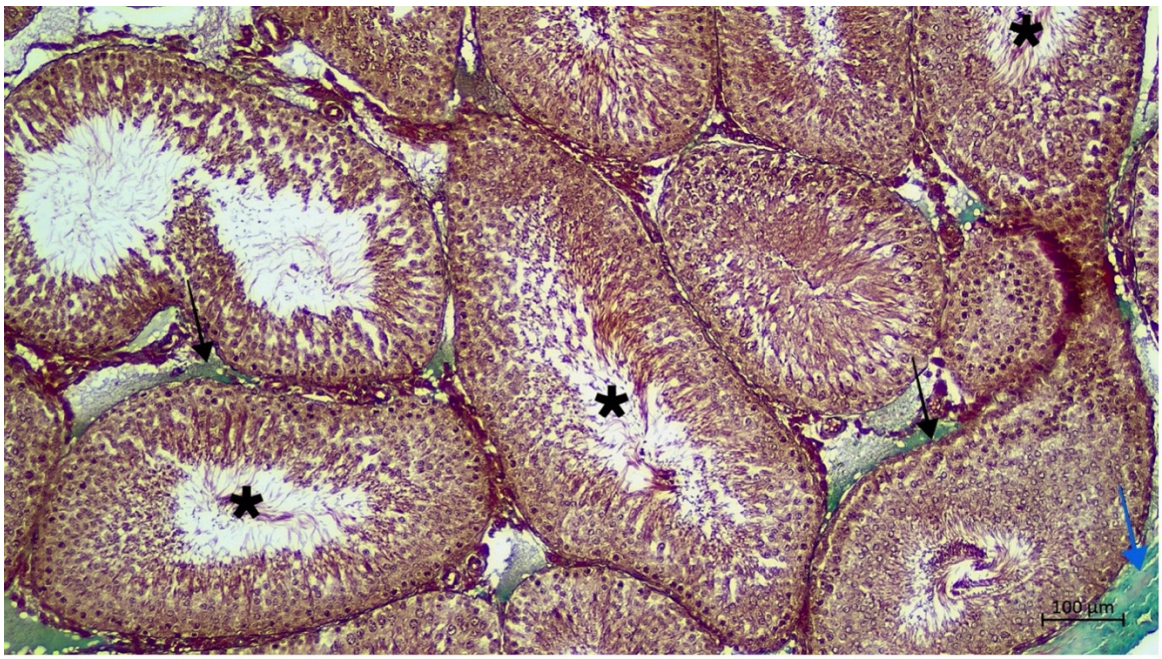
Semikantitatif değerlendirmede normal dağılım göstermeyen veriler incelendiğinde gruplar arası fark anlamlıydı ($p=0.0007$). Kontrol ile C.siliqua ve I/R+C.siliqua grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.99$). İ/R grubundaki fibrozis, kontrol ve C.siliqua gruplarına kıyasla fazlaydı ($p=0.0049$, $p=0.0049$).



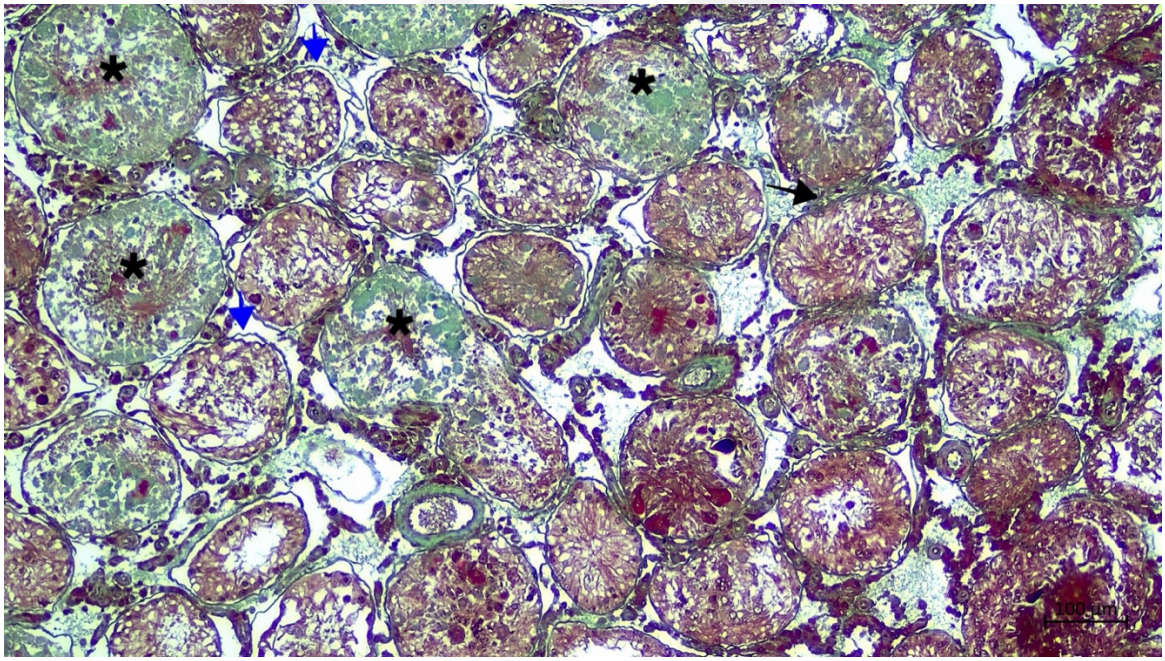
Şekil 4.15: Kontrol grubu. Kontrol grubuna ait kesitte çok nadir ve hafif boyanmış seminifer tübül duvarı gözlenmektedir. Kontrol testisleri normal testiküler morfolojidedir (asteriks). Masson-Trikrom. Objektif 10X. Ölçek 100 µm.



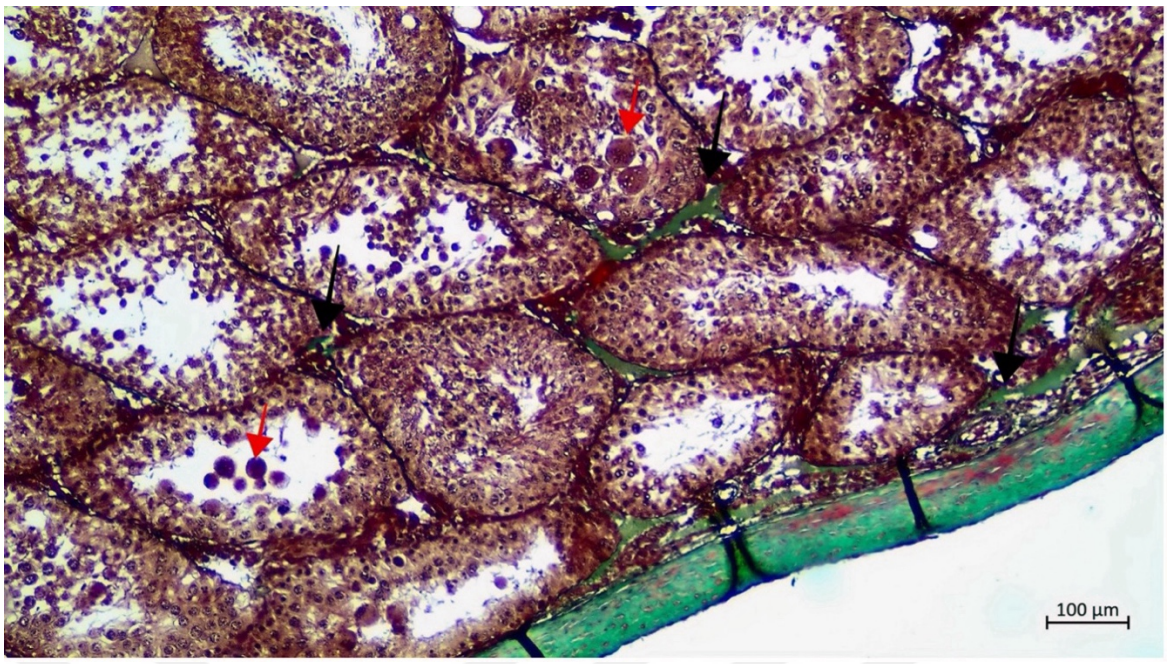
Şekil 4.16: Kontrol grubu seminifer tübülü. Kontrol grubuna ait seminifer tübül kesitinden seminifer tübül yapısı, hücrelerin organizasyonu seçilmektedir. Tübül epitelinde çok hafif boyanma mevcuttur (ok). Masson-Trikrom. Objektif 40X. Ölçek 50 µm



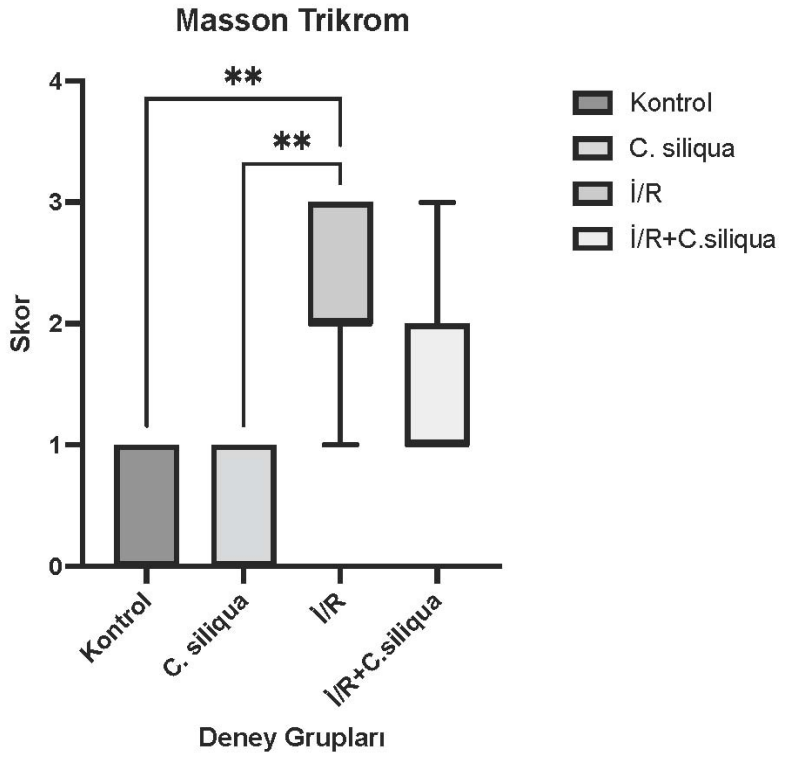
Şekil 4.17: C. siliqua grubu. Testis kapsülünün boyandığı izlenmektedir (mavi ok). Yer yer tübül duvarında yeşil boyanmalar gözlense de istatistiksel olarak anlamlı değildir. Tübüller normal morfolojidedir (asteriks). Masson-Trikrom. Objektif 10X. Ölçek 100 µm.



Şekil 4.18: İ/R grubu. Tübüllerin organizasyonu bozulmuştur. Neredeyse bütün tübül duvarları fibrotiktir (siyah ok). Bazı tübüllerin tamamında fibrosiz mevcuttur (asteriks). Tübül duvarlarında ayrışma mevcuttur (mavi ok). Masson-Trikrom. Objektif 10X. Ölçek 100 µm.



Şekil 4.19: İ/R+C.siliqua grubu. Tübül yapıları ve organizasyonu hasar grubuna kıyasla kontrole yakındır. Yer yer dev hücreler (kırmızı) seçilmektedir. Tübül duvarlarında yeşil boyalı fibrosiz alanları azdır (siyah ok). Masson-Trikrom. Objektif 10X. Ölçek 100 µm.

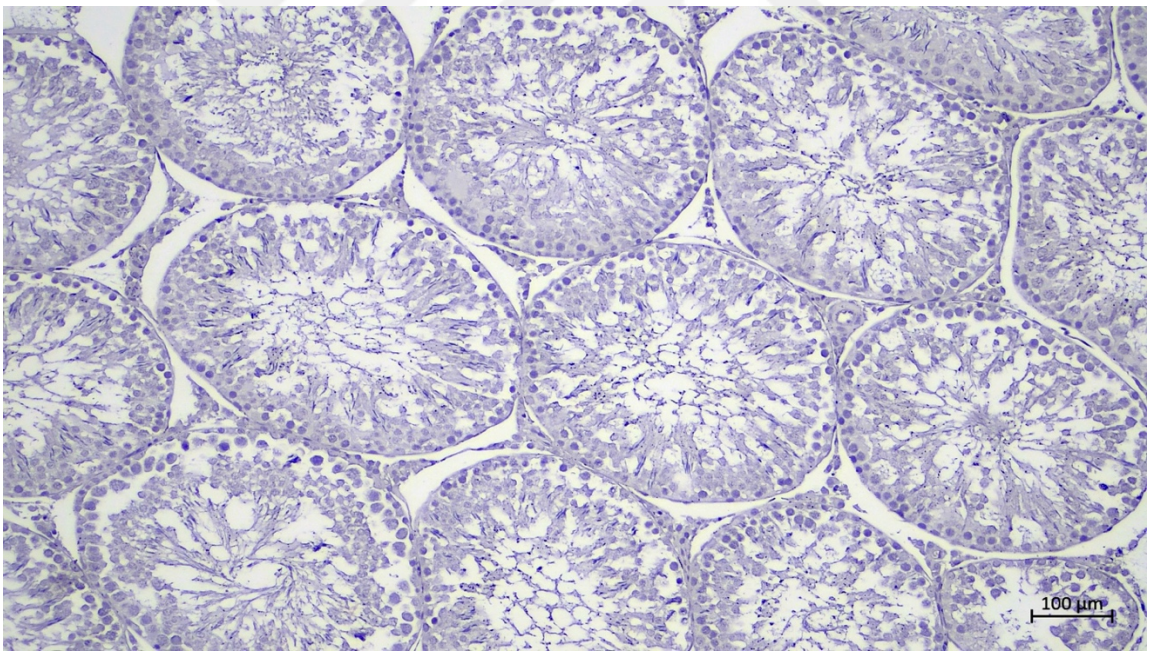


Şekil 4.20: Masson-Trikrom fibrosiz skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (**) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak verilmiştir. (: p<0.01)**

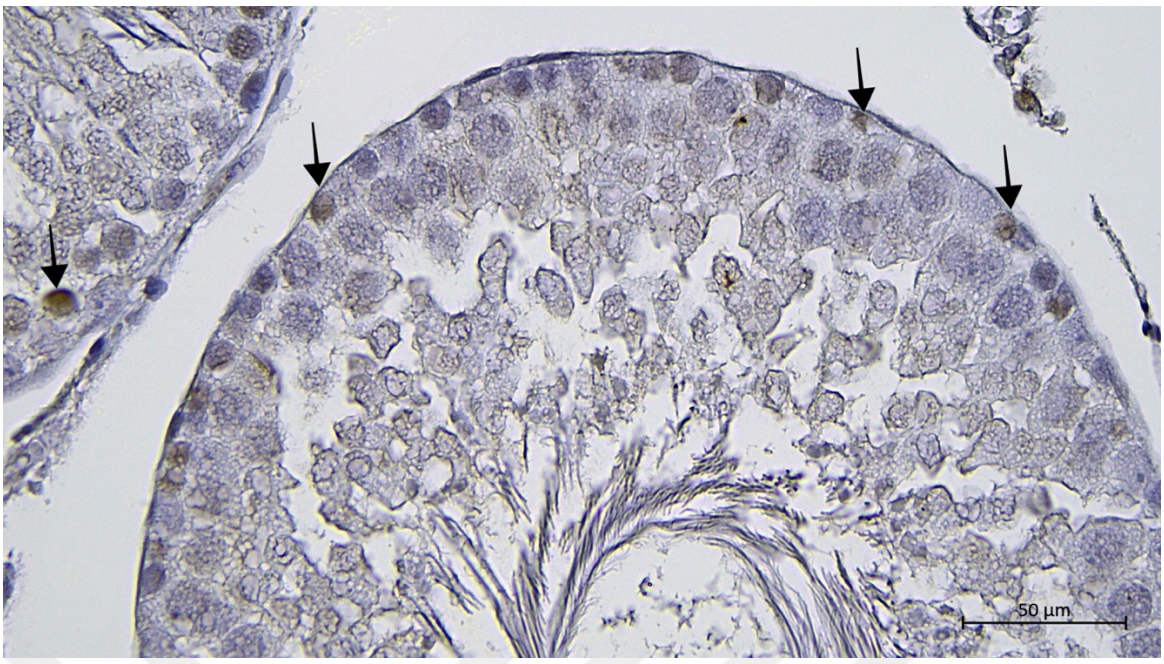
4.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

4.2.1. Apoptoz Değerlendirmesi

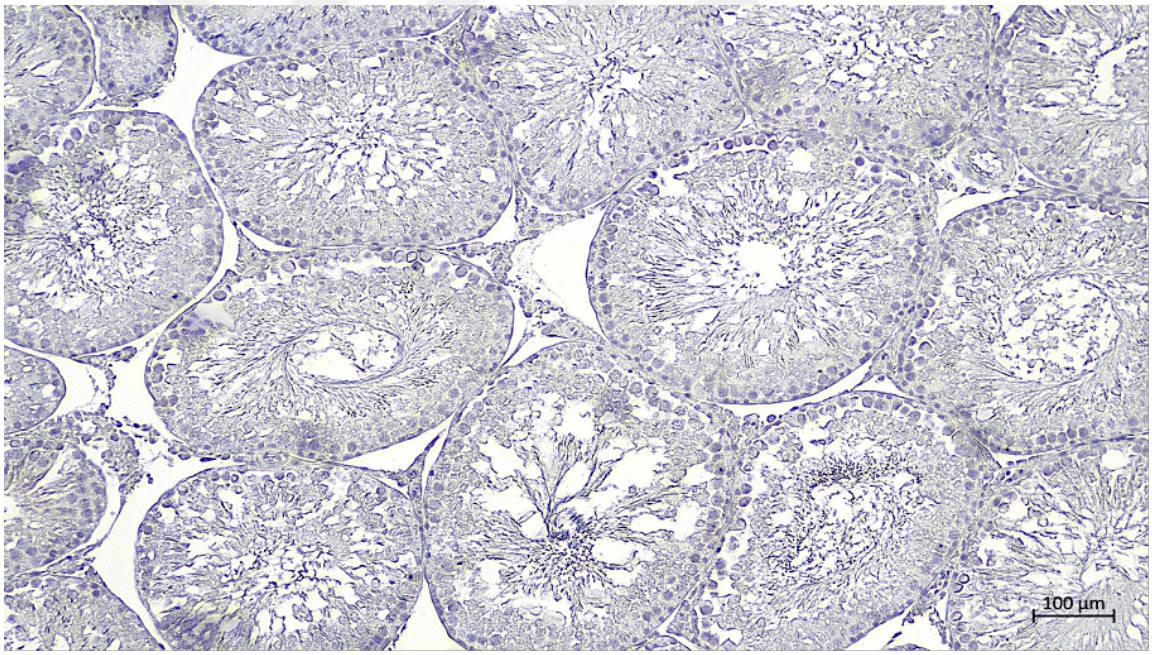
Apoptozun değerlendirmesi amacıyla yapılan Kaspaz-3 boyamasında İ/R grubunda seminifer tübüllerde yaygın ve yoğun boyanma gözlendi (Şekil 4.24). Preparatların çoğunda Leydig hücreleri pozitif boyanmazken bazı preparatlarda Leydig hücrelerinin kaspaz-3 ile pozitif boyandığı izlendi. Preparatlarda yaygın şekilde spermatogonyumlar kaspaz-3 pozitif boyanmaktaydı (Şekil 4.25). Kontrol grubunda spermatogonyumlarda (Şekil 4.21, Şekil 4.22); İ/R+C.siliqua grubunda ise spermatogonyum ve spermatidlerde (Şekil 4.26, Şekil 4.27) boyanma izlenebildi Semikantitatif değerlendirmede normal dağılım göstermeyen veriler arasında karşılaştırma yapıldığında gruplar arası anlamlı farklılık saptandı ($p=0.0025$). Kontrol ve İ/R grubu arasında ($p=0.0042$), İ/R+C.siliqua ve İ/R grubu arasında ($p= 0.0390$) anlamlı farklılık bulundu. Kontrol ve İ/R+C.siliqua grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.99$).



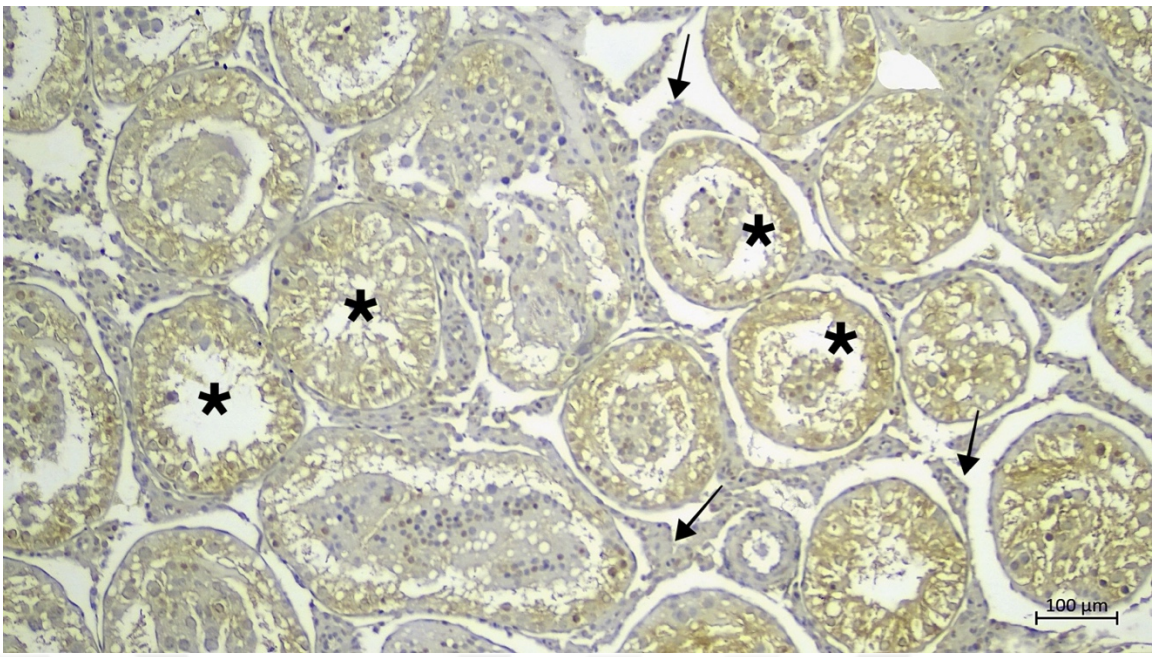
Şekil 4.21: Kontrol grubunda Kaspaz-3 boyanması. Kontrol grubuna ait testislerin bir kısmında kaspaz-3 boyanması izlenmemiştir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm



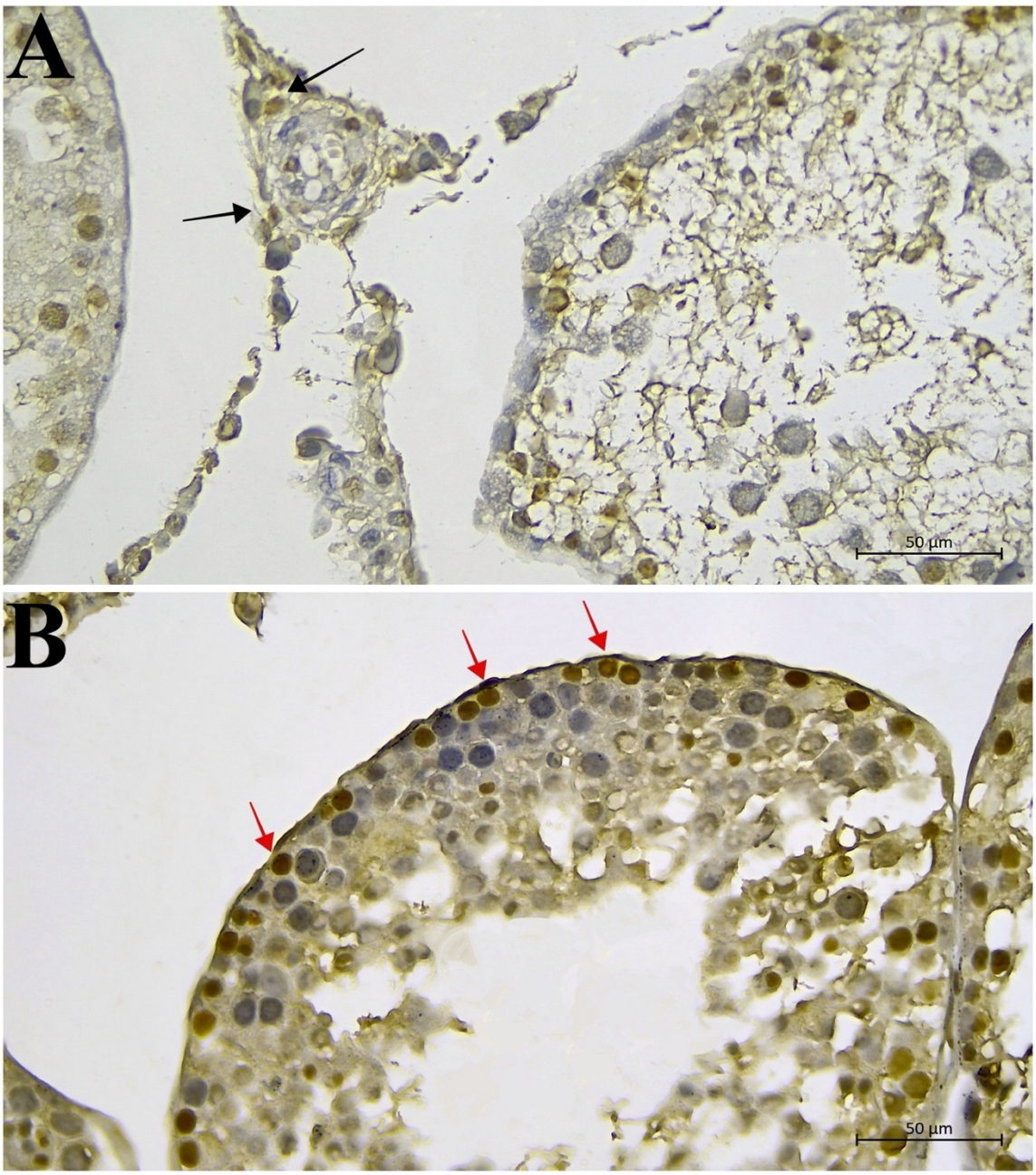
Şekil 4.22: Kontrol grubunda apoptoz. Kontrol grubuna ait testislerin bir kısmında ise spermatogonyumlarda (ok) hafif kaspaz-3 boyanması izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm



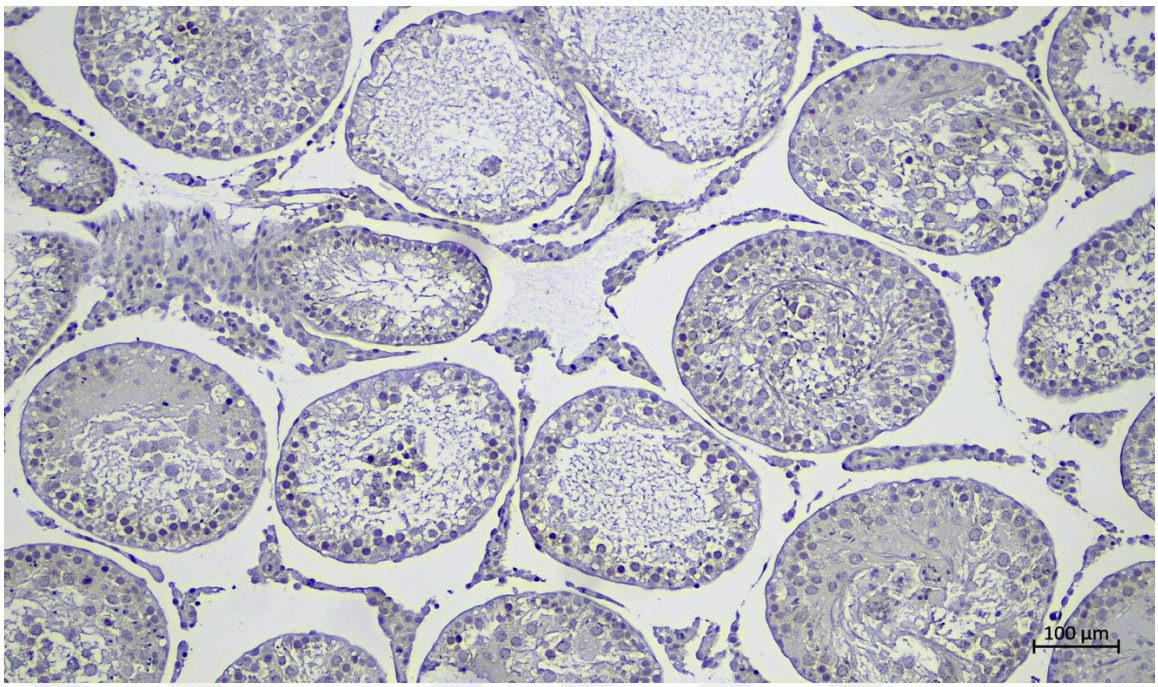
Şekil 4.23: C.siliqua grubunda Kaspaz-3 boyanması. İnterstisyel alanda ve tübüllerde pozitif boyanma izlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 µm



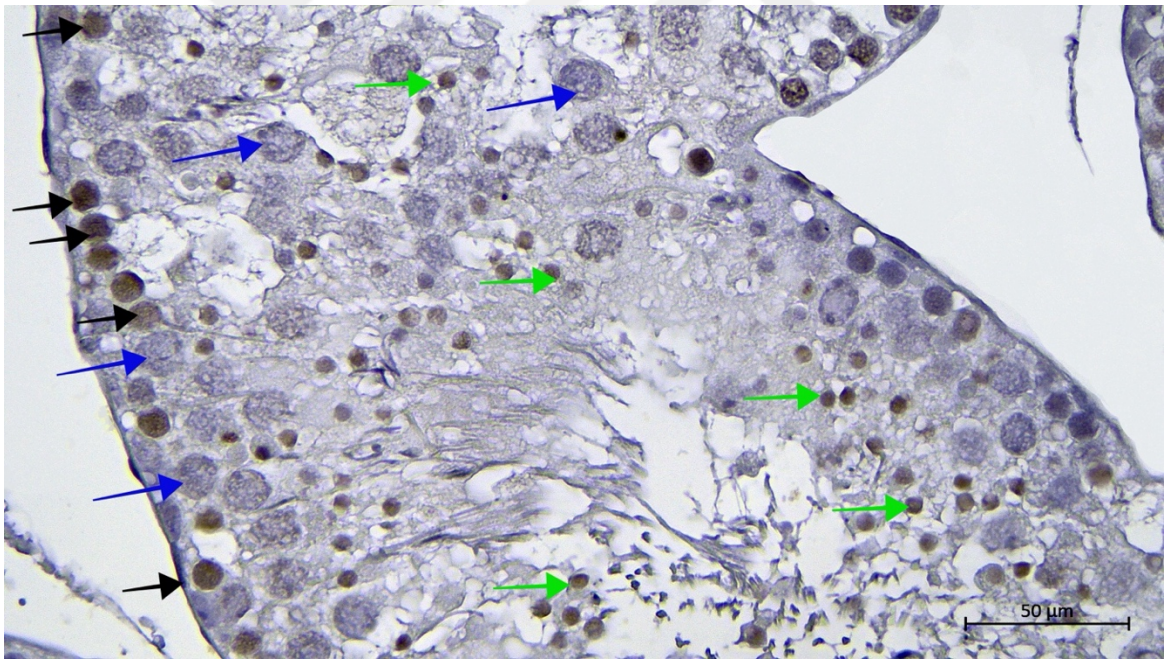
Şekil 4.24: İ/R grubunda Kaspaz-3 boyanması. İ/R grubunda seminer tübüllerde (asteriks) güçlü kaspaz-3 boyanması izlenmektedir. Ancak interstisyel alanda (siyah ok) pozitif kaspaz-3 boyaması gözlenmemiştir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm



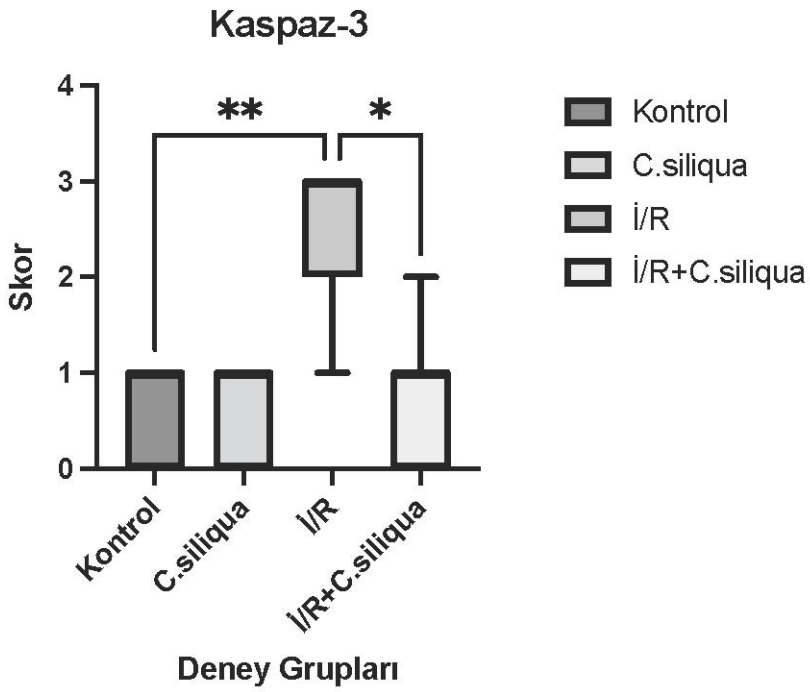
Şekil 4.25: İ/R grubunda Kaspaz-3 boyanan hücreler. Leydig hücreleri (siyah ok) az sayıda testiste pozitif boyanmıştır (A): Spermatogonyumlar (kırmızı ok) kaspaz-3 ile güçlü boyanmışlardır (B). DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm



Şekil 4.26: İ/R+C.siliqua grubunda Kaspaz-3 boyanması. İnterstisyel alanda ve seminifer tübüllerde yoğun kaspaz-3 boyanması izlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm



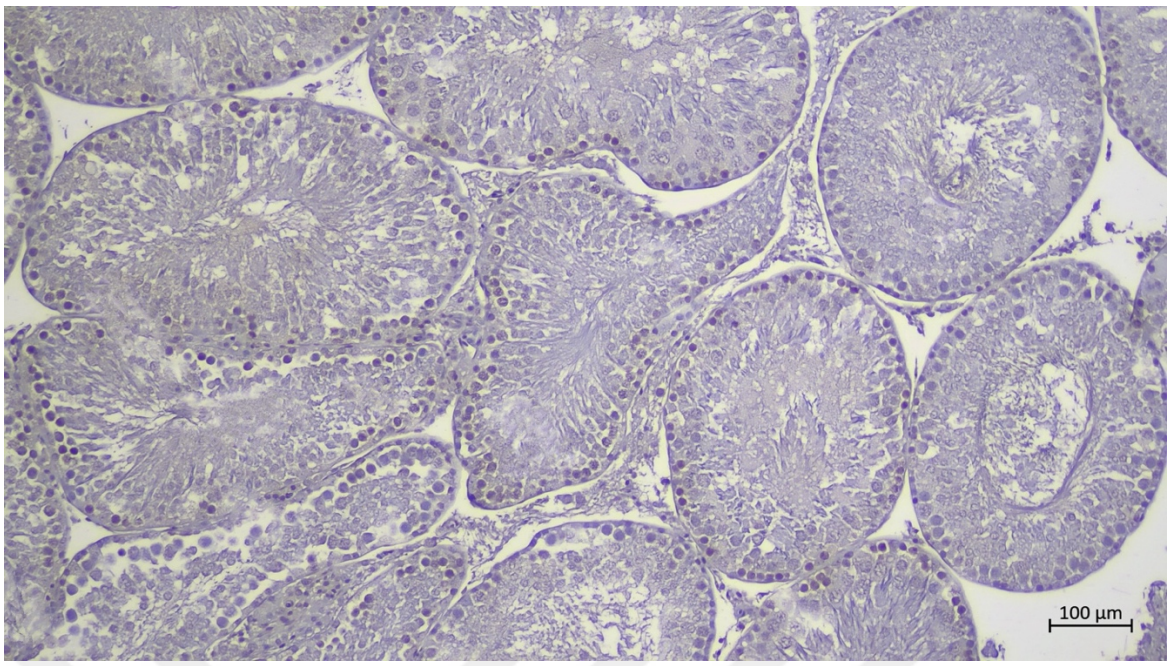
Şekil 4.27: İ/R+C.siliqua grubunda apoptoz. Spermatogonyumlarda (siyah ok) ve spermatidlerde (yeşil ok) kaspaz-3 boyanması izlenmektedir ancak spermatositlerde (mavi ok) boyanma görülmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm



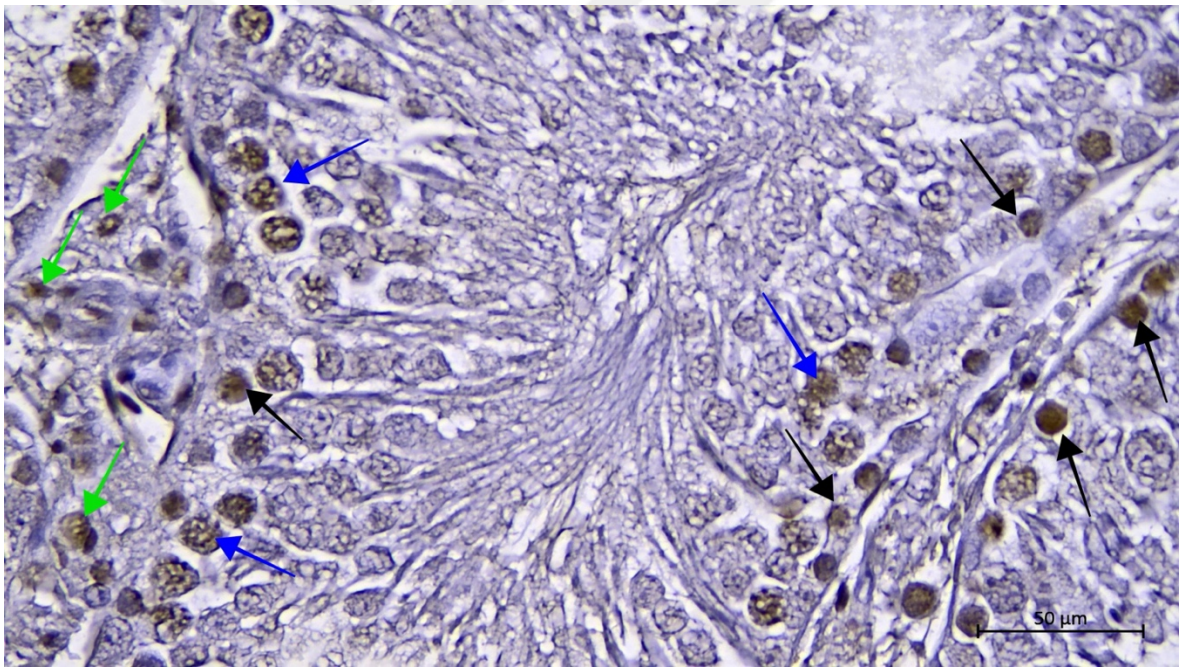
Şekil 4.28: Kaspaz-3 skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) ve (**) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (*: p<0.05; **: p<0.01)

4.2.2. İskemik Hasar Değerlendirmesi

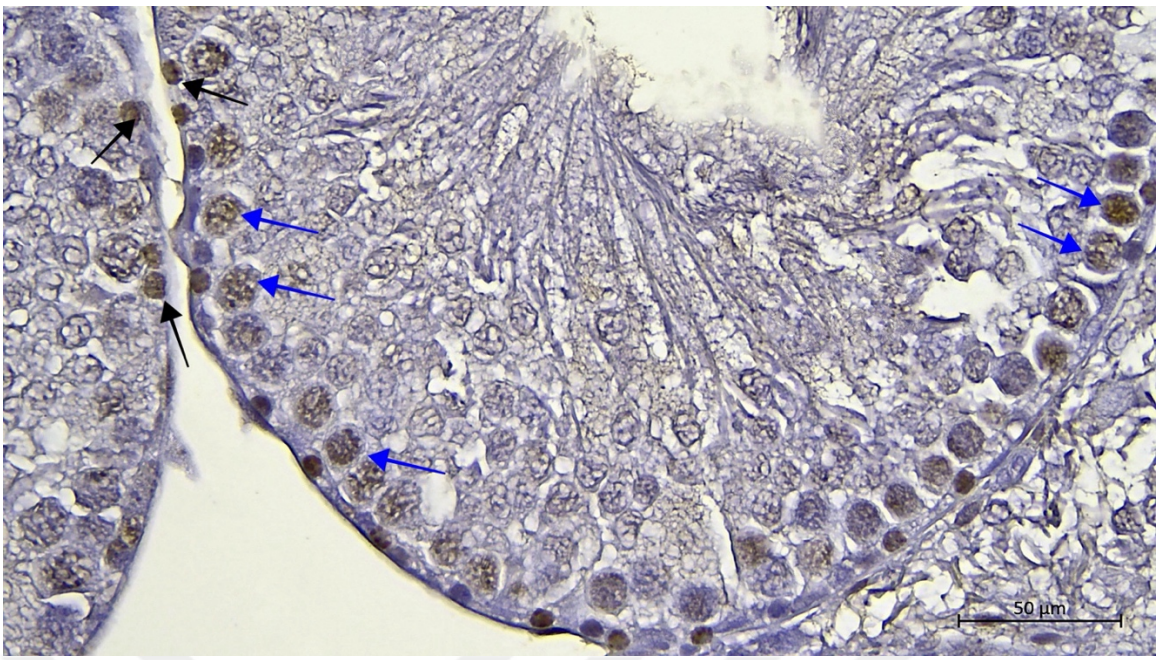
HIF-1α boyamasında tüm gruplarda spermatogonyumlar ve spermatositlerde boyanma izlenmiştir. İ/R grubunda interstisyel alanda boyanan hücrelerin olduğu örnekler de mevcuttur (Şekil 4.33). Semikantitatif değerlendirmede normal dağılım göstermeyen veriler arasında karşılaştırma yapıldığında Kontrol ve İ/R grubu arasında (p= 0.0621) fark anlamlı olma eğilimdeydi. İ/R+C.siliqua ve İ/R grubu arasında (p>0.99), kontrol ve İ/R+C.siliqua grupları arasında (p= 0.1668) anlamlı farklılık bulunmadı.



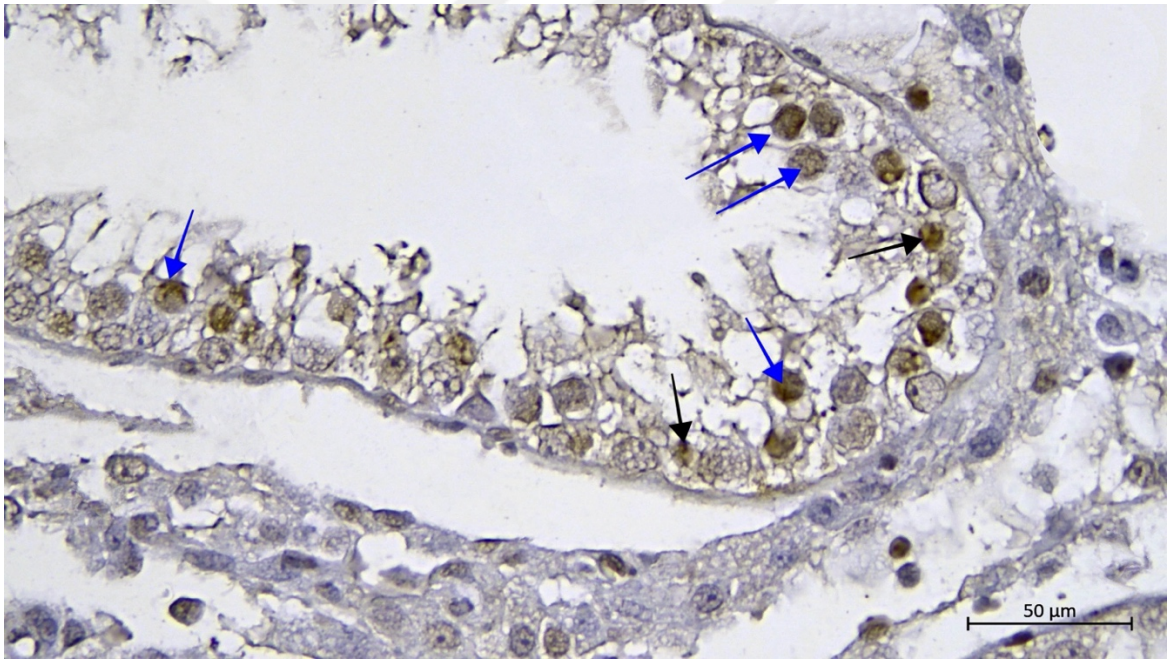
Şekil 4.29: Kontrol grubunda HIF-1α. Seminifer tübüllerde spermatogonyumlarda hafif boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm



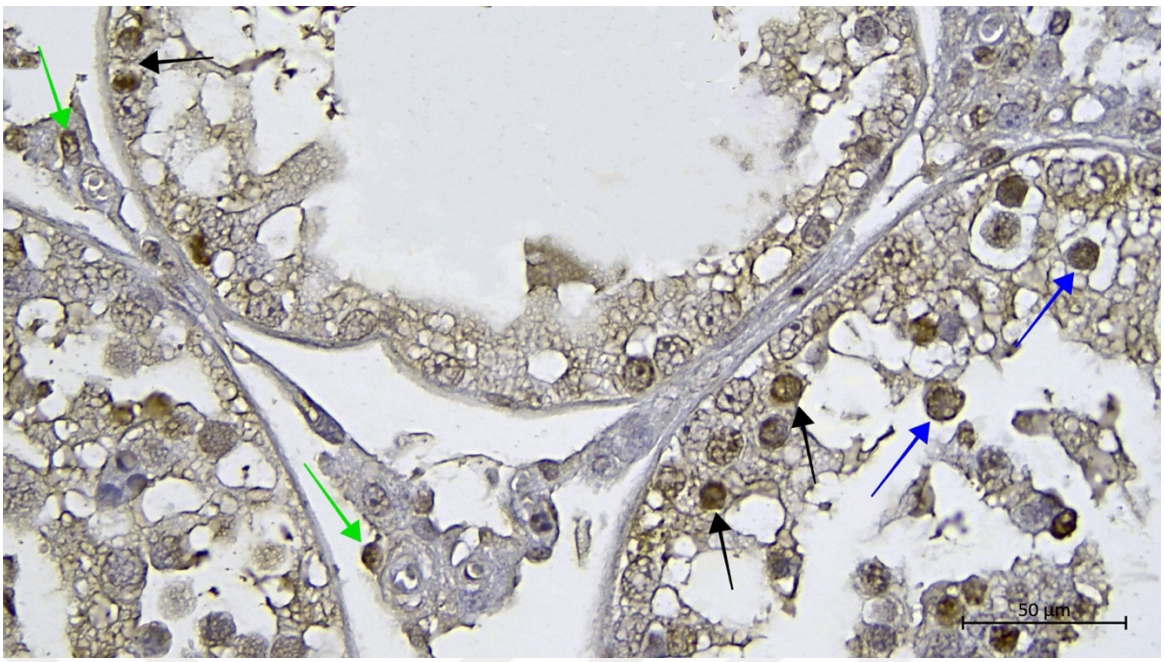
Şekil 4.30: Kontrol grubunda HIF-1α pozitif boyanan hücreler. Spermatogonyumlar (siyah ok) ve spermatositler (mavi ok) HIF-1α ile pozitif boyanmaktadır. İnterstisyel alanda pozitif boyanmış hücreler (yeşil ok) izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm



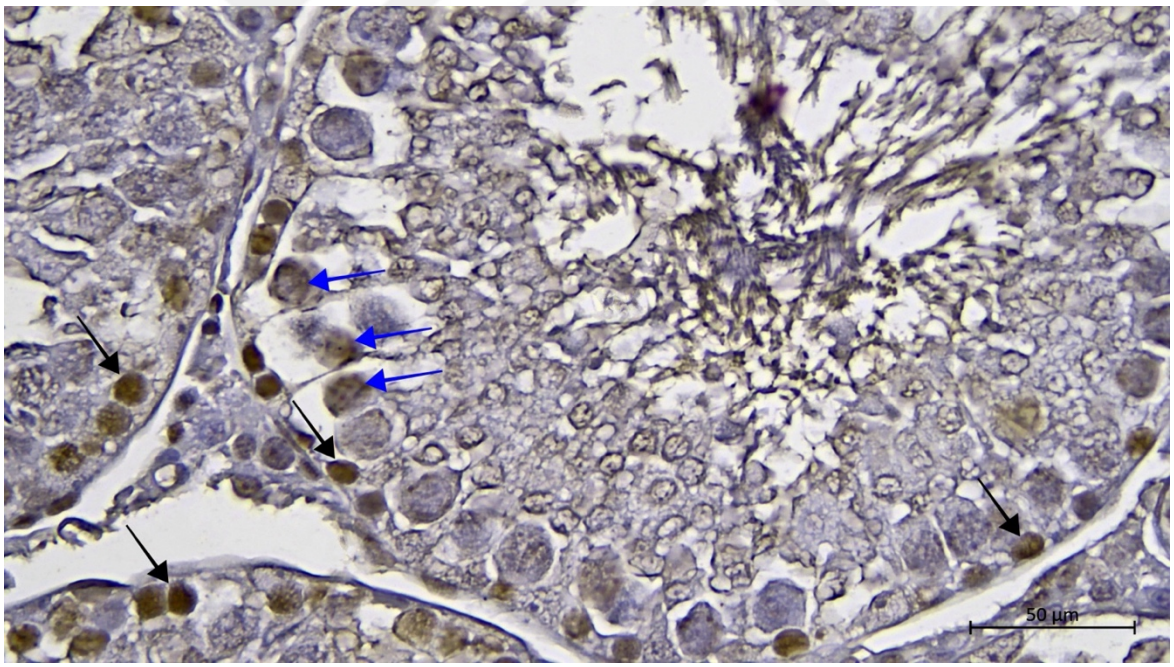
Şekil 4.31: C.siliqua grubunda HIF-1α boyanması. Spermatogonyumlar (siyah ok) ve spermatositler (mavi ok) pozitif boyanmaktadır. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm



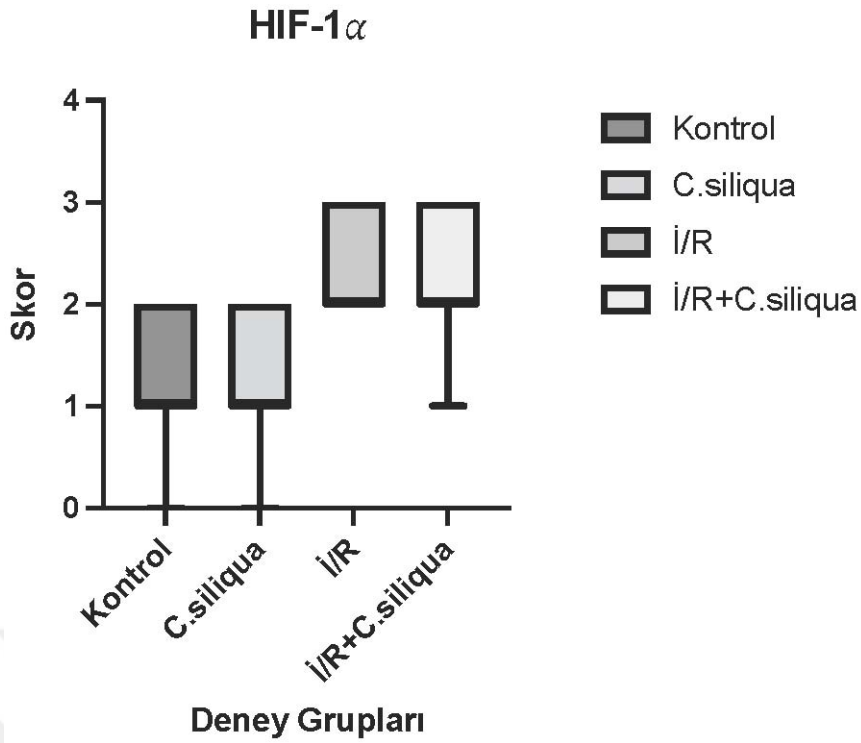
Şekil 4.32: İ/R grubunda HIF-1α boyanması. Seminifer tübüllerde spermatogonyumlar (siyah ok) ve spermatositler (mavi ok) pozitif boyanmıştır; ancak interstisyel alanda boyanma gözlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm



Şekil 4.33: İ/R grubunda HIF-1α boyanması. İnterstisyel alanda (yeşil ok) boyanan hücrelerin izlendiği örnekler mevcuttur. Spermatogonyumlarda (siyah ok) ve spermatositlerde (mavi ok) boyanma izlenmektedir. Objektifler 40X Ölçekler 50 µm



Şekil 4.34: İ/R+C.siliqua grubunda HIF-1α boyanması. Spermatogonyumlar (siyah ok) ve spermatositler (mavi ok) HIF-1α ile pozitif boyanmaktadır. İnterstisyel alanda boyanma izlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm

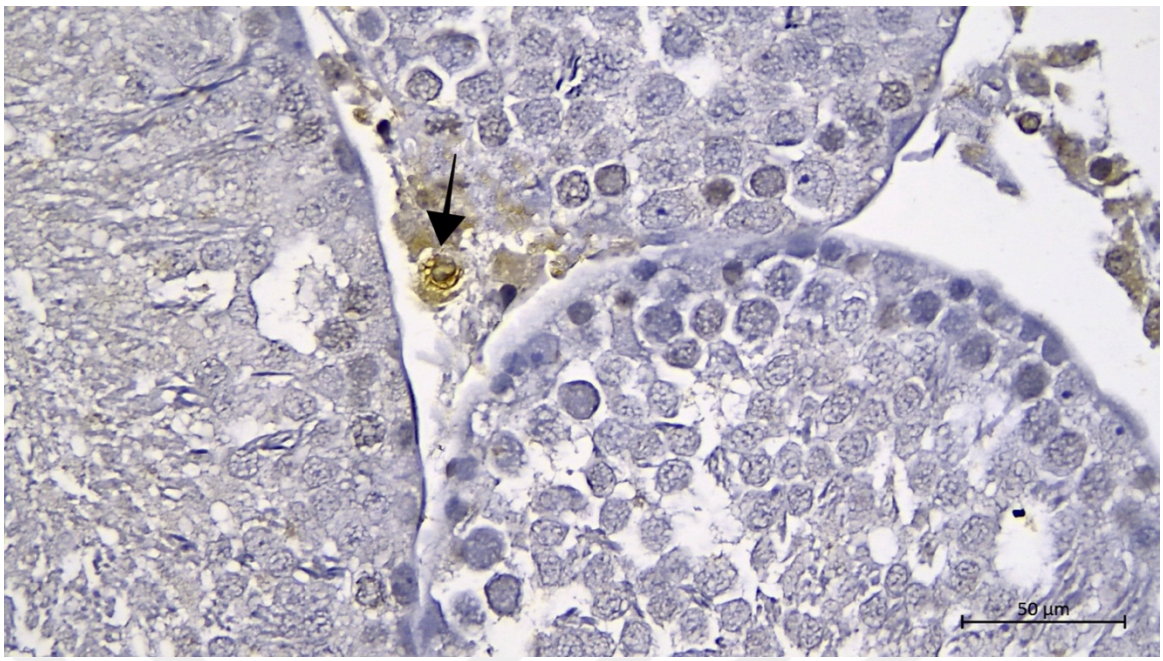


Şekil 4.35: HIF-1α skorlaması. Gruplar arası anlamlı farklılık saptanmamıştır. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir.

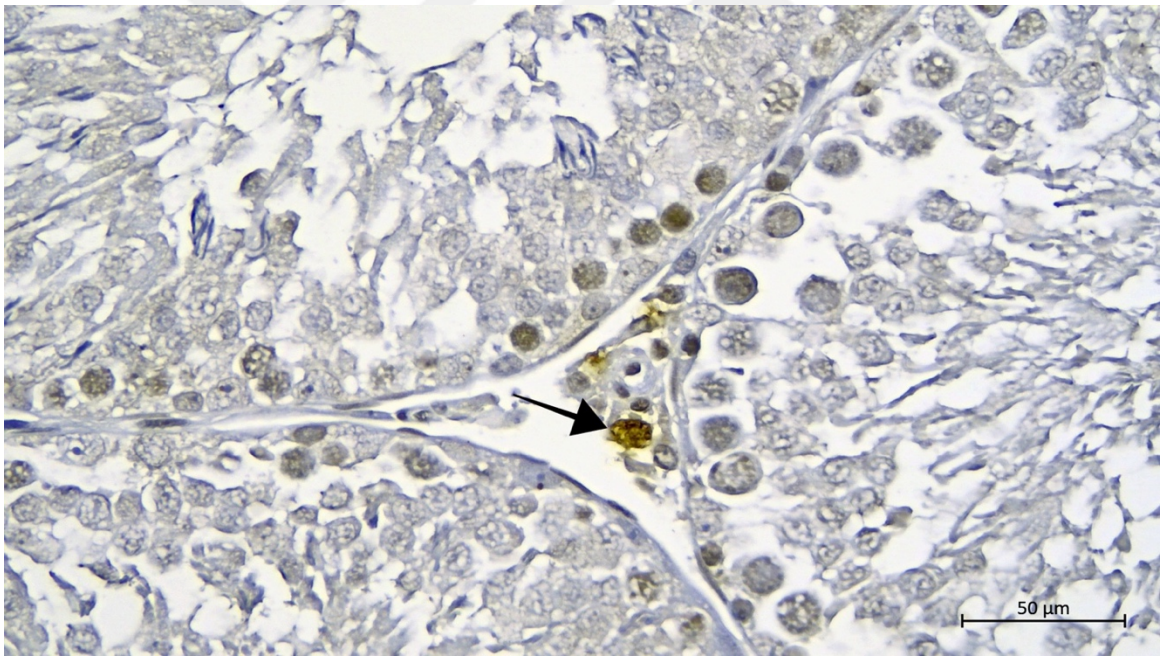
4.2.3. İnflamasyon Değerlendirmesi

CD68 immünohistokimyasal boyamasında, kontrol ve C.siliqua gruplarında pozitif boyanan az sayıda hücre izlendi (Şekil 4.36, Şekil 4.37). İ/R grubunda ise interstisyel alanda yaygın pozitif immünoreaktivite veren alanlar mevcuttu (Şekil 4.38). İ/R+C.siliqua gruplarında, interstisyel alanda pozitif boyanma görülebildi ancak hasar gruplarına kıyasla boyanma şiddeti düşük ve boyalı alanın yaygınlığı azdı (Şekil 4.39).

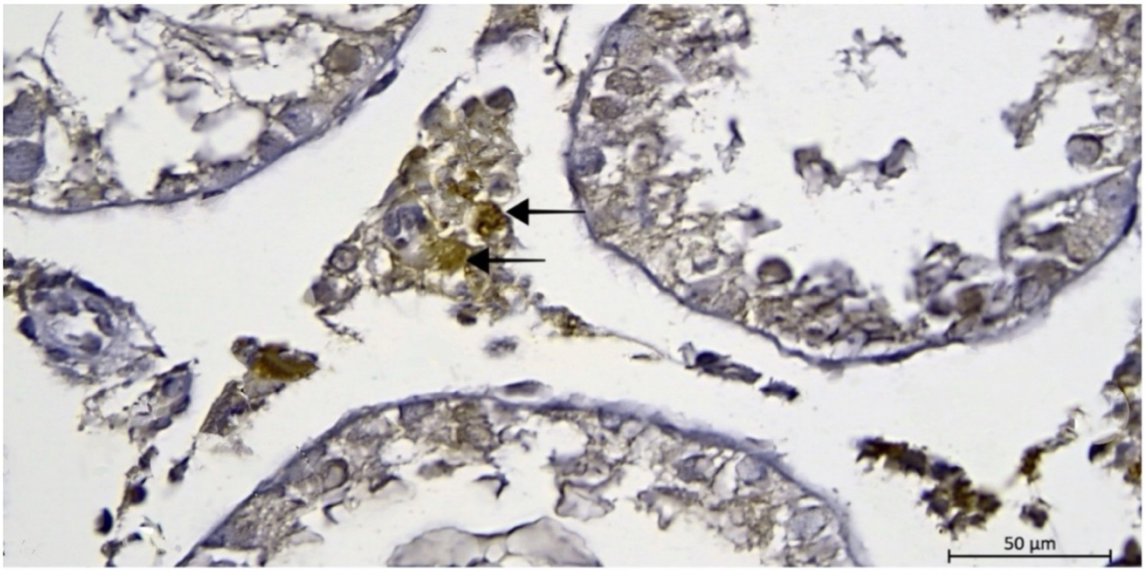
CD68 pozitif hücre sayımı yapıldığında İ/R grubunda pozitif hücre sayısı fazlaydı ($p=0.008$). İ/R ve İ/R+C.siliqua grupları arasında pozitif hücre sayısı karşılaştırmasında fark anlamlı değildi ($p=0.2203$). Kontrol ve C.siliqua grupları arasında fark anlamlı değildi ($p>0.9999$).



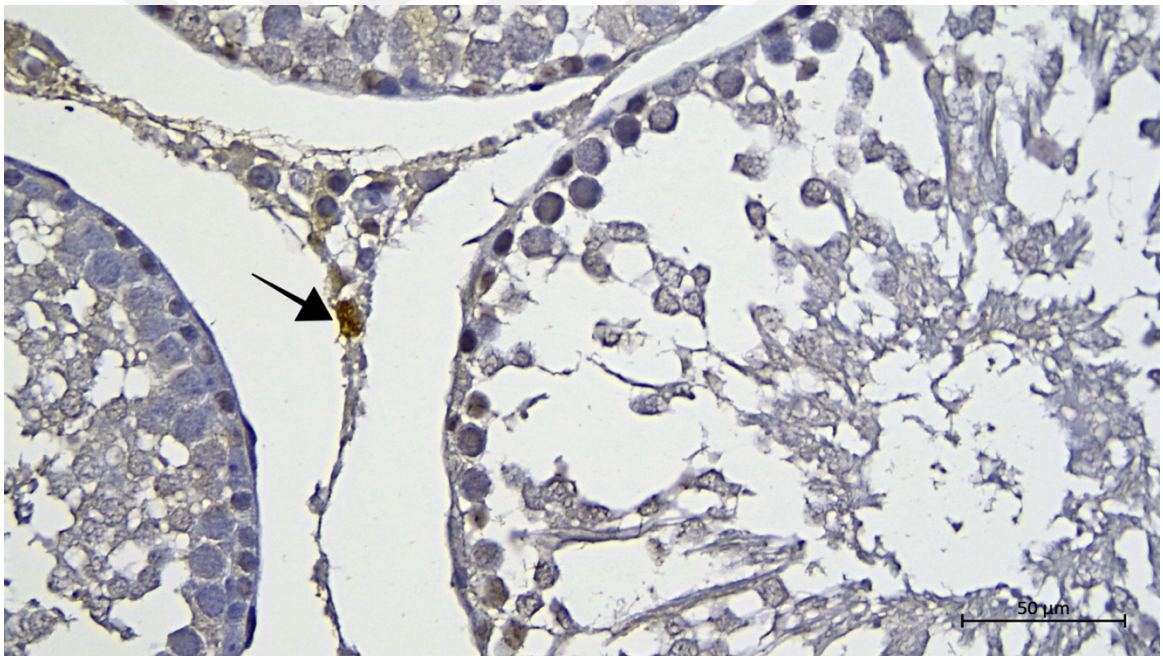
Şekil 4.36: Kontrol grubu interstisyel alanda CD68 immünohistokimyasal boyanma. İnterstisyel alan makrofaj infiltrasyonu açısından değerlendirildiğinde CD68 pozitif boyanma mevcuttur (ok). DAB-Hematoksilen. Objektif: 40X. Ölçek 50 µm



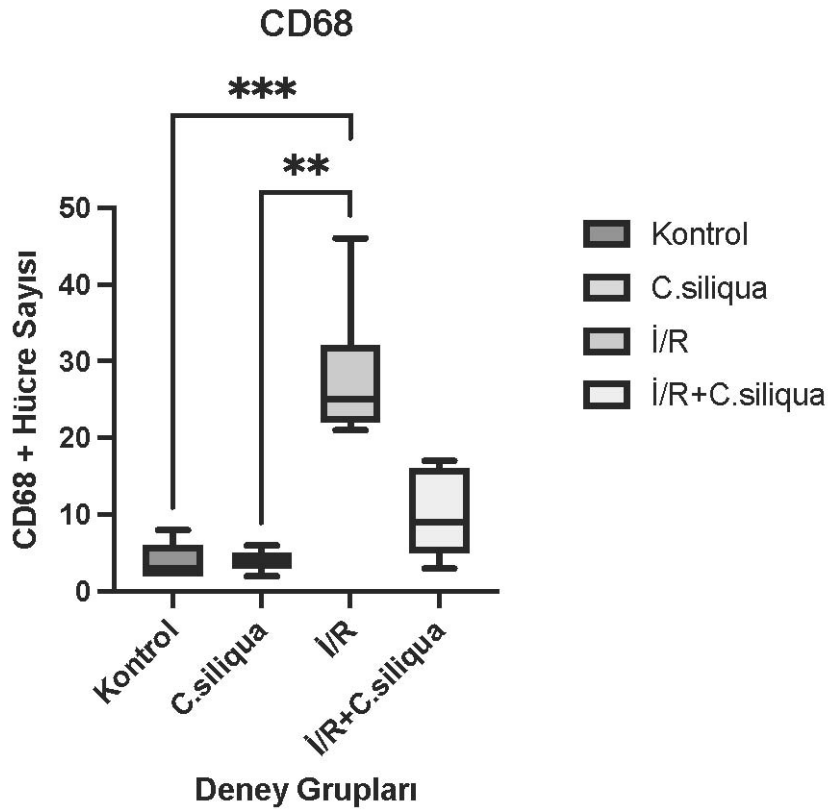
Şekil 4.37: C. siliqua grubunda CD68 immünohistokimyasal boyaması. İnterstisyel alanda pozitif boyanan az sayıda hücre tespit edilmiştir. DAB-Hematoksilen. Objektif: 40X. Ölçek 50 µm



Şekil 4.38: İ/R grubu grubu interstisyel alanda CD68 immünohistokimyasal boyanma. İnterstisyel alan makrofaj infiltrasyonu açısından değerlendirildiğinde yoğun CD68 pozitif boyanma mevcuttur (ok). DAB-Hematoksilen. Objektif: 40X. Ölçek 50 µm



Şekil 4.39: İ/R+C.siliqua grubu interstisyel alanda CD68 immünohistokimyasal boyanma. İnterstisyel alanda yer yer pozitif boyanmış hücreler seçilmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif: 40X. Ölçek 50 µm

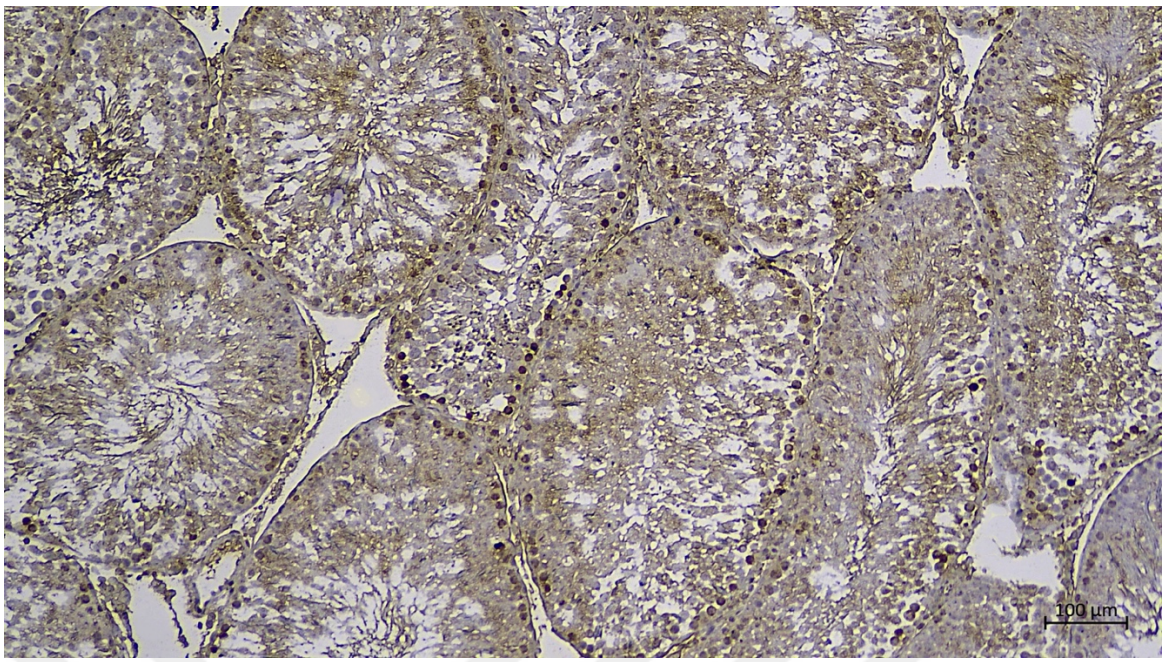


Şekil 4.40: CD68 + Hücre Sayımı. Anlamlı farklılık düzeyi (**) ve (***) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (: p<0.01, ***: p<0.001)**

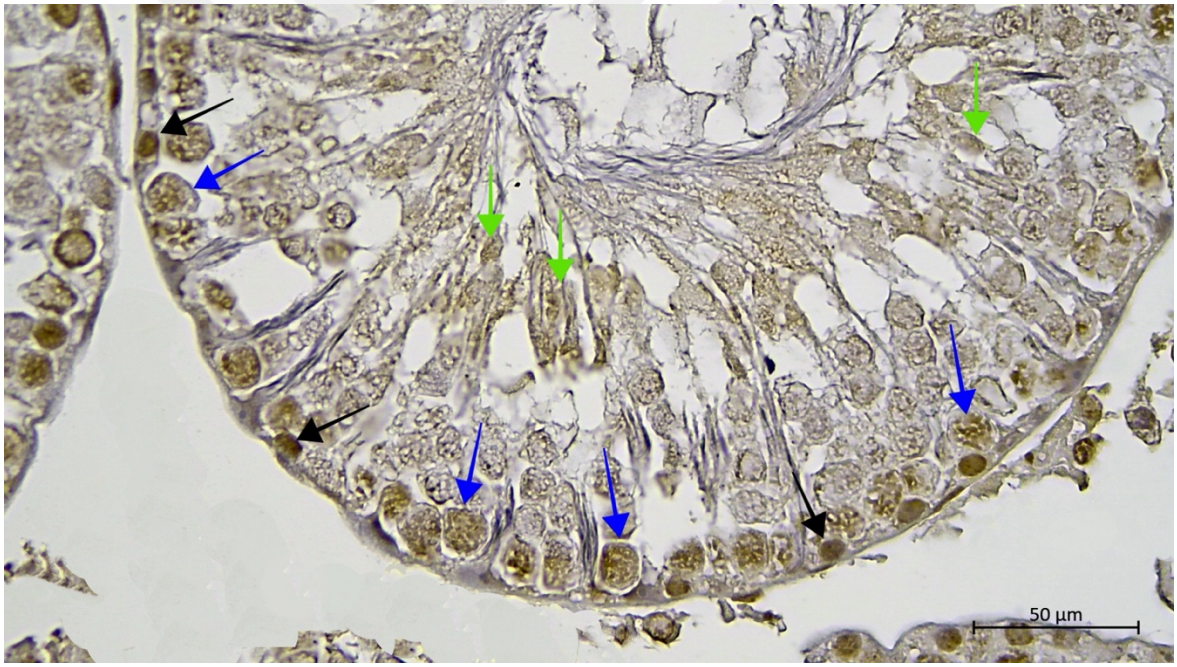
4.2.4. Antioksidan Gücün Değerlendirmesi

4.2.4.1. SOD

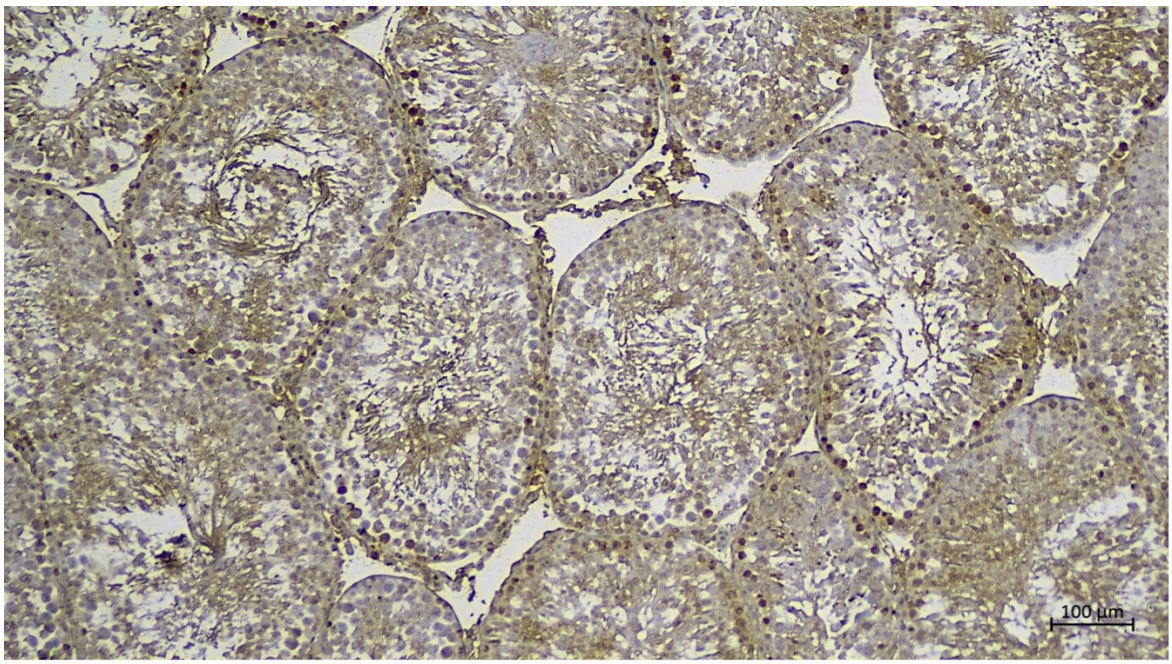
Dokudaki antioksidan gücü incelemek için yapılan antioksidan enzimlerden SOD boyamasında İ/R grubunda interstisyel alanda ve seminifer tübül lümenindeki immatür germ hücrelerinde çok hafif boyanmalar izlendi (Şekil 4.44, Şekil 4.45). Kontrol grubunda seminifer tübüllerde yaygın ve güçlü boyanma görüldü (Şekil 4.41, Şekil 4.42). İ/R+C.siliqua grubunda ise spermatogonyum, spermatosit ve spermatidlerde (Şekil 4.47) boyanma izlendi. İ/R+C.siliqua grubunda, seminifer tübüllerde ve interstisyel alanda immünreaktivite gözlenebildi (Şekil 4.46). Semikantitatif değerlendirmede normal dağılım göstermeyen veriler arasında karşılaştırma yapıldığında gruplar arası anlamlı farklılık saptandı (p=0.0009). Kontrol ve İ/R grubu arasında (p= 0.0029), İ/R+C.siliqua ve İ/R grubu arasında (p= 0.0385) anlamlı farklılık bulundu, kontrol ve tedavi grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p>0.99).



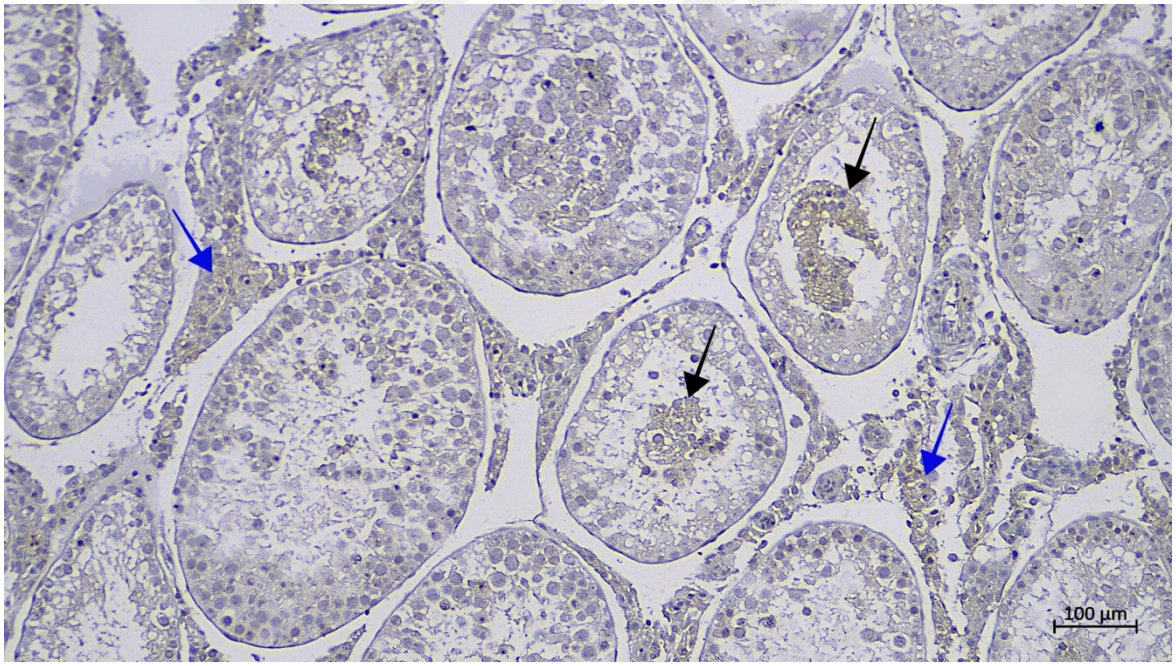
Şekil 4.41: Kontrol grubunda SOD. Seminifer tübüllerde yaygın pozitif boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm



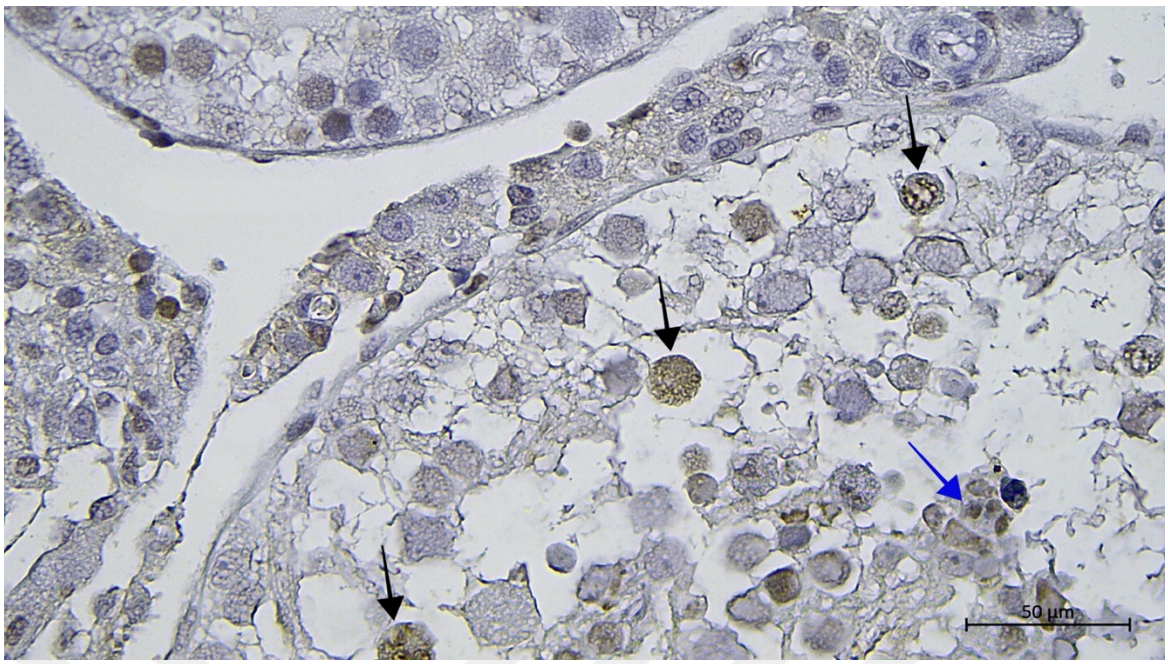
Şekil 4.42: Kontrol grubunda SOD. Spermatogonyumlar (siyah ok), spermatositler (mavi ok) güçlü; spermatidler (yeşil ok) hafif olarak SOD ile pozitif boyanma göstermektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm



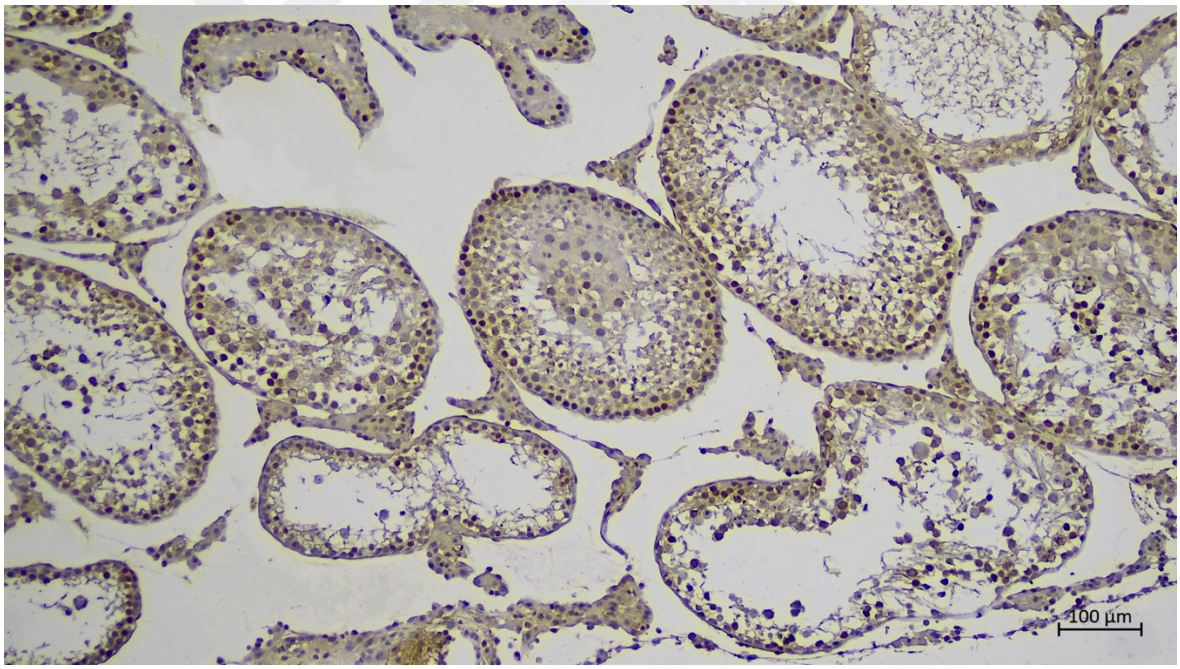
Şekil 4.43: C.siliqua grubunda SOD. Boyanma özelliği kontrol grubuyla benzerlik göstermektedir. Seminifer tübüller SOD ile güçlü boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm



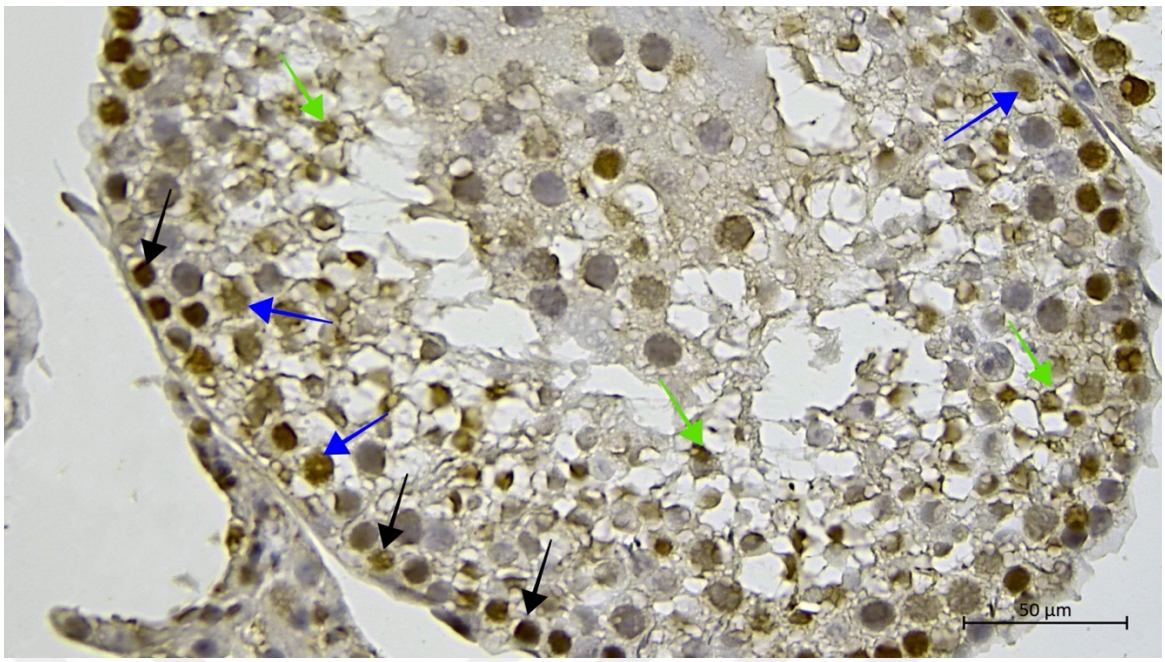
Şekil 4.44: İ/R grubunda SOD. Lümen içine dökülmüş immatür germ hücrelerinde ve interstisyel alanda immünreaktivite gözlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm



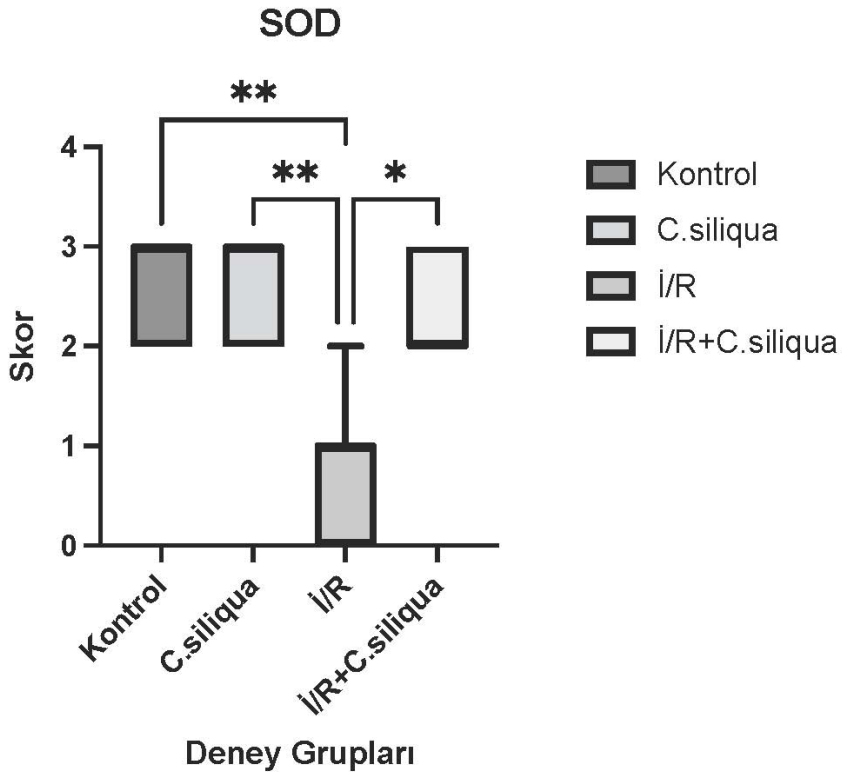
Şekil 4.45: İ/R grubunda SOD. Spermatositlerde (siyah ok) ve lümen içine dökülmüş immatür germ hücrelerinde (mavi ok) hafif boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm



Şekil 4.46: İ/R+C.siliqua grubunda SOD. Seminifer tübüllerde ve interstisyel alanda SOD ile yoğun boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm



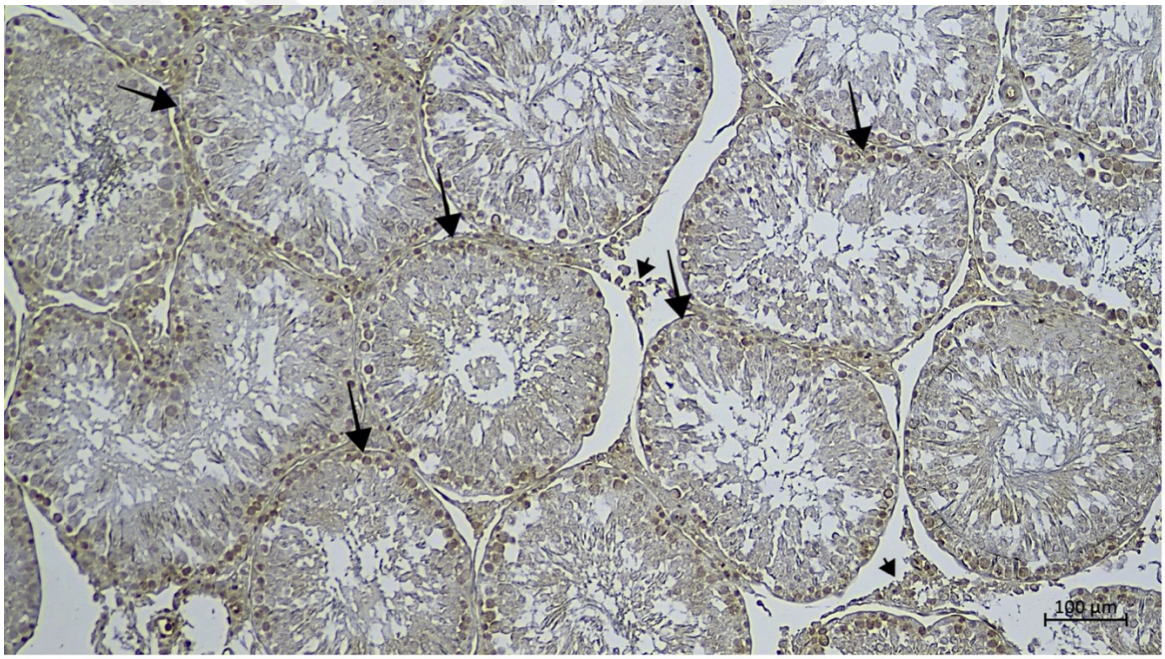
Şekil 4.47: İ/R+C.siliqua grubunda SOD. Spermatogonyumlar (siyah ok), spermatositler (mavi ok) ve spermatidler (yeşil ok) pozitif olarak SOD ile boyanmıştır. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm



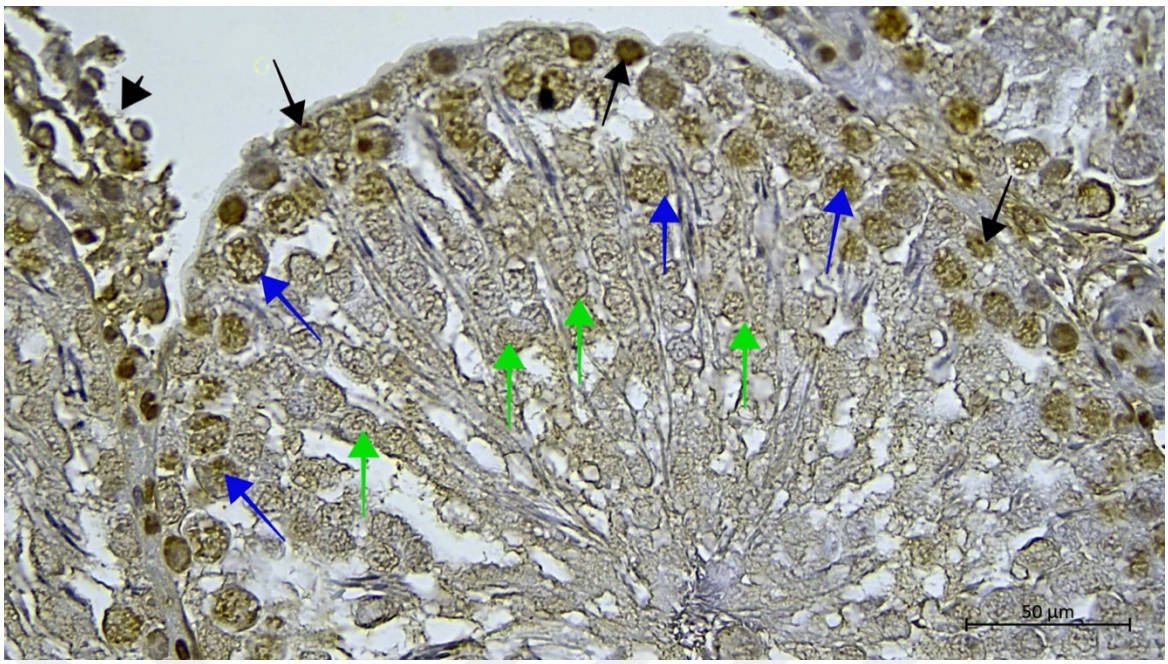
Şekil 4.48: SOD skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) ve (**) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (*: $p<0.05$; **: $p<0.01$)

4.2.4.2. Katalaz

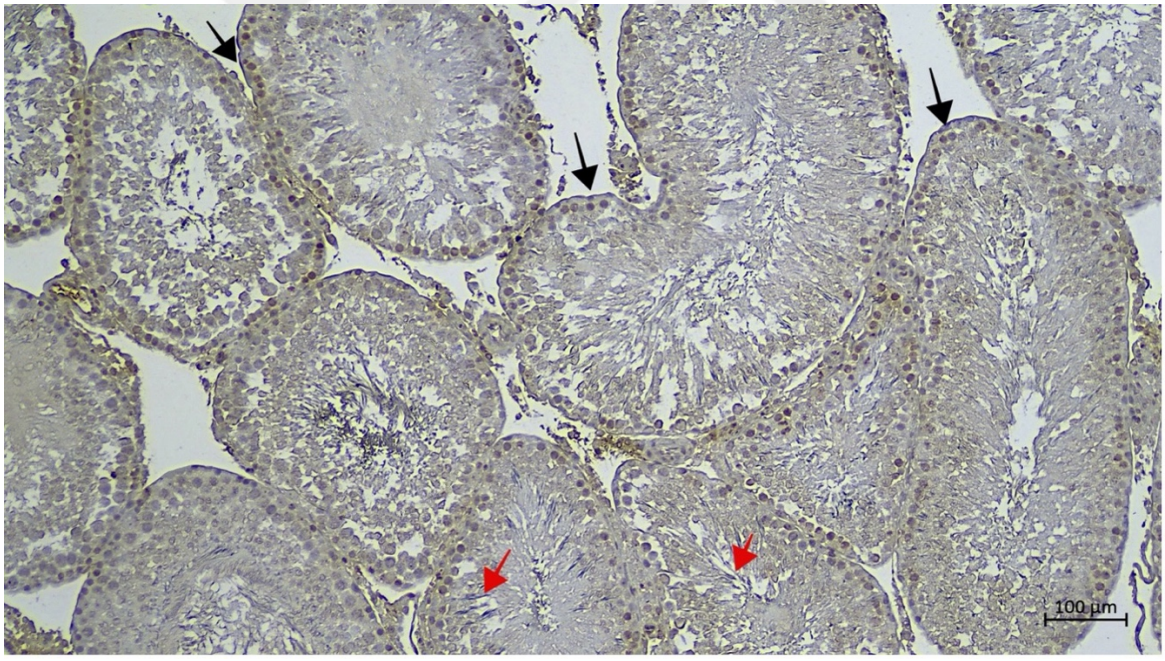
Dokudaki antioksidan gücü incelemek için yapılan antioksidan enzimlerden katalaz boyamasında İ/R grubunda seminifer tübüllerde hafif spermatogonyum boyanması dışında boyanma izlenmedi (Şekil 4.52, Şekil 4.53). Kontrol grubunda seminifer tübüllerde güçlü boyanma izlenebildi, spermatogonyumlar ve spermatositler yoğun boyanmıştı (Şekil 4.49, Şekil 4.50). C.siliqua grubunun boyanma modeli kontrol grubu ile benzerdi (Şekil 4.51) İ/R+C.siliqua grubunda ise spermatogonyum ve spermatidlerde (Şekil 4.55) yoğun pozitif boyanma izlenebildi. İ/R+C.siliqua grubu seminifer tübüllerinde ve interstisyel alanda immünreaktivite gözlendi (Şekil 4.54). Semikantitatif değerlendirmede normal dağılım göstermeyen veriler arasında karşılaştırma yapıldığında gruplar arası anlamlı farklılık saptandı (p=0.0093). Kontrol ve İ/R grubu arasında (p= 0.0179), İ/R+C.siliqua ve İ/R grubu arasında anlamlı farklılık bulundu (p= 0.0490), kontrol ve İ/R+C.siliqua grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p>0.99).



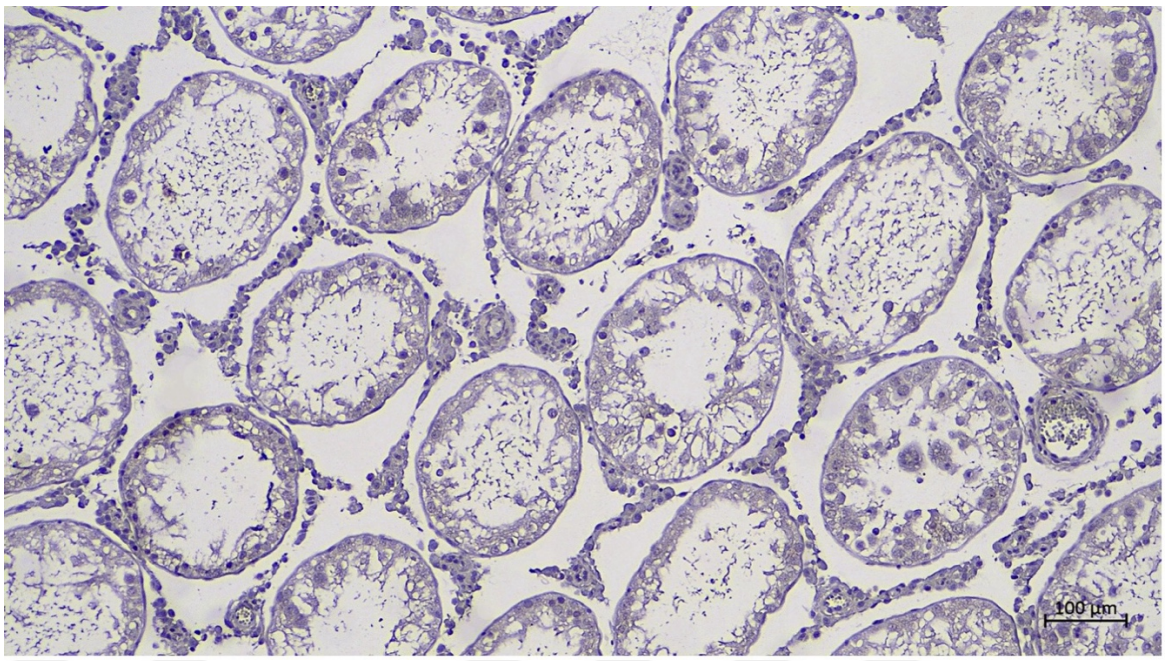
Şekil 4.49: Kontrol grubunda Katalaz. İnterstisyel alanda (ok başı), spermatogonyumlarda (ok) katalaz ile pozitif boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm



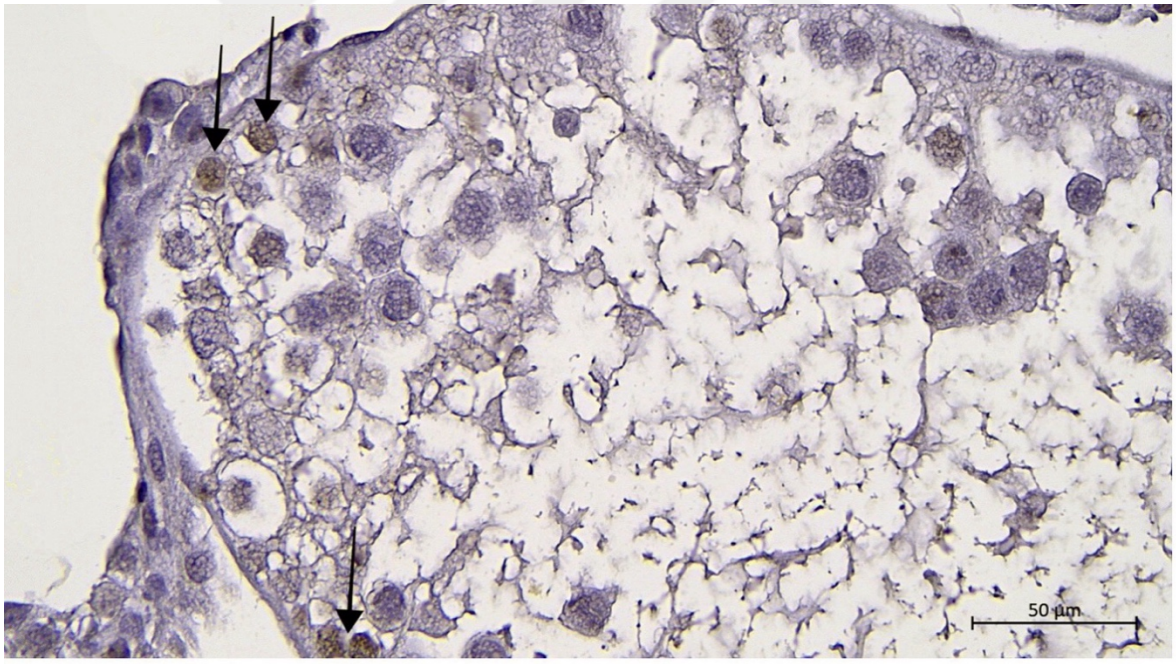
Şekil 4.50: Kontrol grubunda Katalaz. Spermatogonyumlar (siyah ok) ve spermatositler (mavi ok) Katalaz ile pozitif boyanmaktadırlar. Spermatidlerde (yeşil ok) hafif boyanma izlenmektedir. İnterstisyel alanda (ok başı) katalaz ile immünreaktivite görülmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm



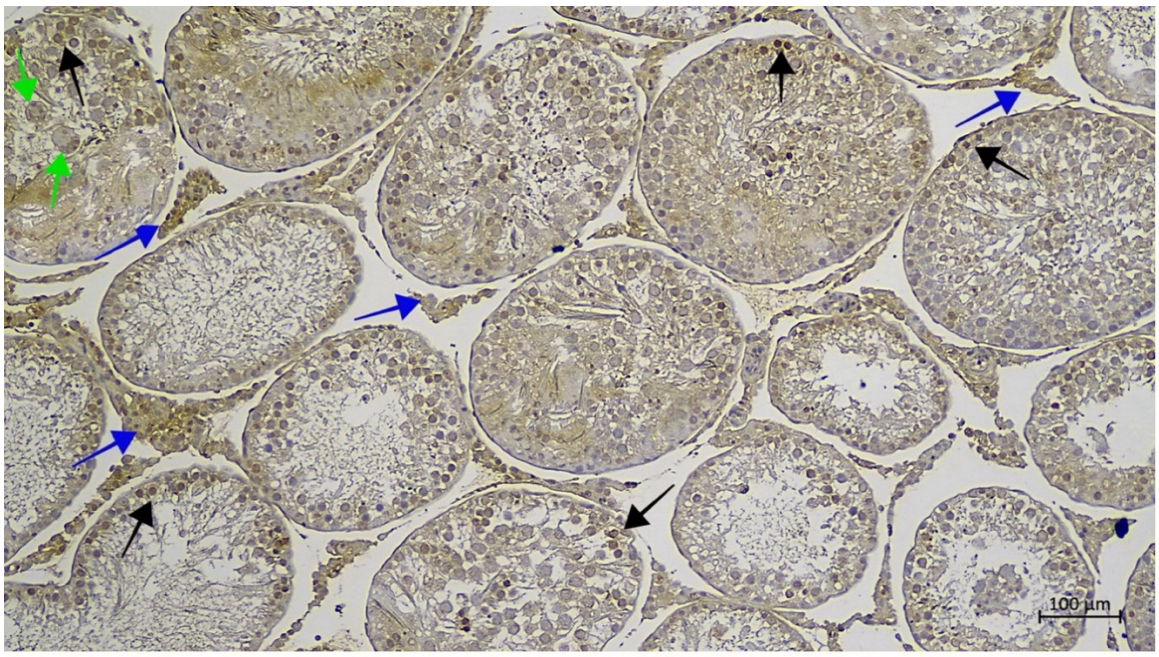
Şekil 4.51: C. Siliqua grubunda Katalaz. Spermatogonyumlar ve spermatositler pozitif boyanmaktadır (siyah ok). Olgun spermlerde (kırmızı ok) boyanma izlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 µm



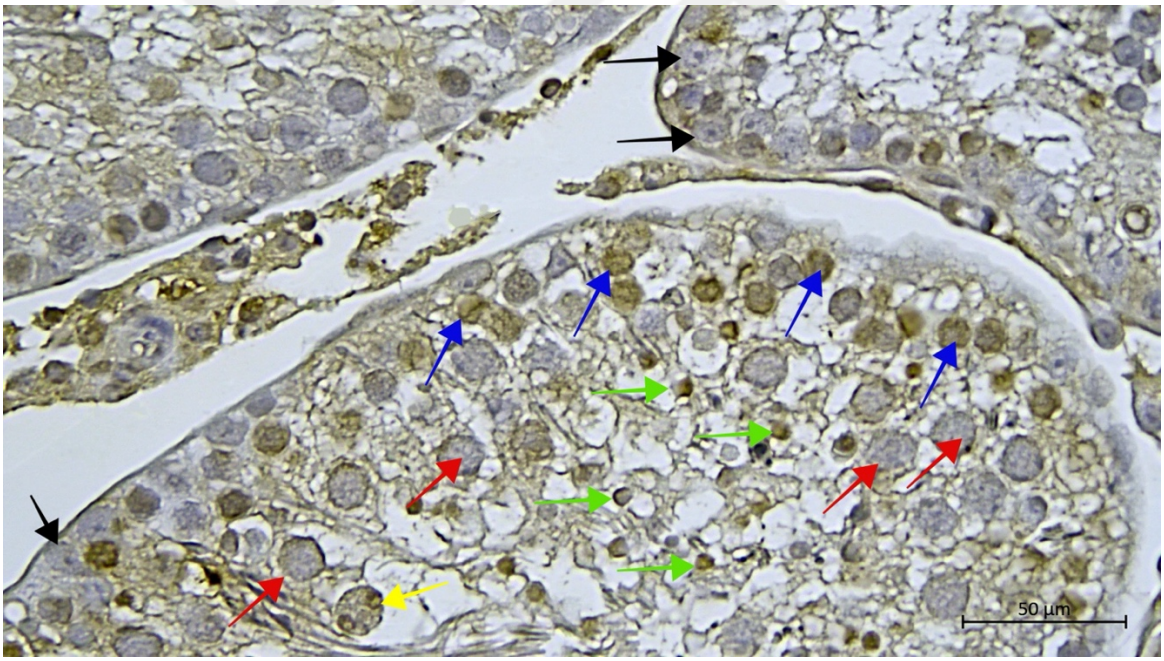
Şekil 4.52: İ/R grubunda Katalaz. Seminifer tübüllerde ve interstisyel alanda boyanma izlenmemektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 μm



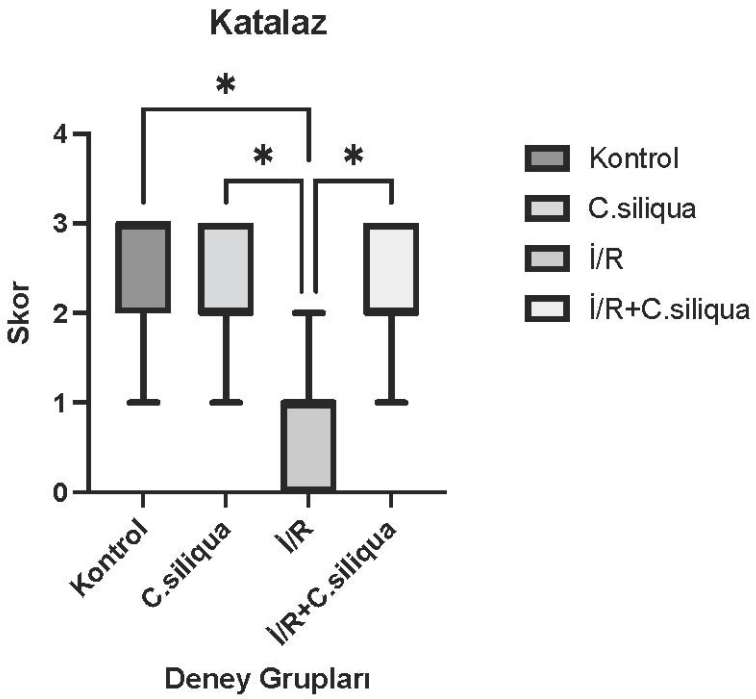
Şekil 4.53: İ/R grubunda Katalaz. Spermatogonyumlarda hafif boyanma izlenmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 μm



Şekil 4.54: İ/R+C.siliqua grubunda Katalaz. İnterstisyel alanda (mavi ok) ve spermatogonyumlarda (siyah ok) güçlü boyanma izlenmektedir. Nadir sayıda gözlenen dev hücrelerde (yeşil ok) boyanma izlenmemiştir. DAB-Hematoksilen. Objektif 10X. Ölçek 100 µm



Şekil 4.55: İ/R+C.siliqua grubunda Katalaz. Sertoli hücrelerinde (siyah ok) ve spermatositlerde (kırmızı ok) boyanma gözlenmemektedir. Spermatogonyumlar (mavi ok) ve spermatidler (yeşil ok) katalaz ile güçlü boyanmaktadırlar. Dev hücrede (sarı ok), hafif immünreaktivite izlenmektedir. İnterstisyel alanda da boyanma görülmektedir. DAB-Hematoksilen. Objektif 40X. Ölçek 50 µm



Şekil 4.56: Katalaz skorlaması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak ifade edilmiştir. (*: p<0.05)

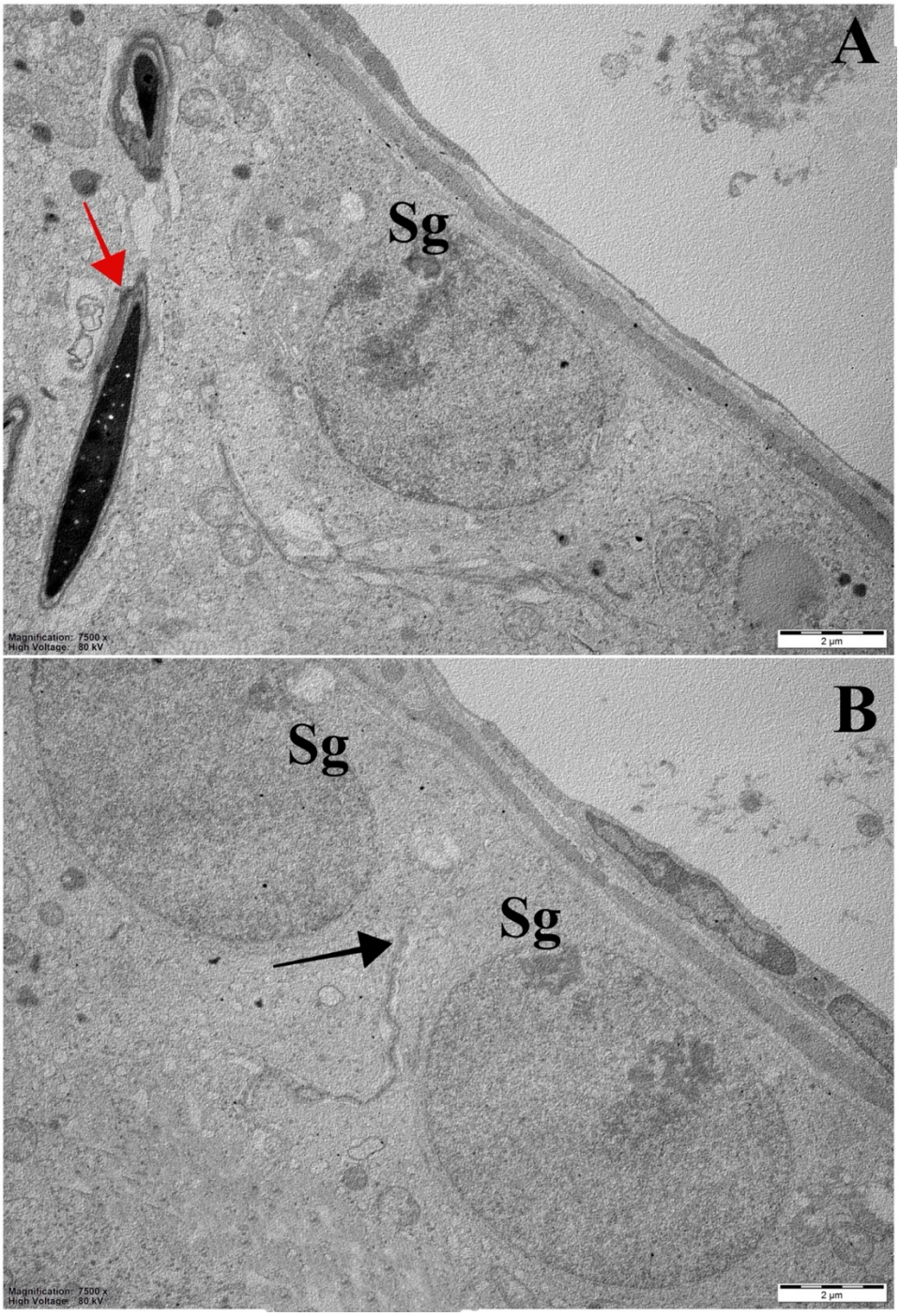
4.3. ELEKTRON MİKROSKOBU BULGULARI

Dört deney grubuna ait örneklerin ultrastrüktürel yapısı incelendi.

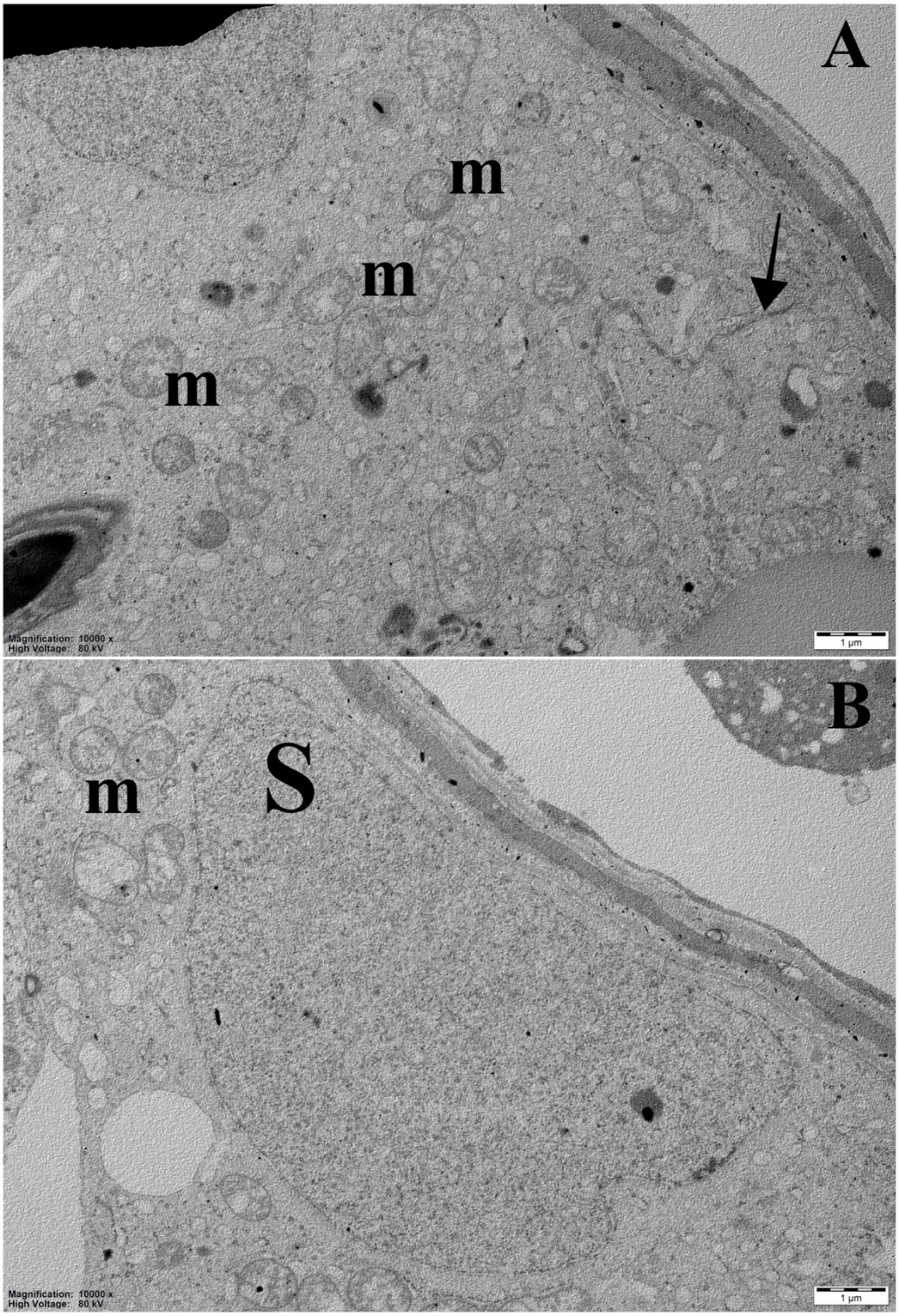
Kontrol grubunda spermatogenik seri hücrelerin yapısı normal izlenebildi (Şekil 4.57). Hücreler arası bağlantı kompleksleri doğal izlendi, çok sayıda normal mitokondri görüldü (Şekil 4.58). Spermatid çekirdeğinin etrafında oluşmakta olan akrozom yapısı, sperm kuyrukları izlenebildi (Şekil 4.59). Çok sayıda kep fazında spermatid ve sperm başı kontrol grubunda bulunabildi (Şekil 4.60). C. Siliqua grubunda spermatogenik seriye ait hücreler izlenebildi (Şekil 4.62, Şekil 4.63, Şekil 4.64 ve Şekil 4.65). Her iki grupta da Leydig hücre yapısı normal görünümdedir (Şekil 4.61).

İ/R grubunda multinükleer dev hücreler izlenebildi (Şekil 4.66). Hücreler ödemlidir (Şekil 4.67). Hücreler arası ödem ve hücrelerde vakuolizasyon görüldü (Şekil 4.68). Apoptotik hücreler fazla sayıda izlenebildi (Şekil 4.69, Şekil 4.71). Nekrozu destekleyen kromatoliz ve ödem izlenen hücreler bulundu (Şekil 4.69). Kromatini düzgün kondanse olmamış, vakuolize sperm hücreleri görülebildi (Şekil 4.70). Mitokondriyonlarda kristaların silinmesi ve genişlemelerin olduğu izlendi (Şekil 4.72). İ/R grubunda interstisyel alanda eritrositlere ve makrofajlar gözlendi (Şekil 4.73). Leydig hücrelerinde de vakuolizasyon izlendi, interstisyel alanda fibrin görüldü (Şekil 4.74).

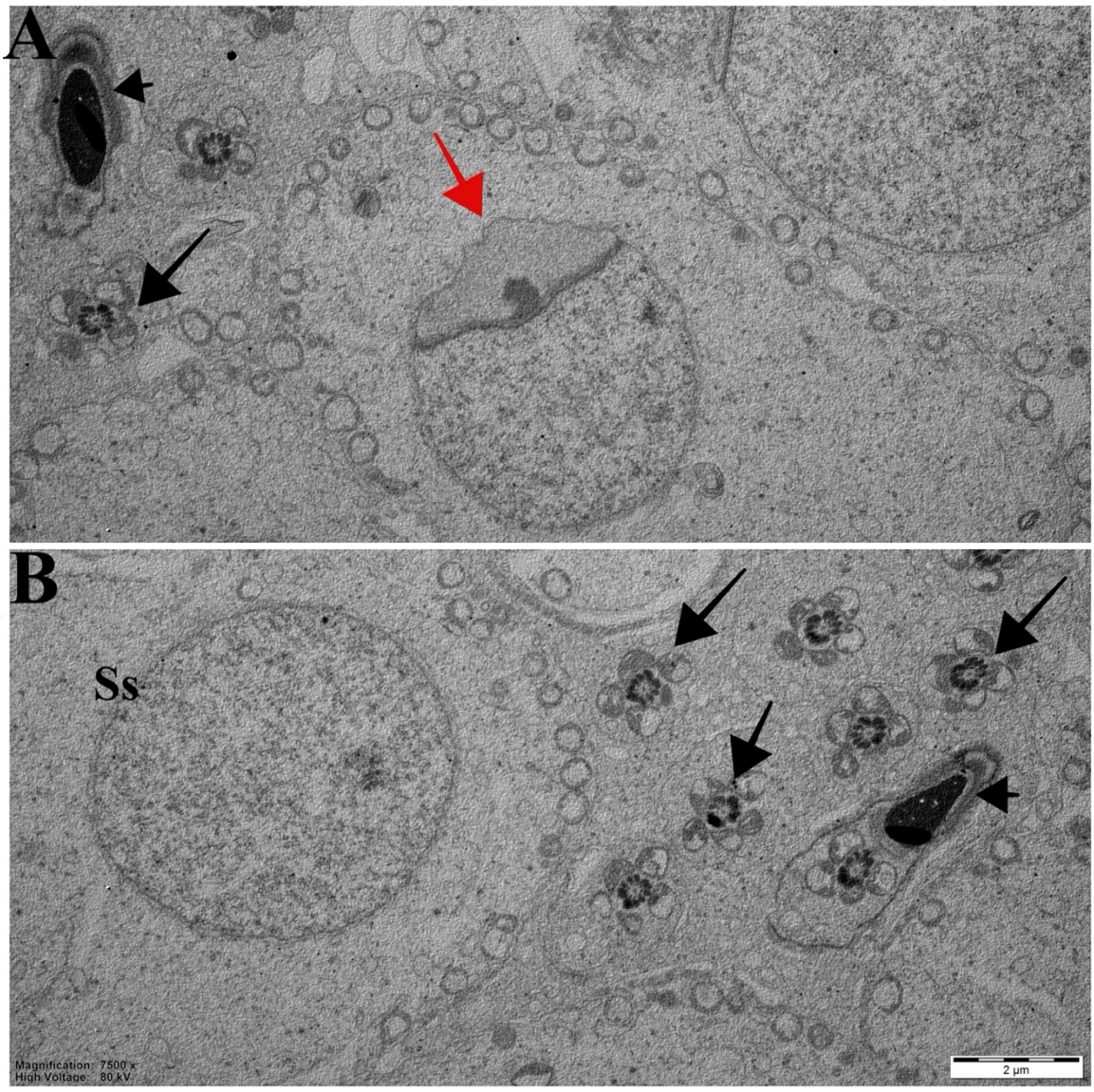
İ/R+C.siliqua grubunun genel yapısı kontrole yakın bulundu. Spermatik seri hücrelerinin yapısının korunabildiği görüldü (Şekil 4.75). Elonge spermatidler (Şekil 4.76), sperm başının ve kuyruğunun izlendiği alanlar mevcuttu (Şekil 4.77, Şekil 4.78). Kristaları silinmiş mitokondri izlendi. Kristaları korunmuş normal morfolojili mitokondriyonların bulunduğu da görüldü (Şekil 4.79). Leydig hücrelerinde kontrol grubuna benzer özellikler görüldü (Şekil 4.80).



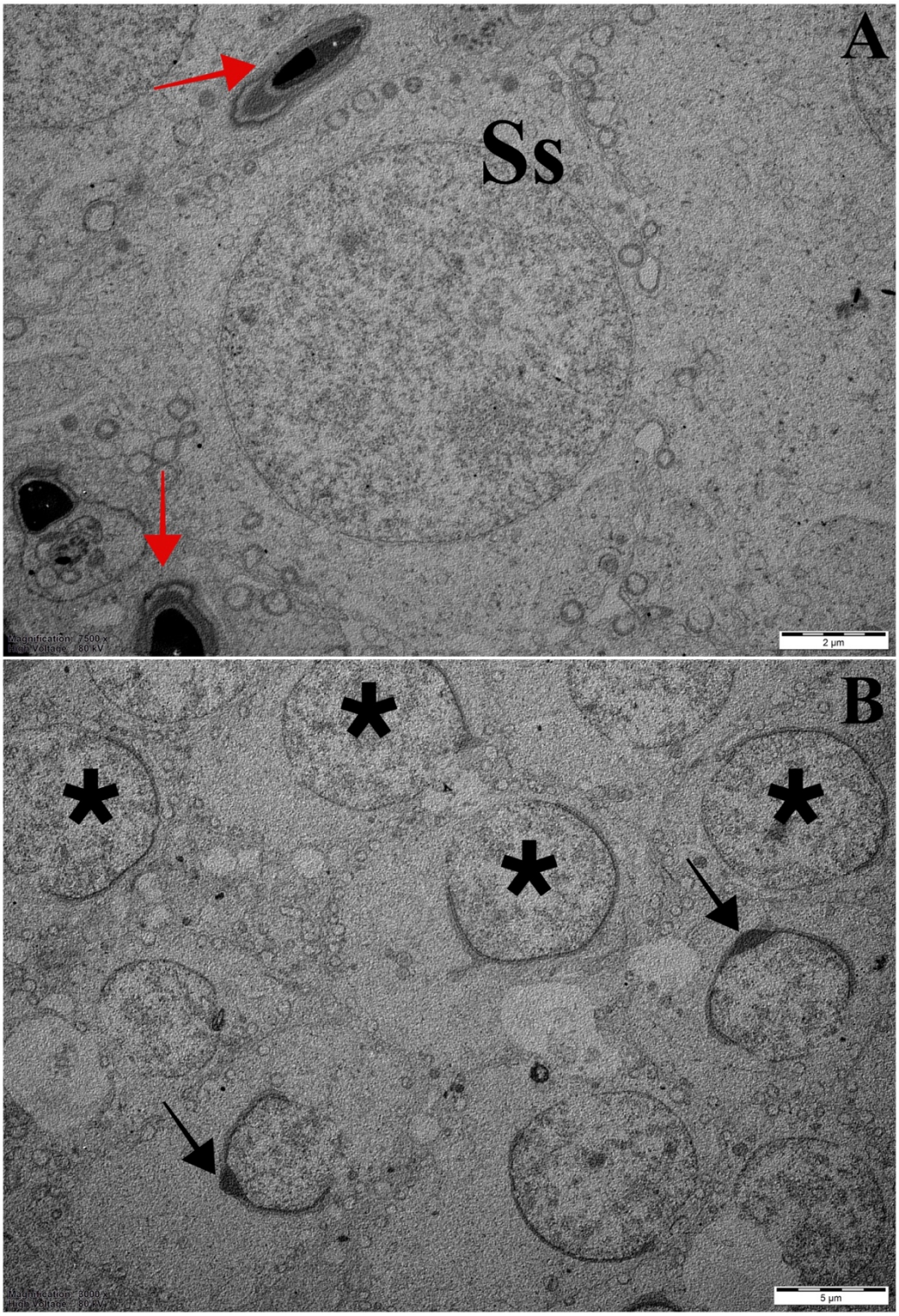
Şekil 4.57: Kontrol grubunda spermatogonyum ve sperm başının TEM görüntüsü. Bazal membran üzerine oturmuş spermatogonyum hücresi (Sg) ve sperm başı (kırmızı ok) izlenmektedir (A). İki spermatogonyum hücresi ve aralarındaki bağlantı kompleksleri (ok) görülmektedir (B). Büyütme 7500X



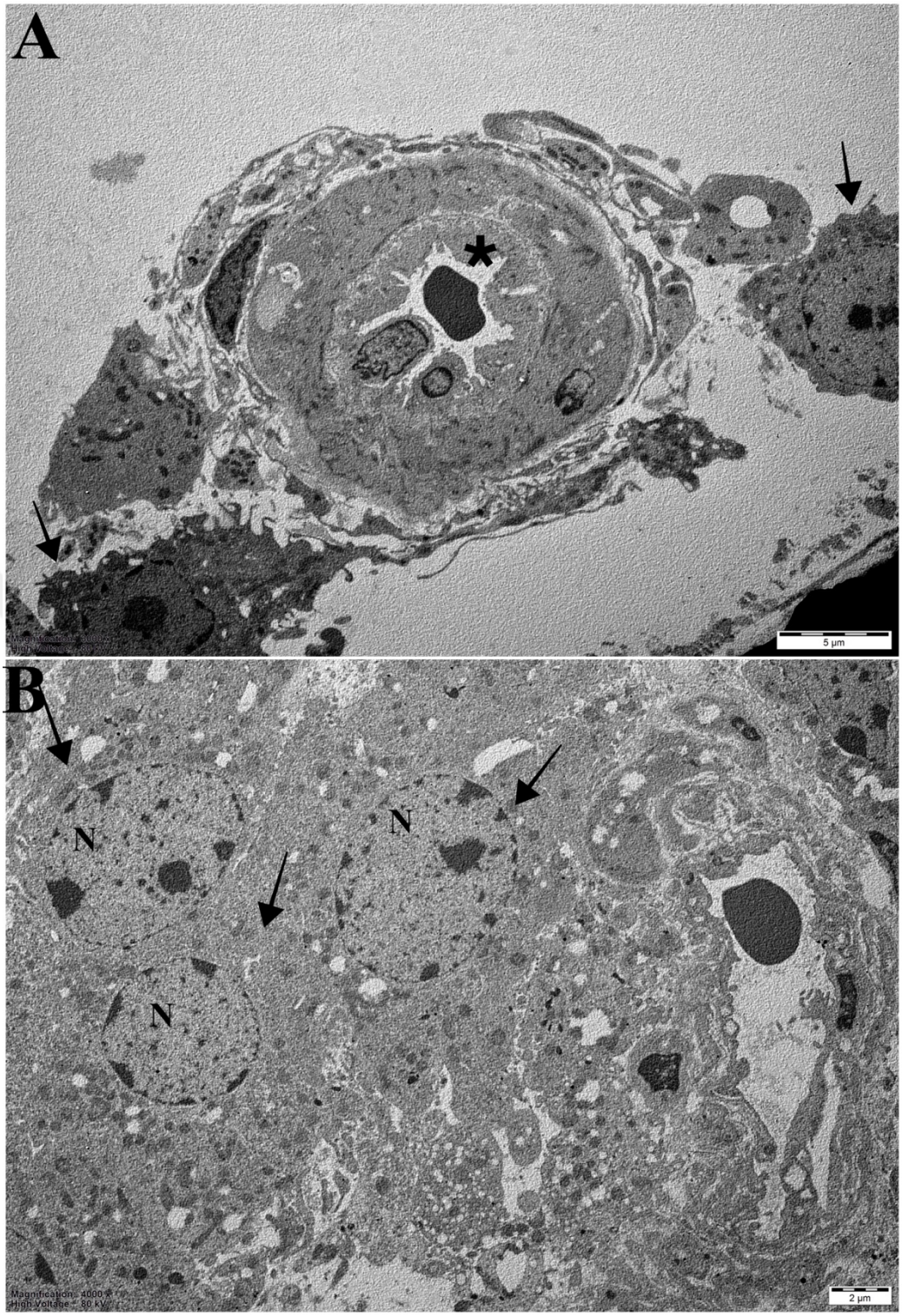
Şekil 4.58: Kontrol grubunda Sertoli hücresi ve normal yapılı mitokondri. Mitokondri (m) ve hücreler arası bağlantı kompleksleri görülmektedir (A). Sertoli hücresinin bazal membrana yakın konumlanmış büyük çekirdeği (S) ve normal yapıda mitokondri (m) izlenmektedir. Büyütme 10000X



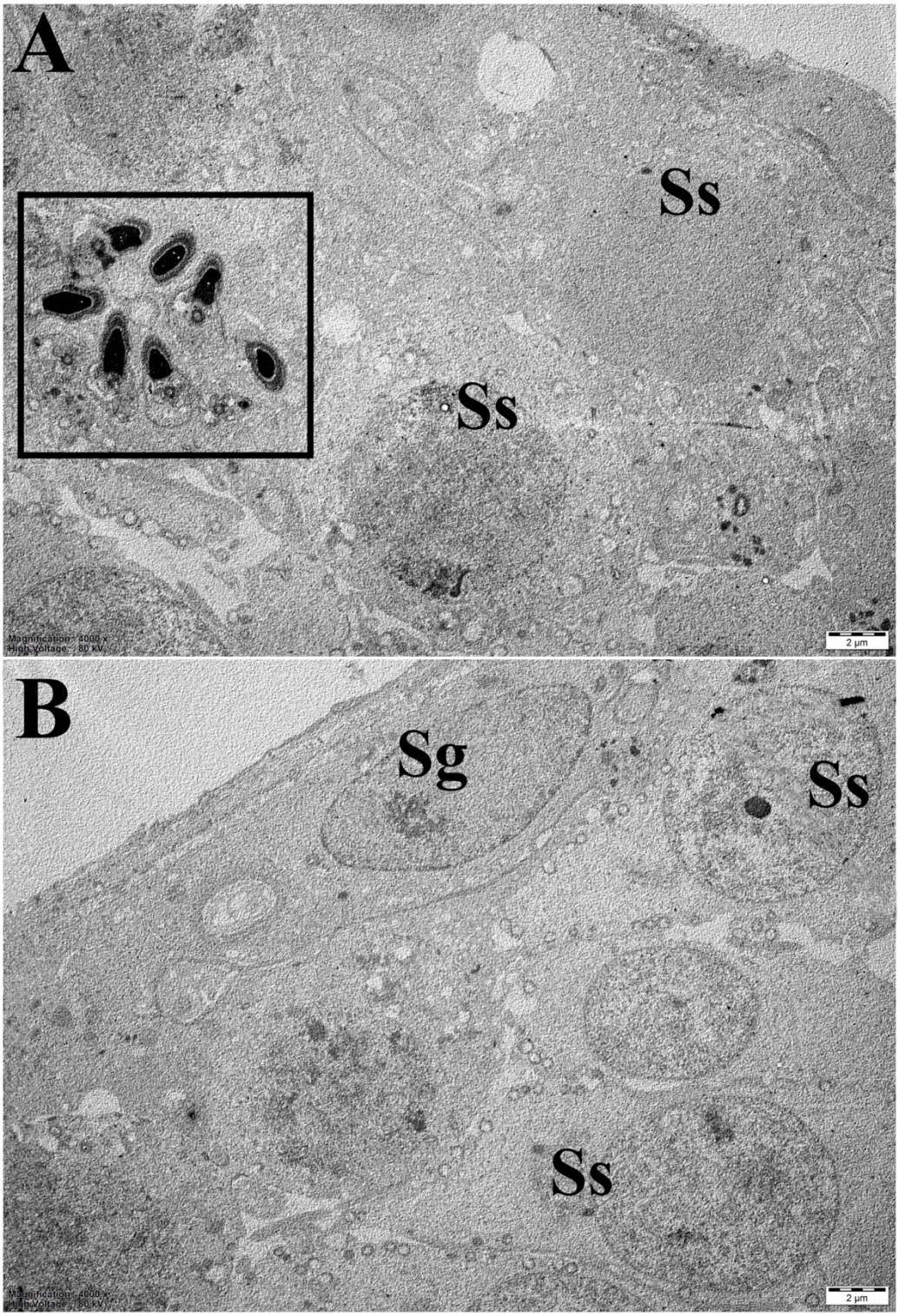
Şekil 4.59: Kontrol grubunda spermatogenik seri hücreleri. Spermatid çekirdeği etrafında birikmeye başlayan akrozom (kırmızı ok), gelişmekte olan sperm boynunu çevreleyen mitokondriyonlar (siyah ok) ve sperm başı (ok başı) izlenmektedir (A ve B). Yuvarlak büyük çekirdekli ve spermatogenik serinin en büyük hücrelerinden spermatosit (Ss) görülmektedir (B). Büyütme 7500X



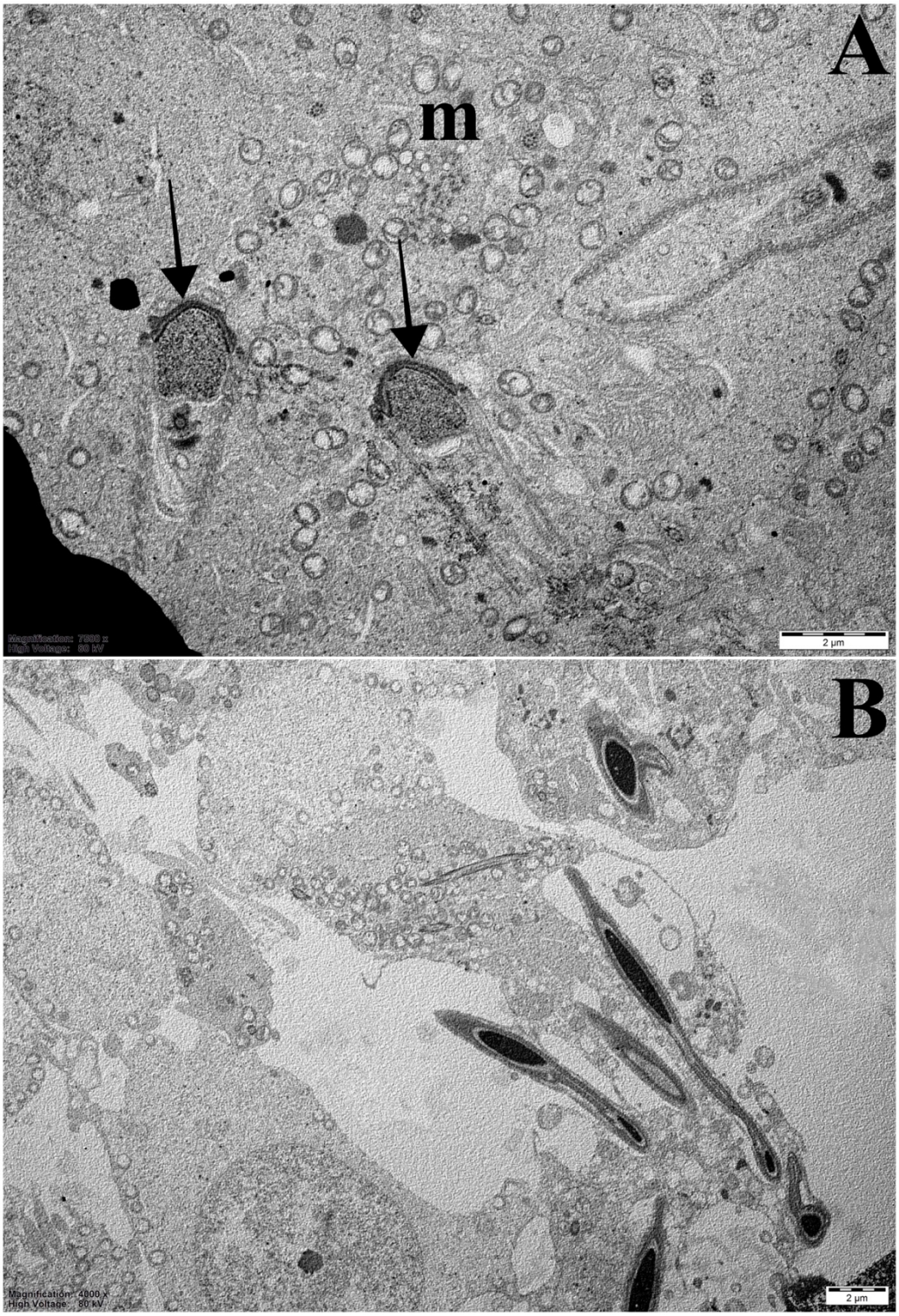
Şekil 4.60: Kontrol grubunda spermatosit ve spermatidler. Normal morfolojide bir spermatosit (Ss) ve sperm hücre başları (kırmızı ok) izlenmektedir (A). Kep fazına girmiş, çekirdek etrafında akrozomal granüllerin (ok) birikmeye başladığı spermatid hücreleri görülmektedir (asteriks) (B). Büyütmeler A:7500X B:3000X



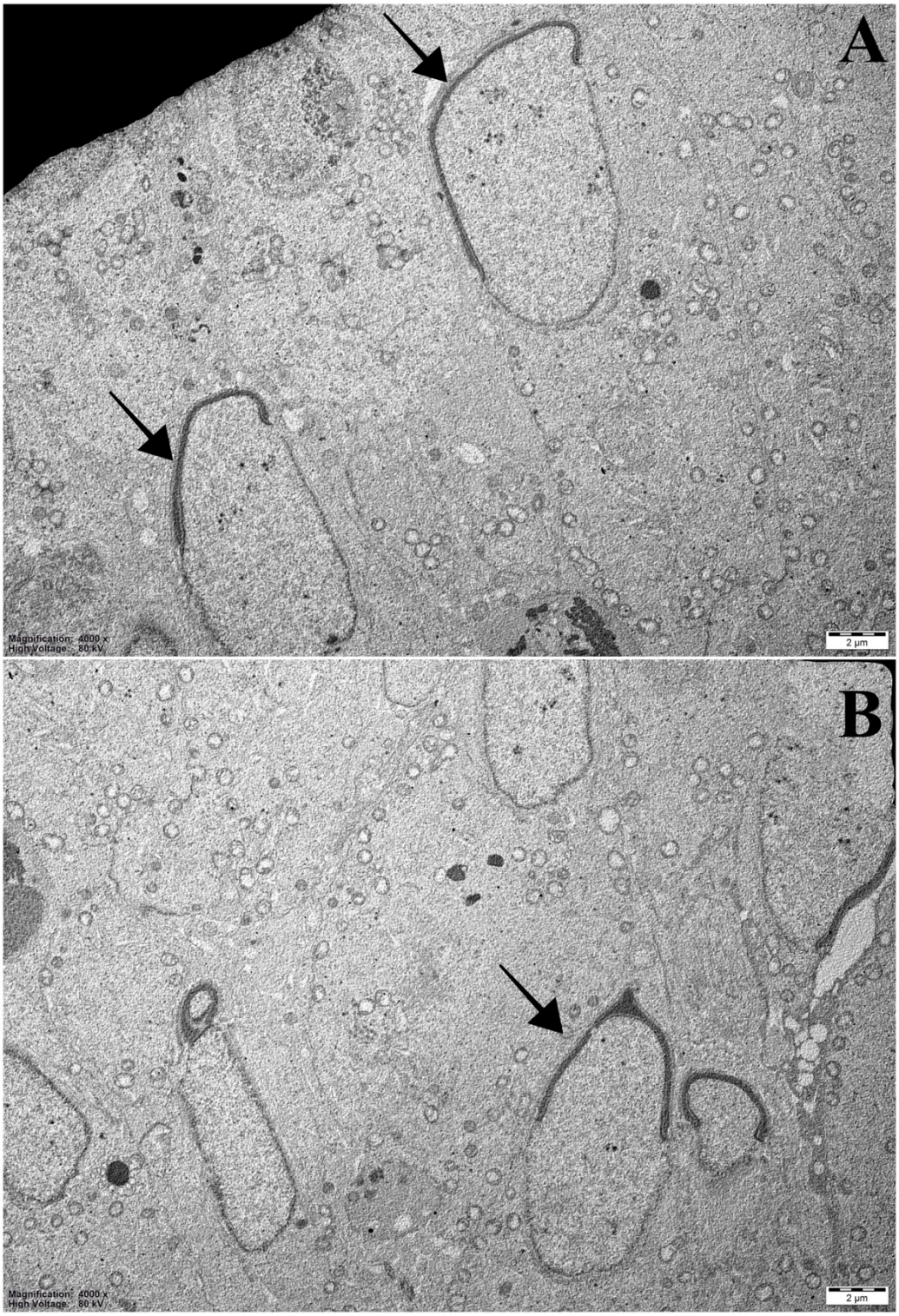
Şekil 4.61: Kontrol ve C.siliqua gruplarında Leydig hücreleri. Kontrol grubunun interstisyel alanında görülen normal morfolojide Leydig hücresi (ok) ve damar yapısı (asteriks) görülmektedir (A). C. siliqua grubuna ait görüntüde kontrol grubu ile benzer morfolojiye sahip Leydig hücreleri izlenmektedir (B). Büyütmeler A:3000X B:4000X



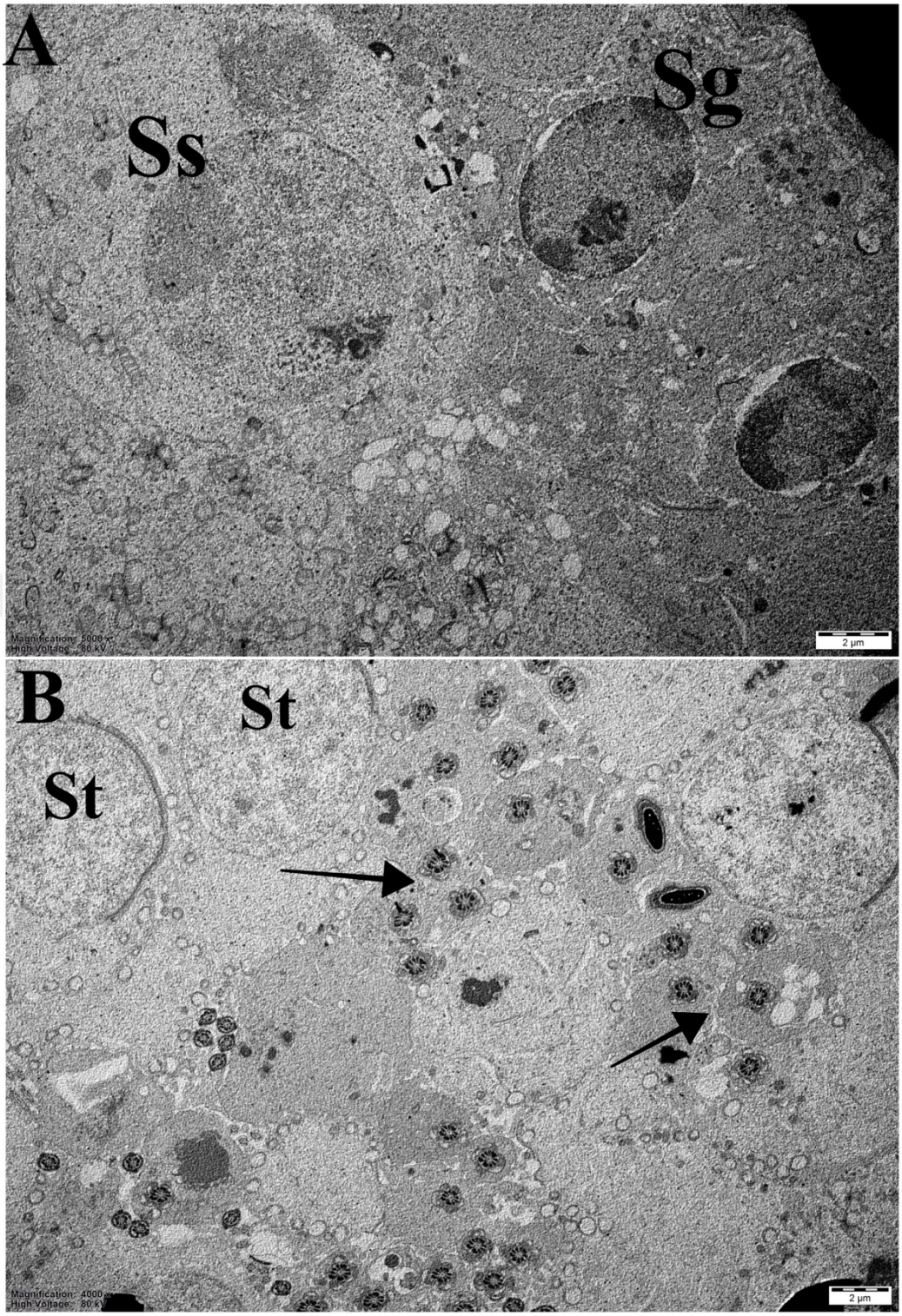
Şekil 4.62: C.siliqua grubunda spermatogenik seri hücreleri. Spermatogonyumlar (Sg), spermatositler (Ss) ve sperm başları (dikdörtgen) izlenmektedir. Büyütme:4000X



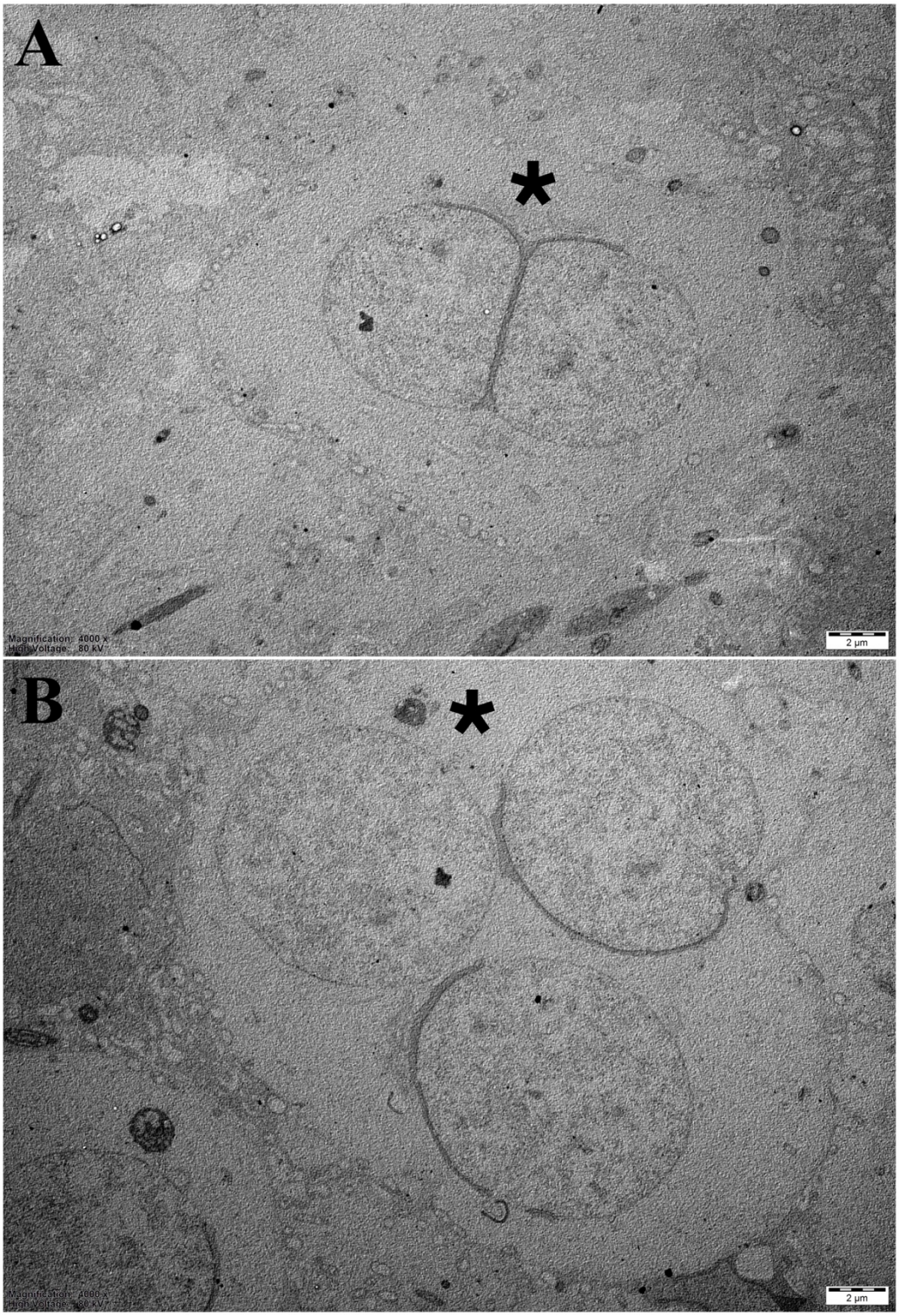
Şekil 4.63: C.siliqua grubunda elonge spermatid ve lümene bırakılan spermatozoa. Çekirdek etrafında akrozom yapısının oluşmakta olduğu elonge spermatidler (ok) ve Sertoli hücresine ait mitokondri izlenmektedir (A). Seminifer tübül lümenine bırakılan spermatozoa görülmektedir (B). Büyütme A:7500X B:4000X



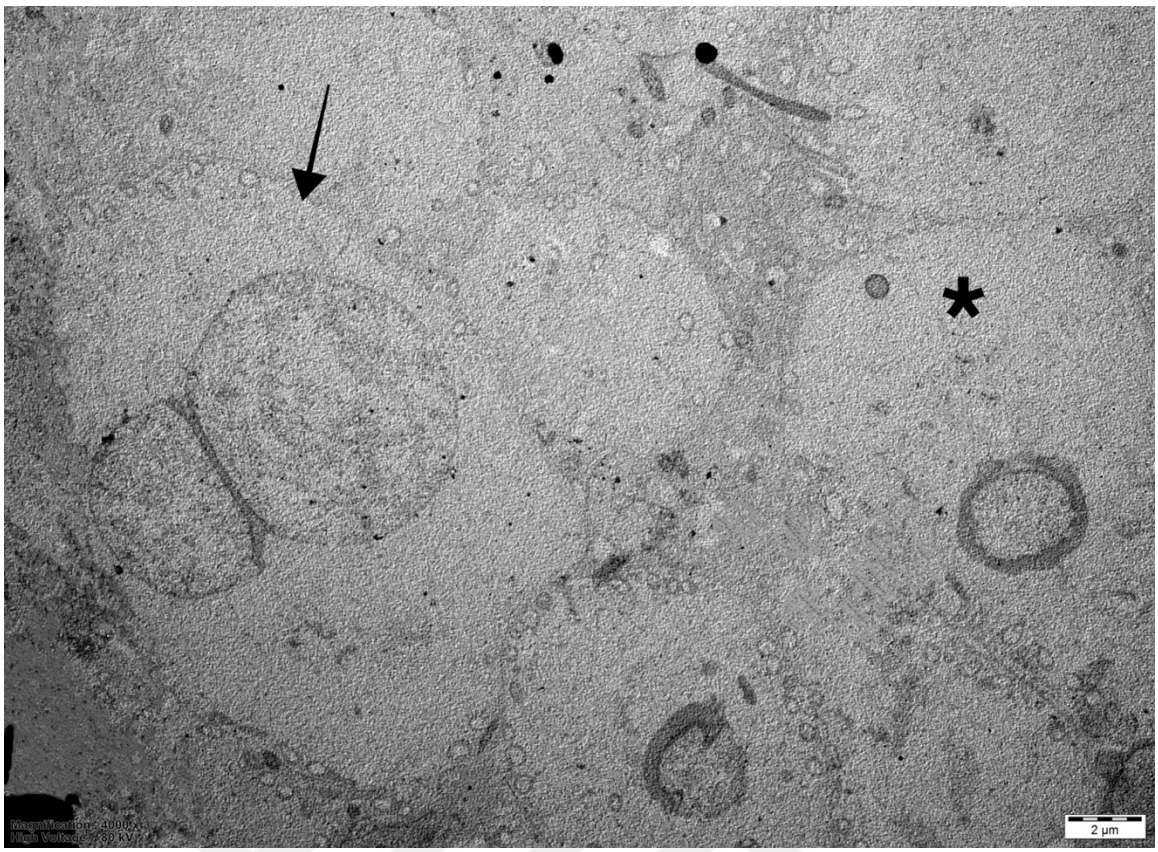
Şekil 4.64: C.siliqua grubunda kep fazı. Çekirdeğin etrafında akrozomun birikmeye başladığı kep fazına giren spermatidler izlenmektedir (ok) Büyütme:4000X



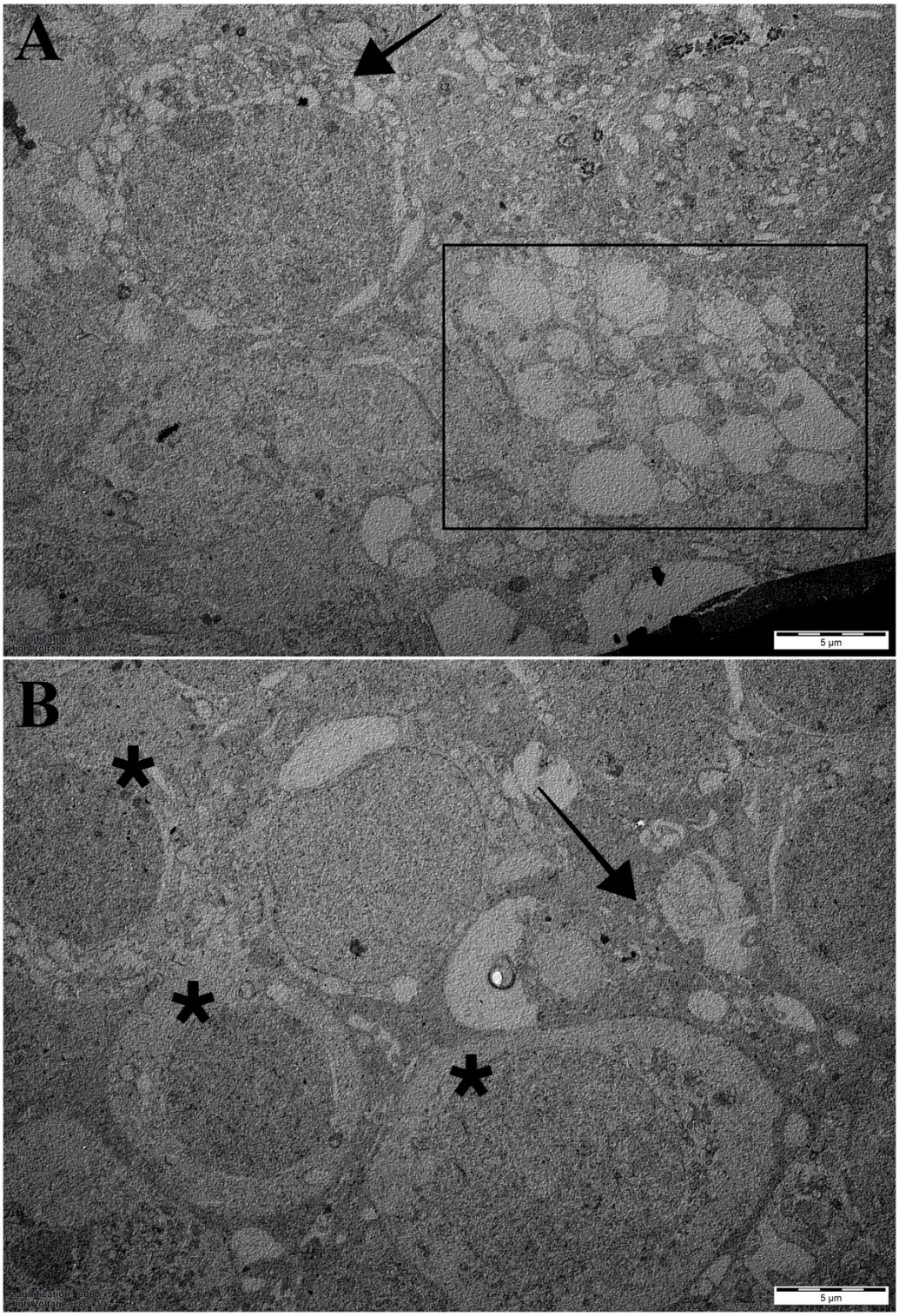
Şekil 4.65: C. siliqua grubunda spermatogenik seri hücreleri ve gelişmekte olan sperm. Spermatogonyum (Sg) ve spermatosit (Ss) hücreleri izlenmektedir (A). Sperm boynunda mitokondri (ok) ve kep fazına girmiş spermatidler (St) görülmektedir (B). Büyütmeler A:5000X B: 4000X



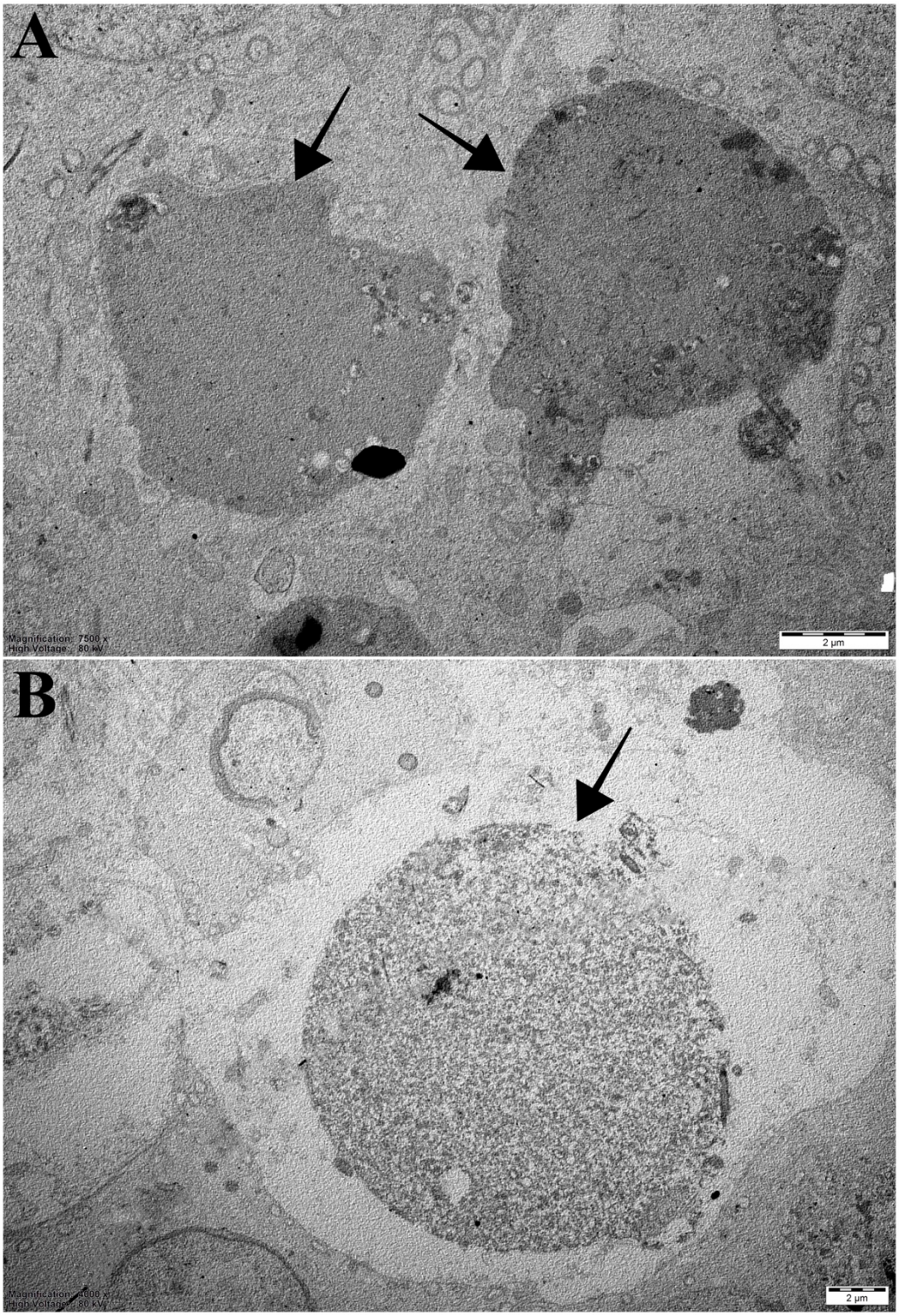
Şekil 4.66: İ/R grubunda dev hücrelerin TEM görüntüsü. Multinükleer dev hücrelerle özellik kazanan hasar izlenmektedir (asteriks). Kep fazına benzer çekirdek etrafında akrozomal granül birikimi görülmektedir (B). Büyütme: 4000X



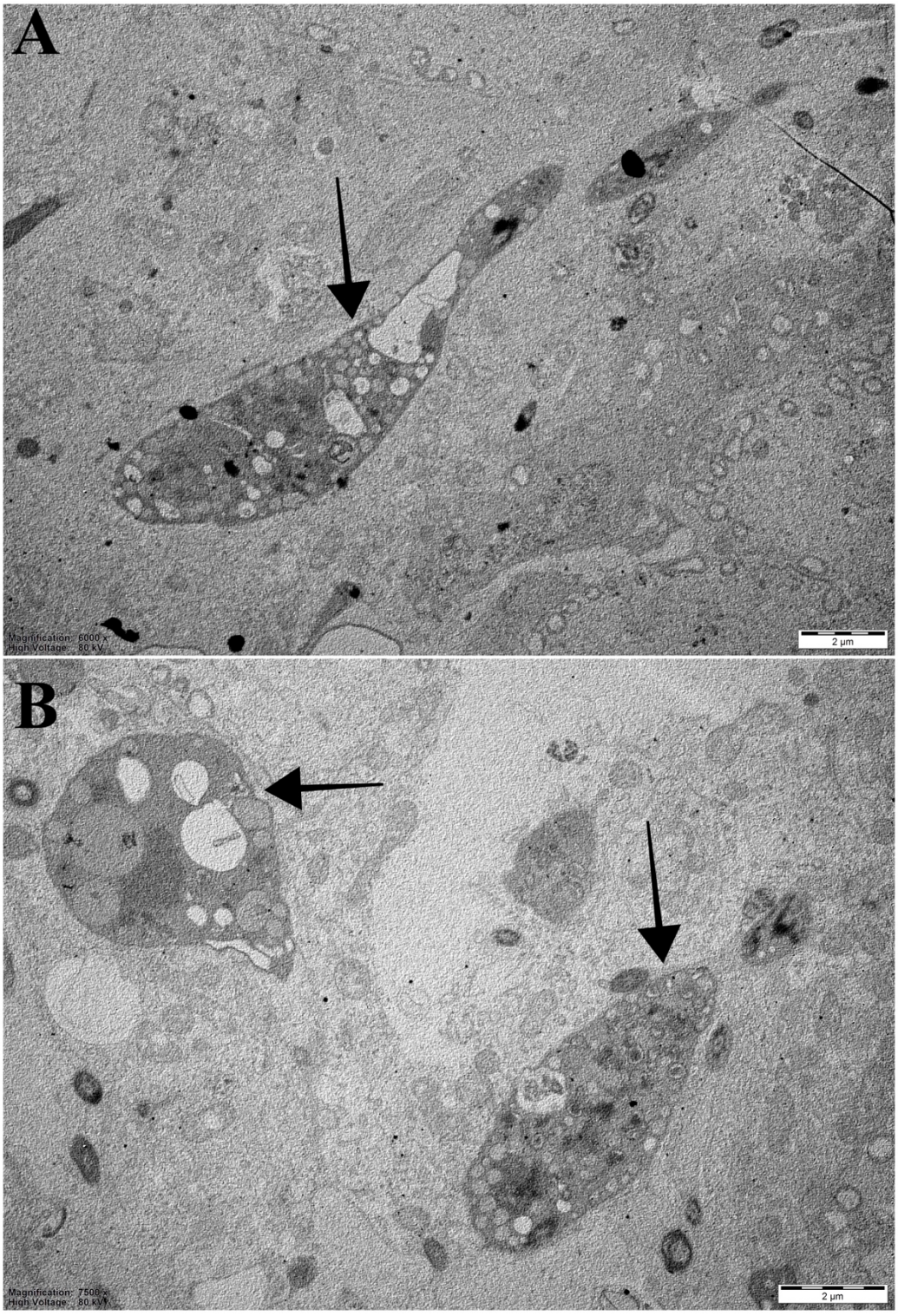
Şekil 4.67: İ/R grubunda dev hücre ve ödemli hücre. İki çekirdekli dev hücre (ok) ve ödemli büyük hücre (asteriks) izlenmektedir. Büyütme: 4000X



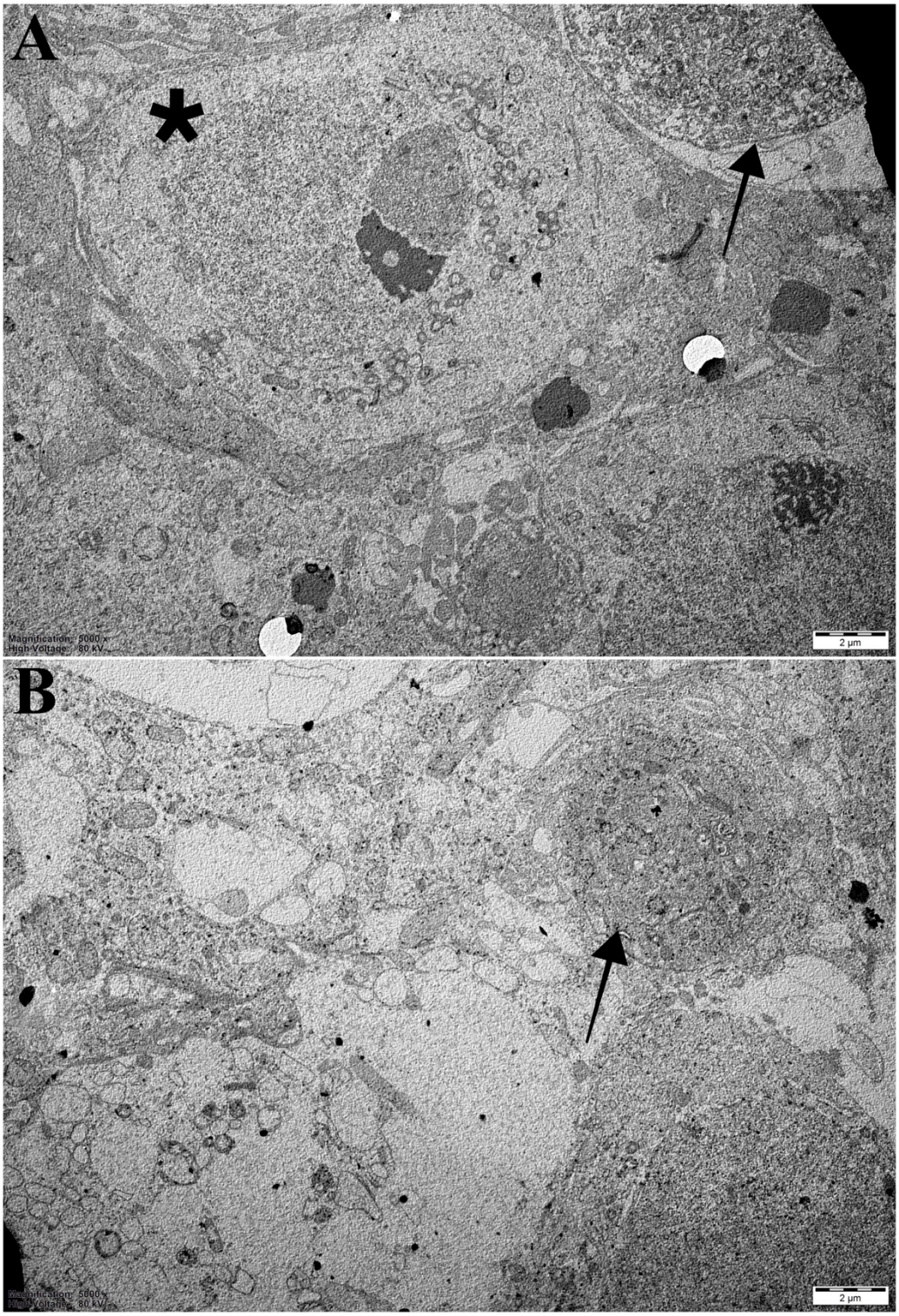
Şekil 4.68: Sertoli hücresinde vakuol ve ödemli hücreler. Apoptotik hücre (ok) ve Sertoli hücresinde vakuolize görünüm (dikdörtgen) izlenmektedir (A). Spermatogenik seri hücrelerde ödem (asteriks) ve hücreler arası ödem (siyah ok) görülmektedir (B). Büyütme: 3000X



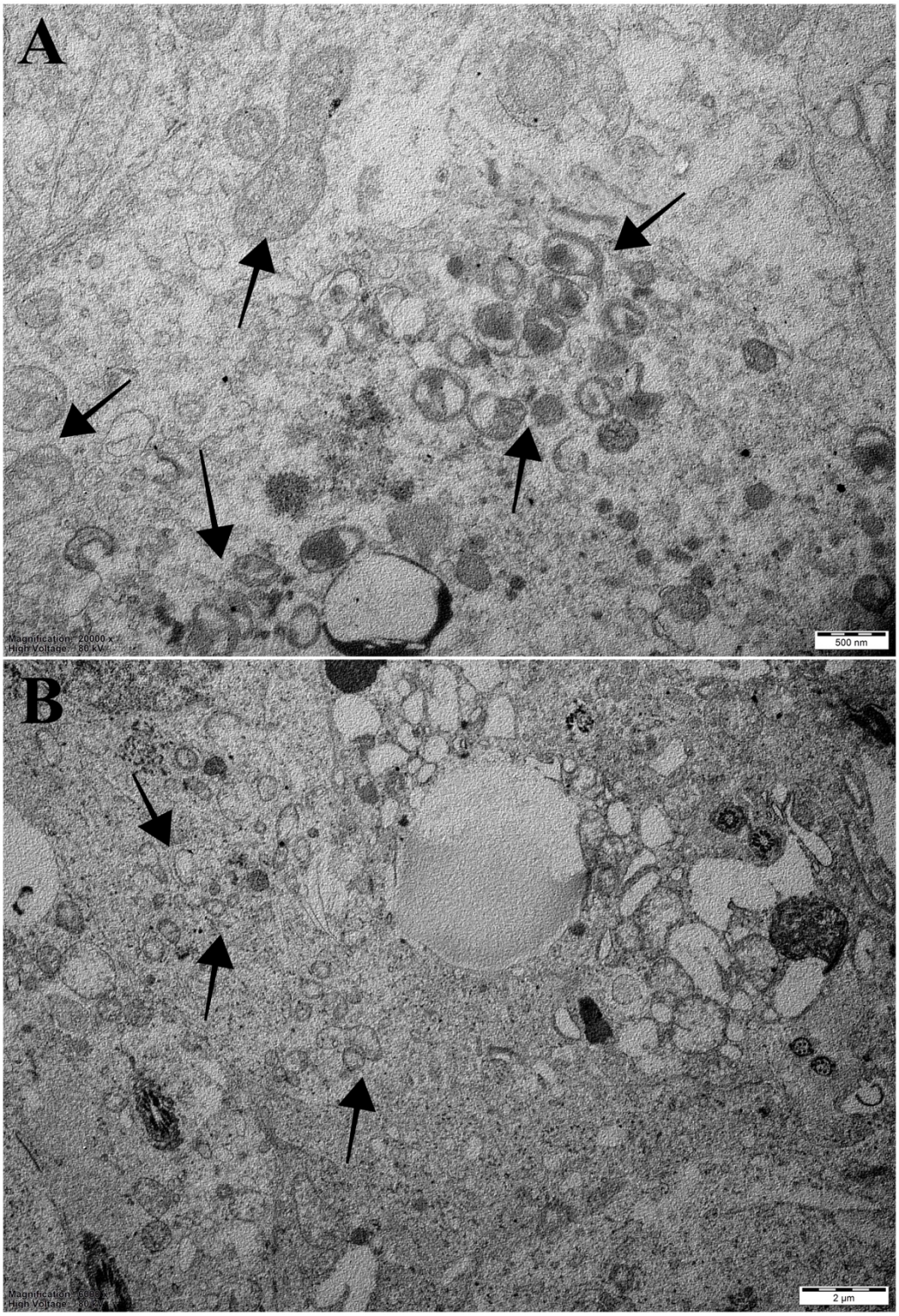
Şekil 4.69: İ/R grubunda apoptoz. Apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir. Apoptotik bleblerin oluşmaya başladığı görülmektedir (A). Kromatoliz (ok) ve ödem izlenmektedir (B). Büyütme A:7500X B: 4000X



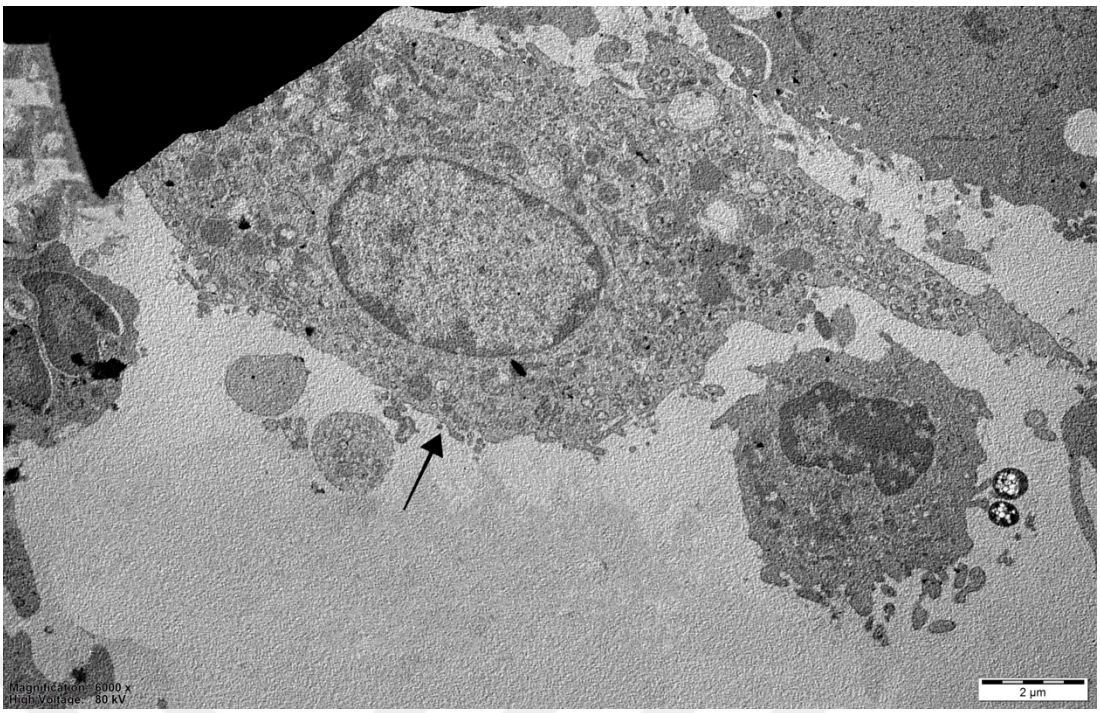
Şekil 4.70: İ/R grubunda vakuolizasyon. Kromatini düzgün kondanse olmamış, vakuolize sperm hücresi izlenmektedir (A). Vakuolize sitoplazmalı, hasarlı hücreler görülmektedir (B). Büyütme: A:6000X B:7500X



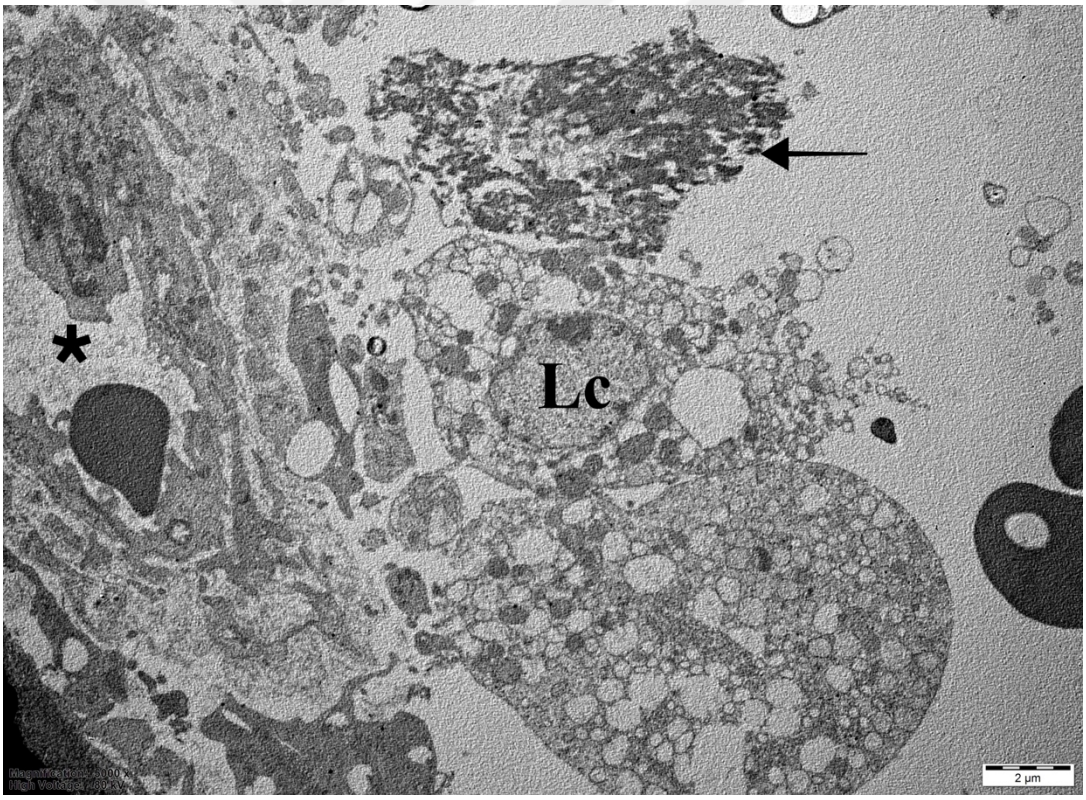
Şekil 4.71: İ/R grubunun TEM görüntüsü. Kromatin kondansasyonu hasarlı hücreler (asteriks), apoptotik hücreler (siyah ok) izlenmektedir (A): Hücrelerin sitoplazmasında ödem görünümü ve apoptotik hücreler (ok) yaygın izlenmektedir (B). Büyütme:5000X



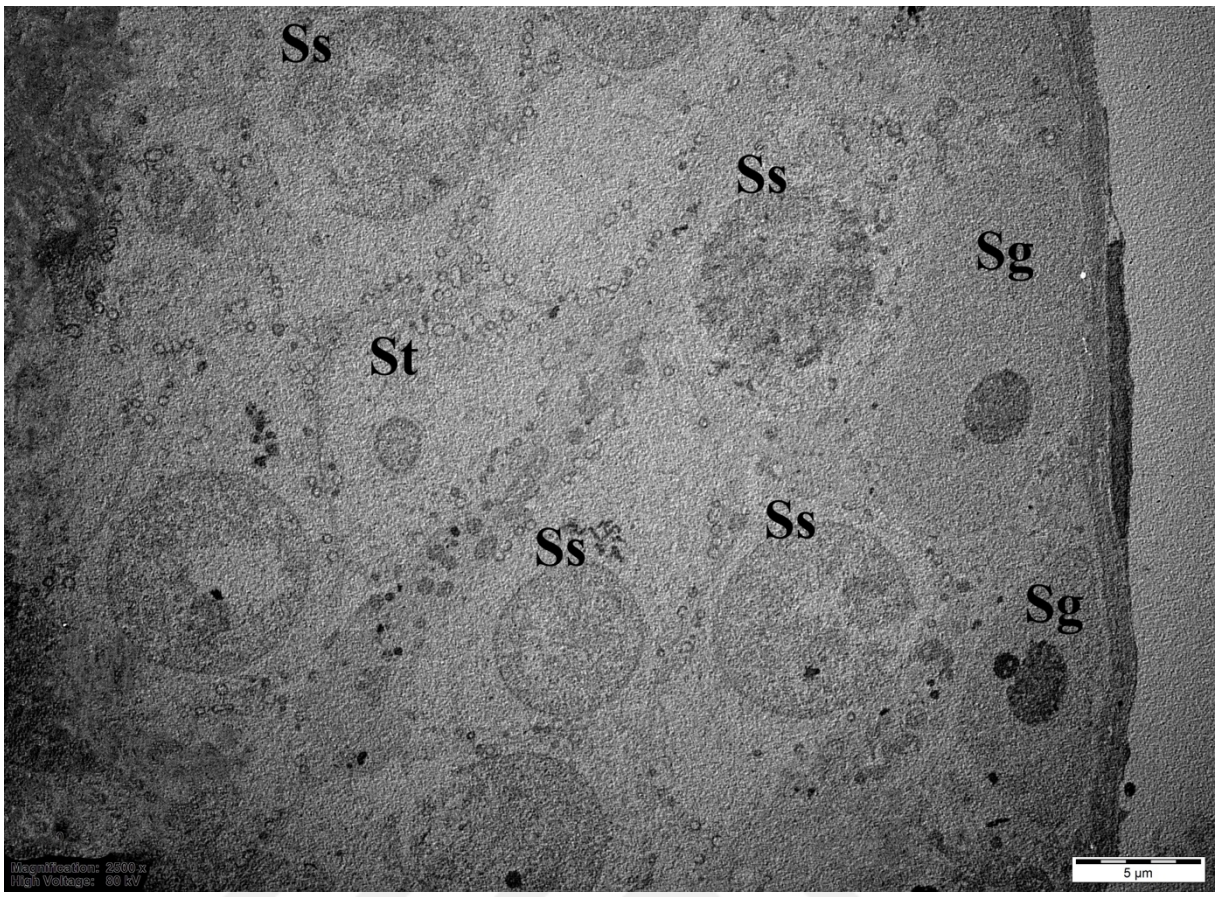
Şekil 4.72: İ/R grubunda mitokondri TEM görüntüsü. Mitokondri kristalarında silinme oluşan Sertoli hücreleri izlenmektedir (ok) Büyütme A:20000X B:6000X



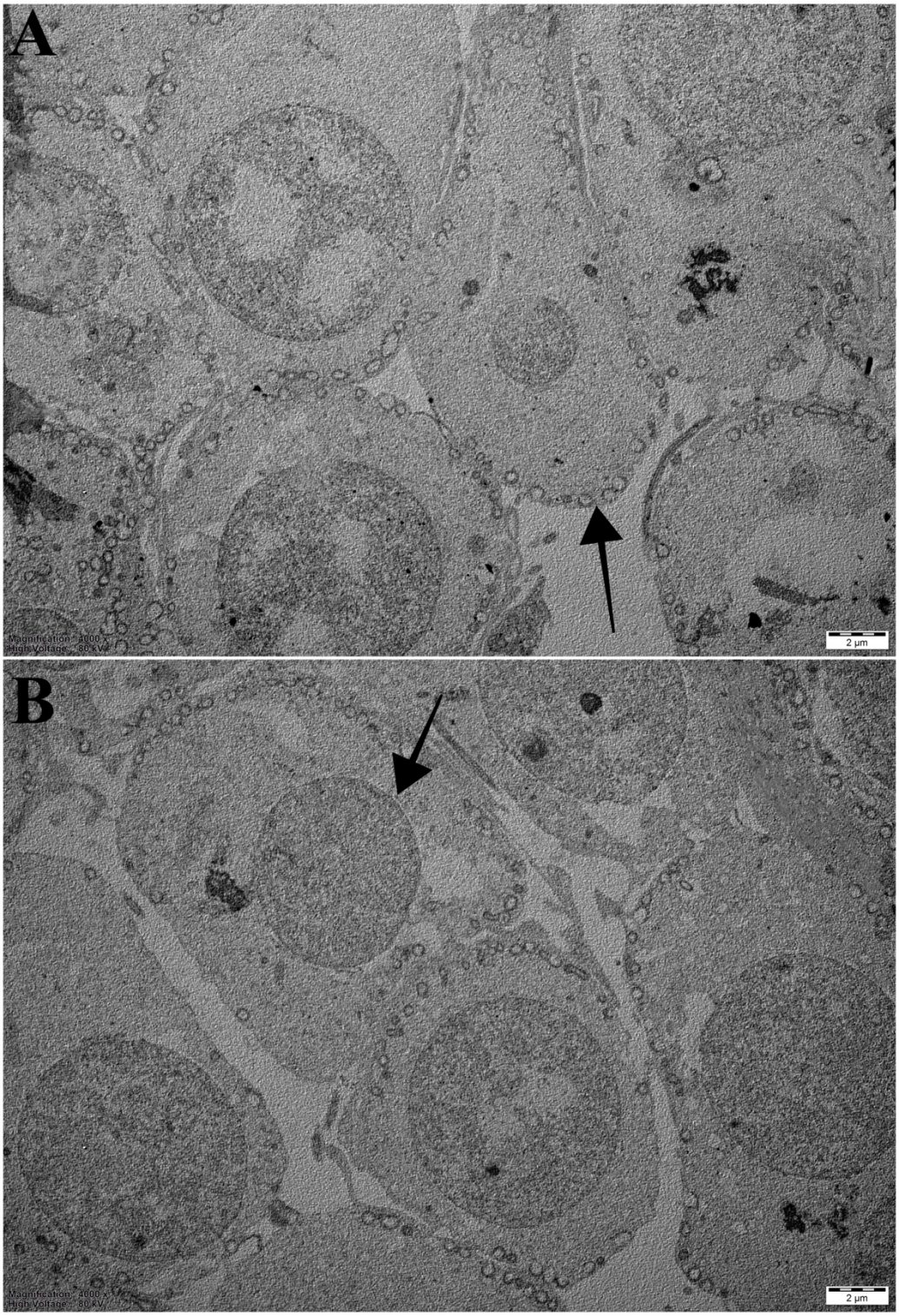
Şekil 4.73: İ/R grubunda makrofaj. İnterstisyal alanda makrofaj (ok) izlenmektedir. Büyütme: 6000X



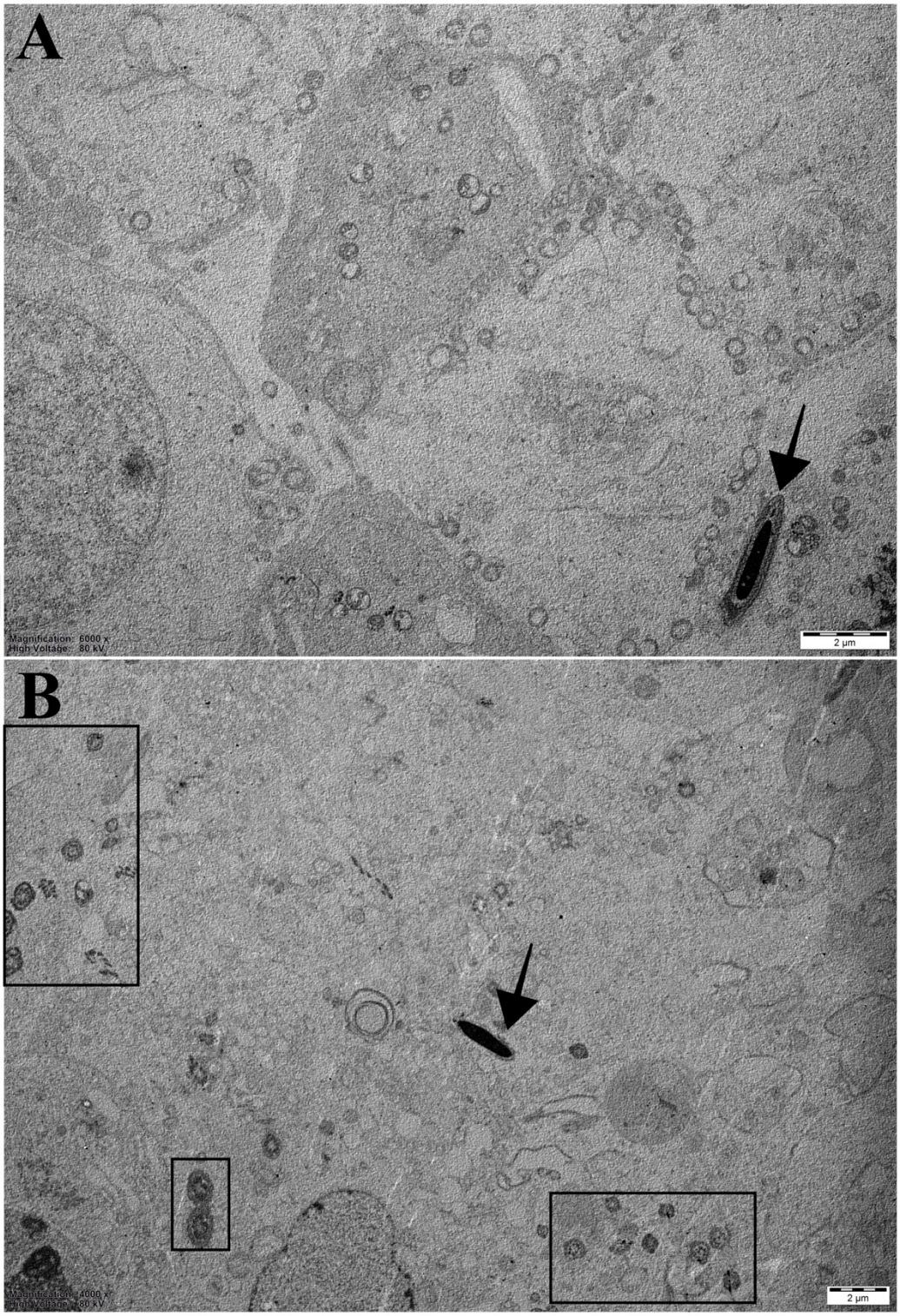
Şekil 4.74: İ/R grubunda Leydig hücresi TEM görüntüsü. Vakuolize Leydig hücresi (Lc) ve interstisyel alanda fibrin yapısı (ok) izlenmektedir. Büyütme:5000X



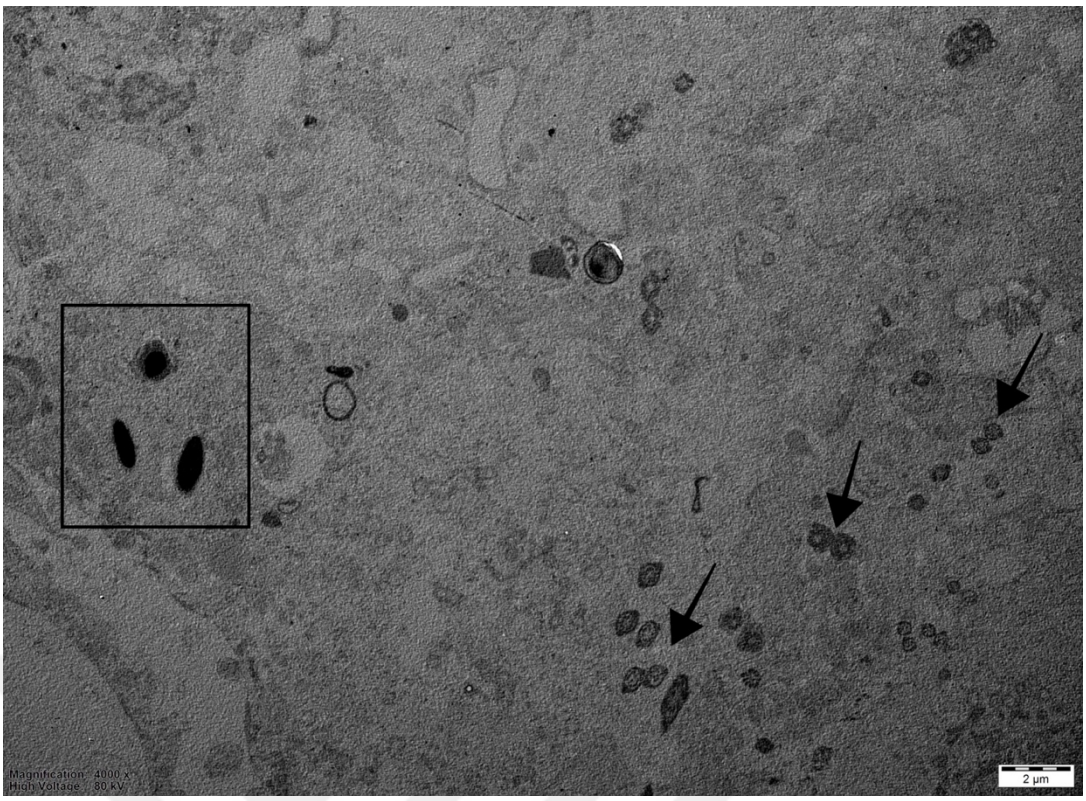
Şekil 4.75: İ/R+C.siliqua grubunda spermatogenik seri hücreleri. Kontrol grubuna benzer yapı özelliklerine sahip spermatogonyumlar (Sg), spermatositler (Ss) ve spermatidler (St) izlenmektedir. Büyütme:2500X



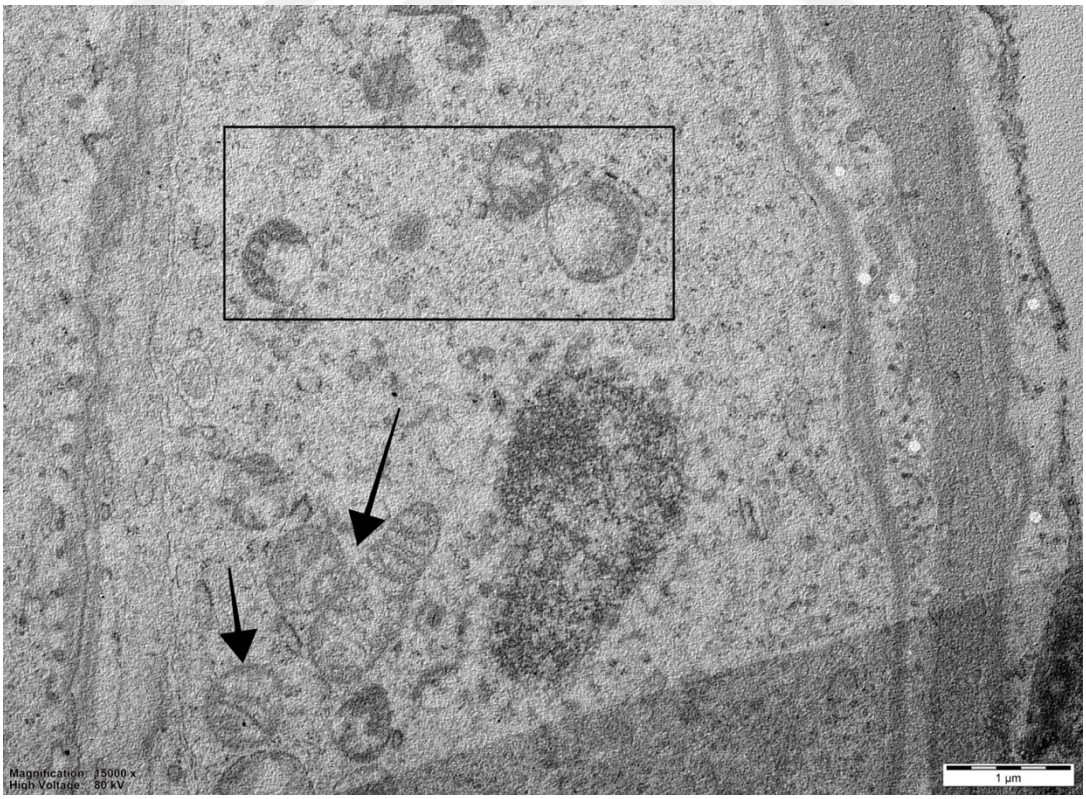
Şekil 4.76: İ/R+C.siliqua grubunda spermatidlerin TEM görüntüsü. Elonge spermatid (ok) görülmektedir (A). Spermatid çekirdeklerinin etrafında akrozom (ok) oluşmaya başlamıştır (B). Büyütme: 4000X



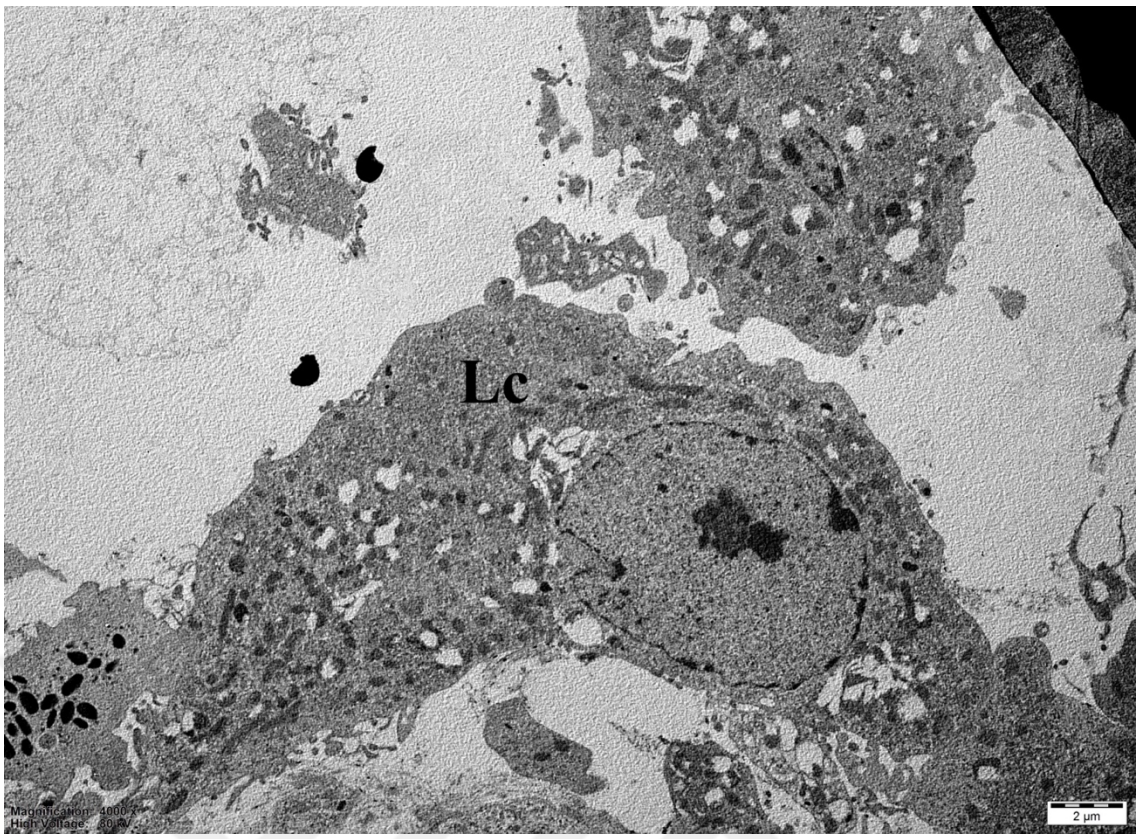
Şekil 4.77: İ/R+C.siliqua grubunda spermlerin TEM görüntüsü. Sperm kuyrukları oluşmaya başlamıştır (dikdörtgen) ve sperm başları izlenmektedir (ok). Büyütmeler A:6000X B:4000X



Şekil 4.78: İ/R+C.siliqua grubunda sperm baş ve kuyruk yapıları. Sperm başları (dikdörtgen) ve sperm kuyrukları (ok) izlenmektedir. Büyütme: 4000X



Şekil 4.79: İ/R+C.siliqua grubuna ait mitokondri TEM görüntüsü. Mitokondri kristası seçilmektedir (ok). Yer yer kristada silinmeler izlenen hasarlı mitokondri de bulunmaktadır (dikdörtgen). Büyütme:15000X



Şekil 4.80: İ/R+C.siliqua grubuna ait Leydig hücrelerinin TEM görüntüsü. Normal morfolojiye sahip Leydig hücresi (Lc) izlenmektedir. Büyütme:4000X

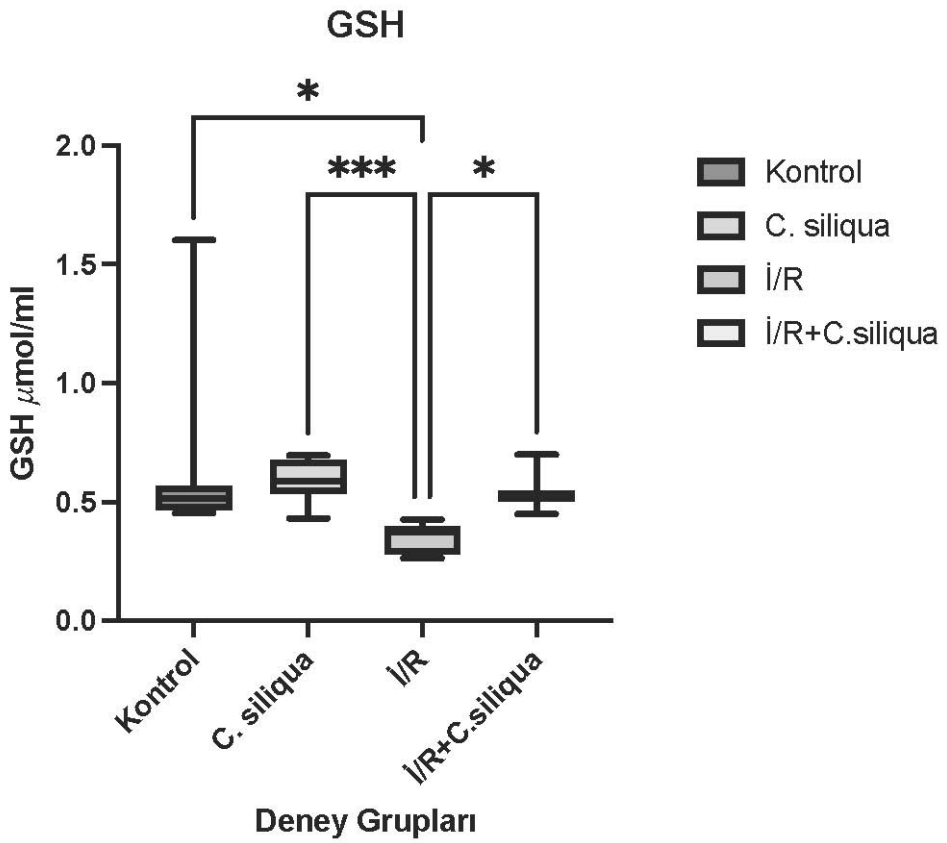
4.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.4.1. GSH

Gruplara göre GSH seviyelerinin ortalama değerleri±SD, medyan değerleri ve maksimum-minimum GSH seviyeleri tabloda verilmiştir (Tablo 4.1). Normal dağılım göstermeyen veriler nonparametrik test kullanılarak analiz edildi. GSH düzeyleri hasar grubunda kontrol (p=0.0281) ve C.siliqua gruplarına (p=0.0007) kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu. İ/R+C.siliqua grubunda testis GSH seviyeleri İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksektir (p=0.0254). İ/R+C.siliqua ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamaktadır (p>0.99).

Tablo 4.1: GSH seviyeleri

GRUPLAR	Ortalama±SD	Median	Maks-Min Değerler
Grup 1: Kontrol	0.66±0.40	0.51	1.60-0.45
Grup 2: C. siliqua	0.60±0.09	0.59	0.70-0.43
Grup 3: İ/R	0.34±0.07	0.37	0.43-0.26
Grup 4: İ/R+C.siliqua	0.54±0.08	0.52	0.70-0.45



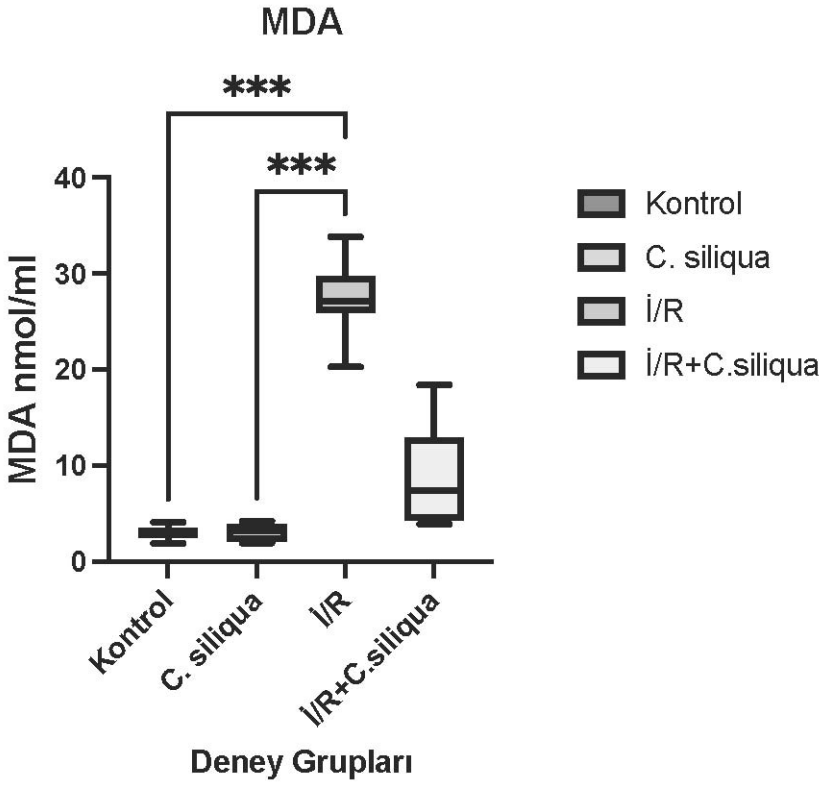
Şekil 4.81: Gruplar arası GSH seviyelerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) ve (***) olarak gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak verilmiştir. (*: p<0.05; ***: p<0.001)

4.4.2. MDA

Gruplara göre MDA seviyelerinin ortalama değerleri±SD, medyan değerleri ve maksimum-minimum MDA seviyeleri tabloda verilmiştir (Tablo 4.2). Normal dağılım göstermeyen veriler nonparametrik test kullanılarak analiz edildi. MDA düzeyleri İ/R grubunda kontrol (p=0.0004) ve C.siliqua gruplarına (p=0.0006) kıyasla anlamlı olarak yüksektir. İ/R+C.siliqua grubunda testis MDA seviyeleri İ/R grubuna kıyasla anlamlı olma eğilimindeydi (p=0.0585). İ/R+C.siliqua ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamaktadır (p=0.1159).

Tablo 4.2: MDA seviyeleri

GRUPLAR	Ortalama±SD	Median	Maks-Min Değerler
Grup 1: Kontrol	3.16±0.71	3.29	4.15-1.94
Grup 2: C. siliqua	3.21±0.88	3.25	4.27-1.98
Grup 3: İ/R	27.19±4.11	27.18	33.87-20.32
Grup 4: İ/R+C.siliqua	8.91±5.41	7.40	18.45-3.94



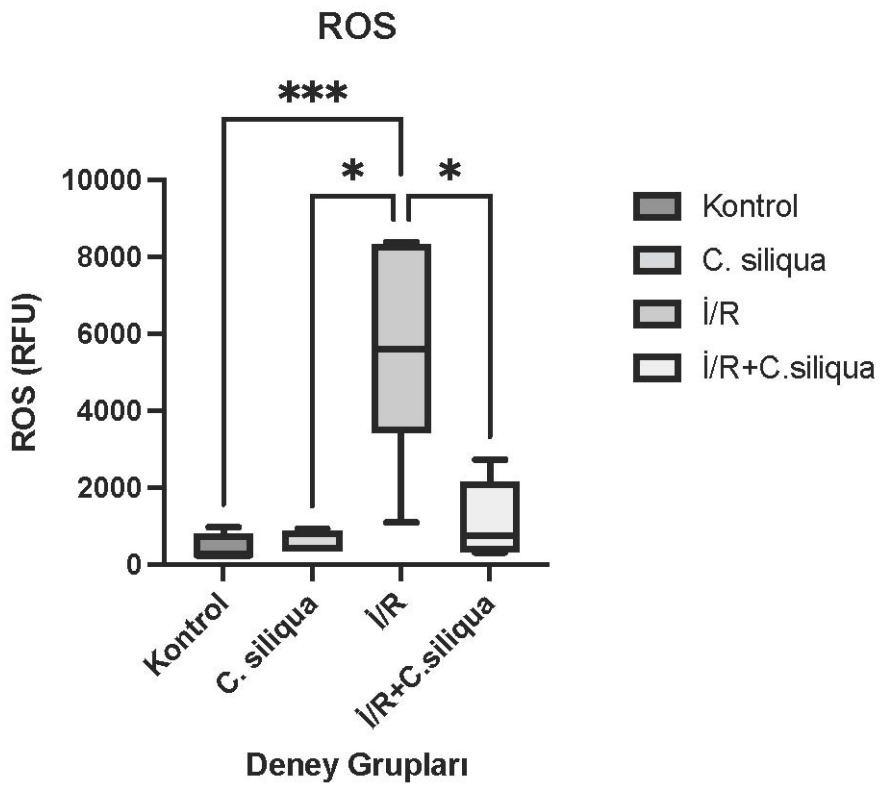
Şekil 4.82: Gruplar arası MDA seviyelerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık düzeyi (***) olarak gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak verilmiştir. (*: p<0.001)**

4.4.3. ROS

Gruplara göre ROS seviyelerinin ortalama değerleri±SD, medyan değerleri ve maksimum-minimum ROS değerleri tabloda verilmiştir (Tablo 4.3). Kolmogorov-Smirnov testi ile verilerin dağılımı değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen veriler nonparametrik test kullanılarak analiz edildi. ROS seviyeleri İ/R grubunda kontrol (p=0.001) ve C.siliqua gruplarına (p=0.0255) kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. İ/R+C.siliqua grubunda testis ROS seviyeleri İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak düşüktür (p=0.0463). İ/R+C.siliqua ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamaktadır (p>0.99).

Tablo 4.3: ROS seviyeleri

GRUPLAR	Ortalama±SD	Median	Maks-Min Değerler
Grup 1: Kontrol	454.9±318.3	232.5	963.5-201.9
Grup 2: C. siliqua	540.4±244.3	430.4	922.3-352.0
Grup 3: İ/R	5404±2606	5597	8376-1085
Grup 4: İ/R+C.siliqua	1061±974.8	751.1	2723-301.6



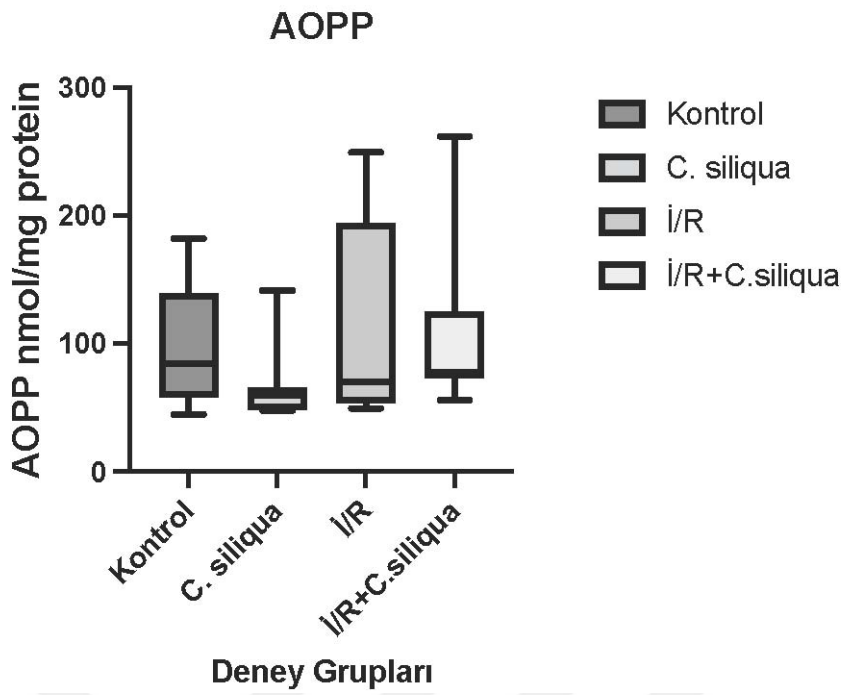
Şekil 4.83: Gruplar arası ROS seviyelerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) ve (***) olarak gösterilmektedir. Değerler medyan ve IQR olarak verilmiştir. (*: p<0.05; ***: p<0.001)

4.4.4. AOPP

Gruplara göre AOPP seviyelerinin ortalama değerleri±SD, medyan değerleri ve maksimum-minimum AOPP değerleri tabloda verilmiştir (Tablo 4.4). Normal dağılım göstermeyen veriler nonparametrik test kullanılarak analiz edildi. AOPP seviyeleri arasında gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır (p=0.2966)

Tablo 4.4: AOPP seviyeleri

GRUPLAR	Ortalama±SD	Median	Maks-Min Değerler
Grup 1: Kontrol	99.63±48.61	84.67	182.0-44.77
Grup 2: C. siliqua	68.58±32.86	59.81	141.5-47.87
Grup 3: İ/R	118.1±79.79	70.15	249.4-49.68
Grup 4: İ/R+C.siliqua	107.0±71.55	77.59	262.0-56.05



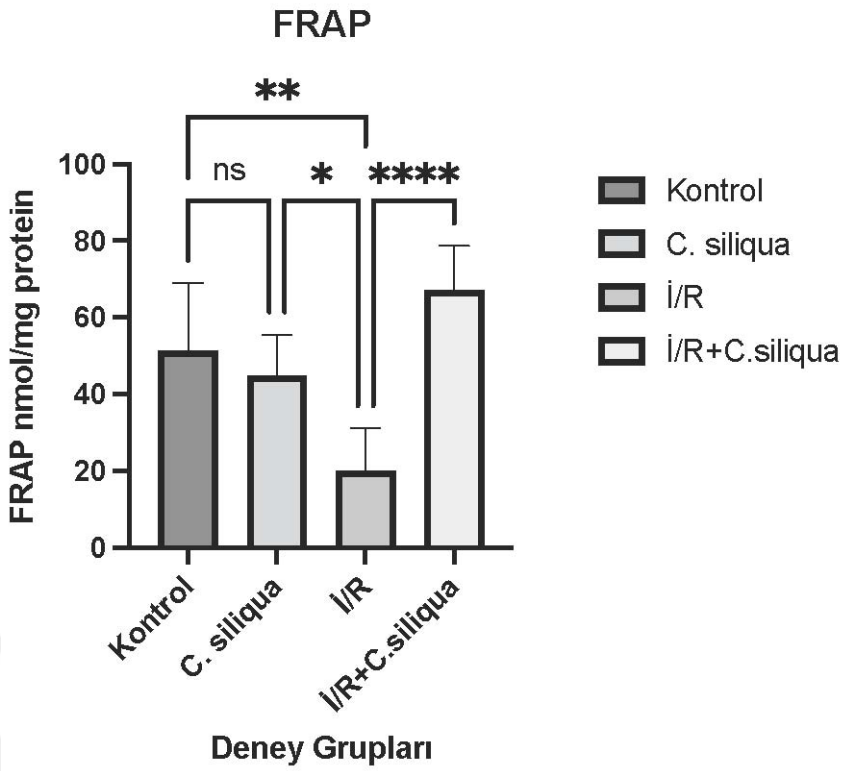
Şekil 4.84: Gruplar arası AOPP seviyelerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık saptanmamıştır. Değerler medyan ve IQR olarak verilmiştir.

4.4.5. FRAP

Gruplara göre FRAP seviyelerinin ortalama değerleri±SD, medyan değerleri ve maksimum-minimum FRAP seviyeleri tabloda verilmiştir (Tablo 4.5). Veriler normal dağıldığı için parametrik test kullanıldı. FRAP düzeyleri İ/R grubunda kontrol (p=0.0025) ve C.siliqua gruplarına (p=0.0179) kıyasla anlamlı olarak düşüktür. İ/R+C.siliqua grubunda testis FRAP seviyeleri İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.0001). İ/R+C.siliqua ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamaktadır (p=0.1912).

Tablo 4.5: FRAP seviyeleri

GRUPLAR	Ortalama±SD	Median	Maks-Min Değerler
Grup 1: Kontrol	51.49±17.59	49.98	75.19-23.48
Grup 2: C. siliqua	44.80±10.78	48.90	52.93-25.11
Grup 3: İ/R	20.04±11.21	21.74	30.86-5.68
Grup 4: İ/R+C.siliqua	67.24±11.47	66.05	85.11-51.08



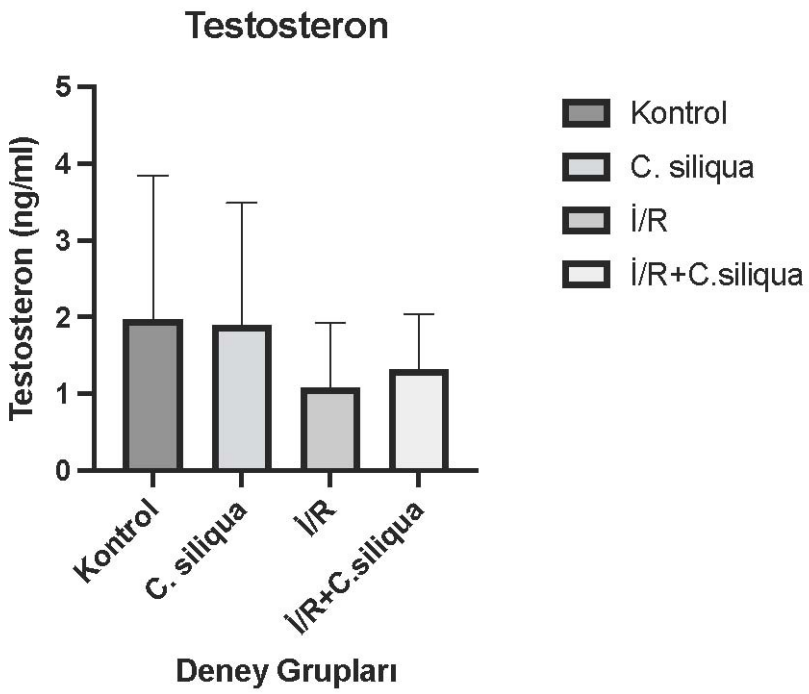
Şekil 4.85: Gruplar arası FRAP seviyelerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık düzeyi (*), (**) ve (***) olarak gösterilmektedir. Değerler ortalama ve SD olarak verilmiştir. (*: p<0.05; **:p<0.01; ***: p<0.001)

4.4.6. Testosteron

Gruplara göre testosteron seviyelerinin ortalama değerleri±SD, medyan değerleri ve maksimum-minimum testosteron değerleri tabloda verilmiştir (Tablo 4.6). Veriler normal dağıldığı için parametrik test kullanıldı. Gruplar arsında serum testosteron seviyeleri açısından anlamlı fark bulunmamaktadır (p=0.5474).

Tablo 4.6: Serum testosteron seviyeleri

GRUPLAR	Ortalama±SD	Median	Maks-Min Değerler
Grup 1: Kontrol	1.97±1.88	1.69	4.98-0.008
Grup 2: C. siliqua	1.89±1.60	1.23	5.25-0.72
Grup 3: İ/R	1.08±0.85	0.90	2.82-0.26
Grup 4: İ/R+C.siliqua	1.32±0.27	1.19	2.60-0.51



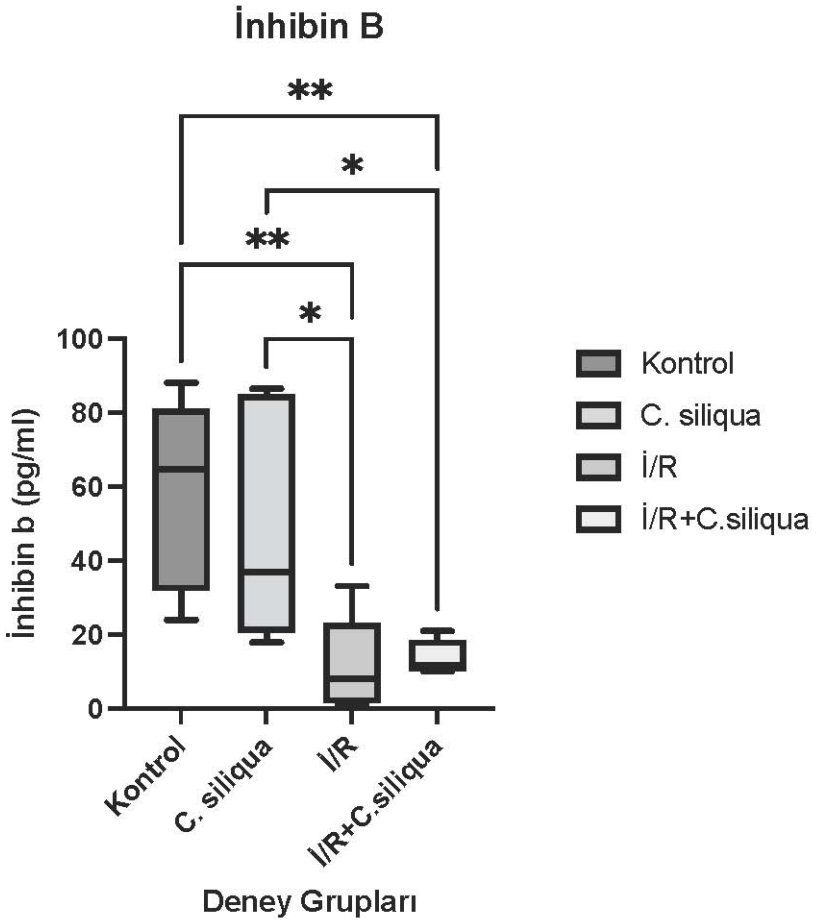
Şekil 4.86: Gruplar arası serum testosteron düzeylerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık saptanmamıştır. Değerler ortalama ve SD olarak verilmiştir.

4.4.7. İnhibin-B

Gruplara göre İnhibin-B seviyelerinin ortalama değerleri±SD, medyan değerleri ve maksimum-minimum İnhibin-B seviyeleri tabloda verilmiştir (Tablo 4.7). Normal dağılım göstermeyen veriler nonparametrik test kullanılarak analiz edildi. İnhibin-B düzeyleri İ/R grubunda kontrol (p=0.0018) ve C.siliqua gruplarına (p=0.0114) kıyasla anlamlı olarak düşüktür. İ/R+C.siliqua grubunda serum İnhibin-B seviyeleri açısından İ/R grubuyla anlamlı fark bulunmamıştır (p=0.8288). İ/R+C.siliqua ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmaktadır (p=0.0026).

Tablo 4.7: Serum İnhibin-B seviyeleri

GRUPLAR	Ortalama±SD	Median	Maks-Min Değerler
Grup 1: Kontrol	56.85±24.73	64.75	88.04-23.95
Grup 2: C. siliqua	47.12±28.65	36.91	86.47-17.85
Grup 3: İ/R	11.63±12.10	8.16	33.12-1.02
Grup 4: İ/R+C.siliqua	13.97±4.53	11.83	20.97-10.01



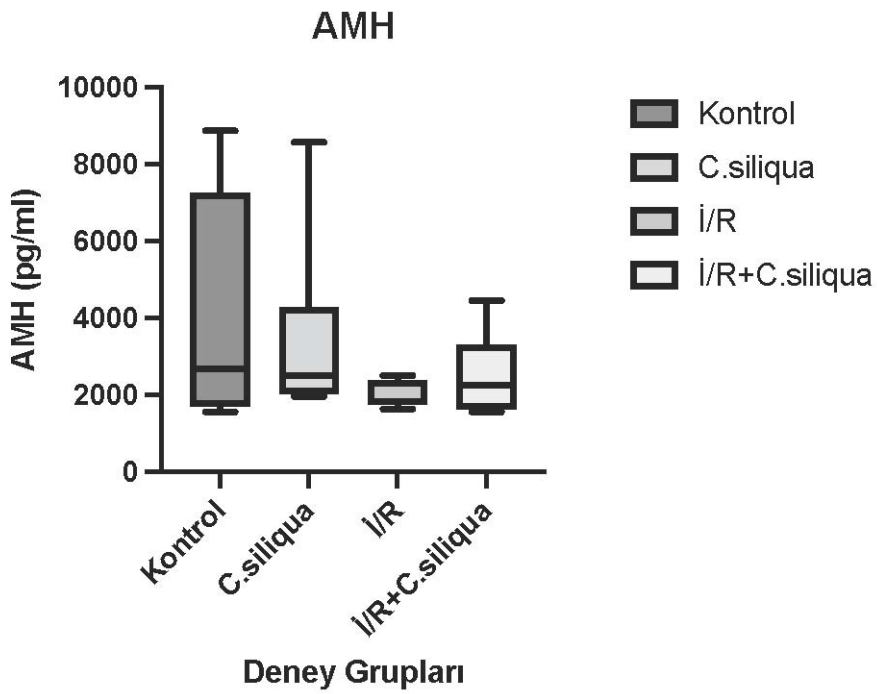
Şekil 4.87: Gruplar arası serum İnhibin-B düzeylerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık düzeyi (*) ve (**) olarak gösterilmektedir. Değerler ortalama ve SD olarak verilmiştir. (*: p<0.05; **: p<0.01)

4.4.8. AMH

Gruplara göre AMH seviyelerinin ortalama değerleri±SD, medyan değerleri ve maksimum-minimum AMH değerleri tabloda verilmiştir (Tablo 4.6). Normal dağılım göstermeyen veriler nonparametrik test kullanılarak analiz edildi. Gruplar arasında serum AMH seviyeleri açısından anlamlı fark bulunmamaktadır (p=0.3577).

Tablo 4.8: Serum AMH seviyeleri

GRUPLAR	Ortalama±SD	Median	Maks-Min Değerler
Grup 1: Kontrol	4040±3068	2669	8873-1564
Grup 2: C. siliqua	3476±2384	2513	8572-1966
Grup 3: İ/R	2015±337,6	1825	2504-1638
Grup 4: İ/R+C.siliqua	2513±1092	2254	4452-1561



Şekil 4.88: Gruplar arası serum AMH düzeylerinin karşılaştırılması. Anlamlı farklılık saptanmamıştır. Değerler medyan ve IQR olarak verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Testis torsiyonu cerrahi müdahale gerektiren ürolojik bir acildir ve operasyona rağmen testis kaybıyla ve infertilite ile sonuçlanabilmektedir. Hayvan çalışmalarıyla testiküler iskemi-reperfüzyon hasarını önlemek için çeşitli farmakolojik ajanların etkileri değerlendirilmektedir (68). Bu tez çalışmasında, deneysel testis torsiyonu modelinde cerrahi müdahaleye ek olarak destek tedavi olarak kullanılan *C. siliqua*'nın, iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri histopatolojik ve ultrastrüktürel olarak değerlendirdi. Gruplar arasında antioksidan enzimlerin ve hormonal parametrelerin seviyeleri de karşılaştırıldı. Reperfüzyon sonrası testiste hasar meydana geldiği, apoptozun ve oksidatif stresin arttığı, testiste inflamatuar yanıtın oluştuğu görüldü. Sonuç olarak, *C. siliqua* tedavisi ile hasarda azalma izlenmiş; apoptoz ve oksidatif stres biyobelirteçlerinin bir kısmında azalma görülmüş, inflamatuar yanıt hafiflemiş ve bu sonuçlar ince yapısal bulgularla desteklenmiştir.

C. siliqua flavonoidler, polifenoller ve steroller açısından zengin; antioksidan, antibakteriyel, antitümoral etkileri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuş bir bitkidir. Farmakolojik olarak polifenollerin antioksidan aktivitesi gösterilmiş; flavonoidlerin de antioksidan, antibakteriyel ve analjezik etkileri olduğu ortaya konmuştur (94, 96). *C. siliqua*'nın farklı hastalık modellerinin incelendiği hayvan çalışmalarında oksidatif stres ve spermatogenez üzerindeki etkileri incelenmiştir (95, 98, 100). Testis torsiyonu üzerine etkisiyle ilgili bir çalışmaya ise literatür araştırmamızda rastlamadık. *C.siliqua* ile benzer içeriğe sahip ajanlarla yapılan çalışmalarda ise olumlu sonuçların elde edildiğini gördük. Polifenol içeriği bilinen *Plantago majör* bitkisinin yapraklarının kullanıldığı bir çalışmada, tedavinin T/D hasarını azalttığı, oksidatif stresi azalttığı görülmüştür (111). Fenolik bir bileşik olan, siringik asitin de T/D modeli uygulanan sıçanlarda histopatolojik hasarı ve apoptozu azalttığı izlenmiştir (112). Kullandığımız *C.siliqua* ekstraktının analizinde içeriğinde olduğu görülen çinko, yapılan bir çalışmada melatonin ile birlikte testis torsiyonu tedavisi için kullanılmış; tedavi ile birlikte oksidatif stresin azaldığı ve inhibin-B seviyelerinin arttığı izlenmiştir (113). Yüksek flavonoid içeriğine sahip Gingko biloba'nın verildiği çalışmada da histopatolojik hasarın ve apoptozun tedavi ile azaldığı, sperm morfolojisinin düzeldiği ortaya konmuştur (114).

Bu tez çalışmasında testiste meydana gelen histopatolojik değişiklikler açısından tedavi grubundaki hücre morfolojisinin daha iyi olduğu görüldü. Hasarlı testislerde dev hücrelere rastlandı. Sertoli hücre iskeletinin bozulması, spermatid veya spermatositlerin dejenerasyonu ile ortaya çıkan hücreler arası köprülerin genişlemesi sonucu oluştuğu düşünülen dev hücrelerin tübüler dejenerasyonun bir parçası olduğu bildirilmiştir (115). Testisin İ/R hasarında dev hücrelerin artışı başka çalışmalarda da gözlenmiştir (116, 117). Hasar skoru değerlendirildiğinde İ/R grubunda skorun düşük olduğu, tedavi ile artış olsa da bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi. Bu durum *C. siliqua* tedavisinin İ/R hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu; ancak bu etkinin tam bir düzelme sağlayamadığını düşündürmüştür.

Gruplar fibrozis açısından değerlendirildiğinde İ/R grubunda fibrozis olduğu izlendi ancak *C.siliqua* tedavisinin fibrozis üzerine olumlu bir etkisi olmadığı görüldü. Çalışma planı yapılırken literatürde uygulanan süreler temel alınmıştır; ancak sürenin fibrozis üzerine etkinin gözlenmesi için kısa olması nedeniyle gruplar arası fark saptanamamış olabilir. T/D sonrası uzun süreli etkinin değerlendirildiği ileriki çalışmalarda bu konu üzerinde durulabilir. Ayrıca Tadalafil ve darbopoetinin T/D modeli üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada semikantitif olarak yapılan fibrozis değerlendirmesinde hasar grubunun skoru anlamlı olarak yüksek; kontrol ve tedavi gruplarının skorları ise anlamlı olarak düşük bulunmuştur (4). Bu tez çalışmasında İ/R hasarının testiste fibrotik hasar oluşturduğu izlenmekle birlikte *C. siliqua* tedavisinin fibrotik değişiklikler üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

T/D modeli ile yapılan çalışmalarda, İ/R hasarının apoptozu arttırdığı bilinmektedir (117-120). Bu tez çalışmasında semikantitatif değerlendirmede kontrol ve İ/R grubu ile İ/R ve İ/R+C.siliqua grubu arasında apoptoz açısından anlamlı farklar saptanmıştır. C.siliqua ile benzer polifenol ve flavonoid içeriği olan ajanlarla yapılan çalışmalarda da hasarla birlikte artan apoptozun tedavi sonrası azaldığı izlenmiştir (112, 114) İnsanlarda ve sıçanlarda germ hücre sayısının korunabilmesi için gelişimin çeşitli aşamalarında apoptoz izlenmektedir. Apoptozun anormal derecede fazla izlenmesi ise bu dengenin bozulmasına ve germ hücre kaybına neden olmaktadır (121). Sonuçlarımız bize, reperfüzyon sonrası artan oksidatif stres ve ROS sebepli olarak germ hücrelerinde apoptozun arttığı ve var olan bu dengenin bozulduğunu düşündürdü. Buna karşın verilen *C.siliqua* tedavisinin temelde oksidatif stresi azaltıcı etkisiyle apoptozu seviyelerini düşürdüğü söylenebilir.

HIF-1α'nın hipoksi ve oksidatif strese adaptasyonda görevli bir transkripsiyon faktörü olduğu, hipoksik koşullarda arttığı ve hücre ölümüyle bağlantılı olduğu

bilinmektedir (108, 122). Çalışmamızda HIF-1α immünohistokimyasal boyamasında gruplar arasında anlamlı farklar saptanmamıştır. Kontrol ve İ/R grubu arasında fark anlamlı olma eğiliminde bulunmuştur (p=0.0621). İ/R grubunda hem seminifer tübüllerde hem de interstisyel alanda boyanma izlenmiştir. İ/R+C.siliqua grubundaki ekspresyon ise İ/R grubundan da kontrol grubundan da anlamlı olarak farklı saptanmamıştır. Literatürde T/D modeli uygulanan hayvanlarda HIF-1α gen ekspresyonunun arttığı, dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü vidagliptin tedavisi ile de HIF-1α ekspresyonunun azaldığı ile ilgili çalışma bulunmaktadır (123). HIF-1α'nın testis torsiyonunun fizyopatolojisindeki mekanizması ile ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulduğu, kontrol testislerde lümene yakın spermatozoa ve spermatidlerde de ekspresyonunun olduğu, Leydig hücrelerinde HIF-1α ekspresyonuna dair farklı sonuçların bulunduğu da bilinmektedir (90). Hasar grubunda hem apoptoz hem de HIF-1α seviyelerinde paralel bir artış izlenmiştir ancak *C.siliqua* tedavisi ile apoptozda meydana gelen azalmaya paralel HIF-1α ekspresyonunda azalma görülmemiştir. *C.siliqua*, içeriğindeki flavonoidlerle apoptotik süreç üzerindeki azaltıcı etkisini hipoksik hasar üzerinden göstermemiştir. Bu durum bize, *C.siliqua'*nın vasodilatatif etkisi olmadığını, hipoksik hasarı azaltamadığını düşündürmüştür.

Doku makrofaj belirteci olan CD68'in T/D modeli uygulanan sıçanlarda interstisyel alanda eksprese edildiği bilinmektedir (84). Çalışmamızda gözlemsel olarak İ/R grubunda makrofajların sayısal olarak arttığını; *C.siliqua* tedavi grubunda ise bu artışın daha az olmasına karşı arada istatistiksel anlamlı bir fark olmadığını saptadık. Bu sonuçlar tedavinin inflamatuar süreç üzerine olumlu etkileri olabileceğini düşündürdü. Kontrol gruplarına kıyasla hasarla birlikte artan inflamatuar süreçte, tedavi sonrasında azalma izlenmiştir. Flavonoidlerin inflamatuar sürece etkisinin incelendiğinde sepsis durumlarında anti-inflamatuar ve antioksidan etkilerinin olduğu gösterilmiştir (124). *C. siliqua*'nın flavonoid içeriği sayesinde testislerde anti-inflamatuar etkisi olabileceğini düşündük. Çeşitli anti-inflamatuar ajanlarla sürecin desteklenmesi daha olumlu sonuçlar alınmasını sağlayabilir.

C. siliqua tedavisinin oksidatif stres üzerine etkisinin immünohistokimyasal olarak incelenmesi amacıyla antioksidan enzimler olan SOD ve katalaz boyamaları yapıldı. Her iki antioksidan enzimin İ/R hasarlı grupta azaldığını, *C.siliqua* tedavisiyle birlikte dokularda antioksidan enzimlerin boyanmasında artış olduğunu gözlemlendi. *C.siliqua*'nın içeriğindeki polifenollerin ve flavonoidlerin oksidatif stresi azalttığına dair var olan çalışmalara uygun bir sonuç izlenmiştir (111).

TEM ile ultrastrüktürel analizde sadece *C.siliqua* verilen grupta testislerde ince yapının korunması ve herhangi bir hasarın izlenmemesi uygulanan tedavinin güvenilirliği

açısından olumlu bir göstergedir. Işık mikroskobu ile gözlemleyemediğimiz mitokondri yapılarında İ/R grubunda mitokondrinin genişlemiş olduğu ve kristalarının silindiği görülmüştür. İ/R+C.siliqua grubunda ultrastrüktürel olarak hücre içinde mitokondri yapılarının çoğunun kristaları izlenebilmiş; anormal yapıda mitokondriye nadir olarak rastlanmıştır. Işık mikroskobu ile gözlemlediğimiz makrofajlar TEM ile İ/R grubunda da izlenebildi ve tedavi alan grupta makrofaj sayısının daha az olduğu görüldü. Çalışmalarda spermatogenik seri hücrelerinin mitokondri morfolojilerinde hasar olduğu bildirilmiştir (125). Torsiyone testislerde mitokondriyal bozulma, az ve gevşek kromatin, dilate endoplazmik retikulum ve damar tıkanıklığı olduğu bildirilmiştir (126). Testis torsiyonu sonrasında kontralateral testiste Leydig hücre hasarı, bazal kompartmanda hücreler arası bağlantılarda kopma, dejenere mitokondrilerin varlığını bildiren çalışma da mevcuttur (88). Çalışmamızda da İ/R grubunda Leydig ve Sertoli hücrelerinde hasar olduğu görüldü. Sertoli ve Leydig hücre morfolojilerinin tedavi ile korunduğu izlendi. Sertoli hücrelerinin tedavi grubunda korunması spermatogenik seri hücrelerinin destek görmesi açısından anlamlıydı. Sonuçlar, *C.siliqua* tedavisi ile oksidatif stresin ve ROS üretiminin azalması ile mitokondriyal hasarın da azaldığı; bunun sonucunda apoptotik sürecin de olumlu yönde etkilendiğini düşündürmüştür.

Bu çalışmada *C. siliqua*'nın oksidatif stres üzerine etkileri biyokimyasal incelemelerle de desteklenmiştir. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, ROS'un da indirekt göstergesidir (127). İ/R hasarı grubunda MDA seviyeleri yükselmiştir. İ/R ve İ/R+C.siliqua grupları arasındaki fark ise anlamlı olma eğiliminde bulunmuştur ($p=0.0585$). Bu sonuçlar İ/R'nin dokuda oksidatif stres yarattığının, *C.siliqua* tedavisinin ise bu stresi azaltmak üzerine etkisi olabileceği düşüncesini desteklemiştir. GSH ise oksidatif strese karşı korunma mekanizmalarından birini oluşturur. Bir çöpçü gibi ROS'u dokulardan temizler ve proteinlerdeki tiyol gruplarını oksidasyondan korur (128). Çalışmamızda İ/R grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuş; İ/R+C.siliqua grubunda ise İ/R grubuna kıyasla GSH seviyelerinde anlamlı bir yükselme izlenmiştir. Oksidatif streste artarak hücre hasarına sebep olan ROS seviyeleri İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. İ/R+C.siliqua grubu, İ/R grubuyla kıyaslandığında fark anlamlı bulunmuştur. Tedavi ile birlikte ROS seviyelerinin düşmesi *C.siliqua*'nın antioksidan etkisini destekleyen bulgulardan biridir. AOPP değerleri de incelenmiş ancak gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Total antioksidan kapasiteyi gösteren FRAP seviyeleri ise İ/R grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuştur. *C. siliqua* tedavisi alan grupta FRAP düzeyleri anlamlı olarak yükselmiş; İ/R+C.siliqua ve kontrol grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

Tüm bunlar göz önüne alındığında *C.siliqua'nın* oksidatif stresi azaltıcı etkisi olduğu düşünülmüştür.

Hasar sonrası ve tedavi ile hormonların düzeyini incelemek ve testis fonksiyonu için yorum yapabilmek amacıyla testosteron seviyelerine bakıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak TEM incelemelerinde İ/R grubunda hasarlı Leydig hücreleri izlenmiş; tedavi ile hasarlı Leydig hücrelerine az rastlanmıştır. Hücresel düzeyde Leydig hücrelerinde fark izlenirken; testosteron seviyeleri arasında fark görülmemiştir. Testosteron seviyeleri ile ilgili anlamlı sonuçlar elde etmek için uzun dönem sonuçların gözlenmesi gerekebilir. Polifenol içeriği yüksek *Matricaria chamomile* bitki ekstresinin T/D modeli uygulanan hayvanlardaki etkisinin araştırıldığı çalışmada, detorsiyondan 30 dakika önce IP olarak enjekte edilen ekstraktın testosteron seviyelerini anlamlı olarak yükselttiği sonucuna ulaşılmıştır. Kontrol ve tedavi grupları ile hasar grubu arasında anlamlı fark olduğu bildirilmiştir (129). Torsiyon sonrası orşiopeksi yapılan hastalarda 4-10 yıl sonra testosteron seviyelerinde anlamlı bir fark saptanmamıştır (59). Testis fonksiyonunun, İ/R hasarı sonrası hormonal düzeyde ne kadar etkilendiği ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

Sertoli hücre fonksiyonunu yorumlamak için inhibin-B seviyeleri incelendiğinde, İ/R grubunda kontrole kıyasla inhibin-B düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur. İ/R+C.siliqua grubunda serum inhibin-B düzeylerinde İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir artış görülmemiştir. T/D modeli uygulanan sıçanlarda çinko ve melatoninin etkisinin araştırıldığı çalışmada hasarlı grup serumunda inhibin-B seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı; çinko ve melatoninin ayrı ayrı ve birlikte uygulanması sonrasında inhibin-B seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir (113). Bu çalışmada kullanılan ekstraktın içeriğinde de çinko bulunmaktadır ancak inhibin-B düzeylerinde anlamlı bir artış saptanmamıştır. İnsanlarda testis torsiyonu sonrası detorsiyon ve orşiopkesi uygulanan hastalarda ortalama 5 yıl sonra serum inhibin-B seviyeleri incelendiğinde kontrole kıyasla anlamlı derecede azalma olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada testosteron seviyeleri arasında fark saptanmamıştır (130). İ/R hasarı sonrası serum inhibin-B düzeylerinin düşmesi, Sertoli hücrelerinde hasar olduğu sonucunu düşündürmektedir. Çalışmamızda inhibin-B seviyelerinin İ/R hasarı ile düştüğü; *C.siliqua* tedavisinin ise inhibin-B düzeylerinde bir artışa sebep olmadığı bulunmuştur.

Sertoli hücre fonksiyonunun belirteçlerinden AMH düzeyleri incelendiğinde de gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. İnsanlarda testis torsiyonu sebebiyle opere olanlarla kontrol testislerin karşılaştırıldığı bir çalışmada iki grup arasındaki AMH seviyeleri kıyaslandığında, operasyon hikayesi olan grupta hafif bir düşüş olduğu bulunmuş ama

istatistiksel anlam saptanmamıştır (131). Doğumdan itibaren AMH konsantrasyonunun FSH ve testosteronun etkileri arasındaki dengeyi yansıttığı bilinmektedir. AMH ekspresyonunun doğumla birlikte giderek azaldığı, ergenlikte artan testosteron seviyeleri ile AMH sekresyonunun inhibe edildiği bildirilmiştir (132). Testosteron, AMH ve inhibin-B ile torsiyonun ilişkilendirilmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Farklı tedavi ajanlarının kombinasyonu ile hormonal parametrelerde iyileşme sağlanması da ileride amaçlanabilir.

Çalışmamız *C.siliqua'*nın testis torsiyon sonrası ortaya çıkan İ/R hasarına etkisini gösteren ilk çalışma olması açısından değerlidir. Histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle sonuçlar desteklenmiştir. Çalışmanın hayvan deneyi olması sebebiyle hayvanlarda ek bir patolojinin bulunmaması, kullanılan ilacın olmaması standardizasyonu sağlamıştır; ancak insanda sonuçların değişkenlik gösterme ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır. Kullanılan bitki ekstraktının yetiştiği koşullara ve üretildiği ülkelere göre içeriğinin ve etkinliğinin değişiklik göstermesi sonuçların standardizasyonunun yapılamamasına neden olmaktadır. *C. siliqua*'nın yetiştirilme koşullarına göre içeriği değişiklik gösterebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, çalışmamız, *C. siliqua*'nın testis torsiyonu sebebiyle acile başvuran hastalarda operasyona kadar geçen sürede ve operasyon sonrasında destek tedavi olarak uygulanabileceğini, testis fonksiyonlarını ve İ/R hasarına karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. İ/R hasarı sonucu bozulan denge ile ortaya çıkan oksidatif stres hasarı ve apoptotik süreçler dokuda ortaya çıkan sonuçların temelini oluşturmaktadır. *C.siliqua* tedavisi alan sıçanlarda hem histopatolojik ve ultrastrüktürel değerlendirmelerde hem de biyokimyasal parametrelerde düzelmeler saptanmıştır. Hastaların doğal yöntemlere, gıda takviyelerine ilgisi ve olumlu yaklaşımı, *C.siliqua* destek tedavisinin klinikte hastalara uygulanmasını kolaylaştıracak etkenlerden biridir. *C.siliqua*'nın testis fonksiyonuna etkisinin uzun dönem sonuçları için ileriki çalışmalarda reperfüzyon süresi uzatılabilir. Semen analizi ile bulgular desteklenebilir. Destek tedavi ajanlarının birlikte kullanılmasının olası etkilerini gözlemlemek, klinik kullanımda yerini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. *C.siliqua'*nın içeriğindeki polifenollerin ve flavonoidlerin tespiti ile bu ajanların tek başına kullanılması ve medikal yöntemin standardize edilmesi ileride yapılacak çalışmalarda dikkate alınabilir. Testis torsiyonun kesin tedavisi olan cerrahi müdahale ile detorsiyon sonrası reperfüzyon hasarının ortaya çıkardığı olası organ kaybını önlemek ve infertiliteyle sonuçlanmasını engellemek için destek tedaviler ile ilgili çalışma sayısı fazladır. Klinikte henüz kullanımı olan bir ajan bulunmamaktadır. *C.siliqua* antioksidan ve anti-apoptotik özellikleriyle gelecekte T/D sonrası testis hasarına karşı koruyucu etkisi olan bir farmakolojik ajan olarak klinikte destek tedavi olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Ross MH. Histology: A Text and with Correlated Cell and Molecular Biology. Histology: A Text and with Correlated Cell and Molecular Biology. 7: Wolters Kluwer Health; 2016. p. 790-833.
2. Moore KL, Persaud. T.V.N. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. 8. p. 263-84.
3. Sarıbal D, Erdem E, Güngör-Ordueri NE, Usta A, Karakuş C, Karacan M. Metformin decreases testicular damages following ischaemia/reperfusion injury in rats. Andrologia. 2020;52(2):e13481.
4. Yildirim C, Yuksel OH, Urkmez A, Sahin A, Somay A, Verit A. Protective effects of Tadalafil and darbepoetin against ischemia-reperfusion injury in a rat testicular torsion model. International braz j urol. 2018;44:1005-13.
5. Keseroglu B, Ozgur B, Surer H, Ogus E, Hucemenoglu S, Ozer E, et al. Which agent should be used to reduce ischemia-reperfusion injury after testicular torsion: a comparative animal experiment. Journal of Pediatric Urology. 2019;15(6):607. e1-. e7.
6. Sekerci C, Tanidir Y, Sener T, Sener G, Cevik O, Yarat A, et al. Effects of platelet-rich plasma against experimental ischemia/reperfusion injury in rat testis. Journal of pediatric urology. 2017;13(3):317. e1-. e9.
7. Tamer SA, Yıldırım A, Arabacı Ş, Çiftçi S, Akın S, Sarı E, et al. Treatment with estrogen receptor agonist ERβ improves torsion-induced oxidative testis injury in rats. Life sciences. 2019;222:203-11.
8. Kölükçü E, Atılgan D, Uluocak N, Deresoy FA, Katar M, Unsal V. Milrinone ameliorates ischaemia-reperfusion injury in experimental testicular torsion/detorsion rat model. Andrologia. 2021;53(8):e14128.
9. Cummings JM, Boullier JA, Sekhon D, Bose K. Adult testicular torsion. The Journal of urology. 2002;167(5):2109-10.
10. Vafaei A, Mohammadi S, Fazel A, Soukhtanloo M, Mohammadipour A, Beheshti F. Effects of carob (Ceratonia siliqua) on sperm quality, testicular structure, testosterone level and oxidative stress in busulfan-induced infertile mice. Pharmaceutical Sciences. 2018;24(2):104-11.
11. Aghajani MMR, Mahjoub S, Mojab F, Namdari M, Gorji NM, Dashtaki A, et al. Comparison of the effect of Ceratonia siliqua L.(carob) syrup and vitamin E on sperm parameters, oxidative stress index, and sex hormones in infertile men: A randomized controlled trial. Reproductive Sciences. 2021;28(3):766-74.
12. Khani HM, Shariati M, Forouzanfar M, Hosseini SE. Protective effects of Ceratonia siliqua extract on protamine gene expression, testicular function, and testicular histology in doxorubicin-treated adult rats: An experimental study. International Journal of Reproductive BioMedicine. 2020;18(8):667.
13. Tiwana MS, Leslie SW. Anatomy, abdomen and pelvis, testicle. 2017.
14. Moore KL, Dalley, A.F. , Agur, A.M.R. Clinically Oriented Anatomy. Clinically Oriented Anatomy. 82018. p. 431-8.
15. JAROW JP. Intratesticular arterial anatomy. Journal of andrology. 1990;11(3):255-9.
16. Shafik A, Moftah A, Olfat S, Mohi-el-Din M, El-Sayed A. Testicular veins: Anatomy and role in varicocelo genesis and other pathologic conditions. Urology. 1990;35(2):175-82.
17. Drake RL, Vogl, A.W. , Mitchell, A.W.M. Gray's Anatomy: Elsevier; 2020.
18. Skandalakis JE, Skandalakis LJ, Colborn GL. Testicular atrophy and neuropathy in herniorrhaphy. The American surgeon. 1996;62(9):775-82.
19. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas. McGraw-Hill Education; 2018. p. 439-59.

20. Kierszenbaum AL, Tres, L. L. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Palme Yayınevi; 2021. p. 611-50.

21. Johnson L, Thompson Jr DL, Varner DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. Animal reproduction science. 2008;105(1-2):23-51.

22. Griswold MD. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. Biology of reproduction. 1995;52(2):211-6.

23. Zirkin BR, Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. Biology of reproduction. 2018;99(1):101-11.

24. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Langman Medikal Embriyoloji. 132022. p. 261-77.

25. Eşrefoğlu M. Embriyoloji. Embriyoloji: EMA TIP Kitabevi; 2022. p. 283-300.

26. Carlson BM. İnsan Embriyolojisi ve Gelişim Biyolojisi. İnsan Embriyolojisi ve Gelişim Biyolojisi2022. p. 372-90.

27. Singh N, Singh D, Bhide A, Sharma R, Bhowmick S, Patel V, et al. LHX2 in germ cells control tubular organization in the developing mouse testis. Experimental Cell Research. 2023;425(1):113511.

28. Singh N, Singh D, Modi D. LIM homeodomain (LIM-HD) genes and their co-regulators in developing reproductive system and disorders of sex development. Sexual Development. 2022;16(2-3):147-61.

29. Bay K, Main KM, Toppari J, Skakkebæk NE. Testicular descent: INSL3, testosterone, genes and the intrauterine milieu. Nature Reviews Urology. 2011;8(4):187-96.

30. Adham IM, Emmen JM, Engel W. The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position. Molecular and cellular endocrinology. 2000;160(1-2):11-6.

31. Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF, et al. Targeted disruption of the Insl3 gene causes bilateral cryptorchidism. Molecular endocrinology. 1999;13(5):681-91.

32. Elamo HP, Virtanen HE, Toppari J. Genetics of cryptorchidism and testicular regression. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2022;36(1):101619.

33. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. Annual review of biochemistry. 2017;86:715-48.

34. Tryfonas G, Violaki A, Tsikopoulos G, Avtzoglou P, Zioutis J, Limas C, et al. Late postoperative results in males treated for testicular torsion during childhood. Journal of pediatric surgery. 1994;29(4):553-6.

35. Lacy A, Smith A, Koyfman A, Long B. High risk and low prevalence diseases: Testicular torsion. The American Journal of Emergency Medicine. 2023;66:98-104.

36. Ringdahl E, Teague L. Testicular torsion. American family physician. 2006;74(10):1739-43.

37. Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM. Testicular torsion: diagnosis, evaluation, and management. American family physician. 2013;88(12):835-40.

38. Greear GM, Romano MF, Katz MH, Munarriz R, Rague JT. Testicular torsion: epidemiological risk factors for orchiectomy in pediatric and adult patients. International Journal of Impotence Research. 2021;33(2):184-90.

39. Karaguzel E, Kadihasanoglu M, Kutlu O. Mechanisms of testicular torsion and potential protective agents. Nature Reviews Urology. 2014;11(7):391-9.

40. Tjioe D, Steinberger E. A quantitative study of the effect of ischaemia on the germinal epithelium of rat testes. Reproduction. 1970;21(3):489-94.

41. Turner T, Brown K. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. Biology of reproduction. 1993;49(2):401-7.

42. Kumar V, Abbas, Abul K. , Aster, Jon C. Robbins Temel Patoloji. Robbins Temel Patoloji. 10: Elsevier; 2020. p. 43-8, 693.

43. Kylat R. Perinatal testicular torsion. Archives de Pédiatrie. 2021;28(1):75-9.

44. Callewaert PR, Van Kerrebroeck P. New insights into perinatal testicular torsion. European journal of pediatrics. 2010;169:705-12.

45. Partin AW, Dmochowski, R.R. , Kavoussi, L.R. , Peters,C.A. Campbell-Walsh-Wein Urology2021.

46. Pentyala S, Lee J, Yalamanchili P, Vitkun S, Khan SA. Testicular torsion: a review. Journal of lower genital tract disease. 2001;5(1):38-47.

47. Ta A, D'Arcy FT, Hoag N, D'Arcy JP, Lawrentschuk N. Testicular torsion and the acute scrotum: current emergency management. European Journal of Emergency Medicine. 2016;23(3):160-5.

48. Laher A, Ragavan S, Mehta P, Adam A. Testicular torsion in the emergency room: a review of detection and management strategies. Open Access Emergency Medicine. 2020:237-46.

49. Davenport M. ABC of general surgery in children: acute problems of the scrotum. BMJ. 1996;312(7028):435-7.

50. Caesar RE, Kaplan GW. The incidence of the cremasteric reflex in normal boys. The Journal of urology. 1994;152(2):779-80.

51. Kadish HA, Bolte RG. A retrospective review of pediatric patients with epididymitis, testicular torsion, and torsion of testicular appendages. Pediatrics. 1998;102(1):73-6.

52. Hugbess ME, Currier SJ, Della-Giustina D. Normal cremasteric reflex in a case of testicular torsion. American Journal of Emergency Medicine. 2001;3(19):241-2.

53. Davis JE, Silverman M. Scrotal emergencies. Emergency Medicine Clinics. 2011;29(3):469-84.

54. Baker LA, Sigman D, Mathews RI, Benson J, Docimo SG. An analysis of clinical outcomes using color Doppler testicular ultrasound for testicular torsion. Pediatrics. 2000;105(3):604-7.

55. Yagil Y, Naroditsky I, Milhem J, Leiba R, Leiderman M, Badaan S, et al. Role of Doppler ultrasonography in the triage of acute scrotum in the emergency department. Journal of Ultrasound in Medicine. 2010;29(1):11-21.

56. Wu H-c, Sun S-S, Kao A, Chuang F-J, Lin C-C, Lee C-C. Comparison of radionuclide imaging and ultrasonography in the differentiation of acute testicular torsion and inflammatory testicular disease. Clinical nuclear medicine. 2002;27(7):490-3.

57. Puri P, Barton D, O'Donnell B. Prepubertal testicular torsion: subsequent fertility. Journal of pediatric surgery. 1985;20(6):598-601.

58. Minas A, Mahmoudabadi S, Gamchi NS, Antoniassi MP, Alizadeh A, Bertolla RP. Testicular torsion in vivo models: Mechanisms and treatments. Andrology. 2023;11(7):1267-85.

59. Jacobsen FM, Rudlang TM, Fode M, Østergren PB, Sønksen J, Ohl DA, et al. The impact of testicular torsion on testicular function. The world journal of men's health. 2020;38(3):298.

60. Turner TT, Bang HJ, Lysiak JJ. Experimental testicular torsion: reperfusion blood flow and subsequent testicular venous plasma testosterone concentrations. Urology. 2005;65(2):390-4.

61. Genişol İ, KARKINER Ö, Sinan G, Ergin M, Duman S, Akgün O, et al. Evaluation of testicular torsion in rats by using the Superb Microvascular Imaging Ultrasound technique comparison with Power Doppler Ultrasound and Color Doppler Ultrasound techniques. Pamukkale Medical Journal. 2021;14(4):854-61.

62. Turner TT, Bang HJ, Lysiak JL. The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. The Journal of urology. 2004;172(6 Part 2):2574-8.

63. Wu M-Y, Yiang G-T, Liao W-T, Tsai AP-Y, Cheng Y-L, Cheng P-W, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. Cellular Physiology and Biochemistry. 2018;46(4):1650-67.

64. Preiser JC. Oxidative stress. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 2012;36(2):147-54.

65. Yilmaz E, Hizli F, Afşarlar ÇE, Demirtaş C, Apaydin S, Karaman İ, et al. Early diagnosis of testicular torsion in rats by measuring plasma d-dimer levels: comparative study with epididymitis. Journal of pediatric surgery. 2015;50(4):651-4.

66. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacological reviews. 2001;53(1):135-59.

67. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. Molecular mechanisms in spermatogenesis. 2008:154-71.

68. Shimizu S, Tsounapi P, Dimitriadis F, Higashi Y, Shimizu T, Saito M. Testicular torsion–detorsion and potential therapeutic treatments: A possible role for ischemic postconditioning. International Journal of Urology. 2016;23(6):454-63.

69. Rangan U, Bulkley G. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. British medical bulletin. 1993;49(3):700-18.

70. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiological reviews. 1994;74(1):139-62.

71. Naito Y, Masaichi C-iL, Kato Y, Nagai R, Yonei Y. Oxidative stress markers. Anti-Aging Medicine. 2010;7(5):36-44.

72. Ching S, Beilby J, Rossi E, Ingram D, Hahnel R. Serum levels of micronutrients, antioxidants and total antioxidant status predict risk of breast cancer in a case control study. The Journal of nutrition. 2002;132(2):303-6.

73. Selmeci L. Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? Free Radical Research. 2011;45(10):1115-23.

74. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry. 1996;239(1):70-6.

75. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke E, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell death & differentiation. 2009;16(1):3-11.

76. Nicholson D. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death & Differentiation. 1999;6(11):1028-42.

77. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. Stroke. 2009;40(5):e331-e9.

78. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. Cell death & differentiation. 1999;6(2):99-104.

79. Suzanne M, Steller H. Shaping organisms with apoptosis. Cell Death & Differentiation. 2013;20(5):669-75.

80. Palladino MA, Shah A, Tyson R, Horvath J, Dugan C, Karpodinis M. Myeloid cell leukemia-1 (Mc1-1) is a candidate target gene of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in the testis. Reproductive Biology and Endocrinology. 2012;10:1-13.

81. Zhao S, Zhu W, Xue S, Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. Cellular & molecular immunology. 2014;11(5):428-37.

82. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. Journal of cellular physiology. 2018;233(9):6425-40.

83. Bhushan S, Theas MS, Guazzone VA, Jacobo P, Wang M, Fijak M, et al. Immune cell subtypes and their function in the testis. Frontiers in immunology. 2020;11:583304.

84. Balgetir MK, Tektemur NK, Tektemur A, Türk G, Güngör İH, Cihangiroglu AC, et al. Determination of M1/M2 Macrophage Polarization in Ipsilateral and Contralateral Rat Testis Tissue Following Unilateral Torsion/Detorsion. Reproductive Sciences. 2024:1-11.

85. Erol B, Tokgoz H, Hanci V, Bektas S, Akduman B, Yencilek F, et al. Vardenafil reduces testicular damage following ischemia/reperfusion injury in rats. The Kaohsiung journal of medical sciences. 2009;25(7):374-80.

86. Istanbulluoglu MO, Zor M, Celik A, Cicek T, Basal S, Ozgok A, et al. Effects of vardenafil on testicular torsion/detorsion damage: an experimental study in pigs. Urologia internationalis. 2011;86(2):228-32.

87. Yíldíz H, Durmus AS, Şimşek H, Yaman M. Protective effect of sildenafil citrate on contralateral testis injury after unilateral testicular torsion/detorsion. Clinics. 2011;66:137-42.

88. Bozlu M, Acar D, Cayan S, Aktas S, Tunckiran A. Protective effect of trapidil on long-term histologic damage in a rat model of testicular ischemia-reperfusion injury. World Journal of Urology. 2009;27:117-22.

89. Azizollahi S, Babaei H, Derakhshanfar A, Oloumi M. Effects of co-administration of dopamine and vitamin C on ischaemia-reperfusion injury after experimental testicular torsion-detorsion in rats. Andrologia. 2011;43(2):100-5.

90. Antonuccio P, Minutoli L, Romeo C, Nicòtina PA, Bitto A, Arena S, et al. Lipid peroxidation activates mitogen-activated protein kinases in testicular ischemia-reperfusion injury. The Journal of urology. 2006;176(4):1666-72.

91. Koksal M, Oğuz E, Baba F, Eren MA, Ciftci H, Demir M, et al. Effects of melatonin on testis histology, oxidative stress and spermatogenesis after experimental testis ischemia-reperfusion in rats. European Review for Medical & Pharmacological Sciences. 2012;16(5).

92. Kim Y-H, Kim G-H, Shin J-H, Kim K-S, Lim J-S. Effect of korean red ginseng on testicular tissue injury after torsion and detorsion. Korean journal of urology. 2010;51(11):794-9.

93. Gökçe A, Oktar S, Koc A, Gonenci R, Yalcinkaya F, Yonden Z, et al. Protective effect of thymoquinone in experimental testicular torsion. Urologia internationalis. 2010;85(4):461-5.

94. Ben Ayache S, Behija Saafi E, Emhemmed F, Flamini G, Achour L, Muller CD. Biological activities of aqueous extracts from carob plant (Ceratonia siliqua L.) by antioxidant, analgesic and proapoptotic properties evaluation. Molecules. 2020;25(14):3120.

95. Temiz MA, Temur A, Çelik I. Antioxidant role and hepatoprotective effects of carob (Ceratonia siliqua L.) seeds against ethanol-induced oxidative stress in rats. Journal of Food and Nutrition Research. 2015;3(1):57-61.

96. Lachkar N, Al-Sobarry M, El Hajaji H, Lamkinsi T, Lachkar M, Cherrah Y, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effect of Ceratonia siliqua L. methanol barks extract. J Chem Pharm Res. 2016;8(3):202-10.

97. Dahmani W, Elaouni N, Abousalim A, Akissi ZLE, Legssyer A, Ziyyat A, et al. Exploring carob (Ceratonia siliqua L.): A comprehensive assessment of its characteristics, ethnomedicinal uses, phytochemical aspects, and pharmacological activities. Plants. 2023;12(18):3303.

98. Gregoriou G, Neophytou CM, Vasincu A, Gregoriou Y, Hadjipakkou H, Pinakoulaki E, et al. Anti-cancer activity and phenolic content of extracts derived from Cypriot carob (Ceratonia siliqua L.) pods using different solvents. Molecules. 2021;26(16):5017.

99. Hamid I, Janbaz KH, Iqbal R, Akhtar MF, Saleem A, Ali S, et al. Therapeutic potential of Ceratonia siliqua extract for the management of asthma and hypertension. Cellular and Molecular Biology. 2021;67(5):6-15.

100. Pilehvari S, Masoumi SZ, Bahar TG, Kazemi F, Moradkhani S, Maleki P. Effect of Carob and Ginseng Supplements on Semen Analysis Parameters, Sexual Function, and Sex Hormones in Infertile Men: Double-Blind, Randomized Controlled Trial Study. Iranian Journal of Nursing and Midwifery Research. 2024;29(1):113-9.

101. Sadeghzadeh F, Sadeghzadeh A, Changizi-Ashtiyani S, Bakhshi S, Mashayekhi FJ, Mashayekhi M, et al. The effect of hydro-alcoholic extract of Ceratonia Silique L. on spermatogenesis index in rats treated with cyclophosphamide: An experimental study. International Journal of Reproductive BioMedicine. 2020;18(4):295.

102. Faramarzi A, Aghaz F, Bakhtiari M, Khazaei M. In vitro application of Ceratonia siliqua improved sperm parameters and chromatin quality after vitrifacation in normozoospermic aged men. Middle East Fertility Society Journal. 2020;24:1-5.

103. Javanmard F, Bidmeshkipour A, Yadegari JG. Ceratonia siliqua L improved cryodamage of asthenozoospermic specimens: An experimental study. International Journal of Reproductive BioMedicine. 2022;20(12):1029.

104. Meziani S, Oomah BD, Zaidi F, Simon-Levert A, Bertrand C, Zaidi-Yahiaoui R. Antibacterial activity of carob (Ceratonia siliqua L.) extracts against phytopathogenic bacteria Pectobacterium atrosepticum. Microbial pathogenesis. 2015;78:95-102.

105. Ito Y, Unagami M, Yamabe F, Mitsui Y, Nakajima K, Nagao K, et al. A method for utilizing automated machine learning for histopathological classification of testis based on Johnsen scores. Scientific reports. 2021;11(1):9962.

106. Ameli M, Hashemi MS, Moghimian M, Shokoohi M. Protective effect of tadalafil and verapamil on testicular function and oxidative stress after torsion/detorsion in adult male rat. Andrologia. 2018;50(8):e13068.

107. Suskind A, Hayner-Buchan A, Feustel PJ, Kogan BA. Fibrosis correlates with detailed histological analysis of human undescended testes. BJU international. 2008;101(11):1441-5.

108. Guven A, İçkin M, Uzun O, Bakar C, Gulec Balbay E, Balbay O. Erdosteine protects rat testis tissue from hypoxic injury by reducing apoptotic cell death. Andrologia. 2014;46(1):50-8.

109. Chen Y-T, Chuang F-C, Yang C-C, Chiang JY, Sung P-H, Chu Y-C, et al. Combined melatonin-adipose derived mesenchymal stem cells therapy effectively protected the testis from testicular torsion-induced ischemia-reperfusion injury. Stem Cell Research & Therapy. 2021;12(1):370.

110. Güney Saruhan B, Sağsöz H, Akbalık E, Ketani M, Erdoğan S. Distribution of CD 68-, CD 8-, MHCI- and MHCII-positive cells in the bull and ram testis and epididymis. Anatomia, histologia, embryologia. 2018;47(4):313-21.

111. Moradi-Ozarlou M, Javanmardi S, Tayefi-Nasrabadi H, editors. Antioxidant property of Plantago major leaf extracts reduces testicular torsion/detorsion-induced ischemia/reperfusion injury in rats. Veterinary Research Forum; 2020: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

112. Sarikaya K, Kölükçü E, Unsal V, Özdemir S. Protective Effects of Syringic Acid on Ischemia-Reperfusion Injury in Testicular Torsion: An Experimental Study in a Rat Model. Cureus. 2023;15(7).

113. Semercioz A, Baltaci AK, Mogulkoc R, Avunduk MC. Effect of zinc and melatonin on oxidative stress and serum inhibin-B levels in a rat testicular torsion–detorsion model. Biochemical genetics. 2017;55:395-409.

114. Gevrek F, Biçer Ç, Kara M, Erdemir F. The ameliorative effects of Ginkgo biloba on apoptosis, LH-R expression and sperm morphology anomaly in testicular torsion and detorsion. Andrologia. 2018;50(4):e12969.

115. Creasy D, Bube A, Rijk Ed, Kandori H, Kuwahara M, Masson R, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. Toxicologic pathology. 2012;40(6_suppl):40S-121S.

116. Ozbek O, Altintas R, Polat A, Vardi N, Parlakpinar H, Sagir M, et al. The protective effect of apocynin on testicular ischemia-reperfusion injury. The Journal of urology. 2015;193(4):1417-22.

117. Tatar M, Polat Z, Öner J, Öner H. Protective Effect of Myricetin Against Experimentally Induced Torsion in Rats. Biology Bulletin. 2023;50(6):1338-50.

118. Chen S, Liao Z, Zheng T, Zhu Y, Ye L. Protective effect of ligustrazine on oxidative stress and apoptosis following testicular torsion in rats. Scientific Reports. 2023;13(1):20395.

119. Aktoz T, Kanter M, Aktas C. Protective effects of quercetin on testicular torsion/detorsion-induced ischaemia-reperfusion injury in rats. Andrologia. 2010;42(6):376-83.

120. Keivan M, Mansouri Torghabeh F, Davoodi S, Moradi Maryamneghari S, Dadfar R. Single intratesticular injection of blood-serum-derived exosomes can potentially alleviate testopathy following testicular torsion. Animal models and experimental medicine. 2022;5(4):362-8.

121. Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, et al. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. Journal of Andrology. 2003;24(2):185-91.

122. Palladino M, Pirlamarla P, McNamara J, Sottas C, Korah N, Hardy M, et al. Normoxic Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Rat Leydig Cells In Vivo and In Vitro. Journal of andrology. 2011;32(3):307-23.

123. Abdelzaher WY, Rofaeil RR, Ali DME, Attya ME. Protective effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in testicular torsion/detorsion in rats: a possible role of HIF-1α and nitric oxide. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2020;393:603-14.

124. Bayram P, Aksak Karamese S, Ozdemir B, Salum C, Erol HS, Karamese M. Two flavonoids, baicalein and naringin, are effective as anti-inflammatory and anti-oxidant agents in a rat model of polymicrobial sepsis. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2023;45(5):597-606.

125. Shih HJ, Chang CY, Huang IT, Tsai PS, Han CL, Huang CJ. Testicular torsion–detorsion causes dysfunction of mitochondrial oxidative phosphorylation. Andrology. 2021;9(6):1902-10.

126. Nguyen L, Lievano G, Ghosh L, Radhakrishnan J, Fornell L, John E. Effect of unilateral testicular torsion on blood flow and histology of contralateral testes. Journal of pediatric surgery. 1999;34(5):680-3.

127. Bayatli F, Akkuş D, Kilic E, Saraymen R, Sönmez MF. The protective effects of grape seed extract on MDA, AOPP, apoptosis and eNOS expression in testicular torsion: an experimental study. World Journal of Urology. 2013;31:615-22.

128. Uguralp S, Mizrak B, Karabulut AB. Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. European journal of pediatric surgery. 2005;15(02):114-9.

129. Soltani M, Moghimian M, Abtahi-Eivari SH, Shoorei H, Khaki A, Shokoohi M. Protective effects of matricaria chamomilla extract on torsion/detorsion-induced tissue damage and oxidative stress in adult rat testis. International journal of fertility & sterility. 2018;12(3):242.

130. Romeo C, Impellizzeri P, Arrigo T, Antonuccio P, Valenzise M, Mirabelli S, et al. Late hormonal function after testicular torsion. Journal of Pediatric Surgery. 2010;45(2):411-3.

131. Osemlak P, Miszczuk K, Jędrzejewski G, Nachulewicz P, Beń-Skowronek I, Brzozowska A. Testicular torsion: Its effect on autoimmunisation, pituitary–testis axis and correlation with primary gonadal dysfunction in boys. Pediatric Research. 2021;90(6):1193-200.

132. Sansone A, Kliesch S, Isidori A, Schlatt S. AMH and INSL3 in testicular and extragonadal pathophysiology: what do we know? Andrology. 2019;7(2):131-8.

EKLER

EK 1: ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 27.09.2022-1258665

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

Sayı :E-35980450-050.01.99-1258665
Konu :Elif KERVANCIOĞLU DEMİRCİ'ye ait Etik Kurul Onayı Hk.

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif KERVANCIOĞLU DEMİRCİ

İlgi : 02.08.2022 tarihli, 1103007 sayılı yazı

Sorumluluğunu üstlendiğiniz **Şahika YARDIM'a ait** "Deneysel testis torsiyonu modeline Ceratonia siliqua etkisinin ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde araştırılması" isimli projeniz Etik Kurulumuzun 19.08.2022 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, 2022/28 Etik Kurulu Onayı ilişikte gönderilmiştir.

Gereği için bilgileriniz rica olunur.

Prof. Dr. Ufuk KOLAK
Başkan

Ek:Etik Kurul Onayı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSDUVRLE74 Pin Kodu :90662 Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/istanbul-universitesi-ebys

İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü
34452 Beyazıt/Fatih-İstanbul
Tel : 0 212 440 20 89 Faks : 0 212 440 20 88
e-posta : hadyek@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr
Kep Adresi: istanbuluniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için : Süleyman ARIK
Dahili : 10689

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 23.09.2022-1183309

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif KERVANCIOĞLU DEMİRCİ
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

Karar No:2022/28

Başvuru : 02.08.2022/ 1103007

Toplantı Tarihi : 19.08.2022

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen **Şahika YARDIM'a ait** "Deneysel testis torsiyonu modeline Ceratonia siliqua etkisinin ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde araştırılması " isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	28
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		01.10.2022/01.10.2023

Prof. Dr. Ufuk KOLAK
Başkan
(İzinli)

Prof. Dr. Alper OKYAR
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Mustafa Oral ÖNCÜL
Üye
(Toplantıya katılmadı)

Prof. Dr. Hatice Bilge BECERİR
Üye

Prof. Dr. Büket AYBAR
Üye

Prof. Dr. Devrim MEMİŞ
Üye

Prof. Dr. Uğur AKSU
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aydın ÇEVİK
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Ali Cihan TAŞKIN
Üye

Mak.Yük.Müh.Dr.Burak OLGUN
Üye

Av. Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü, 34452 Beyazıt/Fatih-İstanbul
Tel: 0 212 440 20 89 / 10689
e-posta: hadyek@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ: www.istanbul.edu.tr

5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK 2: İNTİHAL RAPORU

DENEYSEL TESTİS TORSİYONU MODELİNE CERATONİA SİLİQUA ETKİSİNİN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

ORIGINALITY REPORT

11%
SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	acikbilim.yok.gov.tr Internet	959 words — 4%
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 Internet	254 words — 1%
3	9lib.net Internet	70 words — < 1%
4	beslenmevediyetdergisi.org Internet	50 words — < 1%
5	dspace.trakya.edu.tr:8080 Internet	49 words — < 1%
6	openaccess.ogu.edu.tr:8080 Internet	48 words — < 1%
7	Demirdelen, Umut. "Sıçanlarda siklofosfamid ile oluşturulan testis hasarında karnozinin etkisi", Dokuz Eylul Universitesi (Turkey), 2024 ProQuest	42 words — < 1%
8	abis-files.erciyes.edu.tr Internet	42 words — < 1%