



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**BİLATERAL TESTİS TORSİYON MODELİ OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA HESPERİDİNİN ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİ, TOTAL OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN DURUM,
STEROİD HORMON SENTEZİ VE GERM HÜCRE
APOPTOZU ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Özden KOKURCAN

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdinç DEVRİM**

ANKARA

2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**BİLATERAL TESTİS TORSİYON MODELİ OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA HESPERİDİNİN ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİ, TOTAL OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN DURUM,
STEROİD HORMON SENTEZİ VE GERM HÜCRE
APOPTOZU ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Özden KOKURCAN

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdinç DEVRİM**

ANKARA

2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum **“Bilateral Testis Torsiyon Modeli Oluşturulmuş Ratlarda Hesperidinin Endoplazmik Retikulum Stresi, Total Oksidan Ve Antioksidan Durum, Steroid Hormon Sentezi Ve Germ Hücre Apoptozu Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması”** başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 31.01.2024 tarihinde, 2024-02-11 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Özden KOKURCAN

Tarih:

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU

Tıpta Uzmanlık Tezi

Yazar Özden Kokurcan

Gönderim Tarihi: 02-Kas-2024 11:39AM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 2505740911

Dosya adı: Tez-Dr._zdenKokurcan_02.11.24.docx (3.56M)

Kelime sayısı: 12227

Karakter sayısı: 87779

BİLATERAL TESTİS TORSİYON MODELİ OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
HESPERİDİNİN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ, TOTAL OKSİDAN VE
ANTIOKSİDAN DURUM, STEROİD HORMON SENTEZİ VE GERM HÜCRE
APOPTOZU ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% **18**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **15**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **9**

YAYINLAR

% **6**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

KABUL ONAY SAYFASI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Özden KOKURCAN	Sınav tarihi: 14.11.2024
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Biyokimya AD	
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Erdiñç DEVRİM	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Bilateral Testis Torsiyon Modeli Oluşturulmuş Ratlarda Hesperidinin Endoplazmik Retikulum Stresi, Total Oksidan ve Antioksidan Durum, Steroid Hormon Sentezi ve Germ Hücre Apoptozu Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğı:	☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliğı ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

Jüri Başkanı
Prof. Dr. H. Serdar ÖZTÜRK
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Serenay ELGÜN ÜLKAR
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Erdiñç DEVRİM
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Tezimin tüm aşamalarında, eğitim hayatımda ve akademik çalışmalarımda büyük katkıları olan, bilgi ve tecrübeleri ile bana mesleği sevdiren ve tıbbi biyokimya uzmanı olmanın önemini öğreten değerli danışman hocam Prof. Dr. Erdinç DEVRİM'e,

Uzmanlık eğitimimde ve gelişimimde büyük katkıları olan, ihtiyacım olduğunda her an bana zaman ayıran, çok kıymetli bilgi birikimlerini bana aktaran ve yol gösteren saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Hasan Serdar ÖZTÜRK'e, Prof. Dr. Serenay Elgün ÜLKAR'a, Prof. Dr. Aslıhan GÜRBÜZ BOLKAN'a, Prof. Dr. B. İmge ERGÜDER'e, Doç. Dr. Özlem DOĞAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm Feyza TÜRKEŞ'e,

Tez çalışmamın tüm aşamalarında ve özellikle de histolojik çalışmaların yürütülmesinde bilgi ve tecrübeleri ile bana yardımcı olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ferda TOPAL ÇELİKKAN'a ve değerli araştırma görevlisi arkadaşım Dr. Nursena TÜTÜNCÜ'ye,

Birlikte çalışmaktan çok mutlu olduğum kıymetli asistan arkadaşlarım ve Anabilim Dalımızın yardımsever çalışanlarına,

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina ve Cebeci Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarları'nın kıymetli çalışanlarına,

Tez çalışmamın planlanması ve ilerlemesinde, tecrübe ve bilgileriyle yardımlarını esirgemeyen başta Uz. Vet. Hekim Atilla İŞGÖREN olmak üzere Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarı ekibine,

Bugünlere gelmemde en çok emeği geçen, her şartta yanımda ve bana destek olan canım annem Asuman KAYA, babam Mustafa KAYA ve kardeşlerime,

Asistanlık hayatım boyunca desteğini ve inancını bir an olsun benden esirgemeyen canım eşim Dr. Alihan KOKURCAN'a ve canımdan çok sevdiğim oğlum Bora KOKURCAN'a,

Son olarak sonsuz sevgisiyle beni sarıp kucaklayan, iyi bir insan, iyi bir anne olmayı bana öğreten, yol göstericim olan, yakın zamanda kaybettiğimiz canım annem Saadet KOKURCAN'a ,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Özgünlük Raporu.....	iii
Kabul Onay Sayfası.....	iv
Önsöz.....	v
İçindekiler.....	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller Dizini.....	xi
Tablolar Dizini.....	xii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	9
4.1. Testisin Anatomisi, Histofizyolojisi, Embriyolojisi	9
4.1.1. Testisin Anatomisi	9
4.1.2. Testisin Histofizyolojisi	10
4.1.3. Testisin Embriyolojisi	11
4.2. Spermatogenez ve Johnsen Skorlaması	13
4.3. Testosteron Sentezi	14
4.4. Testis Torsiyonu	16
4.4.1. Tanım ve Etiyoloji.....	16
4.4.2. Tanı	17
4.4.3. Tedavi.....	18
4.5. İskemi - Reperfüzyon Hasarı	18
4.6. Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ve Oksidatif Stres	19
4.6.1. Serbest Radikaller	19
4.6.2. Reaktif Oksijen Türleri	20
4.6.3. Oksidatif Stres	22
4.7. Oksidatif Stres Belirteçleri.....	24
4.8. Antioksidan Sistem	26
4.9. Endoplazmik Retikulum Stresi	30
4.10. Apoptoz.....	32
5. GEREÇ VE YÖNTEM	35
5.1. Deney Hayvanları	35

5.2. Deney Grupları	36
5.3. Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler.....	39
5.4. Ölçüm Yöntemleri	40
5.4.1. Serumda ATF6 Ölçüm Yöntemi	40
5.4.2. Serumda GRP 78 Ölçüm Yöntemi.....	41
5.4.3. Serumda Kaspaz 3 Ölçüm Yöntemi	41
5.4.4. Serumda Testosteron Ölçüm Yöntemi	42
5.4.5. Serumda Ksantin Oksidaz (XO) Ölçüm Yöntemi.....	42
5.4.6. Protein Miktarı Ölçüm Yöntemi(Lowry Yöntemi):	43
5.4.7. Serum ve Dokuda Katalaz (KAT) Aktivitesi Ölçümü	44
5.4.8. Dokuda Süperoksit Dismutaz (SOD) Ölçüm Yöntemi	45
5.4.9. Dokuda Malondialdehit (MDA) Ölçüm Yöntemi.....	46
5.4.10. Dokuda Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçüm Yöntemi.....	48
5.5. Işık Mikroskopik İnceleme ve Histolojik Bulgular	49
5.6. İstatistiksel Yöntemler	49
6. BULGULAR	51
7. TARTIŞMA.....	62
8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	71
9. KAYNAKLAR.....	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

µm	: Mikrometre
ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
AMH	: Antimüllerian Hormon
AMP	: Adenozin Monofosfat
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
ATF6	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6
ATP	: Adenozin Trifosfat
Ca	: Kalsiyum
Camp	: Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	: Katalaz
cm	: Santimetre
Cu	: Bakır
CV	: Varyasyon Katsayısı
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzim Linked ImmunoSorbent Assay
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: ER ile ilişkili yıkım
F	: Faktör
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
Fe	: Demir
FSH	: Folikül Stimulizan Hormon
g	: Gün
GMP	: Guanin Monofosfat
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GPR	: Glutasyon Redüktaz
gr	: Gram
GRP78	: Glukoz Regüle Protein 78
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz

GSSG	: Glutatyon disülfid
H	: Hidrojen
H⁺	: Proton
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
hcG	: Human Koryonik Gonadotropin
HRP	: Horse Radish Peroksidaz
I/R	: İskemi/Reperfüzyon
IRE1α	: İnositol Gerektiren Enzim 1 alfa
IU	: İnternasyonal Ünite
kDA	: Kilo Dalton
kg	: Kilogram
L	: Litre
L•	: Lipit radikali
LH	: Luteinleştirici Hormon
LOO•	: Lipit peroksil radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mn	: Manganez
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
Na	: Sodyum
NADP⁺	: Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaF	: Sodyum Florür
NBT	: Nitrablu Tetrazolium
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
O₂	: Moleküler Oksijen
OD	: Optik Dansite
OH•	: Hidroksil Radikali
PERK	: Protein Kinaz RNA (PKR) Benzeri ER Kinaz
pg	: Pikogram
PKA	: Protein Kinaz A

ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
StAR	: Steroidojenik akut düzenleyici protein
T/D	: Torsiyon/ Detorsiyon
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TEP	: Tetraetoksipropan
TT	: Testis Torsiyonu
TWIST	: The Testicular Workup for Ischemia and Suspected Torsion
UPR	: Katlanmamış Protein Yanıtı
USG	: Ultrasonografi
v/v	: Hacim/hacim
w/v	: Ağırlık/hacim
XD	: Ksantin Dehidrojenaz
XO	: Ksantin Oksidaz
Zn	: Çinko
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Testisin anatomisi	10
Şekil 4.2. Testis histolojik görüntüsü	11
Şekil 4.3. Testisin embriyolojisi.....	12
Şekil 4.4. Spermatogenez aşamaları.....	14
Şekil 4.5. Testosteron sentezi	16
Şekil 4.6. Malondialdehit (MDA) kimyasal yapısı	25
Şekil 4.7. Pürin nükleozid katabolizması	26
Şekil 4.8. UPR sinyal yolağı	32
Şekil 4.9. Flavanooidlerin kimyasal yapısı	34
Şekil 4.10. Hesperidinin kimyasal yapısı	34
Şekil 5.1. Ratların kafes görüntüsü	36
Şekil 5.2. Ratlara oral hesperidin verilmesi	37
Şekil 5.3. Ratlara anestezi uygulanma aşaması.....	38
Şekil 5.4. Testiküler torsiyon öncesi ve sonrası	39
Şekil 6.1. ATF6 hata çubuk grafiğı	52
Şekil 6.2. GRP78 hata çubuk grafiğı.....	53
Şekil 6.3. Kaspaz-3 hata çubuk grafiğı	54
Şekil 6.4. Testosteron hata çubuk grafiğı	54
Şekil 6.5. Rat testislerinin mikroskopik görüntüleri	56
Şekil 6.6. SOD hata çubuk grafiğı.....	58
Şekil 6.7. KAT-serum hata çubuk grafiğı	59
Şekil 6.8. KAT-doku hata çubuk grafiğı	59
Şekil 6.9. GSH-Px hata çubuk grafiğı	60
Şekil 6.10. MDA hata çubuk grafiğı	60
Şekil 6.11. XO hata çubuk grafiğı.....	61

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 4.1. Johnsen skorlaması	13
Tablo 4.2. TWIST puanlama sistemi	17
Tablo 4.3. Reaktif oksijen türleri sınıflandırması	20
Tablo 4.4. Antioksidanların sınıflandırılması	28
Tablo 4.5. SOD türleri ve yerleşimleri	28
Tablo 5.1. Ksantin oksidaz aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol	43
Tablo 5.2. Protein miktarı ölçüm yöntem protokolü	44
Tablo 5.3. SOD aktivitesi ölçüm yöntem protokolü	45
Tablo 5.4. MDA ölçümünde kullanılan deney protokolü	47
Tablo 5.5. Glutasyon Peroksidaz aktivitesi ölçüm yöntemi protokolü	48
Tablo 6.1. Ratların demografik bilgileri	51
Tablo 6.2. Ratların ATF6 ve GRP78 değerleri	52
Tablo 6.3. Ratların kaspaz-3 değerleri	53
Tablo 6.4. Ratların kan testosteron değerleri	55
Tablo 6.5. Ratların Johnsen skorları	55
Tablo 6.6. Ratların SOD, serum KAT, doku KAT, GSH-Px, MDA ve serum XO değerleri..	58

1. ÖZET

Bilateral Testis Torsiyon Modeli Oluşturulmuş Ratlarda Hesperidinin Endoplazmik Retikulum Stresi, Total Oksidan ve Antioksidan Durum, Steroid Hormon Sentezi ve Germ Hücre Apoptozu Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Testisin çevre dokuya yeterli bağlanamaması sonrası kendi etrafında dönmesi sonucu oluşan testis torsiyonu ve yapılan detorsiyon işlemi testis dokusuna sebep olduğu iskemi/ reperfüzyon (I/R) hasarı nedeniyle zarar vermektedir. Endoplazmik retikulum (ER), hücre içi protein homeostazisinin sürdürülmesinde görev yapan çok önemli bir hücresel organeldir ve oksidatif stres, iskemi/ reperfüzyon (I/R) hasarı gibi patolojik durumlarda "ER stresi" adı verilen bir tepkiye neden olmaktadır. Bu strese bağlı olarak hücrelerde apoptoz gerçekleşmektedir, bu da germ hücre kaybına ve infertiliteye gidebilen sonuçlara neden olmaktadır. Bu çalışmada son dönemlerde çeşitli çalışmalarda antiinflamatuvar, antioksidan ve antikanser etkileri ile öne çıkan ve ER stresini azalttığı gösterilen flavonoid ailesine dahil olan hesperidinin testis torsiyonu ve detorsiyonu durumunda oksidatif stres, ER stresi, steroid hormon sentezi ve germ hücre apoptozu üzerine olan olası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 36 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat (12 haftalık) randomize kullanılmıştır. 4 farklı grup oluşturulmuştur. Ratlar grup I (kontrol grubu), grup II (torsiyon/detorsiyon grubu), grup III (hesperidin grubu) ve grup IV (torsiyon/detorsiyon ve hesperidin gruplarına) randomize edilmiştir. Grup I ve grup II dışındaki ratlara 7 gün boyunca günde 1 kez oral yoldan hesperidin verilmiştir. Çalışmanın 7. günü Grup I ve grup III haricindeki diğer gruptaki ratlara 720⁰ rotasyon yapılarak bilateral testis torsiyon modeli oluşturulmuştur. 4 saatlik torsiyon sonrası testisler detorsiyone edilmiş ve detorsiyondan 4 saat sonra ratlara bilateral orşiektomi uygulanarak intrakardiyak ötenazi uygulanmıştır. Ratlardan alınan serum örnekleri ile ER stres parametreleri, testosteron, kaspaz 3 ve oksidatif stres parametreleri düzeyleri analiz edilmiştir. Alınan sağ testis dokusu histopatolojik incelemeyle değerlendirilmiş ve Johnsen skorlaması hesaplanmış; sol testis dokusundan ise oksidan/antioksidan parametreler çalışılmıştır.

Bulgular: Oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu belirteçlerinden doku MDA seviyesinin torsiyon gruplarında arttığı ancak hesperidin tedavisinin MDA artışını engelleme üzerine bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Antioksidan durum belirteçlerinden doku SOD, GSH-Px ve katalaz

düzeyleri değerlendirildiğinde hesperidin tedavisinin katalaz düzeyi üzerinde anlamlı yükseliğe sahip olduğu görülürken SOD ve GSH-Px düzeylerinde hesperidin gruplarında azalma daha belirgin olarak görülmüştür. Ratların serum ATF6 ve GRP78 değerleri incelendiği zaman gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık izlenmemesine rağmen ATF6 değerleri incelendiğinde hesperidin alan grupların daha düşük değerlere sahip olduğu gözlenmiştir. Serum kaspaz-3 değerleri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, T/D grubunun kaspaz-3 değerlerinin en yüksek olduğu ve T/D+Hesperidin grubunda kaspaz-3 değerlerinin düştüğü gözlenmiştir. Kontrol grubu ile T/D grubu karşılaştırıldığında, T/D grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kan testosteron düzeylerinde düşüş izlenmiştir. Yine T/D ve T/D+hesperidin grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hesperidin verilen torsiyon grubunda testosteron seviyesindeki azalmanın daha düşük olduğu gözlenmiştir. Testis biyopsisi yapılan çalışmada, Johnsen skorları değerlendirildiğinde, T/D grubunun kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha düşük bir skora sahip olduğu tespit edilmiştir. Hesperidin grupları kontrol grubuna göre germinal epitel hücreleri açısından incelendiğinde tübül epitelinin bütünlüğünün bozulmadığı ve lümende spermatozoonlarla birlikte hücrelerin normal görünümde olduğu izlenmiştir.

Sonuç: Hesperidin testis torsiyonu sonrası gelişen oksidatif stres ve antioksidan durum üzerinde MDA, SOD ve GSH-Px seviyelerine etki etmediği ancak katalaz düzeyleri üzerine olumlu etkilerinin olduğu görülmüştür. ER stres belirteçlerinden ATF6 düzeylerinin hesperidin alan gruplarda istatistiksel anlamlılık bulunmamakla birlikte daha düşük olduğu gözlenmiştir. Testosteron sentezinin torsiyon gruplarında azaldığı ve hesperidin bu azalmayı azalttığı görülmüştür. Benzer şekilde kaspaz 3 düzeylerinin istatistiksel anlamlılık bulunmasa da torsiyon gruplarında arttığı, hesperidin bu artışı azalttığı görülmüştür. Histopatolojik değerlendirmede torsiyon sonrası Johnsen skorunun düştüğü, hesperidin alan gruplarda tübül epitelinin bütünlüğünün bozulmadığı ve lümende spermatozoonlarla birlikte hücrelerin normal görünümde olduğu izlenerek Johnsen skorlarının yükseldiği görülmüştür. Bu sonuçlar hesperidin torsiyon ve detorsiyona bağlı gelişen testisteki histopatolojik değişikliklere ve bunun sonucunda görülen spermatogenezdeki bozulmaya karşı kullanılabilecek olası bir koruyucu ajan olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Testis torsiyonu, Hesperidin, ER stresi, Oksidatif stres, Germ hücre apoptozu

2. ABSTRACT

The Effects of Hesperidine on Endoplasmic Reticulum Stress, Total Oxidant and Antioxidant Status, Steroid Hormone Synthesis and Germ Cell Apoptosis in Rats with Bilateral Testicular Torsion Model

Aim: Testicular torsion, which occurs when the testicle fails to attach adequately to the surrounding tissue and rotates around itself, and detorsion procedure causes ischemia/reperfusion (I/R) damage to the testicular tissue. The endoplasmic reticulum (ER) is a very important cellular organelle involved in maintaining intracellular protein homeostasis and oxidative stress causes a response called “ER stress” in pathological conditions such as ischemia/reperfusion (I/R) injury. Due to this stress, apoptosis occurs in cells, which leads to germ cell loss and infertility. In this study, we aimed to investigate the possible protective effects of hesperidin, a member of the flavonoid family, which has recently been shown to reduce ER stress and has anti-inflammatory, antioxidative and anticancer effects in various studies, on oxidative stress, ER stress, steroid hormone synthesis and germ cell apoptosis in testicular torsion and detorsion.

Materials and methods: In the study, 36 male Wistar-Albino rats (12 weeks old) were randomized. 4 different groups were formed. Rats were randomized into group I (control group), group II (torsion/detorsion group), group III (hesperidin group) and group IV (torsion/detorsion and hesperidin groups). Rats except Group I and Group II were given hesperidin orally once a day for 7 days. On the 7th day of the study, bilateral testicular torsion model was created by performing 720° rotations to the rats in the other groups except Group I and Group III. After 4 hours of torsion, the testes were detorsiated and 4 hours after detorsion, the rats were orchietomized bilaterally and euthanized intracardiacy. Serum samples obtained from the rats were analyzed for ER stress parameters, testosterone, caspase 3 and oxidative stress parameters. The right testicular tissue was evaluated by histopathologic examination and Johnsen scoring was calculated; oxidative parameters were analyzed in the left testicular tissue.

Results: It was observed that tissue MDA level, one of the markers of oxidative stress and lipid peroxidation, increased in the torsion groups, but hesperidin treatment had no effect on the prevention of MDA increase. When tissue SOD, GSH-Px and catalase levels, which are among the markers of antioxidant status, were evaluated, it was observed that hesperidin

treatment had a significant increase in catalase level, while the decrease in SOD and GSH-Px levels was more pronounced in hesperidin groups. When serum ATF6 and GRP78 values of the rats were analyzed, no statistically significant difference was observed between the groups, but when ATF6 values were analyzed, it was observed that the groups receiving hesperidin had lower values. While the serum caspase-3 levels did not show statistical significance, it was noted that the T/D group exhibited the highest caspase-3 values, whereas there was a reduction in caspase-3 levels in the T/D+Hesperidin group. When the control group was compared with the T/D group, a decrease in blood testosterone levels was observed in the T/D group, although not statistically significant. Again, when the T/D and T/D+hesperidin groups were compared, it was observed that the decrease in testosterone levels was lower in the hesperidin-treated torsion group, although not statistically significant. When Johnsen scoring was evaluated in the testicular biopsy study, the T/D group was found to have a statistically significantly lower Johnsen score than the control group. When the hesperidin groups were examined in terms of germinal epithelial cells compared to the control group, it was observed that the integrity of the tubule epithelium was not disrupted and the cells with spermatozoa in the lumen had a normal appearance.

Conclusion: Hesperidin had no effect on MDA, SOD and GSH-Px levels but had positive effects on catalase levels on oxidative stress and antioxidant status after testicular torsion. ATF6 levels, one of the ER stress markers, were observed to be lower in the groups receiving hesperidin, although there was no statistical significance. It was observed that testosterone synthesis decreased in torsion groups and hesperidin decreased this reduction. Similarly, caspase 3 levels increased in the torsion groups, although statistical significance was not found, and hesperidine decreased this elevation. In histopathologic evaluation, it was observed that Johnsen score decreased after torsion, the integrity of the tubule epithelium was not disrupted in the groups receiving hesperidin and the cells with spermatozoa in the lumen had a normal appearance and Johnsen scores increased. These results suggest that hesperidin may be a possible protective agent against histopathologic changes in the testis due to torsion and detorsion and the resulting deterioration in spermatogenesis.

Keywords: ER stress, Germ cell apoptosis, Hesperidin, Oxidative stress, Testicular torsion

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Testis dokusu erkeklerde hem fertilité için gerekli sperm yapımı hem de sekonder seks karakterlerinin oluşturulması ve devamlılığı gibi karmaşık görevlerin uygulandığı kompleks bir yapı bütünlüğüdür. Testis torsiyonu (TT), spermatik kordun dönmesi nedeniyle testise giden kan akımının azalmasıyla meydana gelen bir klinik durumdur. Testiküler torsiyon, özellikle çocukluk döneminde sık rastlanan ürolojik acillerden biridir ve akut skrotum vakalarının %17-35'ini teşkil eder(1). Testiküler torsiyonun (TT) ağrı patofizyolojisinde, spermatik kordun dönmesi nedeniyle venöz dönüşdeki bozulma, venlerin tıkanmasına yol açar. Bu durum, testiste ödem oluşumuna ve arteriyel kan akımının kaybına neden olur. Sonuç olarak, testisin nekrozu ve organ kaybıyla sonuçlanabilecek ciddi bir durum ortaya çıkar(2).

TT, genç erişkin döneminde herhangi bir zamanda meydana gelebilse de, genellikle iki belirgin dönemde pik yapar: yeni doğan dönemi ve 12-16 yaş arasındaki adölesan dönem(3). Soğuk ortam maruziyeti, yüzme veya cinsel aktivite ile kremasterik refleksin uyarılması, inmemiş testis, inguinal ve skrotal cerrahi öyküsü, travma ve uzun spermatik kord gibi durumlar, testisin tunika vaginalis içinde aşırı hareket etmesine yol açabilir. Bu koşullar, ayrıca ailesel yatkınlıkla birlikte Bell-Clapper deformitesi gibi yapısal anormalliklerin varlığı, testis torsiyonu (TT) açısından risk faktörleri oluşturur.

Testiküler torsiyonun (TT) öykü ve fizik muayene bulgularında, ipsilateral kremasterik refleksin yokluğu, bulantı/kusma ve skrotal ciltteki değişiklikler, TT'nin önemli belirteçleri olarak tanımlanmıştır(4). Adölesan dönemdeki hastalar genelde skrotal ağrı ile başvurur. Kusma (%10-60) ile birlikte “ani başlayan, şiddetli” testis ağrısı TT için tipiktir.

Ayırıcı tanı için çoğu vakada hastanın anamnezi ve fizik muayene bulgusu yeterli olmayabilir. En sık kullanılan görüntüleme yöntemi %1'lik yanlış negatiflik oranıyla son derece duyarlı (%88,9) ve spesifik (%98,8) bir tanı aracı olan Doppler Ultrasonografidir(USG) (5). Sintigrafi ve skrotumun dinamik kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yöntemleri, ultrasonografi (USG) ile benzer duyarlılık ve özgüllük sunmaktadır. Bu incelemeler, tanı olasılığının daha düşük olduğu ve testiküler torsiyonun anamnez ve fizik muayene ile dışlanamadığı durumlarda kullanılabilir.

Testiküler torsiyonun (TT) ayırıcı tanısında idiyopatik skrotal ödem, kabakulak orşiti, epididimit, varikosel, testis tümörü, inkarsere herni, hidrosel, apandisit, sistemik hastalıklar ve travmaya bağlı olarak gelişen testiküler hematoma, kontüzyon, rüptür ve dislokasyon gibi akut skrotum benzeri ağrıya yol açabilecek diğer nedenler de dikkate alınmalıdır(6).

Testiküler torsiyonun (TT) tedavisinde ilk adımlardan biri cerrahi eksplorasyon sırasında testisin kurtarılma şansını artıran manuel detorsiyon işlemidir. Mümkünse anestezi olmadan gerçekleştirilen ve uygun hastalarda uygulansı gereken bu işlemi ve cerrahi eksplorasyon ve orşiopeksi takip etmelidir(7).

Testiküler torsiyon (TT), acil cerrahi müdahale gerektiren bir durumdur. Testisin erken kurtarılma oranının en önemli iki belirleyicisi, semptomların başlangıcı ile detorsiyon arasında geçen süre ve kordun torsiyon derecesidir. Erken dönemde, ortalama torsiyon süresi 13 saatten az olan vakalarda fertilitenin korunduğu gözlemlenmiştir. Semptom başlangıcından sonraki 24 saat içinde tüm TT vakalarında acil cerrahi müdahale gereklidir. Uzamış torsiyon vakalarında, detorsiyon ile birlikte fiksasyon yerine orşiektomi yapılması bir alternatif olarak değerlendirilebilir(8).

Testis torsiyonu ve erken dönemde farkedilmesi durumunda yapılan detorsiyon işlemi testis dokusuna farklı mekanizmalar ile zarar verebilmektedir. Bu durumların ilki torsiyon sırasında testise yeterli kan akımı olmaması nedeniyle dokuda iskemi durumu oluşmasıdır. Diğer bir durum ise testis detorsiyone edildikten ve kan akımı tekrar sağlandıktan sonra kan akımı ile gelen oksijen moleküllerinin dokuda oksijen radikalleri aracılığıyla testisin yapı bütünlüğünün bozulmasına neden olmasıdır.

Endoplazmik retikulum (ER), hücre içi protein homeostazisinin sürdürülmesinde, proteinlerin doğru üç boyutlu yapılarının elde edilmesinde ve kalsiyumun depolanmasında görev yapan çok önemli bir hücresel organelidir. ER'deki doğru protein katlama mekanizması; oksidatif stres, hipoglisemi, iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı, enfeksiyon ve inflamasyon gibi patolojik durumlarda bozulmaktadır(9). Bu stres koşulları altında ER'de yanlış katlanmış proteinler birikir ve bu patolojiye "ER stresi" adı verilir. Artmış ER stresine sahip hücreler, yanlış katlanmış proteinleri uzaklaştırmak için katlanmamış protein yanıtı (UPR) yolunu aktive eder(10). ER stresi sonucunda hatalı katlanmayı tamir mekanizmaları yeterli olmadığında ER stresine bağlı olarak hücrelerde apoptoz gerçekleşir.

UPR yolu üç ER sensörü tarafından kontrol edilir: inositol-requiring enzyme 1 alpha (IRE1 α), protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) ve activating transcription factor 6 (ATF6) (11). GRP78, ER homeostazisinin merkezi düzenleyicisidir(12). Patolojik koşullar altında GRP78, UPR yolunun etkinleştirilmesine neden olan üç ER stres sensörünü serbest bırakır. Bu nedenle GRP78 ekspresyon düzeyi doğrudan ER stresinin yoğunluğuyla ilişkilidir(11). ATF6 başka bir ER stres belirteci olarak kabul edilir.

Özellikle çeşitli çalışmalar, doğal bileşiklerin, UPR bileşenlerini hedef alarak ve ER stresini azaltarak I/R hasarıyla ilişkili apoptozu önleyebildiğini ortaya koymuştur(10).

Flavonoidler, insan sağlığı üzerinde faydalı etkileri olan doğal bileşiklerdir ve bitkilerde bulunurlar. Flavonoidlerin yapısı, iki fenolik halka ile bağlı bir heterosiklik (C) halka içeren 15 karbonlu bir iskelete dayanmaktadır. Bu bileşiklerin karakteristik özellikleri, özellikle heterosiklik halkadan kaynaklanmaktadır. İnsan diyetinde yaygın olarak bulunan fenolik bileşenler arasında yer alan flavonoidlerin şimdiye kadar 5000'den fazla farklı türü tanımlanmıştır. Flavonlar, flavonoller, flavanonlar, isoflavonoidler, neoflavonoidler, flavanoller (flavan-3-oller ya da kateşinler), antosiyanidinler ve kalkonlar olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar(13).

Turunçgillerde bulunan bir flavanon glikozidi olan hesperidin, antiinflamatuvar, antioksidatif ve antikanser etkileriyle iyi bilinen bir antioksidandır. Hesperidin ile ilgili son biyolojik çalışmalar, onun I/R hasarı sırasında oksidatif stresi azaltma ve baskılamadaki yararlılığını vurgulamıştır(14). Testiküler torsiyon modeli oluşturulan ratlarda düşük doz ve yüksek doz hesperidinin oksidan-antioksidan parametreler üzerindeki etkisi araştırılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir(15). Yine sodyum florür (NaF) ile testiküler toksisite oluşturulan hayvan modeli bir çalışmada hesperidinin ER stresini azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir(16).

Hesperidinin testis hasarı üzerindeki tedavi edici etkisiyle ilgili çalışmalar mevcuttur. Fakat testiküler torsiyon modelinde ER stresini üzerine koruyucu etkisi ile ilgili literatürde yeterli çalışma mevcut değildir. Bu çalışmayı diğerlerinden ayıran en önemli nokta hesperidinin testiküler torsiyon modeli aracılığıyla iskemi ve reperfüzyon hasarının ER stresini, steroid hormon sentezi, germ hücre apoptozu üzerine olan olası koruyucu etkilerinin incelenmesidir.

Bu çalışmada, testis torsiyonu ve detorsiyonu durumlarında flavonoidlerden biri olan hesperidinin oksidatif stres, endoplazmik retikulum (ER) stresi, steroid hormon sentezi ve germ hücre apoptozu üzerindeki olası koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Testisin Anatomisi, Histofizyolojisi, Embriyolojisi

4.1.1. Testisin Anatomisi

Sperm denilen erkek üreme hücrelerinin yapıldığı ve testosteron üretiminin gerçekleştiği bir çift organ olan testislerin her biri yaklaşık 10-15 gr ağırlıkta, 4.5 cm boyunda ve 2.5 cm çapındadır. Parankimi en dıştan en içe doğru sırasıyla tunika vaginalisin visseral yaprağı, tunika albuginea ve tunika vaskülozadan oluşan üç tabakalı bir kapsül ile çevrilidir(18).

Her iki testis, sperm üretim yeri olan 900-1000 kadar seminifer tübüllerden meydana gelmiştir. Her biri yaklaşık 8 cm kadar olan ve testis içerisinde kıvrılmış olarak bulunan tübüllerin yaklaşık 1-3 tanesi, sayıları 200-300 arasında değişen her bir lobül içerisinde bulunur.

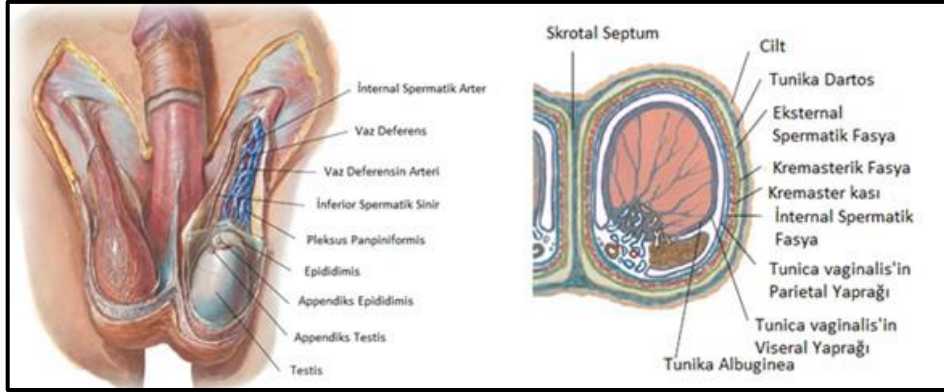
Testisin anterolateral bölümü serbest iken, posterolateral bölümü epididim, bağ dokusu ve damarlarla çevrilidir.

Testislere giden kan, iki organın ortak embriyolojik kökeninden dolayı böbreklerle yakından ilişkilidir. Testisin kanlanması a. testicularis (a. spermatica interna), a. ductus deferentis ve a. spermatica externa adı verilen 3 farklı arterden olmaktadır(18). Abdominal aortadan köken alan arteria spermatica interna, internal inguinal halka seviyesinde spermatik korda eşlik etmeye başlar ve mediastinum testis hizasında çok sayıda küçük dallar vererek testisin beslenmesini sağlar.

İntratestiküler olarak arterlere eşlik etmeyen testisin venleri plexus pampiniformiste 2 dal olarak çıkar. Bunlardan ilki anterior dal olan ve vena cavaya drene olan v. spermatica interna'dır. Bir diğeri ise posterior dal olan ve v. pudenda interna'ya drene olan v. epigastrica inferior 'dur.

Testislerden gelen lenfatik damarlar lomber lenf düğümlerine geçer ve bunlar da mediastinal düğümlere bağlanır.

Testis inervasyonu T10-11. segmentlerden gelen sinir lifleri ile sağlanır. Bu lifler sempatik-parasempatik lifleri taşır ve testosteron salgılanma regulasyonunda rol almaktadırlar(19).



Şekil 4.1. Testisin anatomisi(19)

4.1.2. Testisin Histofizyolojisi

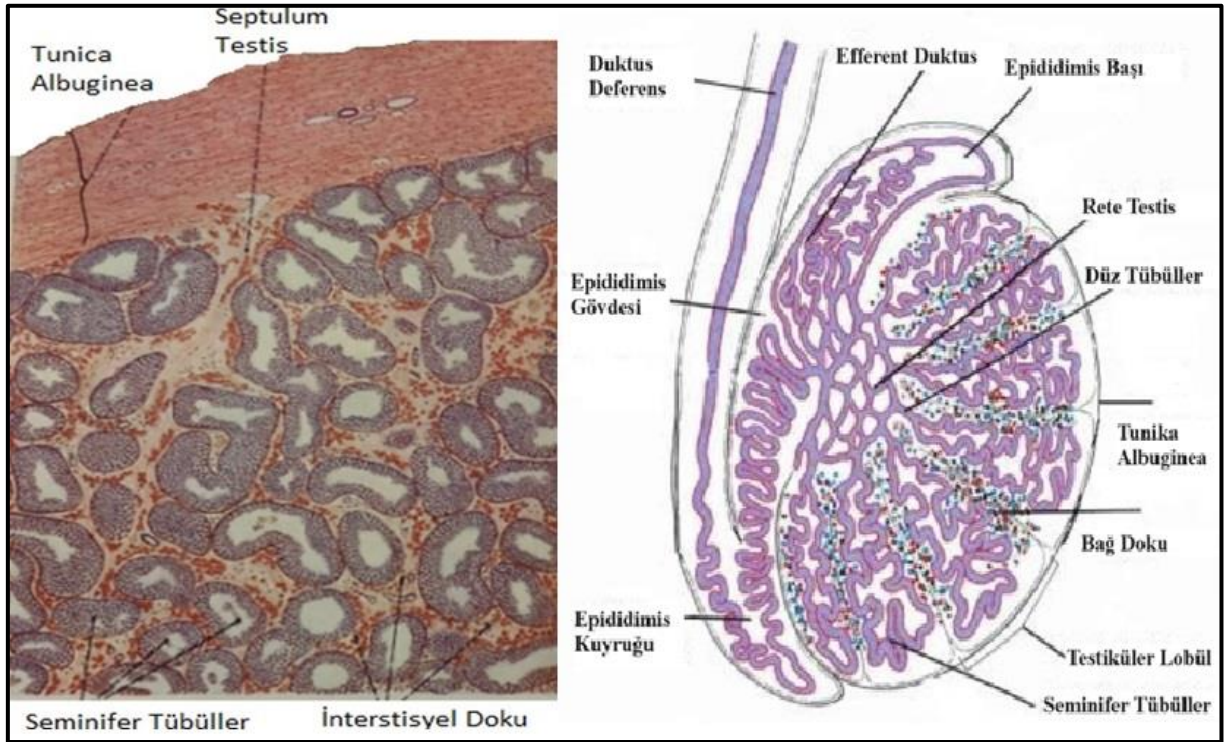
Tunika albuginea adı verilen kalın bir bağ dokusu kapsül ile çevrili olan ve bu bağ dokusunun testisin arka yüzünde kalınlaşarak oluşturduğu mediastinum testis yapısı, testis içinde fibröz uzantılar (septum) oluşturarak testisi testiküler lobüllere (piramidal bölmelere) ayırır. Her lobülde, kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel hücreler (Leydig hücreleri) içeren gevşek bağ dokusu ile çevrili 1-4 seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller sperm üretiminde görev alırken, interstisyel hücreler testosteron salgılar. Her testis, dışta paryetal, içte ise viseral bir tabakadan oluşan tunika vajinalis adı verilen seröz bir kese ile çevrilidir. Tunika vajinalis, testisin ön ve yan kısımlarını örter ve peritondan köken alır(20).

Seminifer tübüller U şeklinde ve kıvrıntılı yapıdadır ve her iki ucu rete testise açılır. Seminifer tübüller gelişmekte olan spermatogenik (germ) hücrelerini içermektedir. Seminifer tübüllerin bazal membranında sertoli hücreleri, fibrositler ve myoid hücreler gibi destekleyici elemanlar bulunur(21).

Sertoli hücreleri puberteden sonra çoğalma yeteneğini kaybeden, belirgin nükleol yapısına ve düzensiz şekilli çekirdeklere sahip, düşük mitotik indeksli hücrelerdir. Germ hücrelerinin beslenmesi, korunması, artık maddelerin fagosit edilmesi, inhibin proteinleri, folikül stimulan hormon (FSH) etkisiyle androjen bağlayıcı protein (ABP) üretimi, transferrin, seruloplazmin, antimüllerian hormon (AMH) üretim ve salınımı gibi görevleri

bulunmaktadır(22). Bunun yanı sıra pek çok büyük molekülün bazal lamina tarafından tübülün lümenine doğru geçişini engelleyen kan-testis bariyeri sertoli hücrelerinin bazal laminaya yakın kısımda birbirleri ile sıkı bağlantılar yapması sonucu oluşur.

Luteinleştirici hormon (LH) etkisi ile leydig hücrelerinden salgılanan testosteronun %35'i kanda serbest olarak bulunurken, %65'i ABP ile bağlı olarak bulunur. Testosteron yetişkinlerde spermatogenezden ve sekonder (ikincil) seks karakterlerinin oluşumundan sorumludur ve kandaki miktarı LH'nin feed-back mekanizması ile dengede tutulmaktadır.



Şekil 4.2. Testis histolojik görüntüsü (23,24)

4.1.3. Testisin Embriyolojisi

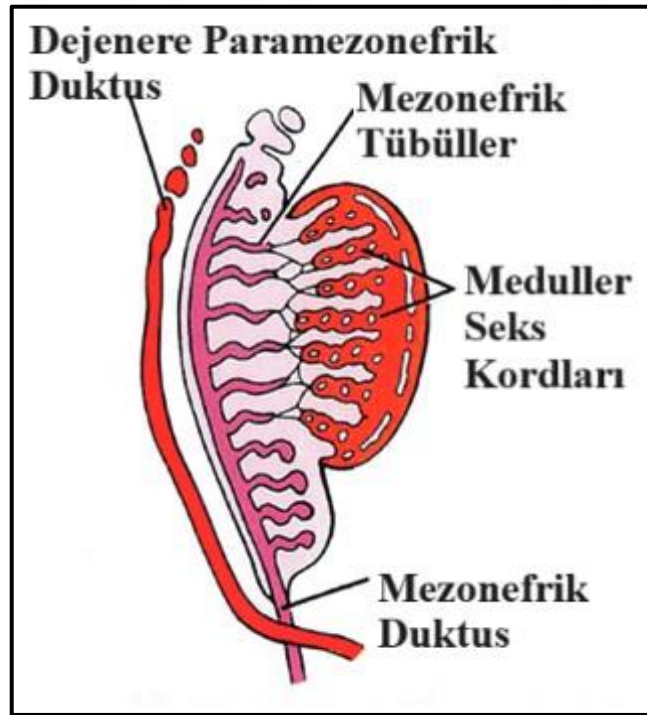
Gelişimin 5. haftasında ara mezoderm, dorsal gövde duvarı, ürogenital sırt boyunca uzunlamasına bir yükselme oluşturur.

Ürogenital çıkıntının çölemik epiteli ve altta yatan mezodermi çoğalarak gonadal çıkıntıyı oluşturur. Birincil seks kordonları gonadal çıkıntıdan gelişir ve yolk sac kesesinin duvarından gonadlara göç eden primordiyal germ hücrelerini (XY genotipi) içerir.

Y kromozomu kısa kolunda testis farklılaşması için çok önemli olan testis belirleyici faktörü kodlayan bir gen taşır. Birincil seks kordonları gonadların medullasına doğru uzanır ve kalın tunika albuginea oluştuğu yüzey epiteli ile bağlantıları kaybolur. Birincil seks kordonları seminifer kordonları, tubuli recti'yi ve rete testisleri oluşturur. Seminifer kordonlar, Müllerian inhibe edici faktör salgılayan primordial germ hücreleri ve destekleyici (Sertoli) hücrelerden oluşur. Seminifer kordonlar arasındaki mezoderm, testosteron salgılayan interstisyel (Leydig) hücrelerine farklılaşır.

Testislerin primordial germ hücreleri, destekleyici (Sertoli) hücreleri, interstisyel (Leydig) hücreleri ve bağ dokusu stroması mezoderminden türetilir. Seminifer kordonlar ergenlik çağına kadar katı kordonlar halinde kalırlar, bu dönemde bir lümen elde ederler ve daha sonra seminifer tübüller olarak adlandırılırlar(25). Gonadal sekse göre gelişen internal ve eksternal genital organlar, diferansiye olan gonadın hormonal fonksiyonuna göre belirlenmektedir(26).

Testisler başlangıçta karın içinde gelişir, ancak daha sonra üst karın bölgesinin pelvik bölgeden orantısız şekilde büyümesi sonucu skrotuma göreceli olarak inerler. İnsanlarda 10. ile 15. haftaları arasında, cinsel organların gelişiminin başlamasının hemen sonrasında başlayan testislerin inmesi 35.hafta sonunda inguinal kanaldan skrotuma geçişi ile tamamlanır(25,26).



Şekil 4.3. Testisin embriyolojisi (27)

4.2. Spermatogenez ve Johnsen Skorlaması

Spermatogenez, seminifer tübüllerde gerçekleşen, testislerdeki ilkel spermatogenik hücrelerden (spermatogonia) spermatozoa (spermiler) adı verilen erkek gametlerin oluşturulduğu süreçtir. Bu süreç yaklaşık olarak 74 gün sürer(28). Bu süreçte sertoli hücreleri, sitoplazmik bağlanma yoluyla spermatogenez için gerekli tüm malzemeleri sağlar.

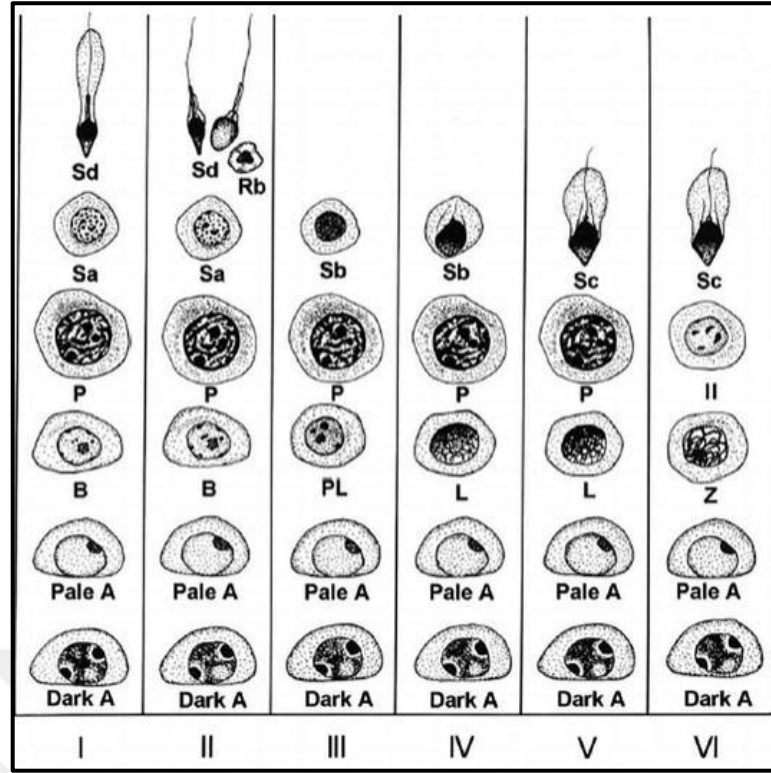
Spermatogonyumlar kendilerini yenilemenin yanı sıra, bazal membran ile temasını kaybeden hücreleri meydana getirerek, artık primer spermatosit olarak adlandırılan mayoz sürecini başlatırlar. İlk mayoz bölünmeyi tamamlayan bu hücreler, ikincil spermatosit adı verilen yavru hücreleri oluşturur ve bunlar mayoz bölünmeyi tamamlamak üzere bölünerek yuvarlak spermatidler oluşturur.

Yuvarlak spermatidler bölünmez ancak spermiyogenez evresinde golgi fazı, akrozom fazı ve maturasyon fazından geçerek olgunlaşarak spermatozoon hücrelerini oluştururlar ve bu hücreler seminifer tübülün lümenine salınırlar(29).

Testis biyopsisinin histopatolojik değerlendirmesinde spermatogenezin kantitatif olarak da değerlendirilmesi gerektiği Johnsen tarafından 1970 yılında ortaya konmuştur(30). Bu skorlamaya göre biyopside izlenen her seminifer tübülüs için skor verilerek bunların toplamı biyopside izlenen seminifer tübülüs sayısına bölünmelidir.

Tablo 4.1. Johnsen skorlaması

Skor	Karakteristik
1	Germ hücresi ve sertoli hücresi yok
2	Germ hücresi yok yalnızca sertoli hücresi mevcut
3	Yalnızca spermatogonia mevcut
4	Yalnızca birkaç spermatosit mevcut
5	Spermatozoa veya spermatid yok, ancak çok sayıda spermatosit mevcut.
6	Yalnızca birkaç spermatid mevcut
7	Spermatozoa yok ancak çok sayıda spermatid mevcut
8	Sadece birkaç adet spermatozoa mevcut
9	Çok sayıda spermatozoa mevcut ancak germinal epitel düzensiz
10	Tamamlanmış spermatogenez ve normal organize tübüller



Şekil 4.4. Spermatogenez aşamaları(27)

4.3. Testosteron Sentezi

Testosteron, 5α -dihidrotestosteron (DHT), androsteron, androstenedion, 17-hidroksiprogesteron, progesteron ve pregnenolon ile birlikte testisin ana salgı ürünüdür(31). Leydig hücreleri adrenal korteksin aksine 21β -hidroksilaz veya 11β -hidroksilaz içermez ve bu nedenle glukokortikoid veya mineralokortikoid sentezleyemez. LH (adrenal kortekste ACTH'ye paralel bir etkiyle), yoldaki ilk adım olan kolesterol desmolazı uyarak testosteron sentezini artırır. Aksesuar seks organları (örneğin prostat), testosteronu aktif formu olan dihidrotestosterona dönüştüren 5-alfa redüktaz içerir(32).

Hipotalamusun arkuat çekirdekleri hipotalamik-hipofizyal portal kana GnRH salgılar. GnRH, FSH ve LH salgılaması için ön hipofizi uyarır. FSH, spermatogenezini sürdürmek için sertoli hücrelerine etki eder. Sertoli hücreleri ayrıca FSH salgılanmasının negatif geri bildiriminde rol oynayan inhibin salgılar. LH, testosteron sentezini uyarmak için leydig hücrelerine etki eder. Testosteron, sertoli hücrelerinde FSH'nin spermatojenik etkilerini güçlendirmek için intratestiküler bir parakrin mekanizma yoluyla etki eder. Testosteron, hipotalamustan GnRH salınımını inhibe ederek ve ön hipofizden LH salınımını doğrudan inhibe

ederek LH salınımını inhibe eder. Ayrıca İnhibin, ön hipofizden FSH salgılanmasını engeller(33).

Testosteron kolesterolden bir dizi aşamada sentezlenir. LH, Leydig hücresi yüzeyinde bulunan LH ve hCG için olan LHCGR olarak adlandırılan G protein ile bütünleşmiş reseptöre bağlanarak reseptör agregasyonu ve konformasyonel bir değişiklik sonucu Gs proteinini aktive eder. Takiben siklik adenosin monofosfat (cAMP) bağlı protein kinaz A (PKA) aktive olur. PKA'nın aktivasyonu steroidogenezi ve testosteron biyosentezini regüle eden proteinlerin üretimini artırır(34).

LH ile stimüle edilen PKA'nın regüle ettiği ana proteinler şunlardır:

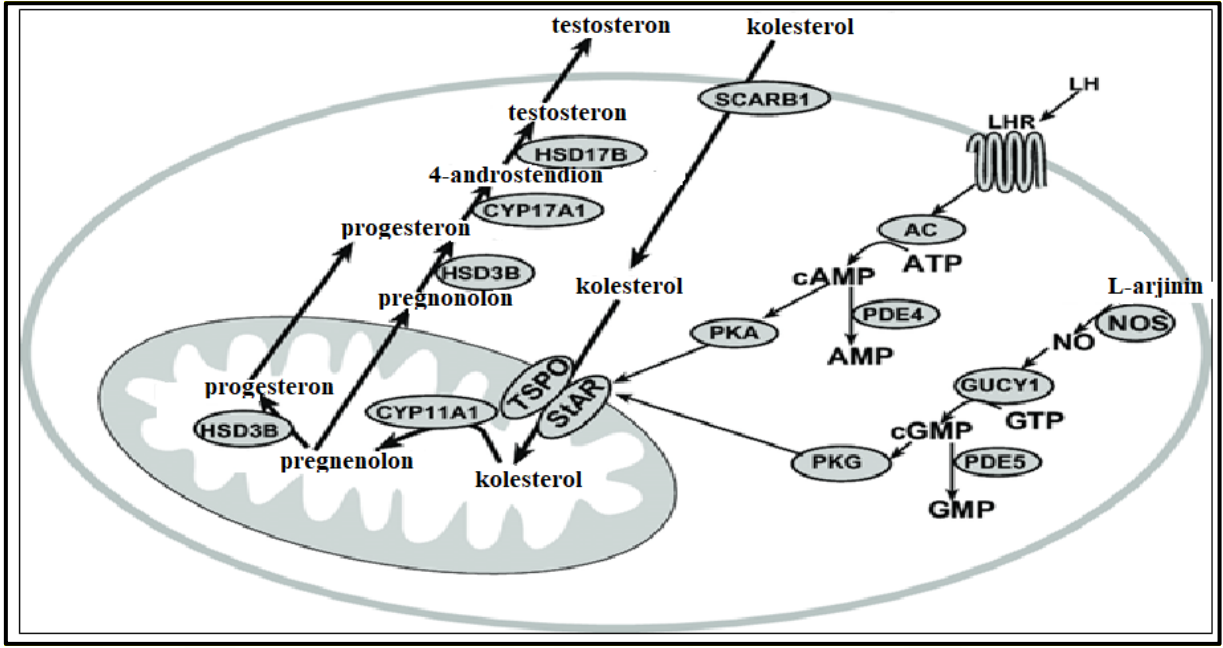
1) Steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR): Bir 30 kDa mitokondriyal faktör olan steroidojenik akut düzenleyici (StAR) protein, steroid hormon biyosentezinin önemli bir düzenleyicisidir ve kolesterolün dıştan iç mitokondriyal membrana transferini kolaylaştırır(35). Steroid üretimi için hız sınırlayıcı basamaktır.

2) Kolesterol yan zincirini kıran enzim (CYP11A1): Steroid sentezindeki ilk adım, mitokondride kolesterolün pregnenolon'a dönüşümüdür ve bu dönüşümünü sağlayan p450_{scc} enziminin ekspresyonundan CYP11A1 geni sorumludur(36).

3) CYP17 (17 α -hidroksilaz): Pregnanolonun 17-OH-pregnanolon'a dönüşmesini katalize eder. Testosteron sentezindeki ikinci enzimatik basamaktır. Takiben bir dizi sentez basamağı sonucu testosteron sentezlenir(34).

Testosteron Leydig hücre membranından pasif difüzyonla interstisyel alana geçerek ekstrasellüler sıvı ve kan plazmasında steroid bağlayan proteinler tarafından bağlanarak taşınır.

Testosteron, cinsiyet farklılaşmasının düzenlenmesinden, erkek cinsiyet özelliklerinin üretilmesinden, spermatogenezden ve fertiliteden sorumlu birincil erkeklik hormonudur. Bunun yanı sıra kemik ve kas kütlesini artırılması, lipid profilinin düzenlenmesi, insülin duyarlılığının ve eritropoezin artırılması, kan basıncının düşürülmesi gibi metabolik etkileri de bulunmaktadır(37).



Şekil 4.5. Testosteron sentezi(38)

4.4. Testis Torsiyonu

4.4.1. Tanım ve Etiyoloji

Testis torsiyonu, testisin spermatik kord boyunca bükülmesi olarak tanımlanır, bu da venöz tıkanıklığa ve zayıf arteriyel kan akımına neden olur ve sonuçta iskemiye yol açar. Morbidite ve potansiyel infertilite riski nedeniyle testis torsiyonu ürolojik bir acil durumdur.

Torsiyon öncelikle testis ve tunika vajinalisin anormal veya eksik fiksasyonu nedeniyle oluşur(39). Tunika vajinalis spermatik kordu içerir ve normalde testisin posterolateral kısmına yapışır. Eksik veya anormal bir fiksasyon, testisin spermatik kord boyunca bükülmesine neden olabilir, bu da venöz çıkışı azaltır ve testiste vasküler konjesyona neden olur. Bu, testisin şişmesine, hassaslaşmasına ve eritemli hale gelmesine neden olur ve bükülmenin devam etmesiyle arteriyel akış azalır, bu da iskemi ve hatta infertilite ile birlikte kalıcı hasara neden olur(38). İskemi en sık torsiyon başlangıcından 4-8 saat sonra ortaya çıkar(40).

Testis torsiyonu, intravajinal ve ekstravajinal torsiyon olarak ikiye ayrılabilir. Ekstravajinal torsiyon genellikle prenatal dönemde ve yenidoğan döneminde ortaya çıkar; bu durum, tunika vajinalislerin spermatik korda bağlantı noktalarının proksimalinde gelişir. Sıklıkla adölesan dönemde görülen intravajinal torsiyon ise, testis ve epididimisin uygun bir

kısının kordu skrotum içinde saran fasyaya ve kas tabakalarına normal bir fiksasyon yapamamasına bağlı olarak oluşur(41).

Torsiyonun kesin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, birkaç faktörden bahsedilmektedir. Puberte döneminde testis hacminin beş-altı kat artması, torsiyonun bu dönemde daha sık görülmesine yol açmaktadır. Ayrıca, travma ya da aşırı egzersiz, kremaster veya dartos kaslarının kasılması da torsiyonu tetikleyebilir. Sıcaklığın düşük olduğu ortamlarda torsiyonun daha sık görüldüğü bildirilmiştir(42).

4.4.2. Tanı

Testis torsiyonu çoğunlukla acil servise ani başlayan, tek taraflı, ağrı kesicilerle bile kontrol altına alınamayan skrotal ağrı ile başvurmaktadır(43). Fizik muayenede erken evrede palpe edilebilen spermatik kord zamanla ödem ve şişliğe bağlı olarak palpe edilmesi zor hale gelir. Yine kremaster refleksinin olmaması ve testisin elevasyonu ile ağrının artması, veya azalmaması (Prehn belirtisi) torsiyon lehinedir. Yenidoğanda torsiyonun lokal ve sistemik semptomları daha az farkedilebilir olup skrotal cilt ödemi, renk değişikliği, huzursuzluk, iştahsızlık gibi özellikli olmayan bulgular eşlik edebilir ve bu nedenle teşhis gecikebilir(44).

Testis torsiyonu tanısı çoğunlukla klinik olarak koyulur ve genellikle laboratuvar veya hatta görüntüleme değerlendirmesi gerektirmez. Ancak tam kan sayımı, böbrek fonksiyonu testleri, elektrolit tayini ve idrar tahlili yapılabilir(45).

TWIST (The Testicular Workup for Ischemia and Suspected Torsion) puanlama sistemi sıklıkla testis torsiyonunun varlığını belirlemek için kullanılır(46). Skor ne kadar yüksekse hastada torsiyon olma olasılığı da o kadar yüksektir. Puanı düşük olanlara USG önerilir.

Tablo 4.2. TWIST puanlama sistemi

Semptomlar	Puanlaması
Skrotal Ödem veya İnflamasyon	2
Testiste Endürasyon	2
Bulantı/Kusma	1
Kremasterik refleks yokluğu	1
Yüksek yerleşimli testis	1

Renkli Doppler USG'nin tanıda yeri önemlidir. Doppler USG ile torsiyone testiste kan akımının olmaması veya azalması torsiyon lehinedir. Anamnez, fizik muayene, laboratuvar ve Doppler USG'ye rağmen torsiyon tanısı şüpheli ise testis sintigrafisi ve dinamik kontrastlı testis MRG da tanıya yardımcı olabilir(47).

4.4.3. Tedavi

Testis torsiyonu cerrahi acil bir durumdur. Acil serviste geçirilen süre çok önemlidir, çünkü hastalar genellikle ilk olaydan birkaç saat sonra başvururlar ve kurtarma oranı en fazla 4-8 saat içinde başarılı olur. Acil yönetim, semptom yönetimi (örn. analjezikler, antiemetikler) ve operatif yönetim için acil üroloji konsültasyonunu gerektirir. Tanıdan kuvvetle şüpheleniliyorsa ileri değerlendirme yapılarak cerrahi değerlendirme ve tedavi geciktirilmemelidir(48).

Cerrahi müdahale, ameliyathanede testislerin eksplorasyonu ve intraoperatif detorsiyonu ve fiksasyonunu içerir. Uzun süreli iskemi, testis iskemisi ve nekrozuna yol açarak orşiektomiye gerektirebilir(40,48). Acil olarak ameliyat mümkün değilse, manuel detorsiyon önerilir.

Başarılı detorsiyonun belirtileri arasında ağrının azalması, testisin normal anatomik pozisyonu (yani skrotumun aşağısında uzunlamasına bir yönetime dönüşmesi) ve normal renkli Doppler USG yer alır(40,48).

4.5. İskemi - Reperfüzyon Hasarı

İskemi dokuların hipoperfüzyonu olarak tanımlanır. Sepsis, akut koroner sendrom, organ nakli ve uzuv yaralanması gibi çeşitli durumlar doku hipoperfüzyonuna neden olabilir(49). İskemi sonucunda belirli bir süre oksijenden yoksun kalan dokuda, doku hasarı veya nekroz meydana gelir(50). Reperfüzyon ise iskemi sonrasında kan akımının yeniden sağlanmasıdır. Son çalışmalar, reperfüzyonun, iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı olarak adlandırılan bir olgu olan iskemik dokuda daha sonra hasara yol açma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. İskemi-reperfüzyon hasarı, hekimlerin hücre hasarını kontrol altına alması ve organ fonksiyonlarını koruması gereken kritik bir durumdur(49).

I/R hasarının temelinde; hücre veya organel membranlarının geçirgenliğinde ve fonksiyonlarında bozulma, buna bağlı moleküler mekanizmaların hücresel hasara yol açması ve bunun sonucunda hücresel fonksiyonların geri döndürülememesi vardır. I/R hasarı için temel moleküler mekanizma hücre için gerekli olan oksijenin sağlanamamasına bağlı ATP sentezinin bozulması veya yıkımının artışıdır(51).

Hem ATP sentezinin bozulması hem de hücre içerisindeki ATP yıkımının artışı sonucunda ATP bağımlı iyon pompalarında fonksiyon bozukluğu meydana gelir ve hücre içi metabolizma anaerobik faza kayar. Bunun sonucunda biriken laktat ve hidrojen hücre içi pH'ını düşürür ve asidoz oluşur(50).

Hücre içindeki artan hidrojen iyonu yükünü dengelemek amacıyla $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ pompası kullanılarak fazla hidrojen iyonları hücre dışına atılır. Aynı zamanda $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ pompası da kalsiyumun hücre içine girmesini sağlar. Benzer şekilde, endoplazmik retikulumda da hasarlar meydana gelir ve bu durum hücre içine kalsiyum salınımına yol açarak kalsiyum seviyesinin artmasına neden olur. Bu artış, kalsiyum bağımlı proteazların aktivasyonunu tetikler(52). Yine ksantin oksidaz aracılı reaktif oksijen radikalleri miktarındaki artış sonucu hücre membranlarındaki lipid yapılarında hasar, hücre içi proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulma ve DNA'da yapısal hasar meydana getirerek hücre zedelenmesine yol açar(53).

4.6. Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ve Oksidatif Stres

4.6.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran yüksek enerjili atom veya moleküller olarak tanımlanabilir(54). Yarılanma ömürleri oldukça kısadır ve hızla tepkimeye girerler(55). Oksijenden tek elektron indirgenmesi sonucu oluşan serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidan yıkım; iskemi, hiperoksijenizasyon ve doku inflamasyonu gibi birçok olayda yer alarak hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynar(56).

Aerobik metabolizma yapan tüm canlılarda oksijenin kullanımı, mitokondriyal elektron taşıma zincirinde, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında, ayrıca oksidatif fagositoz süreçlerinde serbest oksijen radikallerinin oluşmasına yol açar. Bunun yanı sıra, kimyasallar,

sigara, alkol gibi toksinler, hava kirliliği, güneş ışığı ve X-ışınları gibi etmenler de dışsal kaynaklardan serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olur(57).

4.6.2. Reaktif Oksijen Türleri

Oksijen ayrı yörüngelerde iki eşleşmemiş elektrona sahip biradikal bir moleküldür. Hücrelerde rutin olarak meydana gelen bazı enzimatik ve enzimatik olmayan süreçlerde, O_2 tek elektronları alarak reaktif oksijen türlerini (ROT) oluşturur. ROT, oldukça reaktif oksijen radikalleri veya hücrelerde bu reaktif radikallere kolaylıkla dönüştürülebilen bileşiklerdir. Serbest radikallerin fizyolojik olaylardan ve oksidatif hasardan başlıca sorumlu yapıları ROT'lardır; ancak her ROT serbest radikal fonksiyonu göstermemektedir(54).

Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada ROT'lar oluşur. Oksijenli solunum, katabolik ve anabolik işlemler gibi normal durumlar ya da iskemi, hemoraji, travma, radyoaktivite, intoksikasyon gibi oksidatif stres yapıcı durumlar, ksenobiotik maddelerin etkisi, ilaçlar, ksantin oksidaz, indolamin dioksijenaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, monoamino oksidaz gibi oksidan enzimler, stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu, fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelial hücreler), uzun süreli metabolik hastalıklar ve yaşlanma süreci vücutta ROT üretiminin ana kaynaklarıdır(58).

Tablo 4.3. Reaktif oksijen türleri sınıflandırması (54)

Reaktif Oksijen Türleri	Reaktif Oksijen Türleri
Serbest Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, $OH^{\cdot}$	Hipobromik asit, $HOBr^a$
Hidroperoksil, $HO_2^{\cdot}$	Hipokloröz asit, $HOCl^b$
Karbonat, $CO_3^{\cdot-}$	Singlet oksijen, $O_2^1 \Delta g$
Peroksil, $RO_2^{\cdot}$	Organik peroksitler, $ROOH$
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Peroksinitrit, $ONOO^{\cdot-}$
Karbondioksit $CO_2^{\cdot-}$	Peroksinitrat, $O_2NOO^{\cdot-}$
Singlet oksijen, $O_2^1 \Sigma g^+$	Peroksinitröz asit, $ONOOH^c$
	Peroksinitrik asit, O_2NOOH^c
	Nitrozoperoksikarbonat, $ONOOOCO_2^{\cdot-}$
	Peroksomonokarbonat, $HOOCO_2$

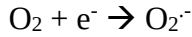
a: $HOBr$ reaktif bromin ürünü olarak da kabul edilmektedir.

b: $HOCl$ genellikle reaktif oksijen türleri içerisine dahil edilmektedir.

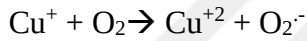
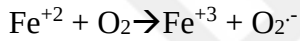
c: $ONOO^{\cdot-}$, $O_2NOO^{\cdot-}$, $ONOOH$, O_2NOOH genellikle reaktif oksijen türleri içerisine dahil edilmektedir.

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$):

Süperoksit radikali oksijen molekülüne bir elektron ilavesiyle moleküler oksijenin indirgenmesiyle oluşmaktadır(59). Hücre mitokondrisinde elektron transfer sistemi ATP'nin ana kaynağı olup, enerji dönüşümü esnasında az miktarda da olsa oluşan elektron kaçakları oksijenin süperoksit radikaline dönüşümüne neden olmaktadır. Süperoksit, elektron taşıma zincirinin hem Kompleks I hem de III'ünden üretilir ve bir kez anyonik formda olduğunda iç mitokondriyal membranı kolayca geçemeyecek kadar güçlü yüklüdür(60).

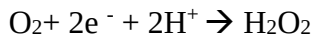
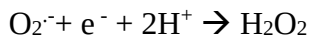


Süperoksit radikali yüksek derecede reaktif değildir ve direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır(61).

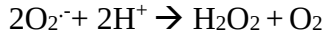


Hidrojen Peroksit (H_2O_2):

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir.



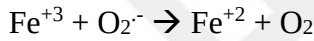
Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin üretimi süperoksidin ($O_2^{\cdot -}$) dismutasyonu ile gerçekleşir. Bu reaksiyonda iki tane süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturur. Süperoksit dismutaz enzimi bu reaksiyonu katalizler ya da spontan olarak gerçekleşir(62).



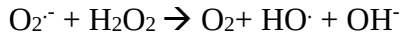
Hidrojen peroksit kendisi serbest radikal olmamasına karşın geçiş metallerinin (Fe^{+2} , Cu^+ gibi) varlığında Fenton reaksiyonu ile ve süperoksit radikallerinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu ile en güçlü oksitleyici radikallerden birisi olan hidroksil radikalini $OH^{\cdot}$ oluşturur (63). Üretilen H_2O_2 ; katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler olarak adlandırılan antioksidan enzim sistemleri tarafından ortadan kaldırılır.

Hidroksil radikali ($HO^{\cdot}$):

Hidroksil radikali $HO^{\cdot}$ Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır(62). Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldır, yarılanma ömrü çok kısadır.



(Fenton Reaksiyonu)



(Haber-Weiss Reaksiyonu)

4.6.3. Oksidatif Stres

Vücutta, hücrelerin enerji üretme süreçlerinin bir parçası olarak oksijenle çeşitli reaksiyonlar gerçekleşir. Oksidatif stres, bu reaksiyonların ürünü olan serbest radikallerin üretimi ile hücrelerin antioksidan özellikleri arasındaki dengesizliktir. Serbest radikallerin üretimini etkileyen faktörler fiziksel ajanlar, kimyasal ajanlar ve biyolojik ajanlardır(64).

Serbest radikaller, ağırlıklı olarak hücresel solunum ve normal metabolizma sırasında üretilen oldukça reaktif moleküllerdir ve bu radikaller hücresel bileşenlere zarar verebilir. Bu da nekroz veya apoptoz yoluyla hücre ölümüne yol açar(65). Bu hasar, bazı hastalıkların nedeni olarak gösterilmektedir ve vücudun yaşlanma süreci üzerinde bir etkiye sahiptir.

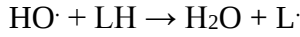
Dokuların zarar görmesini önlemek için serbest radikalleri nötralize etmek önemlidir. Antioksidan üretimi tüm serbest radikalleri nötralize etmek ve temizlemek için yetersizdir. Çok çeşitli gıdalarda bol miktarda antioksidan bulunmaktadır. Diyetle antioksidan alımı artırılarak vücudun savunma sisteminde yardımcı olunabilir. Gıda bazlı antioksidanlara örnek olarak vitaminler (E vitamini, C vitamini, beta karoten), antioksidan enzimlerin bileşenleri olan eser elementler (selenyum, bakır, çinko ve manganez) ve bazı besin dışı maddeler verilebilir(66).

Lipit Peroksidasyonu

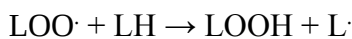
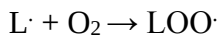
Serbest oksijen gruplarının biyolojik sistemlerdeki en önemli etkilerinden birisi lipitler üzerine olan etkileridir. Bu olay lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve kısaca hücrelerdeki zar fosfolipitlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi olarak tanımlanır. Bu olayda etkili olan oksijen metaboliti süperoksit grubu ve hidroksil grubudur(67).

Lipit peroksidasyonu başlatma, ilerleme ve sonlanım olmak üzere 3 temel aşamada meydana gelir.

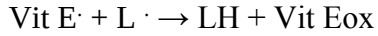
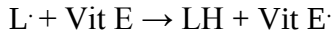
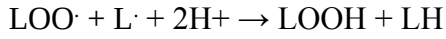
Başlatma: Çoklu doymamış yağ asitleri bir hidrojen atomu kaybettiklerinde lipit radikali ($L\cdot$) meydana gelir.



İlerleme: Karbon temelli bu molekül O_2 'yle tepkimeye girdiğinde lipit peroksidasyonunu başlatan lipit peroksil radikali ($LOO\cdot$) oluşur. Hücre membranı ve organellerde bulunan membranlar, membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitleri nedeniyle oksidatif ataklara oldukça duyarlıdırlar. Lipit peroksil çoklu doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen alarak lipit hidroperoksite ($LOOH$) dönüştürken yeni bir lipit radikali oluşumuna yol açar



Sonlanma: Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma lipidin parçalanması ile sonuçlanır. Zincir reaksiyonu, zincir kırıcı antioksidanlar (vitamin E vs.) tarafından sonlandırılabilir(68).



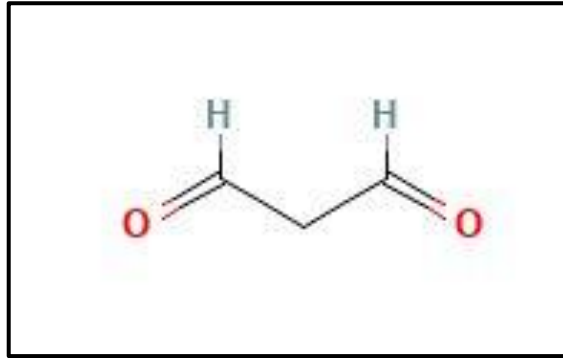
Lipit peroksitler yıkıldığında açığa çıkan yıkım ürünleri (acrolein, malondialdehit, 4-hidroksinonenal) biyolojik olarak aktiftir. Bunlar ya hücrede metabolize edilir ya da hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayar. Lipit peroksitlerinin derişimleri arttıkça membranların akışkanlıkları azalır, kalsiyum gibi iyonların hücre içine geçişi kolaylaşır ve hücre işlevlerinde bozukluklar ortaya çıkmaya başlar(69).

4.7. Oksidatif Stres Belirteçleri

Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), araşidonik asidin ve daha büyük çoklu doymamış yağ asitlerinin enzimatik veya enzimatik olmayan yolla ayrışması sonucu oluşan son üründür. Yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir göstergesi olmamakla beraber lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. 1960'lerden bu yana, in vivo ve in vitro olarak oksidatif stres seviyesini ölçmek için bu molekül değerlendirilmiştir(70).

Kimyasal olarak MDA, ökaryotlar arasında yaygın olarak bulunan, karbon 1 ve karbon 3 pozisyonlarında iki aldehit grubu bulunan üç karbon molekülünden oluşan küçük ve reaktif bir organik moleküldür(71). MDA oluşumu ROT tarafından nonenzimatik olarak veya lipoksigenaz aktivitesi tarafından enzimatik olarak indüklenebilir. Her iki durumda da, birincil lipit hidroperoksit ürünlerinin miktarının belirlenmesi, kararsızlıkları ve reaktiviteleri nedeniyle zordur. Bu nedenle, lipit peroksidasyonunun ölçümü genellikle MDA gibi bu ilk hidroperoksit aldehitlerden türetilen ikincil oksidasyon ürünlerinin konsantrasyonu ölçülerek tahmin edilir(72).



Şekil 4.6. Malondialdehit (MDA) kimyasal yapısı(71)

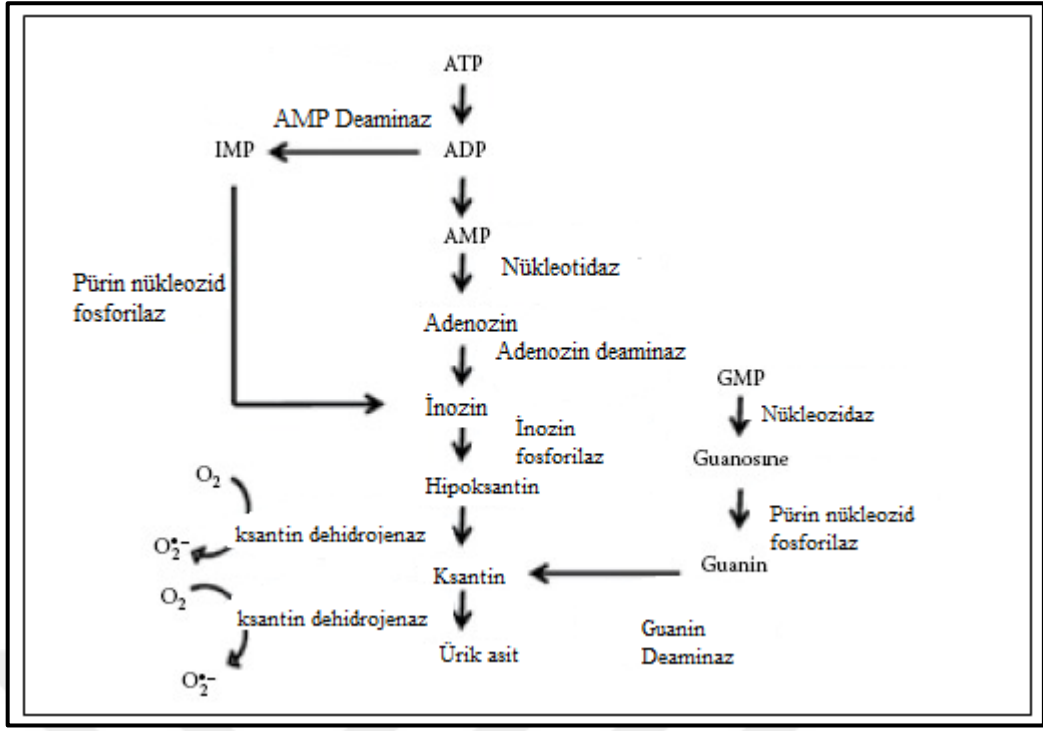
Ksantin Oksidaz (XO)

Ksantin oksidaz, pürin nükleotidlerinin parçalanmasıyla ürik asit üretimi için gerekli olan enzimdir. Ürik asidin kendisi ve enzimatik reaksiyon sırasında açığa çıkan reaktif oksijen türleri vücut üzerinde zararlı etkilere sahip olabilmektedir(73).

XO; flavin adenin dinükleotid, bir molibden ve dört demir-sülfür eki içeren yaklaşık 290kD net moleküler kütleye sahip molibden ailesine üye bir bileşiktir. Enzim ayrıca ksantin dehidrojenaz (XD) aktivitesine de sahip olabilir. Dehidrojenaz, hafif proteolitik modifikasyon ile oksidaza dönüştürülür(74).

Bir dizi reaksiyonla pürinler, guanin monofosfat (GMP) ve adenozin monofosfat (AMP) ya hipoksantin ya da ksantine dönüştürülür. Hipoksantin ve ksantin parçalanma reaksiyonu XO tarafından ürik aside katalizlenir(74). Bu enzim memeli hücreleri için hayati önem taşır çünkü hücre döngüsü vücutta sürekli devam eden bir süreçtir ve endojen olarak üretilen veya dışarıdan alınan pürinler sürekli olarak bozulur ve yenilenir. XO'nun bir başka formu da ksantin dehidrojenazdır (XD). Her iki form da birbirine dönüştürülebilir ve aynı reaksiyonları katalize eder. Ancak, kullanılan kofaktörler bakımından farklılık gösterirler; XO substrat olarak oksijen kullanırken, XD aynı reaksiyonu gerçekleştirmek için NADH kullanır(75). XO tarafından gerçekleştirilen reaksiyon, oksijeni bir süperoksit anyonuna indirger ve bu da sonunda hidrojen peroksit dönüşür.

Hidrojen peroksit bir ROT'tur ve fazlası bütün hücreler için toksiktir. Ayrıca yaşlanma, diyabet ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklar gibi çok sayıda durumla da bağlantısı vardır(76).



Şekil 4.7. Pürin nükleozid katabolizması(74)

4.8. Antioksidan Sistem

Vücutta reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyen ve bu maddelerin neden olduğu hasarı önleme görevi gören, normal hücre metabolizmasının toksik yan ürünü olan serbest radikalleri etkisiz hale getirerek koruyucu etki gösteren savunma sistemine antioksidan sistem adı verilir. Antioksidanlar fazla miktardaki reaktif türleri dengeleyerek dejeneratif hastalık gelişimi riskini azaltabildiğinden, insan sağlığı için hayati öneme sahiptir(77). Çeşitli hastalık durumlarında oksidanlar artabileceğinden, dışsal kaynaklardan antioksidan alımı çok önemlidir. Bazı antioksidanlar doğal olarak endojen sentezlenebilirken bazıları beslenme yoluyla eksojen olarak vücuda alınır(78).

Çeşitli antioksidan sınıfları arasında süpeoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimatik antioksidanlar; ürat, askorbat, glutatyon ve flavonoidler gibi hidrofilik olanlar; tokoferoller, karotenoidler ve ubikinol gibi lipofilik olanlar sayılabilir(79).

Endojen Antioksidanlar

Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki alt grupta değerlendirilebilir.

Enzimatik Antioksidanlar

Superoksit dismutaz(SOD), katalaz(KAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) en iyi bilinen enzimatik antioksidanlardır. ROT'a karşı yüksek afiniteye sahip oldukları için oksidatif stres durumunda daha etkin koruma sağlarlar.

Superoksit Dismutaz (SOD)

Cu, Mn, Zn ve diğer metal iyonlarını içeren bir metalloenzim olan SOD, tüm aerobik organizmalarda ve ROT aracılı oksidatif strese duyarlı tüm subselüler kompartmanlarda bulunan en etkili intrasellüler enzimatik antioksidandır(80). Radikal zincir reaksiyonlarının başlatıcısı olarak değerlendirilen süperoksit radikalının oksijene dismutasyonunu gerçekleştiren ve daha az reaktif bir molekül olan hidrojen peroksit oluşumuna sebep olan bir antioksidan enzim olan SOD, oksidatif strese karşı savunmada ilk basamak olarak kabul edilmektedir. Hidrojen peroksit de katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler tarafından temizlenmektedir(81).



Serbest radikalleri ortadan kaldırma sürecinde SOD, toksik ara ürünleri metabolize ederken maksimum katalitik aktivite göstermek için demir, manganez veya bakır ve çinko gibi kofaktörlere ihtiyaç duyar.

Tablo 4.4. Antioksidanların sınıflandırılması(82)

ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR	
Süperoksit Dismutaz (SOD) Katalaz (KAT) Glutasyon Peroksidaz(GSH-Px) Glutasyon Redüktaz (GR)	Glutasyon Melatonin Ürik asit Bilirubin Albumin	Koenzim Q10 Selenyum α - lipoik asit Transferrin Serüloplazmin
EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR		
VİTAMİN EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR	İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR	
α -Tokoferol (Vitamin E) β -karoten (Vitamin A) Askorbik asit (Vitamin C) Folik asit (Vitamin B9)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar) Rekombinant süperoksit dismutaz Trolox-C (vitamin E analoğu) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin) Nötrofil adezyon inhibitörleri Sitokinler (TNF ve IL-1) Barbitüratlar Demir şelatörleri	

Ökaryotlardaki SOD'lar bağlayıcı metal kofaktörlerine ve hücrel lokalizasyonlarına göre sitoplazmada bulunan veya ekstraselüler sıvıya salgılanan bakır-çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD veya SOD1), mitokondriyal matrikste bulunan manganez içeren süperoksit dismutaz (Mn-SOD veya SOD2) ve ekstraselüler süperoksit dismutaz (EC-SOD veya SOD3) olmak üzere 3'e ayrılır(83). SOD'un oksijen toksisitesine karşı önemli bir hücre içi koruyucu olduğu ve yapılan çalışmalara göre serbest radikalleri temizleyerek oksidatif hasarı azalttığı, yaşlanmaya karşı savaştığı, kanser gibi hastalıkların engellenmesinde rol oynadığı, oksidatif stresle ilişkili hastalıkların tedavisini güçlü bir şekilde desteklediği ve gösterilmiştir(84).

Tablo 4.5. SOD türleri ve yerleşimleri(83)

Tip	Yerleşim	Metal Kofaktörü
SOD1 (Cu/ZnSOD)	Sitoplazma, mitokondrinin zarları arası ve diğer (nükleus, lizozom, peroksizom)	Cu^{+2}
SOD2 (Mn-SOD)	Mitokondriyal matriks	Zn^{+2}
SOD3 (EC-SOD)	Ekstrasellüler matriks, hücre yüzeyi ve ekstraselüler sıvı	Cu^{+2} Zn^{+2}

Katalaz (KAT)

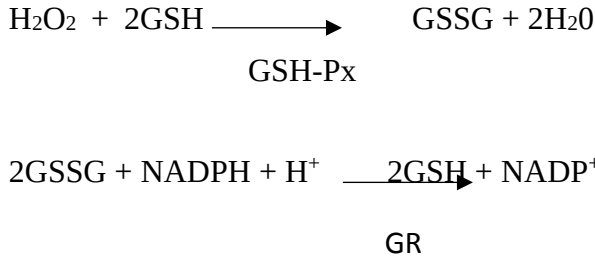
Katalaz, hidrojen peroksitin, H₂O ve O₂'ye dönüşümünü katalize eden, stres koşullarında ROT detoksifikasyonu için vazgeçilmez olan tetrahedral olarak düzenlenmiş, her biri aktif bir hem grubu ve NADPH içeren 60 kDa alt birimden oluşan dört özdeş tetramerik bir enzimdir(85).

Katalaz, büyük ölçüde peroksizomlar gibi hücre içi organellerde ve daha az olarak mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur. Hidrojen peroksit bir radikal olmamasına ve biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile reaksiyona girmemesine rağmen, Cu ve Fe iyonlarının katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile en reaktif oksijen türü olan hidroksil radikali(OH[·]) oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır. Bu nedenle katalaz önemli bir antioksidan enzim olarak kabul edilmektedir(86).



Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon, neredeyse bütün ökaryotik hücrelerde sentezlenen, hücrenin redoks durumunu korumada, detoksifikasyon sisteminin çalışmasında, eikozanoidlerin sentezlenmesinde, hücre sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde, gen ekspresyonunda ve apoptozisde yer alan bir antioksidandır(87). Her bir alt birimi bir selenyum atomu içeren dört protein alt biriminden oluşan glutasyon peroksidaz(GSH-Px) ise elektron kaynağı olarak glutasyonu (GSH) kullanarak H₂O₂'yi ve organik hidroperoksitleri metabolize eden bir enzimdir. GSH-Px enzimi aktif bölgesinde selenyum içerip içermemelerine göre ikiye ayrılır. Aktif bölgesinde selenyum içeren selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz(Se-G GSH-Px) H₂O₂ ve organik hiperoksitlere karşı etkilidir. Selenyuma bağımlı olmayan glutasyon peroksidaz (GST) ise daha çok organik hidroperoksitlerin metabolize edilmesinde faaliyet gösterir. Bu sırada GSH, hidrojen verici olarak hareket ettiğinden dolayı H₂O₂ ve hidroperoksitler indirgenirken GSH glutasyon disülfite (GSSG) okside olur(88). Oksitlenmiş glutasyon (GSSG) oluştuğunda, redoks siklusunda glutasyon redüktaz ile sülfidril formuna indirgenmelidir. Glutasyon redüktaz(GR), bir flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir ve elektronlarını NADPH'den GSSG'nin disülfid bağına transferini katalizler. Bu sebeple NADPH serbest radikal hasarına karşı korunma için gereklidir(89).



4.9. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER), zar proteinlerinin sentezi, katlanması ve olgunlaşmasında kritik bir rol oynar. Ayrıca, olgunlaşan proteinlerin Golgi aparatına geçişinde de merkezi bir öneme sahiptir. Yeni sentezlenen proteinler, ER lümeninde N-glikozilasyon, disülfid bağ oluşumu, oligomerizasyon ve hidroksilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlara uğrar(90). ER aynı zamanda uygun protein katlanmasını sağlayarak kalite kontrolünü sağlayan bir dizi şaperon proteinini de barındırır.

ER stresi sonucu oluşan protein birikimi, hücrelere zarar vererek tip 2 diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıkların yanı sıra Parkinson, Alzheimer, serebral iskemi, uyku apnesi ve multipl skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde de önemli bir rol oynar(91).

Stres dönemleri sırasında ER, protein katlanmasındaki patolojik değişiklikleri çözmek amacıyla katlanmamış protein tepkisi (UPR) olarak adlandırılan bir dizi başa çıkma mekanizmasını başlatır(92). UPR aktivasyonu sonucunda, protein katlanmasındaki kusurların giderilmesine yardımcı olmak için hücresel transkripsiyonel, translasyonel ve yıkım yolları yeniden yapılandırılır(93).

ER lümeninin izlenmesi ve UPR'nin sinyalizasyonu, PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase), IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1) ve ATF6 (Activating Transcription Factor 6) adı verilen 3 ER-membran ilişkili protein aracılığıyla(90). UPR'nin ilk aşaması; salgı aparatının genişletilerek, ER hacminin artırılması, yeni sentezlenen proteinlerin yükünün azaltılarak, ER ile ilişkili yıkım (ERAD) olarak adlandırılan bir işlemle katlanmamış proteinlerin ER'den uzaklaştırılmasının artırılması ve otofajinin uyarılarak ER ile ilişkili stresin çözülmesinin amaçlanmasıdır(94). Bu nedenle UPR, salgı hücre tiplerinde özel öneme sahip önemli bir fizyolojik adaptasyon mekanizması olarak hizmet eder. Ancak stresin üstesinden gelmeye yönelik bu girişimler başarısızlıkla sonuçlandığında hücre ölümü meydana gelir(95).

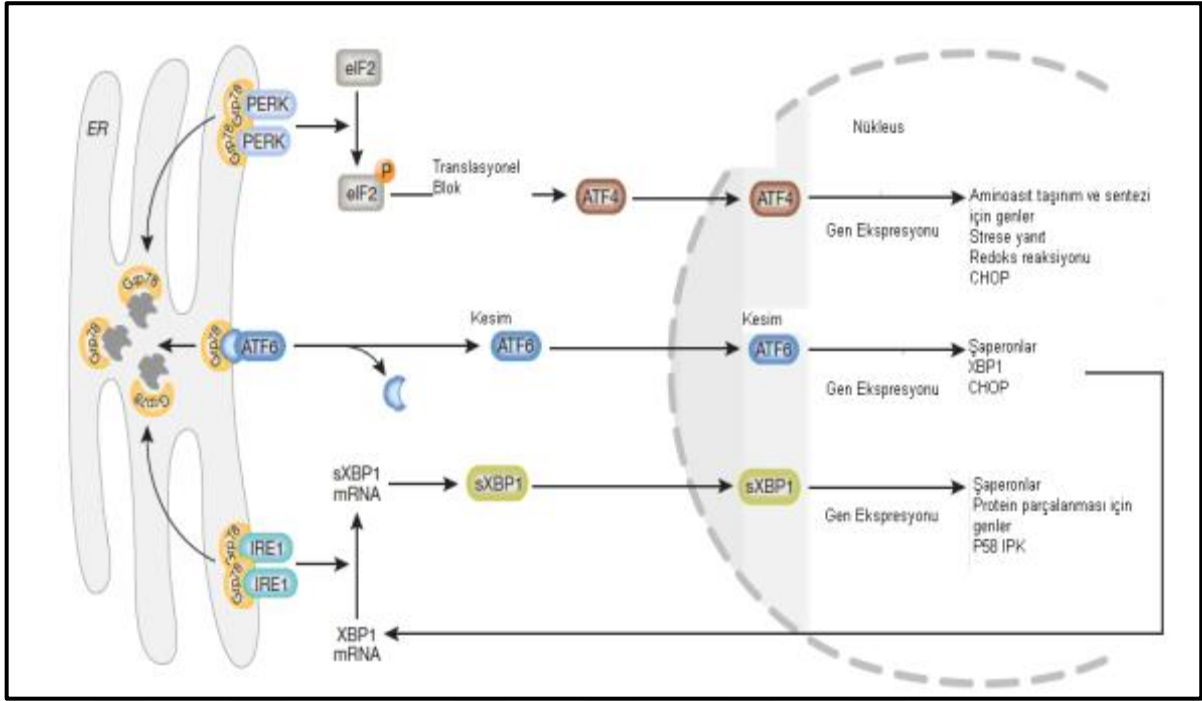
Glukoz ile düzenlenen protein 78 (GRP78)

ER'nin normal işlevi için gerekli olan ER şaperonlarından en iyi karakterize edilenlerinden biri, BiP veya HSPA5 olarak da adlandırılan 78-kDa büyüklüğündeki glukozla düzenlenen protein 78 (GRP78)'dir. GRP78, yalnızca ER'de değil, aynı zamanda nukleus ve mitokondride de bulunur.

GRP78, yeni sentezlenen polipeptitlerin ER membranı boyunca doğru konumlandırılmasına, proteinlerin katlanmasına ve bir araya getirilmesine yardımcı olur. Ayrıca, yanlış katlanmış proteinlerin hedeflenmesi için ERAD (endoplazmik retikulumda doğru katlanmamış proteinlerin parçalanması) sürecinde yer alır, kalsiyum homeostazını düzenler ve ER stres sensörü olarak işlev görür. Antiapoptotik özelliklere sahip büyük bir ER şaperonu olarak, UPR (unfolded protein response) sinyalizasyonunun aktivasyonunu kontrol etme yeteneği sayesinde ER stresinin ana düzenleyicisi konumundadır. Ayrıca, UPR dışında embriyolojik gelişim, kanserin ilerlemesi ve ilaç direnci gibi süreçlerde de rol oynamaktadır(96). GRP78, ER homeostazisinin merkezi düzenleyicisidir. Patolojik koşullar altında GRP78, UPR yolunun etkinleştirilmesine neden olan üç ER stres sensörünü serbest bırakır. Bu nedenle GRP78 ekspresyon düzeyi doğrudan ER stresinin yoğunluğuyla ilişkilidir(11).

Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)

ATF6, hücrede endoplazmik retikulum (ER) stresi olmadığında, ER membranında GRP78 ile birlikte inaktif bir durumda bulunur. ER stresi meydana geldiğinde, GRP78, protein katlanmasına yardımcı olmak üzere lümene gönderilirken ATF6 da posttranskripsiyonel modifikasyona uğrar. Golgiye taşınan ATF6, site1 proteaz (S1) ile etkileşerek kesilir. Ardından site2 proteaz (S2) tarafından daha da kesilen ATF6, nukleusa geçer ve burada ER yanıt elementi ile bağlanır. Bu süreç, GRP78 ve GRP94 gibi ER şaperonlarının ekspresyonunu artırarak, bu proteinlerin sentezini artırır. Sonuç olarak, ER katlama kapasitesi yükselir ve hücre, stresle başa çıkma mekanizmalarını güçlendirir(97).



Şekil 4.8. UPR sinyal yolağı (98)

4.10. Apoptoz

ER stresinin neden olduğu apoptoz, öncelikle Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilen mitokondriyal yol yoluyla ilerler. Katlanmamış proteinler ER lümeninde biriktiğinde GRP78'e bağlanırlar ve bu da UPR'yi indükleyen ER stres sensörleri ATF6, PERK ve IRE1'in aktivasyonuna yol açar. UPR, translasyonun aşağı doğru regülasyonunu ve ER homeostazisini ve hücre hayatta kalmasını teşvik eden genleri düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu içerir. Bununla birlikte, uzun süreli veya şiddetli ER stresi sırasında apoptozu indükleyen genler yukarı doğru düzenlenir.

ER'la bağlantılı apoptozisin indüklenmesinde sistein proteaz ailesinin üyesi olan kaspazlar önemli rol oynarlar. Özellikle kaspaz 12, 3 ve 9'un rolleri ER stresıyla ilgili çalışmalarda önemli bir şekilde gösterilmiştir. Kaspaz 12, ER stresıyla indüklenen apoptozda anahtar bir medyatör olarak kritik bir öneme sahiptir(99). Kalsiyum tarafından aktive olan stoplazmik proteazlar olan kalpainler, kaspaz 12'yi aktive eder. Bu aktivasyon, sırasıyla kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün aktivasyonuna yol açarak sonunda apoptoz sürecini tetikler.

Kaspaz-3

Kaspaz-3 aynı adlı gen tarafından kodlanan, hücre apoptozunun yürütme aşamasında merkezi bir rol oynayan sistein-aspartik asit proteaz (kaspaz) ailesine ait bir proteindir. Kaspaz-3, apoptotik yolda merkezi bir oyuncudur; burada, iltihaplanmaya neden olmadan kontrollü hücre parçalanmasını sağlamak için çeşitli hücresel proteinleri parçalayarak bir uygulayıcı olarak görev yapar. Bu süreç normal gelişim, doku homeostazisi ve hasarlı veya istenmeyen hücrelerin vücuttan uzaklaştırılması için gereklidir.

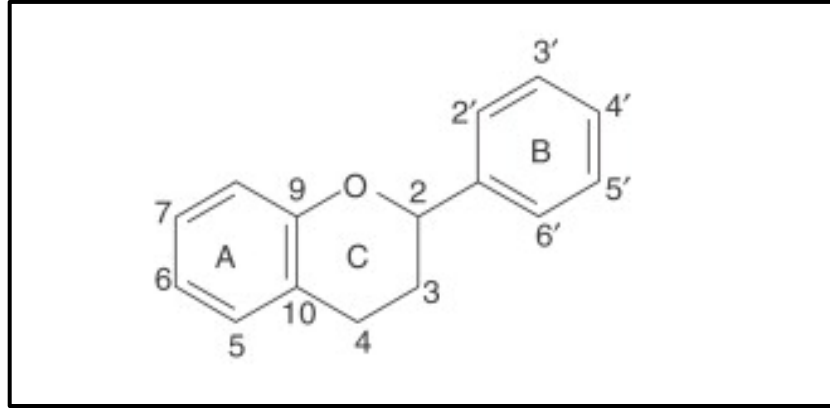
Apoptoz, DNA hasarı, büyüme faktörünün çekilmesi veya bağışıklık sistemi sinyalleri gibi çeşitli sinyallerle tetiklenir. Bu sinyaller, kaspaz-8 veya kaspaz-9 gibi başlatıcı kaspazların farklı yollardan aktivasyonuna yol açar. Başlatıcı kaspazlar aktive edildikten sonra kaspaz-3'ü parçalayıp aktive ederler. Aktive edilen kaspaz-3, yapısal proteinler ve DNA onarım enzimleri dâhil olmak üzere çeşitli hücresel proteinleri parçalar. Bu bölünme süreci hücrenin yapısal bileşenlerini parçalara ayırarak hücrenin büzülmesine ve parçalanmasına yol açar(100).

Hücresel proteinlerin kaspaz-3 tarafından bölünmesi, apoptotik hücrelerde DNA parçalanması, membran taşması ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi karakteristik değişikliklere yol açar. Apoptotik hücre ve onun parçaları daha sonra tanınır ve komşu hücreler veya fagositik bağışıklık hücreleri tarafından yutulur, böylece zararlı hücresel içeriklerin çevredeki dokuya salınması önlenir. Kaspaz-3 gibi kaspazların aracılık ettiği apoptoz, inflamasyonu tetiklemeden, doku bütünlüğünü korumak ve inflamasyona bağlı hasarı önlemek için çok önemli olan düzenli bir süreçtir(101).

Hesperidin

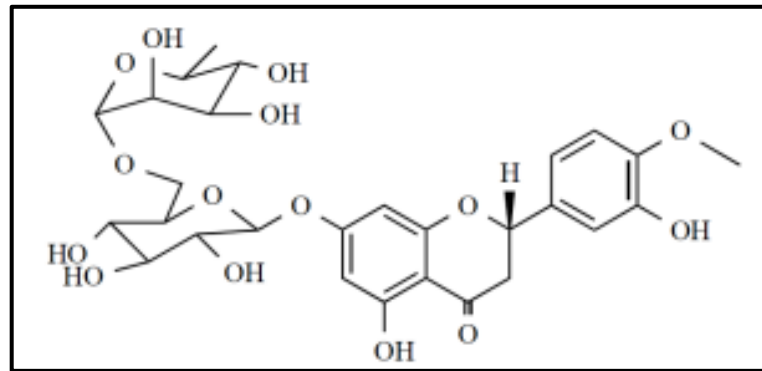
Gıdaların olası faydalı etkileri mikro besinlerden (örneğin vitaminler ve mineraller), fonksiyonel gıda ve antioksidan içeriklerinden yani “fitokimyasal maddelerden” kaynaklanmaktadır. Fitokimyasallar, meyve ve sebzelerde bulunan ve günlük olarak alındığında, kronik ve dejeneratif hastalıkların önlenmesini sağlayacak şekilde insan metabolizmasını düzenleme potansiyeli olan maddeler olarak tanımlanabilir(102). Günümüzde önemli fizyolojik etkilere sahip olabilecek binlerce fitokimyasal üzerinde birçok çalışma yapılmaktadır. Fitokimyasallar arasında flavonoidler turuncgillerde yaygın olarak bulunmaktadır (103).

Turunçgiller ayrıca kanser ve dejeneratif hastalıkların önlenmesinden sorumlu olduğu öne sürülen C vitamini, folat, lif, karotenoidler gibi diğer biyoaktif bileşenleri içerirler(104). Temel olarak flavonoidler 15 karbon atomundan (C6-C3-C6) oluşan bir iskelete sahiptir.



Şekil 4.9. Flavonoidlerin kimyasal yapısı(105)

Santral piran halkasının oksidasyon durumuna göre flavonoidler çeşitli alt gruplara ayrılır. Bunlar; flavonlar, flavonoller, flavanonlar, isoflavonoidler, neoflavonoidler, flavanoller (flavan- 3-oller ya da kateşinler), antosiyanidinler ve kalkonlardır(106). Hesperidin, çoğunlukla limon ve portakalda bulunan suda çözünürlüğü zayıf, beyaz ile sarı kristal toz yapısında bir flavanon glikozitidir(107). Hesperidin'in kapalı formülü $C_{28}H_{34}O_{15}$ olup molekül ağırlığı; 610,5606 g/mol, yoğunluğu; 1,65 g/cm³, erime noktası; 258-262°C ve 760 mmHg'de kaynama noktası; 930,1 °C olup acı bir tada sahiptir(108).



Şekil 4.10. Hesperidin'in kimyasal yapısı(109)

Hesperidin, antibakteriyel, antioksidan, antiinflamatuar, anti-kanser, anti-diyabetik ve kardiyovasküler iyileştirici özelliklere sahip, umut verici fitokimyasal bileşik olarak tanımlanmıştır. Ayrıca bazı çalışmalarda hem kemopreventif hem de kemoterapötik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir(110).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmanın yapılabilmesi için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan yerel etik kurulu onayı alındı (Onay Tarihi: 31/01/2024, Onay numarası 2024-02-11). Ratların bakımı ve çalışmaya ilişkin tüm işlemler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı'nda yürütüldü. Yapılan güç analizi sonucunda; kontrol, T/D, hesperidin ve T/D+hesperidin gruplarında ER stresi düzeylerini karşılaştırmak için yapılan bir çalışmada büyük düzeyde bir etkiyi (Cohen's $f=0.60$) $\alpha=0.05$ yanılma düzeyinde 0.80 güç ile test etmek için çalışmaya her bir grupta en az 9 hayvan olmak üzere toplam 36 hayvan alınması hesaplanarak, çalışma için 36 adet 10-12 haftalık, 250-300 gr ağırlığında, erkek Wistar Albino rat kullanıldı. Çalışmada tüm ratlar; $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, uygun nemde ve sıcaklıkta, 12 saatlik ışık-karanlık siklusu olan odalarda tutuldu ve yeterli miktarda gıda ve suya ulaşmaları (ad libitum) sağlandı. Ratlar çalışma sırasında Rat (Sıçan) Tam Yemi ile beslendi (Korkutelim Yem Gıda San. Tic. A.Ş., Antalya). Yem içerisinde kullanılan hammaddeler soya fasülyesi küspesi, mısır, arpa, buğday kepeği, pelet bağlayıcı, dcp, bypass yağ, toksin bağlayıcı, kanatlı minerali, D L. Methionine, L-Lysine, mineral, kolin klorid barındırmaktadır. Yem içerisindeki temel besin maddeleri ham yağ (%3,00), ham kül (%6,55), lizin (%1,30), fosfor (%0,74), ham protein (%23,50), ham selüloz (%6,95), metionin (%0,43), kalsiyum (%0,62), sodyum (%0,04) olarak içermektedir. Araştırmanın başlangıcından sakrifikasyon aşamasına kadar ratların genel sağlık durumları stabil seyretmiş ve araştırma sonuna kadar ölen rat olmamıştır.



Şekil 5.1. Ratların kafes görüntüsü

5.2. Deney Grupları

Çalışma 9'ar adet rattan oluşan 4 grup olarak planlandı.

Grup 1 (Kontrol Grubu): Ratlara 7 gün boyunca günde 1 kere 1 cc oral yolla mısır özü yağı verildi.

Grup 2 (T/D grubu): Ratlara 7 gün boyunca günde 1 kere 1 cc oral yolla mısır özü yağı verildi. Çalışmanın 7. Günü intramuskuler yoldan 90 mg/kg ketamine ve 10 mg/kg xylazine verilerek genel anestezi oluşturuldu. Ratların skrotumu median longitudinal kesi ile açılarak testisler skrotumdan dışarı alındı. Ardından testislere sırasıyla 720⁰ lik rotasyon uygulandı ve torsiyon modeli oluşturuldu. Torsiyon oluşturulduktan sonra testisler 4/0 vicryl ile çevre dokuya fiks edildi ve skrotumdaki insizyon usulüne uygun olarak kapatıldı. Torsiyonun 4. saatinde skrotumdaki eski insizyon tekrar açılarak testislere ulaşıldı. Ardından testislerdeki fiksasyon sütürleri kesilerek testisler detorsiyone edildi ve skrotumdaki insizyon usulüne uygun olarak tekrar kapatıldı.

Grup 3 (Hesperidin grubu): Ratlara 7 gün boyunca günde 1 kere 100 mg/kg hesperidin 1 cc mısır özü yağı içerisinde çözdürülerek oral olarak verildi. Verilecek hesperidin miktarı belirtilen dozlara uygun şekilde ratların vücut ağırlığına göre hesaplandı.

Grup 4 (T/D+Hesperidin grubu): Ratlara 7 gün boyunca günde 1 kere 100 mg/kg hesperidin 1 cc mısır özü yağı içerisinde çözdürülerek oral olarak verildi. Verilecek hesperidin miktarı belirtilen dozlara uygun şekilde ratların vücut ağırlığına göre hesaplandı. Çalışmanın 7. Günü intramusküler yoldan 90 mg/kg ketamine ve 10 mg/kg xylazine verilerek genel anestezi oluşturuldu. Ratların skrotumu median longitudinal kesi ile açılarak testisler skrotumdan dışarı alındı. Ardından testislere sırasıyla 720°'lik rotasyon uygulandı ve torsiyon modeli oluşturuldu. Torsiyon oluşturulduktan sonra testisler 4/0 vicryl ile çevre dokuya fiks edildi ve skrotumdaki insizyon usulüne uygun olarak kapatıldı. Torsiyon sonrasında 4. saatte skrotumdaki eski insizyon tekrar açılarak testislere ulaşıldı. Ardından testislerdeki fiksasyon sütürleri kesilerek testisler detorsiyone edildi ve skrotumdaki insizyon usulüne uygun olarak tekrar kapatıldı.



Şekil 5.2. Ratlara oral hesperidin verilmesi

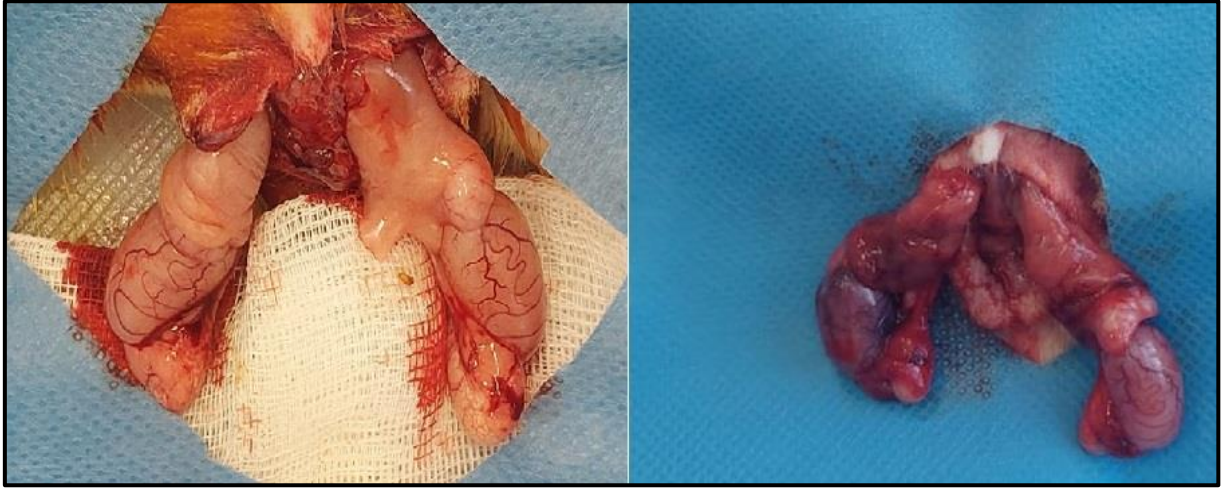


Şekil 5.3. Ratlara anestezi uygulanma aşaması

Grup 3 ve grup 4'e belirlenen protokoller çerçevesinde 7 gün süresince 100 mg/kg hesperidin (Cayman, Michigan, ABD) bileşiği verildi(15).

Son tedavi dozundan sonra grup 2 ve grup 4'e daha önce bahsedildiği gibi intramuskuler (IM) 90 mg/kg ketaminofen (Ketosol, İnterchemie Werken, Hollanda), 10 mg/kg xylazinum (Xylazinbio, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) uygulanarak ratlarda genel anestezi oluşturularak torsiyon ve ardından detorsiyon uygulandı. Detorsiyon sonrası 4. saatte intrakardiak kan alınarak ötenazi uygulandı. Ardından skrotumdaki eski insizyon skarları açılarak testislere bilateral orşiektomi uygulandı.

Son tedavi dozundan sonra grup 1 ve grup 3'e intramuskuler (IM) 50mg/kg ketaminofen (Ketosol, İnterchemie Werken, Hollanda), 10 mg/kg xylazinum (Xylazinbio, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) uygulanarak ratlarda genel anestezi oluşturuldu. Ardından intrakardiak kan alınarak ötenazi uygulandı. Skrotuma median longitudinal kesi uygulanarak testislere ulaşıldı ve bilateral orşiektomi uygulandı.



Şekil 5.4. Testiküler torsiyon öncesi ve sonrası

Serum parametreleri çalışılması için her bir rat için 1 adet kırmızı kapaklı seperatör jel içeren tüpe intrakardiyak kan örneği alındı. Alınan kan örnekleri 4000 devirde (RCF: 1790 x g) 10 dakika süreyle santrifüj edilerek serum elde edildi. Elde edilen serum örnekleri, eppendorf tüplere paylaştırıldı ve analiz edilene kadar -80 °C’de dondurularak saklandı. Elde edilen serum örneklerinden serum testosteron, ER stres belirteçleri (ATF6, GRP78), apoptoz belirteci (kaspaz 3/CPP32), ksantin oksidaz (XO) , katalaz (KAT) ölçülmesi amaçlandı. Çalışmanın sonunda ratların vücut ağırlıkları ölçüldü. Ratların testisleri eksize edilerek ıslak ağırlıkları ölçüldükten sonra ratların sağ testisleri ışık mikroskopisi ve histokimyasal değerlendirilme amacıyla Bouvin solüsyonuna konuldu. Sol testisleri dokuda malondialdehit (MDA),katalaz (CAT), süperoksit dismutaz(SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ölçülmesi amacıyla -80°C’de saklandı. Araştırmada yer alan tüm dokulara ilişkin protein miktar tayinleri Lowry yöntemi ile gerçekleştirilmiş olup, dokulara ilişkin tüm sonuçlar doku protein miktarına oranlanarak verildi(111). Doku çalışmaları için testis dokularının ağırlıkları tartılarak 1:10 (w/v) oranında serum fizyolojik ile dilüe edilip homojenize edildi. Elde edilen homojenat 4000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı.

Çalışma sırasında exitus olan rat olmadı.

5.3. Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler

Nüve FR 490 derin dondurucu (-80°C) (Nüve, Ankara, Türkiye),

Nüve NF 1200 santrifüj cihazı (Nüve, Ankara, Türkiye),

ELISA okuyucu ve yıkayıcı (Biotek, Model: EPOCH2NS Mikroplaka Spektrofotometre),

Ayarlanabilir hacimli çeşitli hacimlerde otomatik pipetler,

Tek kullanımlık pipet uçları,

1,5 ml hacimli kapaklı standart eppendorf tüpü,

Serum ATF6, GRP78, Kaspaz 3 ve testosteron ölçümü yapmak üzere her bir parametreye özgü Shanghai Coon Koon Biotech Co. (Shangai, Çin) marka ELISA kitleri kullanıldı.

ELISA kitleri ALGEN Diagnostik Medikal Şirketi'nden (İstanbul, Türkiye) sağlanmış olup; bütçesi tarafımdan karşılandı. ELISA ölçümleri ve oksidatif durum belirteçleri olan MDA düzeyi, glutatyon peroksidaz aktivitesi, ksantin oksidaz aktivitesi, süperoksit dismutaz aktivitesi ve katalaz aktivitesi ölçümü Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

5.4. Ölçüm Yöntemleri

5.4.1. Serumda ATF6 Ölçüm Yöntemi

Rat Activating Transcription Factor 6 (ATF6) ELISA Kit (Shangai Coon Koon Biotech Co.,Shangai, Çin) ile rat serumunda, firma tarafından hazırlanan kit prospektüsü ile uyumlu şekilde çalışılmıştır. Kite ait ATF6 saptama aralığı: 20-2000 pg/ml'dir. Kitin intra-assay (çalışma içi) varyasyon katsayısı (CV) <7%; inter-assay (çalışmalar arası) varyasyon katsayısı (CV) <10'dur. Kit ile rat serum örneklerinde ATF6 düzeyini kantitatif olarak ölçmek için sandviç enzim immünassay yöntemi analiz amacıyla kullanıldı. Kit içerisindeki plakada bulunan kuyucuklar, ATF6 monoklonal antikorlu ile daha önceden kaplanmış halde hazır olarak bulunmaktaydı. Standartlar kit içerisinde hazır olarak temin edildi. Rat numuneleri ve standartlar, biyotinle işaretlenmiş ATF6'ya özgü antikorlar ile birlikte mikrolaka kuyucuklarına ilave edildi. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra her bir kuyucuğa HRP ('Horse Radish' Peroksidaz) reaktifi ilave edildi. Gerekli inkübasyon beklendi, renklendirici reaktifler ortama eklendi. Reaksiyon sonucunda ATF6, biyotin-konjuge antikor ve enzim-

konjuge avidin içeren kuyucukların renginde bir değişiklik meydana geldi. Oluşan renkli çözeltinin 450 nm dalga boyunda absorbansı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

5.4.2. Serumda GRP 78 Ölçüm Yöntemi

Rat Glucose Regulated Protein 78 (GRP 78) ELISA Kit (Shangai Coon Koon Biotech Co., Shangai, Çin) ile rat serumunda, firma tarafından hazırlanan kit prospektüsü ile uyumlu şekilde çalışılmıştır. Kite ait GRP 78 saptama aralığı: 1-32 ng/ml'dir. Kitin intra-assay (çalışma içi) varyasyon katsayısı (CV) $<7\%$; inter-assay (çalışmalar arası) varyasyon katsayısı (CV) $<10\%$ 'dur. Kit ile rat serum örneklerinde GRP78 düzeyini kantitatif olarak ölçmek için sandviç enzim immunassay yöntemi analiz amacıyla kullanıldı. Kit içerisindeki plakada bulunan kuyucuklar, GRP 78 monoklonal antikoru ile daha önceden kaplanmış halde hazır olarak bulunmaktaydı. Standartlar kit içerisinde hazır olarak temin edildi. Rat numuneleri ve standartlar, biyotinle işaretlenmiş GRP 78'e özgü antikorlar ile birlikte mikrolaka kuyucuklarına ilave edildi. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra her bir kuyucuğa HRP ('Horse Radish' Peroksidaz) reaktifi ilave edildi. Gerekli inkübasyon beklendi, renklendirici reaktifler ortama eklendi. Reaksiyon sonucunda GRP 78, biyotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge avidin içeren kuyucukların renginde bir değişiklik meydana geldi. Oluşan renkli çözeltinin 450 nm dalga boyunda absorbansı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

5.4.3. Serumda Kaspaz 3 Ölçüm Yöntemi

Rat cysteinyl aspartate specific proteinases 3 (Caspase-3/CPP32) ELISA Kit (Shangai Coon Koon Biotech Co., Shangai, Çin) ile rat serumunda, firma tarafından hazırlanan kit prospektüsü ile uyumlu şekilde çalışılmıştır. Kite ait kaspaz 3 aktivitesi saptama aralığı: 1-48U/mL'di. Kitin intra-assay (çalışma içi) varyasyon katsayısı (CV) $<7\%$; inter-assay (çalışmalar arası) varyasyon katsayısı (CV) $<10\%$ 'dur. Kit ile rat serum örneklerinde kaspaz3 düzeyini kantitatif olarak ölçmek için sandviç enzim immunassay yöntemi analiz amacıyla kullanıldı. Kit içerisindeki plakada bulunan kuyucuklar, kaspaz 3 monoklonal antikoru ile daha önceden kaplanmış halde hazır olarak bulunmaktadır. Standartlar kit içerisinde hazır olarak temin edildi. Rat numuneleri ve standartlar, biyotinle işaretlenmiş kaspaz 3'e özgü antikorlar ile birlikte mikrolaka kuyucuklarına ilave edildi. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra her bir kuyucuğa HRP ('Horse Radish' Peroksidaz) reaktifi ilave edildi. Gerekli inkübasyon beklendi,

renklendirici reaktifler ortama eklendi. Reaksiyon sonucunda kaspaz3, biyotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge avidin içeren kuyucukların renginde bir değişiklik meydana geldi. Oluşan renkli çözeltinin 450 nm dalga boyunda absorbansı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

5.4.4. Serumda Testosteron Ölçüm Yöntemi

Rat testosteron ELISA Kit (Shangai Coon Koon Biotech Co., Shangai, Çin) ile rat serumunda, firma tarafından hazırlanan kit prospektüsü ile uyumlu şekilde çalışılmıştır. Kite ait testosteron saptama aralığı: 1-32nmol/L'dir. Kitin intra-assay (çalışma içi) varyasyon katsayısı (CV) <%10; inter-assay (çalışmalar arası) varyasyon katsayısı (CV) <%15'tir. Kit ile rat serum örneklerinde testosteron düzeyini kantitatif olarak ölçmek için kompetitif enzim immunassay yöntemi analiz amacıyla kullanıldı. Kit içerisindeki plakada bulunan kuyucuklara kit içerisinde hazır olarak temin edilen standartlar ve rat numuneleri biyotinle işaretlenmiş antijen ile birlikte mikrolakaya kuyucuklarına ilave edildi. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra her bir kuyucuğa avidin-HRP ('Horse Radish' Peroksidaz) reaktifi ilave edildi. Gerekli inkübasyon beklendi, renklendirici reaktifler ortama eklendi. Reaksiyon sonucunda kuyucukların renginde bir değişiklik meydana geldi. Oluşan renkli çözeltinin 450 nm dalga boyunda absorbansı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

5.4.5. Serumda Ksantin Oksidaz (XO) Ölçüm Yöntemi

Ksantin oksidaz (XO) enzimi ksantini yıkıma uğratarak ürik asit meydana getirmektedir. Bu ölçüm yönteminin prensibi XO enzim aktivitesi sonucunda açığa çıkan ürik asidin optik dansitesinin 293 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Birim zamanda oluşan ürik asit miktarı üzerinden XO aktivitesi hesaplanır(112).

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu (pH 7,5; 0,5 mM Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA); 50 mM fosfat): 93 mg EDTA (disodyum tuzu, dihidrat), 3 g Na₂HPO₄ ve 0,5 g KH₂PO₄ distile suda çözülür ve hacim 500 mL'ye tamamlandı.

Ksantin çözeltisi (2 mM): 25 ml fosfat tamponunda 7,6 mg ksantin çözülerek hazırlandı.

Deney protokolü aşağıdaki gibi uygulanır.

Tablo 5.1. Ksantin oksidaz aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol

Fosfat Tamponu	2,8 ml
Ksantin	0,1 ml
Serum	0,1 ml

Deney tüpündeki çözeltinin optik dansitesi 293 nm dalga boyunda kuvartz küvet kullanılarak distile suya karşı ölçüldü. Aynı örnekler oda sıcaklığında inkübe edilerek 1.saat sonunda optik dansiteleri tekrar ölçüldü. 0. ve 1. Saatlerde yapılan ölçümler arasındaki optik dansite farkı (ΔOD) ve ürik asitin molar absorpsiyon katsayısından faydalanılarak aşağıdaki formüle göre XO enzim aktivitesi hesaplandı:

$$XO \text{ aktivitesi (mIU/ml)} = (\Delta OD / \text{dakika}) \times F$$

Bu çalışmadaki hesaplamalarda F değeri 3000 alınmıştır.

5.4.6. Protein Miktarı Ölçüm Yöntemi (Lowry Yöntemi):

Doku homojenatlarından elde edilen süpernatantların protein miktarının belirlenmesinde Lowry yöntemi kullanıldı(111). Lowry protein analizi, tespit hassasiyetini artırmak için ek adımlar ve reaktifler içeren biüret reaksiyonuna dayanmaktadır. Biüret reaksiyonunda bakır, peptitlerin dört nitrojen atomuyla etkileşime girerek bakırlı bir kompleks oluşturur. Ardından Folin-Ciocalteu reaktifi olarak da bilinen fosfomolibdik/fosfotungstik asit eklenir. Bu reaktif, bakır iyonları ve tirozin, triptofan ve sistenin yan zincirleriyle etkileşime girerek 650 nm ile 750 nm arasında tespit edilebilen mavi-yeşil bir renk üretir(113). Sonuç protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Analizde kullanılan reaktiflerin hazırlanışı:

A Reaktifi: 0.5 gr $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ve 1 gr sodyum sitrat 100 ml distile suda çözülür.

B Reaktifi: 20 gr Na_2CO_3 1 L 0,1 N NaOH içinde çözülür.

C Reaktifi: 50 ml B reaktifine 1 ml A reaktifi eklenir.

D Reaktifi: 10 ml Folin-Ciocalteu reaktifine 10 ml distile su eklenir.

Deneyin yapılışında aşağıdaki protokol kullanıldı.

Tablo 5.2. Protein miktarı ölçüm yöntem protokolü

	KÖR	NUMUNE (Nm)
SÜPERNATAN	-	10 µl
DİSTİLE SU	500 µl	490 µl
C REAKTİFİ	2,5 ml	2,5 ml

Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildikten sonra hem kör hem de numune tüplerine 0,25 ml D reaktifi eklenir. Oda sıcaklığında 30 dk daha beklendikten sonra tüplerin her ikisinin de absorbansları 700 nm dalga boyunda distile suya karşı spektrofotometrik olarak ölçülür. Protein konsantrasyonunun hesaplanması için albümin standardından yararlanıldı. Buna göre faktör değeri 20 alınarak hesaplama aşağıdaki formülle yapıldı.

$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/ml)} = (\text{OD}_{\text{Nm}} - \text{OD}_{\text{KÖR}}) \times \text{Faktör (F)}$$

5.4.7. Serum ve Dokuda Katalaz (KAT) Aktivitesi Ölçümü

Katalaz aktivitesi rat serumu ve doku süpernatanı için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Katalaz, H₂O₂'yi substrat olarak kullanır. Bu deneyin prensibi; Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon sırasında H₂O₂'nin parçalanmasına eşlik eden absorbans azalmasının 240 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilmesi esasına dayanır(114).

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu: KH₂PO₄ ve Na₂HPO₄ kullanılarak 50 mM, pH 7 olan fosfat tamponu hazırlanır.

H₂O₂ çözeltisi: Stok H₂O₂ çözeltisinden (% 30 v/v) 0,2 ml alınır, 100 ml fosfat tamponu ile seyreltilir.

2,99 ml H₂O₂ çözeltisi, 0,01 ml serum veya doku süpernatanı ve 0,01 ml fosfat tamponu, kuvarz küvete konuldu. Spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda absorbans 1 dakika süreyle izlendi. Ortaya çıkan absorbans farkı (ΔOD) hesaplandıktan sonra Katalaz aktivitesi H₂O₂'nin molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı. Buna göre, “Faktör” değeri 7320 olarak bulundu.

Hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır.

$$\text{KAT doku aktivitesi (IU/mg)} = (\Delta OD/\text{dakika}) \times F / [\text{Protein konsant. (mg/mL)}]$$

$$\text{KAT serum aktivitesi (IU/ml)} = (\Delta OD/\text{dakika}) \times F$$

5.4.8. Dokuda Süperoksit Dismutaz (SOD) Ölçüm Yöntemi

SOD enzim aktivitesinin ölçümü; SOD enziminin süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırması ve nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğinin süperoksit tarafından indirgenmesinin engellemesi (SOD aktivitesi ile doğru orantılı olarak) prensibine dayanan bir yöntemle ölçülmüştür(115).

SOD aktivitesine ait ölçüm protokolü aşağıdaki gibidir.

Tablo 5.3. SOD aktivitesi ölçüm yöntem protokolü

	Numune(N)	Kör
Reaktif 1	2,75 ml	2,75 ml
Süpernatant	100 µl	-
XO	50 µl	50 µl

Tüpler oda sıcaklığında 20 dk. bekletilir.

CuCl ₂	100 µl	100 µl
Süpernatant	-	100 µl

Reaktif 1'in Hazırlanışı:

9,1 mg ksantin, 1 N NaOH'den birkaç damla distile su içine damlatıldıktan sonra bu çözeltiye ilave edilerek çözüldü, daha sonra distile su ile hacim 200 ml'ye tamamlandı. 100 ml distile suda 25 mg EDTA çözüldü. 100 ml distile suda 12,3 mg NBT çözüldü. 30 ml distile suda

30 mg sığır albümini çözöldü. 60 ml distile suda 2,54 g Na₂CO₃ çözöldü. En son işlem olarak tüm bu çözeltiler birleştirilerek Reaktif 1 elde edildi. Toplam hacim 490 ml'dir.

Ksantin Oksidaz (XO) çözeltisinin hazırlanması: 10 µL XO 1ml 3,2 M amonyum sülfatta çözöldü.

CuCl₂ çözeltisinin hazırlanması: 108 mg CuCl₂ tartılıp 100 ml distile suda çözölerek hazırlandı.

Bir SOD ünitesi (U), NBT'nin indirgenmesini % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi olarak tanımlanmaktadır. Kö ve numunelere ait absorbanslar spektrofotometrede 560 nm'de distile suya karşı okunduktan sonra SOD aktivitesi şu şekilde hesaplandı:

$$\text{Doku SOD aktivitesi (U/mg)} = [(ODKör - ODN) / ODKör] \times F / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

Bu çalışmada F=20 alınmıştır.

5.4.9. Dokuda Malondialdehit (MDA) Ölçüm Yöntemi

MDA düzeyi ise MDA'nın tiyobarbitürik asitle (TBA) asidik ortamda pembe renkli bileşik oluşturmaya dayanan spektrofotometrik bir yöntemle analiz edilmiştir.

MDA ölçüm yönteminde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu (pH 6; 100 mM): 2,13 g Na₂HPO₄ ve 11,56 g KH₂PO₄ tartılarak distile suda çözöldükten sonra hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı.

Trikloroasetik asit (TCA; % 20 w/v): 500 mL 0,6 N HCl içinde 100 g katı TCA çözölerek hazırlandı.

TBA çözeltisi (% 2 w/v): 200 mg katı TBA 10 mL distile suda çözöldü.

Etil alkol (% 95; v/v).

Tablo 5.4. MDA ölçümünde kullanılan deney protokolü

	Numune	Kör
Süpernatan	100 µl	100 µl
Etil alkol	1 ml	1 ml
Fosfat tamponu	1 ml	1 ml
TCA	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	-

30 dakika boyunca kaynar suda inkübe edilen deney tüpleri 4000 devirde 20 dk süreyle santrifüj edildi. Spektrofotometrik ölçüm sırasında kör tüplerine 1 ml TBA çözeltisi konuldu. 532 nm dalga boyunda numune ve kör tüplerindeki çözeltilerin absorbansları distile suya karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Bu ölçümde MDA standardı olarak tetraetoksipropan (TEP) kullanılır (% 96; d=0,92; MA= 220,3).

TEP Molaritesinin Hesaplanması:

$$0,92 \times 1000 = 920 \text{ g (TEP çözeltisinin 1 litresinin ağırlığı)}$$

$$920 : 100 \times 96 = 883,2 \text{ g (1 litre çözeltideki TEP miktarı)}$$

$883,2 : 220,3 = 4 \text{ mol TEP (1 litre çözeltide 4 mol TEP olduğu için, çözeltideki TEP'in konsantrasyonu 4 molar (M)'dır.}$

4 M'lık çözelti etil alkolle 400.000 kat dilüe edilerek, 10 µM'lık standart çözelti elde edilir. Aynı deney protokolü standart ve standart körü için uygulanır ve spektrofotometrede absorbanslar okunur. Buna göre “Faktör” değeri aşağıda görüldüğü şekilde 161,3 olarak hesaplandı.

$$\text{Standartın optik dansitesi (ODS)} = 0,152$$

$$\text{Standart körünün optik dansitesi} = 0,090$$

$$\Delta \text{ODS} = 0,062$$

$$\text{Doku MDA konsantrasyonu (nmol/mg)} = \Delta \text{ODN} \times \text{Standartın konsantrasyonu} / \Delta \text{ODS} / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

$$= \Delta ODN \times 10 \mu M / 0,062 / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

$$= \Delta ODN \times 161,3 / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

5.4.10. Dokuda Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Ölçüm Yöntemi

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi enzimin katalizlediği reaksiyonda oluşan yükseltgenmiş glutasyonun indirgenmesi sırasında NADPH'nin NADP'ye dönüşmesi sonucu NADPH absorbansındaki azalma prensibine dayanan bir yöntemle analiz edilmiştir(116).

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu (ph:7, 50 mM fosfat, 5,6 mM EDTA): 2,08 g EDTA, 4,2 g Na₂HPO₄ ve 2,72 g KH₂PO₄ 1 litre distile suda çözülerek hazırlandı.

Glutasyon çözeltisi: 250 mg glutasyon 5 mL fosfat tamponunda çözüldü.

NADPH: 15 mg NADPH 2,5 mL fosfat tamponunda çözüldü.

Glutasyon redüktaz enzimi: 3,2 M, 1 mL amonyum sülfatta, 10 µL glutasyon redüktaz enzimi seyreltili.

H₂O₂ çözeltisi: 5 mL fosfat tamponuna, 15 µL H₂O₂ stok çözeltisi (% 30 v/v) ilave edildi.

Sodyum azid: 5 mL fosfat tamponunda 65 mg sodyum azid çözüldü.

Tablo 5.5. Glutasyon Peroksidaz aktivitesi ölçüm yöntemi protokolü

Fosfat Tamponu	2,5 ml
GSH	100 µl
NADPH	50 µl
GSH Redüktaz	100 µl
Sodyum Azid	100 µl
Süpernatant	100 µl

Spektrofotometre 340 nm dalga boyuna ayarlandı ve fosfat tamponuyla sıfırlandı. Protokoldeki maddeler küvete konulduktan sonra 1 dakika süreyle absorbans takip edildi ve böylece kör değeri elde edildi. Aynı işlem 100 µl H₂O₂ çözeltisi eklenerek tekrar edildi ve bu

kez numune değeri bulundu. Numune ile 1 dk'da elde edilen ΔOD değerinden, kör ile 1 dk'da elde edilen ΔOD değeri çıkarılarak absorbans farkı (ΔOD) hesaplandıktan sonra GSH-Px aktivitesi NADPH'nin molar absorpsiyon katsayısı (ϵ) kullanılarak hesaplandı. Buna göre, Faktör değeri 4800 olarak bulundu.

GSH-Px aktivitesi (mIU/mg):

$\Delta OD \times (1/\epsilon_{NADPH}) \times (V_{toplam}/V_{numune}) \times (1/zaman (dk)) \times \text{Seyreltme Faktörü}$

GSHPx aktivitesi (mIU/mg) = $(\Delta OD/dk) \times 4800 / \text{Protein kons. (mg/ml)}$

5.5. Işık Mikroskopik İnceleme ve Histolojik Bulgular

Sıçanların testisleri, tespit amacıyla diseksiyon sonrası Bouin solüsyonuna alındı ve oda ısısında bir gece bekletildi. Fikse olan dokular rutin histolojik takibe alındı; dokular %70, %80, %90 ve %100'lük etil alkol serilerinde pikrik asitten kaynaklanan sarı renk tamamen kayboluncaya kadar bekletilerek dehidrate edildi ve ksilol içerisinde şeffaflandırıldı. Etüvde 60⁰ C'de iki kere ikişer saat bekletilerek sıvı parafinle inkübe edildi. Parafin infiltrasyonunu takiben dokulara pozisyon verilerek sert parafin bloklara gömüldükten sonra dokular kesit alınması amacıyla -20⁰ C'de soğutuldu. Dokulardan Leica RM 2125 (Leica Biosystems, Illinois, ABD) rotary mikrotom ile 5 μm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen&Eozin ile boyanıp Zeiss AxioScope M1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Almanya) ışık mikroskopunda incelendi 40X'lik büyütmede Zeiss AxioCam MRc5 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Almanya) ile fotoğrafları çekildi. Çekilen fotoğraflardaki seminifer tübüller, Johnsen skorlama sistemine göre değerlendirilerek skorlandı. Her hayvan için ayrı preparat kullanıldı, her kesitte toplamda en az 50 seminifer tübül sayıldı.

5.6. İstatistiksel Yöntemler

Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Kolmogorov Smirnov Testi) kullanılarak incelenmiştir. Kategorik değişkenler yüzde ve sayı olarak, sürekli değişkenler ise ortalama $\pm$ standart sapma (ss) sunulmuştur. Bağımlı grupların üç ve üzeri ölçümlerinin karşılaştırılmasında; normal dağılıma uyan veriler için tekrarlı ölçümlerde ANOVA testi yapılmıştır. İkili grupların

karşılaştırılmasında varyans homojenitesi sağlayan grupların değerlendirilmesinde Tukey HSD testi, homojeniteyi sağlamayanlarda ise Tamhane testi yapılmıştır. Bu çalışmada istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. Araştırma verilerinin istatistiksel analizleri için Statistical Package for Social Sciences (SPSS), Windows için sürüm 25.0 bilgisayar paket programı kullanılmıştır



6. BULGULAR

Çalışma sonrasında ratların vücut ve testis ağırlıkları karşılaştırılmıştır. Ratların vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde çalışma sonunda gruplar arasında istatistiksel fark saptanmamıştır.

Sol testis ağırlıkları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel fark saptanmıştır. Gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde kontrol grubunun sol testis ağırlığının istatistiksel anlamlı olarak T/D grubunun sol testis ağırlığından daha fazla olduğu görülmüştür ($p=0,046$). Sağ testis ağırlıkları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel fark izlenmiş olup gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde kontrol grubunun sağ testis ağırlığının T/D grubunun sağ testis ağırlığından istatistiksel olarak daha fazla olduğu izlenmiştir ($p=0,003$). Ayrıca kontrol grubunun sağ testis ağırlığının T/D+hesperidin grubundan istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,01$). Vücut ağırlıkları ve testis ağırlıkları Tablo 6.1.'de verilmiştir.

Tablo 6.1. Ratların demografik bilgileri

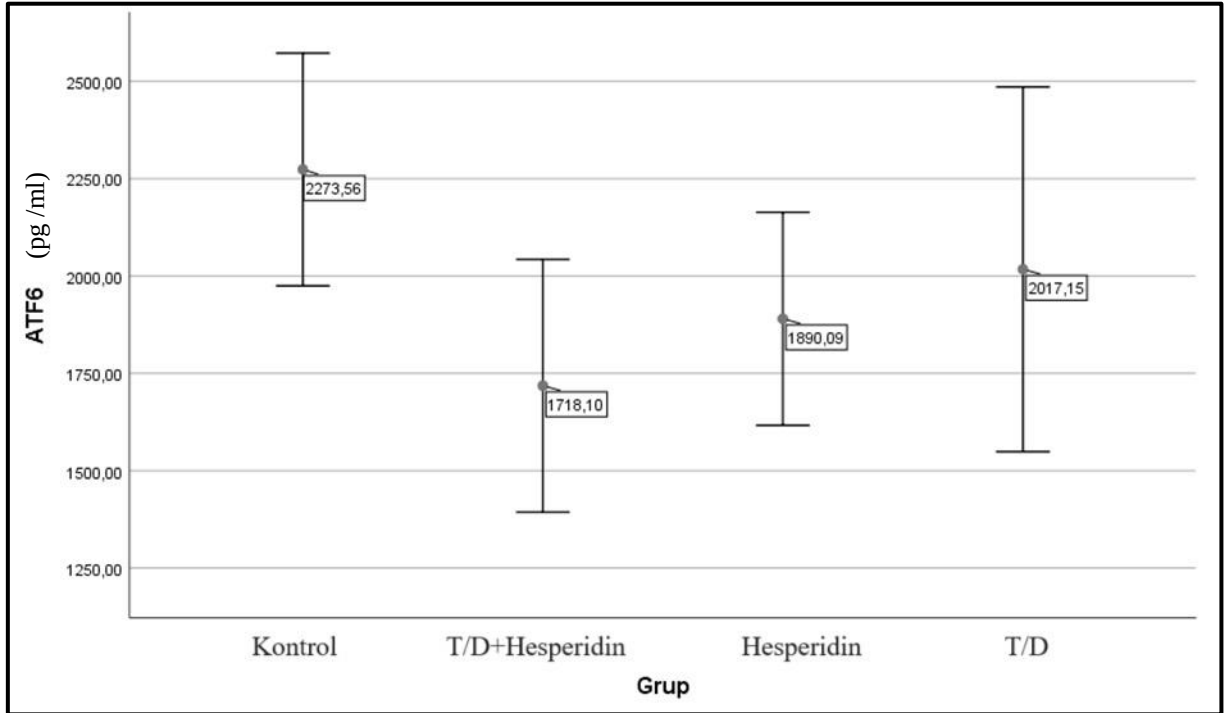
	Vücut ağırlığı (gr) +SD (min-max)	Sağ testis ağırlığı (gr) +SD (min-max)	Sol testis ağırlığı (gr) +SD (min-max)
Kontrol (n=9) (Grup1)	280 ± 13,9 (269,3-290,7)	2,16 ± 0,40 (1,86-2,47)	2,15 ± 0,51 (1,76-2,54)
T/D (n=9) (Grup2)	271,9 ± 19,4 (257,0-286,8)	1,52 ± 0,27 (1,31-1,73)	1,54 ± 0,30 (1,31-1,77)
Hesperidin(n=9) (Grup3)	276,7 ± 18,6 (262,4-291,0)	1,72 ± 0,15 (1,60-1,84)	1,68 ± 0,18 (1,54-1,82)
T/D+Hesperidin (n=9) (Grup4)	268,4 ± 13,9 (257,8-279,1)	1,60 ± 0,49 (1,23-1,98)	1,61 ± 0,50 (1,23-2,00)
ANOVA testi	$p=0,47$	$p<0,05$ Grup1-2: $p=0,003$ Grup1-4: $p=0,010$	$p<0,05$ Grup1-2: $p=0,046$

Ratların ATF6 ve GRP78 değerleri incelendiği zaman gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık izlenmedi. ATF6 değerleri incelendiğinde kontrol grubunun en yüksek değerlere, T/D+Hesperidin grubunun en düşük değerlere sahip olduğu gözlenmesine rağmen bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı çıkmadığı izlendi. GRP78 değerleri incelendiğinde değerler açısından en yüksek grubun Hesperidin grubunda, en düşük değerlerin ise T/D grubunda olduğu izlendi. ATF6 ve GRP78 değerleri Tablo 6.2.'de ve hata grafikleri Şekil 6.1. ve Şekil 6.2.'de verilmiştir.

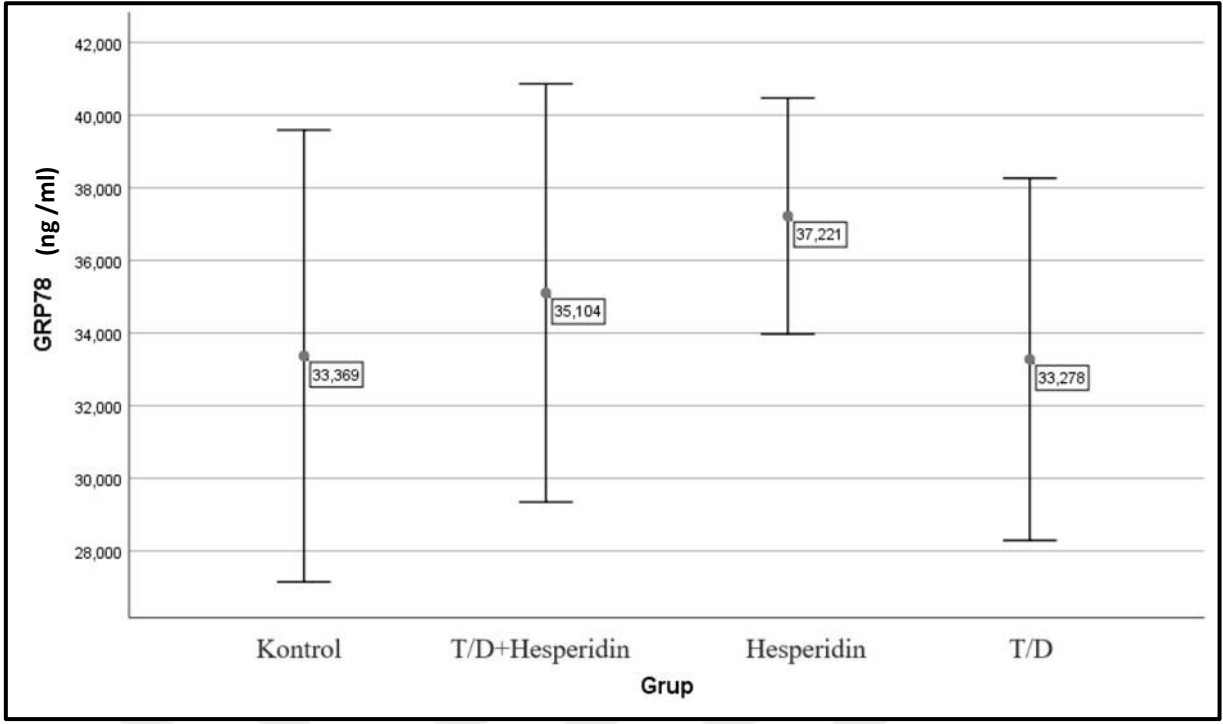
Tablo 6.2. Ratların ATF6 ve GRP78 değerleri

	Kontrol (n=9) (Grup1)	T/D (n=9) (Grup2)	Hesperidin(n=9) (Grup3)	T/D+Hesperidin(n=9) (Grup4)	p*
ATF6 (pg/ml) Ortalama $\pm$ SD (min-max)	2273,56 $\pm$ 388,68 (1974,80-2572,32)	2017,15 $\pm$ 609,37 (1548,75-2485,56)	1890,09 $\pm$ 355,84 (1616,56-2163,61)	1718,10 $\pm$ 422,10 (1393,64-2042,56)	0,08
GRP78 (ng/ml) Ortalama $\pm$ SD (min-max)	33,369 $\pm$ 8,089 (27,151-39,587)	33,278 $\pm$ 6,484 (28,294-38,263)	37,221 $\pm$ 4,224 (33,974-40,468)	35,104 $\pm$ 7,488 (29,348-40,859)	0,57

*ANOVA testi



Şekil 6.1. ATF6 hata çubuk grafiği



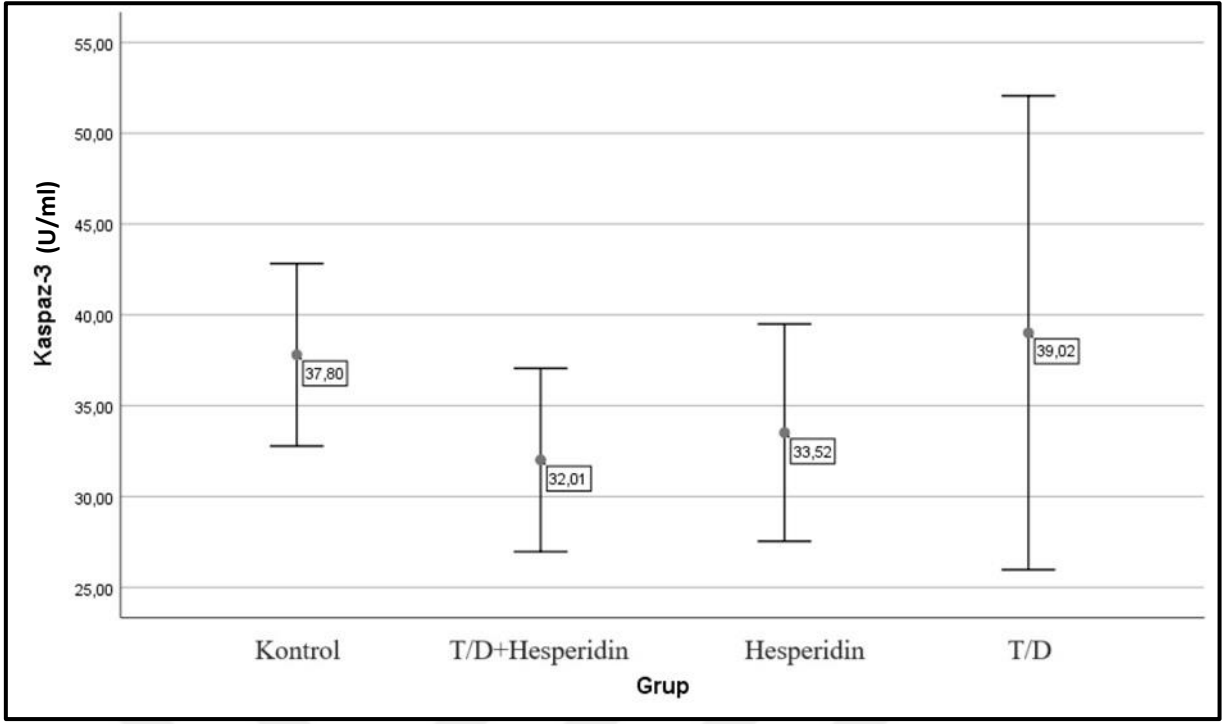
Şekil 6.2. GRP78 hata çubuk grafiği

Ratların kaspaz-3 değerleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmedi. Ancak anlamlı fark oluşturmada en yüksek değerlere T/D grubu sahip iken en düşük değerlerin T/D+Hesperidin grubunda olduğu izlendi. Kaspaz-3 değerleri Tablo 6.3'te, hata grafikleri Şekil 6.3'de verilmiştir.

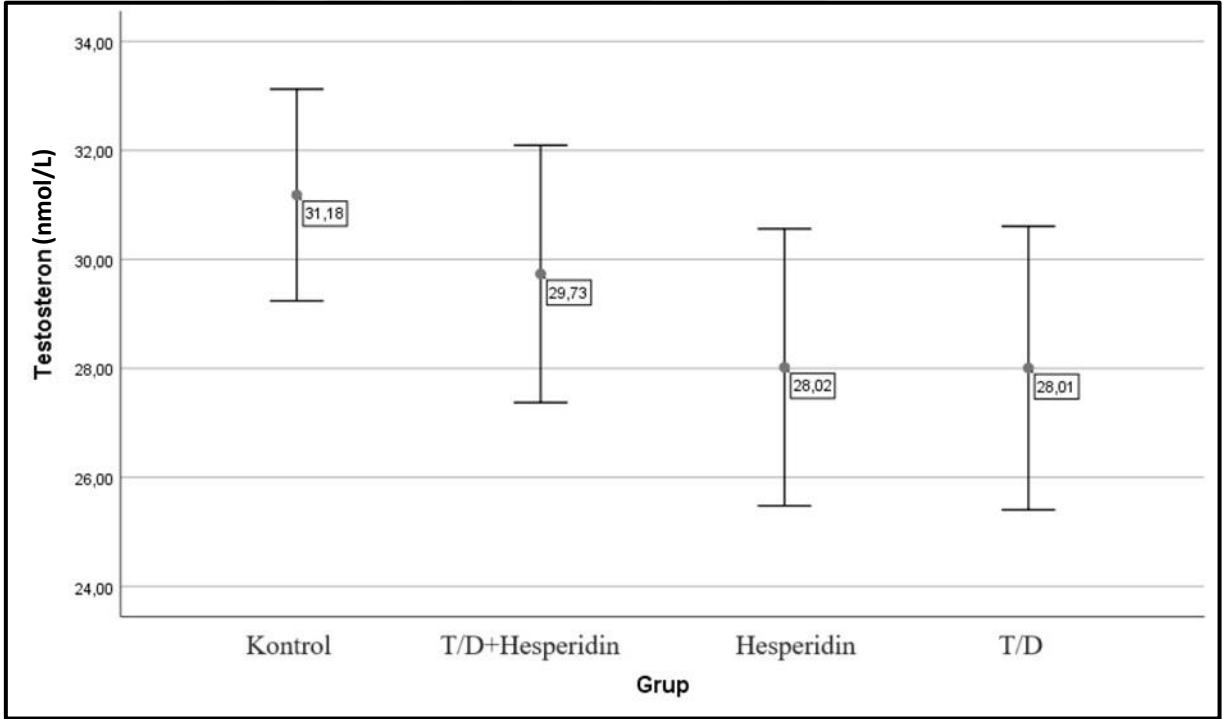
Tablo 6.3. Ratların kaspaz-3 değerleri

	Kontrol (n=9)	T/D (n=9)	Hesperidin (n=9)	T/D+Hesperidin (n=9)	p*
Kaspaz-3 (U/ml) Ortalama $\pm$ SD (min-max)	37,80 $\pm$ 6,54 (32,78-42,83)	39,02 $\pm$ 16,97 (25,98-52,06)	33,52 $\pm$ 7,78 (27,54-39,50)	32,01 $\pm$ 6,56 (26,97-37,06)	0,476

*ANOVA testi



Şekil 6.3. Kaspaz-3 hata çubuk grafiği



Şekil 6.4. Testosteron hata çubuk grafiği

Çalışmada kullanılan ratların kan testosteron değerleri incelendiğinde, kan testosteron değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık izlenmedi. Kan testosteron seviyeleri en yüksek kontrol grubunda izlenirken, en düşük olarak istatistiksel anlamlı bir fark oluşturmada da T/D grubunda olduğu görüldü. Kan testosteron seviyeleri Tablo 6.4’de, hata grafikleri Şekil 6.4’de verilmiştir.

Tablo 6.4. Ratların serum testosteron değerleri

	Kontrol (n=9)	T/D (n=9)	Hesperidin(n=9)	T/D+Hesperidin (n=9)	p*
Testosteron (nmol/L) Ortalama $\pm$ SD (min-max)	31,18 $\pm$ 2,53 (29,24-33,12)	28,01 $\pm$ 3,38 (25,40-30,61)	28,02 $\pm$ 3,31 (25,48-30,56)	29,73 $\pm$ 3,07 (27,37-32,09)	0,107

*ANOVA testi

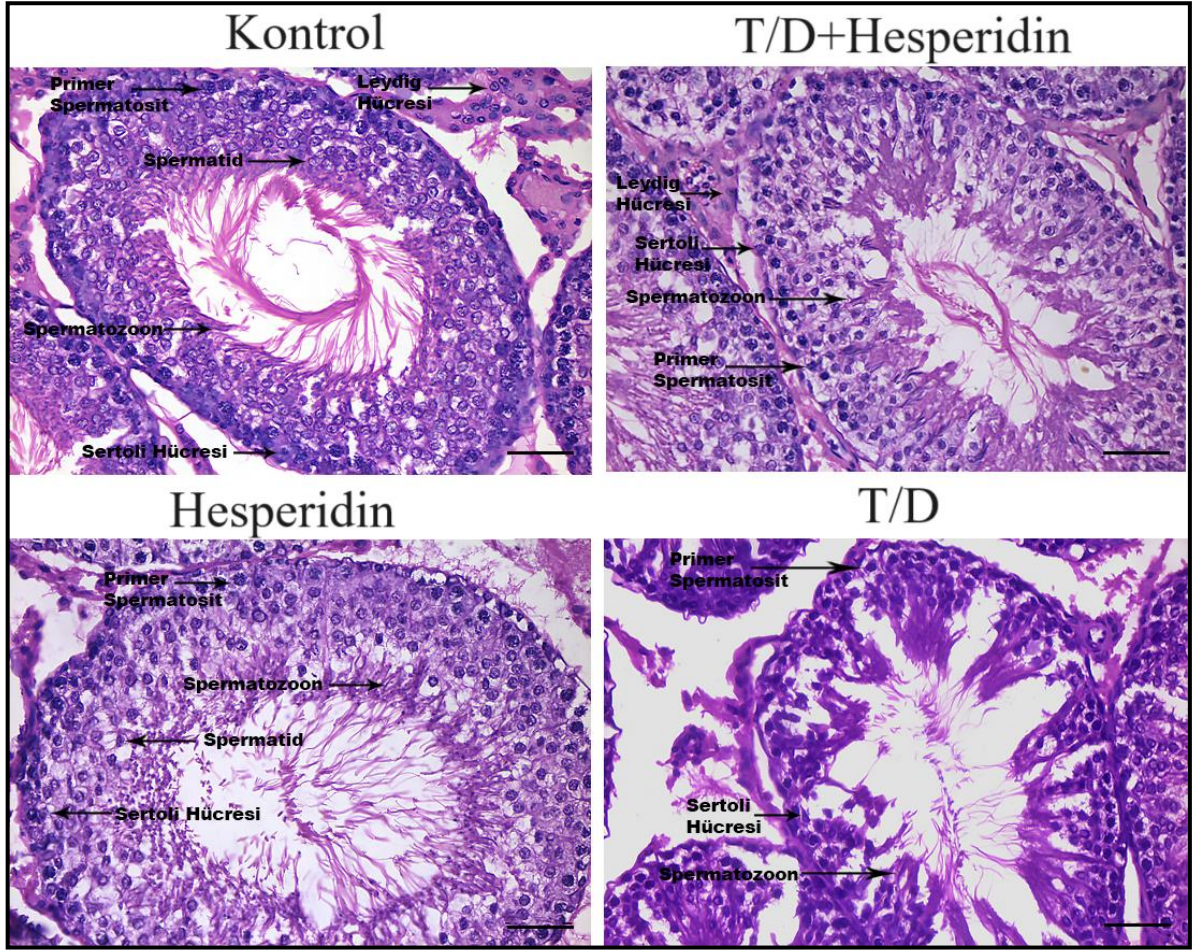
Ratların testisleri değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık izlendi ($p=0,046$). Johnsen skorlarının en yüksek kontrol grubunda olduğu izlendi. Johnsen değerlerinin sırasıyla azalarak Hesperidin ve T/D+Hesperidin grubunda olduğu ve en düşük olarak T/D grubunda olduğu izlendi. Gruplar arası değerlendirilme yapıldığında kontrol grubu ile T/D grubu arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık olduğu izlendi ($p=0,029$). Johnsen skoru değerleri Tablo 6.5’de ve mikroskopik görüntüleri Şekil 6.5’de verilmiştir.

Tablo 6.5. Ratların Johnsen skorları

	Kontrol (n=9) (Grup1)	T/D (n=9) (Grup2)	Hesperidin(n=9) (Grup3)	T/D+Hesperidin (n=9) (Grup4)	p*
Johnsen skoru Ortalama $\pm$ SD (min-max)	8,28 $\pm$ 0,48 (7,91-8,65)	7,79 $\pm$ 0,30 (7,56-8,02)	8,09 $\pm$ 0,32 (7,84-8,33)	8,00 $\pm$ 0,28 (7,78-8,22)	0,046 Grup1-2: $p=0,029$

*ANOVA testi

Sıçan testis kesitlerinde yapılan mikroskopik inceleme ve Johnsen skorlaması değerlendirildiğinde kontrol grubunda seminifer tübül epitel hücrelerinin bütünlüğünü koruduğu ve tübülün normal morfolojide olduğu gözlemlendi. T/D grubunda kontrol grubuna göre daha düşük Johnsen skoruna sahipti. Seminifer tübül bütünlüğünün bozulduğu, germinal epitel hücrelerinin normal morfolojilerini koruyamadıkları ve hücrelerin birbiriyle bağlantılarını koruyamadıkları için ayrıldıkları izlendi. Sitoplazma ve çekirdek görünümü kontrol grubuna göre daha eozinofilik ve hücre boyutları daha küçüktü. T/D+Hesperidin ve Hesperidin gruplarının kontrol grubuna göre germinal epitel hücreleri açısından incelendiğinde tübül epitelinin bütünlüğünün bozulmadığı ve lümende spermatozoonlarla birlikte hücrelerin normal görünümde olduğu izlendi.



Şekil 6.5. Rat testislerinin mikroskopik görüntüleri (Mikroskopik görüntülerde leydig hücreleri, primer spermatosit, spermatid, spermatozoon ve sertoli hücreleri siyah renkli oklarla gösterilmiştir.)

Ratların antioksidan marker değerleri incelendiği zaman doku SOD, serum ve doku KAT değerleri, doku GSH-Px değerleri ve doku MDA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmiştir ($p < 0,001$; $p = 0,027$; $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p = 0,002$). Ancak serum XO değerleri incelendiğinde istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p = 0,280$).

SOD değerleri incelendiğinde istatistiksel anlamlı olarak kontrol grubunun sırasıyla T/D+Hesperidin ve T/D gruplarından daha yüksek olarak izlendi ($p < 0,001$; $p < 0,001$). Ayrıca incelemeye devam edildiğinde Hesperidin grubunun istatistiksel anlamlı olarak T/D ve T/D+Hesperidin gruplarından daha yüksek olduğu izlenmiştir ($p < 0,001$; $p < 0,001$). SOD ile yapılan son ikili grup incelemesinde ise T/D+Hesperidin grubunun istatistiksel anlamlı olarak T/D grubundan daha düşük değerlere sahip olduğu görülmüştür ($p = 0,014$). SOD değerleri Tablo 6.6’da ve hata grafikleri Şekil 6.6’da verilmiştir.

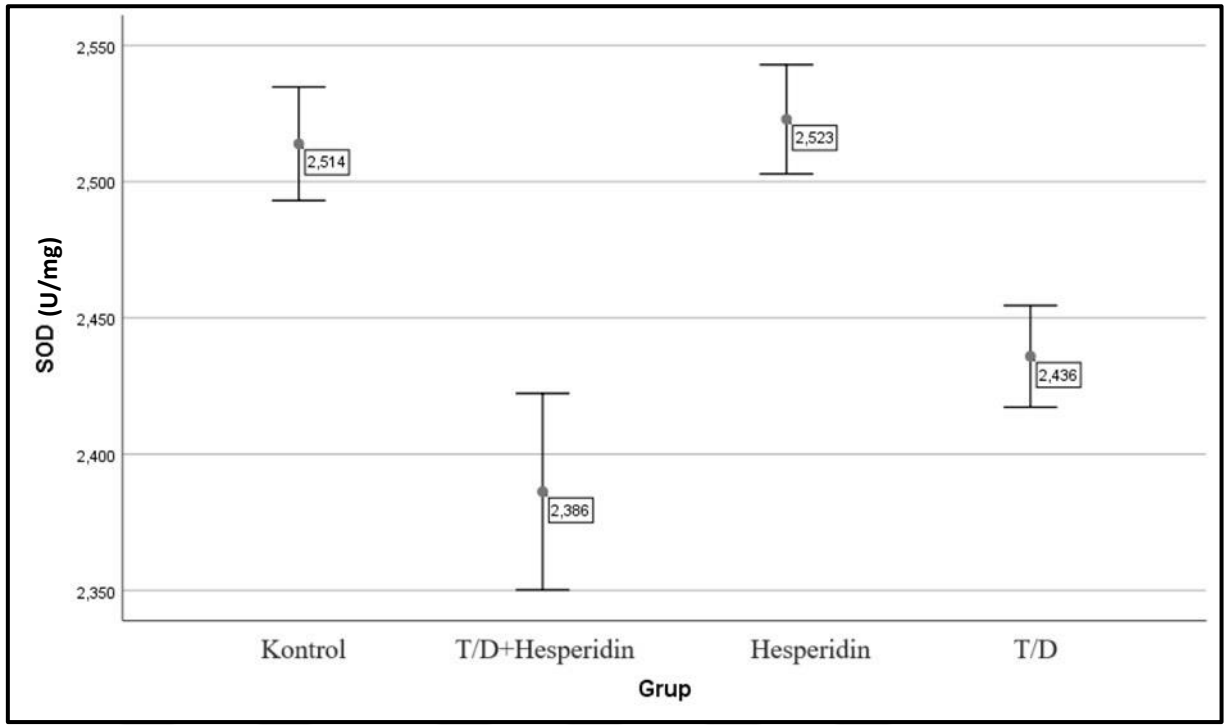
Ratların serum KAT değerleri incelendiği zaman gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık içerdiği izlendi ($p=0,027$). Serum KAT değerlerinin en düşük kontrol grubunda ve en yüksek T/D+Hesperidin grubunda olduğu izlendi. Gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde kontrol grubunun istatistiksel anlamlı olarak T/D+Hesperidin grubundan daha düşük olduğu izlenmiştir ($p=0,019$). Serum KAT değerleri Tablo 6.6'da ve hata grafikleri şekil 6.7'de verilmiştir.

Ratların doku KAT değerleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık izlendi ($p<0,001$). Doku KAT değerleri en yüksek T/D grubunda izlenmişken, değerler sırasıyla T/D+Hesperidin, Hesperidin ve en düşük olarak kontrol grubunda izlenmiştir. Gruplar ikili olarak değerlendirildiğinde kontrol grubunun istatistiksel anlamlı olarak T/D ve T/D+Hesperidin grubundan anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0,001$; $p<0,001$). Ayrıca Hesperidin grubu değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı olarak T/D ve T/D+Hesperidin grubundan anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0,001$; $p<0,001$). Doku KAT değerleri Tablo 6.6'da ve hata grafikleri şekil 6.8'de verilmiştir.

Ratların doku GSH-Px değerleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık izlenmiştir ($p<0,001$). Ayrıca gruplar değerlendirildiğinde en düşük değerler kontrol grubunda izlenmişken en yüksek değerler T/D grubunda görülmüştür. Gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde kontrol ve hesperidin grubunun istatistiksel anlamlı olarak T/D grubundan daha düşük olduğu izlenmiştir ($p=0,016$; $p<0,001$). Doku GSH-Px değerleri Tablo 6.6'da ve hata grafikleri şekil 6.9'da verilmiştir.

Doku MDA değerleri incelendiğinde istatistiksel anlamlı farklılık izlenmiştir ($p=0,002$). Doku MDA değerleri incelendiğinde en düşük değerlerin kontrol grubunda olduğu izlenmiş, en yüksek değerlerin ise Hesperidin grubunda olduğu görülmüştür. Gruplar karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde kontrol grubunun sırasıyla T/D ve T/D+Hesperidin grubundan istatistiksel anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p=0,002$; $p<0,001$). Doku MDA değerleri Tablo 6.6'da ve hata grafikleri şekil 6.10'da verilmiştir.

Serum XO değerleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmazken; değerlerin en yüksek kontrol grubunda olduğu görülmüştür. Değerler sırasıyla Hesperidin, T/D+Hesperidin ve T/D grubunda azalarak devam ettiği görülmüştür. Serum XO değerleri Tablo 6.6'da ve hata grafikleri 6.11'de verilmiştir.

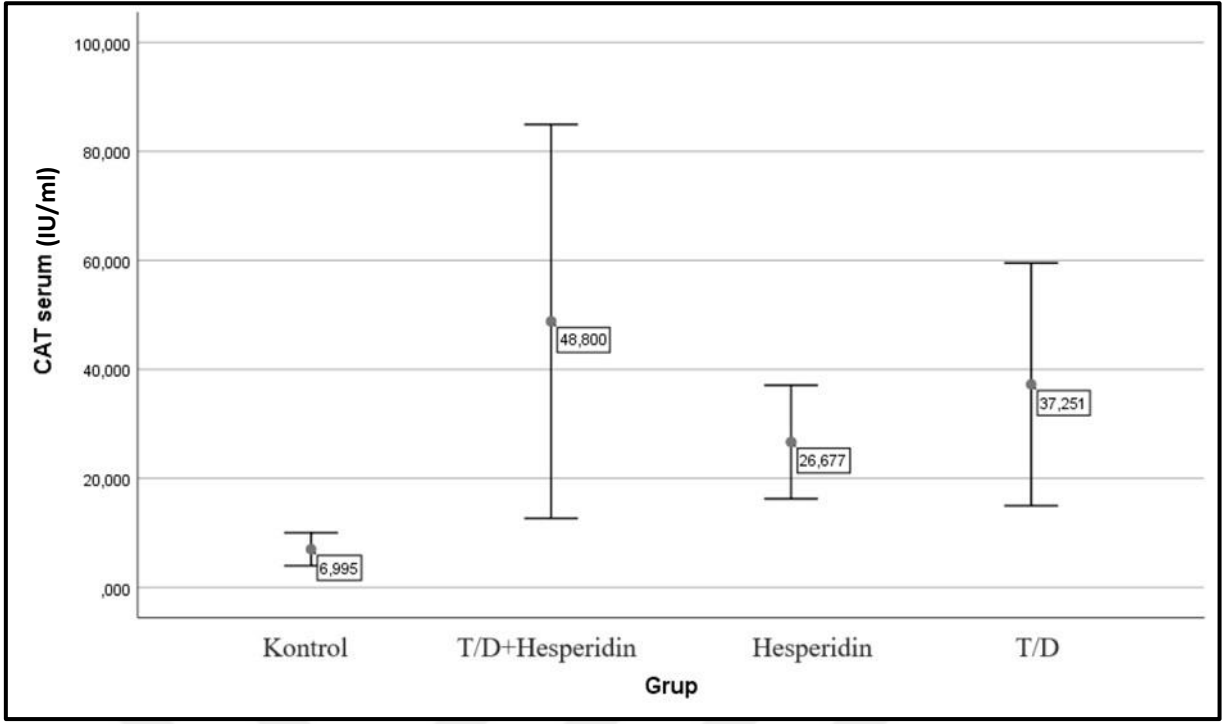


Şekil 6.6. SOD hata çubuk grafiği

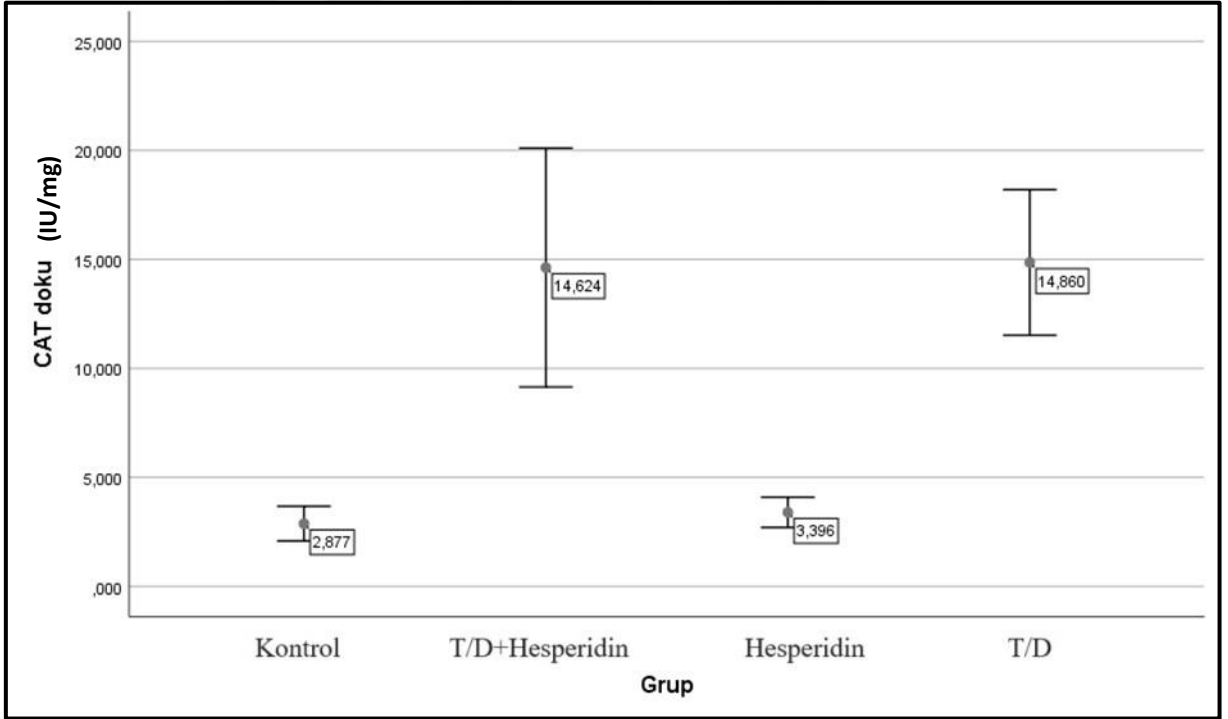
Tablo 6.6. Ratların SOD, serum KAT, doku KAT, GSH-Px, MDA ve serum XO değerleri

	Kontrol (n=9) (Grup1)	T/D (n=9) (Grup2)	Hesperidin(n=9) (Grup3)	T/D+Hesperidin (n=9) (Grup4)	p*
SOD doku (U/mg) Ortalama ± SD (min-max)	2,514 ± 0,027 (2,493-2,535)	2,436 ± 0,024 (2,417-2,455)	2,532 ± 0,026 (2,503-2,543)	2,386 ± 0,047 (2,350-2,422)	<0,001 Gru1-4: p<0,001 Grup1-2: p<0,001 Grup3-4: p<0,001 Grup4-2: p=0,014 Grup3-2: p<0,001
KAT serum (IU/ml) Ortalama ± SD (min-max)	6,995 ± 3,927 (3,976-10,013)	37,251 ± 28,978 (14,977-59,525)	26,667 ± 13,552 (16,260-37,095)	48,800 ± 47,019 (12,658-84,942)	0,027 Grup1-4: p=0,019
KAT doku (IU/mg) Ortalama ± SD (min-max)	2,877 ± 1,035 (2,082-3,673)	14,860 ± 4,345 (11,519-18,200)	3,396 ± 0,901 (2,704-4,089)	14,624 ± 7,127 (9,145-20,102)	<0,001 Grup1-4: p<0,001 Grup1-2: p<0,001 Grup3-4: p<0,001 Grup3-2: p<0,001
GSH-Px doku (mIU/mg) Ortalama ± SD (min-max)	0,078 ± 0,017 (0,065-0,091)	0,101 ± 0,006 (0,096-0,106)	0,084 ± 0,007 (0,078-0,089)	0,093 ± 0,007 (0,087-0,098)	<0,001 Grup1-2: p=0,016 Grup3-2: p<0,001
MDA doku (nmol/mg) Ortalama ± SD (min-max)	0,525 ± 0,182 (0,385-0,665)	0,914 ± 0,187 (0,770-1,057)	1,019 ± 0,455 (0,670-1,368)	0,979 ± 0,153 (0,862-1,097)	0,002 Grup1-4: p<0,001 Grup1-2: p=0,002
XO serum (mIU/ml) Ortalama ± SD (min-max)	8,350 ± 1,216 (7,415-9,285)	6,328 ± 6,312 (1,476-11,180)	5,728 ± 0,983 (4,972-6,483)	5,394 ± 2,227 (3,682-7,107)	0,280

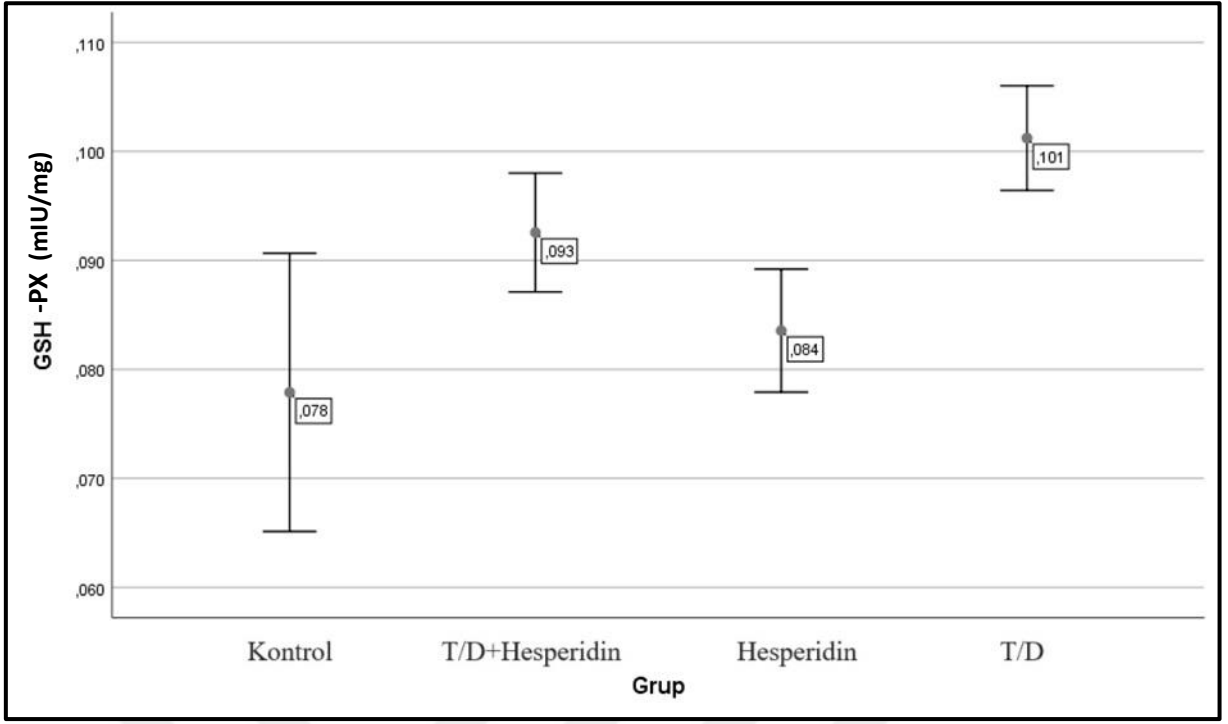
*ANOVA testi



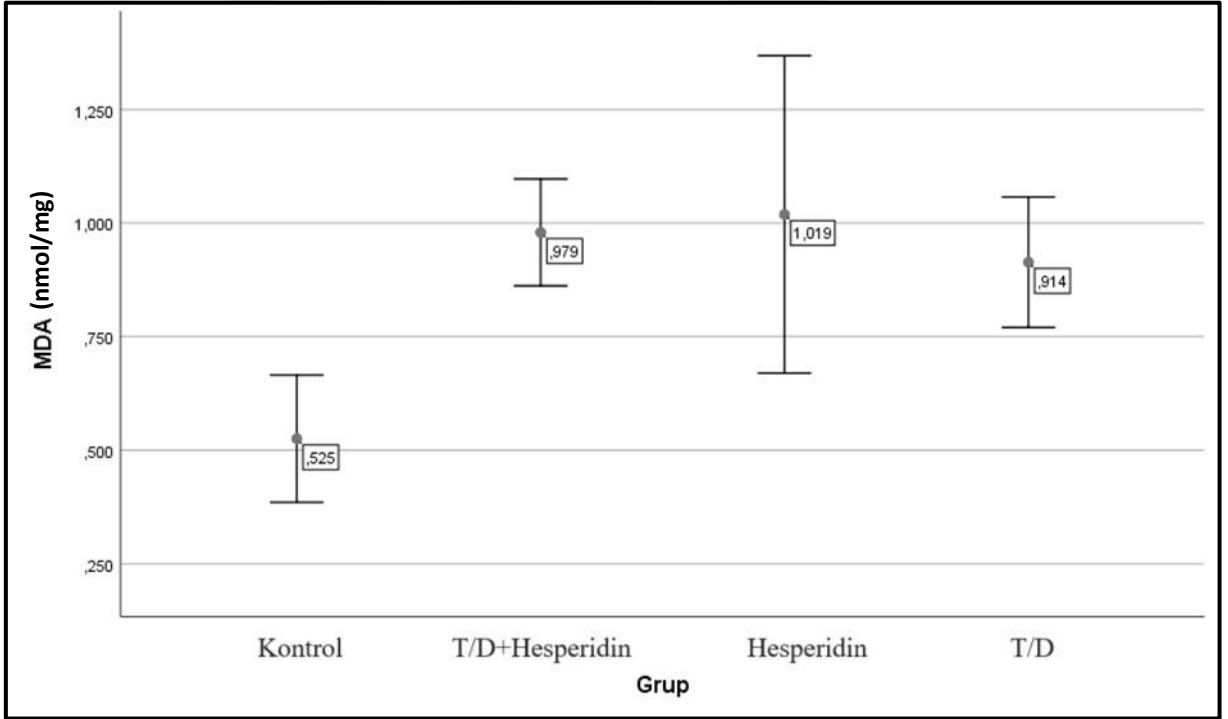
Şekil 6.7. KAT-serum hata çubuk grafiği



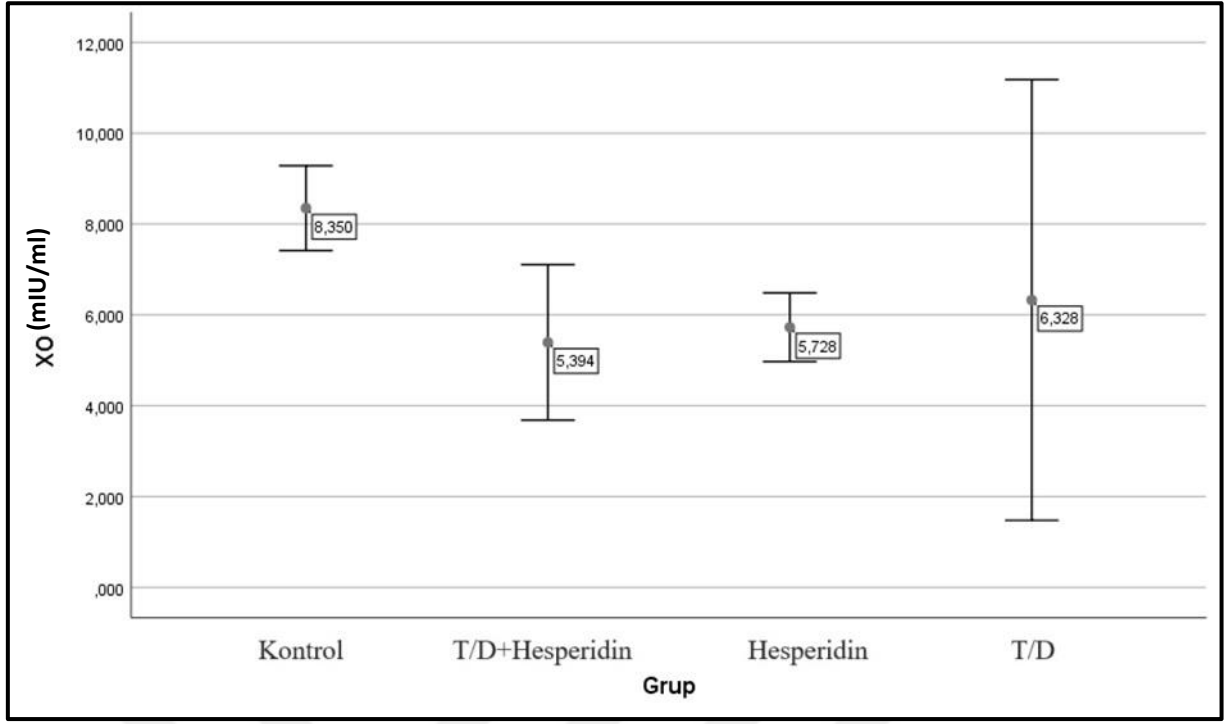
Şekil 6.8. KAT-doku hata çubuk grafiği



Şekil 6.9. GSH-Px hata çubuk grafiği



Şekil 6.10. MDA hata çubuk grafiği



Şekil 6.11. XO hata çubuk grafiği

7. TARTIŞMA

Testis torsiyonu (TT) spermatik kordun rotasyonu ile testise giden kan akımının bozulması sonucu oluşan klinik tabloyu ifade eder. Testisin nekrozu ve organ kaybı ile sonuçlanabilecek ciddi bir klinik tablodur(2).

Torsiyon öncelikle testis ve tunika vajinalisin anormal veya eksik fiksasyonu nedeniyle oluşur(3). Eksik veya anormal bir fiksasyon, testisin spermatik kord boyunca bükülmesine neden olabilir, bu da venöz çıkışı azaltır ve testiste vasküler konjesyona neden olur. Bu, testisin şişmesine, hassaslaşmasına ve eritemli hale gelmesine neden olur ve bükülmenin devam etmesiyle arteriyel akış azalır, bu da iskemi ve hatta infertilite ile birlikte kalıcı hasara neden olur(39). İskemik değişiklikler torsiyon başlangıcından 4-8 saat sonra ortaya çıkar(40). Ağrının başlamasını takiben 6 saat içinde yapılan müdahaleler ile testisin korunma ihtimali %90'ın üzerinde iken 24 saati geçen vakalarda ise bu oran %10'un altına düşmektedir.

Testiküler torsiyon (TT), acil cerrahi müdahale gerektiren bir durumdur. Testisin erken kurtarılma oranının en önemli iki belirleyicisi, semptomların başlangıcı ile detorsiyon arasında geçen süre ve kordun torsiyon derecesidir. Erken dönemde, ortalama torsiyon süresi 13 saatten az olan vakalarda fertilitenin korunduğu gözlemlenmiştir. Semptom başlangıcından sonraki 24 saat içinde tüm TT vakalarında acil cerrahi müdahale gereklidir. Uzamış torsiyon vakalarında, detorsiyon ile birlikte fiksasyon yerine orşiektomi yapılması bir alternatif olarak değerlendirilebilir(8).

Torsiyon sonucu oluşan hasar torsiyonun süresi kadar derecesine de bağlıdır. Testis torsiyonu üzerine yapılan deneysel çalışmalarda farklı torsiyon dereceleri araştırılmıştır. Turner ve ark. ratlarda testise 180°, 360°, 720° torsiyon uygulamış ve torsiyone testisi sırası ile 1, 2, 4 saat sonra detorsiyone etmiştir. Sonuç olarak 360° ve 1 saatlik torsiyonun yalnızca akut vasküler değişikliklere yol açtığını, 720° ve dört saatlik torsiyonun ise tam iskemi ile sonuçlandığını saptamışlardır(117). Bu çalışmada literatür bilgilerinin ışığında 4 saatlik 720° torsiyon uygulanmıştır.

Testis torsiyonu ve erken dönemde farkedilmesi durumunda yapılan detorsiyon işlemi testis dokusuna farklı mekanizmalar ile zarar verebilmektedir. Bu durumların ilki torsiyon sırasında testise yeterli kan akımı olmaması nedeniyle dokuda iskemi durumu oluşmasıdır.

Diğer bir durum ise testis detorsiyone edildikten ve kan akımı tekrar sağlandıktan sonra kan akımı ile gelen oksijen moleküllerinin dokuda oksijen radikalleri aracılığıyla testisin yapı bütünlüğünün bozulmasına neden olmasıdır.

Çeşitli hayvan deneylerinde testis torsiyonunun neden olduğu iskemi reperfüzyon hasarını önlemek amaçlı birçok farklı bileşik araştırılmıştır. Ho ve ark. yapmış olduğu bir fare çalışmasında T/D oluşturulan ratlarda bir nikotinik reseptör parsiyel agonisti olan vareniklin tedavisinin iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı ve testis atrofisini ve fibrozisi önlemede etkili olduğu gösterilmiştir(118). Yine Tanrıverdi ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada bir H₂ - reseptör antagonisti olan famotidinin testis torsiyon ve detorsiyonunun neden olduğu iskemi-reperfüzyon hasarı sırasında oksidatif stres belirteçlerindeki artışı ve antioksidanların azalmasını önlediği gösterilmiştir(119).

Turunçgillerde bulunan bir flavanon glikozidi olan Hesperidin, antiinflamatuvar, antioksidatif ve antikanser etkileriyle iyi bilinen bir antioksidandır. Li ve ark. yapmış olduğu bir çalışmadan karaciğerde iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan farelerde hesperidinin karaciğer oksidatif stresini iyileştirerek, inflamasyonu baskılayarak ve hepatosit apoptozunu önleyerek karaciğer I/R hasarına karşı koruma sağladığını göstermiştir(14). Çelik ve ark. ise sıçan testis T/D modelinde hesperidinin iskemiye bağlı biyokimyasal ve histolojik hasara karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir(15). Yine Meng ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada hesperidinin TLR-4/NF-κB/iNOS sinyalizasyonunu etkileyerek I/R tarafından indüklenen böbrek hasarına karşı koruduğunu göstermişlerdir(120).

Testis torsiyonu tedavi sonrası dönemde testis atrofisi ile karşımıza çıkabilmektedir. Atrofi gelişmesinde iskemi-reperfüzyon hasarının bir rolü olduğu görülmektedir. Atrofiyi saptamak amaçlı birçok çalışmada testis torsiyonu sonrası testis ağırlıkları ölçülmüştür. Song ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada sıçanlarda testis torsiyonu sonrası 6. ve 72. saatte yapılan USG incelemesinde epididim başının genişlediği ve spermatik kordun zamanla kalınlaştığı kaydedilmiştir. Aynı çalışmada torsiyone testislerin kontrol testislerine kıyasla 6. saatte ortalama 0,27 g ağırlık kazanırken 72. saatte ortalama 0,22 g ağırlık kaybettiği görülmüştür(121). Turner ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada unilateral testis torsiyonu oluşturulan ratlarda torsiyonun 1,2 ve 4.saatlerinde her iki testis ağırlığı ölçülmüş ve torsiyone olan testiste testis ağırlığının azaldığı görülmüştür(117). Azizollahi ve ark. yapmış olduğu bir fare çalışmasında testiküler torsiyon sonrası kök hücre transplantasyonu gerçekleştirilmiş ve testis ağırlıkları üzerine torsiyon detorsiyon işleminin ve kök hücre transplantasyonunun

etkisini anlamsız bulmuşlardır(122). Abu-Khudir ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada hesperidinin ratlarda kurşun-asetat kaynaklı testis hasarına karşı koruyucu etkisi araştırılmış ve hesperidinin testis ağırlığındaki azalmayı azalttığı görülmüştür(123). Bizim çalışmamızda ise bilateral T/D uygulaması sonrası sağ ve sol testis ağırlıkları ayrı ayrı değerlendirilmiş ve sol testis ağırlıkları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel fark saptanmıştır. Gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde literatürle uyumlu olarak kontrol grubunun sol testis ağırlığının istatistiksel anlamlı olarak T/D grubunun sol testis ağırlığından daha fazla olduğu görülmüştür ($p=0,046$). T/D+Hesperidin grubunda ise istatistiksel anlamlı fark olmasa da bu gruptaki sol testis ağırlıklarının T/D grubundan daha fazla olduğu izlenmiştir. Sağ testis ağırlıkları değerlendirildiğinde ise gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmiş olup gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde kontrol grubunun sağ testis ağırlığının literatür ile uyumlu olarak T/D grubunun sağ testis ağırlığından istatistiksel olarak daha fazla olduğu izlenmiştir ($p=0,003$). Ayrıca kontrol grubunun sağ testis ağırlığının T/D+hesperidin grubundan istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,01$). T/D+Hesperidin grubunda ise istatistiksel anlamlı fark görülmemiş olsa da bu gruptaki sağ testis ağırlıklarının T/D grubundan daha fazla olduğu izlenmiştir. Bu bilgiler ışığında hesperidin uygulamasının bilateral testis torsiyonunda sağ ve sol testis ağırlıklarındaki azalmayı azaltarak testis atrofisine karşı koruyucu bir ajan olarak değerlendirilebileceğini söyleyebiliriz.

ER'deki doğru protein katlama mekanizması; oksidatif stres, hipoglisemi, I/R hasarı, enfeksiyon ve inflamasyon gibi patolojik durumlarda bozulmaktadır(9). Bu stres koşulları altında ER'de yanlış katlanmış proteinler birikir ve bu patolojiye "ER stresi" adı verilir. Artmış ER stresine sahip hücreler, yanlış katlanmış proteinleri uzaklaştırmak için katlanmamış protein yanıtı (UPR) yolunu aktive eder(10).

ER stresi ve ilişkili UPR mekanizmaları testiküler torsiyon modelinde çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur. Kazaz ve ark. yapmış olduğu klorojenik asitin testis torsiyonunun neden olduğu ER stresine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada T/ D gruplarında ER stres belirteçlerinden GRP78 ve ATF6'nın arttığı gözlenmiştir(124). Demir ve ark. yapmış olduğu astaksantin sığınlarda testis torsiyon detorsiyonunun sebep olduğu ER stresi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada T/D gruplarında GRP78 ve ATF6'nın arttığı gözlenmiştir(125).

Hesperidinin ER stresi üzerine etkilerin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Kızıl ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada sodyum florür (NaF) ile testis hasarı oluşturularak ER stres

belirteçlerinden ATF-6, GRP78, IRE1 ve PERK seviyelerini yükseldiği, 14 günlük 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarındaki hesperidin tedavisinin ise ilgili genlerin seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir(16). Yine İleritürk ve ark. yapmış olduğu çalışmada paklitaksel ile testis hasarı oluşturulan ratlarda ATF6, PERK, IRE1 α , GRP78 düzeylerinin arttığı ve 10 günlük 100mg/kg ve 200 mg/kg hesperidin tedavisi sonrası bu belirteçlerin düştüğü gözlenmiştir(126).

Bizim çalışmamızda ise ratların serum ATF6 ve GRP78 değerleri incelendiği zaman gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık izlenmedi. ATF6 değerleri incelendiğinde daha önce yapılan araştırmalara benzer şekilde T/D+Hesperidin grubunun T/D grubuna göre daha düşük değerlere sahip olduğu gözlenmesine rağmen bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı çıkmadığı görüldü. GRP78 değerleri incelendiğinde değerler açısından en yüksek grubun Hesperidin grubunda, en düşük değerlerin ise T/D grubunda olduğu izlendi. Diğer çalışmalar ile karşılaştırdığımızda ortaya çıkan bu farkın hesperidin tedavisinin 7 gün boyunca ve 100 mg/kg uygulanmış olmasından dolayı olabileceğini düşünmekteyiz. Örneklem sayısı artırılarak ve tedavi süresi uzatılarak yapılacak olan ilerideki çalışmaların bu çıkarımımıza katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Testis torsiyonu sonrasında oluşan ER stresinin tetiklediği apoptoz germ hücre kaybına ve sonucunda infertiliteye kadar gidebilecek üreme fonksiyon kaybına neden olması açısından önemlidir(127). Testis torsiyonunun neden olduğu germ hücre apoptozu birçok çalışmada ele alınmıştır. Liu ve ark. yapmış olduğu bir sıçan testis torsiyonu çalışmasında 2 saatlik torsiyon detorsiyon işlemi sonrasında testis dokusunda apoptozla ilişkili Bax ve Fas/FasL moleküllerinin artmış ekspresyonunu ve artmış sitokrom C salınımını saptamışlardır(128). Yine Shih ve ark. çalışmalarında testis torsiyonu uygulanan ratlarda testis dokusunda apoptoz belirteçlerinden Tunnel testi pozitifliği ve artmış kaspaz-3 ekspresyonu saptamışlar ve önemli bir sinyal molekülü olan sphingosine-1-phosphate (S1P) analogu FTY720'nin testis torsiyonuna bağlı germ hücre apoptozunu azalttığını ortaya koymuşlardır(129). Mestroviç ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada testis dokusunda immünohistokimyasal olarak apoptotik hücre belirteci olan kaspaz-3 boyanmanın torsiyon detorsiyon uygulanan ratlarda arttığı ve Ca-kanal blokörü olan nifedipinin bu boyanmayı azalttığını belirtmişlerdir(130). Bizim çalışmamızda rat serumunda ELISA yöntemiyle kaspaz-3 konsantrasyonu bakılmış olup bu değerler incelendiğinde T/D grubunun kaspaz-3 değerlerinin en yüksek olduğu ve T/D+Hesperidin grubunda kaspaz-3 değerlerinin düştüğü gözlenmiş olmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda hesperidin'in germ hücre apoptozuna yönelik etkileri

ile ilgili örneklem sayısı artırılarak ve farklı apoptotik belirteçler üzerinden farklı yöntemler ile çalışılarak yapılacak olan çalışmaların literatüre katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Klinik ve deneysel çalışmalar testis torsiyonunun süreye ve dönme derecesine bağlı olarak testiste çeşitli hasarlar bıraktığını ortaya koymuştur(131). Torsiyon sonrası testis hasarının ciddiyetini derecelendirmeye yönelik girişimlerde fertilité göstergeleri, testis boyutu, testis ağırlığı, testis histolojisi ve semen analizleri gibi genel parametreler kullanılmasının yanı sıra testis hasarının altında yatan hücresel mekanizmaları belirlemek için ipsilateral ve kontralateral testiste daha spesifik hücresel fonksiyonlar (endokrin, parakrin, vb.) üzerine çalışmalar da yapılmıştır. Spermatogenezin desteklenmesinde birçok faktör rol oynasa da, testosteron bunların arasında açıkça kilit öneme sahiptir. Testosteron, testis interstisyumundaki Leydig hücreleri tarafından üretilir ve testis interstisyel sıvısına (TIF) ve seminifer tübülleri çevreleyen kılcal damarlara salgılanır(132). Testosteron, cinsiyet farklılaşmasını düzenleyen, erkek cinsiyet özelliklerini, spermatogenez ve fertilitéyi sağlayan birincil erkeklik hormonudur; testiküler iniş, spermatogenez, penis ve testislerin büyümesi ve libidonun artmasını içeren birincil seksüel gelişimin gelişmesinden sorumludur. Testosteron ayrıca masküleniteden sorumlu olan ikincil erkeklik özelliklerinin düzenlenmesinde de rol oynar(133). Testis torsiyonuna bağlı gelişen iskemi/reperfüzyon (IR) hasarından sonra seminifer tübül epitelinin infraksiyonu ve sperm hücrelerinin kaybı birçok çalışmada gösterilmiştir(134). Testis torsiyonu ile başvuran ve orşiopeksi veya orşiektomi yapılan erkekler arasında endokrin fonksiyon karşılaştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Kontrollerle karşılaştırıldığında, serum folikül uyarıcı hormon (FSH), lüteinizan hormon (LH) ve testosteron düzeyleri arasında fark bulunmamıştır. Aynı şekilde birçok çalışmada unilateral testis torsiyonundan sonra insanlarda ve deneysel hayvanlarda serum testosteron ve gonadotropin hormon konsantrasyonları değerlendirilmiş ve genel olarak önemli ölçüde değişmediği görülmüştür. Anderson ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada 16 postpubertal erkek hasta testis torsiyonu sonrası testosteron ve gonadotropin seviyeleri kontrol grupları ile karşılaştırılmış ve serum testosteron seviyelerinde anlamlı bir fark görülmemiştir(135). Pakzy ve ark. yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise unilateral testis torsiyonu oluşturulmuş ratlarda kontralateral testiste testosteron seviyesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür(136). Bu sonuçlardan farklı olarak Ameli ve ark. yaptığı bir başka rat çalışmasında testis torsiyonu sonrası torsiyon detorsiyon yapılan grupta kontrol grubuna göre serum testosteron seviyesinin azaldığı gösterilmiştir(137). Hsiao ve ark. yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise ratlarda unilateral testis torsiyonu sonrasında serum testosteron seviyesinin kontrol grubuna göre azaldığı ve FSH seviyelerinin arttığı görülmüş ve orbital yağ kök hücresi enjeksiyonunun

testosteron seviyesindeki azalmayı azalttığı görülmüştür(138). Literatürde testis torsiyonu sonrası yan etkiden veya reaktif oksijen hasarından korunma amacıyla hesperidin kullanılan ve kan testosteron düzeyi değerlendirilmesi yapılan çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda ise kontrol grubu ile T/D grubu karşılaştırılmış ve T/D grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kan testosteron düzeylerinde düşüş izlenmiştir. Yine T/D ve hesperidin verilen T/D grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hesperidin verilen torsiyon grubunda testosteron seviyesindeki azalmanın daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Testis torsiyonunun testis dokusu üzerindeki histopatolojik ve biyokimyasal açıdan olumsuz etkileri daha önce pek çok araştırmacı tarafınca değerlendirilmiştir. Histopatolojik etki açısından baktığımızda testis torsiyonu testisin normal anatomik yapısını bozmakta, seminifer tübüllerin düzenli hali kaybolmakta, leydig hücre sayısı azaltmakta, sertoli hücre aralarındaki sıkı bağlantılar kaybolmakta ve tüm testis içerisinde genel morfolojik yapının bozulmakta olduğu belirtilmektedir. Yapılan birçok çalışmada torsiyone olan testis histopatolojik olarak incelendiğinde testislerin normal yapısının ortadan kalktığı, yerini nekroz, hemoraji ve inflamasyon hücrelerinin aldığı görülmektedir. Orşiektomi veya orşiopeksi yapıp yapılmadığına bakılmaksızın, torsiyon sonrası fertilitate tam olarak anlaşılamamıştır. Bazı çalışmalarda, semen analizi kalitatif anormallikler göstermektedir. Daha kısa bir torsiyon süresi daha az testiküler atrofi ile ilişkilidir ve semen yoğunluğu genellikle normaldir. Bazı çalışmalarda ise hastalarda testiküler I/R hasarının, testiküler atrofi ve ardından bozulmuş spermatogenez gibi olumsuz prognozlara yol açtığı ve TT sonrası anormal spermatogenez, sperm miktarı ve kalitesi de dahil olmak üzere semen kalitesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir(139). Çalışmalar, testis torsiyonunun fertilitate üzerindeki etkisi konusunda çelişkili sonuçlar göstermiştir(40). Testis torsiyonu sonrasında erkek infertilitesinin araştırılmasında anamnez, fizik muayene ve laboratuvar sonuçlarının yanı sıra testis biyopsisinin de önemli bir yeri vardır.

Testis torsiyonu sonrasında testis dokusununun germ hücre durumunun Johnsen skorlaması ile incelendiği birçok çalışma literatürde mevcuttur. Demir ve ark. yapmış olduğu sıçanlarda bir testis torsiyonu çalışmasında torsiyon/detorsiyon yapılan grupta torsiyone testiste Johnsen skorunun azaldığı ve antaksantin uygulanmasının bu azalmayı azalttığı görülmüştür(125). Mahmoud ve ark. yaptığı bir diğer çalışmada yine ratlarda testis torsiyonu oluşturulmuş ve 4 saatlik torsiyon detorsiyon sonucunda torsiyone testiste Johnsen skorunun azaldığı ve pioglitazon uygulamasının bu skordaki düşüşü azalttığı gösterilmiştir(140). Katami

ve ark. ise ratları kontrol, yalnızca torsiyon yapılan, torsiyon ve sonrasında detorsiyon yapılan gruplar olmak üzere 3 gruba ayrılmış ve en düşük Johnsen skorunun torsiyon yapıldıktan sonra detorsiyon uygulanan grupta olduğu gösterilmiştir. Bu da iskemi ile birlikte reperfüzyon hasarının spermatogenez üzerindeki etkisini göstermektedir(141). Bizim çalışmamızda ise literatürle uyumlu olarak sıçan testis kesitlerinde yapılan mikroskopik inceleme ve Johnsen skorlaması değerlendirildiğinde kontrol grubunda seminifer tübül epitel hücrelerinin bütünlüğünü korunduğu ve tübülün normal morfolojide olduğu gözlemlendi. T/D grubu, kontrol grubuna göre daha düşük Johnsen skoruna sahipti. Ayrıca T/D grubu ile karşılaştırıldığında T/D+Hesperidinin istatistiksel anlamlı olmasa da Johnsen değerlerinde literatür ile uyumlu olarak daha yüksek olduğu izlendi. Seminifer tübül bütünlüğünün bozulduğu, germinal epitel hücrelerinin normal morfolojilerini koruyamadıkları ve hücrelerin birbiriyle bağlantılarını koruyamadıkları için ayrıldıkları izlendi. Sitoplazma ve çekirdek görünümü kontrol grubuna göre daha eozinofilik ve hücre boyutları daha küçüktü. T/D+Hesperidin ve Hesperidin gruplarının kontrol grubuna göre germinal epitel hücreleri açısından incelendiğinde tübül epitelinin bütünlüğünün bozulmadığı ve lümende spermatozoonlarla birlikte hücrelerin normal görünümde olduğu izlendi. Bu sonuçlar hesperidinin torsiyon ve detorsiyona bağlı gelişen testisteki histopatolojik değişikliklere ve bunun sonucunda görülen spermatogenezdeki bozulmaya karşı kullanılabilecek olası bir koruyucu ajan olabileceğini göstermekle birlikte, ileride yapılacak olan çalışmaların bu sonucumuza katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Oksidan/antioksidan dengesizliğinden ve oksidan fazlalığı ve/veya antioksidan eksikliğinden kaynaklanan oksidatif stres hücre ölümünü tetikleyen, ciddi metabolik disfonksiyona ve makromoleküler hasara yol açan bir süreçtir. Bu oksidatif stres durumunda ROT üretimi gerçekleşir(142). Testis, yüksek düzeyde çoklu doymamış yağ asidi içermesi nedeniyle ROT saldırısına karşı oldukça hassastır(143). Testiküler I/R kaynaklı oluşan ROT'un, oksidatif hasar yoluyla testiküler membranı bozduğu, böylece hücrelerin ROT saldırısına eğilimli hale geldiği ve leydig hücre popülasyonunda azalmaya bağlı testosteron seviyelerinde düşüşe yol açtığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir(144). Testis torsiyon ve detorsiyonu işlemi sonrasında serumda oksidan, antioksidan düzeylerine bakılmış ve sonuçta dengenin oksidan yönünde bozulduğu görülmüştür(145). Malondialdehit (MDA), araşidonik asidin ve daha büyük çoklu doymamış yağ asitlerinin enzimatik veya enzimatik olmayan yolla ayrışması sonucu oluşan son üründür. Yağ asidi oksidasyonunun spesifik yada kantitatif bir göstergesi olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. 1960'lardan bu yana, in vivo ve in vitro olarak oksidatif stres seviyesini ölçmek için bu molekül değerlendirilmiştir(70). Testis torsiyonu modeli oluşturulan birçok çalışmada testis

dokusundaki hasarın oluşmasında oksidatif stresin rolünü test etmek için doku MDA ölçümü kullanılmıştır. Erboğa ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada testis torsiyonu ve detorsiyonu yapılan sıçanlarda 4 saatlik iskemi/reperfüzyon süresi sonrası testis dokusunda MDA seviyelerinin önemli bir şekilde arttığı görülmüş ve timokinon uygulamasının bu artışı azalttığı gösterilmiştir(146). Kurt ve ark. yapmış oldukları bir diğer sıçanlarda testis torsiyonu gerçekleştirilen çalışmada torsiyon/detorsiyon oluşturulan grupta testis dokusunda MDA seviyelerinin arttığı ve mannitol uygulamasının bu artışı azalttığını tespit etmişlerdir(147). Benzer şekilde Solak ve ark. yapmış oldukları çalışmada testis torsiyonu/detorsiyonu oluşturulan ratlarda 3 saatlik iskemi reperfüzyon işlemi sonrasında testis dokusunda MDA düzeyinin arttığı ve intraperitoneal agmatin uygulamasının bu artışı azalttığı görülmüştür(148). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak doku MDA değerleri incelendiğinde en düşük değerlerin kontrol grubunda olduğu izlenmiş, gruplar karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde kontrol grubunun MDA değerlerinin sırasıyla T/D ve T/D+Hesperidin grubundan istatistiksel anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir.

I/R sürecinin iskemik fazı sırasında, kan akışının bozulması nedeniyle hipoksik koşullar gelişir. Hipoksik koşullar, hipoksantin deoksijenazın bir süperoksit enzim kaynağı olan XO'ya dönüşmesine yol açar(149). XO, iskemi/reperfüzyon kaynaklı hasarda merkezi bir role sahiptir. Testis torsiyonundan sonra, iskeminin başlamasıyla birlikte hipoksantin (adenozin trifosfatın bir bozunma ürünü) biriktiği ve ksantin dehidrojenazın hızla XO'ya dönüştüğü gösterilmiştir. Reperfüzyondan sonra, XO enzimi tarafından hipoksantin ksantin ve ürik aside dönüştürülmesi için gerekli olan fazla oksijen sağlanır. Bu bozunma süreci sırasında, oldukça toksik süperoksit anyonları üretilir. Artan serbest radikal üretimi, endojen serbest radikal temizleyicilerinin kapasitesini aşar ve önceden iskemik olan dokularda önemli hasara yol açar(150). Akhigbe ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada sıçanlara 2,5 saatlik torsiyon/detorsiyon işlemi uygulanmış ve işlem uygulanan grupta doku XO seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı tespit edilmiştir ve omega 3 yağ asidi uygulamasının bu artışı azalttığını tespit etmişlerdir(144). Benzer bir çalışmada Ünsal ve ark. sıçanları kontrol grubu, testis torsiyonu yapılan grup ve testis torsiyonu/detorsiyonu gerçekleştirilen grup olarak gruplara ayırmışlar ve testis torsiyon/detorsiyon yapılan grupta doku XO seviyesinin en yüksek olduğunu ve sarımsak ekstratının bu yükselmeyi azalttığını tespit etmişlerdir(151). Bizim çalışmamızda ise serum XO değerleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmasa da T/D+Hesperidin grubunda T/D grubuna kıyasla daha düşük XO değerleri izlenmiştir.

Süperoksit dismutaz, süperoksit anyon radikallerini seçici ve hızlı bir şekilde hidrojen peroksite indirgeyebilen güçlü bir antioksidandır. Oksidatif stresi ölçmek için kullanılabilir. Glutasyon peroksidaz da H_2O_2 'nin neden olduğu hücresel hasara karşı etkilidir ve I/R hasarına karşı antioksidan savunma sisteminin ilk adımını oluşturur. Katalaz, dokuları I/R'den koruyan bir başka enzimdir(147). Testis torsiyonu oluşturulan birçok modelde bu belirteçler araştırılmıştır. Çelik ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada sıçanlarda testis torsiyonu ve detorsiyonu durumunda hesperidinin düşük doz (50 mg/kg) ve yüksek dozlardaki (100 mg/kg) etkilerini incelemişler ve antioksidan sistemin parçası olan doku SOD, katalaz ve GSH-Px değerlerinin torsiyon/detorsiyon sırasında azaldığını ancak özellikle yüksek doz hesperidin uygulamasının bu azalmayı azalttığını ve normale yakın değerler elde ettiklerini belirtmişlerdir(15). Ekşi ve ark. yapmış oldukları bir diğer çalışmada bununla uyumlu olarak sıçanlarda testis torsiyon ve detorsiyonu oluşturulduktan sonra SOD, katalaz ve GSH-Px değerlerinin azaldığı görülmüş ancak bir flavonoid olan mirisetinin bu azalmaya etkisinin olmadığını belirtmişlerdir(152). Tanrıverdi ve ark. yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise yine torsiyon detorsiyon oluşturulan sıçanlarda doku SOD ve GSH-Px değerlerinin azaldığını ve famotidin uygulamasının SOD değerlerindeki azalmayı azalttığını ancak GSH-Px değerlerini etkilemediğini saptamışlardır(119). Bu çalışmalardan farklı olarak Erdemir ve ark. yapmış oldukları bir ratlarda testis torsiyon detorsiyonu çalışmasında, torsiyon detorsiyon yapılan gruplarda doku SOD ve GSH-Px değerlerinin arttığını ve melatonin uygulamasının bu artışı azalttığını saptamışlardır(153). Bizim çalışmamızda da SOD değerleri incelendiğinde literatürle uyumlu bir şekilde istatistiksel anlamlı olarak kontrol grubunun, sırasıyla T/D+Hesperidin ve T/D gruplarından daha yüksek olarak izlendi. Ayrıca incelemeye devam edildiğinde Hesperidin grubunun istatistiksel anlamlı olarak T/D ve T/D+Hesperidin gruplarından daha yüksek SOD değerlerine sahip olduğu izlenmiştir. SOD ile yapılan son ikili grup incelemesinde ise T/D+Hesperidin grubunun istatistiksel anlamlı olarak T/D grubundan daha düşük değerlere sahip olduğu görülmüştür. Yine çalışmamızda ratların doku KAT değerleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlendi. Doku KAT değerleri en yüksek T/D grubunda izlenmişken en düşük olarak kontrol grubunda izlenmiştir. Ancak gruplar hesperidin tedavisi açısından değerlendirildiğinde T/D+Hesperidin grubunun doku KAT aktivitesinin T/D grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür. Son olarak çalışmamızda ratların doku GSH-Px değerleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlendi. Doku GSH-Px değerleri en yüksek T/D grubunda izlenmişken en düşük olarak kontrol grubunda izlenmiştir. Bu bilgiler hesperidinin testis torsiyonu ve detorsiyonu sonrasında gelişen iskemi/reperfüzyon hasarının neden olduğu oksidan-antioksidan durum üzerine olan etkilerinin daha ayrıntılı araştırılmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda testis torsiyonu ve detorsiyonu durumlarında flavonoid ailesine dahil olan hesperidinin oksidatif stres, ER stresi, steroid hormon sentezi ve germ hücre apoptozu üzerine olan koruyucu etkilerinin araştırılmasını amaçladık. Bu çalışma sonucunda:

1) Testis torsiyonu sonrası gelişen iskemi reperfüzyon hasarı sonucunda oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu belirteçlerinden doku MDA seviyesinin literatürle uyumlu olarak arttığını görmekle birlikte hesperidin uygulamasının MDA artışını engelleme üzerine bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Yine iskemi/reperfüzyon kaynaklı hasarda merkezi bir role sahip olan serum XO seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark elde edilememiştir. İskemi reperfüzyon hasarının bir diğer göstergesi olan antioksidan enzim belirteçlerinden doku SOD düzeyinin literatürle uyumlu olarak torsiyon/detorsiyon işlemi sonrasında anlamlı bulunmasa da azaldığı görülmüştür. SOD ile yapılan ikili grup incelemesinde ise T/D+Hesperidin grubunun istatistiksel anlamlı olarak T/D grubundan daha düşük değerlere sahip olduğu görülmüştür. Antioksidan enzim belirteçlerinden doku katalaz seviyelerinin ise literatürle uyumsuz olarak doku KAT değerleri en yüksek T/D grubunda izlenmişken en düşük olarak kontrol grubunda izlenmiştir. Ancak gruplar hesperidin tedavisi açısından değerlendirildiğinde T/D+Hesperidin grubunun doku KAT aktivitesinin T/D grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür. Bir diğer antioksidan enzim belirteci olan GSH-Px sonuçları istatistiksel olarak anlamlı olarak en yüksek seviyenin T/D grubunda olduğu görüldü ve gruplar karşılaştırıldığında hesperidin uygulamasının doku GSH-Px değerleri üzerine etkisinin olmadığı görüldü.

2) Testis torsiyonu sonrası gelişen ER stresini belirlemek ve hesperidinin ER stresi üzerine etkilerini gözlemlemek amaçlı ratların serum ATF6 ve GRP78 değerleri incelendiği zaman gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık izlenmemesine rağmen ATF6 değerleri incelendiğinde literatürle uyumlu olarak T/D+Hesperidin grubunun T/D grubuna göre daha düşük değerlere sahip olduğu gözlemlendi.

3) Germ hücre apoptozunu ve hesperidinin etkilerini belirlemek amaçlı rat serumunda ELISA yöntemiyle kaspaz-3 konsantrasyonu bakılmış olup bu değerler incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, literatürle uyumlu olarak T/D grubunun kaspaz-3 değerlerinin en yüksek olduğu ve T/D+Hesperidin grubunda kaspaz-3 değerlerinin düştüğü gözlenmiştir.

4) Torsiyon sonrası testis hasarının ciddiyetini derecelendirmek amaçlı endokrin fonksiyonların kaybına ve hesperidinin bu kayıp üzerindeki etkilerinin incelenmesine yönelik baktığımızda çalışmamızda kontrol grubu ile T/D grubu karşılaştırıldığında T/D grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kan testosteron düzeylerinde düşüş izlenmiştir. Yine T/D ve T/D+hesperidin grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hesperidin verilen torsiyon grubunda testosteron seviyesindeki azalmanın daha düşük olduğu gözlenmiştir.

5) Son olarak testis torsiyonu sonrasında erkek infertilitesinin araştırılmasında önemli bir yeri olan testis biyopsisi yapılan çalışmamızda Johnsen skorlaması değerlendirildiğinde literatürle uyumlu olarak kontrol grubunda seminifer tübül epitel hücrelerinin bütünlüğünü koruduğu ve tübülün normal morfolojide olduğu gözlemlendi. T/D grubu, kontrol grubuna göre daha düşük Johnsen skoruna sahipti. T/D+Hesperidin ve Hesperidin gruplarının kontrol grubuna göre germinal epitel hücreleri açısından incelendiğinde tübül epitelinin bütünlüğünün bozulmadığı ve lümende spermatozoonlarla birlikte hücrelerin normal görünümde olduğu izlendi.

Bu sonuçlar hesperidinin torsiyon ve detorsiyona bağlı gelişen testisteki histopatolojik değişikliklere ve bunun sonucunda görülen spermatogenezdeki bozulmaya karşı kullanılabilecek olası bir koruyucu ajan olabileceğini göstermektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Zhao LC, Lautz TB, Meeks JJ, Maizels M. Pediatric testicular torsion epidemiology using a national database: incidence, risk of orchiectomy and possible measures toward improving the quality of care. *The Journal of Urology*. 2011;186(5):2009-2013.
2. 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):680-683.
3. Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM. Testicular torsion: diagnosis, evaluation, and management. *American Family Physician*. 2013;88(12):835-840.
4. Srinivasan A, Cinman N, Feber KM, Gitlin J, Palmer LS. History and physical examination findings predictive of testicular torsion: an attempt to promote clinical diagnosis by house staff. *Journal of Pediatric Urology*. 2011;7(4):470-474.
5. 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 Pt 1):604-607.
6. 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.
7. Cunningham RF. Familial occurrence of testicular torsion. *JAMA*. 1960;174:1330-1331.
8. Arap MA, Vicentini FC, Cocuzza M, Hallak J, Athayde K, Lucon AM ve ark. Late hormonal levels, semen parameters, and presence of antisperm antibodies in patients treated for testicular torsion. *Journal of Andrology*. 2007;28(4):528-532.
9. Bhuvaneshwari S, Yogalakshmi B, Sreeja S, Anuradha CV. Astaxanthin reduces hepatic stress endoplasmic reticulum and nuclear factor- κ B-mediated inflammation in high fructose and high fat diet-fed mice. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19(2):183-191.
10. Martucciello S, Masullo M, Cerulli A, Piacente S. Natural Products Targeting ER Stress, and the Functional Link to Mitochondria. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(6):1905.
11. Bhattarai KR, Riaz TA, Kim HR, Chae HJ. The aftermath of the interplay between the endoplasmic reticulum stress response and redox signaling. *Experimental & Molecular Medicine*. 2021;53(2):151-167.
12. Wang W, Liu T, Liu Y, Yu L, Yan X, Weng W ve ark. Astaxanthin attenuates alcoholic cardiomyopathy via inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated cardiac apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2021;412:115378.
13. Şengün F, Özenoğlu A. Flavonoidlerin Kanseri Gelişimi ve Seyri Üzerine Etkileri. *Avrasya Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2022;6(1):57-65.

14. Li S, Qin Q, Luo D, Pan W, Wei Y, Xu Y ve ark. Hesperidin ameliorates liver ischemia/reperfusion injury via activation of the Akt pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2020;22(6):4519-4530.
15. Celik E, Oguzturk H, Sahin N, Turtay MG, Oguz F, Ciftci O. Protective effects of hesperidin in experimental testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Archives of Medical Science*. 2016;12(5):928-934.
16. Kızıl EH, Gür C, Ayna A, Darendelioğlu E, Küçükler S, Sağ S. Contribution of Oxidative Stress, Apoptosis, Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy Pathways to the Ameliorative Effects of Hesperidin in NaF-Induced Testicular Toxicity. *Chemistry & Biodiversity*. 2023;20(3):e202200982.
17. Aktümsek A. *Anatomi ve Fizyoloji: (İnsan Biyolojisi)*. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım, 2004.
18. Harrison RG, Barclay AE. The distribution of the testicular artery (internal spermatic artery) to the human testis. *British Journal of Urology*. 1948;20(2):57-66.
19. Owen C. The Scrotum. In: Hagen-Ansert SL eds. *Textbook of Diagnostic Sonography*. Hollanda: Elsevier Health Sciences, 2012: 604-628.
20. Junqueira LC, Carneriro J, Kelley RO. *Basic Histology-Text and Atlas*. Ankara: Barış Kitabevi, 2005.
21. Eroschenko VP. Erkek Üreme Sistemi. In: Demir R eds. *di Fiore Histoloji Atlası-Fonksiyonel İlişkileriyle*. Ankara: Palme Yayıncılık, 2001.
22. Kathrins M, Niederberger C. Diagnosis and treatment of infertility-related male hormonal dysfunction. *Nature Reviews Urology*. 2016;13(6):309-323.
23. Paulsen F, Waschke J. *Sobotta Histoloji Atlası*. İstanbul: Beta Basım Yayın AŞ, 1999.
24. Abd-Elmaksoud A. Morphological, Glycohistochemical, and Immunohistochemical Studies on the Embryonic and Adult Bovine Testis [Doktora Tezi]. Almanya: LMU München: Faculty of Veterinary Medicine; 2005.
25. Dudek WR. *BRS Embrology*. ABD: Lippincott Williams&Wilkins, 2014.
26. Ağras K. İnmemiş Testiste Embriyoloji ve Testiküler İnış Mekanizmaları. *Türk Üroloji Seminerleri*. 2012;25(1):17-22.
27. Silber S. Testis development, embryology, and anatomy. In: Silber S eds. *Fundamentals of Male Infertility*. Almanya: Springer, 2018.
28. Sembulingam K, Sembulingam P. *Essentials of Medical Physiology*. İngiltere: JP Medical Ltd, 2012.
29. Sturkie PD. *Sturkie's Avian Physiology*. Hollanda: Elsevier Science, 2000.

30. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970;1(1):2-25.
31. Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of Testicular Function. In: Nieschlag, E., Behre, H.M., Nieschlag, S. Eds. *Almanya: Springer*, 2010.
32. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology*. Hollanda: Elsevier Health Sciences, 2016.
33. L. Costanzo. *Physiology Cases and Problems*. ABD: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
34. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF ve ark. *Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 2013.
35. Manna PR, Pakarinen P, El-Hefnawy T, Huhtaniemi IT. Functional assessment of the calcium messenger system in cultured mouse Leydig tumor cells: regulation of human chorionic gonadotropin-induced expression of the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology*. 1999;140(4):1739-1751.
36. Celiloğlu C, Yüksel B. STAR ve CYP11A1 Mutasyonları. *Türkiye Klinikleri Pediatric Endocrinology-Special Topics*. 2022;3(3): 50-54.
37. Romejko K, Rymarz A, Sadownik H, Niemczyk S. Testosterone deficiency as one of the major endocrine disorders in chronic kidney disease. *Nutrients*. 2022;14(16):3438.
38. Stojkov NJ, Janjic MM, Baburski AZ, Mihajlovic AI, Drljaca DM, Sokanovic SJ ve ark. Sustained in vivo blockade of α_1 -adrenergic receptors prevented some of stress-triggered effects on steroidogenic machinery in Leydig cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2013;305(2):E194-204.
39. Fujita N, Tambo M, Okegawa T, Higashihara E, Nutahara K. Distinguishing testicular torsion from torsion of the appendix testis by clinical features and signs in patients with acute scrotum. *Research and Reports in Urology*. 2017;9:169-174.
40. 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;12:237-246.
41. Memik Ö, Kayıkçı A, Akyüz O, Yaşar M. Testis torsiyonu: Olgu sunumu. *Konuralp Tıp Dergisi*. 2012;4(1):35-37.
42. Strandring S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practise*. Hollanda: Elsevier, 2005.
43. Jefferson RH, Pérez LM, Joseph DB. Critical analysis of the clinical presentation of acute scrotum: a 9-year experience at a single institution. *The Journal of Urology*. 1997;158:1198-1200.

44. King LR. Urologic Surgery in Infants and Children. ABD: Saunders, 1998.
45. 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.
46. Qin KR, Qu LG. Diagnosing with a TWIST: Systematic review and meta-analysis of a testicular torsion risk score. The Journal of Urology. 2022;208(1):62-70.
47. Kadioğlu A, Seçkiner İ, Demirel HC, Şenel S, Sandıkçı F. Güncel Üroloji. İstanbul: Türk Üroloji Derneği, 2022.
48. Rosenberg H, Long B, Keays M. Just the facts: assessment and management of testicular torsion in the emergency department. Canadian Journal of Emergency Medicine. 2021;23(6):740-743.
49. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW ve ark. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. Cell Physiol Biochem. 2018;46(4):1650-1667.
50. Özcan O, Erdal H, Yönden Z. İskemi-reperfüzyon hasari ve oksidatif stres ilişkisine biyokimyasal bakış. The Medical Journal of Mustafa Kemal University 2015;6: 27-33.
51. Canbolat O. İskemi ve Reperfüzyonun Temel Moleküler Mekanizmaları. In: Küçük a, Arslan M eds Deneysel İskemi Reperfüzyon Modelleri. Ankara: Akademisyen Kitabevi, 2021.
52. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. Basic Research in Cardiology. 2009;104(2):181-188.
53. Bayram S. İntestinal iskemi ve reperfüzyon. ODÜ Tıp Dergisi 2015;2(3):166-171.
54. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. ABD: Oxford University Press, 2015.
55. Cadenas E, Sies H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. Advances in Enzyme Regulation. 1985;23:217-237.
56. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. Biochemistry and Cell Biology. 1990;68(7-8):989-998.
57. Grisham MB, Granger DN. Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. Clinics in Chest Medicine. 1989;10:71-81.
58. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL ve ark. Oxygen radicals and human disease. Annals of internal medicine. 1987;107(4):526-545.
59. Fujii J, Homma T, Osaki T. Superoxide Radicals in the Execution of Cell Death. Antioxidants (Basel). 2022;11(3):501.
60. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. Journal of Biological Chemistry. 2004;279:49064-49073.

61. Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M ve ark. The role of antioxidant enzymes in oxidative stress-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). *Medical Journal of Süleyman Demirel University*. 2019;26(3):362-369.
62. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 2002;30(6):620-650.
63. Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*. 1994;91(2-3):133-140.
64. Kopáni M, Celec P, Danišovič L, Michalka P, Biró, C. Oxidative stress and electron spin resonance." *Clinica Chimica Acta* 2006;364(1-2): 61-66.
65. Nanji AA, Hiller-Sturmhöfel S. Apoptosis and necrosis: two types of cell death in alcoholic liver disease. *Alcohol Health and Research World*. 1997;21(4):325-330.
66. Guan J, Wan XS, Zhou Z, Ware J, Donahue JJ, Biaglow Je ve ark. Effects of dietary supplements on space radiation-induced oxidative stress in Sprague-Dawley rats. *Radiation Research*. 2004;162(5):572-579.
67. Yarsan E. Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1998;9(1): 89-95.
68. Wefers H, Sies H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *European Journal of Biochemistry*. 1988;174(2):353-357.
69. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014;2014:360438.
70. Frankel EN, Neff WE. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1983;754(3):264-270.
71. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 10964, Malonaldehyde [internet]. Pubchem [Erişim tarihi: 27 Haizran 2024]. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Malonaldehyde>.
72. Farmer EE, Mueller MJ. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology*. 2013;64:429-450.
73. Battelli MG, Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A. Xanthine Oxidoreductase in Drug Metabolism: Beyond a Role as a Detoxifying Enzyme. *Current Medicinal Chemistry*. 2016;23(35):4027-4036.

74. Bast A, Haenen GRMM. Nutritional Antioxidants: It Is Time to Categorise. In: Lamprecht M, eds. *Antioxidants in Sport Nutrition*. ABD: CRC Press/Taylor & Francis, 2015.
75. Wang CH, Zhang C, Xing XH. Xanthine dehydrogenase: An old enzyme with new knowledge and prospects. *Bioengineered*. 2016;7(6):395-405.
76. Battelli MG, Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A. xanthine oxidoreductase-derived reactive species: Physiological and pathological effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:3527579.
77. F. Shahidi. *Antioxidants: Principles and applications*. In: *Handbook of antioxidants for food preservation*. Hollanda: Elsevier, 2015.
78. Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review. *Journal of Dental and Allied Sciences*. 2012;1(2):63.
79. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. 2006;113(3):189-207.
80. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010;48(12):909-930.
81. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 1999;32(8):595-603.
82. Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*. 2019;1(1):65-76.
83. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;33(3):337-349.
84. Zheng M, Liu Y, Zhang G, Yang Z, Xu W, Chen Q. The applications and mechanisms of superoxide dismutase in medicine, food, and cosmetics. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(9):1675.
85. Garg N, Manchanda GJP. ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems*. 2009;143(1):81-96.
86. Cheung CC, Zheng GJ, Li AM, Richardson BJ, Lam PK. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic toxicology*. 2001;52(3-4):189-203.
87. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003;57(3-4):145-155.

88. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow- Walden L, Chuang J, et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*. 1995;18(1):1-11.
89. Özkan A, Fışkın K. Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidant enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*. 2014;14:52-60.
90. Çetinkaya S, Dursun HG. Endoplazmik retikulum stresinde hücre sağkalım ve ölüm kararı. *Sakarya Tıp Dergisi*. 2016;6(2).
91. Roussel BD, Kruppa AJ, Miranda E, Crowther DC, Lomas DA, Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *The Lancet Neurology*. 2013;12(1):105-118.
92. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334(6059):1081-1086.
93. Harding HP, Novoa I, Zhang Y Zeng H, Wek R, Schapira M ve ark. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*. 2000;6(5):1099-1108.
94. Deegan S, Saveljeva S, Gorman AM, Samali A. Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013;70(14):2425-2441.
95. Vincenz L, Jäger R, O'Dwyer M, Samali A. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response: targeting the Achilles heel of multiple myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2013;12(6):831-843.
96. Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, Manning FC, Tsangaris TN, Schwartz AM ve ark. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2000;59(1):15-26.
97. Kim MK, Kim HS, Lee IK, Park KG. Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review. *Journal of Diabetes Research*. 2012;2012:509437.
98. Seydel GŞ, Aksoy K. Endoplazmik retikulum stresi ve apoptozis mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2012;21(4):221-235.
99. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Annals of the new York Academy of Sciences*. 2003;1010:186-194.
100. Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J ve ark. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell*. 1999;97(3):395-406.

101. McComb S, Chan PK, Guinot A, Hartmannsdottir H, Jenni S, Dobay MP ve ark. Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7. *Science Advances*. 2019;5(7):eaau9433.
102. Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*. 2007;104(2):466-479.
103. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomás-Barberán FA, Datta N, Singanusong R ve ark. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2004;59(3):113-122.
104. Ejaz, S, Ejaz, A, Matsuda, K, Lim, CW. Limonoids as cancer chemopreventive agents *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006;86(3):339-345.
105. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016;5:e47.
106. Patil VM, Masand N. Anticancer potential of flavonoids: chemistry, biological activities, and future perspectives. *Studies in Natural Products Chemistry* 2018;59:401-430.
107. Anwer MK, Al-Shdefat R, Jamil S, Alam P, Abdel-Kader MS, Shakeel F. Solubility of bioactive compound hesperidin in six pure solvents at (298.15 to 333.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data* 2014;59(6):2065-2069.
108. Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*. 2001;15(8):655-669.
109. Suzuki H, Asakawa A, Kawamura N, Yagi T, Inui A. Hesperidin potentiates ghrelin signaling. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 2014;6(1):60-63.
110. Pandey P, Khan F. A mechanistic review of the anticancer potential of hesperidin, a natural flavonoid from citrus fruits. *Nutrition Research*. 2021;92:21-31.
111. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;193(1):265-275.
112. Hashimoto S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Analytical Biochemistry*. 1974;62(2):426-435.
113. Shen, Chang-Hui. *Diagnostic molecular biology*. ABD: Academic Press, 2019.
114. Aebi H. Catalase. In *Methods of enzymatic analysis*. Hollanda: Elsevier, 1974.
115. Durak İ, Canbolat O, Kavutçu M, Öztürk HS, Yurtarslanı Z. Activities of total, cytoplasmic, and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 1996;10, 17-20.

116. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1967;70:158-169.
117. Turner TT. Acute experimental testicular torsion. No effect on the contralateral testis. *Journal of Andrology*. 1985;6(1):65-72.
118. Ho C, Zee RS, Omid N, Bayne C, Hester A, Mukherjee E ve ark. Varenicline limits ischemia reperfusion injury following testicular torsion in mice. *Journal of Pediatric Urology*. 2021;17(5):631.e1-631.e8.
119. Tanriverdi HI, Şenel U, Gevrek F, Akbaş A. Protective effect of famotidine on ischemia-reperfusion injury following testicular torsion in rats. *Journal of Pediatric Urology*. 2021;17(2):167.e1-167.e7.
120. Meng X, Wei M, Wang D, Qu X, Zhang K, Zhang N ve ark. The protective effect of hesperidin against renal ischemia-reperfusion injury involves the TLR-4/NF- κ B/iNOS pathway in rats. *Physiology International*. 2020;107(1):82-91.
121. Song SH, Afşarlar ÇE, Xie HW, Hung AJ, Koh CJ. Estimating the time of onset of testicular torsion using ultrasonography in an experimental rat model. *Ultrasonography*. 2020;39(2):152-158.
122. Azizollahi S, Aflatoonian R, Sadighi Gilani MA, Behnam B, Tajik N, Asghari-Jafarabadi M ve ark. Alteration of spermatogenesis following spermatogonial stem cells transplantation in testicular torsion-detorsion mice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016;33(6):771-781.
123. Abu-Khudir R, Almutairi HH, Abd El-Rahman SS, El-Said KS. The Palliative and Antioxidant Effects of Hesperidin against Lead-Acetate-Induced Testicular Injury in Male Wistar Rats. *Biomedicines*. 2023;11(9):2390.
124. Kazaz IO, Demir S, Kerimoglu G, Colak F, Alemdar NT, Doğan SY ve ark. Chlorogenic acid ameliorates torsion/detorsion-induced testicular injury via decreasing endoplasmic reticulum stress. *Journal of Pediatric Urology*. 2022;18(3):289.e1-289.e7.
125. Demir S, Kazaz IO, Kerimoglu G, Demir EA, Colak F, Yılmaz S ve ark. Astaxanthin protects testicular tissue against torsion/detorsion-induced injury via suppressing endoplasmic reticulum stress in rats. *Journal of Investigative Surgery*. 2022;35(5):1044-1049.
126. Ileriturk M, Kandemir O, Akaras N, Simsek H, Genc A, Kandemir FM. Hesperidin has a protective effect on paclitaxel-induced testicular toxicity through regulating oxidative stress, apoptosis, inflammation and endoplasmic reticulum stress. *Reproductive Toxicology*. 2023;118:108369.

127. Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010;365(1546):1501-1515.
128. Liu ZM, Zheng XM. Molecular pathways of germ cell apoptosis following testicular torsion in rats. *National Journal of Andrology*. 2009;15(2):144-148.
129. Shih HJ, Yen JC, Chiu AW, Chow YC, Pan WH, Huang CJ. FTY720 inhibits germ cell apoptosis in testicular torsion/detorsion. *Journal of Surgical Research*. 2016;202(1):155-164.
130. Meštrović J, Drmić-Hofman I, Pogorelić Z, Vilovic K, Šupe-Domić D, Šešelja-Perišin A ve ark. Beneficial effect of nifedipine on testicular torsion-detorsion injury in rats. *Urology*. 2014;84(5):1194-1198.
131. Williamson RC. The continuing conundrum of testicular torsion. *Journal of British Surgery*. 1985;72(7):509-510.
132. Baker LA, Turner TT. Leydig cell function after experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. *Journal of Andrology*. 1995;16(1):12-17.
133. Kalfa N, Gaspari L, Ollivier M, Philibert P, Bergougnoux A, Paris F ve ark. Molecular genetics of hypospadias and cryptorchidism recent developments. *Clinical Genetics*. 2019;95(1):122-131.
134. Lysiak JJ, Turner SD, Nguyen QA, Singbartl K, Ley K, Turner TT. Essential role of neutrophils in germ cell-specific apoptosis following ischemia/reperfusion injury of the mouse testis. *Biology of Reproduction*. 2001;65(3):718-725.
135. Anderson MJ, Dunn JK, Lipshultz LI, Coburn M. Semen quality and endocrine parameters after acute testicular torsion. *The Journal of Urology*. 1992;147(6):1545-1550.
136. Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M, Cosentino MJ. Spermatogenic cord torsion: effects of cyclosporine and prednisone on fertility and the contralateral testis in the rat. *Journal of Andrology*. 1990;11(5):401-408.
137. 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.
138. Hsiao CH, Ji ATQ, Chang CC, Cheng CJ, Lee LM, Ho JH. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6:1-12.
139. Jacobsen FM, Rudlang TM, Fode M, Østergren PB, Sønksen J, Ohl DA ve ark. The impact of testicular torsion on testicular function. *The World Journal of Men's Health*. 2020;38(3):298-307.

140. Mahmoud NM, Kabil SL. Pioglitazone abrogates testicular damage induced by testicular torsion/detorsion in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2019;22(8):884-892.
141. Katami H, Suzuki S, Fujii T, Ueno M, Tanaka A, Ohta KI ve ark. Genetic and histopathological analysis of spermatogenesis after short-term testicular torsion in rats. *Pediatric Research*. 2023;94(5):1650-1658.
142. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinical Biochemistry*. 2005;38(11):981-986.
143. Akhigbe R, Ajayi A. Testicular toxicity following chronic codeine administration is via oxidative DNA damage and up-regulation of NO/TNF- α and caspase 3 activities. *PLoS One*. 2020;15(3):e0224052.
144. Akhigbe RE, Hamed MA, Odetayo AF, Akhigbe TM, Ajayi AF, Ajibogun FAH. Omega-3 fatty acid rescues ischaemia/perfusion-induced testicular and sperm damage via modulation of lactate transport and xanthine oxidase/uric acid signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;142:111975.
145. Dokmeci D. Testicular torsion, oxidative stress and the role of antioxidant therapy. *Folia Medica*. 2006;48(3-4):16-21.
146. Erboga M, Aktas C, Kurt O, Uygur R, Caglar V, Turan BC ve ark. Protective effects of thymoquinone on experimental testicular ischaemia-reperfusion injury: an apoptotic, proliferative and biochemical study. *Andrologia*. 2016;48(2):222-230.
147. Kurt O, Yazici CM, Erboga M, Turan C, Bozdemir Y, Akbas A ve ark. Mannitol has a protective effect on testicular torsion: An experimental rat model. *Journal of Pediatric Urology*. 2016;12(3): 167.e1-167.e8.
148. Solak T, Salihoğlu YS, Erdemir RU. Deneysel testis torsiyon-detorsiyonunda Agmatine'nin etkisinin tc-99m perteknetat sintigrafisi ile değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Dergisi*. 2020;47(2):387-93.
149. Cay A, Alver A, Küçük M, Işık O, Eminağaoğlu MS, Karahan SC ve ark. The effects of N-acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *Journal of Surgical Research*. 2006;131(2):199-203.
150. Akgür FM, Kiliç K, Tanyel FC, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A. Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral testicular torsion and detorsion. *Urology*. 1994;44(3):413-418.
151. Unsal A, Eroglu M, Avci A, Cimentepe E, Guven C, Derya Balbay M ve ark. Protective role of natural antioxidant supplementation on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*. 2006;40(1):17-22.

152. Ekşi E, Yalçın Cömert HS, Imamoğlu M, Alver A, Aydın Mungan S, Sarıhan H. Effects of myricetin on testicular torsion-detorsion injury in rats. *Andrologia*. 2020;52(10):e13775.
153. Erdemir F, Parlaktaş BS, Özyurt H, Boztepe Ö, Atış Ö, Şahin S. Antioxidant effect of melatonin in systemic circulation of rats after unilateral testicular torsion. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2008;38(1), 1-6.

