

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TİMOKİNONUN TESTİKÜLER İSKEMİ/REPERFÜZYON  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Hazırlayan  
Hatice GÜLMEZ**

**Danışman  
Doç.Dr. Derya KARABULUT**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Temmuz 2024**

**KAYSERİ**



**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TİMOKİNONUN TESTİKÜLER İSKEMİ/REPERFÜZYON  
ÜZERİNE ETKİLERİ  
Yüksek Lisans Tezi**

**Hazırlayan  
Hatice GÜLMEZ**

**Danışman  
Doç.Dr. Derya KARABULUT**

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından TYL-2022-12218 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Temmuz 2024  
KAYSERİ**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

**Adı – Soyadı:** Hatice GÜLMEZ

**İmza:**

## **YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI**

**“Timokinonun Testiküler İskemi/Reperfüzyon Üzerine Etkileri”** adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan**

**Hatice GÜLMEZ**

**Danışman**

**Doç. Dr. Derya KARABULUT**

**Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı**

**Prof. Dr. Arzu YAY**

**Doç. Dr. Derya KARABULUT** danışmanlığında **Hatice GÜLMEZ** tarafından hazırlanan “**Timokinonun Testiküler İskemi/Reperfüzyon Üzerine Etkileri**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

...../07/2024

## **JÜRİ**

## **İmza**

Danışman : Doç. Dr. Derya KARABULUT

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Menekşe ÜLGER

Üye : Doç. Dr. Emin KAYMAK

## **ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve .....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Prof. Dr. Bilal AKYÜZ**

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni her zaman destekleyen, emeğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yol gösteren, güler yüzlü ve samimi davranışları ile bana yüksek lisans eğitiminin zorluklarını atlatmamda yardımcı olan ve meslek hayatım boyunca bana kattığı kıymetli bilgilerle yolumu aydınlatmama yardımcı olan kıymetli danışman hocam Doç.Dr. Derya KARABULUT' a,

Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalı başkanımız sevgili Prof. Dr. Arzu YAY ve değerli öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine, doktora ve yüksek lisans arkadaşlarıma,

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden beri her türlü bilgi, birikim ve deneyimini benimle paylaşan, birbirimize her zaman destek olarak eğitim hayatımızı kolaylaştırdığımız sevgili arkadaşlarım Esra ÖNAL, Necla DEĞER ve Meryem SAYAN' a,

Yüksek Lisans tezimde bulunan deneyler için desteğini ve emeğini esirgemeyerek yardımları ve katkılarından dolayı kıymetli kardeşim Dr. Hüseyin İLBASMIŞ'a,

Ben pes ettiğimde bile beni cesaretlendiren her türlü desteklerini benden esirgemeyen kıymetli annem, rahmetli kıymetli babam ve değerli kız kardeşime,

Elinden gelen tüm desteği ve sabrı göstererek eğitim hayatıma destek olan kıymetli eşim ve değerli ailesine,

Küçük yürekleriyle bana sevgileriyle destek olan sevgili çocuklarım Adem Çınar ve Defne'ye,

Teşekkür ederim...

Hatice GÜLMEZ

# TİMOKİNONUN TESTİKÜLER İSKEMİ/REPERFÜZYON ÜZERİNE ETKİLERİ

Hatice GÜLMEZ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2024

Danışman : Doç.Dr. Derya KARABULUT

## ÖZET

Testis torsiyonu spermatik kord ve içeriğinin bükülmesi sonucu ortaya çıkan cerrahi bir durumdur. Torsiyona bağlı iskemi dokuda lipid peroksidasyonuna, membran geçirgenliğine ve hücrede geri dönüşümsüz hasarlar meydana gelmesine neden olur. Timokinon (THQ) yüksek antioksidan özellikleriyle bilinen aktif fenolik bir bileşiktir. Bu çalışmada testis torsiyonu kaynaklı iskemi/reperfüzyon (İ/R) sonrasında THQ'nun testis dokusundaki etkilerinin çeşitli analizler ile araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada 40 adet *Wistar albino* türü erkek sıçan kullanıldı. Kontrol grubu, İskemi/reperfüzyon grubu (İ/R), Timokinon grubu (THQ) ve İskemi/reperfüzyon+Timokinon grubu (İ/R+THQ) olmak üzere dört grup oluşturuldu. Deney sonunda spermiyogram analizi, testis dokusunda ise hem histolojik hem de immunohistokimyasal analizler, gen ekspresyonu analizleri ile kan örnekleri toplanarak biyokimyasal analizler gerçekleştirildi.

Sonuçlarımıza göre, Kontrol ve THQ grubuna kıyasla İ/R grubunda sperm sayısı, hareketliliği, testis dokusu seminifer tübül epitel kalınlığı, tübül çapı ve Johsen's testiküler biyopsi skorunda azalma gözlemlendi. İ/R grubunda reseptör etkileşimli kinaz (RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3) hem gen ekspresyonu hem de immunoreaktivite yoğunlukları artış gösterdi. Ayrıca, glial hücre türevli nörotrofik faktör (GDNF) ekspresyonu azalırken, steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) ekspresyonu artış gösterdi. İ/R grubunda doku androjen bağlayıcı protein (ABP) seviyesi azalırken, kan testosteron ve luteinizan hormon (LH) seviyesi arttı, folikül stimulan hormon (FSH) seviyesi ise değişmedi. İ/R+THQ grubu sonuçlarına göre THQ'nun tüm parametrelerde düzenleyici bir etki gösterdiği belirlendi.

Testis dokusunda histopatolojik bulguların yanı sıra RIP1/RIPK1, RIP3/RIPK3, GDNF, StAR ekspresyonlarındaki değişiklikler İ/R sonrası dokunun hem spermatojenik seri hem de spermatojenik olmayan hücre serisinde hasara neden olduğunu ortaya koymaktadır. Buna bağlı olarak hormon seviyelerindeki değişikliklerde dokudaki fonksiyon bozukluğunu göstermektedir. İ/R sonrası uygulanan 10 mg/kg THQ dozu testis yapı ve fonksiyon bütünlüğünün sağlanmasında etkili bir bileşik olduğunu histopatolojik, gen ekspresyonu ve biyokimyasal bulgulardaki iyileşmeler ile ortaya koymuştur. Sonuç olarak bu çalışmada İ/R sonrasında dokudaki oksidatif stres kaynaklı hasarda THQ'nun etkili olabileceği ortaya konmuştur. Sonraki çalışmalarımızda daha iyi sonuçlar için hem doz hem de uygulama süresinin revize edilerek daha kapsamlı parametreler ile THQ'nun özelliklerinin ortaya çıkarılması hedeflenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Detorsiyon; İskemi; Reperfüzyon; Testis; Timokinon; Torsiyon

# EFFECTS OF THYMOQUINONE ON TESTICULAR ISCHEMIA/REPERFUSION

Hatice GÜLMEZ

Erciyes University, Institute of Medical Sciences Department of Histology and Embryology

M.Sc. Thesis, July 2024

Advisor: Assoc. Prof. Derya KARABULUT

## ABSTRACT

Testicular torsion is a surgical condition due to twisting the spermatic cord and its contents. Torsion-related ischemia causes lipid peroxidation in the tissue, membrane permeability and irreversible damage to the cell. Thymoquinone (THQ) is an active phenolic compound with high antioxidant properties. This study aimed to investigate the effects of THQ on testicular tissue after testicular torsion-induced ischemia/reperfusion (I/R) with various analyses.

Forty male Wistar albino rats were used in this study. Four groups were created: Control group, Ischemia/reperfusion group (I/R), Thymoquinone group (THQ) and Ischemia/reperfusion+Thymoquinone group (I/R+THQ). At the end of the experiment, spermogram analysis, both histological and immunohistochemical analyses in testicular tissue, gene expression analyses and biochemical analyses were performed by collecting blood samples.

According to our results, a decrease in sperm count, motility, testicular tissue seminiferous tubule epithelium thickness, tubule diameter and Johsen's testicular biopsy score was observed in the I/R group compared to the Control and THQ groups. In the I/R group, both receptor-interacting kinase (RIP1/RIPK1 and RIP3/RIPK3) gene expression and immunoreactivity intensities increased. Additionally, while glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) expression decreased, steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression increased. In the I/R group, tissue androgen binding protein (ABP) level decreased, blood testosterone and luteinizing hormone (LH) levels increased, and follicle-stimulating hormone (FSH) levels did not change. According to the results of the I/R+THQ group, it was determined that THQ had a regulatory effect on all parameters.

In addition to histopathological findings in testicular tissue, changes in RIP1/RIPK1, RIP3/RIPK3, GDNF, StAR expressions reveal that the tissue after I/R causes damage to both spermatogenic and non-spermatogenic cell lines. Accordingly, changes in hormone levels indicate dysfunction in the tissue. The 10 mg/kg dose of THQ administered after I/R demonstrated that it is an effective compound in ensuring the integrity of testicular structure and function, with improvements in histopathological, gene expression and biochemical findings. As a result, this study revealed that THQ may be effective in oxidative stress-induced tissue damage after I/R. In our subsequent studies, we aim to reveal the properties of THQ with more comprehensive parameters by revising both the dose and application time for better results.

**Key Words:** Detorsion; Ischemia; Reperfusion; Testis; Thymoquinone; Torsion

## İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
1 . GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Testis.....	4
2.1.1. Erkek Üreme Sistemi Embriyolojisi.....	4
2.1.2. Testis Anatomisi.....	7
2.1.3. Testis Histolojisi.....	8
2.1.3.1. Seminifer Tübüller.....	8
2.1.3.2. Sertoli Hücreleri.....	9
2.1.3.3. Spermatogonyumlar.....	9
2.1.3.4. Spermatojenik Hücreler.....	10
2.1.3.5. Leydig Hücreler.....	10
2.1.3.6. Spermatogenez.....	11
2.1.3.7. Spermiyogenez.....	12
2.2. İskemi / Reperfüzyon.....	13

2.3. Reseptör Etkileşimli Protein – RIP .....	14
2.3.1. RIP1/ RIPK1 .....	16
2.3.2. RIP3/RIPK3 .....	17
2.4. Glial Hücre Türevli Nörotrofik Faktör .....	19
2.5. Steroidojenik Akut Düzenleyici Protein .....	20
2.6. Timokinon .....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	23
3.1. Semen Analizi (Spermiyogram) .....	25
3.2. Histolojik prosedür .....	25
3.2.1. Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama protokolü .....	25
3.2.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü .....	26
3.2.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru .....	26
3.3. İmmunohistokimyasal analizler .....	27
3.4. mRNA Gen Ekspresyon Analizi .....	28
3.4.1. Testis Dokusundan RNA İzolasyonu .....	28
3.4.2. cDNA sentezi .....	29
3.4.3. Real-Time PCR analizi .....	30
3.5. Biyokimyasal analizler .....	31
3.5.1. ELİSA Yöntemi ile Testosteron, LH ve FSH Seviyelerinin Belirlenmesi .....	31
3.5.2. ELISA Yöntemi ile Testis Homojenatından ABP Seviyesinin Belirlenmesi .....	32
3.5.3. ELISA Yöntemi ile Testis Homojenatından TAS ve TOS Seviyelerinin Belirlenmesi .....	32
3.6. İstatistiksel değerlendirme .....	32
4. BULGULAR .....	33
4.1. Hayvan ağırlıkları ve testis ağırlıklarının belirlenmesi .....	33

4.2. Spermiogram bulguları.....	35
4.3. Histolojik bulgular.....	35
4.4. Gen ekspresyonu sonuçları.....	38
4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular .....	39
4.6. Biyokimyasal Bulgular.....	43
4.6.1. Hormonların değerlendirilmesi .....	43
4.6.2. Total oksidan/antioksidan seviyelerinin değerlendirilmesi .....	44
5. TARTIŞMA .....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	52
7. KAYNAKLAR .....	53
EKLER	
ÖZGEMİŞ	

## KISALTMALAR ve SİMGELER

°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikro Litre
µm	: Mikro Metre
ABP	: Androgen Binding Protein
ATP	: Adenozin Trifosfat
cDNA	: Complementary DNA
Cm	: Santimetre
CD95	: CD95 ligand
cIAP1/2	: Cellular Inhibitor of Apoptosis 1/2
CYLD	: Cylindromatosis
DEKAM	: Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
ELİSA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ER	: Endoplazmik retikulum
FADD	: Fas-associated death domain
FSH	: Folikül Stimulan Hormon
GDNF	: Glialcelline-derived neurotrophic factor
gER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
H&E	: Hematoksilen&Eozin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
İ/R	: İskemi/Reperfüzyon
IU/L	: International unit/litre
İg	: İntragastrik
İp	: İntraperitoneal
JTBS	: Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru
K	: Kontrol grubu
LH	: Luteinizan Hormon
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MEKK1	: Mitogen-activated protein/Extracellular signal-regulated kinase 1

MEKK3	: Mitogen-activated protein/Extracellular signal-regulated kinase kinase3
mRNA	: Messenger RNA
mg/kg	: Miligram/Kilogram
ml	: Mili Litre
mIU/ml	: milli-internatyonel birim/litre
NF-Kb	: Nükleer Faktör-Kappa B
ng/ml	: Nanogram / mililitre
nm	: Nanometre
O <sub>2</sub>	: Superoksit Anyonu
OH	: Hidroksil Radikali
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pg/ml	: Pikogram / Mililitre
RHIM	: Respective Homotypic Interaction Motif
RIP	: Reseptör Etkileşimli Kinaz.
RIP1/RIPK1	: Reseptör Etkileşimli Kinaz-1
RIP3/RIPK3	: Reseptör Etkileşimli Kinaz-3
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
SRY	: Sex-determining Region Y
SSC	: Spermatogonial Kök Hücre
StAR	: Steroidogenic Acute Regulatory
TBF	: Testis Belirleyici Faktör
T	: Testesteron
THQ	: Timokinon
TNF- $\alpha$	: Tumor Necrosis Factor
TNFR	: Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD	: TNF Receptor-Associated Death Domain
TRAF2	: TNF Receptor-Associated Factor2
Ub	: Ubiquitin

## TABLO LİSTESİ

- Tablo 4.1.** Deney gruplarına ait deney başlangıcı ve deney sonu hayvan ağırlıklarının ölçüm sonuçları. Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon. .34
- Tablo 4.2.** Deney gruplarına ait sol testis ve sağ testis ağırlıklarının ölçüm sonuçları. Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon. .... 34
- Tablo 4.3.** Deney gruplarına ait spermioqram analizi sonuçları. Tabloda verilen sperm sayıları  $*10^6$  olacak şekilde hesaplanmıştır. Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon. .... 35
- Tablo 4.4.** Deney gruplarına ait JTBS skoru, interstisyel ödem, ödemli tübül ve atrofik tübül sayısı ölçüm sonuçları. Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, JTBS; Johnsen's testiküler biyopsi skoru. .... 36
- Tablo 4.5.** Tüm gruplara ait testis dokusu seminifer tübül epitel kalınlığı, seminifer tübül çapı ve seminifer tübül lümen çapı ( $\mu\text{m}$ ) ölçüm sonuçları. Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon. .... 38
- Tablo.4.6.** RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 mRNA gen ekspresyonu analizleri sonuçları. Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon. .... 39
- Tablo 4.7.** Deney gruplarına ait RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK1 proteinlerine ait seminifer tübül epiteli ve intertübüler bağ dokusu immunoreaktivite ölçüm sonuçları. Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, RIP; reseptör etkileşimli kinaz. .... 40
- Tablo 4.8.** Tüm gruplara ait testis dokusu GDNF ve StAR immunohistokimya ölçüm sonuçları. Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, GDNF; glial hücre türevli nörotrofik faktör, StAR; Steroidojenik akut düzenleyici protein..... 42
- Tablo 4.9.** Tüm gruplara ait hormon ölçüm sonuçları. ABP testis dokusundan, FSH, LH ve testosteron kan serumundan bakılmıştır. Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, ABP; androjen bağlayıcı protein, FSH; folikül stimulan hormon, LH; luteinizan hormon. .... 44
- Tablo 4.10.**Deney gruplarına ait Total oksidan/antioksidan seviyelerinin analizi. Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, TOS; total oksidan statü, TAS; total antioksidan statü..... 45

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1.** Testiküler gelişim evrelerinin şematik gösterimi. a.5 haftalık bir embriyoda farklılaşmamış gonad evresi gösterilmektedir. b. Gelişmekte olan gonad, primer sex kordonlarının seminifer kordonlara farklılaşması, paramezonefrik kanalın ve bu kanaldan köken alan yapıların gerilemesi, gelişmekte olan rete testis gösterilmektedir. c. Testiküler gelişimin son evreleri, Tunika albuginea septumların gelişimine katılması, Rete testisin seminifer kordonlara ve mesonefrik kanal ve tübüllerden gelişen boşaltım kanallarına bağlanması gösterilmektedir..... 6
- Şekil 2.2.** Erkek üreme sistemi komponentlerinin genel görünümü. Sagittal kesit, testis, epididimis, duktus deferens ve veziküla seminalis intakt olarak gösterilmektedir..... 8
- Şekil 2.3.** İnsan testisinin fotomikrografları. a. H-E ile boyanmış insan testis kesitinin küçük büyütme fotomikrograf seminifer tübüleri ve tunika albugineayı göstermektedir. Seminifer tübüller oldukça kıvrıntılıdır ve bu nedenle kesitleri görünüm olarak değişkendir X30. b. Önceki numunenin daha büyük büyütmesi birkaç seminifer tübülü göstermektedir. Komşu tübüllerin arasındaki alanda küçük kümeler oluşturan Leydig (interstisyel) hücrelerde bulunmaktadır X250..... 11
- Şekil 2.4.** İnsan seminifer tübül epitelinin şematik çizimi. Sertoli hücrelerinin spermatogenik hücrelerle ilişkisini göstermektedir. Seminifer epitel bir bazal laminanın üzerinde yer almaktadır ve seminifer tübülü peritübüler hücre tabakası çevrelemektedir. Tip A açık, tip A koyu ve tip B olarak sınıflandırılan spermatogonyumlar ve spermatozoidler, seminifer epitelin komşu Sertoli hücrelerinin arasında yer alan bağlantı kompleksinin altında bulunan bazal laminada bulunurlar. Primer spermatozoidler, erken spermatozoidler, geç spermatozoidler ve sitoplazma, bağlantı kompleksinin üzerinde yer alan abluminal kompartmanda görülmektedir..... 12
- Şekil 2.5.** RIPK1/RIP1 ve RIPK3/RIP3 nekrotozun kritik araçlarıdır. TNF- $\alpha$ , TNFR'ye bağlanarak TRADD, TRAF2, cIAP1/2 ve RIPK1/RIP1 'den oluşan Kompleks I'in oluşumunu teşvik eder. cIAP1/2, NF- $\kappa$ B ve MAPK yolları yoluyla hücrenin hayatta kalmasını destekleyebilen (Ub) RIPK1/RIP1 'i çoğaltır. CYLD tarafından her yerde bulunan RIPK1/RIP1, kaspaz-8 ve FADD ile etkileşime girerek apoptozu teşvik edebilir. Kaspaz inhibe edildiğinde RIPK1/RIP1, RIPK3/RIP3 ile etkileşime girerek nekrotozu destekleyebilir ve otofosforilasyonuna yol açabilir. Fosforile edilmiş RIPK3/RIP3, plazma zarında translokasyon yapan ve oligomerize olan ve yırtılmayı indükleyen MLKL'yi toplar ve fosforile eder..... 15

- Şekil 3.1.** Seminifer tübül ve seminifer tübül lümen çapı ve seminifer tübül epitel kalınlığı ölçümü. Seminifer tübül epitel kalınlığı yeşil çizgi ile gösterilen şekilde ölçülmüştür. Mavi ile işaretli seminifer tübül çapı, turuncu çizgi ile belirtildiği şekilde ölçülmüştür. Sarı ile işaretli seminifer tübül lümeninin çapı kırmızı çizgi ile belirtildiği şekilde ölçülmüştür.....26
- Şekil 4.1.** Deneysel iskemi/reperfüzyonun oluşturulmasına ait resimler. İskemi öncesine ait resimde testis daha açık renkli gözlenirken, iskemi süresi dolduğunda reperfüze edilecek testisin daha koyu renge sahip olduğu görülmektedir. ....33
- Şekil 4.2.** Deney gruplarına ait H-E boyamaları. (A) Kontrol ve (C) THQ gruplarına ait testis doku kesitleri seminifer tübül yapısı ve interstisyel bağ dokusu bakımından düzenli histolojik görünüme sahiptir. (B) İ/R grubu testis doku kesitlerinde ödemli tübül (siyah yıldız), atrofik tübül (kırmızı yıldız), multinükleer dev hücreler (siyah oklar), düzensiz hasarlı seminifer epitel (yeşil ok) gösterilmiştir. (D) İ/R+THQ grubunda düzensiz hasarlı seminifer epitel (yeşil ok) ve intertübüler bağ dokusunda ödem (sarı yıldız) gösterilmiştir. Resimler 40x objektif (skala bar:100µm) olarak gösterilmiştir. Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon.....37
- Şekil 4.3.** Deney gruplarına ait RIP1/RIPK1 immunohistokimya boyaması. Testis dokusu kesitlerindeki seminifer epitel ve intertübüler bağ dokudaki RIP1/RIPK1 ekspresyonu siyah oklar ile gösterilmiştir. Resimler 40x objektif (skala bar:100µm). Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, RIP; reseptör etkileşimli kinaz.....40
- Şekil 4.4.** Deney gruplarına ait RIP3/RIPK3 immunohistokimya boyaması. Testis dokusu kesitlerindeki seminifer epitel ve intertübüler bağ dokudaki RIP3/RIPK3 ekspresyonu siyah oklar ile gösterilmiştir. Resimler 40x objektif (skala bar:100µm). Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, RIP; reseptör etkileşimli kinaz.....41
- Şekil 4.5.** Deney gruplarına ait GDNF immunohistokimya boyaması. Testis dokusu kesitlerindeki seminifer tübül GDNF ekspresyonu siyah oklar ile gösterilmiştir. Resimler 40x objektif (skala bar:100µm). Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, GDNF; glial hücre türevli nörotrofik faktör. ....43
- Şekil 4.6.** Deney gruplarına ait StAR immunohistokimya boyaması. Testis dokusu kesitlerindeki intertübüler bağ dokusundaki StAR ekspresyonu siyah oklar ile gösterilmiştir. Resimler 40x objektif (skala bar:100µm). Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, StAR; Steroidojenik akut düzenleyici protein. ....43

## 1 . GİRİŞ VE AMAÇ

Testis torsiyonu, spermatik kordun ve içeriğinin bükülmesi sonucu meydana gelen cerrahi acil bir durumdur. Dokuda torsiyonun meydana gelmesi venöz dönüşün engellenmesine neden olmaktadır. Bu durum venöz ve arteriyel basınçların eşitlenmesi sonucu arteriyel akışın tehlikeye atılmasına ve testiküler iskemi ile sonuçlanmasına neden olur. İskemi, torsiyondan sonra ortaya çıkabilir ve 24 saat sonra neredeyse kesindir. Testisin dış rotasyonu ile manuel detorsiyon başarılı olabilir, ancak manevranın ardından kan akışının eski haline geldiği kontrol edilmelidir. Spermatik kordun detorsiyonu, kan akışı tam olarak sağlanana kadar gerçekleştirilerek testis canlılığı kontrol edilmelidir.

Testis torsiyonu, yetişkin bireylerde gözlenen bir durum olmasının yanı sıra 18 yaşından küçüklerde de gözlenen ve ortalama 100.000 erkekte 3,8'ini etkileyen cerrahi bir acil durumdur. Çocuklarda akut skrotal hastalığın %10 ila %15'ini oluşturur ve testis torsiyonu ameliyatı geçiren erkek çocuklarda orşiektomi oranı %42 ile sonuçlanır (Sharp ve ark., 2013). Yenidoğan ve adölesan çocuk grubunda daha yaygın olmakla beraber, her yaşta görülebilmektedir (Barada ve ark., 1989). Testise atardamar sistemi aracılığı ile spermatik arterden kan gelir. Bu kan testiste yayılarak görevini tamamladıktan sonra venler vasıtası ile geri döner. İskeminin derecesi, burulma süresine ve spermatik kordun rotasyon derecesine bağlıdır (Ringdahl ve Teague, 2006). Spermatik kordun detorsiyonu, hiçbir bükülme görülme kadar gerçekleştirilir ve testis canlılığı değerlendirilir (Sharp ve ark., 2013). Testis torsiyonunun derecesi ve süresine bağlı olarak histopatolojik değişiklikler, iskemi hatta nekroza kadar ilerleyebilmektedir (Hız, 2021). Testis torsiyonu klinik bir tanıdır ve hastalar tipik olarak şiddetli akut tek taraflı skrotal ağrı, bulantı ve kusma ile başvururlar (Sharp ve ark., 2013).

Testis torsiyonu iskemi tablosuna, detorsiyon ise reperfüzyona sebep olmaktadır. Testis torsiyonu sonucu dokuda fazla miktarda hasar görülse de detorsiyonun ardından oluşan reperfüzyona bağlı artan serbest oksijen radikalleri testis dokusuna zarar vermektedir (Hız, 2021). İskemi döneminde kan akımı yetersizliğine bağlı testis dokusunda hipoksantin, lipid peroksit ve laktik asit artar (Hız, 2021). Granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılmaya başlar, protein sentezi azalır. Hipoksik tablonun devam etmesi halinde membran geçirgenliğinde artış meydana gelir, mitokondrial fonksiyonlar yavaşlar. Bahsedilen bu olaylar, hücrenin oksijen düzeyi normal şartlara ulaştığı takdirde geri dönüşümlü hasarlardır. İskeminin devam etmesi halinde geri dönüşümsüz hücre hasarı ve nekroz gelişmeye başlar. Hücrede pH düşmesi, lizozomal zarların zedelenmesi ve bunlara bağlı olarak enzimlerin sitoplazmaya geçmesi ile sitoplazmadaki ve çekirdekdeki yapılar enzimler tarafından sindirilmeye başlar (Türkyılmaz, 2003). Reperfüzyon döneminde ise serbest oksijen radikallerinden (SOR) superoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali (OH) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) artmaktadır (Hız, 2021). Reperfüzyon hasarının dokuya iskemik hasara oranla daha fazla zarar verdiği görülmüştür (Hız, 2021). Reperfüzyon ile dokuya oksijenizasyonun tekrar sağlanmasıyla, biriken hipoksantin oksijen ve ksantin oksidaz varlığında serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır (Toyokuni ve ark., 1999). Böylece SOR; karbonhidrat, lipid, protein, nükleik asit gibi pek çok molekülde oksidatif hasara neden olmaktadır.

Testis torsiyonu vakalarında iskemik testise kan akışının hızlı bir şekilde düzeltilmesi çok önemlidir ve bir üroloğa derhal sevk edilmesi önerilmektedir. Tipik olarak, testis histopatolojisindeki morfolojik değişiklikler ve spermatogenez üzerindeki zararlı etkiler ile kendini gösteren önemli iskemik hasar meydana gelmeden önce dört ila sekiz saatlik bir pencere vardır. Bu nedenle, birçok hastanın dört ila sekiz saatlik zamanı aşmasına rağmen acil cerrahi tedavi işe yarayabilmektedir. Semptom başlangıcından sonraki altı saat içinde cerrahi işlem yapılarak tanı konulursa, bildirilen testis kurtarma oranları %90 ila %100'dür. Semptomlar 12 saatten uzun süredir mevcutsa %50'ye düşer ve semptom süresi 24 saat veya daha fazla mevcut ise tipik olarak %10'dan azdır (Sharp ve ark., 2013). Semen kalitesindeki bozulma, testis torsiyonu-detorsiyonunun ciddi bir sonucudur. Yeterli germ hücreli mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, erkek doğurganlığında çok önemli bir rol oynamaktadır (Shih ve ark., 2021).

Timokinon (THQ), *Nigella sativa L.* (çörek otu) yağının temel biyoaktif bileşiği olan, antioksidan ve antineoplastik bir maddedir. THQ, yara iyileşmesi dahil birçok rahatsızlığa karşı önemli terapötik aktiviteye sahip doğal bir biyoaktiftir. Toksik olmayan, diyabet ve kanser dahil olmak üzere birçok insan hastalığını tedavi etmek için geniş uygulamalara sahiptir. Torsiyon kaynaklı iskemi/reperfüzyon (İ/R) testis hasarında da tedavi edici etkiye sahip olabilir. Fenolik bileşiklerin DNA hasarını önleyebildiği, DNA onarım mekanizmalarını düzenleyebildiği ve kanser oluşum sürecini engelleyebildiği iddia edilmektedir (Güzelsoy ve ark., 2018). THQ hücre döngüsünü kontrol eden ve hücre çoğalmasını düzenleyen gen proteinlerin ifadesini (ekspresyonunu/protein miktarını) ve/veya aktivitesini etkileyebilmektedir (Güzelsoy ve ark., 2018). Çeşitli ilaçların yan etkilerini azaltmak için kullanılan, süper oksit anyonu, hidroksil radikali ve moleküler oksijen gibi birçok SOR'nin süpürücüsü olarak görev yapan güçlü bir antioksidan ajandır (Güzelsoy ve ark., 2018; Öztürk ve ark., 2020). Özellikle kombine antioksidanlar spermin ROS'dan korunmasında önemli bir rol oynar ve idiyopatik oligoasthenoteratozoospermi durumunda temel sperm parametrelerini iyileştirebilir (Erol ve Sari, 2017). Testis dokusunda oksidatif strese bağlı İ/R'da koruyucu bir rol oynadığı gösterilmektedir (Ayan ve ark., 2016). Testis torsiyonunda, İ/R hasarını önlemek için kullanılan maddeler genellikle detorsiyon öncesi veya ilk 24 saat içinde tek doz olarak verilmektedir (Kabay ve ark., 2014). THQ etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa bile, THQ apoptozu, oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu azaltarak sitoprotektif etki gösterdiği bilinmektedir (Gur ve ark., 2021).

Bu çalışmada ise İ/R modeli oluşturulan sıçan sol testisinde THQ etkilerinin histolojik, genetik ve biyokimyasal analizler ile gösterilmesi planlanmıştır. İ/R sonrası gelişen olası nekroz mekanizması değerlendirilerek THQ'nun antinekrotik özelliklerinin olup olmadığı açığa çıkarılacaktır. Ayrıca dokudaki oksidan/antioksidan sistem değerlendirilmeye alınacaktır. Çalışmanın sonuçları ile İ/R ve THQ arasındaki ilişki kapsamlı bir şekilde değerlendirilerek sonuçların literatüre kazandırılması hedeflenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi skrotum içinde testisler, testis içindeki ve dışındaki boşaltım kanalları, yardımcı bezler ve penisten oluşmaktadır.

### 2.1. Testis

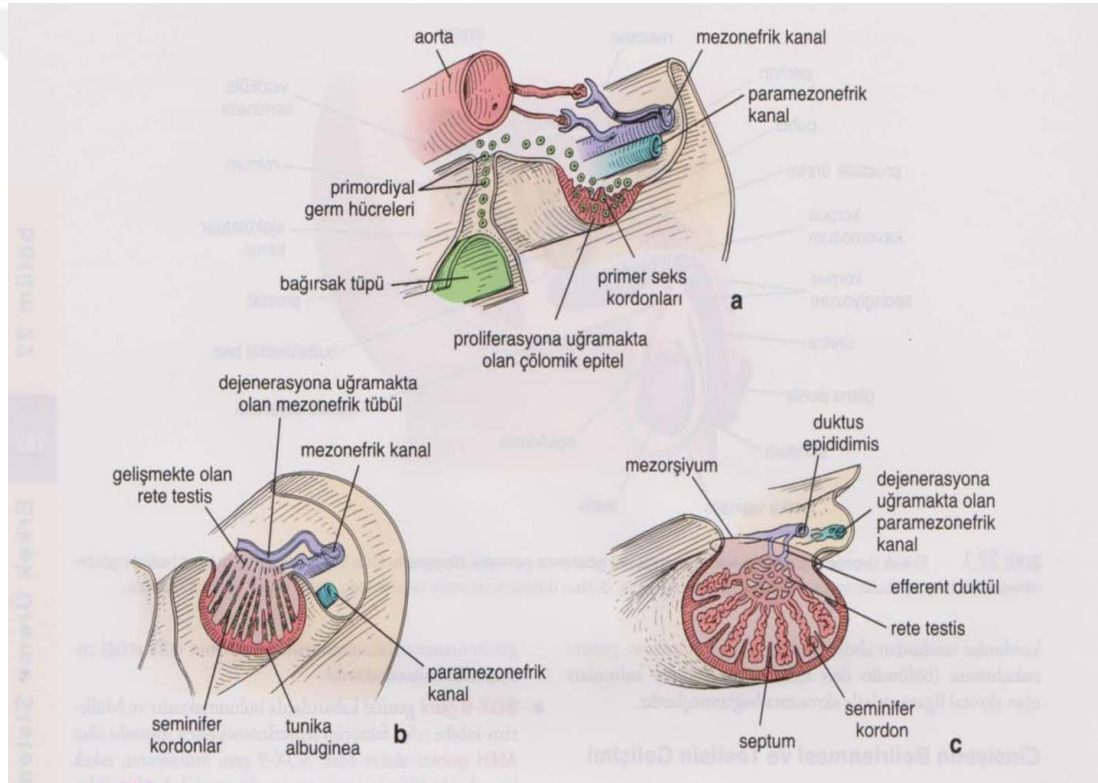
Testis spermatozoanın ve testosteronun üretildiği yerdir. Üretilen salgıların boşaltım kanalları ise duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus ve prostat uretrasına açılmaktadır. Yardımcı bezler ise iki adet vezikula seminalis, bir prostat ve iki adet bulboüretal bezden oluşmaktadır. Testis birleşik tübüler bir bez olup hem ekzokrin hem endokrin salgısı bulunmaktadır (Tekelioğlu, 2002).

#### 2.1.1. Erkek Üreme Sistemi Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti yumurtanın dölllenmesini sağlayan sperm ile belirlenmiş olsa bile erkek veya dişi morfolojileri gelişimin 7. haftasından önce başlamaz (Moore ve Persaud, 2002). Cinsiyet oluşumu birçok genin rol oynadığı bir süreçtir. SRY geni Y kromozomu üzerinde bulunur ve bu genin protein ürünü cinsiyet organlarının oluşumunu sağlayan genleri harekete geçirir. Testis Belirleyici Faktör (TBF) olan SRY geni var olduğunda cinsiyet erkek olur yok ise cinsiyet kız olur (Sadler, 2005). 5. haftada başlayan mezotelde kalınlaşma ve altındaki mezenşimin çoğalması ile bir kabarıklık oluşur. Epitel kordonlar hemen büyürler. Farklılaşmamış gonad dış kısmında korteksten, iç kısmında medulladan oluşur. Eğer embriyo XX kromozomuna sahipse korteks kısmı overe dönüşür, medullası geriler. Eğer embriyo XY kromozomu içeriyorsa medulla testise dönüşür, korteks geriler (Moore ve Persaud, 2002). 6.haftaya kadar gonadlar epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşan genital ve gonadal sırtlar olarak belirlenir ve germ hücreleri içermez. Primordial germ hücreleri yolk kesesinin allontois tarafındaki endoderm hücreleri arasında oluşur. Primitif cinsiyet kordonları germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmasından önce

genital sırtın prolifer olup mezenşimin içine gömülmesi ile oluşur (Sadler, 2005). TBF, kordonları uyararak medullanın derinlerinde birbirleriyle anastomoz yapmasını sağlar. Böylece rete testis oluşur. Seminifer kordonların tunika albugineası gelişince yüzey epiteli ile bağlantısı kalmaz. Seminifer kordonlar belirli aşamalarla seminifer tübüllere tubuli rektiye ve rete testise farklılıklar. Seminifer tübüller, 8. hafta ve sonrasında interstisyel aralıkta bulunan Leydig hücreleri, testosteron ve androjenik hormonları salgılamaya başlar. Testosteron hormonunu gonadotropin hormonu aktive eder (Moore ve Persaud, 2002). Yüzey epitelinden köken alan sertoli destek hücreleri ve primitif germ hücrelerinden meydana gelen testis kordonları dördüncü ayda at nalı şeklini alır. Puberte döneminde lümenler açılarak testis kordonları seminifer tübüller haline gelir. Seminifer tübüller de rete testis ile birleşerek duktuli efferenteslere girer. Rete testis ile wofflian kanalları veya mezonefrik kanalları birbirine bağlayan bu kanallar duktus deferens olarak bilinir (Sadler, 2005). Spermilerin beslenmesi ve salınmasını sağlayan bir çift seminal veziküller de mezonefrik duktuslardan gelişir ve duktus ile üretra arasındaki kısmı ejakuluar duktusu oluşturur. Mezenşim içine büyüyen endodermal çıkıntılar üretranın prostat parçasından oluşur. Endodermal hücrelerden glandüler bez epiteli gelişirken organ stroması ve düz kaslar mezenşimden gelişir. Üretranın spongios kısmından meydana gelen bir çift organ olan bulboüretal bezin düz kas hücreleri ve stroması mezenşimden oluşur. Bu bezin salgısı ile semen karışır (Moore ve Persaud, 2002). Fallus olarak bilinen genital tüberkülün hızlı uzamasıyla ve genişlemesiyle oluşan dış genital organ penisin gelişimi androjenlerin etkisi altındadır. Ürogenital katlantıların birleşmesiyle oluşan spongios üretra penisin ventral yüzeyi boyunca devam eder. Glandüler (üretal) plak ektodermal kökenli olup glans penisin ucunda içe büyüyerek meydana gelir. Penis kökünde spongios üretra ile buluşur ve bağlanır (Moore ve Persaud, 2002). Primitif çizgiden köken alan mezenşim hücreleri 3. haftada kloakal kıvrım adı verilen bir çift, hafif yüksek şişlik oluşturur. Kloakal membran ürogenital ve anal membranlara 6. haftada bölünür. Ürogenital her iki yanında ortaya çıkan yüksek çıkıntı genital şişlik olarak bilinir. Genital şişlikler inguinal bölgede yerleşmişken gelişimin ileri evrelerinde kaudal yönde ilerleyip her şişlik kendi tarafındaki hemiskrotumu oluşturur ve bu hemiskrotumlar skrotal septum ile ayrılır (Sadler, 2005). Testislerin skrotuma iniş sebepleri çok az bilirse de androjenler tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir. Gubernakulum inguinal kanallara yol

oluşturmakla birlikte testisi skrotuma bağlar ve skrotuma inerken yol gösterdiği düşünülmektedir. Testisin inguinal kanala geçişinde abdomenin iç kısmındaki basınç artışı da rol oynar. 26. haftada başlayan testis inişi 2-3 gün sürer. Testislerin skrotuma girmesiyle inguinal kanal spermatik kord etrafında sarılır. Testisler posterior abdominal duvar seviyesindeyken testiküler kan damarları oluşur. Testisler skrotuma inerken kan damarlarını ve duktus deferensini beraberinde taşır (Moore ve Persaud, 2002). Testisi saran peritoneal tabaka tunika vajinalisin visseral tabakası diğer kısımlarına da tunika vajinalisin pariyetal tabakası denir. Transversalis fasyası internal spermatik fasyayı, internal oblik kas kremaster adelesini, eksternal oblik kas ise eksternal spermatik fasyayı oluşturmaktadır (Sadler, 2005). Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.

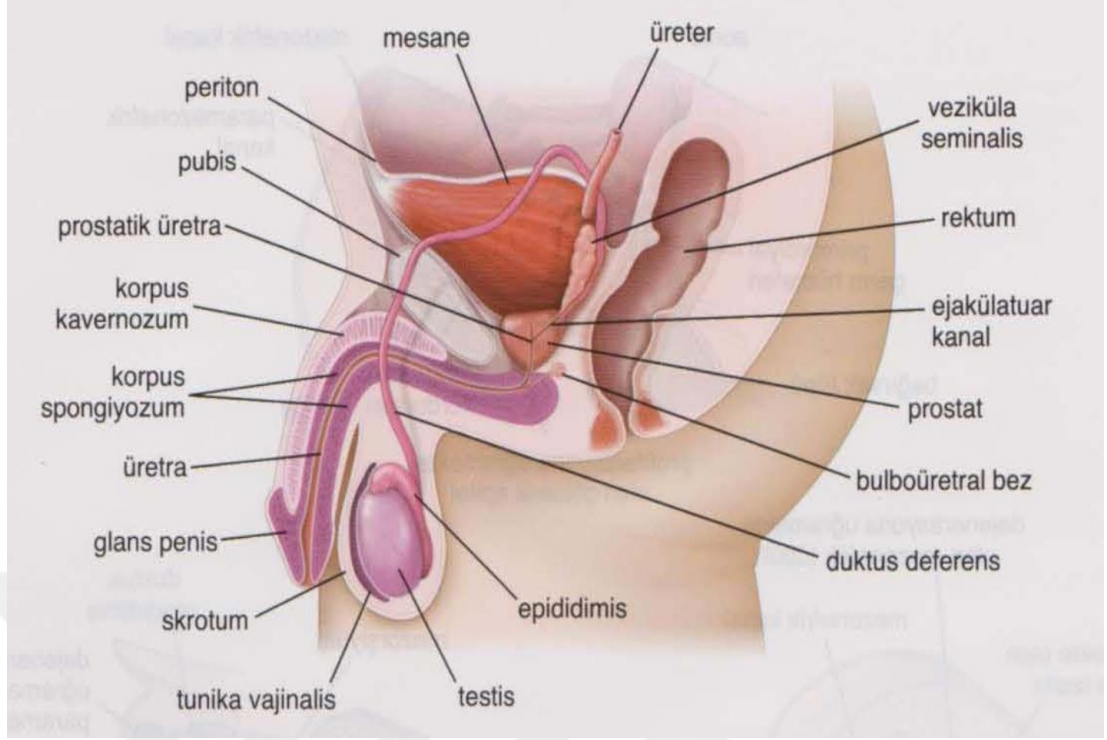


**Şekil 2.1.** Testiküler gelişim evrelerinin şematik gösterimi. a.5 haftalık bir embriyoda farklılaşmamış gonad evresi gösterilmektedir. b. Gelişmekte olan gonad, primer sex kordonlarının seminifer kordonlara farklılaşması, paramezonefrik kanalın ve bu kanaldan köken alan yapıların gerilemesi, gelişmekte olan rete testis gösterilmektedir. c. Testiküler gelişimin son evreleri, Tunika albuginea septumların gelişimine katılması, Rete testisin seminifer kordonlara ve mezonefrik kanal ve tübüllerden gelişen boşaltım kanallarına bağlanması gösterilmektedir (Ross ve Pawlina, 2014).

### 2.1.2. Testis Anatomisi

Erkeklerde bir çift olarak bulunan yanlardan basık oval şekilli testisler skrotum adı verilen deri bir torba içinde bulunmaktadır. Testisler skrotum içerisinde pleksus pampiniformisin ters akım ısı değiştirme mekanizması ile vücut sıcaklığından 3-4°C daha düşük sıcaklıkta tutulmaktadır (Şentürk, 2020). Skrotum sıcakta gevşeyerek sarkar, soğukta büzülerek toplanır ve testislerin optimum sıcaklıkta tutulmasını sağlar. Optimum sıcaklık 34°C'dir. Bu hareketleri de skrotumun kremaster kası gerçekleştirmektedir (Aktümsek, 2009). Testisler 4-5 cm uzunluğunda, 3 cm genişliğinde ve 2,5 cm derinliğinde olup yaklaşık 30 ml hacindedir. Genellikle sol spermatik kord daha uzun ve sol testis daha aşağıda konumlanmış halde bulunmaktadır (Şentürk, 2020).

Testis dıştan içe doğru tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vaskulosa olmak üzere 3 tabakadan oluşan bir kapsül ile sarıdır. Tunika vaginalis visseral ve parietal olmak üzere 2 tabakadır ve tabakalar arasındaki boşlukta seröz sıvı bulunur. Tunika albuginea testis içeriğini sarar, yapısında kollajen doku içine dağılmış, dallanmış düz kas hücreleri bulunur. Tunika vaskulosa testisin septumlarının iç yüzünü örter (Özbek, 2013). Her bir testis seminifer tübüllerden meydana gelmiştir ve tübüllerin her biri yaklaşık 80 cm kadardır. Testis içinde kıvrılmış halde bulunur. Testisler abdominal aortadan çıkan testiküler arterle kanlanır. Testislerin venöz kanı önce pleksus pampiniformisine daha sonra vena testikularise dökülür. Sağ taraf vena cava inferiora sol taraf vena renalis sinistraya dökülmektedir. Testislerin innervasyonu otonom sinirlerle gerçekleşir (Aktümsek, 2009). Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.2.** Erkek üreme sistemi komponentlerinin genel görünümü. Sagittal kesit, testis, epididimis, duktus deferens ve veziküla seminalis intakt olarak gösterilmektedir (Ross ve Pawlina, 2014).

### 2.1.3. Testis Histolojisi

Testis, kalın sıkı bağ dokusu yapısındaki kapsül olan tunika albuginea tarafından çevrenmektedir. Kapsülün iç kısmı tunika vasküloza kan damarları içeren gevşek bağ dokusudur (Ross ve Pawlina, 2011). Testisler kapsülden uzanan septumlarla 250 piramidal lobüle ayrılır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül yer alır. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve intertisyel hücreleri (Leydig hücreleri) içermektedir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

#### 2.1.3.1. Seminifer Tübüller

Her seminifer tübül karmaşık yapıda çok katlı bir epitel ile döşeli olup, yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır (Junqueira ve Carneiro, 2006). Epiteli iki temel hücre popülasyonundan oluşmaktadır. Bunlar, Sertoli hücreleri ve spermatojenik hücrelerdir (Ross ve Pawlina, 2011). Seminifer tübüller kıvrımlıdır, fakat son kısmında düz devam ederek tübuli rekti olarak adlandırılır. Tubuli rekti rete testise bağlanır. Tunika propria tarafından çevrelenen seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı,

bazal lamina ve karmaşık bir seminifer epitelden meydana gelir. Tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman; düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içerir (Junqueira ve Carneiro, 2006). Bu hücreler, tipik fibroblastların yokluğunda kollajen sentezleme rollerinin işareti olan bir özellik olarak belirgin miktarda granüllü endoplazmik retikulum (gER) sergilemektedirler (Ross ve Pawlina, 2011).

### **2.1.3.2. Sertoli Hücreleri**

Bazal laminadan lümeneye uzanan uzun, prizmatik hücrelerdir. Yan yüzleri girintili çıkıntılı olduğu için sınırları belirlenemez ve enine kesitlerde zor ayırt edilir. Eozinofilik sitoplazmaları, bir iki çentikli çekirdekleri vardır. Çekirdekçik belirgindir. Sitoplazma hücrenin dikey aksına paralel yerleşmiş bol mitokondri içerir. Golgi kompleksi, yağ damlacıkları, lizozom, fagozom ve sınırlı sayıda gER bazalinde granülsüz ER vardır (Tekelioğlu, 2002).

Sertoli hücreleri komşu Sertoli hücreleri ile sıkı bağlantı yaparlar. Bu bağlantıların bazal kısmındaki dar bölümü bazal kompartman üst lümen tarafındaki bölümü adluminal kompartman olarak bilinir. Bu sıkı bağlantılar kan-testis bariyerini oluşturur ve lümen altındaki bölmeyle bağ dokusundan gelen etkilere karşı korur (Tekelioğlu, 2002). Sertoli hücrelerinin çeşitli görevleri vardır; gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesini sağlar (Junqueira ve Carneiro, 2006). Spermioyenez sırasında fazla spermatid sitoplazması parçaları lizozomlar sayesinde fagosite edilip sindirilir.

Sertoli hücreleri tarafından folikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında androjen bağlayıcı protein (ABP) üretimi gerçekleştirilir. Bu hormon seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaştırılmasını sağlar (Junqueira ve Carneiro, 2006).

### **2.1.3.3. Spermogonyumlar**

Seminifer epitelin bazal laminasının hemen üzerinde yerleşmiş küçük hücrelerdir. Ergenliğe kadar bekleyip bu dönemde testosteronun etkisiyle aktive olurlar. A spermogonyum ve B spermogonyum olmak üzere iki tip spermogonyum bulunur. A spermogonyumlar bazal lamina üzerine oturmuş oval ve yassı çekirdekli

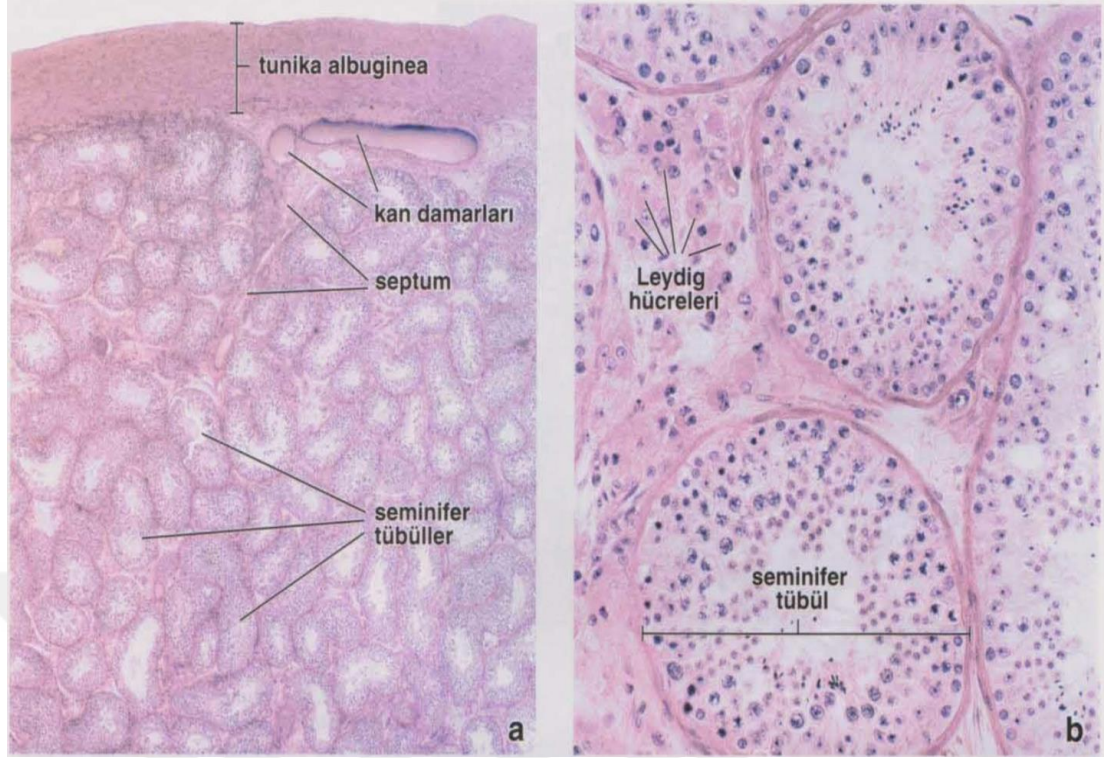
hücrelerdir. Çekirdeklerin kromatin içeriğine göre koyu ve açık olarak ayırt edilir ve koyu olanlar yedek (rezerv) hücreler olarak kabul edilir. Mitozlarla çoğalarak hem sayılarını artırır hem de B spermatogonyumları oluştururlar. B spermatogonyumlar yuvarlak bir çekirdeğe sahiptir. Kromatin içerik kenarlarda toplanmıştır ve belirgin orta duruşlu çekirdekçiği vardır. Bu hücrelerin mitozuyla primer spermatositler farklıdır (Tekelioğlu, 2002).

#### **2.1.3.4. Spermatojenik Hücreler**

Spermatojenik hücreler düzenli olarak çoğalan ve olgun sperme farklılaşan hücrelerdir (Ross ve Pawlina, 2011). Bu hücreler bazalden lümene doğru farklılaşarak ve olgunluklarını artırarak dizilirler. Bu sıra spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoondur (Tekelioğlu, 2002). Spermatojenik hücreler komşu Sertoli hücrelerinin arasında ilerleyici gelişim sergileyen belirgin olmayan tabakalar halinde düzenlenmiştir (Ross ve Pawlina, 2011).

#### **2.1.3.5. Leydig Hücreler**

İntertisyel hücreler olarak da bilinen Leydig hücreleri büyük poligonal hücrelerdir (Şekil 2.3). Eozinofiliktir ve yağ damlacıkları içerir. Testosteron hormonu üretimi ve salgılanmasından sorumludur. Bu hücrelerde salgı granülü bulunmaz. Üretilen testosteron ihtiyaca göre sentezlenir ve bekletilmeden kana verilir (Tekelioğlu, 2002). Testosteron, diğer androjenlerin salgılanması, aksesuar bezlerin salgıları, sperm üretiminin başlaması ve sekonder seks karakterlerinin devamlılığı için gereklidir. Golgi kompleksi, tübüler kristal mitokondri ve gelişmiş granülsüz ER 'a sahiptir.



**Şekil 2.3.** İnsan testisinin fotomikrografları. a. H-E ile boyanmış insan testis kesitinin küçük büyütme fotomikrograf seminifer tübülleri ve tunika albugineayı göstermektedir. Seminifer tübüller oldukça kıvrıntılıdır ve bu nedenle kesitleri görünüm olarak değişkendir X30. b. Önceki numunenin daha büyük büyütmesi birkaç seminifer tübülü göstermektedir. Komşu tübüllerin arasındaki alanda küçük kümeler oluşturan Leydig (interstisyel) hücrelerde bulunmaktadır X250 (Ross ve Pawlina, 2014).

### 2.1.3.6. Spermatogenez

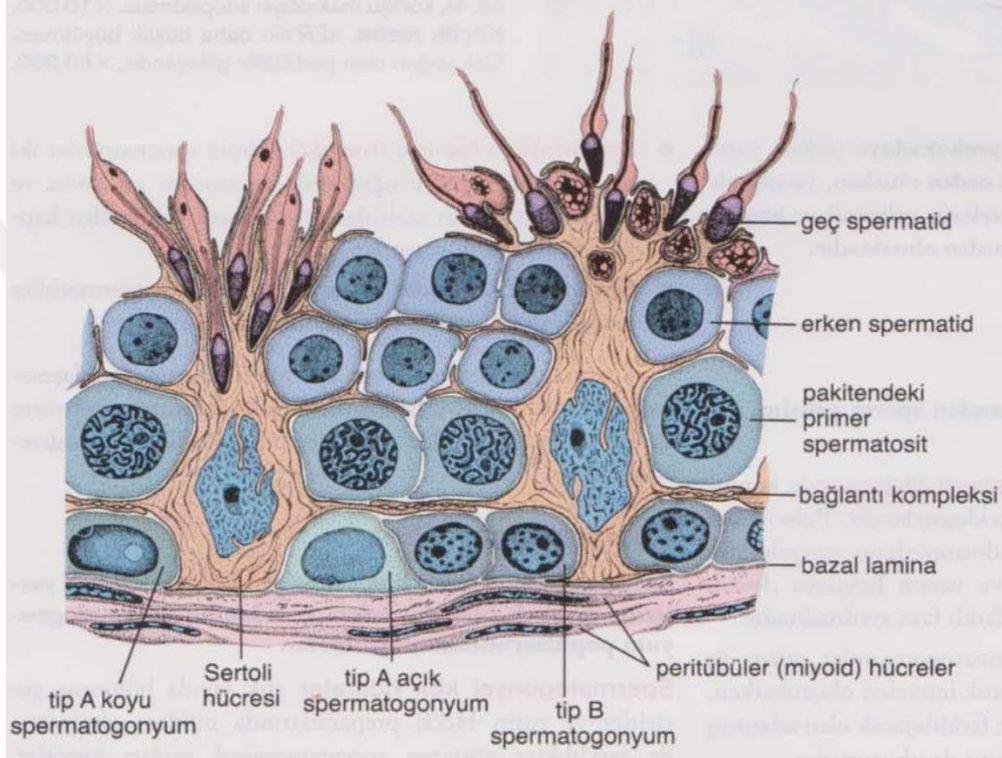
Spermatogenez spermatogonyumdan sperm gelişimi sürecidir. Puberteden kısa bir süre önce, pitüiter gonadotropinlerin seviyelerinin artmasının etkisi altında başlar ve yaşam boyunca devam eder. Üç farklı faza ayrılmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011).

Spermatogonyal fazda, cinsel olgunluk çağında spermatogonyum hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşturur. Yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izleyebilir. A tipi spermatogonyumlar olarak da adlandırılan kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürülebilir ya da süregiden mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak B tipi spermatogonyumları oluştururlar. B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Spermatosit fazında, primer spermatositler mayozu uğrayarak hem kromozom sayısını hem de DNA miktarlarını azaltırlar. Birinci mayotik bölünme ile oluşan hücreler

sekonder spermatositler olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler yeni DNA sentezlemeden hemen ikinci mayozun profaz evresine girerler. İkinci mayotik bölünme tamamlandığında kromozom sayıları ve DNA miktarları azalmış haploid spermatidler oluşur (Ross ve Pawlina, 2011).

Spermatid fazında, spermatidler olgun sperme farklılaşırken yüksek düzeyde yeniden şekillenmeye uğrarlar (Ross ve Pawlina, 2011) (Şekil 2.4.).



**Şekil 2.4.** İnsan seminifer tübül epitelinin şematik çizimi. Sertoli hücrelerinin spermatogenik hücrelerle ilişkisini göstermektedir. Seminifer epitel bir bazal laminanın üzerinde yer almaktadır ve seminifer tübülü peritübüler hücre tabakası çevrelemektedir. Tip A açık, tip A koyu ve tip B olarak sınıflandırılan spermatogonyumlar ve spermatositler, seminifer epitelin komşu Sertoli hücrelerinin arasında yer alan bağlantı kompleksinin altında bulunan bazal laminada bulunurlar. Primer spermatositler, erken spermatidler, geç spermatidler ve sitoplazma, bağlantı kompleksinin üzerinde yer alan abluminal kompartmanda görülmektedir (Ross ve Pawlina, 2014).

### 2.1.3.7. Spermijenez

Spermijenez spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoona

dönüşme sürecidir (Junqueira ve Carneiro, 2006). Golgi fazı, kep fazı, akrozom fazı ve olgunlaşma fazı olmak üzere dört fazdan oluşmaktadır.

### **Golgi Fazı**

Spermatidlerin granüllü ER'lerde üretilen enzimler golgi kompleksine gelerek zarla çevrili küçük proakrozomal granüller olarak sitoplazmaya verilirler. Bu granüller birleşerek akrozom vezikülünü oluştururlar. Elektron yoğun olarak boyanan enzimler ise akrozom granülünü oluşturur. Sentriyoller hücrenin ters kutbuna hareket eder (Tekelioğlu, 2002).

### **Kep Fazı**

Akrozom granülü çekirdeğin ön kısmında kalır. Akrozom vezikülü ise genişler ve çekirdeğin ön yarısına yayılır. Buna akrozomal kep denilmektedir. Akrozomal kepin altında kalan nükleer içerik yoğunlaşır (Tekelioğlu, 2002).

### **Akrozom Fazı**

Akrozom granülü vezikülün içini doldurur ve akrozomun yapımı tamamlanır (Tekelioğlu, 2002). Spermatidin yoğunlaşan nükleusu yassılaşır ve uzar (Ross ve Pawlina, 2011). Distal sentriyolden çıkan ve uzayan fibril demeti gittikçe uzayarak aksonemi yapar. Buna uyarak hücre şekli uzar ve mitokondriler çekirdeğin hemen altında aksonemi silindir şeklinde sarar. Flagellum şekillenir (Tekelioğlu, 2002).

### **Olgunlaşma Fazı**

Spermatidin yeniden modellenmesinin bu son fazında flagellanın etrafındaki fazla sitoplazma azaltılır ve spermatozoon oluşur. Fazla sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir (Ross ve Pawlina, 2011).

Bu tez projesi testis torsiyonu ve detorsiyonuna bağlı İ/R modeli oluşturularak gerçekleştirildiğinden İ/R modelinin anlaşılması önemli bir yer tutmaktadır.

## **2.2. İskemi / Reperfüzyon**

Testis torsiyonu, testisin spermatik kordunun kendi eksenini etrafında 360° ile 720° dönmesi sonucu testis kan akımının bozulmasıdır. Testis torsiyonuna bağlı kan akımının azalması, testiste hipoksiye neden olan iskemik bir durumdur. İskemi, dokudaki kan akımının ve oksijen miktarının, hücresel metabolik ihtiyaçları karşılamak için gerekli

olan seviyenin altına düşmesidir. İskemi sırasında hücresel enerji depoları azalır ve toksik metabolitler birikir (Türkili, 2010). Testiküler torsiyonda oluşan İ/R, spermatogenezin sürdürülebilmesi için tedavi edilmesi gereken önemli bir durumdur.

Kan akımı azalan veya tamamen kesilen dokularda enerji oksijensiz yoldan elde edilmeye çalışıldığından hücredeki laktik asit miktarı artar, oksidatif fosforilasyon azalır ve hipoksantin, lipid peroksit düzeyleri artmaya başlar. Torsiyonun derecesine ve süresine bağlı olarak testiste iskemiden nekroza kadar ilerleyen histopatolojik değişiklikler oluşmaktadır (Yurtçu ve ark., 2005). İskemi sonucu oluşan testis dokusu hasarı sonucu dokuya kan akışının azalmasından kaynaklı oksijen eksikliği, reperfüzyon sağlandığı zaman hasarlı dokuların tekrar oksijenlenmesiyle devam eder.

Reperfüzyon ise iskemik dokuya yeniden kan akımıyla birlikte oksijenin sağlanması olayıdır (Türkili, 2010). Reperfüzyon, testis hücrelerinin ve dokularının hayatta kalması için gerekli olmasına rağmen, testiküler İ/R hasarına neden olan olaylar dizisini tetikleyen ROS'un ve reaktif nitrojen türlerinin üretimi yoluyla gerçekleşir (Kocaman ve ark., 2022). Deneysel testis torsiyonu ve detorsiyonu modellerinde, reperfüzyonun germ hücrelerinde lipid peroksidasyonunun, miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin, nitrik oksit üretiminin ve apoptozun artmasına neden olduğunu göstermiştir (Özgür ve ark., 2022).

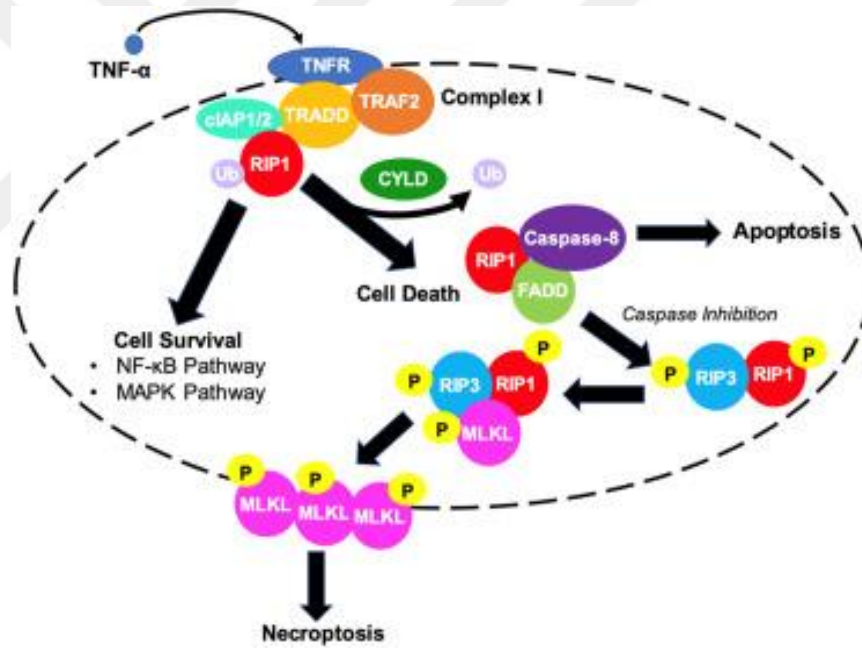
Dokudaki hasar sonucu meydana gelen ROS hücre içinde çok çeşitli mekanizmaların etkilenmesine neden olarak bazen geri dönüşümlü bazen de geri dönüşümsüz süreçlere ait mekanizmaların tetiklenmesine neden olmaktadır. Bu süreçlerden biri de hücrede programsız olarak gerçekleşen nekroz ve son yıllarda programlı nekroz olarak da tanımlanan nekroptoz adı verilen hücre ölüm süreçleridir (Değer ve ark., 2022). Tez projesinin ana amacı bu mekanizmalarda rol oynayan bu moleküllerin İ/R sonrasında değişip değişmediğinin gösterilmesidir.

### **2.3. Reseptör Etkileşimli Protein – RIP**

Reseptör Etkileşimli Protein (RIP) kinaz ailesi, hücrenin hayatta kalması ve hücre ölümünde önemli bir sinyal rolü oynayan yedi Serin/Treonin kinazdan oluşur. Her RIP ailesi üyesi, korunmuş bir kinaz alanı ve protein-protein etkileşimleri yoluyla spesifik kinaz fonksiyonunu belirleyen diğer alanları içerir. Bu protein ailesinin bilinen iki üyesi RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 en iyi nekroptoz, programlanmış nekroz ve apoptotik

olmayan inflamatuvar hücre ölümü sürecindeki kritik rolleriyle bilinir. RIP kinazların düzensizliği, inflamatuvar hastalıklar, nörolojik hastalıklar ve kanser gibi çeşitli patojenik koşullara katkıda bulunur. Kanser hücrelerinde RIP kinazlarda genetik, epigenetik ve ekspresyon seviyelerinde değişiklikler bulunur ve tümörün ilerlemesini ve metastazı, antitümör immün yanıtından kaçışı ve terapötik direnci teşvik ettiği ileri sürülmektedir (Ermine ve ark., 2021).

RIP kinaz ailesi üyeleri, hücre içi ve hücre dışı streslerin temel uyarıları olarak ortaya çıkmaktadır. Sadece iltihaplanma ve diğer bağışıklık tepkilerinde değil, aynı zamanda ölüme neden olan süreçlerde de önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (Festjens ve ark., 2007; Declercq ve ark., 2009). RIP kinazları hepsi homolog bir kinaz alanını paylaşan ancak farklı fonksiyonel alanlara sahip olan RIP1, RIP2, RIP3, RIP4, RIP5, RIP6 ve RIP7 olacak şekilde yedi üyeden oluşmaktadır (Zhang ve ark., 2010).



**Şekil 2.5.** RIPK1/RIP1 ve RIPK3/RIP3 nekroptozun kritik araçlarıdır. TNF- $\alpha$ , TNFR'ye bağlanarak TRADD, TRAF2, cIAP1/2 ve RIPK1/RIP1 'den oluşan Kompleks I'in oluşumunu teşvik eder. cIAP1/2, NF- $\kappa$ B ve MAPK yolları yoluyla hücrenin hayatta kalmasını destekleyebilen (Ub) RIPK1/RIP1 'i çoğaltır. CYLD tarafından her yerde bulunan RIPK1/RIP1, kaspaz-8 ve FADD ile etkileşime girerek apoptozu teşvik edebilir. Kaspaz inhibe edildiğinde RIPK1/RIP1, RIPK3/RIP3 ile etkileşime girerek nekroptozu destekleyebilir ve otofosforilasyonuna yol açabilir. Fosforile edilmiş RIPK3/RIP3, plazma zarında translokasyon yapan ve oligomerize olan ve yırtılmayı indükleyen MLKL'yi toplar ve fosforile eder. (Ermine ve ark., 2021).

### 2.3.1. RIP 1/ RIPK1

RIP kinaz ailesinin ilk üyesi olan RIP1/ RIPK1, ilk olarak 1995 yılında C-terminal ölüm alanına sahip yeni bir protein kinaz olarak tanımlanmıştır (Stanger ve ark., 1995). Bu sayede reseptör Fas'ın (CD95) ölüm alanıyla etkileşime girdiği belirlenmiştir. Bu nedenle 'reseptörle etkileşime giren protein' olarak adlandırılmıştır. Daha fazla RIP kinaz karakterize edildikçe buna 'RIP1' adı verilmiştir. RIP1/RIPK1, RIP1/RIPK1'in farklı yolları başlatan sinyal komplekslerine alınabileceği bir C-terminali ölüm alanı içermektedir. RIP1/RIPK1'in ölüm alanının, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü 1 (TNF-R1), TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptörü 1 ve 2 ve TNF reseptörü ile ilişkili apoptoz gibi çeşitli ölüm reseptörlerine bağlandığı bilinmektedir. RIP1/RIPK1'in ara alanı ve ölüm alanı, RIP3/RIPK3, fokal adezyon kinaz, mitojenle aktive olan protein/ hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz kinaz 1 (MEKK1) ve MEKK3 gibi çeşitli diğer kinazlarla ilişki kurmasını sağlamaktadır (Zhang ve ark., 2010).

RIP1/RIPK1 birçok dokuda yapısal olarak eksprese edilir. Bununla birlikte, TNF- $\alpha$  tedavisi veya T hücresi aktivasyonu da RIP1/RIPK1 ekspresyonunu indüklenebilir hale getirmektedir. RIP1/RIPK1 ekspresyonu, T hücresinin hayatta kalması için önemlidir, lenfoid dokuda yoğun apoptoz sergiler (Stanger ve ark., 1995). Kültürlenmiş RIP1/RIPK1 delesyon hücreleri ayrıca TNF- $\alpha$  kaynaklı hücre ölümüne karşı daha duyarlıdır. Bunların hepsi RIP1/RIPK1'in hücre ölümünün düzenlenmesinde ve bir doku veya organizmanın homeostazisinin kontrol edilmesinde çok önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. RIP1/RIPK1'in fosforilasyon ve her yerde bulunma gibi modifikasyonu, RIP1/RIPK1'in hayatta kalma ve ölüme neden olan sinyal yollarındaki fonksiyonunu belirler. TNF uyarımı üzerine RIP1/RIPK1 otofosforile edilir ve her yerde bulunur (Zhang ve ark., 2010).

Ölüm reseptörleri TNF-R1, Fas ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand reseptörü, birçok hücre sisteminde apoptoza aracılık eder. Bu reseptörler ligandlarına bağlandıklarında polimerleşirler veya bir inflamatuvar tepkiye ya da hücre ölümüne yol açan sinyal yollarını başlatırlar. TNF- $\alpha$ 'nın reseptörü TNF-R1'e bağlanması, iki ardışık sinyal kompleksinin oluşumunu indükler; RIP1/RIPK1, her iki kompleksin de bir bileşenidir. RIP1'in programlanmış nekroza aracılık etmede kritik rolü vardır. Homolog kinaz RIP3/RIPK3 'ün, TNF uyarımı üzerine RIP1/ RIPK1 ile etkileşime girebildiği ve

onu fosforile edebildiği bilinmektedir. RIP3/RIPK3 ve RIP1/RIPK1, sonunda nekrotik hücre ölümüne yol açan fosforilasyonla yönlendirilen bir nekrozom oluşturur (Micheau ve Tschopp, 2003).

RIP1/RIPK1'in, hücre ölümüne aracılık etmesinin yanında, NF- $\kappa$ B ve MAPK yolları ile hücrenin hayatta kalmasını da desteklediği gösterilmiştir. RIP1/RIPK1'in hücre hayatta kalmasını veya hücre ölümünü destekleyip desteklemediği spesifik hücresel bağlama ve bağlanma ortaklarına bağlıdır. Nekrostatin-1 tarafından bloke edilebilen RIP1/RIPK1'in kinaz aktivitesinin, hücre ölümündeki rolü açısından kritik olduğu, ancak RIP1/RIPK1 aracılı hücrenin hayatta kalması için vazgeçilmez olduğu bilinmektedir. Nekrostatin-1, RIP1/RIPK1'in konformasyonuna müdahale eder ve bu nedenle kinaz dışı fonksiyonlarını potansiyel olarak etkileyebilir (Degterev ve ark., 2008; Liu ve ark., 2017).

### **2.3.2. RIP3/RIPK3**

RIP3/RIPK3 ilk olarak 1999'da kinaz aktivitesinden bağımsız olarak apoptozun bir indükleyicisi olarak tanımlanmıştır (Pazdernik ve ark.,1999). RIP1/ RIPK1 ve RIP2/RIPK2'den farklı olarak RIP3/RIPK3, bir ölüm alanı içermez ve ölüm alanı içeren proteinlerle doğrudan etkileşime girdiği düşünülerek araştırılmıştır. 2009 yılında RIP3/RIPK3 'ün, kinaz aktivitesini gerektiren TNF- $\alpha$ 'ya bağımlı nekroptozun önemli bir aracısı olduğu belirlenmiştir (Cho ve ark., 2009; He ve ark., 2009; Khan ve ark., 2014).

RIP3/RIPK3 'ün aşırı üretildiğinde veya kinaz inhibisyonu gibi belirli şartlar altında nekroptozla birlikte apoptozu da destekleyebildiği bilinmektedir. Küçük molekülle RIP3/RIPK3 kinaz inhibitörleriyle yüksek konsantrasyonda tedavi aynı zamanda bloke nekroptoz ve apoptozla sonuçlanır (Ermine ve ark., 2021).

RIP3/RIPK3, üçüncü RIP kinaz ailesi üyesidir. RIP3/RIPK3, bilinen tüm protein alanları arasında benzersiz olan bir C terminaline sahiptir (Zhang ve ark., 2010). Bununla birlikte, RIP1/RIPK1'in ara alanında bulunan bir RIP homotipik etkileşim motifi (RHIM), RIP3/RIPK3 'ün C terminalinde de tanımlanmıştır. RHIM alanının, RIP3/RIPK3 ve RIP1/RIPK1 arasındaki etkileşim için gerekli olduğundan, protein-protein etkileşimlerine aracılık etmesi muhtemeldir (Meylan ve Tschopp., 2005). RIP3/RIPK3, diğer RIP kinazlarda bulunanlara benzer bir N-terminal kinaz alanından, bir RHIM alanından ve bilinen tüm protein alanlarından farklı olan benzersiz bir C-

terminal alanından oluşur. RIP3/RIPK3 'ün aşırı ekspresyonu bazı hücre hatlarında apoptozu indükleyebilir (Feng ve ark., 2006; Pazdernik ve ark., 1999; Sun ve ark., 1999; Yu ve ark., 1999). Bununla birlikte, RIP3/RIPK3 RIP1/RIPK1'i fosforile eder (Sun ve ark., 2002). Son zamanlarda, TNF tedavisinin tetiklediği kaspazdan bağımsız nekrotik hücre ölümü için RIP1/RIPK1'e benzer şekilde RIP3/RIPK3 'ün de gerekli olduğu bulunmuştur. Silme ve nokta mutasyonları analizi, RIP3/RIPK3 'teki kinaz aktivitesinin ve RIP1/ RIPK1 ile etkileşime giren RHIM alanının her ikisinin de nekrotik sinyalleme için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır (Zang ve ark., 2009). RIP1/ RIPK1 ve RIP3/RIPK3 'ün fosforilasyonu, pronekrotik kompleks içindeki etkileşimlerini stabilize edebilir, pronekrotik kinaz aktivitesini aktive edebilir ve sonunda nekrotik hücre ölümüne yol açan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini tetikleyebilir (Zhang ve ark., 2010).

RIP1/ RIPK1 çoğunlukla meme kanseri, kolorektal kanser, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda aşağı regüle edilmektedir. RIP1/ RIPK1 'in bilinen bir onkogenik taşıma proteini olan Aquaporin-1'i negatif olarak düzenlediği ve RIP1/ RIPK1 aşırı eksprese edildiğinde tümör yükünün azaldığı bilinmektedir. RIP1/ RIPK1; glioblastoma, melanom, akciğer kanseri, pankreas adenokarsinomu, mide kanseri ve safra kesesi kanserinde yukarı doğru düzenlenir (Ermine ve ark., 2021).

RIP3/RIPK3 'ün CRC, malign mezotelyoma, meme kanseri, melanom, akciğer kanseri, akut miyeloid lösemi (AML), kronik lenfositik lösemi (CLL) ve prostat kanserinde aşağı regüle edildiği bilinmektedir (Ermine ve ark., 2021). RIP1/ RIPK1 ve RIP3/RIPK3 'ün ilaç tedavisi veya enfeksiyon sırasında bağımsız olarak hücre ölümünü teşvik edebildiğini belirtmek önemlidir (Ermine ve ark., 2021). Bu genler, serin/treonin protein kinazların reseptör etkileşimli protein (RIP) ailesinin bir üyesini kodlar. Kodlanan protein, doku hasarına yanıt olarak, patojen tanımda ve gelişimsel düzenlemenin bir parçası olarak iltihaplanma ve hücre ölümünde rol oynar. RIPK1/RIPK3 kinaz aracılı nekroza nekroptoz denir (The Human Protein Atlas, 2024).

Hücre ölümünün iki paralel formu olan nekroptoz ve apoptozu aktive eden serin/treonin protein kinazdır. Ölüme neden olan TNF- $\alpha$  ailesi üyelerine yanıt olarak programlanmış bir hücre ölümü süreci olan nekroptoz RIPK3 tarafından tetiklenir. Aktive edilmiş RIPK3, nekrozu indükleyen bir kompleks oluşturur, kalsiyum akışı ve plazma zarı

hasarı ile karakterize edilen programlanmış nekrozun yürütülmesini sağlar. RIPK3, zarf ve hücrese DNA'nın sitozole sızmasını sağlar, ayrıca apoptozu da düzenler. Apoptoz, RIPK1 ve RIPK3 kinaz aktivitesinden bağımsızdır. RIPK1 ve RIPK3 karşılıklı oto ve trans-fosforilasyona uğrar. RIPK3 metabolik enzimlere bağlanır ve aktivitesini artırır. Bu metabolik enzimler sonunda trikarboksilik asit döngüsünü ve oksidatif fosforilasyonu uyarabilir (Uniprot, 2024).

Testis İ/R'na bağı doku hasarında yer alan çeşitli mekanizmaların değerlendirilmesinin yanı sıra testis dokusu spermatojenik olan ve spermatojenik olmayan hücre serilerinin de değerlendirilmeye alınması çalışmanın sonuçlarının hangi düzeyde hücre popülasyonuna etki ettiğinin gösterilmesi bakımından önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle bu yüksekisans tez projesinde hem Sertoli hücrelerinin hem de Leydig hücrelerinin fonksiyonelliğinin değerlendirilebilmesi için bu hücrelerden salgılanan hormonların yanı sıra bu hücelere özgü proteinlerin de değerlendirilmesi sağlanmıştır.

#### **2.4. Glial Hücre Türevli Nörotrofik Faktör**

Sertoli hücreleri, erkek germ hücresi çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen, homeostazi çeşitli sinyal yollarının ve büyüme faktörlerinin etkileşimi ile sağlayan spermatogoniyal kök hücre (SSC) nişinin bir bileşenidir. Bu faktörler Sertoli hücreleri ve interstisyel hücreler tarafından salgılanır. Sertoli hücreleri ve peritübüler miyoid hücreler, farklılaşmamış spermatogonia yüzeyindeki glial hücre türevli nörotrofik faktör (GDNF) üretir. GDNF, SSC'nin kendi kendini yenilemesini ve hücre çoğalmasını sağlama yeteneğine sahiptir (Parekh ve ark., 2019). Spermatogoniyal kök hücreler (SSC'ler) erkek doğurganlığının temelidir. Bu temelin korunmasını, bir kök hücre havuzunu sürdürmesini ve ayrıca çok sayıda spermin sürekli üretimini sağlamak için yeterli sayıda farklılaşan progenitör spermatogonia üretmesini gerektirir.

Tüm kök hücrelerde olduğu gibi, SSC'ler de testiste Sertoli ve peritübüler miyoid hücreleri de dahil olmak üzere testis somatik hücreleri tarafından oluşturulan özel bir fizyolojik ortamda veya nişte bulunur. Bu somatik hücreler, SSC replikasyonunu ve farklılaşmasını düzenleyen çok sayıda büyüme faktörü ve sitokin salgılar. GDNF, SSC nişinin normal fonksiyonu için gerekli olduğu gösterilen ilk büyüme faktörüdür (Wright, 2022). FSH ve sitokinler, Sertoli hücrelerinde GDNF ekspresyonunun pozitif düzenleyicileri olabilir. Hipotalamustaki nöronlar tarafından salgılanan gonadotropin

salgılatıcı hormon, spermatogenezin ana düzenleyicisidir. GnRH'nin döngüsel üretimi, hipofiz tarafından glikoproteinler olan FSH ve luteinize edici hormonun (LH) salınmasını indükler ve bu hormonlar, spermatogenezin düzenlenmesi için testis somatik hücreleri üzerinde etki gösterir. Sertoli hücre büyüme ve farklılaşma faktörlerinin ekspresyonu yoluyla spermatogenez üzerindeki etkilerini gösterir (Parekh ve ark., 2019).

## **2.5. Steroidojenik Akut Düzenleyici Protein**

Somatik hücrelerden biri olan Leydig hücreler, interstisyel bölgelerde bulunur ve testosteron gibi androjenler üretir. Leydig hücrelerinden elde edilen testosteron, spermatogenezin başlatılması, sürdürülmesi ve düzenlenmesi için gereklidir; dolayısıyla Leydig hücrelerindeki sorunlar androjen sentezinin azalmasına neden olarak spermatogenezin aksamasına neden olur. Testosteron, Leydig hücrelerinde steroidogenez yoluyla üretilen önemli bir androjen ve Sertoli hücrelerini hedef alarak spermatogenezde kritik bir rol oynar (Otsuka ve ark., 2021).

Steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) mitokondriyal bir protein olup indüklenmesi LH ile kontrol edilir ve hücrenin steroid üretiminde gereklidir. Steroidogenez, StAR tarafından düzenlenir ve etkisiyle kolesterolün dış mitokondriyal membrandan iç mitokondriyal membrana transferi ile başlatılır. Steroidojenik süreç açısından StAR proteini önemlidir (Bouchard ve ark., 2022).

Testis İ/R'nu sonrasında dokuda meydana gelen hasarın düzeltilmesi için çok çeşitli ajanların kullanımına devam edilmekte ve dokunun normal sürecine döndürülmesi için kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bu yüksek lisans tez projesinde ise THQ kullanılarak İ/R sonrasında dokuda meydana gelen değişikliklerin histolojik, biyokimyasal ve gen seviyesi düzeyinde analiz edilmesi amaçlanmıştır.

## **2.6. Timokinon**

THQ, ilk defa El-Dakhkhny tarafından *Nigella sativa L.* yani çörek otunun tohumlarından 1963 yılında izole edilmiştir (Kaçar, 2020). Yaygın olarak çörek otu olarak bilinen bu bitki türü, *Ranunculaceae* familyasına ait olup, Akdeniz ülkeleri ve Hindistan yarımadasına özgü tek yıllık bir bitkidir. Ayurveda, Unani, Çin ve Arap geleneksel tıp sistemlerine ait incelemelerde bahsedilmektedir. *N. sativa* tohumlarındaki

başlıca ve en yaygın olarak araştırılan biyoaktif bileşik, bu tohumlardan üretilen uçucu yağda bulunan (ağırlıkça %0,4 civarında) THQ'dur. Ancak THQ, *N. sativa* tohumlarından üretilen tüm uçucu yağlarda bulunmaz; bu yağların yalnızca %28-57'sinin THQ içerdiği tahmin edilmektedir. Molekül formülü  $C_{10}H_{12}O_2$  ve molekül ağırlığı 164,20 g/mol olan monoterpenoid sınıfından bir benzokinondur. Suda az çözünen, etanol, dimetil sülfoksit ve dimetil formamid gibi organik çözücülerde çözünen sarı kristalli bir maddedir. THQ'nun düşük pH'lı çözeltilerde daha stabil olduğu ve pH arttıkça stabilitesinin azaldığı bulunmuştur. THQ oldukça lipofiliktir (Malik S. ve ark., 2021). Ancak THQ oldukça da hidrofobik bir bileşiktir ve bu maddenin hayvanlara uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Çözünürlüğünün düşük olması ve emiliminin zayıf olması nedeniyle bu madde kan serumunda ve dokularda düşük seviyelere ulaşır (Isaev ve ark., 2023).

THQ, güçlü bir antioksidandır ve iyi bir ROS toplayıcısıdır. THQ'nun antioksidan özelliği ile ilgili olarak, lipit peroksidasyonunu engellediği, güçlü bir antioksidan potansiyelinin olduğu ve farklı radikal türlerini temizleme kabiliyetinin bulunduğu, fakat özellikle de  $O_2$ 'ye karşı daha da güçlü etkileri olduğu bilinmektedir (Badary ve ark., 2003). Aynı zamanda ER stresi ve mitokondri kaynaklı apoptozu da önlediği gösterilmiştir (Kaçar, 2020).

THQ, bağışıklık sistemini artırır ve normal hücrelerin oksidatif hasarını engeller. Ayrıca anti-inflamatuar, anti-oksidatif, anti-oksidan ve antitümör etkileri gösterdiği bilinen geniş bir yelpazede faydalı farmakolojik ve biyolojik özelliklere sahiptir. Baskın anti-oksidan aktivitesi, kanserlerde ve inflamatuvar bozukluklarda terapötik kullanımlar için faydalı olmasını sağlamıştır (Alam ve ark., 2022). Halk arasında inflamasyon, hipertansiyon, astım, bronşit, diyabet, baş ağrısı, egzema, gastrointestinal rahatsızlıklar gibi durumlarda birçok hastalığa çare olarak yüzyıllar boyu kullanılmıştır (Kaçar, 2020).

THQ'nun etkilerinin gösterilmesi çoğunlukla oksidatif stres ile ilişkilendirilerek gerçekleştirilmektedir. Çünkü oksidatif stres hücre içinde yer alan mekanizmaların işleyişinin düzenlemesine etki ederek yapı ve fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır. Oksidatif stres nükleik asitlere zarar verir, protein ve lipit peroksidasyonunu indükleyerek doğrudan hücresel hasara neden olur. En önemli serbest radikaller oksijen içerdiğinden dolayı biyolojik sistemlerde sıklıkla reaktif oksijen türleridir (Koç ve

ark.,2023). Vücuttaki antioksidanlar ve serbest oksijen radikalleri arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkan oksidatif stres, spermelere zarar verir ve infertiliteye sebep olabilir. Oksidatif stres, spermde DNA hasarına yol açan asıl etiyolojik faktör olarak ele alınmaktadır (Ötünçtemur ve ark., 2012). ROS'ların çok düşük miktarları erkek üreme sisteminde spermatozoa olgunlaşması; sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon gibi pek çok önemli olayın düzenlenmesinde olumlu rol oynarken; kronik stres koşullarında olduğu gibi yüksek konsantrasyondaki ROS'lar ise toksik etkilerinden dolayı, sperm kalitesini ve buna bağlı olarak fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyerek infertilite patogenezinde yer alırlar (Bahçivan ve ark., 2018).

Bu yüksek lisans tez projesinde torsiyon-detorsiyona bağlı İ/R modeli oluşturularak dokuda meydana gelen değişiklikler üzerinde THQ'nun etkilerinin histolojik, biyokimyasal ve gen analizleri kullanılarak geniş kapsamlı değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Testis dokusunda meydana gelen hasarda hem spermatojenik hem de spermatojenik olmayan hücre popülasyonlarının birlikte ele alınması ile dokunun yapı ve fonksiyon bütünlüğünün her bakımdan değerlendirilerek literatüre geniş kapsamlı bir veri sağlanması amaçlanmaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 40 adet 250-300 gr ağırlığında erkek 10 haftalık erişkin *Wistar albino* cinsi sıçan kullanılmıştır. Deney hayvanları Erciyes Üniversitesi "Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DEKAM) takip edilmiş, ratlara standart su ve besin uygulanmıştır. Araştırma süresi boyunca 19-21 °C sıcaklıkta aydınlık ve karanlık dönemlerin sağlandığı odalarda takip edilmiştir. Deney başlayana kadar stressiz ortamda her kafeste 4 sıçan olacak şekilde barındırılmışlardır. Deneye başlamadan önce hayvan ağırlıkları ölçülerek yakın ağırlıklı hayvanlar gruplandırılarak her grupta 10'ar adet sıçan olacak şekilde dağıtılmıştır. Çalışmada uygulanan deney grupları aşağıda verilmektedir.

#### **Deney grupları**

**Kontrol grubu (K):** K grubu (n=10) genel anestezi verildikten sonra cerrahi işlemle skrotum açılıp 3.0 ipek süturla kapatıldı ve işlem sonlandırıldı. Kontrol grubuna herhangi bir madde uygulanmamış olup batın açıp kapatma dışında başka işlem uygulanmamıştır.

**İskemi/reperfüzyon grubu (İ/R):** İ/R grubu (n=10) Genel anestezi (ksilazin 5-10 mg/kg, ketamin 50-70 mg/kg, intraperitoneal (ip)) altında skrotum üzerinde kesi açılarak sol testis görünür hale getirildi. Daha sonra 720° saat yönünde döndürülen sol testis 4.0 ipek sütur ile skrotuma sabitlenerek 120 dakika (2 saat) bekletildi. İskemi süresi tamamlandıktan sonra testis doğal pozisyonuna ters çevrilerek detorsiyon (reperfüzyon) yapılmıştır (Gökçe ve ark., 2010; ve Erol ve ark., 2017). Açılan skrotum içine testis yerleştirilerek yeniden 3.0 ipek sütur ile kapatılmıştır.

**Timokinon grubu (THQ):** THQ grubu (n=10) Hayvanlara 7 gün boyunca 10 mg/kg THQ intragastrik (ig) olarak uygulandı ve 8. gün hayvanların hayatına son verilmiştir.

Bu gruptaki hayvanların uygulaması diğer grupların işlemleri ile aynı gün olacak şekilde ayarlanmıştır. THQ dozu literatürel kaynaklar referans alınarak belirlenmiştir (Gökçe ve ark., 2010). THQ her gün aynı saatte 10 mg/kg olacak şekilde 500µl saf zeytinyağı içerisinde çözdürülüp uygulanmıştır.

**İskemi/Reperfüzyon + Timokinon grubu (İ/R+THQ):** (İ/R+THQ) (n=10) Genel anestezi (ksilazin 5-10 mg/kg, ketamin 50-70 mg/kg, ip) altında skrotum üzerinde kesi açılarak sol testis görünür hale getirilmiştir. Daha sonra 720° saat yönünde döndürülen sol testis 4.0 ipek sütur ile skrotuma sabitlenip 120 dakika (2 saat) bekletilmiştir. İskemi süresi tamamlandıktan sonra testis doğal pozisyonuna ters çevrilerek detorsiyonyapılarak reperfüzyon sağlanmıştır (Gökçe ve ark., 2010; Erol ve ark., 2017). Açılan skrotum içine testis yerleştirilerek 3.0 ipek sütur ile yeniden kapatıldı. Reperfüzyon sonrasındaki ilk 30 dakika da ilk doz THQ 10 mg/kg ig olarak 500µl saf zeytinyağında çözdürülerek verilip, ilk dozu takiben diğer dozlar ise 24 saat arayla 6 gün daha toplam 7 doz olacak şekilde uygulanmıştır.

Deney prosedüründeki cerrahi müdahale işlemi uygun şekilde gerçekleştirildikten sonra hayvanların acı/ağrı çekme olasılığına karşın post-op olarak aspirin, ketoprofen, karprofen gibi maddelerden birinin uygulanması önerilmektedir. Çalışmamızda operasyon sonrası analjezik madde olarak aspirin uygulanması tercih edilmiştir. Uygulama 1 gün süreyle sıçan ağırlığına uygun olarak 4 saatte bir 100 mg/kg olarak içme sularına katılacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Deney süresi İ/R müdahalesi dahil toplam 7 gün/1 hafta olacak şekilde planlanmıştır. Deneyde uygulanan son THQ dozundan 24 saat sonra (8. Gün) hayvanlara ketamin 50 mg/kg ve ksilazin 5 mg/kg anestezi verildikten sonra sıçanlar tartıldı ve ağırlıkları kaydedildi. Daha sonra karın ön duvarı açılarak, abdominal vena kavadan kanları alındı ve deneklerden orşiektomi (testis dokusunun çıkarılarak alınması) yapıp dokular çıkarıldı. Skrotum açılınca sol epididimis kısmından örnek alınarak spermiyogram yapılmıştır. Çıkarılan testis dokuları tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir. Alınan testis dokularının bir kısmı %10'luk formaldehid solüsyonu içerisine diğer kısmı ise biyokimyasal analizler için alimünyum folyaya sarılıp etiketlenerek -80°C'ye kaldırıldı.

### **3.1. Semen Analizi (Spermiyogram)**

Sıçanların testis dokusu alınırken epididimisin kaudal kısmından bir parça alınarak içerisindeki sıvı 1 ml spermwash medium ile karıştırıldı. Motilite ve vitalite kaybı yaşamamak için hızlı bir şekilde pipetaj yapıldı. Daha sonra spermatozoalar tek kat ve homojen dağılarak ışık mikroskobunda inceleme yapabilmek için makler sperm sayma kamerası içerisine damlatıldı. Üst camı kapatıldıktan sonra ışık mikroskobuna yerleştirildi. X20 objektif ile sayım yapıldı. İnceleme sonrasında sayı ve hareket değerlendirmesi gerçekleştirildi.

### **3.2. Histolojik prosedür**

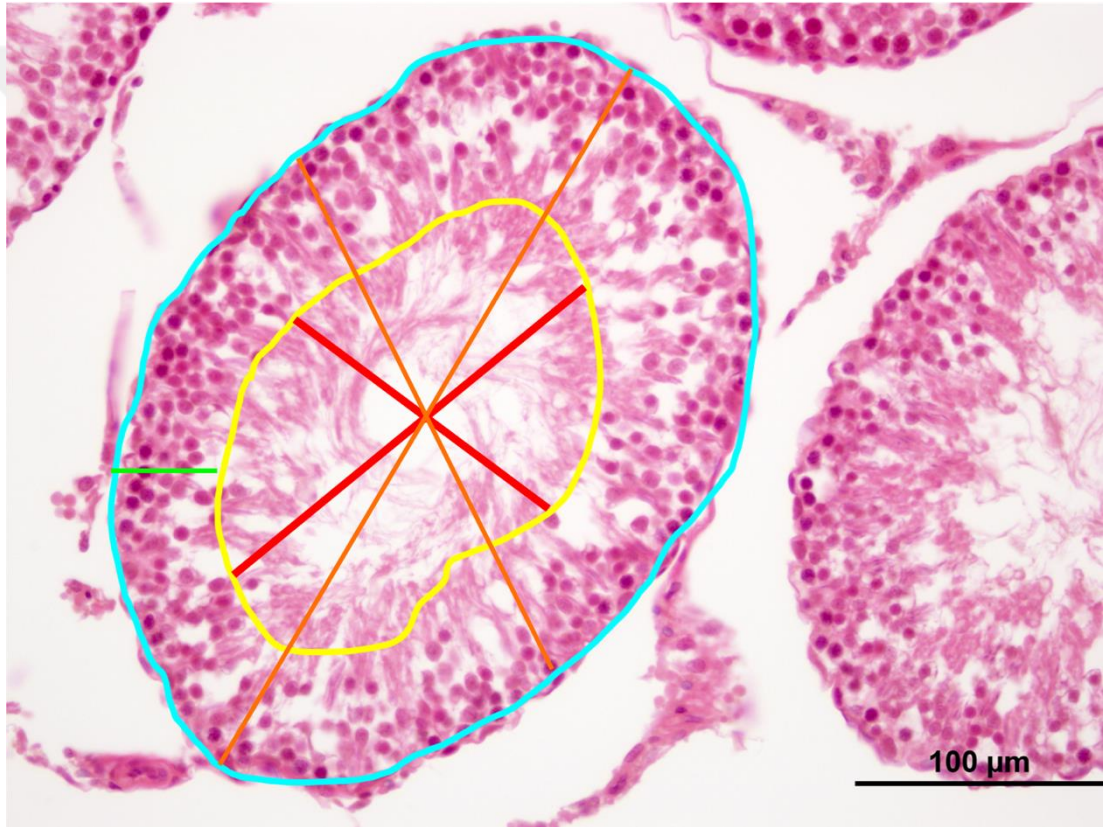
Deney sonunda testis dokuları alınarak %10'luk formaldehid solüsyonuna alınan dokular iki hafta formaldehid içerisinde tespit edildi. Tespit işleminden sonra dokular akan musluk suyu altında iki defa yıkandı. Daha sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirilmek üzere %50 alkole alındı 1 saat bekletildi. Daha sonra sırasıyla %70, %80, %96, 3 x %100 alkol serileri içinde birer saat şeklinde uygulanarak dehidrate edildi. Ksilol serisi içerisinde de 1'er saat bekletilerek şeffaflandırılan dokular etüv içerisinde bulunan eriyik parafine alındı. Bir gece eriyik parafin içerisinde bekleyen dokular bloklanarak kesit almak üzere depolandı.

#### **3.2.1. Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama protokolü**

Parafin bloklanmış olan sol testis dokularından alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere Hematoksilen-Eozin (H-E) boyaması yapılarak doku örneklerinde oluşan histopatolojik değişiklikler belirlenmiştir. Parafin blokalardan alınan kesitler lam üzerine yayıldı. Kesitler 2-3 saat 60°C' de inkübe edildi. Kesitler 3 kez 10'ar dakika (dk) ksilende bekletildikten sonra azalan alkol (2x %100, %96, %80, %70 ve %50) serilerinde 5'er dk bekletilerek su aşamasına getirildi. Çeşme suyunda 5 dk yıkanan kesitler oda sıcaklığında hematoksilen solüsyonu içinde 10 dk bekletildi. Çeşme suyunda tekrar yıkanan kesitler eosin solüsyonunda 6 dk bekletildikten sonra yeniden çeşme suyuna alındı ve 5 dk yıkandı. Artan dereceli alkol (%50, %70, %80, %96, 3x%100) serilerinden 2'şer dk geçirilen kesitler ksilen serilerine alınarak 30 dk bekletildikten sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelendi.

### 3.2.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü

H-E boyaması yapılan testis dokuları seminifer tübül çapı ölçülmek için Olympus BX51 marka ışık mikroskobu altında 40x objektif büyütmesi ile alınan görüntülerden yapılmıştır. Her grup için her hayvandan 15 seminifer tübül olacak şekilde 10 hayvan için toplamda 150 ölçüm gerçekleştirilmiştir. Image j programı ile gerçekleştirilen ölçümlerde tübül çapı ölçmek için karşılıklı iki noktadan doğru düzlemi oluşturulmuştur ve sonuç  $\mu\text{m}$  olarak belirlenmiştir. Şekil 3.1.'de gösterildiği gibi seminifer tübül çapı, seminifer tübül lümen çapı ve seminifer tübül epitel kalınlığı ölçümü gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.1.** Seminifer tübül ve seminifer tübül lümen çapı ve seminifer tübül epitel kalınlığı ölçümü. Seminifer tübül epitel kalınlığı yeşil çizgi ile gösterilen şekilde ölçülmüştür. Mavi ile işaretli seminifer tübül çapı, turuncu çizgi ile belirtildiği şekilde ölçülmüştür. Sarı ile işaretli seminifer tübül lümeninin çapı kırmızı çizgi ile belirtildiği şekilde ölçülmüştür (Önal, 2023).

### 3.2.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

Tübüllerdeki bu hasarlanmanın derecesinin değerlendirilmesinde Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) kullanılmıştır. Histolojik incelemelerin sonuçları iki uzman

histolog tarafından değerlendirilmiştir. Her gruptan rastgele seçilmiş 10 farklı preparattan 15'er farklı tübül 40'lik objektifteki farklı alanlar incelenerek yapılmıştır. Her grup için ayrı ayrı 150 adet tübül değerlendirilerek JTB skoru için istatistiksel analiz yapılmıştır. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar için GraphadPrism 10 programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler önceden hazırlanan bir forma işlenmiştir. Değerlendirme ölçütlerine göre tübüler kesitte hiç hücre yoksa 1, sadece Sertoli hücresi varsa 2, spermatogonyum varsa 3, az sayıda tübül varsa 4, fazla sayıda spermatosit varsa 5, az sayıda spermatid varsa 6, farklanma işareti olmaksızın fazla sayıda spermatid varsa 7, olgun spermatozoa olmaksızın geç spermatidler varsa 8, az sayıda spermatozoa varsa 9, fazla sayıda spermatozoa görüldüğü spermatogenez varsa 10 şeklinde skorlama yapılmaktadır (Johnsen, 1970).

### **3.3. İmmunohistokimyasal analizler**

Deneydeki sol testis dokularındaki RIP1/RIPK1 (FNab07313, FineTest, China), RIP3/RIPK3 (E-AB-60962, Elabscience, USA), StAR (E-AB-15419, Elabscience, USA) ve GDNF (bs-1024R, Bioss, USA) proteinleri göstermek için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immunohistokimya uygulanmıştır. Kesitler 2-4 saat 60°C'de etüvde bekletilmiştir ve ksilende 15 dk bekletilerek deparafinize edilmiştir. Daha sonra azalan alkol serilerinden önce 3 x %100 alkolde 5'er dk daha sonra %96, %80, %70 ve %50 alkol serilerinde de 5'er dk bekletilerek rehidrate edildikten sonra distile su ile 3 defa yıkanmıştır. Daha sonra antijen retrieval için 5 dakika mikrodalgada 600W da %5 sitrat buffer ile muamele edilmiştir. Fosfat tamponu (PBS) ile iki defa 5'er dakika yıkanan kesitlere 13 dakika %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) uygulanmıştır. Sonrasında 3 defa 5'er dk PBS ile yıkanan kesitlere boyama aşamasında boyama (TA-125-HDX, Thermo Scientific, USA) kitinde bulunan normal serum 8 dakikada uygulanmıştır. Antikor uygulaması firma tarafından önerilen sulandırılmalarda primer antikor damlatılıp 1 gece +4 °C'de buzdolabında bekledikten sonra ertesi gün oda sıcaklığına alınarak 30 dakika beklenilmiştir. Daha sonra PBS ile 3 defa 5'er dk yıkanarak biotinize sekonder antikor uygulanmıştır. Daha sonra 15 dk içinde AB enzim reagent (Avidin Biotin HRP) uygulanan kesitler PBS ile tekrar 3 defa 5'er dk yıkandıktan sonra kit prosedürüne uygun olarak hazırlanan DAB (TL-125-HD, Thermo Scientific, USA) kromojeni 1-10 dakikada uygulanmıştır. Distile su ile yıkanan kesitlere Gill hematoksilen ile 5 dk zıt boyama yapıldıktan sonra 5 dk boyunca musluk suyuyla yıkanmıştır ve sonrasında

distile sudan geçirilmiştir. Artan alkol serilerinin %70, %80, %96, ve 3 x %100 her birinden 5'er dk geçirilmiştir. Daha sonra ksilen serilerinden de 5'er dk geçirilerek entellan ile kapatılmıştır. Negatif kontrol için PBS kullanıldı. Işık mikroskobunda incelemesi yapılmıştır. Her gruba ait her dokudan 10 alan olacak şekilde resimler çekilerek bu resimlerden her grup için toplam 100 alan Image-J program ile ölçülerek istatistiksel analizi yapılmıştır.

### **3.4. mRNA Gen Ekspresyon Analizi**

Gruplardaki hayvanlardan alınan testis dokuları metabolizmasında rol oynayan RIPK1/RIP1 ve RIPK3/RIP3 genlerinin ekspresyonunun belirlenmesi için önce testis dokularından RNA, izole edilen total RNA'lardan cDNA sentezi daha sonra Real-time da PCR yapılmıştır.

#### **3.4.1. Testis Dokusundan RNA İzolasyonu**

Her gruptan alınan ve tek tek parafin bloklanan dokulardan mikrotom cihazı ile kesit alındı. Parafin bloklardan alınan kesitler 2 ml 'lik eppendorf tüpe alındı. Alınan doku örnekleri 1000 µl ksilol ile yıkanarak 55 °C olan çalkalayıcı inkübatörde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sırasında aralıklı olarak vortekslendi. İnkübasyon bitiminde doku örnekleri 16.000 g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Dipte kalan pellete dokunmadan üstte kalan süpernatant kısım pipetle alındı. Pellete 800 µl ksilol eklenerek 15-20 dakika vortekslendi. Vorteksleme bitince 55 °C çalkalayıcı inkübatörde deparafinizasyon işlemi için gerekli olan inkübasyon sağlandı. İnkübasyon sonrasında 2 dakika 16.000 g 'de santrifüj yapıldı. Pellet dipte kalacak şekilde süpernatantdan tüpte 0.5 ml kısmına kadar pipetle alındı. Kalan üzerine tüpe 500 µl saf etanol eklemesi yapıldı. Etanol eklendikten sonra doku örnekleri 2 dakika 16.000 g'de santrifüj edildi. Daha sonra pellete dokunmadan süpernatant alındı kalan üzerine 1000 µl saf etanol eklendi ve tekrar 16.000 g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant dikkatli bir şekilde pipetle alındı. Santrifüj işlemi pellet dipte hareket etmeyene kadar tekrarlanmalıdır. Doku üzerine eklemeye yapılan etanolü uzaklaştırmak için dokular 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Pelletin tamamen kurumasına dikkat edildi. Pellet kuruduktan sonra üzerine 100 µl Tissue Lysis Buffer, 16 µl SDS (%10), 50 µl Proteinaz K mix olarak hazırlanarak eklendi. Kapak üzerine parafilm kapatılarak açılmaması sağlandı. 85 °C 'de 1 saat inkübe edildi. Aralıklı olarak vortekslendi. Daha sonra tüpler oda sıcaklığına

alınarak 55 °C 'ye soğuması beklendi. Aynı anda tüp içerisine 80 µl Proteinaz K eklendi. 55 °C 'de 1 saat inkübe edildi ve ara sıra vortekslendi. İnkübasyon bitiminde şeffaf hale gelen lizat üzerine 325 µl RNA Binding Buffer ve 325 µl absöüt etanol eklendi. Doku örnekleri vortekslendikten sonra dikkatlice alınan lizatın tamamı HPF tüplerine konuldu ve 6000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında kolon temiz bir 2 ml 'lik toplama tüpüne alınarak 14.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. (total RNA kolona tutunduğu için diğere hücre lizatları toplama tüpüne geçmektedir.) HPF tüpte bulunan filtre üzerine 100 µl DNaz-1 eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. HPF kolon üzerine 500 µl Wash Buffer-1 eklenerek 1 dakika 6000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpü yenisi ile değiştirildikten sonra filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer-II eklenerek 6000 g' de 1 dakika santrifüj yapıldı ve iki kere tekrarlandı. Toplama tüpünün değiştirilmesinden sonra örneklerin kuruması için 2 dakika 16.000 g'de santrifüj yapıldı. Kolon temiz eppendorf tüplerin üzerine alınarak yıkama işlemleri ardından kolonda tutulmuş RNA üzerine 25-50 µl Elution Buffer eklenerek oda sıcaklığında 1-5 dk bekletildi. Daha sonra 2 dakika 6000 g'de santrifüj edildi. Kolon içerisindeki süzölen RNA artık eppendorf içine alınmıştır. RNA konsantrasyonları nanodropta ölçölererek -80 °C' ye kaldırıldı.

#### **3.4.2. cDNA sentezi**

-80 °C'de muhafaza edilen RNA'lar mRNA cDNA sentezinde kullanılmıştır. cDNA sentezi için, RT2 First Strand Kit (ref#330404, Qiagen, United States) kullanılmıştır. Kitin kendi protokolü uyarınca işlemler sırasıyla uygulanmıştır. RNA'lar final konsantrasyonları mikrolitresinde 400 ng olacak şekilde dilue edilmiştir ve Buffer GE ve kalıp RNA karışımı PCR tüplerinde hazırlanmıştır.

1 reaksiyona gerekli olan genomik DNA eliminasyonu için kalıp RNA'dan 8 µl ve Buffer GE'den 2 µl toplamda 10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

RNA -Buffer GE karışımı DNA'yı elimine etmek için 42°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir, sonra da tüpler hemen buz üzerine alınıp 1 dakika soğutulmuştur. RNA-Buffer GE karışımına revers transkripsiyon için kalan bileşenler 5xBuffer BC3 (4µl), Control P2 (1µl), RE3 Reverse Transcriptase Mix (2µl) ve Su (3µl) olarak toplam hacim 10 µl olacak şekilde eklenmiştir.

Tüpler PCR cihazında 15 dakika 42°C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında Revers Transkriptaz Enzimini inhibe etmek için 5 dakika 95°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler uygun koşullarda saklanmıştır.

### 3.4.3. Real-Time PCR analizi

Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) analizinde kullanılmak üzere her bir örneğin cDNA'ları 1:5 oranında dilüe edilmiştir. Hedef genlerin ifadesini belirlemek için farklı dokularda da ifadesinin değişmediği bilinen referans gen olan Beta-Aktin primerleri kullanılmıştır. RT<sup>2</sup> SYBR-Green qPCR mastermiks (Ref# 330502, Qiagen United States) kullanılarak önerilen protokollere uygun olarak RT<sup>2</sup> SYBR qPCR Mastermix (12,5µl), Primer-10pmol (1 µl), Su (6,5µl) ve cDNA (5µl) toplam 25 µl olacak şekilde Real-Time PCR yapılmıştır. Her bir çalışmada 1 adet negatif kontrol kullanılmıştır. LightCycler 480 II (Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, İsviçre) cihazında 95 °C 10 dakika, 95 °C'de 15 saniye, 60°C'de 30 saniye olacak şekilde 40 döngü olarak PCR termal reaksiyon şartları ile ekspresyon gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan primer oligonükleotidleri (Makrogen) HPLC yöntemi ile saflaştırılmış olarak liyofilize şekilde üretici firma tarafından temin edilmiştir. Liyofilize gelen primerler firmanın gönderdiği konsantrasyon bilgisine göre son konsantrasyonu 100 pmol/µl olacak şekilde; DNase ve RNase içermeyen steril distile su eklenerek çözülmüştür. Sulandırılan primer stokları Real Time-PCR'da kullanılmak için distile su ile 10 pmol/µl olacak şekilde 1:10 oranında dilüe edilmiştir.

Her örnek iki kez çalışılmıştır. Real Time PCR'de Ct değerlerinin elde edilmesi için Sybrgreen deteksiyon metodu kullanılmıştır. Ct gerçek zamanlı PCR yönteminde önemli değişkendir. Ct değeri örnekte ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Çalışılan örneklerde hem hedef genin hemde referans geninin Ct değerleri elde edilmiştir. Elde edilen CT değerleri delta-delta CT ( $\Delta\Delta CT$ ) yöntemi ile hesaplanmıştır. Hesaplanan veriler normalize edilmiştir. Uygun istatistiksel yöntem ile sonuçlar değerlendirilmiştir.

Hedef genler RIPK1/RIP1, RIPK3/RIP3 ve referans genin (Beta Aktin) optimizasyonu tamamlanmıştır ve hem Beta Aktin geninin hemde RIPK1/RIP1, RIPK3/RIP3 genlerinin CT değerleri elde edilmiştir. Bu değerler  $\Delta\Delta CT$  yöntemi ile analiz edilerek

RIPK1/RIP1, RIPK3/RIP3 genlerinin ekspresyon değerleri sonuaları örneklerin bulunduğu gruplara göre istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Ekspresyon çalışmasında kullanılan primer genlerin numaraları ise Beta Aktin-numarası PPR06570C, RIPK1-numarası PPR64906B-200 ve RIPK3-numarası PPR43779A-200'dir.

### **3.5. Biyokimyasal analizler**

Testis dokusu çıkarılan deneklerin yaşamlarına son verildikten sonra alınan kanlar tp içerisine alındı ve 5000 rpm de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen serumlarda testosteron, LH ve FSH seviyeleri lld. Sıçanlardan alınan sol testisin kk bir kısmı buz altında homojenizatör ile homojenize edildi. +4 C 'de 10000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek üstte kalan kısım başka bir eppendorf tüpe alındı ve -80 C 'de saklandı. Testis dokusu homojenatlarından ABP, total oksidan (TOS) ve total antioksidan statüler (TAS) değerlendirildi.

#### **3.5.1. ELİSA Yöntemi ile Testosteron, LH ve FSH Seviyelerinin Belirlenmesi**

Hayvanlardan alınan kanlardan santrifüj edilerek elde edilen kan serumlarında testosteron (201-11-0260, Sun Red Biotechnology, China), LH (201-11-0180, Sun Red Biotechnology, China) ve FSH (201-11-0183, Sun Red Biotechnology, China) parametreleri incelenmek üzere eppendorf tüpe alınarak -80C 'de muhafaza edildi. Bu hormonlar için uygun sıçan ELISA kitleri kullanılmış olup prosedür üretici firmanın direktiflerine göre gerçekleştirilmiştir. Tüm rnekler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Standartlar kit protokolünde belirtildiği şekilde hazırlandı. Standart kuyucuklarına 50 l, örnek kuyucuklarına ise 40 l serum rneği eklendi. Standartlar kuyucuğu hariç her kuyucuğa 10 l antibody eklenerek 1 saat 37C'de inkübe edildi. Tüm kuyucuklar yıkama cihazı aracılığıyla 3 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 50 l kromojen A ve 50 l kromojen B eklendi ve 10 dakika 37 C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 l stop solüsyonu eklendi. Serum ABP miktarları ELISA Reader cihazı aracılığıyla 450 nm'de lld. Sonuçlar bilgisayara aktarıldı ve kaydedildi.

### **3.5.2. ELISA Yöntemi ile Testis Homojenatından ABP Seviyesinin Belirlenmesi**

Deney hayvanlarından alınan sol testis homojenatından ELISA yöntemi ile ABP seviyesinin tayini yapıldı. Doku örnekleri üzerinde satın alınan Rat ABP Kitinin (201-11-5077, Sun Red Biotechnology, China) protokolü uygulandı. Daha sonra ELISA Reader cihazı ile doku homojenatında ABP seviyesi ng/ml olarak ölçüldü ve kaydedildi.

### **3.5.3. ELISA Yöntemi ile Testis Homojenatından TAS ve TOS Seviyelerinin Belirlenmesi**

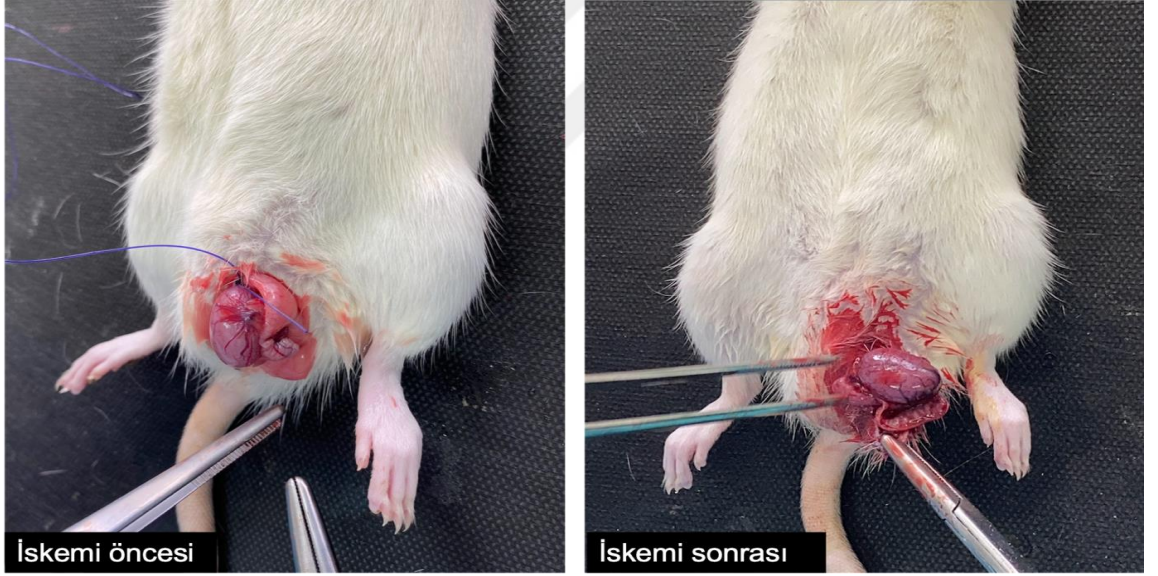
Hayvanlar alınan sol testis homojenatından ELISA yöntemi ile TOS ve TAS seviyelerinin ölçümü yapıldı. Dokular üzerinde satın alınan Rat TOS Kitlerinin (E-BC-K802-M, Elabscience, USA) ve TAS (E-BC-K801-M, Elabscience, USA) protokolü uygulandı. ELISA Reader cihazı ile doku homojenatında TAS ve TOS seviyeleri ölçüldü ve kaydedildi. ELISA (Elabscience marka) protokolüne göre; tüm örnekler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi ve standartlar kit protokolünde belirtildiği şekilde hazırlandı. Standart kuyucuklarına 10 µl, örnek kuyucuklarına ise 10 µl doku homojenatı örneği eklendi. Her kuyucuğa 200 µl Reagent 1 solüsyonu eklendi. ELISA Reader cihazı aracılığıyla TOS 590 nm'de, TAS 660 nm'de olacak şekilde ölçüldü. Sonuçlar kaydedildi. Her bir kuyucuğa 20 µl Reagent 2 solüsyonu eklendi ve 37°C'de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ELISA Reader cihazı aracılığıyla TAS 660 nm'de, TOS 590 nm'de ikinci defa ölçüldü ve sonuçlar kaydedildi.

### **3.6. İstatistiksel değerlendirme**

Bu projede gerçekleştirilen tüm istatistiksel analizler GraphadPrism 10 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm verilerin normal dağılım gösterip göstermediği D'Agustino&Pearson normallik testi ile belirlenmiştir. Normal dağılım gösteren verilerin analizi One-way ANOVA testi ile gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi için Tukey's post-hoc testi kullanılmıştır. Non-parametrik verilerin analizleri için median minimum-maksimum değerleri ve Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Bu verilerin gruplar arası istatistiksel farklılıklarının belirlenmesi için Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Analizlerde  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

Çalışmamızda tüm gruplara ait sol testis torsiyon/detorsiyonuna bağlı iskemi/reperfüzyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğine ait resimler gösterilmektedir. İskemi öncesinde testis açık renkli, parlak bir görünüme sahip iken reperfüzyon için açıldığında koyu mor renkte bir görünüme sahip olduğu gözlenmiştir. İskemi öncesi ve sonrasına ait görüntüler Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** Deneyel iskemi/reperfüzyonun oluşturulmasına ait resimler. İskemi öncesine ait resimde testis daha açık renkli gözlenirken, iskemi süresi dolduğunda reperfüze edilecek testisin daha koyu renge sahip olduğu görülmektedir.

### 4.1. Hayvan ağırlıkları ve testis ağırlıklarının belirlenmesi

Deney gruplarına dahil edilecek hayvanların ağırlıkları kaydedilerek bir araya getirildi ve gruplar rastgele olacak şekilde oluşturulmuştur. Deney başlangıcında kaydedilen hayvan ağırlıklarının istatistiksel analizi gerçekleştirildiğinde grupların normal dağıldığı tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre deney grupları arasında

anlamli bir fark gözlenmemiştir. Deney sonlandırılmadan önce hayvanların ağırlıkları tekrar tartılarak kaydedilmiştir. Deney sonu hayvan ağırlıklarının istatistiksel analizinde de başlangıç ağırlıklarına kıyasla deney gruplarında azalma ve artışın olduğu tespit edilmesine rağmen, gruplar arasında istatistiksel yönden anlamli bir fark gözlenmemiştir. Deney başlangıcı ve sonuna ait hayvanların ağırlıkları istatistiksel sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Deney gruplarına ait deney başlangıcı ve deney sonu hayvan ağırlıklarının ölçüm sonuçları. Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon.

	Kontrol	İ/R	THQ	İ/R+THQ	<i>p</i>
<b>Deney başlangıcı hayvan ağırlıkları (gr)</b>	267.4±14.9	243.4±37.17	233.3±26.7	251±36.6	0.0982
<b>Deney sonu hayvan ağırlıkları (gr)</b>	255.3±37.7	238.4±27.7	238.7±28.1	242.1±34.9	0.6177

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli bir fark bulunmamıştır. *P* <0.05 anlamli olarak kabul edilmiştir.

Deney sonlandırılırken hayvanlardan alınan sol ve sağ testisler hassas terazi de tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir. Deney gruplarına ait testis ağırlıklarının istatistiksel sonuçlarına göre deney prosedürü uygulanan sol testis ağırlığında Kontrol grubuna kıyasla İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamli azalmanın olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli bir farklılık bulunmamaktadır. Sonuçlarımıza göre, sağ testis ağırlıklarında deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamli bir farklılık olmadığı belirlenmiştir (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** Deney gruplarına ait sol testis ve sağ testis ağırlıklarının ölçüm sonuçları. Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon.

	Kontrol	İ/R	THQ	İ/R+THQ	<i>p</i>
<b>Sol testis ağırlığı (gr)</b>	1.32±0.17 <sup>a</sup>	1.007±0.28 <sup>bc</sup>	1.25±0.07 <sup>ac</sup>	1.03±0.35 <sup>ac</sup>	0.9537
<b>Sağ testis ağırlığı (gr)</b>	1.32±0.18 <sup>a</sup>	1.32±0.11 <sup>a</sup>	1.26±0.07 <sup>a</sup>	1.36±0.11 <sup>a</sup>	0.5337

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı harfi ifade eden (a,b,c) gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. *p* <0.05 anlamli olarak kabul edilmiştir.

## 4.2. Spermioqram bulguları

Deney sonunda sperm sayımı yapılarak sperm hareketleri yönünden değerlendirilmiştir. Kontrol ve THQ grupları birbirine benzer sonuç gösterirken, bu gruplara kıyasla İ/R ve İ/R+THQ gruplarında sperm sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Sperm hareketliliği de değerlendirilmeye alınmıştır. Kontrol ve THQ gruplarına ait sperm hareketliliği değerlendirildiğinde bu gruplarda çoğunlukla ileri hareket eden spermelerin olduğu gözlenirken, İ/R grubunda daha çok yerinde hareketli spermelerin olduğu daha az sayıda ise hareketsiz spermelerin olduğu gözlenmiştir. İ/R+THQ grubunda da hareketsiz, yerinde hareketli ve ileri hareketli spermelerin olduğu gözlenmiştir. Sperm sayısına ilişkin yapılan spermioqram analizinin gruplar arası istatistiksel farklılıkları Tablo 4.3.'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.** Deney gruplarına ait spermioqram analizi sonuçları. Tabloda verilen sperm sayıları  $\times 10^6$  olacak şekilde hesaplanmıştır. Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon.

	Kontrol	İ/R	THQ	İ/R+THQ	<i>p</i>
<b>Spermioqram</b>	27.5±12.09 <sup>a</sup>	8.6±5.06 <sup>b</sup>	36.8±25.9 <sup>a</sup>	8.7±5.8 <sup>b</sup>	0.0001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı harfi ifade eden (a,b,c) gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. *P* <0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## 4.3. Histolojik bulgular

Deney gruplarına ait testis dokusu kesitlerinde tübül değerlendirme için JTB skoru uygulanırken doku aynı zamanda interstisyel ödem, ödemli tübül ve atrofik tübül sayısı bakımından skorlanarak değerlendirmeye alınmıştır. JTBS ile histopatolojik değerlendirme Şekil.4.2'de, skorlamaya ait veriler ise Tablo.4.4' de gösterilmiştir.

Kontrol ve THQ gruplarına ait kesitlerde testis seminifer tübül yapısı, spermatojenik hücre serileri, intertübül bağ dokusu ve hücreleri bakımından düzenli bir histolojik görünüme sahip olduğu belirlenmiştir.

İ/R grubu testis doku kesitlerinde JTBS skoru istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Bu gruba ait kesitlerde çoğunlukla seminifer tübül epitelinde dökülmeler

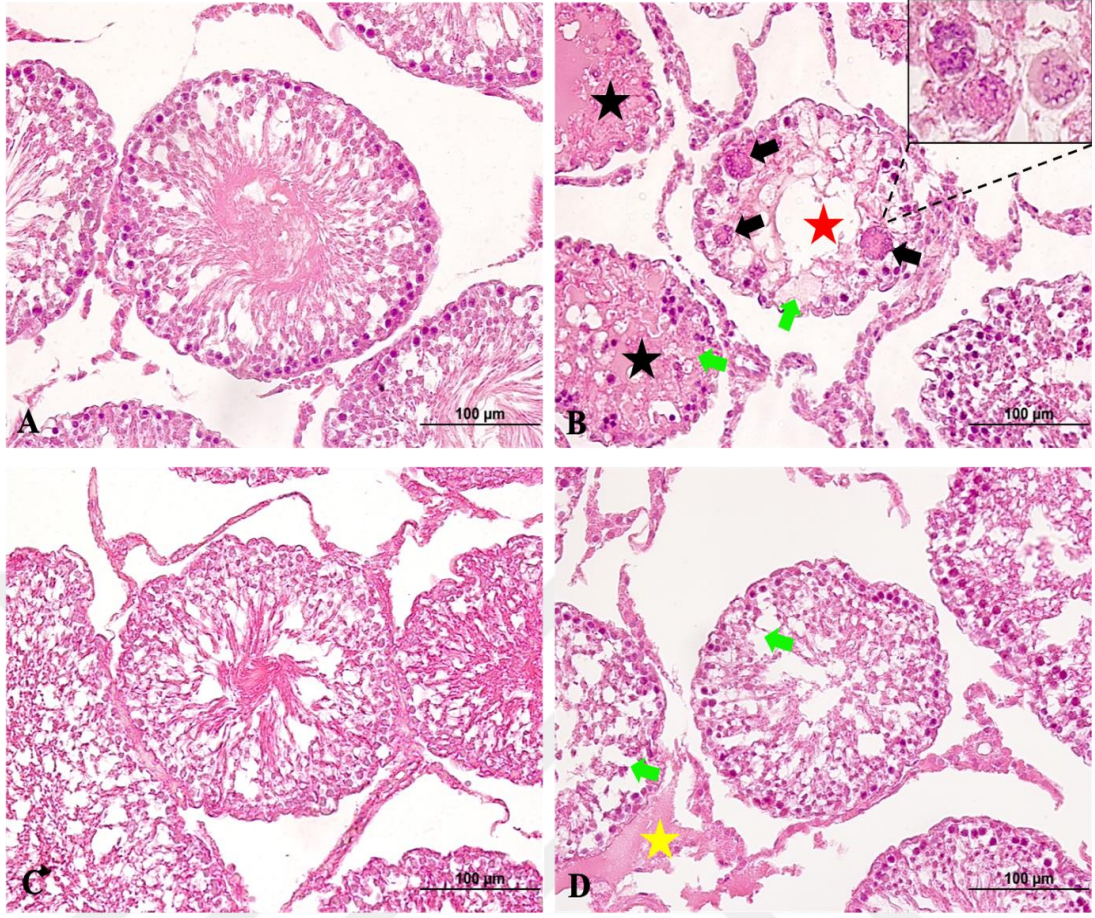
olduğu, daha az dökülme görülen tübüllerin hücreleri arasında geniş vakuolizasyon benzeri boşlukların yer aldığı, intertübüler bağ dokusunda ise disorganizasyon gözlemlendi. İnterstisyel ödem, ödemli tübül ve atrofik tübül sayısı da yapılan Kruskal Wallis analizi sonuçlarına göre İ/R grubunda diğer gruplara göre daha yüksek sayıda olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu gruba ait deney hayvanlarının dört tanesinde multinuklear dev hücrelerin varlığı da tespit edilmiştir. Bu hücreler bazı seminifer tübüllerde bir adet yer alırken bazı tübüllerde sayısının birden fazla olduğu da gözlemlenmiştir.

İ/R+THQ grubunda ise JTBS skoru İ/R grubuna kıyasla artış gösterirken, Kontrol ve THQ grubundan daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu gruba ait seminifer tübüllerde dökülmelerin daha az olduğu, seminifer epitel arasında görülen boşlukların da azaldığı belirlenmiştir. Aynı zamanda interstisyel ödem, ödemli tübül ve atrofik tübül sayısının da I/R grubuna kıyasla azaldığı belirlenmiştir.

**Tablo 4.4.** Deney gruplarına ait JTBS skoru, interstisyel ödem, ödemli tübül ve atrofik tübül sayısı ölçüm sonuçları. Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, JTBS; Johnsen's testiküler biyopsi skoru.

	<b>Kontrol</b>	<b>İ/R</b>	<b>THQ</b>	<b>İ/R+THQ</b>	<b>p</b>
<b>JTBS</b>	7,08±1,1 <sup>a</sup>	4,1±2,1 <sup>b</sup>	7,1±1,3 <sup>a</sup>	5,9±2,09 <sup>c</sup>	0.0001
<b>İnterstisyel ödem</b>	0(0-1) <sup>a</sup>	1(0-3) <sup>b</sup>	0(0-1) <sup>a</sup>	1(0-3) <sup>c</sup>	0.0001
<b>Ödemli tübül sayısı</b>	0(0-1) <sup>a</sup>	0(0-3) <sup>b</sup>	0(0-1) <sup>a</sup>	0(0-2) <sup>c</sup>	0.0001
<b>Atrofik tübül sayısı</b>	0(0-1) <sup>a</sup>	0(0-2) <sup>b</sup>	0(0-1) <sup>a</sup>	0(0-2) <sup>b</sup>	0.0001

Normal dağılım gösteren veriler ortalama±standart sapma, normal dağılım göstermeyen veriler median(minimum-maksimum) olarak ifade edilmiştir. Aynı harfleri gösteren gruplar (a, b, c) arasında anlamlı fark bulunmaz, farklı harfler içeren gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunur. P <0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.



**Şekil 4.2.** Deney gruplarına ait H-E boyamaları. (A) Kontrol ve (C) THQ gruplarına ait testis doku kesitleri seminifer tübül yapısı ve interstisyel bağ dokusu bakımından düzenli histolojik görünümüne sahiptir. (B) İ/R grubu testis doku kesitlerinde ödemli tübül (siyah yıldız), atrofik tübül (kırmızı yıldız), multinükleer dev hücreler (siyah oklar), düzensiz hasarlı seminifer epitel (yeşil ok) gösterilmiştir. (D) İ/R+THQ grubunda düzensiz hasarlı seminifer epitel (yeşil ok) ve intertübüler bağ dokusunda ödem (sarı yıldız) gösterilmiştir. Resimler 40x objektif (skala bar:100µm) olarak gösterilmiştir. Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon.

Testis dokusuna ait yapılan H-E boyamalara ait görüntülerden seminifer epitel kalınlığı, seminifer tübül çapı ve seminifer tübül lümen çapı ölçümü gerçekleştirilmiştir. Sonuçlarımıza göre, seminifer tübül epitel kalınlığı Kontrol ve THQ gruplarında benzer sonuçlar göstermiştir. Kontrol grubuna kıyasla İ/R grubunda azaldığı belirlenmiştir. İ/R+THQ grubu ölçüm sonuçlarının ise Kontrol grubuna benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Seminifer tübül çapı ve lümen çapı ölçümleri istatistiksel analizi veriler normal dağılım göstermediği için Kruskal Wallis testi ile belirlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırma testi için Dunn's çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. İstatistik analizi seminifer tübül çapı ölçüm sonuçlarına göre, İ/R grubunda azalma olduğu, İ/R+THQ

grubunda ise seminifer tübül çapının İ/R grubuna kıyasla artış gösterdiği belirlenmiştir. Seminifer tübül lümen çapının İ/R grubunda azaldığı İ/R+THQ grubunda ise artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu parametrelerin deney gruplarına ait istatistiksel analiz sonuçları Tablo.4.5'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.5.** Tüm gruplara ait testis dokusu seminifer tübül epitel kalınlığı, seminifer tübül çapı ve seminifer tübül lümen çapı ( $\mu\text{m}$ ) ölçüm sonuçları. Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon.

	<b>Kontrol</b>	<b>İ/R</b>	<b>THQ</b>	<b>İ/R+THQ</b>	<b>p</b>
<b>Seminifer tübül epitel kalınlığı (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	35,5 $\pm$ 7,1 <sup>a</sup>	32,3 $\pm$ 8,6 <sup>b</sup>	34,3 $\pm$ 5,8 <sup>ab</sup>	34,9 $\pm$ 9,7 <sup>a</sup>	0.0039
<b>Seminifer tübül çapı (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	185,1(200-374,9) <sup>ab</sup>	182,7(11,7-316,7) <sup>a</sup>	187,7(117,7-404,2) <sup>ab</sup>	194(101,3-366,8) <sup>b</sup>	0.0592
<b>Seminifer tübül lümen çapı (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	97,7(59,7-212,6) <sup>a</sup>	92,7(41,5-216,7) <sup>a</sup>	104,1(68,2-194,2) <sup>b</sup>	109,3(39,8-247,8) <sup>bc</sup>	0.0001

Normal dağılım gösteren veriler ortalama $\pm$ standart sapma, normal dağılım göstermeyen veriler median (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Aynı harfleri gösteren gruplar (a, b, c) arasında anlamlı fark bulunmaz, farklı harfler içeren gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunur.

#### 4.4. Gen ekspresyonu sonuçları

Testis dokusuna ait RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 gen ekspresyonu analizi gerçekleştirildikten sonra istatistiği yapılmıştır. RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 ekspresyonlarında Kontrol ve THQ gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Kontrol ve THQ gruplarına kıyasla hem RIP1/RIPK1 hem de RIP3/RIPK3 ekspresyonunun İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı belirlenmiştir. RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 ekspresyonlarının İ/R+THQ grubunda ise İ/R grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı belirlenmiştir. Gen ekspresyonu analizine ait RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 ekspresyonlarına ait veriler Tablo.4.6'da gösterilmiştir.

**Tablo.4.6.** RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 mRNA gen ekspresyonu analizleri sonuçları. Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon.

	<b>Kontrol</b>	<b>İ/R</b>	<b>THQ</b>	<b>İ/R+THQ</b>	<b>p</b>
<b>RIP1/RIPK1 ekspresyonu</b>	7.22±9,6 <sup>a</sup>	70,4±91,1 <sup>b</sup>	1,36±2,3 <sup>a</sup>	0,10±0,1 <sup>a</sup>	0.0043
<b>RIP3/RIPK3 ekspresyonu</b>	1,54±1,6 <sup>a</sup>	25,98±23,4 <sup>b</sup>	0,93±1,1 <sup>a</sup>	0,27±0,2 <sup>a</sup>	0.0001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı harfi ifade eden (a,b) gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.

#### 4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

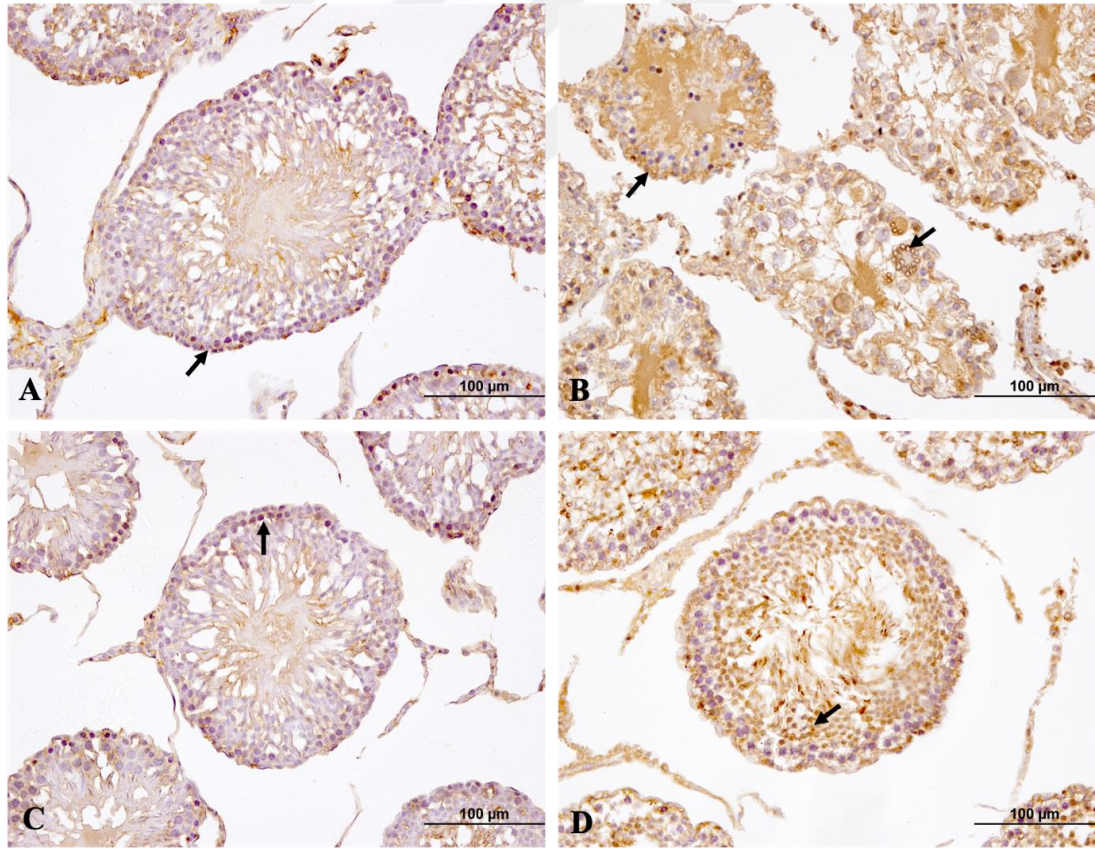
Tüm deney grupları testis dokusunda RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 immunhistokimya boyaması gerçekleştirilmiştir. Boyama sonucunda RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 ekspresyonlarının hem seminifer tübül epitelinde hem de intertübüler bağ dokusunda olduğu gözlenmiştir. RIP1/RIPK1 ekspresyonu seminifer tübül epitelinde Kontrol ve THQ gruplarında benzerlik gösterirken, İ/R grubunda istatistiksel olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. İ/R+THQ grubundaki artış ise İ/R grubuna benzer iken Kontrol ve THQ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. RIP1/RIPK1 ekspresyonu intertübüler bağ dokusunda Kontrol ve THQ grubuna kıyasla İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artmıştır. İ/R+THQ grubunda ise İ/R grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalma gösterdiği belirlenmiştir. Bu azalmanın Kontrol ve THQ grubuna istatistiksel olarak benzer olduğu belirlenmiştir.

RIP3/RIPK3 ekspresyonu seminifer tübül epitelinde Kontrol ve THQ grubuna kıyasla İ/R grubunda istatistiksel olarak artış göstermiştir. Seminifer tübül epiteli RIP3/RIPK3 ekspresyonu İ/R grubuna kıyasla İ/R+THQ grubunda azaldı fakat, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. RIP3/RIPK3 intertübüler bağ dokusu ekspresyonu Kontrol ve THQ grubuna kıyasla İ/R grubunda istatistiksel olarak artış göstermiştir. İntertübüler bağ dokusu RIP3/RIPK3 ekspresyonu İ/R grubuna kıyasla İ/R+THQ grubunda azalmış olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 hem seminifer tübül epiteli hem de intertübüler bağ dokusu ekspresyonları Tablo.4.7’de gösterilmiştir.

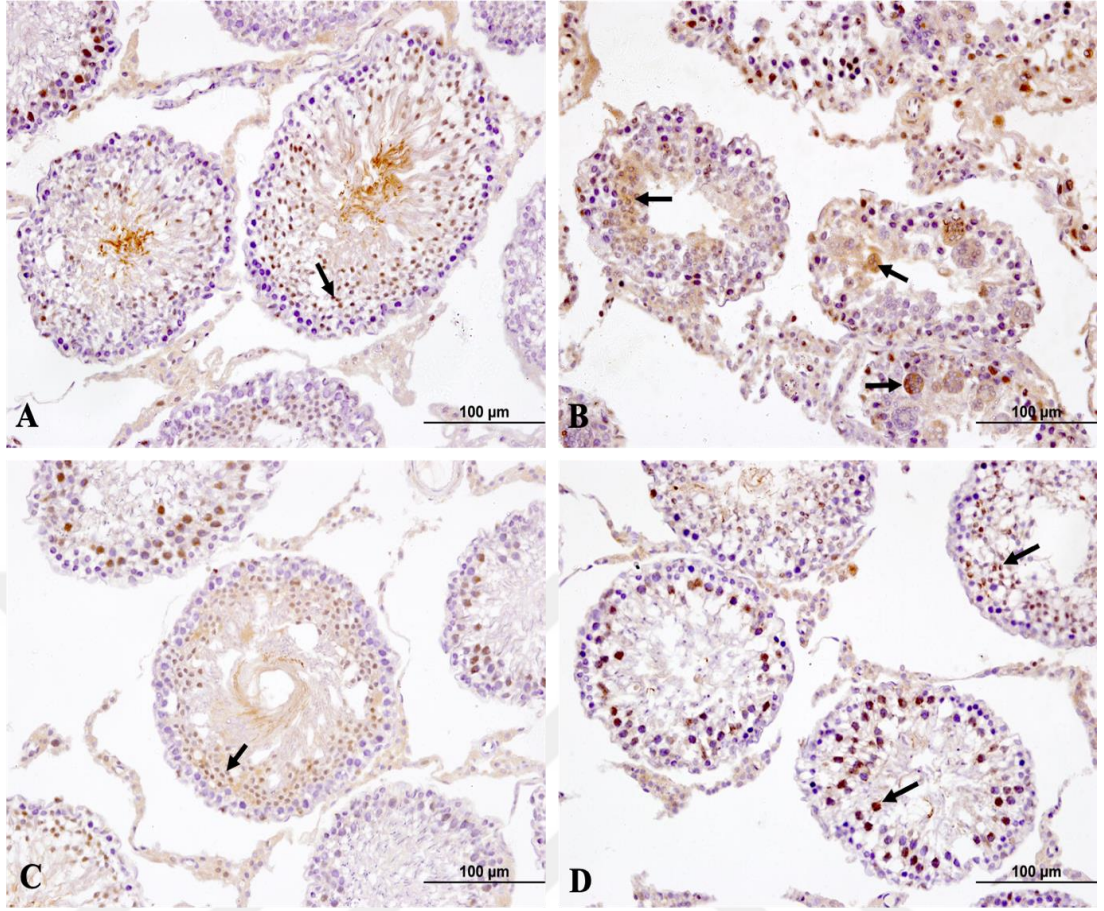
**Tablo 4.7.** Deney gruplarına ait RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK1 proteinlerine ait seminifer tübül epiteli ve intertübüler bağ dokusu immunoreaktivite ölçüm sonuçları. Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, RIP; reseptör etkileşimli kinaz.

	Kontrol	İ/R	THQ	İ/R+THQ	<i>p</i>
<b>RIP1/RIPK1 seminifer tübül epiteli</b>	89.7±6.2 <sup>a</sup>	91.7±9.3 <sup>b</sup>	87.2±5.3 <sup>a</sup>	92.8±7.1 <sup>b</sup>	0.0001
<b>RIP1/RIPK1 intertübüler bağ dokusu</b>	92.6±9.1 <sup>a</sup>	97.0±11.6 <sup>b</sup>	91.5±9.5 <sup>a</sup>	91.7±13.6 <sup>a</sup>	0.0115
<b>RIP3/RIPK3 seminifer tübül epiteli</b>	79.7±4.4 <sup>a</sup>	85.5±6.2 <sup>b</sup>	80.5±4.7 <sup>a</sup>	84.8±6.5 <sup>b</sup>	0.0001
<b>RIP3/RIPK3 intertübüler bağ dokusu</b>	79.6±7.3 <sup>a</sup>	85.7±7.5 <sup>b</sup>	81.0±6.4 <sup>a</sup>	83.9±8.3 <sup>b</sup>	0.0001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı harfi ifade eden (a,b,c) gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.



**Şekil 4.3.** Deney gruplarına ait RIP1/RIPK1 immunohistokimya boyaması. Testis dokusu kesitlerindeki seminifer epitel ve intertübüler bağ dokudaki RIP1/RIPK1 ekspresyonu siyah oklar ile gösterilmiştir. Resimler 40x objektif (skala bar:100µm). Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, RIP; reseptör etkileşimli kinaz.



**Şekil 4.4.** Deney gruplarına ait RIP3/RIPK3 immunohistokimya boyaması. Testis dokusu kesitlerindeki seminifer epitel ve intertübüler bağ dokudaki RIP3/RIPK3 ekspresyonu siyah oklar ile gösterilmiştir. Resimler 40x objektif (skala bar:100µm). Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinin, RIP; reseptör etkileşimli kinaz.

Testis dokusu kesitlerinde spermatojenik olmayan hücre serisinde de GDNF ve StAR immunohistokimya değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Sertoli hücrelerinde ekspres edilen GDNF ekspresyonu Kontrol ve THQ grubuna kıyasla İ/R grubunda azalma göstermiştir. İ/R+THQ grubunda ise GDNF ekspresyonunda artış olduğu belirlenerek bu artışın hem Kontrol hem de THQ grubuna benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

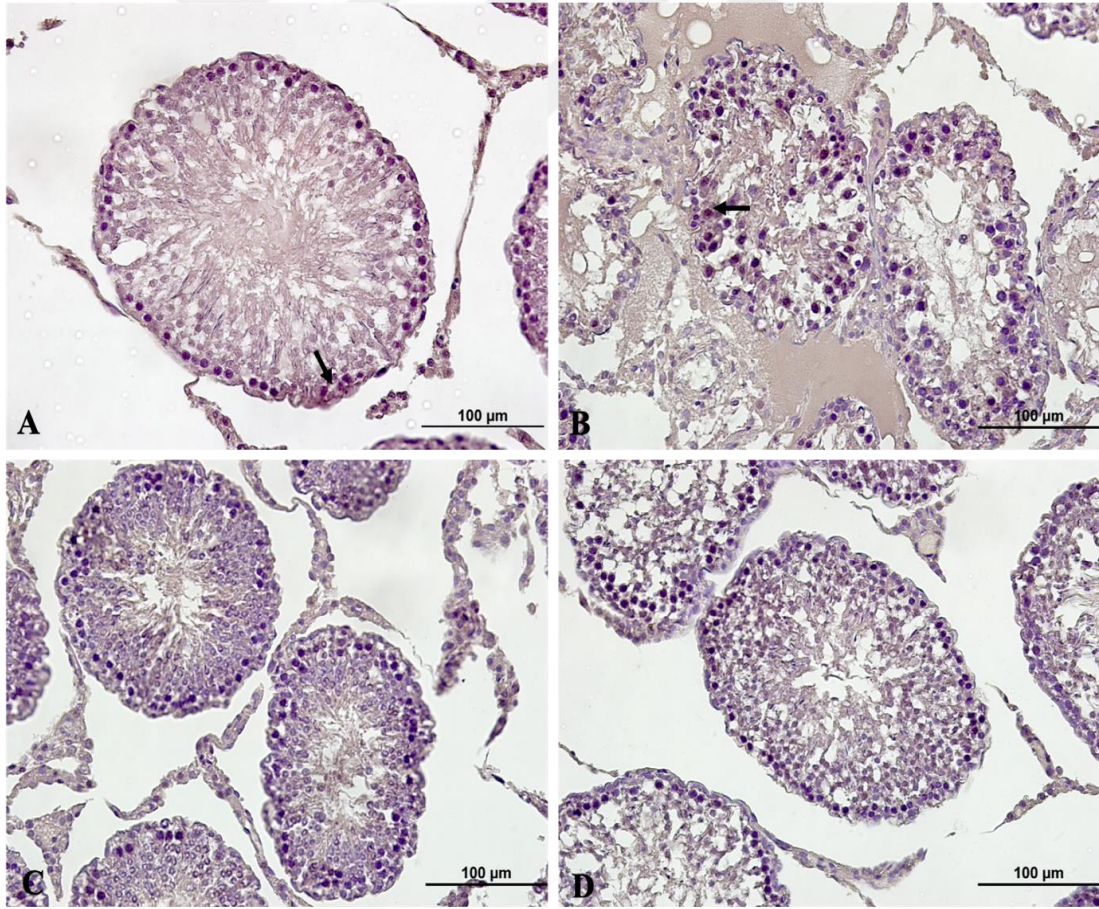
İntertübüler bağ dokusunda bulunan Leydig hücrelerinin değerlendirilmesi amacıyla StAR ekspresyonu immunohistokimyası gerçekleştirilmiştir. StAR ekspresyonunun Kontrol grubuna kıyasla diğer deney gruplarında artış gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek artışın İ/R grubunda olduğu sırasıyla İ/R+THQ ve THQ gruplarında azalma gösterdiği belirlenmiştir. GDNF ve StAR ekspresyonlarına ait ölçüm sonuçları

Tablo.4.7’de, deney gruplarının immunohistokimya boyamasına ait resimleri ise Şekil.4.5 ’te ve Şekil.4.6’da gösterilmiştir.

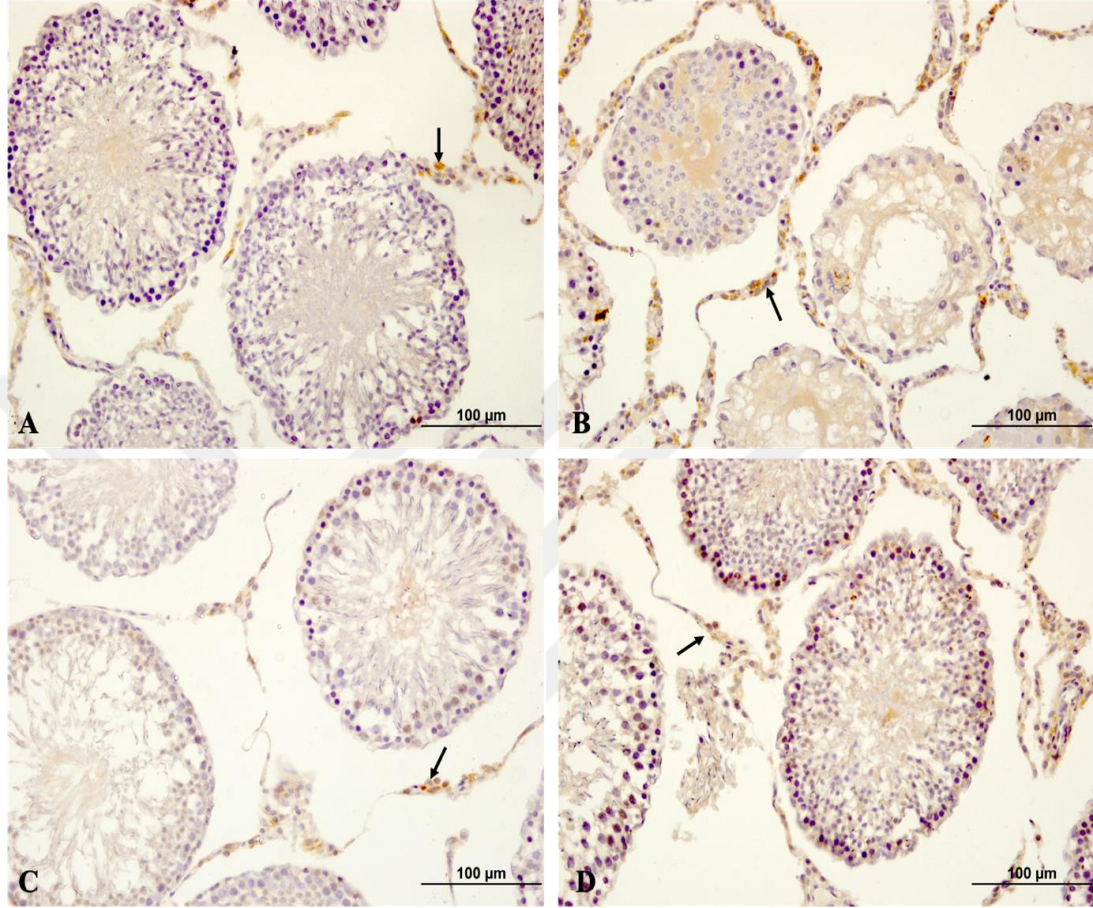
**Tablo 4.8.** Tüm gruplara ait testis dokusu GDNF ve StAR immunohistokimya ölçüm sonuçları. Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, GDNF; glial hücre türevli nörotrofik faktör, StAR; Steroidojenik akut düzenleyici protein.

	<b>Kontrol</b>	<b>İ/R</b>	<b>THQ</b>	<b>İ/R+THQ</b>	<b>p</b>
<b>GDNF seminifer tübül epiteli</b>	86,5±4,8	84,7±4,3	87,1±5,7	87,3±10,7*	0.0314
<b>StAR intertübüler bağ dokusu</b>	80,2±5,0 <sup>a</sup>	85,6±6,5 <sup>b</sup>	83,8±4,9 <sup>b</sup>	84,3±4,6 <sup>b</sup>	0.0001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. \* İ/R ile İ/R+THQ arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Aynı harfi ifade eden (a,b,c) gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.



**Şekil 4.5.** Deney gruplarına ait GDNF immunohistokimya boyaması. Testis dokusu kesitlerindeki seminifer tübül GDNF ekspresyonu siyah oklar ile gösterilmiştir. Resimler 40x objektif (skala bar:100µm). Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinin, GDNF; glial hücre türevli nörotrofik faktör.



**Şekil 4.6.** Deney gruplarına ait StAR immunohistokimya boyaması. Testis dokusu kesitlerindeki intertübüler bağ dokusundaki StAR ekspresyonu siyah oklar ile gösterilmiştir. Resimler 40x objektif (skala bar:100µm). Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinin, StAR; Steroidojenik akut düzenleyici protein.

#### 4.6. Biyokimyasal Bulgular

Tüm deney gruplarına ait kan serum örneklerinden testosteron, FSH, ve LH, doku numunelerinden ABP, TOS ve TAS analizi gerçekleştirilmiştir.

##### 4.6.1. Hormonların değerlendirilmesi

Testosteron, FSH ve LH seviyeleri kan serum örneklerinden değerlendirilmiştir. Testosteron seviyesi ise Kontrol grubuna kıyasla İ/R grubunda artış göstermiş olmasına rağmen bu artış anlamlı bulunmamıştır. THQ ve İ/R+THQ grubunda ise testosteron

seviyesinin azalmış olduğu belirlenmiştir. FSH seviyesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturacak herhangi bir azalma ya da artma göstermemiştir. LH seviyesi Kontrol grubuna kıyasla İ/R grubunda artış göstermiştir, fakat bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İ/R grubuna kıyasla THQ ve İ/R+THQ gruplarında LH seviyesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir.

ABP seviyesi testis dokusunda gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre Kontrol grubuna kıyasla İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. İ/R ile THQ ve İ/R+THQ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 4.9.** Tüm gruplara ait hormon ölçüm sonuçları. ABP testis dokusundan, FSH, LH ve testosteron kan serumundan bakılmıştır. Kısaltmalar: İ/R; iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, ABP; androjen bağlayıcı protein, FSH; folikül stimulan hormon, LH; luteinizan hormon.

	Kontrol	İ/R	THQ	İ/R+THQ	<i>p</i>
<b>Testosteron (kan) (pg/ml)</b>	222,3±33,2	281,3±102,7	243,5±93,6	253,7±82,2	0.6099
<b>FSH (kan) (IU/L)</b>	4,1±1,3	4,8±1,2	4,3±1,9	5,1±1,4	0.5859
<b>LH (kan) (mIU/ml)</b>	5,2±1,9	6,6±1,0	5,02±2,2	5,4±1,5	0.3167
<b>ABP (doku) (ng/ml)</b>	9,1±2,7	4,2±1,3**	8,6±2,1*	7,9±3,1*	0.004

Tüm veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edildi.  $p < 0,05$  anlamlı kabul edildi.\* İ/R ile THQ arasında ve İ/R ile İ/R+THQ arasında, \*\* Kontrol ile İ/R arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu gösterir. Harf bulundurmeyen gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaz.

#### 4.6.2. Total oksidan/antioksidan seviyelerinin değerlendirilmesi

Deney grupları testis dokusu TOS ve TAS ölçüm sonuçları Tablo.4.8'de verilmiştir. İstatistiksel analiz sonucuna göre TOS seviyesi Kontrol grubuna kıyasla İ/R grubunda artış göstermiş, fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Deney gruplarının tamamında TOS seviyesinde değişiklikler olduğu gözlenmiş olsa da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecek herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır. TAS seviyesi ise Kontrol grubuna kıyasla İ/R grubunda bir miktar azaldığı gözlenmiştir. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İ/R+THQ

grubunda ise TAS seviyesinin diğer deney gruplarına kıyasla artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu artış Kontrol ve İ/R grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, THQ grubuna benzer olduğu gözlenmiştir.

**Tablo 4.10.** Deney gruplarına ait Total oksidan/antioksidan seviyelerinin analizi. Kısaltmalar: İ/R;iskemi/reperfüzyon, THQ; timokinon, TOS; total oksidan statü, TAS; total antioksidan statü.

	<b>Kontrol</b>	<b>İ/R</b>	<b>THQ</b>	<b>İ/R+THQ</b>	<b><i>p</i></b>
<b>TOS (<math>\mu</math>mol) (Doku)</b>	0.35 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.28 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.0563
<b>TAS (mmol) (Doku)</b>	0.70 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.60 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.80 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>	1.003 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	0.0025

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı harfi ifade eden (a,b) gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Testis torsiyonu toplumda her yaş kesiminden erkek bireylerin yaşayabileceği ciddi bir sağlık sorunudur. Doğru zamanda tedavi edilmediği takdirde kısırlığa neden olabilecek şekilde ciddi bir testis hasarına neden olabilir. Testis torsiyonu sonucu oluşan hasarın ana nedeni İ/R kaynaklı hasardır (Çay ve ark., 2006). İ/R kaynaklı bu hasar testis dokusunda biyokimyasal ve morfolojik değişiklikleri indükleyerek hipoksiye, germinal hücre nekrozuna ve daha sonra nekroz sonucu kısırlığa sebep olabilir (Kanter, 2010, Özmerdiven, 2015). Bu çalışmada testis torsiyon ve detorsiyonuna bağlı İ/R modeli oluşturularak testis dokusunda meydana gelen değişiklikler üzerinde THQ'nun etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sıçanlarda deneysel testis torsiyonu sonrası minimum bir saatlik sürenin testis hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Kanter, 2010). Testiste tam iskemi oluşturmak amacıyla torsiyonun derecesinin 720° olmasının yeterli olduğu belirtilmektedir (Özmerdiven, 2015). Bu çalışmada da ciddi testis hasarı oluşturacak şekilde sol testisi saat yönünde 720° döndürerek iki saatlik testis torsiyonu ile iskemi modeli oluşturulmuştur. İskemi süresi bittikten sonra detorsiyon yaparak reperfüzyon işlemi gerçekleştirmiş ve bu işlemden 30 dk sonra ilk THQ uygulaması gerçekleştirilerek toplam yedi doz 10 mg/kg THQ uygulanmıştır. İ/R testis dokusu ağırlığı başta olmak üzere JTBS skorunun, testis seminifer tübül epitel kalınlığı, seminifer tübül çapı ve lümen çapının azalmasına neden olmuştur. Seminifer tübül epitelinin dökülmesi sonucunda lümenin genişleyeceği kanısının aksine seminifer tübül çapının da küçülmesi tübüllerin toplam hacminde bir azalmanın meydana geldiğini düşündürmektedir. Yapılan spermiyogram analizi sonucuna göre de İ/R grubunda sperm sayısı, canlılık ve hareketliliğinde önemli ölçüde azalmanın olduğu tespit edilmiştir. İ/R sonrası THQ uyguladığımız grupta ise başta seminifer tübül epitel kalınlığı, seminifer tübül çapı ve lümen çapı olmak üzere testis yapısının düzelmeye başladığı, JTB

skorunda artışa neden olduğu gözlenmiştir. Işık mikroskopik histolojik bulguların yanı sıra spermiyogram analizi sonuçlarında İ/R+THQ grubunda iyileşmenin istenilen düzeyde olmadığı tespit edilmiştir. Bu durumun muhtemelen sağlıklı sperm üretimi için gerekli sürenin sağlanmadan sıçanların hayatlarına son verilmesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Sağ ve sol testise ayrı ayrı yapılan İ/R sonrasında JTB skorunun azaldığı, sperm sayısının düştüğü bilinmektedir (Köksal, 2012). Çünkü İ/R sonrasında seminifer tübül çapı azalmasına paralel bir şekilde lümeneye dökülen germ hücre sayısı ve dejenere hücre sayısında, dev hücre varlığında artış olmaktadır (Erdoğan, 2018). Sisplatin kaynaklı testis hasarı sonrasında aşırı ROS üretimine bağlı hücrelerde DNA kırıklarının olduğu, kontrolsüz bu ROS üretiminin sperm üretimine ve dolayısıyla testis fonksiyon bozukluğuna neden olarak seminifer tübüllerde nekroz belirtisi olarak kabul edilen multinükleuslu dev hücrelerin gözlemlendiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2020). Çalışmamızdaki İ/R grubunun dört deneğine ait preparatlarda bu hücelere rastlanmıştır. Bu hücrelerin çoğunlukla seminifer tübüllerin lümeninde çok çekirdekli ve oldukça büyük bir çapa sahip olduğu gözlenmiştir. Bu hücrelerin varlığı bize İ/R grubunda moleküler düzeyde göstermeyi hedeflediğimiz nekrozun dokuda ciddi boyutta gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Ayrıca bu durum İ/R'nun önemli ölçüde ROS üretimine neden olduğunun bir işareti olarak kabul edilebilir. İ/R'nun ayrıca testis dokusunda konjestiyone damar yapıları, seminifer tübüllerde ödem ve yapısal bozukluklara neden olarak nekroza yol açabileceği gösterilmiş olsa da bunlar nekroza spesifik belirteçlerle gösterilmemiştir (Chi ve ark., 2016, Polat, 2017). Çalışmamızda İ/R+THQ grubuna ait kesitlerde ise bu hücelere rastlanmamıştır. THQ'nun oksidatif stresi engelleyici etkisinin olduğunu testis endokrin ve antioksidan sistemlerini aktive ederek dokuyu iyileştirebileceği kanıtlanmıştır (Kaçar, 2020, Sayed ve ark., 2014). ROS metabolizma sırasında üretilen, hücre fonksiyonunun bir parçasıdır ve zararlı etkilerini azaltan hücre içi mekanizmalar sayesinde genellikle kontrol altında tutulur. Antioksidanlar, ROS'un zararlı etkilerini hafifletmekte, toksisiteye ve hastalığa katkıda bulunan olayları bozabilmekte ya da tersine çevirebilmektedir (Trouba, 2002). İ/R+THQ grubunda bu multinükleuslu dev hücrelerin gözlenmemesindeki etkenin THQ'nun ROS'u düzenlemesinden kaynaklandığı sonucuna varılabilir.

Testis torsiyonu sonucu gelişen doku hasarının temelinde yatan oksidatif stres dokuda çeşitli mekanizmaların tetiklenmesine sebep olmakta ve hücrenin fonksiyon

bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır. Hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları gibi ROS'ların kromozomal DNA'ya ve diğer hücrel bileşenlere zarar vererek DNA bozulmasına, protein denatürasyonuna, lipid peroksidasyonuna yol açarak apoptoz ve nekroz gibi hücre ölüm mekanizmalarını tetiklemektedir (Higuchi, 2003). Bu hücre ölümlerinden nekroz pasif bir süreç olarak bilinse de hücrede homeostaz kaybından kaynaklanan kontrolsüz bir olaydır. Hücre ve organel şişmesi ile karakterize olan bu süreçte hücre içeriğinin hücre dışı ortama yayılması komşu dokularda olumsuz etkilere sebep olabilir (D'Arcy, 2019). Son yıllarda dokuda nekroz özellikleri gösteren fakat önceki gözlemlerin aksine düzenlenmiş bir mekanizmaya sahip nekroptoz adı verilen hücre ölüm biçimi tanımlanmıştır (Degretev, 2005). Nekroptoz terimi ile artık kazara ölüm yerine hücrede apoptozdan farklı programlanmış bir hücre ölüm biçimini temsil etmektedir (Nikoletopoulou, 2013). Reseptörle etkileşimli protein (RIP) kinazları nekrozun oluşum yolunda önemli bir rol oynamaktadır. Bunlar ölüm reseptörü ligandları tarafından aktive edildiğinde RIP1 ve RIP3 birleşerek bir kompleks oluşturur ve bu sonraki nekroz süreçlerinin aktivasyonuna yol açar. Dolayısıyla RIP3/RIPK3 varlığı ölüm reseptörü aracılı nekroz için bir başlatma adımı olarak kabul edilmektedir (Xu T, 2018). Aksine RIP1/RIPK1 ise ölüm reseptörü TNF ile indüklenen bir mekanizmayla kaspazdan bağımsız apoptoza neden olmaktadır. Dolayısıyla bu nekroz/nekroptoz yolunun temel düzenleyicisi RIP1-RIP3 kompleksinin oluşumunun tetiklenmesine neden olan RIP3/RIPK3 varlığıdır (Pasparakis M, 2015). Bu çalışmada İ/R kaynaklı testis dokusunda meydana gelen nekroz bu belirteçlerin hem gen seviyesinde hem de immunohistokimyasal olarak gösterilmesiyle de protein seviyesinde belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonuçlarımıza göre hem RIP1/RIPK1 mRNA gen ekspresyonu hem de RIP3/RIPK3 mRNA gen ekspresyonu İ/R grubunda oldukça şiddetli bir biçimde artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu artış aynı grupta RIP3/RIPK3 ekspresyonuna kıyasla RIP1/RIPK1 ekspresyonundan daha fazla olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum dokuda nekrozun şiddetli olduğunu gösterirken aynı zamanda ölüm reseptörü ilişkili apoptozun da hücrede tetiklenebileceğini ortaya koymaktadır. Aynı şekilde immunohistokimyasal bulgularımızda hem seminifer tübül yapısında hem de intertübüler bağ dokusunda güçlü RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 immunoreaktivitesinin belirlenmesiyle hem gen hem de protein seviyesinde dokudaki nekrozun varlığı kanıtlanmıştır. THQ uygulanan

İ/R+THQ grubunda ise hem RIP1/RIPK1 hem de RIP3/RIPK3 ekspresyonlarında çok ciddi düzeyde azalmanın olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar bize THQ'nun hem RIP1/RIPK1 hem de RIP3/RIPK3 ekspresyonları üzerinde önemli bir inhibitör bileşik olabileceğini ortaya koymaktadır. THQ'nun 20 mg/kg dozunun myokardiyal infarktüs geçiren sıçanların kalp dokusunda hem RIP1/RIPK1 hem de RIP3/RIPK3 protein ekspresyonunda azalmaya neden olduğu daha önce kanıtlanmıştır (Değer, 2022). Bu çalışma ise testis İ/R'nunda RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 ekspresyonlarının gösterildiği en önemli kanıt olma özelliği taşımaktadır. Bu sonuçların nekroptozda RIP3/RIPK3 sonrası basamağında yer alan karışık lineage kinaz alanı benzeri (MLKL)'nin değişiminin de ortaya konmasıyla ilerleyen dönemlerde desteklenmesine ihtiyaç duyulabilir. Böylece oksidatif stres kaynaklı ROS oluşumu testis İ/R hasarında nekroptoz sürecinde yer alan iki önemli belirtecin dokuda var olan ölüm mekanizmalarının tetiklendiğini ortaya koymaktadır. Çünkü ROS, RIPK1 otofosforilasyonunu aktive ederek RIPK3 alımına yol açtığı ve ROS indüksiyonunun ayrıca nekrozomda RIPK3'ü gerektirdiği, dolayısıyla nekroptozun etkili bir şekilde indüklendiği pozitif bir geri besleme devresi oluşturduğu unutulmamalıdır (Gong ve ark., 2019).

Bu çalışmada dokuda meydana gelen ölüm mekanizmalarının yanı sıra hücre popülasyonu bakımından hem spermatojenik hem de spermatojenik olmayan hücre serilerindeki değişimin belirlenmesi hedef alınmıştır. Spermatojenik hücre serilerindeki değişimin spermiyogram ve JTB skorunun gerçekleştirilmesi ile belirlenirken, Sertoli ve Leydig hücrelerindeki değişimde hücrelere spesifik belirteçlerin protein seviyesinde gösterilmesiyle ortaya konmaya çalışılmıştır. GDNF, spermatogoniyal kök hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşması arasındaki dengeyi kontrol ederek erkek germ hücresi gelişiminde önemli bir rol oynar. Sertoli hücreleri, peritübüler ve endotelial hücreler gibi çeşitli hücreler tarafından eksprese edilir. GDNF'nin ekspresyonu, seminifer epitelyum döngüsünün farklı aşamalarında önemli ölçüde değişiklik gösterir ve döngüsel ekspresyonu, spermatogoniyal kök hücrelerin homeostazisi için gereklidir (Di Persio ve ark., 2021). Çalışmamızda GDNF ekspresyonunun İ/R grubunda azalma gösterdiği belirlendi. THQ uygulanan İ/R+THQ grubunda ise GDNF ekspresyonu artış göstermekteydi. GDNF ifadesinin FSH hormonu tarafından in vivo olarak indüklendiği, ayrıca Sertoli hücrelerinde cAMP yoluyla TNF- $\alpha$ 'nın GDNF üretimine engel olduğu

gösterilmiştir (Di Persio ve ark., 2021; Tadokoro ve ark., 2002). Çalışma sonuçları birlikte değerlendirildiğinde İ/R grubunda artmış FSH seviyesinin Sertoli hücrelerindeki GDNF ekspresyonunu düzenlemeye yetmediği, aksine nekroz sürecinde yer alan yüksek RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 ekspresyonuna bağlı olarak GDNF ekspresyonunun azaldığı sonucuna varılmıştır. Çünkü nekroptoz mekanizmasında TNF varlığında RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 aktivasyonu gerçekleşmektedir. Çalışmamızda TNF varlığının değerlendirilmemiş olması bir eksiklik olarak görülse de azalan GDNF ekspresyonunun artmış RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 varlığından kaynaklandığı söylenebilir.

Leydig hücreleri, memeli testislerindeki androjenlerin birincil kaynağıdır. Doğum sonrası testisteki Leydig hücrelerinin yapısını ve fonksiyonunu korumak için LH'nin gerekli olduğu tespit edilmiştir (Mendis-Handagama, 2005). Steroid hormonlarının üretimi, kolesterolün dış mitokondriyal membrandan iç mitokondriyal membrana translokasyonu ile başlatılır; bu olaya yakın zamanda StAR proteininin aracılık ettiği bulunmuştur (Aspden ve ark., 1998; Dong ve ark., 2016). Leydig hücre fonksiyonunun nasıl değiştiğinin belirlenmesi amacıyla çalışmada hormonların yanı sıra StAR proteinin ekspresyonu da incelenmiştir. StAR ekspresyonu İ/R grubunda artış gösterdiği, İ/R+THQ grubunda ise azaldığı belirlenmiştir. Testiküler StAR ekspresyonu ve aktivitesi, gonadotropin LH tarafından akut bir şekilde düzenlenir. StAR proteininin Leydig hücrelerinde bol miktarda bulunması sonucu LH stimülasyonuna bağlı testiste steroidogenezin indüklenmesine ve testosteron salgılanmasına neden olur (Bouchard, 2022). Çalışmamızda artmış LH ve testosteron varlığına paralel bir şekilde StAR ekspresyonu da artmıştır. İ/R'na bağlı hasarın önlenmesi amacıyla, artmış LH varlığında Leydig hücrelerinin aktive olduğunu ve buna bağlı artan testosteronun Sertoli hücrelerinden salgılanan ABP ile etkileşime girerek spermatogenezi düzenlemeye çalıştığını düşünüyoruz. Çalışmada ABP seviyesi testis dokusu homojenatları kullanılarak biyokimyasal analizle belirlenmiştir. Doku ABP seviyesi İ/R grubunda azalırken İ/R+THQ grubunda artış göstermiştir. Bu sonuçlar artmış Leydig hücre fonksiyonunun aksine azalmış Sertoli hücre fonksiyonunun olduğunu göstermektedir. Çünkü Sertoli hücre fonksiyonunun nasıl değiştiğinin gösterilmesi bakımından tercih edilen hem GDNF ekspresyonunda hem de ABP üretiminde azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar İ/R varlığında spermatojenik olmayan hücreler içinde Sertoli hücrelerinin

Leydig hücresinden daha çok etkilendiğini öne sürmektedir. Sertoli hücrelerinin germ hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenlediği ve GDNF ifadesinin bu nişin homeostazının korunmasında etkili olduğu, FSH sinyalinin ise bu süreçte endokrin bir düzenleyici olarak görev yaptığı bilinmektedir (Bellaïche ve ark., 2014; Hofmann, 2008; Parekh PA, 2019). FSH'ın Sertoli hücrelerindeki sinyallemesini, rolünü ve Sertoli hücrelerinde işlevsiz FSH sinyallemesi olan hastaların tedavisi için daha iyi tedavilerin geliştirilmesinde FSH varlığının korunmasının gerektiği öne sürülmüştür (Wang ve ark., 2022). Çalışmamızda İ/R+THQ grubunda THQ, FSH seviyesinde artışa neden olmuştur. Çalışmamıza benzer şekilde FSH ve LH hormonları üzerinde THQ'nun farklı aktivelere neden olabileceği vurgulanmıştır (Adana ve ark., 2022). THQ'nun en iyi bilinen anti-oksidan etkisinin gösterilmesi için TOS ve TAS seviyeleri de belirlenmiştir. Testis dokusu TOS seviyesinde İ/R grubunda artış gözlenirken doku antioksidan seviyesinin korunması amacıyla THQ'nun TAS seviyesindeki artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır. THQ'nun anti-oksidan özelliklerini göstermek amacıyla çok çeşitli dokulara ait yapılan çalışmalarda, elde ettiğimiz sonuçlara benzer nitelikte TOS ve TAS seviyesini etkileyerek değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Akin ve ark., 2021; Kaymak ve ark., 2022; Öztürk ve ark., 2020). Bu çalışmada THQ'nun güçlü anti-oksidan özelliğinin malondialdehit, katalaz, süperoksit dismütaz ve glutatyon peroksidaz gibi parametrelerle ortaya konmaması bir eksiklik olarak değerlendirilmiştir. Çünkü THQ'nun histolojik ve genetik analizlerde ortaya koyduğu etkiyi, TOS ve TAS seviyesindeki değişiklikler üzerinde hedeflenen düzeyde göstermediği kanaatine varılmıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Metabolizmadaki faaliyetler için dokulardaki kan damarlarının, pıhtı veya mekanik nedenler ile tıkanması sonucu doku kanlanması ve beslenmesinin etkilenmesiyle oluşan iskemi, reperfüzyon ile yeniden düzeltilmeye çalışılsa da dokuda ciddi boyutta dönüşü olmayan hasarlara sebep olmaktadır. Bu çalışmada testis torsiyonu ve detorsiyonuna bağlı İ/R hasarı oluşturularak THQ'nun doku üzerindeki tedavi edici etkileri özellikle nekroz metabolizması üzerinden, hormonlar ve hedef hücre belirteçleri ile birlikte ele alınmaya çalışılmıştır. İ/R'nun çeşitli dokularda nekroza sebep olduğu bildirilmekte ve bu çoğunlukla ışık mikroskopik bulgularla ortaya konmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmada testis İ/R sonrası oluşan nekroz bu süreçte yer alan özel belirteçler ile hem gen ekspresyonu hem de protein seviyesinin gösterilmesiyle birlikte ortaya konmuştur. Dokuda meydana gelen hasardan etkilenen spermatojenik hücre ve spermatojenik olmayan hücre serileri değerlendirilmeye alınarak THQ'nun hem nekroz hem de doku fonksiyonunun korunmasında ne kadar etkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları ile, elde ettiğimiz bulgulara ek olarak RIP1/RIPK1 ve RIP3/RIPK3 etkileşimi için gerekli ölüm reseptörleri ve kompleks oluşumu sürecinden sonra meydana gelen moleküllerin de tespit edilmesi gerektiği önerilmektedir. Toplumdan her yaş kesiminde yer alan erkek bireyler meydana gelen iskemik durumun düzenlenmesinde reperfüzyon sonrası alınacak olan THQ'nun dokunun yapı ve fonksiyon bütünlüğünün sağlanması bakımından etkili bir bileşik olabileceği de unutulmamalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

- Adana MY, Imam A, Bello AA, Sunmonu OE, Alege EP, Onigbolabi OG, Ajao MS. Oral thymoquinone modulates cyclophosphamide-induced testicular toxicity in adolescent Wistar rats. *Andrologia*, 2022; 54(4):14368.
- Akin AT, Öztürk E, Kaymak E, Karabulut D, Yakan B. Therapeutic effects of thymoquinone in doxorubicin-induced hepatotoxicity via oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Anat Histol Embryol*, 2021;50(6):908-917.
- Aktümsek A. *Anatomi ve Fizyoloji İnsan Biyolojisi*. 4.Baskı, Bölüm 11, Nobel Yayın Dağıtım. Ankara 2009; S.372.
- Alam M, Hasan GM, Ansari MM, Sharma R, Yadav DK, Hassan MI. Therapeutic implications and clinical manifestations of thymoquinone. *Phytochemistry*, 2022; 200: 113213.
- Aspden WJ, Rodgers RJ, Stocco DM, Scott PT, Wreford NG, Trigg TE, Walsh J, D'Occhio MJ. Changes in testicular steroidogenic acute regulatory (StAR) protein, steroidogenic enzymes and testicular morphology associated with increased testosterone secretion in bulls receiving the luteinizing hormone releasing hormone agonist deslorelin. *Domest Anim Endocrinol*, 1998; 15(4):227-238.
- Ayan M, Tas U, Sogut E, Caylı S, Kaya H, Esen M, Erdemir F, Uysal M. Protective effect of thymoquinone against testicular torsion induced oxidative injury. *Andrologia*, 2016;48(2):143-151.
- Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol*, 2003;26(2):87-98.
- Bahçivan C, Söğüt İ, Hürdağ C, Çikler Dülger E. Investigation on the Therapeutic Effect of the Fulvic Acid upon the Testicular Damage Occurred by the Water Avoidance Stress (WAS). *Bozok Tıp Dergisi*, 2018;8(4): s.:61.

- Barada JH, Weingarten JL, Cromie WJ. Testicular salvage and age-related delay in the presentation of testicular torsion. *J Urol*, 1989;142(3):746-748.
- Bellaïche J, Goupil AS, Sambroni E, Lareyre JJ, Le Gac F. Gdnf-Gfra1 pathway is expressed in a spermatogenetic-dependent manner and is regulated by Fsh in a fish testis. *Biol Reprod*, 2014; 91(4):1.
- Bouchard MF, Picard J, Tremblay JJ, Viger RS. A Short Promoter Region Containing Conserved Regulatory Motifs Is Required for Steroidogenic Acute Regulatory Protein (Star) Gene Expression in the Mouse Testis. *Int J Mol Sci*, 2022; 23(19): 12009.
- Chi KK, Zhang WH, Chen Z, Cui Y, He W, Wang SG, Zhang C, Chen J, Wang GC. Comparison of quercetin and resveratrol in the prevention of injury due to testicular torsion/detorsion in rats. *Asian J Androl*, 2016;18(6):908-912.
- Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 2009;137(6): 1112-1123.
- Çay A, Alver A, Küçük M, Işık O, Eminağaoğlu MS, Karahan SC, Değer O. The effects of N-acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *J Surg Res*, 2006;131(2):199-200.
- D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 2019;43(6):582-592.
- Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell*, 2009; 138(2): 229-232.
- Deger N, Ozmen R, Karabulut D. Thymoquinone regulates nitric oxide synthase enzymes and receptor-interacting serine-threonine kinases in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *Chem Biol Interact*, 2022;365:110090.
- Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*, 2008; 4(5): 313-321.

- Di Persio S, Starace D, Capponi C, Saracino R, Fera S, Filippini A, Vicini E. TNF- $\alpha$  inhibits GDNF levels in Sertoli cells, through a NF- $\kappa$ B-dependent, HES1-dependent mechanism. *Andrology*, 2021;9(3): 960-963.
- Dong C, Cao J, Cao C, Han Y, Wu S, Wang S, Wang J. Effects of fluoride and aluminum on expressions of StAR and P450scc of related steroidogenesis in guinea pigs' testis. *Chemosphere*, 2016; 147:345-350.
- Dünya Sağlık Örgütü.WHO Labaratuar El Kitabı İnsan Semeninin İncelenmesi ve İşlemden Geçirilmesi. Beşinci Basım, 2011; S.24, S.30 ve S.50.
- Erdoğan Ö. Ratlarda Testis İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Nesfatin-1'in Koruyucu Etkisinin Araştırılması Uzmanlık Tezi Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Muğla, 2018; s.:39.
- Ermine K, Yu J, Zhang L. Role of Receptor Interacting Protein (RIP) kinases in cancer. *Genes Dis*, 2021; 9(6):1579-1593.
- Erol B, Sari U, Amasyali AS, Ozkanli S, Sogut S, Hanci V, Efiloglu O, Danacioglu YO, Engin P, Yencilek F, Atis G, Yildirim A, Alkoc OA, Caskurlu T. Comparison of combined antioxidants and thymoquinone in the prevention of testis ischemia- reperfusion injury. *Andrology*, 2017; 5(1): s.:119-120.
- Feng S, Ma L, Yang Y, Wu M. Truncated RIP3 (tRIP3) acts upstream of FADD to induce apoptosis in the human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006;347(3):558-565.
- Festjens N, Vanden Berghe T, Cornelis S, Vandenabeele P. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ*, 2007; 14(3):400-401.
- Gong Y, Fan Z, Luo G, Yang C, Huang Q, Fan K, Cheng H, Jin K, Ni Q, Yu X, Liu C. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Mol Cancer*, 2019; 23:18(1): 100: 3.
- Gur FM, Timurkaan S, Taskin E, Guven C, Gur HE, Senturk M, Dastan S, Nurdinov N, Unalan A, Cankut S, Tatyuz I. Thymoquinone improves testicular damage and sperm quality in experimentally varicocele-induced adolescent rats. *Andrologia*, 2021; 53(5):14033.

- Güzelsoy P, Aydın S, Başaran N. Çörek Otu (*Nigella Sativa* L.) Aktif Bileşeni Timokinonun İnsan Sağlığı Üzerindeki Potansiyel Etkileri. *Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 2018; 7: S.:2.
- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*, 2009 12;137(6):1107-111.
- Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol*, 2003;66(8):1527-35.
- Hız İ. Sıçanlarda Testis İskemi/Reperfüzyon Hasarı Üzerine Nimodipine'in Koruyucu Etkisinin Morfometrik Yöntemlerle Araştırılması,. Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Eskişehir, 2021; s.:1.
- Hofmann, M.C. GDNF Signaling Pathways within the Mammalian Spermatogonial Stem Cell Nich. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008; 228:95-103.
- Isaev NK, Genrikhs EE, Stelmashook EV. Antioxidant Thymoquinone and Its Potential in the Treatment of Neurological Diseases. *Antioxidants (Basel)*, 2023; 12(2): s.: 433.
- 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.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*, Textand Atlas, 2006; s.: 431-443.
- Kabay S, Ozden H, Guven G, Burukoglu D, Ustuner MC, Topal F, Gunes HV, Ustuner D, Ozbayer C. Protective effects of the nuclear factor kappa B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate on experimental testicular torsion and detorsion injury. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014; 18(4):321-326.
- Kaçar S. Akrilamitin C6 Sıçan Glioma Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisine Karşı Timokinon ve Kuersetinin Etkilerinin Araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. Eskişehir, 2020;s.:19,s.:30,s.:31.
- Kanter M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol*, 2010; 89(3): 314-320.

- Kaymak E, Öztürk E, Akın AT, Karabulut D, Yakan B. Thymoquinone alleviates doxorubicin induced acute kidney injury by decreasing endoplasmic reticulum stress, inflammation and apoptosis. *Biotech Histochem*, 2022;97(8):622-634.
- Khan N, Lawlor KE, Murphy JM, Vince JE. More to life than death: molecular determinants of necroptotic and non-necroptotic RIP3 kinase signaling. *Curr Opin Immunol*, 2014; 26:76-89.
- Kocaman OH, Günendi T, Dörterler ME, Koyuncu I, Çelik H, Yumuşak N, Böleken ME. Protective effect of osthole on testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2022; 28(5):563-569.
- Koç M, Deniz ÇD, Eryılmaz MA, Tezcan Y, Gürbilek M. Radioprotective effects of melatonin and thymoquinone on liver, parotid gland, brain, and testis of rats exposed to total body irradiation. *Turk J Med Sci*, 2023; 53(4):902-908.
- Köksal M, Oğuz E, F Baba, Eren M A, Çiftçi H, Demir ME, Kurcer Z, G al, Aral F, Ocak AR, Aksoy N, Ulaş T. Effects of melatonin on testis histology, oxidative stress and spermatogenesis after experimental testis ischemia-reperfusion in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012; 16 (5):582-588.
- Liu Y, Fan C, Zhang Y, Yu X, Wu X, Zhang X, Zhao Q, Zhang H, Xie Q, Li M, Li X, Ding Q, Ying H, Li D, Zhang H. RIP1 kinase activity-dependent roles in embryonic development of Fadd-deficient mice. *Cell Death Differ*, 2017; 24(8): 1459-1469.
- Malik S, Singh A, Negi P, Kapoor VK. Thymoquinone: A small molecule from nature with high therapeutic potential. *Drug Discov Today*, 2021; 26(11): 2716-2725.
- Mendis-Handagama SM, Siril Ariyaratne HB. Leydig cells, thyroid hormones and steroidogenesis. *Indian J Exp Biol*, 2005;43(11):939-962.
- Meylan E, Tschopp J. The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci*. 2005 Mar;30(3):151-159.
- Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 2003; 114(2): 181-190.

- Moore K.L. ve Persaud T.V.N. Klinik yöntemleri ile İnsan embriyolojisi. Çeviri: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. 6.baskı. Nobel tıp kitapçevleri. İstanbul 2002; s.:323-343.
- Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):3448-3459.
- Otsuka K, Matsubara S, Shiraishi A, Takei N, Satoh Y, Terao M, Takada S, Kotani T, Satake H, Kimura AP. A Testis-Specific Long Noncoding RNA, *Start*, Is a Regulator of Steroidogenesis in Mouse Leydig Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021; 12: 665874.
- Önal E. Deneysel Varikosel Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Melatoninin Tedavi Edici Etkisinin Değerlendirilmesi,. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, 2023; s.:26.
- Ötünçtemur A., Çakır S.S., Polat E.C., Özbek E. Varicocele and Oxidative Stress. *Türkiye Klinikleri J Urology-Special Topics*, 2012; 5(3): 25-37.
- Özbek Ö. Testis İskemi/Reperfüzyonu Oluşturulmuş Ratlarda Apocyninin Testis Dokusu Üzerine Koruyucu Ve Tedavi Edici Etkilerinin Araştırılması,. Uzmanlık Tezi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Malatya,2013; s.:14.
- Özgür BC, Surer H, Yüçetürk CN, Karakan T, Özer E, Ogus E. The protective effect of roflumilast and ibuprofen on testicular ischemia reperfusion injury: An experimental study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2022; 28(6): 730-735.
- Özmerdiven Ç.G. Sıçanlarda testis iskemi/reperfüzyon hasarında nitrik oksit (l-arjinin) ve fosfodiesteraz tip 5 inhibitörünün (tadalafil) etkisi,. Uzmanlık Tezi Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Bursa, 2015; s.:48.
- Öztürk E, Kaymak E, Akin AT, Karabulut D, Ünsal HM, Yakan B. Thymoquinone is a protective agent that reduces the negative effects of doxorubicin in rat testis. *Hum Exp Toxicol*, 2020; 39(10):1364-1373.
- Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*. 2015;517(7534):311-320.

- Parekh PA, Garcia TX, Hofmann MC. Regulation of GDNF expression in Sertoli cells. *Reproduction*, 2019; 157(3): 95-107.
- Pazdernik NJ, Donner DB, Goebel MG, Harrington MA. Mouse receptor interacting protein 3 does not contain a caspase-recruiting or a death domain but induces apoptosis and activates NF-kappaB. *Mol Cell Biol*, 1999; 19(10): 6500-6508.
- Polat E.C. Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Testis İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Nimesulid'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması,. Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzincan, 2017; s.:43.
- Ringdahl E, Teague L. Testicular torsion. *Am Fam Physician*, 2006; 74(10):1739-1743.
- Ross MH. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas A Textand Atlas, Baykal B, Palme Yayıncılık, Ankara, 2011; s.: 784- 800.
- Ross MH. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas A Textand Atlas, Baykal B, Palme Yayıncılık, Ankara, 2016; s.: 785-791.
- Sadler TW. Langman's medical embryology. Palme Yayıncılık İstanbul, 2005; s.:328-351.
- Sayed MM, Hassanein KMA, Senosy W. Protective effects of thymoquinone and l-cysteine on cadmium-induced reproductive toxicity in rats. *Toxicol Rep*, 2014; 13;1:612-620.
- Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM. Testicular torsion: diagnosis, evaluation, and management. *Am Fam Physician*, 2013; 88(12): 835-840.
- Shih HJ, Chang CY, Huang IT, Tsai PS, Han CL, Huang CJ. Testicular torsion-detorsion causes dysfunction of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Andrology*, 2021; 9(6): 1902-1910.
- Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*, 1995; 81(4): 513-523.
- Sun X, Lee J, Navas T, Baldwin DT, Stewart TA, Dixit VM. RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. *J Biol Chem*, 1999; 274(24): 16871-16875.

- Sun X, Yin J, Starovasnik MA, Fairbrother WJ, Dixit VM. Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. *J Biol Chem*, 2002; 277(11): 9505-9511.
- Şentürk İ.Y. Aktoz Pioglitazonun Testis İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Olan Etkisinin İncelenmesi,. Uzmanlık Tezi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Edirne,2020; S.:3.
- Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev*, 2002;113(1):29-39.
- Tekelioğlu M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme. Antıp a.ş. Ankara 2002; s.: 231-244.
- The HumanProteinAtlas.  
Erişim:[<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000137275-RIPK1>], Erişim Tarihi: 26.05.2024.
- Toyokuni, S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology international*, 1999; 49(2): 91-102.
- Trouba KJ, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid Redox Signal*, 2002; 4(4):665-673.
- Türkili A. B. Sıçan Testis iskemisi Reperfüzyon Hasarında Anjiyotensin Ve Endotelinin Rolü,. Ecz. Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Zonguldak, 2010; s.:15.
- Türkyılmaz Z, Hatipoğlu A, Yüksel M, Aydoğdu N, Hüseyinova G. Comparison of effects of melatonin, pentoxifylline and dimethyl sulfoxide in experimental liver ischemia-reperfusion injury by three different methods. *Eur Res J*. January 2019;5(1): s.:148-158.
- UniProt konsorsiyumu. Erişim: [<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9QZL0/entry>], Erişim Tarihi: 26.05.2024.
- Wang JM, Li ZF, Yang WX, Tan FQ. Follicle-stimulating hormone signaling in Sertoli cells: a licence to the early stages of spermatogenesis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022; 2;20(1): 97.

- Wang TE, Lai YH, Yang KC, Lin SJ, Chen CL, Tsai PS. Counteracting Cisplatin-Induced Testicular Damages by Natural Polyphenol Constituent Honokiol. *Antioxidants (Basel)*, 2020; 9;9(8):723.
- Wright WW. The Regulation of Spermatogonial Stem Cells in an Adult Testis by Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022;13: 896390.
- Xu T, Ding W, Tariq MA, Wang Y, Wan Q, Li M, Wang J. Molecular mechanism and therapy application of necrosis during myocardial injury. *J Cell Mol Med*, 2018;22(5):2547-2557.
- Yu PW, Huang BC, Shen M, Quast J, Chan E, Xu X, Nolan GP, Payan DG, Luo Y. Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NF-kappaB. *Curr Biol*, 1999;9(10):539-542.
- Yurtçu M, Abasıyanık A, Avunduk MC, Karagözoğlu E, Abasıyanık F. The effects of one dose and seven days' managements of melatonin and steroid to prevent ischemia-reperfusion injury in testicular torsion. *Turkiye klinikleri j med sci*, 2005; 25:496-500.
- Zhang D, Lin J, Han J. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell Mol Immunol*, 2010; 7(4):243-249.
- Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*, 2009;325(5938):332-336.

## EKLER



Tarih: 06.04.2022

Toplantı Sayısı: 04



Karar No:22/060

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06.04.2022 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Nurcan DURSUN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞ A	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakülte
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Selma BÜYÜKKILIÇ BEYZİ	Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Doç. Dr.	Sağlık Bilimleri Fakül
Ali İleriş AYKUN	Arş. Gör.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi EF
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMİŞ	Veteriner Hekim	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrk
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluş Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji/Embriyoloji A.D'dan Doç.Dr.İ sunulan "Timokinonun Testiküler İskemi/Reperfüzyon Üzerine Etkil çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulması

Tarih : 06.04.2022

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN

## kaynaksız.doc

### ORJİNALLİK RAPORU

% **24**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **22**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **10**

YAYINLAR

% **9**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

[acikbilim.yok.gov.tr](http://acikbilim.yok.gov.tr)

İnternet Kaynağı

% **10**

2

[openaccess.ogu.edu.tr:8080](http://openaccess.ogu.edu.tr:8080)

İnternet Kaynağı

% **3**

3

Submitted to Erciyes Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

% **1**

4

[abis-files.erciyes.edu.tr](http://abis-files.erciyes.edu.tr)

İnternet Kaynağı

% **1**

5

[tipdergisi.bozok.edu.tr](http://tipdergisi.bozok.edu.tr)

İnternet Kaynağı

% **1**

6

[apps.who.int](http://apps.who.int)

İnternet Kaynağı

<% **1**

7

[dergipark.org.tr](http://dergipark.org.tr)

İnternet Kaynağı

<% **1**

8

[dspace.trakya.edu.tr:8080](http://dspace.trakya.edu.tr:8080)

İnternet Kaynağı

<% **1**

9

[acikerisim.istinye.edu.tr](http://acikerisim.istinye.edu.tr)

İnternet Kaynağı

<% **1**

## **ÖZGEMİŞ**

### **KİŞİSEL BİLGİLER**

**Ad Soyad** : Hatice GÜLMEZ

### **EĞİTİM**

**2007-2011** Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü 2.94/4.00

**2020-2024** Erciyes Üniversitesi Histoloji Embriyoloji  
Tezli Yüksek Lisans

### **İŞ TECRÜBESİ**

**Ağustos 2011- Nisan 2012** ÖZEL ERCİYES HASTANESİ AMELİYATHANE  
SAĞLIK TEKNİSYENİ

**Mayıs 2012- Ekim 2019** ACIBADEM KAYSERİ HASTANESİ  
ÜREME SAĞLIĞI LABORATUVARI BİYOLOG

### **SEMİNERLER VE KONGRELER**

**2012** 5.Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite  
Kongresi

**2013** IV. Üreme Tıbbı Derneği Kongresi

**2015** V. Üreme Tıbbı ve Cerrahisi Derneği  
Kongresi

**2024** Nuh Naci Yazgan Ulusal Sağlık Bilimleri  
Kongresi

### **BİLGİSAYAR BİLGİSİ**

Microsoft Office programları (İyi Düzeyde)

### **YABANCI DİL**

İngilizce