

**DENEYSEL OLARAK TESTİKÜLER TORSİYON DETORSİYON İLE
İNDÜKLENMİŞ TESTİS DOKUSU OKSİDATİF HASARININ
AZALTILMASINDA 6-SHOGAOL' UN OLASI YARARLI ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Emrah KIZILASLAN
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR
Doç. Dr. Ayhan TANYELİ
AĞRI-2021
(Her Hakkı Saklıdır)**

**DENEYSEL OLARAK TESTİKÜLER TORSİYON DETORSİYON İLE
İNDÜKLENMİŞ TESTİS DOKUSU OKSİDATİF HASARININ
AZALTILMASINDA 6-SHOGAOL' UN OLASI YARARLI ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Emrah KIZILASLAN
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR
Doç. Dr. Ayhan TANYELİ
AĞRI-2021
(Her Hakkı Saklıdır)

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENEYSEL OLARAK TESTİKÜLER TORSİYON DETORSİYON İLE
İNDÜKLENMİŞ TESTİS DOKUSU OKSİDATİF HASARININ
AZALTILMASINDA 6-SHOGAOL' UN OLASI YARARLI ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Emrah KIZILASLAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AĞRI-2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENEYSEL OLARAK TESTİKÜLER TORSİYON DETORSİYON İLE İNDÜKLENMİŞ TESTİS DOKUSU OKSİDATİF HASARININ AZALTILMASINDA 6-SHOGAOL' UN OLASI YARARLI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emrah KIZILASLAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR

Ortak Danışman: Doç. Dr. Ayhan TANYELİ

Bu çalışmanın amacı, deneysel torsiyon detorsiyon (T/D) modeli oluşturulan ratlarda testis dokusu oksidatif hasarının azaltılmasında 6-Shogaol (6-SHO) uygulamasının yararlı etkilerinin olup olmadığının değerlendirilmesidir.

Bu amaçla çalışmamızda 18 adet Wistar tip erkek rat tartılarak 3 gruba ayrıldı. Gruplar, sham, T/D ve 6-SHO+T/D olarak planlanmış olup, sham grubu ratlarda skrotal insizyon yapıp tekrar kapatıldı ve herhangi bir tedavi uygulanmadı. T/D grubunda ise skrotum orta hattan insizyon yapılarak sol testis serbestlenerek saat yönünün tersine 720° burularak skrotum duvarına sabitlendi. 6-SHO+T/D grubunda T/D modeli oluşturuldu ve detorsiyondan 30 dakika önce 20 mg/kg dozda 6-SHO intraperitoneal (i.p) yolla uygulandı. Testis dokularında oksidan ve antioksidan parametrelerin düzeyleri değerlendirildi.

Bu çalışmada, T/D grubunda antioksidan kapasite belirgin şekilde azalırken, oksidan düzeylerinin ise anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Aksine 6-SHO desteğiyle birlikte antioksidan kapasitenin istatistiksel olarak yeniden arttığı ve sham grubu sonuçlarına yaklaştığı buna karşılık oksidan düzeylerinin ise oldukça azaldığı görüldü.

Sonuç olarak, 6-SHO tedavisinin ratların testis dokusu oksidatif hasarının hafifletilmesinde yararlı etkiye sahip olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: 6-Shogaol, testis, torsiyon/detorsiyon, oksidatif stres.

2021, 71 Sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE BENEFICIAL EFFECTS OF 6-SHOGAOL IN REDUCING OF TESTICULAR TISSUE OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY EXPERIMENTAL TESTICULAR TORSION DETORTION

Emrah KIZILASLAN

Thesis Advisor: Assoc. Dr. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR

Co-Advisor: Doç. Dr. Ayhan TANYELİ

The aim of this study is to evaluate whether 6-Shogaol (6-SHO) application has beneficial effects on alleviating testicular tissue oxidative damage in experimental rat torsion detortion (T/D) model.

For this purpose, 18 male Wistar rats were weighed and divided into 3 groups in our study. The groups were planned as sham, T/D and 6-SHO+T/D. In sham group rats, scrotal incision was made and re-closed but no treatment was applied. In the T/D group, an incision was made in the midline of the scrotum, the left testis was released and the scrotum wall was fixed by twisting it 720° counterclockwise. In the 6-SHO+T/D group, the T/D model was created and 6-SHO was administered as intraperitoneal (i.p.) at a dose of 20 mg/kg 30 minutes before detorsion. Oxidant and antioxidant parameters were evaluated in testicular tissues.

In this study, it was observed that antioxidant capacity decreased significantly, while oxidant levels increased significantly in the T/D group. On the contrary, it was observed that antioxidant capacity increased statistically with 6-SHO treatment and approached to sham group results, whereas oxidant levels decreased considerably.

As a result of, it has been observed that 6-SHO treatment has beneficial effects on alleviating the oxidative damage of testicular tissue of rats.

Keywords: 6-Shogaol, testis, torsion / detorsion, oxidative stress.

2021, 71 Pages

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, tez çalışmamızın planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen, bu sıkıntılı pandemi sürecinde her zaman yanımda olarak varlığıyla beni mutlu eden danışmanım kıymetli hocam Doç. Dr. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR' e sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamızın yürütülmesinde desteğini ve katkılarını bana her daim sunan değerli hocam Doç. Dr. Ayhan TANYELİ' ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışma sürecinde desteklerini sunan değerli hocam Erdal BAŞARAN ve tecrübelerinden faydalandığım değerli dostum Nurullah ÖZGÖKMAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Tabiki bugünlere gelmemde büyük emekleri olan her zaman eğitim hayatımda maddi ve manevi tüm fedakarlığı yapan canım annem ve babama, beni her zaman destekleyen kardeşlerime, sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2021

Emrah KIZILASLAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ BÖLÜMÜ	3
2.1. Testislerin Yapı ve Morfolojisi	3
2.2. Fetüste Testis Gelişimi	8
2.3. Oksidatif Stres	10
2.3.1. Antioksidanlar	12
2.3.2. Serbest radikaller	13
2.3.3. Süperoksit dimutaz (SOD)	16
2.3.4. Malondialdehit (MDA).....	16
2.4. İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	16
2.5. Testis Torsiyonu	17
2.6. 6-Shoagaol Kimyasal Yapısı ve Farmakokinetiği.....	19
2.7. Özgün Değer.....	21
2.8. Yaygın Etki.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. İlaçlar, Denekler ve Labaratuar Koşulları	23
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Deney Protokolü	23
3.2.2. Numunelerin Hazırlanması.....	24
3.2.3. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	25
3.2.4. Malondialdehit Ölçümü (MDA).....	25
3.2.5. Myeloperoksidaz Ölçümü (MPO)	27
3.2.6. Süperoksit Dismutaz Ölçümü (SOD)	28

3.2.6. Total Antioksidan Kapasitesi (TAK) Ölçümü.....	29
3.2.7. Total Oksidan Kapasitesi (TOK) Ölçümü.....	30
3.2.8. OSI Hesaplanması	32
3.2.9. İstatistiksel Analiz	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	33
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	46
KAYNAKÇA	47
EKLER	57
EK 1: Etik Kurul Onayı.....	57
EK 2: Turnitine Raporu	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

6-SHO	6-Shogaol
ALA	Alfa-lipoik asit
FLC	Fetal Leydig hücreleri
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
I/R	İskemi reperfüzyon
MDA	Malondialdehit
MPO	Miyeloperoksidaz
NO	Nitrik Oksit
NO ₂	Nitrojen Dioksit
O ₂ ^{•-}	Süperoksit
ONOO-	Peroksinitrit
OH ⁻	Hidroksil
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAK	Total Antioksidan Kapasitesi
TOK	Total Oksidan Kapasitesi
T/D	Torsiyon Detorsiyon
TBA	Tiyobarbitürik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Testislerin Yapısı	3
Şekil 2.2.	Serbest radikallerin hücreye saldırısı	21
Şekil 2.3.	Oksidatif denge	22
Şekil 2.4.	6-shogaol molekülünün kimyasal yapısı	30
Şekil 2.5.	8-shogaol ve 10-shogaol	30
Şekil 4.1.	MDA ($\mu\text{mol/gr tissue}$) düzeyini ifade eden Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait gruplar arası karşılaştırmalar.	44
Şekil 4.2.	SOD (U/mg protein) düzeyini ifade eden Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait gruplar arası karşılaştırmalar	45
Şekil 4.3.	MPO (U/mg protein) aktivitesi ifade eden Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait gruplar arası karşılaştırmalar	46
Şekil 4.4.	TAK (mmol equivalent/L) düzeyini ifade eden Sham, T/D ve 6-SHA+T/D gruplarına ait gruplar arası karşılaştırmalar	47
Şekil 4.5.	TOK (mmol Trolox equivalent/L) düzeyini ifade eden Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait gruplar arası karşılaştırmalar	47
Şekil 4.6.	OSİ düzeyini ifade eden Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait gruplar arası karşılaştırmalar	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Kullanılan cihazlar/aletler	35
Çizelge 3.2.	MDA ölçümü	36
Çizelge 3.3.	MDA ölçümü	36
Çizelge 3.4.	MPO ölçümü	37
Çizelge 3.5.	SOD ölçümü	38
Çizelge 3.6.	TAK ölçümü	40
Çizelge 3.7.	TOK ölçümü	41
Çizelge 4.1.	Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait Malondialdehit (MDA) ($\mu\text{mol/gr tissue}$), Süperoksit dismutaz (SOD) (U/mg protein) ve Myeloperoksidaz (MPO) (U/mg protein), düzeylerine ait minimum-maksimum değerleri, ortalama ve standart hata (SEM) sonuçları özetlenmiştir	43
Çizelge 4.2.	Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait Total antioksidan kapasite (TAK) (mmol equivalent/L), Total oksidan kapasite (TOK) ($\mu\text{mol Trolox equivalent/L}$) ve Oksidatif stres indeksi (OSİ) değerlerine ilişkin minimum-maksimum değerleri, ortalama ve standart hata (SEM) sonuçları özetlenmiştir	44

1. GİRİŞ

Testisler erkek üreme sistemi içinde yer alan temel organlardır (Bradley *et al.* 1982) ve dişi yumurtalıklarla homologdur (Prillaman and Turner 1997). Testislerin işlevi, başta testosteron olmak üzere hem sperm hem de androjen üretmektir (Okusa *et al.* 1999). Testosteron salınımı, ön hipofizden salınan luteinize edici hormon tarafından kontrol edilir (Foschi *et al.* 1993). Sperm üretimi ise hem ön hipofizden salınan folikül uyarıcı hormon hem de gonadal testosteron tarafından kontrol edilir (Bradley *et al.* 1982). Testisler, gamet (sperm) üretimi ve özellikle erkeklik hormonu olan testosteron salgılama gibi iki temel işlevi yerine getirirler (Akgur vd 1994).

Erkek üreme sistemindeki sperm kanal sistemi ve penis de dâhil olmak üzere diğer yapılar üremeye yardımcı olan organlardır (Gower *et al.* 1982). Yardımcı üreme organları, gamet üretmek yerine spermi testislerin dışına taşıyarak üreme döngüsünde etkin bir rol oynar (Prillaman and Turner 1997).

Testis torsiyonu ve iskemi, testis dokusunda ciddi hasara neden olan ve hatta kısırlıkla sonuçlanabilen akut bir cerrahi durumdur. Çünkü torsiyon öyküsü olan erkeklerin % 38' inde yapılan çalışmalarda, sperm sayısı ml' de 20 milyondan azdır. Testis, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu zararlara duyarlıdır. Literatürde iskemi sonrası detorsiyonun neden olduğu hasardan oksidatif stresin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Özellikle germinal hücreler oksidatif streste ciddi şekilde hasar görür (Topdağı vd 2020).

Deformasyondan sonra daha fazla kan akışı ile iskemik alana göç eden moleküller testiste iskemi reperfüzyon hasarına yol açmaktadır. Nötrofiller, oksidatif ve nitrozatif sistemle etkileşime girerek reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumunda önemli bir rol oynarlar (Ekinci Akdemir ve Tanyeli 2020). Çünkü süperoksit anyonları, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri, ROT' un oluşumuna neden olur ve hücre zarı ve DNA başta olmak üzere hücrenin birçok bileşenine zarar verir. Günümüzde kullanılan antioksidanlar, vücudun endojen antioksidan savunma mekanizmalarına ek olarak ROT' u ortadan kaldırarak oksidatif hasarı azaltır (Wei *et al.* 2008).

Zencefil ve türevleri eski zamanlardan beri besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. Zencefil son yıllarda düşük toksisitesinin yanı sıra geniş terapötik etkileri nedeniyle dünyanın dört bir yanında araştırmacıların dikkatini çekmektedir.

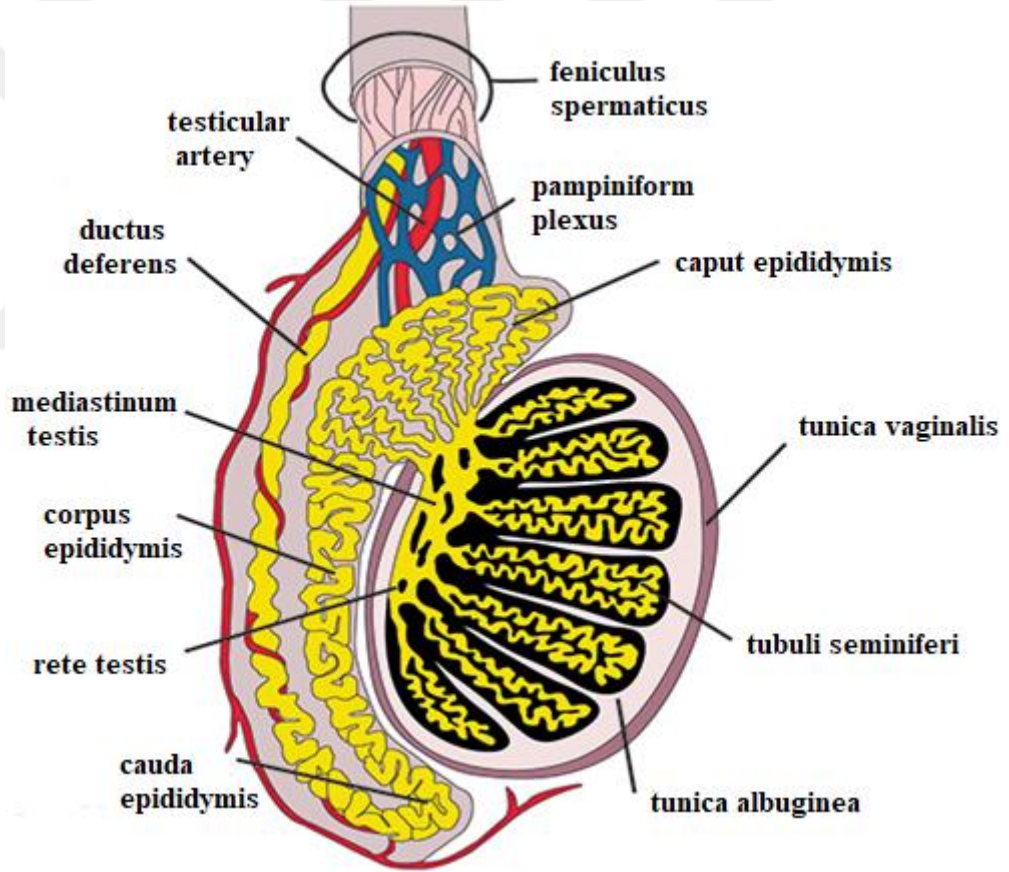
Antioksidan, anti-inflamatuvar, anti-apoptotik, analjezik, sitotoksik, anti-proliferatif, antitümör ve anti-trombosit etkileri zencefilin ana terapötik aktiviteleri olarak sıralanabilir. Zencefil köksapında en çok bulunan anti-oksidan madde ise 6-SHO' dur (Ling *et al.* 2010).

Sunulan tez çalışmasında, deneysel testiküler T/D ile oluşturulan testis dokusunun oksidatif hasarının hafifletilmesi ya da azaltılmasında 6-SHO' un olası yararlı etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu bakımdan bu çalışmada cevaplandırılması hedeflenen soru 20 mg/kg dozda 6-SHO tedavisinin deneysel testiküler T/D modeli uygulanarak I/R kaynaklı testis dokusu oksidatif hasarı oluşturulan ratlar üzerine etkisinin ne olduğudur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ BÖLÜMÜ

2.1. Testislerin Yapı ve Morfolojisi

Şekil 1' de görüldüğü üzere çok katmanlı bir tunika ile kaplanmış olan testisler, testosteron ve sperm üreten hücreler içeren bir dizi tübülden oluşur (Myers *et al.* 1995; Sarica ve Bakir 1999). Birincil işlevi sperm üretimi olan testisler, sperm üretiminde rol oynayan ve testislerin ana bileşenleri olan Seminifer Tübüller, Sertoli ve Leydig hücrelerinden oluşur (Prillaman and Turner 1997; Filho *et al.* 2004). Ayrıca testislerin iç yapısında, üretilen spermlerin taşınmasına yardımcı olan bir dizi kanal ve doku vardır (Anderson *et al.* 1992; Visser and Heyns 2003).



Şekil 2.1. Testislerin Yapısı (Prater and Overdorf 1991).

Tunika (Tunica): Çok katmanlı olan tunika, testisleri örter, testislere doğru olan kan akımını kolaylaştırır ve testislerin sperm üreten bölgeleri arasında bir bölme oluşturur (Noronha *et al.* 1995). Tunika, tunica vasculosa, tunica albuginea ve tunica vaginalis olmak üzere üç katmandan oluşur (Sun *et al.* 2001).

Tunica vasculosa: Tunikanın iç tabakasını oluşturan tunica vasculosa, kan damarları ve bağ dokusundan oluşur (Camussi *et al.* 1991). Tunica vasculosa aynı zamanda tunica albuginea ile kaplıdır ve testislere kan akışını kolaylaştırır (Sharp *et al.* 2013).

Tunica albuginea: Latince “beyaz önlük” anlamına gelen tunica albuginea, testisleri çevreler ve epididimi çevreleyen lif katmanlarına bağlanan yoğun bir dokudan oluşur (Karaguzel vd 2014) ve spermi testislerden penise taşıyan bir dizi kanal içerir (Hadziselimovic *et al.* 1998). Tunika albuginea ayrıca testise doğru genişleyerek spermin üretildiği seminifer tübüller arasında bölümler oluşturur (Drlik and Kocvara 2013). İç taraflara doğru mavimsi beyaz bir görünüme sahip olan tunica albuginea, tunika'nın iç tabakası olan tunica vasculosa'nın çoğunu kaplar. Bu yapının üzerinde tunika'nın dış tabakası olan tunica vaginalis bulunur (Shiraishi *et al.* 2001).

Tunica vaginalis: Tunica vaginalis, viseral ve parietal olmak üzere iki katmandan oluşur (Sun *et al.* 2001). Viseral tabaka tunika albugineanın (tunika'nın orta tabakası) üzerinde yer alırken, parietal tabaka skrotal boşluğu kaplar. İnce sıvı katman, tunica vaginalisin iki bölümünü ayırır ve testisler ile skrotum arasındaki sürtünmeyi azaltır (Lutzker and Zuckier 1990). Bu katmanlar arasında artan sıvı miktarı hidrosel (sıvı birikimi) oluşturabilir (Drlik and Kocvara 2013).

Seminifer tübüller (Seminiferous tubules): Seminifer tübüller, testislerin içinde bulunur ve testis örtüsünün orta katmanı olan tunika albuginea'nın uzantılarıyla bölümlere ayrılır (Aydiner vd 2012). Germ hücrelerini (erkeklerde sperm üretmek için çoğaltılan 23 kromozom hücresi) barındıran seminifer tübüller, testislerin spermatogenez (sperm üretimi) bölgesidir (Azizollahi *et al.* 2009). Seminifer tübüller yer alan bölmeler, testisleri seminifer tübülleri içeren lobüllere ayırır. Her lobül 1-4 seminifer tübül içerir ve her testis bu tübüllerden yaklaşık 900 tanesini içerebilir. (Noronha *et al.* 1995). Tübüller ortalama 50 cm uzunluğundadır ve testisleri sıkıca sarar (Sharp *et al.* 2013). Tipik bir testis, 800 metre uzunluğuna kadar sıkıca sarılmış seminifer tübüllerden oluşabilir (Comhaire *et al.* 2005).

Mediasten (Mediastinum): Mediasten, rete testise bağlanan bir doku bölgesidir (Elmore *et al.* 1995). Mediasten, testisin kan damarlarını, lenfatik sistemi

(vücut dokularından fazla sıvıyı uzaklaştıran sistem) ve testis içindeki sperm taşıyan kanalları destekler (Junqueira and Carneiro 2009)

Düz tübüller (Straight tubules): Düz tübüller, seminifer tübülleri rete testise bağlayarak spermin taşınmasını kolaylaştırır (Karaguzel vd 2014). Düz tübüller, testislerin içindeki seminifer tübülleri birbirinden ayıran bölmeler içinden geçerler (Aydiner vd 2012).

Rete testis: Seminifer tübüller, rete testis adı verilen bir dizi kanala açılır (Kierszenbaum 2006). Spermin testislerden penisin sperm taşıma kanallarına taşınmasını kolaylaştıran doku rete testistir (Karaguzel vd 2014).

Verimli kanallar (Efferent ducts): Verimli kanallar, rete testisler ile epididim arasında bulunur (Köksal vd 2012). Testisleri, erkek kanallarına bağlayarak spermin testislerden taşınmasını kolaylaştırırlar (Hadziselimovic *et al.* 1998).

Leydig hücreleri (Leydig cells): Yetişkin erkekte, seminifer tübülleri çevreleyen yumuşak bağ dokuları Leydig'in interstisyel hücrelerinden oluşur (Laron and Klinger 1998; Moore and Persaud 2009). Hayvanlarda, Leydig hücreleri normalde seminifer tübülleri çevreleyen (Sertoli hücrelerinin bulunduğu) bağ dokusu içinde bulunur. Bu nedenle, genellikle geçiş hücreleri olarak da adlandırılırlar. Bununla birlikte, her fazın farklı bir Leydig hücre popülasyonu ürettiği iki ana büyüme fazına sahiptir (Noske *et al.* 1998). Bu hücreler, ergenliğin başlangıcında testisler testosteron üretiminin başlamasından önce neredeyse yok denilebilecek düzeydedir (Noske *et al.* 1998).

Leydig hücrelerinin ilk popülasyonu fetal Leydig hücreleri (FLC) olarak bilinir. Bu aşama, farklılaşma aşaması, olgunlaşma ve evrim aşamasını içeren üç ana aşamaya bölünmüştür. Gelişimin erken dönemlerinde, Sry-Sox9' un aktivasyonu, Sertoli hücrelerinin farklılaşmaya başlamasına neden olur (Ovalle *et al.* 2009). Sonuç olarak Sertoli hücreleri, erkek gonadların testise dönüşmesini etkiler. Seminifer tübüllerde, bu Sertoli hücreleri ayrıca FLC' nin farklılaşmasını etkileyen trombosit kaynaklı büyüme faktörleri salgılar. Farelerde, bu hücreler testisteki interstisyel

bölgede bulunmaktadır. Mitoz yapamayacakları düşünüldüğünde, bu artışın progenitor hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Noske *et al.* 1998).

Leydig hücreleri, androjenlerin üretiminde ve ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesinde rol oynayan testis hücreleridir. Leydig hücrelerinin başlıca görevi androjenler, özellikle erkeklik hormonu olan testosteronun üretimi ve salgılanmasına yardımcı olmaktır (Olaizola and Huntley 2002). Leydig hücrelerinde üretilen testosteronun birincil amacı spermatogenezi (sperm üretimi) uyarmak ve olgunlaşmamış spermatozoanın (sperm) gelişimini desteklemektir. Ergenlik sonrası erkek vücudu tarafından üretilen testosteronun yaklaşık % 95' i Leydig hücrelerinde üretilir (Ovalle *et al.* 2009). Hipogonadizm, primer ya da sekonder nedenli farketmez, sonuçta testosteron üretimindeki azalmadır. Ancak, testosteron üretimindeki azalma, bir nedenden çok, sonuçtur. (Noske *et al.* 1998).

FLC, erişkin Leydig hücreleri gelişmeye başlamadan kaybolursa da, embriyodaki erkek üreme sisteminin (erkek cinsel özellikleri) gelişiminde rol alırlar (Kato *et al.* 2011). Fetal Sertoli hücreleri ile birlikte, FLC' nin androjen ürettiği tespit edilmiştir (Ferlin *et al.* 2003). Bu nedenle FLC, embriyodaki erkek özelliklerinin gelişmesinde önemli görevler üstlenir. Beyinde, hem Sertoli hücreleri hem de FLC tarafından üretilen androjenlerin süptil kalıpları etkilediği düşünülmektedir (Ovalle *et al.* 2009).

Erkek fetal cinsel farklılaşması, Leydig hücresi tarafından salgılanan androjenler ve Sertoli hücresi tarafından salgılanan anti-Müllerian hormonu tarafından yönlendirilir (Laron and Klinger 1998). Hormon insülin benzeri faktör 3 (INSL3), Leydig hücresi farklılaşmasının durumuna bağlı olarak testis Leydig hücreleri tarafından üretilir ve luteinize edici hormonun uzun vadeli trofik etkileriyle uyarılır (Piersma *et al.* 2007). Androjenlere ek olarak, FLC ayrıca transabdominal ve inguinoskrotal testisin inişini düzenleyen insülin benzeri faktör 3 (INSL3) üretir. Embriyodaki bu salgıların eksikliğinin yetişkinlerde kriptorşidizm (testislerin vücut boşluğunda tutulduğu yer) ve kısırlıkla sonuçlandığı tespit edilmiştir (Weinbauer *et al.* 2004). Burada, FLC tarafından INSL3 üretimi, daha sonra testis inişinin transabdominal fazını düzenlemekten sorumlu olan gubernakulum bağının farklılaşmasını etkiler (Aversa *et al.* 2015). Bu süreç testislerin, spermatogenez için

ideal sıcaklık aralığının (35 °C' lik optimum sıcaklıkla) uygun olduğu skrotuma doğru inmesine izin vermesi açısından özellikle önemlidir (Aghazadeh *et al.* 2015). Vücut boşluğunda, kriptorşidizm durumunda yani daha yüksek sıcaklık (37 °C) sperm üretimi için zararlıdır ve bu nedenle ideal sıcaklığın üzerindeki sıcaklıklar bireyde kısırlığa neden olur (Kim *et al.* 2008). Kriptorşidizm, germ hücreli tümörlerin yanı sıra Leydig hücre tümörleri ile ilişkilendirilmiştir (Huhtaniemi *et al.* 1999). Son araştırmalara göre, FLC' nin Sertoli hücrelerinin proliferasyonunda da rol oynadığı gösterilmiştir (Kim *et al.* 2008; Moore and Persaud. 2009) .

Sertoli hücreleri: Leydig hücreleri gibi Sertoli hücreleri de cinsel üreme sisteminin önemli bir bileşenidir. Üreme sisteminde yer alan bu iki hücre türü arasında bir takım farklılıklar vardır. Leydig hücreleri ile Sertoli hücreleri arasındaki en büyük farklardan biri, testisteki özel konumlarıyla ilgilidir (Ewing *et al.* 1983). Sertoli hücreleri, aynı zamanda germ hücreleri için çimlenme yeri olan seminifer tübüllerde bulunur. Burada Sertoli hücreleri, kan-testis bariyerini oluşturacak şekilde düzenlenmiş ve böylece belirli maddelerin Sertoli hücrelerinin oluşturduğu epitel doku boyunca hareketini engeller (Sriraman and Rao 2004). Bu, germ hücrelerini dolaşımdaki çeşitli etkenlerden koruma sağlaması ve aynı zamanda çeşitli antijenik materyalin (germ hücreleri olgunlaştıkça üretilen) hareketinin kan dolaşımına girmesini engellemesi açısından özellikle önemlidir (aksi takdirde, germ hücrelerine karşı bir otoimmün yanıt oluşturacaktır). Leydig hücreleri ise interstisyel dokuda bulunur; seminifer tübüllere bitişik yerleşimlidir. Bu nedenle, bunlar aynı zamanda geçiş hücreleri olarak da adlandırılır (Habert *et al.* 2001).

Morfolojik olarak, iki hücre türü (Leydig hücreleri ve Sertoli hücreleri) arasında farklılıklar şu şekilde tanımlanabilir: Örneğin, seminifer tübüllerde Sertoli hücrelerinin, germ hücrelerinin etrafını saran uzun sitoplazmik kollarla uzadığı gözlenmiştir (Wang and Swerdloff 2003). Bu, Sertoli hücrelerinin farklılaştıkça germ hücreleriyle etkileşime girmesine ve beslemesine izin verir. Buna ek olarak, Sertoli hücreleri belirli koşullar altında şekil değiştiren belirli büyük bir çekirdeğe sahiptirler (Qoubaitary *et al.* 2005). Leydig hücreleri ise çok yüzlü bir şekle sahiptir. Ancak iğ ve üçgen şeklinden çokgen ve diğer düzensiz şekillere kadar değişen farklı şekiller

de gösterebilirler. Bununla birlikte, Leydig hücreleri Sertoli hücreleri gibi, aynı zamanda büyük bir çekirdeğe sahiptirler (Allen *et al.* 2002).

Fonksiyonlar açısından Sertoli hücreleri, kan testis bariyerinin oluşturulmasında ve spermatozoa için besin sağlamada önemli bir rol oynar (Qoubaitary *et al.* 2005). Burada daha önce de belirtildiği gibi sitoplazmik ekstrüzyonlar sertoli hücrelerinden uzanır ve germ hücrelerinin etrafını sarar. Bu durum, hücrelerin yüzey alanını artırır ve germ hücrelerini beslemek için gerekli besinlerin transferine yardımcı olur (Beitel *et al.* 2005). Buna ek olarak, Sertoli hücreleri aynı zamanda aktivinler ve inhibitörler, anti-Müllerian hormonu ve androjen bağlayıcı proteinler gibi bir dizi madde salgılar. Bu maddeler üreme sisteminin gelişiminde rol oynar (Amory *et al.* 2003). Öte yandan, sertoli hücreleri öncelikle testosteronun üretimine ve testosteronun etkilerini arttırmaya yardımcı olur (Wang *et al.* 2004). Bu nedenle, spermatogeneze (seminifer tübüller içindeki germ hücrelerinden spermatozoa üretimi) büyük ölçüde katkı sağlar. İki hücre türünün bazı farklılıkları olsa da (morfoloji ve bulundukları yer açısından) etkileştikleri/iletişimde oldukları tespit edilmiştir (Liverman and Blazer 2004). Yetişkinlerde yapılan çalışmalar, Sertoli hücrelerinin Leydig hücre popülasyonunun korunmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Qoubaitary *et al.* 2005). Sertoli hücrelerinin çıkarıldığı bir deneyde, yetişkin Leydig hücrelerinin yüzde 70' i kaybedildiğini ve bu da Leydig hücrelerinin Sertoli hücrelerine bağımlı olduğunu göstermiştir (Amory *et al.* 2003). Öte yandan, Sertoli hücre işlevlerinin Leydig hücrelerinin işlevlerine bağlı olduğu da tespit edilmiştir (Bahrke and Yesalis 2004).

2.2. Fetüste Testis Gelişimi

Bir fetüs, gebeliğin 6. haftasına kadar eşeysiz gonadlar geliştirir ve bu dönemde erkek ve dişi fetüsler ayırt edilemez (Ovalle *et al.* 2009). Genital sırtlar ve Sertoli hücreleri, fetal büyümenin ilk haftalarında gelişmektedir (Sade vd 1998). Genital çıkıntılar, erkek fetüste testislerin seminifer tübülleri olarak eninde sonunda gelişecek olan birincil cinsiyet kordonlarının temelini oluşturur (Tinkler *et al.* 1994). Germ hücreleri, genital sırtlarda bulunur (Laron and Klinger 1998). Genital sırtlar, erken fetal gelişimde üreme organlarını böbreklere bağlayan geçici bir yapı olan mezonefrik kanalın yanında oluşur (Nakajima *et al.* 2008). Yaklaşık 4 haftalık

gebelikte genital tüberkül (fetüsün cinsiyetine bağlı olarak penis başını veya klitorisini oluşturacak) gelişmeye başlar (Anafarta vd 2007). Anüsü oluşturan deri kıvrımı ise gebeliğin 6. haftasından itibaren oluşmaktadır (Aydiner vd 2012). Erkek fetüste testisler, erkek fetüsün genital sırtının çekirdeğindeki hücreler hormon salgılamaya başladığında, gebeliğin 7. haftasından itibaren gelişmeye başlar (Barada *et al.* 1989). Salgılanan hormonlar fetüsün cinsiyetine bağlıdır ve bu hormonlar bireyde erkek ya da kadın cinsel organının mı gelişeceğini belirler (Barada *et al.* 1989).

Testosteron anahtar erkeklik hormonudur ve erkek fetüste testosteron salgılanması da gebeliğin 7. haftasında başlar (Bartsch *et al.* 1980). Bu hormon, erkek bir fetüsün gelişimini tetikler. Testosteron üretimi ayrıca gelişen hipotalamusu etkiler ve hormon salgılanması, libido ve cinsel davranışların düzenlenmesi dâhil olmak üzere hipotalamik fonksiyonları düzenler (Choi *et al.* 2010).

Sertoli hücreleri bu aşamada testis gelişiminde önemli rol oynar (Comhaire *et al.* 2005). Büyümeyi engelleyen ve dişi üreme organlarının (Müllerian kanalları olarak da adlandırılır) gerilemesine neden olan bir hormon olan Müllerian inhibe edici etken maddeler salgırlar (Cuzzocrea *et al.* 2001). Testosteron ve Müllerian-inhibe edici faktörün yokluğunda, fetüste dişi üreme organları geliştirecektir (Gillenwater *et al.* 1991).

Testosteron salgılanmasının başladığı gebeliğin 7. haftasında, geçici mezonefrik kanal, mezonefrik nefron adı verilen iki yapıya bölünür (Gürsoy ve Koptagel 1997). Erkek fetüste mesonefrik nefronlar testislerin temelini oluşturur. Testis gelişimi, mezonefrik nefronlara bağlanan iki testis kordonunun oluşmasıyla başlar (Keislinger *et al.* 1984). Her testis kordonu sonunda testisin seminifer tübüllerine dönüşür (Lu *et al.* 2010). Bu tübüller testiküler tunika albuginea ile çevrelenir ve 12. gebelik haftasında gelişen rete testise bağlanır (Gillenwater *et al.* 1991). Erkek üreme kanalları ise gebeliğin 4. ayından itibaren oluşmaya başlar (Comhaire *et al.* 2005).

Testis kordonları oluşmaya başladığında, gebeliğin 7. haftasında, gubernaculum testis adı verilen bir bağ dokusu lifi demeti de gelişir (Moore and

Persaud 2009). Bu doku, her testisten peritona bağlanmak için uzanır ve fetal gelişim döneminin çoğunda testisleri karın boşluğunun içinde tutar (Nakajima *et al.* 2008).

Gebeliğin 7. ayından itibaren meydana gelen hormonal değişiklikler, gubernakulum testislerinin kasılmasını tetikleyerek testislerin karın boşluğundan skrotuma inmesine neden olur (Steinbrenner and Linden 2001). Bu süreçten sonra testisler karın boşluğunu terk eder ve skrotumda oluşmaya başlar (Vidhyavathi *et al.* 2008). Tunica vaginalis veya testislerin dış yüzeyi de peritondan ayrılır ve yaklaşık gebeliğin 7. ayında karın boşluğundan skrotuma iner (De Luna *et al.* 2003). Testisler karın boşluğundan aşağıya doğru inemediği durumda ise testisler sperm üretemeyecekleri için işlevini yerine getiremeyecektir (Nakajima *et al.* 2008).

Testislerin karın boşluğundan aşağıya inmesinden sonraki aşamada epididim, vas deferens ve seminal veziküller (spermi penise taşıyan erkek kanal) oluşur (Barada *et al.* 1989). Testislerin yapısının diğer tüm kanallar ancak testisler skrotuma indikten sonra oluşmaya başlar. Bu kanallar topluca, spermi penise taşıyan spermatik kordonu oluşturur (Cuzzocrea *et al.* 2001).

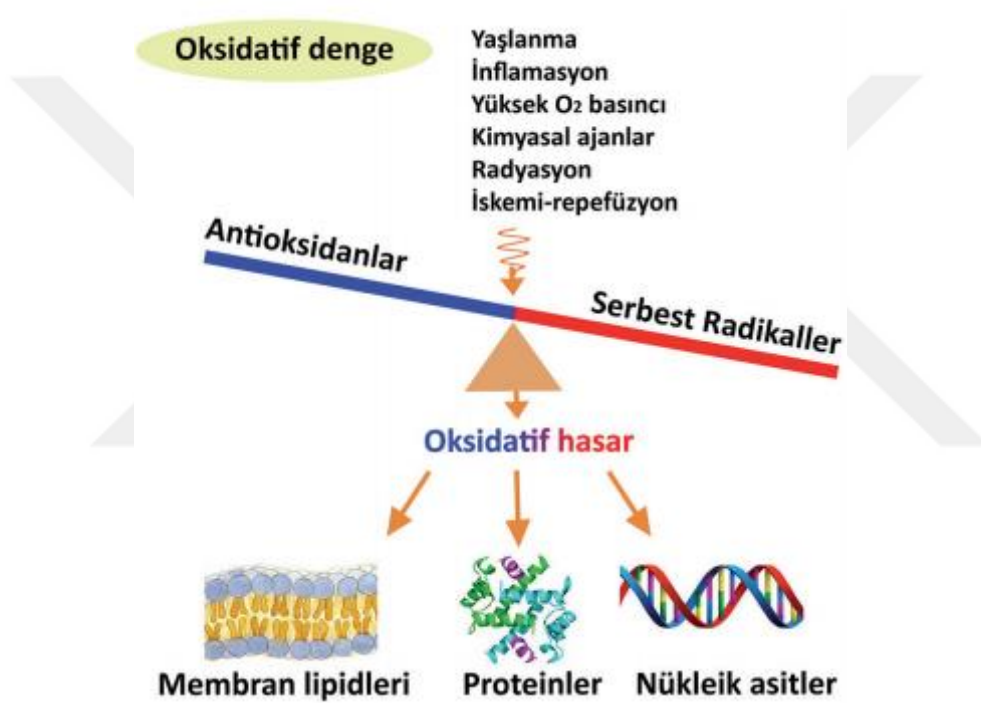
2.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, vücudunuzdaki serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik durumudur. Serbest radikaller, eşit olmayan sayıda elektrona sahip oksijen içeren moleküllerdir (Spear and Aust 1995). Eşit olmayan sayı, diğer moleküllerle kolayca reaksiyona girmelerini sağlar. Şekil 2' de görüldüğü üzere serbest radikaller, diğer moleküllerle çok kolay reaksiyona girdikleri için kimyasal reaksiyonlara neden olabilir. Bu reaksiyonlara oksidasyon denir (Jomova and Valko 2011).



Şekil 2.2. Serbest radikallerin hücreye saldırısı (Pacher and Szabo 2008).

Bu reaksiyonlar yararlı veya zararlı olabilirler. Antioksidanlar, kendilerini kararsız hale getirmeden bir serbest radikale elektron verebilen moleküllerdir. Bu, serbest radikalın stabilize olmasına ve daha az reaktif olmasına neden olur (Du *et al.* 2008). Oksidasyon, vücudunuzda gerçekleşen normal ve gerekli bir süreçtir. Oksidatif stres ise serbest radikal aktivitesi ile antioksidan aktivite arasında bir dengesizlik olduğunda ortaya çıkar. Düzgün çalıştıklarında, serbest radikaller patojenlerle savaşmaya yardımcı olabilir (Jomova and Valko 2011).



Şekil 2.3. Oksidatif denge (Özcan vd 2015).

Şekil 3' te gösterildiği gibi antioksidanların dengede tutabileceğinden daha fazla serbest radikal mevcut olduğunda, serbest radikaller vücudunuzdaki hücrelere, yağ dokusuna, DNA' ya ve proteinlere zarar vermeye başlar (Pacher and Szabo 2008; Özcan vd 2015). Proteinler, lipidler ve DNA canlı organizmanın büyük bir bölümünü oluşturur, bu nedenle hasar zamanla çok sayıda hastalığa yol açabilir (Satoh *et al.* 2002):

- Diyabet
- Ateroskleroz veya kan damarlarının sertleşmesi
- İnflamatuvar durumlar

- Hipertansiyon olarak da bilinen yüksek tansiyon
- Kalp hastalığı
- Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar
- Kanser

Oksidatif stres ayrıca, testis dokusunda çok yüksek hücre bölünmesi ve mitokondriyal oksijen tüketimi oranının yanı sıra bu dokudaki diğer dokulara göre nispeten daha yüksek doymamış yağ asitleri seviyeleri nedeniyle erkek kısırlığının gelişimi için önemli bir faktördür (Munzel *et al.* 2010).

Ayrıca, testis arterinin zayıflığı nedeniyle oksijen basıncı seviyesi düşüktür; bu nedenle, testislerde oksijen için şiddetli bir hücre rekabeti vardır. Bu nedenle, testis dokusu ve erkek üreme sistemi oksidatif strese özellikle duyarlıdır (Luther *et al.* 2011). Öte yandan, çevrede bulunan X ışınlarına, toksinlere ve kimyasallara maruz kalmanın yanı sıra varikozel gibi belirli fiziksel koşullar oksidatif stresini şiddetlendirebilir ve germ hücrelerinin apoptozunu ve ardından spermatogenezini tetikleyebilir (Moore and Persaud 2009). Bununla birlikte, normal koşullar altında, vücudun oksidatif stresin olumsuz etkilerini engellemek için antioksidan üretme kapasitesi, metabolik süreç ve genetik yapıdan etkilenir (Munzel *et al.* 2010). Diyet, kirleticiler ve kimyasallar gibi çevresel faktörler bu kapasiteyi etkileyebilir (Zhang *et al.* 2017). Dolayısıyla, vücudun antioksidan sistemi tek başına tüm serbest radikalleri nötralize edemez ve oksidatif stresin zararlı komplikasyonlarını önleyemez (Wei *et al.* 2008). Bu nedenle, antioksidanların kullanımı ve antioksidan tedavinin geliştirilmesi, oksidatif zincir reaksiyonunu bozabilir ve vücudun serbest radikal kaynaklı oksidatif stresle savaşma kapasitesini artırmada çok önemli bir rol oynayabilir ve dolayısıyla spermatogenez sürecini iyileştirebilir (Zhang *et al.* 2017).

2.3.1. Antioksidanlar

Antioksidanlar, hücrelere zarar vermeden serbest radikalleri etkisiz hale getirebilen moleküllerdir. Vücut organlarını serbest radikal hasarına karşı korumak için birbiriyle sinerjik olarak çalışan birçok karmaşık enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar vardır: Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi enzimler ile α -tokoferol (E vitamini), β -karoten, askorbik asit (C vitamini) gibi enzimatik olmayan bileşikler ve glutatyon örnek olarak verilebilir. Söz

konusu enzimler, serbest radikallerin proteinlerini yan zincirlere ve peptit bağlarına bağlanmasını sağlar (Beitel *et al.* 2005). Ayrıca antioksidanlar, bir diyetin veya diyet takviyesinin bir parçası gibi endojen veya eksojen kaynaklı olabilir. Oksidatif stres altında, endojen antioksidanlar yeterli olmayabilir ve optimal hücresel fonksiyonları sürdürmek için diyet antioksidanları gerekebilir (Sun *et al.* 1988). Literatüre göre, eksojen antioksidanlar, oksijensiz radikallere karşı ikincil savunma sistemini oluşturur. Dahası, iskemi-reperfüzyonun, patofizyolojisinde mevcut antioksidan savunma sisteminin kapasitesinin ötesinde olan aşırı miktarlarda ROT oluşumu ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır. Bu nedenle, ikincil savunma sisteminin katkısı, iskemi-reperfüzyon ile ilişkili yaralanmalarda çok önemlidir (Antony *et al.* 2020).

Bir antioksidan, serbest radikalleri ortadan kaldırmalı ve kolayca emilmeli ve redoks metallerini fizyolojik olarak uygun seviyelerde şelatlamalıdır. Redoks-aktif metaller, güçlü bir şekilde bağlanarak serbest radikallerin oluşumunda rol oynarlar. Aynı zamanda hem sulu hem de zar alanlarında çalışmalı ve gen ifadesini olumlu yönde etkilemelidir (Bahrke and Yesalis 2004).

ROT' un tamamının insan vücudunda sürekli olduğu ancak bu enzimler yardımıyla bu endojen antioksidatif mekanizmalarla yok edildiği bir gerçektir. Endojen antioksidanlar, insan metabolizmasının ürünleridir. Daha önce bahsettiklerimiz dışında, insan vücudunda çok sayıda farklı antioksidan bulunur (Rezk *et al.* 2019). Alfa-lipoik asit (ALA), koenzim Q ve melatonin bunlardan bazılarıdır. Alfa-lipoik asit, oktanoik asit ve sisteinin bir disülfür türevidir ve bir tür tiyol antioksidandır. ALA' nın serbest radikalleri süpürme, metal iyon şelasyonu ve antioksidan geri dönüşümü gibi önemli işlevleri vardır. Koenzim Q, yağda çözünen tek endojen antioksidandır. Elektronları, mitokondri içindeki kompleks I ve II' den kompleks III' e aktarır. Melatonin, bir indolamin nörohormonu olan epifiz bezinde üretilir. Pek çok fizyopatolojik işlevi vardır. Melatoninin önemli bir işlevi, serbest radikalleri temizlemek için oksijen metabolizmasıdır (Vaos and Zavras 2017).

2.3.2. Serbest radikaller

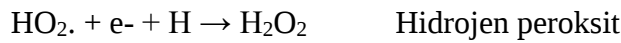
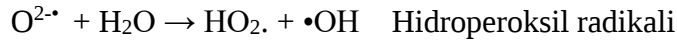
Serbest radikal, atomik yörüngede eşleşmemiş bir elektron içeren, bağımsız olarak var olabilen herhangi bir moleküler türü olarak tanımlanabilir. Eşleşmemiş bir elektronun varlığı, çoğu radikal tarafından paylaşılan bazı ortak özelliklerle

sonuçlanır. Birçok radikal kararsız ve oldukça reaktiftir (Paduch and Skoog 2004). Serbest radikaller ya diğer moleküllere bir elektron bağışlayabilir ya da başka moleküllerden bir elektron kabul edebilirler, bu nedenle oksidan ya da indirgeyici olarak davranırlar. Pek çok hastalık durumunda oksijen içeren en önemli serbest radikaller hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, oksijen singleti, hipoklorit, nitrik oksit radikali ve peroksinitrit radikalidir. Bunlar, çekirdekte ve DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipidler gibi biyolojik olarak ilgili moleküllere zarar verebilen hücrelerin zarlarında yüksek düzeyde reaktif türlerdir. Serbest radikaller, hücre hasarına ve homeostatik bozulmaya yol açan önemli makromoleküllere saldırır. (Moncada *et al.* 1991).

Bu reaksiyonlar, doku hasarına neden olan bir oksidatif reaksiyonlar zinciri yoluyla meydana gelir. Çoğu biyolojik yapı için (lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi), serbest radikal hasarı, oksidatif hasar ile yakından ilişkilidir ve lipid ve protein peroksidasyonunu indükleyerek ve nükleik asitlere zarar vererek doğrudan hücresel hasara neden olur (Aitken and Clarkson 1987). Biyolojik olarak en önemli serbest radikaller oksijen merkezli olduğundan, pek çok biyolojik sistemde, serbest radikaller genellikle ROT olarak adlandırılır. Hücrelerde üretilen ROT, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$) ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) içerir, ancak H_2O_2 teknik olarak çiftlenmemiş elektron içermediği için serbest radikal olarak kabul edilmez. Bununla birlikte, H_2O_2 , demir ve bakır gibi reaktif geçiş metalleri ile etkileşimler yoluyla oldukça reaktif serbest radikaller hidroksil üretme kabiliyeti nedeniyle reaktif bir oksijen türü olarak kabul edilir (Aitken and Clarkson 1987). Reaktif nitrojen türleri (RNT), hücresel işlevi değiştirebilen başka bir serbest radikal grubudur. RNT toplu olarak nitrojen merkezli radikalleri ifade eder ve nitrik asit (NO), peroksinitrit ($ONOO^-$), nitrojen dioksit radikalini (NO_2) içerir. RNT, diğer nitrojen oksitlerini ve NO, $O_2^{\cdot-}$ peroksil radikali ($RO\cdot$) ve alkoksil radikali ($ROO\cdot$) ile reaksiyona girdiğinde ortaya çıkan ürünleri de içerir (Zini *et al.* 1996).

ROT, bakterilerin nötrofil granülositler tarafından hücre içi öldürülmesi, karaciğer tarafından detoksifikasyon, prostaglandin üretimi ve belirli hücre sinyalleme süreçleri dâhil olmak üzere bir dizi fizyolojik süreçte bazı önemli roller oynamaktadır (Paduch and Skoog 2004). İnsanlarda $O_2^{\cdot-}$, oksidatif fosforilasyon veya doğal yan ürün olarak mitokondride (solunum) O_2 'nin bir elektron azalması sırasında

üretileen en yaygın üretilen ve iyi çalışılmış ROT' tur. Moleküler oksijen (O_2), paralel spin konfigürasyonlarına sahip iki eşleşmemiş elektron içerir. H_2O ya tamamen indirgenmesi, elektronların ardışık transferini gerektirir, bu da $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 ve $\bullet OH$ dâhil olmak üzere diğer yüksek derecede reaktif ara maddelerin oluşumuyla sonuçlanır. Oksijenin tamamen azaltılması aşağıdaki denklemlerde özetlenmiştir (Zini *et al.* 1996):



Serbest radikal reaksiyonların, vücutta yaşla birlikte biriken ilerleyici olumsuz değişiklikler üretmesi gözlenebilmektedir. Kanseri ve ateroskleroz, göze çarpan “serbest radikal” hastalıklarıdır. Kanseri başlatması ve yükselmesi, kromozom kusurları ve onkojen aktivasyonu ile ilişkilidir. İyonlaştırıcı radyasyon tarafından başlatılanlar gibi endojen serbest radikal reaksiyonlarının tümör oluşumuna neden olması mümkündür. 55 yaşın üzerindeki kişilerde yağ ve sıvı yağ tüketimi ile lösemi ve meme, yumurtalık ve rektumun malign neoplazisinden ölüm oranları arasındaki son derece önemli korelasyon, daha fazla lipid peroksidasyonunun bir yansıması olabilir. Ateroskleroz üzerine yapılan çalışmalar, hastalığın, peroksitler ve diğer maddeler üretmek için arteriyel duvarda ve serumda diyet kaynaklı lipidleri içeren serbest radikal reaksiyonlarından kaynaklanma olasılığını ortaya koymaktadır. Bu bileşikler, endotel hücre hasarına neden olur ve arter duvarlarında değişiklikler üretir (Paduch and Skoog 2004). Aşırı ROT ve RNT üretimi ve/veya antioksidan savunmanın azalması söz konusu olduğunda, oksidatif ve nitrozatif stres (O ve NS) meydana gelir ve çeşitli patolojilerde doku hasarına neden olur (Cuzzocrea *et al.* 2001).

Erkek üreme sisteminde, fizyolojik ROT miktarları, sperm fonksiyonu, akrozom reaksiyonu, hiperaktivasyon ve spermatozoanın oositle füzyonu üzerinde önemli rol oynar. Belirli koşullarda O ve NS, toksik maddeye maruz kalma, orşit/inflamasyon, varikosel, kriptorşidizm, yaşlanma ve testis torsiyonu gibi erkek fertilitesi için zararlı bir rol oynayabilir (Berlett and Stadtman 2007).

2.3.3. Süperoksit dimutaz (SOD)

Süperoksit serbest radikalinin yani $O_2^{\cdot-}$ molekülünün H_2O_2 ve O_2 moleküllerine dönüşümünü katalizleyen antioksidant is SOD antioksidan enzimidir. $O_2^{\cdot-}$, oksijen metabolizmasının bir yan ürünü olarak üretilir ve dönüşümü sağlanmadığı takdirde birçok hücre hasarına neden olabilir. H_2O_2 de zararlıdır ve katalaz gibi diğer enzimler tarafından bozular. Bu nedenle, SOD, oksijene maruz kalan neredeyse tüm canlı hücrelerde önemli bir antioksidan savunmadır (Hess 1995).

SOD' lar ayrıca ROT' lara bağlı yaralanmalara karşı savunmanın ön cephesini oluşturur. Bu proteinler, süperoksit anyon serbest radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) moleküler oksijen ve H_2O_2 dönüştürülmesini katalize eder ve aşırı konsantrasyonlarda ise hücrelere zarar veren O_2 seviyesini düşürür. Bu reaksiyona, SOD' ların aktif bölgesinde bulunan metal iyonlarının alternatif oksidasyon-indirgenmesi eşlik eder. Aktif bölgelerde bulunan metal kofaktörlere bağlı olarak, SOD' lar dört farklı gruba ayrılabilir: Bakır-Çinko-SOD (Cu, Zn-SOD), Demir SOD (Fe-SOD), Mangan SOD (Mn-SOD) ve Nikel SOD (Zhang *et al.* 2008).

2.3.4. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), $CH_2(CHO)_2 \rightarrow HOC(H) = CH-CHO$ formülü ile gösterilir bir enoldür. MDA, hücrelerdeki çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir. Serbest radikallerdeki bir artış, MDA' nın aşırı üretimine neden olur. MDA seviyesi, kanserli hastalarda oksidatif stres ve antioksidan durumunun tespiti için başvurulmuş bir moleküldür. MDA reaktiftir ve potansiyel olarak mutajeniktir. Ayçiçeği ve palmye yağı gibi ısıtılmış yemeklik yağlarda bulunmuştur (Didziapetriene *et al.* 2014).

2.4. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

I/R hasarının önlenmesi amacıyla pek çok tedavi amaçlı yöntem öne sürülmüştür. Bu tedavi edici deneysel çalışmalarda dehidroepiandrosteron (Aksoy vd 2007), ibuprofen (Dokmeci vd 2007), erdostein (Koc vd 2005), kafeik asit fenil ester (Uz vd 2002), allopurinol (Akgur vd 1994), sildenafil (Beheshtian *et al.* 2008), verapamil (Sarica vd 1999), propofol (Yagmurdu vd 2006), barbaloin (Topdağı vd

2019), higenamin (Tanyeli vd 2020) ve Cryptotanshinone (Tanyeli vd 2019) gibi farklı ilaçların koruyucu ve/veya tedavi edici etkinliği araştırılmıştır. Tüm bu tedavi edici deneysel çalışmalara karşın klinik uygulama konusunda bir fikir birliğine varılamamıştır.

Bu çalışmada ise 6-SHO (‘‘bkz.’’şekil 2) molekülü kullanılarak bu molekülün testiküler T/D ile oluşturulan testiküler dokunun oksidatif hasarı üzerindeki hasarı hafifletici ya da azaltıcı olası yararlı etkileri incelenecektir. 6-SHO, MDA-MB-231 hücre invazyonunun güçlü bir inhibitörüdür ve moleküler mekanizma, en azından kısmen Nükleer Faktör Kabba B aktivasyonunu hedefleyerek MMP-9 transkripsiyonunun regülasyonunu içerir (Ling *et al.* 2010). Doğal olarak oluşan bu küçük moleküller sınıfı antimetastatik tedaviler olarak klinik kullanım potansiyeline sahiptir (Overall and Lopez-Otin 2002).

2.5. Testis Torsiyonu

Testiste ortaya çıkan testis torsiyonu 1840 gibi erken bir tarihte tanımlanmıştır. Ancak acil teşhis ve tedavi gerektiren bir vasküler acil durum olarak tanınması uzun zaman almıştır (Midzak *et al.* 2015). Ani gelişen skrotal ağrı ve testiste şişlik olan bir hastada testis torsiyonunun basit bir teşhisi olarak kabul edilmektedir (Rone *et al.* 2009). Bu durumun teşhis edilememesi, testis kaybına yol açabilir. Sorun, nispeten benzer geçmişe ve bulgulara sahip bir dizi koşulla birleşir. Bunlar, öncelikle akut epididimo-orşit ve testis uzantılarının torsiyonunu içerir (Cuzzocrea *et al.* 2001). Şüpheli torsiyon durumlarında izlenecek kesin algoritma konusunda fikir birliği yoktur. Uzman klinisyen bile testis torsiyonu ile epididimo-orşit arasında klinik olarak kesin bir ayrım yapamaz. Testis torsiyonundan şüphelenilen bir hasta için geleneksel değerlendirme, klinik değerlendirme ve ardından acil cerrahi inceleme şeklindedir (Zirkin *et al.* 1980). Bu hastaya genellikle akut epididimo-orşit tanısı ameliyathanede yapılır. Bu hüküm, gereksiz cerrahi müdahaleye yol açarak maliyet ve morbiditenin artmasına neden olabilmektedir. Kısırlığın mekanizmasının bilinmemesine rağmen literatürde testis torsiyonunun doğurganlığı azaltabileceği tespit edilmiştir (Barsoum *et al.* 2013).

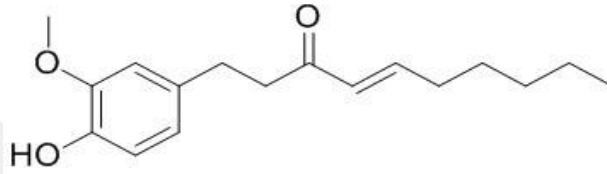
Testislerin ve spermatik kordun torsiyonu klinikte sıklıkla karşılaşılan acil müdahale gerektiren ürolojik durumlardan biridir (Gülmez vd 1988). Potansiyel olarak erkek subfertilitesine yol açan testis hasarına neden olur (Darrell and Cass 2005). Spermatik kordun ve spermatik yapıların kendi etrafında dönmesi biyokimyasal ve histolojik değişikliklerle sonuçlanır (Niki *et al.* 2005). Bununla birlikte, testis detorsiyonunu takiben, dokular iskeminin indüklediğinden daha ciddi hasara neden olan reperfüzyona da maruz kalabilir (Gülmez vd 1988).

Testiküler hasarın birincil nedenleri ROT' un aşırı üretimi, mitokondriyal kalsiyum konsantrasyonunda artış ve artmış hücrel apoptoz olduğu bilinmektedir (Martin and Tremblay 2010). Bu bakımdan günümüze kadar çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda farklı ilaçların potansiyel yararları ve yan etkileri değerlendirilmiştir (Niki *et al.* 2005). Dahası bu maddelerin, deneysel ve bazen klinik olarak I/R takiben meydana gelen hücrel hasarda tedavi edici bir rol oynadığı ortaya konulmuştur (Darrell and Cass 2005). Antioksidanlar, kalsiyum kanal blokerleri, fitoterapötik ilaçlar, anestezikler, hormonlar ve trombosit inhibitörleri, bir adjuvan geri yükleme terapisi için potansiyel olarak sağlam bir temel oluşturabilir ve burulmadan sonra testis fonksiyonunu iyileştirebilir (Niki *et al.* 2005).

Testis torsiyonu, genç fertil erkeklerde ortaya çıkabilecek ve testis hasarına neden olan klinik acil bir durumdur (Niki *et al.* 2005). Testis detorsiyonunu takiben, dokular reperfüzyona uğrar, bu da iskemi tarafından indüklenenden daha ciddi hasara neden olur (Güler vd 2020). Bu nedenle testis torsiyonunda, torsiyonun süresi ve derecesi hasarın şiddetini belirlemede önemlidir (Ozturk vd 2014). Çünkü I/R hasarı, akut iskeminin bir döneminden sonra kan dolaşımı düzeldiğinde ortaya çıkar (Ekinci Akdemir ve Tanyeli 2020). Bu tür yaralanmalarda, dokuya kan akışı başlangıçta kesilir ve metabolik olarak aktif dokulara zarar verir (Wei *et al.* 2008). Bununla birlikte, dokulara kan akışının yeniden sağlanması, intraselüler serbest oksijen radikal üretimi, hücre içi kalsiyum aşırı yüklenmesi ve lipid peroksidasyonu dâhil olmak üzere paradoksal olarak birçok olaylar dizisini başlatır ve bu da daha fazla hücrel ve doku hasarına yol açar (Kandhare *et al.* 2017). İskeminin başlamasının ardından ATP hipoksantin' e indirgenir ve ksantin dehidrojenaz ksantin oksidaza

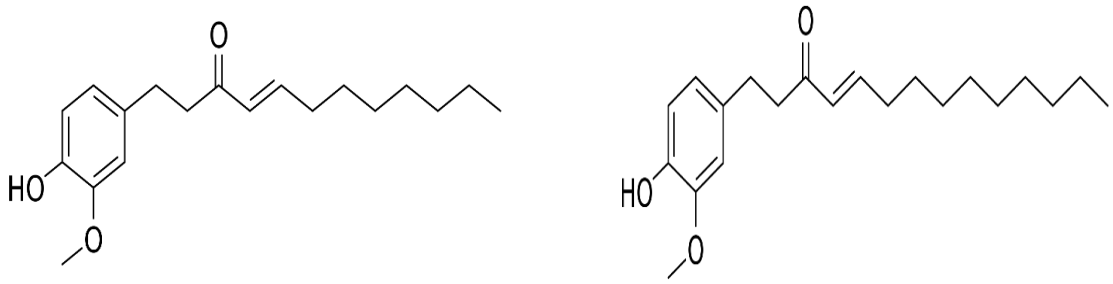
dönüştürülür (Wang *et al.* 2019). Testiküler I/R, henüz tam olarak anlaşılmayan karmaşık bir hücrel ve moleküler reaksiyon çağrısını aktive eder (Atik vd 2006). Bununla birlikte, çok sayıda çalışma tarafından, iskemik testislere kan tedariğinin restorasyonunun sağlanması, ROT' ların aşırı üretimi ve mitojenle aktive edilmiş protein kinazları aktive eden testiküler oksidatif stresin üretimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Duman vd 2015). Testiküler I/R, lipid peroksidasyonuna, protein denatürasyonuna, DNA hasarına ve apoptozisin aktivasyonuna yol açar (Al-Maghrebi *et al.* 2012).

2.6. 6-Shogaol Kimyasal Yapısı ve Farmakokinetiği



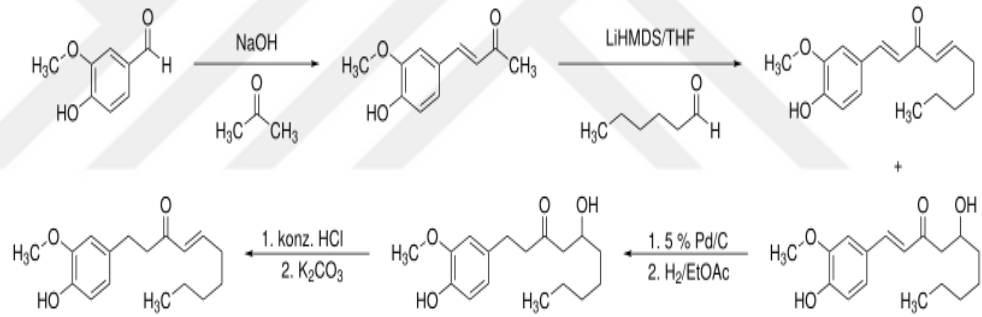
Şekil 2.4. 6-shogaol molekülünün kimyasal yapısı.

Shogaol, 8-shogaol ve 10-shogaol (tümü zencefilde bulunur) birlikte shogaol grubunu oluşturur (Hung-Cheng 2014) (Şekil 2.5). Zencefil kültürlerinde metillenmiş shogaollerde de vardır: bunlar metil 6-SHO ve metil 8-shogaol şeklinde sıralanabilir (Ling *et al.* 2010). Shogaoller, depolama sırasında veya aşırı ısıyla oluşan artefaktlardır ve muhtemelen gingerollerin dehidrasyon reaksiyonu ile şekillenmiştir. Shogaollerin gingerollere oranı bazen ürün kalitesinin bir göstergesi olarak alınır (Hibbs *et al.* 1985).



Şekil 2.5. 8-shogaol ve 10-shogaol.

Şekil 2.4' te görüldüğü üzere 6-SHO sentezi, dehidrozingeron üreten, vanilin ve asetonun klozen yoğunlaşmasıyla başlar (Hung-Cheng 2014). Daha sonra ürün, bir aldol yoğunlaşmasında tetrahidrofuran içinde heksanal ile 6-dehidroshogaol ve 6-dehidrogingerole reaksiyona girer. Reaksiyon bitince bir katalizörle 6-gingerole hidrojene edilebilir. Son aşamada, istenen 6-SHO' yu elde etmek için hidroklorik asit eklenir (Harold 2004).



Şekil 2.5. 6-shogaol' ün vanilinden sentezi.

Zinc *et al.* (2008) 6-SHO' nun farmokinetik etkileri incelediği çalışmasında insan gönüllülerine 100 mg ila 2,0 g (N = 27) dozlarında zencefil verilmiş uygulamadan sonra 15 dakika ila 72 saat aralığında katılımcıların kan örnekleri alınmıştır. Katılımcıda saptanabilir serbest 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol veya 6-shogaol bulunmamıştır. Ancak 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol ve 6-shogaol glukuronidler tespit edilmiştir. 6-gingerol sülfat konjugatı 1.0-g dozun üzerinde tespit edilmiştir. 2.0 g doz için tahmin edilen Cmax ve eğri altındaki alan (ortalama $\pm$ SE) 0.85 ± 0.43 , 0.23 ± 0.16 , 0.53 ± 0.40 ve 0.15 ± 0.12 $\mu\text{g/mL}$ ' dir; ve 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol ve 6-shogaol için 65.633 ± 44.4 , 18.1 ± 20.3 , 50.1 ± 49.3 ve 10.9 ± 13.0 $\mu\text{g}\cdot\text{saat/mL}$. Karşılık gelen tmax değerleri 65.6 ± 44.4 , 73.1 ± 29.4 , 75.0

± 27.8 ve 65.6 ± 22.6 dakikadır ve analitlerin eliminasyon yarılanma ömrü <2 saattir. Bu sonuçlar, 6-SHO' nun çoğunlukla vücutta metabolize olduğunu ve metabolitler olarak atıldığını göstermektedir.

Zencefil ve türevleri eski zamanlardan beri besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. Zencefil son yıllarda düşük toksisitesinin yanı sıra geniş terapötik etkileri nedeniyle dünyanın dört bir yanında araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Antioksidan, anti-inflamatuvar, anti-apoptotik, analjezik, sitotoksik, anti-proliferatif, antitümör ve anti-trombosit etkileri zencefilin ana terapötik aktiviteleri olarak sıralanabilir. Zencefil kök sapında en çok bulunan anti-oksidant madde ise 6-SHO' dur (Ling *et al.* 2010).

2.7. Özgün Değer

Testiküler T/D ile indüklenmiş I/R kaynaklı testis dokusunun oksidatif hasarı, hücre içinde birçok biyokimyasal reaksiyonla üretilen ROT' lar aracılığı ile primer ve uzak organ hasarları ile sonuçlanır. Torsiyonun süresi ve şiddeti ile dokuların bu sürece gösterdiği hassasiyet, I/R hasarın genişlemesinde önemli rol oynar. Bu nedenle, I/R hasarında oksidatif stresin biyokimyasal mekanizmalarının anlaşılması doku ve organlara yönelik yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesinde klinikte önemli bir role sahiptir. Bu alanda yapılacak çalışmalar, testiküler T/D ile oluşturulan testiküler dokunun oksidatif hasar yanıtını ortaya koymakta yararlı olacaktır.

Detaylı literatür taramalarımız sonucunda deneysel testiküler T/D ile oluşturulan testiküler dokunun I/R kaynaklı oksidatif hasarının hafifletilmesi ya da azaltılmasında 6-SHO' un olası yararlı etkilerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu bakımdan sunduğumuz bu çalışmada, deneysel testiküler T/D ile oluşturulan testiküler dokunun oksidatif hasarının hafifletilmesi ya da azaltılmasında 6-SHO' nun olası yararlı etkilerini değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2.8. Yaygın Etki

Bu tez çalışmasının verileri ulusal ve uluslararası kongre ve sempozyumlarda sunulacaktır. Ayrıca çalışmanın verilerinin daha geniş bir akademik camiaya ulaşabilmesi uluslararası yaygın etkisi geniş olan uluslararası indexli dergilere gönderilerek yayımlanması planlanmaktadır.



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından 04.11.2020 Tarih ve 202 Toplantı Karar Numarası ile onaylanılan etik izinler alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın tüm hayvan deneyleri Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Araştırma ve Uygulama Merkezinde (ATADEM) gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. İlaçlar, Denekler ve Laboratuvar Koşulları

Bu çalışmada kullanılan 6-Shogaol (≥ 99 pure) (1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-decen-3-one) Sigma Aldrich USA firmasından satın alınarak temin edildi. Sunulan deneysel çalışmada kullanılan ortalama 200 ± 10 gr ağırlıklarda ve Wistar tip erkek ratlar Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Araştırma ve Uygulama Merkezinden (ATADEM) temin edildi. Tüm deney hayvanları deney protoklü süresince oda sıcaklığının korunduğu ortalama 25°C sıcaklıkta, aydınlık/karanlık döngüsünün korunduğu (12 saat aydınlık/12 saat karanlık) standart % 55 nemin sağlandığı laboratuvar koşullarında standart kafeslerde tutulup musluk suyu ve standart rat yemi ile beslendi. Yalnızca torsiyon/detorsiyon işleminden 12 saat önce hayvanlar aç bırakıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Protokolü

Sunulan bu tez çalışmasında 18 adet Wistar tip erkek rat her grup 6 hayvan olacak şekilde tartılarak gruplar homojen olacak şekilde düzenlenerek 3 gruba ayrıldı. Gruplar, Sham, T/D ve 6-SHO+T/D grupları biçiminde tasarlandı.

Sham Grubu: Bu grupta bulunan ratlara sadece skoratal hatta insizyon açılıp kapatıldı ancak herhangi bir başka işlem ve tedavi uygulanmadı. Deney süresinin sonunda yüksek doz anestezi uygulanan ratlar kurban edilmek suretiyle hızlıca testis dokuları çıkarıldı.

T/D Grubu: Bu gruptaki ratlara ketamin/ksilazin (50/10 mg/kg, i.p) uygulanarak derin anestezi sağlanarak tek taraflı (sol testis) testiküler T/D modeli yapıldı. Bu işlem için skrotuma orta hat insizyonu yapılarak sol testis serbestleştirildi ve saat yönünde 720° döndürülerek bu pozisyonda skrotuma 2 saat süresince sabitlendi. Daha sonra torsiyon süresinin tamamlanmasının akabinde sol testis tekrar eski pozisyona geri döndürülere 2 saat süreyle yeniden kanlanması sağlanarak detorsiyon gerçekleştirildi. Tez çalışmamızda uygulamış olduğumuz T/D modeli literatürde yer alan önceki çalışmalar referans alınarak gerçekleştirilmiştir (Topdağı vd 2019; Tanyeli vd 2020).

6-SHO+T/D Grubu: T/D işlemi T/D grubunda tanımlandığı üzere bu grupta da aynı şekilde uygulandı. Ancak torsiyon işleminden 30 dakika önce ratlara 6-SHO 20 mg/kg dozda i.p. olarak verildi. Bu tez çalışmasında kullanılan 6-SHO dozu literatürdeki çalışmalar referans alınarak seçilmiştir (Güler vd 2020).

Deney protokolü başlatılmadan önce hayvanlar tartıldı ve ilaç uygulamaları hayvanların ağırlıkları dikkate alınarak i.p. yolla uygulandı. Tüm hayvanlar deney süresinin tamamlanmasıyla birlikte yüksek doz ketamin/ksilazin (150/40 mg/kg) ile anestezi yapılarak sakrifiye edildi ve oksidatif hasarı doku hasarını değerlendirebilmek üzere testis dokuları hızlıca alınarak biyokimyasal analizler yapılncaya kadar uygun sıcaklıkta saklandı.

3.2.2. Numunelerin Hazırlanması

Dokular gerekli miktarlarda alınarak tartıldı ve çalışılması planlanan parametreye özgü tampon çözeltiler içinde homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Daha sonra homojenatlar 5000 rpm' de +4 °C' de 30 dakika süreyle santrifüj edilerek MDA, MPO, SOD, TOK (Total Oksidan Kapasite), TAK (Total Antioksidan Kapasite) analizleri yapılmak üzere çalışılacakları güne kadar -80 °C' de derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.3. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Tez çalışmamızın deney süresince ve deney sonrasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar Çizelge 3.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar/aletler.

Cihaz/Alet	Firma
Santrifüj	Beckman Coulter
Derin dondurucu (-80 °C)	Sanyo
Vorteks	Velp Scientifica
Mikroplate okuyucu spektrofotometre	BioTek
96 kuyucuklu mikroplate	Termo
Pipetler (2-20µL, 20-200µL, 100-1000µL)	Eppendorf
Hassas terazi	Denver Instrument

3.2.4. Malondialdehit Ölçümü (MDA)

Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu ile ölçülebilen son ürün olarak MDA meydana gelmektedir. Lipit peroksidasyonu, doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle etkileşmesi sonucu, doymamış yağ asitindeki metilen grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Yağ asiti peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek pembe renkli bir kompleks oluşturur. Metodun prensibi absorbandsın 532 nm dalga boyunda ölçümü ve MDA aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanır (Ohkawa *et al.* 1979).

Kullanılan Çözeltiler:

1. TBA Çözeltisi (% 0.9): 0.9 g TBA bir miktar saf suda hafifçe ısıtılarak çözülür, hacim 100 mL’ ye tamamlanır. Çözelti taze olarak hazırlanır.
2. Piridin/n-Bütanol Çözeltisi (1/15): Çözelti 30 mL 1-bütanole 2 mL piridin eklenmesi ile hazırlanır.
3. Sodyum dodesil sülfat (SDS) Çözeltisi (% 8.1): 4.05 g SDS saf suda çözünür, hacim 50 mL’ ye tamamlanır.

4. Asetik Asit Çözeltisi (% 20): % 100' lük asetik asitten 20 mL alınır ve son hacim saf suyla 100 mL' ye tamamlanır.

5. Stok Standart Çözeltisi (200 µM): 1,1,3,3-tetraetoksipropandan 25 µL alınıp 500 mL saf suda karıştırılarak çözünür. Taze hazırlanmalıdır. Seri dilüsyonla stok standarttan 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, ve 0 (saf su kullanılır) µM' lık standartlar hazırlanır. Cam tüplere Çizelge 3.2' deki çözeltiler pipetlendi.

Çizelge 3.2. MDA ölçümü

	Numune Tüpü	Standart Tüpü	Kör Tüpü
SDS %8,1	200 µL	200 µL	200 µL
Asetik Asit % 20	1500 µL	1500 µL	1500 µL
TBA % 0.9	1500 µL	1500 µL	1500 µL
Numune	100 µL	-	-
Standart	-	100µL	-
Distile su	700 µL	700 µL	800 µL

Tüm tüplerin kapakları kapatılıp vortekslendi ve sıcaklığı 95 °C olan su banyosunda 1 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda çeşme suyu ile soğutuldu. Daha sonra her bir tüpün süpernatantından 600 µL alınarak karşılık gelen ependorflara aktarıldı. Her bir ependorfa Çizelge 3.3' teki pipetlemeler yapıldı.

Çizelge 3.3. MDA ölçümü

	Numune Tüpü	Standart Tüpü	Kör Tüpü
Distile su	150 µL	150µL	150 µL
n-Bütanol/piridin	750 µL	750 µL	750 µL

Ependorflar vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra 1250 gramda 10 dakika santrifuj edildi. Oluşan fazlar karıştırılmadan üst fazdan 200 µL alınarak tüm kuyucuklara pipetlendi. Mikroplate okuyucuda numune ve standartlar köre karşı 532 nm dalga boyunda okutuldu. Standart grafik yöntemi ile cihazın yazılım programı

(KC Junior) kullanılarak numunelerin konsantrasyonları hesaplandı. Konsantrasyon $\mu\text{mol/L}$ olarak ifade edildi.

3.2.5. Myeloperoksidaz Ölçümü (MPO)

H_2O_2 varlığında MPO ile o-dianisidine' nin oksidasyonu sonucu oluşan sarımsı-turuncu renkli kompleksin 460 nm dalga boyunda absorbansının kinetik olarak ölçümü esasına dayanır (Bradley *et al.* 1982).

Kullanılan Çözeltiler:

1. % 0.5 hexadecyltrimetil ammonium bromide
2. o-dianisidine dihydrochloride
3. H_2O_2 (% 30' luk)
4. Fosfat tamponu (50 mM, pH: 6.0)

Ölçüm reaktifi: 0,0075 gr o-dianisidine dihydrochloride, 4,5 mL H_2O_2 , 0,3062 gr KH_2PO_4 alınıp 40 mL distile suda çözüldü. pH6' ya ayarlandı. Distile su ile 45 ml ye tamamlandı.

Çizelge 3.4. MPO ölçümü

	Numune Tüpü	Kör Tüpü
Numune	20 μL	-
Deiyonize su	-	20 μL
Ölçüm reaktifi	280 μL	280 μL

Kuyucuklara pipetlemeler yapıldıktan sonra mikropate okuyucuda 460 nm dalga boyunda köre karşı 5 dakika boyunca absorbans artışı ölçüldü. Lineer aktivite artışının gözlemlendiği reaksiyon grafiğinde hesaplamalar yapıldı.

Hesaplama:

$$\text{MPO (U/L)} = \frac{\Delta A/t \times 10^6 \times SK}{1.3 \times 10^4}$$

$\Delta A/t$: Dakikadaki absorbans değişimi

SK: Seyreltme katsayısı

1.3×10^4 : o-dianisidine'nin 460 nm' deki molar absorbtivite katsayısı

10^6 : Molü mikromole çevirme katsayısı

3.2.6. Süperoksit Dismutaz Ölçümü (SOD)

Süperoksit dismutaz süperoksit serbest radikalının ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Oluşan süperoksit, SOD enziminin etkisinin yetersiz kaldığı durumlarda tetrazolyum tuzu ile reaksiyona girerek formazan boyasını oluşturur ve SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür (Sun *et al.* 1988).

Kullanılan Çözeltiler:

Assay reaktifi:

1. Xanthine (0.3 mM): 0.00913 gr xanthine 200 mL distile suda çözüldü. 1 M lık NaOH dan 1 damla çözmek için kullanıldı.
2. EDTA (0.6 mM): 0.023 gr EDTA disodyum tuzu 100 mL distile suda çözüldü.
3. NBT: 0.0123 gr Nitroblue tetrazolium 100 mL distile suda çözüldü. Renkli şişede saklandı.
4. Na_2CO_3 (0.4 M): 2.544 gr Na_2CO_3 60 mL distile suda çözüldü.
5. Bovine serum albümin (1gr/L) : 0.03 gr Bovine serum albümin 30 mL distile suda çözüldü.

Hazırlanan bu beş reaktif deneyden hemen önce renkli bir şişede birleştirildi. Ve iyice karıştırıldı.

*Xanthine oksidaz (167U/L) : 50 μ L xanthine oksidaz alındı. 600 μ L 2M $(NH_4)_2SO_4$ ile dilüe edildi. $(NH_4)_2SO_4$ buz gibi soğuk ve taze olmalıdır.

*2M $(NH_4)_2SO_4$: 2.643 gr $(NH_4)_2SO_4$ 10 mL distile suda çözüldü.

Hazırlanan beş reaktiften, 20 mL Xanthine, 10 mL EDTA, 10 mL NBT, 6 mL Na₂CO₃, 3 mL BSA deneyden hemen önce renkli şişede birleştirildi.

Çizelge 3.5. SOD ölçümü

	Numune Tüpü	Kör Tüpü
Numune	20 µL	-
Deiyonize su	-	20µL
Ölçüm reaktifi	280 µL	280 µL
Xantine Oxidase	10 µL	10 µL

Mikroplate nazikçe karıştırıldı. 25 °C de 20 dakika inkübe edildi. 20 dakika sonra oluşan mor renkli kompleksin absorbansları mikroplate okuyucuda 560 nm de okutuldu.

Hesaplama:

1U: % 50 lik NBT inhibisyonu

$$\% \text{ inhibisyon: } \frac{(A_{\text{kör}} - A_{\text{numune}})}{A_{\text{kör}}} \times 100$$

SOD (U/mL): % inhibisyon / (50x 0,01)

3.2.6. Total Antioksidan Kapasitesi (TAK) Ölçümü

TAK' ın belirlenmesi ticari olarak sağlanan (Rel Assay Diagnostics) ile yapıldı. Ölçüm, numunedeki antioksidanların koyu mavi-yeşil renkli 2,2'- azino bis (3-etil benzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirgemesi esasına dayanır. 660 nm' deki absorbans değişimi numunedeki total antioksidan düzeyi ile ilişkilidir. Kit, stabil bir antioksidan standart olarak bir E vitamini analogu olan ve klasik olarak "trolox equivalent" diye adlandırılan bir çözelti ihtiva eder.

Reaktif Bileşimi

R1: tampon solüsyon

R2: prokromojen solüsyon (ABTS)

Standart: trolox

QC1: trolox

QC2: trolox

Çizelge 3.6. TAK ölçümü

	Numune	Standartlar (standart, H ₂ O)
Standart çözelti	-	30 µL
Numune	30 µL	-
R1	500 µL	500 µL
Karıştırıldı ve 30 saniye sonra 1. okuma (A1) yapıldı.		
R2	75 µL	75µL
Karıştırıldı ve 5 dakika sonra 2. okuma (A2) yapıldı.		

Hesaplama:

A2-A1=standart veya numunenin absorbans farkı

$$\text{Sonuç} = \frac{[(\Delta\text{Abs H}_2\text{O}) - (\Delta\text{Abs Numune})]}{[(\Delta\text{Abs H}_2\text{O}) - (\Delta\text{Abs Standart})]}$$

Birim: mmol/L

3.2.7. Total Oksidan Kapasitesi (TOK) Ölçümü

TOK ölçümü ticari olarak sağlanan kit (Rel Assay Diagnostics) ile yapıldı. Numunede mevcut oksidanlar, ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyon yükseltger. Oluşan ferrik iyon asidik ortamda kromojenle renkli bir kompleks

meydana getirir. Spektrofotometrik olarak belirlenebilen renk yoğunluğu numunede bulunan oksidan moleküllerin total miktarıyla ilişkilidir.

Reaktif Bileşimi:

R1: tampon solüsyon

R2: substrat solüsyon

SSS: stabilize standart solüsyon

QC1: Kontrol 1

QC2: kontrol 2

Çizelge 3.7. TOS ölçümü

	Numune	Standart
Standart çözelti	-	75µL
Numune	75 µL	-
R1	500 µL	500 µL
Karıştırıldı ve 30 saniye sonra 1. okuma (A1) yapıldı.		
R2	25 µL	25µL

Karıştırıldı ve 5 dakika sonra 2. okuma (A2) yapıldı.

Hesaplama:

A2-A1=Standart veya numunenin absorbans farkı

$$\text{Sonuç} = \frac{[(\Delta \text{Abs Numune})]}{[(\Delta \text{Abs Standart})]} \times \text{standartın konsantrasyonu}$$

Birim: µmol/L

Standartın konsantrasyonu= 10 µmol/L

3.2.8. OSI Hesaplanması

Toplam oksidan durumunun toplam antioksidan statüye oranı oksidatif stres indeksi (OSİ) olarak kabul edildi. OSİ değeri şu şekilde hesaplanır: $OSİ = [(TOK, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}) / (TAK, \text{mmol Trolox equivalent/L}) \times 10]$. OSİ değerini bir diğer önemli oksidatif stres belirteci olarak ifade ettik. Önceki çalışmalarda kullanılan metoda göre bu parametreyi hesapladık (Tanyeli vd 2020).

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Sunulan tez bu tez çalışmasına ait testis dokusu sonuçları için IBM SPSS Statistich 19.0 software paket programı kullanılarak istatistiksel analiz hesaplamaları yapıldı. Elde edilen bulgulara One-Way ANOVA ve Tukey testleri uygulandı. Sonuçlar tablo ve grafikler halinde minimum, maksimum, ortalama ve standart hata (Standart Error Mean $\pm$ SEM) değerleri şeklinde sunuldu. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Tez çalışmamıza ait biyokimyasal ölçüm sonuçları Çizelge 4.1' de Ortalama±SEM olarak sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait MDA (µmol/gr doku) düzeyi, SOD (U/mg protein), MPO (U/mg protein) aktivitelerine, ait minimum-maksimum değerleri, ortalama ve standart hata (SEM) sonuçları özetlenmiştir.

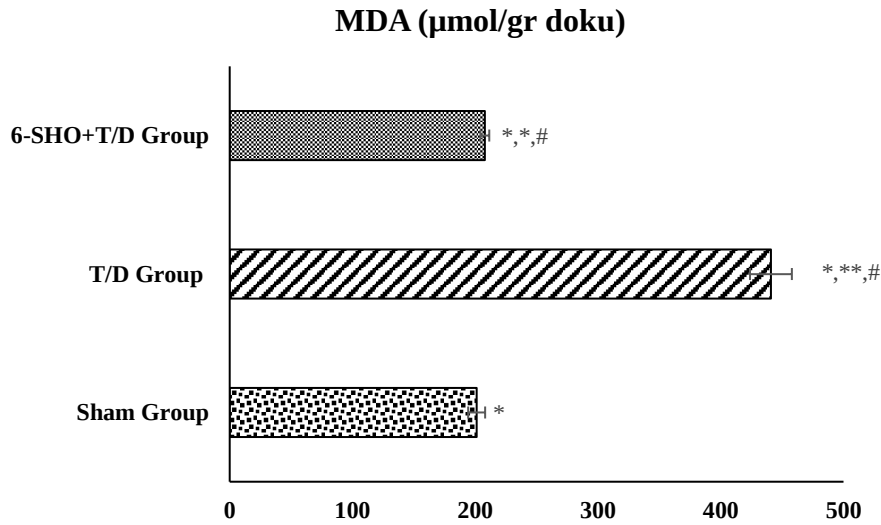
Groups (n=6)		MDA (µmol/gr doku)	SOD (U/mg protein)	MPO (U/mg protein)
Sham Group	Ortalama	201.17*	416.17*	34872.30*
	Minimum	176.85	367.74	29034.18
	Maksimum	221.24	480.88	41993.93
	SEM	6.91	18.49	1832.57
T/D Group	Ortalama	440.87*,**, #	182.65*,**, #	90028.62*,**, #
	Minimum	385.49	166.52	83267.34
	Maksimum	498.70	207.50	97843.33
	SEM	17.06	6.17	1959.95
6-SHO+T/D Group	Ortalama	207.84**, #	403.76**, #	36437.74**, #
	Minimum	194.75	371.41	33267.14
	Maksimum	219.43	450.40	40893.96
	SEM	3.61	12.83	1274.79

*,**, #: Mevcut simgelerin gösterildiği gruplar arasında bulunan istatistiksel ilişkiyi temsil etmektedir. İstatistiksel anlamlılık ilişkisi p<0.05 düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 4.2. Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait TAK (mmol equivalent/L), TOK (μmol Trolox equivalent/L) ve Oksidatif stres indeksi (OSİ) değerlerine ilişkin minimum-maksimum değerleri, ortalama ve standart hata (SEM) sonuçları özetlenmiştir.

Groups (n=6)		TAK (mmol equivalent/L)	TOK (μmol Trolox equivalent /L)	OSİ
Sham Group	Ortalama	1.57*	6.12*	0.38*
	Minimum	1.44	5.37	0.35
	Maksimum	1.70	6.90	0.42
	SEM	0.04	0.21	0.01
T/D Group	Ortalama	0.76*,**, #	12.30*,**, #	1.62*,**, #
	Minimum	0.63	11.74	1.37
	Maksimum	0.87	12.94	2.03
	SEM	0.03	0.22	0.09
6-SHO+T/D Group	Ortalama	1.42**, #	6.37**, #	0.50**, #
	Minimum	0.99	5.33	0.37
	Maksimum	10.67	7.04	0.67
	SEM	0.09	0.32	0.05

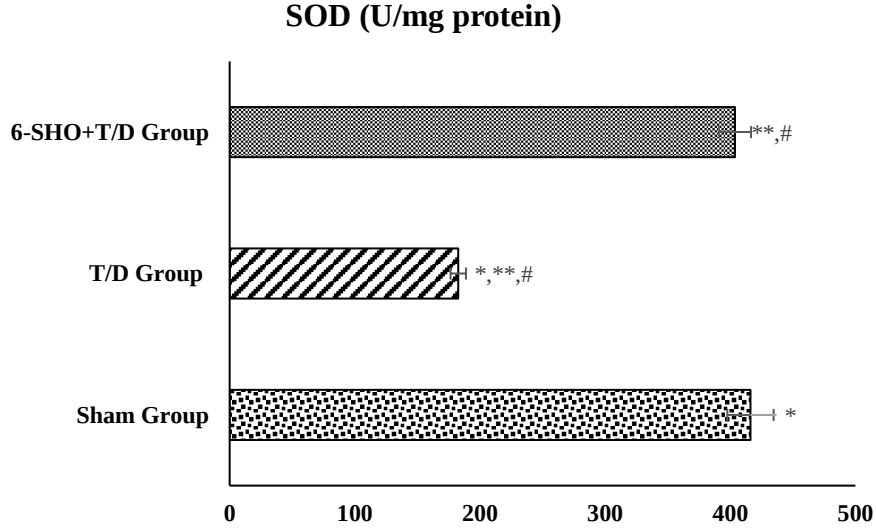
*,**, #: Mevcut simgelerin gösterildiği gruplar arasında bulunan istatistiksel ilişkiyi temsil etmektedir. İstatistiksel anlamlılık ilişkisi $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 4.1: MDA ($\mu\text{mol}/\text{gr}$ doku) düzeyini ifade eden Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait gruplar arası karşılaştırmalar. *: Sham ve T/D grupları arasında bulunan istatistiksel anlamlılık ilişkisini temsil eder ($p < 0.05$). **, #: T/D ve 6-SHO+T/D grupları arasında bulunan istatistiksel anlamlılık ilişkisini temsil eder ($p < 0.05$).

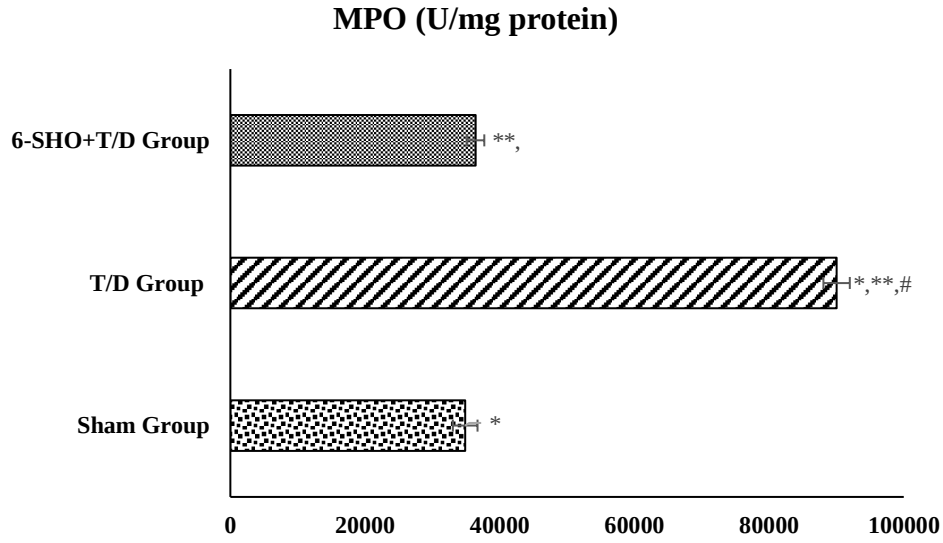
Lipit peroksidasyonson ürünü olarak değerlendirmiş olduğumuz MDA düzeyine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1' de sunulmuştur. Tüm gruplara ilişkin MDA düzeyi incelendiğinde, T/D grubunda Sham grubuna göre anlamlı

derecede bir artış olduğu gözlemlenirken 6-SHO uygulanan tedavi grubunda ise anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.2: SOD (U/mg protein) düzeyini ifade eden Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait gruplar arası karşılaştırmalar. *: Sham ve T/D grupları arasında bulunan istatistiksel anlamlılık ilişkisini temsil eder ($p<0.05$). **, #: T/D ve 6-SHO+T/D grupları arasında bulunan istatistiksel anlamlılık ilişkisini temsil eder ($p<0.05$).

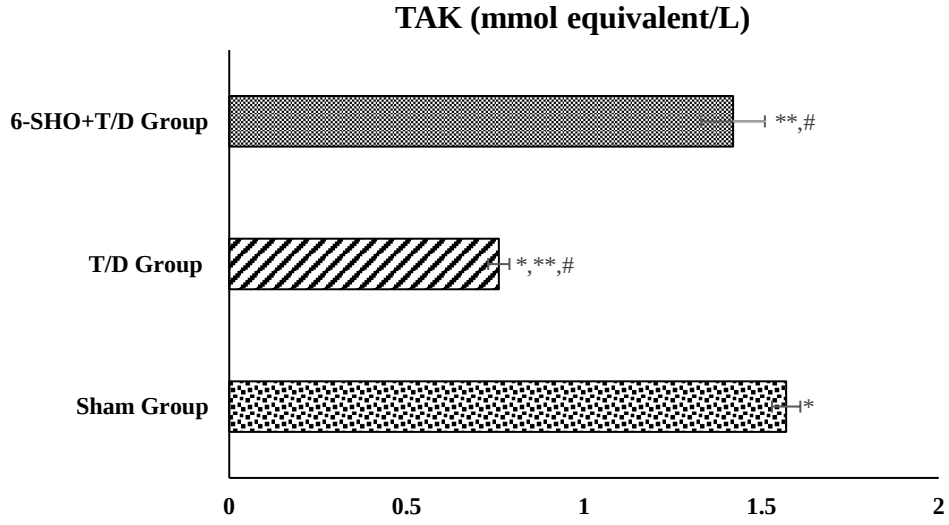
Antioksidan enzim aktivitesi oksidatif stres koşullarında belirgin şekilde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle SOD enzim aktivitesi antioksidan düzeyin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olarak kabul edildiğinden tez çalışmamızda SOD aktivitesinin T/D grubunda özellikle sham grubuna kıyasla belirgin şekilde azaldığı ve oksidatif testis doku hasarının hafifletmede yetersiz kaldığı gözlenmektedir. Ancak 6-SHO uygulanan tedavi grubunda SOD enzim aktivitesinin anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2).



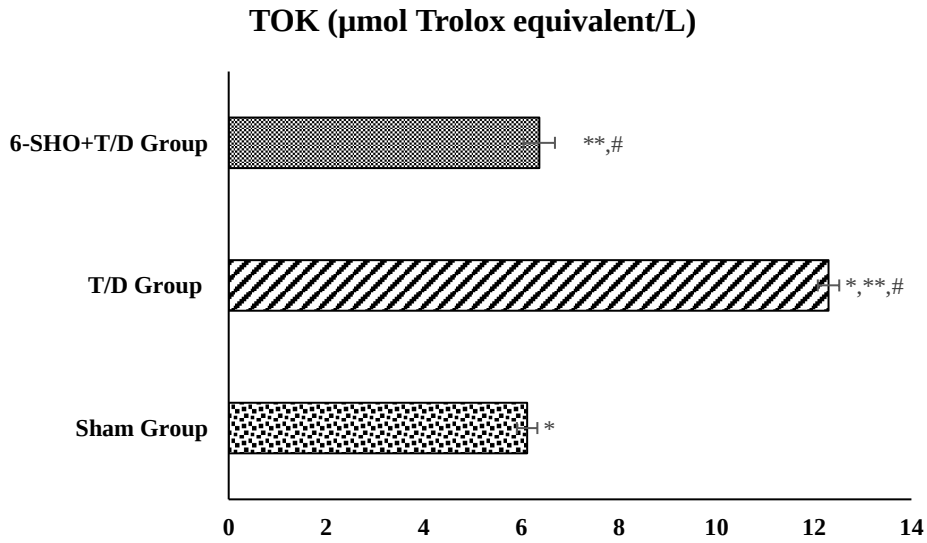
Şekil 4.3: MPO (U/mg protein) aktivitesi ifade eden Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait gruplar arası karşılaştırmalar. *: Sham ve T/D grupları arasında bulunan istatistiksel anlamlılık ilişkisini temsil eder ($p<0.05$). **, #: T/D ve 6-SHO+T/D grupları arasında bulunan istatistiksel anlamlılık ilişkisini temsil eder ($p<0.05$).

MPO aktivitesine ait sonuçlarımız Çizelge 4.1 de ve Şekil 4.3 de özelenmiştir. Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3 dikkatle incelendiğinde, Sham grubunda düşük düzeylerde olduğu görülen MPO aktivitesinin T/D modeli uygulanan grupta belirgin şekilde arttığı aksine 6-SHO verilen tedavi grubunda ise anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir.

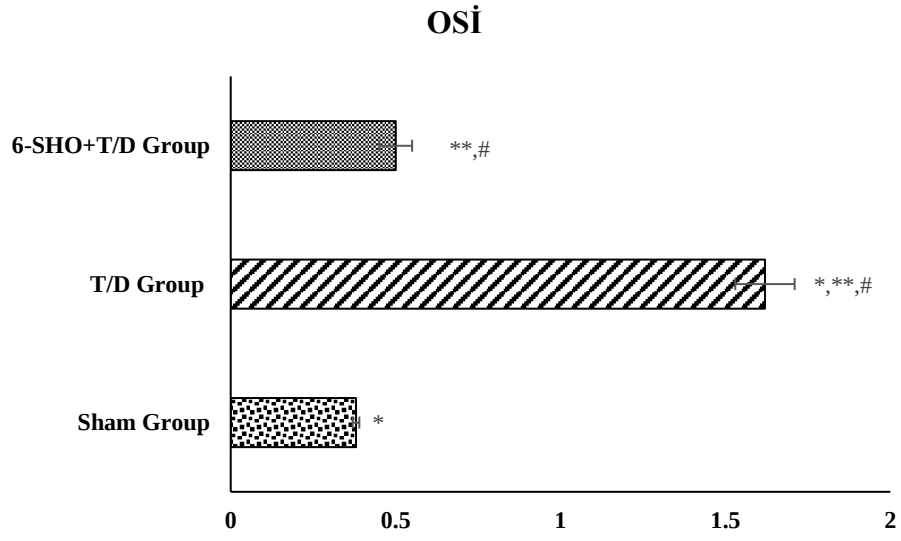
MDA düzeyleri, MPO ve SOD aktiviteleri yanında oksidatif stres kaynaklı testiküler doku hasarının değerlendirilmesinde kullanılan TAK, TOK ve OSİ düzeyleri gibi parametreler literatürde ki çok sayıda çalışmada ölçülmüştür. Sunulan tez çalışmasında deneysel T/D modeli oluşturulan deney grubunda TAK düzeyinin belirgin şekilde azalırken, TOK ve OSİ düzeylerinin ise anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Aksine 6-SHO desteğiyle birlikte TAK düzeyinin istatistiksel olarak arttığı ve sham grubu sonuçlarına yaklaştığı buna karşılık TOK ve OSİ düzeylerinin ise oldukça azaldığı görülmüştür (Çizelge 4.2.; Şekil 4.4, 4.5, 4.6.)



Şekil 4.4: TAK (mmol equivalent/L) düzeyini ifade eden Sham, T/D ve 6-SHA+T/D gruplarına ait gruplar arası karşılaştırmalar. *: Sham ve T/D grupları arasında bulunan istatistiksel anlamlılık ilişkisini temsil eder ($p<0.05$). **,#: T/D ve 6-SHA+T/D grupları arasında bulunan istatistiksel anlamlılık ilişkisini temsil eder ($p<0.05$).



Şekil 4.5: TOK (mmol Trolox equivalent/L) düzeyini ifade eden Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait gruplar arası karşılaştırmalar. *: Sham ve T/D grupları arasında bulunan istatistiksel anlamlılık ilişkisini temsil eder ($p<0.05$). **,#: T/D ve 6-SHO+T/D grupları arasında bulunan istatistiksel anlamlılık ilişkisini temsil eder ($p<0.05$).



Şekil 4.6: OSİ düzeyini ifade eden Sham, T/D ve 6-SHO+T/D gruplarına ait gruplar arası karşılaştırmalar. *: Sham ve T/D grupları arasında bulunan istatistiksel anlamlılık ilişkisini temsil eder ($p<0.05$). **,#: T/D ve 6-SHO+T/D grupları arasında bulunan istatistiksel anlamlılık ilişkisini temsil eder ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA

İskemi genel olarak literatürde dokuların hipoperfüzyonu olarak tanımlanır. Doku iskemisi, hücrelerin metabolik talepleri karşılamak için gerekli olan oksijenin yetersiz iletimi olarak tanımlanır (Kohen and Nyska 2002). I/R hasarı, hücre hasarının kontrol edilmesi ve organ fonksiyonunun korunması durumları için gerekli olan kritik bir olgudur. Ayrıca sepsis, akut koroner sendrom, organ nakli ve uzuv yaralanması gibi çeşitli durumlar doku hipoperfüzyonuna neden olabilir. Tedaviye yönelik çalışmalarda çoğunlukla organ fonksiyonunu korumak için hipoperfüzyon süresinin kısaltılmasına odaklanılmaktadır (Behroozi-Lak *et al.* 2017). Bununla birlikte, iskemik dokuya kan akışının restorasyonundan sonraki klinik sonuçlar optimal değildir. Son çalışmalar, reperfüzyonun, I/R hasarı olarak adlandırılan bir fenomen olan iskemik dokuda müteakip hasarı indüklemeye potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. I/R yaralanmasının neden olduğu yaralanmalar, organ ve nörojenik işlevi korumada büyük güçlükleri beraberinde getirebilmektedir (Mortaz *et al.* 2018).

Çeşitli fizyolojik mekanizmalar, iskeminin meydana gelmesine neden olur ve durum ateroskleroz ve akut miyokard enfarktüsü dâhil olmak üzere hipoksiye ve hipoperfüzyona yol açar. Arteriyel kan akışının engellenmesi hipoksiye neden olur ve mitokondride elektron taşıma zincirinin işlev bozukluğuna yol açar (Akdemir vd 2019). Mitokondride ATP üretiminin azalması, anaerobik metabolizmaya, sodyum-potasyum pompalarının (Na^+/K^+ ATPaz pompaları) işlev bozukluğuna ve ribozomların ayrılmasına neden olur. Anaerobik metabolizma, hücrelerde daha düşük seviyede ATP ve antioksidatif maddeler üretir. Ayrıca laktik asidin tutulması metabolik asidoza yol açabilir (Ahmed *et al.* 2000). Bunun yanında hücre yüzeyinde Na^+/K^+ ATPaz pompaları ve kalsiyum pompaları (Ca^{2+} ATPaz pompaları) düzensizleşebilir. Na^+/K^+ ATPaz pompalarının başarısızlığı, hücrelerde sodyumun ve hücrelerin dışında potasyumun tutulmasına neden olur. Hücrelerdeki daha yüksek sodyum seviyesi, sodyum-hidrojen pompalarının (Na^+/H^+ pompaları) aktivitesini azaltır. Endoplazmik retikulum üzerindeki Ca^{2+} ATPaz pompaları da işlevsiz hale gelir ve bu da kalsiyum geri alımını sınırlar. Hücrelerde, hidrojen, sodyum ve kalsiyum iyonlarının birikmesi hiperosmolariteye neden olur (Bahrke and Yesalis

2004). Bu durum ise sitoplazmaya su akışına ve hücrenin şişmesini sağlar (Cuzzocrea *et al.* 2001). Hidrojenin tutulması hücresel pH' ı düşürerek enzim aktivitesinin bozulmasına ve nükleer kromatinin kümelenmesine yol açar. Ribozomların ayrılması protein sentezini azaltır. Reperfüzyon aşamasından sonra, iskemik dokuya kan akışının yeniden sağlanması, kırmızı kan hücreleri aracılığıyla oksijen sağlar. Buna paralel olarak, iskemik hücrelerde daha düşük antioksidatif ajan konsantrasyonu nedeniyle ROT oluşumu artar (Ringdahl and Teague 2006). ROT, endotel disfonksiyonunu, DNA hasarını ve lokal inflamatuvar tepkileri teşvik eden oksidatif strese neden olur. İnflamatuvar kaskadlar ve oksidatif stres, daha sonra bir sitokin fırtınasına neden olarak hücresel yapılara verilen hasarın neden olduğu hücre ölümüne neden olabilir. Reperfüzyon aşaması dinamikdir ve birkaç gün sürebilir. I/R hasarının ayrıntılı mekanizmasının anlaşılması, sadece yeni terapötik fırsatlar için değil, aynı zamanda yaralanmanın önlenmesi içinde güçlü bir temel sağlayabilir (Akgür vd 1994).

Kısaca iskemik durum, anaerobik metabolizmayı indükleyerek daha düşük ATP üretimine ve iyon değişim kanallarının bozulmasına yol açar. İyon değişim kanallarının bozulması, hücre şişmesine ve sitoplazma da bozulmuş enzimatik aktiviteye yol açar (Turner *et al.* 2004). Reperfüzyon durumundaki mitokondriyal hasar ve elektrolit dengesizliği, üç ana sistemden oksidatif stresi teşvik eder. Bunlar nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz sistemi, nitrik oksit sentaz sistemi ve ksantin oksidaz sistemi şeklinde sıralanabilir. ROT tutulması, hücre hasarına neden olarak dört yolla hücre ölümüne yol açar: otofaji, mitoptoz, nekroz ve nekroptoz ve apoptoza neden olmaktadır (Ohkawa *et al.* 1979).

Genel olarak yukarıda da söz edildiği gibi I/R hasarı, bir akut iskemi epizodunu takiben kan dolaşımı geri yüklendiğinde meydana gelir. Bu tür bir yaralanmada, dokuya giden kan akışı başlangıçta kesintiye uğrar ve metabolik olarak aktif dokulara zarar verir (Turner *et al.* 2004). Bununla birlikte, dokulara kan akışının restorasyonu, serbest oksijen radikal üretimi, hücre içi kalsiyum aşırı yüklenmesi ve lipid peroksidasyonu dâhil olmak üzere, daha fazla hücresel ve doku hasarına yol açan paradoksik bir olaylar dizisi başlatır. İskeminin başlamasını takiben adenozin

trifosfat, hipoksantine indirgenir ve ksantin dehidrojenaz, ksantin oksidaza dönüştürülür (Akgür vd 1994).

Testis hasarının patofizyolojik mekanizması ise bir tür I/R hasarıdır. Testis detorsiyonunu takiben dokular reperfüzyona uğrar ve iskeminin indüklediğinden daha ciddi hasara neden olur. Testis torsiyonu veya spermatik kordun torsiyonu, en ciddi ürolojik durumlardan biri olduğu için potansiyel olarak erkeklerde subfertiliteye yol açan testis yaralanmasına neden olur (Jomova and Valko 2011). Spermatik kordun ve spermatik yapıların kendi etrafında dönmesi biyokimyasal ve histolojik değişikliklere neden olur; bununla birlikte, testis detorsiyonunu takiben dokular, iskeminin indüklediğinden daha ciddi hasara neden olan reperfüzyona uğrar. Testiküler I/R, ROT' ların aşırı üretimine yol açar. Aşırı üretilen ROT' lar lipidlere, proteinlere ve DNA' ya zarar vererek hücresel işlev bozukluğuna ve hatta ölüme neden olabilir. ROT' ları doğrudan ölçmek çok zordur çünkü ROT yüksek reaktiviteye ve kısa ömre sahiptir (Pacher and Szabo 2008).

Testiküler I/R henüz tam olarak anlaşılamayan karmaşık bir hücresel ve moleküler reaksiyonlar silsilesini harekete geçirir. Bununla birlikte, bir dizi çalışma, iskemik testislere kan beslemesinin restorasyonunun, ROT aşırı üretimi ve mitojenle aktive olan protein kinazları aktive eden testiküler oksidatif stres oluşumu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Testiküler I/R, lipid peroksidasyonuna, protein denatürasyonuna, DNA hasarına ve apoptotik mekanizmanın aktivasyonuna yol açar. Ayrıca, Testiküler I/R' de aktifleştirilmiş nötrofillerin mikrovasküler endotelyuma yapıştığı ve daha sonra ROT oluşumunu katalize eden miyeloperoksidaz enzimini dışarı çıkarıp salgıladığı tespit edilmiştir (Eraslan vd 2020). Testisler serbest radikal hasarına duyarlıdır. Normal koşullar altında, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz dahil enzimatik antioksidan savunma sistemleri, bu hücreleri serbest radikal hasarından korur. Testiküler I/R sırasında, hücresel ve mitokondriyal Ca^{2+} (mCa^{2+}) birikimlerindeki değişiklikler kritik derecede önemlidir. mCa^{2+} seviyeleri, hücre içi Ca^{2+} yı artıran mCa^{2+} uniporter kanallarıyla artar. Aşırı mCa^{2+} yükleri, geçirgenlik geçişleri ve gözenek oluşumu yoluyla hücre apoptozuna neden olan geri dönüşü olmayan olayları başlatır (Akgür vd 1994).

Ayrıca oksidatif stres, oksidanların üretimi ile bir organizmanın ilgili savunma sistemleri arasındaki dengesizliği ifade eden bir terimdir. Oksidanlar, ROT, RNS, kükürt merkezli radikalleri ve çeşitli diğerlerini kapsar. Bu reaktif türlerin tümü radikal değildir. Bununla birlikte, çoğu durumda, radikal olmayan reaktif türler, oksidasyon yoluyla biyomoleküllere zarar verecek şekilde radikaller haline gelebilmektedir. Bu tür bir reaksiyon, kendi kendine devam edebilir ve kapsamlı hücre hasara yol açabilir. Testis torsiyonu, genellikle yeni doğanları, çocukları ve ergenleri ilgilendiren ciddi bir ürolojik acil durumdur. Testis hasarını belirleyen en önemli iki faktör, spermatik kordun burulma süresi ve derecesidir (Tanyeli vd 2019). İskemik dokunun reperfüzyonunun, parankimal hücrelerde ksantin oksidaz sisteminin aktivasyonundan veya interstisyel dokuya nüfuz eden lökositlerden kaynaklanan ROT oluşumunu teşvik ettiği gözlenmiştir. Bu nedenle detorsiyonla tedavi testise daha fazla zarar verebilir (Akgür vd 1994). Kan akışının yeniden başlamasıyla birlikte, hipoksantinin ürik aside dönüşümü için gerekli oksijen testise verilir ve bu da büyük miktarlarda serbest radikallerin üretilmesine neden olur. Bu serbest radikaller, hücre ve mitokondri zarlarındaki lipidlerle reaksiyona girerek geçirgenliklerini değiştirir ve hücre bütünlüğünü bozar. Normal koşullar altında, serbest radikaller üretilir ve etkileri endojen antioksidan sistem tarafından dengelenir. ROT üretimi, savunma mekanizmalarının kontrol kapasitesini aştığında, oksidatif stres üretilir ve tersine çevrilebilir veya geri döndürülemez hücre hasarına katkıda bulunur (Antony *et al.* 2020).

Testis hasarının birincil nedenleri ROT üretimi, mitokondriyal kalsiyum konsantrasyonunun da artış ve hücre apoptoz oranının artması olduğundan, farklı ilaçlar potansiyel olarak etkili olabilir (Dokmeci vd 2007). MDA, ROT' ların neden olduğu lipid peroksidasyonunun kararlı bir son ürünüdür. Bu nedenle, genellikle ROT için duyarlı bir indeksi olarak kabul edilir. Testis I/R, ipsilateral testislerde malondialdehit düzeyinde anlamlı artışa ve spermatogenezde anlamlı düşüşe neden olarak testis I/R sonrası ROT' ların aşırı üretiminin testis spermatogenezine zarar verdiğini düşündürmektedir. ROT' ları temizleyen bileşenlerin, I/R hasarına karşı korumada etkili olduğu gösterilmiştir (Elmore *et al.* 1995).

Bu anlamda güçlü antioksidanların beyin, kalp ve böbrekte I/R hasarına karşı koruma sağlayabileceği gözlemlenmiştir. Antioksidanlar, kalsiyum kanal blokerleri, fitoterapötik ilaçlar, anestetikler, hormonlar ve trombosit inhibitörleri, bir adjuvan geri yükleme tedavisi için potansiyel olarak sağlam bir temel oluşturabilir ve torsiyonu takiben testis fonksiyonunun iyileşmesinde önemli roller üstlenebilir (Sarica vd 1999).

Literatürde I/R hasarının önlenmesi amacıyla tedavi edici deneysel çalışmalarda dehidroepiandrosteron (Aksoy vd 2007), carvedilol (Parlaktas vd 2014), ibuprofen (Dokmeci vd 2007), erdostein (Koc vd 2005), kafeik asit fenil ester (Uz vd 2002), allopurinol (Akgur vd 1994), sildenafil (Beheshtian *et al.* 2008), verapamil (Sarica vd 1999), propofol (Yagmurdur vd 2006), barbaloin (Topdağı vd 2019), higenamin (Tanyeli vd 2020) ve cryptotanshinone (Tanyeli vd 2019) gibi farklı ilaçların koruyucu ve/veya tedavi edici etkinliği araştırılmıştır.

İlgili çalışmalar incelendiğinde Yang *et al.* (2020) 6-SHO' nun vitiligo hastalığı ve diğer pigment bozukluklarının erken evrelerinde melanosit kaybının önlenmesine yönelik tedavi edici etkilerini araştırdıkları çalışmalarında söz konusu etken maddenin melanositleri in vitro oksidatif strese karşı koruduğu ve koruyucu etkisinin Nrf2-antioksidantının aktivasyonu ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Ray *et al.* (2015) 6-SHO' nun meme kanseri hücrelerine karşı hem tek tabakalı hem de kanser-kök hücre benzeri sferoid kültüründeki inhibitör aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında tek tabakalı ve kanser kök hücre benzeri sferoidlerdeki etkinliği, 6-SHO' nun meme kanseri tedavisinde terapötik yararları olabileceğini göstermiştir. Nonaka *et al.* (2019), 6-SHO' nun oksidatif ve anti-oksidatif aktiviteleri düzenleyerek gelişmiş glikasyon son ürünlerin neden olduğu inflamatuvar yanıtları inhibe ettiğini ve diabetes mellitus periodontitis üzerinde koruyucu etkileri olabileceğini tespit etmişlerdir. Kaspaz aktivasyonu ve endoplazmik retikulum (ER) stres sinyali ile ilgili olarak insan hepatoselüler karsinom hücrelerinde 6-SHO' nun apoptozu indükleyici etkisinin araştırıldığı çalışmada Hu *et al.* (2019) SMMC-7721 hücrelerinde 6-SHO' nun ER stresi ve apoptozda önemli bir rol oynadığını tespit etmişlerdir. Woźniak *et al.* (2020) ise 6-SHO' nun iki kolon kanseri hücre hattı

(SW480 ve SW620) üzerindeki tedavi edici etkilerini inceledikleri çalışmalarında 6-SHO'nun olumlu etkilerini gözlemlemişleridir.

Bu çalışmada ise 6-SHO molekülü kullanılarak bu molekülün testiküler T/D ile oluşturulan testiküler dokunun oksidatif hasarı üzerindeki hasarı hafifletici ya da azaltıcı olası yararlı etkileri araştırılmıştır. Literatürde 6-SHO molekülün erkek fertilitesi üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Güncel araştırmalar ise zencefilin küçük bir bileşeni olan 6-SHO, 6-gingerolden biyolojik olarak daha aktif olabileceğini göstermiştir. Bhattarai, *et al.* (2010), 6-gingerolün, asidik koşullar ve yüksek sıcaklık gibi bir model sistemde 6-SHO' ya indirgenebileceğini ifade etmiştir. Bu nedenle, testis I/R hasarının tedavisi için 6-SHO molekülünü kullandık. Testiste MDA, tiyobarbitürik asit-reaktif madde testi ile ölçüldü.

6-SHO kimyasal yapısında α , β -doymamış keton iskeletinin konjugasyonu, antioksidan, anti-enflamatuar, antikanser, antiemetik ve diğer biyoaktiviteler açısından 6-gingerol' den daha yüksek potensini ve etkinliğini açıklamaktadır. Literatürde 6-SHO' nun hücrelerde oksidatif hasarı etkili bir şekilde inhibe ettiğine ilişkin pek çok çalışma vardır. Hur vd (2020) 6-SHO' nun iskelet kası hücresinin oksidatif hasarını etkili bir şekilde inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Bak *et al.* (2012) zencefilden elde edilen 6-SHO özünün fare hücrelerindeki antioksidan savunma sistemlerini düzenlediğini tespit etmiştir. Güler vd (2020) sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada 6-SHO' nun yumurtalık hasarına karşı koruyucu ve faydalı aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Eraslan vd (2020) çekal ligasyon ve delmeye bağlı polimikrobiyal sepsis sıçan modelinde 6-SHO' nun böbrek dokusu üzerine renoprotektif etkileri üzerine yaptıkları çalışmalarında 6-SHO uygulamasının çekal ligasyon ve delme ile indüklenen polimikrobiyal sepsis modeli tarafından üretilen oksidatif böbrek hasarına karşı etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak, testiküler I/R hasarı olan hastalarda klinik uygulanabilirliğe sahip olabileceğini düşünülmektedir. Bununla birlikte, 6-SHO' nun testislerdeki ROT' un seviyesini düşürdüğü kesin mekanizma hala bilinmemektedir. Bu mekanizma da ayrıca incelenmesi gereken bir nokta olarak karşımıza çıkmaktadır. ROT üretiminin önemli bir kaynağı, dokunun kendisine sızan nötrofillerdir. Bir

endotel hücre adezyon molekülü olan E-selektin, nötrofillerin dokuya alınmasında önemli bir rol oynar. Dokunun I/R' den sonra vasküler endoteldeki hasar, endotel hücrelerinde E-selektin ekspresyonunun artmasına yol açar. Daha sonra E-selektin, nötrofillerin vasküler endotelyuma yapışmasına aracılık eder. Son olarak, nötrofiller vasküler endotelyum yoluyla dokuya göç eder ve doku hasarına neden olan ROT' ları serbest bırakır. MPO, ağırlıklı olarak nötrofillerin granüllerinde bulunur. Bu nedenle enzim aktivitesi, dokuda nötrofil birikiminin bir göstergesi olarak kullanılır. Bir başka çalışmada tek taraflı testis I/R, E-selektin ekspresyonu, MPO aktivitesi ve MDA düzeyinde önemli artışlara neden olmuş ve ipsilateral testislerde spermatogenezde anlamlı azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlar, testiküler I/R sonrası vasküler endotel hücrelerinde E-selektin ekspresyonunun yukarı düzenlenmesinin testislerde nötrofil birikimini artırdığını ve artan nötrofillerin, ipsilateral testislerde spermatojenik hasara yol açabilecek aşırı ROT ürettiğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada, ipsilateral testislerde E-selektin ekspresyonunu, MPO aktivitesini ve MDA seviyesini önemli ölçüde azalttığını ve spermatogenezi önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Bunlar, vasküler endotelyal hücreler üzerindeki E-selektin ekspresyonunu düşürdüğünü ve testislerde nötrofil birikimini azaltarak ROT' ların oluşumunda bir azalmaya ve spermatogenezde bir artışa neden olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen tüm sonuçları özetlersek;

1. Lipid peroksidasyonunun ürünü olan MDA seviyesinin sham grubu sonuçları ile karşılaştırıldığında T/D grubunda yükseldiği ancak 6-SHO uygulaması ile tedavi grubunda T/D grubuna göre anlamlı olarak azaldığını,
2. 6-SHO' nun testiküler T/D ile indüklenmiş testis dokusu TOK ve OSI değerlerinin sham grubu ile karşılaştırıldığında T/D grubunda önemli biçimde arttığı buna karşılık 6-SHO tedavi grubunda anlamlı düzeyde azaldığı,
3. T/D' nin indüklediği oksidatif strese bağlı olarak T/D grubunda sham grubuna göre oksidan parametrelerden MPO aktivitesinin önemli şekilde arttığı aksine 6-SHO tedavisi ile belirgin bir şekilde azaldığı gözlenmiştir.
4. Dahası çalışmamızda 6-SHO' nun testiküler T/D ile indüklenmiş testis dokusu TAK seviyesi ve SOD aktivitesi sham grubuna kıyasla T/D grubunda düştüğü 6-SHO tedavi grubunda ise anlamlı düzeyde yükseldiği tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar ışığında, 6-SHO uygulamasının T/D tarafından indüklenen oksidatif testis dokusu hasarının azaltma yeteneğine sahip olabileceği söylenebilir. T/D uygulamasıyla meydana gelen testiküler doku oksidatif hasarının etkilerinin azaltılmasında 6-SHO' nun T/D tedavisinde destek bir tedavi olarak kullanılabileceği düşünülebilir. Ancak 6-SHO' nun klinik uygulanabilirliği üzerine daha ileri deneysel çalışmalara ihtiyaç olduğunu ifade etmekteyiz.

KAYNAKÇA

- Aghazadeh, Y., Zirkin, B. R. and Papadopoulos, V. 2015. Pharmacological regulation of the cholesterol transport machinery in steroidogenic cells of the testis. *Vitam Horm*, 98, 189-227.
- Ahmed, F. A., Whelan, J., Jequier, A. M. and Cummins, J. M. 2000. Torsion-induced injury in rat testes does not affect mitochondrial respiration or the accumulation of mitochondrial mutations. *Int. J. Androl*. 23, 347-356.
- Aitken, R. J. and Clarkson, J. S. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprodue Fertil*. 81(2), 459-469.
- Akdemir, E. F. N., Yildirim, S., Kandemir, F. M., Tanyeli, A., Küçükler, S. and Bahaeddin, D. M. 2019. Protective effects of gallic acid on doxorubicin-induced cardiotoxicity; an experimental study. *Arch Physiol Biochem*, 26, 1-8.
- Akgür, F. M., Kiliç, K., Aktug, T. and Olguner, M. 1994. The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *J. Urol*. 151, 1715-1717.
- Aksoy, H., Yapanoglu, T., Aksoy, Y., Ozbey, I., vd. (2007). Dehydroepiandrosterone treatment attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion in rats. *J Pediatr Surg*, 42, 1740-4.
- Al-Maghrebi, M., Renno, W.M. and Al-Ajmi, N. 2012. Epigallocatechin-3- gallate inhibits apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from ischemia/reperfusion-induced inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*, 420, 434-439.
- Amory, J. K., Scriba, G. K., Amory, D. W. and Bremner, W. J. 2003. Oral testosterone-triglyceride conjugate in rabbits: single-dose pharmacokinetics and comparison with oral testosterone undecanoate. *J Androl*, 24(5), 716-720.
- Anafarta, K., Bedük, Y. And Arıkan, N. 2007. *Temel Üroloji* (3. Baskı), Ankara: Güneş tıp yayınevi.
- Anderson, M. J., Dunn, J. K., Lipshultz, L .I. and Coburn, M. 1992. Semen quality and endocrine parameters after acute testicular torsion. *J. Urol*. 147, 1545-1550.
- Antony, B., Benny, B. and Reshma, M. 2020. Validation of reversed-phase high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of 6-, 8-, 10-gingerols and 6-shogaol from ginger extracts. *Int. J. Pharm. Phar. Sci*. 12, 67-70.
- Atik, E., Görür, S. and Kiper, A. N. 2006. The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on histopathological changes in testicular ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res*, 54, 293-297.

- Aversa, A., Francomano, D. and Lenzi, A. 2005. Does testosterone supplementation increase PDE5-inhibitor responses in difficult-to-treat erectile dysfunction patients? *Expert Opin Pharmacother*, 16, 625-8.
- Aydiner, Ç. Y., Pul, M., İnan, M., Bilgi, S. ve Çakır, E. (2012). Deneysel testiküler torsiyon modelinde N-asetilsistein doku hasarını önlemede rol oynayabilir mi?, *Cumhuriyet Med J*, 34, 462-471.
- Azizollahi, S., Babaei, H., Derakhshanfar, A. And Oloumi, M. M. 2009. Effects of coAdministration of Dopamine and Vitamin C on Ischemia- Reperfusion Injury After Experimental Testicular Torsion-Detorsion in Rats, *Andrologia*, 43(2), 100-105.
- Bahrke, M. S. and Yesalis, C. E. 2004. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol*, 4(6), 614-620.
- Bak, M.-J., Ok, S., Jun, M. and Jeong, W.-S. 2012. 6-Shogaol-Rich Extract from Ginger Up-Regulates the Antioxidant Defense Systems in Cells and Mice. *Molecules*, 17, 8037-8055.
- Barada, J. H., Weingarten J. L. and Cromie, W. J. 1989. Testicular salvage and age-related delay in the presentation of testicular torsion, *J Urol*, 142, 746-8.
- Bartsch, G., Frank, S., Marberger, H. and Mikuz, G. 1980. Testicular torsion late results with special regard to fertility and endocrine function, *J Urol*, 124, 375.
- Beheshtian, A., Salmasi, A. H., Payabvash, S., Kiumehr, S. and vd. 2008. Protective effects of sildenafil administration on testicular torsion/detorsion damage in rats. *World J Urol*, 26, 197-202.
- Behroozi-Lak T, Zarei, L., Moloody-Tapeh, M. and vd. 2017. Protective effects of intraperitoneal administration of nimodipine on ischemia-reperfusion injury in ovaries: Histological and biochemical assessments in a rat model. *J Pediatr Surg*, 52, 602-608.
- Beitel, L. K., Scanlon, T., Gottlieb, B. and Trifiro, M. A. 2005 Progress in Spinobulbar muscular atrophy research: insights into neuronal dysfunction caused by the polyglutamine-expanded androgen receptor. *Neurotox Res*, 7(3), 219-230.
- Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. 2007. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 272, 20313-20316.
- Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D. and Rothstein, G. 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest Dermatol.*, 78, 206-209.
- Camussi, G., Albano, E., Tetta, C. and Bussolino, F. 1991. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J. Biochem*, 202, 3-14.
- Choi, H. D., Kang, H. E., Yang, S. H., Lee, M.G. and Shin, W. G., 2010. Pharmacokinetics and First-Pass Metabolism of Astaxanthin in Rats. *Br J Nutr*, 105(2), 220-7.

- Comhaire, F.H., El Gareem, Y., Mahmoud, A., Eertmans, F., ve Schoonjans, F. 2005. Combined conventional/antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind, randomized trial., *Asian J Androl*, 3, 257-62.
- Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Caputi, A. P. and Salvemini, D. 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*, 53, 135-59.
- Darrell, L. and Cass, M.D. 2005. Ovarian torsion. *Semin Pediatr Surg*, 14, 86-92.
- De Luna, A. M., Ortenberg, J. and Craver, R. D. 2003. Exploration for testicular remnants: implications of residual seminiferous tubules and crossed testicular ectopia. *J Urol*, 169(4), 1486-9.
- Didziapetriene, J., Smailyte, G., Bublevic, J., Kazbariene, B., Kasiulevicius, V. and Stukas R. 2014. Relationship of MDA plasma concentrations to long-term survival of breast cancer patients. *Tumori*, 100, 333-7.
- Dokmeci, D., Kanter, M., Inan, M., Aydogdu, N., vd. 2007. Protective effects of ibuprofen testicular torsion/detorsion-induced ischemia reperfusion injury in rats. *Arch Toxicol*, 81, 655-63.
- Drlik, M. and Kocvara, R. 2013. Torsion of spermatic cord in children: a review. *J Pediatr Urol*, 9, 259-66.
- Du, X., Edelstein, D. and Brownlee, M. 2008. Oral benfotiamine plus alpha-lipoic acid normalises complication-causing pathways in type 1 diabetes. *Diabetologia*, 51, 1930-1932.
- Duman, A., Mogulkoc, R., Baltaci, A. K., and Menevse, E. 2015. 3', 4'-dihydroxyflavonol attenuates tissue damage in unilateral testis ischemia-reperfusion in rats. *Bratisl Lek Listy*, 116, 735-740.
- Ekinci Akdemir, F. N. and Tanyeli, A. 2020. The effect of Fraxin against lung and testis damage induced by testicular torsion detorsion in rats. *Ann Med Res.*, 27(10), 2769-74.
- Elmore, J., Becher, J.R. and Terry, T. 1995. Turner: Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat, *J. Androl*, 16(4).
- Eraslan, E., Tanyeli, A., Ekinci Akdemir, F. N., and Guler, M.C. 2020. Reno-Protective effects of 6-shogaol on kidney tissue in cecal ligation and puncture-induced polymicrobial sepsis rat model. *Atatürk University J. Vet. Sci.*, 15(3), 244-250.
- Ewing, L. L., Wing, T-Y., Cochran, R. C., Kromann, N. and Zirkin, B. R. 1983. Effect of luteinizing hormone on Leydig cell structure and testosterone secretion. *Endocrinology*, 112(5), 1763-1769.
- Ferlin, A., Simonato, M. and Bartoloni, L. 2003. The INSL3-LGR8/ GREAT ligand-receptor pair in human cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 4273-9.
- Filho, D. W., Torres, M. A., Bordin, A. L., Crezcynski-Pasa, T. B. and Boveris, A. 2004. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Molecular Aspects of Medicine*, 25, 199-210.

- Gillenwater, J. Y., Grayhack, J. T., Howards, S. S., ve Duckett, J. W. 1991. Adult and Pediatric Urology, Mosby Year Book, USA, 2. Edition, 2195-2200.
- Gower, J. D., Healing, G., Fuller, B. J., Simpkin, S. and Green, C. J. 1989. Protection against oxidative damage in cold-stored rabbit kidneys by desferrioxamine and indomethacin. *Cryobiology*, 26, 309-317.
- Güler M. C, Tanyeli A, Eraslan E, Ekinçi Akdemir F. N. 2020. Role of 6-Shogaol Against Ovarian Torsion Detorsion-Induced Reproductive Organ Damage. *New Trend Med Sci*, 1(1), 29-34.
- Güler, M. C., Tanyeli, A., Eraslan, E. and Ekinçi Akdemir, F. N. 2020. Lazaroid u 74389g decreases testis tissue injury induced by testicular torsion detorsion an experimental study. *Int J. Aca Med Pharm.*, 2(2), 96-100.
- Gülmez, İ., Karacıgil, M. ve Tatlışen, A. 1988. Testis torsiyonu. *Türkiye Klinikleri*, 8(6), 435-38.
- Gürsoy, E., ve Koptagel, E. 1997. Embriyoloji Atlası (ss. 149- 152). Esnaf Ofset Matbaacılık: İstanbul.
- Habert, R., Lejeune, H. and Saez, J. M. 2001. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.*, 179, 47-74.
- Hadziselimovic, F., Geneto, R. and Emmons, L. R. 1998. Increased apoptosis in the contralateral testes of patients with testicular torsion as a factor for infertility. *J Urol*, 160, 1158-60.
- Harold, M. 2004. *On Food and Cooking: The Science and Lore of the Kitchen* (2nd ed.). New York: Scribner.
- Hess, K.R. 1995. Graphical methods for assessing violations of the proportional hazards assumption in cox regression. *Stat Med.* 14, 1707-23.
- Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. H. and Mainardi, C. L. 1985. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem.* 260, 2493-2500.
- Huhtaniemi, I., Jiang, M., Nilsson, C. and Petterson, K. 1999. Mutations and polymorphisms in gonadotropin genes. *Mol Cell Endocrinol.* 151, 89-94.
- Hung-Cheng, S. vd., 2014. Synthesis of Analogues of Gingerol and Shogaol, the Active Pungent Principles from the Rhizomes of Zingiber officinale and Evaluation of Their Anti-Platelet Aggregation Effects. *Int J. Mol Sci*, 15(3), 3926-3951.
- Hur, J., Lee, Y., Lee, C.J. and vd. 2020. 6-shogaol suppresses oxidative damage in L6 muscle cells. *Appl Biol Chem* 63.
- Jomova, K. and Valko, M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283, 65-87.
- Junqueira, L.C. and Carneiro, J. 2009. Temel Histoloji, (Çev: Solakoğlu S. ve Aytekin Y.) Nobel Tıp Kitabevleri, onyedinci baskı, 418-428.

- Kandhare, A. D., Mukherjee, A. and Bodhankar, S. L. 2017. Antioxidant for treatment of diabetic nephropathy: A systematic review and meta-analysis. *Chem Biol interact*, 278, 212-21.
- Karaguzel, E., Kadihasanoglu, M. and Kutlu, O. 2014. Mechanisms of testicular torsion and potential protective agents. *Nat Rev Urol*, 11, 391-9.
- Karakaya, E., Ateş, O., Akgür, F. M. and Olguner, M. 2010. Rosuvastatin protects tissue perfusion in the experimental testicular torsion model. *Int Urol Nephrol*, 42, 357-360.
- Kato, S., Yokoyama, A. and Fujiki, R. 2011. Nuclear receptor coregulators merge transcriptional coregulation with epigenetic regulation. *Trends Biochem Sci*. 36, 272-81.
- Keislinger, V. J., Schroder, D. E., Paulijev, P. and Hull, J. 1984. Spermatic cord bloc and manual reduction: primary treatment for spermatic cord torsion. *J Urol* , 132, 921-92.
- Kierszenbaum, A.L., 2006. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, (Çev: Demir R.), Palme Yayıncılık, 398, 531-544.
- Kim, S.H., Hu, Y., Cadman, S. and Bouloux, P. 2008. Diversity in fibroblast growth factor receptor 1 regulation: learning from the investigation of kallmann syndrome. *J Neuroendocrinol*. 20, 141-63.
- Koc, A., Narci, A., Duru, M., Gergerlioglu, H. S. and vd. 2005. The protective role of erdosteine on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *Mol Cell Biochem*. 280, 193-9.
- Kohen, R. and Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol pathol*, 30, 620-650.
- Köksal, M., Işık O., Uslu, L. ve Mutlu, Y. 2012. Işık sıcaklık besin eksikliği ve havalandırmanın haematococcus pluvialis flotow'da büyüme ve astaksantin miktarına etkisi, *J. Fisher Sci*, 6(4), 297-305.
- Laron, Z. and Klinger, B. 1998. Effect of insulin-like growth factor on serum androgens and testicular and penile size in males with Laron syndrome (primary growth hormone resistance). *Eur J Endocrinol*, 138,176-80.
- Ling, H., Yang, H., Tan, S-H., Chui, W-K. and Chew, E-H. 2010. 6-Shogaol, an active constituent of ginger, inhibits breast cancer cell invasion by reducing matrix metalloproteinase-9 expression via blockade of nuclear factor-κB activation. *Br J Pharmacol*, 161(8), 1763-1777.
- Liverman, C. T. and Blazer, D. G. 2004. *Testosterone and Aging: Clinical Research Directions*. Washington, DC: National Academies Press.
- Lu, Y. P., Liu, S. Y., Sun, H., Wu, X. M., Li, J. J. and Zhu, L., 2010. Neuroprotective effect of astaxanthin on h2o2 - induced neurotoxicity in vitro and on focal cerebral ischemia in vivo, *Brain Res*, 11, 1360-1368.
- Luther, J. M. and Brown, N.J. 2011. The renin–angiotensin–aldosterone system and glucose homeostasis. *Trends Pharmacol. Sci*, 32, 734-739.

- Lutzker, L. G. and Zuckier, L. S. 1990. Testicular scanning and other applications of radionuclide imaging of the genital tract. *Semin Nucl Med*, 20, 159-88.
- Martin, L. J., & Tremblay, J. J. 2010. Nuclear receptors in leydig cell gene expression and function. *Biol Reprod*, 83, 3-14.
- Midzak, A., Zirkin, B. and Papadopoulos, V. 2015. Translocator protein: pharmacology and steroidogenesis. *Biochim Soc Trans*, 43(4), 572-578.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43(2), 109-142.
- Moore, K. L., ve Persaud, T. V. N. 2009. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*, (Çev: Dalçık H. ve Yıldırım M.), Nobel Tıp Kitabevleri (8. Baskı), 263-265.
- Mortaz, E., Alipoor, S. D., Adcock, I. M., Mumby, S., Koenderman, L. 2018. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Front Immunol*, 9, 2171.
- Munzel, T., Gori, T., Bruno, R. M. and Taddei, S. 2010. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *Eur. Heart J.*, 31, 2741-2748.
- Myers, S. I., Hernandez, R., Turnage, R. H., Bartula, L. and Taylorkalley, B. 1995. Resuscitation of Ischemia-Reperfusion with Hyperalimentation Increases Intestinal Pgi(2) Synthase (Ps) Content and Pgi(2) Release. *Shock*, 3, 422-429.
- Nakajima, Y., Inokuchi, Y., Shimazawa, M., Otsubo, K., Ishibashi, T. and Hara, H., 2008. Astaxanthin, a Dietary Carotenoid, Protects Retinal Cells Against Oxidative Stress in-vitro and in Mice in-vivo. *J Pharma Pharmacol*, 60(10), 1365-74.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y. and Noguchi, N. 2005. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Com.* 338, 668-76.
- Nonaka, K., Bando, M., Eijiro, S., Inagaki, Y., Naruishi, K., Yumoto, H. and Kido, J, I. 2019. 6-Shogaol inhibits advanced glycation end-products-induced il-6 and ıcam-1 expression by regulating oxidative responses in human gingival fibroblasts. *Molecules*, 24(20), 3705.
- Noronha, I. L., Niemir, Z., Stein, H., ve Waldherr, R. 1995. Cytokines and growth-factors in renal-disease. *Nephrol Dial. Transplant.*, 10, 775-786.
- Noske, H. D., Kraus, S. W., Altinkilic, B. M., Weidner, W. 1998. Historical milestones regarding torsion of the scrotal organs, *J Urol*, 159, 13-16.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytic Biochem*, 95, 351-358.
- Okusa, M. D., Linden, J., Macdonald, T. and Huang, L. 1999. Selective A2A adenosine receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *The Am J. Physiol*, 277, 404-412.
- Olaizola, M. and Huntley, M. E., 2002. *Recent advances in commercial production of Astaxanthin from microalgae* (Ed: Fingerman, M., Nagabhushanam, R.), Biomaterials and Bioprocessing, Enfield, NH: Science Publishers.

- Ovalle, W. K., Nahirney, P. C., Netter, F. H. and Chovan, J. 2009. *Netter Temel Histoloji*, (Çev: Müftüoğlu, S., Kaymaz, F. ve Atilla, P.), Güneş Tıp Kitabevleri, 486.
- Overall, C.M. and Lopez-Otin, C. 2002. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, 2, 657-672.
- Ozturk, H., Ozturk, H., Terzi, E. H., Bugdayci, G. and Duran, A. 2014. Interleukin 10 reduces testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Urology*, 83, 508. 1-6.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırcı, G., and Yönden, Z. 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *J. Clin and Exp. Invest.*, 6(3), 331-336.
- Pacher, P. and Szabo, C. 2008. Role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human disease. *Am. J. Pathol.*, 173, 2-13.
- Paduch, D. A. and Skoog S. J. 2004. Diagnosis, evaluation and treatment of adolescent varicocele. *Sci World J.*, 4, 263-278.
- Parlaktas, B. S., Atilgan, D., Gencten, Y., Akbas, A. and vd., 2014. The effects of carvedilol on ischemia-reperfusion injury in the rat testis. *Int Braz J Urol* 40, 109-17.
- Piersma, D., Verhoef-Post, M., Berns, E.M. and Themmen, A. P. 2007. LH receptor gene mutations and polymorphisms: an overview. *Mol Cell Endocrinol*, 262, 282-286.
- Prater, J. M., ve Overdorf, B. S. 1991. Testicular torsion: a surgical emergency. *American family physician*, 44, 834-840.
- Prillaman, H. M. and Turner, T. T. 1997. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J. Urol.*, 157, 340-345.
- Qoubaitary, A., Swerdloff, R.S. and Wang, C. 2005. Advances in male hormone substitution therapy. *Expert Opin Pharmacother*, 6(9), 1493-1506.
- Ray, A., Vasudevan, S. and Sengupta, S. 2015. 6-Shogaol inhibits breast cancer cells and stem cell-like spheroids by modulation of notch signaling pathway and induction of autophagic cell death. *PLoS One*, 10(9).
- Rezk, M.R., Monir, H. and Marzouk, H.M. 2019. Novel determination of a new antiviral combination; sofosbuvir and velpatasvir by high performance thin layer chromatographic method; application to real human samples. *Microchem. J.* 146, 828-834.
- Ringdahl, E. and Teague, L. 2006. Testicular torsion. *Am Family Phys*, 74, 1739-1743.
- Rone, M.B., Fan, J. and Papadopoulos, V. 2009. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: Role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta*, 1791(7), 646-658.
- Sade, M., Esen, A., Çelebi, İ. and Mungan, U. 1998. Ürogenital sistemin acil yaklaşım gerektiren hastalıkları, Göğüş, O., Anafarta, K., Bedük, Y., Arıkan, N., (Eds), *Temel Üroloji*, Ankara: Güneş Kitabevi.

- Sarica, K., Bakir, K., Yagci, F., Erbagci, A. and vd. 1999. Unilateral testicular torsion: protective effect of verapamil on contralateral testicular histology. *Urol Int*, 62, 159-163.
- Sarica, K. and Bakir, K. 1999. Semiquantitative evaluation of testicular histology after testicular torsion: protective effect of external cooling. *Urol Int.*, 63, 110-114.
- Satoh, K., Ikeda, Y., Shioda, S., Tobe, T. and Yoshikawa, T. 2002. Edarabone scavenges nitric oxide. *Redox Rep.*, 7, 219-222.
- Sharp, V. J., Kieran, K. and Arlen, A.M. 2013. Testicular torsion: diagnosis, evaluation, and management. *Am Fam Physician*, 88, 835-40.
- Shiraishi, K., Naito, K. and Yoshida, K. 2001. Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod*, 65, 514-21.
- Spear, N. and Aust, S. D. 1995. Hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by copper and thiols. *Arch Biochem Biophys*, 317, 142-148.
- Sriraman, V. and Rao, A. J. 2004. Evaluation of the role of FSH in regulation of Leydig cell function during different stages of its differentiation. *Mol Cell Endocrinol*, 224, 73-82.
- Steinbrenner, J. and Linden, H. 2001. Regulation of Two Carotenoid Biosynthesis Genes Coding for Phytoene Synthase and Carotenoid Hydroxylase during Stress-Induced Astaxanthin Formation in the Green Alga *Hematococcus pluvialis*, *Plant Physiol*, 125(2), 810-817.
- Sun, Y., Oberley, L.W. and Li, Y. 1988. A simple method for clinical assay of superoxide-dismutase. *Clin Chem.*, 34, 497-500.
- Sun, Z., Wang, X., Lasson, A., Bojesson, A., Annborn, M. and Andersson, R. 2001. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scan J. Gastroenterol*, 36, 55-65.
- Tanyeli, A., Eraslan, E., Ekinci Akdemir, F. N., Guler, M. C., Guzel Erdogan, D., Polat, E., and Topdagi, O. 2019. Cryptotanshinone mitigates ischemia reperfusion-induced testicular damage: A experimental study. *Ann Med Res.*, 26(11), 2549-52.
- Tinkler, J. H., Bohm, F., Schalch, W., Photochem, J., Photobiol, B. and Truscott, T.G. 1994. Dietary carotenoids protect human cells from damage, *Photobiol. B: Biol*, 26, 283-285.
- Topdağ1 O, Tanyeli A, Ekinci Akdemir F. N, Eraslan E, Güler M. C. (2020). Barbaloin Attenuates Oxidative Testicular Injury Induced by Ischemia Reperfusion via Antioxidant Effects. *Turk J. Sci.*, 5(1), 28-33.
- Topdağ1 O., Tanyeli, A., Ekinci Akdemir, F.N., Güzel Erdoğan, D., Güler, M.C. and Eraslan, E. 2019. The Effects of Higenamine on Testicular Damage Injured by Ischemia Reperfusion: A Biochemical Study. *Turk J. Sci.*, 4(2), 92-99.

- Turner, T. T., Bang, H. J. and Lysiak, J. L. 2004. The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. *J. Urol.* 172, 2574-2578.
- Uz, E., Sogut, S., Sahin, S., Var, A. and vd. 2002. The protective role of caffeic acid phenethyl ester on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *World J Urol*, 20, 264-270.
- Vaos, G. and Zavras, N. 2017. Antioxidants in experimental ischemia-reperfusion injury of the testis: Where are we heading towards? *World J Methodol*, 7(2), 37-45.
- Vidhyavathi, R., Venkatachalam, L., Sarada, R. and Ravishankar, G. A. 2008. Regulation of Carotenoid Biosynthetic Gene Expression and Carotenoid Accumulation in the Green alga *Hematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions, *J Exp Bot*, 59(6), 1409-18.
- Visser, A. J. and Heyns, C. F. 2003. Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU International*, 92, 200-203.
- Wang, C. and Swerdloff, R. S. 2003. Androgen replacement therapy in hypogonadal men. In: Winters SJ, editor. *Male Hypogonadism: Basic, Clinical and Therapeutic Principles*. Totowa: The Humana Press, 353-370.
- Wang, C., Catlin, D. H., Demers, L. M., Starcevic, B., and Swerdloff, R. S. 2004. Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(2), 534-543.
- Wang, X., Li, X., Jingfen, W., Fei, D. and Mei, P. 2019. Higenamine alleviates cerebral ischemiareperfusion injury in rats. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 24, 859-69.
- Wei, S.M., Yan, Z.Z. and Zhou, J. 2008. Taurine reduces testicular ischemia/reperfusion-induced neutrophil recruitment to testis probably by downregulation of pro-inflammatory cytokines and E-selectin. *Urology*, 72, 464-465.
- Weinbauer, G. F., Niehaus, M. and Nieschlag, E. 2004. The role of testosterone in spermatogenesis. Testosterone: action, deficiency, substitution. Cambridge: Cambridge University Press.
- Woźniak, M. and vd. 2020. 6-Shogaol enhances the anticancer effect of 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan via increase of apoptosis and autophagy in colon cancer cells in hypoxic/aglycemic conditions. *BMC Complement Med Ther.*, 20, 141.
- Yagmurdur, H., Ayyildiz, A., Karaguzel, E., Ogus, E. and vd. 2006. The preventive effects of thiopental and propofol on testicular ischemia-reperfusion injury. *Acta Anaesthesiol Scand*, 50, 1238-43.
- Yang, L., Yang, F., Teng, L. and Katayama, I. 2020. 6-Shogaol protects human melanocytes against oxidative stress through activation of the nrf2-antioxidant response element signaling pathway. *Int J Mol Sci.*, 21(10), 3537.

- Zhang, Y., Tang, H. R. and Luo, Y. 2008. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. *World J Agric. Sci*, 4, 458-68.
- Zhang, N., Lian, Z., Peng, X., Li, Z. and Zhu, H. 2017. Applications of Higenamine in pharmacology and medicine. *J. Ethnopharmacol*, 196, 242-52.
- Zini, A., O'Bryan, M. K., Magid M. S. and Schlegel P. N. 1996. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reproduct*. 55(5), 935-941.
- Zirkin, B. R., Ewing, L. L., Kromann, N. and Cochran, R. C. 1980. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology*, 107, 1867-1874.

EKLER

EK 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük



Sayı : 75296309-050.01.04-E.1900324023 12.11.2019
Konu : HADYЕК Kararı.

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 05.11.2019 tarihli ve 42190979-000-E.1900318083 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 07.11.2019 tarih ve 14 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 202 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYЕК Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#!birim=veteriner-fakultesi>
Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr



1 / 2

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
<https://ubys.atauni.edu.tr/ERMS/Record/Confirmation/Confirmation?code=8761631F33C>

TOPLANTI TARİHİ : 07.11.2019

TOPLANTI SAYISI : 14

KARAR N0 202: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr.Öğr.Üyesi Ayhan TANYELİ'nin yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **"Sıçan Testis İskemi Reperfüzyon Hasarında 6-Shogaol'un Koruyucu Etkileri"** isimli araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 05.11.2019 tarih ve 42190979-000-E.1900318083 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesinin, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.