



TC

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA DENEYSEL TESTİS İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE, KARVAKROLÜN OLASI ETKİLERİNİN
HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

Cemre Nur BALCI

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT BOLU

2018



TC

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA DENEYSEL TESTİS İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE, KARVAKROLÜN OLASI ETKİLERİNİN
HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

Cemre Nur BALCI

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje numarası: 2017.08.03.1175)

ŞUBAT 2018

BOLU

Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim
Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aysel KÜKNER

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yakın Doğu Üniversitesi

Prof. Dr. Meryem ÇAM

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Düzce Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Abant İzzet Baysal Üniversitesi

(imza)

(imza)

(imza)

Tarih:02/02/2018

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu, Cemre Nur BALCI'nın Yüksek
Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Erol AYAZ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

(imza)

ÖZET

RATLARDA DENEYSEL TESTİS İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE, KARVAKROLÜN OLASI ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

Testis torsiyonu genç erkeklerde ve yeni doğanlarda subfertiliteye ve testis hasarına sebep olan ürolojik bir sorundur. Testis torsiyonunu takiben detorsiyon uygulaması testiste iskemi reperfüzyon hasarını meydana getirir. Testis iskemi reperfüzyon hasarı Reaktif oksijen türleri ile birlikte oksidatif stres ve germ hücre apoptozuna sebep olmaktadır. ATP bağımlı potasyum kanallarının açılması ise iskemi reperfüzyon hasarına karşı dokuyu korumaktadır. Bu çalışmamızda Testis iskemi reperfüzyon hasarına karşı karvakrolün olası koruyucu etkisi ile ATP bağımlı potasyum kanalı olan Kir6.2 kanalları üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada 36 adet 2-4 aylık erkek Albino Wistar ratlar kullanıldı. Deney grupları; Sham, Kontrol+DMSO, Kontrol+Karvakrol, İR, İR+DMSO ve tedavi grubu olmak üzere toplam 6 grup olarak belirlendi. Deneysel testis iskemi reperfüzyon modeli oluşturmak için sol testis saat yönünün tersine 720° döndürülerek 2 saat boyunca torsiyon, torsiyonu takiben 2 saat boyunca detorsiyon yapıldı. Tedavi grubunda karvakrol, detorsiyon yapılmadan yarım saat önce 73mg/kg dozunda %5'lik DMSO içinde çözülerek 0.2 ml intraperitoneal olarak verildi.

Histolojik olarak, intertübüler alanlarda konjesyon, ödem, seminifer tübüllerde yapısal bozukluk ve hücre döküntüleri İR grubunda çok iken, tedavi grubunda minimal düzeyde gözlemlendi. Apoptotik hücre sayıları ve serum MDA değerlerinde, Tedavi grubunda İR grubuna göre anlamlı azalma ($p \leq 0.05$), Kir6.2 aktivasyonunda ise anlamlı bir artış ($p \leq 0.05$) olduğu görüldü.

Çalışmanın sonucunda, karvakrolün testis iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu etkisi olduğu, apoptozu engellediği ve Kir6.2 kanallarını aktive ettiği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Karvakrol, Testis, İskemi-reperfüzyon hasarı, Kir6.2, Kaspaz-3

ABSTRACT

HISTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INVESTIGATION OF POSSIBLE EFFECTS OF CARVACROL ON EXPERIMENTAL TESTIS ISCHEMIA REPERFUSION MODEL IN RATS

Testicular torsion is a urological problem that causes subfertility and testicular damage in young males and newborns. Following the testis torsion, detorsion leads to ischemia reperfusion injury in the testis. Testicular ischemia reperfusion injury causes increase of reactive oxygen species, oxidative stress and germ cell apoptosis. The opening of ATP-dependent potassium channels protects the tissue against ischemia reperfusion injury. In this study, it was aimed to investigate the possible protective effects of carvacrol against the testicular ischemia reperfusion injury and effects on Kir6.2 channels which is a member of ATP-dependent potassium channels.

In this study 36 male 2-4 months old male Albino Wistar rats were used. Experimental groups were determined as Sham, Control+DMSO, Control+Carvacrol, IR, IR+DMSO and Treatment groups. The left testis was rotated counter-clockwise at 720° for testicular torsion for 2 hours, and detorsion for 2 hours following torsion were performed for experimental testicular ischemia reperfusion model. In treatment group, carvacrol was dissolved in 5% DMSO at a dose of 73 mg/kg and half hour before detorsion, and 0.2 ml dose was administered intraperitoneally.

Histologically, congestion, edema, structural disturbance in seminiferous tubules and cell debris were very common in the IR group, but minimal in the treatment group. Apoptotic cell counts and serum MDA levels were significantly decreased ($p \leq 0.05$) and Kir6.2 activation was significantly increased in the treatment group when compared to IR group ($p \leq 0.05$).

As a result of the study, it was understood that carvacrol has a protective effect of testicular ischemia reperfusion injury, activates Kir6.2 channels and inhibits apoptosis.

Key words: Carvacrol, Testis, Ischemia-reperfusion injury, Kir6.2, Caspase-3

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca hiçbir zaman desteğini esirgemeyen,engin bilgi ve tecrübeleri ile bana ışık tutan, örnek olan değerli hocam eski Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Aysel Kükner'e saygılarımı sunar, çok teşekkür ederim. Eğitim ve tez sürecim boyunca her anlamda yardımına koşan, nasihatleri ile bana yol gösteren tez danışmanım ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Tülin Fırat'a çok teşekkür ederim.

Projemde emeği geçen, güler yüzü ile beni rahatlatan Biyokimya Anabilim Dalı üyesi Sayın Doç. Dr. Buket Kın Tekçe'ye, Deney aşamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Hayriye Orallar'a, Vet. Hekim Enes Eğilmez'e, AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlara çok teşekkür ederim. Ayrıca deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen AİBÜ Biyokimya Anabilim Dalı çalışanları ve AİBÜ Patoloji Anabilim Dalı çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Ayrıca bölüm arkadaşlarım Gizem Söyler, Serhat Gökdaş, Gizem İlter Aktaş, Esra Fidan, Hande Yılmaz, Gizem Dede ve Uzm. Dr. Sevilay Erimsah'a yardımları ve birlikte geçirdiğimiz güzel günler için teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca beni her konuda destekleyen, yaptığım seçimlerde her zaman arkamda duran sevgili annem Sevda Balcı, canım babam Mustafa Balcı ve kardeşim Buğra Balcı'ya çok teşekkür ederim.

Cemre Nur BALCI

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER.....	viii
TABLolar.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Testis Anatomisi	3
2.1.1. Epididimis.....	3
2.1.2. Spermatik kordon	4
2.1.3. Skrotum	4
2.2. Testis Embriyolojisi	6
2.2.1. Primordiyal germ hücrelerinin göçü.....	6
2.2.2. Testis oluşumu.....	6
2.3. Testis Histolojisi.....	9
2.3.1. Sertoli hücreleri	9
2.3.2. Leydig Hücreleri.....	10
2.3.3. Spermatogenik hücreler ve spermatogenez	10
2.3.4. Spermiyogenez	10
2.3.5. Spermin yapısı	11
2.3.6. Epididimis histolojisi.....	12
2.4. Testis Torsiyonu.....	15
2.4.1. Testis iskemi reperfüzyon hasarı	16
2.5. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	18
2.5.1. Lipid peroksidasyonu	18
2.5.2. Oksidatif stres ve antioksidanlar	18
2.5.3. Oksidatif stres ve apoptoz	19
2.6. ATP Bağımlı Potasyum Kanalları.....	21

2.6.1. Kir6.2.....	22
2.7. Karvakrol.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1. Deney Hayvanları Temini ve Bakımı	25
3.2. Deney Grupları.....	25
3.3. Testis İskemi Reperfüzyon Modeli Oluşturma	25
3.4. Deney Aşaması.....	26
3.5. Spermiyogram	28
3.6. Doku Takip Aşaması.....	29
3.7. Işık Mikroskopik İnceleme	29
3.7.1. Hematoksilen-eozin boyaması.....	29
3.7.2. Masson'un üçlü boyaması	30
3.7.3. İmmünohistokimyasal işaretleme	31
3.8. Johnsen Skorlaması.....	33
3.9. Biyokimyasal Analiz	34
3.10. İstatistiksel Bulgular.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Biyokimyasal Bulgular.....	35
4.2. Spermiyogram Bulguları:	36
4.3. Işık Mikroskopik Bulgular	38
4.3.1. Histolojik bulgular.....	38
4.3.2. Seminifer tübül çapı ve johnsen skorlama bulguları	49
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	50
4.4.1. Kaspaz-3 İmmün İşaretleme.....	50
4.4.2. Kir6.2 immün işaretleme	55
4.4.3. TUNEL immün işaretleme	59
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
7. KAYNAKLAR	69
8. ÖZGEÇMİŞ	80
9. EKLER	81

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1. Sol testis anatomisi.
- Şekil 2.2. Testis ve epididimisin vertikal kesiti.
- Şekil 2.3. Testis kanallarının düzenlenmesi ve vaz deferens oluşum şekli.
- Şekil 2.4. Testis gelişim evreleri şematik diyagramları.
- Şekil 2.5. Testis ve epididimis.
- Şekil 2.6. İnsan seminifer epitelinin şematik çizimi.
- Şekil 2.7. Spermatogenez.
- Şekil 2.8. Testis fonksiyonunun hormonal kontrolü.
- Şekil 2.9. İnsan sperminin yapısı.
- Şekil 2.10. Testis torsiyonunun patofizyolojisi.
- Şekil 2.11. Kaspaz-3 ve programlanmış hücre ölümünün (PCD) düzenlenmesi.
- Şekil 2.12. Karvakrolün kimyasal yapısı.
- Şekil 2.13. Karvakrolün biyolojik yararları.
- Şekil 3.1. Testis İskemi reperfüzyon modeli oluşturma.
- Şekil 4.1. Tüm grupların serum MDA değerleri.
- Şekil 4.2. Tüm grupların serum Testosteron değerleri.
- Şekil 4.3. Tüm gruplardaki sperm konsantrasyon değerleri.
- Şekil 4.4. Tüm gruplardaki toplam hareketli sperm yüzdeleri.
- Şekil 4.5. Sham grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 10x.
- Şekil 4.6. Sham grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 20x.
- Şekil 4.7. K+DMSO grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 10x.
- Şekil 4.8. K+DMSO grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 20x.
- Şekil 4.9. K+Karvakrol grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 10x.
- Şekil 4.10. K+Karvakrol grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 20x.
- Şekil 4.11. İR grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 10x.
- Şekil 4.12. İR grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 10x.
- Şekil 4.13. İR grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 10x.
- Şekil 4.14. İR grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 20x.
- Şekil 4.15. İR+DMSO grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 10x.
- Şekil 4.16. İR+DMSO grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 20x.
- Şekil 4.17. Tedavi grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 10x.
- Şekil 4.18. Tedavi grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması 20x.
- Şekil 4.19. Sham grubuna ait Masson'un üçlü boyaması, 10x.
- Şekil 4.20. K+DMSO grubuna ait Masson'un üçlü boyaması, 10x.
- Şekil 4.21. K+Karvakrol grubuna ait Masson'un üçlü boyaması, 10x.
- Şekil 4.22. İR grubuna ait Masson'un üçlü boyaması, 10x.
- Şekil 4.23. İR+DMSO grubuna ait Masson'un üçlü boyaması, 10x.
- Şekil 4.24. Tedavi grubuna ait Masson'un üçlü boyaması, 10x.
- Şekil 4.25. Tüm grupların tübül çapı değerleri.
- Şekil 4.26. Tüm grupların Johnsen skorum değerleri.
- Şekil 4.27. Tüm grupların Kaspaz-3 pozitif hücre sayısı.

- Şekil 4.28. Sham grubuna ait testis dokusu. Kaspaz-3 immün işaretleme, 20x.
- Şekil 4.29. K+DMSO grubuna ait testis dokusu. Kaspaz-3 immün işaretleme, 20x.
- Şekil 4.30. K+Karvakrol grubuna ait testis dokusu. Kaspaz-3 immün işaretleme, 20x.
- Şekil 4.31. K+Karvakrol grubuna ait testis dokusu. Kaspaz-3 immün işaretleme, 40x.
- Şekil 4.32.. İR grubuna ait testis dokusu. Kaspaz-3 immün işaretleme, 20x.
- Şekil 4.33. İR+DMSO grubuna ait testis dokusu. Kaspaz-3 immün işaretleme, 20x.
- Şekil 4.34. Tedavi grubuna ait testis dokusu. Kaspaz-3 immün işaretleme 20x.
- Şekil4.35. Tüm grupların Kir6.2 pozitif hücre sayımı değerleri.
- Şekil 4.36. Sham grubuna ait testis dokusu. Kir6.2 İmmün işaretleme, 20x.
- Şekil 4.37. K+DMSO grubuna ait testis dokusuKir6.2 İmmün işaretleme, 20x.
- Şekil 4.38. K+Karvakrol grubuna ait testis dokusu. Kir6.2 İmmün işaretleme, 20x.
- Şekil 4.39. İR grubuna ait testis dokusu. Kir6.2 immün işaretleme, 20x.
- Şekil 4.40. İR+DMSO grubuna ait testis dokusu. Kir6.2 immün işaretleme, 20x.
- Şekil 4.41. Tedavi grubuna ait testis dokusu. Kir6.2 işaretleme, 20x.
- Şekil 4.42. Tüm Grupların TUNEL pozitif hücre sayımı değerleri.
- Şekil 4.43. Sham grubuna ait testis dokusu. TUNEL boyaması, 20x.
- Şekil 4.44. K+DMSO grubuna ait testis dokusu. TUNEL boyaması, 20x.
- Şekil 4.45. K+Karvakrol grubuna ait testis dokusu. TUNEL boyaması, 20x.
- Şekil 4.46. İR grubuna ait testis dokusu. TUNEL boyaması, 20x.
- Şekil 4.47. İR+DMSO grubuna ait testis dokusu. TUNEL boyaması, 20x.
- Şekil 4.48. Tedavi grubuna ait testis dokusu. TUNEL boyama, 20x.

TABLÖLAR

Tablo 2.1. Karvakrolün özellikleri.

Tablo 3.1. Deney süreci.

Tablo 4.1. Serum MDA değerleri.

Tablo 4.2. Serum Testosteron değerleri.

Tablo 4.3. Sperm konsantrasyon değerleri.

Tablo 4.4. Toplam hareketli sperm yüzdeleri.

Tablo 4.5. Tübül çapı değerleri.

Tablo 4.6. Johnsen skorlaması değerleri.

Tablo 4.7. Kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları.

Tablo 4.8. Kir6.2 ile pozitif boyanan hücre sayıları.

Tablo 4.9. TUNEL ile boyanan hücre sayıları.



SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP:	Androjen Bağlayıcı Protein
Apaf1:	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
Bcl-2:	B Hücre Lenfoma 2
CAD:	Caspase Activated DNase
CARD:	Kaspaz Aktive edici Domain
DMSO:	Dimetilsülfoksit
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FSH:	Folikül Uyarıcı Hormon
GCA:	Germ Hücre Apoptozu
GDNF:	Glial Hücre Hattından Türetilen Nörotrofik Faktör
H₂O₂:	Hidrojen Peroksit
ICAD:	Caspase Activated DNase İnhibitörü
İR:	İskemi Reperfüzyon Hasarı
KATP:	ATP Bağımlı Potasyum Kanalları
LH:	Luteinize Hormon
MDA:	Malondialdehit
MIF:	Müllerian İnhibe Edici Faktör
mitoKATP:	Mitokondrial ATP'ye Bağımlı Potasyum Kanalı
MOMP:	Mitokondrial Dış Zar Geçirgenliği
NO:	Nitrik Oksit
nukKATP:	Nükleer ATP'ye Bağımlı Potasyum Kanalı
NuMa:	Nükleer Mitotik Aparat Proteinini
O₂:	Süperoksit Anyonu
OH:	Hidroksil Radikali
PARP:	poli [ADP-riboz] polimeraz
PBS:	Fosfat Tamponlu Çözelti
RNS:	Reaktif Azot Türleri
RNOS:	Reaktif Nitrik Oksit Türleri
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
sarcKATP:	Sarkolemmal ATP'ye Bağımlı Potasyum Kanalı
SCF:	Kök Hücre Faktörü
SOD:	Süperoksit Dismutaz
SUR:	Sülfonilüre Reseptörü
TDF:	Testis Belirleyici Faktör
TNF-α:	Tumor Necrosis Factor-Alpha
TUNEL:	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling

1.GİRİŞ

Testis torsiyonu, testisin testis damarları ve spermatik kordonun etrafında dönerek kan akımının engellenmesiyle, testis hasarına yol açan ve subfertiliteye sebep olan ürolojik bir sorundur (1,2). Çocukluk çağında oluşan testis torsiyonu akut skrotuma sebep olur (3). Torsiyon iskemik hasara yol açarken, detorsiyon ise reperfüzyon hasarına neden olarak testis dokusunda patolojik değişikliklere sebep olur. Bu değişikliklere reaktif oksijen türlerinin (ROS) yol açtığı düşünülmektedir (4,5). Serbest oksijen türleri, proteinleri bozarak hücre harabiyetine neden olur (6). Yapılan çalışmalarda farklı dokularda iskemi reperfüzyon hasarlarının antioksidan tedavileri ile azaltıldığı görülmüştür (7). Daha çok genç erkeklerde görülen testis torsiyonu, müdahale edilmediği zaman gonad kaybına neden olur (8). Deneysel oluşturulan testis iskemi modelinde en çok spermatosit ve spermatogonyum gibi germ hücrelerinin kaybı gözlenmiştir (9,10). İskemi sırasında düşen oksijen seviyesi, metabolik ihtiyaçların azalması ve toksik metabolitlerin birikmesiyle hücre ölümleri gerçekleşir (11). Dokularda oluşan hasara ek olarak peroksidasyonun artması antioksidan akvitenin azalması ve hücre içinde metal iyonlarının artarak serbest hale gelmesi ile hücre lipidlerinin oksidasyonu gerçekleşir. Peroksidasyon sırasında açığa çıkan metabolitlerden olan Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun bir belirteci olarak kabul edilir (12). Çalışmalar, antioksidanların spermatozoayı ROS'tan koruyarak anormal spermatozoa üretimini engellediğini, lökositler tarafından üretilen ROS'u süpürüp DNA fragmantasyonunu önlediğini, sperm kalitesini iyileştirdiğini, prematüre sperm olgunlaşmasını engellediğini ve sonuçları iyileştirdiğini göstermiştir (13). Aynı zamanda iskemi reperfüzyon hasarında ortaya çıkan metabolik stresi inhibe etmede ATP'ye duyarlı potasyum kanallarının (KATP) görevi olduğu bilinmektedir. KATP kanalları, voltaja bağımlı olmayan, potasyum-seçici kanallardır ve ATP ve ADP hücre içi nükleotidleri tarafından kaplıdır. Üç tip KATP kanalı vardır: sarkolemmal (sarcKATP), mitokondriyal (mitoKATP) ve nuklear (nucKATP) (14). ATP'ye duyarlı potasyum kanallarının dokuyu iskemik hasardan koruduğu tespit edilmiştir (15). KATP kanalları gözenek oluşturan ve düzenleyici alt birimlerden oluşmaktadır. Bu alt birimlerden Kir6.1, Kir6.2, SUR1, SUR2A ve SUR2B nin testiste bulunduğu tespit edilmiştir (16). ATP'ye duyarlı potasyum kanalları, germ hücrelerinin zar potansiyellerini korumakla sorumludur. Farklı KATP kanalları farklı evrelerdeki germ hücrelerinde lokalize olur (17). Kir6.2 altbirimi spermatogonyum, spermatosit ve geç evre spermelerde bulunmaktadır (16). Birçok testis iskemi-reperfüzyon modeli çalışmasında spermatogenez aktivasyonunun azaldığı gösterilmiştir. Spermatogenezdeki bu kayıp, testisteki diğer hücrelerin etkilenmeden kaldığı germ hücre özellikli apoptozu (GCA) olarak tanımlanmıştır (18,19). Yapılan bir çalışmada iskemi reperfüzyon yapılan testis

dokusunda açılan KATP kanallarının kaspaz bağımlı apoptozu engellediği görülmüştür (20).

Bu çalışmada kullanılacak olan karvakrol 2-Methyl-5-(1-methylethyl) phenol, Origanum, Thymus ve Corydothymus türleri de dâhil olmak üzere Labiatea ailesinin birçok uçucu yağında bulunan baskın monoterpenik fenoldür (21). Yapılan çalışmalarda karvakrolün antitümör, antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan gibi etkilerinin olduğu belirlenmiştir (22).

Çalışmamızda ratlarda oluşturulan testis iskemi reperfüzyon hasarı üzerinde karvakrolün etkileri incelenmiştir. Gruplara ait testis dokularında Kaspaz-3, Kir6.2 ekspresyonu üzerindeki etkileri immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Biyokimyasal olarak serum MDA ve Testosteron hormonu ölçülmüştür. Histolojik değerlendirmede, testis dokuları ışık mikroskobu ile incelenmiş, seminifer tübül çapları ölçülmüş, spermatogenez değişikliklerini saptamak için Johnsen skorlaması yapılmıştır. Epididimisten alınan sperm örnekleri sayılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Anatomisi

Testisler, sperm ve testosteron üretiminden sorumlu organlardır. Erişkin bireylerde 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde, 3-4 cm çapındadır (23). Testislerin ağırlıkları 12-20 gram arasında değişmektedir. Ortalama bir testisin hacmi 15 ile 25 ml arasında değişir (24,25). Testisler skrotumun içinde spermatik kordonlarla asılı halde bulunur. Genelde sol testis sağ testise göre daha aşağıdadır. Her iki testis de oblik olarak yerleşiktir. Böylece üst kutup anterolateral olarak eğilirken alt kutup anteromedial eğilir. Testisler skrotumda, testiküler pampiniform pleksusun ters akım ısı değiştirme mekanizması ile birlikte vücut sıcaklığından 3-4 °C daha az bir sıcaklıkta tutulmaktadır (26).

Testisler üç tabakadan oluşan sert bir kapsül içine alınmıştır: Kapsülün iç tarafında tunika vasküloza, arada tunika albuginea ve dışında tunika vaginalis bulunmaktadır. Testisin arka yönüne epididimis bağlanır ve bu nedenle, kısmen serozayla kaplıdır. Tunika albuginea mediastinum testisi oluşturmak için içeriye uzanır ve tunika vaginalis epididimi örtmek için dışa doğru uzanır. Skrotumda testisler fibröz orta septum ile ayrılır. Testis arteri, abdominal aortadan köken alır ve inguinal kanaldaki spermatik kordon ile skrotum içine girer. Testis arteri testis boyunca, bir ya da daha fazla internal spermatik arter, bir inferior testiküler arter ve epididimisin kaput, korpus ve kaudasını destekleyen dallar verir (26).

Tunika Vasküloza: Tunika vasküloza kan damarlarını içeren gevşek bir bağ dokudur. Tunika albugineanın iç kısmında bulunmaktadır ve testis içindeki tüm yüzeyleri ve septasyonları kaplar (26).

Tunika Albuginea: Tunika albuginea, yoğun mavi-beyaz bir tabaka olup kollajen liflerden oluşmaktadır. Tunika vaskülozayı kaplar ve tunika vaginalisin visseral tabakası tarafından sarılıdır. Testisin posterior yönünde, testisin üst kutbundan alt kutbuna kadar uzanan, kalın fakat tamamlanmamış bir fibröz septum olan mediastinum testis şeklinde içeriye doğru uzanır (26).

Tunika Vaginalis: Tunika vaginalis, periton boşluğunun devamıdır. Tunika vaginalis testisin yüzeyinden, skrotumun iç tabakasına doğru uzanır ve testisin her iki kutbunda visseral ve pariyetal tabakalar oluşturur. Visseral tabaka, pariyetal tabaka ile süreklilik kazanmadan önce, epididime doğru arka hariç testisin tüm yönlerini sarar. Pariyetal tabakanın iç yüzeyi düz mezotelyumdur. Visseral ve pariyetal tabakalarının arasında bulunan tunika vaginalis boşluğunda, ince bir sıvı tabakası bulunur (26).

2.1.1. Epididimis

Epididimis, testisin posteriorunda ve hafif lateralinde yer alır. Kaput (baş), korpus (gövde) ve kauda (kuyruk) olarak üç bölümden oluşmaktadır. Efferent

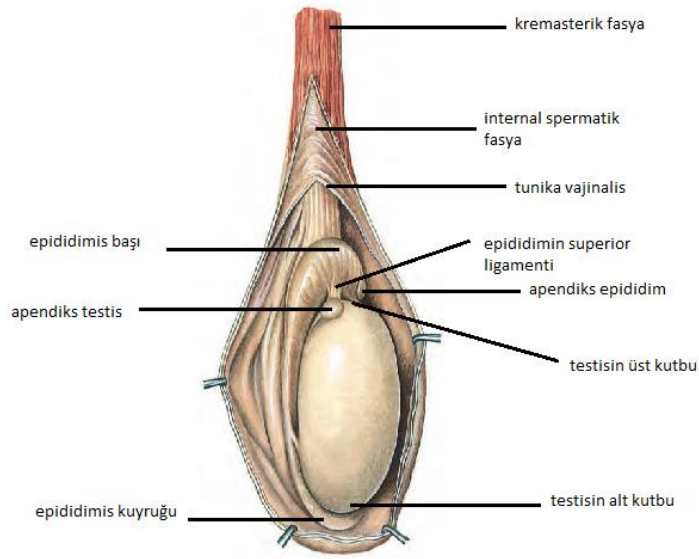
kanallar 8-10 adettir ve testisin üst kutbundan içeriye doğru girerek kaput epididimi oluştururlar. Epididimisin kauda bölgesi distalde vas deferensin kıvrık kısmı ile kesintisiz hale gelir (26).

2.1.2. Spermatik kordon

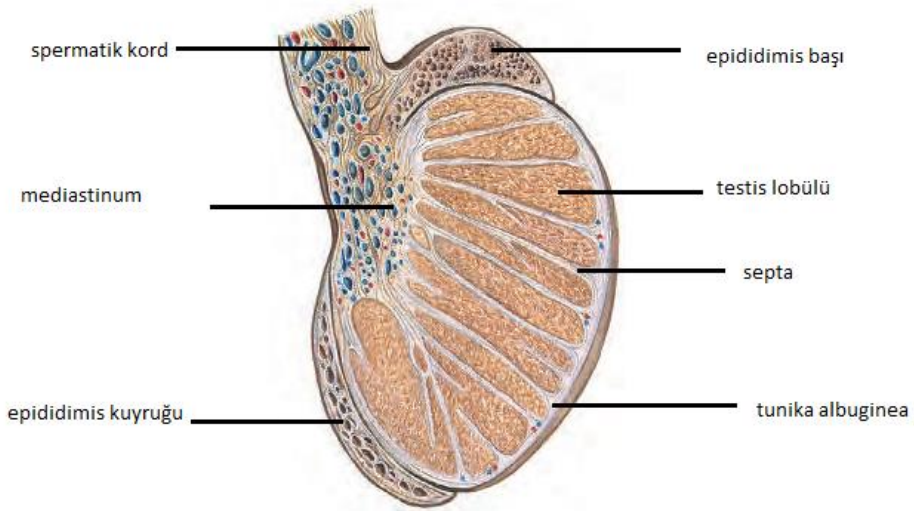
Spermatik kordon, inguinal halkadan başlar, inguinal kanalın uzunluğu boyunca devam eder. Yüzeysel veya dış inguinal kanaldan çıkar ve testisin skrotumda asılı kalmasını sağlar. Spermatik kordon içinde testiküler damar ve sinirler, ilioinguinal sinir, genitofemoral sinirin genital dalı, kremasterik damarlar ile duktus deferens bulunur. Bu fasiyal katmanlar karın duvarının katmanlarıyla devamlılık gösterir. İnternal spermatik fasiyal, transversalis fasyadan türemiştir ve spermatik kordon çevresinde ince, gevşek bir tabaka oluşturur. Kremaster kasını oluşturan iskelet kası liflerini içeren kremaster fasiyal, iç oblikden köken alır. Dış spermatik fasiyal dış oblik aponevrozu ile kesintisiz devam eder (26).

2.1.3. Skrotum

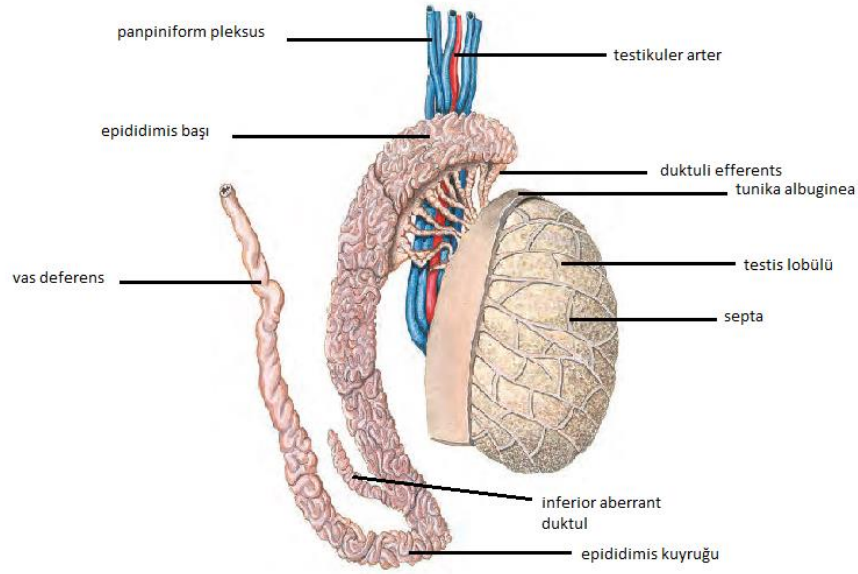
Skrotum deri, dartos kası, dış spermatik, kremasterik ve internal spermatik fasya dahil olmak üzere bir çok doku katmanından oluşur. Skrotal deri ince, pigmentli ve ter bezleri bakımından zengin bir yapıdadır. Orta hat raphesi üretral meatustan, ventral penil shaftın altından anüse uzanır ve genital tüberküllerin hattında kaynaşma gösterir. Raphenin derinliğinde skrotum deri hariç, skrotal duvarın tüm katmanlarından oluşan bir septum ile iki bölmeye ayrılır. Testisler, bu bölmelerde spermatik kordonlarla asılı bulunmaktadır. Düz kasların dartos tabakası, Colles, Scarpa ve perinedeki dartos fasyası ile kesintisiz devam eder. Skrotumun dış spermatik, kremasterik ve iç spermatik katmanları sırasıyla spermatik kordonlardaki katmanlarla kesişir. Daha sonra sırasıyla dış ve iç oblik aponevrozlardan ve karın duvarının transversalis fasyasından ortaya çıkar. Testis aynı zamanda alt kutbundaki skrotal duvara, gubernakulum olarak bilinen lifli bir doku bandıyla sabitlenir (26).



Şekil 2.1. Testis anatomisi. (26, 27)



Şekil 2.2. Testis ve epididimisin vertikal kesiti. (26, 27)



Şekil 2.3. Testis kanallarının düzenlenmesi ve vaz deferens oluşum şekli. (26,27)

2.2. Testis Embriyolojisi

2.2.1. Primordiyal germ hücrelerinin göçü

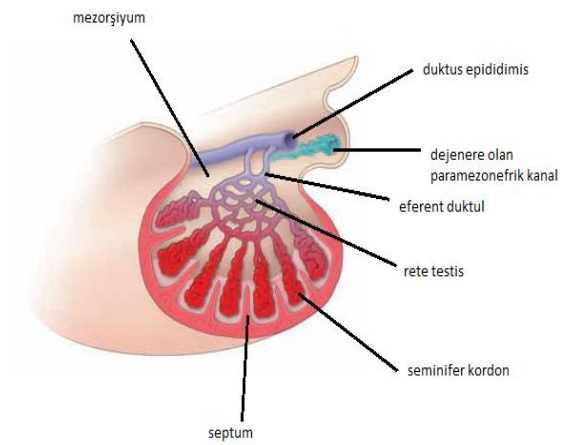
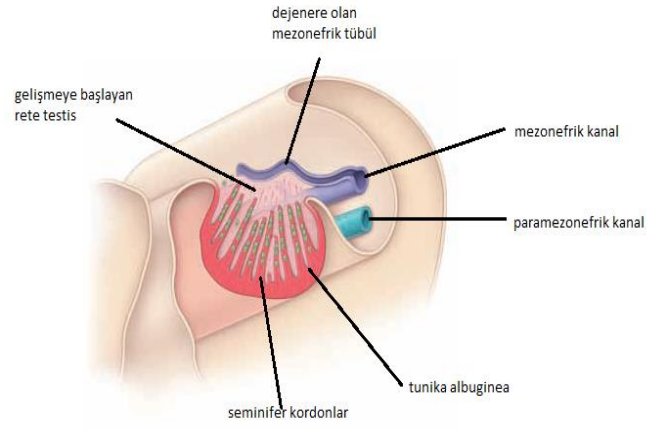
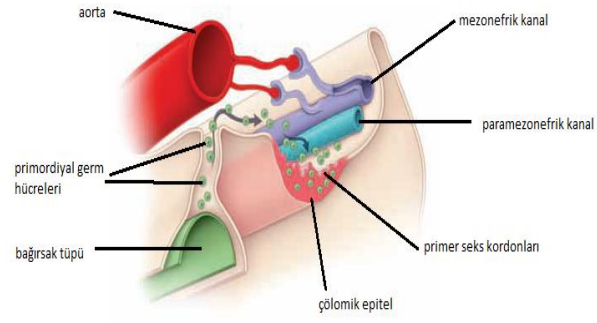
Primordiyal germ hücreleri allontois orijinine yakın olan yolk kesesinin endodermal hücrelerinden köken alır (28). 4. haftada primordiyal germ hücreleri mezenterin dorsali boyunca ilerler ve 5. haftada primitif gonadlara ulaşır. Daha sonra 6. haftada ise genital kabartılara yerleşirler (29). Primordiyal germ hücreleri, primitif gonadlara ulaşmadan önce ve ulaştığında genital kabartının endodermal hücreleri ve çöломik mezotelyum hücreleri çoğalarak mezenşime gömülürler ve primitif cinsiyet kordonlarının oluşumunu indükler (29,30).

2.2.2. Testis oluşumu

Genetik cinsiyet, Y kromozomun varlığı ve yokluğu ile döllenme sırasında belirlenir. Testisler gelişimin 7. haftasına kadar gelişmez. Gonadal cinsiyet, Y kromozomun kısa kolunun cinsiyet belirleyici bölgesinde bulunan SRY geninin varlığı ile belirlenir. SRY geni tarafından kodlanan testis belirleyici faktörün (TDF) moleküler bölgesi, DNA'nın spesifik bölgesine bağlanır ve bu da DNA'nın yapısını değiştirir. Yapısı değişen DNA halka şeklini alarak diğer transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına da olanak sağlar. Bu bağlanan transkripsiyon faktörler de testis ve diğer erkek cinsiyet organlarının gelişiminde rol alır (30). Testis belirleyici faktörün kodlanması ile primitif cinsiyet kordonları proliferasyon olarak medullanın içine doğru ilerler. Çoğalan kordonlar, ağ oluşturarak hilusa dağılır ve rete testis tübüllerini oluşturur. İlerleyen evrelerde fibröz bağ dokusu olan tunika albuginea, testis

kordonları ile yüzey epiteli arasına girerek birbirinden ayırır. Gelişimin 4. ayında kordonlar at nalı şeklini alarak uçları rete testis ile birleşir. Testis kordonları farklılaşmaya başladığı zaman kordonların arasında bulunan ve mezenşimden köken alan Leydig hücreleri de gelişir. 8. haftada gelişen Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlarlar. Eksprese olan testosteron, genital kanal ve dış genital organların gelişimini etkiler. Lümeni olmayan testis kordonları pubertede lümene sahip olarak seminifer tübüllere dönüşürler. Seminifer tübüller, rete testis ile birleşerek duktuli efferentese bağlanır. Daha sonra duktuli efferentes, mezonefrik kanalları birbirine bağlayarak duktus deferens oluşturur (29).





Şekil 2.4. Testis gelişim evreleri şematik diyagramları. (29)

2.3. Testis Histolojisi

Kalın, yoğun bir bağ dokusu kapsülü olan tunika albugenia testisi sarar. Kapsülün iç kısmında tunika vaskulosa adı verilen kan damarları içeren gevşek bağ dokusu vardır. Her testis, kapsül mediastinumdan iç kısma doğru uzanan tamamlanmamış bağ doku septaları ile yaklaşık 250 lobüle bölünür. Her bir lobül, çok kıvrıntılı birkaç seminifer tübülünden oluşmaktadır. Testisin her lobülü, bir ila dört seminifer tübül bulundurur (30,31). Seminifer tübüllerin çapları yaklaşık 250 µm uzunlukları ise yaklaşık 80 cm dir. Seminifer tübüllerin uçları 'U' şeklinde rete testislere açılırlar (31). Seminifer tübüller seminifer epitelyum ile döşeli olup bir lümene sahiplerdir. Seminifer epitelyum Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerden oluşmaktadır. Seminifer epitelyumu, kollajen lifler, fibroblastlar ve miyoid hücrelerden oluşan bir duvar sarar. Miyoid hücreler ritmik kasılma hareketleri ile seminifer tübülde bulunan hareketsiz spermleri rete testise doğru iter. Seminifer tübüllerin arasında kan damarları, lenfatik kanallar, makrofajlar ve Leydig hücrelerini içeren ince bağ doku bulunmaktadır (31).

2.3.1. Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri, destekleyici hücreler veya sustentaküler hücreler olarak da bilinirler. Bu hücreler ergenlik çağından sonra çoğalmazlar. Sertoli hücreleri, spermatogenik hücreleri saran ve aralarındaki boşlukları kaplayan geniş apikal ve lateral yüzeylere sahip hücrelerdir. Sertoli hücreleri, seminifer epitelin tam kalınlığı boyunca uzandığı için tüplere yapısal bir düzenleme sağlar (30). Seminifer tübüllerin bazal laminasına oturan Sertoli hücreleri, uzun prizmatik epitel hücreleridir. Spermatogenik hücreler Sertoli hücrelerinin yüzeyi boyunca ilerleyerek metabolik ve fiziksel destek alır (32). Sertoli hücrelerin çekirdekleri oluklu, oval veya üçgen şeklinde olup ökromotik boyanmaktadır. Çekirdekçikleri ise heterokromatinler ile ilişkili ve belirgindir. Sitoplazmalarında bol miktarda granülsüz, az miktarda granüllü endoplazmik retikulum bulunmaktadır. Bunun yanında Golgi kompleksleri iyi gelişmiş olup, mitokondri ve lizozom içerir (31,32). Sertoli hücreleri bazolateral kısımlarında okludens bağlantıları oluşturarak seminifer epiteli bazal ve adluminal olarak bölümlere ayırarak kan testis bariyerini oluşturur. Ayrıca Sertoli hücreleri spermiyogenez esnasında oluşan artık cisimcikleri fagosite etmekle sorumludur (31). Sertoli hücreleri spermatogonyumların spermatozoaya başarılı bir şekilde ilerlemesi için kritik faktörler üretmektedir. Bu hücreler, 90 kDa androjen bağlayıcı protein (ABP) salgırlar. ABP, gelişmekte olan spermlerin normal olgunlaşması için şart olan testosteronu konsantre hale getirir. Folikül stimüle edici hormon (FSH) ve testosteron reseptörleri Sertoli hücrelerinde bulunur. Sertoli hücrelerinin sekresyon fonksiyonları FSH ve testosteron tarafından düzenlenir. Sertoli hücreleri, inhibin gibi endokrin maddeleri salgılayarak FSH'nin sekresyonunu geribildirim ile baskılar. Sertoli hücreleri plazminojeni aktif proteolitik hormon plasmine dönüştüren, transferrin ve serüloplazmin gibi plasminojen etkinleştiricileri sentezler. Ayrıca, Müllerian inhibe edici faktör (MIF), kök hücre faktörü (SCF) ve glial hücre hattından

türetilen nörotrofik faktör (GDNF) gibi büyüme faktörlerini veya parakrin faktörler olarak işlev gören diğer glikoproteinleri salgırlar (30).

2.3.2. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri lipid damlacıkları içeren büyük, çekirdekleri merkezde, eozinofilik sitoplazması olan hücrelerdir (30,32). Leydig hücreleri granülsüz endoplazmik retikülüm içerir. Bu granülsüz endoplazmik retikülüm testosteronun sentezi için gerekli olan enzimleri üretir. Leydig hücreleri, erken fetal yaşam süresince testosteronu salgılamaya başlarlar (30). Leydig hücrelerinin testosteron salgılaması hipofizden salgılanan Luteinizan Hormon (LH) tarafından indüklenir (31,32). Testosteron embriyonik gelişme, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu sırasında gereklidir. Testosteron salgılanması embriyonik gelişimde, erkek fetusdaki gonadların normal gelişimi için önemlidir. Ergenlik döneminde ise, sperm üretimi, cinsiyet bezlerinin salgısı ve sekonder cinsiyet özellikleri üzerinde önemli bir rolü vardır. Yetişkinlerde ise spermatogenez, sekonder cinsiyet özellikleri, genital dış kanallar ve aksesuar seks bezlerinin bakımı için gereklidir (30).

2.3.3. Spermatogenik hücreler ve spermatogenez

Primordiyal germ hücrelerinden köken alan spermatogenik hücreler çoğalıp farklılaşarak olgun spermleri meydana getirir. Bu hücreler seminifer epitelyumda sıralı halde bulunur (30). Seminifer tübülün bazal laminasının hemen altında diploid yapıda spermatogonyum hücreleri vardır (31). Çapları 12 mikrometre olan küçük yuvarlak hücrelerdir (32). Bu hücreler Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantıları altında olduğu için kan testis bariyerinin dışındadır. Spermatogonyumlar ergenlik döneminde mitoz ile bölünmeye başlayarak Tip A ve Tip B spermatogonyumları oluştururlar (31). Spermatogonyumların proliferasyonu spermatogenezi başlatır (32). Spermatogonyum B hücreleri mitoz bölünme geçirerek primer spermatositleri oluşturur (30). Primer spermatositler yuvarlak, ökromotik çekirdekli hücrelerdir (32). Spermatositler Sertoli hücrelerinin okludensleri üzerinde olduğu için kan testis bariyerinin içinde bulunur. Primer spermatositler spermatogonyumlardan 2 kat daha fazla DNA miktarına sahiptir (31). Primer spermatositler spermatogenik hücreler arasında en büyük hücrelerdir ve kromozomları sıkı paketlenmiştir. İlk olarak primer spermatositler sekonder spermatositleri oluşturmak için birinci mayozu gerçekleştirirler. Daha sonra sekonder spermatositler ikinci mayozu gerçekleştirerek kardeş kromatidleri birbirinden ayırır ve spermatidleri oluşturur. Sekonder spermatositler çok hızlı bir şekilde ikinci mayozu gerçekleştirdiği için kısa ömürlü olarak tanımlanır (32). İkinci mayozdan sonra kardeş kromatidlerin ayrılmasıyla haploid yapıda bulunan spermatidler, Sertoli hücrelerinin kriptaları içinde gömülü halde bulunurlar ve spermiyogenez olarak adlandırılan farklılaşma ile spermiyumları oluştururlar (31,32).

2.3.4. Spermiyogenez

Spermatogenezin son aşaması olan spermiyogenez 4 ana yol ile gerçekleşir:

Golgi Fazı: Glikoproteinler bakımından zengin olan proakrozom granülleri çekirdek zarı bitişindeki akrozomal veziküldeki membrana bağlı bir vezikül halinde birleşir. Vezikül büyür ve içeriği artar. Akrozomal vezikülün yeri, spermin ön kutbunu belirler. Bu aşamada, olgun sentriyoller spermatidin arka kutbuna göç eder. Distal sentriyol, sperm kuyruğunun aksonemini oluşturan dokuz periferik mikrotübül çiftleri ve iki merkezi mikrotübül montajını başlatır (30).

Kep Fazı: Bu fazda, akrosomal vezikül çekirdeğin ön yarısı üzerine yayılır. Yeniden şekillendirilen yapıya akrozomal başlık adı verilir. Çekirdek zarının akrozomal başlığın altındaki kısmı, gözeneklerini kaybeder ve daha kalın hale gelir ve nükleer içerik de yoğunlaşmaya başlar (30).

Akrozom Fazı: Bu evrede spermatid kendiliğinden yön değiştirir ve baş kısmı Sertoli hücrelerine gömülür ve bazal tabakaya doğru bakar. Gelişen flagellum, seminifer tübülün lümenine kadar uzanır. Spermatidin yoğunlaşan çekirdeği düzleşir yassı bir hal alır. Çekirdek ve üstsüneki akrozomu ön plazma membranının hemen yanında bir konuma hareket eder ve sitoplazma posterior olarak yer değiştirir. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kenarından spermatidin arka kutbuna doğru uzanan silindirik bir kılıf halinde manşeti oluşturmak için organize olurlar. Flagellumun gelişimini daha önce başlatan sentriyoller, artık çekirdekteki posterior yüzeye, yani olgunlaşmamış sentriyole çekirdeğin sığ bir oluşuna bağlanmaya başlar. Daha sonra, gelişmekte olan spermilerin bağlantı parçasını veya boyun bölgesini oluşturmak üzere modifiye edilir. Dokuz kalın lif çekirdeğe bağlanan sentriyollerden gelişir ve aksonem mikrotübülleri çevresindeki dış yoğun lifler kuyruğa doğru uzanır. Bu lifler nükleusu flagellum ile birleştirir. Plazma membran, büyüyen kamçıyı örtmek için posterior olarak hareket ettiğinde, manşet kaybolur ve mitokondri, boyun bölgesindeki kaba liflerin etrafında ve hemen arka uzantısında sıkı, sarmal sargılı bir kılıf oluşturmak için sitoplazmanın geri kalanından göç eder. Bu bölge, sperm kuyruğunun orta parçasıdır. Orta parçaya uzakta, iki uzunlamasına kolondan ve sayısız bağlantı yivinden neredeyse sonuna kadar uzanır. Fibröz kılıfın distalindeki kısa kuyruk kısmı son parça olarak adlandırılır (30).

Olgunlaşma Fazı: Spermatid farklılaşmasının son fazıdır. Olgun spermatozoon oluşturmak için Spermatidin çevresindeki aşırı sitoplazma azaltılır. Sertoli hücreleri daha sonra fazladan sitoplazmayı fagosite eder. Spermatidler artık birbirine bağlı halde olmaz ve Sertoli hücrelerinden ayrılırlar (30).

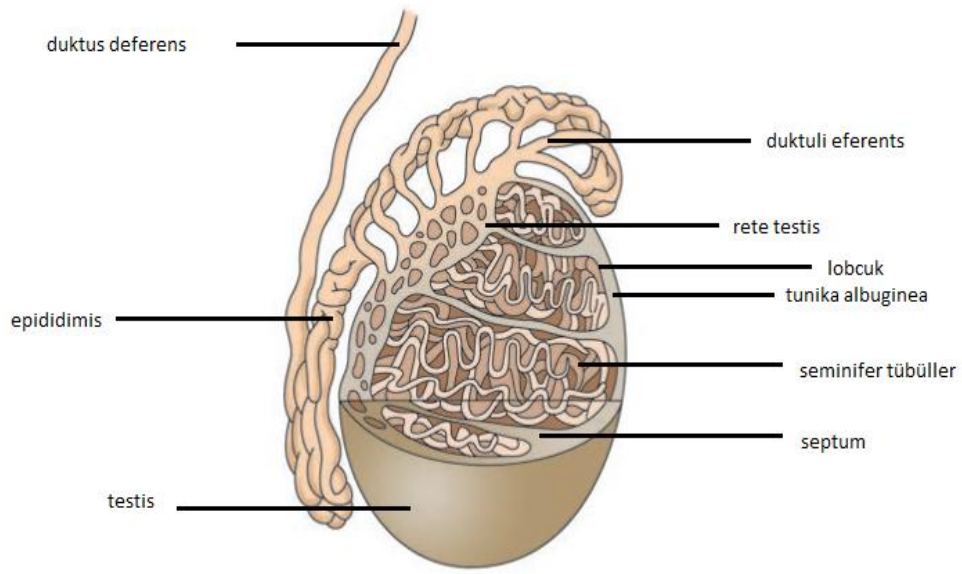
2.3.5. Spermin yapısı

Olgun bir sperm baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Baş ve kuyruğu bağlantı parçası olarak adlandırılan boyun bağlamaktadır. Baş ve kuyruk kısımlarını bir plazma membranı çevreler. Kuyruk orta parça esas parça ve son parça olmak üzere 3 bölmeye ayrılmıştır. Spermin başı akrozom başlıkla sarılmış olan bir çekirdekten oluşmaktadır. Çekirdek akrozomdan dolayı yassı bir haldedir. Spermin

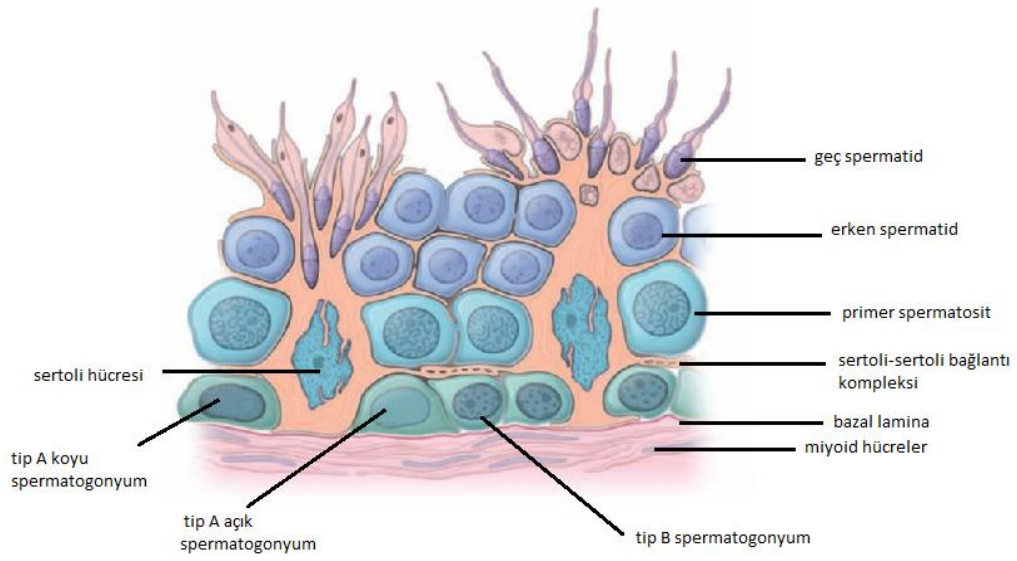
boyunda çift sentriyol bulunmaktadır. Kuyruğun orta parçasında sarmal şekilde dizilen mitokondiyonların yanı sıra aksonemden uzanan 9 adet kolon bulunmaktadır. Esas parçasında ise 7 adet yoğun lif ile sarılmış aksonem ve fibröz kılıftan oluşmaktadır(30).Esas parça kuyruğun en uzun kısmıdır, fibröz kılıf kolonlardan çıkan iskelet tarafından oluşturulur ve bu iskelet keratin içerir (31). Kuyruğun son parçası ise sadece aksonemal kompleksi içerir (30).

2.3.6. Epididimis Histolojisi

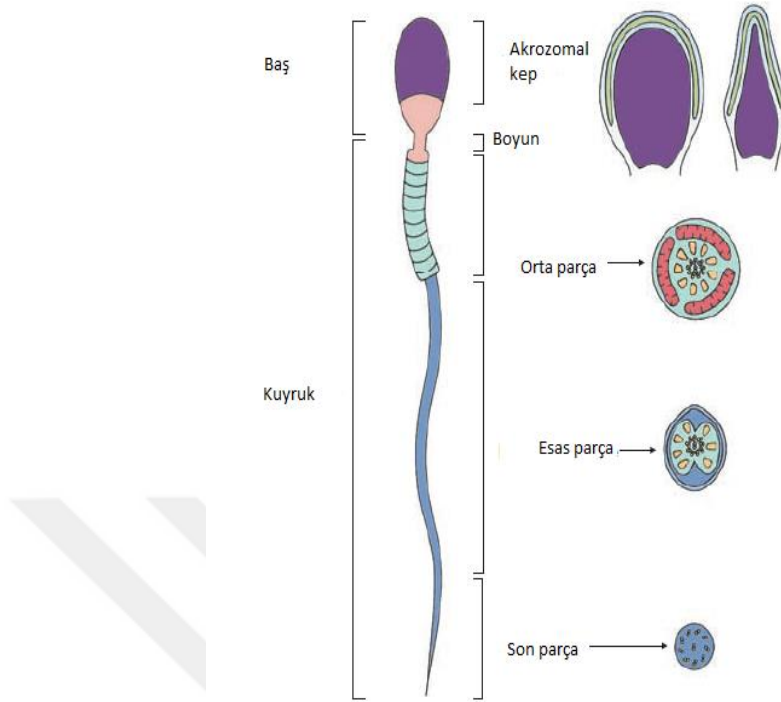
Epididimis, testisin üst ve arka yüzeyleri boyunca uzanan hilal şeklindeki bir yapıdır. Epididimisin uzunluğu yaklaşık 7,5 cm kadardır. Duktuli eferentes, duktus epididimis, damarlar, düz kaslar ve bağ dokusu örtüsünden oluşur. Epididimis kanalı, 4-6 cm uzunluğunda bir tüptür. Epididimis; kaput (baş), korpus (gövde) ve kauda (kuyruk) olarak üç kısma ayrılır. Efferent kanallar başı, epididimis kanalları ise vücut ve kuyruk kısmını kaplar. Seminifer tübüllerde üretilen spermiler, epididim kanalından geçerken dölleme yeteneği kazanır. Androjene bağımlı olgunlaşma süreci boyunca spermin başı, yüzey ilişkili dekapasitasyon faktörü içeren epididimal sıvının eklenmesi ile modifiye edilir. Boşaltım kanalları gibi epididimis kanalı da yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Bu epitelde esas ve bazal hücreler olmak üzere iki tip hücre bulunmaktadır. Epididimisin baş kısmında esas hücreler 80 mikrometre, kuyruk kısmında ise 40 mikrometre uzunluğunda bulunmaktadır. Esas hücrelerin yüzeyinde çok sayıda steriosilyumlar vardır. Bunlar ise baş kısmında 25 mikrometre, kuyrukta ise 10 mikrometre uzunluğundadır. Küçük ve yuvarlak yapıda olan bazal hücreler bazal laminanın üzerinde yer alır. Bazal hücreler kök hücre olarak da bilinmektedir (30).



Şekil 2.5. Testis ve epididimis. (33,34)



Şekil 2.6. İnsan seminifer epitelinin şematik çizimi. (30,35)



Şekil 2.9. İnsan sperminin yapısı. (34,38)

2.4. Testis Torsiyonu

Testis torsiyonu, testisin testis damarları ve spermatik kordon etrafında dönerek kan akımını engellemesiyle testis hasarına yol açan ve subfertiliteye sebep olan ürolojik bir sorundur (1,2). Testiküler torsiyon veya spermatik kordon torsiyonu karşılaşılan en ciddi ürolojik acillerdendir ve genellikle yenidoğan ve genç erkeklerde saptanır (6). Testis torsiyonu testiküler hasara sebep olmaktadır. Yanlış teşhis edildiğinde veya uygun olmayan şekilde tedavi edildiğinde erkek subfertilitesinin gelişmesine yol açar (39). Ani başlangıçlı tek taraflı skrotal ağrı, yaygın olarak akut testis torsiyonuna bağlıdır. Testis aniden skrotumda dönerek kan damarlarını içe doğru bükerek ve kan akışını durdurur. Testis torsiyonu için süre önemlidir, 4-8 saatten uzun süre müdahale edilmediğinde; şiddetli ağrıya yol açar ve testis nekrozu oluşur. Her yıl 25 yaşın altındaki 100.000 erkek içinde yaklaşık 5 erkekte testis torsiyonu gözlemlenir (40). Sol spermatik kordon sağ spermatik kordondan daha uzun olduğu için testis torsiyonu daha çok sol testiste oluşur (2). Spermatik kordonun ve spermatik yapıların kendi etrafında çevrilmesi ile biyokimyasal, histolojik değişiklikler ve testiküler fonksiyon bozukluğu meydana gelir (41). Testis torsiyonunda kan akışının kesilmesi ile birlikte, enerji zengini fosfatların tükendiği ve hipoksantin gibi ürünlerin seviyesinin yükseldiği durumda iskemi meydana gelir (42,43). Testis detorsiyonundan sonra, testis dokusu iskemiden daha ciddi hasara sebep olan reperfüzyona girer (44). Detorsiyon sonrası, serbest

oksijen türlerinin ve nötrofillerin artışı ile reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir (45).

2.4.1. Testis iskemi reperfüzyon hasarı

İskemi reperfüzyon hasarı (İR), akut iskemi döneminden sonra kan dolaşımı iyileştiğinde ortaya çıkan, zararlı bir klinik olaydır. Başlangıçta, metabolik açıdan aktif dokuların hasar görmesine neden olan, kan dolaşımının kesilmesidir ancak olayların devamını başlatan kan akışının restorasyonudur (46). Testis torsiyonunda, testiküler nekroza sebep olan iki olay vardır. Birincisi torsiyon boyunca oluşan iskemik hasar, ikincisi ise detorsiyon boyunca oluşan reperfüzyon hasarıdır (47). İskemi reperfüzyon hasarı, serbest radikal türlerinin oluşması, proinflamatuvar sitokinler, adezyon molekülleri, lipid peroksidasyonu, apoptoz, anoksi ve mikrovasküler kan akışının değişmesiyle birlikte hücresel hasara sebep olur. Bu olaylar zinciri, testiste atrofiye neden olur (45). Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretilmesi ile ilişkili olan oksidatif stres, iskemi-reperfüzyon hasarında temel patofizyolojik süreci oluşturur (46,48).

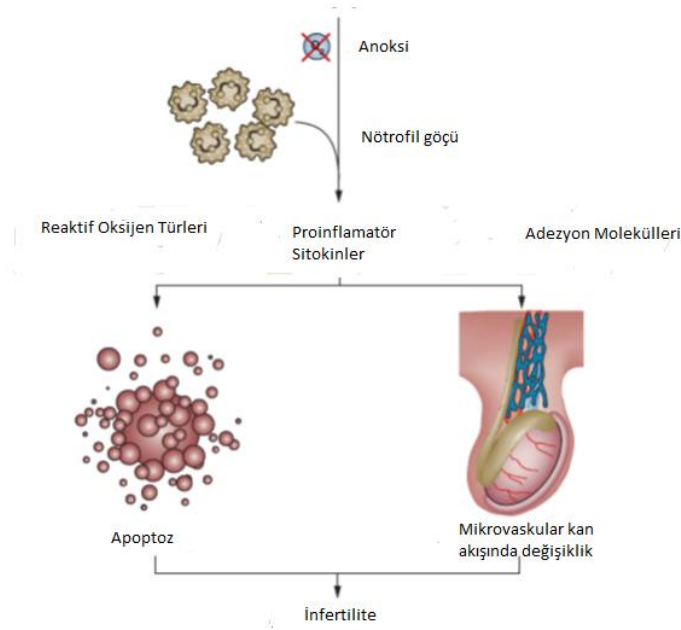
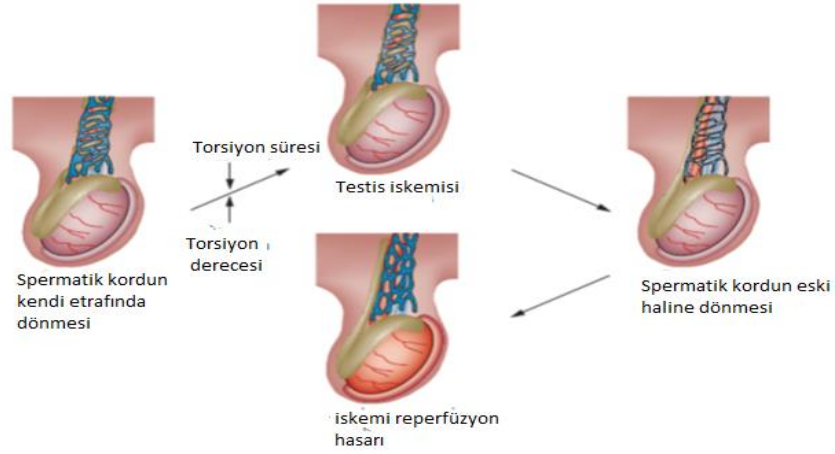
2.4.1.1. İskemik hasar

İskemi boyunca laktik asit, protonlar ve NAD birikmesi hücrenin pH'ını düşürür. Bu değişikliği dengede tutabilmek için hücre, Na^+/H^+ değişim sistemi ile H^+ iyonunu dışarı atmaya zorlar (49). Daha sonra Na^+ iyonları Ca^{2+} ile plasmalemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değişim sistemiyle yer değiştirerek, reperfüzyon sırasında Ca^{2+} iyonunun artmasına neden olur. Ca^{2+} iyonundaki bu büyük değişiklikler hücre ölümüne katkıda bulunan bir dizi sistemi uyarır (49-51). Artan Ca^{2+} iyonu mitokondrial proteinler aracılığı ile mitokondrionlara girerek, ölümcül Ca^{2+} konsantrasyonunu artırır. İR sırasında Ca^{2+} 'un sitosolik yükselmesi, Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı protein kinazları tetikleyebilir ve böylelikle hücre ölümüne, doku işlev bozukluğuna sebep olur (52). Ek olarak, Ca^{2+} artışı ile bir sistein proteaz ailesinden olan kalpainlerin aktivasyonu, hücre iskelet sistemi, endoplazmik retikulum ve mitokondriyal proteinler de dahil olmak üzere hücre içi proteinlerin bir grubunu parçalamaktadır (53). Ayrıca, Ca^{2+} , inflamazom adı verilen bir protein kompleksine bağlanan kalsiyum pirofosfat yapıları ve ürik asit oluşumunu zorlar; bu da, IL-1 β ve TNF- α 'nın üretimini arttırarak, iskemi reperfüzyon hasarının daha şiddetli olmasına neden olur (52).

2.4.1.2. Reperfüzyon hasarı

Çalışmalarda reperfüzyon esnasında, geri dönen oksijenlenmiş kanın ATP üretimini eski haline getirdiğini fakat aynı zamanda hücrelerde bulunan her biyomoleküle modifiye olabilen ROS üretimine yol açarak daha fazla hücre işlev bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir (54,55). Reaktif azot türleri (RNS) olarak adlandırılan nitrik oksitten (NO) türeyen redoks molekülleri, ROS ile etkileşime girer ve makro moleküllerin zararlı hasarından sorumlu peroksinitrit gibi reaktif nitrik oksit türlerinin (RNOS) üretimine, endotelial ve parankim hücre ölümünün başlatılmasına, çeşitli hücre grupları tarafından proinflamatuvar mediatörlerin

uyarılmasına ve salınmasına, lökosit/lenfosit-endotel hücre etkileşimlerini destekleyen adezyon moleküllerinin indüksiyonu ve koruyucu NO'nun azaltılmasına neden olur (54-56).



Şekil 2.10. Testis torsiyonunun patofizyolojisi. (57)

2.5. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Dış orbitallerinde bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektron taşıyan moleküller, serbest radikaller olarak adlandırılır (58-60). Serbest radikaller, oksijen ve nitrojen kaynağı bakımından ikiye ayrılmaktadır. Oksijen kaynaklı olan serbest radikallere reaktif oksijen türleri denmektedir (61,62). Reaktif oksijen türleri, radikal (hidroksil iyon süperoksit, NO, peroksil vb.), radikal olmayan (ozon, singlet oksijen, lipid peroksit, hidrojen peroksit) ve oksijen türevlerini içeren geniş bir molekül kategorisini temsil eder (63). ROS, aerobik metabolizmanın yan ürünleridir. ROS, süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerini ($OH\cdot$) içerir; bunların hepsi, farklı biyolojik hedeflere tepki veren doğal kimyasal özelliklere sahiptir. ROS sıklıkla oksidatif stres ile ilişkilidir ve lipidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar vererek patolojik olaylara yol açarlar (64). Oksidatif stres, hücre içi bileşenlerindeki prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlikten kaynaklanır (65). Organizmaya, oksidatif denge boyunca reaktif oksijen türlerinin olumsuz bir etkisi bulunmamaktadır. Reaktif oksijen türlerinin hızlı artışı veya azalması oksidatif dengeyi bozarak oksidatif stresi oluşturmaktadır (66). İskemi reperfüzyon hasarı sırasında H_2O_2 gibi kesintisiz radikal olmayan oksidanlar, moleküler ağlar aracılığı ile düzenleyici proteinlerin oksidatif ve nitrosatif modifikasyonları, oksidant radikallerin DNA, proteinler, lipidler ve karbonhidratlara hasar vermesi gibi oksidatif stres mekanizmaları oluşur (52,67).

2.5.1. Lipid peroksidasyonu

Reaktif oksijen türleri, hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerine saldırarak lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan bir dizi zincirleme kimyasal reaksiyonlara sebep olur (13). Hücre membranındaki lipid peroksidasyonu, hücre zarının akışkanlığını ve geçirgenliğini bozarak hücrelere zarar verir. Başka bir deyişle hücre membranı, serbest radikaller tarafından hasar aldığı zaman tüm hücre risk altına girer (68). Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile yapmış olduğu oksidasyon reaksiyonu sonucunda birincil metabolitlerden olan lipid hidroperoksitler, daha ileri oksidasyon reaksiyonlarında ise ikincil lipid peroksidasyon metabolitlerinden sıklık peroksitler oluşmaktadır (69). Lipid peroksidasyonu sırasında açığa çıkan ürünlerden biri olan malondialdehit (MDA), çeşitli biyokimyasal tahliller ile spermatozoadaki peroksidatif hasarın belirteci olarak kullanılır (70,71). MDA molekülleri, hücre membranı yapılarına penetre olarak, lipid membran bileşenlerinde asimetrik bozukluklara sebep olur (68). Lipid peroksidasyonunun neden olduğu hasarın, testiküler fonksiyon bozukluğuna sebep olan en önemli faktör olduğu bilinir (72). Bu hasar, spermin orta kısmında bozukluğa ve fertilizasyon sırasında akrozom kapasitesinin azalmasına neden olur (68).

2.5.2. Oksidatif stres ve antioksidanlar

Antioksidanlar, bir hedef molekülde oksidatif hasarı geciktiren, önleyen veya ortadan kaldıran maddeler olarak tanımlanmıştır (73). Antioksidanlar reaktif oksijen türlerini temizleyen, antioksidan savunmaları düzenleyen ve ROS üretimini

engelleyen maddelerdir. Antioksidan aktivitesi, serbest radikal oksidasyon reaksiyonlarının önleyicileri olarak serbest lipid radikallerinin oluşumunu inhibe eder; otomatik oksidasyon zincir reaksiyonunun çoğalmasını durdurur, hidroperoksitleri kararlı bileşikler haline dönüştürür, metal prooksidantları kararlı ürünlere dönüştüren metal şelatörleri olarak görev alır ve prooksidatif enzimlerin inhibitörleri olarak rol oynar (74).

Çalışmalar, antioksidanların spermatozoayı ROS'dan koruyarak anormal spermatozoa üretiminin engellediğini, lökositler tarafından üretilen ROS'u temizlediğini, DNA parçalanmalarını önlediğini, semen kalitesini arttırdığını ve yardımcı üreme tekniklerinin sonucunu olumlu yönde geliştirdiklerini göstermiştir (13). Antioksidanlar endojen ve eksojen olarak sınıflandırılabilir (75). Endojen antioksidanlar, sitoplazmada sunulan çeşitli enzimatik molekülleri içerir. Mevcut yaygın endojen antioksidan enzimler arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve peroksidazlar bulunur (75,76). Eksojen antioksidanlar bitki ürünleri gibi doğal türevi bileşenleri (77,78), vitaminleri (79,80), selenyum (81), hormonları (82,83), hormon reseptörlerini (84,85), vasküler ajanları (86,87), fosfodiesteraz inhibitörlerini (88,89), anestetik ve non-steroid anti-inflamatuar ilaçları (90,91), mukolitik ajanları (92) ve hiperbarik oksijen terapilerini içerir (93). Tümü, İR hasarındaki oksidatif stresin sonuçlarını önlemek amacıyla kullanılmıştır (94).

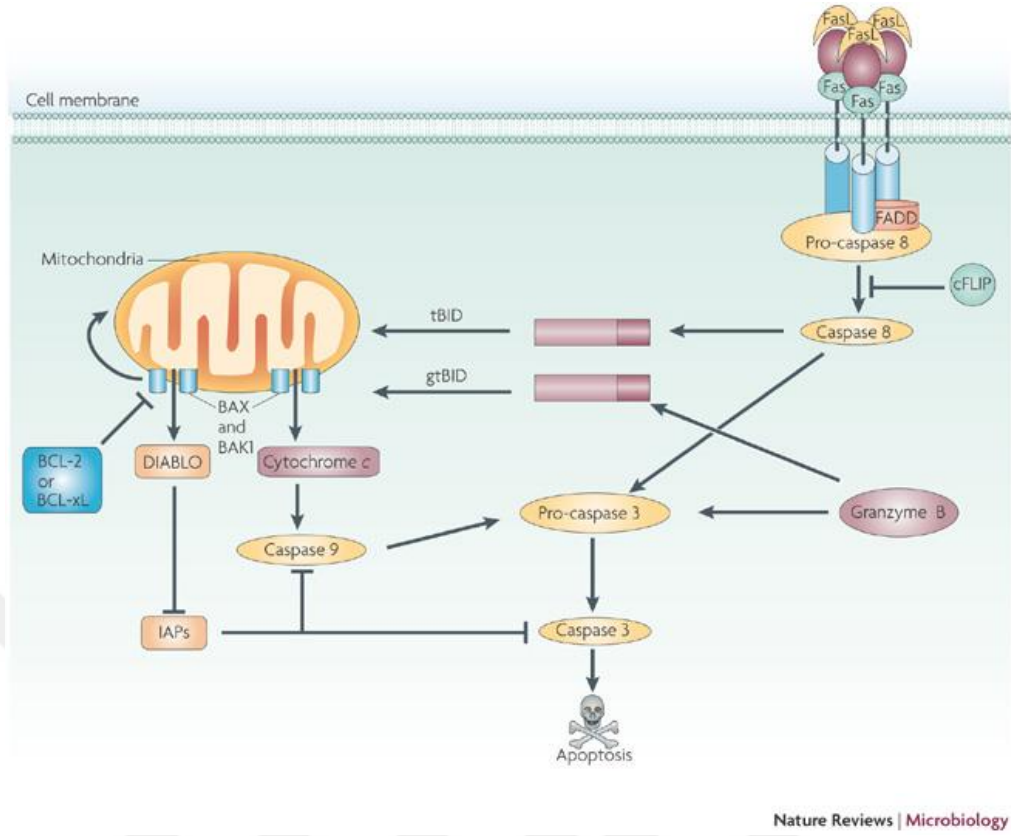
2.5.3. Oksidatif stres ve apoptoz

Gelişme ve yaşlanma sırasında, dokulardaki hücre popülasyonunu korumak için homeostatik bir mekanizma olarak apoptoz veya programlı hücre ölümü meydana gelir. Apoptoz, bağışıklık reaksiyonlarında olduğu gibi, hücrelerin hastalık veya zararlı maddelerle hasar görmesi sonucunda savunma mekanizması olarak ortaya çıkar (95). Testisteki iskemi reperfüzyon hasarının germ hücre apoptozuna yol açtığı bilinmektedir (96). Yüksek ROS seviyeleri iç ve dış mitokondriyal membranları bozarak sitokrom c proteininin serbest bırakılmasına sebep olarak kaspaz aktivasyonunu ve apoptozu indükler. Spermdeki apoptoz, hücre yüzeyi protein Fas'ı içeren ROS'dan bağımsız yollarla da başlatılabilir (97). İnfertil olan erkek hastalarda, ROS ile artmış sperm hasarının, sitokrom c, kaspaz 9 ve 3'ün yüksek seviyeleri ile arasında apoptozu işaret eden korelasyon olduğu gösterilmiştir (98).

2.5.3.1. Kaspaz-3

Apoptoz mekanizmaları son derece kompleks ve sofistike olup, enerjiye bağlı bir moleküler olaylar kaskadı içerir (99). Memelilerde, kaspaz kaskadının aktivasyonu için, hücre yüzey reseptörleri gerektiren ekstrinsik hücre ölüm yolağı ve iç hücre ölüm yolağı olarak iki ana yol gelişmiştir (100,101). Kaspazlar proteolitik aktiviteye sahiptir ve farklı kaspazların komşu amino asitlerin tanımlanmasını içeren proteinleri aspartik asit kalıntılarıyla parçalayabilirler. Kaspazlar başlangıçta harekete geçtiğinde, hücre ölümü geri döndürülemez. Bugüne kadar, başlatıcı

kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9, -10), efektör veya uygulayıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5) olarak on temel kaspaz tanımlanmıştır (102,103). Apoptoz ile ilişkili Bcl-2 (B hücre lenfoma 2) protein ailesi proapoptotik (Bax, Bak gibi üyeleri içeren) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-XL gibi) olarak iki alt gruba ayrılır. Proapoptotik proteinler, apoptotik uyaranlara bağlı olarak yapısal değişiklikler geçirir ve oligomer oluşturur, mitokondriyal dış zarında gözenekler oluşturarak mitokondriyal dış zar geçirgenliğine (MOMP) neden olur (104,105). Proapoptotik proteinlerin aktivitesi, sitozoldan sitokrom c salınmasına sebep olarak sitoplazmada apoptozom olarak adlandırılan makromoleküler kompleksi olan Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'i (Apaf1) indükler. Apoptozom oluştuktan sonra, Kaspaz Aktive edici domain (CARD) etkileşimleri yoluyla prokaspaz-9'u görevlendirir (106). Bu, prokaspaz-9 için yerleştirme motifi gibi davranır ve Apaf1-kaspaz-9 apoptozom kompleksi oluşarak prokaspaz-3'ü görevlendirir (107). Ekstrinsik ve intrinsik hücre ölüm yolları, diğer efektör kaspazlarıyla birlikte spesifik substratların bölünmesiyle hücre yapısının bozulmasını düzenleyen kaspaz-3'ü aktive eder (108). Kaspaz-3'ün aktivasyonu, apoptotik hücre ölümünün uygulanması için gerekli fakat yetersiz bir olaydır ve bazen, spesifik substratları hedefleyerek ilgisiz hücre ölüm rolleri gösterebilir (109). Kaspaz-3 Sisteinil aspartik asit-proteaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7, sitokeratinler, PARP (poli [ADP-riboz] polimeraz), plazma membranı sitoskeletal proteini ALFA fordin, nükleer protein NuMA (Nükleer mitotik aparat proteini) ve diğerleri gibi çeşitli substratları parçalayan efektör veya "uygulayıcı" kaspazlar olarak işlev görerek, apoptotik hücrelerde görülen morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olur (110). Kaspaz-3, uygulayıcı kaspazların en önemlisi olarak kabul edilir ve başlatıcı kaspazlarından herhangi biri tarafından aktive edilir (kaspaz-8, kaspaz-9 veya kaspaz-10). Kaspaz-3 özellikle endonukleaz CAD'yi aktive eder. Proliferatif hücrelerde CAD, inhibitörü olan ICAD (Caspase Activated DNase İnhibitörü) ile kompleksleşmiştir. Aktif kaspaz-3, apoptotik hücrelerde CAD'yi serbest bırakmak için ICAD'yı parçalamaktadır (111). CAD (Caspase-Activated DNase) çekirdeklerin içindeki kromozomal DNA'yı parçalayıp kromatin yoğunlaşmasına neden olur. Kaspaz-3 aynı zamanda hücre iskelet sisteminin yeniden düzenlenmesine ve hücrenin apoptotik cisimlere ayrılmasına neden olur (99).



Şekil 2.11. Kaspaz-3 ve programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesi. (112)

2.6. ATP Bağımlı Potasyum Kanalları

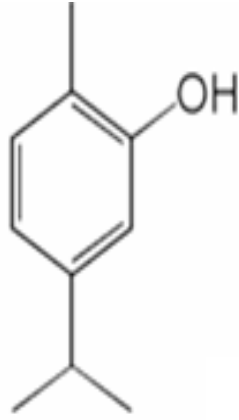
ATP'ye duyarlı potasyum (KATP) kanalları, iç doğrultucu potasyum kanalı ailesinden, KIR6.x-tipi altbirimlerden ve sülfonilüre reseptörü (SUR) alt birimlerinden oluşan heterooktamerik proteindir (113,14). KATP kanalları sarkolemma, iç mitokondriyal membran ve nükleer membranın yüzeyinde bulunur (113,114,14). KATP kanal altbirimleri hücre zarında, spermatogenik hücrelerin membranlı organellerinde, fare ve rat testisindeki Sertoli hücrelerinde bulunduğu anlaşılmıştır (115,16). Potasyum kanalları, germ hücrelerinin zar potansiyellerini korumakla sorumludur. Farklı K^+ kanalları, farklı aşamalarda germ hücrelerinde lokalizedir (17). ATP bağımlı potasyum kanalları ilk olarak kardiyomiyositlerde keşfedilen hetero-oktamerik komplekslerdir (116,117). KATP kanalının açılması, hücre içi ATP seviyesi veya ATP/ADP oranı ile doğrudan düzenlenir ve böylece kanal, hücrenin metabolik durumunu membran potansiyeli ile birleştirir (118). Kalp kasında bulunan ATP'ye duyarlı potasyum (KATP) kanalları voltaja bağlı olmayan, ATP ve ADP hücre içi nükleotidleri tarafından kapatılan potasyum seçici kanallardır (116). Üç tip KATP kanalı vardır; sarkolemmal (sarcKATP), mitokondriyal (mitoKATP) ve nükleer (nukKATP) (14). Yapılan bir çalışmada, KATP kanallarının iskemik korumayı sağladığı görülmüştür (15).

2.6.1. Kir6.2

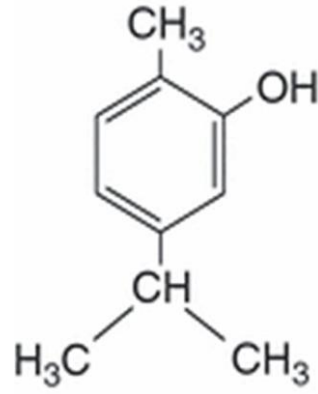
ATP bağımlı potasyum kanalları, gözenek oluşturan bir altbirim molekülü Kir6.x ve bir düzenleyici altbirim molekülü SUR olmak üzere iki tür molekül tarafından oluşturulur: Kir6.x (Kir6.1 ve Kir6.2), iç doğrultucu K⁺ kanal ailesine aittir (119). SUR (SUR1, SUR2A ve SUR2B), ATP'ye bağlanan kaset proteini üst familyasına aittir (120,121). KATP kanal altbirimleri Kir6.1, Kir6.2 ve SUR2B, yuvarlak spermatidlerde, SUR2A'nın ise uzun spermatidlerde yüksek oranda bulunduğu ifade edilmiştir. Kir6.2'nin spermatidlerde SUR2B ile birlikte lokalize olduğu bilinmektedir. Kir6.1, Kir6.2, SUR1, SUR2A ve SUR2B KATP kanal altbirimlerinin hücre membranındaki ve spermatogenik hücrelerin ve Sertoli hücrelerinin membranöz organellerinde farklı lokalizasyonları tanımlanmıştır (16). Ayrıca KATP kanal altbirimleri, Kir6.1, Kir6.2, SUR1 ve SUR2, fare spermatogenik hücrelerinde ve spermelerde yer almaktadır. Bu kanalların kapasiteyle ilişkili sperm hiperpolarizasyonunda bir rol oynadığını düşünülmektedir (115). Kir6.2 spermatogonyum, spermatosit ve geç evre spermelerde bulunmaktadır (16). KATP kanallarının açılmasının IR hasarına karşı dokunun korunmasını sağlayabileceği saptanmıştır (14).

2.7. Karvakrol

Karvakrol (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol), kekik, biber ve yabani bergamot gibi aromatik bitkilerin uçucu yağlarında bulunan ve karakteristik kekik kokusu bulunan monoterpenoid bir bileşiktir (122). Doğal ürünler arasında uçucu yağların kullanımı, kanıtlanmış terapötik eylem nedeniyle umut verici bir seçenektir (123). İn vitro ve in vivo çalışmaların bazıları, antibakteriyel, antioksidan, antiseptik, antispazmodik, büyüme düzenleyici, antifungal, antiviral, anti-inflamatuvar, balgam söktürücü, antitussif, immün modülatör ve kimyasal önleyici gibi rumen mikrobiyal fermantasyon modifikatörü, metan emisyonunun azaltılması da dahil olmak üzere karvakrolün farklı biyoaktiviteleri tanımlanmıştır (124-127). Karvakrol, hücresel membranların oksidatif yıkımına yol açan lipid peroksidasyonunun azaltılmasında doğal antioksidan olarak kritik bir rol oynar (128).



a

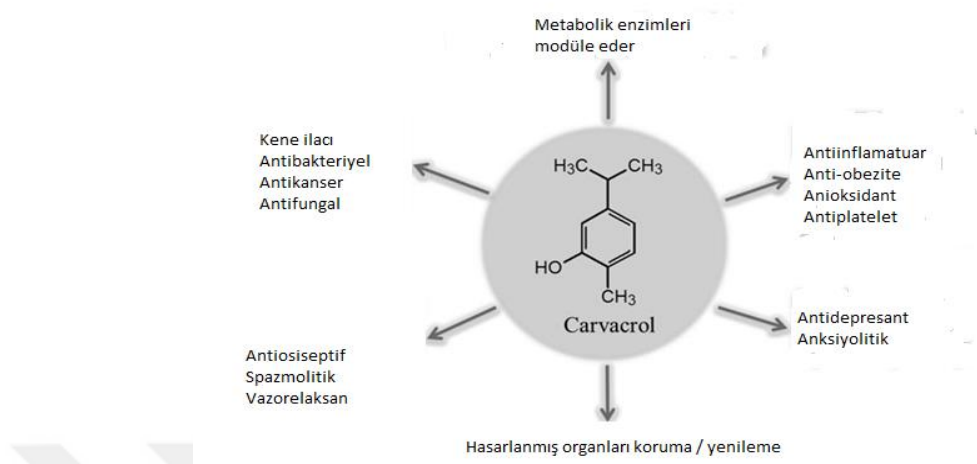


b

Şekil 2.12. Karvakrolün kimyasal yapısı. a(129) b(130)

Karvakrolün Kimyasal Özellikleri	
Bilinen Adları	2-methyl-5-(1-methylethyl)phenol
CAS kayıt no	499-75-2
Kapalı Formülü	C ₁₀ H ₁₄ O
Molekül Ağırlığı	150.22 g/mol
Erime Sıcaklığı	0°C
Kaynama Sıcaklığı	236-237°C
Yoğunluğu	0.976 g/cm ³
Suda Çözünürlüğü	1.25 g/l (25°C)
Fiziksel Durumu	Sıvı
Renk	Açık Sarı
Rat oral LD ₅₀	810 mg/kg
Rat i.p. LD ₅₀	73 mg/kg
Rat s.c. LD ₅₀	680 mg/kg
Rat i.v. LD ₅₀	80 mg/kg
Saflık düzeyi	98%

Tablo 2.1. Karvakrolün özellikleri. (131)



Şekil 2.13. Karvakrolün biyolojik yararları. (122)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmaya başlamadan önce 22.02.2017 tarihinde 2017.08 karar no'lu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu Onayı alınmıştır.

3.1. Deney Hayvanları Temini ve Bakımı

Çalışma deneysel olarak Wistar albino cinsi 2-4 aylık erkek ratlar üzerinde yapılmıştır. Deney hayvanları, AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Hayvanlar çalışma öncesi ve çalışma süresince Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, 12 saat aydınlık/karanlık, nispi nemi %60-70 olan ortamda tutularak ad libitum beslenmiştir.

3.2. Deney Grupları

Çalışmada Sham, Kontrol+Karvakrol, Kontrol+DMSO İR, İR+DMSO ve Tedavi grubu olmak üzere toplamda 6 grup ile çalışılmıştır. Gruplardaki bireyler rastgele seçilmiştir.

Sham grubu (grup1 n:6): Ratlarda skrotum açılıp testise herhangi bir işlem yapılmadan kapatıldı.

Kontrol+Karvakrol grubu (grup2 n:6): Ratlara karvakrol, 73mg/kg dozunda (149) %5 DMSO içinde çözülerek 0,2 ml intraperitoneal (ip) olarak verildi.

Kontrol+DMSO grubu (grup3 n:6): Ratlara %5 lik DMSO, 0,2 ml ip olarak verildi.

İskemi-reperfüzyon grubu (grup4 n:6): Ratlarda İki saat testis torsiyon ve iki saat detorsiyon yapılarak testis iskemi reperfüzyon modeli oluşturuldu.

İskemi-reperfüzyon+DMSO grubu (grup5 n:6): İki saat testis torsiyonu yapılan ratlara detorsiyon yapılmadan yarım saat önce %5 lik DMSO 0,2 ml ip olarak verildi.

Tedavi grubu (grup6 n:6): iki saat testis torsiyonu yapılan ratlara detorsiyon yapılmadan yarım saat önce karvakrol, 73mg/kg dozunda %5 lik DMSO içinde çözülerek 0,2 ml ip olarak verildi.

3.3. Testis İskemi Reperfüzyon Modeli Oluşturma

2-4 aylık Wistar albino cinsi erkek ratlarda, sol testis ve spermatik kordon skrotum dışına alınarak saat yönünün tersine 720° çevrilerek, torsiyon yapıldı. 2 saat boyunca iskemik hasar oluşturulduktan sonra torsiyonu takiben detorsiyon yapılarak sol testis skrotum içine alınıp dikilmiştir. 2 saat boyunca reperfüzyon hasarı oluşturulmuştur (132).



Şekil 3.1. Testis İskemi reperfüzyon modeli oluşturma. **A:** Anestezi altındaki ratların skrotumu tıraşlanıp batikon ile dezenfekte edildi. **B:** Sol testis skrotum dışına alındı ve 720° saat yönünün tersine döndürülerek torsiyon yapıldı, iskemik hasar başlatıldı. **C:** 2 saat sonra torsiyon yapılan testisi eski haline döndürerek detorsiyon yapıldı, reperfüzyon başlatıldı. **D:** Torsiyon ve detorsiyon yapılmış testis. **E:** Detorsiyon sonrası testis skrotum içine alındı. **F:** Skrotum dikilerek kapatıldı, reperfüzyon hasarı oluşturmak için 2 saat bekletildi.

3.4. Deney Aşaması

Deneye başlamadan önce deney hayvanları tartıldıktan sonra, Her hayvana 0,1ml ksilasin+ 0,25 ml ketamin ip enjekte edilerek anesteziye alındı.

Sham grubu (n:6): Anestezi altında ratların skrotumları açılarak sol testise ulaşıldı ve dışarı çıkarıldı. Bir işlem yapılmadan testisler tekrar skrotum içine alındı ve skrotum dikildi. İskemi reperfüzyon süresi baz alınarak 4 saat bekledikten sonra sağ ve sol testis dokuları alındı ve %10'luk nötral formalin içine koyuldu. Sol epididimisler ise spermiyogram yapılmak üzere PBS solüsyonu içine alındı. Her hayvandan yaklaşık 3 ml kan kalpten alınarak kan tüplerine koyuldu. Kan tüpleri 10 dk boyunca 9000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen serumlar ependorf tüplere alınıp -80 oC'de biyokimyasal analiz için bekletildi.

Kontrol+Karvakrol grubu (n:6): Anestezi altındaki ratlara, %5'lik DMSO içinde çözünen karvakrol 0,2 ml ip olarak enjekte edildi. Reperfüzyondan yarım saat önce verildiği var sayılarak 2.5 saat sonra sağ ve sol testis dokuları alındı ve %10'luk nötral formalin içine koyuldu. Sol epididimisler ise spermiyogram yapılmak üzere PBS solüsyonu içine alındı. Her hayvandan yaklaşık 3 ml kan kalpten alınarak kan

tüplerine koyuldu. Kan tüpleri 10 dk boyunca 9000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen serumlar ependorf tüplere alınıp -80 °C'de biyokimyasal analiz için bekletildi.

Kontrol+DMSO grubu (n:6): Anestezi altındaki ratlara 0,2 ml %5'lik DMSO ip olarak enjekte edildi. Reperfüzyondan yarım saat önce verildiği var sayılarak 2.5 saat sonra sağ ve sol testis dokuları alındı ve %10'luk nötral formalin içine koyuldu. Sol epididimisler ise spermiyogram yapılmak üzere PBS solüsyonu içine alındı. Her hayvandan yaklaşık 3 ml kan kalpten alınarak kan tüplerine koyuldu. Kan tüpleri 10 dk boyunca 9000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen serumlar ependorf tüplere alınıp -80 °C'de biyokimyasal analiz için bekletildi.

İskemi-reperfüzyon grubu (n:6): Anestezi altında olan ratların skrotumları açılarak sol testisleri dışarı çıkartıldı. Sol testisler, saat yönünün tersinde 720° spermatik kordon etrafında çevrilerek torsiyon yapıldı ve iskemi başlatıldı. Dışarda bekletilen testislerin üzeri gazlı bez ile örtülerek kurummasını önlemek için üzerlerine serum fizyolojik sıkıldı. 2 saat torsiyone olan sol testis eski haline getirilerek detorsiyon yapıldı ve reperfüzyon hasarı oluşturuldu. Detorsiyondan sonra testisler skrotum içine alındı ve skrotumlar dikildi. 2 saat reperfüzyon hasarı oluşturduktan sonra sonra sağ ve sol testis dokuları alındı ve % 10'luk nötral formalin içine koyuldu. Sol epididimisler ise spermiyogram yapılmak üzere PBS solüsyonu içine alındı. Her hayvandan yaklaşık 3 ml kan kalpten alınarak kan tüplerine koyuldu. Kan tüpleri 10 dk. boyunca 9000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen serumlar ependorf tüplere alınıp -80 °C'de biyokimyasal analiz için bekletildi.

İskemi-reperfüzyon+DMSO grubu (n:6): Anestezi altında olan ratların skrotumları açılarak sol testisleri dışarı çıkartıldı. Sol testisler, saat yönünün tersinde 720° spermatik kordon etrafında çevrilerek torsiyon yapıldı ve iskemik hasar başlatıldı. Dışarda bekletilen testislerin üzeri gazlı bez ile örtülerek kurummasını önlemek için üzerlerine serum fizyolojik sıkıldı. Detorsiyon yapılmadan yarım saat önce hayvanlara 0,2 ml %5'lik DMSO ip olarak enjekte edildi. 2 saat torsiyone olan sol testis eski haline getirilerek detorsiyon yapıldı. Detorsiyondan sonra testisler skrotum içine alındı ve skrotumlar dikildi. ve 2 saat reperfüzyon hasarı oluşturduktan sonra sağ ve sol testis dokuları alındı ve % 10'luk nötral formalin içine koyuldu. Sol epididimisler ise spermiyogram yapılmak üzere PBS solüsyonu içine alındı. Her hayvandan yaklaşık 3 ml kan kalpten alınarak kan tüplerine koyuldu. Kan tüpleri 10 dk boyunca 9000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen serumlar ependorf tüplere alınıp -80 °C'de biyokimyasal analiz için bekletildi.

Tedavi grubu (n:6): Anestezi altında olan ratların skrotumları açılarak sol testisleri dışarı çıkartıldı. Sol testisler, saat yönünün tersinde 720° spermatik kordon etrafında çevrilerek torsiyon yapıldı ve iskemik hasar başlatıldı. Dışarda bekletilen testislerin üzeri gazlı bez ile örtülerek kurummasını önlemek için üzerlerine serum fizyolojik sıkıldı. Detorsiyon yapılmadan yarım saat önce hayvanlara 0,2 ml %5'lik DMSO

içinde çözünen karvakrol ip olarak enjekte edildi. 2 saat torsiyone olan sol testis eski haline getirilerek detorsiyon yapıldı. Detorsiyondan sonra testisler skrotum içine alındı ve skrotumlar dikildi. 2 saat reperfüzyon hasarı oluşturduktan sonra sağ ve sol testis dokuları alındı ve %10'luk nötral formalin içine koyuldu. Sol epididimisler ise spermiyogram yapılmak üzere PBS solüsyonu içine alındı. Her hayvandan yaklaşık 3 ml kan kalpten alınarak kan tüplerine koyuldu. Kan tüpleri 10 dk boyunca 9000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen serumlar ependorf tüplere alınıp -80°C'de biyokimyasal analiz için bekletildi.

	İskemik Hasar / Torsiyon				Reperfüzyon Hasarı / Detorsiyon			
SHAM								
K+Karvakrol								
K+DMSO								
İR								
İR+DMSO								
Tedavi								
Süre/Dk	30	60	90	120	150	180	210	240

Tablo 3.1. Deney süreci Sham grubu: Sol testis skrotum dışına alınıp hiç bir müdahale yapılmadan tekrar skrotum içine alınır. Hayvanlar 4 saat sonunda sakrifiye edilir. K+Karvakrol grubu: Hayvanlara sakrifiye edilmeden 2.5 saat önce karvakrol uygulaması (mavi) yapılır. K+DMSO grubu: Hayvanlara sakrifiye edilmeden 2.5 saat önce DMSO uygulaması (sarı) yapılır. İR grubu: Sol testislere torsiyon yapıp 2 saat boyunca iskemik hasar ,detorsiyon yapıp 2 saat reperfüzyon hasarı oluşturulduktan sonra hayvanlar sakrifiye edilir. İR+DMSO grubu: Sol testisler torsiyon halindeyken detorsiyondan yarım saat önce yani sakrifikasyondan 2.5 saat önce DMSO uygulaması (sarı) yapılır. Tedavi grubu: Sol testisler torsiyon halindeyken detorsiyondan yarım saat önce yani sakrifikasyondan 2.5 saat önce karvakrol uygulaması (mavi) yapılır.

3.5. Spermiyogram

Sol epididimislerin kauda kısmı PBS içinde tiftiklenerek, hareketlik kazanmış olan spermier açığa çıkartıldı. Elde edilen sprem örnekleri Makler Chamber üzerine damlatılarak ışık mikroskobu (Olympus CX21) altında sayıldı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Spermier Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) kriterine göre,

- İleri hareketli
- Yavaş hareketli
- Yerinde hareketli
- Hareketsiz olmak üzere sınıflandırıldı.

3.6.Doku Takip Aşaması

%10'luk formaldehit içinde fikse olan dokular takip aşamasından önce yıkanarak fiksasyon solüsyonu dokulardan uzaklaştırıldı. Doku takip aşamasında, dokular dehidratasyon için alkol serilerinde, şeffaflandırmak için ksilolde bekletildi. Gömme için sıvı parafin kullanılarak parafin bloklar hazırlandı. Doku takip aşaması aşağıdaki gibidir;

Aşama	Süre
%70'lik Alkol	1 saat
%80'lik Alkol	1 saat
%96'lık Alkol	1 saat
%100'lük Alkol	1 saat
Alkol + Ksilol	1 saat
Ksilol	1 saat
Ksilol + Parafin	1 saat
Parafin	1 saat
Parafin ile Gömme	

3.7. Işık Mikroskopik İnceleme

Işık mikroskopunda incelenmek üzere parafin bloklardan mikrotom (Leica RM 2125 RT) ile 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen Eozin boyaması ve Masson'un üçlü boyaması için kesitler rodajlı lamlara (Patolab Ref. No:165014) alındı. Kaspaz-3, Kir6.2 ve TUNEL immünohistokimyasal boyamalar için ise kesitler pozitif şarjlı lamlara (Patolab Ref:165013) alındı.

3.7.1.Hematoksilen-eozin boyaması

Hazırlanan kesitlere hematoksilen-eozin boyaması yapılarak ışık mikroskobu altında histolojik olarak incelenmesi için hazır hale getirildi. Kesitler boyanmadan önce etüv içine alınarak 60 °C'de 30 dakika bekletildi. Hematoksilen Eosin boyama prosedürü şu şekildedir;

Aşama	Süre
1 Ksilen I	2 dakika
2 Ksilen II	2 dakika
3 %100'lük Alkol	1 dakika
4 %100'lük Alkol II	1 dakika
5 %96'lık Alkol I	1 dakika

6	%96'lık Alkol II	1 dakika
7	Distile suda yıkama	3 kez
8	Mayer Hematoksilen	5 dakika
9	Distile suda yıkama	3 kez
10	Asit Alkol	10 saniye
11	Distile suda yıkama	3 kez
12	Amonyum	10 saniye
13	Distile suda yıkama	3 kez
14	%80'lık Alkol	2 dakika
15	Eozin	2 dakika
16	%96'lık Alkol I	2 dakika
17	%96'lık Alkol II	2 dakika
18	%100'lük Alkol I	2 dakika
19	%100'lük Alkol II	2 dakika
20	Ksilol I	2 dakika
21	Ksilol II	2 dakika
22	Entellan ile kapatma	

3.7.2. Masson'un üçlü boyaması

Kesitlerde bağ doku değişikliği incelenmek için özel bağ dokusu boyası olan Masson'un üçlü boyaması yapıldı. Kesitler boyanmadan önce etüv içine alınarak 60°C'de 30 dakika bekletildi. Masson'un üçlü boyaması prosedürü şu şekildedir;

Aşama	Süre
1 Ksilen I	2 dakika
2 Ksilen II	2 dakika
3 %100'lük Alkol	1 dakika
4 %100'lük Alkol II	1 dakika
5 %96'lık Alkol I	1 dakika
6 %96'lık Alkol II	1 dakika
7 Distile suda yıkama	2 kez
8 A+B solüsyon karışımı	20 dakika
9 Dislite suda yıkama	2 dakika
10 Asit alkol	10 saniye
11 Distile suda yıkama	2 kez

12	Panceau Fuchsin	4 dakika
13	Distile suda yıkama	2 dakika
14	Phosphotungstic asit	7 dakika
15	Methyl blue	7 dakika
16	Distile suda yıkama	2 dakika
17	%96'lık Alkol I	2 dakika
18	%96'lık Alkol II	2 dakika
19	%100'lük Alkol I	2 dakika
20	%100'lük Alkol II	2 dakika
21	Ksilol I	2 dakika
22	Ksilol II	2 dakika
23	Entellan ile kapatma	

3.7.3. İmmünohistokimyasal işaretleme

İmmünohistokimyasal işaretleme için pozitif şarjlı lamlara alınan kesitler bir gece boyunca 37°C'lik etüvde bekletildi. Kaspaz-3 boyaması için Thermo Scientific™ Caspase 3 (CPP32) Ab-4, Rabbit Polyclonal Antibody; Kir6.2 boyaması için Santa Cruz KIR6.2 (B-9): sc-390104 Mouse Monoclonal Antibody; sekonder olarak ise Thermo Scientific™ Lab Vision™ UltraVision™ Detection System (TP-015-HD) anti-Polyvalent HRP/DAB kit kullanıldı. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) boyama için ise Milipore apoptag plus peroxidase in situ apoptosis detection kit(cat no: S7101) kullanıldı. Kaspaz-3 ve Kir6.2 immünohistokimyasal boyama prosedürü aşağıdaki gibi uygulanmıştır;

Aşama	Süre
1 Ksilen I	5 dakika
2 Ksilen II	5 dakika
3 %100'lük Alkol	5 dakika
4 %96'lık Alkol	3 dakika
5 %70'lık Alkol	3 dakika
6 %50'lik Alkol	3 dakika
7 Distile suda yıkama	3 dakika
8 PBS ile yıkama	3 dakika
9 pH:6.00 sitrat tampon içinde 360Watt'ta kaynatma	10 dakika
10 Soğutma	20-30 dakika

11	Hidrojen peroksidaz	10 dakika
12	PBS ile yıkama	3 dakika
13	Serum block	15 dakika
14	Primer antikör (Kaspaz-3 1:50, Kir6.2 1:50) uygulaması	
15	Kesitler bir gece +4°C'de inkübe ediliir	
16	PBS ile yıkama	3 dakika
17	Sekonder antibody	40 dakika
18	PBS ile yıkama	3 dakika
19	HRP Streptavidin	15 dakika
20	PBS ile yıkama	3 dakika
21	DAB kromojen	15-25 saniye
22	Hematoksilen ile zıt boyama	15 saniye
23	%50'lik Alkol	30 saniye
24	%70'lik Alkol	30 saniye
25	%96'lik Alkol	30 saniye
26	%100'lük Alkol	1 dakika
27	Ksilen I	1 dakika
28	Ksilen II	1 dakika
29	Entellan ile kapama	

TUNEL boyama prosedürü aşağıdaki gibi uygulanmıştır;

Aşama	Süre
1 Ksilen I	5 dakika
2 Ksilen II	5 dakika
3 %100'lük Alkol	5 dakika
4 %96'lik Alkol	3 dakika
5 %70'lik Alkol	3 dakika
6 %50'lik Alkol	3 dakika
7 Distile suda yıkama	3 dakika
8 PBS ile yıkama	3 dakika
9 pH:6.00 sitrat tampon içinde 360Watt'ta kaynatma	10 dakika
10 H ₂ O ₂	5 dakika
11 Dengeliyici tampon	30 saniye
12 Tdt ile 37 °C'de inkübasyon	1 saat

13	Durdurma, yıkama tamponu	10 dakika
14	PBS ile yıkama	3 kez
15	Anti-Digoxigenin-Peroksit	30 dakika
16	DAB kromojen	1 dakika
17	Distile su ile yıkama	3 kez
18	Hematoksilen ile zıt boyama	45 saniye
19	%50'lik Alkol	30 saniye
20	%70'lik Alkol	30 saniye
21	%96'lık Alkol	30 saniye
22	%100'lük Alkol	1 dakika
23	Ksilen I	1 dakika
24	Ksilen II	1 dakika
25	Entellan ile kapama	

3.8. Johnsen Skorlaması

Hematoksilen-eozin ile boyanan kesitlere, seminifer tübül ve spermatogenez değişikliğini saptamak için Johnsen skorlaması yapıldı. Her örnekten 20 tübül rastgele seçilip 1'den 10'a kadar puan verildi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Johnsen skorlaması aşağıdaki puan sistemine göre yapılmıştır;

1. Hiç hücre bulunmayan tübüller
2. Germ hücresi bulunmayan ama Sertoli hücresi içeren tübüller
3. Germ hücre olarak sadece spermatogonyum içeren tübüller
4. Spermatozoa ve spermatid içermeyen, spermatositlerin ise 5'den az sayıda bulunduğu tübüller
5. Spermatosit içeren ancak spermatozoa ve spermatid içermeyen tübüller
6. Spermatozoa içermeyen, spermatidlerin ise 10'dan az sayıda bulunduğu tübüller
7. Çok sayıda spermatidi olan ancak spermatozoa içermeyen tübüller
8. Germinal epiteli çok sıralı olan fakat lümeninde 10'dan az spermatozoa içeren tübüller
9. Spermatozoa içeren ancak germinal epitelinin düzeni bozulmuş ve lümene doğru yığılma görülen tübüller
10. Çok sayıda spermatozoa içeren germinal epiteli çok sıralı ve düzgün olan tübüller

3.9. Biyokimyasal Analiz

Kan serumları -80°C’de muhafaza edildikten sonra -20°C’ye alınıp bir gece bekletilip +4°C’ye alınarak kademeli bir şekilde ısısı arttırıldı. Biyokimyasal analizler Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı’nda yapıp, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi kullanıldı. Testosteron (Elabscience E-EL-R0640) için 0.31-20 ng/mL, MDA (Elabscience E-EL-R0391) için 31.25-2000 ng/mL referans aralıkları kullanıldı. Ölçümler BioRad ELISA okuyucu cihazında yapıldı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.10. İstatistiksel Bulgular

İstatistiksel inceleme SPSS Istatistics 20 programı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin ortalama, ortanca değerleri ve standart sapmaları hesaplanılarak, Kolmogorov –Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile dağılımların normal olup olmadığı saptandı. Gruplar arası dağılımlar One Way ANOVA ve Mann-Whitney U testleri ile belirlendi. Gruplar arası ilişkiler Post Hoc testler ile belirlendi. Elde edilen sonuçların anlamlılığı $p \leq 0.05$ olarak kabul edildi.

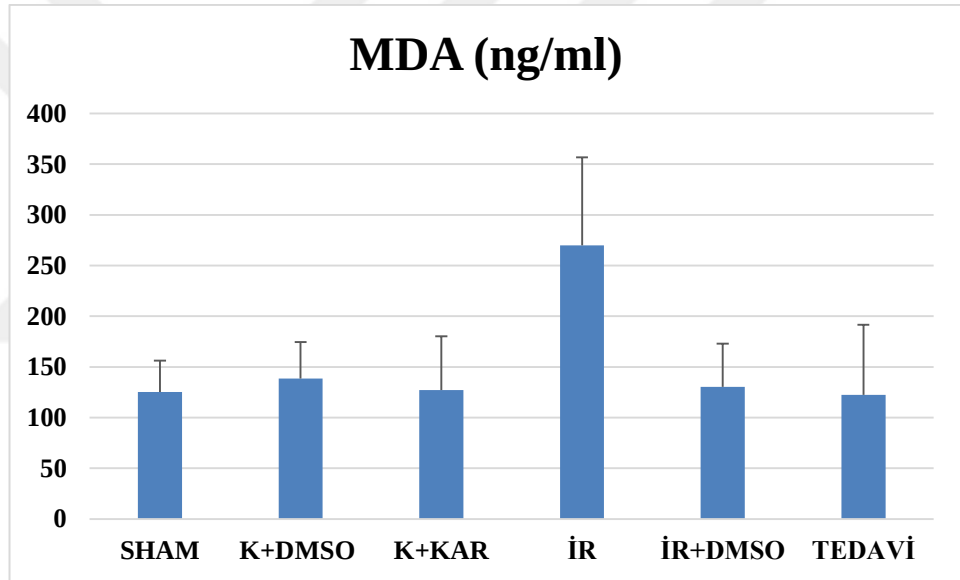
4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Deney gruplarında serum MDA ve testosteron düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlenmiş olup, elde edilen bulgular aşağıdaki Tablo 4.1, Tablo 4.2, Şekil4.1 ve Şekil4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Serum MDA değerleri

Grup	Sham ($\pm$ SD)	K+DMSO ($\pm$ SD)	K+KAR ($\pm$ SD)	İR ($\pm$ SD)	İR+DMSO ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
MDA (ng/ml)	125,38 $\pm$ 30,69	138,56 $\pm$ 35,88	127,24 $\pm$ 53,08	269,81 $\pm$ 86,87	130,41 $\pm$ 42,43	122,53 $\pm$ 69,09

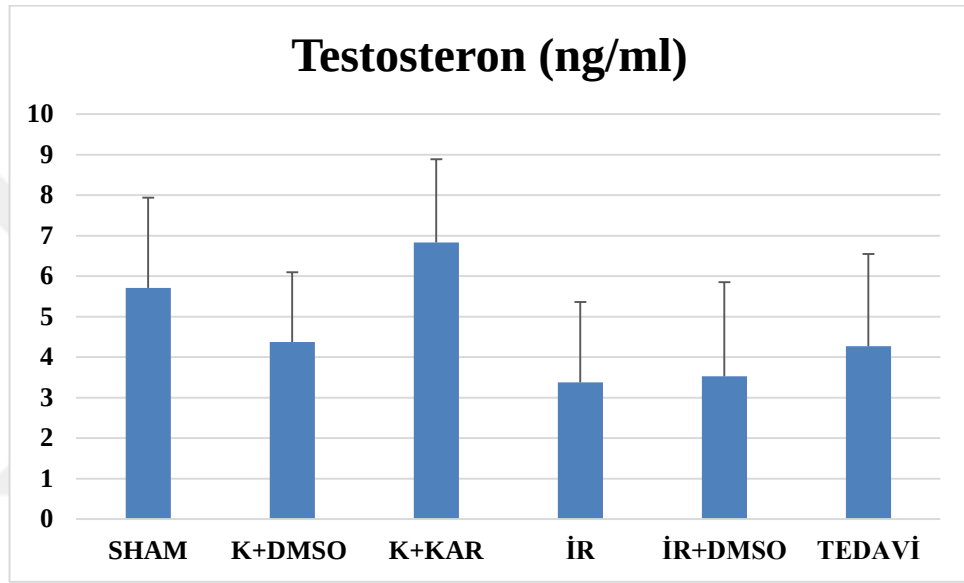


Şekil4.1. Tüm grupların serum MDA değerleri

MDA değerlerine bakıldığında Sham ve İR grubu arasında anlamlı bir fark vardı ($p=0.001$). İR grubu ve Tedavi grubu arasında da anlamlı bir fark vardı ($p=0.001$). Tedavi ve İR+DMSO grubu arasında anlamlı bir fark yoktu. İR+DMSO ve İR grubu arasında anlamlı bir fark vardı ($p=0.002$) İR grubunda MDA değerlerinin Sham grubuna göre artış göstermesi, iskemi reperfüzyon hasarının beklendiği gibi lipid peroksidasyonuna sebep olduğunu göstermiştir. Tedavi grubunda MDA değerlerinin azalma göstermesi ise karvakrol ile tedavinin lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermiştir. Aynı zamanda İR+DMSO grubunda MDA seviyesinin İR grubua kıyasla anlamlı azalması, DMSO uygulamasının iskemi reperfüzyon hasarı sırasında lipid peroksidasyonunu engelleyebildiğini göstermiştir.

Tablo 4.2 Serum Testosteron değerleri

Grup	Sham ($\pm$ SD)	K+DMSO ($\pm$ SD)	K+KAR ($\pm$ SD)	İR ($\pm$ SD)	İR+DMSO ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
Testosteron (ng/ml)	5,71 $\pm$ 2,23	4,37 $\pm$ 1,73	6,83 $\pm$ 2,06	3,38 $\pm$ 1,98	3,53 $\pm$ 2,32	4,27 $\pm$ 2,28



Şekil4.2. Tüm grupların serum Testosteron değerleri

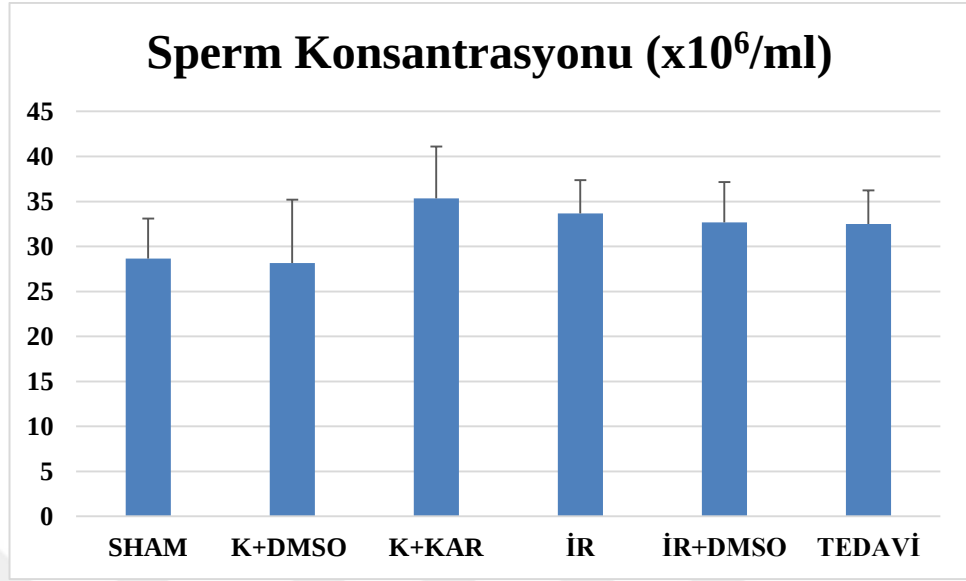
Testosteron değerlerine göre sadece Kontrol+Karvakrol grubu ile İR ve İR+DMSO arasında anlamlı bir fark vardı ($p=0.025$ ve $p=0.037$). İR gruplarındaki testosteron seviyelerindeki azalma, iskemi reperfüzyon hasarının testosteron seviyesini düşürdüğünü göstermiştir. İR grubu ile Tedavi grubu arasında anlamlı bir fark yoktu.

4.2.Spermiyogram Bulguları:

Epididimisin kauda bölgesinden elde edilen sperm örneklerinin sayımı sonucuna göre grupların sperm konsantrasyonu ve toplam hareketli sperm yüzdeleri aşağıdaki Tablo 4.3, Tablo 4.4, Şekil4.3 ve Şekil4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.3. Sperm konsantrasyon değerleri

Grup	Sham ($\pm$ SD)	K+DMSO ($\pm$ SD)	K+KAR ($\pm$ SD)	İR ($\pm$ SD)	İR+DMSO ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
Toplam sperm ($\times 10^6$ /ml)	28,66 $\pm$ 4,45	28,16 $\pm$ 7,05	35,33 $\pm$ 5,78	33,66 $\pm$ 3,72	32,66 $\pm$ 4,50	32,5 $\pm$ 3,72

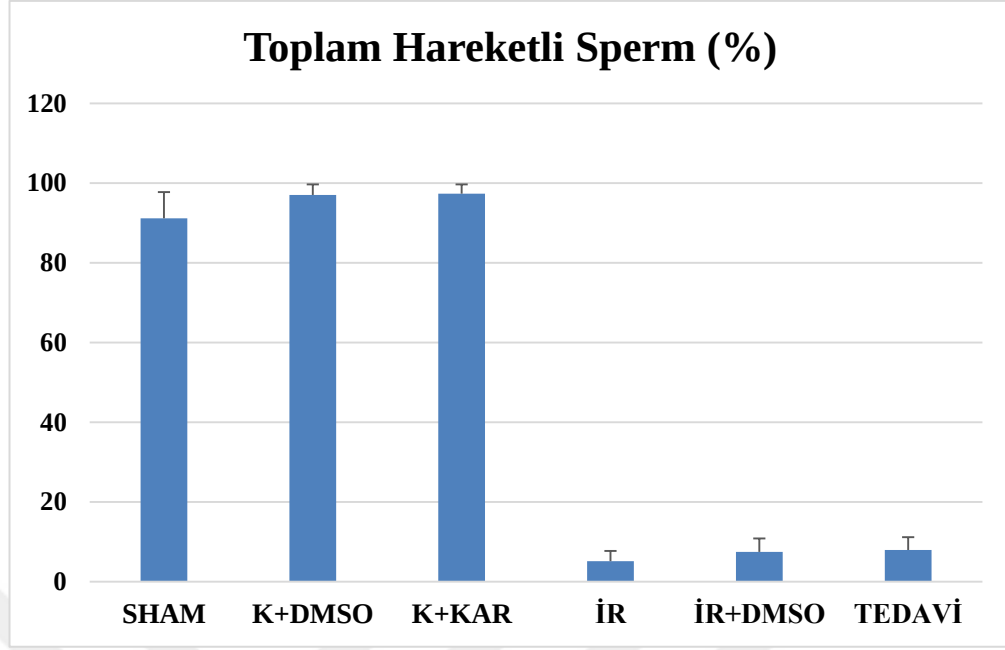


Şekil4.3. Tüm gruplardaki sperm konsantrasyon değerleri.

Gruplar arasında sperm konsantrasyon değerlerine bakıldığında anlamlı bir fark yoktu.

Tablo 4.4. Toplam hareketli sperm yüzdesi

Grup	Sham ($\pm$ SD)	K+DMSO ($\pm$ SD)	K+KAR ($\pm$ SD)	İR ($\pm$ SD)	İR+DMSO ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
Toplam hareketli sperm (%)	91,16 $\pm$ 6,58	97,00 $\pm$ 2,68	97,33 $\pm$ 2,33	5,16 $\pm$ 2,56	7,50 $\pm$ 3,39	8,00 $\pm$ 3,22



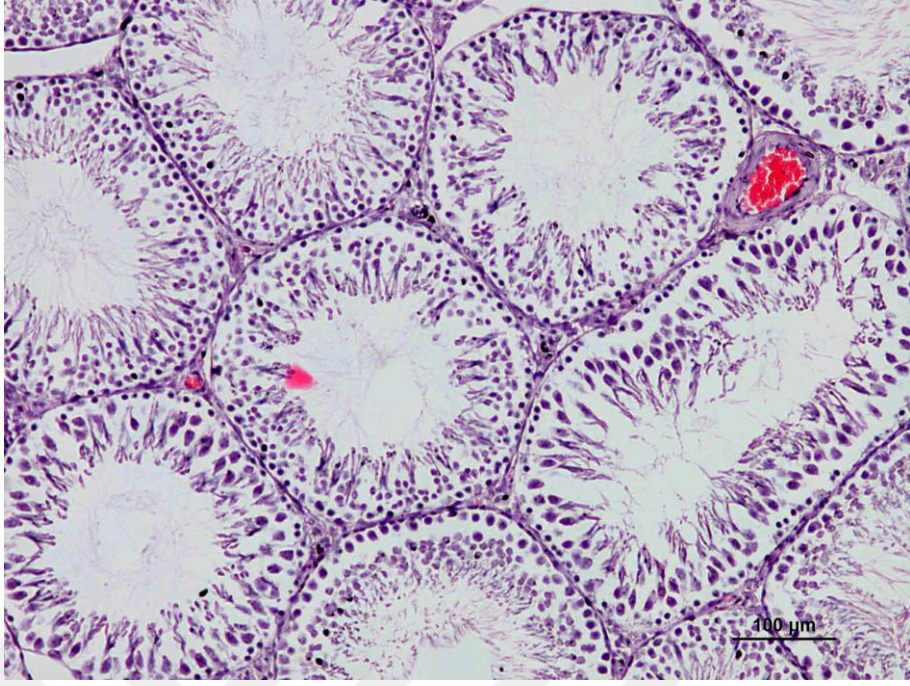
Şekil4.4. Tüm gruplardaki toplam hareketli sperm yüzdeleri

Toplam hareketli sperm yüzdelerine baktığımızda Sham ile İR grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ($p<0.001$). İR grubunda toplam hareketli sperm sayısının Sham grubuna kıyasla azalışı, iskemi reperfüzyon hasarının hareketli sperm sayısının azalmasına sebep olduğunu gösterdi. İR grubu ve Tedavi grubu arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.779$) ancak Tedavi grubunda toplam sperm hareketliliği İR grubuna kıyasla minimal bir artış gösterdi.

4.3. Işık Mikroskopik Bulgular

4.3.1. Histolojik bulgular

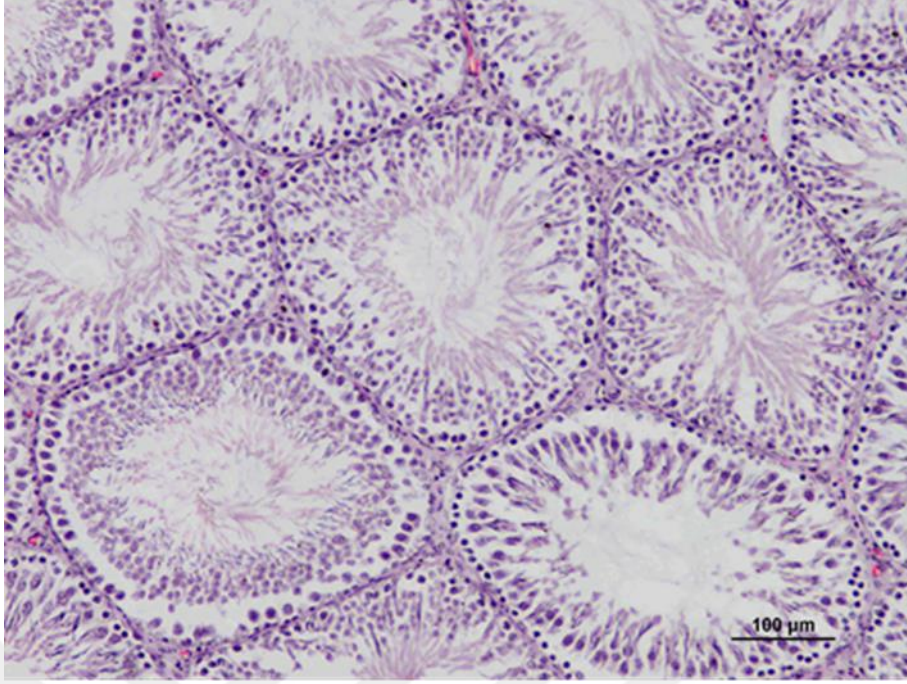
Sham grubuna ait testis dokularında histopatolojik bir değişiklik gözlenmedi. Aynı şekilde Kontrol+DMSO ve Kontrol+Karvakrol gruplarının testis dokularında da yapısal bir bozukluk yoktu. İR grubuna ait testis dokularında ise intertübüler alanlarda konjesyon, kalınlaşma, ödem, seminifer tübül yapılarında bozukluk, germinal epitellerde düzensizlik ve lümenlerinde hücre döküntüleri mevcuttu. Tedavi grubundaki yapısal bir bozukluk ve konjesyon, İR grubuna göre daha minimaldi.



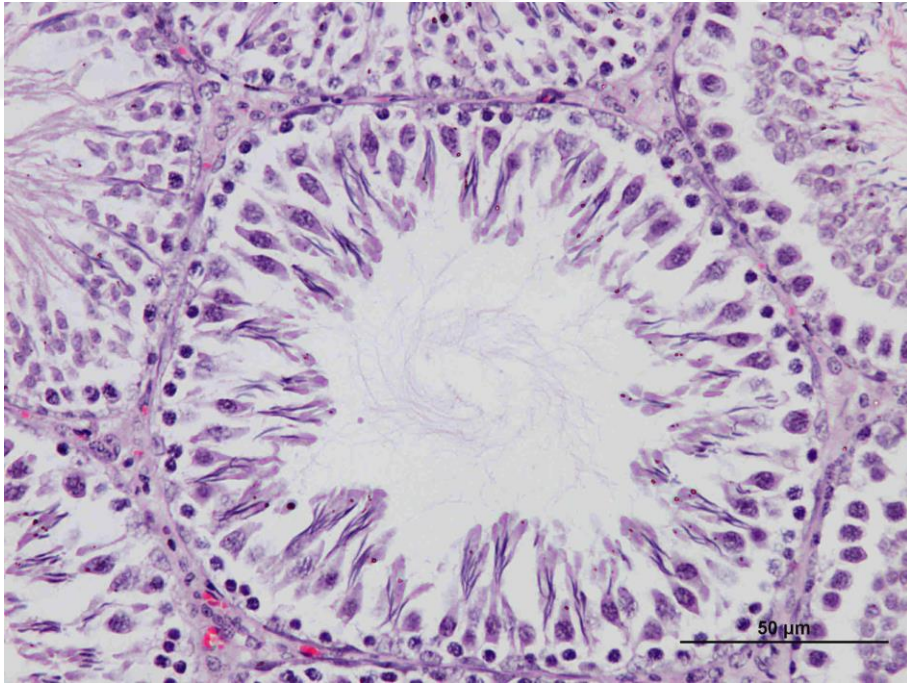
Şekil 4.5. Sham grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 10x



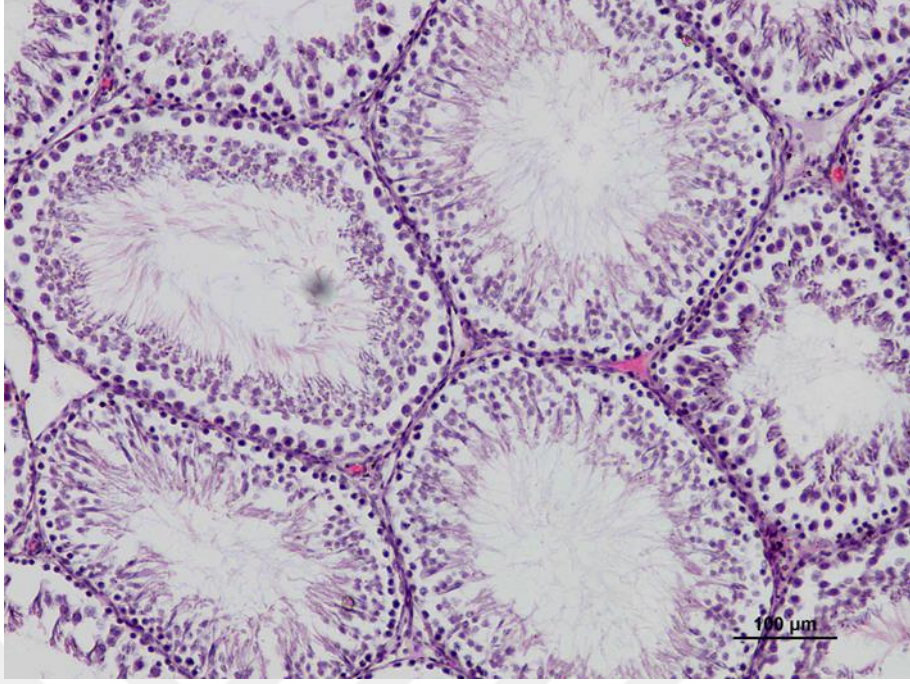
Şekil 4.6. Sham grubuna ait hemotoksilen-eozin boyaması, 20x



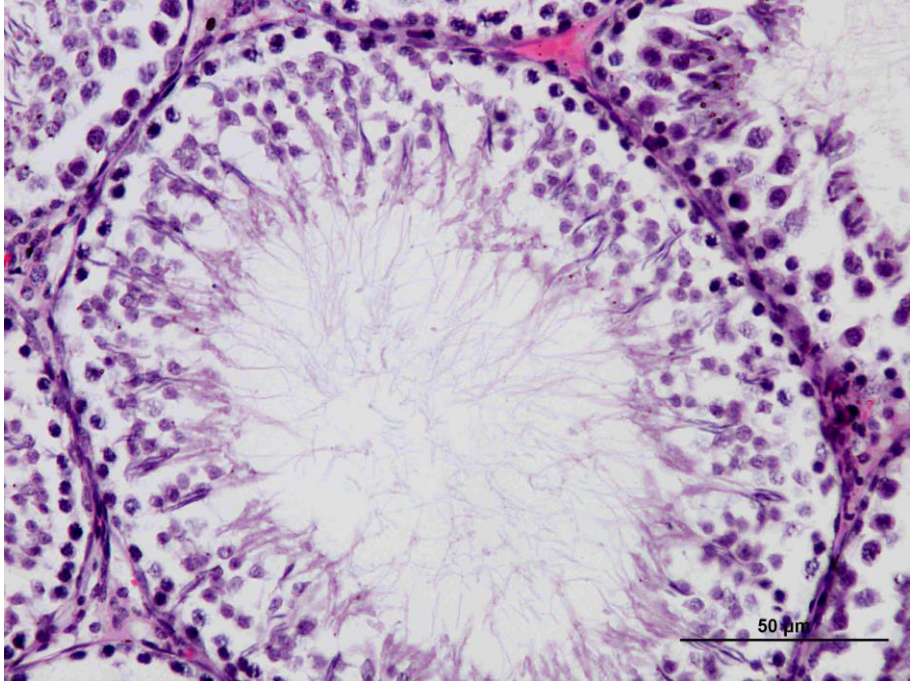
Şekil 4.7. K+DMSO grubuna ait hematoksilen-eozin boyaması, 10x



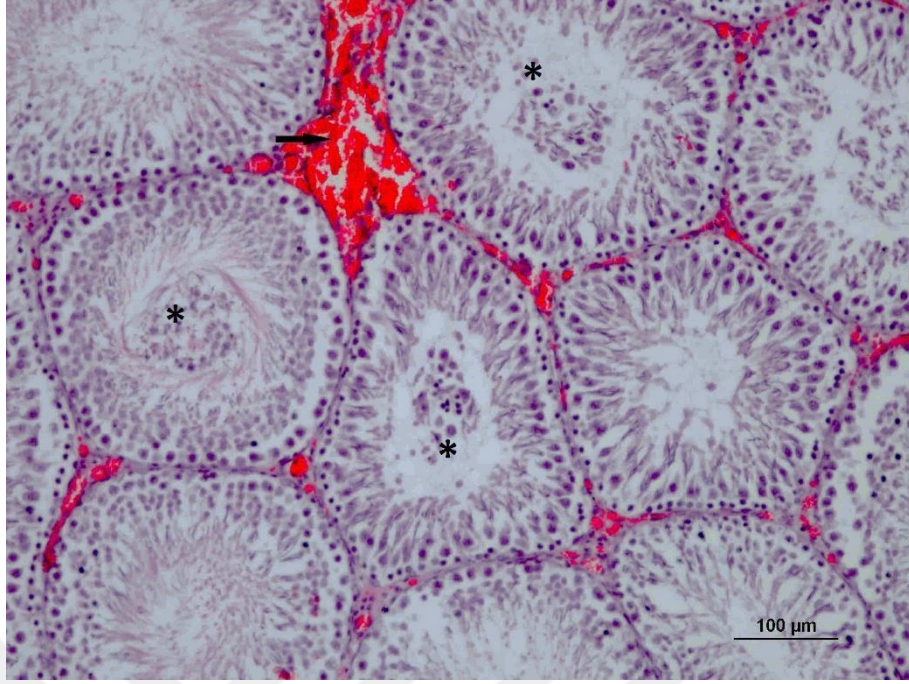
Şekil 4.8. K+DMSO grubuna ait hematoksilen-eozin boyaması, 20x



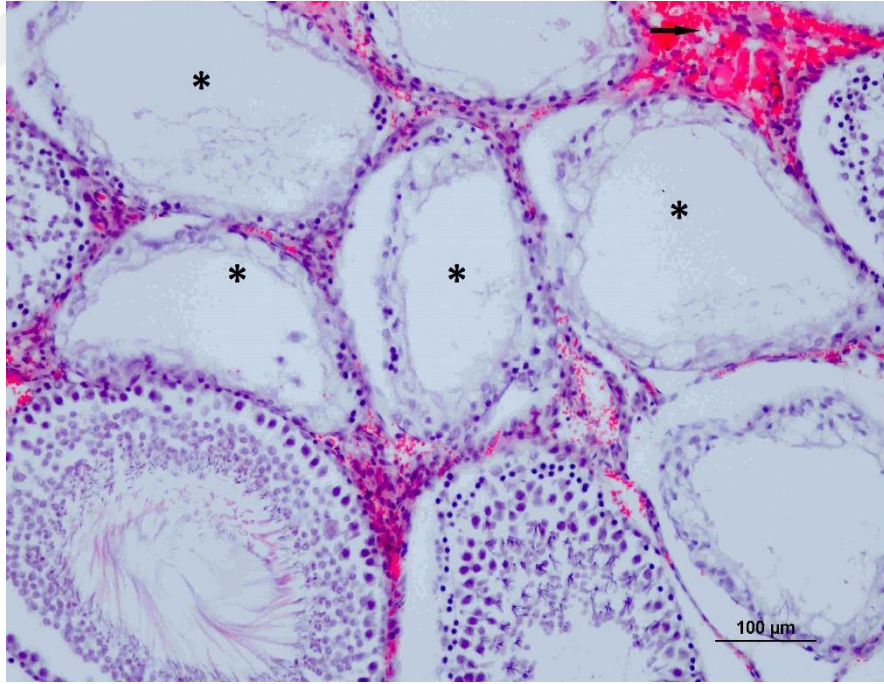
Şekil 4.9. K+Karvakrol grubuna ait hematoksilin-eozin boyaması, 10x



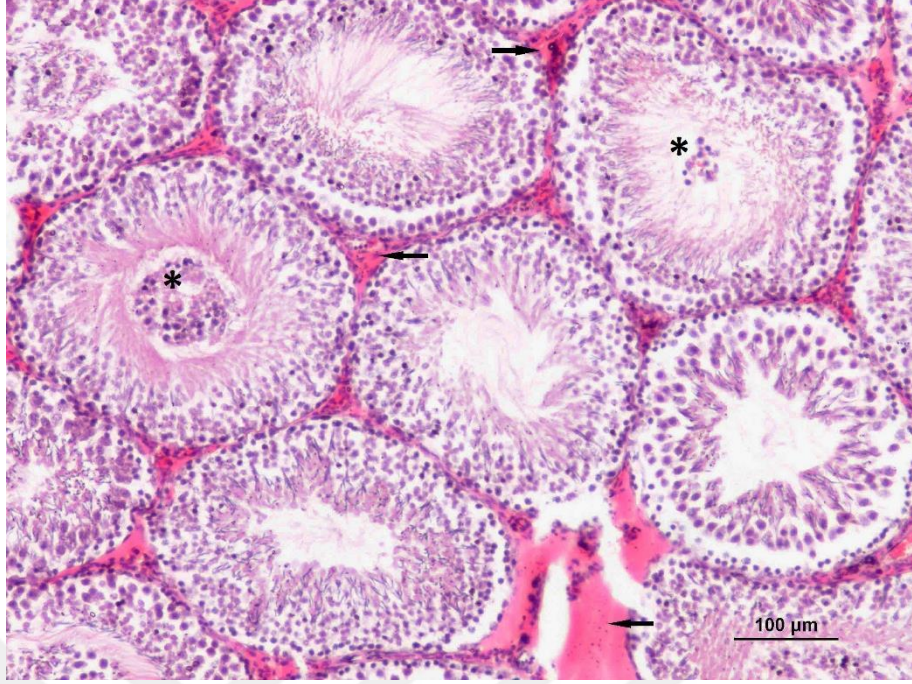
Şekil 4.10. K+Karvakrol grubuna ait hematoksilin-eozin boyaması, 20x



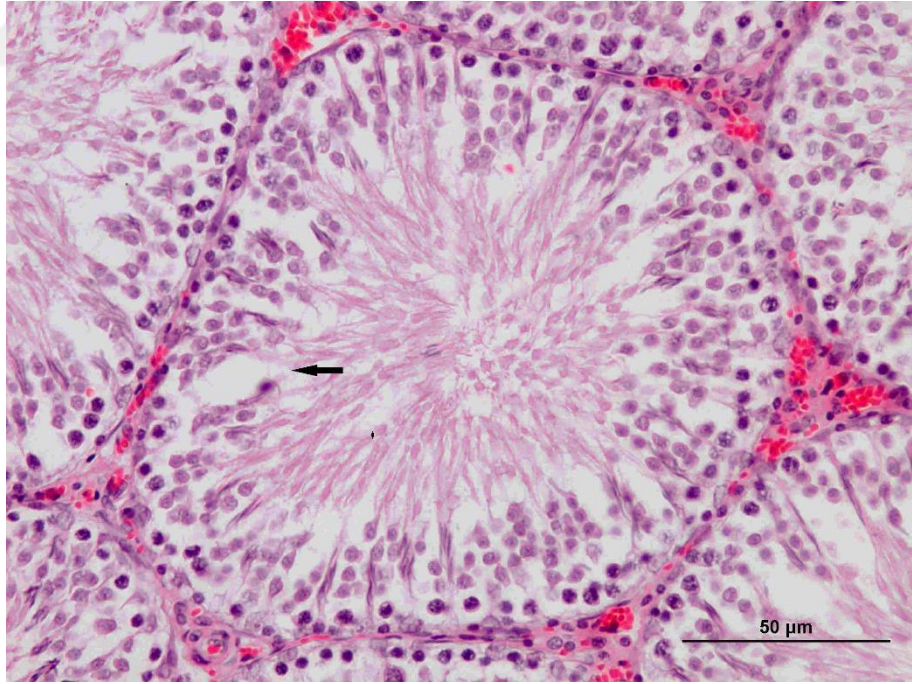
Şekil 4.11. İR grubuna ait hematoksilin-eozin boyaması, intertübüler alanlarda konjesyon (ok ucu), seminifer tübüllerde hücre döküntüleri (*), 10x



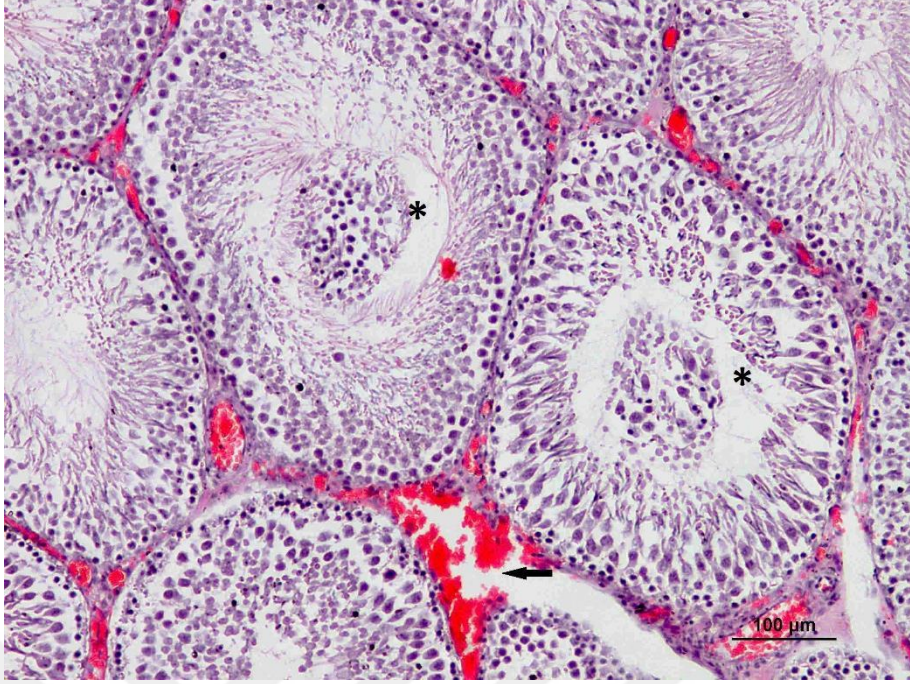
Şekil 4.12. İR grubuna ait hematoksilin-eozin boyaması, intertübüler alanda konjesyon (ok ucu), düzeni bozulmuş ve hücre kaybı olan seminifer tübüller (*), 10x



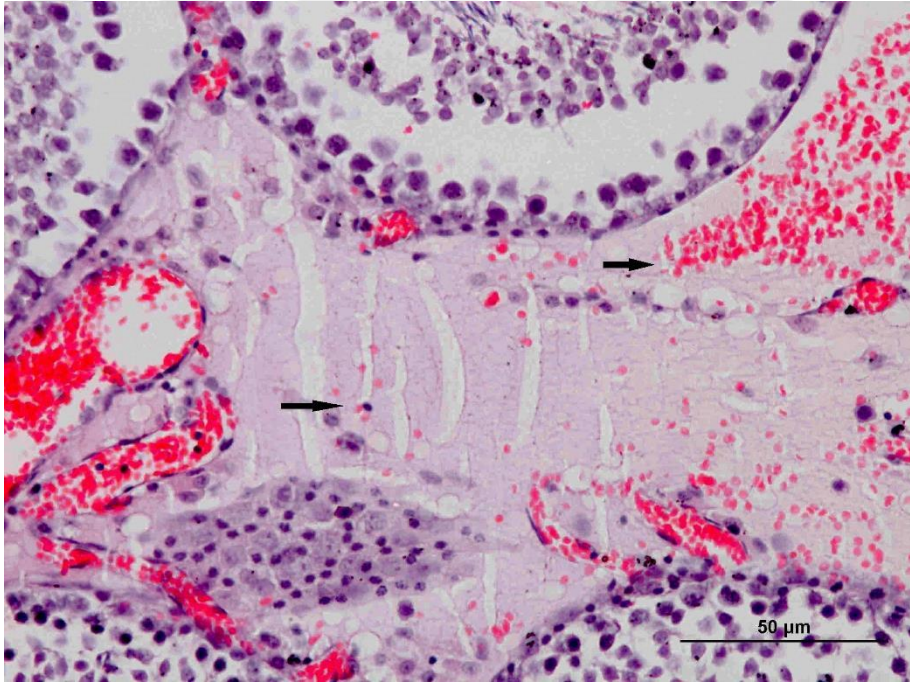
Şekil 4.13. İR grubuna ait hematoksilin-eozin boyaması, intertübüler alanda kalınlaşma, ödem (ok ucu), seminifer tübüllerde hücre döküntüleri (*), 10x



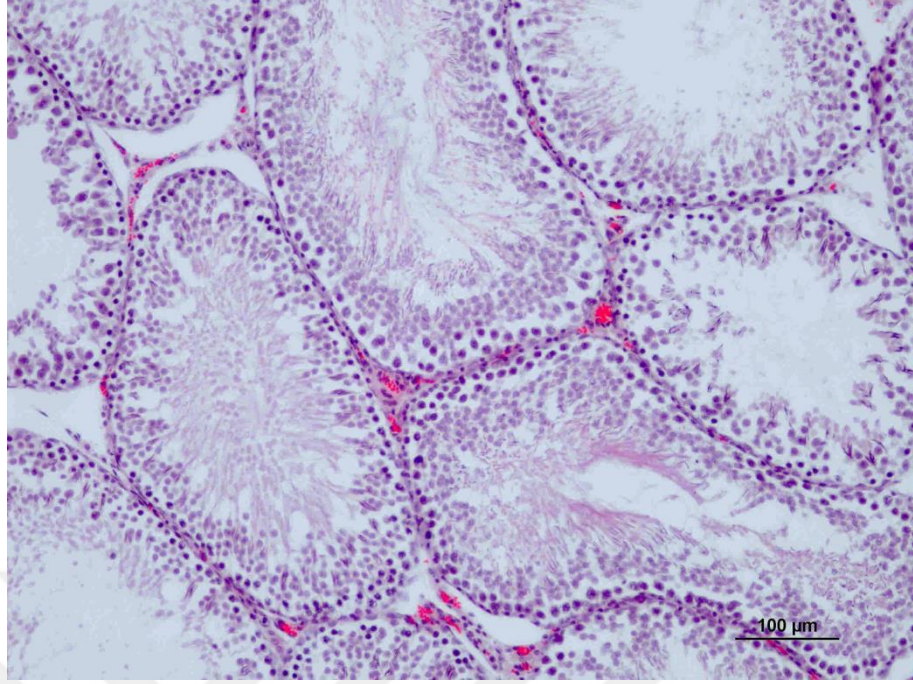
Şekil 4.14. İR grubuna ait hematoksilin-eozin boyaması, seminifer tübülde vakoul (ok ucu), 20x



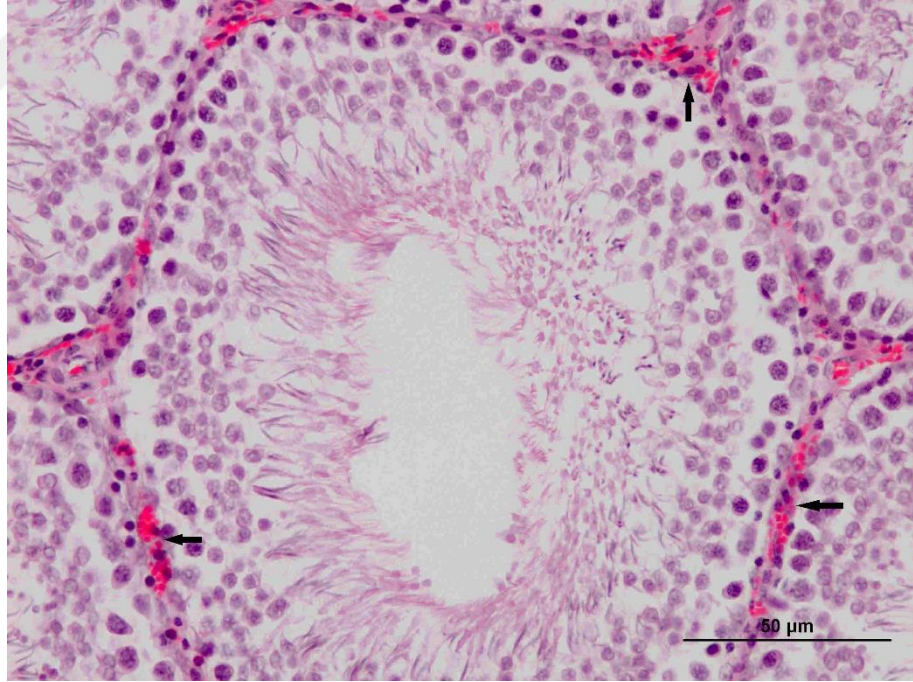
Şekil 4.15. İR+DMSO grubuna ait hematoksilin-eozin boyaması, intertübüler alanda konjesyon (ok ucu), seminifer tübüllerde hücre döküntüleri (*), 10x



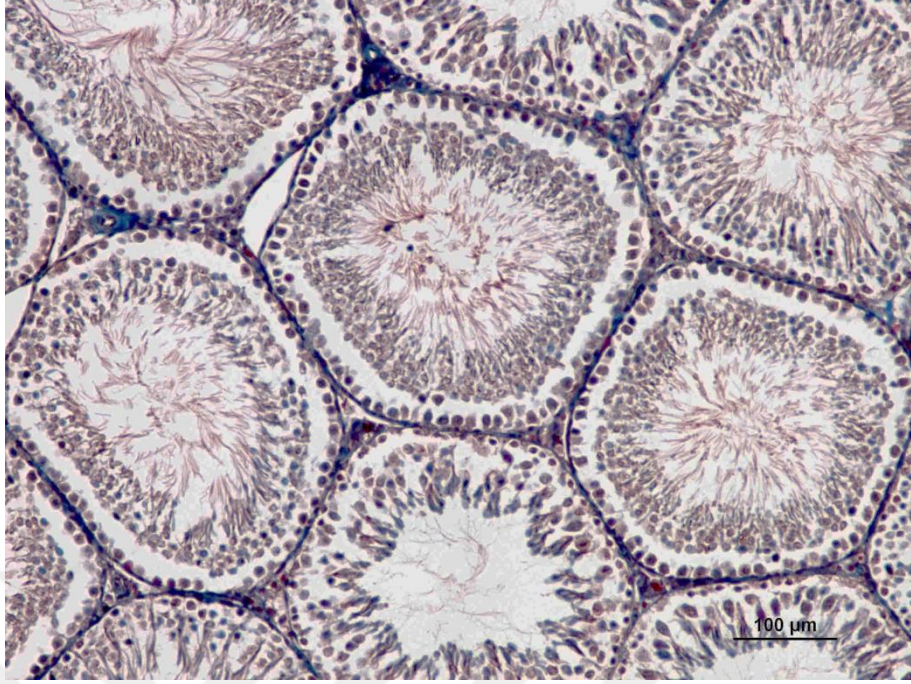
Şekil 4.16. İR+DMSO grubuna ait hematoksilin-eozin boyaması, intertübüler alanda konjesyon ve ödem (ok ucu), 20x



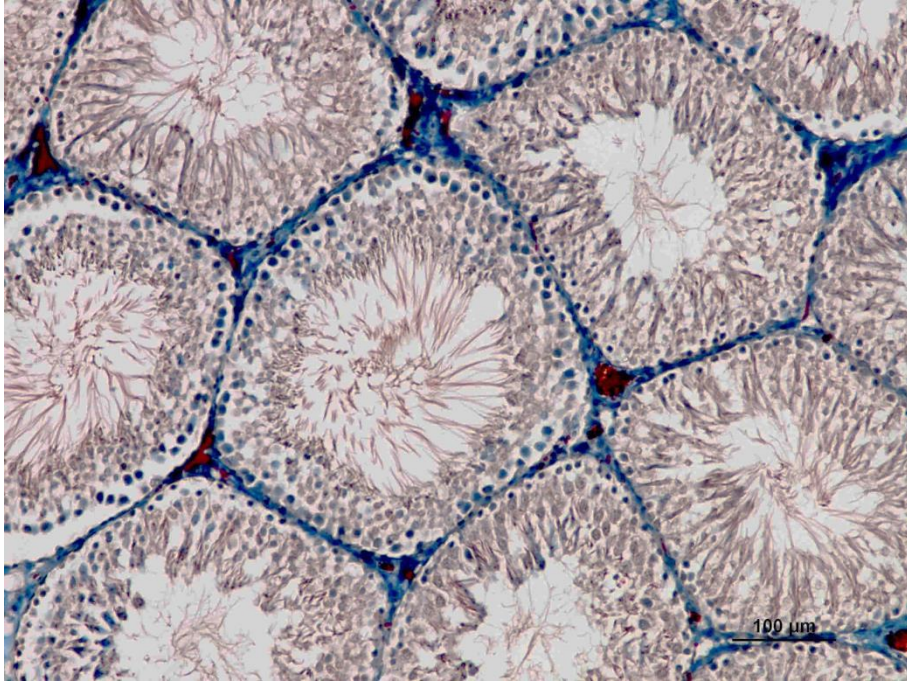
Şekil 4.17. Tedavi grubuna ait hematoksilin-eozin boyaması, 10x



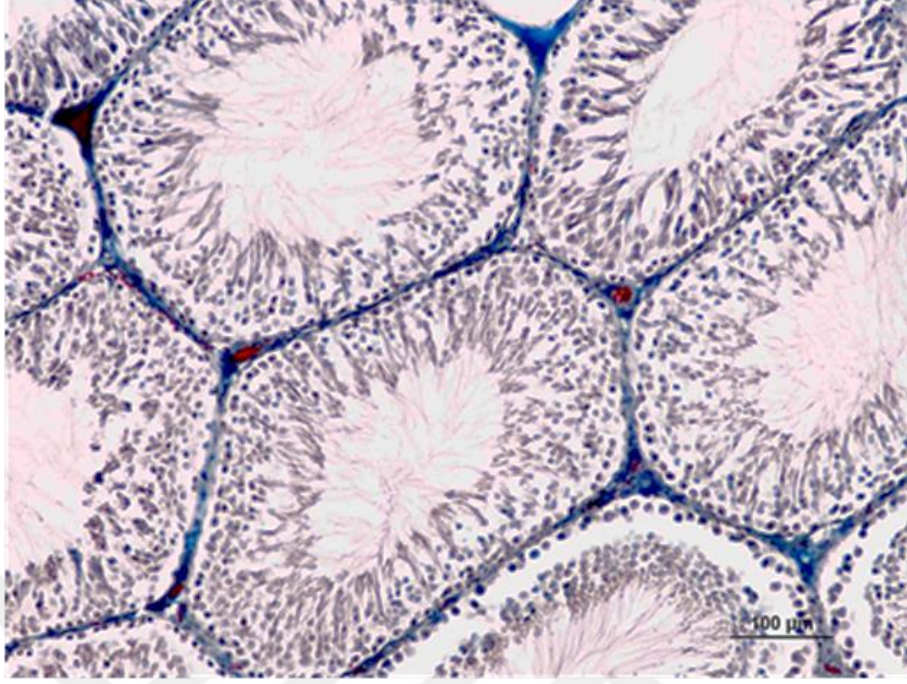
Şekil 4.18. Tedavi grubuna ait hematoksilin-eozin boyaması, intertübüler alanlarda minimal konjesyon, 20x



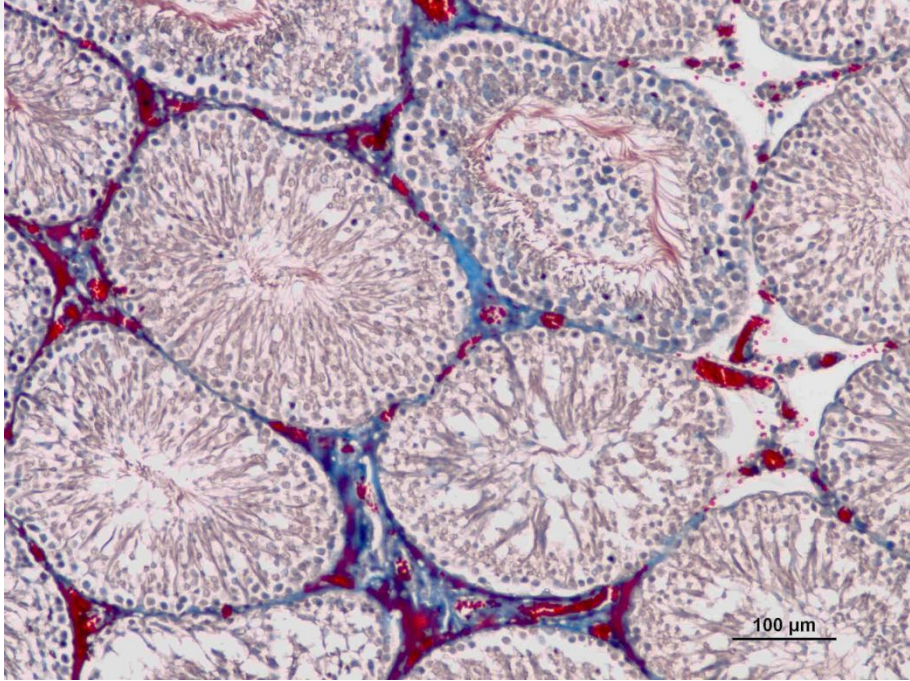
Şekil 4.19. Sham grubuna ait Masson'un üçlü boyaması, 10x



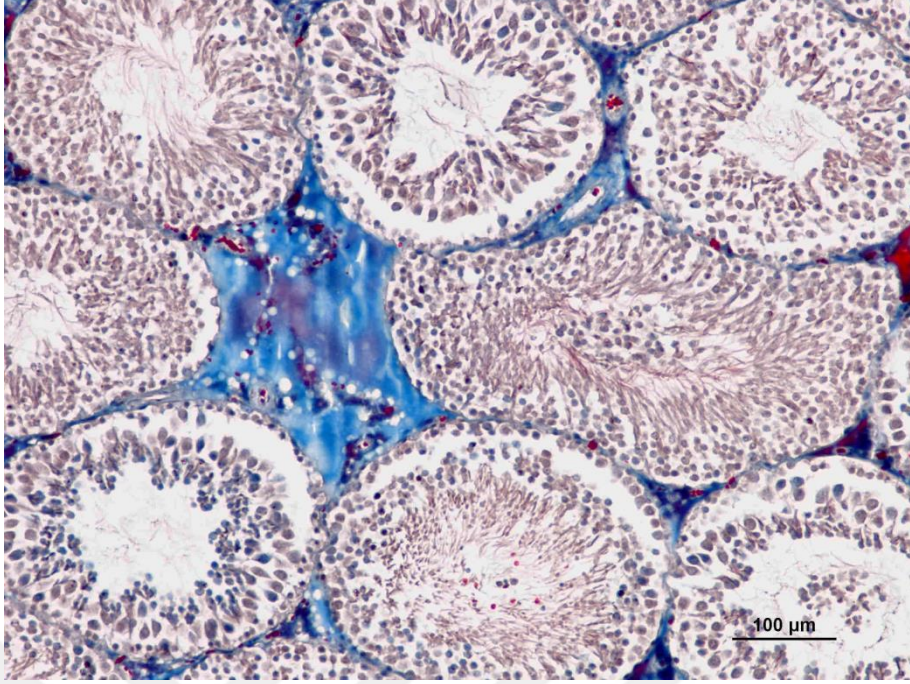
Şekil 4.20. K+DMSO grubuna ait Masson'un üçlü boyaması, 10x



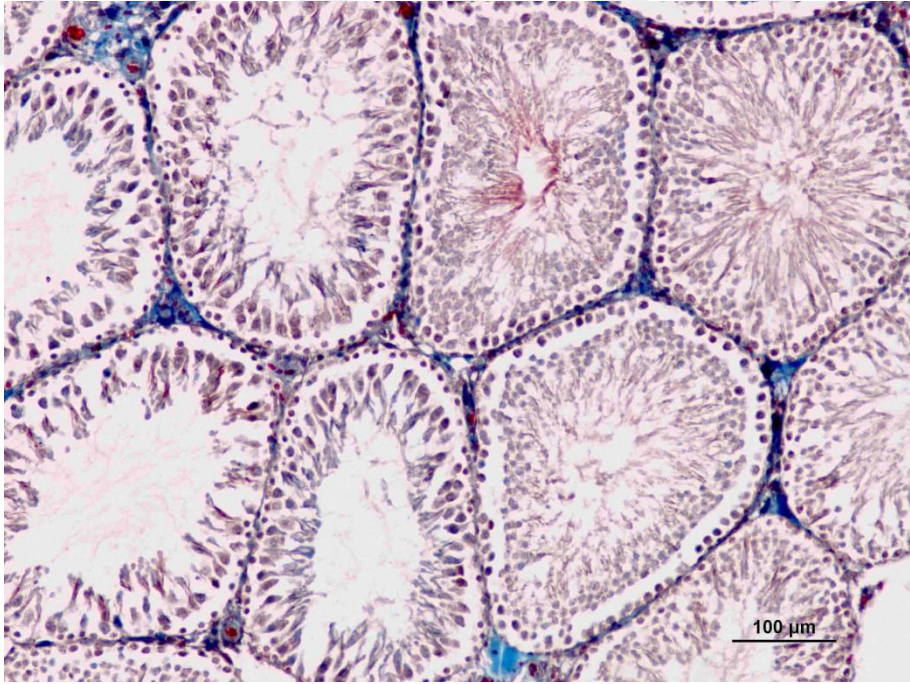
Şekil 4.21. K+Karvakrol grubuna ait Masson'un üçlü boyaması, 10x



Şekil 4.22. İR grubuna ait Masson'un üçlü boyaması, 10x, intertübüler alanlarda konjesyon, kalınlaşma, ödem ve lümende hücre döküntüleri mevcut.



Şekil 4.23. İR+DMSO grubuna ait Masson'un üçlü boyaması, 10x, intertübüler alanlarda konjesyon, ödem ve lümende hücre döküntüleri mevcut.



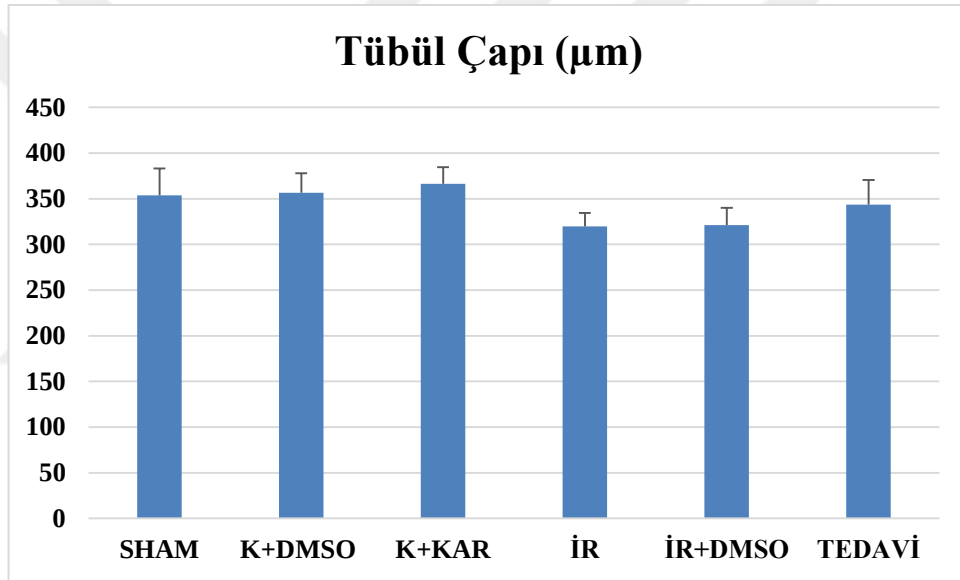
Şekil 4.24. Tedavi grubuna ait Masson'un üçlü boyaması, 10x

4.3.2. Seminifer tübül çapı ve johnsen skorlama bulguları

Tüm gruplarda tübül çapı ölçümü ve Johnsen skorlaması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 4.5 Tablo 4.6 Şekil4.25 ve Şekil4.26’da gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Tübül çapı değerleri

Grup	Sham ($\pm$ SD)	K+DMSO ($\pm$ SD)	K+KAR ($\pm$ SD)	İR ($\pm$ SD)	İR+DMSO ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
Tübül Çapı (μ m)	353,72 $\pm$ 29,30	356,33 $\pm$ 21,52	366,44 $\pm$ 18,07	319,56 $\pm$ 14,92	321,19 $\pm$ 18,77	343,42 $\pm$ 26,97

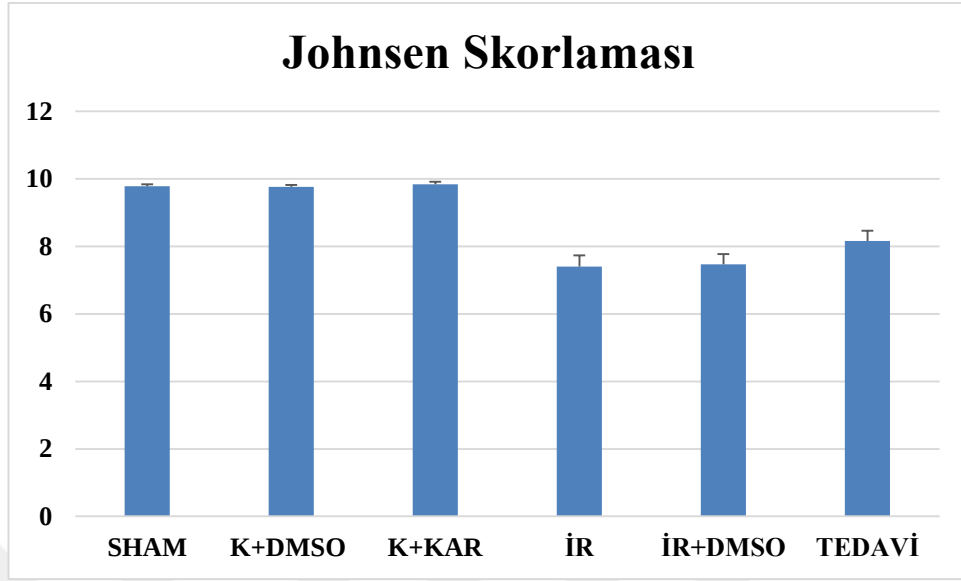


Şekil4.25. Tüm grupların tübül çapı değerleri

Tübül çapı değerlerine göre Sham ve İR grubu arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.112$). Aynı şekilde İR ve Tedavi grubu arasında da anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.443$). Kontrol+Karvakrol ve İR grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0.011$). İR grubunda kontrol grubuna kıyasla tübül çapında azalma görüldü. Testis iskemi reperfüzyon hasarının seminifer tübül yapısına hasar verdiği tespit edildi.

Tablo 4.6. Johnsen skorlaması değerleri

Grup	Sham ($\pm$ SD)	K+DMSO ($\pm$ SD)	K+KAR ($\pm$ SD)	İR ($\pm$ SD)	İR+DMSO ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
Skor	9,78 $\pm$ 0,06	9,77 $\pm$ 0,05	9,84 $\pm$ 0,08	7,40 $\pm$ 0,34	7,47 $\pm$ 0,30	8,16 $\pm$ 0,31



Şekil4.26. Tüm grupların Johnsen skoruması değerleri

Johnsen skoruması yapılarak elde edilen verilere göre, Sham ve İR grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0.001$). İR ve Tedavi grubu arasında da anlamlı bir fark vardı ($p=0.001$). Sham grubuna kıyasla İR grubunun Johnsen skorundaki azalma, iskemi reperfüzyon hasarı sırasında seminifer tübüllerin yapısını bozduğunu göstermiştir. İR grubuna kıyasla Tedavi grubunun Johnsen skorundaki artış, tedavinin seminifer tübüllerdeki hasarı engelleyebildiğini göstermiştir.

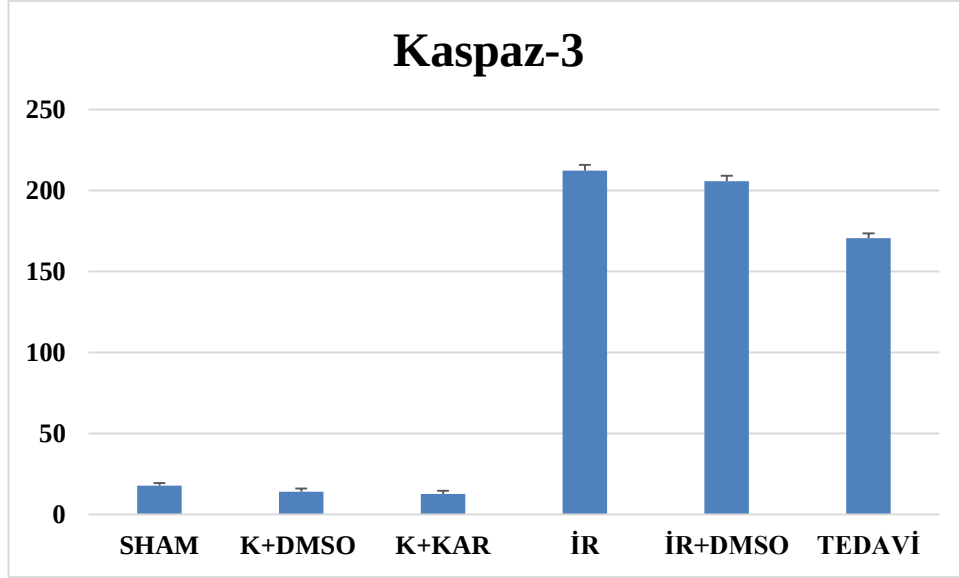
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.4.1. Kaspaz-3 İmmün İşaretleme

Testis dokusundaki apoptotik hücreleri belirlemek için Kaspaz-3 immün işaretleme yapılmıştır. İşaretlenen apoptotik hücreler sayılarak, elde edilen değerler aşağıdaki Tablo 4.7 ve Şekil4.27’de gösterilmiştir.

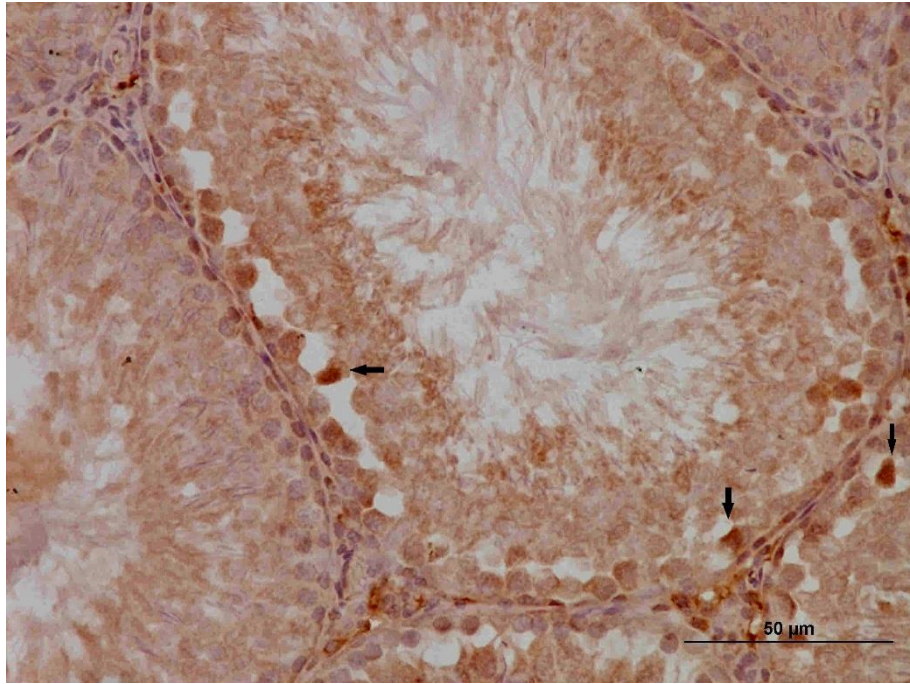
Tablo 4.7. Kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları

Grup	Sham ($\pm$ SD)	K+DMSO ($\pm$ SD)	K+KAR ($\pm$ SD)	İR ($\pm$ SD)	İR+DMSO ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
Kaspaz-3	17,83 $\pm$ 1,47	14 $\pm$ 1,89	12,66 $\pm$ 1,96	212,16 $\pm$ 3,54	205,66 $\pm$ 3,50	170,5 $\pm$ 3,08

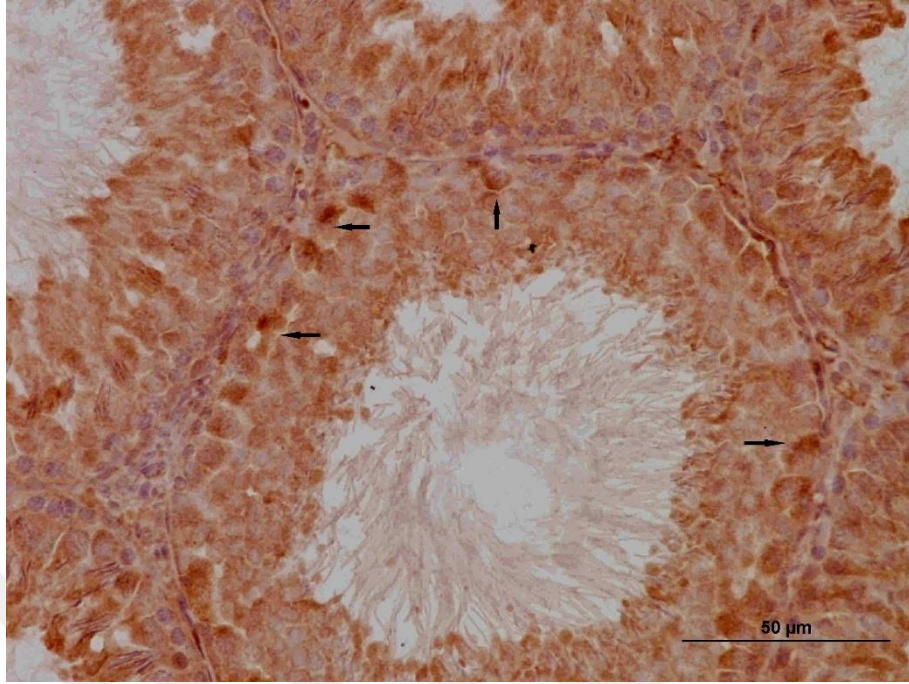


Şekil4.27. Tüm grupların Kaspaz-3 pozitif hücre sayısı

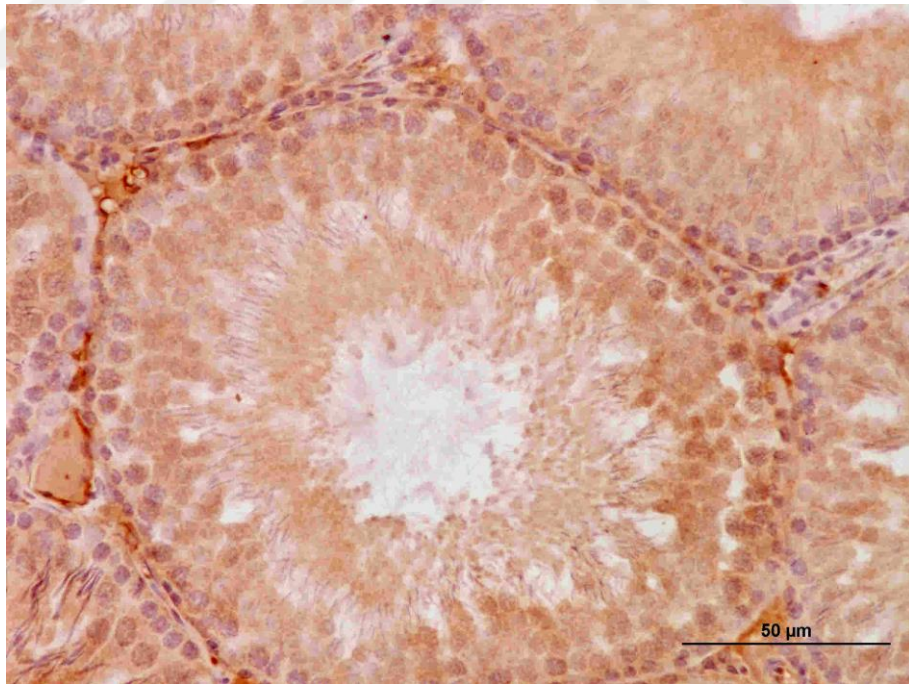
Kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları değerlerine göre Sham ile İR grubu arasında anlamlı bir fark vardı ($p=0.001$). İR grubundaki boyanan hücre sayısındaki anlamlı artış, iskemi reperfüzyon hasarının apoptozu indüklediğini göstermiştir. İR grubu ile Tedavi grubu arasında da anlamlı bir fark vardı ($p=0.001$) Tedavi grubunda boyanan hücre sayısındaki İR grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azalması, karvakrol uygulamasının iskemi reperfüzyon hasarı sırasında apoptozu engellediği anlaşılmıştır.



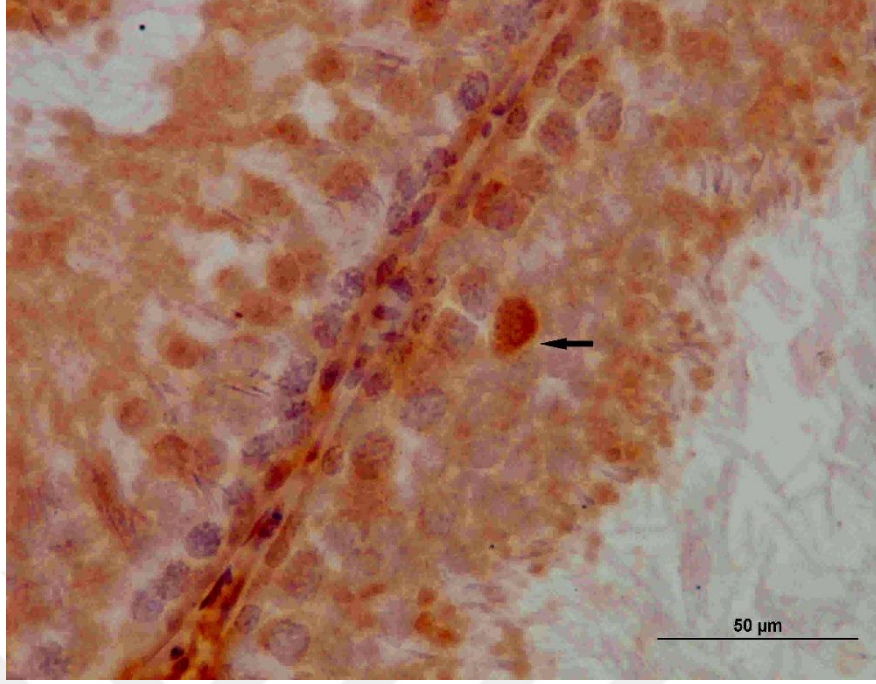
Şekil 4.28. Sham grubuna ait testis dokusu. Pozitif boyanan hücreler (ok ucu) Kaspaz-3 immün işaretleme, 20x



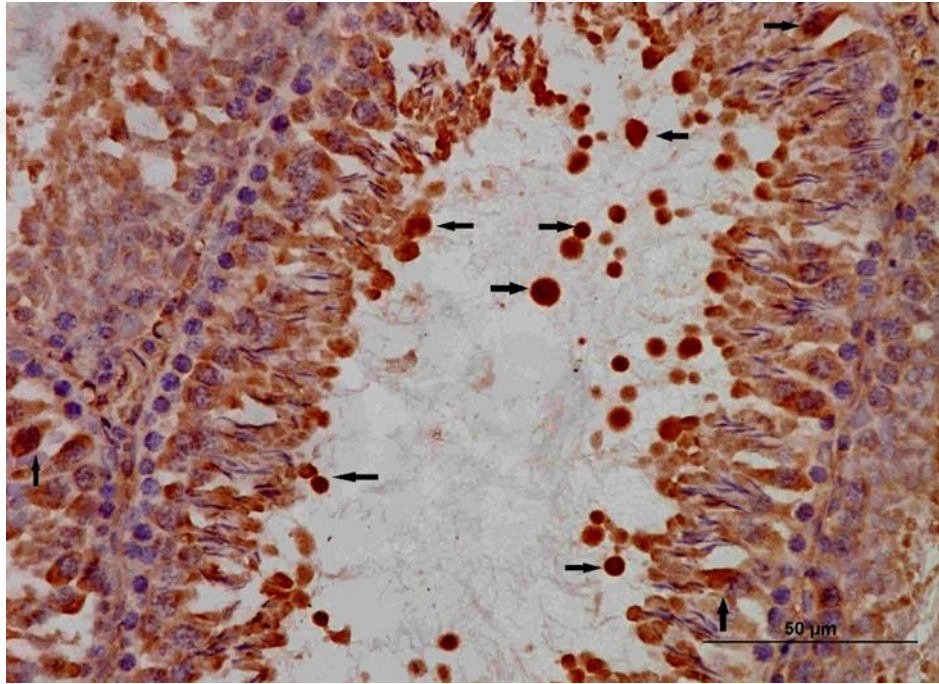
Şekil 4.29. K+DMSO grubuna ait testis dokusu. Pozitif boyanan hücreler (ok ucu) Kaspaz-3 immün işaretleme, 20x



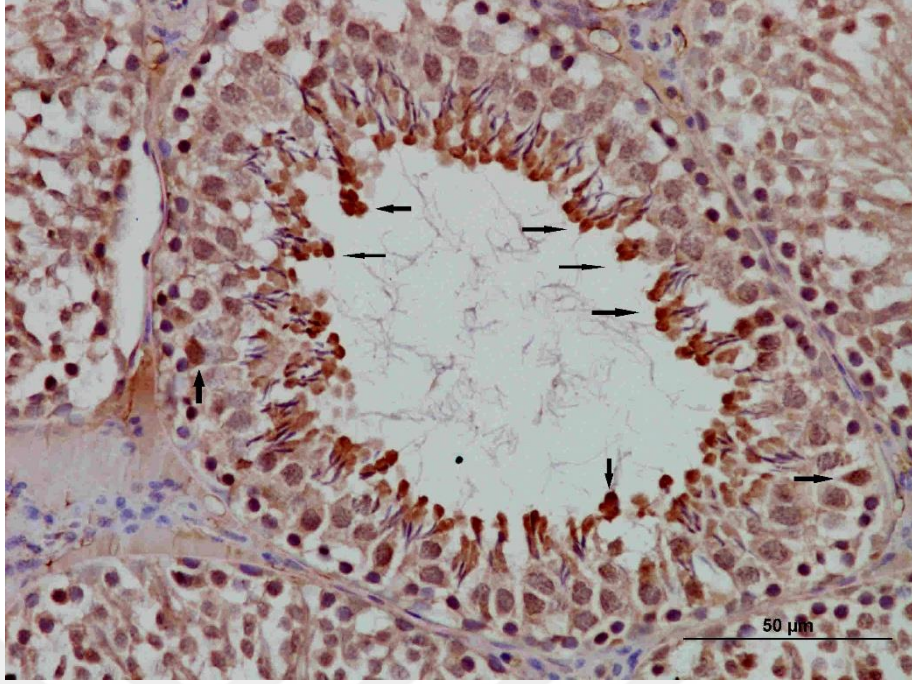
Şekil 4.30. K+Karvakrol grubuna ait testis dokusu. Kaspaz-3 immün işaretleme, 20x



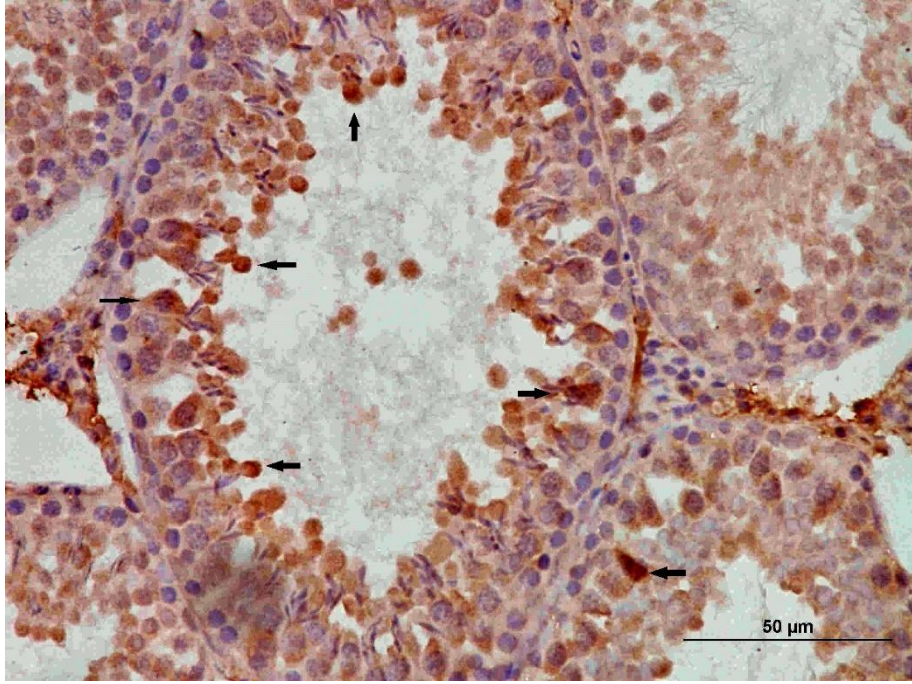
Şekil 4.31. K+Karvakrol grubuna ait testis dokusu. Pozitif boyanan hücreler (ok ucu) Kaspaz-3 immün işaretleme, 40x



Şekil 4.32. İR grubuna ait testis dokusu. Pozitif boyanan hücreler (ok ucu) Kaspaz-3 immün işaretleme, 20x



Şekil 4.33. İR+DMSO grubuna ait testis dokusu. Pozitif boyanan hücreler (ok ucu) Kaspaz-3 immün işaretleme, 20x



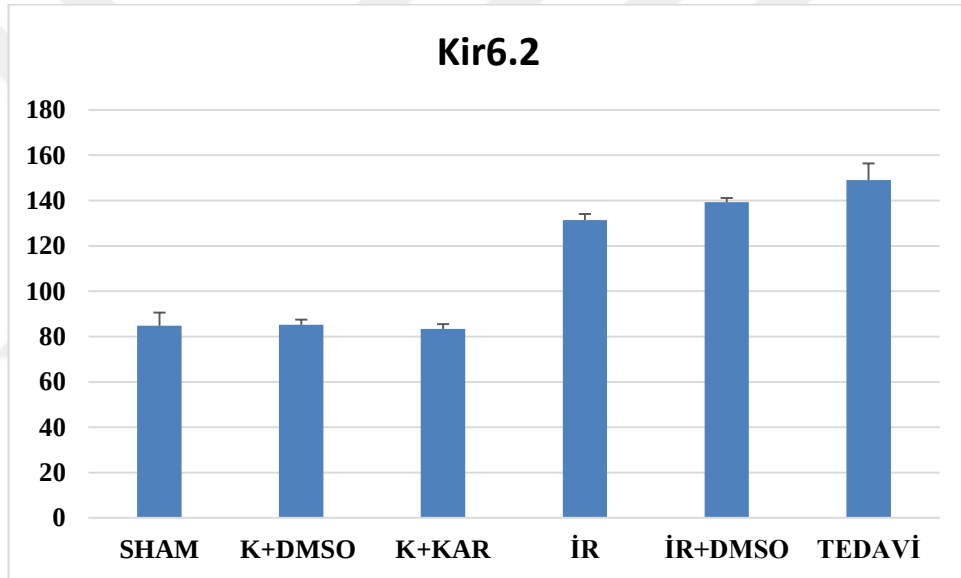
Şekil 4.34. Tedavi grubuna ait testis dokusu. Pozitif boyanan hücreler (ok ucu) Kaspaz-3 immün işaretleme 20x

4.4.2. Kir6.2 immün işaretleme

Testis dokularında açılmış olan ATP bağımlı potasyum kanallarını altbirimlerinden Kir6.2 kanallarını belirleme amacı ile immün işaretleme yapılmıştır. Pozitif boyanan hücreler koyu kahverengi renkte olup sayılmıştır. Elde edilen değerler aşağıdaki Tablo 4.8 ve Şekil4.35’de gösterilmiştir.

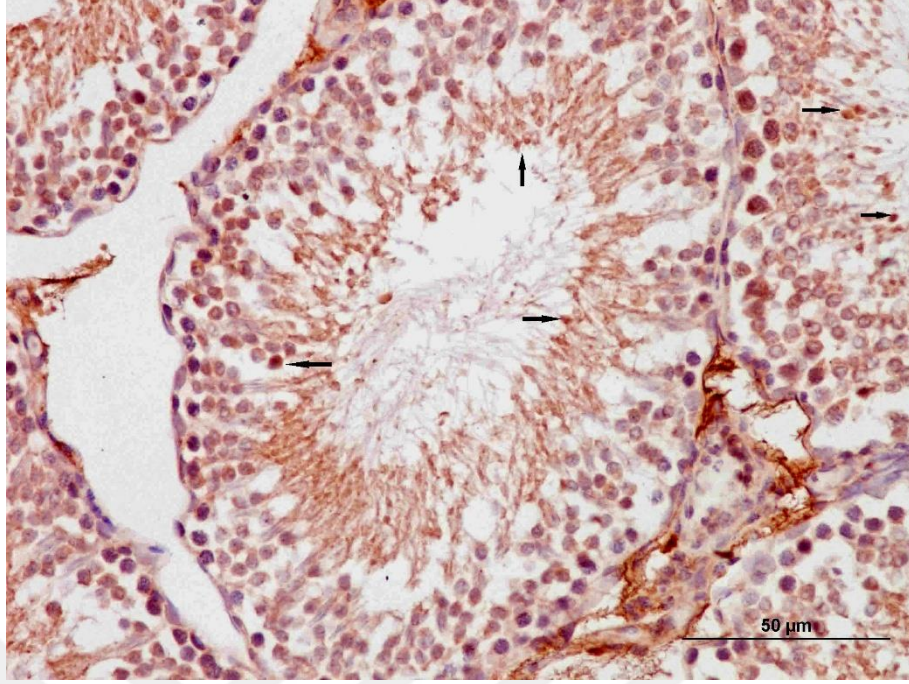
Tablo 4.8. Kir6.2 ile pozitif boyanan hücre sayıları

Grup	Sham ($\pm$ SD)	K+DMSO ($\pm$ SD)	K+KAR ($\pm$ SD)	İR ($\pm$ SD)	İR+DMSO ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
Kir6.2	84,83 $\pm$ 5,77	85,16 $\pm$ 2,31	83,33 $\pm$ 2,16	131,33 $\pm$ 2,73	139,33 $\pm$ 1,75	149 $\pm$ 7,45

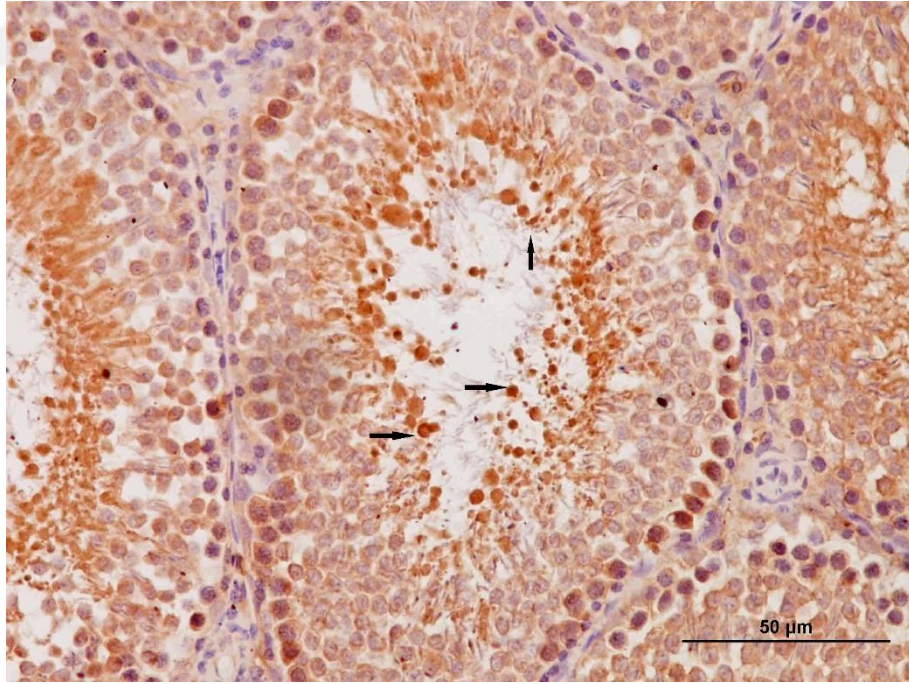


Şekil4.35. Tüm grupların Kir6.2 pozitif hücre sayımı değerleri

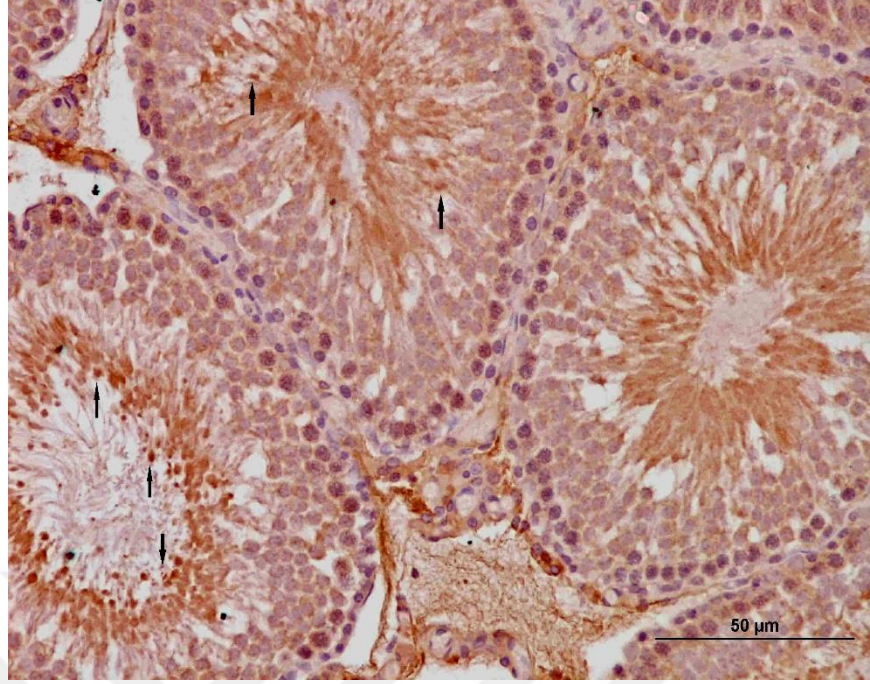
Kir6.2 pozitif boyanan hücre sayımı değerlerine göre Sham ile İR grubu arasında anlamlı bir fark vardı ($p<0.001$) İR grubunda boyanan hücrelerin anlamlı artışı, iskemi reperfüzyon hasarı sırasında Kir6.2 ATP bağımlı potasyum kanalının açıldığını göstermiştir. İR ile Tedavi grubu arasında da anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0.001$). Tedavi grubunda Kir6.2 pozitif boyanan hücrelerin İR grubuna kıyasla daha çok açılması, karvakrolün iskemi reperfüzyon hasarı sırasında bu kanalları açarak hasarı engelleyebildiğini göstermiştir.



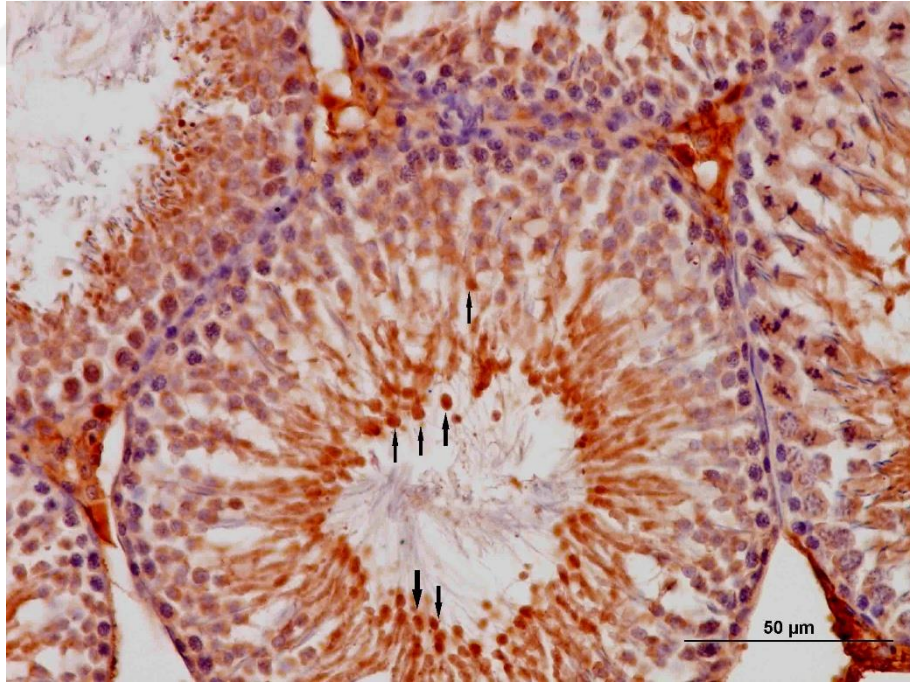
Şekil 4.36. Sham grubuna ait testis dokusu. Pozitif boyanan hücreler (ok ucu) Kir6.2 İmmün işaretleme, 20x



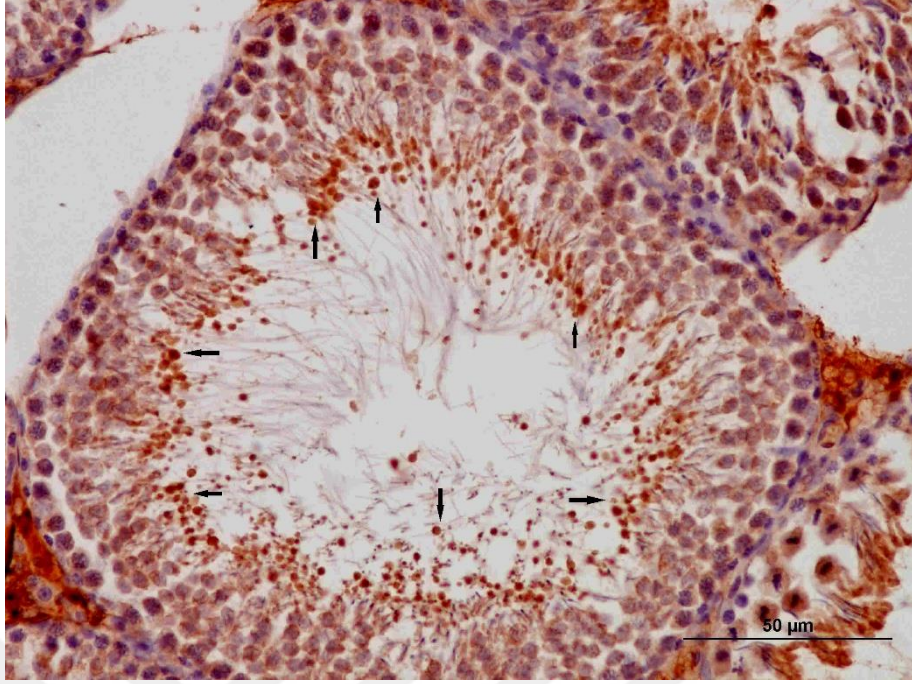
Şekil 4.37. K+DMSO grubuna ait testis dokusu. Pozitif boyanan hücreler (ok ucu) Kir6.2 İmmün işaretleme, 20x



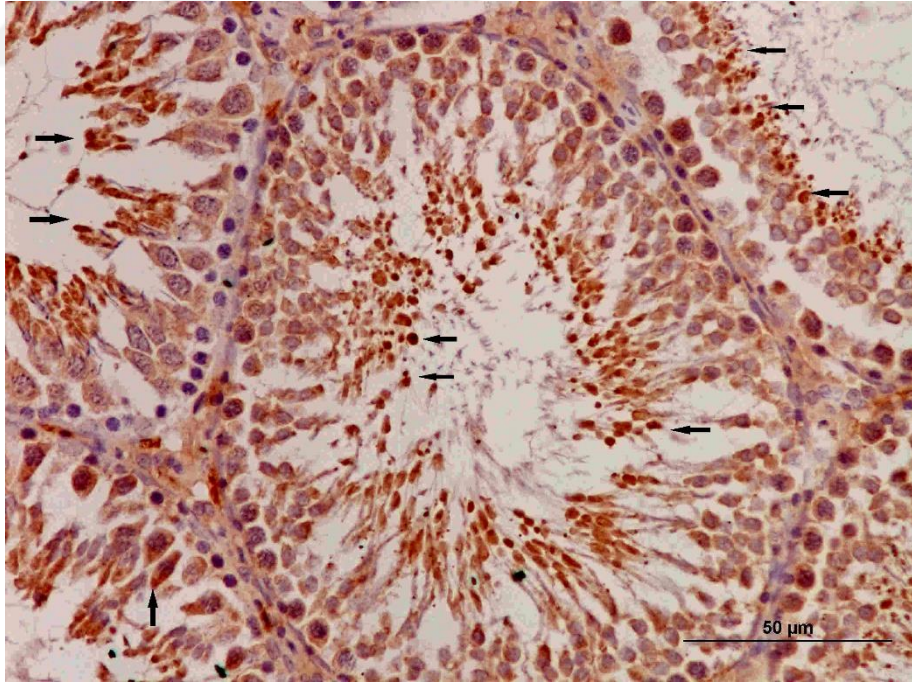
Şekil 4.38. K+Karvakrol grubuna ait testis dokusu. Pozitif boyanan hücreler (ok ucu) Kir6.2 İmmün işaretleme, 20x



Şekil 4.39. İR grubuna ait testis dokusu. Pozitif boyanan hücreler (ok ucu) Kir6.2 immün işaretleme, 20x



Şekil 4.40. İR+DMSO grubuna ait testis dokusu. Pozitif boyanan hücreler (ok ucu) Kir6.2 immün işaretleme, 20x



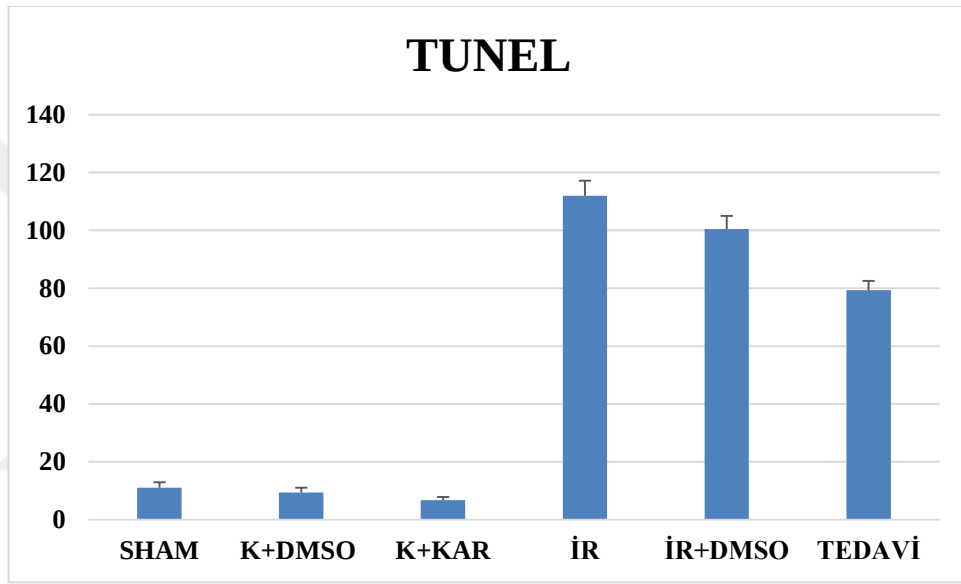
Şekil 4.41. Tedavi grubuna ait testis dokusu. Pozitif boyanan hücreler (ok ucu) Kir6.2 işaretleme, 20x

4.4.3. TUNEL immün işaretleme

Testis dokularında apoptotik hücreleri belirlemek için TUNEL uygulaması yapılmıştır. Kahverengi boyanan hücreler pozitif sayılmıştır. Elde edilen değerler aşağıdaki Tablo 4.9 ve Şekil4.42’de gösterilmiştir.

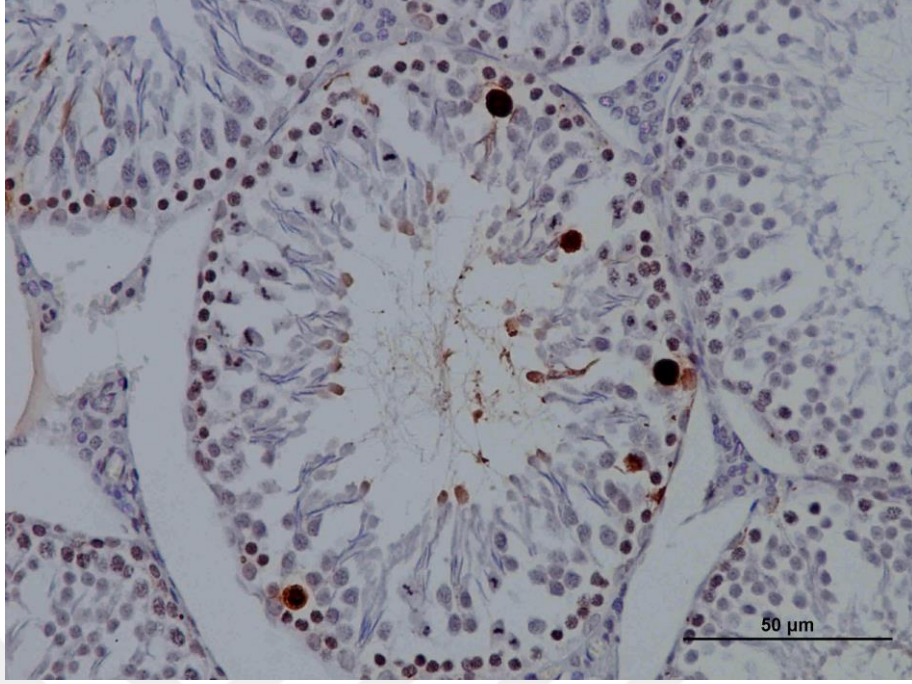
Tablo 4.9. TUNEL ile boyanan hücre sayıları

Grup	Sham ($\pm$ SD)	K+DMSO ($\pm$ SD)	K+KAR ($\pm$ SD)	İR ($\pm$ SD)	İR+DMSO ($\pm$ SD)	Tedavi ($\pm$ SD)
TUNEL	11 $\pm$ 1,89	9,33 $\pm$ 1,75	6,66 $\pm$ 1,21	112 $\pm$ 5,21	100,5 $\pm$ 4,50	79,33 $\pm$ 3,20

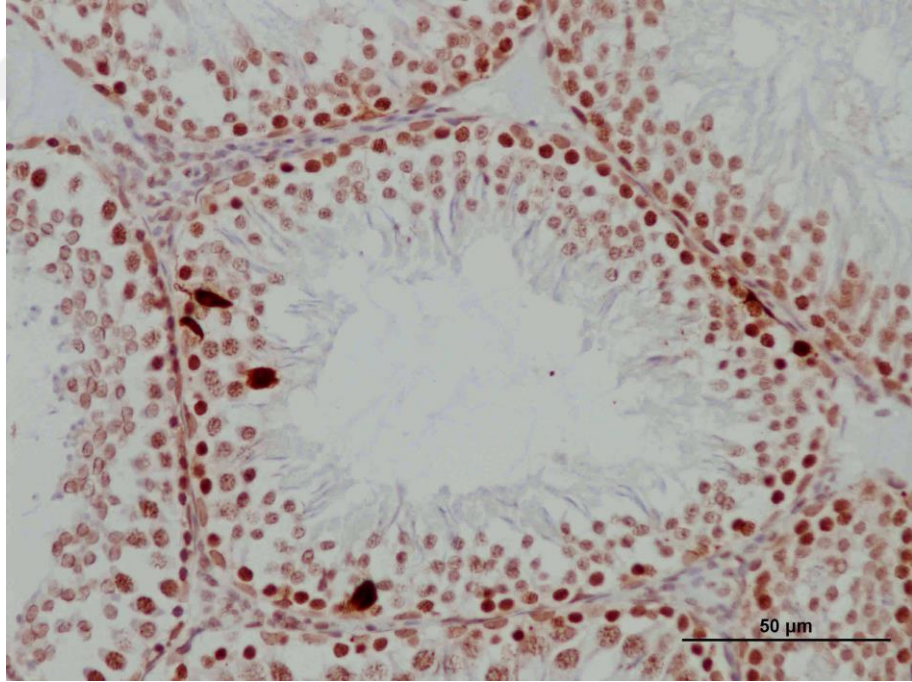


Şekil4.42. Tüm Grupların TUNEL pozitif hücre sayımı değerleri

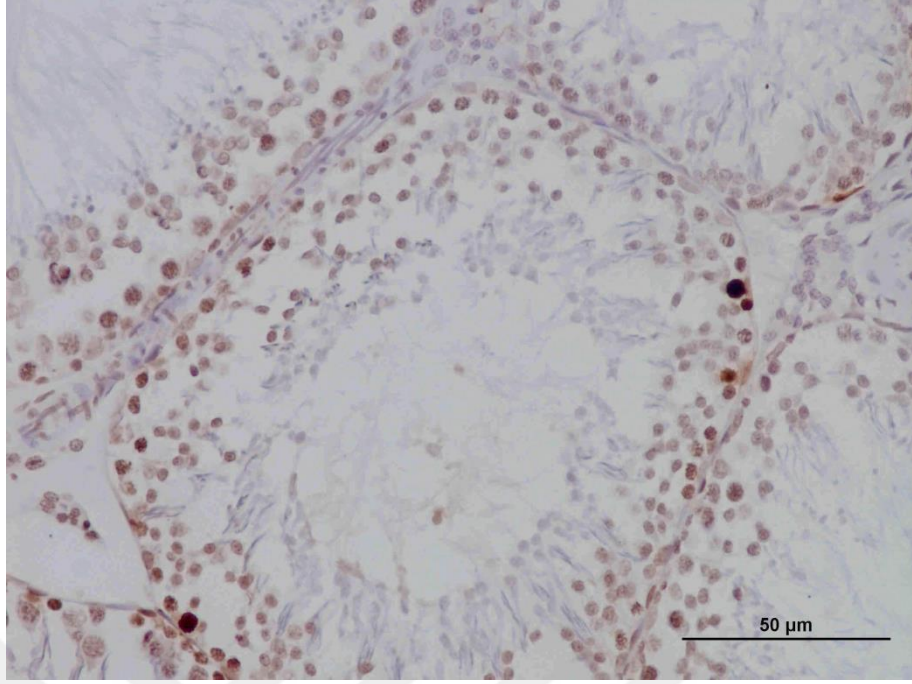
TUNEL ile pozitif boyanan apoptotik hücre sayımı değerlerine göre Sham ile İR grubunda anlamlı bir fark vardı ($p=0.001$) İR grubunda apoptotik hücre sayımındaki anlamlı artış, iskemi reperfüzyon hasarının apoptozu indüklediğini göstermiştir. İR grubu ile Tedavi grubu arasında da anlamlı bir fark vardı ($p=0.001$). Tedavi grubundaki apoptotik hücre sayısının anlamlı azalışı, karvakrolün iskemi reperfüzyon hasarı sırasında apoptozu engelleyebildiğini göstermiştir.



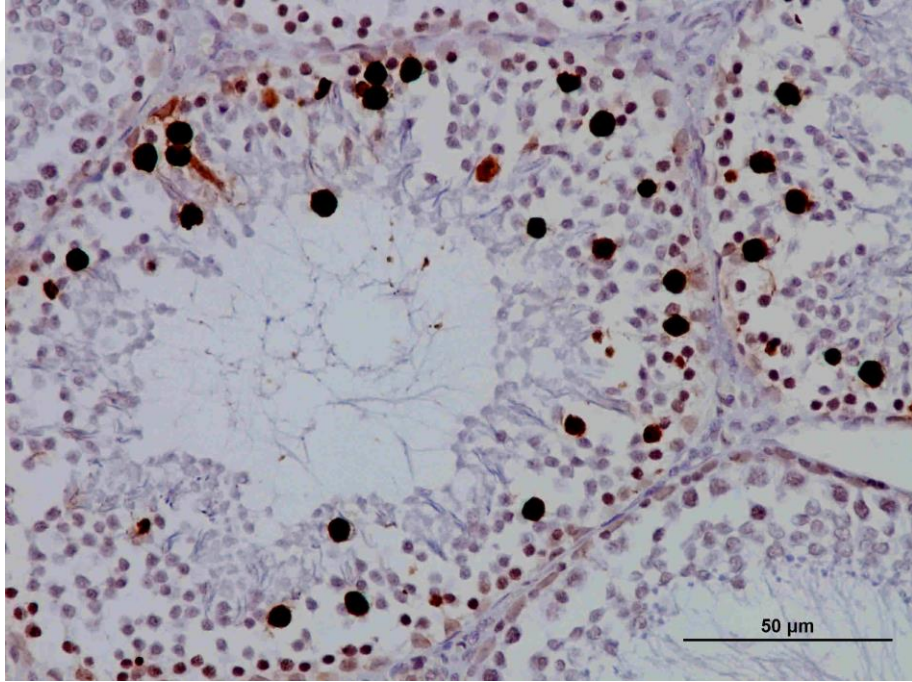
Şekil 4.43. Sham grubuna ait testis dokusu. TUNEL boyaması, 20x



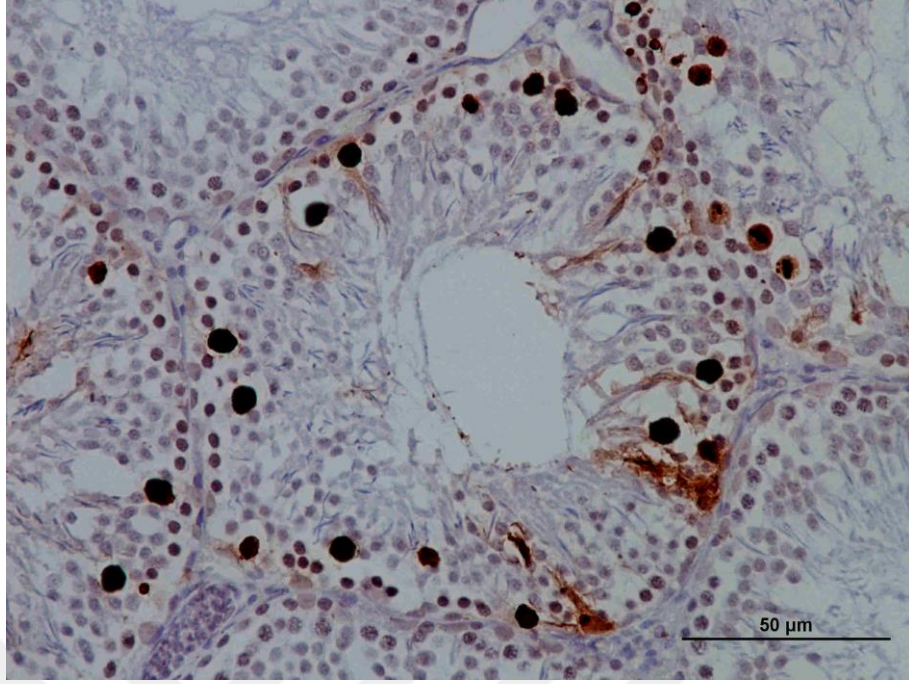
Şekil 4.44. K+DMSO grubuna ait testis dokusu. TUNEL boyaması, 20x



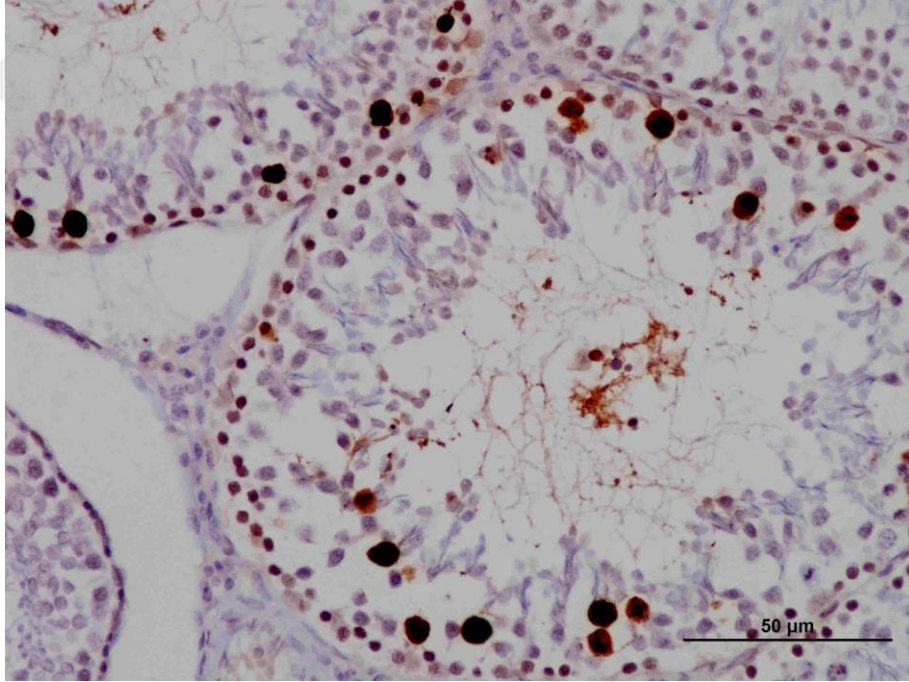
Şekil 4.45. K+Karvakrol grubuna ait testis dokusu. TUNEL boyaması, 20x



Şekil 4.46. İR grubuna ait testis dokusu. TUNEL boyaması, 20x



Şekil 4.47. İR+DMSO grubuna ait testis dokusu. TUNEL boyaması, 20x



Şekil 4.48. Tedavi grubuna ait testis dokusu. TUNEL boyama, 20x

5. TARTIŞMA

Testis torsiyonu; doku hasarına ve subfertiliteye sebep olan ürolojik bir sorundur. Testisin spermatik kordon ve damarlarının etrafında dönmesiyle kan akımı durur, böylelikle doku hasarı başlar (1,2). Testiküler hasara sebep olan torsiyon boyunca oluşana iskemik hasar ve detorsiyon sonucunda başlayana ise reperfüzyon hasarı denir (47). Oluşan iskemi reperfüzyon hasarı dokuda ROS artışına, lipid peroksidasyonuna ve apoptoza sebep olur (45).

ROS, çoklu doymamış yağ asitlerine saldırarak hücre membranında lipid peroksidasyonunu başlatır (13). Lipid peroksidasyonu; testiküler fonksiyon bozukluğuna, sperm anomalilerine ve kapasitasyonun azalmasına neden olur (68,72). MDA, lipid peroksidasyonu sırasında açığa çıkmakta olup, önemli bir belirteçdir (70,71).

Oksidatif strese sebep olan ROS, mitokondriyal membranları bozarak sitokrom-c salınımını hızlandırır. Sitokrom-c'nin serbest kalması ile kaspaz aktivasyonu başlar ve bunun sonucunda apoptoz meydana gelir (97).

KATP kanalları ilk olarak kardiyomiyositlerde keşfedilmiştir (116,117). Bu kanalların açılması hücrenin metabolik durumu ve ATP seviyesi ile ilişkilidir (118). KATP alt biriminden olan Kir6.2 spermatogonyum, spermatosit ve geç evre spermlerde bulunmaktadır (16). ATP'ye bağımlı potasyum kanallarının açılması dokuyu iskemi reperfüzyon hasarına karşı korur (14).

Karvakrol çeşitli aromatik bitkilerin uçucu yağlarında bulunan monoterpenoid bir bileşiktir (122). Antioksidan, antiseptik, anti bakteriyel anti fungal gibi çeşitli koruyucu biyoaktiviteleri vardır (124-127). Karvakrol antioksidan özelliği ile lipid peroksidasyonunu azaltır (128).

Yapılan kaynak araştırmalarında testis iskemi reperfüzyon modeli üzerinde karvakrol uygulamasının etkisi ile ilgili çalışmalar bulunamamıştır. Ancak karvakrolün başka modellerde koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Romeo ve arkadaşları (80) ratlarda oluşturdukları testis iskemi reperfüzyon hasarında torsiyon yapılan sol testiste, intertübüler alanlarda dilatasyon, ödem ve hemoraji olduğunu belirtmişlerdir. Dağlar ve arkadaşları (133) torsiyon yapılan testis dokusunda düzensizlik, germinal epitel tabakalarında incelleme, germ hücrelerinde dejenerasyon ve tübüllerde spermatogenezin olmadığını gözlemlemişlerdir. Aydın ve arkadaşları (134), torsiyone olan testis dokularında seminifer tübüller ve intertübüler alanlarda hasarlanma olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmalar ile aynı sonuçlar elde edilmiş olup, testis iskemi reperfüzyon hasarının intertübüler alanlarda konjesyon, kalınlaşma, ödem, seminifer tübül yapılarında

bozukluk, germinal epitellerde düzensizlik ve lümenlerinde hücre döküntülerine sebep olduğu görülmüştür. Bu çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda spermatogonyal hücreler arasında vakuol yapıları gözlenmiştir.

Johnsen skorlaması, seminifer tübüllerin morfolojik hasarını değerlendirmek için kullanılmıştır (5). Özcan ve arkadaşları (135) çalışmalarında, testis torsiyon grubunda seminifer tübül Johnsen skorlamasında (5.38 ± 1.86) anlamlı bir düşüş saptamışlardır ($p \leq 0.05$). Azizollahi ve arkadaşları (136) yaptıkları çalışmada, testis iskemi reperfüzyon hasarı grubunda kontrol grubuna kıyasla Johnsen skorlamasında (2.90 ± 0.37) anlamlı bir düşüş olduğunu göstermişlerdir. ($p \leq 0.05$). Mete ve arkadaşları (137) testis torsiyonu grubunda Johnsen skorunun düşük olduğunu (1.2 ± 0.4) belirtmişlerdir. Kemahlı ve arkadaşları (138), testis iskemi reperfüzyon grubunun Johnsen skorlamasında kontrol grubuna göre anlamlı düşüş gösterdiğini çalışmalarında rapor etmişlerdir ($p = 0.001$). Testis torsiyonunun testis dokusunda oluşturduğu hasarı anlamak için seminifer tübül çaplarını ölçen Taati ve arkadaşları (139) torsiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla germinal epitel kalınlığı ve tübül çaplarının azaldığını göstermişlerdir ($p \leq 0.05$). Andıran ve arkadaşları (140) çalışmalarında testis torsiyonunun seminifer tübül çaplarını azalttığını rapor etmişlerdir. Dokucu ve arkadaşları (141), torsiyon grubunun seminifer tübül çap ortalamalarının ($245 \mu\text{m}$) kontrol grubuna göre ($303 \mu\text{m}$) azaldığını rapor etmişlerdir. Kemahlı ve arkadaşları da (138) testis iskemi reperfüzyon hasarının seminifer tübül çapında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gösterdiğini bildirmişlerdir ($p = 0.002$). Bizim çalışmamızda ise Johnsen skorlama ve seminifer tübül çapları değerlerine bakıldığında önceki çalışmalarda olduğu gibi Johnsen skorlamasında, İR grubunda Sham grubuna kıyasla anlamlı bir azalma görülmüştür ($p = 0.001$). Tedavi grubunda ise İR grubuna göre Johnsen skorunda anlamlı bir artış ($p = 0.001$) tespit edilerek karvakrolün İR hasarına karşı spermatogenik hücreleri ve seminifer tübül yapısını koruduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda İR grubunda Kontrol+Karvakrol grubuna göre tübül çapı değerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p = 0.011$). Fakat Tedavi grubu ve İR grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p = 0.443$).

Taati ve arkadaşları (142) yaptıkları çalışmada 1 saat torsiyonu takiben 30 gün reperfüzyon yapılan İR grubunda toplam sperm motilitesinin (8.8 ± 5.05) ve sperm konsantrasyonunun ($28.5 \pm 2.1 \times 10^6$) kontrol grubunun toplam sperm motilitesi (66.5 ± 1.93) ve sperm konsantrasyonuna ($28.5 \pm 2.1 \times 10^6$) göre azaldığını tespit etmişlerdir. Azizollahi ve arkadaşları (136) çalışmalarında testis torsiyonu grubunda reperfüzyondan iki hafta sonra sperm motilite (1.00 ± 2.24) ve sperm konsantrasyonunda ($0.10 \pm 0.00 \times 10^6$) kontrol grubu motilite (52.80 ± 2.77) ve konsantrasyonuna ($5.72 \pm 0.48 \times 10^6$) göre anlamlı bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Hekimoğlu ve arkadaşları (143) testis İR grubunda toplam sperm hareketliliğinin (23.9 ± 4.23) ve konsantrasyonunun ($41.0 \pm 6.72 \times 10^6$) Sham grubuna (66.0 ± 1.15 , $65.2 \pm 1.19 \times 10^6$) göre azaldığını göstermişlerdir. Yine Hekimoğlu ve arkadaşlarının (144) yaptıkları başka bir çalışmada da testis torsiyonu

yapılan İR grubunun Sham grubuna göre sperm motilitesi ve konsantrasyonunun azaldığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da diğer çalışmalar gibi toplam sperm hareketliliği yüzdesinde İR grubunda kontrol gruplarına göre anlamlı bir azalma ($p=0.001$) olmuştur fakat sperm konsantrasyonunda gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.121$). Karvakrol uygulaması yapılan Tedavi grubu toplam hareketli sperm yüzdesi ($\%8,00\pm3,22$) ile İR grubunun toplam hareketli sperm yüzdesi ($\%5,16\pm2,56$) arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Ghasemnejad ve arkadaşları (145) çalışmalarında testis iskemi reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonunun oluştuğunu ve MDA seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğunu rapor etmiştir ($p<0.001$). Jiang ve arkadaşları (146) yaptıkları çalışmada Sham grubuna kıyasla testis torsiyonu grubunda MDA seviyesinde anlamlı bir artış olduğunu bildirmişlerdir ($p<0.01$). Raju ve arkadaşları (147) iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan testis dokusunda MDA seviyesinin anlamlı bir artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Yu ve arkadaşları (148) akut miyokardiyal enfarktüs modelinde MDA seviyesinin Sham kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdiğini ($p<0.01$), karvakrolün ise MDA seviyesini anlamlı bir şekilde düşürdüğünü bildirmişlerdir ($p<0.01$). Samarghandian ve arkadaşları (149) yaşa bağlı oksidatif stresin karaciğerde oluşturduğu hasarda MDA seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığını ($p<0.001$), karvakrol tedavisinin ise MDA seviyelerini anlamlı bir şekilde düşürdüğünü ($p<0.001$) rapor etmişlerdir. Canbek ve arkadaşları (150) hepatik iskemi reperfüzyon modelinde karvakrol uygulamasında MDA seviyesinin (5.1 ± 0.34) tedavi edilmemiş iskemi reperfüzyon grubuna (6.80 ± 0.36) göre anlamlı bir azalma gösterdiğini bildirmişlerdir ($p<0.05$). Suo ve arkadaşlarının (151) oluşturdukları karaciğer iskemi reperfüzyon modelinde İR grubu MDA seviyesinin ($8.43\pm0.56\text{nmol/mg protein}$) Sham grubuna ($5.10\pm0.38\text{ nmol/mg protein}$) göre anlamlı bir artışı olduğunu, karvakrol uygulaması yapılan İR grubunun MDA seviyesinde ($6.21\pm0.45\text{nmol/mg protein}$) ise İR grubuna göre anlamlı bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Cetik ve arkadaşları (152) oluşturdukları kardiyotoksisite modelinde MDA seviyesinin karvakrol uygulamasından sonra anlamlı bir azalma olduğunu bildirmişlerdir Bizim çalışmamızda da benzer bulgulara rastlayıp, testis iskemi reperfüzyon hasarının lipid peroksidasyonuna sebep olduğu ve Karvakrol tedavisinin iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyup lipid peroksidasyonunu engellediği ve MDA seviyesini düşürdüğü anlaşılmıştır. Çalışmamızda MDA seviyesinde İR grubunda ($269,81\pm86,87$) Sham grubuna ($125,38\pm30,69$) göre anlamlı bir artış olduğu ($p=0.001$) saptanmıştır. Karvakrol ile tedavi edilen grubun MDA seviyesinde ($122,53\pm69,09$) ise İR grubuna göre anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür ($p=0.001$). Çalışmamızda çözücü olarak kullandığımız DMSO'nun MDA seviyesini düşürdüğü görülmüştür İR+DMSO grubunun MDA seviyesinde ($130,41\pm42,43$) İR grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş saptanmıştır ($p=0.002$). Şahin ve arkadaşları (153) karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında DMSO'nun MDA seviyesini (8.11 ± 2.52) tedavi edilmemiş İR grubuna göre (14.41 ± 2.47) düşürdüğünü

belirtmişlerdir. Tamjidipoor ve arkadaşları (154) overoktomi sonrası MDA seviyesi artışının (1.251 ± 0.30) DMSO uygulamasından sonra (0.720 ± 0.038) anlamlı bir şekilde düştüğünü rapor etmişlerdir. Li ve arkadaşları (155) ise intestinal inflamasyon modelinde zymosol enjeksiyonunun MDA seviyesini arttırdığını DMSO'nun ise MDA artışını baskıladığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmalar bizim çalışmamızdaki bulguları desteklemekte olup, karvakrol ve DMSO'nun lipid peroksidasyonunu engellediği anlaşılmıştır. Çalışmamızda Tedavi ve İR+DMSO grupları arasında anlamlı fark bulunmamakla birlikte tedavi grubu MDA seviyesinde minimal bir azalma görülmesi karvakrolün ek olarak düşürücü etkisine bağlanmıştır. Gruptaki bir hayvana ait yüksek MDA değeri ortalama etkilemiş ve ortalama değeri negatif etkilediği düşünülmektedir.

Zhang ve arkadaşları (156) testis dokusunda 1 saat iskemi ve 3 gün reperfüzyon sonucunda serum testosteron seviyesinin anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Gholami ve arkadaşları (157) oluşturdukları testis iskemi reperfüzyon modelinde reperfüzyondan 50 gün sonra İR grubu testosteron seviyesinde anlamlı bir düşüş, Tedavi grubunda ise İR grubuna kıyasla anlamlı bir artış olduğunu rapor etmişlerdir. Tsounapi ve arkadaşları (158) testis detorsiyonundan 2 gün sonra serum testosteron seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığını belirtmişlerdir. Ghasemnezhad ve arkadaşlarının (159) yaptığı çalışmada testis iskemi reperfüzyon hasarı modelinde 2 saat iskemi ve 1 saat reperfüzyon yapılmış olup kontrol, İR ve Tedavi grubu arasında anlamlı bir sonuç bulunmadığını rapor etmişlerdir. Araghi ve arkadaşları (160) ketamin ile testis hasarı oluşturulmuş ratlarda 2 hafta boyunca karvakrol 50mg/kg uygulaması yapılan Tedavi grubunda serum testosteron seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığını bildirmişlerdir ($p < 0.05$). Bizim çalışmamızda ise testosteron değerlerine göre sadece Kontrol+Karvakrol grubu ile İR ve İR+DMSO arasında anlamlı bir fark vardı ($p = 0.025$) ve ($p = 0.037$). 2 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon sonucunda İR ve karvakrol ile Tedavi grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p = 0.337$). İR gruplarındaki testosteron seviyelerindeki azalma, iskemi reperfüzyon hasarının testosteron seviyesini düşürdüğünü göstermiştir.

Maghrebi ve Renno (161), testis iskemi reperfüzyon hasarı grubunda TUNEL ile pozitif boyanan hücre sayısı (70.0 ± 5.0) ile Kaspaz-3 aktivasyonunun (17.75 ± 0.65) Sham grubuna kıyasla (3.0 ± 1.0 , 9.93 ± 0.47) anlamlı bir şekilde artış gösterdiğini bildirmişlerdir ($p < 0.0001$). Ayan ve arkadaşları (162) TUNEL pozitif hücrelerin testis torsiyonu grubunda ($18.5 \pm 0.9\%$) kontrol grubuna (1.5 ± 0.5) kıyasla arttığını, İR hasarının Kaspaz-3 aktivasyonunu anlamlı bir şekilde arttırdığını belirtmiştir ($p < 0.05$). Al-Ajmi ve arkadaşları (163) TUNEL ile pozitif boyanan hücrelerin Testis torsiyonu grubunda Sham grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde arttığını belirtmişlerdir (37 ± 5.1 vs. 8.9 ± 0.94 , $p \leq 0.05$). Li ve arkadaşları (164) oluşturdukları travmatik nöronal hasarı modelinde karvakrol tedavisinin TUNEL pozitif ve Kaspaz-3 aktivasyonunun hasar grubuna kıyasla anlamlı olarak düştüğünü

rapor etmişlerdir ($p<0.05$). Suo ve arkadaşları (151) oluşturdukları karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı modelinde karvakrol tedavisinin TUNEL pozitif hücre sayıları ve Kaspaz-3 aktivasyonunu anlamlı bir şekilde düşürdüğünü bildirmişlerdir ($p<0.05$). Potocnjak ve Domitrovic (165) cisplatin ile hasar oluşturdukları böbrek dokularında karvakrol tedavisinin TUNEL pozitif hücre sayısını anlamlı olarak düşürdüğünü rapor etmişlerdir ($p<0.05$). Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre Kaspaz-3 ve TUNEL pozitif hücre sayılarında Sham grubuna kıyasla İR grubunda anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p\leq 0.05$). Çalışmamızda karvakrol ile tedavi edilen iskemi reperfüzyon hasarı grubunda ise Kaspaz-3 ve TUNEL pozitif hücre sayılarında İR grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p\leq 0.05$). Çalışmamızda Testis iskemi reperfüzyon hasarının apoptozu başlattığı, karvakrolün ise İR hasarı sırasında apoptozu engellediği belirlenmiştir.

Teshima ve arkadaşları (166) çalışmalarında diazoxide ile açtıkları mitoKATP kanallarının apoptozu engelleyerek nöroprotektif bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Shimizu ve arkadaşları (167) ise oluşturdukları testis iskemi reperfüzyon modelinde KATP kanal açıcı cromakalim ile MDA seviyesi ve apoptozun minimal düzeyde düştüğünü fakat KATP kanal blokeri Glibenclamide ile bu değerlerin anlamlı olarak düştüğünü rapor etmişlerdir. Wojtovich ve arkadaşları (168) iskemik ön koşullanmada Kir6.2 aktivasyonunun kardiyoprotektif özelliği olduğunu rapor etmişlerdir. Tsounapi ve arkadaşları (20) testis iskemi reperfüzyon modelinde KATP kanallarını açan cromakalim uygulamasında Kir6.2 kanallarını açarak apoptozu engellediklerini ve KATP kanalı aktivasyonunun iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Zhang ve arkadaşları (169) çalışmalarında sarcKATP açıcı olan P-1075'in lipopolisakkarit ile indüklenen apoptozu azalttığını, sarcKATP bloke edici olan HMR-1098'in ise kültürlenmiş neonatal rat kardiyomiyosit hücrelerinde lipopolisakkarit ile indüklenen apoptozu arttırdığını bildirmişlerdir. Oliveira ve arkadaşları (170) deneysel gastrik lezyon modelinde karvakrolün endojen prostaglandinlerin salınımına aracılık ettiğine, mukus üretiminin artmasına, KATP kanallarının açılmasına, NO sentaz aktivasyonuna yol açarak gastroprotektif bir rolü olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise Kir6.2 pozitif boyanan hücre sayısında İR grubunda anlamlı bir artış olduğu ($p\leq 0.05$), karvakrol ile Tedavi grubunda ise İR grubuna kıyasla Kir6.2 ile işaretlenmiş hücre sayısında anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Yaptığımız immünohistokimyasal boyama sonucu elde edilen bulgular Tsounapi ve arkadaşları ve Oliveira ve arkadaşlarının bulgularını destekler niteliktedir. Kir6.2 KATP kanalının İR hasarında açıldığı ve karvakrol uygulamasının, bu kanalların açılmasını daha fazla aktive ederek iskemi reperfüzyon hasarından korunmada yardımcı olduğu tahmin edilmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Testis iskemi reperfüzyon hasarında karvakrolün antioksidan rolü ile MDA seviyesini anlamlı bir şekilde azaltıp oksidatif stresi engellediği görülmüştür.
2. Tedavi grubunda serum testosteron değerlerinde minimal bir artış gözlemlenmiştir fakat istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Karvakrolün testosteron seviyesi üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için hormon seviyesi dokuda veya uzun süreli tedavi sonunda bakılmalıdır.
3. Testis iskemi reperfüzyon hasarında Kaspaz-3 aktivasyonunda anlamlı bir artış, Tedavi grubunda ise anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu durumda karvakrolün iskemi reperfüzyon hasarında anti-apoptotik etkisi anlaşılmıştır.
4. İR grubunda TUNEL işaretleme yapılan apoptotik hücre sayısında anlamlı bir artış, Tedavi grubunda ise anlamlı bir azalma görülmüştür. Karvakrolün germ hücre apoptozuna karşı koruyucu özelliği bulunduğu anlaşılmıştır.
5. Toplam hareketli sperm yüzdesinde İR grubunda anlamlı bir azalma görülmüştür. İR grubu ve Tedavi grubu arasında anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir fakat Tedavi grubundaki hareketli sperm oranında %3'e yakın bir artışa yol açması, yardımcı üreme teknikleri açısından önemli bir değere sahiptir. Sperm konsantrasyonunda gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır. Sperm konsantrasyonu ve motiliteye etkisinin anlaşılabilmesi için karvakrol tedavisinin ve reperfüzyon süresinin uzatılması ile pozitif etkilerin görülebileceği düşünülmektedir.
6. İR grubunda Kir6.2 aktivasyonunda anlamlı bir artış saptanmıştır. Tedavi grubunda ise Kir6.2 aktivasyonunda İR grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bunun sonucunda karvakrolün KATP kanal açıcı etkisi olduğu görülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. **Saba M, Morales C, De Lamirande E, Gagnon C.** Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *J Urol*, **1997**; 157: 1149.
2. **Murphy J, Ziegler M, Azizkhan R, Weber T.** Operative pediatric surgery. McGraw-Hill Companies, **2003**; 563-568.
3. **Rowe M, O'Neill J, Grosfeld J, Fonkalsrud E, Coran A.** Essentials of pediatric surgery. St. Louis: Mosby-Year Book Inc **1995**; 457- 9.
4. **Cadenas E, Ahmad S.** Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification and oxidative stress and antioxidant defences in biology. *New York: Chapman and Hall*, **1995**; 4- 47.
5. **Filho D, Moacir A. Torres, Andre L. Bordin A, Tania B. Crezcynski-Pasa T, Boveris A.** Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia reperfusion injury. *Molecular Aspects of Medicine*, **2004**; 25: 199– 210.
6. **Unsal A, Devrim E, Guven C, Eroglu M, Durak I, Bozoklu A, Balbay MD.** Propofol attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion. *World J Urol*, **2004**; 22: 461- 465.
7. **Prillaman H, Turner T.** Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J Urol*, **1997**; 157: 340- 5.
8. **Sade M, Esen, A, Çelebi, Mungan U Göğüş O, Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N.** Ürogenital sistemin acil yaklaşım gerektiren hastalıkları ve temel üroloji. Güneş Kitabevi, **1998**; 963.
9. **Turner T.** Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *J Androl*, **1995**; 16: 342- 51.
10. **Cvetkovic T, Stankovic J, Najman S, Pavlovic D, Stokanovic D, Vljakovic S, Dakovic-Bjelakovic M, Cukuranovic J, Zivkovic V, Stefanovic V.** Oxidant and antioxidant status in experimental rat testis after testicular torsion/detorsion. *Int J Fertil Steril*, **2015**; 9(1): 121- 128.
11. **Mogilner JG, Lurie M, Coran AG, Nativ O, Shiloni E, Sukhotnik I.** Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. *Pediatr Surg Int*, **2006**; 22: 99- 105.
12. **Slater T.** Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*, **1984**; 222: 1- 15.
13. **Agarwal A, Makker K, Sharma R.** Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An update. **2008**; 59: 2– 11.
14. **Zhuo M, Huang Y, Liu D, Liang C.** KATP channel: relation with cell metabolism and role in the cardiovascular system. *Int J Biochem Cell Biol*, **2005**; 37: 751– 64.
15. **Ardehali H, O'Rourke B.** Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *J Mol Cell Cardiol*, **2005**; 309: 7- 16.
16. **Zhou M, He HJ, Tanaka O, Sekiguchi M, Kawahara K, Abe H.** Different localization of ATP sensitive K⁺ channel subunits in rat testis. *Anat Rec. (Hoboken)*, **2011**; 294: 729– 37.
17. **Gong X, Li J, Leung G, Cheung K, Wong P.** A BK(Ca) to K(v) switch during spermatogenesis in the rat seminiferous tubules. *Biol Reprod*, **2002**; 67: 46– 54.

18. **Baser K.** Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Des*, **2008**; 14: 3106- 3119.
19. **Turner T, Tung K, Tomomasa H, Wilson L.** Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis in the rat. *Biol Reprod*, **1997**; 57: 1267– 74.
20. **Tsounapi P, Saito M, Dimitriadis F, Kitatani K, Kinoshita Y, Shomori K, Takenaka A, Satoh K.** The role of KATP channels on ischemia-reperfusion injury in the rat testis. *Life Sciences*, **2012**; 649- 656.
21. **Lysiak J, Turner S, Nguyen Q, Singbartl K, Ley K, Turner T.** Essential role of neutrophils in germ cell-specific apoptosis following ischemia/reperfusion injury of the mouse testis. *Biol Reprod*, **2001**; 65: 718– 25.
22. **Sökmen M, Serkedjieva J, Daferera D, Gulluce M, Polissiou M, Tepe B, Akpulat H, Sahin F, Sokmen A.** In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *J Agric Food Chem*, **2004**; 52: 3309- 3312.
23. **Tishler P.** Diameter of testicles. *N Engl J Med*, **1971**; 285: 1489
24. **Prader A.** Testicular size: assessment and clinical importance. *Triangle*, **1966**; 7: 240– 3
25. **Goede J, van der Voort-Doedens L, Sijstermans K et al.** The volume of retractile testes. *J Urol*, **2011**; 186: 2050– 4.
26. **Standring S.** **Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice.** Forty-first ed. Elseiver, **2016**
27. **Waschke J, Paulsen F.** **Sobotta Atlas of Human Anatomy**, 15th ed, Elsevier, Urban and Fischer. **2013**
28. **Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG.** **The developing human : clinically oriented embryology**, 10th ed, Elsevier, **2016**
29. **Sadler TW.** **Langman Medikal Embriyoloji.** 11. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, **2005**
30. **Ross MH and Pawlina W.** **Histology: A text and atlas: with correlated cell and molecular biology.** 7th edition Baltimore, Wolters Kluwer Health, **2016**
31. **Kierszenbaum AL and Tres LL.** **Histology and Cell Biology: An Itroduction to Pathology.** 6th edition. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, **2012**
32. **Mescher A.** **Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitap.** Nobel Tıp Kitapevleri, **2015**
33. **Gartner L, Hiatt J.** **Color Textbook of Histology.** 2nd ed. Philadelphia, Saunders, **2001**
34. **Gartner L, Hiatt J.** **BRS Hücre Biyolojisi ve Histolojisi.** 7. Baskı. Wolters Kluwer, **2016**
35. **Clermont Y.** The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*, **1963**; 112:35.
36. **Dudek RW.** **BRS Embriyoloji.** 6. Baskı, Wolters Kluwer, **2016**
37. **Fawcett D.** **Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology**, 10th ed. New York, Chapman and Hall, **1975**
38. **Henrikson R, Kaye G, Mazurkiewicz J.** **Histology National Medical Series for Independent Study.** Baltimore, Williams & Wilkins, **1997**: p 399.

39. **Ringdahl E, Teague L.** Testicular torsion. *Am Fam Physician* **2006**; 74: 1739- 1743.
40. **Mansbach J, Forbes P, Peters C.** Testicular torsion and risk factors for orchiectomy. *Arch Pediatr Adolesc Med*, **2005**; 159(12): 1167– 1171.
41. **Tamamura M, Saito M, Kinoshita Y, Shimizu S, Satoh I, Shomori K, Dimitriadi F, Satoh K.** Protective effect of edaravone, a free-radical scavenger, on ischaemia-reperfusion injury in the rat testis. *BJU Int*, **2010**; **105**: 870- 876
42. **Werns S, Lucchesi B.** Free radicals and ischemic tissue injury. *Trends Pharmacol Sci*, 1990; 11: 161- 166
43. **Elshaari F, Elfagih R, Sheriff D, Barassi I.** Oxidative and antioxidative defense system in testicular torsion/detorsion. *Indian J Urol*, **2011**; 27: 479484
44. **Unsal A, Eroglu M, Avci A, Cimentepe E, Guven C, Derya Balbay M, Durak I.** Protective role of natural antioxidant supplementation on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *Scand J Urol Nephrol* **2006**; 40: 17- 22
45. **Cuzzocrea S, Riley D, Caputi A, Salvemini D.** Antioxidant Therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol*, **2001**; 53: 135
46. **Akbas H, Ozden M, Kanko M, Maral H, Bulbul S, Yavuz S, et al.** Protective antioxidant effects of carvedilol in a rat model of ischaemia-reperfusion injury. *J Int Med Res*, **2005**; 33: 528- 36
47. **Celik E, Oguzturk H, Sahin N, Turtay M, Oguz F, Ciftci O.** Protective effects of hesperidin in experimental testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Med Sci*, **2016**; 12: 928- 934
48. **Cay A, Alver A, Küçük M, Işık O, Eminağaoğlu M, Karahan S, et al.** The effects of N-acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *J Surg Res*, **2006**; 131: 199- 203
49. **Sanada S, Komuro J, Kitakaze M.** Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning and translational aspects of protective measures. *AM J physiol Heart Circ Physiol*, **2011**; 301 H1723- H174
50. **Baines C.** The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* **2009**; 104:b181- 188
51. **Baines C.** The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol* **2009**; 46: 850- 857
52. **Kalogeris T, Baines C, Krenz M, Korthuis R.** Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*, **2012**; 298: 229- 317
53. **Croall D, Ersfeld K.** The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biol* **2007**; 8: 218
54. **Kvietys P, Granger D.** Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med*, **2012**; 52: 556- 592
55. **Raedschelders K, Ansley D, Chen D.** The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*, **2012**; 133: 230- 255

56. **Granger D.** Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*, **1999**; 6: 167-178
57. **Karaguzel E, Kadihasanoglu M, Kutlu O.** Mechanisms of testicular torsion and potential protective agents. *Review Rev. Urol*, advance online publication, **2014**.
58. Bast A, Haenen G, Goelmen J. Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am J Med*, **1991**; 91(3 Suppl 3): 2- 13
59. **Halliwell B, Gutteridge J.** The Importance of Free Radicals and Catalytic Metal Ions In Human Diseases. *Mol. Aspects Med*, **1985**; 8(2): 89- 193.
60. **Nawar W.** Lipids. In "Food Chemistry". 3rd ed. Fennema O. Ed. New York: Marcel Dekker, **1996**: 225- 319
61. **Halliwell B, Gutteridge J.** Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. New York: Oxford University Press. **1999**; 10- 121.
62. **Valko M, Leibfritz D, Moncola J, ve ark.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, **2007**; 39: 44-84
63. **Agarwal A, Probakaran S.** Mechanism measurement and predention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol*, **2005**; 43: 963- 974
64. **Cross C, Halliwell B, Borish E, Pryor W, Ames B, Saul R, McCord J, Harman D.** Oxygen radicals and human disease. *Ann. Int. Med*, **1987**; 107: 526– 545
65. **Mak I, Freedman A, Dickens B, Weglicki W.** Protectiive effects of sulfhydryl-containing angiotensin converting enzyme inhibitors against free radical injury in endothelial cells. *Biochem Pharmacol*, **1990**; 40: 2169- 2175
66. **Serafini M, D Del Rio.** Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: Is the Total Antioxidant Capacity the right tool? *Redox Report*, **2004**; 9(3): 145- 52- 41
67. **Granger D, Karthuis R.** Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol*, **1995**; 57: 311- 332
68. **Asadi N, Basmani M, Kheradmand A, Rafieian-Kopaei M.** The impact of oxidative stress on testicular function and th role of antioxidants in improving it: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **2017**; 11(5): IE 01- IE 05
69. **Yin H, Parter N.** News insides regarding the autooxidation of polyunsaturated fatty acids. *Antioxid Redox Signal*, **2005**; 7(1-2): 170-84
70. **Aikken J, Krawz Z, Backingham D.** Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod. Dev*, **1994**; 39: 268- 279
71. **Aitken R, Clarkson J, Fishel S.** Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod*, **1989**; 41: 183- 197
72. **Peltona V, Manthla E, Huntaniemi I, Ahutopa M.** Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the rat testis after cigarette smoke inhalation or administration of polychlorinated biphenyls or polychlorinated naphthalenes. *J Androl*, **1994**; 15: 353- 61

73. **Halliwell B.** Biochemistry of oxidative stress. *BiochemSoc Trans*, **2007**; 35: 1147–1150
74. **Khlebnikov A, Schepetkin I, Domina N, Kirpotina L, Quinn M.** Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg. Med. Chem*, **2007**; 15: 1749– 1770
75. **Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K.** Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*, **2014**; 2014: 761264
76. **Turner T, Lysiak J.** Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl*, **2008**; 29: 488- 498
77. **Kim Y, Kim G, Shin J, Kim K, Lim J.** Effect of korean red ginseng on testicular tissue injury after torsion and detorsion. *Korean J Urol*, **2010**; 51: 794- 799
78. **Aktoz T, Kanter M, Aktas C.** Protective effects of quercetin on testicular torsion/detorsion-induced ischaemia-reperfusion injury in rats. *Andrologia*, **2010**; 42: 376- 383
79. **Azizollahi S, Babaei H, Derakhshanfar A, Oloumi M.** Effects of co-administration of dopamine and vitamin C on ischaemiareperfusion injury after experimental testicular torsion-detorsion in rats. *Andrologia*, **2011**; 43: 100- 105
80. **Romeo C, Antonuccio P, Esposito M, Marini H, Impellizzeri P, Turiaco N, Altavilla D, Bitto A, Zuccarello B, Squadrito F. Raxofelast.** A hydrophilic vitamin E-like antioxidant, reduces testicular ischemia-reperfusion injury. *Urol Res*, **2004**; 32: 367- 371
81. **Ursini F, Bindoli A.** The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem Phys Lipids*, **1987**; 44: 255- 276
82. **Koksal M, Oğuz E, Baba F, Eren M, Ciftci H, Demir M, Kurcer Z, Take G, Aral F, Ocak A, Aksoy N, Ulas T.** Effects of melatonin on testis histology, oxidative stress and spermatogenesis after experimental testis ischemia-reperfusion in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **2012**; 16: 582- 588
83. **Yazihan N, Ataoglu H, Koku N, Erdemli E, Sargin A.** Protective role of erythropoietin during testicular torsion of the rats. *World J Urol*, **2007**; 25: 531- 536
84. **Yapanoglu T, Aksoy Y, Gursan N, Ozbey I, Ziypak T, Calik M.** Antiapoptotic effects of dehydroepiandrosterone on testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia*, **2008**; 40: 38- 43
85. **Minutoli L, Bitto A, Squadrito F, Irrera N, Rinaldi M, Nicotina PA, Arena S, Magno C, Marini H, Spaccapelo L, Ottani A, Giuliani D, Romeo C, Guarini S, Antonuccio P, Altavilla D.** Melanocortin 4 receptor activation protects against testicular ischemia-reperfusion injury by triggering the cholinergic antiinflammatory pathway. *Endocrinology*, **2011**; 152: 3852- 3861
86. **Yancopoulos G, Davis S, Gale N, Rudge J, Wiegand S, Holash J.** Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, **2000**; 407: 242-248

87. **Shirazi M, Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Ardeshtiri M, Afrasiabi M, Monabati A.** Comparison of the protective effects of papaverine, lidocaine and verapamil on the sperm quality of the testis after induced torsion-detorsion in rats. *Scand J Urol Nephrol*, **2010**; 44: 133- 137
88. **Zavras N, Kostakis ID, Sakellariou S, Damaskos C, Roupakas E, Tsagkari E, Spartalis E, Velaoras K, Dontas IA, Karatzas T.** Comparison of erythropoietin and sildenafil protective role against ischemia/reperfusion injury of the testis in adult rats. *Int Urol Nephrol*, **2014**; 46: 731- 736
89. **Istanbuluoglu M, Zor M, Celik A, Cicek T, Basal S, Ozgok A, Ustun H, Ozgok Y.** Effects of vardenafil on testicular torsion/ detorsion damage: an experimental study in pigs. *Urol Int*, **2011**; 86: 228- 232
90. **Kidambi S, Yarmush J, Fong W, Kamath S, Schianodicola J, Nahmias Y.** Propofol induces ERK-dependant expression of c-Fos and Egr-1 in neuronal cells. *Neuroreport*, **2009**; 20: 657- 662
91. **Hanci V, Erol B, Bektaş S, Mungan G, Yurtlu S, Tokgöz H, Can M, Ozkoçak Turan I.** Effect of dexmedetomidine on testicular torsion/detorsion damage in rats. *Urol Int*, **2010**; 84: 105-111
92. **Aktaş B, Bulut S, Bulut S, Baykam M, Ozden C, Senes M, Yücel D, Memiş A.** The effects of N-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Pediatr Surg Int*, **2010**; 26: 293-298
93. **Zhang Y, Lv Y, Liu Y, Yang C, Hu H, Meng X, Li M, Pan S.** Hyperbaric oxygen therapy in rats attenuates ischemia-reperfusion testicular injury through blockade of oxidative stress, suppression of inflammation, and reduction of nitric oxide formation. *Urology*, **2013**; 82: 489.e9- 489.e15
94. **Vaos G, Zavras N.** Antioxidants in experimental ischemiareperfusion injury of the testis: Where are we heading towards? *World J Methodol*, **2017**; 7(2): 37- 45
95. **Norbury C, Hickson I.** DNA hasarına karşı hücresel tepkiler. *Annu Rev Pharmacol Toksikol*, **2001**; 41: 367- 401
96. **Turner T, Tung K, Tomomasa H, Wilson L.** Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis in the rat. *Biol Reprod*, **1997**; 57: 1267– 74.
97. **Lee J, Richburg J, Younkin S, Boekelheide K.** The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*, **1997**; 138: 2081– 2088.
98. **Wang X, Sharma R, Sikka S, Thomas A, Falcone T, Agarwal A.** Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril*, **2003**; 80: 531–535
99. **Elmore S.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, **2007**; 35(4): 495– 516
100. **Schulze-Osthoff K. Et al.** Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem*, **1998**; 254, 439–459
101. **Green D, et al.** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **2004**; 305, 626–629
102. **Cohen G.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, **1997**; 326(Pt 1): 1– 16

103. **Rai N, Tripathi K, Sharma D, Shukla V.** Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*, **2005**;4:138–44
104. **Er E. Et al.** Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**; 1757: 1301–1311
105. **Kroemer G, et al.** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, **2007**; 87; 99– 163
106. **Hofmann K, Bucher P.** The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem. Sci*, **1997**; 22: 155– 156
107. **Cain K. Et al.** Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-Mda apoptosome complexes. *J. Biol. Chem*, **2000**; 275: 6067–6070
108. **Taylor R, et al.** Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, **2008**; 9: 231–241
109. **D'Amelio M00, Sheng M, Cecconi F.** Kaspaz-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends in Neurosciences*, **2012**; 35: 11
110. **Slee E, Adrain C, Martin S.** Executioner Kaspaz-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, **2001**; 276: 7320– 6
111. **Sakahira H, Enari M, Nagata S.** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, **1998**; 391: 96– 9
112. **Tyler K, Clarke P.** Apoptosis in animal models of virus-induced disease *Nat Rev Microbiol*, **2009**; 7(2): 144– 155
113. **Simard J, Woo S, Schwartzbauer G, Gerzanich V.** Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: a focused review. *J Cereb Blood Flow Metab*, **2012**; 32: 1699–1717
114. **Kowaltowski A, Seetharaman S, Paucek P, Garlid K.** Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2001**; 280: 649–657
115. **Acevedo J, Mendoza-Lujambio I, de la Vega-Beltran J, Treviño C, Felix R, Darszon A.** KATP channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation. *Dev Biol*, **2006**; 289: 395–405
116. **Noma A.** ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*, **1983**; 305: 147– 148
117. **Noma A, Shibasaki T.** Membrane current through adenosinetriphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol*, **1985**; 363: 463– 480
118. **Seino S.** Physiology and pathophysiology of K(ATP) channels in the pancreas and cardiovascular system: a review. *J Diabetes Complications*, **2003**; 17: 2–5.
119. **Inagaki N, Gono T, Clement J, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J.** Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, **1995a**; 270: 1166– 1170
120. **Clement J, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J.** Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron*, **1997**; 18: 827– 838
121. **Inagaki N, Gono T, Seino S.** Subunit stoichiometry of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel. *FEBS Lett*, **1997**; 409: 232–236.

122. **Suntres Z, Coccimiglio J, Alipour M.** The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, **2015**; 55: 304- 318
123. **Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu B, Kurkcuoglu M, Baser K.** Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/ microsomal test. *Food Chem*, **2005**; 93: 551– 6
124. **Luna A, Lábaque M, Zygodlo J, Marin R.** Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poult Sci*, **2010**; 89(2): 366- 70.
125. **Soltanab Y, Morsybc A, Araujo R, Elzaiaatab H, Sallama S, Louvandini H, Abdallab A.** Carvacrol and eugenol as modifiers of rumen microbial fermentation, and methane production in vitro. *Foreign Agricultural Relations*, **2011**;01– 11
126. **Hashemipour H, Kermanshahi H, Golian A, Veldkamp T.** Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poult. Sci*, **2013**; 92(8):2059-69.
127. **Bravo D, Pirgozliev V, Rose S.** A mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsicum oleoresin improves energy utilization and growth performance of broiler chickens fed maize-based diet. *J. Anim. Sci*, **2014**; 92(4): 1531-1536.
128. **Yanishlievaa N, Marinovaa E, Gordonb M, Ranevaa V.** Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem*, **1999**; 64: 59-66
129. **Tepe B, Sökmen M, Akpulat H, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A,** Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *Sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*, **2005**; 66: 447-454
130. **Aristatile B, Al-Numair K, Veeramani C, Pugalendi K.** Effect of carvacrol on hepatic marker enzymes and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Fundam Clin Pharmacol*, **2009**; 23(6): 757-65
131. **Azırak S.** Thymol ve Carvacrol'un in vivo genotoksik etkilerinin araştırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı, Adana **2007**
132. **Parlaktas B, Atilgan D, Gencten Y, Akbas A, Markoc F, Erdemir F, Ozyurt H, Uluocak N.** The effects of carvedilol on ischemia-reperfusion injury in the rat testis. *Int Braz J Urol*. **2014**; 40: 109-17.
133. **Dağlar Z, Günşar C, Neşe N, Şencan A, Yılmaz Ö, Genç A, TANELİ C, Mir E.** Diklofenak'ın deneysel testis torsiyonundaki etkileri. *Çocuk Cerrahisi Dergisi*, **2009**; 23(1): 4-9
134. **Aydiner ÇY, Pul M, İnan M, Bilgi S, Can EÇ.** N-Acetylcysteine Play A Role On Preventing Tissue Damage On Experimental Testicular Torsion. *Cumhuriyet Tıp Derg*, **2012**; 34: 462-471
135. **Levent Ozcan, Alper Otunctemur, Emre Can Polat, Emin Ozbek, Sinan Levent Kirecci, Adnan Somay.** Selective Nuclear Factor Kappa b (NFκB) Inhibitor, Pyrrolidinium Dithiocarbamate Prevents, Long-Term Histologic Damage in Ischemia-Reperfusion Injuries after Delayed Testicular Torsion. *Sexual Dysfunction And Infertility*, **2016**; 13(3): 27-02

136. **Azizollahi S, Aflatoonian R, Gilani M, Behnam B, Tajik N, Asghari-Jafarabadi M, Asgari HR, Koruji M.** Alteration of spermatogenesis following spermatogonial stemcells transplantation in testicular torsion-detorsion mice *J Assist Reprod Genet*, **2016**; 33: 771–781
137. **Mete F, Tarhan H, Celik O, Akarken I, Vural K, Ekin RG, Aydemir I, Ilbey YO.** Comparison of intraperitoneal and intratesticular ozone therapy for the treatment of testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Asian Journal of Andrology*, **2017**; 19: 43–46
138. **Kemahli E, Yildiz M, Firat T, Özyalvacı ME, Uğurüyetürk U, Yılmaz B, Gücük A.** An experimental study on effects of pyrrolidine dithiocarbamate on ischemia-reperfusion injury in testis. *Can Urol Assoc J*, **2016**; 10(3-4): E104-9
139. **Taati M, Moghadasi M, Dezfoulıan O, Asadian P.** Effects of Ghrelin on Testicular Ischemia/Reperfusion-Induced Injury. *Acta Med Iran*, **2016**;54(1):32-38
140. **Andiran F, Okur DH, Kılınç A, Gedıkoğlu G, Kılınç K, Tanyel F.** Do experimentally induced ipsilateral testicular torsion, vas deferens obstruction, intra-abdominal testis or venous obstruction damage the contralateral testis through a common mechanism? *BJU International*, **2000**; 85: 330-335
141. **Dokucu A, Ozturk H, Ozdemir E, Ketani A, Buyukbayram H, Yucesan S.** The protective effects of nitric oxide on the contralateral testis in prepubertal rats with unilateral testicular torsion. *BJU International*, **2000**; 85: 767-771
142. **Taati M, Moghadasi M, Dezfoulıan O, Asadian P, Kheradmand A, Abbasi M, Zendeıdel M.** The effect of ghrelin pretreatment on epididymal sperm quality and tissue antioxidant enzyme activities after testicular ischemia/reperfusion in rats. *J Physiol Biochem*, **2012**; 68: 91–97
143. **Hekimoglu A, Kurcer Z, Aral F, Baba F, Sahna E, Atessahin A.** Lycopene, An Antioxidant Caroteboid, Atteuates Testicular Injury Caused By Ishemia/Reperfusion in Rats. *Tohoku J. Exp. Med*, **2009**; 218: 141-147
144. **Hekimoglu A, Kurcer Z, Aral F, Baba F, Sahna E, Atessahin A, Sakin F.** Effects of 3-aminobenzamide on unilateraltesticular ischemia–reperfusion injury: What is therole of PARP inhibition? *Can. J. Physiol. Pharmacol*, **2010**; 88: 1123–1129
145. **Ghasemnejad-berenji M, Ghazi-Khansari M, Yazdani I, Saeedi Saravi SS, Nobakht M, Abdollahi AR, Mohajer Ansari J, Ghasemnejad-berenji H, Pashapour S, Dehpour AR.** Rapamycin protects testes against germ cell apoptosis and oxidative stress induced by testicular ischemia-reperfusion. *Iran J Basic Med Sci*, **2017**; 20: 905-911.
146. **Jiang D, Wu D, Zhang Y, Xu B, Sun X, Li Z.** Protective Effects of Hydrogen Rich Saline Solution on Experimental Testicular Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *The Journal Of Urology*, **2012**; 187: 2249-2253
147. **Raju AB, Challa1 SR, Akula A, Kiran K, Harinadh GB.** Evaluation of Oxidant and Anti-Oxidant Balance in Experimentally Induced Testicular Injury by Ischemia Reperfusion in Rats. *Eur J Gen Med*, **2011**; 8(2): 117-21
148. **Yu W, Liu Q, Zhu S.** Carvacrol Protects against Acute Myocardial Infarction of Rats via Anti-oxidative and Anti-apoptotic Pathways. *Biol. Pharm. Bull.*, **2013**; 36(4): 579–584

149. **Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T.** Preventive Effect of Carvacrol Against Oxidative Damage in Aged Rat Liver. *Int J Vitam Nutr Re*, **2016**; 21: 1-8
150. **Canbek M, Uyanoglu M, Bayramoglu G, Senturk H, Erkasap N, Koken T, Uslu S, Demirustu C, Aral E, Baser K.** Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine*, **2008**; 15: 447–452
151. **Suo L, Kang K, Wang X, Cao Y, Zhao H, et al.** Carvacrol Alleviates Ischemia Reperfusion Injury by Regulating the PI3K-Akt Pathway in Rats. *PloS ONE*, **2014**; 9(8): e104043
152. **Cetik S, Ayhanci A, Sahinturk V.** Protective Effect of Carvacrol Against Oxidative Stress and Heart Injury in Cyclophosphamide-Induced Cardiotoxicity in Rat *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2015**; 58(4):569-576
153. **Sahin M, Avsar FM, Ozel H, Topaloglu S, Yilmaz B, Pasaoglu H, Avunduk MC, Erikoglu M, Hengirmen S.** The Effects of Dimethyl Sulfoxide on Liver Damage Caused by Ischemia-Reperfusion. *Transplantation Proceedings*, **2004**; 36: 2590–2592
154. **Tamjidipoor A, Tavafi M, Ahmadvand H.** Effect of dimethyl sulfoxide on inhibition of post-ovariectomy osteopenia in rats. *Connective Tissue Research*, **2013**; 54(6): 426-431
155. **Li YM, Wang HB, Zheng JG, Bai XD, Zhao ZK, Li JY, Hu S.** Dimethyl sulfoxide inhibits zymosan-induced intestinal inflammation and barrier dysfunction. *World J Gastroenterol*, **2015**; 21(38): 10853-10865
156. **Zhang X, Lv F, Tang J.** Protection from ischemia by preconditioning, postconditioning, and combined treatment in rabbit testicular ischemia reperfusion injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2016**; 608: 1e7
157. **Gholami M, Abbaszadeh A, Khayat ZK, Anbari K, Baharvand P, Gharravi AM.** Honey improves spermatogenesis and hormone secretion in testicular ischaemia–reperfusion-induced injury in rats *Andrologia*. **2017**;e12804
158. **Tsounapi P, Saito M, Dimitriadis F, Shimizu S, Yukako Kinoshita Y, Shomori K, Satoh I, Satoh K.** Protective Effect Of Sivelestat, A Neutrophilelastase Inhibitor, On Ipsilateral And Contralateral Testes After Unilateral Testicular Ischaemia–Reperfusion Injury in Rats. *BJU International*, **2010**; 107: 329 – 336
159. **Ghasemnezhad R, Mohammadghasemi F, Faghani M, Bahadori MH.** Oxytocin can decrease germ cells apoptotic index in testis under acute ischemia reperfusion in a rat model. *Iran J Reprod Med*, **2015**; 13(5) : 283-290
160. **Araghi A, Abouhosseini-Tabari M, Golshahi H.** Protective effect of carvacrol on ketamine induced testicular damage in mouse model of schizophrenia. *J Herbmmed Pharmacol.* **2017**; 6(3): 100-106.
161. **Al-Maghrebi M, Renno WM.** Genistein Alleviates Testicular Ischemia And Reperfusion Injury-Induced Spermatogenic Damage And Oxidative Stress By Suppressing Abnormal Testicular Matrix Metalloproteinase System Via The Notch 2/Jagged 1/Hes-1 And Caspase-8 Pathways. *Journal Of Physiology And Pharmacology*, **2016**; 67(1): 129-137

162. **Ayan M, Tas U, Sogut E, Caylı S, Kaya H, Esen M, Erdemir F, Uysal M.** Protective effect of thymoquinone against testicular torsion induced oxidative injury. *Andrologia*, **2016**; 48: 143–151
163. **Al-Ajmi N, Al-Maghrebi M, Renno WM.** (-)-Epigallocatechin-3-gallate Modulates the Differential Expression of Survivin Splice Variants and Protects Spermatogenesis During Testicular Torsion. *Korean J Physiol Pharmacol*, **2013**; 17: 259–265
164. **Li WT, Zhang SY, Zhou YF, Zhang BF, Liang ZQ, Liu YH, Wei Y, Li CK, Meng XJ, Xia M, Dan Y, Song JN.** Carvacrol attenuates traumatic neuronal injury through store-operated Ca^{2+} entry-independent regulation of intracellular Ca^{2+} homeostasis. *Neurochemistry International*, **2015**; 90: 107–113
165. **Potocnjak I, Domitrovic R.** Carvacrol attenuates acute kidney injury induced by cisplatin through suppression of ERK and PI3K/Akt activation. *Food and Chemical Toxicology*, **2016**; 98: 251–261
166. **Teshima Y, Akao M, Li RA, Chong TH, Baumgartner WA, Johnston MV, Marbán E.** Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel Activation Protects Cerebellar Granule Neurons From Apoptosis Induced by Oxidative Stress. *Stroke*, **2003**; 34: 1796–1802.
167. **Shimizu S, Oikawa R, Tsounapi P, Inoue K, Shimizu T, Tanaka K, Martin DT, Honda M, Sejima T, Tomita S, Saito M.** Blocking of the ATP sensitive potassium channel ameliorates the ischaemia-reperfusion injury in the rat testis. *Andrology*, **2014**; 2: 458–465
168. **Wojtovich AP, Urciuoli WR, Chatterjee S, Fisher AB, Nehrke K, Brookes PS.** Kir6.2 is not the mitochondrial KATP channel but is required for cardioprotection by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2013**; 304: H1439–H1445
169. **Zhang X, Zhang X, Xiong Y, Xu C, Liu X, Lin J, Mu G, Xu S, Liu W.** Sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel protects cardiac myocytes against lipopolysaccharide-induced apoptosis International Journal Of Molecular Medicine, **2016**; 38: 758–766
170. **Oliveira IS, Silva FV, Viana AF, Santos MR, Quintans-Júnior LJ, Martins MC, Nunes PH, Oliveira FA, Oliveira RC.** Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **2012**; 385:899–908

8. ÖZGEÇMİŞ

Ortaöğretim eğitimimi Konya’da tamamladım. 2008 yılında Konya Yabancı Dil Ağırlıklı Erbil Kuru Lisesi’nden mezun oldum. 2009 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Biyoloji (İngilizce) bölümünde eğitim almaya başlayarak 2014 yılında mezun oldum. Aynı yıl Abant İzzet Baysal Üniversitesi’nde Pedagojik Formasyon eğitimi aldım. 2015 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimime başladım.



9. EKLER

T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 19

08.3./2017

Konu : Kararlar

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Ratlarda deneysel testis iskemisi reperfüzyon modelinde, karvakrolün olası etkilerinin histolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Y.Lisans Öğ.Cemre Nur BALCI, Doç.Dr.Buket KIN TEKÇE
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	AİBÜ Deneysel Hayvanlar Uygulama ve Araştırma Merkezi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No):2017/08	Tarih (Date): 22.02.2017
	Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık Alanı	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Aysel KÜKNER (Başkan)	Histoloji ve Embriyoloji AD. Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Erol AYAZ (Üye)	Tıbbi Parazitoloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Neriman ŞENGÜL (Invivo Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Ali Rıza GEZİCİ (Üye)	Beyin Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Fatih ULAŞ (Üye)	Göz Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Orçun TOPTAŞ (Üye)	Cerrahi AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Diş Hek. Fakültesi	
Doç. Dr. Yeşim YENER (Üye)	İlköğretim Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Eğitim Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Eray KEMALİ (Üye)	Üroloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Yrd.Doç.Dr.Hayriye ORALLAR (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Vet. Hek. Ayhan ÇETİNKAYA (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	AİBÜ Deneysel Hayvanlar Uygulama ve Araştırma Merkezi	
Vet. Hek. Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLCA Hindi /BOLU	
Av. Cihan KARAGÖZ (Sivil Toplum Kuruluşu üyesi)	Avukat	Tabaklar Mahallesi Hürriyet cad.No.47/7Merkez/ BOLU	

9.1. EK 1 : Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu Onayı



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : B.30.2.ABÜ.0.05.05-050.01.04- 244
Konu: Proje çalışması hk.

20.12.2017

Sayın Yrd.Doç.Dr.Tülin FIRAT
AİBÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Deney Hayvanları Etik Kuruluna başvurusu yapıp onay almış 2017/08 no'lu "Ratlarda deneysel testis iskemisi reperfizyon modelinde,karvakrolün olası etkilerinin histolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi" isimli daha önce etik onay almış 2017/08 no'lu çalışmada, materyal ve metod bölümündeki "Potasyum kanallarını işaretlemek için kullanılacak olan SUR2A immunohistokimyasal antikorunun temin edilememesinden dolayı aynı işaretleme için Kir6.2 antikorunu kullanılmış Anahtar kelimeler de bu değişikliğe uygun olarak SUR2A yerine Kir6.2 olarak değiştirilmiş Ayrıca deneysel yöntem kısmında, testistorsiyonu sehven saat yönünde yazılmış pşup saat yönünde tersine uygulanmış ve histoloji laboratuvarında mevcutta bulunan TUNEL kiti ile apoptozis için immün işaretleme yapılmıştır" şeklindeki değişiklik talebinizin etik olarak uygun olduğuna mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Erol AYAZ
Hayvan Araştırmaları
Yerel Etik Kurul Başkan Yrd.

Üyeler	Uzmanlık Alanı	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Erol AYAZ (Başkan Yrd.)	Tıbbi Parazitoloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Neriman ŞENGÜL (İnvivo Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Ali Rıza GEZİCİ (Üye)	Beyin Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Fatih ULAŞ (Üye)	Göz Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Orçun TOPTAŞ (Üye)	Cerrahi AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Diş Hek. Fakültesi	
Doç. Dr. Yeşim YENER (Üye)	AİBÜ Temel Eğitim Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Eğitim Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Eray KEMAHLI (Üye)	Üroloji AD Öğretim. Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Yrd.Doç.Dr.Hayriye ORALLAR (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Yrd.Doç.Dr.Ayhan ÇETİNKAYA (Üye)	Fizyoloji AD Öğretim. Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Vet. Hek. Enes EĞİLMEZ (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama. ve Araştırma Merkezi	
Vet. Hek. Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLU BEYPILIÇ AŞ.	
Av.Cihan YAVUZ (TC Üyesi)	Avukat	Tabaklar mah. İzzet Baysal cad. No:6 BOLU	

9.2. EK 2: Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu Düzeltme Onayı



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA / YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI
ORJİNALLİK RAPORU

AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

29.12.2017

Öğrencinin Adı Soyadı: Cemre Nur BALCI

Numarası: 27296111234

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Lisansüstü Eğitim
Düzeyi: Yüksek Lisans ☒

Doktora ☐

Tez Başlığı: RATLARDA DENEYSEL TESTİS İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE,
KARVAKROLÜN OLASI ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
OLARAK İNCELENMESİ

Yukarıda başlığı yazılı olan tez çalışmasının kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan ...96...sayfalık kısmına ilişkin 28./12/2017 tarihinde tarafımdan/tez danışmanımca **Turnitin** intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı "alıntılar hariç" yapıldığında % 8, "alıntılar dahil" yapıldığında ise % 8 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan Filtrelemeler:

- 1- Kaynakça Hariç,
- 2- Alıntılar Hariç / Dahil
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç.

"AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması Ve Kullanılması Uygulama Esasları" nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin tespit edileceği durumda her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bilgilerinize arz ederim.

Cemre Nur BALCI

C. Balcı

Öğrencinin Ad Soyad ve İmza

EK: 1 adet tezin tam başlığını öğrencinin ad soyad bilgisini ve tezin toplam sayfa sayısını gösterecek şekilde raporlama işlemi bittikten sonra alınmış ekran görüntüsü eklenecektir.

TEZ DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR

29.12.2017

Yrd. Doç. Dr. T. ULUN FIRAT

(Unvan, Ad Soyad, Tarih, İmza)

T. Ulun

9.3. EK 3: Orijinallik Raporu