

RABİA GEZER	DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA TEZİ	DIYARBAKIR -2023
--------------------	---	---------------------	-------------------------



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN TESTİSİNDE OLUŞTURULAN DENEYSEL İSKEMİ-
REPERFÜZYON HASARINDA QUERSETİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Rabia GEZER

DOKTORA TEZİ

ANATOMİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet Cudi TUNCER

DIYARBAKIR – 2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN TESTİSİNDE OLUŞTURULAN DENEYSEL İSKEMİ-
REPERFÜZYON HASARINDA QUERSETİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Rabia GEZER
DOKTORA TEZİ

ANATOMİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet Cudi TUNCER

DİYARBAKIR – 2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Rabia GEZER'İN hazırladığı “**Sıçan Testisinde Oluşturulan Deneysel İskemi/Reperfüzyon Hasarında Quersetin Etkisinin Araştırılması**” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 19/06/2023

Danışman: Prof.Dr. Mehmet Cudi TUNCER

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı	Prof.Dr. Mehmet Cudi TUNCER	Dicle Üniversitesi
Üye	Prof.Dr. Engin DEVECİ	Dicle Üniversitesi
Üye	Prof.Dr. Özlen KARABULUT	Dicle Üniversitesi
Üye	Prof.Dr. Murat ÖGETÜRK	Fırat Üniversitesi
Üye	Prof.Dr. Ahmet KAVAKLI	Fırat Üniversitesi

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../20.. tarih ve Sayılı kararıyla onaylanmıştır.

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

Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

19/06/2023

Rabia GEZER

İmza

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi aşamasında yol gösteren ve deneyimleri ile her aşamada destek olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Cudi TUNCER başta olmak üzere Anatomi ana bilim dalında görevli bütün hocalarıma ve görevli personele, tezimin oluşturulması ve deneysel aşamasındaki tüm katkılarından dolayı Histoloji ana bilim dalı başkanı değerli hocam sayın Prof. Dr. Engin DEVECİ hocama ve kıymetli ekibine, deneyimleri ve özveriyle varlığını her daim hissettiren kıymetli arkadaşım Zeynettin KASIRGA'ya, akademik başarıları ile ufkumu açmanın yanı sıra; dostluğu, varlığı ve destekleri ile her aşamada yanımda olduğunu hissettiğim kıymetli hocam sayın Doç. Dr. Eylem KILIÇ OĞURLU ve kıymetli eşi İhsan OĞURLU bey'e, çalışma hayatımın önemli bir kısmını oluşturan Bingöl Devlet Hastanesi Sterilizasyon birimindeki bütün çalışma arkadaşlarıma ve değerli dostum Muhammet Ali TEKİN'e ve hayatımın bütün gerçekliğinin temelini atmış, varlıkları bir insan için en büyük şans sayılan, gücümün kaynağı sevgili ailemin bütün üyelerine sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (DÜBAP) komisyonu başkanlığı tarafından SBE.21.019 numaralı proje ile desteklenmiştir. Bütün kurum çalışanlarına teşekkür ediyorum.

Rabia GEZER

Diyarbakır-2023

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
1.ÖZET.....	1
1.1.Türkçe Özet.....	1
1.2.Abstract.....	3
2. GİRİŞ	5
3. GENEL BİLGİLER.....	8
3.1.Testis Anatomisi.....	8
3.1.1 Yeri, şekli ve boyutları	8
3.1.2. Testis iç yapısı.....	9
3.1.3. Testis'lerin nörovasküler yapıları	12
3.2. Testis Embriyolojisi.....	13
3.3. Testis torsiyonu	14
3.3.1. Perinatal testis torsiyonu	15
3.4. Quercetin	15
3.4.1. Quercetin'in Yapısı ve Kaynakları.....	15
3.4.2. Quercetin'in Farmakokinetik Özellikleri.....	16
3.4.3. Quercetin'in Yan Etkileri.....	17
3.4.4. Quercetin'in Etki Mekanizması.....	17

3.4.5. Quercetin Dozajı.....	19
4. GEREÇ VE YÖNTEM	20
4.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Uygulanan Protokol.....	20
4.2. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Yöntem.....	21
4.2.1. H&E (Hematoksilen-Eozin) boyama.....	21
4.2.2. İmmunohistokimyasal boyama	22
4.3. Biyokimyasal Analiz	24
4.4. İstatistiksel Analizler	24
5. BULGULAR.....	25
6. TARTIŞMA.....	35
7. SONUÇLAR.....	40
8. KAYNAKÇA.....	42
9. ÖZGEÇMİŞ	49
10. EKLER	50
10.1. Ek- 1. Etik Kurul Karar Formu	50
10.2. Ek- 2. Makale	51
11. ORJİNALLİK RAPORU.....	52

KISALTMALAR ve SİMGELER

TT	: Testis Torsiyonu
MPO	: Myeloperoksidaz
MDA	: Malondialdehit
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü alfa
CAT	: Katalaz
TWST	: Testicular Torsiyon Risk Score
ROS	: Reaktif oksijen türleri
OS	: Oksidatif stres
MIF	: Mülleryan inhibe edici faktör
İ/R	: İskemi/reperfüzyon
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
MIF	: Müllerian inhibe edici faktör
LH	: Lüteinize edici hormon
FSH	: Folikül stimülan hormon
ABP	: Androjen bağlayıcı protein
ATP	: Adenozin Trifosfat
TNF-α, IL-6, IL-1β	: İnflamatuvar Sitokinler
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Scrotum ve Testis Anatomisi.	9
Şekil 2: Testis Anatomisi	12
Şekil 3: Quercetin Kimyasal Yapısı	15
Şekil 4: (a-l) Bütün gruplar için H&E, TNF-alfa ve Caspase-9 gösterimi	32



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Tüm grupların biyokimyasal ve immünohistokimyasal değerleri	25
Tablo 2: MDA verilerine göre gruplar arası korelasyon	26
Tablo 3: MPO verilerine göre gruplar arası korelasyon.....	27
Tablo 4: CAT verilerine göre gruplar arasındaki korelasyon.....	27
Tablo 5: Spermosit dejenerasyonu verilerine göre gruplar arası korelasyon	28
Tablo 6: Dilatasyon verilerine göre gruplar arası korelasyon	29
Tablo 7: İnflamasyon verilerine göre gruplar arası korelasyon.....	29
Tablo 8: TNF-alfa verilerine göre gruplar arası korelasyon.....	30
Tablo 9: Caspase-9 verilerine göre gruplar arası korelasyon	31

1.ÖZETLER

1.1.Türkçe Özet

Sıçan Testisinde Oluşturulan Deneysel İskemi/Reperfüzyon Hasarında Quercetin Etkisinin Araştırılması

Öğrencinin adı soyadı: Rabia GEZER

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Cudi TUNCER

Ana bilim dalı: Anatomi

Amaç: Testis torsiyonu (TT) çocukluk çağı akut scrotum sebeplerinden en önemlisidir. Tedavi edilmemesi durumunda organ kaybına yol açabilecek acil cerrahi bir problemdir. Tedavide amaç İ/R hasarının azaltılması veya yok edilmesidir. Bu amaca yönelik kullanılacak yöntemlerden biride antioksidanların etkisidir. Bu çalışmada sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmuş İ/R hasarının eşsiz bir bioflavonoid ve oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu bilinen bir antioksidan olan quercetin ile önlenbilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Çalışmada Sprague Dawley ırkı 12 haftalık ve 250-300gr ağırlığında 32 adet erkek sıçan kullanıldı. 4 ayrı grup oluşturuldu. 1. Grup olan kontrol grubuna hiçbir cerrahi işlem yapılmadı. Torsiyon grubuna sol testislere torsiyon uygulanarak 5 saatlik iskemi sağlandı. Torsiyon/Detorsiyon grubuna 5 saatlik iskeminin ardından 2 saatlik reperfüzyon uygulandı. Torsiyon/Detorsiyon+Quercetin grubuna ise 5 saatlik iskeminin ardından 2 saatlik reperfüzyon uygulandı ve i.p. quercetin enjekte edildi.

Bulgular: Çalışmamızda 2. Grupta belirgin olarak MPO (myeloperoksidaz) ve MDA (Malondialdehit) değerleri artmış, quercetin uygulanan 4. grupta ise artışın olduğu fakat anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. TNF- α (Tümör nekroz faktörü alfa) değerlerinin quercetin uygulaması ile anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. CAT (Katalaz) ortalamasının ise torsiyon grubunda düşük olduğu ve quercetin uygulanmasının CAT seviyelerinin normale dönmesinde etkili olduğu 4. grupta gösterilmiştir. Spermetosit dejenerasyonu ve inflamasyon açısından quercetin

uygulanan grupta anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir. Quercetin uygulanan grupta dilatasyon verilerinde azalma görülmüş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç: Güçlü bir antioksidan etkiye sahip olan Quercetin'in deneysel olarak oluşturulmuş İ/R hasarı üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Testis torsiyonu, iskemi-reperfüzyon, antioksidan, quersetin, inflamasyon



1.2.Abstract

Investigation of the Effect of Quesetin in Experimental Ischemia-Reperfusion Injury Caused in Rat Testicle

Student's name and surname: Rabia GEZER

Adviser of Thesis: Prof. Dr. Mehmet Cudi TUNCER

Department: Anatomy

Aim: Testicular torsion (TT) is the most important cause of childhood acute scrotum.

It is an urgent surgical problem that can lead to organ if left untreated. The aim of treatment is to reduce or eliminate torsion/detorsion damage. One of the methods to be used for this purpose is the effect of antioxidants. In this study, it was aimed to prevent experimentally induced torsion/detorsion damage in rats with a unique bioflavonoid and quercetin, an antioxidant known to be against oxidative damage.

Material and Methods: In the study, 32 male Sprague Dawley rats, 12 weeks old and weighing 250-300 gr, were used. They were divided into 4 separate groups. No surgical procedure was performed in the control group. 5-hour ischemia was achieved by applying torsion to the left testicles in the torsion group. After 5 hours of ischemia, a 2-hour reperfusion was applied to the torsion/detorsion group. In the torsion/detorsion+quercetin group, 2 hours of reperfusion was applied after 5 hours of ischemia and i.p. quercetin was injected.

Result: In our study, it was determined that MPO (myeloperoxidase) and MDA (malondialdehyde) values increased significantly in the 2nd group, while the increase was found in the 4th group, which was applied quercetin, but it was not significant. It has been shown in the 4th group that the mean CAT (katalase) was low in torsion group and the application of quercetin was effective in returning the CAT levels

to normal. A significant decrease was observed in the quercetin-administrated group in terms of spermatocyte degeneration and inflammation. There was a decrease in dilatation data in the quercetin group, but it was not statistically significant.

Conclusion: Quercetin, which has a strong antioxidant effect, has been shown to have positive effects on experimentally induced torsion/detorsion damage.

Keywords: Testicular torsion, ischemia-reperfusion, antioxidant, quercetin, Inflammation

2. GİRİŞ

TT funiculus spermaticus'un kendi eksenini üzerindeki rotasyonu ile vasküler akışın bozulması sonucu testislerde meydana gelen, kalıcı iskemik hasara yol açabilen ürolojik acil bir durum olarak ifade edilmektedir (1-3). Yetişkinlerde görülmesine rağmen çoğu vakanın yaşamın ilk yıllarında ve 12-18 yaşlarında görüldüğü söylenmektedir. En sık görülen semptom tek taraflı scrotal ağrı olmakla birlikte mide bulantısı ve kusma şeklindedir. Yapılan tetkikler sonucu torsiyon varlığı tanısı hem erken hem de doğru tedavi gerektirir. Aksi halde iyileşmesi zor testis kayıpları meydana gelebilmektedir. Acil serviste transfer veya üroloji konsültasyonu beklenirken manuel detorsiyon uygulanabilmektedir (2). Hızlı tanı ve tedavi torsiyona uğramış testisin daha fazla zarar görmesini engelleyebilmektedir. Bunun için semptomların süresi, bükülme derecesi ve testis parankiminin homojenliği ile birlikte ileri ultrason bulguları önem arz etmektedir. Semptomların başlamasının üzerinden 4-8 saatten fazla zamanın geçmesi, hücre nekrozu ve sonucunda testis dokusunda hücre kayıplarına yol açabilmektedir (4). Deneysel çalışmalarda testis iskemisine en duyarlı hücrelerin germ hücreleri, özellikle spermatogonia ve spermatositler olduğu belirtilmiştir (5). Ayrıca erken dönemde müdahale edilmeyen vakalarda orşiektomi yapma olasılığının arttığı da bildirilmektedir (4). Erken tanıda akut scrotal ağrıyı değerlendirmek için Testicular Torsion Risk Score (TWST) adı verilen skorlamanın kullanımının uygun olduğu bildirilmektedir. Bu testin parametreleri testis şişmesi (2 puan), sert testis (2 puan), yüksekte testis (1 puan), kremester refleksinin olmaması (1 puan) ve mide bulantısı/kusma (1 puan) olacak şekilde toplam 7 puanlık bir skordan oluşmaktadır (6). Testiküler torsiyon iskemik hasara neden olurken, detorsiyon ise reperfüzyon hasarına neden olabilmektedir. İskemik reperfüzyon hasarı testislerde oksidatif stres, inflamasyon ve germ hücre ölümü şeklinde problemlere neden olabilmektedir (7). Eksternal manuel redüksiyon ilk müdahale olarak kullanılabilir, ancak hastaneden ayrılmadan önce cerrahi tespit zorunludur (1,3). Ayrıca kontralateral testisteki torsiyonu önlemek için profilaktik fiksasyon yapılmalıdır (1). Etkilenen testisin canlılığı yok ve nekroze ise orşiektomi yapılmaktadır (8).

İskemi ve reperfüzyon (I/R)'un, dokulardaki arteriyel kan miktarındaki azalmaya ve dokuların beslenmemesine, ardından perfüzyonun restorasyonu ile reoksijenasyona neden olduğu bildirilmektedir. Kan akışının yeniden sağlanması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi, hücrel iyon homeostazına müdahale ve hücre ölümüne karşı inflamatuvar tepkiler yoluyla iskemik dokuda daha fazla hasarı tetikler. ROS üretimleri uzadığında veya arttığında kendine özgü hücrel değişikliklerle dokuda bir takım zararlı olaylara neden olur (9). Reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller genel olarak hücre sinyali ve diğer hayati işlevler için gereklidir; fakat aşırı miktarlar hücrel indirgeme-oksidasyon (redoks) dengesinde değişikliğe sebep olmaktadır. Bu da biyolojik fonksiyonların anormal çalışmasına neden olmaktadır (10). İskeminin olduğu dokuların canlılığını korumak için mümkün olan en kısa sürede doku reperfüzyonu sağlanmalıdır. Testisin detorsiyonundan sonra reperfüzyonu ile serbest oksijen radikallerinin (ROS) üretimindeki artışı ve nötrofil infiltrasyonu sonucu hücre hasarları görülebilmektedir. Bu süreçte oluşan radikaller, hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyonuna ve proteinlerin denatürasyonu ile DNA hasarına neden olur (11). ROS aktiviteleri ile antioksidan savunma sistemleri arasında bir dengesizlik olduğunda, oksidatif stres (OS) meydana gelir. Birçok çalışma OS'nin erkek infertilite ve çeşitli hastalıklar yatkınlığı artırabileceği bildirilmektedir (3,10). Antioksidan ajanlar bu durumun önüne geçebilmek için deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Bu antioksidanlar, I/R hasarının zararlı etkilerini önleyebilen veya iyileştirebilen çeşitli doğal ve farmasötik ajanlardan oluşmaktadır (3). Çalışmaların tümünde testis torsiyonu olgularında iskem/reperfüzyon hasarıyla serbest oksijen radikallerinin fazlalığı biyokimyasal tetkiklerde gösterilmiştir (11–13). Farklı antioksidan ajanların kullanımının serbest oksijen radikallerini azaltabileceği gösterilmiştir (12–14). Quercetin, birçok sebze ve meyvede bulunan ve immünomodülatör, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip doğal bir flavonoiddir (15). Yapılan çalışmalarda quercetin'in oksidatif hasara karşı koruyucu görev gördüğü önemli bir antioksidan olduğu belirtilmiştir (15–17). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada endojen hücrel antioksidan savunma sisteminin sürdürülmesine de katkıda bulunan quercetin'in farklı türlerdeki taze ve çözülme sonrası spermlerin çeşitli parametreleri üzerindeki faydalı özelliklerinin olduğu bildirilmiştir (18).

Bu alışmamızda ratlarda testis torsiyon/detorsiyon sonrası iskemi/reperfüzyon ile testiste oluşturulan serbest radikallerin sebep olduğu testis hasarına karşı bir antioksidan olan quersetinin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

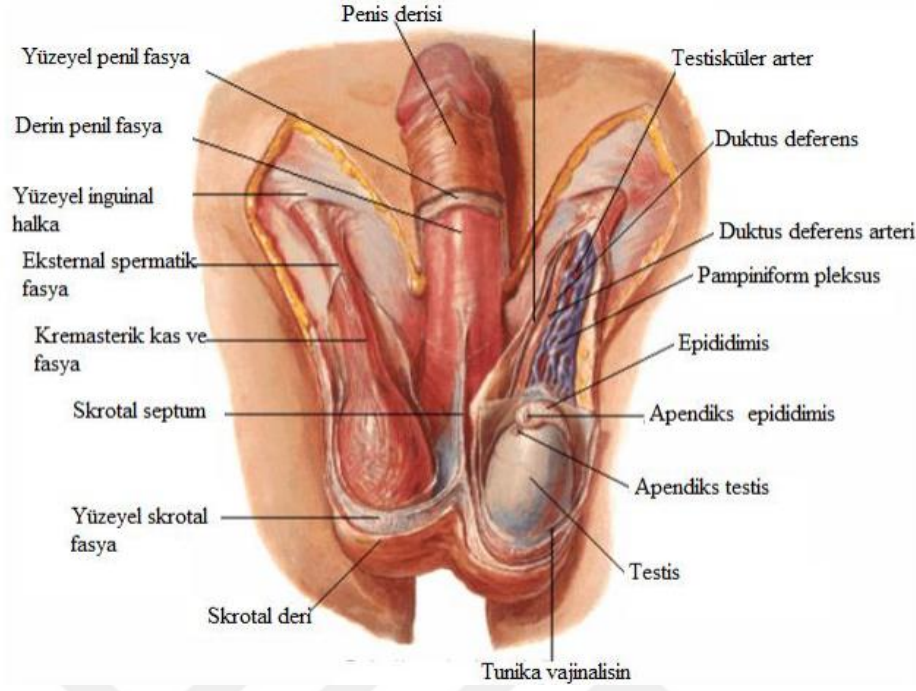


3. GENEL BİLGİLER

3.1. Testis Anatomisi

3.1.1 Yeri, şekli ve boyutları

Scrotum içinde bulunan bir çift üreme organıdır (19–21). Testis’ler sitogenetik fonksiyonlar sayesinde spermatozoonları (erkek üreme hücreleri), testosteron ve inhibin’i ise endokrin fonksiyonlar aracılığıyla üretirler (22). Erkek üreme sisteminin üreme hücresi sperm ile testosteron üretiminde görev alan önemli bir genital organdır (19,20). Sol testis konum olarak sağ testis’ten 1 cm kadar aşağıda yerleşim göstermektedir (19). Bu durum testis’leri askıda tutan funiculus spermaticus ile ilgili olduğu söylenmektedir (19,22). Başka bir neden olarak kan stazı sol testis’in daha ağır olması ile ilişkilendirilebileceği de bildirilmiştir (22). Böylece günlük hareketlerde rahatsızlık verici çarpmalar olmaz (20). Funiculus spermaticus her bir testis’i besleyen damar ve sinirler ile duc. deferens (vas deferens)’in içinde bulunduğu bir kordondur (22). Testis’lerin uzunluğu 4-5 cm kadardır. Genişliği 2,5 cm ve kalınlığı ise 3 cm olup oval bir şekle sahiptirler. Her bir testis yaklaşık 10,5-14 gr ağırlığındadır. Testis’ler iki yüze (facies medialis ve lateralis), iki kenara (margo anterior ve posterior) ve iki uca (extremitas superior ve inferior) sahiptir (19,20,22). Arka kenarın ortasında mediastinum testis denilen testis damar ve sinirleri ile spermin kanallarının girip çıktığı yer bulunmaktadır (19). Margo anterior’u peritoneum visceralis’in devamı olan epiorchium ile örtülüdür. Margo posterior’un iç yüzünde corpus epididymis bulunur. Orta kısmında ise testis damar ve sinirleri ve aynı zamanda spermin kanallarının bulunduğu mediastinum testis yapısı bulunur. Extremitas superior üst uç olup caput epididymis’te yerleşim göstermektedir. Cauda epididymis ile örtülü alt uç testis’in extremitas inferior’udur (20).



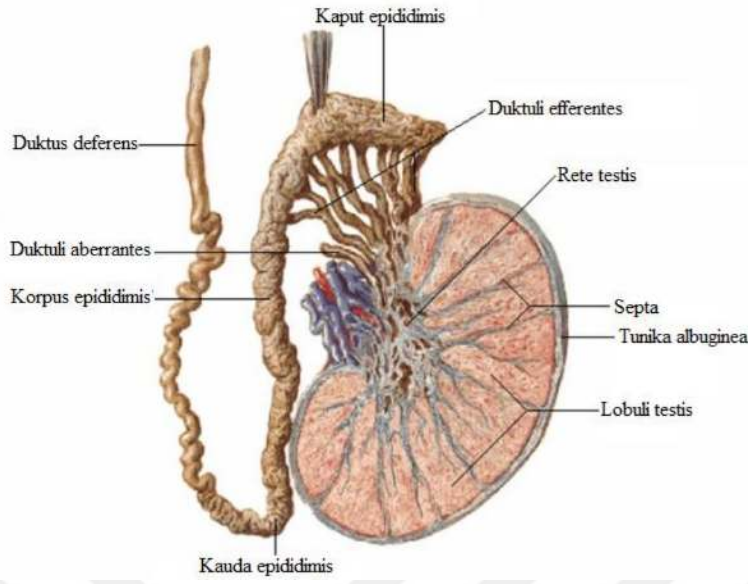
Şekil 1: Scrotum ve Testis Anatomisi(23).

3.1.2. Testis içyapısı

Testis, testis parankimi (parenchyma testis)'nden yapılıdır ve üç yapı ile sarılıdır (22). Dıştan içe doğru sırasıyla tunica vaginalis'e ait lamina visceralis (epiorchium), tunica albuginea ve en içte tunica vasculosa denilen üç tabaka ile çevrelenmiştir (19,20,22). Tunica albuginea'nın içeriye uzantıları olan septula testis'ler, testis'i 200-300 lobuli testis'e ayırırlar. Lobuli testislerin içinde spermilerin üretildiği ve bulunduğu birbirleri ile devamlı kanallar bulunur. Bu kanalların ilki tubuli seminiferi contorti'dir. Daha sonra tubuli seminiferi recti ve rete testis bulunur. Ve son olarak 12-20 adet ductuli efferentes testis ile testisleri terk ederler (19). Epiorchium, testis'in iniş sırasında sürükleyerek taşıdığı parietal periton'un bir bölümü olan saccus vaginalis'e ait olan visseral yapıdır. Epiorchium'un alt kısmında fibröz örtü olan, beyaz renkte ve kalın görünümlü olan tunica albuginea yer alır. Bu tabaka, testis dokusu içine testis'in arka kısmında yer alan ve mediastinum testis (Corpus Higmori) adı verilen vertikal görünümlü ve yarım bir bölüm gönderir. Akabinde mediastinum testis'in ön-yan taraflarından çıkarak, tunica albuginea'nın iç yan kısmına kadar

uzanan ve çok sayıda ve septula testis adı verilen fibröz uzantılar, testis'i piramidal görünüme sahip, sayıları 250 - 300 kadar olan lobuli testis isimli lobçuklara ayırır. Tunica albuginea'nın altında bulunan testis parenkimi örten örtü tunica vasculosa olarak adlandırılır. Kan damarları ve gevşek bir bağ dokudan oluşmuş olun örtü, tunica albuginea'nın iç kısmını testis'lerin septulasını sarar (20,22). Parankim doku (parenchyma testis), lobulus'ların her birinde var olan ve testis içinde 1-4 adet bulunan küçük borucuklar (tubuli seminiferi) benzeri bezden yapılıdır. Tubuli seminiferi'ler gevşek bir bağ doku ile ayrılırlar. Gevşek bağ doku arasında, sarı renkte pigment granülleri bulunduran endokrin hücreler (Leydig hücreleri)'ni içerir ve Interstitium testis olarak isimlendirilir. Bu Leydig hücreleri seks hormonları olarakta adlandırılmış testosteron ve androstenedion hormonlarını salgırlar. Testis 'teki 250-300 lobcukta 600-1000 kadar tubuli seminiferi bulunur. Her bir tubuli seminiferi 75 cm boyunda ise, testis'in kanal uzunluğu 750 m olarak hesaplanmaktadır. Tubuli seminiferi'ler iki bölüme ayrılırlar. İlki tubulus seminiferi convolutus ve ikincisi tubulus seminiferi rectus'tur. Bazı lobçukların tubuli seminiferi contorti (convoluti)'leri lobçukların tepe kısmına doğru uzanırlar. Her bir testis'te var olan 20-30 kadar tubuli seminiferi recti ise mediastinum testis'te birleşerek rete testis'i (Haller) meydana getirirler. Daha sonra rete testis'ten çıkan 10-20 tane ductuli efferentes testis ise caput epididymis'te bulunan ductus epididymis ile birleşirler (22). Seminifer kanalların duvarı iki tür hücre yapısından oluşur. Bu hücreler ise bazal membran üzerinde bulunurlar. Bu hücrelerin ilki Destek hücreleri (Sertoli hücreleri) olarak adlandırılırken, ikincisi ise germinal hücreler (cellulae spermatogenicae) diye adlandırılır (21,22). Tubuli seminiferi contorti'ye ait duvar, sustentakular (Sertoli) ve spermatogenik seri hücreleri olmak üzere iki tip hücre barındıran germinal bir doku ile döşenmiştir. Spermatogenik seri hücreleri bazal lamina ile tübül lümeni ortasında ve 4-8 tabaka halinde dizilidirler. Bu hücre grubu bölünmeler ile farklılaşarak olgun spermi oluşturacak olan spermatogonia, spermatocytes ve spermatid'leri içerirler. Hücre bölünmesiyle oluşan hücre farklılaşma olayına spermatogenes adı verilir. Meny brana basalis'e oturan ve lümene uzantılar gönderen sustentakular hücreler testis'e ait kan-testis bariyerinin oluşturulması ve spermiogenezis'i için gerekenleri temin eder. Gelişme

evresindeki spermatozoaların korunması, beslenmesi ve desteklenmesini düzenler. Aynı zamanda bu hücreler hipofiz'den salgılandığı bilinen follikül sümüle edici hormonun (FSH) salınımını düzenlemekle görevli inhibin, sperm'in genital kanallarda taşınmasına destek olan androjen bağlayıcı hormon salgırlar. Tubuli seminiferi contorti yapıları arasında var olan bağ dokuda damar ve sinirler arasında küme biçiminde interstitial endocrinocytes ya da Leydig hücreleri olarak isimlendirilen endokrin hücreler vardır. Bu hücreler testiküler androgen denilen erkek seks hormonlarını üretirler. Bunlar arasındaki hormonlardan en önemlisi testosteron'dur. Tubuli seminiferi recti, zamanla düzleşen ve sayıları giderek azalan tubuli seminiferi contorti'lerden meydana gelir. Tubuli recti yapısında bulunan bu borucuklar mediastinum testis'e doğru uzanarak ve kendi aralarında anastomoz yaparak rete testis (Haller ağı) olarak isimlendirilen ağı oluşturlar. Rete testis mediastinum testis'in üst kısmında yer alan ve sayılan yaklaşık olarak 12-15 kadar olan kanallara dönüşür. Burası ductuli efferentes testis'in ilk kısmı olup, testis'in kenarının üst bölümünden tunica albuginea'nın içinden delerek çıkarlar (21). Mezonefroz'un bu dejenerasyonunun ardından, her iki tarafta olmak üzere gonad'ların alt taraftaki uçlarından aşağıya doğru gubernaculum olarak adlandırılan bir ligament uzanır. Bu ligament, gelişimin tamamlanmasıyla inguinal kanalı yaratacak olan karın duvarı kısmında oblik olarak geçip, labioscrotal kabartıların iç bölgesine yapışarak son bulur. Testis'lerin scrotum'a inişinde sırasında gubernaculum yol göstericidir. Ve ayrıca testis'leride scrotum'a bağlar. Testis'ler scrotum'a indiklerinde, testisten scrotum derisine uzanan birer ligament (scrotal ligament) olarak kalırlar (20).



Şekil 2: Testis Anatomisi (23).

3.1.3. Testis'lerin nörovasküler yapıları

Aorta abdominalis'ten ayrılan a. testicularis testislerin beslenmesini sağlamaktadır (19,21). Testis'in venöz drenajını sağlayan venler önce plex. pampiniformis'i meydana getirirler. Daha sonra bu pleksustan ayrılan iki adet ven sonradan bir araya gelerek v. testicularis'i oluştururlar. V. testicularis ise daha sonra sağda v. cava inferior'a, solda ise v. renalis'e drene olurlar (19,21,22). Lenfi ise aorta abdominalisin etrafındaki damarlara drene olur (19). Testisten ve epididymis'ten çıkan venler bir araya gelerek plexus pampiniformis olarakta isimlendirilen venöz ağ meydana getirirler. Bu ağ Duktus deferens'in ön kısmında yer alır, üst ucundan başlayan v. testicularis, sağda v. cava inferior'a, solda ise v. renalis sinistra'ya ulaşırlar. Testisin lenf damarları, temel olarak lateral aortik lenf düğümlerine ve az bir kısmı ise preaortik lenf düğümlerine gider (21). Testis otonom sinirler aracılığıyla innerve olur. Sempatik ve parasempatik bu lifler plex. testicularis'i meydana getirirler. Plexus testicularis'e ait bu sinirler a. testicularis ve a. ductus deferentis'ler ile birlikte testis'e ulaşırlar. Sempatikleri medulla spinalis'in T10-12 segmentlerinden, parasempatikleri n. vagus'tan köken alır (22).

3.2. Testis Embriyolojisi

Fötal gelişimde testis'ler karın boşluğunun arka tarafında retroperitonel yerleşim göstererek böbreklerin tam altında bulunurlar. 3. ayda bulundukları bu yerden aşağıya canalis inguinalis'e doğru inmeye başlarlar. 7. Ayda ise artık canalis inguinalis'e geçmiş olurlar. Bu kanal testislerin scrotum'a inişi sırasında bir geçit şeklinde hizmet eder. Testislerin scrotum'a tam inişleri bazen doğumdan sonra bazende doğumdan kısa bir süre önce tamamlanmış olur (descensus testis) (19,20). Canalis inguinalis genellikle testislerin geçişinden sonra kapanır. Kanal tam olarak kapanmamış veya kanalda zorlamaya bağlı yırtık oluşmuşsa inguinal herni (fitik) oluşabilir (20). Testislerin karın boşluğundaki yerlerinden scrotum'a inişinin olmaması durumuna cryptorchism (inmemiş testis) denir. Testis karın boşluğunda veya kasık kanalının herhangi bir bölgesinde kalabilir. Bu durum erken dönemde cerrahi müdahale ile düzeltilebilir. Testis iniş yolu üzerinde bir yerde takılıp kalırsa inmemiş testis adı verilir. Testisin iniş yolundan sapıp başka yere yerleşmesine ise ektopik testis adı verilir. Bu durumlar cerrahi olarak düzeltilmezse testis kanserine yol açabilir. Testisin damarlarının kendi etrafında dönmesi testis torsiyonu olarak bilinir ve çok şiddetli ağrıya neden olur. Testis'in İltihabına orşit adı verilir (19). Düzeltilme yapılmazsa tubuli seminiferi contorti'de atrofi, spermatogenesis ve spermatohistogenesis'in gerçekleşmesini engeller. Testislerin asılı olarak gövdeden uzak olmaları vücut ısısından daha az ısıya sahip olmalarını sağlar. Bu da aktif sperm üretimi ve spermatohistogenesis için gereklidir. Bu nedenle testis'lerin karın boşluğundan scrotum'a inmemeleri durumunda sperm yaşamını sürdüremez ve bu durumdada olgunlaşamaz. Leyding hücrelerinin görevlerini yapıyor olması testislerde testesteron'un varlığını sağlar ancak sperm gelişemez. Ve ne yazıkki bu durumda kısırlık (sterilite) oluşur. Kriptoorşit kişiler steril olmalarına rağmen sekonder seks karakterleri gelişir ve ereksiyon oluşur. Bu kişilerde testis dokusunda multipotent hücre varlığı sebebiyle testis kanser riski fazladır. Soğukta m. cremaster'in kasılması ile testisler yukarı çekilerek vücut ısısına yaklaştırılır. Bu şekilde testis'lerin ısısı sabit kalır. Ter bezleri de testislerin bu ısıda korunmalarına yardımcı olurlar. Vücut sıcaklığı 37 °c iken testiküler sıcaklığın 35 °c olması önemlidir. İnmemiş testislerde, testiküler ısı 37 C'de olduğundan spermatogenesis ve

spermiohistogenesis gerçekleşmez. Kötü beslenme, alkolizm, X ışını ve bazı ilaçlar spermatogenik hücre serisi için toksik olup bu hücrelerin ölümüne neden olurlar. Bu da steriliteye yol açar (20).

3.3. Testis torsiyonu

Testis torsiyonu, funiculus spermaticus'un ve içeriğinin bükülmesidir ve yılda 18 yaşından küçük 100.000 erkekte 3.8'i etkileyen cerrahi bir acil durumdur. TT çocuklarda meydana gelen akut scrotal hastalık sebeplerinin %10 ila %15'ini kapsar ve testis torsiyonu nedeniyle ameliyat edilen erkek çocuklarda orşiektomi oranı %42'dir. Akut scrotum ile başvuran tüm hastalarda testis'in kurtarılması için hızlı tanı ve tedavi gereklidir ve torsiyon dışlanmalıdır. Testis torsiyonu klinik bir tanıdır ve hastalar tipik olarak şiddetli akut tek taraflı skrotal ağrı, bulantı ve kusma ile başvururlar. Fizik muayenede kremasterik refleksin olmadığı yüksekte testis görülebilir. Öykü ve fizik muayene torsiyon düşündürüyorsa, acil cerrahi eksplorasyon endikedir ve görüntüleme çalışmaları yapmak için ertelenmemelidir. Kalıcı iskemik hasar oluşmadan önce tipik olarak dört ile sekiz saatlik bir pencere vardır. Tedavide gecikme infertilite oluşumuna sebep olabilir veya orşiektomi gerektirebilir (24).

3.3.1. Perinatal testis torsiyonu

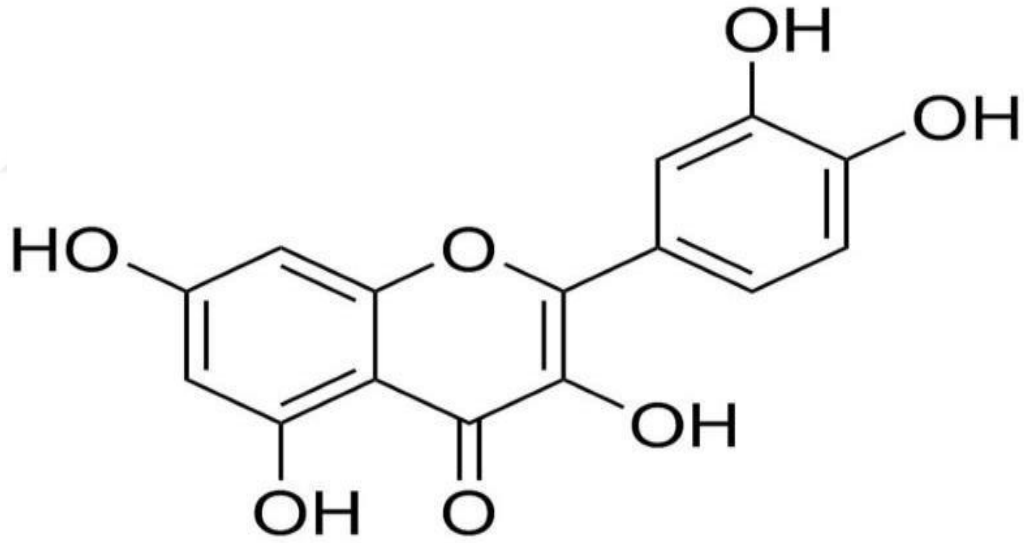
Testis torsiyonu (TT), testisin spermatik kord eklerinin eksenini etrafında dönmesi ve testise kan akışını engelleyerek doku iskemisi ile sonuçlanmasıyla oluşur. Bu, yaşamın ilk ayında meydana gelirse, "perinatal TT" (PTT) veya "neonatal TT" (NTT) olarak adlandırılır. PTT insidansı 100.000 canlı doğumda 6.1'dir. Bu vakaların bazıları doğum öncesi ortaya çıkar. Asemptomatik olabildiği için ilk yenidoğan muayenesinde gözden kaçabilir. Bu nedenle, yetersiz teşhis edildiğinden gerçek insidans çok daha yüksektir. TT türleri arasında ekstravajinal, intravajinal ve mezorkial bulunur. Çoğu PTT vakası ekstravajinaldır. Tanı genellikle fizik muayene ile konulabilir. Ultrasonografi (US), cerrahi müdahale geciktirilmediği sürece diğer

nadir teşhislerin dışlanması yardımcı olabilir. Ameliyatın zamanlaması ile ilgili bazı tartışmalar olmuştur. Torsiyonlu testis kurtarılamayabilir, ancak asemptomatik bilateral TT olasılığı akılda tutulmalı ve eksplorasyon sırasında kontralateral orşiopeksi yapılması asenkron torsiyonu önleyecektir. PTT'de detorse için ameliyat dışı manevralar önerilmez. Bu nispeten nadir durumun değerlendirilmesi, tanısal yaklaşımı ve yönetimi açıklanmaktadır (25,26).

3.4. Quercetin

3.4.1. Quercetin'in Yapısı ve Kaynakları

Acı tatta sarı kristal bir katı olan kuersetin, antioksidanlar arasında baskın flavonoiddir. Birbirine bağlı üç halka ve beş hidroksil grubu ile karakterize edilir ve bol miktarda bulunması ile bilinir.



Şekil 3: Quercetin'in Kimyasal Yapısı

(Erişim: <https://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin> Erişim tarihi: 18.06.2023)

Quercetin; flavonol da denilen flavonoid grubuna dâhil ve hesperidin, rutin, tangeritin ve naringenin gibi diğer çoğu flavonoidin temelini oluşturur (27). Suda

çözünmez fakat alkolde bir miktar çözünebilir, sulu alkali solüsyonlarda ve asetik asitte ise tam çözünür. Quercetin'in kendisi bir aglikon veya aglukondur (28). Glikozidin hidrolizi şeklinde oluşmuş ise kimyasal sentezi de mümkündür (29). Flavonoidler bitkilerde çok miktarda bulunmaktadır. Quercetin, özellikle de soğanda fazla olmakla birlikte meyveler, sebzeler, çay, eğreltiotu, tohumlar, kahve ve doğal boyalar gibi besin ürününde ve bitkilerde bulunmaktadır. Flavonoidler lipid peroksidasyonu ve UV güneş ışığına karşı koruyucudur (30).

3.4.2. Quercetin'in Farmakokinetik Özellikleri

Flavonoid bir bileşik olan quersetin, ince bağırsaktan sınırlı miktarlarda emilir. Bağırsakta mikrobiyota, quersetin'in glikozit formunu quersetin ve şekere parçalar ve bunlar daha sonra enterohepatik sisteme emilebilir. Araştırmalar, enjeksiyon yoluyla uygulanan quersetin'in yaklaşık %25'inin ince bağırsaktan emildiğini göstermiştir (31). Quercetin karaciğere portal dolaşım ile dâhil olur ve burada ilk geçiş metabolizmasına uğrar. Vücudun tüm dokularına geçer ve plazmaya geçtiğinde albumine bağlanır. Quercetin'in tüketilmesi sonrasında 0,7 ile 7,0 saat içinde pik yapar yarılanma ömrü yaklaşık 25 saattir (32). Quercetin yağla tüketildiğinde eliminasyonun çok geciktiği bildirilmiştir (33).

3.4.3. Quercetin'in Yan Etkileri

Quercetin'in oral kullanımı çok iyi tolere edilemez. Yan etki olarak bulantı gibi gastrointestinal etkiler, ekstremitelerde hafif karıncalanma, baş ağrısı görülebilir. İv. uygulanması ise diaforez, bulantı, kusma ve dispneye neden olabilir. Bazı çalışmalarda quercetin'in toksik ve hatta mutajenik oluşu bildirilmiş fakat tam tersinin savunulduğu çalışmalarda mevcuttur (34,35). Quercetin, bazı ilaçlarla etkileşimi sonucu ilaçların etkilerini değiştirebilir. Quercetin'in ya da fazla miktarda içeren greyfurt suyunun kullanıldığı çalışmalarda kanda estradiol (36), siklosporin (37) ve digoksin (38) düzeylerini yükseldiği bildirilmiştir. Çalışmalarda bakterilerdeki DNA giraz denilen bölgesine bağlanarak kuramsal olarak kinolonlarla var olan

bölgeye bağlanmak amacıyla bir yarışa girerek, kinolonların etkisini inhibe edebileceği bildirilmiştir (39).

3.4.4. Quercetin'in Etki Mekanizması

Quercetine ait en belirgin özellik antioksidan özelliğidir. Serbest radikallerin hücreye verdiği zarara yol açan durum lipid peroksidasyonudur. Canlı organizmalar hücrelerin zarar görmesinin engellenmesi amaçlı işlev gören enzimatik veya enzimatik olmayan savunma yani antioksidan sistemlerine sahiptir. Bu antioksidan savunmanın başlıca aktörleri SOD, CAT ve GSHPx' dir. A vitamini, C vitamini ve quercetin gibi fitokimyasallarda diğer savunma sistemleridir. Serbest radikalleri ortadan kaldırdığı için quercetin'in iskemi-reperfüzyonun oluşturduğu doku hasarında koruyucu etkisi bildirilmiştir (40,41). Quercetin, iskemi-reperfüzyon hasarını iNOS aktivitesini etkileyerek oluşturur. iNOS tarafından makrofajlardan salıverilen nitrik oksidin, yüksek konsantrasyonlarda serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturması oksidatif hasara yol açar. Quercetin serbest radikallerin nitrik oksitle reaksiyonuna engel olarak hasar oluşumunu azaltır (42,43). Ksantin dehidrogenaz ve ksantin oksidaz, ksantin'in ürik aside dönüştürülmesi amaçlı önemli enzimlerdir. Fiziki olarak var olan enzim ksantin dehidrogenaz iken, hasara yol açabilecek farklı şartların varlığında ksantin oksidaza dönüşür. Quercetin de ksantin oksidaz enzimini yok ederek oksidatif hasarı aza indirir (44,45). İskemi ve inflamasyon oksidan ve inflamatuvar mediyatörlerin artan varlığı dokuda hasar oluşumu sebebidir. Quercetin ve diğer flavonoidler reperfüzyon sırasında lökosit sayısını azaltarak koruyuculuğu arttırdığı belirtilmiştir (45). Quercetin'in inflamatuvar hastalıkların oluşum sürecinde ve oksidatif strese rol alan TNF- α üretimini ve gen aktivasyonunu doza-bağımlı şekilde önlediğini gösterilmiştir (45). Quercetin aynı zamanda Ca düzenleyici etkisi olan kalmodulini antagonize ederek, ATPazlar ve fosfolipazlar gibi enzimleride inhibe eder. Bu şekilde membran geçirgenliğini etkiler ve aynı zamanda mast hücrelerinden histaminide düşürür (46). Quercetin, histamin ve allerjik/inflamatuvar ajanların yapımında baskıladığından allerjik hastalıklarda da etkili olurlar (47,48). Quercetin'in kolon, meme ve akciğer kanseri gibi hastalıklarda

kanser hücrelerinin büyümesini azalttığı gösterilmiştir (49). Ayrıca Quercetin'nin karcığır kanseri (50), beyin tümörü (51), dalak hasarı (52), rahim ağzı kanseri (53) ve prostat kanseri (54) üzerinde olumlu etkilerinin tespit edildiği güncel çalışmalar yapılmıştır. Bazı çalışmalarda flavonoid tüketiminin ileri yaş erkeklerde koroner kalp hastalıklarından kaynaklı ölüm riskini azalttığı belirtilmiştir (55). Glukozun diyabetik yan etkilere (retinopati, nöropati, nefropati, katarakt vb.) sebep olan sorbitole çevrilmesini sağlayan aldoz redüktaz enzimini azaltarak diyabetik hastalardada yararlı olabileceği görülmüştür (56).

3.4.5. Quercetin Dozajı

Oral yolla günde 15-40 mg Quercetin günlük tüketilen sebze ve meyvelerden alınabilir. Quercetin'in var olan olumlu etkilerinden yararlanabilmek için diyetteki toplam bioflavonoid miktarı artırılabilir ve bu amaçla sebze ve meyve tüketimi arttırılabilir. Ya da quercetin dışarıdan besin desteği şeklinde alınabilir. Fakat tedavi amaçlı doz daha yüksektir ve günde 3 kez 250-500 mg alınmalıdır. Piyasada kapsül ve tablet formları mevcuttur (56).

Bu bilgiler ışığında quersetinin antioksidan etkisi göz önünde bulundurularak, testis torsiyonu ile oluşturulmuş deneysel iskemi/reperfüzyon hasarı üzerine olumlu etkilerinin var olup olmadığı araştırılmış ve biyokimyasal ve histolojik açıdan değerlendirilmiştir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (DÜHADEK) tarafından 2020\36 protokol numarası ile onaylanmıştır. Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından SBE.21.019 no'lu proje bütçesi ile maddi açıdan desteklenmiştir. Çalışmadaki deney hayvanları Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜSAM) laboratuvarından temin edilmiştir. Çalışmanın deneysel bölümü Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (DÜSAM) laboratuvarında yapılmıştır.

4.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Uygulanan Protokol

Ratlar 4 eşit gruba (n:8) ayrıldıktan sonra, operasyon öncesi 6 saat açlığı takiben 90 mg/kg ketamin hidroklorür ve 8 mg/kg xylazine (intramusküler) kullanılarak genel anesteziye alındı. Operasyon öncesi ratların cildi traşlanarak ve %10'luk povidon iyot çözeltisi ile antisepsi sağlandıktan sonra 2,5 cm boyunda scrotum orta hattı insize edildi. Deney gruplarına aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. grup (kontrol): Hayvanlara herhangi bir cerrahi operasyon yapılmadı ve deney sonunda sakrifiye edildi.

2. grup (torsiyon): Genel anestezi uygulaması sırasında sıçanların scrotum'larının ortasından cerrahi bir kesi yapıldı. Sol testis'ler saat yönünde tam 720 derece döndürülerek tunika dartos'a sabitlendi. Kan akışının azaldığı (iskemi) 5 saatlik bir sürenin sonuna doğru, bu gruptaki hayvanlara intraperitoneal salin solüsyonu enjeksiyonu yapıldı. Beşinci saatin sonunda, daha ileri analizler için hayvanlara ötenazi uygulandı.

3. grup (torsiyon/detorsiyon): Hayvanlara genel anestezi verildi ve scrotum'da orta hat kesisinin yapıldığı bir cerrahi prosedür uygulandı. Daha sonra sol testis'ler saat yönünde 720° döndürüldü ve tunika dartos'a sabitlendi. Toplam 5 saatlik kısıtlı kan akışının (iskemi) ardından, bu gruptaki hayvanlara son 30 dakika boyunca salin

enjekte edildi. Beşinci saatin sonunda scrotum dikişleri açıldı, sol testis'ler yeniden konumlandırıldı ve scrotum'lar tekrar kapatıldı. Daha sonra testis'lerin 2 saat boyunca kan akışını yeniden sağlamasına (reperfüzyon) izin verildi. Bu reperfüzyon döneminin sonunda hayvanlara ötenazi uygulandı.

4. grup (torsiyon/detorsiyon+Quercetin): Deney sırasında hayvanlara genel anestezi uygulandı. Scrotum'un ortasına cerrahi bir kesi yapıldı ve sol testis'ler saat yönünde 720° döndürülerek tunika dartosaya sabitlendi. Toplam beş saatlik kısıtlı kan akışının ardından, bu gruptaki sıçanlara son 30 dakika boyunca 30 mg/kg Quercetin intraperitoneal enjeksiyonu yapıldı. Beşinci saat dolduğunda, scrotum'daki dikişler açılarak sol testis'lerin yeniden konumlandırılmasına izin verildi. Scrotum'lar daha sonra tekrar kapatıldı ve testis'ler iki saatlik bir süre boyunca reperfüze edildi. Reperfüzyon süresinin sonunda hayvanlara ötenazi uygulandı.

4.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Yöntem

DeneySEL protokol tamamlandıktan sonra, testis dokusu örnekleri %10 nötr tamponlu formalin çözeltisine daldırıldı ve parafine gömme için standart işlemlerden geçirildi. 24 saatlik bir fiksasyon süresinin ardından, dokular bir gece boyunca yıkandı ve ardından artan konsantrasyonlarda (%50, %70, %80, %90, %96 ve mutlak etil alkol) bir dizi alkol çözeltisine tabi tutuldu. Daha sonra, dokular 30'ar dakikalık üç aralıkla ksilende temizlendi ve 58°C'de parafin ile infiltre edildi. Gömülen dokular daha sonra Hematoksilen-Eozin ve immünohistokimyasal boyama için bir mikrotom (katalog no: Leica RM2265, Wetzlar, Almanya) kullanılarak 4-6 µm kalınlığında dilimler halinde kesildi. Hematoksilen-Eozin boyaması yapmak için parafin bloklardan alınan testis dokusu kesitleri 37°C'de bir benmari içine yerleştirildi. Son olarak, lamlardaki fazla parafini uzaklaştırmak için kesitler etüvde 58-62°C'de 6 saat ısıtıldı.

4.2.1. H&E (Hematoksilen-Eozin) boyama

Kesitler, her biri 15 dakika olmak üzere üç kez ksilene daldırılarak parafinin uzaklaştırılması için işleme tabi tutuldu. Ardından, her biri 10 dakika süreyle azalan konsantrasyonlarda alkolden (%100, %96, %90, %70, %50 etil alkol) geçirildi ve ardından 5 dakika süreyle distile suda bekletildi. Kesitler daha sonra Harris Hematoksilen ile 8 dakika boyandı, 5 dakika akan su altında durulandı ve 6 dakika alkolik eozin boyasına daldırıldı. Ardından, kesitler hızla artan alkol konsantrasyonlarına (%80, %90, %96 etil alkol serileri) daldırıldı, 2 dakika mutlak alkolde tutuldu ve her biri 15 dakika olmak üzere üç kez ksilene batırıldı. Son olarak, dokuya Entellan uygulandı ve üzerine bir lamel yerleştirildi.

4.2.2. İmmunohistokimyasal boyama

Parafin bloklardan alınan kesitler polilizin lamlara aktarıldı ve immünohistokimyasal boyama için 37°C'ye ayarlanmış benmari içinde sıvılaşmaya bırakıldı. Lam üzerindeki fazla parafinin eritilmesi amacıyla kesitler altı saat boyunca 58-62°C'de etüvde tutuldu. Kesitler üç kez 15 dakika süreyle ksilende deparafinize edildi. Kesitler, 5 dakika süreyle distile suya yerleştirilmeden önce her biri 10 dakika süreyle bir dizi aşamalı olarak daha düşük alkol konsantrasyonlarından (%100, %96, %90, %70 ve %50 etil alkol) geçirildi. Kesitleri üç kez beş dakika boyunca yıkamak için fosfat tampon çözeltisi (PBS) kullanıldı. Isı kaynaklı epitop alımı, kesitler EDTA tampon çözeltisine (pH: 8.0, katalog no. ab93680, Abcam, Cambridge, ABD) daldırıldıktan sonra gerçekleştirildi. Kesitler oda sıcaklığında 20 dakika bekletildikten sonra PBS'ye geri konuldu. Kesitler immünohistokimya çubuğuna yerleştirildi ve çubuğun sıcaklık ve nem seviyeleri izlendi.

Kesitler 20 dakika boyunca %3 hidrojen peroksit solüsyonuna (katalog no. TA-015-HP, ThermoFischer, Fremont, CA, ABD) maruz bırakıldı. Bundan sonra, PBS içinde beş dakika süreyle üç kez yıkandı ve ardından Ultra V Blok (katalog no. TA-015-UB, ThermoFischer, Fremont, CA, ABD) içinde yedi dakika süreyle inkübe edildi. TNF- α ve Caspase-9 antikorları, Fremont, California'daki ThermoFischer'dan sırasıyla PA5-16358 ve PHC3015 katalog numaraları kullanılarak kesitlerle +4°C'de

gece boyunca inkübe edildi. Parçalar ertesi gün 30 ila 60 dakika boyunca oda sıcaklığına maruz bırakıldı. Kesitler biyotinlenmiş sekonder antikora (katalog no. TP-015-BN, ThermoFischer, Fremont, CA, ABD) 14 dakika maruz bırakılmadan önce PBS ile durulandı. 15 dakika bekledikten sonra streptavidin-peroksidaz (katalog no. TS-015-HR, ThermoFischer, Fremont, CA, ABD) eklendi. Yıkanan kesitlere diaminobenzidin (DAB) eklendi ve reaksiyon PBS (katalog no. TA-001-HCX, ThermoFischer, Fremont, CA, ABD) ile durdurulmadan önce mikroskop altında izlendi. Kesitler daha sonra entellan (katalog numarası: 107961, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri) ile kaplanıp, Harris hematoksilin ile karşı boyandı, ardından Zeiss Imager A2 fotomikroskop kullanılarak incelendi ve görüntüldü.

İmmunohistokimyasal skorlama yapılırken TNF- α ve Caspase-9 ekspresyonları değerlendirildi. Analizde kullanılmak amacıyla her bir gruptaki kesitlerden 10'ar adet olacak şekilde alınarak ölçüldü ve ortalamaları alındı. Skorlamada;

- 0: Ekspresyon hiç yok ise
- 1: Ekspresyon az ise
- 2: Ekspresyon orta düzeyde ise
- 3: Ekspresyon yüksek düzeyde ise
- 4: Ekspresyon çok yoğun düzeyde ise

Şeklinde değerlendirilme yapılmıştır.

Histopatolojik olarak dejenerasyon, inflamasyon, dilatasyon kriterleride skorlama ile değerlendirildi. Bu değerlendirmede skorlama kriterleri;

- 0: Değişiklik hiç yok ise
- 1: Değişiklik hafif düzeyde ise
- 2: Değişiklik orta düzeyde ise
- 3: Değişiklik yüksek düzeyde ise

4: Değişiklik çok yoğun düzeyde ise
Şeklinde değerlendirime yapılmıştır.

4.3. Biyokimyasal Analiz

Alınan kan örnekleri santrifüj edildi. 3500 rpm 20 dakika olacak şekilde ve plazmaları ayrıştırıldı. Serumlar biyokimyasal analiz için tüm örnekler toplanıncaya kadar -80 °C' de saklandı. ELISA cihazında Malondialdehit (MDA) değerleri ölçüldü. lipid peroksidasyonunun miktarı ve oksidatif stres düzeyi bu parametre belirlendi. Serum örneklerinde MDA düzeyleri $\mu\text{mol/L}$ olarak verildi. Miyeloperoksidaz (MPO) değerleri ölçüldü. İnflamatuvar yanıt oluşumu değerlendirildi. Serum örneklerinde MPO düzeyleri ng /mL olarak verildi. Katalaz (CAT) değerleri ölçüldü. Antioksidan düzeyi ölçüldü. Serum örneklerinde CAT düzeyleri $\mu\text{mol/g}$ olarak verildi.

4.4. İstatistiksel Analizler

İstatiksel analizler IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM Inc, Chicago, IL, USA) bilgisayar programı ile yapıldı. İki ya da daha fazla grubun ortalamalarını karşılaştırmak amacıyla tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) testi kullanıldı. Grupların homojenliği Levene testiyle incelendi. Grupların normal dağılması ve homojen olması durumunda gruplar arasındaki farklılıkların analizi için Post-hoc testlerden Tukey HSD kullanıldı. Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan, en düşük, en yüksek değerler kullanılmıştır. Tüm testlerde $P < 0.05$ hata, istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Tüm gruplardan elde edilen biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal veriler şu şekildedir. Ortalama MDA değerleri grup 1'de $35,2\pm4,8$, grup 2'de $54,2\pm2,3$, grup 3'te $41,4\pm7,7$ ve grup 4'te $37,0\pm3,4$ olarak tespit edildi. Ortalama değerlere bakıldığında en yüksek değer grup 2'de bulundu, diğer gruplarda ise bu ortalama değerlerin grup 3, grup 4 ve grup 1 olarak sıralandığı görülmektedir (Tablo 1). Ortalama MPO değerleri grup 1'de $3,8\pm1,0$, grup 2'de $7,1\pm1,3$, grup 3'te $5,4\pm1,0$ ve grup 4'te $4,0\pm0,6$ olarak tespit edildi. Ortalama değerlere bakıldığında en yüksek değer grup 2'de, diğer gruplarda ise bu ortalama değerlerin grup 3, grup 4 ve grup 1 olarak sıralandığı görülmektedir (Tablo 1). Ortalama CAT değerleri grup 1'de $6,4\pm0,3$, grup 2'de $3,0\pm0,7$, grup 3'te $5,7\pm0,9$ ve grup 4'te $5,8\pm0,6$ bulundu. Ortalama değerlere bakıldığında en düşük değer grup 2'de bulundu diğer gruplarda ise bu ortalama değerlerin grup 3, grup 4 ve grup 1 olarak sıralandığı görülmektedir (Tablo 1). Spermatosit dejenerasyonunun ortalama değerleri grup 1'de $0,4\pm0,5$, grup 2'de $3,5\pm0,5$, grup 3'te $3,4\pm0,7$ ve grup 4'te $2,2\pm1,1$ olarak saptandı. Ortalama değerlere bakıldığında en düşük değer 1. grupta en yüksek değer 2. grupta görülmektedir (Tablo 1). Ortalama dilatasyon değerleri grup 1'de $0,6\pm0,7$, grup 2'de $3,5\pm0,5$, grup 3'te $3,6\pm0,5$ ve grup 4'te $2,7\pm0,9$ olarak saptandı. Ortalama değerlere bakıldığında en yüksek değeri grup 2 ve grup 3'te görülürken en düşük değer grup 1'de görülmektedir (Tablo 1). Ortalama inflamasyon değerleri grup 1'de $0,3\pm0,5$, grup 2'de $3,6\pm0,5$, grup 3'te $3,8\pm0,4$ ve grup 4'te $2,7\pm0,8$ olarak saptandı. Ortalama değerler incelendiğinde en düşük değer grup 1, diğer gruplarda ise bu ortalamaların artan sırada grup 4, grup 2 ve grup 3 olarak sıralandığı görülmektedir (Tablo 1). Ortalama TNF- α değerleri grup 1'de $0,3\pm0,5$, grup 2'de $3,8\pm0,4$, grup 3'te $3,8\pm0,4$ ve grup 4'te $3,1\pm0,7$ olarak tespit edildi. Ortalama değerlere bakıldığında en yüksek ortalama değerler grup 2 ve grup 3'te görülürken, en düşük değer grup 1'de görülmektedir (Tablo 1). Ortalama Caspase-9 değerleri grup 1'de $0,4\pm0,5$, grup 2'de $3,4\pm0,5$, grup 3'te $3,6\pm0,5$ ve grup 4'te $2,7\pm0,8$ olarak tespit edildi. Ortalama değerler incelendiğinde en düşük değer grup 1'de belirlenirken, diğer gruplarda bu ortalamalar grup 4, grup 2 ve grup 3 olarak sıralanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1: Tüm grupların biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal değerleri

Parametre	Grup	N	Ortalama	SD	Min.	Max.
MDA	Grup 1	8	35,2	4,8	25,6	41,3
	Grup 2	8	54,2	2,3	50,3	58,0
	Grup 3	8	41,4	7,7	34,6	55,6
	Grup 4	8	37,0	3,4	30,4	42,6
MPO	Grup 1	8	3,8	1,0	2,3	5,7
	Grup 2	8	7,1	1,3	5,2	9,2
	Grup 3	8	5,4	1,0	3,0	6,8
	Grup 4	8	4,0	0,6	3,1	5,2
CAT	Grup 1	8	6,4	0,3	6,0	6,8
	Grup 2	8	3,0	0,7	2,1	3,9
	Grup 3	8	5,7	0,9	4,3	7,0
	Grup 4	8	5,8	0,6	4,9	6,7
Spermatosit Dejenerasyonu	Grup 1	8	0,4	0,5	0,0	1,0
	Grup 2	8	3,5	0,5	3,0	4,0
	Grup 3	8	3,4	0,7	2,0	4,0
	Grup 4	8	2,2	1,1	1,0	4,0
Dilatasyon	Grup 1	8	0,6	0,7	0,0	2,0
	Grup 2	8	3,5	0,5	3,0	4,0
	Grup 3	8	3,6	0,5	3,0	4,0
	Grup 4	8	2,7	0,9	1,0	4,0
Inflamasyon	Grup 1	8	0,3	0,5	0,0	1,0
	Grup 2	8	3,6	0,5	3,0	4,0
	Grup 3	8	3,8	0,4	3,0	4,0
	Grup 4	8	2,7	0,8	2,0	4,0
TNF-α	Grup 1	8	0,3	0,5	0,0	1,0
	Grup 2	8	3,8	0,4	3,0	4,0
	Grup 3	8	3,8	0,4	3,0	4,0
	Grup 4	8	3,1	0,7	2,0	4,0
Caspase-9	Grup 1	8	0,4	0,5	0,0	1,0
	Grup 2	8	3,4	0,4	3,0	4,0
	Grup 3	8	3,6	0,4	3,0	4,0
	Grup 4	8	2,7	0,8	2,0	4,0

(Grup 1: kontrol, Grup 2: torsiyon, Grup 3: torsiyon/detorsiyon, Grup 4: torsiyon/detorsiyon+quersetin) SD: standart sapma, Min: Minimum değer, Max: Maksimum değer)

MDA verilerine göre 2. grup ile diğer gruplar arasında pozitif korelasyon gözlenmektedir. Böylece grup 2'deki ortalama MDA değerlerinin grup 1, grup 3 ve grup 4'ten elde edilen verilerden anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ($r=19.069$; $r=12.805$; $r=17.220$; $F= 29.488$; $p<0, 01$). Ayrıca 1. ve 3. grup arasında negatif korelasyon olduğu görülmektedir ($r=-6.264$; $p<0.01$). Böylece grup 2 ve 3'te ortalama MDA değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış saptanırken, grup 4'te artış olduğu ancak bu artışın anlamlı olmadığı görülmektedir (Tablo 2).

Tablo 2: MDA verilerine göre gruplar arası korelasyon

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	F	p
Grup 1	1	-19,06900*	-6,26400*	-1,84900		
Grup 2	19,06900*	1	12,80500*	17,22000*	29,488	$p<0,01$
Grup 3	6,26400*	-12,80500*	1	4,41500		
Grup 4	1,84900	-17,22000*	-4,41500	1		

(Grup 1: kontrol, Grup 2: torsiyon, Grup 3: torsiyon/detorsiyon, Grup 4: torsiyon/detorsiyon+quersetin)

MPO verilerine göre 2. grup ile diğer gruplar arasında pozitif korelasyon görülmektedir. Böylece grup 2'deki ortalama MPO değerlerinin grup 1, grup 3 ve grup 4'te elde edilen verilerden anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ($r=3,265$; $r=1,690$; $r=3,148$; $F= 22,554$; $p<0, 01$). Böylece kontrol grubuna göre grup 2 ve 3'te ortalama MPO değerlerinde anlamlı artış varken, grup 4'te artış olmuş ancak bu artış anlamlı görülmemiştir (Tablo 3).

Tablo 3: MPO verilerine göre gruplar arası korelasyon

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	F	p
Grup 1	1	-3,26500*	-1,57500*	-0,11700		
Grup 2	3,26500*	1	1,69000*	3,14800*	22,554	p<0,01
Grup 3	1,57500*	-1,69000*	1	1,45800*		
Grup 4	0,11700	-3,14800*	-1,45800*	1		

(Grup 1: kontrol, Grup 2: torsiyon, Grup 3: torsiyon/detorsiyon, Grup 4: torsiyon/detorsiyon+quersetin)

CAT verilerine göre 2. grup ile diğer gruplar arasında negatif korelasyon görülmektedir. Böylece grup 1, grup 3 ve grup 4'te elde edilen veriler çerçevesinde grup 2'deki ortalama CAT değerlerinin anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi. ($r=-3.343$; $r=-2.626$; $r=-2.765$; $F = 50.855$; $p<0.01$). Kontrol grubuna göre grup 3 ve grup 4'te CAT değerlerinde anlamlı artış olduğu saptandı (Tablo 4).

Tablo 4: CAT verilerine göre gruplar arasındaki korelasyon

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	F	p
Grup 1	1	3,34300*	0,71700	0,57800		
Grup 2	-3,34300*	1	-2,62600*	-2,76500*	50,855	p<0,01
Grup 3	-,71700	2,62600*	1	-0,13900		
Grup 4	-,57800	2,76500*	0,13900	1		

(Grup 1: kontrol, Grup 2: torsiyon, Grup 3: torsiyon/detorsiyon, Grup 4: torsiyon/detorsiyon+quersetin)

Spermatozit dejenerasyon verilerine göre 1. grubun diğer gruplarla negatif korelasyon gösterdiği görülmektedir. Böylece grup 1'deki spermatozit dejenerasyon verilerinin ortalama değerlerinin grup 2, grup 3 ve grup 4'ten elde edilen veriler çerçevesinde anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi ($r=-3,100$; $r=-3,000$; $r=-1,800$; $F= 35.871$; $p<0.01$). Ayrıca torsiyon uygulanan grup 2 ile grup 4 arasında pozitif korelasyon olduğu görülmektedir ($r=1.300$; $F= 35.871$; $p<0.01$). Torsiyon grubuna göre sadece detorsiyonun yetersiz olduğu görülmektedir, ancak Quercetin uygulamalarının spermatozit dejenerasyonunu önemli ölçüde azalttığı belirlendi (Tablo 5).

Tablo 5: Spermatozit dejenerasyonu verilerine göre gruplar arası korelasyon

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	F	p
Grup 1	1	-3,10000*	-3,00000*	-1,80000*		
Grup 2	3,10000*	1	0,10000	1,30000*	35,871	p<0,01
Grup 3	3,00000*	-,10000	1	1,20000*		
Grup 4	1,80000*	-1,30000*	-1,20000*	1		

(Grup 1: kontrol, Grup 2: torsiyon, Grup 3: torsiyon/detorsiyon, Grup 4: torsiyon/detorsiyon+quercetin)

Dilatasyon verilerine göre 1. grup ile diğer gruplar arasında negatif korelasyon olduğu görülmektedir. Böylece grup 1'deki dilatasyon verilerinin ortalama değerlerinin grup 2, grup 3 ve grup 4'ten elde edilen veriler çerçevesinde anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi ($r=-2,900$; $r=-3,000$; $r=-2,100$). ; $F= 40,138$; $p<0.01$). Torsiyon grubu yani grup 2'ye göre grup 4'te dilatasyon anlamlı olarak azalmakla birlikte bu ilişkinin anlamlı olmadığı saptandı ($r=-0,80$; $p>0,01$) (Tablo 6).

Tablo 6: Dilatasyon verilerine göre gruplar arası korelasyon

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	F	p
Grup 1	1	-2,90000*	-3,00000*	-2,10000*	40,138	p<0,01
Grup 2	2,90000*	1	-0,10000	0,80000		
Grup 3	3,00000*	,10000	1	0,90000*		
Grup 4	2,10000*	-0,80000	-,90000*	1		

(Grup 1: kontrol, Grup 2: torsiyon, Grup 3: torsiyon/detorsiyon, Grup 4: torsiyon/detorsiyon+quersetin)

İnflamasyon verilerine göre 1. grup ile diğer gruplar arasında negatif korelasyon olduğu görülmektedir. Böylece grup 1'deki inflamasyon verilerinin ortalama değerlerinin grup 2, grup 3 ve grup 4'ten elde edilen veriler çerçevesinde anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi ($r=-3.300$; $r=-3.500$; $r=-2.400$; $F= 76,131$; $p<0.01$). Ayrıca grup 2 ile grup 4 arasında pozitif korelasyon olduğu görülmektedir ($r=0,900$; $F= 76,131$; $p<0,01$). Grup 2'ye göre grup 3'teki inflamasyon değerlerinde artışa neden olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($r=-0,200$; $p>0,01$) (Tablo 7).

Tablo 7: İnflamasyon verilerine göre gruplar arası korelasyon

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	F	p
Grup 1	1	-3,30000*	-3,50000*	-2,40000*	76,131	p<0,01
Grup 2	3,30000*	1	-0,20000	0,90000*		
Grup 3	3,50000*	0,20000	1	1,10000*		
Grup 4	2,40000*	-0,90000*	-1,10000*	1		

(Grup 1: kontrol, Grup 2: torsiyon, Grup 3: torsiyon/detorsiyon, Grup 4: torsiyon/detorsiyon+quersetin)

TNF- α verilerine göre 1. grubun diğer gruplarla negatif korelasyon gösterdiği görülmektedir. Böylece grup 1'deki TNF- α verilerinin ortalama değerlerinin grup 2, grup 3 ve grup 4'ten elde edilen veriler çerçevesinde anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi ($r=-3,300$; $r=-3,500$; $r=-2,400$; $F= 98.000$; $p<0.01$). Ayrıca 2. grup ile 4. grup arasında pozitif korelasyon olduğu görülmektedir ($r=0.700$; $F= 98.000$; $p<0.01$). Grup 2'ye göre quercetin uygulamalarının TNF- α verilerinin ortalama değerlerini önemli ölçüde azalttığı görülmektedir (Tablo 8).

Tablo 8: TNF-alfa verilerine göre gruplar arası korelasyon

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	F	p
Grup 1	1	-3,50000*	-3,50000*	-2,80000*	98,000	p<0,01
Grup 2	3,50000*	1	0,00000	0,70000*		
Grup 3	3,50000*	0,00000	1	0,70000*		
Grup 4	2,80000*	-0,70000*	-0,70000*	1		

(Grup 1: kontrol, Grup 2: torsiyon, Grup 3: torsiyon/detorsiyon, Grup 4: torsiyon/detorsiyon+quercetin)

Caspase-9 verilerine göre 1. grubun diğer gruplarla negatif korelasyon gösterdiği görülmektedir. Böylece grup 1'deki caspase-9 verilerinin ortalama değerlerinin grup 2, grup 3 ve grup 4'ten elde edilen veriler çerçevesinde anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi ($r=-3.00$; $r=-3.200$; $r= -2.30$; $F= 58.353$; $p<0.01$). Ayrıca grup 3 ile grup 4 arasında pozitif korelasyon olduğu görülmektedir ($r=0,900$; $F= 58,353$; $p<0,01$). caspase-9 verilerinin ortalama değerlerinin grup 4'te grup 3'e göre anlamlı olarak düştüğü görüldü. Grup 3'teki caspase-9 verilerinin ortalama değerlerinin grup 2'ye göre daha yüksek olduğu ancak artışın anlamlı olmadığı belirlendi ($r=0,200$; $p>0,01$) (Tablo 9).

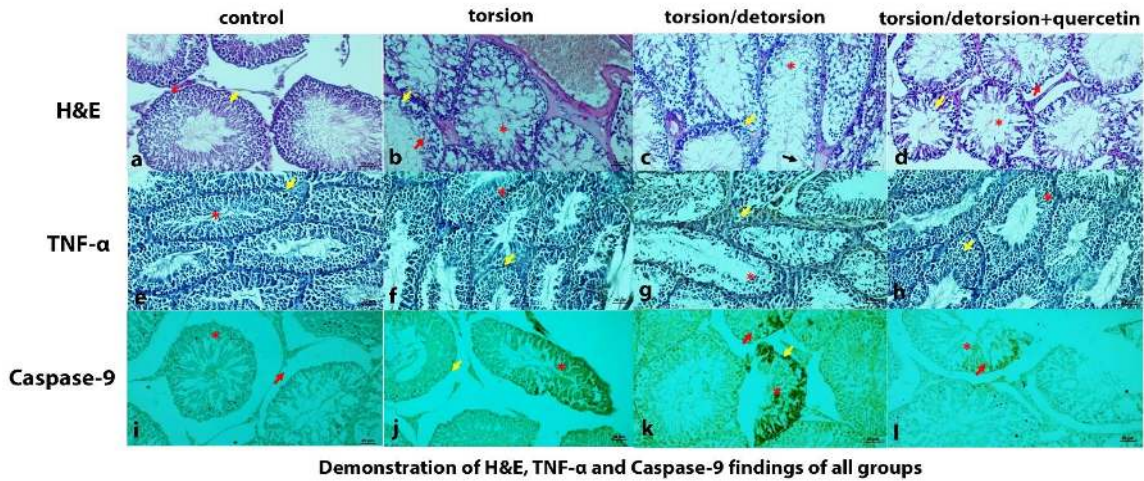
Tablo 9: Caspase-9 verilerine göre gruplar arası korelasyon

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	F	p
Grup 1	1	-3,00000*	-3,20000*	-2,30000*		
Grup 2	3,00000*	1	-0,20000	0,70000		
Grup 3	3,20000*	0,20000	1	0,90000*	58,353	p<0,01
Grup 4	2,30000*	-0,70000	-0,90000*	1		

(Grup 1: kontrol, Grup 2: torsiyon, Grup 3: torsiyon/detorsiyon, Grup 4: torsiyon/detorsiyon+quersetin)

Histopatolojik verilere göre; Kontrol grubunda seminifer tübüllerin enine kesitinde, bazal membran boyunca sıralanmış spermatogonia hücrelerinde (kırmızı yıldızlar) (sarı ok) ve spermatositlerin sertoli hücrelerinde, özellikle kromatinden zengin çekirdekte bulunurlar. Taban zarına yakın geniş bir taban bölgesi ile mitotiktir ve uçları sivridir. Seminifer tübüldeki spermatogoniada genel olarak güçlü bir mitotik aktivite olmasına rağmen, spermyum oluşumları lümene doğru düzenli bir dizilim gösterdi (Şekil 4a). Torsiyon grubu kesitinde seminifer tübüller transvers olarak incelendiğinde bazal membran yapısının özellikle bozulduğu (sarı ok), üzerindeki spermatogonia ve spermatositlerin dejenere olduğu (kırmızı yıldızlar), çekirdeklerin piknotik ve apoptotik bir görünüme sahip oldukları görüldü. 2 seminifer tübül arasında özellikle vakuol yapılarının arttığı, bağ dokusu alanlarının genişlediği (kırmızı ok) ve leydig hücrelerinin yer yer dejeneratif değişiklikler gösterdiği belirlendi. Bunlarda piknotik çekirdekler de bulundu. Özellikle tunika vasküloza bölgesinde kan damarlarında aşırı genişleme ve tıkanıklık durumları tespit edildi (Şekil 4b). Torsiyon/detorsiyon grubu kesitlerinde seminifer tübüllerde bazal membran bütünlüğünün (sarı ok) bozulduğu, özellikle hyalinize alanlarda artış

gözlendiği (siyah ok), iki tübül arasındaki kan damarlarının genişlemesi ve leydig hücrelerinde dejenerasyon saptandı. Seminifer bir tübül incelendiğinde özellikle bazal bölgede spermatogonyumların (kırmızı yıldızların) apoptotik görünümlü hücreler şeklinde ve hyalinize alanlarda çoğaldığı ve yapısal bütünlüğün tamamen kaybolduğu belirlendi (Şekil 4c). Torsiyon/detorsiyon+kuersetin grubunda testis seminifer tübüllerinin transversal kesitinde özellikle bazal membran yapısının belirginleşmeye başladığı (sarı ok), bazı tübüllerde lokal olarak spermatogonia mitotik aktivitelerinin arttığı (kırmızı ok) gözlendi. Ve spermyumların lümene doğru belirginleşmeye başladığı görülmektedir. Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) interlobüler alanda lokal genişlemeler ve hipertrofiler gözlenirken, bağ dokusu alanlarında hücre dışı matriks alanlarının belirgin olduğu görüldü (Şekil 4d).



Şekil 4: (a-ı) Bütün gruplar için H&E, TNF-alfa ve Caspase-9 gösterimi

İmmünohistokimyasal bulgulardan TNF-α; Kontrol grubunda az sayıda plazma hücresinde (sarı ok) TNF-α ekspresyonu pozitif kabul edilirken, genel olarak seminifer tübüllerde, sertoli hücrelerinde ve spermatogoniada (kırmızı yıldızlar) TNF-α ekspresyonu negatif olarak değerlendirildi (Şekil 4e). Torsiyon grubunda Leydig hücreleri (sarı ok) ve sertoli hücrelerinde spermatogonia'nın (kırmızı yıldız) bazal membrana yakın kısımlarında da TNF-α ekspresyonunda artış gözlendi. Bu, dejeneratif değişimden kaynaklanan hasarı gösterir. Nadiren damar çevresinde

inflamasyon ve TNF- α ekspresyon pozitifliği görüldü (Şekil 4f). Torsiyon/detorsiyon grubunda TNF- α , intertübüler alanlarda ve bol miktarda makrofaj hücresinde (sarı ok) arttı. TNF- α pozitifliği, bazal membran peritübüler alanı boyunca hücrelerde gösterildi. Spermatogonya bozulmuştur (kırmızı yıldızlar). Burada hem sertoli hem de spermatogonia TNF- α pozitif olarak değerlendirildi. Bazı sertoli hücrelerinin içinin boş olması dikkat çekici bulundu (Şekil 4g). Torsiyon/detorsiyon+quersetin grubunda spermatogonia iyileşme sürecine girmiştir, ancak bazılarında dejeneratif değişiklikler halen devam etmektedir. TNF- α pozitifliği özellikle dejenere spermatogonia (kırmızı yıldızlar) ve bazı sertoli hücrelerinde gözlendi. TNF- α pozitifliği en çok bazal membran ve leydig hücreleri (sarı ok) aralığında bulundu. Bu, özellikle inflamasyonun arttığını göstermektedir. Spermatogonyumların büyük çoğunluğunda negatif ekspresyon gözlendi (Şekil 4h). İmmünohistokimyasal bulgulardan Caspase-9 bulguları; Kontrol grubunda az sayıda spermatogonyumda (kırmızı yıldız işaretleri) Caspase-9 ekspresyonunun pozitif olduğu görüldü. Ancak hücrelere genel hatlarıyla bakıldığında spermatogonyumlarda (kırmızı ok) az da olsa pozitiflik saptandı (Şekil 4i). Torsiyon grubunda seminifer tübüllerin enine kesitinde, apoptotik durumdaki Caspase-9 hücreleri, özellikle dejenere spermatogonia'da (kırmızı yıldızlar) (sertoli ve bazal membrana bağlı spermatogonia hücreleri) pozitif olarak belirlendi. Bazı leydig hücrelerinde Caspase-9 pozitif olarak değerlendirildi (sarı ok) (Şekil 4j). Torsiyon/detorsiyon grubunda Özellikle seminifer tübüllerin bazılarında yoğun dejeneratif değişiklikler ve sertoli hücreleri ile dejenere hücrelerde (kırmızı yıldızlar) Caspase-9 reaksiyonunda artış gözlendi. Yine bazal membran boyunca sıralanan hücrelerde Caspase-9 ekspresyonu (kırmızı ok), leydig hücrelerinin özellikle periferik doğru olan kısımlarında Caspase-9 reaksiyonu pozitif olarak değerlendirildi (sarı ok) (Şekil 4k). Torsiyon/detorsiyon+quersetin grubunda ise özellikle bazı seminifer tübüllerde tübülün 1/3'ü diyebileceğimiz bölgesinde bazal membran boyunca sıralanmış spermatositler (kırmızı ok) ve primer spermatositler (yıldız) özellikle dejeneratif apoptotik görünümde Caspase-9 pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 4l).

6. TARTIŞMA

Erkeklerde çocukluk ve ergenlik döneminde görülen testis torsiyonu (TT), akut cerrahi ile tedavi edilmesi gereken, ürolojik acil bir durumdur (57,58). TT, spermatik kordun kendi eksenine etrafındaki rotasyonuna bağlı olarak testis ve eklerine kan akışının engellenmesi olarak tanımlanır (57). 25 yaş altı erkek bireylerde görülme sıklığı yaklaşık 1/4000'dir (57). Testis torsiyonunda rotasyon ve devamında arteriyel daralma testis dokusunda hasara neden olan iskemiyi neden olur (4,58). Çoğu kişide, testis 90-180 derece arasında döner ve kan akışı dokuların beslenmesi için istenilen düzeyde sağlanamaz. Tam torsiyon çok az görülür. Şayet olması durumunda dokuların canlılığını hızlı bir şekilde azaltır. Torsiyon 8 saatten az ise dokuların kurtarılması mümkündür, ancak 24 saatten fazla sürmüştse dokuların kurtarılma olasılığı ciddi derecede azalır (59). Etkilenen testis orşiektomi ile tamamen çıkarılabilir veya orşiopeksi yapılarak manuel detorsiyon ile skrotuma sabitlenebilir (4,58). TT'nin sperm motilitesinde düşüşe neden olduğu ve sperm sayısını azalttığı gösterilmiştir. Semen kalitesinin düşmesi iskemik hasar ve reperfüzyon hasarı sonucu meydana geldiği söylenmektedir (58). Kan akışının yeniden sağlanması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimine neden olmaktadır (9). Reaktif oksijen türlerindeki (ROS) aşırı miktarlar hücrelerel indirgeme-oksidasyon (redoks) dengesinin bozulmasına ve hücre hasarlarına yol açabilmektedir (10,11). Ayrıca bu artış antioksidan sistemlerindeki dengesizlik sonucu oksidatif stres (OS) meydana getirmektedir (3,10). Antioksidan ajanlar deneysel çalışmalarda oluşacak bu hasarın en aza indirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bizde çalışmamızda birçok sebze ve meyvede bulunan ve immünomodülatör, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip quersetin'nin oksidatif stres üzerinde rejeneratif etkisini gözleterek çalışmamızda kullandık.

Malondialdehit artışı, zayıf antioksidan durumda lipid peroksidasyonun bir göstergesidir. Oksidatif hasarda lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyindeki artış çalışmalarda bir gösterge olarak kullanılmaktadır (60). Katalaz (CAT), aerobik organizmalarda bulunan bir antioksidan enzimdir. Oksidatif stres veya lipid peroksidasyonu ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışını

etkilemektedir. CAT enzimi, hidrojen peroksitin (H_2O_2) su ve oksijene dönüşmesini sağlayarak ROS seviyelerinin düşmesini ve hücre ölümlerinin azalmasını desteklemektedir (61). Ganoderma lucidum'un testiküler torsiyon/detorsiyon sonucu iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı üzerindeki koruyucu etkisi üzerine yapılan bir çalışmada TS/DT grubunda yükselen MDA düzeylerinin Ganoderma lucidum uygulanan grupta sham grubu düzeylerine düşürüldüğü bildirilmektedir. Ayrıca TS/DT grubunda düşen CAT değerlerinin ise Ganoderma lucidum uygulanan grupta sham grubu düzeylerine yükseldiği bildirilmektedir. (62). (Doğan ve İpek, 2020) Oltipraz'ın testiküler iskemi/reperfüzyon hasarında koruyucu etki gösterdiği başka bir çalışmada MDA seviyeleri, I/R grubunda yüksek iken tedavi grubunda düştüğü ve Sham grupları düzeyine geldiği bildirilmektedir (63). Yeşil ve arkadaşlarının testiküler TS/DT sonrası testis hasarını önemli ölçüde azalttığı bir çalışmada MDA seviyeleri, I/R grubunda yüksek iken tedavi grubunda düştüğü, I/R grubundaki düşen CAT seviyelerinin tedavi grubunda yükseldiği gösterilmiştir (64). Bizim çalışmamızda testis TS/DT sonrası elde ettiğimiz MDA değerlerinin yükselmesi ve CAT değerlerinin anlamlı bir şekilde düşmesi I/R hasarının oluştuğunu göstermektedir. Buda çalışmamızda uygun modelin kullanıldığını göstermektedir. Ayrıca yukardaki çalışmalara paralel olarak TS/DT grubunda yükselen MDA ve düşen CAT düzeylerinin quercetin uygulanan grupta kontrol grubu düzeylerine geldiği saptanmıştır. Bu da quersetinin iyi bir antioksidan olduğu, bozulmuş bu değerleri normal seviyeye getirmede bir regülatör görevi gördüğü anlaşılmaktadır.

Miyeloperoksidaz polimorfonükleer lökositlerin ve monositlerin azurofilik granüllerinde bulunan bir lizozomal hemoproteindir. MPO proteini nötrofillerde çok fazla bulunmaktadır (65). MPO'nun lipid peroksidaz için inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (66). Çalışmamızda testis TS/DT sonrası elde ettiğimiz MPO değerlerinin yükselmesi lipid peroksidasyonunu göstermektedir. TS/DT grubunda I/R hasarında yükselen MPO düzeylerinin quercetin uygulanan grupta düştüğü ve bu değerlerin kontrol grubu düzeylerine geldiği saptanmıştır. Quersetinin MPO düzeyini düşürdüğü ve etkisinin azalmasını sağladığı görülmektedir. Bu da enflamatuar problemlerde patofizyolojik bir rolünün olabileceğini göstermektedir.

Seryum oksidinin testis fonksiyonu ve oksidatif stres üzerindeki koruyucu etkisinin bildirildiği bir çalışmada, TS/TD grubundaki sıçanlarda, germinal hücrelerin kohezyon kaybı, seminifer tübüller içinde dökülmüş germinal hücreler ve pıhtılaşma ile karakterize koagülatif nekrozun olduğu, testiste ciddi dejeneratif değişikliklerin olduğu belirtilmiştir. Ayrıca seminifer tübül epiteli kaybı ve bazı tübüllerin sınırlarında belirsizlikle beraber germ hücrelerinde dağınık bir yapılaşma gösterdiği bildirilmiştir. İnterstisyel bölgede ise hemoraji ve ödemin belirgin olduğu tespit edilmiştir. TS/DT ile birlikte seryum oksit uygulanan grupta, seminifer tübüllerin kıyasla daha sağlam olduğu, germinal hücrelerin daha kohezif olduğu bulunmuştur. Bazı tübüllerde dejenere olmuş, dökülmüş germinal hücreler ve çok çekirdekli dev hücreler tespit edilmiştir. Tübüllerdeki atrofinin azaldığı ve sadece birkaç tübülün sınırlarında düzensizlik görüldüğü söylenmektedir. Kanama ve vasküler ödemde azaldığı söylenmektedir (64). Bir diğer çalışmada TS/DT grubunda seminifer tübüllerin bazal membranlarında bozulma, spermatojenik hücrelerde bozulma, apoptotik hücrelerde artış ve sertoli hücrelerde belirgin deformasyon olduğu gözlenmiştir. TS/DT grubunda hiperplastik çekirdekli spermatojenik hücrelerde ve bazal membrandan lümene doğru ayrılan dejenere sertoli hücrelerinde deformasyonun arttığı belirtilmiştir (67). Başka bir çalışmada TS/DT grubunda seminifer tübül çapın, sham grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu ve testise giden kan akışının bozulması sonucu germ hücre apoptozunun artışı olduğu bildirilmiştir (68). Doğan ve İpek yaptıkları çalışmada TS/DT grubunda tübüllerin bazal membran kalınlığının arttığını, spermatojenik hücrelerin piknozu ve çekirdeklerinde bozulmayı, sperm hücrelerinde atenüe maturasyonu ve dejenere sertoli hücrelerini gözlemlemişlerdir. İnterstisyel bölge kan damarlarında kanama ve dilatasyon, bağ dokusu artışı ve dejenere leyding hücreleri olduğunu belirtmişlerdir. TS/DT+ G. lucidum grubunda TS/DT grubuna göre tübüllerin bazal membran kalınlığında azalma, mitoz artışı ile bazı tübüllerde dejenere ve bozulmuş spermatik hücreler saptadı. Ayrıca interstisyel düzenli bağ dokusu hücrelerinin ve heterokromatin leydig hücrelerinin kan damarlarında çok az kanama olduğu söylenmektedir (62). Çalışmamızda torsiyon grubunda bazal membran yapısının tübülünün bozulduğu, üzerindeki spermatogonia ve spermatositlerin dejenere olduğu,

nükleusların piknotik olduğu ve apoptotik görünümlü hücreler ile seminiferler arasında bağ dokusu alanları olduğu saptandı. Tübül özellikle vakuoller artmış ve leydig hücreleri yer yer dejeneratif değişiklikler göstermiştir. Özellikle tunica vasculosa bölgesinde kan damarlarında aşırı genişleme ve tıkanıklık görüldü. TS/DT grubunda seminifer tübüllerde bazal membran bütünlüğünün bozulduğu, özellikle hyalinize alanlarda artış, tübüller arasındaki kan damarlarında aşırı genişleme ve leydig hücrelerinde dejenerasyon gözlemlendi. Quercetin uygulaması sonrası testis seminifer tübüllerinin enine kesitinde özellikle bazal membran yapısındaki bütünlükte bozulma olmadığı, spermatogonia mitotik aktivitelerinin arttığı ve spermiumun lümene doğru belirginleşmeye başladığı gözlemlendi. Leydig hücrelerinde ise interlobüler alanda lokal genişlemeler ve hipertrofiler gözlenirken, bağ dokusu alanlarında hücre dışı matriks alanları gözlemlendi. Bu da bize quersetin uygulamasının Testis torsiyonunun neden olduğu testis yaralanmasını iyileştirdiğini göstermektedir.

Testisin iskemi-reperfüzyonu germ hücresinde apoptoza neden olur. iskemi-reperfüzyonu takiben oksidatif stres ürünlerinin testislerde biriktiğini ve gözlemlenen germ hücresindeki apoptozun mitokondriyal Caspase-9 ile ilgili olduğu söylenmektedir (69). Caspase-9, kemoterapiler, stres ajanları ve radyasyon dahil olmak üzere çeşitli uyaranlara dahil olan intrinsik veya mitokondriyal yolda kilit bir enzimdir (70). Apoptoz kanser, beyin hastalığı, yaşlanma ve kalp hastalığında çok önemli bir role sahiptir. Caspase-9, apoptozun başlatıcı bir Caspase olması nedeniyle, apoptoz ile ilgili çeşitli hastalıkların önemli bir terapötik hedefidir. Caspase-9'un düzenleyicileri önem arz etmektedir. ((71). Bağışıklık hücreleri, normal testiküler immünosupresör mikro ortamı bozan proinflamatuvar sitokinler, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-17 ve IL-23 salgılar (72). TNF- α çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarda farklı uyaranlar üreten pleiotropik bir sitokindir. Aynı zamanda güçlü bir enflamatuvar aracı ve apoptoz indükleyicidir (73). Çalışmalarda TNF- α enflamatuvar bir biyobelirteç olarak kullanılır (72). Gallik asidin I/R kaynaklı testis hasarı üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada torsiyon ve detorsiyon grubunda artan enflamasyona bağlı olarak dejeneratif spermatogonia, Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve interstisyel makrofajlarda TNF- α ekspresyonu pozitif olduğunu, TS/DT hasarı, artan TNF - α sinyalleri ile apoptotik hücre oluşumunu indüklediğini, Gallik

asit uygulanan grupta dejeneratif spermatositlerde TNF - α aktivitesinin azalmasıyla hücre yapılanmasında yeni bir sürecin başladığı, seminifer tübül hücrelerinde inflamasyonun azaldığı, Sertoli ve Leydig hücrelerinde bu azalmanın olduğunu göstermişlerdir (74). Çalışmamızın Torsiyon grubundaki TNF- α aktivitesi incelendiğinde Spermatogoniumların bazal membrana yakın kısımlarında Leydig hücrelerinde ve Sertoli hücrelerinde TNF- α ekspresyonda artış, İnter tubuler alanda damar çevresinde enflamasyon ve TNF- α ekspresyonda pozitiflik gözlenmiştir. TS/DT grubunda Bazal membran peritübüler alan boyunca hücrelerde TNF- α pozitiflik göstermiş, spermatogonia hücrelerinde bozulma görülmüştür. Hücrelerde TNF- α reaksiyonu enflamasyonla paralel yukarı yöndedir.

Quercetin uygulanan grupta, Spermatogoniaların büyük çoğunluğunda negatif ekspresyon gözlenirken bazı dejenere sertoli ve leydig hücrelerinde enflamasyona bağlı TNF- α ekspresyonu pozitif olarak gözlemlendi. Çalışmamızın Caspase-9 aktivitesi incelendiğinde TNF- α sinyal reaksiyonu ile uyumlu olarak torsiyon grubunda dejenere olmuş spermatogoniaların (bazal membrana yapışık hem sertoli hem spermatogonia hücrelerinde) apoptotik durumdaki Caspase-9 hücrelerinin pozitif olduğu, bazı leydig hücrelerinde de Caspase-9 ekspresyonu pozitif olarak görülmüştür. TS/DT grubunda apoptotik sürecin hızlandığı seminifer tübüllerin bazılarında yoğun dejeneratif değişiklikler ve sertoli hücrelerinde dejenere hücrelerde Caspase-9 reaksiyonunda artış görülmüştür. Özellikle bazal membran boyunca dizilmiş hücrelerde Caspase-9 ekspresyonu pozitif olması mitotik sürecin engellendiğine işaret olduğu düşünülmüştür. Quercetin uygulanan grubun incelemesinde bazal membran boyunca dizilmiş spermatositler primer spermatositler özellikle dejenratif halde olduğu apoptotik görünümde Caspase-9 pozitif hücrelerin bulunduğu görülmüştür. Ancak genel anlamda seminifer tubullerin incelemesinde Quercetin etkisinin spermatogonia hücrelerinde etkili olduğu apoptotik süreci azaltma yönünde olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda testis torsiyonuna karşı quersetin uygulamasının testislerdeki germ hücre apoptozu önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür. Apoptozdaki bu azalma spermatogenez üzerindeki yararlı ve daha az spermatosit dejenerasyonunu göstermektedir. Testis torsiyonunda meydana gelen ROS'un testisteki morfolojik hasarına karşı quersetinin inhibitör ve koruma etkisi

antioksidan ve anti enflamatuar etkisinden kaynaklı olabilir. Quersetin testis torsiyonu ve germ hücre kitlesinin korunmasında fertilitenin önlenmesinde fayda sağlayabilir.



7. SONUÇLAR

Testis dokusunda kan akımının kısıtlanması bağlı iskemi ve buna bağlı olarak reperfüzyon işlemi ile oksidatif stresin artması, inflamasyon ve hücre dejenerasyonu spermatogenez gelişimini olumsuz yönde etkilemiştir. Doku hasarı sonucu artan MDA, MPO ve düşen CAT değerlerinin uygulanan quersetin etkisiyle normal düzeye regüle oldu. Testis torsiyonunun testis dokusunda oluşturduğu hasara karşı quersetin uygulaması koruyucu ve iyileştirici etkiye sahiptir. Quercetin koruyucu etkisinin temel olarak antioksidan özelliğinden kaynaklandığı ve anjiyojenik etkiyi indüklediği, inflamasyon sinyalini azaltarak apoptotik gelişmeyi durdurma yönünde etki gösterdiği ve infertiliteye bağlı germ hücre dejenerasyonunu inhibe edebileceği sonucuna varılmıştır

İskemi/reperfüzyon (İ/R) sonrası oluşan testiküler hasarda reperfüzyon sırasında üretilen serbest oksijen radikalleri artış göstererek hücre membran yapısını ve apoptotik süreci hızlandırmıştır.

Çalışmamızda Oksidatif stres sonucu artan inflamasyon ve hücre dejenerasyonu spermatogenez gelişimini olumsuz yönde etkilemiştir. Quercetin koruyucu etkisinin temel olarak antioksidan özelliğinden kaynaklandığı ve anjiyojenik etkiyi indüklediği, inflamasyon sinyalini azaltarak apoptotik gelişmeyi durdurma yönünde etki gösterdiği ve infertiliteye bağlı germ hücre dejenerasyonu inhibe edebileceği düşünülmüştür. Çalışmamızın daha kapsamlı çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

8. KAYNAKÇA

1. Beers M, Porter R, Jones T, Kaplan J, Berkwits M. The Merck Manual-tanı/tedavi El Kitabı (18 bs.): Yüce Yayın. 2008, p:2024-2030.
2. Lacy A, Smith A, Koyfman A, Long B. High risk and low prevalence diseases: Testicular torsion. Am J Emerg Med. 2023;66:98-104.
3. Vaos G, Zavras N. Antioxidants in experimental ischemia-reperfusion injury of the testis: where are we heading towards? World J Methodol. 2017;7(2):37.
4. Michail A, Ioanna G, Euaggelia S, Ioannis T, Christina P, Ioannis P. New insights about prognosis of Spermatic Cord Torsion. Urologia. 2023;391560323115567.
5. Hadziselimovic F, Geneto R, Emmons LR. Increased apoptosis in the contralateral testes of patients with testicular torsion as a factor for infertility. J Urol. 1998;160(3 Part 2):1158-60.
6. Qin KR, Qu LG. Diagnosing with a TWIST: Systematic Review and Meta-Analysis of a Testicular Torsion Risk Score. J Urol. 2022;208(1):62-70.
7. Almarzouq D, Al-Maghrebi M. NADPH Oxidase-Mediated Testicular Oxidative Imbalance Regulates the TXNIP/NLRP3 Inflammasome Axis Activation after Ischemia Reperfusion Injury. Antioxid Basel Switz. 2023;12(1):145.
8. Türk H, Çelik O, İşoğlu Cs, Tarhan H, İlbey Yö. Erişkinde Testis Torsiyonu. Tepecik Eğit Hast Derg. 2014;24(1):73-6.
9. Minutoli L, Puzzolo D, Rinaldi M, Irrera N, Marini H, Arcoraci V, et al. ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation in brain, heart, kidney, and testis ischemia/reperfusion injury. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016.
10. Aprioku JS. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. J Reprod Infertil. 2013;14(4):158.
11. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol Rev. 2001;53(1):135-59.

12. Saçık U, Çavdar Z, Ural C, Ersoy N, Özoğul C, Erbil G. Effect of ferulic acid on testicular damage caused by torsion-detorsion in rats. *Biotech Histochem.* 2023;98(2):77-85
13. Taheri S, Davoodi F, Raisi A, Zakian A, Rajabzadeh A, Hablolvarid MH, et al. Co-administration of *Salvia miltiorrhiza* and verapamil inhibits detrimental effects of torsion/detorsion on testicular tissue in rats. *Andrologia.* 2021;53(6):e14049.
14. Demir S, Kazaz IO, Kerimoglu G, Ayazoglu Demir E, Colak F, Yilmaz S, et al. Astaxanthin protects testicular tissue against torsion/detorsion-induced injury via suppressing endoplasmic reticulum stress in rats. *J Invest Surg.* 2022;35(5):1044-9.
15. Sallam AA, Ahmed MM, El-Magd MA, Magdy A, Ghamry HI, Alshahrani MY, et al. Quercetin-Ameliorated, Multi-Walled Carbon Nanotubes-Induced Immunotoxic, Inflammatory, and Oxidative Effects in Mice. *Mol Basel Switz.* 2022;27(7):2117.
16. Chow JM, Shen SC, Huan SK, Lin HY, Chen YC. Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(12):1839-51.
17. Mahmoud MF, Hassan NA, El Bassossy HM, Fahmy A. Quercetin protects against diabetes-induced exaggerated vasoconstriction in rats: effect on low grade inflammation. *PloS One.* 2013;8(5):e63784.
18. Abdelnour SA, Sindi RA, Abd El-Hack ME, Khalifa NE, Khafaga AF, Noreldin AE, et al. Quercetin: Putative effects on the function of cryopreserved sperms in domestic animals. *Reprod Domest Anim Zuchthyg.* 2023;58(2):191-206.
19. Şahin B. Sağlık Bilimleri İçin Resimli Temel Anatomi. İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık. İstanbul. 2019, s:173-176.
20. Gökmen F.G. Sistematik Anatomi. İzmir Güven Kitabevi. İzmir. 2023, s:548-554.
21. Ozan H. Ozan Anatomi. TUSDATA Yayınları 3. Baskı. Ankara. 2014, s:441-446.
22. Yıldırım M. Yıldırım M. İnsan Anatomisi 2. Nobel Yayınları. İstanbul. 2006, s:181-190.

23. Netter, FH. İnsan Anatomisi Atlası. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002.
24. Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM. Testicular torsion: diagnosis, evaluation, and management. *Am Fam Physician*. 2013;88(12):835-40.
25. Kylat RI. Perinatal testicular torsion. *Arch Pédiatrie*. 2021;28(1):75-9.
26. Kylat RI, Ahmed MN. Neonatal testicular torsion. *Afr J Paediatr Surg AJPS*. 2022;19(1):1.
27. Wang Y, Wan R, Peng W, Zhao X, Bai W, Hu C. Quercetin alleviates ferroptosis accompanied by reducing M1 macrophage polarization during neutrophilic airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2023;938:175407.
28. Moskaug JØ, Carlsen H, Myhrstad M, Blomhoff R. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech Ageing Dev*. 2004;125(4):315-24.
29. Krishnamurty HG, Cheng KJ, Jones GA, Simpson FJ, Watkin JE. Identification of products produced by the anaerobic degradation of rutin and related flavonoids by *Butyrivibrio* sp. C3. *Can J Microbiol*. 1970;16(8):759-67.
30. Mariani C, Braca A, Vitalini S, De Tommasi N, Visioli F, Fico G. Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of *Aconitum anthora* L.(Ranunculaceae). *Phytochemistry*. 2008;69(5):1220-6.
31. Bokkenheuser VD, Shackleton CH, Winter J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochem J*. 1987;248(3):953-6.
32. Young JF, Nielsen SE, Haraldsdóttir J, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, et al. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(1):87-94.
33. Lesser S, Cermak R, Wolffram S. Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *J Nutr*. 2004;134(6):1508-11.
34. Trzeciak A. Quercetin: significance in mutagenesis and carcinogenesis. *Postepy Biochem*. 2001;47(4):299-306.

35. Kato K, Mori H, Fujii M, Bunai Y, Nishikawa A, Shima H, et al. Lack of promotive effect of quercetin on methylazoxymethanol acetate carcinogenesis in rats. *J Toxicol Sci.* 1984;9(4):319-25.
36. Weber A, Jäger R, Börner A, Klinger G, Vollan R, Matthey K, et al. Can grapefruit juice influence ethinylestradiol bioavailability? *Contraception.* 1996;53(1):41-7.
37. Amatori FM, Meucci V, Giusiani M, Soldani G, Corazza M, Giorgi M. Effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of cyclosporine in dogs. *Ultrasound.* 2004;40:44-57.
38. Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem.* 1999;47(6):2274-9.
39. Hilliard JJ, Krause HM, Bernstein JJ, Fernandez JA, Nguyen V, Ohemeng KA, et al. A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Antimicrob Resist Crisis Health Care.* 1995;59-69.
40. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet.* 1994;344(8924):721-4.
41. Halliwell B. How to characterize an antioxidant: an update. *İçinde: Biochemical Society Symposium.* 1995. s. 73-101.
42. Shoskes DA. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: A new class of renoprotective agents: 1. Transplantation. 1998;66(2):147-52.
43. Huk I, Brovkovich V, Nanobash Vili J, Weigel G, Neumayer C, Partyka L, et al. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia–reperfusion injury: an experimental study. *Br J Surg.* 1998;85(8):1080-5.
44. Özevren H, Deveci E, Tuncer MC. Histopathological changes in the choroid plexus after traumatic brain injury in the rats: a histologic and immunohistochemical study. *Folia Morphol.* 2018;77(4):642-8.

45. Friesenecker B, Tsai AG, Allegra C, Intaglietta M. Oral administration of purified micronized flavonoid fraction suppresses leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury: in vivo observations in the hamster skin fold. *J Vasc Res.* 1994;14(1-2):50-5.
46. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol.* 1983;32(7):1141-8.
47. Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Bhagwat S, et al. Flavonoid content of US fruits, vegetables, and nuts. *J Agric Food Chem.* 2006;54(26):9966-77.
48. Mlcek J, Jurikova T, Skrovankova S, Sochor J. Quercetin and its anti-allergic immune response. *Molecules.* 2016;21(5):623.
49. Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The anti-cancer effect of quercetin: molecular implications in cancer metabolism. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3177.
50. Sethi G, Rath P, Chauhan A, Ranjan A, Choudhary R, Ramniwas S, et al. Apoptotic Mechanisms of Quercetin in Liver Cancer: Recent Trends and Advancements. *Pharmaceutics.* 2023;15(2):712.
51. Shala AL, Arduino I, Salihu MB, Denora N. Quercetin and Its Nano-Formulations for Brain Tumor Therapy-Current Developments and Future Perspectives for Paediatric Studies. *Pharmaceutics.* 2023;15(3):963.
52. Shukla P, Sahu NK, Kumar R, Dhalla DK, Rakshit S, Bhadauria M, et al. Quercetin ameliorates acute acrylamide induced spleen injury. *Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm.* 2023;98(4):221-9.
53. Murata M, Komatsu S, Miyamoto E, Oka C, Lin I, Kumazoe M, et al. Quercetin up-regulates the expression of tumor-suppressive microRNAs in human cervical cancer. *Biosci Microbiota Food Health.* 2023;42(1):87-93.
54. Mirzaei A, Deyhimfar R, Azodian Ghajar H, Mashhadi R, Noori M, Dialameh H, et al. Quercetin can be a more reliable treatment for metastatic prostate cancer than the localized disease: An in vitro study. *J Cell Mol Med.* 2023;27(12):1725-34.

55. Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D, Hertog MGL, Hollman PCH, Hertog MGL, et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*. 1993;342(8878):1007-11.
56. 1-Benzopyran-4-one Antioxidants as Aldose Reductase Inhibitors | *Journal of Medicinal Chemistry*. [a.yer 23 Haziran 2023]. Erişim adresi: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm980441h>
57. Yecies T, Bandari J, Schneck F, Cannon G. Direction of rotation in testicular torsion and identification of predictors of testicular salvage. *Urology*. 2018;114:163-6.
58. Jacobsen FM, Rudlang TM, Fode M, Østergren PB, Sønksen J, Ohl DA, et al. The impact of testicular torsion on testicular function. *World J Mens Health*. 2020;38(3):298.
59. Schick MA, Sternard BT. Testicular Torsion. İçinde: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [a.yer 02 Mart 2023]. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448199/>
60. Lykkesfeldt J, Viscovich M, Poulsen HE. Plasma malondialdehyde is induced by smoking: a study with balanced antioxidant profiles. *Br J Nutr*. 2004;92(2):203-6.
61. Raza A, Su W, Gao A, Mehmood SS, Hussain MA, Nie W, et al. Catalase (CAT) gene family in rapeseed (*Brassica napus* L.): genome-wide analysis, identification, and expression pattern in response to multiple hormones and abiotic stress conditions. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):4281.
62. Doğan G, İpek H. The protective effect of *Ganoderma lucidum* on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion (I/R) injury. *Acta Cirúrgica Bras*. 2020;35.
63. Can O, Canat L, Eraldemir FC, Acar E, Yildirim F, Sonmez K, et al. Protective effect of oltipraz in testicular ischaemia/reperfusion injury: an experimental study. *Andrologia*. 2022;54(1):e14245.
64. Yesil S, Ozdemir C, Arslan M, Gundogdu AC, Kavutcu M, Atan A. Protective effect of cerium oxide on testicular function and oxidative stress after torsion/detorsion in adult male rats. *Exp Ther Med*. 2023;25(1):1-13.

65. Segelmark M, Persson B, Hellmark T, Wieslander J. Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin? Clin Exp Immunol. 1997;108(1):167-74.
66. Kiyohara C, Yoshimasu K, Takayama K, Nakanishi Y. NQO1, MPO, and the risk of lung cancer: a HuGE review. Genet Med. 2005;7(7):463-78.
67. Dursun R, Sen A, Yaman M, Durgun HM, Asir F. Effects of carvacrol on experimental testicular torsion-detorsion model: Investigation by immunohistochemistry. Anal Quant Cytopathol Histopathol. 2020;42(4):125-32.
68. Meštrović J, Pogorelić Z, Drmić-Hofman I, Vilović K, Todorčić D, Popović M. Protective effect of urapidil on testicular torsion–detorsion injury in rats. Surg Today. 2017;47:393-8.
69. Lysiak JJ, Zheng S, Woodson R, Turner TT. Caspase-9-dependent pathway to murine germ cell apoptosis: mediation by oxidative stress, BAX, and caspase 2. Cell Tissue Res. 2007;328:411-9.
70. Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. Oncotarget. 2017;8(14):23996.
71. Kim B, Srivastava SK, Kim SH. Caspase-9 as a therapeutic target for treating cancer. Expert Opin Ther Targets. 2015;19(1):113-27.
72. Jacobo P, Guazzone VA, Theas MS, Lustig L. Testicular autoimmunity. Autoimmun Rev. 2011;10(4):201-4.
73. Postal M, Appenzeller S. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Cytokine. 2011;56(3):537-43.
74. Sogiitcii N, Yokus B. Effects of gallic acid on ischemia-reperfusion induced testicular injury in a rat testicular torsion model. Anal Quant Cytopathol Histopathol. 2021;43(1).

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Rabia	Soyadı	GEZER
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu		Tel	
E-posta			

EĞİTİM DURUMU

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)

Yabancı Dil Sınav Notu								

ALES Puanı			
-------------------	--	--	--

10. EKLER

10.1. Ek- 1. Etik Kurul Karar Formu

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ PROF.DR. SABAHATTİN PAYZİN SAĞLIK BİLİMLERİ ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (DÜHADEK)					
ETİK KURULU KARARI					
TOPLANTI TARİHİ	09/12/2020	KARAR NO	2	TOPLANTI SAYISI	8
KARAR: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi ABD Prof. Dr. M. Cudi TUNÇER' in yürütücüsü olduğu, Doktora Öğrencisi Rabia GEZER, Prof. Dr. Engin DEVECİ, Arş. Gör. Fırat AŞIR' ın yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Sıçan Testisinde Oluşturulan Deneysel İskemi-Reperfüzyon Hasarında Quercetin Etkisinin Araştırılması." başlıklı ve 2020/36 protokol numaralı çalışma; Etik kurulumuzca görüşülmüş olup, daha önceden belirtilen eksikler/düzeltilmeler yapılmış olduğu, başkan ve raporör tarafından görülerek uygun olduğuna karar verilmiştir.					
Deneysel Hayvanın	Türü Sprague Dawley	Cinsiyeti Erkek	Sayısı 32	Yaşı 12 Hafta, 250-300 gr	
KATILIMCILARIN					
ÜNVANI	ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA		
Prof. Dr.	Beran YOKUŞ	(BAŞKAN)			
Prof. Dr.	Ayşe MEŞE	(ÜYE)			
Doç. Dr.	Selçuk TUNİK	(ÜYE)			
Doç. Dr.	Ramazan DEMİREL	(ÜYE)			
Doç. Dr.	Mehmet Erdem AKBALIK	(ÜYE)			
Doç. Dr.	Mehmet Hüseyin ALKAN	(ÜYE)			
Doç. Dr.	Ulaş ALABALIK	(ÜYE)			
Doç. Dr.	Feray ALTAN	(ÜYE)			
Doç. Dr.	Elif VARHAN ORAL	(ÜYE)			
Dr. Öğr. Üyesi	Ersin UYSAL	(ÜYE)			
Dr. Öğr. Üyesi	Akan KOÇHAN	(ÜYE)			
Dr. Öğr. Üyesi	Selim KARAHAN	(ÜYE)			
Öğr. Gör.	Ömer Faruk KATANALP	(ÜYE)			
Avukat	Abdullah YAVUZ	(ÜYE)			
Öğretmen	M. Yavuz KAHRAMAN	(ÜYE)			

KYK-FRM-387/00

İletişim: DÜŞTAM binası, Zemin Kat, DÜŞAM laboratuvarları (İlahiyat Fak. Karşısı) 21280 Sür /DİYARBAKIR
E-posta: dusam@dicle.edu.tr/Sekreterya: 0 412 248 8431 (3956) Vet.Hekim: 0 412 2488001-16 hat (4423)

10.2. Ek- 2. Makale

Tezden üretilmiş yayınımıza ilişkin bilgiler aşağıda verilmiştir.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v13i6.6106>

Gezer et al. Journal of Drug Delivery & Therapeutics. 2023; 13(6):60-65

Available online on 15.06.2023 at <http://jddtonline.info>

Journal of Drug Delivery and Therapeutics

Open Access to Pharmaceutical and Medical Research

Copyright © 2023 The Author(s). This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC 4.0 which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium for non-commercial use provided the original author and source are credited

Check for updates

Research Article

Investigation of the Effect of Quercetin in Experimental Ischemia-Reperfusion Injury Model in Rat Testicle

Rabia Gezer¹, Mehmet Cudi Tuncer^{2,*}, Zeynettin Kasirga³, Engin Deveci⁴, Fırat Aşır⁴

¹ Bingöl State Hospital, Bingöl, Turkey

² Dicle University, Medical School, Department of Anatomy, Diyarbakır, Turkey

³ Kilis 7 Aralık University, Vocational School of Health Services, Department of Therapy and Rehabilitation, Physiotherapy Pr., Kilis, Turkey

⁴ Dicle University, Medical School, Department of Histology and Embryology, Diyarbakır, Turkey

Article Info:

Abstract

Article History:

Received 18 April 2023
Reviewed 13 May 2023
Accepted 27 May 2023
Published 15 June 2023

Cite this article as:

Gezer R, Tuncer MC, Kasirga Z, Deveci E, Aşır F. Investigation of the Effect of Quercetin in Experimental Ischemia-Reperfusion Injury Model in Rat Testicle. Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 2023; 13(6):60-65

DOI: <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v13i6.6106>

***Address for Correspondence:**

Mehmet Cudi TUNCER, Address: D.D. Tıp Fakültesi
Anatomi ABD Telephone Work:
04122488001/4539 Mobile: 05322744926
rabiagezerr@gmail.com

Abstract

Testicular torsion (TT) is the most important cause of acute scrotum in childhood. It is an emergency surgical problem that can lead to loss of organ if left untreated. The aim of treatment is to reduce or eliminate the torsion/detorsion damage. The affect of antioxidants is one of the methods to be used for this reason. In this study, a special bioflavonoid and quercetin, an antioxidant known to protect against oxidative damage, were used to avoid experimentally caused torsion/detorsion damage in rats.

32 male Sprague Dawley rats, 12 weeks old, weighing 250-300 g, were used in the study. Rats were randomized into 4 groups. No surgical procedure was performed in the control group. 5-hour ischemia was achieved by applying torsion to the left testicle in the torsion group. After 5 hours of ischemia, a 2-hour reperfusion was applied in the torsion/detorsion group. In the torsion/detorsion+quercetin group, 2 hours of reperfusion was applied after 5 hours of ischemia and i.p. quercetin was injected.

A significant decrease was observed in the quercetin-administered group in terms of spermatocyte degeneration and inflammation. There was a decrease in dilatation data in the quercetin group, but it was not statistically significant.

Quercetin, which has a strong antioxidant effect, has been shown to have positive effects on experimentally induced torsion/detorsion damage.

Keywords: Testicular torsion, ischemia-reperfusion, antioxidant, quercetin, Inflammation

INTRODUCTION

Testicular torsion is defined as a urological emergency that can lead to permanent ischemic damage to the testicles as a result of the rotation of the "funiculus spermatic" on its axis and the disruption of vascular flow ¹⁻³. Although it is seen in adults, most cases are said to occur in the first years of life and between 12-18 years of age. The most common symptom is unilateral scrotal pain, with nausea and vomiting. The diagnosis of the presence of torsion as a result of the examinations requires both early and correct treatment. Otherwise, testicular losses that are difficult to heal may occur. Manual detorsion can be applied while waiting for transfer or urology consultation in the emergency department ². Rapid diagnosis and treatment can prevent further damage to the torsed testis. For this, the duration of the symptoms, the degree of bending and the homogeneity of the testicular parenchyma together with advanced ultrasound findings are important. More than 4-8 hours after the onset of symptoms can lead to cell necrosis and, as a result, cell loss in the testicular tissue ⁴. It has been stated in experimental studies that germ cells, particularly spermatogonia and spermatocytes, are most vulnerable type of cells to testicular ischemia ⁵. Additionally, it is said that in instances where early

intervention is not made, the likelihood of conducting an orchiectomy rises ⁶. It has been reported that using Testicular Torsion Risk Score will be appropriate to evaluate acute scrotal pain in early diagnosis. The parameters of this test are testicular swelling (2 points), hard testis (2 points), elevated testicles (1 point), absence of cremaster reflex (1 point), and nausea/vomiting (1 point) with a total score of 7 points ⁶. Testicular torsion may cause ischemic injury, while detorsion may cause reperfusion injury. Ischemic reperfusion injury can cause testicular problems such as oxidative stress (OS), inflammation and germ cell death ⁷. Although surgery fixation is required before departing the hospital, external manual reduction can be used as starting treatment ^{1,3}. In addition, prophylactic fixation should be performed to prevent torsion at the contralateral testis ¹. Orchiectomy is performed if the affected testis has lost its vitality and cell degeneration has developed ⁸.

Antioxidant agents have been used in experimental studies to prevent this situation. These antioxidants consist of various natural and pharmaceutical agents that can prevent or ameliorate the harmful effects of I/R injury ³. Studies using molecular assays have demonstrated that testicular torsion-induced ischemia/reperfusion increases the production of free

11. ORJİNALLİK RAPORU

SIÇAN TESTİSİNDE OLUŞTURULAN DENEYSEL İSKEMİREPERFÜZYON HASARINDA QUERSETİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 11	% 10	% 6	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
2	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	EROĞLU, Ahmet, TOPUZ, Ali Kıvanç, ŞİMŞEK, Hakan, DİNÇ, Cem, DEMİREL, Dilaver and İPÇİOĞLU, Osman. "Bir antiepileptik ajan olan topiramatin nöroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travma modelinde incelenmesi", Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Derneği, 2016. Yayın	%1
4	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
6	ÖRGÜL, Gökçen, SOYAK, Burcu, AYDIN, Emine, TANAÇAN, Atakan, ÇAĞAN, Murat and	%1