

**TESTİS TORSİYONUNDA TİMOKİNONUN NRF2
EKSPRESYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

BETÜL MUTLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ KAYIHAN KARAÇOR**

DÜZCE, 2025

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TESTİS TORSİYONUNDA TİMOKİNONUN NRF2
EKSPRESYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Betül MUTLU tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR

Düzce Üniversitesi

Eş Danışman

Doç. Dr. Hakan SOYLU

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR

Düzce Üniversitesi

Doç. Dr. Ersin BEYAZÇİÇEK

Düzce Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ertan KATIRCI

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 16/07/2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda 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 beyan ederim.

16 Temmuz 2025

Betül MUTLU



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi, deneyim ve akademik birikimleriyle yol gösteren, bilimsel bakış açımı geliştirmemde önemli katkılarda bulunan kıymetli danışmanlarım Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR ve Doç. Dr. Hakan Soylu hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince akademik ve kişisel anlamda desteklerini esirgemeyen bölüm arkadaşlarım Selcan Burak ve Zeynep Sare'ye teşekkür ederim.

Teşekkürlerin az kalacağı, diğer üniversite hocalarımda, 4 yıllık eğitim hayatım boyunca bilgi, deneyim ve rehberlikleriyle bana verdikleri destek için hepsine teker teker teşekkürlerimi sunuyorum.

Ve son olarak hayatımın her aşamasında yanımda olan, koşulsuz sevgi ve destekleriyle bana güç veren en büyük şansım aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi 2024.04.01.1516 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

16 Temmuz 2025

Betül MUTLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
KISALTMALAR	x
SİMGELER.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	3
2.1. DENEY HAYVANLARI	3
2.2. DENEY GRUPLARI, MADDELER VE DOZLARI	3
2.3. CERRAHİ PROSEDÜR.....	4
2.4. İZLENEN YOL	5
2.5. DENEYİN SONLANDIRILMASI VE DOKU ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI	7
2.6. DOKU TAKİBİ VE PARAFİN BLOK HAZIRLAMA	7
2.7. IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME	8
2.7.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması	8
2.7.2. İmmünohistokimyasal Boyama	9
2.8. JOHNSEN SKORLAMASI	11
2.9. H SKORLAMASI	12
2.10. İSTATİKSEL ANALİZLER	13
3. GENEL BİLGİLER.....	14
3.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ.....	14
3.2. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ.....	15
3.3. TESTİS ANATOMİSİ	17
3.4. TESTİS HİSTOLOJİSİ.....	19
3.4.1. Seminifer Tübüller	20
3.4.2. Spermatogenik Hücreler (Germ Hücreleri)	22
3.4.3. Spermatogenez	22
3.4.3.1. Spermatogonyum fazı (Mitoz)	23
3.4.3.2. Spermatosit fazı (Mayoz).....	24
3.4.3.3. Spermatid fazı (Spermiyogenez).....	25
3.4.4. İntertisyel Hücreler (Leydig Hücreleri)	27
3.4.5. Genital Kanallar	28
3.4.5.1. İntratestiküler Genital Kanallar.....	28
3.5. TESTİS TORSİYONU	28
3.5.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı (İ/R Hasarı).....	30
3.5.1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Oksidatif Stres.....	30
3.6. ANTİOKSİDANLAR	31
3.7. GÜÇLÜ BİR ANTİOKSİDAN OLAN TİMOKİNON.....	32
3.7.1. Antioksidan Etkisi.....	34

3.8. NRF2	35
3.9. PTEN/mTOR.....	37
4. BULGULAR VE TARTIşMA.....	40
4.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	40
4.1.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması	40
4.1.2. Johnsen Skarlama Bulguları.....	43
4.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	45
4.2.1. Nrf2 İmmünohistokimyasal Boyama	45
4.2.2. Nrf2 H Skarlama Bulguları.....	49
4.2.3. mTOR İmmünohistokimyasal Boyama	50
4.2.4. mTOR H Skarlama Bulguları.....	54
4.2.5. PTEN İmmünohistokimyasal Boyama.....	55
4.3. TARTIşMA.....	56
5. SONUÇ.....	60
6. KAYNAKÇA	61
7. EKLER.....	70
7.1. ETİK KURUL ONAYI.....	70
ÖZGEÇMİş	71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Testis iskemi reperfüzyon modelinin oluşturulması.....	6
Şekil 3.1. Erkek üreme sisteminin kısımlarını gösteren şematik diyagram [11].	14
Şekil 3.2. Testis anatomisinin şematik görünümü [22]	18
Şekil 3.3. İnsan testisinin sagittal kesiti [11]	20
Şekil 3.4. Seminifer tübül epiteli [22].	21
Şekil 3.5. Spermatogenik hücre serisinin şematik gösterimi [34]	23
Şekil 3.6. Testiküler torsiyon [49]	29
Şekil 3.7. <i>Nigella sativa</i> bitkisi (a) çiçeği (b) tohumları(c) ve tohumlarının biyoaktif bileşeninin kimyasal yapısı [72].	34
Şekil 4.1. Kontrol grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x).	41
Şekil 4.2. Sham grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x).	41
Şekil 4.3. Timokinon grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.).....	42
Şekil 4.4. Torsiyon/Detorsiyon grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.).....	42
Şekil 4.5. Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.).....	43
Şekil 4.6. Sol testis dokusunun Johnsen skorlama grafiği. a: Torsiyon/Detorsiyon grubunda Johnsen skoru, Kontrol Sham ve Timokinon gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düştü ($p<0.01$). b: Timokinon+T/D grubunun yalnızca T/D grubuna göre kıyasla anlamlı şekilde yüksek Johnsen skoru gösterdi ($p<0.01$).	44
Şekil 4.7. İmmünohistokimyasal boyama ve deney gruplarının pozitif ve negatifleri (Nrf2 x 400x).	45
Şekil 4.8. Kontrol grubunun Nrf2 antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.).....	46
Şekil 4.9. Sham grubunun Nrf2 antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid hücrelerini göstermektedir.)	47
Şekil 4.10. Timokinon grubunun Nrf2 antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.).....	47
Şekil 4.11. Torsiyon grubunun Nrf2 antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, siyah ok: geç spermatid hücrelerini göstermektedir.)	48
Şekil 4.12. Timokinon+torsiyon/detorsiyon grubunun Nrf2 immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok:	

sertoli hücrelerini göstermektedir.).....	48
Şekil 4.13. Sol testis dokusu Nrf2 antikoru ile immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği. a: Kontrol sham ve timokinon grubuna göre anlamlılığı b ise T/D grubuna göre anlamlılığı gösterir. T/D; torsion/detorsiyon.....	49
Şekil 4.14. İmmünohistokimyasal boyama ve deney gruplarının pozitif ve negatifleri (mTOR x 400x).....	50
Şekil 4.15. Kontrol grubunun mTOR antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.).....	51
Şekil 4.16. Sham grubunun mTOR antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.).....	52
Şekil 4.17. Timokinon grubunun mTOR antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid hücrelerini göstermektedir.).....	52
Şekil 4.18. Torsiyon grubunun mTOR antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x) (Yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid hücrelerini göstermektedir.).....	53
Şekil 4.19. Timokinon+torsiyon grubunun mTOR antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.).....	53
Şekil 4.20. Sol testis dokusu mTOR antikoru ile immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği. a: Kontrol sham ve timokinon grubuna göre anlamlılığı, b: Sham grubuna göre anlamlılığı, c: Kontrol sham ve timokinon grubuna göre anlamlılığı d: T/D grubuna göre anlamlılığı gösterir. T/D: torsiyon/detorsiyon.....	54

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Deney grupları, maddeler ve dozları	4
--	---



KISALTMALAR

ARE	Antioksidan Yanıt Elemanı
DAB	Diaminobenzidin
DHT	Dihidrotestosteron
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
H/E	Hematoksilen-Eozin
HO-1	Heme Oksijenaz-1
ICSH	İntertisyel Hücre Uyarıcı Hormon
I/R	İskemi/Reperfüzyon
Keap1	Kelch-benzeri ECH ile ilişkili protein1
LH	Luteinleştirici Hormon
MIF	Müller Kanal İnhibe Edici Faktör
mTOR	Memeli rapamisin hedefi
Nrf2	Eritroid 2 ile ilişkili Nükleer Faktör 2
PBS	Fosfat Tamponlu Salın
PGC	Primordial Germ Hücresi
PI3K/AKT	Fosfatidilinozitol 3-Kinaz /AKT yolu
PIP2	Fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat
PIP3	Fosfatidilinozitol 3,4,5 trisfosfat
PRL	Prolaktin
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homolog
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
SRY	Y Kromozomu Cinsiyet Belirleyici Bölgesi
SOD	Süperoksit Dismutaz
T/D	Torsiyon/Detorsiyon
TDF	Testis Belirleyici Faktör
TQ	Timokinon

SİMGELER

g	Gram
kg	Kilogram
ml	Mililitre
µm	Mikrometre



ÖZET

TESTİS TORSİYONUNDA TİMOKİNONUN NRF2 EKSPRESYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Betül MUTLU

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR

Temmuz 2025, 70 sayfa

Testis torsiyonu, spermatik kordun kendi etrafında dönmesiyle birlikte kan akışının ciddi şekilde azalmasına ya da tamamen durmasına yol açan acil ürolojik durumdur. Testiküler torsiyon-detorsiyondan kaynaklanan iskemi ve reperfüzyon (I/R) testis hasarına neden olur. İskemik/reperfüzyon (İ/R) hasarı ise organa giden kan akımının azalması ve bunu reperfüzyonun takip etmesi sonucu oluşan patolojik bir olaydır. Testis dokusu, spermatogenez sürecinin sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesi için oksidanlara karşı belirli savunma mekanizmalarına sahiptir. Ancak bazı iç (endojen) ve dış (eksojen) faktörlerin bu dengeyi bozarak oksidatif stres oluşumuna yol açtığı bilinmektedir. Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), redoks dengesinin ana düzenleyicisidir ve çeşitli hücre streslerine yanıt verir ki oksidatif stres en iyi bilinenidir. Nrf2'nin koruyucu etkilerini göstermek ve ROS üretimini azaltmak için nükleer translokasyona uğraması gerekir. Timokinon (TQ) çörek otunun (*Nigella sativada* L.) uçucu yağının ana etken maddesidir. Timokinon antiinflamatuvar antidiyabetik ve analjezik özellikler dahil olmak üzere çok yönlü farmakolojik özelliklere sahip doğal bir bileşiktir. Bununla birlikte oksidatif stresin baskılanmasında da potansiyel bir rol oynadığı bildirilmektedir. Biz de bu çalışmayla, sıçanlarda testiküler iskemi reperfüzyon hasarına karşı antioksidatif özelliklere sahip olan timokinonun Nrf2, mTOR, PTEN ekspresyonu üzerinden koruyucu etkinliğinin olup olmadığını göstermeyi amaçladık. Erişkin Wistar erkek sıçanlar 5 gruba ayrıldı. Kontrol (n=6), Sham (n=6), Timokinon (n=6), Torsiyon/Detorsiyon (n=6), Timokinon + Torsiyon/Detorsiyon (n=6). Bu çalışmada torsiyon/detorsiyon modeli uygulanacak sıçanlara timokinon 7 gün boyunca intraperitoneal yolla verildi. 7.günün sonunda, sıçanların sol testisleri 720° döndürülerek 2 saat süreyle iskemik duruma getirildi; ardından testisler tekrar 720° çevrilerek 3 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon süresinin bitiminde, tüm sıçanların, sağ ve sol testisleri çıkarılarak histolojik inceleme amacıyla değerlendirildi. İncelemelerde Johnsen skorlama sistemi ve immünohistokimyasal H-skor yöntemi kullanılarak seminifer tübüllerin spermatogenik aktivitesi ve Nrf2, mTOR ekspresyon düzeyleri kantitatif olarak değerlendirildi. Histolojik analiz sonuçlarına göre torsiyon/detorsiyon grubunda, Johnsen skoru anlamlı derecede düşerken tedavi grubunda bu skurun belirgin şekilde yükseldiği gözlemlendi. Aynı şekilde Nrf2 ve mTOR boyanma yoğunluğu da torsiyon grubunda arttı, tedavi uygulanan grupta ise ekspresyon düzeyi torsiyon grubuna göre anlamlı şekilde azaldı. Bu sonuçlar doğrultusunda timokinon, antioksidatif mekanizmalar üzerindeki düzenleyici rolü sayesinde fertilitenin korunmasında potansiyel bir tedavi ajanı olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Sözcükler: Rat, Testis, Torsiyon/Detorsiyon, Timokinon, Nrf2

ABSTRACT

EFFECT OF THYMOQUINONE ON NRF2 EXPRESSION IN TESTICULAR TORSION

Betül MUTLU

Düzce University

Institute of Graduate Education, Department of Histology and Embryology

Master's Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Kayıhan KARAÇOR

July 2025, 70 pages

Testicular torsion is a urological emergency that causes severe disruption of the spermatic cord and its surrounding blood supply or complete amputation. Ischemia and reperfusion (I/R) resulting from testicular torsion-detorsion causes testicular damage. Ischemic/reperfusion (I/R) injury is a pathological event that occurs as a result of decreased blood flow to the organ and subsequent reperfusion. Testicular tissue has certain defense mechanisms against oxidants to maintain the spermatogenesis process in a healthy way. However, it is known that some internal (endogenous) and external (exogenous) factors disrupt this balance and cause oxidative stress. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a master regulator of redox balance and responds to various cellular stresses, of which oxidative stress is the best known. Nrf2 must undergo nuclear translocation to exert its protective effects and reduce ROS production. Thymoquinone (TQ) is the main active ingredient of the essential oil of black cumin (*Nigella sativada* L.). Thymoquinone is a natural compound with versatile pharmacological properties, including anti-inflammatory, antidiabetic and analgesic properties. However, it has also been reported to play a potential role in suppressing oxidative stress. In this study, we aimed to demonstrate whether thymoquinone, which has antioxidative properties, has a protective effect against testicular ischemia-reperfusion injury in rats by inducing Nrf2, mTOR, and PTEN expression. Adult Wistar male rats were divided into 5 groups: Control (n=6), Sham (n=6), Thymoquinone (n=6), Torsion/Detorsion (n=6), Thymoquinone + Torsion/Detorsion (n=6). In this study, thymoquinone was administered intraperitoneally to rats that would undergo torsion/detorsion model for 7 days. At the end of the 7th day, the left testes of the rats were rotated 720° and placed in an ischemic state for 2 hours; then the testes were rotated 720° again and reperfusion was achieved for 3 hours. At the end of reperfusion, the right and left testes of all rats were removed and evaluated for histological examination. In the examinations, spermatogenic activity of seminiferous tubules and Nrf2, mTOR expression levels were quantitatively evaluated using the Johnsen scoring system and immunohistochemical H-score method. According to histological analysis results, the Johnsen score decreased significantly in the torsion/detorsion group, while this score increased significantly in the treatment group. Likewise, Nrf2 and mTOR staining intensity increased in the torsion group, and the expression level in the treated group decreased significantly compared to the torsion group. In line with these results, thymoquinone can be considered as a potential therapeutic agent for preserving fertility thanks to its regulatory role on antioxidative mechanisms.

Keywords: Rat, Testis, Torsion/Detorsion, Thymoquinone, Nrf2

1. GİRİŞ

Testis torsiyonu, spermatik kordun kendi eksenini etrafında dönmesi sonucu testislere giden arteriyel kan akışının azalması veya tamamen kesilmesiyle ortaya çıkan, acil müdahale gerektiren ürolojik acil bir durumdur. Bu patolojik durum, kısa sürede gelişen skrotal ağrı ile karakterize olup genellikle adolesan erkeklerde görülmektedir. Kan akımının kesintiye uğraması sonucu testiküler dokuda iskemi gelişirken, torsiyonun çözülmesiyle başlayan reperfüzyon süreci ise oksidatif stresin daha da artmasına ve doku hasarının derinleşmesine yol açar. İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı, hücrelerde ciddi yapısal ve fonksiyonel bozulmalar meydana getirerek testiküler atrofi ve uzun vadede fertilité kaybına neden olabilir [1]. İ/R hasarının temelinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi yer almaktadır. Bu moleküller, hücre zarında lipid peroksidasyonunu artırarak, protein yapılarını bozarak ve DNA hasarına neden olarak hücre ölümünü tetikleyebilir. Bu süreçte endojen antioksidan savunma sistemlerinin yeterli düzeyde aktive edilememesi, doku hasarının ilerlemesine neden olur. Bu nedenle, oksidatif stresi baskılayan ve hücrel savunma mekanizmalarını güçlendiren ajanların kullanımı, testiküler torsiyon sonrası İ/R hasarını azaltmada önemli bir strateji olarak değerlendirilmektedir [2] [3]. Nrf2, hücre içi antioksidan savunma sistemlerinin temel düzenleyici faktörlerinden biridir. Normal koşullarda sitoplazmada inaktif halde bulunan Nrf2, oksidatif stres durumunda aktive olarak nükleusa taşınır ve burada antioksidan yanıt elementlerini (ARE) içeren genlerin transkripsiyonunu uyarır. Bu mekanizma sayesinde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve heme oksijenaz-1 (HO-1) gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonu artar [4] [5]. Öte yandan, hücrel büyüme, metabolizma ve hayatta kalma gibi süreçlerin önemli bir düzenleyicisi olan mTOR (mammalian target of rapamycin) sinyal yolu da testiküler dokuda iskemi-reperfüzyon sürecine yanıt olarak aktive olabilmektedir [6]. mTOR'un aşırı aktivasyonu oksidatif stres, inflamasyon ve hücre ölümü ile ilişkilendirilmiştir [7]. mTOR yolunun regülasyonu, hem hücre proliferasyonu hem de ototofaji mekanizmalarının dengelenmesinde kritik rol oynar [8]. Timokinon (TQ), *Nigella sativa* bitkisinin temel biyolojik aktif bileşeni olup, güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir [9]. Bu çalışma, testis torsiyonu sonrası gelişen iskemi-reperfüzyon hasarına karşı timokinonun koruyucu etkisini histolojik

düzeyde incelemeyi amaçlamaktadır. Ayrıca, timokinonun bu etkisinde Nrf2, PTEN ve mTOR sinyal yollarının rolünün araştırılması da çalışmanın önemli hedeflerinden biridir.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmaya başlamadan önce 21.02.2024 tarihinde 2024.02 karar numarası ile Düzce Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli etik onayı alınmıştır.

2.1. DENEY HAYVANLARI

Bu çalışmada ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen 30 adet Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Çalışmada kullanılacak olan hayvanlar Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Hayvanlar gruplar arasında vücut ağırlığı açısından homojenlik sağlamak amacıyla ağırlıklarına göre dengeli şekilde 5 gruba ayrıldı (n=6) ve kafesler ilgili grup isimleri ile etiketlendi. Hayvanların deney gruplarına atanmasında randomizasyon yapılmadı, ağırlık eşitliği gözetildi. Hayvanlar, laboratuvar ortamında 23°C oda ısısında, 60± 5% nem ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsüne uygun koşullarda tutuldu. Besin ve su tüketimleri serbest bırakıldı. Deneysel uygulamalar ve sakrifikasyon işlemleri Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirildi.

2.2. DENEY GRUPLARI, MADDELER VE DOZLARI

Çalışmada, Timokinon ve Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon grubundaki ratlara %1 DMSO içinde çözdürülen timokinon, 7 gün boyunca günlük 10mg/kg dozunda intraperitoneal (i.p) yolla uygulandı. Kullanılan tüm ilaç çözeltileri her gün taze olarak hazırlandı (Çizelge 2.1.). Timokinon dozu, daha önce farklı oksidatif stres modellerinde terapötik etkisi gösterilmiş olan çalışmalara dayanarak belirlendi. Timokinon çözeltisinde kullanılan %1 DMSO'nun olası biyolojik etkilerini kontrol edebilmek amacıyla, kontrol grubundaki hayvanlara aynı oranda DMSO intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Böylece DMSO'nun potansiyel etkileri izole edilerek yalnızca Timokinonun etkilerinin değerlendirilmesi hedeflendi.

Çizelge 2.2. Deney grupları, maddeler ve dozları

Grup No	Grup Adı	Verilen Madde	Verilen Miktar	Hayvan Sayısı
1	Kontrol	DMSO (7 gün)	%1'lik DMSO	6
2	Sham (Operasyon Grubu)			6
3	Timokinon	Timokinon (7 gün)	10mg/kg/gün	6
4	Torsiyon/Detorsiyon			6
5	Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon	Timokinon (7 gün)	10mg/kg/gün	6

2.3. CERRAHİ PROSEDÜR

Hayvanlara uygulanan cerrahi müdahaleler steril koşullar altında ve intraperitoneal yolla uygulanan ürethan ile genel anestezi sağlanarak gerçekleştirildi. Anestezi derinliği hayvanların refleksleri ve solunum durumu izlenerek dikkatle takip edildi. Bu çalışmada iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturmak amacıyla testiküler torsiyon-detorsiyon modeli tercih edildi. Deneysel modelde sol testis, saat yönünde 720° döndürülerek 2 saat süreyle iskemiye maruz bırakıldı. Bunu takiben detorsiyon işlemi gerçekleştirilerek 3 saat süreyle reperfüzyon sağlandı. Bu model, insanlarda acil cerrahi müdahale gerektiren testis torsiyonu patofizyolojisini deneysel olarak araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.4. İZLENEN YOL

Ağırlıkları önceden bilinen sıçanlar üretan kullanılarak genel anestezi altına alındı. Genel anestezi uygulanan hayvanlarda inguinal bölge asepsi ve antisepsi kurallarına uygun olarak tıraş edildi. Tıraş edilen alana bisturi ile sol skrotal duvarda insizyon yapıldı. Tunika vajinalis tabakası geçildikten sonra sol testis dokusu serbestleştirildi.

Çalışmada toplam 30 sıçan, her grupta 6 hayvan olacak şekilde beş gruba ayrıldı ve gruplara göre işlemler gerçekleştirildi.

1-Kontrol Grubu (n:6): Bu gruba ait sıçanlara 7 gün boyunca sadece DMSO intraperitoneal olarak uygulandı. Testis dokusuna herhangi bir müdahalede bulunulmadı. Deney sonunda orşiektomi yapılarak testis dokuları histolojik inceleme amacıyla bouin solüsyonuna alındı.

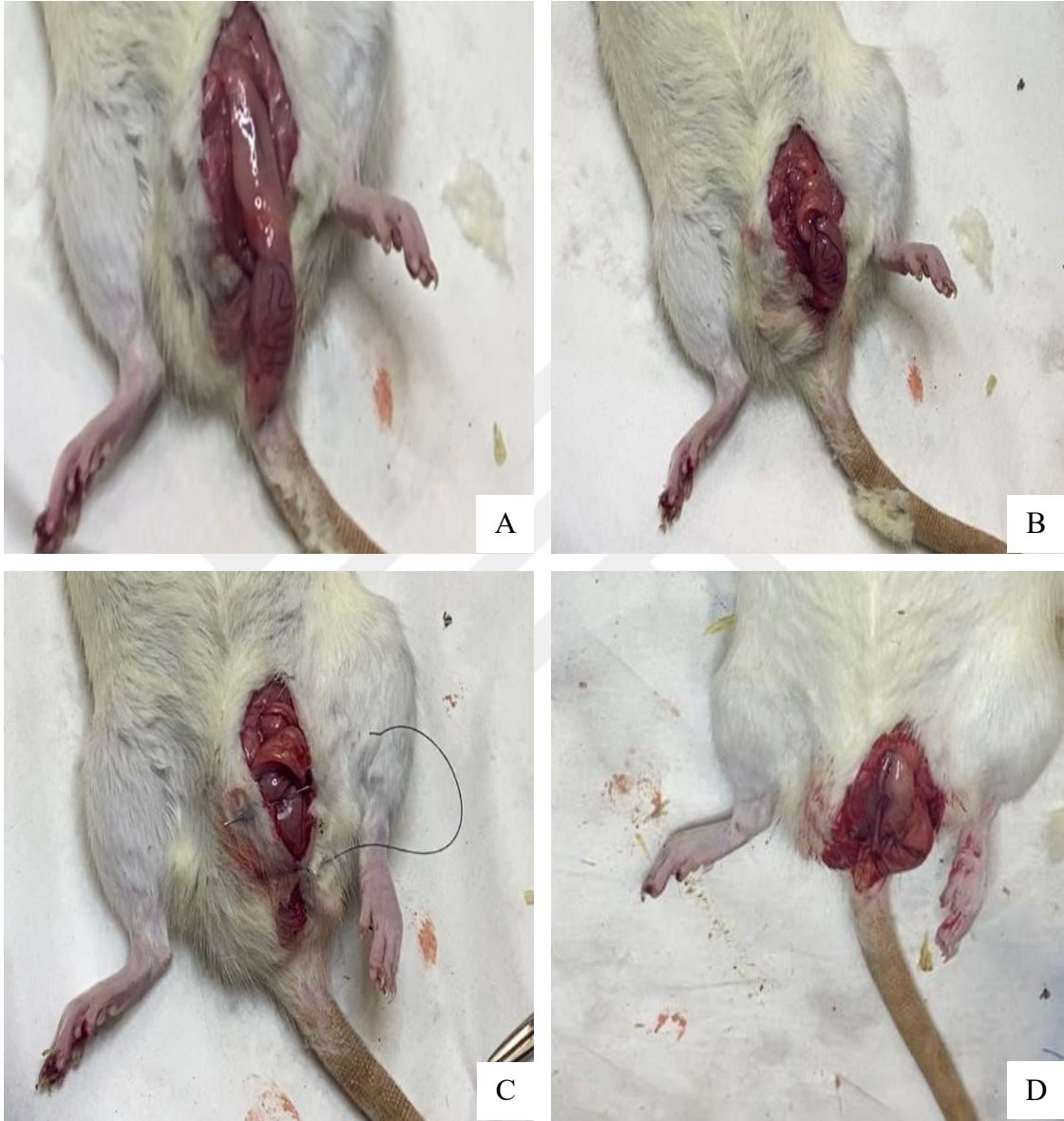
2-Sham Grubu (n:6): Bu gruptaki sıçanların sol testisleri skrotum dışına çıkarıldı, ancak torsiyon/detorsiyon modeli uygulanmadı. Testisler atravmatik sütürlerle yeniden yerine kondu ve 5 saat sonra orşiektomi yapılarak doku örnekleri alındı.

3-Timokinon Grubu (n:6): Grup 3 de sıçanlara 7 gün boyunca sadece timokinon intraperitoneal olarak uygulandı. 7.günün sonunda sağ ve sol testis dokusuna hiçbir şey uygulanmadı. Orşiektomi yapılarak testis dokuları histolojik incelemeler için bouin solüsyonuna alındı.

4-Torsiyon/Detorsiyon Grubu (n:6): Bu gruptaki sıçanların sol testislerinde tunika vajinalis açılarak testis saat yönünde 720° döndürüldü ve 2 saat boyunca iskemi oluşturuldu. İskemi süresinin sonunda, testis 720° detorsiyone edilerek 3 saat reperfüzyon uygulandı. Sağ testise torsiyon veya detorsiyon işlemi uygulanmadı. İskemi-reperfüzyon süresinin tamamlanmasının ardından, 5 saat sonunda orşiektomi yapılarak her iki testis dokusu histolojik inceleme için bouin solüsyonuna alındı.

5-Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon Grubu (n:6): Bu gruptaki sıçanlara torsiyon/detorsiyon modeli uygulanmadan önce 7 gün süreyle günlük 10mg/kg timokinon intraperitoneal olarak verildi. Yedinci günün sonunda, sol testiste tunika vajinalis açılarak testis saat yönünde 720° döndürüldü ve 2 saat iskemi oluşturuldu. İskemi süresi tamamlandıktan sonra testis 720° detorsiyone edilerek 3 saat boyunca reperfüzyon

sağlandı. Sağ testise torsiyon veya detorsiyon uygulanmadı. 5 saat sonunda her iki testis orşiektomi ile alınarak histolojik inceleme amacıyla bouin solüsyonuna alındı.



Şekil 2.1. Testis iskemi reperfüzyon modelinin oluşturulması

A: Anestezi altındaki sıçanların skrotal bölgesi traş edilip antiseptik solüsyon ile dezenfekte edildikten sonra sol testis skrotum dışına çıkarıldı. B: Sol testis saat yönünde 720° döndürülerek torsiyon modeli oluşturuldu. C: Torsiyone edilen testis yeniden skrotuma yerleştirilerek 2 saatlik iskemi süreci başlatıldı. D: 2 saatin sonunda testis, torsiyon yönünün tersine çevrilerek detorsiyone edildi ve 3 saat reperfüzyon sağlandı.

2.5. DENEYİN SONLANDIRILMASI VE DOKU ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Tüm gruptaki sıçanlar çalışma sonrası servikal dislokasyon ile ötanazi uygulanarak deney sonlandırıldı. Sakrifiye edilen hayvanlardan elde edilen sol ve sağ testisler, bisturi ile horizontal kesildi ve her biri eşit boyutta iki parça olacak şekilde simetrik olarak ayrıldı. Testis dokusu histolojik çalışmalar için bouin solüsyon dolu kaplara alındı. 24 saat boyunca bouin solüsyonunda fikse edildi

2.6. DOKU TAKİBİ VE PARAFİN BLOK HAZIRLAMA

Testis dokuları uygun şekilde kasetlere yerleştirildikten sonra, doku takibi işlemleri başlatıldı.

Doku örnekleri, artan konsantrasyonlardaki etil alkol serilerinden geçirilerek kademeli olarak dehidrate edildi. Ardında asetonda bekletilerek dokuların suyunun alınması ve mikrotom ile kesime uygun sertliğe ulaşması sağlandı. Dehidratasyon işlemini takiben dokular, doku şeffaflaştırıcı olarak görev yapan ksilene aktarıldı. Son aşamada 75°C sıcaklığındaki etüvde eriyik halde bulunan parafin içerisinde belirli bir süre tutuldu ve parafin infiltrasyonu tamamlandıktan sonra gömme işlemi uygulanarak parafin bloklar hazırlandı.

- 1- 15 dakika %70'lik etil alkolde bekletildi.
- 2- 15 dakika %80'lik etil alkolde bekletildi.
- 3- 30 dakika %90'lık etil alkolde bekletildi.
- 4- 30 dakika %90'lık etil alkolde bekletildi.
- 5- 30 dakika %96'lık etil alkolde bekletildi.
- 6- 30 dakika %96'lık etil alkolde bekletildi.
- 7- 45 dakika %96'lık etil alkolde bekletildi.
- 8- Dokular kalan suyun tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla asetonda yaklaşık 45 dakika süreyle bekletildi. Bu işlemin ardından şeffaflaştırma aşamasına geçilerek dokular ksilene alındı.
- 9- Dokular, şeffaflaştırma işleminin tamamlanabilmesi için yaklaşık 30 dakika

süreyle ksilende bekletildi. Ardından dokular etüvdeki sıvı parafin içerisine alındı.

10- Parafinleme aşamasında dokular 75°C sıcaklığa ayarlanmış etüvde bulunan erimiş parafin içerisinde yaklaşık 60 dakika süreyle bekletildi.

11- Döküm aşaması: Dokular etüv içerisindeki parafinde bekledikten sonra içinde sıcak parafin bulunan metal gömme kaplarının içerisine yerleştirildi. Blokların sertleşmesi için soğumaya bırakıldı.

12- Aşamalar sonrasında testis dokularımız parafin blok haline getirildi.

13- Hazırlanan parafin bloklardan Leica RM2245 model mikrotom cihazı ve Feather marka metal mikrotom bıçakları kullanılarak 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitler düzgün bir şekilde açılmaları amacıyla sıcak su banyosuna yerleştirildi. Düzleştirilen kesitler daha sonra lam üzerine aktarılıp kurutularak boyama işlemi için hazır hale getirildi.

2.7. IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME

Lam üzerine alınan testis dokuları histolojik değerlendirme için Hematoksilen- eozin ile boyandı. Boyanan kesitler Olympus BX50 mikroskobu ile değerlendirildi. Zeiss Axiocam ICc 5 kamera ile de fotoğrafları çekildi.

2.7.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması

- 1- Hematoksilen-eozin boyama işlemine başlamadan önce, kesitlerin üzerindeki parafinin uzaklaştırılması amacıyla lamlar, 75°C sıcaklıktaki etüvde yaklaşık 40 dakika süreyle bekletildi. Bu işlem, parafinin erimesini ve dokuların boyamaya uygun hale gelmesini sağladı.
- 2- Etüvden bekletilen kesitler, kalan parafinin tamamen uzaklaştırılabilmesi amacıyla iki ayrı ksilolde 15 dakika olmak üzere toplam 30 dakika süreyle bekletildi. Bu işlemle birlikte dokuların içerisindeki parafinin çözünmesi sağlandı.
- 3- Kesitlerin alkol derecelerine göre yeniden hidrasyonu sağlamak amacıyla sırasıyla %96'lık %80'lik ve %70'lik etil alkol solüsyonlarına her birinde 10 kez daldırılıp çıkarılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- 4- Ardından kesitler akan musluk suyu altında durulanarak boyamaya hazır hale

getirildi.

- 5- Hematoksilen boyası uygulanmak üzere lamalar, boyama çözeltisi içerisinde yaklaşık 2 dakika süreyle bekletildi.
- 6- Hematoksilenin fazlasını uzaklaştırmak amacıyla kesitler tekrar akan su altında durulandı.
- 7- Boyanın aşırı tutulmasını önlemek için lamalar iki kez asit alkol solüsyonuna daldırıldı.
- 8- Tekrar akan suda yıkandı.
- 9- Lamalar amonyaklı suya iki kez daldırıldı ardından tekrar akan suyla durulandı.
- 10- Lamalar, ikinci boyama ajanı olan eozin ile boyanmak üzere önce %70'lik etil alkolde 10 defa yıkanıp ardından eozin solüsyonuna 10 kez daldırıldı.
- 11- Eozin fazlasını uzaklaştırmak amacıyla kesitler kısa süreyle akan su altında yıkandı.
- 12- Kesitlerin dehidrasyonu amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol solüsyonlarına her birinde 10 defa daldırma işlemi gerçekleştirildi.
- 13- Alkolleme işleminin ardından, lamalar 1-2 dakika süreyle etüvde bekletilerek kalan nem uzaklaştırıldı.
- 14- Dokuların şeffaflaştırılması için lamalar 10 dakika süreyle ksilende bekletildi.
- 15- Son aşamada, preparatlar üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

2.7.2. İmmünohistokimyasal Boyama

Çalışmada Timokinonun testis üzerindeki etkisini detaylı değerlendirmek için Nrf2, mTOR, PTEN antikoru ile immünohistokimyasal incelemeler yapıldı. (Phospho-Nrf2 #DF7519, mTOR #AF6308, Phospho PTEN #AF4450).

İmmünohistokimyasal boyama için uygulanan aşamalar:

- 1- Parafin bloklardan alınan kesitler, polilizin kaplı lamalar üzerine yerleştirildi.
- 2- Lamalar üzerindeki parafinin uzaklaştırılması amacıyla 75°C sıcaklıktaki etüvde 40 dakika bekletildi.

- 3- Parafin temizliği için kesitler sırasıyla: İlk ksilen banyosunda 10 dakika, ikinci ksilen banyosunda 5 dakika süreyle bekletildi.
- 4- Rehidrasyon işlemi için dokular; %100 etil alkolde 5 dakika, %90 etil alkolde 5 dakika, %80 etil alkolde 5 dakika, %70 etil alkolde 5 dakika bekletildi.
- 5- Alkolden arındırılan kesitler distile suya alınarak 5 dakika süreyle bekletildi.

Sitrik Asit Hazırlama: 2.10 gram sitrik asit, 900 ml distile su içerisinde tamamen çözdürüldü. Ardından çözeltinin pH değeri sodyum hidroksit ile dikkatli bir şekilde ayarlanarak pH 6.0 olacak şekilde düzenlendi.

- 6- Antijen geri kazanımı için hazırlanan sitrat tamponu içinde, kesitler mikrodalga fırında 750 Watt da 7 dakika kaynatıldı.
- 7- Oda ısısında yaklaşık 20 dakika süreyle soğumaya bırakıldı.
- 8- PBS solüsyonu ile 3 kez her biri 5 dakika olacak şekilde yıkama yapıldı.

PBS Hazırlama: 2 litre distile su içerinde 2,885 gram Di Sodyum Hidrojen Fosfat, 16 gram Sodyum Klorür ve 0.8 gram Potasyum Dihidrofosfat tamamen çözündürülerek homojen bir çözelti elde edildi.

- 9- Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla doku kesitleri %3'lk Hidrojen Peroksit çözeltisinde (63 ml Methanol+7ml Hidrojen peroksit karışımı) 15 dakika süreyle inkübe edilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi.
- 10- PBS çözeltisinde 3 kez 5 dakika yıkama yapıldı.
- 11- Dokuların etrafı kurulandı ve sonrasında hidrofobik kalemle (Pap-pen) dokuların etrafı çizildi.
- 12- Lamlar humidity chambera dizildi.
- 13- Dokulara UV Block damlatıldı. Bu aşamada 7 dakika bekletildi.
- 14- Primer antikor hazırlandı. Phospho Nrf2 1:100, mTOR 1:100 Phospho-PTEN 1:100 oranlarında hazırlandı. Primer antikor hazırlanırken PBS ile sulandırıldı.
- 15- Seçilen dokulara primer antikor damlatıldı. Kontrol dokularına ise PBS damlatıldı. Dokular humidity chamber içerisinde Primer antikor ile +4°C'de gece boyu inkübe edildi.
- 16- Ertesi gün şaleye dizilen lamlar PBS çözeltisinde 3 kez 5 dakika yıkandı.
- 17- Lamlar humidity chambera dizilerek dokulara sekonder antikor damlatıldı (1:500) 1 saat beklendi.

- 18- Şaleye alınan lamalar PBS solüsyonu ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- 19- Humidity chambera dizilen lamlara Streptavidine (HRP) solüsyonu damlatıldı. 15 dakika bekletildi.
- 20- Lamlar şalede 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- 21- Dokular kesitleri üzerine DAB kromojen solüsyonu damlatıldı ve yaklaşık 5 dakika bekletildi. Bu süre boyunca mikroskop altında reaksiyon gelişimi gözlendi. İstenen boyama yoğunluğuna ulaşıldığında reaksiyon distile su ile yıkama yapılarak sonlandırıldı.
- 22- Mayer'hematoksilen ile 3 dakika zıt boyama yapıldı.
- 23- Çeşme suyunda yıkanan lamalar şaleye alındı.
- 24- Lamlar, dokuların su içeriğinin uzaklaştırılması amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %90'lık etanol çözeltilerine 10 'ar kez daldırılarak dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından %100'lük etil alkolde 4 dakika süreyle bekletildi.
- 25- 2 ayrı ksilen solüsyonunda 5'er dakika bekletildi.
- 26- Ksilenden çıkarılan dokuların üzerine entellan damlatılarak lamelle kapama işlemi yapıldı.

2.8. JOHNSEN SKORLAMASI

Hematoksilen eozin(H&E) ile boyanan kesitlerde, seminifer tübüllerdeki spermatogenez sürecine ilişkin morfolojik değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla Johnsen skorlama yöntemi uygulandı. Her hayvana ait histolojik kesitlerden rastgele seçilen 5 kesitte toplam 100 seminifer tübül incelendi. (her kesitte 20 tübül). Değerlendirme, ışık mikroskopunda 40x objektif büyütme (400x) ile gerçekleştirildi. Her seminifer tübül, spermatogenez kalitesine göre 1 ila 10 arasında puanlandı. Değerlendirme sırasında, körleme yöntemiyle analiz yapıldı. Elde edilen skorların ortalaması alındı. Bu sayede interobserver varyasyon en aza indirildi. Elde edilen Johnsen skorları istatistiksel analizlere tabi tutuldu.

Skorlama aşağıda verilen puan sistemine göre yapıldı.

1. Tübül içerisinde germ hücresi veya diğer hücrelerin bulunmaması.
2. Yalnızca sertoli hücrelerinin görülebildiği, germ hücrelerin yer almadığı ve yapısal bütünlüğün bozulduğu tübüller.
3. Sadece spermatogonyum içeren tübüller.

4. Spermatid ve ve spermatozoa bulunmayan; 5'ten az sayıda spermatosit içeren tübüller.
5. Spermatozoa ve spermatid yok, çok sayıda spermatosit olan tübüller.
6. Spermatozoa görülmeyen; sayıca az (10'dan az) spermatid içeren tübüller.
7. Fazla sayıda spermatid içeren ancak spermatozoa barındırmayan tübüller.
8. Germinal epitel tabakası belirgin şekilde sıralanmış ancak lümeninde 10'dan az spermatozoa bulunan tübüller.
9. Lümeninde bol miktarda spermatozoa bulunan fakat yapısal organizasyonu düzensiz olan tübüller.
10. Spermatogenezin tam olduğu, bol miktarda spermatozoa ve düzgün tübül.

2.9. H SKORLAMASI

İmmünohistokimyasal boyama değerlendirmesi, histopatolojik görünimleri taramak ve tespit etmek için önce 10x objektif (100x büyütme) kullanılarak ışık mikroskopunda gerçekleştirildi. Daha sonra boyama hakkında daha detaylı bilgi için 40x objektif (400x büyütme) uygulandı. Her hayvana ait 5 doku kesitinden rastgele seçilen toplam 100 seminifer tübül üzerinde değerlendirme yapıldı. Analizler, körleme yöntemiyle yapıldı. Sonuçlar arasında interobserver varyasyon kontrolü sağlanarak, skorların ortalaması alındı.

İmmünreaktivitenin yorumlanması, hem boyama yoğunluğunu (i) hem de her yoğunluk seviyesindeki boyalı hücrelerin yüzdesini (P_i) içeren histokimyasal puanlama (H- skoru) değerlendirmesine dayanır. i değerleri 0 (boyanma kanıtı yok), 1 (zayıf yoğunlukta boyanma), 2 (orta derecede boyanma) ve 3 (güçlü yoğun boyanma) olarak gösterilir. P_i değerleri %0 ile %100 arasında değişir. Son H-skoru, aşağıda gösterilen denklemde olduğu gibi i 'nin P_i ile çarpılmasıyla elde edilir. Bu nedenle bu puan 0 ile 300 (3-5) aralığındadır.

$$\text{H-score} = (0 \times P_0) + (1 \times P_1) + (2 \times P_2) + (3 \times P_3)$$

2.10. İSTATİKSEL ANALİZLER

Tez çalışmamızda immünohistokimyasal yöntem ile boyanan dokuların Olympus BX50 mikroskobu ile Zeiss Axiocam ICc 5 kamera kullanılarak fotoğrafları çekildi. Elde edilen verilerin gruplar arası karşılaştırmalarında One Way ANOVA (post hoc: Tukey test) kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi ise $p < 0.01$ kabul edildi. Analizlerde GraphPad Prism 9 programı kullanıldı.

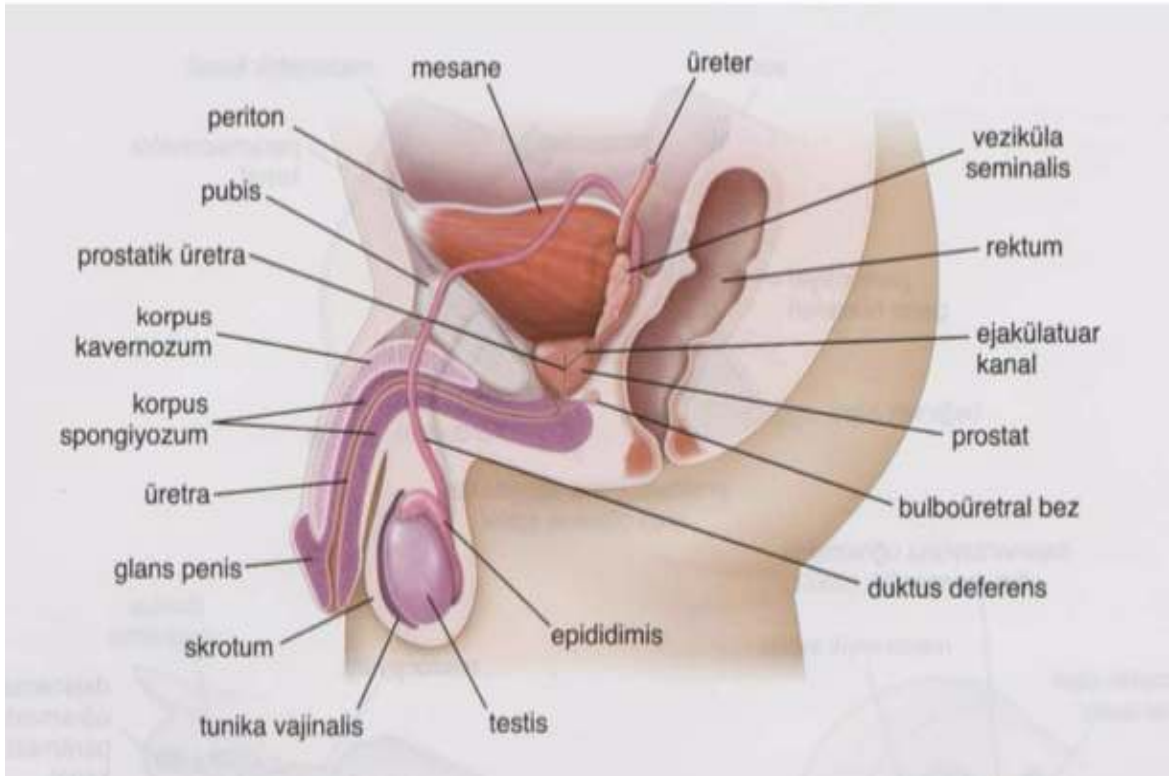


3. GENEL BİLGİLER

3.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ

Erkek üreme sistemi; haploid erkek gametlerin sürekli olarak üretilmesi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasının yanı sıra, erkek cinsiyet hormonlarının sentezlenmesi ve salgılanmasında temel rol oynar. Bu sistem, başlıca üç temel bileşenden oluşur.

Testisler, sperm hücrelerinin üretildiği ve androjen hormonlarının (özellikle testosteron) salgılandığı organlardır. Taşıyıcı kanallar sistemi, epididimis, ductus deferens (vas deferens), ejakülatör kanal ve erkek uretrasının bir bölümünü içerir. Bu yapılar spermatozoanın testislerden dış ortama taşınmasında görev alır. Aksesuar bezler ise seminal veziküller, prostat bezi ve bulbouretral bezlerden oluşur. Bu bezler, semen sıvısının hacmini oluşturan salgıları üretir ve ejakülasyon sırasında sperm hücrelerine besin sağlar. Son olarak penis, erektil doku içeren ve çiftleşme sırasında işlev gören erkek üreme organıdır [10].



Şekil 3.1. Erkek üreme sisteminin kısımlarını gösteren şematik diyagram [11].

3.2. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ

Cinsiyet genellikle Y kromozomunun spesifik bölgesinde bulunan küçük, tek ekzonlu bir gen olan Sry'nin varlığı veya yokluğu ile belirlenir [12]. Ancak testisler gelişimin yedinci haftasına kadar oluşmaz. Erken embriyonik gelişimdeki SRY geninin ekspresyonu, gonadların testise cinsel farklılaşmasını başlatmak için gereklidir [13]. Y kromozomunda bulunan genetik materyal, erkek gonadlarının gelişimini başlatmak için yeterli değildir. Bunun yerine SRY geni, 9, 11, 17 ve 19 numaralı otozomlar ve X kromozomu üzerindeki çeşitli gen aktivasyonlarının kademesini kontrol eden bir ana anahtar olarak çalışır. SRY geninin kodladığı TDF (cinsiyet belirleyici faktör) olarak adlandırılan transkripsiyon faktörü, DNA'nın belirli bir bölgesine bağlanan ve yapısını değiştiren moleküler bir alana sahiptir. Etkilenen DNA bölgeleri, diğer transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına olanak tanıyan bir yapı kazandığında, bu durum yalnızca testislerin değil aynı zamanda diğer erkek üreme organlarının gelişimini başlatan genlerin de ekspresyonunu tetikler. Testisler başlangıçta karın arka duvarında gelişir ve daha sonra skrotuma doğru iner. Karın boşluğunun arka duvarında, retroperitoneal konumda ve üriner sistem ile yakın ilişki içinde gelişimlerini sürdürürler. Testisler (overler gibi) üç farklı kaynaktan türetilir:

- 1- Ara mezoderm, karın arka duvarında yer alan ürogenital çıkıntıların oluşumuna katkı sağlayarak testislerde bulunan Leydig (intertisyel) hücreleri ile peritübüler kontraktıl özellik gösteren miyoid hücrelerin gelişiminde önemli rol oynar.
- 2- Söloomik mezotelyumdan köken alan mezodermal epitel, ürogenital çıkıntıları çevreleyerek 'birincil seks kordonları' olarak adlandırılan parmak benzeri epitelyal uzantıların oluşumunu teşvik eder. Bu kordonlar altlarında yer alan ara mezoderme doğru ilerleyerek buraya göç eden ilkel germ hücreleri tarafından kolonize edilir. Oluşan birincil seks kordonları zamanla farklılaşarak testislerin destek hücreleri olan Sertoli hücrelerine dönüşür.
- 3- İlkel germ hücreleri (PGC), yolk kesesinin etrafındaki bölgeden kaynaklanır.

PGC'ler, gebeliğin yaklaşık beşinci haftasında gonadları kolonize etmeye başlar. Gebeliğin altıncı haftasında, PGC'ler genital çıkıntıları istila etmiş olur. İlkel germ hücreleri, yaklaşık 3000 hücreye ulaşmak için bölünür ve gametojenik genlerin aktivasyonu ve pluripotansiyel genlerin inaktivasyonu ile daha fazla uzmanlaşmaya uğrar [14]. Bu aşamada, bu kordonlar ilkel germ hücreleri, Sertoli öncesi hücreler ve onu çevreleyen miyoid hücre katmanından oluşur. Daha sonra birincil cinsiyet kordonları seminifer tübüllere, düz tübüllere ve rete testislere yol açan seminifer kordonlara

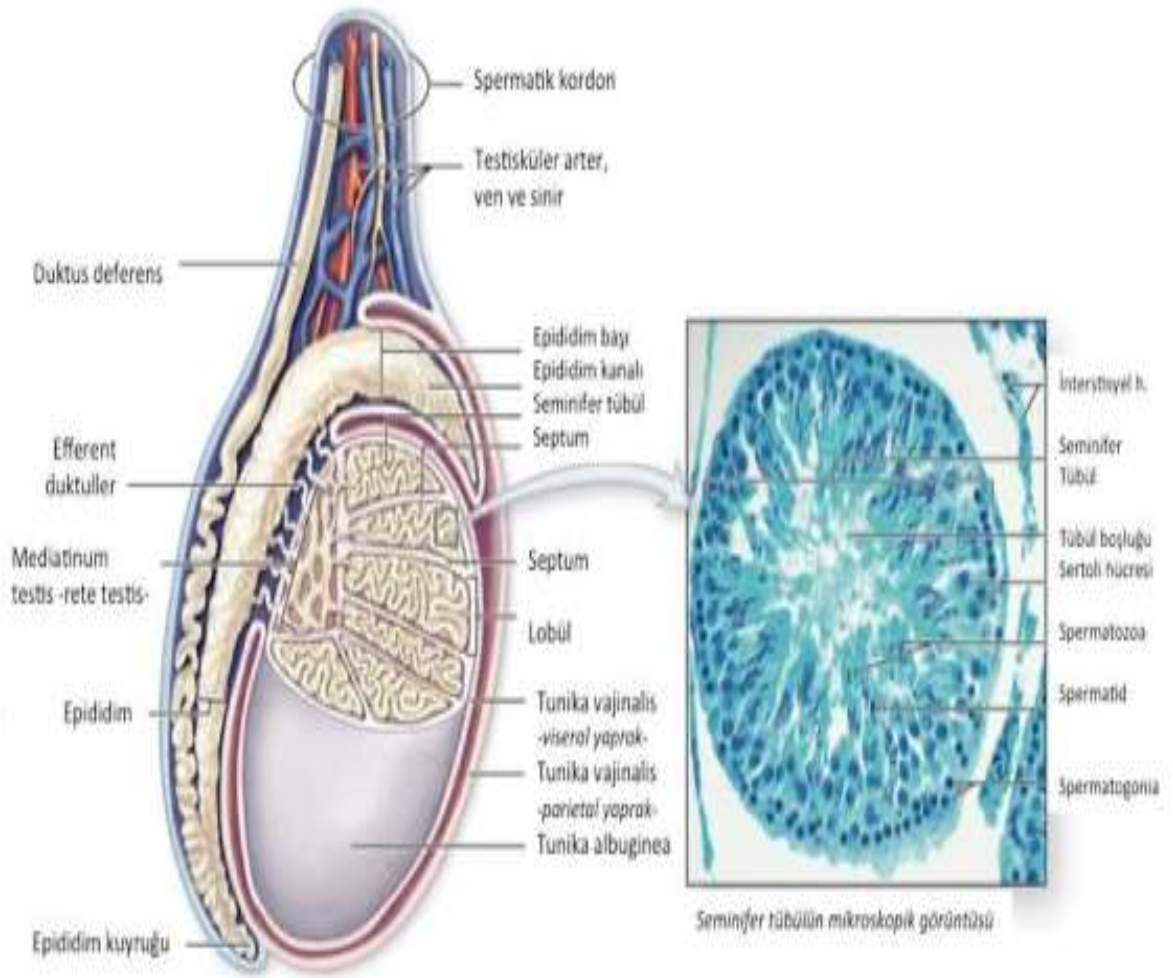
farklılaşır. Gelişimin ilk aşamasında, testisler karın arka duvarında her iki cinsiyette de aynı olan ürogenital çıkıntılarının farklı primordiallarından gelişir. Bu kayıtsız aşamada embriyonun erkek ya da kadına dönüşme potansiyeli vardır. Bununla birlikte, SRY geninin ekspresyonu (özellikle Sertoli öncesi hücrelerde) embriyonun erkek gelişimini düzenler [11]. Leyding hücreleri gestasyonun 2. ayında testosteron üretmeye başlar. Testosteron aynı zamanda erkek genital boşaltım kanallarına dönüşen mezonefrik (Wolffian) kanallarının büyümesinde ve farklılaşmasında önemli rol oynar [15]. Bu erken aşamada, seminifer kordlarda gelişen Sertoli hücreleri, Müllerian inhibe edici faktör (MIF) adı verilen bir başka önemli hormonal maddeyi üretir. MIF'in moleküler yapısı, dönüştürücü büyüme faktörü-P'nin (TGF- β) kine benzer. Paramezonefrik (Müllerian) kanallarının hücre bölünmesini engelleyen büyük bir glikoproteindir, bu da dişi üreme organlarının gelişimini engeller dış cinsel organların gelişimi ve farklılaşması (aynı zamanda cinsel açıdan farklı olmayan aşamadan itibaren) aynı anda meydana gelir ve testosteronun 5 α -redüktaz tarafından dönüştürülmesinin bir ürünü olan dihidrotestosteronun (DHT) etkisinden kaynaklanır. DHT olmadan, genetik ya da gonadal cinsiyete bakılmaksızın, dış cinsel organlar dişi şablonuna göre gelişecektir. Gelişmekte olan erkek embriyosunda testosteron, MIF ve DHT'nin ortaya çıkışı, onun hormonal cinsiyetini belirler. Gebeliğin yaklaşık 26. haftasında testisler, karın boşluğu ile skrotum arasındaki dar geçit olan kasık kanalından geçerek skrotuma inerler. İnış sırasında testisler kan damarlarını, lenfatik damarlarını ve sinirlerinin yanı sıra ana boşaltım kanalı sistemi olan duktus deferens de yanlarında taşırlar. Testisin inişi bazen engellenir, bu da kriptorşidizm veya inmemiş testislerle sonuçlanır. Testisler karın boşluğundan skrotuma inerken kan damarlarını, lenfatik damarları, otonomik sinirleri ve anterolateral yüzeylerini kaplayan tunika vaginalis adı verilen karın peritonunun bir uzantısını da beraberlerinde taşırlar. Testislerin sıcaklığı, skrotum içinde vücut sıcaklığının 2 ila 3°C altındadır. Bu düşük sıcaklık spermatogenez için gereklidir ancak normal vücut sıcaklığında meydana gelebilecek hormon üretimi (steroidogenez) için gerekli değildir. Testisler yüksek sıcaklıkta tutulursa (örneğin ateş nedeniyle) veya testis torbasına inilmezse sperm üretilemez. Her testis, abdominal aortun doğrudan bir dalı olan testis arteri yoluyla kan alır. Testisin yakınında oldukça kıvrımlıdır ve testislerden karın damarlarına kan taşıyan pampiniform venöz pleksus ile çevrelenmiştir. Bu düzenleme kan damarları arasında ısı alışverişine izin verir ve testislerin daha düşük bir sıcaklıkta korunmasına yardımcı olur [11].

3.3. TESTİS ANATOMİSİ

Testisler funiculus spermaticusa asılı olarak skrotum içinde yer alan, sağlı sollu bir çift oval yapıdır. Yaklaşık 4-5 cm uzunluğa, 2-5 cm genişliğe, 3 cm kalınlığa sahiptir ve ağırlıkları 20-25 gr arasında değişir [16]. Kıvrımlı bir deri yapısına sahip olan skrotumun iç yüzeyi, ortadan bir bölme olan septum skroti ile iki bölmeye ayrılır. Testislerin skrotum içindeki yerleşimleri vertikal yönde olmayıp her bir testisin uzun eksenini yukarıdan aşağıya ve önden arkaya doğru eğimli bir konumda bulunur. Genellikle sol testis, sağ testise kıyasla biraz daha aşağıda yer alır. [17]. Testisin yapısında üst (extremitas superior) ve alt (extremitas inferior) olmak üzere iki uç yer alır. Organ ayrıca medial (facies medialis) ve lateral (facies lateralis) olmak üzere iki yüzeyle tanımlanır. Facies medialis septum scroti'ye bakar. Testisin kenarları ise ön (margo anterior) ve arka (margo posterior) olarak adlandırılır. Düz bir yapı sergileyen margo posterior'dan, çeşitli sayıda ayrılan küçük kanalcıklar (ductuli efferentes testis) çıkar. Bu kanallar, epididimis üzerine açılarak testisle epididimis arasında bağlantı oluşturur [18]. Testisin arka kenarının (margo posterior) orta bölümünde, sperm taşıyıcı kanalların yanı sıra testise ait damar ve sinirlerin geçtiği mediastinum testis adı verilen bir yapı yer alır. Testisin üst ucu (extremitas superior), kaput epididimis ile yakın ilişkili olup bu yapının üzerine yerleşmiştir. Buna karşılık alt ucu (extremitas inferior), kauda epididimis ile örtülüdür ve bu iki yapı birlikte testisin alt kısmında devamlılık gösterir [19]. Testislerin arteriyel kan dolaşımı, büyük oranda testiküler arterler aracılığıyla sağlanır. Bu arterler, abdominal aorta'dan köken alır ve önemli anatomik yapılarla yakın ilişkidir. İnguinal kanal yoluyla skrotuma ulaşan testiküler arter, testis yüzeyinde birçok dala ayrılır. Bu damarların yerleşim düzeni, özellikle damar bütünlüğünün korunması açısından önem taşır. Testislerin arteriyel kanlanması yalnızca testiküler arterle sınırlı değildir; buna ek olarak diferansiyel arter (ductus deferens arteri) ve kremasterik arter de bu bölgeye kan akışına katkı sağlar. Venöz drenaj, mediastinum testis içerisinden çıkan ve birbiriyle bağlantı kuran küçük venöz yapılar aracılığıyla gerçekleştirilir. Testisin arka yüzeyinden çıkan testiküler venler, önce bir ağ yapısı oluşturarak plexus pampiniformis şeklinde yukarı doğru ilerler. Bu venöz ağ duktus deferensin önünden geçerek inguinal kanal yoluyla karın boşluğuna ulaşır. Abdomen içerisine girdikten sonra bu küçük venler birleşerek, testiküler arterin her iki yanından yükselen çift testiküler ven halini alır. Ardından her tarafta yer alan bu çift ven birleşerek tek bir testiküler ven oluşturur. Venöz

drenaj yönünden bakıldığında, sağ testiküler ven doğrudan vena cava inferiora sol testiküler ven ise sol renal vene açılmaktadır [20].

Testiste anjiogenez sürecinde temel rol oynayan yapılar lenfatik damarlardır. Bu damarlar, testisten toplanan lenfi başta paraaortik ve interaortokaval lenf nodlarına yönlendirerek drenajı sağlar. Testis ve epididimin sinirsel innervasyonu iki farklı yolla gerçekleşmektedir. Birinci yol, renal ve aortik pleksuslardan çıkan sinir liflerinin gonadal damarlar boyunca ilerleyerek ilgili yapılara ulaşmasıdır. İkinci yol ise, pelvik pleksus kökenli gonadal afferent ve efferent sinirlerin, testis ve epididime doğru innervasyon sağlamasıyla oluşur [21].

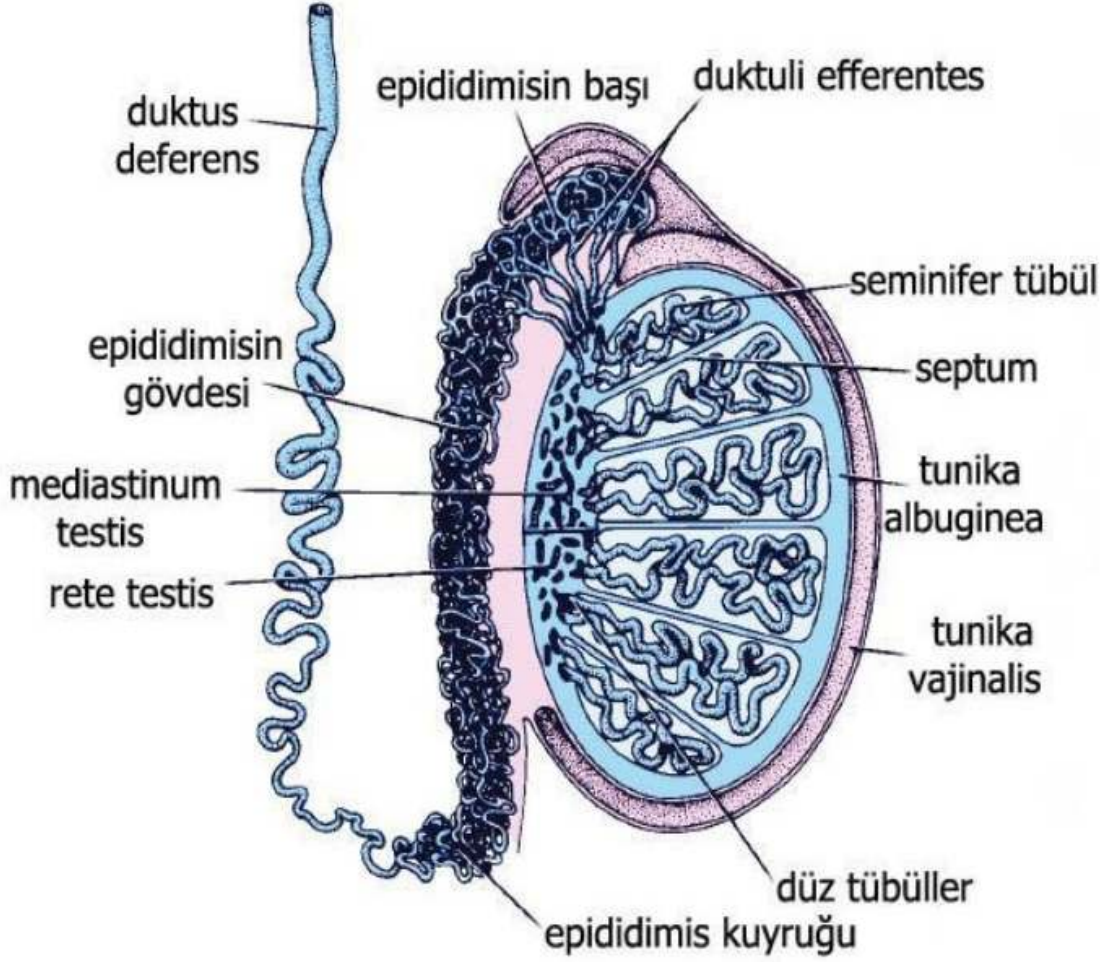


3.4. TESTİS HİSTOLOJİSİ

Testisler, karın boşluğunun dışında yer alan hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonlara sahip çift yapılı bezlerdir. Endokrin olarak testosteron hormonu üretirken, ekzokrin fonksiyonuyla erkek olgun gamet hücresi olan spermatozoon'u üretir. Normal spermatogenez sürecinin sağlıklı bir şekilde gerçekleşebilmesi için 34-35 °C sıcaklık gereklidir. Skrotum içinde asılı durumda bulunan testisler dıştan testiküler kapsül ile sarılmış olup, bu kapsül 3 tabakadan oluşur [10].

- a) Tunika Vaginalis: Bu tabaka iyi gelişmiş bir bazal membran üzerinde yer alan tek katlı yassı mezotelyal hücrelerden oluşur. Testisler abdominal kaviteden skrotuma inerken tunika vaginalis de beraberinde lenf damarlarını, otonom sinirleri kan damarlarını ve testislerin anterolateral yüzeyini kaplayan abdominal periton uzantısını taşır [11].
- b) Tunika Albuginea: Testisleri saran en kalın ve belirgin tabakadır. Yoğun fibroelastik bağ dokusundan oluşur ve düz kas hücreleri içerir. Testisin arka yüzeyinde kalınlaşarak testis dokusuna giren ve çıkan kan damarları, kanallar ve lenf damarlarını içeren mediastinum testis adlı yapıyı oluşturur.
- c) Tunika Vasküloza: Testiküler kapsülün en iç tabakası olup, damardan zengin ve gevşek bağ dokusundan oluşan bir yapıdır [23]

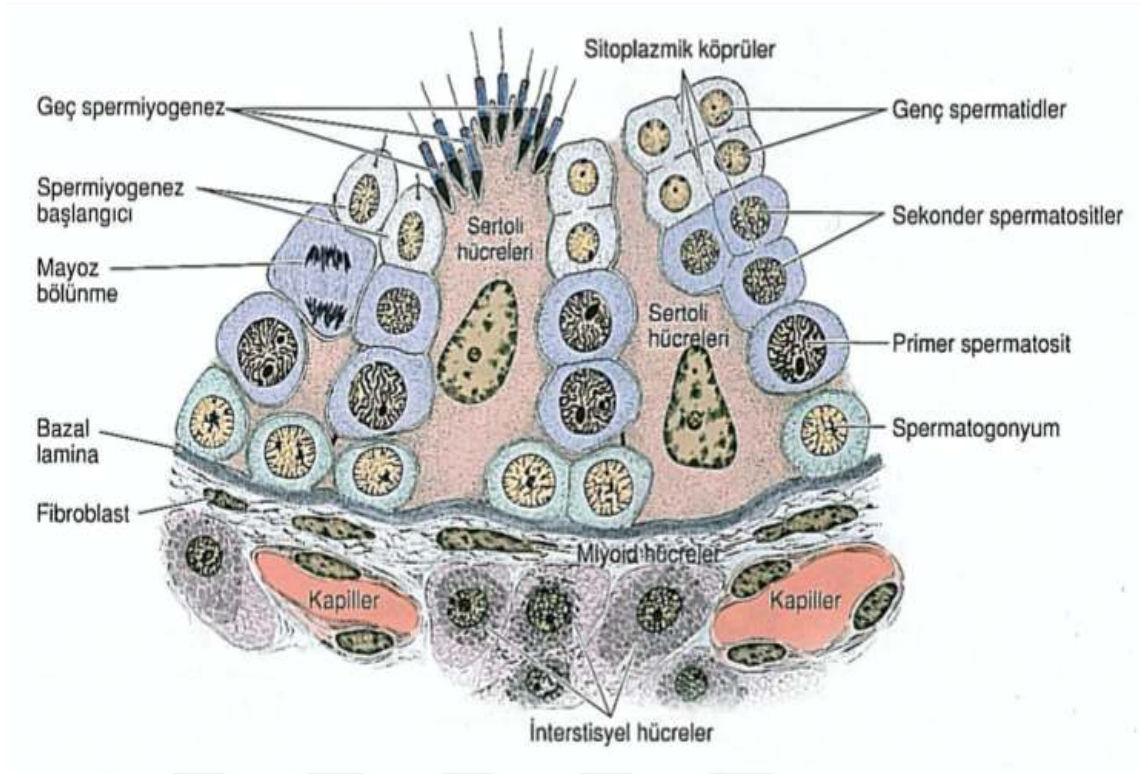
Testisi çevreleyen fibröz yapı olan tunika albuginea, organın arka yüzeyinde kalınlaşarak mediastinum testis olarak adlandırılan yapıyı oluşturur. Bu bölgeden testis kapsülüne doğru uzanan ince fibröz bölmeler (septalar), testis parenkimini yaklaşık 250 adet piramidal lobüle ayırarak iç yapının bölümlenmesini sağlar. Bu bölmeler lobuli testis (testis lobülleri) olarak adlandırılır ve her bir lobül, 1 ila 4 seminifer tübül ile Leydig hücrelerini içeren bağ dokusundan meydana gelir. Seminifer tübüllerin mediastinum testis içinde yer alan düz bölümlerine tubulus recti (düz tübüller) denir. Bu yapılar mediastinum testiste bulunan ve anastomoz oluşturan rete testis kanallar sistemiyle devam eder. Stroma içinde damarlar, sinirler ve büyük oranda Leydig hücreleri bulunur. Leydig hücreleri, genellikle gruplar halinde yer alan ve endokrin fonksiyona sahip geniş hücrelerdir [22].



Şekil 3.3. İnsan testisinin sagital kesiti [11]

3.4.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller, spermatojenik germ hücrelerinin, bölünerek olgunlaşması ve spermatozoonlara dönüşmesi sürecinin gerçekleştiği, oldukça kıvrımlı yapıda olan tübüllerdir. Yaklaşık 30-70 cm uzunluğunda ve 150-250 μm çapında olup, çok katlı germinal epitel ile döşenmiştir. [22] [11]



Şekil 3.4.Seminifer tübül epiteli [22]

Seminifer tübülleri döşeyen epitel tabakasında iki temel hücre tipi bulunur: Destek işlevi gören Sertoli hücreleri ve spermatogenezin farklı evrelerinde bulunan olgun sperm hücresine dönüşecek olan spermatogonik hücreler [22].

Sertoli hücreleri (besleyici ve destekleyici hücreler):

Sertoli hücreleri, spermatogonik serideki hücreleri çevreleyen uzun piramidal şekilli hücrelerdir. Sayıları azdır ve bazal membrana tutunarak tübül lümenine kadar uzanırlar. Işık mikroskopunda, spermatogonik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda uzantıları nedeniyle sınırları belirgin şekilde seçilemez. Nükleusları genellikle üçgen şeklinde olup, bazalda yer alır ve hücre eksenine paralel konumlanır. Ökromatik yapıya sahip oldukları için 2-3 belirgin nükleolus görülebilir. Sitoplazmaları, bol miktarda mitokondri, granüllü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi aygıtı, lizozomlar ve salgı granülleri içerir. Sertoli hücreleri, spermatogoniumlar seviyesinde birbirlerine zonkula okludens (sıkı bağlantılar) ile bağlanmıştır. Bu sıkı bağlantılar kan- testis bariyerini oluşturarak, seminifer tübüllerin iç kısmı (intratübüler alan) ile dış ortam (ekstratübüler alan) arasında makromoleküllerin geçişini önler. Bu mekanizma, germ hücrelerini bağışıklık sistemin olası saldırılarından korur, çünkü kan dolaşımındaki antikorların testis içindeki

proteinlere ulaşmasını engeller. Sertoli hücreleri bölünme yeteneğine sahip olmamakla birlikte, hasar durumunda kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahiptir [10] [22].

Sertoli hücrelerinin görevleri şu şekilde sıralanabilir;

Sertoli hücreleri çeşitli sinyal yollarıyla spermatogenik hücreleri destekler, besler ve korur [24].

Gelişen germ hücrelerinin ihtiyaç duyduğu lipidler, karbonhidratlar, vitaminler, amino asitler ve metal iyonlarını salgılar [24].

Kolesterol metabolizmasını düzenleyerek spermatogenez sürecini destekler [25]

FSH salgılanmasını baskılayan inhibin B hormonunu salgılar, böylece sperm üretimini ve Sertoli hücre fonksiyonlarını düzenler [26].

Olgunlaşan germ hücrelerini lümene taşır [26].

Spermiyogenezden türetilen apoptotik spermatositleri ve hücre kalıntıları fagositöz ile temizler [27].

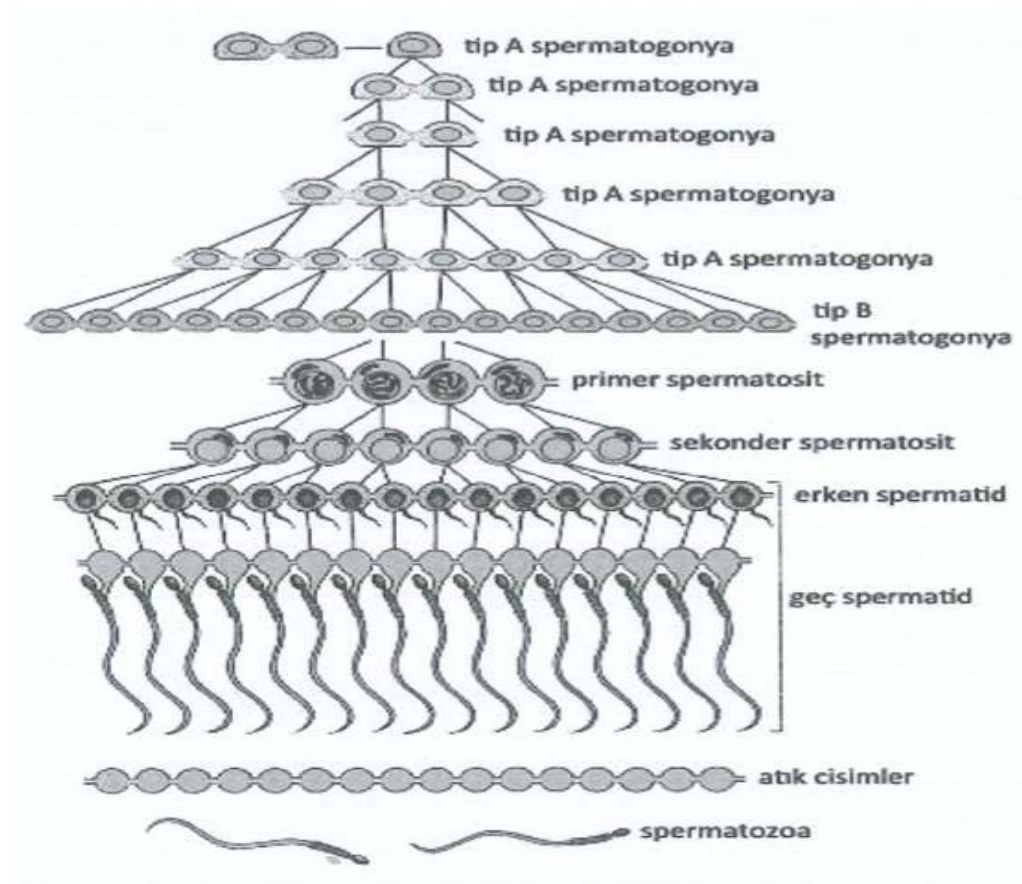
3.4.2. Spermatogenik Hücreler (Germ Hücreleri)

Spermatogenik hücreler, düzenli mitotik ve mayotik bölünmeler yoluyla çoğalan ve sonunda olgun spermatozoonlara dönüşen hücrelerdir. Bu hücreler, testisin embriyonik gelişimi sırasında, yolk kesesinden köken alıp gonadal kabartıya göç eden primordiyal germ hücrelerinden türemektedir. Sertoli hücreleri arasında, gelişim evrelerine göre organize olmuş tabakalar halinde yer alırlar. Gelişim açısından en erken evrede bulunan spermatogonyumlar, bazal membran üzerinde konumlanırken; en olgun hücreler olan spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal yüzeyine tutunarak seminifer tübüllerin lümen sınırını oluşturur. Bu tabakalı yapı sayesinde testislerde sperm üretimi ve olgunlaşma süreci koordineli ve düzenli bir şekilde yürütülür [11].

3.4.3. Spermatogenez

Spermatogenez, diploid spermatogonyanın testisin seminifer tübüllerinde haploid spermatozoaya doğru olgunlaştığı ve farklılaştığı, kompleks ve aşamalı bir olaylar dizisidir [28]. Spermatogonyal kök hücreler kendilerini yenileme ve farklılaşma yetenekleri sayesinde sonuçta haploid yapıda spermatozoa hücresine dönüşür [29] [30]. Germ hücreler her faz sonrası geliştikçe, seminifer tübüllerin bazal kompartmanından,

luminal alana doğru ilerler ve spermatozoa halinde rete testise ulaşır. Sertoli hücreler, yapısal ve nutrisyonel desteği spermatogenez boyunca sağlar. Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerin bazal kısmından lümene doğru uzanarak germ hücrelerinin gelişimini hem kalitatif hem de kantitatif olarak destekleyen bir niş oluştururlar [31] [32]. Spermatogenez, spermatogonyal mitotik bölünmelerin bir sonucu olarak spermatositlerin üretildiği birinci aşama, spermatositlerin mayoz bölünmesinin bir sonucu olarak spermatitlerin üretildiği ikinci aşama ve spermatidlerin metamorfozunun bir sonucu olarak spermiyogenezin olduğu üçüncü bir aşamadan oluşmaktadır [33].



Şekil 3.5. Spermatogenik hücre serisinin şematik gösterimi [34]

3.4.3.1. Spermatogonyum fazı (Mitoz)

Spermatogonyal fazda, kök hücreler kendilerini yenileyerek spermatogonyal bir popülasyon oluştururlar. Bu hücreler birden fazla bölünmeye uğrayarak farklı spermatogonyal nesiller meydana getirir. Bu süreçte luteinize edici hormon (LH), erkeklerde bazen interstisyel hücre uyarıcı hormon (ICSH) olarak bilinir; folikül uyarıcı hormon (FSH); ve prolaktin (PRL) gibi hormonlarda etkilidir. PRL, Leydig hücrelerinin

steroidojenik aktivitelerini artırarak LH ile etki gösterir. Sertoli hücreleri FSH ve testosteron reseptörlerine sahip olup, bu hücreler spermatogenezin ana düzenleyicileridir. İnsan spermatogonyumları, histolojik incelemelerde çekirdek morfolojisine göre üç farklı tipe ayrılır. Tip A koyu (Ad) spermatogonia, yoğun bazofilik yapıda ve ince granüler kromatin içeren oval şekilli çekirdeklere sahiptir [11]. Bu spermatogoniaların seminifer epitelin kök hücreleri olduğu düşünülmektedir [35]. Rezerv kök hücre olarak kalan bir çift Ad tipi spermatogonyum, düzensiz aralıklarla bölünerek yeni hücreler oluşturur. Tip A soluk (Ap) spermatogonia ince granüler kromatin içeren ve hafif lekelenmiş oval çekirdeklere sahip hücrelerdir. Ap spermatogonyalar, spermatogeneze katılacak şekilde farklılaşmaya başlar ve bir dizi mitotik bölünme geçirerek sayılarının artmasını sağlar. Bu hücreler aynı zamanda yenileyici kök hücreler olarak bilinir. Tip B spermatogonia, merkezi bir nükleolus etrafında yoğunlaşmış kromatinle çevrili genellikle nükleer zarf boyunca kümelenmiş küresel çekirdeklere sahiptir. Bir Ad spermatogoniumun iki tip Ap spermatogoniaya bölünmesinin özelliklerinden biri yavru hücrelerin ince bir sitoplazmik köprüyle birbirine bağlı kalmasıdır. Bu bağ Ap spermatogonia çiftinin soyunun her mitotik ve mayotik bölünmesinde devam eder. Sonuç olarak ilk Ap spermatogonia çiftinin tüm yavruları, tıpkı bir inci teli gibi birbirine bağlıdır. Bu sitoplazmik bağlar spermatid olgunlaşmasının son aşamalarına kadar bozulmadan kalır ve her klonun orjinal Ap hücre çiftinden eşzamanlı gelişimi için gereklidir. Birkaç bölünmeden sonra A tipi spermatogonia, B tipi spermatogoniaya dönüşür. Tip B spermatogonia'nın oluşumu, spermatogonial fazdaki son adımı temsil eder [11].

3.4.3.2. *Spermatosit fazı (Mayoz)*

Meiosis, B tipi spermatogonyumların bazal membranla olan temaslarını kaybedip preleptoten primer spermatositleri oluşturmasıyla başlar. Preleptoten primer spermatositler DNA sentezine başlar ve kromozomlar yoğunlaşmaya başlar, bu süreç sonucunda çekirdekte leptoten aşamasına özgü ince filamentler ortaya çıkar [36]. Bu evrede, her kromozom iki kromatitten oluşur. Zigoten aşamasına geçişle birlikte kromatitler dahada kalınlaşır ve homolog kromozomlar eşleşmeye başlar. Çekirdeğin genişlemesi ve homolog kromozom çiftlerinin yoğunlaşarak bivalentleri oluşturması pakiten aşamasındaki primer spermatositin nükleer özelliklerini belirler. Bu süreçte anne ve babadan gelen homolog kromozomlar arasında genetik materyal değişimi gerçekleşir ve bu değişim gametlerin genetik çeşitliliğini artırır. Genetik materyalin aktarıldığı bölgeler, kiyazmaların oluşmasıyla belirgin hale gelir ve homolog kromozomlar diploten

aşamasına geldiğinde hafifçe ayrılarak kiasmalar görünür hale gelir. Genetik materyal değişimi DNA ipliklerinde meydana gelen kırılmaların onarılmasıyla gerçekleşir [37]. Diploten aşaması, homolog kromozom çiftlerinin kısmen ayrılmasıyla karakterizedir, ancak bu kromozomlar kiasmalar aracılığıyla hala birbirine bağlı kalır ve her biri iki kromatitten oluşmaya devam eder. Nükleer zarın parçalanmasıyla birlikte kromozomlar iğ iplikleri üzerinde hizalanır ve anafaz sırasında homolog kromozom çiftlerinin her bir üyesi iğ iplikleri boyunca karşıt kutuplara doğru hareket eder. Bu süreç sonunda oluşan yavru hücreler sekonder spermatosit olarak adlandırılır ve haploid kromozom sayısına sahiptir. Ancak her kromozom iki kromatitten oluştuğu için DNA içeriği hala diploid seviyededir. İnsanda yaklaşık altı saat süren kısa bir ara fazın ardından sekonder spermatositler, ikinci mayotik bölünmeye girerek her kromozomun kardeş kromotitlerinin zıt kutuplara çekilmesiyle yuvarlak spermatitler olarak bilinen yavru hücreleri oluşturur. İnsanda meiotik olgunlaşma, preleptoten aşamasından yuvarlak spermatitlerin oluşumuna kadar yaklaşık 24 gün sürer [33].

3.4.3.3. *Spermatid fazı (Spermiyogenez)*

Spermatidlerin spermatozoonlara dönüşebilmek için geçirdiği değişimlerin tümü spermiyogenez olarak bilinir. İnsanlarda bir spermatogoniumun olgun spermatozoon haline gelmesi yaklaşık 64 gün sürer. Tam olgunlaşmasını tamamlayan spermatozoonlar, seminifer tübüllerin lümenine geçiş yapar. Bu hücreler tübül duvarında bulunan kontraktıl yapılar aracılığıyla epididimise doğru yönlendirilir. İlk aşamada sınırlı hareket kabiliyetine sahip olan sperm hücrelerinin motilitesi, epididim boyunca ilerledikçe artar ve en yüksek seviyesine burada ulaşır [38].

Spermatid popülasyonunun olgun sperme farklılaşması esnasında meydana gelen spermiyogenez dört fazdan oluşmaktadır [11].

1-Golgi fazı: Bu aşamada, küçük veziküller içinde bulunan granüller birleşerek, tek ve büyük bir granül olan akrozomu oluşturur. Daha önce radyal olarak simetrik olan spermatidler, bu süreçte kutuplaşmaya başlar. Hücrenin bir ucunda kafa bölgesi gelişirken, golgi aygıtı akrozomu oluşturacak enzimleri sentezler. Hücrenin diğer ucunda ise, mitokondrilerin toplandığı ve distal sentriolün aksonem oluşturmaya başladığı kalınlaşmış bir orta parça gelişir. Ayrıca, spermatid DNA'sı yoğun bir şekilde paketlenmeye başlar. İlk olarak DNA belirli nükleer baz proteinleri ile sarılır, ardından spermatidin uzama sürecinde bu proteinler protaminlerle değiştirilir. Sonuç olarak, sıkıca

paketlenmiş kromatin oluşur ve bu yapı transkripsiyonel olarak aktif değildir [39].

2-Kep fazı: Başlık fazı sırasında, golgi'den türeyen proakrozomal kesecikler, spermatid çekirdeğinin uzamasına paralel olarak kaudal inişini başlatan, giderek genişleyen akrozomal keseyle birleşmeye devam eder. Akrozom başlık benzeri bir şekil alır ve dar inen girintisi, akroploksomun marjinal halkası içeren dezmozom benzeri, keratin ara filament proteini tarafından nükleer zarfa sabitlenir [10].

3-Akrozom fazı: Bu aşamada spermatid, yeniden düzenlenerek Sertoli hücresinin içine daha derin yerleşir ve bazal laminaya doğru yönlendirilir. Bu süreçte gelişmekte olan flagellum seminifer tübül lümenine doğru uzanır. Spermatidin yoğunlaşan nükleusu uzayarak yassı bir şekil alır. Nükleus ve onu çevreleyen akrozom plazma zarının ön bölgesine yakın bir konuma taşınırken, sitoplazma hücrenin arka kısmına doğru hareket eder. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kenarından başlayarak spermatidin arka kutbuna doğru uzanan ve silindirik bir yapı oluşturan 'manşet' adı verilen özel organizasyonu meydana getirir. Bu yapı sperm hücresinin şekillenmesinde ve hücre içi bileşenlerin yer değiştirmesinde önemli rol oynar. Flagellumun gelişimini önceden başlatan seritriyoller, bu aşamada nükleusun arka yüzeyine doğru taşınır. Burada, immatür sentriyol nükleustaki sıkı bir oluğa tutunur. Daha sonra sentriyoller, gelişmekte olan spermin bağlantı parçasını veya boyun bölgesini oluşturacak şekilde dönüşüme uğrar. Nükleusa tutunan sentriyollerden köken alan dokuz kalın fibril, aksonemin mikrotübül yapısının çevresinde yer alarak dış yoğun lifleri oluşturur ve kuyruk yapısı boyunca uzanır. Gelişmekte olan flagellumun etrafını sarmak üzere plazma membranı arka tarafa doğru ilerlerken, sperm hücresinin şekillenme sürecinde görev alan manşet yapısı kademeli olarak ortadan kalkar. Bu sırada mitokondriler boyun bölgesinde bulunan kaba fibrillerin çevresine ve hemen arkasındaki bölgeye hareket ederek sıkı, helikal bir yapı oluşturur. Bu yapı spermin kuyruğunun orta parçası olarak bilinir. Orta parçasının distalinde, uzunlamasına uzanan iki sütun ve çeşitli bağlantılardan oluşan fibröz kılıf, flagellumun ana yapısını sarar ve neredeyse kuyruğun ucuna kadar uzanır. Bu fibröz kılıfın sonlandığı kısa segment ise son parça olarak adlandırılır [40].

4-: Olgunlaşma (maturasyon) fazı: Spermatozoondan geride kalan artık sitoplazma ve hücreler arası köprüler temizlenir. Olgun ama işlevsel olmayan spermatozoon tübül lümenine bırakılır [23].

3.4.4. İntertisyel Hücreler (Leydig Hücreleri)

Leydig hücreleri, intertübüler boşlukta belirgin şekilde bulunan hücreleridir [41]. Bu hücreler kılcal damarların çevresinde gruplar halinde yerleşim gösterir. Başlıca işlevleri arasında androjenlerin, özellikle de testosteronun üretimi ve salgılanması yer alır. Testosteron, hipofiz-testis ekseninin düzenlenmesinde, beynin ve cinsel davranışın erkek özellikleri kazanmasında, spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesinde, erkek genital organlarının farklılaşmasında ve ikincil cinsiyet karakterinin gelişiminde önemli bir rol oynar [42]. Leydig hücreleri, seminifer tübüller arasındaki intertisyel dokuda, genellikle on hücreye kadar gruplar halinde yerleşmiş olarak bulunur. Bu hücreler büyük, yuvarlak çekirdeğe sahip poligonal yapılarıyla tanımlanır ve belirgin bir nükleolus ile eozinofilik sitoplazmaya sahiptir. İçerdikleri yüksek miktarda lipid nedeniyle, steroid salgılayan hücrelerin karakteristik özelliklerini taşırlar. Bu özellikler arasında, iyi gelişmiş düz endoplazmik retikulum, çok sayıda lipid damlacığı, tübüloveziküler kristallara sahip mitokondriler bulunur. Leydig hücrelerinde sıkça gözlenen bir diğer yapı ise, lizozomlarda biriken lipid damlacıklarının oluşturduğu çoklu, yuvarlak ve düzensiz şekilli lipofuscindir. Ayrıca bu hücrelere özgü olan Reinke kristaloidleri, soluk lekeli sitoplazmik inklüzyonlar şeklinde görülür. Çubuk benzeri veya silindirik yapıda olan bu kristaller genellikle doğrusal bir düzende yerleşmiştir. Reinke kristaloidlerinin işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte bazı araştırmalar bunların testosteron üretimi ve steroid metabolizmasının yan ürünleri ile ilişkili olabileceğini öne sürmektedir [43] [44]. Erkek embriyosunun gelişimi sırasında Leydig hücreleri, Wolffian kanalının gelişimini uyarak erkek ürogenital yapıların oluşumunu sağlayan androjenleri üretir. Bu süreçte, Sertoli hücreleri ise dişi genital yapıların gelişimini baskılayan anti-Müllerian hormonu salgılar. Yetişkinlik döneminde, embriyolojik dönemde bulunan infantil Leydig hücreleri, yaşam boyu androjen üretimini sürdüren yetişkin Leydig hücreleriyle yer değiştirir. Daha önce belirtildiği gibi, Leydig hücreleri seminifer tübüllerin dışında, intertisyel bölgede yer alır. Ürettikleri androjenler, seminifer tübüllere difüze olarak germ hücreleri ve Sertoli hücreleri üzerinde etkili olur, böylece sperm üretimini başlatır ve devam ettirir. Testis içindeki testosteron seviyesinin azalması, spermatogenezde bozulmalara yol açabilir ve bu durumun, germ hücrelerinin düzenlenmesinde görev alan temel proteinlerin ekspresyonunun azalmasıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir [45].

3.4.5. Genital Kanallar

3.4.5.1. İntratestiküler Genital Kanallar

Tubuli Rekti: Her testis lobülünün tepe kısmına yakın bir bölgede, seminifer tübüller birleşerek kısa ve düz yapıda olan tubuli rectiyi oluşturur. Bu yapının astar epitelinde germ hücreleri bulunmaz; yalnızca Sertoli hücreleri tarafından döşenmiştir. Basit kolumnar epitel, ince bir bazal lamina üzerinde yer alır ve gevşek bağ dokusuyla çevrelenmiştir. Tubuli recti'nin lümeni, testisin mediasteninde yer alan ve birbirine anastomoz yapan kanallardan oluşan rete testi ile doğrudan bağlantılıdır [46].

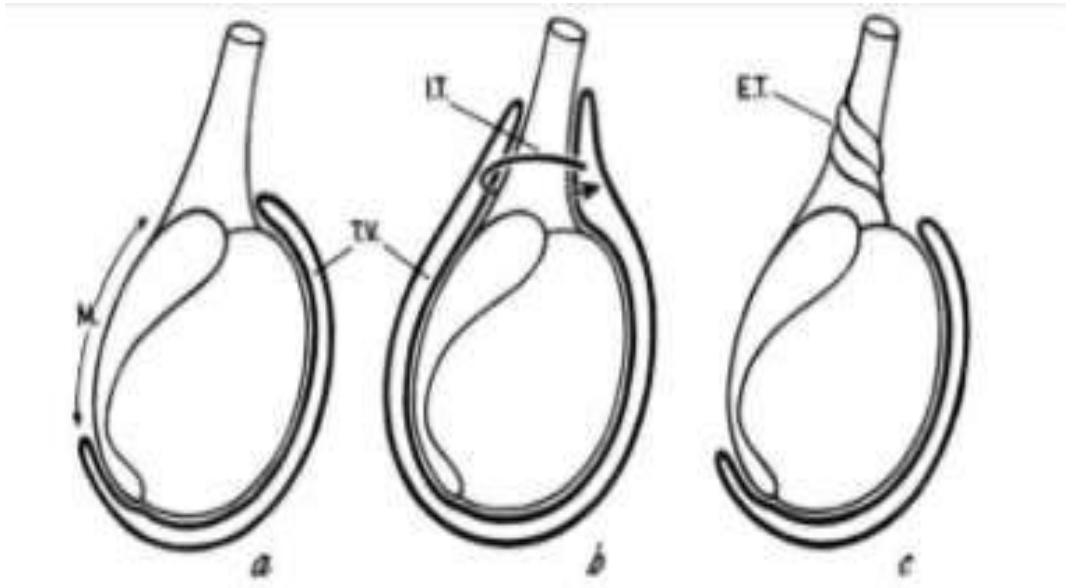
Rete Testis: Seminifer tübüller, rete testis adı verilen pleksiform kanal ağını oluşturmak üzere mediasten testis bölgesinde birleşir. Bu yapı, miyoid hücreleri içeren oldukça vaskülarize kollajen destek dokusuyla çevrilidir. Rete testis, yüzeyinde mikrovilluslar ve tek bir silyum bulunan düşük küboidal epitel hücreleri ile döşelidir. Miyoid hücrelerin kasılması, spermatozoaların karışmasını sağlayarak epididime doğru ilerlemelerine yardımcı olur. Epitel hücreleri ayrıca, seminal sıvıdan protein ve potasyumun geri emiliminde rol oynar. Silyum hareketinin ise, epididimde olgunlaşma süreci tamamlanana kadar hareket edemeyen spermatozoaların ilerlemesine katkı sağladığı düşünülmektedir [47].

Duktuli Efferentes: Duktuli efferentes veya efferent duktuslar testisin arka-üst yüzeyinde yer alan mediastenden çıkarak rete testisi duktus epididimise bağlar. Bu yapılar bağ dokusu içinde yer alır ve epididimin baş kısmının oluşumuna katkıda bulunur. Bu yapıların lümeni, epitel astarının uzun silli hücrelerle kısa, silsiz hücrelerin dönüşümlü olarak dizilmesinden dolayı düzensiz bir kontur gösterir. Tübüllerin bazal yüzeyi düzgün bir yapı sergiler. Bu yüzeyin altında ince bir düz kas tabakası içeren ince bir bağ dokusu katmanı yer alır. Duktuli efferentes duktus epididimise açıldığı için, lümeni duktus epididimise özgü psödostratifiye kolumnar epitel ile örtülüdür [48].

3.5. TESTİS TORSİYONU

Testis torsiyonu (spermatik kord torsiyonu), testis ve spermatik kordun tunika vajinalisin distal (intravajinal) (Şekil b) ya da proksimal (ekstravajinal) (Şekil c) bölümünde kendi eksenini etrafında dönmesiyle meydana gelen klinik bir durumdur. Her ne kadar bu durum esas olarak yenidoğanlarda ve ergenlik dönemindeki bireylerde görülsede, zaman zaman 40-50 yaş aralığındaki erişkinlerde veya testiküler travma geçirmiş kişilerde de meydana

gelebilir. Ergenlerde ve erişkinlerde tunika vajinalis testisleri sabit bir şekilde posterolateral yöne tutturur. Bu yapı, spermatik kordun tunika vajinalisin içinde dönmesine olanak tanır. Bu anatomik özellik ‘Bell-clapper deformitesi’ olarak adlandırılır ve genellikle intravajinal torsiyonla ilişkilidir. Öte yandan, yenidoğanlarda tunika vajinalis henüz gubernaculumla birleşmediğinden hem spermatik kord hem de tunika vajinalis birlikte dönerek ektravajinal torsiyon oluşturur. Bu tip torsiyon doğum öncesinde veya hemen sonrasında gelişebilir [49].



Şekil 3.6. Testiküler torsiyon [49]

Testis torsiyonu (TT), acil servise akut skrotal ağrı şikayetiyle başvuran hastaların yaklaşık %20 sini oluşturmaktadır. Bu durumun görülme sıklığı, iki belirgin yaş aralığında artış gösterir: biri bebeklik döneminde (her 100.000 doğumda yaklaşık 4,35 vaka) diğeri ise ergenlik çağında (100.000’de 10,46 vaka). Testis torsiyonu, spermatik kordun kendi eksenini etrafında dönmesiyle ortaya çıkan ve testiküler dokuya giden kan akımını keserek iskemiye yol açan bir patolojidir. Tedavide gecikme olması halinde, testisin nekrozu gibi ciddi ve kalıcı sonuçlar doğurabilir. Bu nedenle torsiyonun erken dönemde tanınması ve acilen müdahale edilmesi, testisin kaybını önlemede kritik rol oynar [50]. Testise gelen hasarın derecesi, torsiyonun ne kadar şiddetli olduğu ve kan akışının ne kadar süre kesildiğiyle doğrudan ilişkilidir. Genellikle geri dönüşü olmayan doku hasarının gelişmesinden önce yaklaşık 4 ila 8 saatlik bir müdahale süresi vardır. Bu

sürenin aşılması halinde orşektomi gerekebilir. Torsiyon sonrası gelişen doku hasarı iki aşamalı olarak meydana gelir: Birincisi torsiyon sırasında oluşan iskemi, ikincisi ise detorsiyon sonrası yeniden kan akışının sağlanmasıyla meydana gelen reperfüzyon hasarıdır. Bu ikinci aşamada oluşan iskemi/reperfüzyon hasarı; nötrofillerin aktive olması, inflamatuvar sitokinlerin salınımı, artmış trombojenite, hücre içi kalsiyum dengesinin bozulması ve reaktif oksijen (ROS) ile azot türlerinin (RNS) aşırı üretimi gibi çeşitli moleküler ve hücresel süreçlerin devreye girmesiyle kompleks bir hasar mekanizmasına neden olur. Bu süreçte hücre adezyon moleküllerinin aktive olmasında hasarın ilerlemesinde rol oynar [51].

3.5.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı (İ/R Hasarı)

Organ ya da dokulara ulaşan kan akışının çeşitli nedenlerle ciddi şekilde azalması ya da tamamen durması sonucu, ilgili bölgenin yeterli şekilde oksijenlenememesi durumuna iskemi adı verilir. İskemiye maruz kalan dokular, belirli bir süre boyunca oksijensiz kaldığında, bu durum hücresel düzeyde hasara veya nekroza yol açabilir. İskeminin ardından kan dolaşımının yeniden sağlanması ise reperfüzyon olarak tanımlanır ve genellikle mevcut doku hasarının daha da ilerlemesine neden olur. İlk olarak kan akışının engellenmesiyle başlayan hücresel yanıt, oksijenin tekrar dokulara ulaşmasıyla birlikte ters etki yaratabilir. Bu duruma “paradoksal oksijen etkisi” denir ve bu süreçte ortaya çıkan çeşitli metabolitler, hücresel hasarın derinleşmesine ve hücrelerin stres yanıtı geliştirmesine sebep olabilir. Bu stres durumları; ortaya çıkan metabolitlerin türüne ve etkilenen organellere bağlı olarak oksidatif stres, nitrozatif stres, endoplazmik retikulum stresi ve mitokondriyal stres gibi farklı başlıklar altında sınıflandırılabilir. Hücreler bu zararlı etkileri baskılamak amacıyla antioksidan savunma sistemlerini devreye sokar. Ancak bu mekanizmalar yetersiz kalırsa, hücresel bütünlük bozulur ve hücre ölüm yolları aktif hale gelir [52] [53].

3.5.1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı miktarda oluşması ile hücrenin bu türleri ortadan kaldırma yetisinin yetersiz kalması sonucu oluşan ve dokulara zarar verebilen patolojik bir süreçtir [54] [55]. Bu dengenin bozulması, tüm organizmayı etkileyebilecek düzeyde, hayati biyomoleküller ve hücrelerde hasara yol açabilir [56]. Reaktif oksijen türleri (ROS), hücresel metabolizma sırasında oluşan ve fizyolojik koşullarda belirli düzeylerde üretimi doğal kabul edilen yan ürünlerdir. Hem bitki hem de

hayvan hücrelerinde, hücre içi ve dışı çevresel değişimlere yanıt olarak sinyal iletim yollarının aktive edilmesinde kritik rol oynarlar [57]. ROS'ların büyük bir kısmı hücrelerde mitokondriyal solunum zinciri tarafından üretilmektedir [58]. Aerobik hücreler, endojen metabolik süreçler sırasında moleküler oksijenin biyolojik olarak indirgenmesi sonucunda süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve organik peroksitler gibi çeşitli ROS türlerini sentezler. [59]. Ayrıca hipoksik koşullarda mitokondriyal solunum zinciri, nitrik oksit (NO) üretimi yoluyla reaktif nitrojen türlerinin RNS oluşumuna da katkı sağlar [58].Reaktif nitrojen türleri (RNS) aşırı lipid peroksidasyonunu tetikleyerek reaktif aldehytler gibi ikincil zararlı bileşiklerin, örneğin malondialdehit ve 4-hidroksinonenal gibi moleküllerin oluşumuna yol açabilir. Proteinler ve lipitler, oksidatif hasarın başlıca hedefleri arasında yer alır ve bu moleküllerde meydana gelen yapısal değişiklikler mutagenез riskini artırabilir [60]. Çevresel stres faktörlerinin sürekli etkisi altında, ROS üretimi uzun süre devam edebilir ve bunun sonucunda hücresel yapı ve işlevlerde ciddi bozulmalar oluşabilir [61]. İskemi-reperfüzyon hasarı (İ/R) hasarı, özellikle testis gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip organlarda, germ hücrelerinin bütünlüğünü bozarak spermatogenez sürecini durdurabilir ve sonuç olarak erkek infertilitesine yol açabilir. Testiküler torsiyon gibi cerrahi acil durumlarda kan akışının kısa sürede yeniden sağlanması kritik öneme sahiptir; ancak reperfüzyonla birlikte ortaya çıkan yoğun oksidatif stres, testiküler yapının kendisine zarar verebilmektedir. Bu nedenle hem klinik hem deneysel çalışmalarda İ/R hasarının erken tanınması ve antioksidan tedavi yaklaşımlarının kullanımı cerrahi sonrası testiküler fonksiyonun korunması açısından önem arz etmektedir [55] [3] [62].

3.6. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar, serbest radikallerin hücresel yapılarda yol açabileceği zararlı etkileri önleyebilen savunucu moleküllerdir. Bu bileşikler, serbest radikallerle doğrudan reaksiyona girerek onların kararsız yapısını stabilize eder ve böylece oksidatif stres kaynaklı hücresel hasarın engellenmesine yardımcı olurlar [63].

Antioksidanlar, hücresel düzeyde serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için farklı yollarla etki gösterirler. Bu mekanizmalar genel olarak altı başlık altında toplanabilir.

1. Radikal süpürücü (toplayıcı etki); Serbest oksijen radikallerini doğrudan yakalayarak veya onları daha az reaktif moleküllere dönüştürerek etki ederler. Bu etki özellikle antioksidan enzimler tarafından gerçekleştirilir.
2. Bastırıcı etki; Serbest radikallere hidrojen atomu ekleyerek, bu radikallerin aktivitesini azaltır veya tamamen inaktive ederler. Vitaminler (örneğin C ve E vitaminleri) ile flavonoidler bu gruba giren antioksidanlardır.
3. Zincir kırıcı etki; Serbest radikal zincir reaksiyonlarını kesintiye uğratarak yayılmalarını engellerler. Hemoglobin, serüloplazmin ve bazı mineraller bu etkiyi gösteren bileşikler arasındadır.
4. Onarıcı etki; Serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasarları tamir etme kapasitesine sahiptirler.
5. Hücresel kinaz kayıplarını önleme; Oksidatif reaksiyonları durdurarak hücresel sinyal yollarında yer alan kinaz enzimlerinin bozulmasını engellerler.
6. Enzimatik etki; Süperoksid dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimlerin etkisiyle, enzimatik olmayan antioksidanların sentezini artırarak koruyucu rol oynarlar. [64].

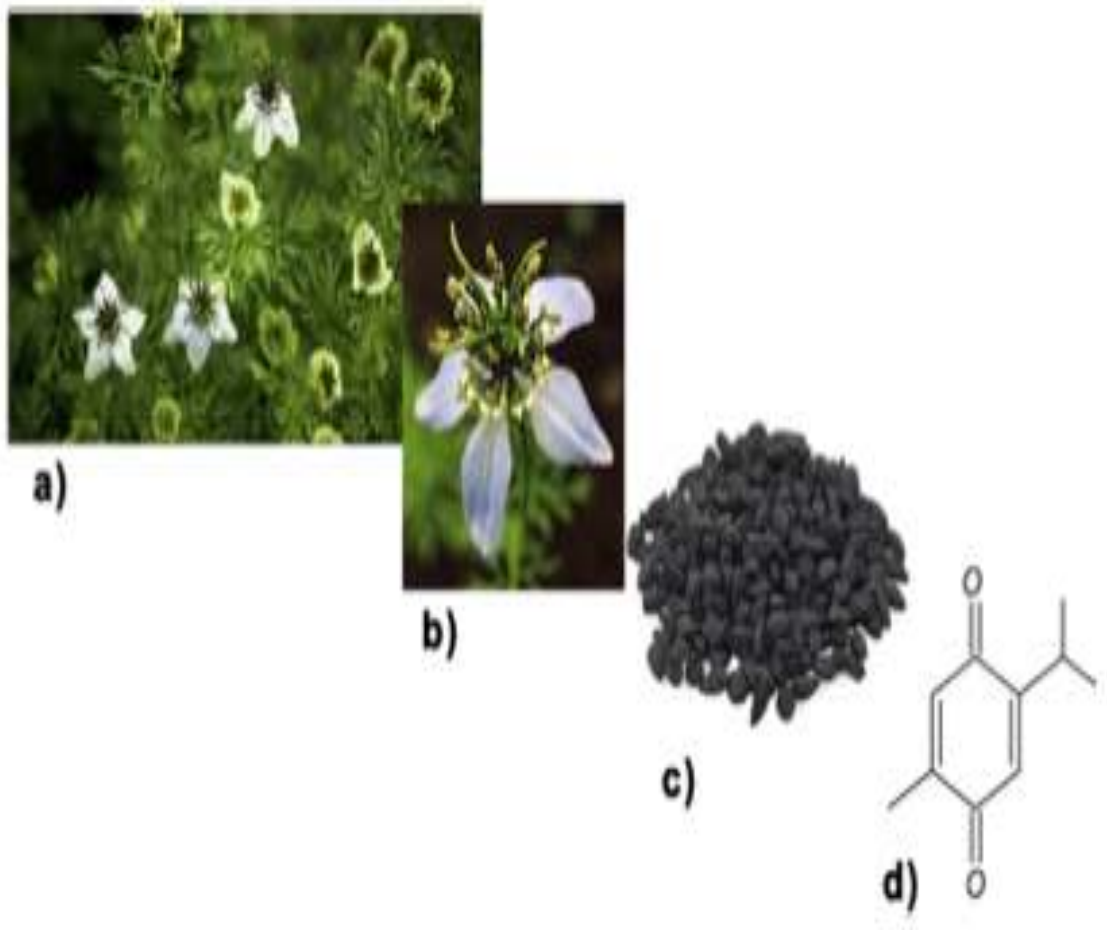
3.7. GÜÇLÜ BİR ANTIOKSİDAN OLAN TİMOKİNON

Timokinon (TQ) gelecek vadede şifalı bitkiler arasında yer alan *Nigella sativa* (yaygın adıyla çörek otu), Ranunculaceae (dügünçiçeğigiller) familyasına ait, tek yıllık ve ortalama 20–30 cm boyunda çiçek açan bir bitkidir. Özellikle Pakistan, Hindistan ve Akdeniz havzasında yaygın olarak yetiştirilmekte olup, Türkiye’de ise ağırlıklı olarak Afyon, Isparta, Burdur ve Konya bölgelerinde yetiştirilmektedir [65] [66]. *Nigella sativa*’nın tohumları ve bu tohumlardan elde edilen yağ, yaklaşık iki bin yıldır geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Etkin bileşenler yönünden oldukça zengin olan bu tohumlar, özellikle Orta Doğu ve Uzak Doğu’da pek çok farklı hastalığın doğal tedavi sürecinde önemli yer tutmuştur. Geleneksel kullanımlar arasında astım, bronşit, iltihaplanma, egzama, ateş, grip, hipertansiyon, öksürük, baş ağrısı ve baş dönmesi gibi solunum ve sistemik rahatsızlıkların yanı sıra; diyabet, karaciğer ve böbrek fonksiyon bozuklukları, sinir sistemi hastalıkları, romatizma, kanser ve ilişkili inflamatuvar hastalıklar ile mide-bağırsak problemleri gibi çok çeşitli durumlar

yer almaktadır [67]. *Nigella sativa* tohumlarının kimyasal bileşimi, yetiştirildiği bölgenin iklimsel özelliklerine göre değişiklik göstermekle birlikte; uçucu yağlar (%0.4–0.45), sabit yağlar (%32–40), protein (%16–19.9), amino asitler, alkaloidler, tanenler, saponinler, lif (%5.5), karbonhidrat (%33.9), mineral maddeler (%1.79–3.44) ve çeşitli vitaminleri (askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin ve folik asit) içermektedir. Sabit yağ fraksiyonunda oleik asit, linoleik asit, eikozadienoik asit, araşidonik asit ve linolenik asit gibi doymamış yağ asitleri bulunurken; doymuş yağ asitleri arasında miristik, palmitik ve stearik asit yer almaktadır [68] [69]. Uçucu yağ bileşiminde ise nigellon, karvakrol, p-simen, d-limonen, α - ve β -pinen'in yanı sıra başlıca farmakolojik etkilerden sorumlu olan timokinon (TQ), ditimokinon, timohidrokinon ve timol gibi bileşenler yer almaktadır. Her ne kadar TQ bir antioksidan ve antiinflamatuvar ajan olarak büyük bir potansiyele sahip olsa da çok çeşitli faydaları vardır. İmmün güçlendirici, antitümöral ve antidiyabetik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [70].

TQ' un Tanımı;

Timokinon, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin yanı sıra; bağışıklık sistemini destekleyici, antitümöral ve antidiyabetik özellikleriyle de dikkat çeken çok yönlü bir bileşen olarak öne çıkmaktadır [71].



Şekil 3.7. *Nigella sativa* bitkisi (a) çiçeği (b) tohumları(c) ve tohumlarının biyoaktif bileşenin kimyasal yapısı [72]

3.7.1. Antioksidan Etkisi

Günümüzde doğal kaynaklı antioksidan bileşikler ve fitokimyasallar, özellikle oksidatif stresle ilişkili hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde önemli bir ilgi odağı hâline gelmiştir. Bu ilginin temelinde, bu bileşiklerin serbest radikalleri etkisiz hâle getirme ve oksidatif stres kaynaklı patolojik süreçlere karşı hücresel düzeyde koruyucu etki gösterme potansiyeli yatmaktadır. Aynı zamanda doğal immünomodülatörler, bağışıklık sistemini aktive ederek ve düzenleyerek organizmanın savunma kapasitesini artırmaktadır. Bu bağlamda doğal bir bileşik olan timokinon (TQ), güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve immün sistemi destekleyici özellikleri sayesinde farmakolojik araştırmalarda dikkat çeken bir ajan olarak öne çıkmıştır. Antioksidan savunma sistemi içerisinde yer alan enzimatik yapılar, reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı hücresel düzeyde koruma sağlar. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($\bullet OH$) ve peroksil radikali ($ROO\bullet$)

gibi ROS türleri; hücre içinde doğal olarak gerçekleşen aerobik metabolik süreçler ile birlikte ultraviyole (UV) ışıınımı ve çevresel kirlilik gibi dış etkenler aracılığıyla da sürekli olarak üretilir. Bu reaktif türlerin aşırı üretimi, hücre zarındaki lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin oksidatif hasarına yol açarak hücresel işlev bozukluklarına neden olabilir. Timokinon (TQ), süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi çeşitli reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı gösterdiği etkili temizleme kapasitesiyle dikkat çeken güçlü bir fitokimyasal antioksidan olarak tanımlanmaktadır. Bu özelliği sayesinde, ROS birikiminin neden olduğu hücresel düzeydeki zararlı etkileri azaltarak pek çok hastalık sürecinde koruyucu bir rol üstlenebilir. TQ ile yapısal benzerlik taşıyan sentetik bir bileşik olan tert-butilhidrokinon (TBHQ) ile birlikte, demir bağımlı mikrozomal lipid peroksidasyonunun güçlü bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. TQ'nun antioksidan etkileri, büyük ölçüde kinon yapısından kaynaklanan redoks özelliklerine ve fizyolojik bariyerleri geçme kabiliyetine bağlanmaktadır. Bu bileşiğin hücre içi kompartmanlara kolay erişimi, radikal temizleyici etkinliğini daha da artırmaktadır. Literatürde, endojen antioksidan savunma sisteminin güçlendirilmesinin, oksidatif stresin yol açtığı doku hasarını ve hücrelerin neoplastik dönüşümünü önlemede terapötik açıdan kritik bir rol oynadığına dikkat çekilmektedir. Bu bağlamda TQ, oksidatif hasar, otoimmün süreçler ve çeşitli dokularda gelişebilecek inflamatuvar komplikasyonlara karşı hücre koruyucu (sitoprotektif) etkiler sunan umut verici bir tedavi adayı olarak değerlendirilmektedir. [67].

3.8. NRF2

Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), hücrelerin çevresel stres faktörlerine karşı verdiği yanıtları düzenleyen temel transkripsiyon faktörlerinden biridir [73]. Temel bir “basic leucine zipper” (bZIP) yapısına sahip olan bu protein, özellikle inflamasyon ve doku yaralanması gibi uyarıcılar sonucunda ortaya çıkan reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı savunma sisteminde kritik rol oynar. Nrf2, antioksidan savunmada görev alan enzimlerin sentezinden sorumlu genlerin ekspresyonunu düzenleyerek oksidatif stresi dengelemeye katkıda bulunur [74]. Bu koruyucu etkilerini etkinleştirebilmesi için Nrf2'nin sitoplazmadan nükleusa transloke olması gerekir. Bu translokasyon, genellikle oksidatif stres veya iskemi/reperfüzyon (İ/R) gibi patolojik durumlar sonucunda gerçekleşir. İ/R hasarı, belirli bir organa kan akışının azalmasının ardından yeniden kanlanma ile tetiklenen ve ciddi hücresel hasara yol açabilen bir süreçtir [5]. Yapılan

araştırmalar, Nrf2 yolunun aktive edilmesinin akciğer, karaciğer, beyin, testis ve kalp gibi birçok organda İ/R kaynaklı hasarı azalttığını ortaya koymuştur [5]. Nrf2, ROS düzeylerini düşürmek amacıyla antioksidan enzimlerin aktivitesini artırmakla kalmaz; aynı zamanda proinflamatuvar sitokinlerden IL-6, IL-1 β ve TNF- α gibi moleküllerin ekspresyonunu da azaltarak inflamatuvar yanıtları baskılar. Bu özellikleri sayesinde Nrf2, yalnızca oksidatif stresi baskılamakla değil, aynı zamanda hücre ölümünü engellemek ve hücreyel canlılığı korumakla da ilişkilendirilmektedir. Dahası, Nrf2'nin otofajiyi indükleme yoluyla, İ/R hasarı sırasında hücrelerin apoptozdan korunmasında etkili olduğu gösterilmişti [5]. Nrf2, sitoplazmada yer alan çözüner bir protein olup, Cap 'n' Collar (CNC) alt ailesine aittir, 605 amino asit uzunluğundadır ve yedi işlevsel olarak korunmuş protein homolojisi bölgesi (Nrf2-ECH homolojisi, Neh) içerir. Bu bölgeler, hem Nrf2'nin stabilitesini hem de transkripsiyonel aktivitesini düzenleyen çeşitli moleküler etkileşimlere aracılık eder. Neh1 bölgesi, bir ubiquitin-konjugasyon enzimi içermesi nedeniyle Nrf2'nin transkripsiyonel aktivitesini artırıcı rol oynar. Neh2 bölgesi ise, DLG ve ETGE adı verilen iki motif aracılığıyla Keap1 (Kelch-benzeri ECH ile ilişkili protein 1) ile etkileşime girer. Keap1, fizyolojik koşullarda, Nrf2'yi ubiquitinasyon ve proteazomal yıkım yoluyla baskılayan culin-bazlı bir E3 ubiquitin ligaz kompleksinin substrat adaptörüdür. Neh3, Neh4 ve Neh5 bölgeleri, transaktivasyon alanları olarak görev yapar. Neh3, Nrf2'nin C-terminalinde yer alır ve CHD6 adlı ATPaz/helikaz DNA bağlayıcı proteinle etkileşerek transkripsiyonel aktivasyonu sağlar. Neh4 ve Neh5 ise, Neh1 ve Neh7 arasında konumlanır ve cAMP yanıt elemanı bağlayıcı proteinin (CREB) aktivasyonu aracılığıyla gen transkripsiyonunu başlatmada işlev görür. Neh6 bölgesi, serin aısından zengin bir peptid dizisi barındırır ve DSGIS ile DSAPGS olarak tanımlanan iki motif içerir. Bu alan, β -transdüsin tekrarı içeren protein (β -TrCP) ile etkileşerek Nrf2'nin negatif düzenlenmesini sağlar ve ayrıca Nrf2-Keap1 kompleksi içerisinde protein stabilitesini kontrol eder. Nrf2, nükleusa geçerek endojen antioksidan yanıt elementlerine (ARE) bağlanır ve NQO1, HO-1 gibi çeşitli antioksidan enzimlerin ekspresyonunu başlatır. Neh7 bölgesi ise, retinoid X reseptörü alfa (RXR α) ile etkileşerek Neh4 ve Neh5'in aktivasyonunu baskılar ve böylece Nrf2-ARE sinyal yolunu negatif yönde düzenler. Nrf2 ve endojen inhibitörü Keap1, oksidatif strese karşı koruma sağlayan, evrimsel aıdan korunmuş, hücre içi bir savunma sistemi oluşturur. Normal koşullarda Keap1 aracılığıyla proteazomal yıkıma uğrayan Nrf2, oksidatif stres altında Keap1'den ayrılarak küçük muskuloaponeotik fibrosarkom (sMaf) proteinlerinden biri ile heterodimerleşir ve nükleusa transloke olur. Bu heterodimer, transkripsiyonu

başlatmak üzere Nrf2 hedef genlerinin promotör bölgelerinde yer alan ARE dizilerini tanıyarak bağlanır [75] [76].

3.9. PTEN/mTOR

Pten bugüne kadar tanımlanan bispesifik fosfataz aktivitesine sahip ilk onkogendir [77]. Fonksiyon kaybı mutasyonundan sonra tümorojenezi indüklemenin yanı sıra, hücre hayatta kalma, çoğalması, yaşlanma, hareketlilik ve polarite dahil olmak üzere fizyolojik koşullar altında bir dizi hücresel süreci yönetir [78]. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu modüle etme yeteneği, kök hücrenin kendi kendini yenilemesini, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını sağlamak için hayati öneme sahiptir [79]. Ayrıca, peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gamma (PPAR γ) ve tümör baskılayıcı p53 gibi transkripsiyon faktörleri, PTEN ekspresyonunu yukarı yönlü düzenleyebilmektedir. Bununla birlikte, PTEN gen promotörünün metilasyonu, transkripsiyonel olarak susturulmasına neden olabilmektedir. Enzimatik aktivitesi ise fosforilasyon, asetilasyon ve oksidasyon gibi çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlarla düzenlenmektedir. İnsan kanserlerinde sıkça mutasyona uğrayan veya delesyona uğrayan bu gen, önemli bir tümör baskılayıcı rol üstlenmektedir. Ayrıca, PTEN ekspresyonundaki azalma ya da işlev kaybı, birçok tümör türünde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [80]. Protein, N-terminalde yer alan bir fosfataz bölgesi ve C-terminalde bulunan C2 ile PDZ (PSD-95, DLG1 ve ZO-1 ile etkileşim sağlayan) bağlanma bölgelerini içermektedir. Fosfataz aktivitesi için kritik olan üç anahtar amino asit kalıntısını içeren CX₅R(S/T) motifi, aktif bölgenin bir parçası olarak görev yapar. Bu yapısal özellik, PTEN'in fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3) gibi negatif yüklü lipid substratlara karşı yüksek afinite göstermesini sağlamaktadır. Lipit fosfataz aktivitesi sayesinde PTEN, PIP3 düzeylerini dengeleyerek hücre çoğalması, apoptoz ve hücre göçü gibi olayları kontrol eden AKT sinyal yolunu baskılar. AKT yolunun aktivasyonu hipoksiye yanıt olarak HIF-1 (hipoksiye indüklenbilir faktör-1) stabilitesini artırırken; PTEN, bu süreçte HIF-1'in stabilizasyonunu azaltarak hipoksiyle ilişkili yanıtları sınırlar. HIF-1, düşük oksijen düzeylerine adaptasyonda görevli genlerin transkripsiyonunu düzenlemede anahtar rol oynamaktadır [81]. Fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP3), reseptör tirozin kinaz sinyalleri aracılığıyla aktive olan PI3K (fosfatidilinozitol 3-kinaz) yolunun temel ikinci haberci molekülü olarak görev yapar. PTEN, PIP3'ü defosforile ederek fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata (PIP2) çevirir ve böylece PI3K/AKT yolunun aşırı aktivasyonunu baskılar. Hücre zarında biriken PIP3,

Pleckstrin homoloji (PH) alanı içeren proteinlerin özellikle AKT'nin zar lokalizasyonunu destekleyerek bu proteinlerin fosforilasyonla aktifleşmesini sağlar [82]. Aktif hale gelen AKT, hücresel yaşamı sürdürmeye yönelik çeşitli proteinleri fosforile eder ve bu süreçler; hücre döngüsü ilerlemesi, anjiyogenez, metabolizma ve apoptoza direnç gibi temel biyolojik işlevleri kapsar. PTEN ise, PIP3 seviyelerini dengeleyerek bu süreçlerin aşırı uyarılmasını engelleyen kritik bir düzenleyici olarak rol alır. PIP3 birikimi; hücre çoğalması, hayatta kalma ve hücre hareketliliğinin artışı gibi biyolojik etkilerle ilişkilidir ve bu etkiler, tümör oluşum sürecine doğrudan katkıda bulunabilir. Nitekim, PI3K/AKT sinyal yolunun regülasyonundaki bozukluklar pek çok farklı malign kanserde rapor edilmiştir. PTEN'in tümör baskılayıcı rolü, PIP3'ün fosfat grubunu uzaklaştırarak AKT'nin aktivasyonunu önlemesiyle gerçekleşir. Bu yolla, hücre hayatta kalma sinyalleri baskılanır. Yüksek düzeyde PIP3, kanser hücrelerine proliferatif avantaj sağladığı için PTEN geninde meydana gelen inaktif edici mutasyonlar, birçok tümör tipinde yaygın olarak gözlenmektedir [83]. Reaktif oksijen türleri (ROS), hücresel sinyal yollarında yer alan moleküllerle doğrudan etkileşime girerek proliferasyon ve hücre hayatta kalma gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyebilir. Özellikle, PTEN'in katalitik etkinliği ROS tarafından modüle edilmekte ve oksidatif stresin varlığında PTEN'in fosfataz aktivitesi baskılanmaktadır. Bu inhibisyon, hücre içi PIP3 düzeylerinde artışa yol açar; PIP3'ün plazma zarında birikmesi, AKT gibi hedef proteinlerin aktivasyonunu tetikler ve ROS'un bu süreçte işlevsel bir rol üstlendiğini düşündürür. PI3K/AKT yolunun aktive olması, hücre hayatta kalmasını destekleyen çok sayıda genin ekspresyonunu artırır. Antioksidan uygulamaları hem PTEN'in fosforilasyonunu hem de buna bağlı olarak gelişen AKT aktivasyonunu engelleyebilir. ROS, PTEN'in inaktivasyonuna neden olurken, gen düzeyindeki PTEN ekspresyonunu etkilememektedir [84].

mTOR:

mTOR (mammalian target of rapamycin), hücre büyümesi, metabolizma, protein sentezi, otofaji ve hücresel yaşam döngüsünün düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayan serin/treonin kinaz yapısında bir proteindir [85]. Raptor ve Rictor alt birimleride dahil olmak üzere çeşitli proteinlerle etkileşime girer ve mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) protein kompleksleri olarak bilinen iki farklı kompleks hâlinde görev yapar [86]. mTORC1 kompleksi, temel bileşeni olan Raptor sayesinde, DNA hasarı ve reaktif oksijen türleri (ROS), amino asitlerin ve büyüme faktörlerinin mevcudiyeti, glikoz ve diğer enerji kaynakları gibi çevresel ve hücresel stres faktörlerine

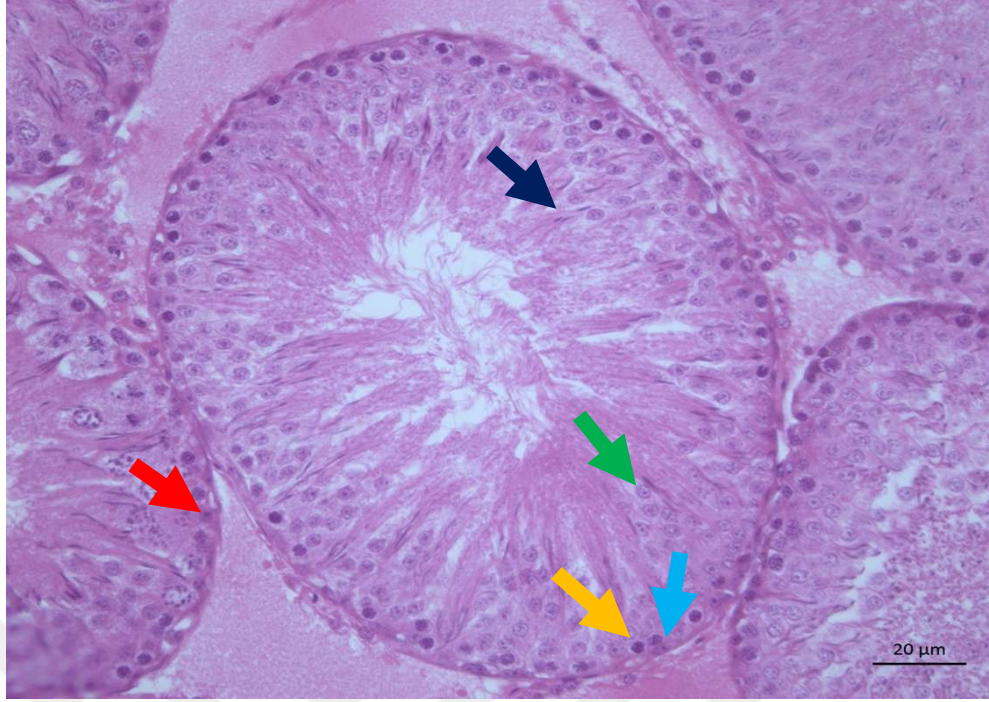
karşı yanıt verir. Bu kompleks, başlıca reseptör tirozin kinaz (RTK) aracılı yukarı akış sinyalleri üzerinden protein sentezi, translasyon, otofaji, lizozomal ve mitokondriyal biyogenez ile lipid ve nükleotid üretimini düzenler. RTK ile ilişkili bu sinyalleme yolları; sitokinler, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), Wnt, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/AKT, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve 5' adenosin monofosfatla aktive edilen protein kinaz (AMPK) gibi kaskadların çoğunu içermekle birlikte, sinyalleri genellikle TSC1/TSC2 (tüberöz skleroz kompleksi) üzerinden entegre eder. mTORC2 kompleksi ise Rictor alt birimiyle tanımlanır ve başlıca IGF ve PI3K/AKT sinyal yolları aracılığıyla iyon taşınımı, hücre hayatta kalma, proliferasyon, hücre göçü, sitoskeletal yeniden yapılanma ve glikoz metabolizması gibi süreçleri kontrol eder. Ayrıca, mTORC1 ve mTORC2, mTOR sinyallemede yer alan çeşitli proteinler üzerinden birbirlerini karşılıklı olarak düzenleyerek, hücresel homeostaz ve hastalıkların patogenezi üzerinde etkili olan karmaşık bir düzenleyici ağ oluşturur [87].

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

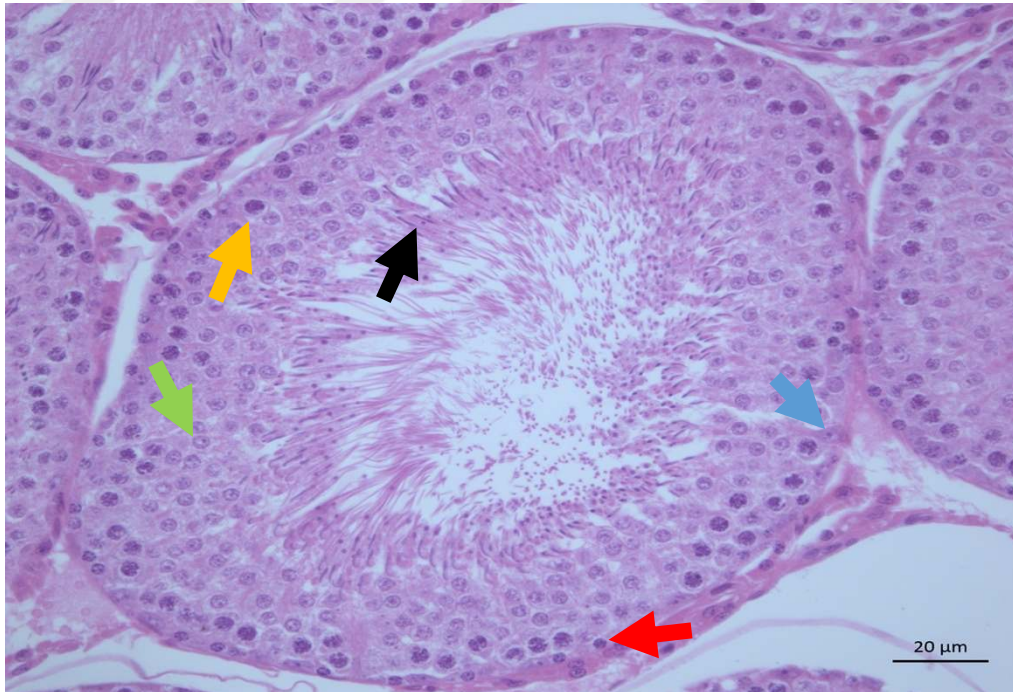
4.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

4.1.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması

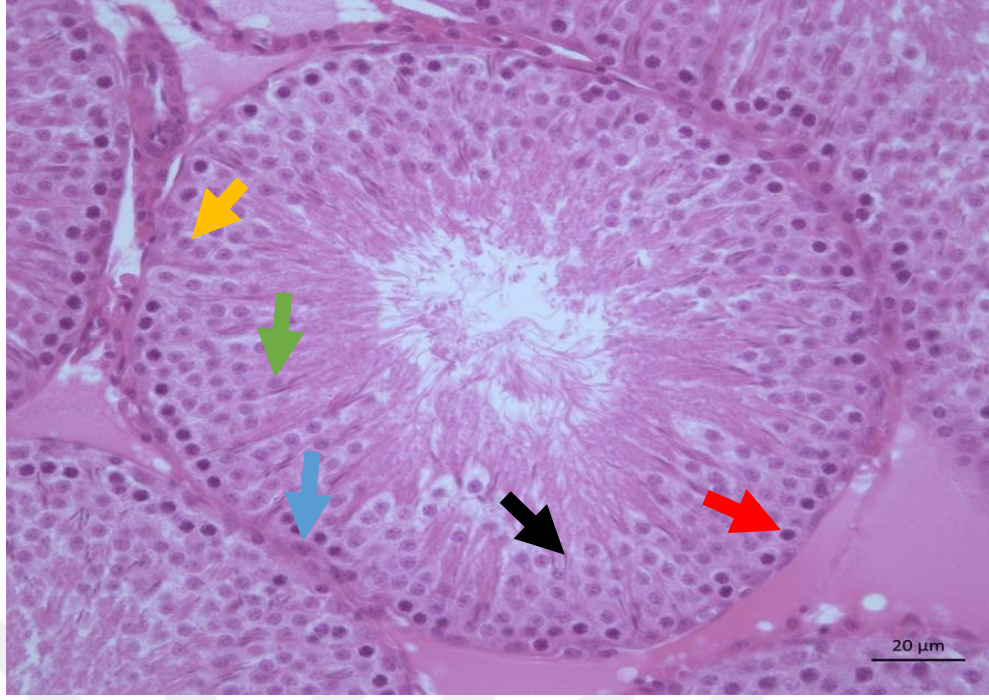
Hematoksilen-Eozin boyaması sonucunda, testis dokularında grup bazlı histolojik farklılıklar gözlemlendi. Kontrol grubuna ait testiküler dokular, fizyolojik yapıyı yansıtan düzenli histo-morfolojik özellikler göstermiştir. Seminifer tübüller dairesel ve kompakt bir görünümde olup, germinal epitel tabakaları bütünlüğünü korumaktadır. Spermatogenik hücre dizilimleri belirgin, Sertoli ve Leydig hücreleri ise normal morfolojidedir. İntertisyel alanda herhangi bir ödem, inflamasyon veya dejeneratif değişikliğe rastlanmamıştır (Şekil 4.1.). Sham grubunda kontrol grubuna benzer yapısal bütünlük korunmuştur (Şekil 4.2.). Ancak cerrahi müdahaleye bağlı olarak bazı tübüllerde hafif düzeyde hücresel düzensizlikler saptanmıştır. Buna rağmen germinal epitel organizasyonu genel olarak sağlam kalmış, belirgin doku hasarına rastlanmamıştır. Timokinon uygulanan grupta, testis dokularında genel olarak sağlıklı bir histolojik görünüm gözlemlenmiştir. Seminifer tübüller düzgün dizilim göstermiş, germinal epitelin yapısı korunmuştur (Şekil 4.3.). Torsiyon/Detorsiyon grubunda testis dokularında belirgin yapısal bozulmalar ve ağır histopatolojik hasarlar tespit edilmiştir. Seminifer tübüller deforme olmuş, germinal epitelde hücre dizilimi kaybolmuş ve belirgin spermatogenik hücre kaybı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.). Bu bulgular, torsiyonun testiküler dokuya ciddi iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturduğunu göstermektedir. Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon grubunda ise Torsiyon grubuna kıyasla doku bütünlüğünün büyük oranda korunduğu görülmüştür. Seminifer tübüller daha düzenli görünümde olup, germinal epiteldeki hücresel kayıplar ve dejeneratif değişiklikler daha sınırlıdır (Şekil4.5.). Bu gözlemler, Timokinonun torsiyona bağlı testiküler hasarı hafiflettiğini ve doku üzerindeki iyileştirici etkisini ortaya koymaktadır.



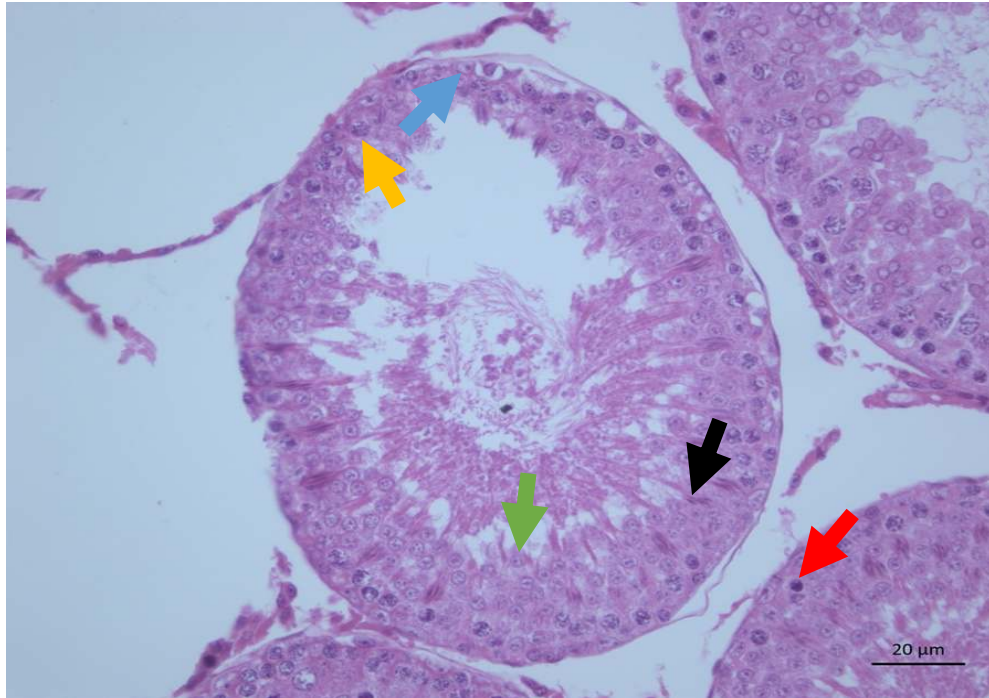
Şekil 4.1. Kontrol grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x)
(Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.)



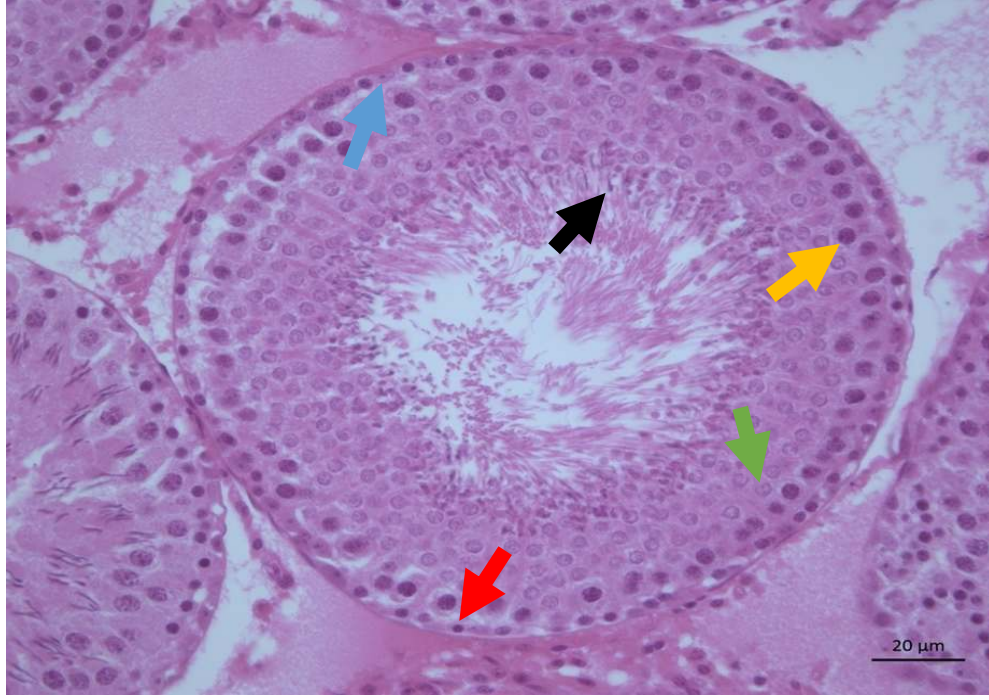
Şekil 4.2. Sham grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x)
(Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.)



Şekil 4.3. Timokinon grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.)



Şekil 4.4. Torsiyon/Detorsiyon grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.)

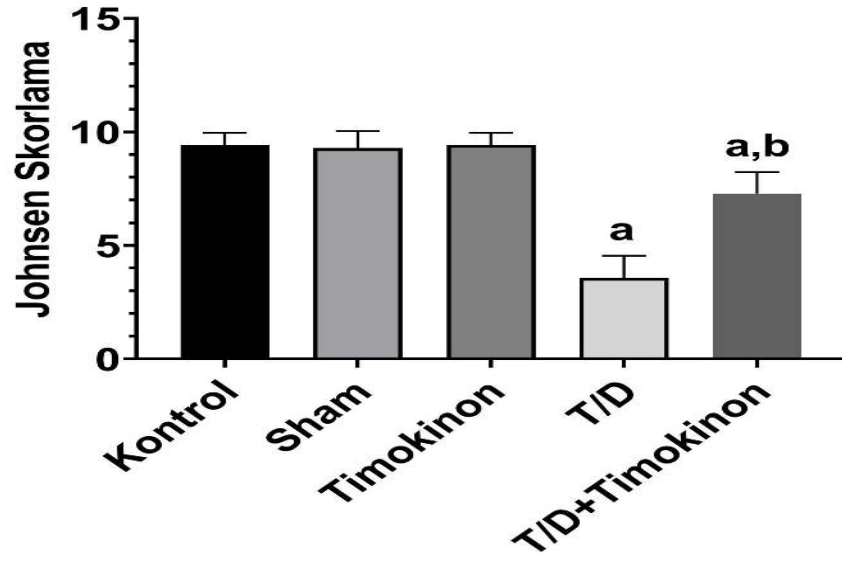


Şekil 4.5. Timokinin+Torsiyon/Detorsiyon grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.)

4.1.2. Johnsen Skorum Bulguları

Testis dokusuna ait histolojik değerlendirme, Johnsen testiküler skorum sistemi esas alınarak yapıldı.

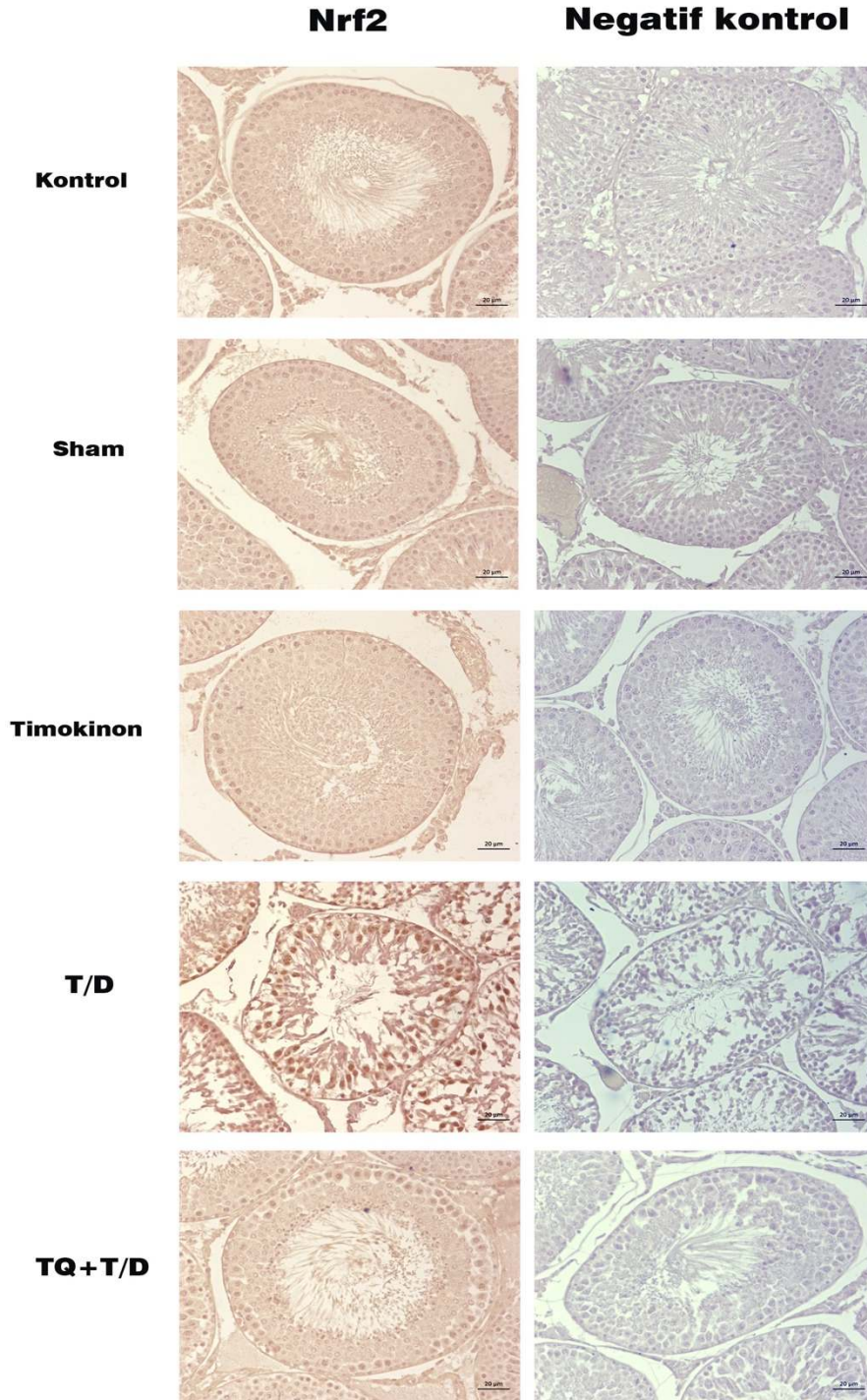
Yapılan istatistiksel analizler sonucunda (Şekil 4.6.): Torsiyon/detorsiyon (T/D) grubundaki Johnsen skorlarının, kontrol, sham ve yalnızca timokinin uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0.01$). Bu düşüş torsiyonun spermatogenezi ciddi ölçüde bozduğunu göstermektedir. Öte yandan, Timokinin+T/D grubunda elde edilen skorların yalnızca T/D grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p<0.01$). Bu artış Timokininin torsiyon sonrası testiküler hasarı hafiflettiğini ve spermatogenezi kısmen koruyabildiğini göstermektedir.



Şekil 4.6. Sol testis dokusunun Johnsen skorlama grafiği. a: Torsiyon/Detorsiyon grubunda Johnsen skoru, Kontrol Sham ve Timokinin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düştü ($p<0.01$). b: Timokinin+T/D grubunun yalnızca T/D grubuna göre kıyasla anlamlı şekilde yüksek Johnsen skoru gösterdi ($p<0.01$).

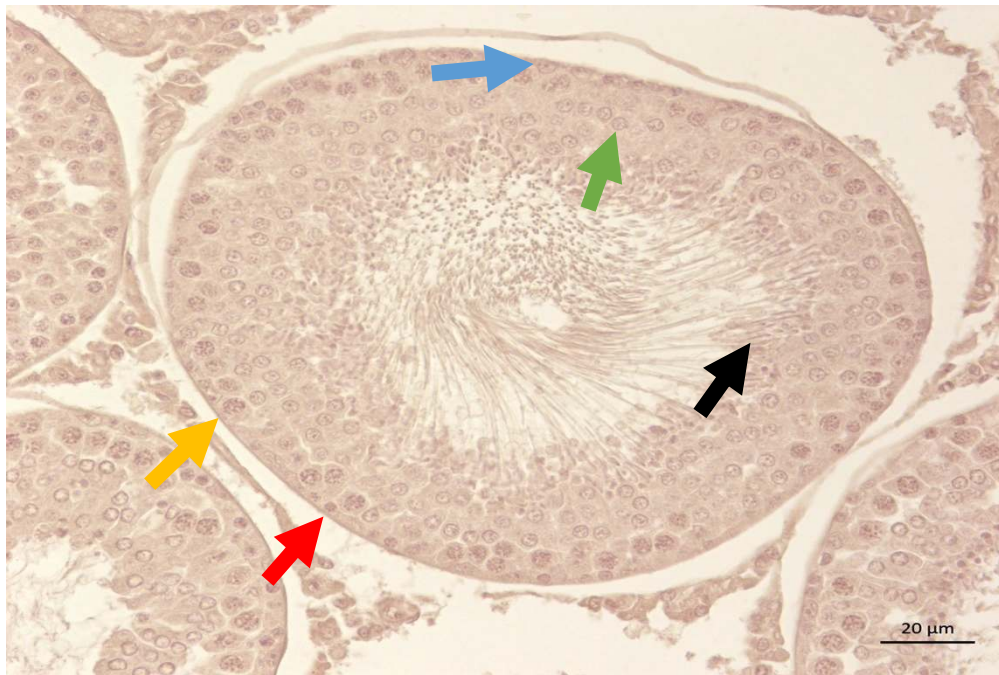
4.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

4.2.1. Nrf2 İmmünohistokimyasal Boyama

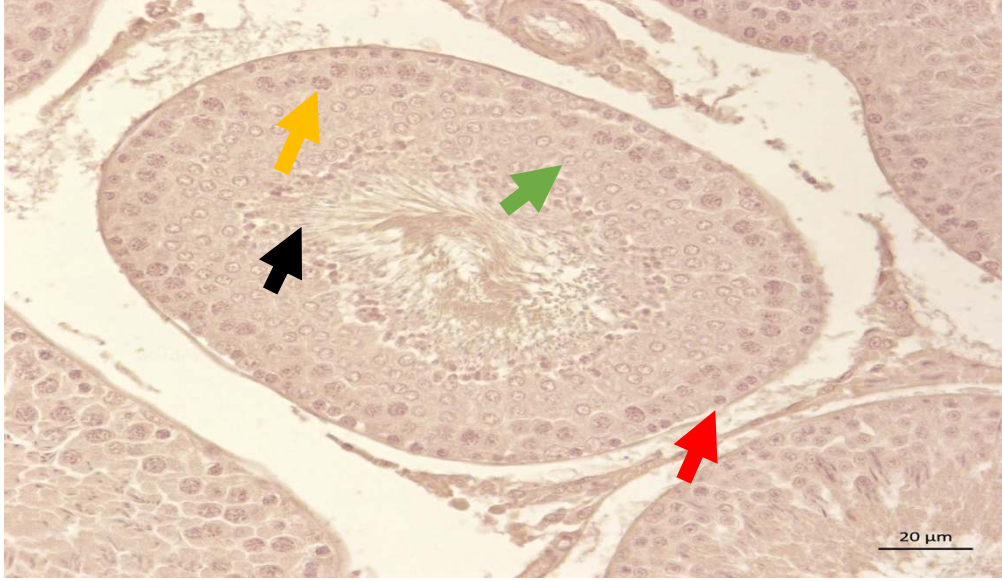


Şekil 4.7. İmmünohistokimyasal boyama ve deney gruplarının pozitif ve negatifleri
(Nrf2 x 400x)

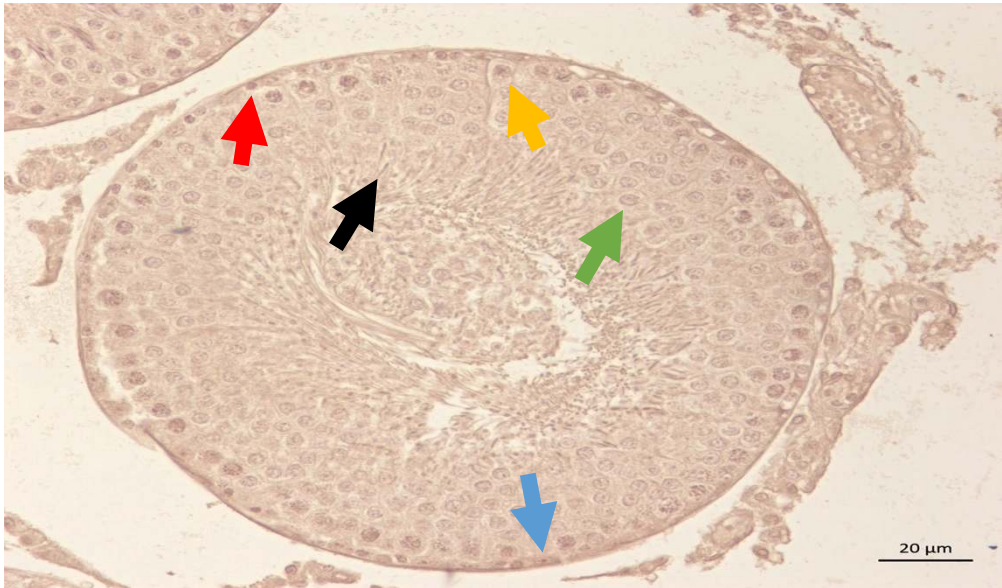
Nrf2 immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, testis dokularında gruplar arasında ekspresyon farklılıkları gözlemlendi. Kontrol Sham ve Timokinon gruplarında Nrf2 boyanması oldukça zayıf olup, germ hücreleri ve Sertoli hücrelerinde sınırlı düzeyde sitoplazmik ve nüklear boyanma izlendi. Torsiyon grubunda, testiküler hasarın olduğu bölgelerde Nrf2 ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlendi (Şekil 4.11.). Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon grubunda ise Nrf2 ekspresyonu torsiyon grubuna göre azdı (Şekil 4.12.). Bu da Timokinonun antioksidan etkisiyle oksidatif stresin şiddetini azaltarak Nrf2 yolunun aktivasyonunu sınırladığını göstermektedir.



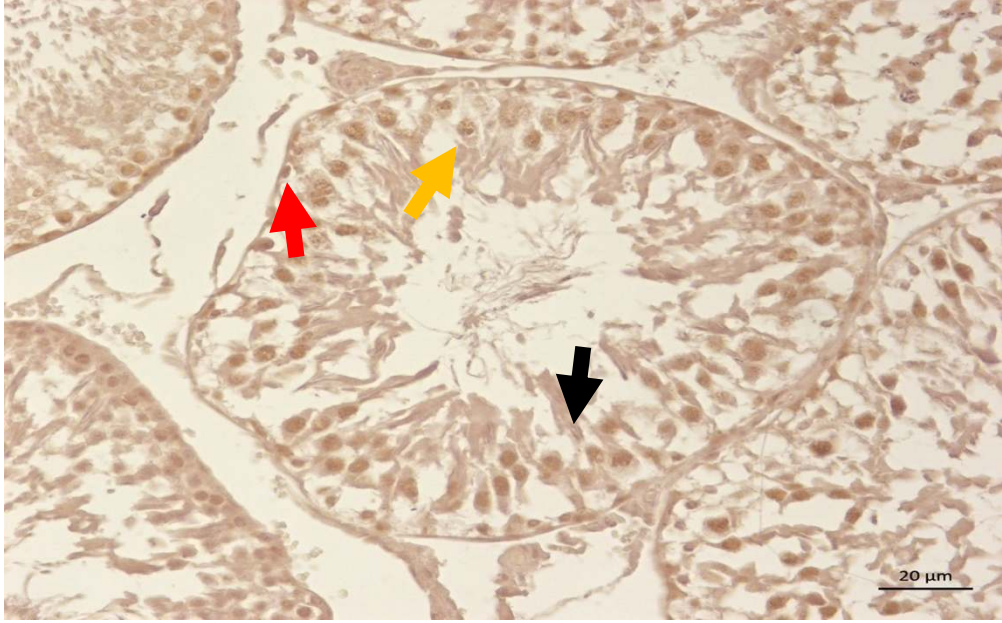
Şekil 4.8. Kontrol grubunun Nrf2 antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x)
(Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid,
siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.)



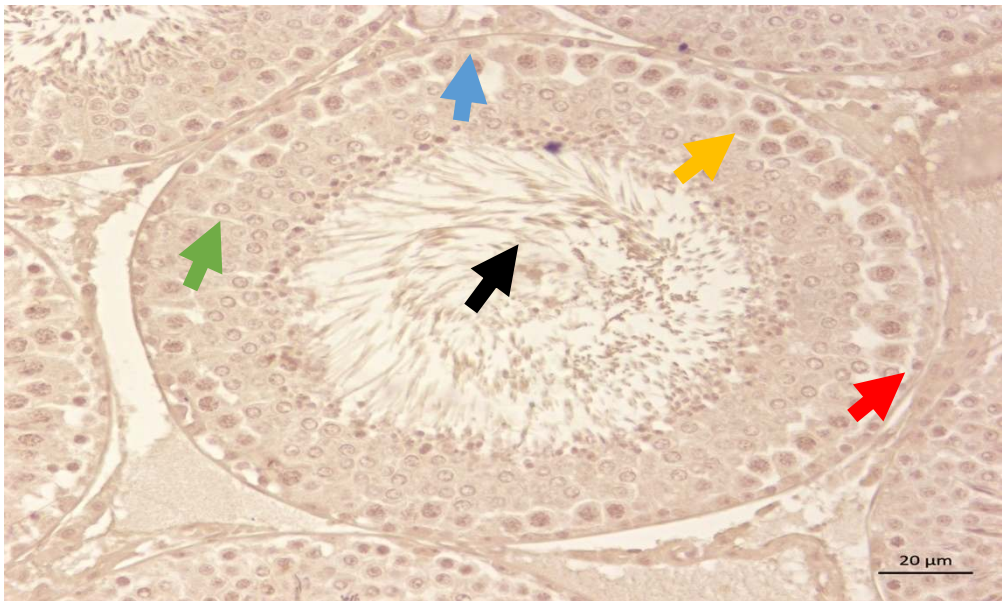
Şekil 4.9. Sham grubunun Nrf2 antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x)
(Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid,
siyah ok: geç spermatid hücrelerini göstermektedir.)



Şekil 4.10. Timokinon grubunun Nrf2 antikoru ile immünohistokimyasal boyaması
(400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken
spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.)

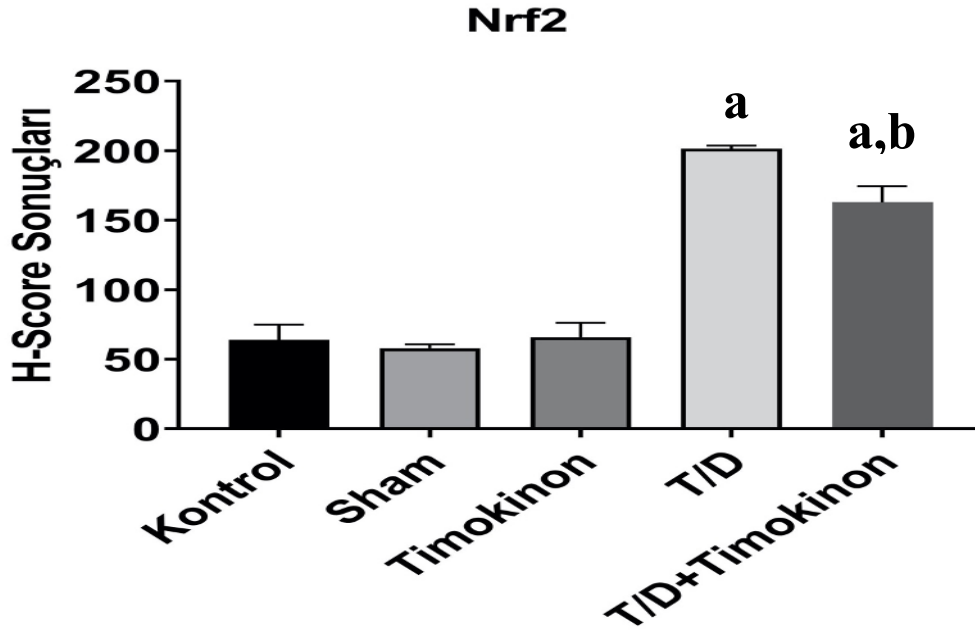


Şekil 4.11. Torsiyon grubunun Nrf2 antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x)
(Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, siyah ok: geç spermatid
hücresini göstermektedir.)



Şekil 4.12. Timokinon+torsiyon/detorsiyon grubunun Nrf2 immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücresini göstermektedir.)

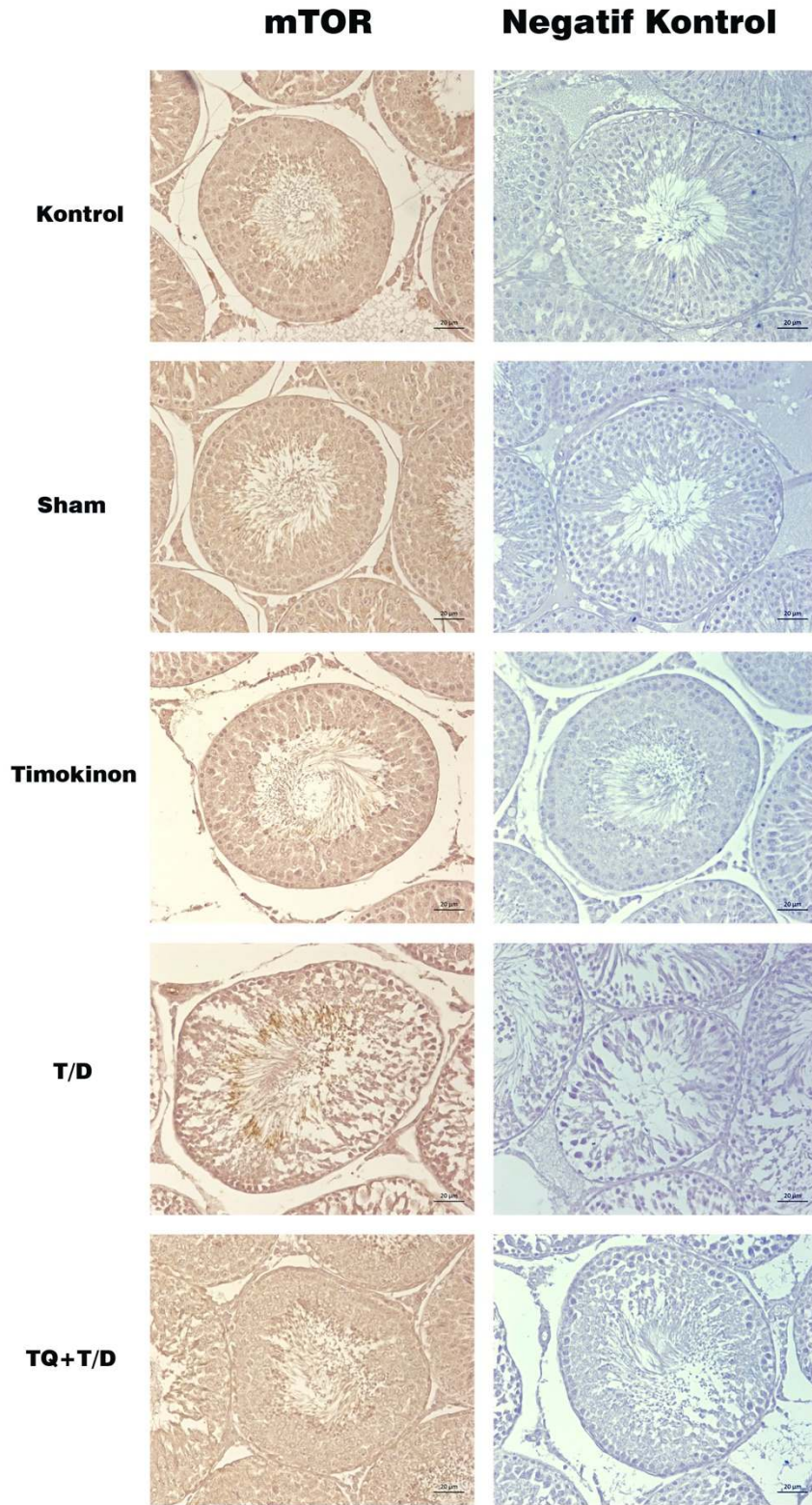
4.2.2. Nrf2 H Skorlama Bulguları



Şekil 4.13. Sol testis dokusu Nrf2 antikoru ile immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği. a: Kontrol sham ve timokinin grubuna göre anlamlılığı b ise T/D grubuna göre anlamlılığı gösterir. T/D; torsion/detorsiyon.

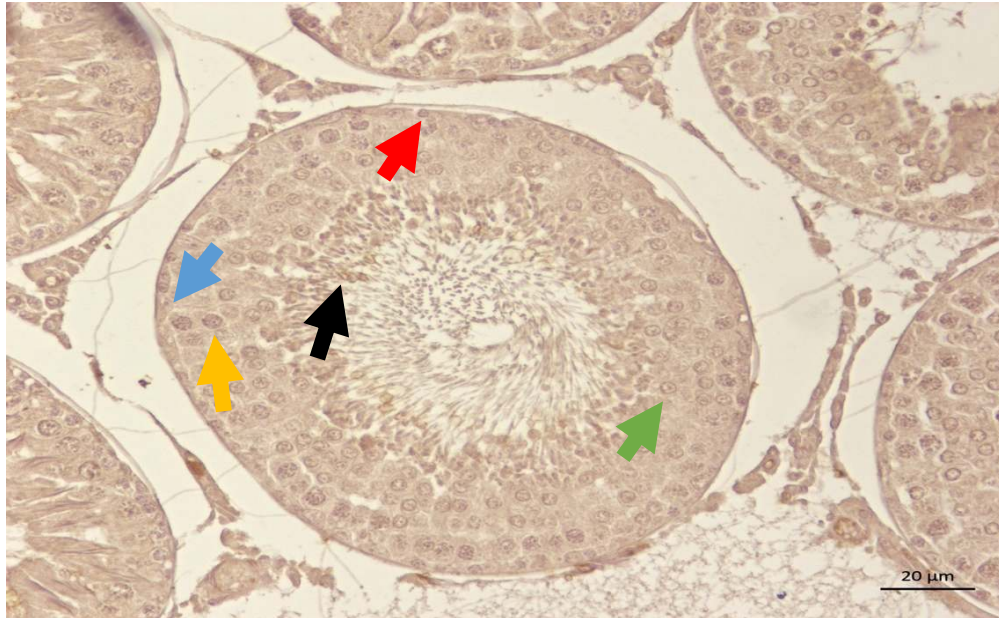
Tüm gruplardaki ratların testis dokusu Nrf2 antikoru ile immünohistokimyasal boyama sonrası incelendi ve H skorlaması yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre (Şekil 4.13): Kontrol grubu ile Sham grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.418$). Kontrol grubu ile Timokinin grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0.689$). Kontrol grubunun hem Torsiyon/Detorsiyon grubuna ($p<0.01$) hem de T/D+Timokinin grubuna ($p<0.01$) göre anlamlı derecede daha düşük hasar skoruna sahip olduğu görüldü. Kontrol ile T/D+Timokinin grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0.01$), Sham ile Timokinin grubu arasında anlamlı fark görülmedi ($p=0.316$). Sham grubunun T/D grubuna göre anlamlı şekilde daha düşük hasar skoruna sahip olduğu görüldü ($p<0.01$). Sham grubu ile T/D+Timokinin grubu karşılaştırıldığında anlamlı saptandı ($p<0.01$). Timokinin grubunun T/D ve T/D+Timokinin gruplarına göre anlamlı şekilde daha az histolojik hasar gösterdiği görüldü ($p<0.01$). Ayrıca T/D+Timokinin grubunun T/D grubuna göre anlamlı derecede düşük histolojik hasar skoruna sahip olduğu gözlemlendi ($p<0.01$). Bu bulgular, testiküler torsiyon modelinde uygulanan Timokinin tedavisinin histolojik düzeyde koruyucu etkiler gösterebileceğini ve bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ortaya koymaktadır.

4.2.3. mTOR İmmünohistokimyasal Boyama

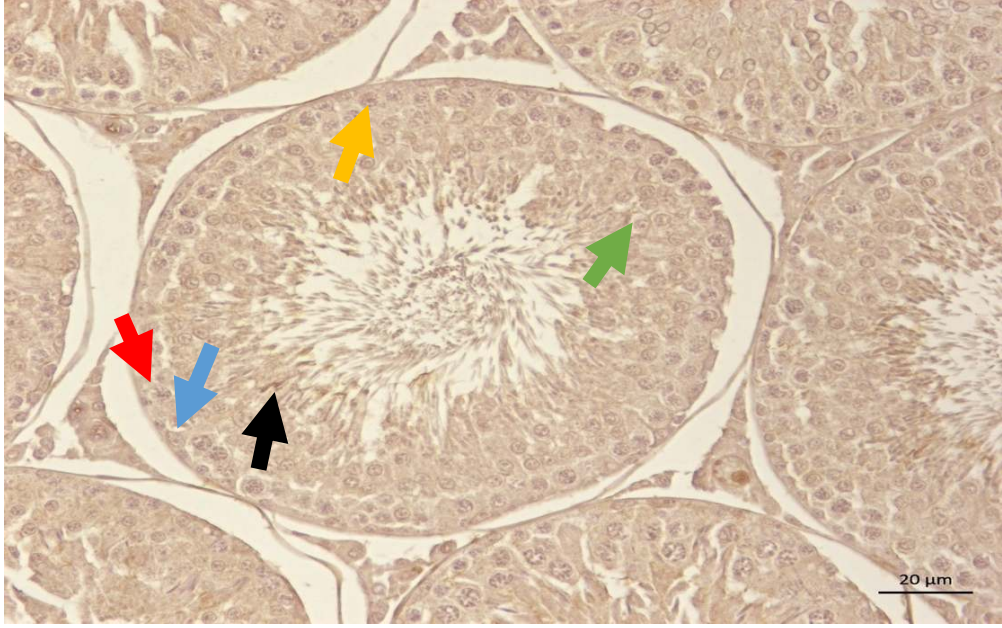


Şekil 4.14. İmmünohistokimyasal boyama ve deney gruplarının pozitif ve negatifleri
(mTOR x 400x)

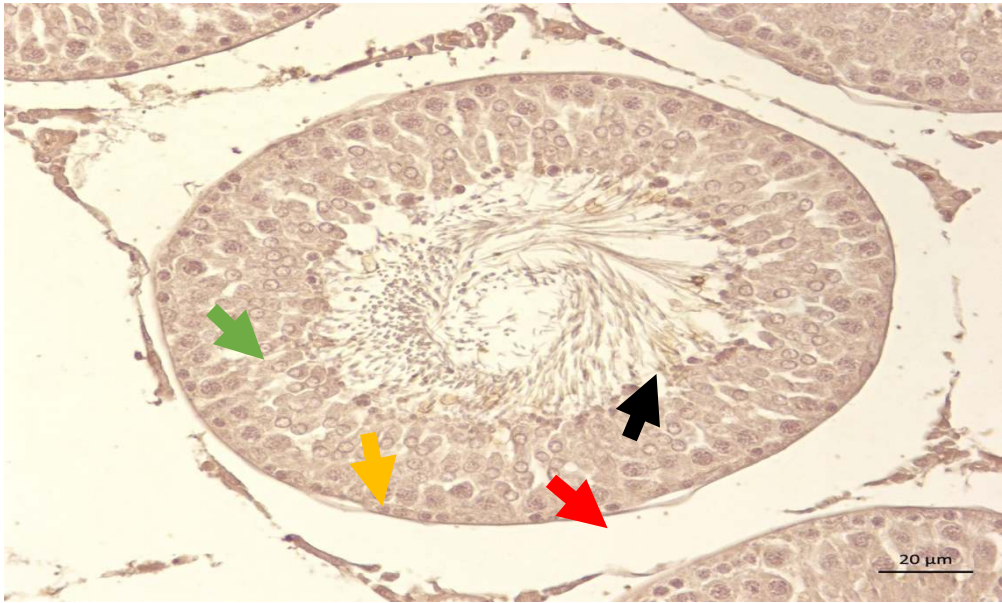
mTOR immünohistokimyasal boyama sonuçları incelendiğinde, testis dokularında gruplar arasında ekspresyon farklılıkları gözlemlendi. Kontrol grubunda mTOR ekspresyonu düşük seviyede olup germinal epitelde sınırlı düzeyde sitoplazmik boyanma izlenmiştir (Şekil 4.15.). Bu durum fizyolojik koşullarda mTOR sinyal yolunun düşük bazal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Sham grubunda da kontrol grubuna benzer şekilde minimal düzeyde boyanma saptanmış, cerrahi işlemin mTOR aktivasyonu üzerinde anlamlı bir etki yaratmadığı belirlendi (Şekil 4.16.). Sadece timokinon uygulanan grupta mTOR boyanmasının sham grubuna göre hafif düzeyde arttığı özellikle Sertoli hücrelerinde ve bazı germ hücrelerinde belirgin sitoplazmik boyanma gözlemlendiği tespit edildi (Şekil 4.17.). Bu bulgu Timokinonun hücrel metabolizma ve büyüme ile ilişkili mTOR yolunu belirli ölçüde aktive edebileceğini düşündürmektedir. Torsiyon grubunda ise mTOR ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı, testiküler dokunun birçok bölgesinde yoğun sitoplazmik boyanma gözlemlendiği belirlendi (Şekil 4.18.). Bu artış torsiyonun neden olduğu hücrel stres ve inflamatuvar yanıt sonucu mTOR sinyal yolunun aşırı aktivasyonuna işaret etmektedir. Timokinon+Torsiyon grubunda ise mTOR ekspresyonunun torsiyon grubuna göre daha düşük düzeyde olduğu, boyanmanın orta şiddette kaldığı ve daha sınırlı alanlarda yoğunlaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.19.). Bu bulgu Timokinonun torsiyonun tetiklediği aşırı mTOR aktivasyonunu baskılayarak, hücre hasarını azaltıcı bir etki oluşturabileceğini göstermektedir.



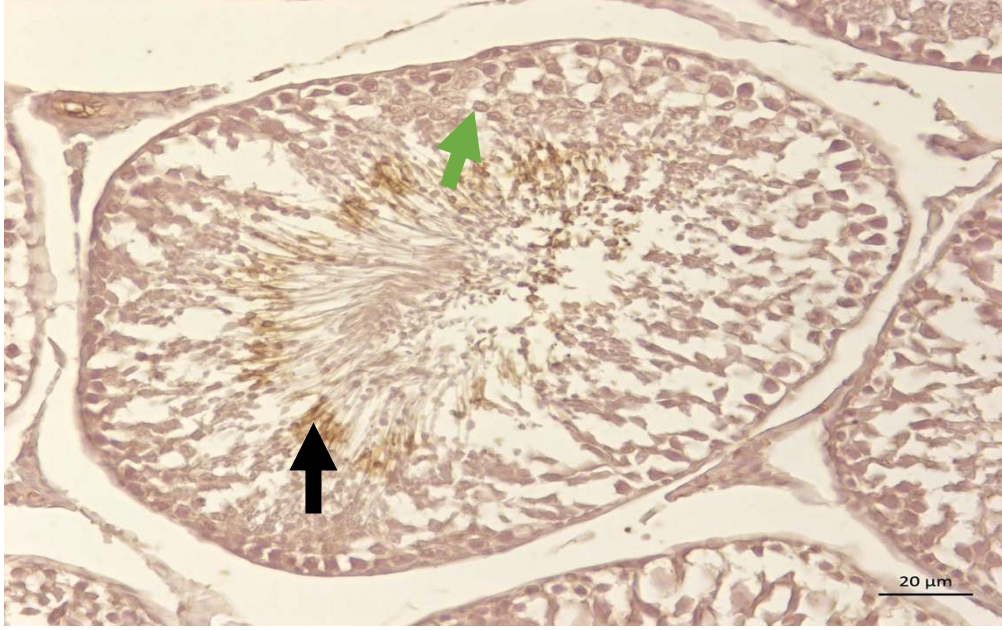
Şekil 4.15. Kontrol grubunun mTOR antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.)



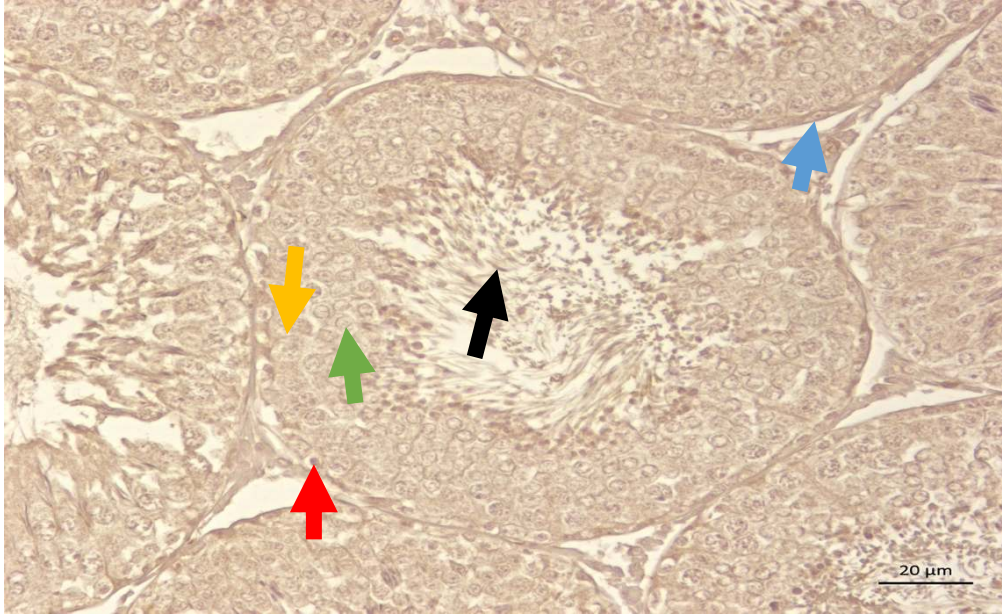
Şekil 4.16. Sham grubunun mTOR antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x)
(Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid,
siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.)



Şekil 4.17. Timokinon grubunun mTOR antikoru ile immünohistokimyasal boyaması
(400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken
spermatid, siyah ok: geç spermatid hücrelerini göstermektedir.)

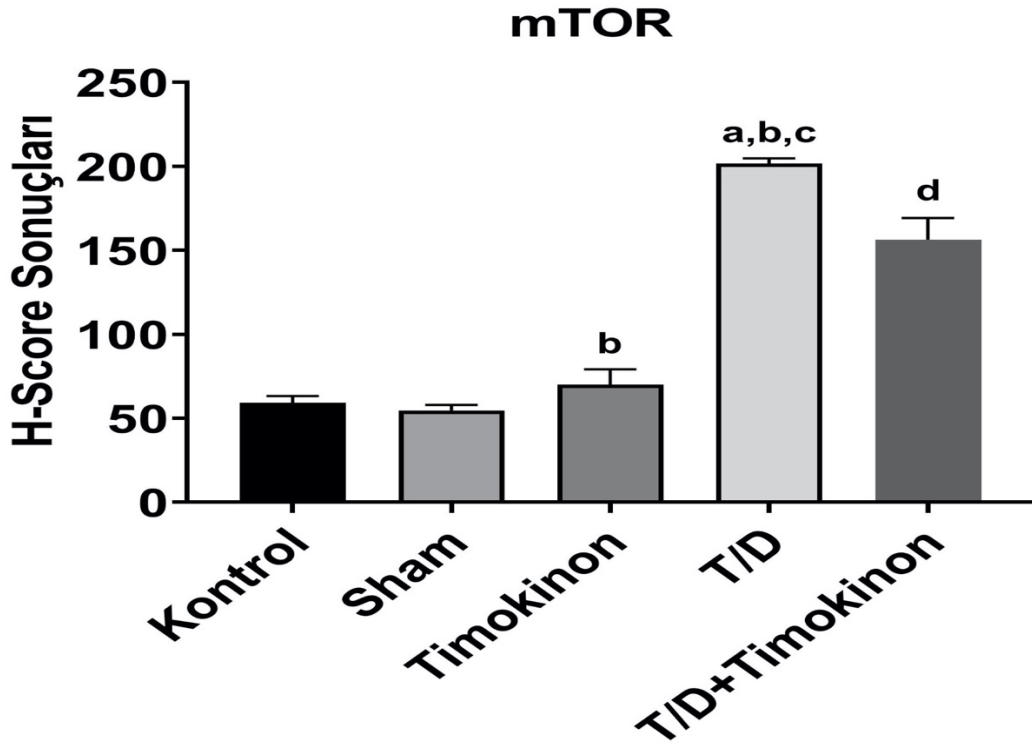


Şekil 4.18. Torsiyon grubunun mTOR antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x) (Yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid hücrelerini göstermektedir.)



Şekil 4.19. Timokinon+torsiyon grubunun mTOR antikoru ile immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: spermatogonyum, sarı ok: primer spermatosit, yeşil ok: erken spermatid, siyah ok: geç spermatid, mavi ok: sertoli hücrelerini göstermektedir.)

4.2.4. mTOR H Skorlama Bulguları



Şekil 4.20. Sol testis dokusu mTOR antikoru ile immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği. a: Kontrol sham ve timokinin grubuna göre anlamlılığı, b: Sham grubuna göre anlamlılığı, c: Kontrol sham ve timokinin grubuna göre anlamlılığı d: T/D grubuna göre anlamlılığı gösterir. T/D: torsiyon/detorsiyon.

mTOR ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılmasında Kontrol grubu ile Sham grubu arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.135$). Kontrol ile Timokinin grubu karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.053$). Kontrol grubu ile T/D +Timokinin grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark tespit edildi ($p<0.01$). Sham grubunun Timokinin grubuna göre anlamlı derecede düşük skor gösterdiği saptandı ($p=0.002$). Sham grubunun hem T/D ($p<0.01$) hem de T/D+Timokinin gruplarına ($p<0.01$) kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük mTOR skoru gösterdiği bulundu. Timokinin grubunun, T/D ve T/D+Timokinin gruplarına göre anlamlı şekilde daha az mTOR ekspresyonuna sahip olduğu görüldü. ($p<0.01$). Son olarak ise T/D+Timokinin grubunun T/D grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha düşük mTOR skoru gösterdiği gözlemlendi ($p<0.01$). Bu sonuçlar torsiyon/detorsiyon modelinde mTOR ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığını, ancak Timokinin uygulamasının bu artışı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığını göstermektedir.

4.2.5. PTEN İmmünohistokimyasal Boyama

PTEN antikoru ile yapılan immün boyamalarda spesifik bir işaretlenme elde edilememiştir. Bu durum muhtemelen kullanılan antikorun dokuda yeterli düzeyde bağlanma göstermemesi, protokolün PTEN antikoru için uygun olmaması ya da teknik bir aksaklıktan kaynaklanmış olabileceğini göstermektedir. PTEN'in ifade edilmediği sonucuna varmak yerine, bu sonucun daha hassas ve doğrulayıcı yöntemlerle yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir.

4.3. TARTIŞMA

Testiküler torsiyon, spermatik kordun kendi etrafında dönmesi sonucu testise giden kan akışının azalması veya tamamen durması sonucu gelişen ciddi bir ürolojik acil durumdur. En sık olarak adölesan yaş grubunda görülmekle birlikte, her yaşta ortaya çıkabilmektedir. Bu durum, testis dokusunda hipoksiye ve metabolik atıkların birikmesine yol açarak germ hücrelerinde yapısal ve fonksiyonel hasara neden olur. Literatürde torsiyonun süresi uzadıkça testiküler doku kaybı riskinin arttığı, dolayısıyla zamanında tanı ve müdahalenin testis fonksiyonlarının korunmasında kritik rol oynadığı bildirilmektedir [88] [89].

Testiküler torsiyonda, oksidatif stres önemli rol oynamaktadır. Reperfüzyon sırasında oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), lipid peroksidasyonu, protein denatürasyonu ve DNA hasarına neden olarak hücresel canlılığın azalmasıyla sonuçlanır. Bu süreçte karşı hücresel savunma mekanizmaları devreye girer. Antioksidan sistemlerin başında yer alan Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) transkripsiyon faktörü, bu süreçte oksidatif stresin azaltılmasında merkezi bir rol oynar. Benzer şekilde, mTOR (mechanistic target of rapamycin) sinyal yolunun aktivasyonu da hücresel büyüme, hayatta kalma ve otofaji süreçlerini etkileyerek doku yanıtlarını belirler [90] [91] [92].

Testiküler torsiyon modelinde yapılan birçok çalışmada, bu moleküler belirteçlerin ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişiklikler saptanmıştır. Nrf2 ekspresyonundaki artışın, dokuya karşı bir savunma mekanizması olduğu bildirilmiştir [93]. Aynı şekilde, mTOR ekspresyonunun artışı, oksidatif strese ve hücresel strese bağlı olarak aktive olan hücresel yanıtları temsil etmektedir [94].

Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulan testiküler torsiyon modelinde, Nrf2 ve mTOR ekspresyon düzeyleri immünohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. Elde edilen bulgular, özellikle torsiyon grubunda bu belirteçlerin ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığını göstermiştir. Ayrıca, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olan Timokinon (TQ) uygulamasının bu ekspresyon düzeylerini modüle ettiği ve testis dokusundaki yapısal bütünlüğün korunmasına katkı sağladığı gözlemlendi [95].

Testiküler torsiyon, iskemik hasara neden olan ciddi bir klinik durumdur ve bu hasar yalnızca oksijen yoksunluğundan değil, aynı zamanda reperfüzyon sonrasında gelişen oksidatif stres nedeniyle daha da şiddetlenmektedir. Reperfüzyon süreci sırasında oksijen

yeniden dokulara ulaştığında, reaktif oksijen türleri (ROS) yoğun şekilde üretilir. Bu serbest radikaller, hücre zarındaki lipidleri okside ederek lipid peroksidasyonuna, proteinlerin yapısal ve fonksiyonel bozulmalarına ve DNA hasarına yol açabilir [55].

ROS'un testiküler dokuda birikmesiyle hücre içi homeostaz bozulur ve apoptoz mekanizmaları aktive olur. Ayrıca oksidatif stres, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu olmasını teşvik ederek testiküler yapının daha da bozulmasına neden olur. Bunun sonucunda, spermatogenezin kesintiye uğradığı ve fertilitenin azaldığı bildirilmektedir [96].

Testis, antioksidan enzim sistemleri bakımından zengin bir organdır. Ancak aşırı ROS  retimi, bu sistemlerin kapasitesini açarak hücresel hasarı kaçınılmaz hale getirir. Superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz gibi enzimler, oksidatif stresle savaşan başlıca moleküllerdir. Ancak özellikle reperfüzyon sürecinde bu enzimlerin aktivitesinde azalma görüldüğü ve buna bağlı olarak testiküler yapının hasara uğradığı saptanmıştır [97].

Nrf2, oksidatif strese karşı hücresel adaptif yanıtın en önemli unsurlarından biridir. Oksidatif stres altında Nrf2, Keap1 proteininden ayrılarak nükleusa geçer ve burada antioksidan yanıt elemanlarına (ARE) bağlanarak SOD, HO-1, NQO1 gibi koruyucu genlerin transkripsiyonunu başlatır [98]. Dolayısıyla Nrf2 aktivasyonundaki artış, dokunun ROS'lara karşı geliştirdiği endojen savunma yanıtı olarak değerlendirilmektedir.

Benzer şekilde, Sun ve ark. [99] testiküler iskemi-reperfüzyon modelinde Nrf2'nin ekspresyon düzeyinin antioksidan gen aktivitesiyle korelasyon gösterdiğini ve apoptoz oranını düşürdüğünü raporlamışlardır. Bu veriler,  alışmamızdaki Nrf2 artışının oksidatif stresin etkilerini azaltmaya yönelik bir yanıt olduğuna işaret etmektedir.

Bizim  alışmamızda, torsiyon grubunda Nrf2 ekspresyonu belirgin olarak artmıştır. Bu sonuç, dokuya yönelen şiddetli oksidatif stresin, Nrf2 aktivasyonunu tetiklediğini ve doku koruyucu mekanizmaların devreye girdiğini göstermektedir. Ayrıca, Timokinon uygulanan torsiyon grubunda Nrf2 ekspresyonunun azalması, Timokinon'un doğrudan ROS oluşumunu engelleyerek Nrf2 aktivasyon ihtiyacını ortadan kaldırmış olabileceğini düşündürmektedir.

Abu-Baih ve ark. (2024), farelerde indüklenen testiküler torsiyon modelinde Nrf2'nin aktivasyonunun arttığını ve bu durumun HO-1 ekspresyonunu artırarak dokuyu oksidatif strese karşı koruduğunu bildirmiştir. Nrf2 genetik olarak eksiltilmiş farelerde ise dokuda hasarın belirgin olarak arttığı ve spermatogenezin bozulduğu gözlemlenmiştir [100].

Ayrıca, Abdel-Kader ve ark. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada, Nrf2'nin yalnızca ROS ile değil, inflamatuvar yanıtlarla da yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Torsiyon modelinde inflamasyon belirteçlerinin (TNF- α , IL-6) Nrf2 düzeyine bağlı olarak değiştiği hücre infiltrasyonunun azaldığı tespit edilmiştir [2].

Çalışmamızda gözlenen Nrf2 artışı da benzer şekilde ROS ve inflamasyonla mücadelede Nrf2'nin aktif rol oynadığını desteklemektedir. Bu moleküler mekanizma, testiküler torsiyon sonrası hücresel savunma sistemlerinin hızla devreye girdiğini ve adaptif yanıtın Nrf2 üzerinden organize edildiğini göstermektedir.

mTOR (mechanistic Target of Rapamycin), hücre büyümesi, metabolizması, otofaji ve hayatta kalma süreçlerini düzenleyen önemli bir serin/treonin kinazdır. mTOR sinyal yolu, özellikle oksidatif stres ve inflamasyon gibi hücresel tehditler karşısında metabolik yeniden yapılanma ve onarım mekanizmalarının başlatılmasında kritik rol oynar. mTOR, mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki farklı kompleks formunda işlev görür ve bu kompleksler aracılığıyla hücre çoğalması, protein sentezi, otofaji ve hücresel stres yanıtlarını düzenler [101].

Bizim çalışmamızda, torsiyon grubunda mTOR ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı tedavi grubunda ise azaldığı görülmüştür. Bu bulgu, literatürdeki benzer deneysel torsiyon modelleriyle paralellik göstermektedir. Örneğin, Javdan ve ark. (2018) yaptığı çalışmada testis torsiyonu mTOR fosforilasyonunu arttırmış ve testis doku hasarını tetiklemiştir. Kapsaisin tedavisi sonrası mTOR fosforilasyonu azalmıştır [8].

Timokinin'in antioksidan etkisi ise bu noktada önem kazanmaktadır. Çalışmamızda, torsiyon + Timokinin grubunda mTOR ekspresyonunun torsiyon grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür. Bu durum, Timokinin'in oksidatif stresi azaltarak mTOR aktivitesini baskılamış olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde Zhang ve ark. (2018) Timokinin'in AMPK/mTOR yolunu aktive ederek otofajiyi artırdığını ve böylece doku hasarını azalttığını bildirmiştir [102].

mTOR sinyal yolunun bu çalışmada testis dokusunda belirgin şekilde aktive olması ve Timokinon tedavisi ile bu artışın gerilemesi, mTOR'un hem tanısal hem de tedaviye yanıt açısından önemli bir biyomarker olabileceğini göstermektedir.

Timokinon (TQ), *Nigella sativa*'nın (çörek otu) başlıca biyoaktif bileşenidir ve antioksidan, antiinflamatuvar, analjezik özellikleri sayesinde pek çok deneysel hastalık modelinde koruyucu etkileri gösterilmiştir [9]. Timokinon, özellikle oksidatif stresin baskın olduğu durumlarda ROS oluşumunu azaltarak, hücre içi savunma sistemlerinin etkinliğini artırmaktadır.

Testiküler torsiyon modeline uygulandığında Timokinon'un koruyucu etkisi sınırlı çalışmalarda raporlanmıştır. Ancak genel I/R modellerine dayanan veriler, bu bileşiğin testiküler torsiyonda da benzer mekanizmalarla koruma sağlayabileceğini düşündürmektedir. Erol ve ark. (2017) çalışmasında sıçanlarda testiküler I/R modelinde Timokinon uygulanması sonucunda Malondialdehit seviyelerinde anlamlı azalma, toplam antioksidan kapasite artışı gözlemlenmiş immünohistokimyasal analizde germinal epitel bütünlüğü korunmuştur [103].

Bizim çalışmamızda, Timokinon'un torsiyon sonrası oluşan oksidatif stresi baskıladığı; Nrf2 ve mTOR ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Timokinon + Torsiyon grubunda Nrf2 ve mTOR düzeylerinin yalnızca torsiyon grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük olması, Timokinon'un oksidatif stres ve hücrel metabolik stresi azalttığını düşündürmektedir.

Timokinon'un mTOR sinyal yoluna etkisi oldukça dikkat çekicidir. Çalışmamızda torsiyon+timokinon grubunda mTOR ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum Timokinonun oksidatif stresi azaltarak mTOR aktivitesini baskılamış olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde Al-Rawashde ve ark. (2022) tarafından yapılan in vitro çalışmada, timokinon tümör hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu belirgin şekilde inhibe ettiği ve PI3K/AKT/ ve mTOR gen ifade düzeylerini anlamlı oranda azalttığı gösterilmiştir [104].

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, testiküler torsiyon/detorsiyon (T/D) modelinde meydana gelen oksidatif doku hasarına karşı timokinonun (TQ) olası koruyucu etkisi, Nrf2 ve mTOR sinyal yolları üzerinden histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildi. T/D uygulaması sonucunda testis dokusunda belirgin histopatolojik hasar, germinal epitelde hücre kaybı ve seminifer tübül yapısında bozulmalar gözlemlendi. Timokinon tedavisi bu doku hasarlarını anlamlı düzeyde azalttı, tübül bütünlüğünü koruyarak germ hücre organizasyonunu destekledi.

Sonuç olarak timokinonon testiküler torsiyon/detorsiyon modeli üzerinde özellikle Nrf2 ve mTOR sinyal yolları aracılığıyla koruyucu etkiler gösterdiği tespit edildi. Timokinon, bu tür testiküler hasar durumlarında potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilebilir.

6. KAYNAKÇA

- [1] S. Zolfaghari, A. Soleimanzadeh ve M. Baqerkhani, “The synergistic activity of fisetin on quercetin improves testicular”, *Scientific Reports*, c. 15, sayı 1, ss. 12053, 2025.
- [2] M. S. Abdel-Kader, R. F. Abdel-Rahman, H. N. Althurwi, G. A. Soliman, H. A. Ogaly ve F. F. Albaqami, “Samarcandin protects against testicular ischemia/reperfusion injury in rats via activation of Nrf2/HO-1-mediated antioxidant response”, *Saudi Pharmaceutical Journal*, c. 31, sayı 7, ss. 1186-1196, 2023.
- [3] G. Vaos ve N. Zavras, “Antioxidants in experimental ischemia-reperfusion injury of the testis: where are we heading towards?”, *World journal of methodology*, c. 7, sayı 2, ss. 37, 2017.
- [4] V. Ngo ve M. L. Duennwald, “Nrf2 and oxidative stress: A general overview of mechanisms and implications in human disease”, *Antioxidants*, c. 11, sayı 12, ss. 2345, 2022.
- [5] M. Sadrkhanloo, M. Entezari, S. Orouei, A. Zabolian, A. Mirzaie, A. Maghsoudloo, R. Raesi, N. Asadi, M. Hashemi, A. Zarrabi, H. Khan, S. Mirzaei ve S. Samarghandian, “Targeting Nrf2 in ischemia-reperfusion alleviation: From signaling networks to therapeutic targeting”, *Life Sciences*, c. 300, ss. 120561, 2022.
- [6] R. A. Saxton ve D. M. Sabatini, “mTOR signaling in growth, metabolism, and disease”, *Cell*, c. 168, sayı 6, ss. 960-976, 2017.
- [7] N. D. Seldas ve A. Efeyan, “The mTOR–autophagy axis and the control of metabolism”, *Frontiers in cell and developmental biology*, c. 9, ss. 655731, 2021.
- [8] N. Javdan, S. A. Ayatollahi, M. I. Choudhary, S. A. Hasani, F. Kobarfard, A. Ata ve H. P. Toroudi, “Capsaicin protects against testicular torsion injury through mTOR-dependent mechanism”, *Theriogenology*, c. 113, ss. 247-252, 2018.
- [9] C. C. Woo, A. P. Kumar, G. Sethi ve K. B. T. Tan, “Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer”, *Biochemical pharmacology*, c. 83, sayı 4, ss. 443-451, 2012.
- [10] A. L. Kierszenbaum, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006.
- [11] M. H. Ross ve W. Pawlina, *Histology a text and atlas with correlated cell and molecular biology*, Wolters Kluwer, 2016.

- [12] C. Larney, T. L. Bailey ve P. Koopman, "Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry", *Development*, c. 141, sayı 11, ss. 2195-2205, 2014.
- [13] T. Kidokoro, S. Matoba, R. Hiramatsu, M. Fujisawa, M. K. Azuma, C. Taya, M. Kurohmaru, H. Kawakami, Y. Hayashi, Y. Kanai ve H. Yonekawa, "Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific Sox9 activation by ectopic Sry expression during early phases of testis differentiation in mice", *Developmental biology*, c. 278, sayı 2, ss. 511-525, 2005.
- [14] M. E. Gill, C. Y. Hu, Y. Lin ve D. C. Page, "Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, c. 108, sayı 18, ss. 7443-7448, 2011.
- [15] Ö. Kaplan ve S. Özdemir Başaran , SAĞLIK & BİLİM 2022: Genel Embriyoloji-II, Ankara: Efe Akademi Yayınları, 2022.
- [16] S. Yılmaz, M. Sofikerim, N. Acer, M. Nisari, F. Dedeoğlu, T. Ertekin, K. Aycan ve Ö. O. Yıldızlı, "İntraabdominal İnmemiş Testis Olgusu", *Sağlık Bilimleri Dergisi*, c. 26, sayı 3, ss. 291-293, 2017.
- [17] B. Sancak ve M. Cumhuriyet, Fonksiyonel Anatomi Baş Boyun ve İç Organlar, 4. baskı, Ankara: ODTÜ yayıncılık, 2008.
- [18] V. Kavak , "Testis (Orchis) Anatomisi", *Çocuk ve Ergenlerde Gonad Hastalıkları*, c. 5.
- [19] F. G. Gökmen, Sistematik Anatomi, İzmir Güven Kitabevi, 2008.
- [20] S. Tunalı ve R. Başar, "Testisin Vasküler Anatomisi", *Türkiye Klinikleri Urology-Special Topics*, c. 5, sayı 3, ss. 1-5, 2012.
- [21] M. Rauchenwald ve W. D. Steers, "Efferent innervation of the rat testis", *Biology of reproduction*, c. 52, sayı 5, ss. 1136-1143, 1995.
- [22] A. L. Mescher, Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitap, İstanbul: Nobel Kitabevleri, 2015.
- [23] E. Erbaş, "Erkek Üreme Sistemi Histolojisi", *Histoloji ve Embriyoloji-I*, Sağlık&Bilim, 2024, ss. 143, 2024.
- [24] F. D. Ni ve W. X. Yang, "Multiple signaling pathways in Sertoli cells: recent findings in spermatogenesis", *Cell death & disease*, c. 10, sayı 8, ss. 541, 2019.
- [25] J. F. Shi, Y. K. Li, K. Ren, Y. J. Xie, W. D. Yin ve Z. C. Mo, "Characterization of cholesterol metabolism in Sertoli cells and spermatogenesis", *Molecular medicine reports*, c. 17, sayı 1, ss. 705-713, 2018.

- [26] Y. Makanji, J. Zhu, R. Mishra, C. Holmquist, W. P. Wong, N. B. Schwartz, K. E. Mayo ve T. K. Woodruff, "Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review", *Endocrine reviews*, c. 35, sayı 5, ss. 747-794, 2014.
- [27] F. Barrionuevo, M. Burgos ve R. Jimenez, "Origin and function of embryonic Sertoli cells", ss. 537-547, 2011.
- [28] D. D. Mruk ve C. Y. Cheng, "The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation", *Endocrine reviews*, c. 36, sayı 5, ss. 564-591, 2015.
- [29] R. P. Amann, "The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?", *Journal of andrology*, c. 29, sayı 5, ss. 469-487, 2008.
- [30] B. Muciaccia, C. Boitani, B. P. Berloco, F. Nudo, G. Spadetta, M. Stefanini, D. G. d. Rooij ve E. Vicini, "Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development", *Biology of reproduction*, c. 89, sayı 3, ss. 1-10, 2013.
- [31] M. D. Griswold, "The central role of Sertoli cells in spermatogenesis", *In Seminars in cell & developmental biology*, c. 9, sayı 4, ss. 411-416, 1998.
- [32] R. M. Sharpe, C. McKinnell, C. Kivlin ve J. S. Fisher, "Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood", *Reproduction-Cambridge*, c. 125, sayı 6, ss. 769-784, 2003.
- [33] Y. Clermont, "Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal", *Physiological reviews*, c. 52, sayı 1, ss. 198-236, 1972.
- [34] M. Dym ve D. W. Fawcett, "Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis", *Biology of reproduction*, c. 4, sayı 2, ss. 195-215, 1971.
- [35] M. S. Lehti ve A. Sironen, "Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis", *Reproduction*, c. 151, sayı 4, ss. R43-R54., 2016.
- [36] T. Shinohara, K. E. Orwig, M. R. Avarbock ve R. L. Brinster, "Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, c. 97, sayı 15, ss. 8346-8351, 2000.
- [37] L. Stubbs ve H. Stern, "DNA synthesis at selective sites during pachytene in mouse spermatocytes", *Chromosoma*, c. 93, sayı 6, ss. 529-536, 1986.
- [38] T. W. Sadler, *Langman Medikal Embriyoloji*, Ankara: Palme Yayıncılık, 2005.
- [39] F. Kızılay ve B. Altay, "Spermatogenez, spermiyogenezis ve klinik yansımaları", *Androloji Bülteni*, c. 21, sayı 4, ss. 177-184, 2019.

- [40] A. L. Kierszenbaum ve L. Tres, *Histology and Cell Biology: an introduction to pathology*, Elsevier Health Sciences, 2015.
- [41] A. H. Payne ve M. P. Hardy, *The Leydig cell in health and disease*, Springer Science & Business Media, 2007.
- [42] M. S. Davidoff, W. Schulze, R. Middendorff ve A. F. Holstein, "The Leydig cell of the human testis a new member of the diffuse neuroendocrine system", *Cell and tissue research*, c. 271, ss. 429-439, 1993.
- [43] J. Codesal, J. Regadera, M. Nistal, J. R. Sejas ve R. Paniagua, "Involution of human fetal Leydig cells. An immunohistochemical, ultrastructural and quantitative study", *Journal of anatomy*, c. 172, ss. 103-114, 1990.
- [44] A. M. Mahran, D. A. Elgamal, H. H. Ghafeer, S. A. Maksoud ve A. A. Farrag, "Histological alterations in Leydig cells and macrophages in azoospermic men", *Andrologia*, c. 49, sayı 8, ss. e12714., 2017.
- [45] S. L. Griswold ve R. R. Behringer, "Fetal Leydig cell origin and development", *Sexual Development*, c. 3, sayı 1, ss. 1-15, 2009.
- [46] W. J. Krause, *Krause's essential human histology for medical students.*, 2005.
- [47] B. Young, G. O'Dowd ve P. Woodford, *Wheater's Functional Histology A Text and Colour Atlas*, Churchill Livingstone , 2006.
- [48] V. P. Eroschenko, *diFIORE'S ATLAS OF HISTOLOGY WITH FUNCTIONAL CORRELATIONS*, Wolters Kluwer, 2013.
- [49] P. M. Cuckow ve J. D. Frank, "Torsion of the testis", *BJU international*, c. 86, sayı 3, 2000.
- [50] Y. Liu, M. Liu, M. Sun, Z. Zeng ve S. Wu, "Association between meteorological factors and testicular torsion: A scoping review of clinical research evidence", *Journal of Pediatric Urology*, c. 21, sayı 2, ss. 482-488, 2024.
- [51] F. Kazak, G. Akcakavak, I. Alakus, H. Alakus, O. Kirgiz, K. Ozhan, M. Z. Y. Deveci ve P. Coskun, "Proanthocyanidin alleviates testicular torsion/detorsion-induced ischemia/reperfusion injury in rats", *Tissue and Cell*, c. 89, ss. 102459, 2024.
- [52] O. Ozcan, H. Erdal ve Z. Yonden, "İskemi-reperfüzyon hasari ve oksidatif stres ilişkisine biyokimyasal bakiş", *The Medical Journal of Mustafa Kemal University*, c. 6, sayı 23, ss. 27-33, 2015.
- [53] Ü. G. Bozok, A. Küçük ve M. Arslan , "İskemi reperfüzyon hasarında stres ve hücre ölümü", *Hitit Medical Journal*, c. 4, sayı 2, ss. 64-73, 2022.

- [54] L. Wu, X. Xiong, X. Wu, Y. Ye, Z. Jian, Z. Zhi ve L. Gu, "Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury", *Frontiers in molecular neuroscience*, c. 13, 2020.
- [55] T. T. Turner ve J. J. Lysiak, "Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction", *Journal of andrology*, c. 29, sayı 5, ss. 488-498, 2008.
- [56] Z. Durackova, "Some current insights into oxidative stress", *Physiological research*, c. 59, sayı 4, ss. 459-469, 2010.
- [57] T. Jabs, "Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animal", *Biochemical pharmacology*, c. 57, sayı 3, ss. 231-245, 1999.
- [58] R. O. Poyton, K. A. Ball ve P. R. Castello, "Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling", *Endocrinology & Metabolism*, c. 20, sayı 7, ss. 332-340, 2009.
- [59] I. Fridovich, "The Biology of Oxygen Radicals: The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense", *Science*, c. 201, sayı 4359, ss. 875-880, 1978.
- [60] I. Schraufstatter, P. A. Hyslop, J. H. Jackson ve C. G. Cochrane, "Oxidant-induced DNA damage of target cells", *The Journal of clinical investigation*, c. 82, sayı 3, ss. 1040-1050, 1988.
- [61] J. Fang, T. Seki ve H. Maeda, "Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation", *Advanced drug delivery reviews*, c. 61, sayı 4, ss. 290-302, 2009.
- [62] O. H. Kocaman, T. Günendi, M. E. Dörterler, İ. Koyuncu, H. Celik, N. Yumusak ve M. E. Boleken, "Protective effect of osthole on testicular ischemia/reperfusion injury in rats", *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*, c. 28, sayı 5, ss. 563, 2022.
- [63] A. Shinde, J. Ganu ve P. Naik, "Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review", *Journal of Dental and Allied Sciences*, c. 1, sayı 2, ss. 63, 2012.
- [64] B. Aydemir ve E. Karadağ Sarı, "Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi", *Kocatepe Veterinary Journal*, c. 2, sayı 2, ss. 56-60, 2009.
- [65] H. G. Muhtasib, A. Roessner ve R. S. Stock, "Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources", *The international journal of biochemistry & cell biology*, c. 38, sayı 8, ss. 1249-1253., 2006.
- [66] H. Hosseinzadeh ve S. Parvardeh, "Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of Nigella sativa seeds, in mice", *Phytomedicine*, c. 11, sayı 1, ss. 56-64, 2004.

- [67] S. Darakhshan, A. B. Pour, A. H. Colagar ve S. Sisakhtnezhad, “Thymoquinone and its therapeutic potentials”, *thymoquinone and its therapeutic potentials.*, c. 95, ss. 138-158, 2015.
- [68] E. Bacak Güllü ve G. Avcı, “Timokinon: Nigella Sativa’nın biyoaktif komponenti”, *Kocatepe Veterinary Journal*, c. 6, sayı 1, ss. 51-61, 2013.
- [69] K. E. D. H. El Tahir ve D. M. Bakeet, “The black seed nigella sativa linnaeus-a mine for multi cures: a plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil”, *Journal of Taibah University Medical Sciences*, c. 1, sayı 1, ss. 1-19, 2006.
- [70] N. E. Abdelmeguid, R. Fakhoury, S. M. Kamal ve R. J. Wafaı, “Effects of Nigella sativa and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic β -cells of streptozotocin-induced diabetic rats”, *Journal of diabetes*, c. 2, sayı 4, ss. 256-266, 2010.
- [71] L. Pari ve C. Sankaranarayanan, “Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats”, *Life sciences*, c. 85, sayı 23-26, ss. 830-834, 2009.
- [72] K. Srinivasan, “Cumin (Cuminum cyminum) and black cumin (Nigella sativa) seeds: traditional uses, chemical constituents, and nutraceutical effects”, *Food quality and safety*, c. 2, sayı 1, ss. 1-16, 2018.
- [73] J. Valipour, F. Taghizadeh, R. Esfahani, M. Ramesh ve R. Tayebbeh, “Role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in female and male fertility”, *Heliyon*, c. 10, sayı 9, ss. e29752, 2024.
- [74] O. S. Aydos, Y. Yukselten, D. Aydos, A. Sunguroglu ve K. Aydos, “Relationship between functional Nrf2 gene promoter polymorphism and sperm DNA damage in male infertility”, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, c. 67, sayı 6, ss. 399-412, 2021.
- [75] L. Lin, Q. Wu, F. Lu, J. Lei, Y. Zhou, Y. Liu, N. Zhu, Y. Yu, Z. Ning, T. She ve M. Hu, “Nrf2 signaling pathway: current status and potential therapeutic targetable role in human cancers”, *Frontiers in oncology* 13, c. 22, sayı 13, ss. 1184079, 2023.
- [76] F. Chen, M. Xiao ve M. Wang, “Keap1-Nrf2 pathway: a key mechanism in the occurrence and development of cancer”, *Frontiers in oncology* 14, c. 3, sayı 14, ss. 1381467, 2024.
- [77] Y. Fang, W. Ji ve C. Yan, “[Retracted] Research Progress of PI3K/PTEN/AKT Signaling Pathway Associated with Renal Cell Carcinoma”, *Disease Markers*, c. 2022, sayı 1, ss. 1195875, 2022.
- [78] L. Wan, Y. Wang, J. Li, Y. Wang ve H. Zhang, “Inhibition of the AKT/mTOR pathway negatively regulates PTEN expression via miRNAs”, *Acta Biochimica et*

- [79] S. Kim, B. Jung, J. Kim, J. H. Jeon, S. H. Jang, M. Kim, C. S. Kim ve H. Jang, “Newcastle disease virus harboring the PTEN gene inhibits pancreatic cancer growth by inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling and activating apoptosis”, *Molecular Therapy Oncology*, c. 32, sayı 4, 2024.
- [80] G. Singh ve A. M. Chan, “Post-translational modifications of PTEN and their potential therapeutic implications”, *Current cancer drug targets*, c. 11, sayı 5, ss. 536-547, 2011.
- [81] J. D. Carver, B. Gaston, K. Deronde ve L. A. Palmer, “Akt-mediated activation of HIF-1 in pulmonary vascular endothelial cells by S-nitrosoglutathione”, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, c. 37, sayı 3, ss. 255-263, 2007.
- [82] A. L. Howes, J. F. Arthur, T. Zhang, S. Miyamoto, J. W. Adams, G. W. Dorn, E. A. Woodcock ve J. H. Brown, “Akt-mediated cardiomyocyte survival pathways are compromised by Gαq-induced phosphoinositide 4, 5-bisphosphate depletion”, *Journal of Biological Chemistry*, c. 278, sayı 41, ss. 40343-40351, 2003.
- [83] C. A. Castaneda, H. C. Funes, H. L. Gomez ve E. M. Ciruelos, “The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer”, *Cancer and Metastasis Reviews*, c. 29, sayı 4, ss. 751-759, 2010.
- [84] Y. Kitagishi ve S. Matsuda, “Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cancer and aging”, *International journal of molecular medicine*, c. 31, sayı 3, ss. 511-515, 2013.
- [85] D. Yagmur, S. Inan, G. A. Ercan ve A. Sencan, “The role of CAPE in PI3K/AKT/mTOR activation and oxidative stress on testis torsion”, *Acta histochemica*, c. 118, sayı 1, ss. 31-37, 2016.
- [86] Y. Ding ve Q. Chen, “mTOR pathway: A potential therapeutic target for spinal cord injur”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, c. 145, ss. 112430, 2022.
- [87] A. N. Gargalionis, K. A. Papavassiliou ve A. G. Papavassiliou, “mTOR signaling: recent progress”, *International Journal of Molecular Sciences*, c. 25, sayı 5, ss. 2587, 2024.
- [88] R. Kylat ve M. N. Ahmed, “Neonatal testicular torsion”, *African Journal of Paediatric Surgery*, c. 19, sayı 1, ss. 1-4, 2022.
- [89] M. S. A. Kader, R. F. A. Rahman, H. N. Althurwi, G. A. Soliman, H. A. Ogaly ve F. F. Albaqami, “Samarcandin protects against testicular ischemia/reperfusion injury in rats via activation of Nrf2/HO-1-mediated antioxidant responses”, *Saudi Pharmaceutical Journal*, c. 31, sayı 7, ss. 1186-1196, 2023.
- [90] R. H. Abu-Baih, D. H. Abu-Baih, S. M. N. Abdel-Hafez ve M. Fathy, “Activation of SIRT1/Nrf2/HO-1 and Beclin-1/AMPK/mTOR autophagy pathways by

eprosartan ameliorates testicular dysfunction induced by testicular torsion in rats”, *Scientific Reports*, c. 14, sayı 1, ss. 12566, 2024.

- [91] P. Zhao, Y. Wei, G. Sun, L. Xu, T. Wang, Y. Tian, H. Chao, Y. Tu ve J. Ji, “Fetuin-A alleviates neuroinflammation against traumatic brain injury-induced microglial necroptosis by regulating Nrf-2/HO-1 pathway”, *Journal of Neuroinflammation*, c. 19, sayı 1, ss. 269, 2022.
- [92] Y. C. Kim ve K. L. Guan, “mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulatio”, *The Journal of clinical investigation*, c. 125, sayı 1, ss. 25-32, 2015.
- [93] C. Yu ve J. H. Xiao, “The Keap1-Nrf2 system: a mediator between oxidative stress and aging”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, c. 2021, sayı 1, ss. 6635460, 2021.
- [94] S. Sengupta, T. R. Peterson ve D. M. Sabatini, “Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress”, *Molecular cell*, c. 40, sayı 2, ss. 310-322, 2010.
- [95] M. Ayan, U. Tas, E. Sogut, S. Caylı, H. Kaya, M. Esen, F. Erdemir ve M. Uysal, “Protective effect of thymoquinone against testicular torsion induced oxidative injury”, *Andrologia*, c. 48, sayı 2, ss. 143-151, 2016.
- [96] I. T. Koksall, M. Usta, S. Abbasoglu ve A. Kadioglu, “Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility”, *Asian journal of andrology*, c. 5, sayı 2, ss. 95-99, 2003.
- [97] M. Kanter, C. Aktas ve M. Erboga, “Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis”, *Food and chemical toxicology*, c. 50, sayı 3-4, ss. 719-725, 2012.
- [98] Q. Ma, “Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity”, *Annual review of pharmacology and toxicology*, c. 53, sayı 1, ss. 401-426, 2013.
- [99] Y. Zhang, M. Liu, Y. Yang, J. Cao ve W. Mi, “Dexmedetomidine exerts a protective effect on ischemia-reperfusion injury after hepatectomy: a prospective, randomized, controlled study”, *Journal of clinical anesthesia*, c. 61, ss. 109631, 2020.
- [100] R. H. Abu-Baih, S. M. N. Abdel-Hafez ve M. Fathy, “Activation of SIRT1/Nrf2/HO-1 and Beclin-1/AMPK/mTOR autophagy pathways by eprosartan ameliorates testicular dysfunction induced by testicular torsion in rats”, *Scientific Reports*, c. 14, sayı 1, ss. 12566, 2024.
- [101] M. Laplante ve D. M. Sabatini, “mTOR signaling in growth control and disease”, *cell*, c. 149, sayı 2, ss. 274-293, 2012.
- [102] Y. Zhang, Y. Fan, S. Huang, G. Wang, R. Han, F. Lei, A. Luo, X. Jing, L. Zhao, S. Gu ve X. Zhao, “Thymoquinone inhibits the metastasis of renal cell cancer cells

by inducing autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway”, *Cancer science*, c. 109, sayı 12, ss. 3865-3873, 2018.

[103] B. Erol, U. Sari, A. S. Amasyali, S. Ozkanli, S. Sogut, V. Hanci, O. Efiloglu, Y. O. Danacioglu, P. Engin, F. Yencilek, G. Atis, A. Yildirim, O. A. Alkoc ve T. Caskurlu, “Comparison of combined antioxidants and thymoquinone in the prevention of testis ischemia - reperfusion injury”, *Andrology*, c. 5, sayı 1, ss. 119-124, 2017.

[104] F. A. Al-Rawashde, A. S. Al-Wajeih, M. N. Vishkael, H. K. M. Saad, M. F. Johan, W. R. W. Taib, I. Ismail ve H. A. N. Al-Jamal, “Thymoquinone Inhibits JAK/STAT and PI3K/Akt/ mTOR Signaling Pathways in MV4-11 and K562 Myeloid Leukemia Cells”, *Pharmaceuticals*, c. 15, sayı 9, ss. 1123, 2022.



7. EKLER

7.1. ETİK KURUL ONAYI

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ / DÜZCE UNIVERSITY
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
LOCAL ETHICS COMMITTEE PRESIDENCY ON ANIMAL TESTINGS
ETİK KURUL BAŞVURU KARARI / ETHICS COMMITTEE'S DECISION ON APPLICATION

Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR tarafından kurulumuza sunulan "Testis Torsiyonunda Timokininonun Nrf-2 Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi" isimli araştırma başvuru projesi etik yönden değerlendirilmiş olup; yönergemiz ilkelerine göre proje etiği açısından "UYGUN OLDUĞUNA" oy birliği / oy-cokluğu ile karar verilmiştir.

The research project entitled "Effect of Thymoquinone on Nrf-2 Expression in Testicular Torsion", submitted to our committee by Asst. Prof. Dr. Kayıhan KARAÇOR has been evaluated. According to the principles stated in our directive and the related ethical standards and codes, it has been decided unanimously / by-majority-vote that the research project is appropriate to be conducted.

Toplantı Tarihi / Meeting Date: 21.02.2024
Karar No / Decisions No: 2024/02/05

Unvan / Title, Adı / Name, Soyadı / Surname, Görevi / Position	Karar / Decision	İmza / Signature
Assoc. Prof. Dr. Meral KEKEÇOĞLU Başkan / Chairman	Uygundur / Appropriate	
Prof. Dr. Şengül CANGÜR Üye / Member	Uygundur / Appropriate	
Assoc. Prof. Dr. Merve ALPAY Üye / Member	Uygundur / Appropriate	
Assoc. Prof. Dr. Emel ÇALIŞKAN Üye / Member	Uygundur / Appropriate	
Assoc. Prof. Dr. Salih Tunç KAYA Üye / Member	Uygundur / Appropriate	
Assoc. Prof. Dr. Mert İLHAN Üye / Member	Uygundur / Appropriate	
Asst. Prof. Dr. Tolga ALTAŞ Veteriner Hekim / Veterinary Physician	Uygundur / Appropriate	
Asst. Prof. Dr. Hakan SOYLU Üye / Member	Araştırmacıdır / Researcher	
Asst. Prof. Dr. Özge BEYAZÇİÇEK Üye / Member	Uygundur / Appropriate	
Asst. Prof. Dr. Ceren GÜNEY Üye / Member	Uygundur / Appropriate	
Ali GÖK Üye / Member	Uygundur / Appropriate	
Dr. Recep ERGÜL Sivil Üye / Civil Member	Uygundur / Appropriate	
Aykut EKİNCİ STK Üyesi / CSO Member	Uygundur / Appropriate	

Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu / Düzce University Experimental Animals Local Ethics
Committee

Düzce Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi/Düzce University, Experimental Animals
Application and Research Center,
Konuralp Yerleşkesi, Merkez, 81620, Düzce, Turkey
0850 800 81 81 – Dahili/Extension:3060 Faks: 0380 5421302

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Betül MUTLU

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	Düzce Üniversitesi	2025
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Bülent Ecevit Üniversitesi	2021
Lise	Fen Bilimleri	Anadolu Öğretmen Lisesi	2017