

**TESTİS TORSİYONUNDA TİMOKİNONUN PRDX6
EKSPRESYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

SELCAN ATAŞ

**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 PRDX6
EKSPRESYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Selcan Ataş 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 Üyeler

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.

16.07.2025

Selcan ATAŞ

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı çok değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR ve Doç. Dr. Hakan SOYLU' ya en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Tez yazım sürecinde benden yardımını esirgemeyen arkadaşlarım Zeynep Sare KOLOĞLU ve Betül MUTLU'ya, hayvan deneylerinde bana büyük yardımcı dokunan Arş. Gör. Eren Burak İŞGÖREN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisansım boyunca benden desteklerini esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi BAP 2024.04.01.1517 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

16.07.2025

Selcan ATAŞ

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR.....	ix
SİMGELER	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM	4
2.1. HAYVANLAR.....	4
2.2. MADDELER VE DOZLARI	4
2.3. CERRAHİ PROSEDÜR.....	4
2.4. DENEY GRUPLARI, MADDELER, VERİLİŞ YOLLARI	5
2.5. İZLENECEK YOL	6
2.6. RUTİN PARAFİN TAKİBİ	6
2.7. GOMORİ TRİKROM BOYAMA PROSEDÜRÜ	7
2.8. İMMÜNOHİSTOKİMYA TEKNİĞİNİN UYGULANMASI	8
2.8.1. İmmünohistokimya Protokolü.....	8
2.9. COSENTİNO SKORLAMA PROTOKOLÜ.....	9
2.10. H-SCORE PROTOKOLÜ.....	9
2.11. İSTATİKSEL ANALİZ	10
3. GENEL BİLGİLER	11
3.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ.....	11
3.2. TESTİS HİSTOLOJİSİ	11
3.2.1. Seminifer tübüller	12
3.2.1.1. Sertoli hücresi	13
3.2.1.2. Leydig Hücreleri	14
3.2.1.3. İntertisyel Doku	15
3.2.1.4. Kan Testis Bariyeri	15
3.2.2. Testis içi Kanallar	15
3.2.2.1. Tubuli Rektuli.....	15
3.2.2.2. Rete Testis	16
3.2.2.3. Duktuli Efferentes	16
3.2.3. Spermatogenez ve Spermiyogenez	16

3.3. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ	19
3.4. TESTİS ANATOMİSİ.....	21
3.5. TESTİS TORSİYONU.....	22
3.5.1. İntravajinal Testis Torsiyonu.....	23
3.5.2. Ekstravajinal Testis Torsiyonu	23
3.6. İSKEMİ REPERFÜZYON	24
3.6.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Oksidatif Stres	25
3.7. TİMOKİNON	26
3.8. PRDX6.....	27
3.9. GLUKAGON BENZERİ PEPTİD-1 (GLP-1).....	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. BULGULAR	31
4.1.1. Histopatolojik bulgular	31
4.1.2. İmmünohistokimyasal bulgular	35
4.2. TARTIŞMA.....	48
5. SONUÇ	53
6. KAYNAKÇA.....	54
7. EKLER.....	62
7.1. ETİK KURUL ONAY	62
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Ratlara uygulanan torsiyon/detorsiyon modelinin fotoğrafları	5
Şekil 3.1. Erkek üreme sistemindeki yapıların şematik diyagramı	11
Şekil 3.2. Testis Anatomisi	12
Şekil 3.3. İnsan seminifer epitelinin şematik çizimi.....	14
Şekil 3.4. Spermatogenik hücre nesillerini gösteren şematik diyagram.....	17
Şekil 3.5. Spermiyogenez	19
Şekil 3.6. Testis gelişimi şematik gösterim	21
Şekil 3.7. Skrotum ve testisin enine kesiti.....	22
Şekil 3.8. Torsiyon Çeşitleri	24
Şekil 3.9. Nigella sativa.....	26
Şekil 3.10. Timokinonun kimyasal yapısı	27
Şekil 4. 2. Kontrol grubu gomori trikrom boyası.	33
Şekil 4. 3. Sham grubu gomori trikrom boyası.....	33
Şekil 4. 4. Timokinon grubu gomori trikrom boyası.....	34
Şekil 4. 5. Torsiyon/Detorsiyon grubu gomori trikrom boyası.	34
Şekil 4. 6. Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon grubu gomori trikrom boyası.	35
Şekil 4. 7. Farklı gruplardaki Prdx6 immunohistokimyasal boyamasının temsili fotoğrafları.	37
Şekil 4. 8. Kontrol grubu Prdx6 ekspresyonu.....	38
Şekil 4.9. Sham grubu Prdx6 ekspresyonu.....	38
Şekil 4.10. Timokinon grubu Prdx6 ekspresyonu.	39
Şekil 4.11. Torsiyon/Detorsiyon grubu Prdx6 ekspresyonu.	39
Şekil 4.12. Timokinon+Torsiyon grubu Prdx6 ekspresyonu.	40
Şekil 4.13. Farklı gruplardaki Glp-1 immunohistokimyasal boyamasının temsili fotoğrafları.	41
Şekil 4.14. Kontrol grubu Glp-1 ekspresyonu.....	42
Şekil 4.15. Sham grubu Glp-1 ekspresyonu	42
Şekil 4.16. Timokinon grubu Glp-1 ekspresyonu.....	43
Şekil 4.17. Torsiyon/Detorsiyon grubu Glp-1 ekspresyonu.	43
Şekil 4.18. Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon grubu Glp-1 ekspresyonu.	44
Şekil 4.19. Testiste Prdx6 ekspresyonunun Histolojik skor (H-score) sonuçları. .	45
Şekil 4.20. Testiste Glp-1 ekspresyonunun Histolojik skor (H-score) sonuçları..	46
Şekil 4.21. Cosentino Skor Sonuçları	47

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Torsiyon rat modelleri, maddeler ve veriş yolları.	5
---	---



KISALTMALAR

AEC	Aminoetilkarbazol
AP	Alkalin Fosfataz
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ER	Endoplazmik Retikulum
GLP-1	Glukagon Benzeri Peptid-1 (Glucagon Like Peptide-1)
GLP-1R	Glukagon Benzeri Peptid-1 Reseptörü
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
H&E	Hematoksilen-Eozin
HRP	Horseradish Peroxidase (Yaban turpu peroksidaz)
IP	İntraperitoneal
iPLA2	Kalsiyumdan Bağımsız Fosfolipaz A2
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)
PLA2	Fosfolipaz A2
PRDX6	Peroxsiredoksin 6
Prdx	Peroxsiredoksin
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
SOD	Süperoksit Dismutaz
T/D	Torsiyon / Detorsiyon
TQ	Timokinon

SİMGELER

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
Mg	Dioktil ftalat
Kg	Kilogram
gr	Gram
ml/kg	Mililitre bölü kilogram
mg/kg	Miligram bölü kilogram
pH	Hidrojen iyon konsantrasyonu

ÖZET

TESTİS TORSİYONUNDA TİMOKİNONUN PRDX6 EKSPRESYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Selcan ATAŞ

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR

Temmuz 2025, 62 sayfa

Testis torsiyonu spermatik kordun kendi etrafında dönmesi sonucu testisin kanlanmasının bozulması ve iskemiye gitmesi ile sonuçlanan acil bir durumdur. Genelde ergenlik ve çocukluk döneminde sık görülür. 25 yaşın altındaki her 100.000 erkek için yılda yaklaşık 4,5 erkekte testis torsiyonu görülür. Testiküler torsiyon-detorsiyon (T/D) nedeniyle oluşan iskemi ve reperfüzyon (İ/R) testiküler hasara, infertiliteye(kısırlığa) ve organ fonksiyon bozukluğuna neden olur. Testis torsiyonu karın alt kadrana yayılım gösteren skrotal ağrı, beraberinde bulantı, kusma gibi semptomlara sebep olabilir. Testis torsiyonu genellikle nedeni bilinmemekle birlikte %20 oranında travmayla meydana gelebilmektedir. Testis torsiyonuna bağlı olarak oluşan iskemi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyesinde artışa sebep olur. ROS üretiminin artması DNA hasarına, endotel yıkımına ve testis germ hücresi apoptozuna neden olur. Testis fonksiyon bozukluklarını önlemek amacıyla çeşitli antioksidanlar denenmektedir. Peroksiredoksinler (PRDX'ler), reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarını önleyen antioksidan enzimlerdir. Siyah tohum kabuğunun (*Nigella sativa*) biyoaktif bileşenlerinden biri olan timokinon (TQ), önemli anti-inflamatuar ve antioksidan aktivitelere sahiptir, ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda timokinonun oksidatif stresi baskılayabildiği ortaya çıkmıştır. Bu çalışmamızın amacı testiküler iskemi reperfüzyon hasarına karşı antioksidatif özelliklere sahip olan timokinonun Prdx6 ekspresyonu üzerinden koruyucu etkinliğinin olup olmadığını göstermektir. Bu amaçla 30 adet erkek cinsi rat; kontrol (DMSO), sham (sadece operasyon), torsiyon/detorsiyon, timokinon ve timokinon + torsiyon/detorsiyon gruplarına ayrıldı. Timokinon ve timokinon + torsiyon/detorsiyon gruplarına 7 gün boyunca 10 mg/kg dozunda timokinon intraperitonel olarak uygulandı ve akabinde torsiyon/detorsiyon modeli oluşturuldu. Model oluşturulduktan sonra testiküler dokuda gomori trikrom boyaması ile immünohistokimya tekniği uygulandı. Torsiyon/Detorsiyon grubunda testis dokusunda belirgin histopatolojik hasar gözlenmiş, Timokinon tedavisi ise bu hasarı azaltarak tübül bütünlüğünü korumuştur. Prdx6 ve GLP-1 ekspresyonu Torsiyon/Detorsiyon grubunda artmış, Timokinon uygulanan grupta ise azalmıştır. Bu bulgular, Timokinonun Prdx6 ve GLP-1 ekspresyonunu düzenleyerek testis dokusunda antioksidan bir koruma sağladığını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Testis, Torsiyon, Timokinon, Prdx6, İskemi/Reperfüzyon

ABSTRACT

THE EFFECT OF THYMOQUINONE ON PRDX6 EXPRESSION IN TESTICULAR TORSION

Selcan ATAŞ

Düzce University

Institute of Graduate Education, Department of Histology and Embryology,

Master's Thesis

Supervisor: Asisst. Prof. Dr. Kayıhan KARAÇOR

July 2025, 62 pages

Testicular torsion is an emergency condition resulting from the twisting of the spermatic cord around itself, which leads to impaired blood flow and subsequent ischemia of the testis. It is most commonly seen during childhood and adolescence. Testicular torsion affects approximately 4.5 out of every 100,000 males under the age of 25 annually. Ischemia and reperfusion (I/R) resulting from testicular torsion-detorsion (T/D) can lead to testicular damage, infertility, and organ dysfunction. It typically presents with scrotal pain radiating to the lower abdomen, and may be accompanied by symptoms such as nausea and vomiting. Although the exact cause of testicular torsion is often unknown, trauma accounts for approximately 20% of cases. Ischemia resulting from testicular torsion increases the levels of reactive oxygen species (ROS). Elevated ROS production can lead to DNA damage, endothelial destruction, and apoptosis of testicular germ cells. To prevent testicular dysfunction, various antioxidants are being investigated. Peroxiredoxins (PRDXs) are antioxidant enzymes that prevent ROS-induced cellular damage. One of the bioactive components of black seed (*Nigella sativa*), thymoquinone (TQ), possesses significant anti-inflammatory and antioxidant activities. Studies have shown that thymoquinone can suppress oxidative stress. The aim of our study is to investigate whether thymoquinone, which has antioxidant properties, provides a protective effect against testicular ischemia-reperfusion injury through the regulation of Prdx6 expression. For this purpose, 30 male rats were divided into the following groups: control (DMSO), sham (operation only), torsion/detorsion, thymoquinone, and thymoquinone + torsion/detorsion. Thymoquinone was administered intraperitoneally at a dose of 10 mg/kg daily for 7 days in the thymoquinone and thymoquinone + torsion/detorsion groups, followed by the creation of a torsion/detorsion model. After the model was established, Gomori trichrome staining and immunohistochemical techniques were applied to the testicular tissue. In the Torsion/Detorsion group, significant histopathological damage was observed in the testicular tissue, whereas thymoquinone treatment reduced this damage and preserved tubular integrity. Prdx6 and GLP-1 expression increased in the Torsion/Detorsion group, while it decreased in the thymoquinone-treated group. These findings indicate that thymoquinone provides antioxidant protection in testicular tissue by regulating the expression of Prdx6 and GLP-1.

Keywords: Testis, Torsion, Thymoquinone, Prdx6, Ischemia/Reperfusion

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Testiküler torsiyon, testisin spermatik kord boyunca bükülmesi ile tanımlanmaktadır. Testis aniden skrotumda dönerek kan damarlarını testise doğru bükerek ve testis kan akışını durdurur. Testise kan akışının sağlanamaması iskemiye yol açmaktadır[1]. Potansiyel infertilite riski nedeniyle testis torsiyonu ürolojik bir acil durumdur. 25 yaşın altındaki her 100.000 erkek için yılda yaklaşık 4,5 erkekte testis torsiyonu görülür[2], [3]. Bu ürolojik acil durum için zaman çok önemlidir, çünkü 4-8 saatten fazla süren ağrı, herhangi bir müdahale yapılmazsa testis hasarı ile sonuçlanır. Testis torsiyonu en sık genç erkek hastalarda ortaya çıkmaktadır. Orta veya şiddetli testis ağrısı, yaygın testis hassasiyeti ve şişlik testis torsiyon belirtileridir. Bu belirti ve semptomlar çoğunlukla testislere küçük bir travma veya fiziksel aktiviteden birkaç saat sonra ortaya çıkar, ancak hastalar uykudan şiddetli ağrıyla uyanabilir veya istirahatte ani bir ağrı yaşayabilir. Hastalarda bulantı, kusma ve alt karın ağrısı da görülebilir[3]. Testis torsiyonu en sık puberte döneminde görülür. Bu dönemde artan testosteron düzeyine bağlı olarak testis hacmi artar ve testisin hareketliliği artabilir, bu da torsiyon riskini artırır. Yenidoğan döneminde görülen testis torsiyonları ise daha nadirdir ve genellikle hormonal değil, anatomik ve mekanik faktörlere bağlı olarak gelişir[4]. Testis torsiyonu genellikle üç şekilde görülür: testis dışındaki yapının dönmesi (ekstravajinal), testisin kendi etrafında dönmesi (intravajinal) ve testis eklerine ait yapıların torsiyonu [5]. Testiküler torsiyon reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesini artırır. Artan serbest radikaller DNA hasarına, protein denatürasyonuna, germ hücresi apoptozuna ve lipid peroksidasyonuna neden olur[6].

Peroksiredoksinler (Prdx), bakterilerde, bitkilerde, mayalarda, hayvanlarda kısaca tüm canlı organizmalarda bulunmaktadır. Memeli Peroksiredoksinleri (Prdx'ler) ise, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarını önleyen antioksidan enzimlerdir[7]. PRDX'ler aktif bölgelerindeki peroksitlerle reaksiyona girecek sistein kalıntılarına (Cys) bağlı olarak sınıflandırılır. 1-Cys bağlı ise PRDX6 oluşur[8]. PRDX6, hem GSH (Glutatyon) peroksidaz hem de fosfolipaz A2 aktivitelerine sahip, iki işlevli 25 kDa'lık bir proteindir. Aynı zamanda önemli bir antioksidan enzimdir, akciğerde yüksek olmak üzere birçok organda eksprese edilir[9]. PRDX6, spermatozoaların oksidatif stres kaynaklı hasarlardan korunmasında kritik bir antioksidan savunma mekanizması olarak görev yapmaktadır[10]. Yapılan bir çalışmada PRDX6'nın spermatozoanın canlılığını

etkileyebileceğini, oksidatif stresi ve lipid peroksidasyon seviyelerini düşürebildiğini gözlemlemiştir[11]

Timokinon, 1963 yılında El-Dakhkhny tarafından *Nigella sativa* L. (çörek otu) tohumlarından izole edilen, kristalize yapıda, uçucu bir monoterpendir. Sarı renkli olan bu bileşik, $C_{10}H_{12}O_2$ formülüne ve 164.2 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir[12]. Çörek otu, Akdeniz'e kıyısı olan bölgelerde yetişen yıllık otsu bir bitki olup, geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın şekilde kullanılmıştır[13]. Oksidatif stresin temel nedeni olan serbest radikaller, hücresel yapı taşlarına zarar vererek önemli biyolojik hasarlara neden olur[14]. Timokinon (TQ), reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücresel hasarı azaltmada etkili olan doğal bir antioksidan bileşiktir. Antioksidan etkisini hem doğrudan serbest radikalleri temizleyerek hem de endojen antioksidan savunma sistemlerini destekleyerek gösterir[15]. Bu savunma sistemlerinin başında gelen süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit anyonlarını (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) çevirerek toksik etkilerini azaltır. Timokinon, oksidatif stres koşullarında SOD aktivitesini artırarak hücresel düzeyde savunma mekanizmalarını güçlendirmektedir. Böylece timokinon hem serbest radikal oluşumunu baskılayarak hem de SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini destekleyerek toksisiteyi azaltma yeteneği göstermektedir[16]. Antioksidan özelliğinden dolayı *Nigella sativa*da bulunan timokinonun iskemi ve testis torsiyonu gibi hastalıklarda koruyucu etkinliğinin olabileceği düşünülmektedir[17].

Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1), besin alımı sonrasında distal ileum ve kolon bölgesindeki enteroendokrin L hücrelerinden salgılanan bir inkretin hormonudur[18]. GLP-1 preproglukagon genini (Gcg) kodlayan gen dizisinin bir parçası olarak 1983 yılında tanımlanmıştır. Etkisi birçok dokuda görülmüştür. En yüksek etkisini akciğer ve pankreasta, daha azını ise mide, bağırsak, böbrek, kalp ve beyinde göstermiştir. İfadesini G proteinine bağlı GLP-1 reseptörü (GLP-1R) aracılığıyla gerçekleştirir[19]. GLP-1 insülin salınımını ve daha sonra yükselmiş glikoz seviyelerinin normalleşmesini sağlar, hücre kütlelerinde esas olarak anti-apoptotik olan koruyucu bir etki gösterir. Ayrıca GLP-1, sitokin etkisine karşı koyarak güçlü bir anti-inflamatuar rol oynar[20]. Ek olarak, GLP-1R inflamasyon ve oksidatif stresi düzenlemede kritik bir rol oynar[21]. Bazı yakın tarihli çalışmalar, üreme sisteminde de önemli miktarda GLP-1 R tanımlamıştır[22], [23]

Bu çalışmamızın amacı testiküler iskemi reperfüzyon hasarına karşı antioksidatif özelliklere sahip olan timokinonun Prdx6 ve GLP-1 ekspresyonu üzerinden koruyucu etkinliğinin olup olmadığını göstermektir.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. HAYVANLAR

Bu çalışmada, Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen toplam 30 adet Wistar cinsi, 2–3 aylık, 250–300 gram ağırlığında erkek sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar, laboratuvar ortamında 23 °C sıcaklık, %60 ± 5 bağıl nem ve 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık olacak şekilde düzenlenmiş ışık döngüsünde, yem ve suya serbest erişim sağlanarak standardize koşullarda barındırılmıştır.

2.2. MADDELER VE DOZLARI

Çalışmada, torsiyon/detorsiyon uygulanacak ratlara, dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürülen Timokinon, günlük olarak hazırlandı ve 7 gün boyunca her gün 10 mg/kg dozunda intraperitonel yolla uygulandı. Anestezik olarak 1.25gr/kg üretan intraperitonel olarak kullanılmıştır. Tunika vajinalis açıldıktan sonra sol testis saat yönünde 720° döndürülecek skrotuma sabitlenerek torsiyon sağlanmıştır. 120 dakika torsiyon ve 180 dakika detorsiyon sonrasında deney sonlandırılmıştır.

2.3. CERRAHİ PROSEDÜR

Her gruptaki hayvanlar, üretan kullanılarak anestezide alındıktan sonra, skrotum dikkatlice katman katman kesilerek testis ve epididimise erişim sağlanmıştır. Ardından testis özenle çıkarılmıştır. Her grupta 6 rat olacak şekilde toplam 30 rat kullanılmıştır. Gruplar ve gruptaki hayvanlara uygulanan prosedürler Çizelge 2.1'de detaylı bir şekilde açıklanmıştır.



Şekil 2.1. Ratlara uygulanan torsiyon/detorsiyon modelinin fotoğrafları

2.4. DENEY GRUPLARI, MADDELER, VERİLİŞ YOLLARI

Ratlar, her grupta 6 hayvan olacak şekilde toplamda 30 rat 5 gruba ayrılmıştır. Gruplar ve gruplardaki hayvanlara uygulanacak prosedürler Tablo 2.1’ de detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

GRUP NO	GRUP ADI	VERİLEN MADDE	VERİLEN MİKTAR	HAYVAN SAYISI
1	Kontrol	DMSO	%1 İntraperitoneal	6
2	Sham	Sadece operasyon	—	6
3	Timokinon	Timokinon	10 mg/kg İntraperitoneal	6
4	Torsiyon/Detorsiyon		—	6
5	Timokinon+ Torsiyon/Detorsiyon	Timokinon	10 mg/kg İntraperitoneal	6

Tablo 2.1. Torsiyon rat modelleri, maddeler ve veriş yolları.

2.5. İZLENECEK YOL

Deney gruplarındaki hayvanlara, 7 gün süresince her gün 08:00 ile 12:00 saatleri arasında Tablo 1’de yer alan maddeler uygulanmıştır. Uygulama sonunda ise üreter enjeksiyonu ile anestezi sağlanmıştır. Daha sonra testiste iskemi reperfüzyon modeli oluşturmak için torsiyon ve timokinon+torsiyon grubundaki ratların sol testisleri önce 120 dakika boyunca saat yönünde 720° döndürülerek torsiyone edilmiş ve bir sütür atılarak skrotuma sabitlenmiştir, daha sonra 180 dakika boyunca detorsiyone hale getirilmiştir. Torsiyon/detorsiyon işlemi yapıldıktan sonra testis dokusu dikkatli bir şekilde çıkarılmış, tartılmış, boyutları, rengi, dokusu gözlemlenmiştir ve immünohistokimyasal çalışmalar için %4’lük bouin solüsyonuna alınmıştır. Dokular ışık mikroskopik gözlem için, 24 saat boyunca bouin solüsyonunda sabitlenmiştir, kademeli olarak etanol ve ksilen serisinde dehidre edildikten sonra parafin içerisine gömülmüştür. Mikrotom sayesinde kesitler alınmış ve cam slaytlara monte edilerek hematoksil-eozin ile boyanarak mikroskop altında incelenmiştir. Ayrıca alınan kesitler immünohistokimyasal çalışma için de kullanılmıştır.

2.6. RUTİN PARAFİN TAKİBİ

1. **Fiksasyon işlemi:** Doku örnekleri Bouin solüsyonuna yerleştirilerek 24 saat boyunca sabitlenmiştir.
2. **Yıkama:** Fiksasyonun ardından dokular, artıklı fiksatif kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla 3 saat boyunca akan musluk suyunda yıkanmıştır.
3. **Dehidratasyonun başlangıcı:** Dokuların içeriğindeki suyun uzaklaştırılması amacıyla sırasıyla artan konsantrasyonlarda etil alkol serisine alınmıştır.
4. **Alkol serileri:**
 - İlk olarak 15 dakika süreyle %70’lik etil alkole konulmuştur.
 - Ardından 15 dakika %80’lik etil alkolde bekletilmiştir.
 - Daha sonra 2 kez 30 dakika boyunca %90’lik etil alkolde tutulmuştur.
 - Son olarak 2 kez 30 dakika ve ilave olarak 45 dakika %96’lık etil alkolde bekletilerek dehidratasyon tamamlanmıştır.

5. **Sertleştirme işlemi:** Dokular, yapılarının daha stabil hâle gelmesi için 45 dakika boyunca aseton içinde bekletilmiştir.
6. **Şeffaflaştırma:** Dokular, ışık geçirgenliğini sağlamak amacıyla sırasıyla 10 dakika Ksilen 1 ve ardından 20 dakika Ksilen 2’de tutulmuştur.
7. **Parafinleme işlemi:** Gömme öncesi aşamada, dokular 75°C sıcaklıktaki etüvde önce 30 dakika Parafin 1’de, ardından 30 dakika Parafin 2’de bekletilmiştir.
8. **Gömme işlemi:** Isıtılmış parafinle doymuş dokular, metal kalıplar içerisinde yerleştirilerek blok hâline getirilmiştir.
9. **Kesit alma:** Parafin bloklarından mikrotom aracılığıyla 4 mikrometre kalınlığında doku kesitleri alınmış ve bu kesitler su banyosunda düzleştirilmiştir.
10. **Lam hazırlama ve boyama:** Düzleştirilen kesitler uygun cam lamalar üzerine yerleştirilmiş Gomori Trikrom ile Prdx6 ve GLP-1 antikoru kullanılarak boyanmıştır.

2.7. GOMORİ TRİKROM BOYAMA PROSEDÜRÜ

Parafin bloklardan alınan kesitler, 75°C’deki etüvde 40 dakika süreyle kurutuldu. Deparafinizasyon amacıyla kesitler 20 dakika boyunca ksilende bekletildi. Ardından sırasıyla %96, %80 ve %70’lik etil alkol serilerinden, her biri 10 daldırma olacak şekilde geçirildi. Alkol işlemi sonrası kesitler musluk suyunda yıkandı. Sabitleme için kesitler Bouin solüsyonuna alınarak 75°C’deki etüvde 35 dakika inkübe edildi. Daha sonra, üç ayrı kaptaki bol suyla iyice yıkandı. Hematoksilen ile 2 dakika boyandıktan sonra tekrar üç ayrı kaptaki musluk suyuyla durulandı. Trikrom solüsyonuna 25 dakika süreyle daldırıldı. Boyama sonrası %0,5’lik asetik asit ile diferansiyasyon yapıldı ve kesitler yeniden musluk suyunda yıkandı. Dehidrasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96’lık etil alkollere onar kez daldırıldı. Takiben 10 dakika boyunca ksilende bekletildi. Son olarak, 75°C’deki etüvde 2 dakika kurutuldu. Kesitlerin üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

2.8. İMMÜNOHİSTOKİMYA TEKNİĞİNİN UYGULANMASI

Testis ve testis dokusu hücrelerine immünohistokimyasal teknik uygulanarak hücresel dağılımları belirlendi.

2.8.1. İmmünohistokimya Protokolü

Tüm gruplara ait parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alınarak immün boyama için özel lamlara yerleştirildi. Bu lamlar 75°C'deki etüvde 40 dakika bekletildi. Deparafinizasyon işlemi için kesitler sırasıyla 10 dakika Ksilen 1'de ve 5 dakika Ksilen 2'de bekletildi. Ardından, rehidratasyon amacıyla %100, %90, %80 ve %70'lik etil alkol serilerinden her birinde 5 dakika bekletildi. Alkol serilerinden geçirilen kesitler distile suda 5 dakika bekletildikten sonra pH 6.0'a ayarlanmış 0.01 M sitrat tamponu içinde mikrodalga fırında 750 Watt gücünde 8 dakika ısıtıldı ve ardından oda sıcaklığında 20 dakika soğumaya bırakıldı. Bu işlemin ardından kesitler fosfat tamponlu tuzlu çözeltide (PBS, pH 7.2–7.4) 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı ardından %3'lük hidrojen peroksit ile 15 dakika inkübe edilip yine PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı. Kesitlerin çevresi hidrofobik kalem (Pap-pen) ile çizilerek sıvı dağılımları engellendi. Non-spesifik bağlanmaların önüne geçmek için oda sıcaklığında ve nemli bir ortamda 7 dakika boyunca bloklama serumu uygulandı. Daha sonra, Prdx6 (abcam, lot:GR3273633-1) (1\100) ve GLP-1 (Affinity, lot:46k7199) (1\300) primer antikoru kesitler üzerine damlatıldı ve lamlar +4°C'de nemli kutuda gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün, kesitler PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandıktan sonra, biyotinle işaretlenmiş sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edildi ve ardından tekrar PBS ile 3 kez yıkama yapıldı. Daha sonra kesitler HRP ile konjuge edilmiş streptavidin çözeltisi ile 20 dakika inkübe edildi. Bu aşamadan sonra 3 kez PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Görüntüleme işlemi için kesitler 4 dakika boyunca DAB (ScyTek, #ACK500) kromojeni ile işleme tabi tutuldu ve ardından distile suyla yıkandı. 1 dakika süresince Mayer's hematoksilen (ScyTek, #800-729-8350) ile zıt boyama yapıldı. Boyama işlemi tamamlanan kesitler, sırasıyla %70, %80 ve %90'lık etil alkol serilerinden her birinde 10 kez daldırılarak geçirildi ve son olarak %100'lük alkolde 4 dakika bekletilerek dehidratasyon tamamlandı. Son aşamada, çıkış ksileni olarak kullanılan Ksilen 1 ve Ksilen 2'de 5'er dakika bekletilen lamlar, Entellan kapatma solüsyonu ile kapatılarak değerlendirilmeye hazır hâle getirildi.

2.9. COSENTİNO SKORLAMA PROTOKOLÜ

Testislerde meydana gelen histopatolojik değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla Cosentino skorlama yöntemi uygulanmıştır. Her histolojik kesitten yaklaşık 10 adet seminifer tübül seçilmiştir. İlk tübül rastgele olarak belirlenmiş, geri kalanlar saat yönünde ilerleyerek seçilmiştir. Belirlenen her tübül, morfolojik özelliklerine göre 1 ile 4 arasında puanlanmıştır. Germ hücre dizilimi düzenli olan ve yapısal bütünlüğü koruyan seminifer tübüller 1 puan almıştır. Germ hücrelerinde minimal düzeyde kohezyon kaybı bulunan, ancak hâlâ düzenli ve kompakt yapıda olan tübüller 2 puanla değerlendirilmiştir. Germ hücreleri büzüşmüş, piknotik nükleuslara sahip, yapısı bozulmuş ve düzensiz görünümdeki tübüller 3 puan olarak kaydedilmiştir. Germ hücrelerinde yaygın koagülatif nekroz ve belirgin hasar barındıran tübüller ise 4 puan ile derecelendirilmiştir. Her gruba ait tübüllerin puan ortalamaları hesaplanarak gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır. Değerlendirme, 40x büyütmede elde edilen mikroskopik görüntüler üzerinden gerçekleştirilmiş olup, çalışmanın dizaynından haberdar olmayan iki bağımsız uzman tarafından yapılmıştır.

2.10. H-SCORE PROTOKOLÜ

İmmünohistokimyasal boyama analizi, histopatolojik yapıları gözlemlemek ve pozitif boyanan hücreleri tespit etmek amacıyla öncelikle 10x objektif (100x büyütme) ile ışık mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilir. Daha ayrıntılı inceleme ise 40x objektif (400x büyütme) ile yapılır.

Boyama sonuçlarının değerlendirilmesi, hem boyamanın yoğunluğunu (i) hem de bu yoğunlukta boyanmış hücrelerin yüzdesini (Pi) dikkate alan bir skorlama sistemi olan H-score yöntemi ile yapılır. Yoğunluk skorları; 0 (boyama yok), 1 (zayıf boyama), 2 (orta düzeyde boyama) ve 3 (kuvvetli boyama) olarak sınıflandırılır. Her yoğunluk düzeyine karşılık gelen hücre yüzdesi belirlenerek formülde yerine konur:

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

Bu hesaplama sonucunda elde edilen skor, 0 ile 300 arasında bir değer alır.

Değerlendirme Kriterleri:

- Her bir örnek için 10x büyütmede boyama değerlendirilir.

- Boyanmış hücrelerin yüzdesi göz önünde bulundurularak sayısal bir değer verilir.
- Kantitatif analizlerde yüksek büyütme (40x) kullanılarak detaylı değerlendirme yapılır.
- İmmün boyama yoğunluğu 0'dan (negatif) 3'e (güçlü) kadar derecelendirilir.
- Her yoğunluk düzeyine karşılık gelen hücre yüzdesi ile çarpılarak H-score hesaplanır.

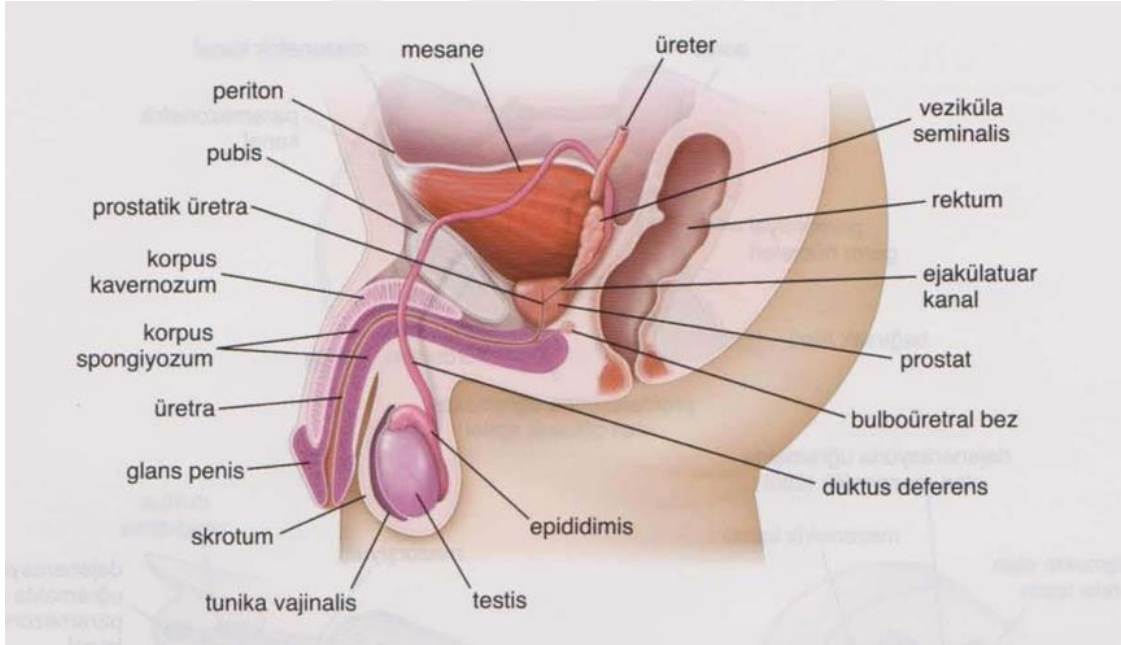
2.11. İSTATİKSEL ANALİZ

Elde edilen verilerin analizi GraphPad Prism 9 ile yapılmıştır. Tüm immünohistokimya verileri one-way ANOVA takiben Holm -Sidak metodu kullanılarak analiz edildi. İstatiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ

Testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penis gibi yapıların bir araya gelmesiyle erkek üreme sistemi oluşur. Veziküla seminalis, prostat ve bulboüretral bezler ise yardımcı bezler arasında yer alır. Testisler, sperm üretiminin yanı sıra, erkek üreme fizyolojisinin gelişimi için gerekli olan testosteron hormonunu da salgılar[24]. Spermatogenezin, fetal ve embriyonik dönemde cinsel gelişim ile gonadotropin salınımının düzenlenmesinde testosteronun önemli bir rolü vardır. Testislerde üretilen spermatozoonların dışarıya taşınması için gerekli salgılar, genital kanallar ve yardımcı bezler tarafından üretilir. Bu salgılar, aynı zamanda spermatozoonların beslenmesini de sağlar. Kanallarda üretilen salgılar ile spermatozoonlar birleşerek penisten dışarı atılan semen oluşur[25].

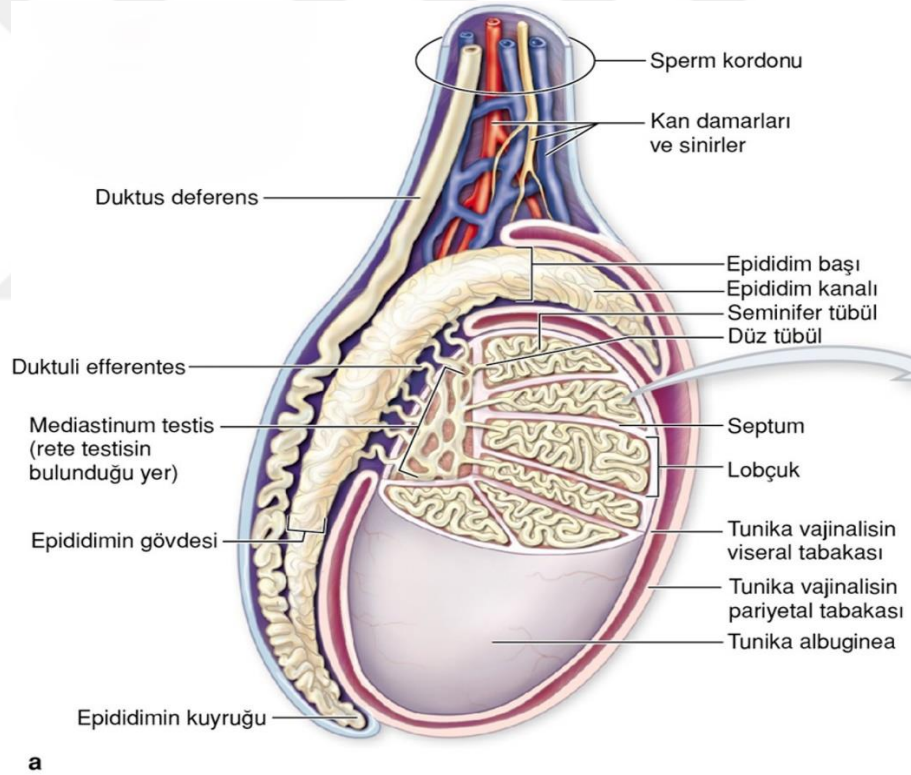


Şekil 3.1. Erkek üreme sistemindeki yapıların şematik diyagramı[26]

3.2. TESTİS HİSTOLOJİSİ

Yetişkin bireylerde testisler, vücut boşluğunun dışında yer alan skrotum içerisinde konumlanmış, çift yapıli oval organlardır. Embriyonal gelişim sürecinde karın

boşluğunun arka duvarında, retroperitoneal alanda oluşurlar. Her bir testis, periton kökenli bir seröz zar olan tunika vajinalis ile çevrilidir. Bu yapı; dışta skrotum duvarını döşeyen pariyetal tabaka ve içte testisin ön ve yan yüzlerini saran viseral tabaka olmak üzere iki katmandan oluşur [27]. Testis, ayrıca tunika albuginea adı verilen yoğun bağ dokusundan oluşan bir kapsülle çevrelenmiştir. Bu kapsül, testisin arka yüzeyinde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur. Testise giren ve çıkan damarlar, lenfatikler ve boşaltım kanalları bu yapı içerisinde geçer. Her testiste, mediastinumdan kaynaklanan bağ dokusu uzantıları testis parenkimini yaklaşık 250 lobüle ayırır[28]. Bu lobüllerin her birinde 1 ila 4 adet arasında değişen sayılarda, kıvrımlı yapıya sahip seminifer tübüller bulunur. Sperm üretiminin gerçekleştiği bu tübüllerin çevresinde ise gevşek bağ dokusu içerisinde yer alan ve testosteron sentezinden sorumlu olan Leydig hücreleri yer alır [29].



Şekil 3.2. Testis Anatomisi[29]

3.2.1. Seminifer tübüller

Seminifer tübüller, içi boş, uzun ve oldukça ince yapıda olan mikroskobik kanallardır ve sperm hücrelerinin üretildiği temel yapılardır. Her bir testiste yaklaşık 250 ila 1000 arasında değişen sayılarda seminifer tübül bulunur. Bu tübüller ortalama 50–250 µm çapında olup, uzunlukları 30–70 cm arasında değişebilir. Tüm seminifer tübüllerin

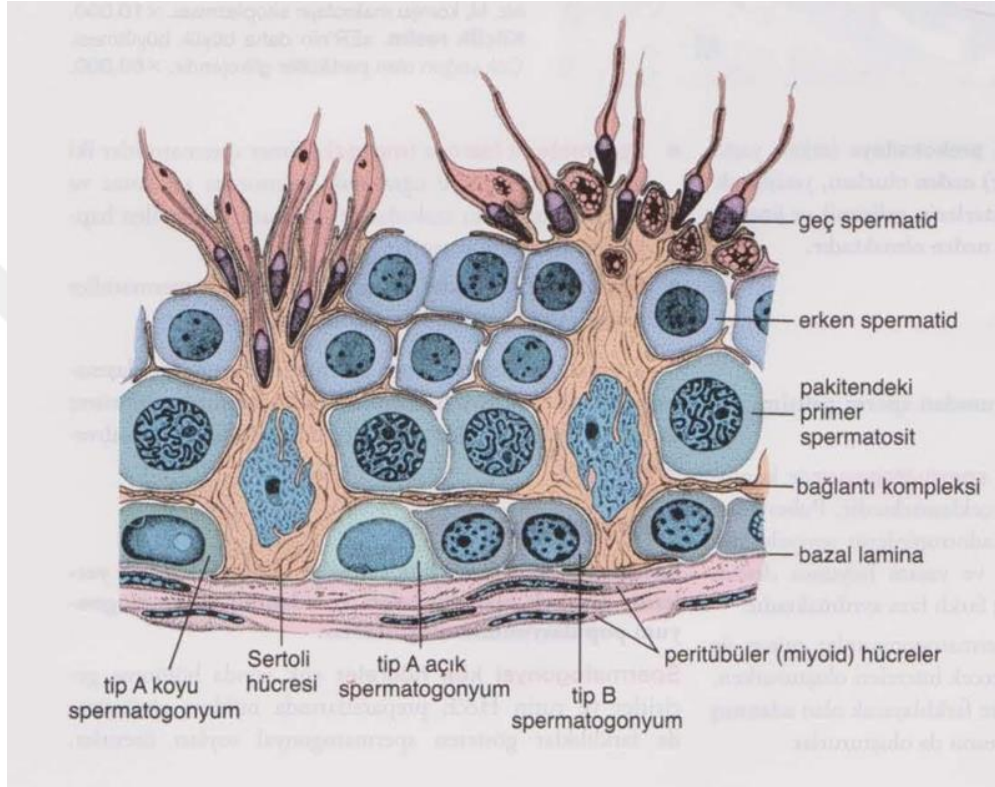
birleşiminden oluşan toplam uzunluk bir testiste yaklaşık 250 metreyi bulabilir [30]. Seminifer tübüllerin distal uçları düz tübüller (tubuli recti) olarak adlandırılan yapılarla sonlanır ve bu yapılar, olgunlaşmakta olan spermatozoonları rete testis adı verilen ağa benzer bir yapıya iletir. Rete testis, yaklaşık 150–250 µm çapında kanalcıklardan oluşur ve bu yapılar da duktuli efferentes adı verilen 15–20 adet küçük kanal aracılığıyla epididimise bağlanır [31]. Epididimis, spermlerin son olgunlaşma sürecini geçirdiği, oldukça kıvrımlı bir kanaldır. Her seminifer tübül, germinal epitel veya spermatogenik epitel olarak bilinen özel birçok katlı epitel dokusu ile çevrilidir. Bu epitelin bazalinde fibröz bağ doku yer alır ve en iç katmanda düz kas özellikleri taşıyan yassılaştırmış miyoid hücreler bulunur. Miyoid hücreler, tübüllerin hafif ritmik kasılmalarla sperm hareketine yardımcı olmasını sağlar. Germinal epitel, temel olarak iki hücre tipinden oluşur: Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri[32]. Sertoli hücreleri, gelişmekte olan spermatogenik hücrelere fiziksel, besleyici ve metabolik destek sağlayan, testis içinde “bakıcı hücreler” olarak görev yapan yapılardır. Spermatogenik seri hücreleri ise 4 ila 8 katman hâlinde dizilmiş öncül sperm hücrelerinden oluşur. Bu hücreler yaklaşık 10 hafta süren bir süreç sonunda farklılaşarak olgun spermatozoonlara dönüşür [33].

3.2.1.1. Sertoli hücresi

Sertoli hücreleri, testiste spermatogenezi destekleyen temel somatik hücreler olarak tanımlanır. Puberte sonrasında mitotik olarak bölünme yeteneklerini kaybederler ve artık çoğalmazlar. Bu hücreler, prizmatik yapıdadır ve spermatogenik hücreleri çevreleyen, aralarındaki boşlukları dolduran apikal ve lateral yönlerde uzantılar içerir. Sertoli hücrelerinin bu kompleks morfolojik yapısı, rutin hematoksil-eosin (H&E) boyamalarında genellikle ayrıntılı biçimde seçilemez. Bazal kutupları bazal lamina üzerine yerleşmiş olan bu hücrelerin apikal kısımları ise seminifer tübül lümenine kadar ulaşır[34]. Sitoplazmaları iyi gelişmiş organeller içerir; özellikle granüllü ve agranüler endoplazmik retikulum, mitokondri, Golgi kompleksi ve lizozomlar açısından zengindirler. Sertoli hücreleri arasında zonula okludens tipi sıkı bağlantılar kurularak, seminifer tübül lümeni etrafında kesintisiz bir bariyer oluşur. Bu yapı, kan-testis bariyeri olarak adlandırılır ve germ hücrelerini immünolojik olarak korur.

Bu hücrelerin çekirdekleri genellikle üçgen şeklinde uzanmış olup açık renkli (ökromatik) boyanır ve belirgin bir nükleolus içerir. Nükleolus, sıklıkla heterokromatinle çevrilidir ve bu durum mikroskopik olarak dikkat çekici bir özellik oluşturur[35]. Sertoli hücrelerinin işlevleri arasında gelişmekte olan spermatogenetik hücrelere fiziksel destek ve besin

sağlamak, ayrıca henüz tam olgunlaşmamış ya da bozuk yapıdaki germ hücrelerini ortadan kaldırmak yer alır. Bunun yanında, androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılayarak seminifer tübül içindeki testosteron konsantrasyonunun yüksek kalmasını sağlarlar. Bu durum, spermatogenez süreci için kritik öneme sahiptir. Sertoli hücreleri ayrıca folikül stimülan hormon (FSH) üretimini ve salınımını negatif geri bildirim yoluyla baskılayabilir [34], [36].



Şekil 3.3. İnsan seminifer epitelinin şematik çizimi[26]

3.2.1.2. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri, büyük, çokgen (poligonal) şekilli ve sitoplazmaları eozinofilik boyanma özelliği gösteren hücrelerdir. Sitoplazmalarında lipid damlacıkları da bulunur. Bu hücreler, embriyonik dönemde erken farklılaşarak testosteron üretimini başlatırlar. Testosteron, erkek üreme sisteminin gelişimi, cinsel olgunlaşma ve fertilitenin sağlanması açısından hayati öneme sahiptir. Leydig hücreleri testis içinde genellikle tek tek ya da küçük kümeler hâlinde yerleşmiştir. Seminifer tübüllerin çevresindeki bağ dokuda, özellikle yoğun kan ve lenf kılcallarının bulunduğu alanlarda gözlenirler. Hücre içeriği bakımından zengindirler; özellikle düz endoplazmik retikulum, mitokondri,

Golgi aygıtı, lipid damlacıkları ve yaşlanma pigmenti olarak bilinen lipofuksin granüllerini bol miktarda içerirler[26]. Fetal dönemde bu hücreler aktif olarak androjen sentezlerken, gebeliğin yaklaşık beşinci ayından itibaren inaktif bir döneme girerler. Bu inaktif evrede, morfolojik olarak fibroblastlara benzedikleri için ayırt edilmeleri zor olabilir. Ergenlik dönemine gelindiğinde, gonadotropinlerin (özellikle LH) etkisiyle tekrar aktifleşirler ve testosteron üretmeye başlarlar. Bu fonksiyonlarını yaşam boyu sürdürürler[37].

3.2.1.3. İntertisyel Doku

Testis dokusu, seminifer tübüller (tubuli seminiferi) ve interstisyel dokudan oluşur. İntertisyel doku ise gevşek bağ dokusu yapısında olup lenf kanalları, sinirler, Leydig hücreleri ve kan damarlarını içerir[38].

3.2.1.4. Kan Testis Bariyeri

Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerin epitelinin tabanına yakın bir yerde, sahip oldukları sıkı bağlantılar ile kan-testis bariyerini meydana getirir. Bu bariyer suyun, elektrolitlerin, iyonların, hormonların, parakrin faktörlerin ve diğer ekzojen biyomoleküllerin paraselüler ve transselüler difüzyonunu sınırlar, spermatogenez için benzersiz bir mikro ortam sağlar ve testislerin normal fizyolojik işlevine yardımcı olur. Aynı zamanda bu bariyer seminifer tübüllere immünglobulinlerin geçişine engel olarak spermatogenik hücrelerin immün sistemden izole edilmesinde hayati rol oynar[39].

3.2.2. Testis içi Kanallar

Tubuli rekti, rete testis ve duktuli eferentes, testis içindeki kanallar olarak kabul edilir. Bu kanalların temel işlevi, spermatozoonları ve seminifer tübüllerden gelen sıvıyı duktus epididimise taşımaktır[25], [40].

3.2.2.1. Tubuli Rektuli

Testis lobüllerinin içindeki seminifer tübüller, lobüllerin üst (apikal) kısımlarına yakın bölgelerde birleşerek tubuli recti olarak adlandırılan kısa ve düz tübülleri meydana getirir. Bu yapıların karakteristik özelliği, sadece Sertoli hücreleriyle döşeli olmalarıdır; bu bölgede germ hücrelerine rastlanmaz. Tubuli recti'nin distal kısmına doğru ilerledikçe tübüller daralır ve epitel dokusu tek katlı kübik epitele dönüşür. Epitel hücreleri, ince bir bazal lamina üzerinde yer almakta olup, bu yapı gevşek bağ dokusu ile çevrilidir. Tubuli recti, testisin iç kısmındaki bağ dokusu olan mediastinum testis içerisinde yer alan ve

birçok küçük kanalın birbirine bağlandığı bir ağ yapısına sahip olan rete testis ile devam eder. Rete testis, kübik epitel ile döşenmiş olup sık anastomozlar içeren bir kanal sistemidir ve bu yapılar, seminifer tübüllerden çıkan spermatozoonların daha ileri yapılara taşınmasında görev alır [25], [40].

3.2.2.2. Rete Testis

Rete testis, mediastinumun vasküler bağ dokusu içinde karmaşık bir şekilde birbiriyle bağlantılı kanallardan oluşan bir kanal sistemidir. Rete testisin kanallarını tek katlı kübik ya da alçak prizmatik epitel döşer. Bu hücreler, bir apikal silyuma ve birkaç kısa apikal mikrovillusa sahiptirler. Rete testisin lümeni yaklaşık 20 duktuli efferentese açılır[25][40]

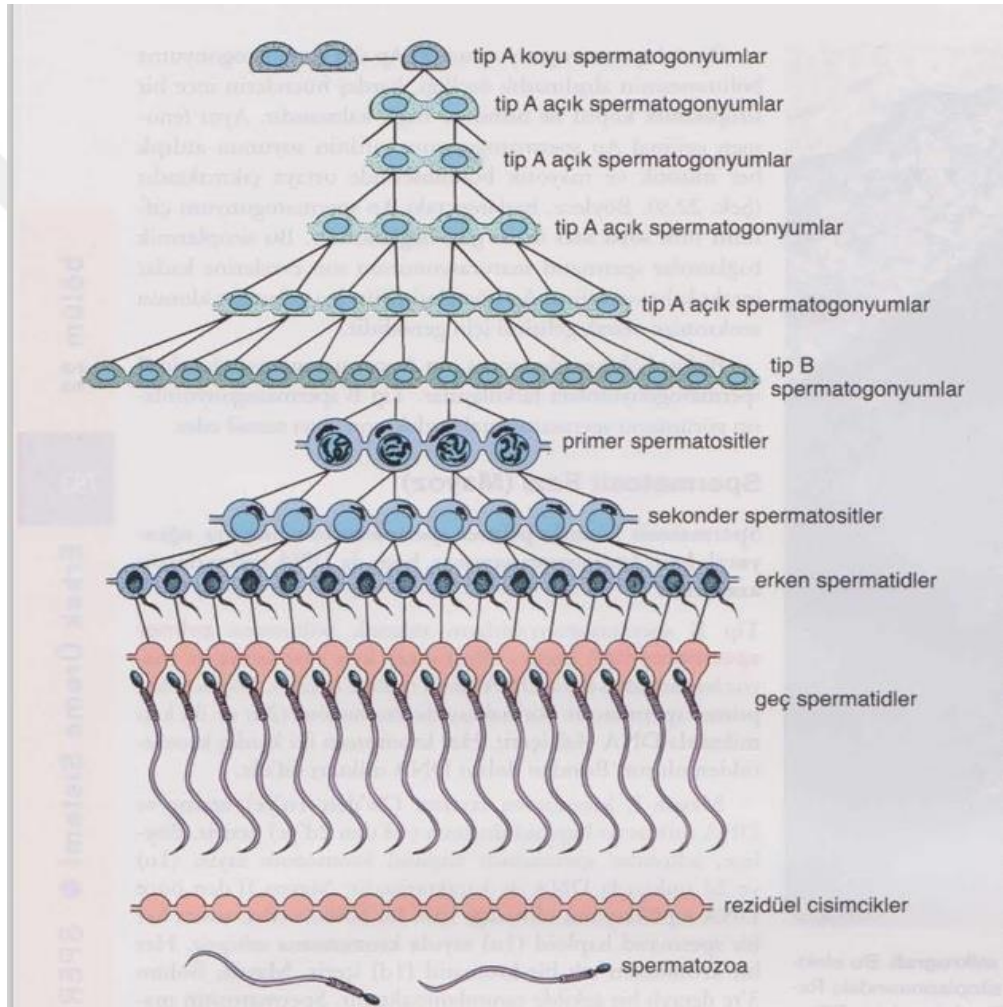
3.2.2.3. Duktuli Efferentes

İnsanda yaklaşık 20 adet duktuli efferentes, testisin üst (süperior) kısmında yer alan rete testis kanallarını, duktus epididimisin başlangıç (proksimal) bölümüyle birleştirir. Bu kanalların iç yüzeyi, yüksek ve alçak hücrelerden oluşan yalancı çok katlı prizmatik epitel ile kaplıdır. Epiteldeki yüksek prizmatik hücreler silyum taşır; bu silyalı hücreler, testisten çıkan hareketsiz spermlerin epididimis yönünde taşınmasına yardımcı olur. Daha kısa yapıli hücreler ise silyum içermez, ancak yüzeylerinde çok sayıda mikrovillus bulundurulur. Bu hücreler, testiste salgılanan sıvının büyük bir kısmının geri emilimini gerçekleştirir. Böylece seminifer tübüllerden gelen sıvı hacmi azaltılır. Epitel tabakasının altında yer alan bazal lamina, çevresinde sirküler olarak dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşan ince bir kas tabakası ile desteklenmiştir. Bu kas tabakası, kanalların peristaltik hareketlerle sperm taşınmasına katkı sağlamasına yardımcı olur. Duktuli efferentes ilerledikçe birleşerek epididimisin yapısına katılır[40]

3.2.3. Spermatagonez ve Spermiyogenez

Spermatogenez, spermatogonyumların olgun sperm hücrelerine dönüşümünü kapsayan süreci ifade eder. Spermatogonyumlar, yaklaşık 12 mikrometre çapında, küçük ve yuvarlak hücrelerdir ve seminifer tübüllerin germinal epitelyumunun bazal bölgesinde yer alırlar. Bu hücreler iki tipe ayrılır: A tipi spermatogonyumlar, koyu renkli ve oval şekilli çekirdeklere sahiptir. Mitoz bölünmelerle çoğalarak ileride gelişecek germ hücreleri için bir kök hücre rezervi oluştururlar. A tipi spermatogonyumlar, mitotik bölünmeler sonucu B tipi spermatogonyumları meydana getirir. B tipi spermatogonyumlar, daha açık renkli ve küresel çekirdeklidir. Bunlar mitoz geçirerek

diploid kromozom sayısına sahip olan primer spermatositleri oluşturur. Primer spermatositler, germinal epitelin daha merkezine doğru yerleşmiş, büyük hücrelerdir. Primer spermatositler birinci mayoz bölünmeye girerek haploid kromozom taşıyan sekonder spermatositleri oluşturur. Bu hücreler kısa sürede ikinci mayoz bölünmeye geçtiklerinden mikroskopik kesitlerde nadiren gözlenirler. Sekonder spermatositlerin ikinci mayoz bölünmesi sonucunda haploid kromozom sayısına sahip spermatidler oluşur. Bu bölünmede interfaz evresinde S fazı yer almaz, bu da hücrelerin kromozom sayısının yarıya inmesini sağlar[36][41].



Şekil 3.4. Spermatogenik hücre nesillerini gösteren şematik diyagram[26].

Meydana gelen spermatidler, merkezi küresel çekirdekli, belirgin golgi aygıtı, çok sayıda mitokondri içeren yuvarlak hücrelerdir. Spermiyogenez akrazom oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, flagellum(kamçı) gelişimini içeren bir süreçtir[36],[41]

Spermiyogenez 4 faza ayrılır:

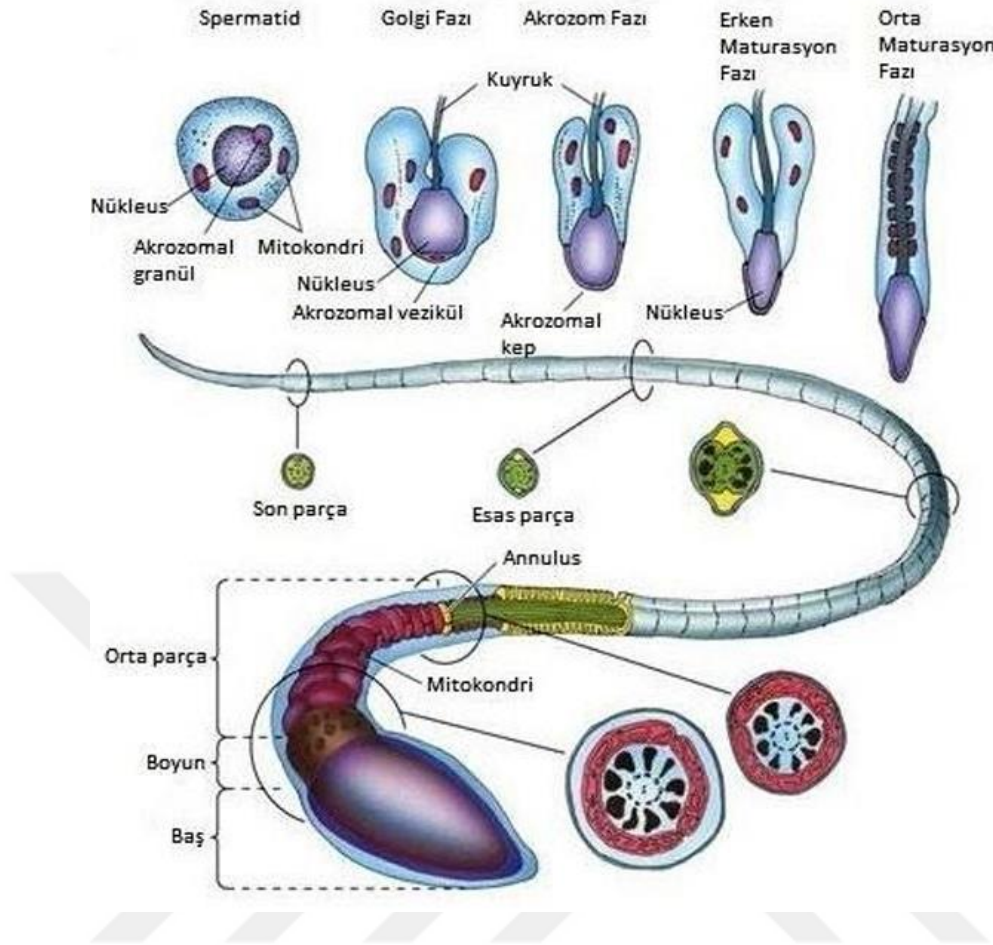
Golgi Fazi: Spermatid gelişiminin bu ilk evresinde, hücrenin sitoplazmasında nükleusun çevresinde belirginleşmiş Golgi aygıtı, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum (dER) tübülleri yer alır. Golgi aygıtı tarafından sentezlenen litik enzimler, önce proakrozomal veziküller şeklinde birikir; bu küçük veziküller birleşerek akrozomal vezikülü oluşturur. Aynı anda sentriyoller, akrozomal vezikülden uzaklaşarak hücrede kutupsal bir yerleşim kazanır. Bu sentriyollerden biri bazal cisim hâline gelir ve ilerleyen süreçte flagellanın aksonem yapısını oluşturmaya başlar[36],[41]

Kep Fazi: Bu aşamada gelişen akrozomal vezikül, yoğunlaşan spermatid nükleusunun ön kısmını örtmeye başlar ve akrozom adını alır. Akrozom, sperm hücresinin yumurtayı döllemesini sağlayacak olan önemli hidrolitik enzimleri içerir. Bu enzimler arasında hiyalüronidaz, nöraminidaz ve asit fosfataz gibi zona pellusidayı parçalayan moleküller bulunur. Bu süreç, döllemenin başlangıcında gerçekleşen akrozomal reaksiyon için zemin hazırlar[36],[41]

Akrozomal Faz: Bu evrede spermatidin nükleusu belirgin şekilde uzar, yoğunlaşır ve baş kısmında morfolojik değişiklikler meydana gelir. Hücrenin baş kısmı, Sertoli hücresinin içine gömülerek bazal laminaya doğru yönelir. Sentriyollerden biri olgunlaşarak flagellumu oluşturur. Mitokondriler ise flagellumun başlangıç kısmında, yani kuyruk bölgesinin proksimalinde spiral şekilde toplanır ve orta parça olarak adlandırılan bölgeyi oluşturur. Bu mitokondri yoğunluğu, spermatozoon hareketi için gerekli enerjinin sağlanmasında rol oynar[36],[41]

Maturasyon Fazi

Spermatid bu evrede morfolojik olarak tam bir spermatozoon şekline ulaşır. Artık işlevini yitirmiş olan sitoplazmik artıklar, sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Olgunlaşan spermatozoonlar, seminifer tübül lümenine salınır. Ardından, sertoli hücreleri ile rete testis tarafından salgılanan testis sıvısı aracılığıyla epididimise taşınırlar. Bu sıvı; steroid hormonlar, proteinler, iyonlar ve testosteron etkisiyle sentezlenen androjen bağlayıcı proteinler (ABP) gibi birçok önemli bileşeni içerir[36],[41]

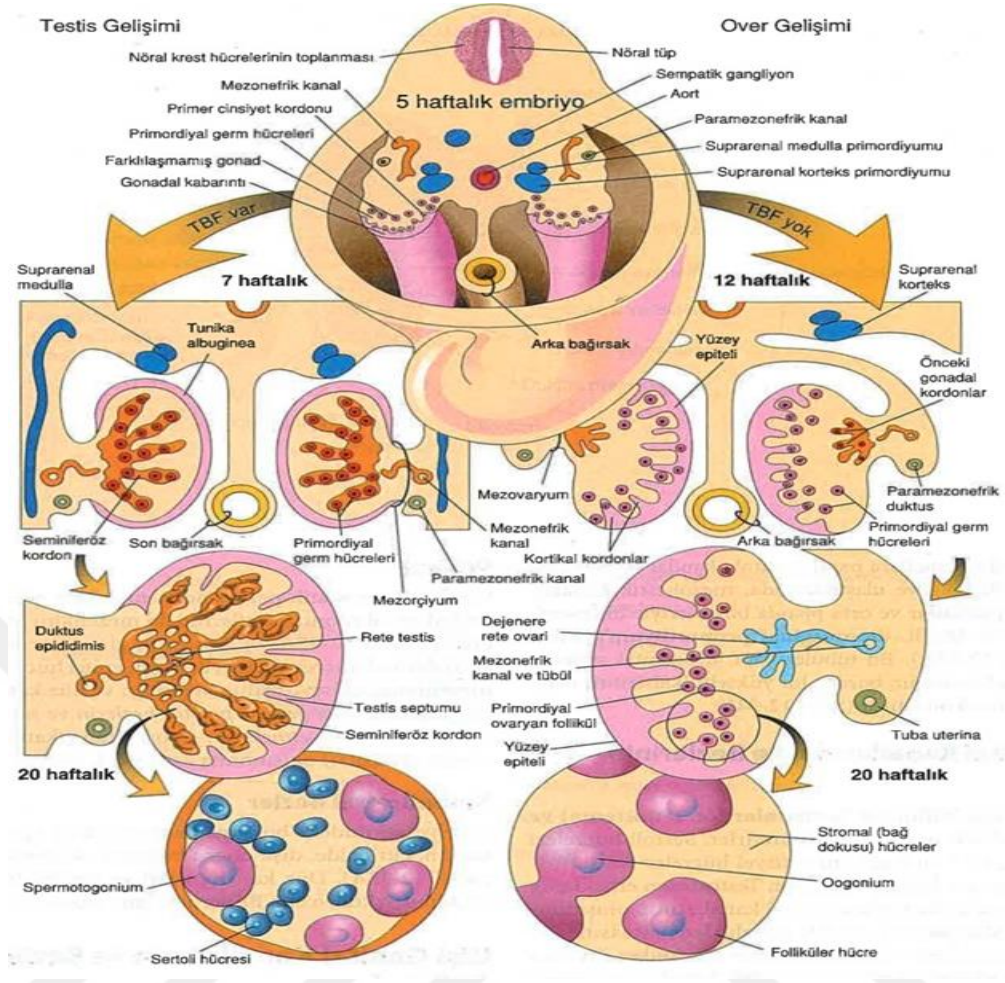


Şekil 3.5 Spermiyogenez[31]

3.3. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ

Gonadal gelişim, embriyonal dönemin 5. haftasında başlar. Bu süreçte mezonefrozun mediyasında yer alan yüzey epitel hücrelerinde proliferasyon meydana gelir. Bu proliferasyona ek olarak, epitelin altında bulunan mezenşim dokusunun yoğunlaşmasıyla birlikte oluşan kabarıklık, gonadal kabartı (gonadal çıkıntı) olarak adlandırılır. Epiblast kökenli olan primordial germ hücreleri, 3. haftada primitif çizgi boyunca aktif bir göç süreciyle ilerleyerek yolk kesesinin allantoise komşu duvarındaki endoderm hücreleri arasında yer alır. 4. haftada, dorsal mezenter boyunca hareket ederek gonadal kabartıya doğru ilerlerler ve 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşırlar. 6. haftadan itibaren ise bu hücreler gonadal kabartıyı işgal ederler. Y kromozomunun kısa kolunda yer alan SRY (Sex-determining Region Y) geni tarafından kodlanan testis belirleyici faktör (TDF), farklılaşmamış gonadın testis yönünde gelişiminde temel rol oynar. Primordial germ hücreleri gonadal çıkıntıya ulaşmadan önce, gonadın yüzey epitel hücreleri

proliferasyona uğrayarak medullaya doğru uzanır ve bu hücreler mezenşim içerisine gömülerek primitif seks kordonlarını oluşturur. SRY geninin etkisiyle, bu seks kordonları gonadın medullasına doğru uzanarak kalınlaşır ve hilusa doğru dallanarak ve anastomoz yaparak rete testis yapısını oluşturur. Gelişimin ilerleyen aşamalarında, testis kordonları yüzey epiteli ile olan bağlantılarını kaybeder ve bu yapılar ile epitel arasında yoğun fibröz bağ dokudan oluşan tunika albuginea gelişir. Testis kordonları, ilerleyen süreçte farklılaşarak seminifer tübülleri, tubuli recti (düz tübüller) ve rete testisi oluşturur. 4. ayda, testis kordonları karakteristik olarak at nalı şeklini alır ve uçları rete testisle bağlantı kurar. Bu dönemde testis kordonları, primordial germ hücreleri ile bunları destekleyen Sertoli hücrelerinden oluşur. Genital sırt mezenşiminden türeyen interstisyel Leydig hücreleri ise testis kordonları arasında yer alır. Leydig hücreleri, embriyonal gelişimin 8. haftasından itibaren testosteron üretimine başlar. Testosteron, genital kanallarının erkek üreme yollarına dönüşümünü ve dış genital organların erkek yönünde farklılaşmasını sağlar. Doğum öncesi dönemde testis kordonları solid (lümensiz) yapıdadır. Ancak puberte dönemine girilmesiyle birlikte lümen kazanarak seminifer tübülleri oluştururlar. Kanalize olan seminifer tübüller, rete testis ile birleşir ve burada duktuli efferentes ile bağlantı kurarlar. Duktuli efferentes ise, ileride duktus deferens adını alacak olan mezonefrik kanalı ile rete testis arasındaki geçişi sağlar.[42].

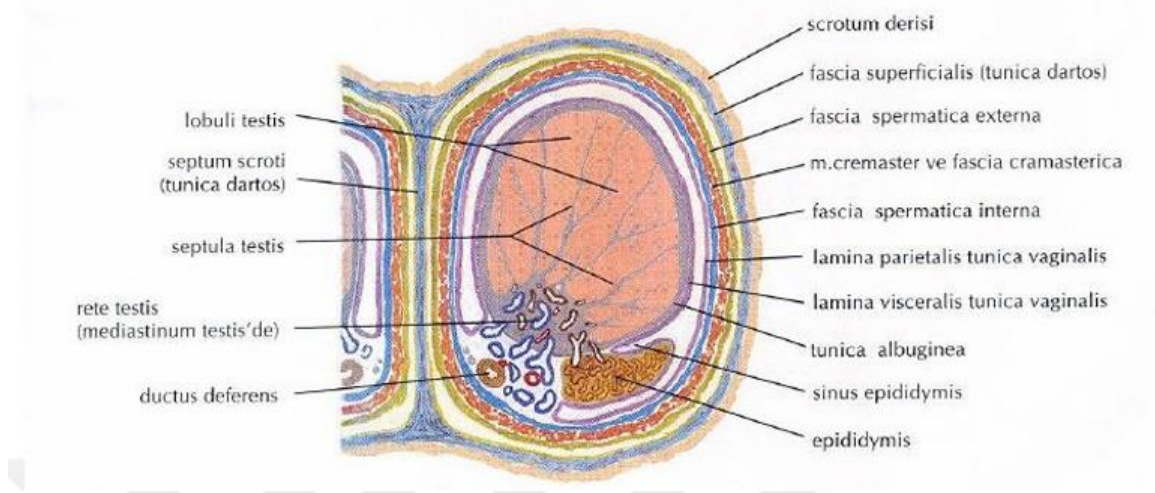


Şekil 3.6. Testis gelişimi şematik gösterim[43]

3.4. TESTİS ANATOMİSİ

Testisler, skrotum içerisinde bulunan bir çift organdır ve yaklaşık 3x5x2.5 cm boyutlarında olup, 15-25 cc hacme sahiptir[44]. Anatomik konumları itibariyle üst bölümleri öne ve dışa, alt bölümleri ise öne ve içe dönük şekilde yerleşmiştir. Testislerin üst kutbunda appendiks testis bulunurken, posterolateral bölgede epididim ile komşuluk gösterirler. Testisler, içten dışa doğru üç tabaka ile çevrilidir: tunica vaskülosa, tunica albuginea ve tunica vaginalis. En içte bulunan tunica vaskülosa, yoğun damarsal yapılarla sahiptir[45]. Bunun üzerinde yer alan tunica albuginea, fibrin ve kollajen bakımından zengin bir bağ dokusu tabakasıdır. En dışta ise periton kökenli olduğu düşünülen tunica vaginalis yer alır ve bu yapı testis ile epididimi çevreleyen visseral ve parietal yapraklardan oluşur. Daha dış katmanlarda skrotumu oluşturan yapılar sırasıyla; fascia spermatica interna, musculus cremasterica, fascia spermatica externa, tunica dartos ve skrotum cildi olarak sıralanır. Testisleri askıda tutan bir yapı olan funiculus spermaticus

içerisinde; lenf damarları, testiküler arter, pampiniform pleksus, kremasterik arter ve ven, deferensiyel arter ve ven, ductus deferens, genitofemoral sinirin genital dalı ve ilioinguinal sinir gibi önemli anatomik yapılar yer almaktadır[46].



3.5. TESTİS TORSİYONU

Testiküler torsiyon, testisin spermatik kord boyunca bükülmesi ile ortaya çıkmaktadır. Testis aniden skrotumda dönerek kan damarlarını testise doğru bükerek ve testise giden kan akışının kesilmesine neden olur. Kan akışının durması, iskemiye yol açmaktadır. Testis torsiyonu, potansiyel infertilite riski taşıdığı için ürolojik bir acil durumdur[48]. Testis torsiyonu vakalarında, testisin fonksiyonunu sürdürebilmesi açısından cerrahi müdahalenin ilk 4–8 saat içinde gerçekleştirilmesi en uygun süre aralığı olarak belirtilmektedir[49]. Testiküler torsiyonun gelişiminde rol oynayan çeşitli risk faktörleri tanımlanmış olsa da her olguda belirgin bir neden saptanamayabilir. Bu duruma zemin hazırlayan başlıca etkenler arasında kalıtsal yatkınlık (testisin normalden fazla hareketli olması), çevresel faktörler (özellikle soğuk hava), geçirilmiş skrotal cerrahiler, aşırı aktif kremasterik refleks, inmemiş testis, epididim ile testis arasındaki yapısal anomaliler ve “çan tokmağı deformitesi” (bell clapper deformitesi) gibi anatomik varyasyonlar yer almaktadır. Ayrıca, yoğun fiziksel efor ve travmatik olaylar da testiküler torsiyon gelişimini tetikleyebilmektedir[50]. Yılda her 18 yaş altı 100000 erkekten 3.8’inde görülür[51]. Ani başlayan skrotal ağrı, hastaların yaklaşık %80’inde genellikle bulantı ve kusmayla birlikte görülen temel semptomdur[52]. Testis torsiyonuna bağlı olarak oluşan

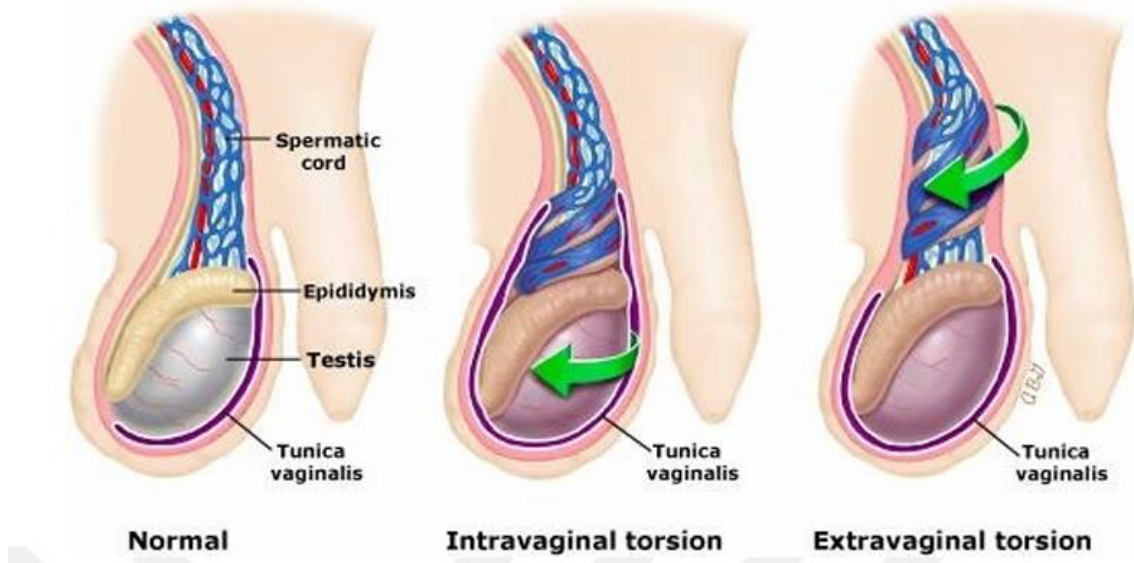
iskemi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyesinde artışa sebep olur. ROS üretiminin artması DNA hasarına, endotel yıkımına ve testis germ hücresi apoptozuna neden olur[53]. Testis torsiyonu ekstravajinal ve intravajinal olarak 2 ye ayrılır.

3.5.1. İntravajinal Testis Torsiyonu

İntravajinal testis torsiyonu, spermatik kordun, tunika vajinalisin distalinde yer alan yapışma noktasından itibaren kendi etrafında dönmesiyle meydana gelir. Bu rotasyon, genellikle kas kasılmalarıyla ilişkilidir; sağ testis saat yönünde, sol testis ise saat yönünün tersine doğru döner. Bu torsiyon tipinin gelişiminde, tunika vajinalisin spermatik korda normalden daha yukarı (proksimal) bir seviyeden yapışmasının da etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu anatomik varyasyon literatürde Clapper Bell deformitesi olarak adlandırılır ve intravajinal torsiyon için risk faktörü oluşturabilir. İntravajinal torsiyon, ekstravajinal torsiyona kıyasla daha yaygın olarak gözlemlenmektedir[54]. Çoğu olgu travmatik bir olayla ilişkili olmasa da, ani başlayan kas hareketleri ya da pozisyon değişiklikleri nedeniyle, genellikle uyku sırasında geliştiği bildirilmektedir[55]. Bununla birlikte, yüzmeye, cinsel ilişki, spor aktiviteleri (örneğin fitness) ya da bisiklet kullanımı gibi yoğun fiziksel efor gerektiren durumlar da torsiyonun tetikleyicileri arasında yer alabilir [56]. Her ne kadar çoğunlukla ergenlik öncesi dönemde ortaya çıksa da intravajinal torsiyon her yaş grubunda görülebilir[57].

3.5.2. Ekstravajinal Testis Torsiyonu

Ekstravajinal torsiyon, tunika vajinalisin spermatik korda bağlandığı bölgenin daha proksimalinden başlayarak, kordun birden fazla kez kendi etrafında dönmesiyle ortaya çıkar. Bu torsiyon tipi genellikle doğum öncesi (intrauterin) ya da doğumdan sonraki ilk 30 gün içinde gelişir. Ancak bu dönemde tanı çoğu zaman doğumdan sonra konulabildiği için, etkilenen testisin canlılığını koruyarak kurtarılması genellikle mümkün olmaz [58] Klinik olarak, yeni doğanlarda skrotumda belirgin şişlik en dikkat çekici bulgudur ve tanıda yol göstericidir. Tedavi yöntemi, cerrahi eksplorasyon yani skrotal bölgenin cerrahi olarak incelenmesidir. Eğer torsiyon intrauterin dönemde saptanabilirse, doğumdan hemen sonra yapılacak cerrahi müdahale önerilir. Bu erken girişim, karşı testisin (kontralateral testis) yerinde sabitlenmesiyle (orşiopeksi) torsiyon riskinin önlenmesini amaçlar. Aynı zamanda, karşı testiste oluşabilecek ikincil hasarın azaltılması da hedeflenir [54].



Şekil 3.8. Torsiyon Çeşitleri[59]

3.6. İSKEMİ REPERFÜZYON

Vücut dokularına ulaşan kan akışının belirli nedenlerle ciddi ölçüde azalması ya da tamamen durması durumunda, ilgili bölgedeki hücreler yeterli düzeyde oksijen alamaz. Bu duruma iskemi adı verilir. İskemi süreci uzadıkça, oksijen eksikliği nedeniyle hücresel düzeyde fonksiyon bozuklukları ve hatta hücre ölümü meydana gelebilir[60]. Kan akımının kesintiye uğramasından sonra tekrar sağlanması ise reperfüzyon olarak tanımlanır. Ancak reperfüzyon süreci, paradoksal olarak hücre hasarını azaltmak yerine artırabilir. Bu fenomene literatürde “paradoksal oksijen etkisi” denilmektedir[61]. Reperfüzyon esnasında oksijenin yeniden dokulara ulaşması, reaktif oksijen türleri (ROS) ve diğer zararlı metabolitlerin birikmesine neden olur. Bu moleküller, hücre içi organeller üzerinde toksik etkiler yaratarak çeşitli stres türlerini tetikler. Bu bağlamda; oksidatif stres, nitrostatif stres, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve mitokondriyal stres gibi farklı hücresel yanıtlar ortaya çıkar. Hücreler, bu zararlı etkilerle başa çıkmak amacıyla antioksidan savunma mekanizmalarını aktive eder. Ancak bu savunma sistemleri yetersiz kaldığında, hücresel bütünlük bozulur ve apoptoz veya nekroz gibi hücre ölüm yolları devreye girer[62]

3.6.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Oksidatif Stres

Oksidatif stres, hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi ile bu türleri detoksifiye eden antioksidan sistemlerin yetersizliği sonucu ortaya çıkan ve hücresel yapıya zarar verebilen bir süreçtir. Bu durum, hücredeki biyomoleküllerin oksidatif hasara uğramasına ve fizyolojik işlevlerin bozulmasına neden olabilir[63] Normal fizyolojik koşullarda ROS, hücresel metabolizmanın yan ürünleri olarak mitokondriyal solunum zincirinde üretilir ve hücresel sinyal iletim yollarında görev alarak homeostazın sağlanmasında rol oynar. ROS'un başlıca kaynaklarından biri mitokondriyal elektron taşıma zinciridir. Aerobik canlılarda, oksijenin kısmi indirgenmesi sonucunda süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\bullet OH$) ve çeşitli organik peroksitler oluşur[64] Ayrıca düşük oksijen koşullarında (hipoksi), mitokondriler nitrik oksit (NO) aracılığıyla reaktif nitrojen türleri (RNS) de üretir. Bu moleküller, lipid peroksidasyonunu artırarak malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi toksik aldehytlerin oluşumuna neden olur. Proteinler ve lipitler, oksidatif stresin temel hedeflerindendir. Bu moleküllerde meydana gelen yapısal ve fonksiyonel değişiklikler, hücresel sinyal bozulmalarına ve mutasyon riskinde artışa yol açabilir. Çevresel stres etkenlerinin (UV ışınları, toksinler, enfeksiyonlar vb.) sürekli varlığı, ROS üretiminin kronik hale gelmesine neden olarak hücre bütünlüğünü tehdit eder[65].

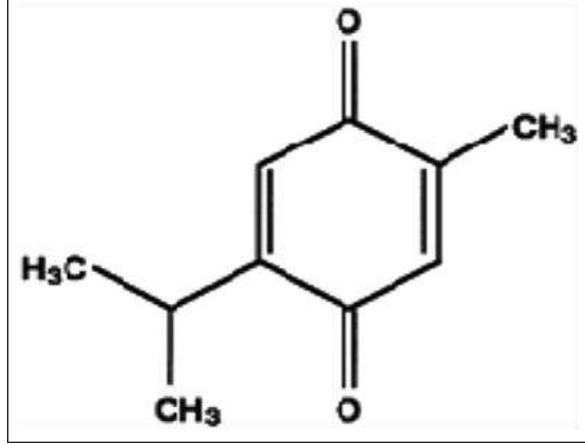
3.7. TİMOKİNON

Nigella sativa L., halk arasında yaygın olarak çörek otu adıyla bilinen ve Ranunculaceae (Düğün çiçeğigiller) familyasına ait, çiçekli ve tek yıllık otsu bir bitkidir. Genellikle 20–30 cm boylarında gelişen bu tür, doğal olarak Güneybatı Asya, Avrupa’nın bazı bölgeleri ve Kuzey Afrika’da yetişmektedir. Türkiye’de ise özellikle Afyon, Isparta, Burdur ve Konya çevresindeki bölgelerde doğal yayılım göstermekte ve sıkça yetiştirilmektedir [66].



Şekil 3.9. *Nigella sativa*[66]

Timokinon, ilk kez 1963 yılında El-Dakhakhny tarafından *Nigella sativa* bitkisinden izole edilmiştir. Bu bitkinin en önemli biyoaktif bileşenleri arasında timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve timol yer alır. Timokinon, kimyasal olarak 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon yapısına sahiptir; moleküler formülü $C_{10}H_{12}O_2$, moleküler ağırlığı ise 164.2 g/mol’dür. Sarı renkte, uçucu özellik taşıyan ve kristalize yapıda bir monoterpen bileşiğidir [67]. Timokinon, halk hekimliğinde yüzyıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Özellikle inflamasyon, hipertansiyon, astım, bronşit, diyabet, baş ağrısı, egzama ve gastrointestinal sistem rahatsızlıkları gibi durumlarda destekleyici tedavi olarak değerlendirilmiştir[68].



Şekil 3.10. Timokinonun kimyasal yapısı[66]

Oksidatif stres hücre içinde yer alan mekanizmaların işleyişinin düzenlemesine etki ederek yapı ve fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır[69]. Vücuttaki antioksidanlar ve serbest oksijen radikalleri arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkan oksidatif stres, spermlere zarar verir ve infertiliteye sebep olabilir[70]. Timokinon, güçlü antioksidan özelliklere sahip olup, reaktif oksijen türlerini (ROS) etkili bir şekilde temizleyebilmektedir. Lipit peroksidasyonunu engelleyerek oksidatif stresi azalttığı ve farklı serbest radikalleri nötralize etme kapasitesine sahip olduğu belirtilmektedir. Özellikle süperoksit anyonuna (O_2^-) karşı daha güçlü bir etki gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve mitokondri kaynaklı apoptozun önlenmesine katkı sağlayabileceği gösterilmiştir[71].

3.8. PRDX6

Peroksiredoksinler, bakterilerde, bitkilerde, mayalarda hayvanlarda kısaca tüm canlı organizmalarda bulunmaktadır. Peroksiredoksinler, hidrojen peroksit (H_2O_2), lipit peroksitler ve peroksinitrit temizleyici olarak görev yapmaktadır[72]. Peroksiredoksin (Prdx) ailesi altı farklı izoformdan oluşur. Bu izoformlar; Prdx1, Prdx2, Prdx3, Prdx4, Prdx5 ve Prdx6 olarak adlandırılır. Sınıflandırmaları ise, sahip oldukları katalitik aktivitede görev alan sistein (Cys) kalıntılarının sayısına göre yapılır[73]. Prdx1'den Prdx6'ya kadar olan altı Prdx üyesi, hücre içerisinde geniş bir dağılım göstererek çeşitli biyolojik süreçlerde görev alır. Bu üyeler arasında Peroksiredoksin 6 (Prdx6), 1-Cys Prx alt grubuna dâhil olan ve memelilerde tanımlanmış tek örnektir. Yapısal ve işlevsel açıdan

diğer Prdx alt türleriyle belirli benzerlikler taşımasına rağmen, özgün özellikleriyle ayrılmaktadır[74]. Memeli Peroksiredoksinleri (Prdx'ler), reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarını önleyen antioksidan enzimlerdir. Aynı zamanda çeşitli hücre ve doku tiplerinde fizyolojik düzenleyiciler ve sensörler olarak görev yaparlar [75]. PRDX6, yaklaşık 25 kDa ağırlığında, hem glutatyon peroksidaz (GPx) hem de kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A2 (PLA2) aktivitelerine sahip iki işlevli bir proteindir. Bu enzim, birçok dokuda ifade edilmekle birlikte, özellikle akciğerlerde yüksek düzeyde eksprese edilir. Prdx6'nın antioksidan özelliği, temel olarak peroksidaz aktivitesinden kaynaklanır ve bu aktivite, katalitik döngünün tamamlanmasını sağlar. Bunun yanı sıra, PLA2 (Fosfolipaz A2) aktivitesi sayesinde fosfolipitlerin asil grubunun hidrolizini gerçekleştirir. Bu çift fonksiyonu sayesinde PRDX6 hem oksidatif stresle mücadelede hem de hücrel fosfolipit metabolizmasında önemli bir rol oynayan benzersiz bir proteindir[76].

Prdx6, peroksidaz aktivitesi sayesinde kısa zincirli hidroperoksitleri indirger ve bu yolla oksidatif stresi sınırlandırarak antioksidan etki gösterir. Bununla birlikte, Prdx6'ya özgü olan fosfolipaz A2 aktivitesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini teşvik ederek oksidan oluşumuna katkı sağlar. Bu nedenle, peroksidaz aktivitesi oksidatif stresin önlenmesinde koruyucu bir rol üstlenirken, fosfolipaz A2 aktivitesi ise ROS üretiminde belirleyici bir işlev görür[77]. Prdx6'nın bu çift yönlü ve birbirine zıt biyokimyasal özellikleri, onun oksidatif stresin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Her iki enzimatik aktivite aracılığıyla PRDX6, vasküler homeostazın korunması ve hücrel düzeyde optimal ROS dengesinin sağlanması için ROS seviyelerini hassas biçimde düzenleyen bir moleküler düzenleyici olarak görev yapmaktadır[78]. Doğal yaşlanma süreci ya da bazı patolojik durumlar sonucunda Prdx6 ekspresyonunun azalması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına ve buna bağlı hücrel bozukluklara yol açabilmektedir. Literatürde yapılan çeşitli araştırmalarda, Prdx6'nın farklı uyaranlar tarafından tetiklenen oksidatif stresin etkilerini azaltmada önemli bir rol oynadığı ortaya konmuştur[79].

Prdx6'nın sperm fizyolojisindeki rolü hem deneysel hem de klinik çalışmalarla desteklenmektedir. Fare modellerinde yapılan araştırmalarda, Prdx6 eksikliği ya da fosfolipaz A2 (PLA2) aktivitesinin baskılanmasının in vitro fertilizasyon başarısını olumsuz etkilediği gösterilmiştir[80]. İnsan infertilite vakalarında ise Prdx6 düzeylerinin düşük olduğu saptanmış ve bu durum, Prdx6'nın insan spermatozoasında oksidatif strese

karşı ilk savunma hattı olabileceğini düşündürmüştür[81]. Her ne kadar Prdx6 yoksunu farelerde spermatogenez devam etse de bu hayvanlar kısırılık göstermekte ve fonksiyonel bozukluklara sahip, düşük kalitede spermatozoa üretmektedir. PRDX ailesinin sperm hücresinin bütünlüğü ve fonksiyonları açısından önemli olduğu bilinmekle birlikte, bu proteinlerin germ hücre gelişiminin erken evrelerinden (primordial germ hücrelerinden) itibaren hangi rolleri üstlendiği konusunda bilgiler sınırlıdır[82]. Prdx6, bu ailenin altı üyesinden biri olarak, spermatozoayı oksidatif hasardan koruma görevini üstlenmektedir[83]. O'Flaherty ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar, Prdx6'nın sperm canlılığı üzerine etkili olabileceğini ve bu etkinin artan oksidatif stres ve lipid peroksidasyon ile bağlantılı olduğunu göstermiştir[84]. Ayrıca, Prdx6'nın sahip olduğu peroksidaz ve kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A2 (iPLA2) aktivitelerinin, sperm motilitesi, döllenme kapasitesi ve embriyo gelişiminin sürdürülebilirliği açısından kritik öneme sahip olduğu vurgulanmıştır[85].

3.9. GLUKAGON BENZERİ PEPTİD-1 (GLP-1)

Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1), besin alımını takiben distal ileum ve kolon bölgelerinde bulunan enteroendokrin L hücreleri tarafından salgılanan bir inkretin hormonudur. GLP-1'in temel fizyolojik etkileri arasında glikoza karşı normalden daha fazla insülin duyarlılığı, bunu takiben insülin salınımının artırılması ve kandaki yükselmiş glikoz düzeylerinin normal sınırlarına dönmesi yer almaktadır[86]. Bu glikoza bağımlı yanıt, özellikle pankreas β hücrelerinde yoğun olarak bulunan glukagon benzeri peptid-1 reseptörünün (GLP-1R) aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir[87]. Son dönem çalışmalar, GLP-1R'nin yalnızca pankreasla sınırlı kalmadığını, aynı zamanda kalp, akciğer, böbrek, iskelet kası, yağ dokusu, hipotalamik çekirdekler ve hipofiz bezi gibi birçok farklı dokuda da yer aldığını göstermiştir. GLP-1, bu dokularda organlarda kendine özgü, spesifik işlevler gerçekleştirir[88]. Ayrıca, pankreastaki adacık hücreleri (özellikle insülin salgılayan β hücreleri) dışındaki dokularda da etkili olduğu bilinmektedir. GLP-1'in bu dokularda hücresel düzeyde koruyucu bir etki gösterdiği, özellikle anti-apoptotik özellikleri ile hücre kütesinin devamlılığını desteklediği bilinmektedir. Ayrıca, inflamatuvar süreçlerde yer alan sitokinlerin etkilerini baskılayarak güçlü bir anti-inflamatuvar rol üstlendiği de gösterilmiştir[89]. Yapılan bir çalışmada GLP-1'in endotel hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini azaltarak oksidatif stres düzeylerini düşürdüğü rapor edilmiştir[90]. GLP-1 reseptörünün (GLP-1R) ekspresyonu

hem in vitro hem de in vivo koşullarda yapılan çalışmalarda kemirgen ve insan testis dokularında saptanmıştır. Bu bulgular, GLP-1R'nin erkek üreme sistemi üzerinde potansiyel bir düzenleyici rol oynayabileceğine işaret etmektedir[91]. GLP-1 reseptörünün bulunmadığı (nakavt) fare modellerinde, seminal vezikül ve testis ağırlıklarında azalma ile birlikte pubertal gelişimin gecikmeli olarak başladığı gözlemlenmiştir[92].

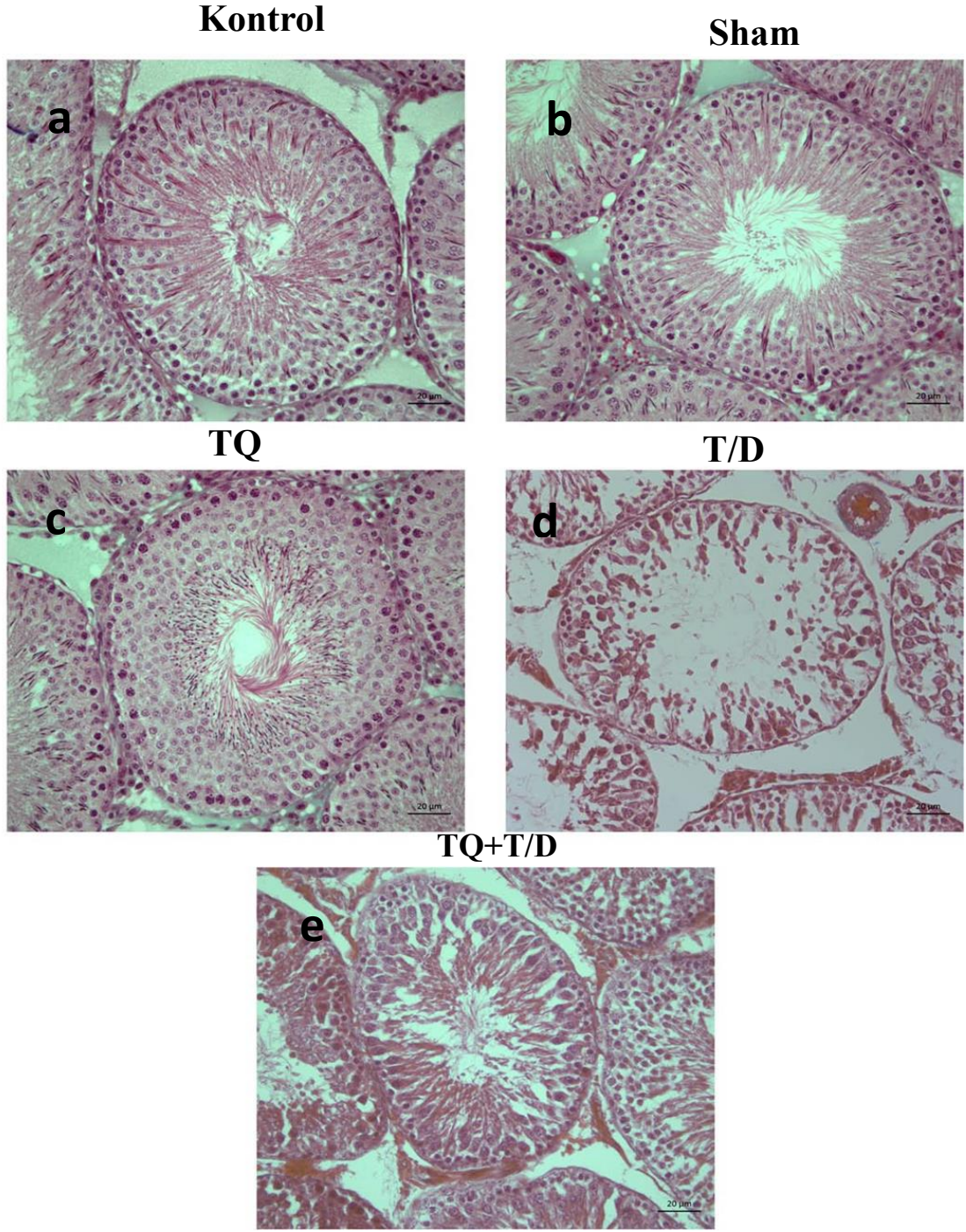


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Histopatolojik bulgular

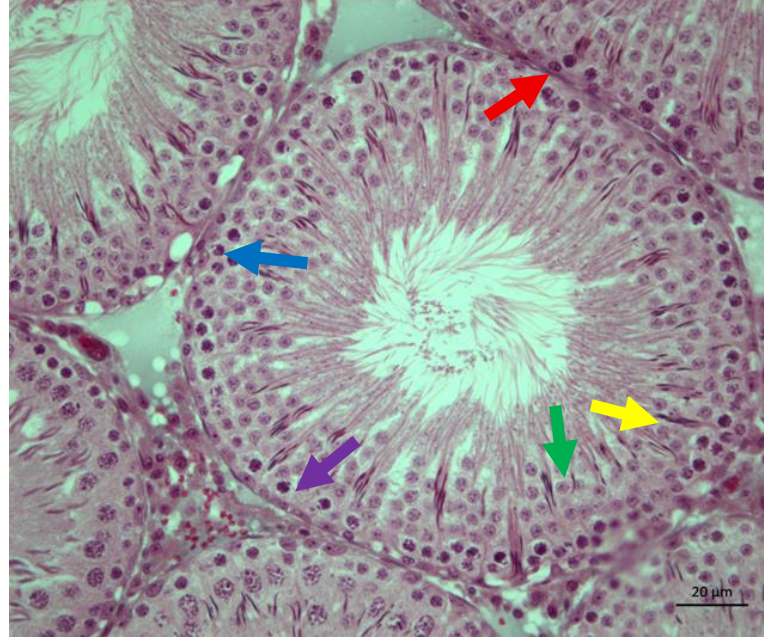
Testis dokusundaki morfolojik değişiklikleri değerlendirmek amacıyla Gomori trikrom boyama yöntemi uygulanmıştır. Yapılan histolojik incelemelerde kontrol, sham ve yalnızca timokinon uygulanan gruplarda hücresel yapının korunduğu, histolojik mimarinin bozulmadığı ve sitoplazmada herhangi bir belirgin değişikliğin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.a, Şekil 4.1.b, Şekil 4.1.c). Buna karşın, torsiyon grubunda germinal epitel tabakasında belirgin dökölme, hücre sayısında azalma ve seminifer tübüllerde sperm sayısında dikkate değer bir düşüş tespit edilmiştir (Şekil 4.1.d). Torsiyon sonrasında timokinon uygulanan grupta ise hücre sayısındaki azalma kısmen devam etse de germinal epitel tabakasında yapısal düzelmelerin başladığı ve sperm sayısında artış gözlemlendiği belirlenmiştir (Şekil 4.1.e). Bu bulgular, timokinonun testiküler doku üzerindeki koruyucu etkilerini destekler niteliktedir.



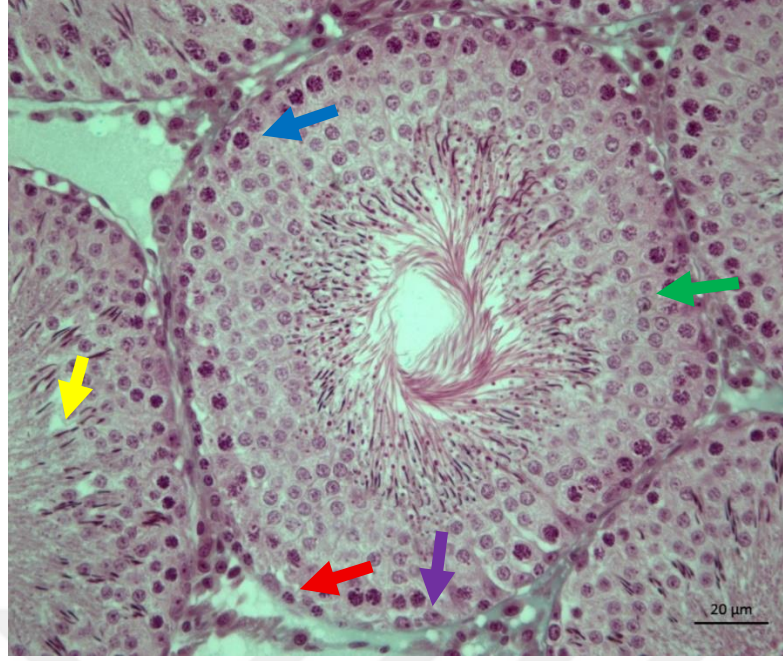
Şekil 4.1. Farklı grupların testis dokusunun gomori trikrom boyaması temsili fotoğrafları. TQ; Timokinon, T/D; Torsiyon/Detorsiyon. Görüntü büyütmesi 40x'dir ve skala bar 20 µm'dir.



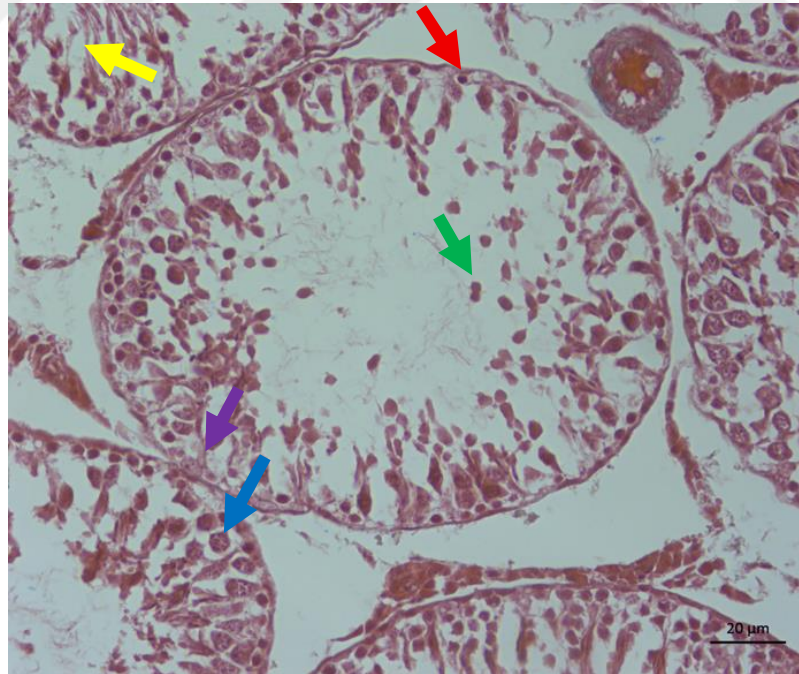
Şekil 4.2. Kontrol grubu gomori trikrom boyası. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μm 'dir.



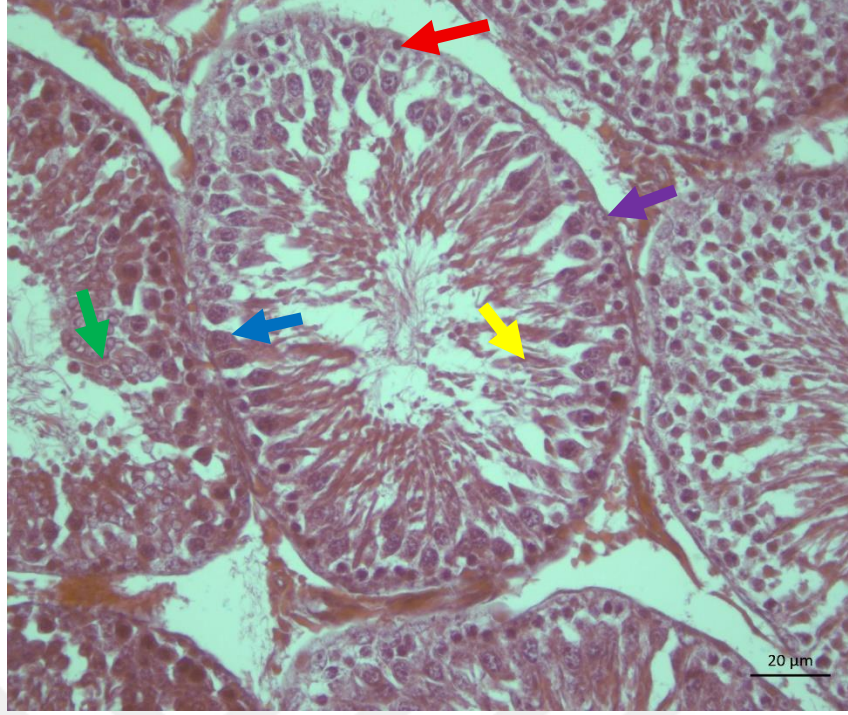
Şekil 4.3. Sham grubu gomori trikrom boyası. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μm 'dir.



Şekil 4.4. Timokinon grubu gomori trikrom boyası. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.



Şekil 4.5. Torsiyon/Detorsiyon grubu gomori trikrom boyası. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.

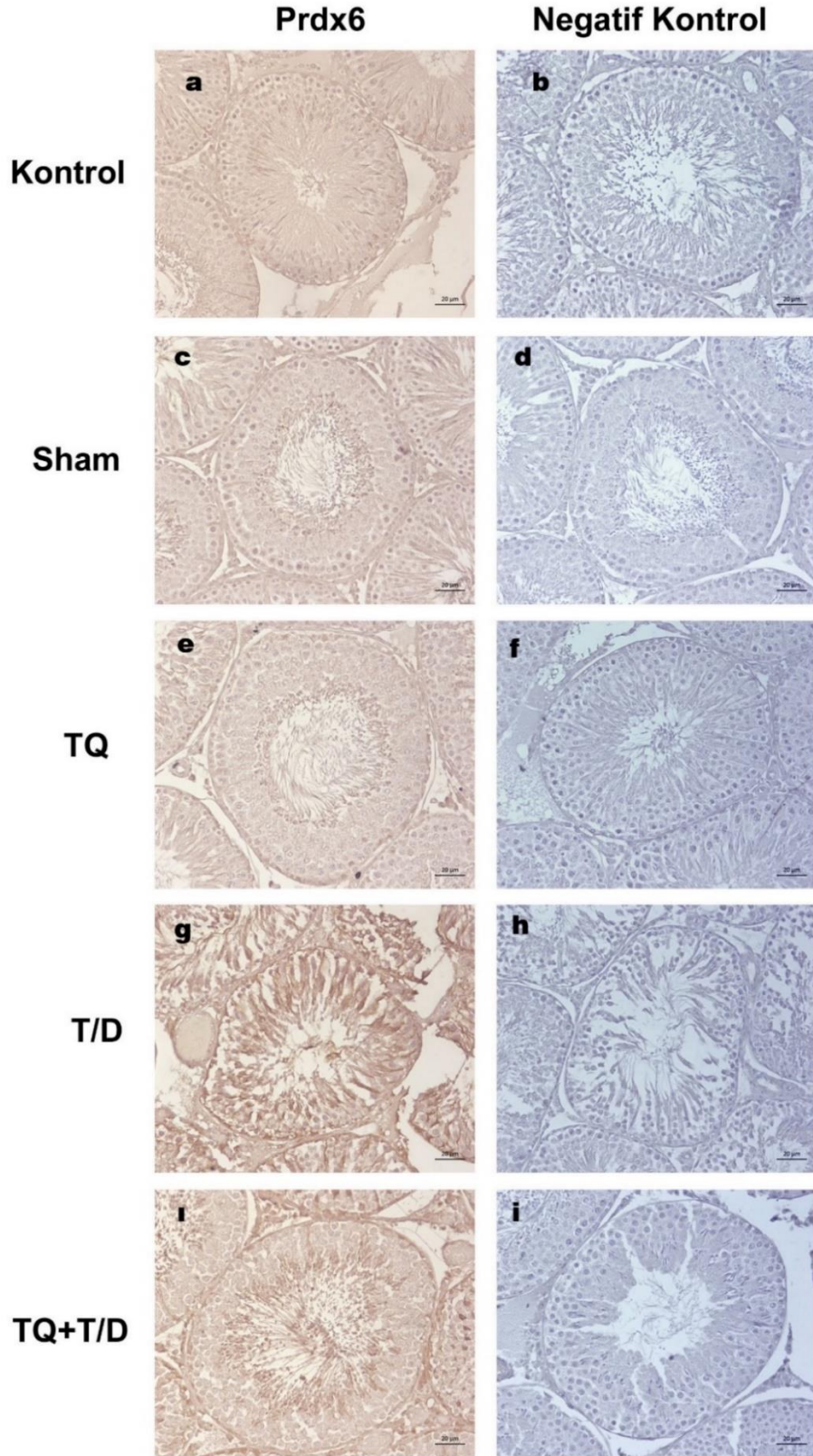


Şekil 4.6. Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon grubu gomori trikrom boyası. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.

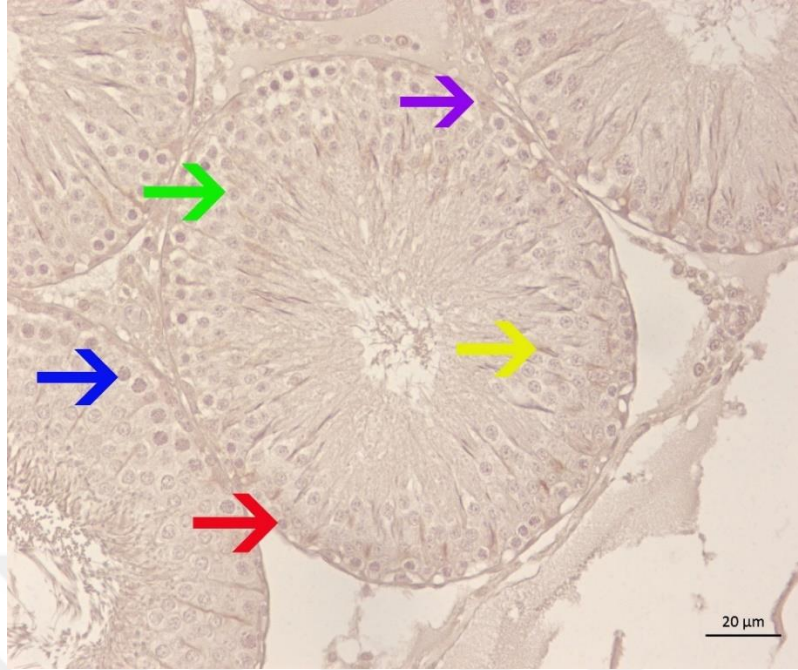
4.1.2. İmmünohistokimyasal bulgular

İmmünohistokimyasal olarak boyanan dokuların fotoğrafları Olympus Cx41 mikroskopta AxioCam Zeiss dijital kamera ile çekildi. ImageJ programı kullanarak immünohistokimyasal boyanma yüzdeleri hesaplandı. Daha sonra elde edilen veriler GraphPad Prism 8 InStat analiz programında değerlendirildi. Elde edilen tüm veriler one-way ANOVA'yı takiben Holm Sidak metodu kullanılarak gruplar arası farklılıklar incelendi. İstatiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edilerek Prdx6 ve Glp-1 antikorları için analiz yapıldı. Testiste Prdx6 ekspresyonu hem sitoplazmik hem de nükleardı. Kontrol ve sham grupları arasında prdx6 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0.7195$) (Şekil 4.7.a-c, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.19) Kontrol ve timokinon grupları arasında prdx6 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0.7195$) (Şekil 4.7.a-e, Şekil 4.8 ve Şekil 4.10.). Sham ve timokinon grupları arasında prdx6 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir

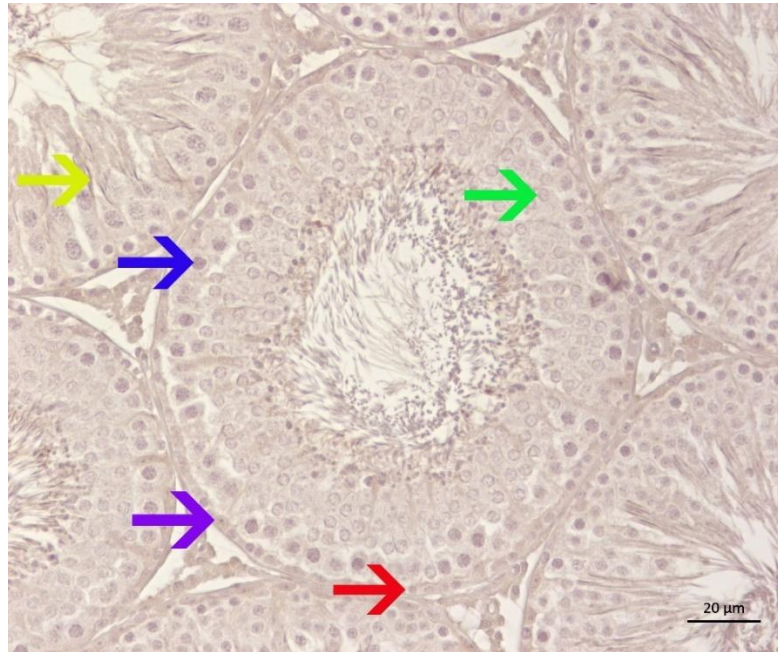
fark gözlemlenmedi($p=0.8739$) (Şekil 4.7.c-e, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10.). Kontrol, sham ve timokinon grupları Prdx6 ekspresyonunun hücresel dağılımı Sertoli hücreleri, geç spermatidler ve Leydig hücrelerinde zayıf pozitif, spermatogonyum, primer spermatositler ve erken spermatidlerde negatifti (Şekil 4.7.a-c-e, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Torsiyon/Detorsiyon grubunda Prdx6 ekspresyonu kontrol, sham ve timokinon gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı($p<0.01$) (Şekil 4.7.g, Şekil 4.11 ve Şekil 4.19) Torsiyon/Detorsiyon grubunda Prdx6 ekspresyonunun hücresel dağılımı Sertoli hücreleri, geç spermatidler ve Leydig hücrelerinde yoğun pozitif, spermatogonyum, primer spermatositler ve erken spermatidlerde negatifti (Şekil 4.7.g ve Şekil 4.11). Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon grubunda Prdx6 ekspresyonu Torsiyon/Detorsiyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı($p<0.01$) (Şekil 4.7.1 ve Şekil 12). Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon grubunda Prdx6 ekspresyonunun hücresel dağılımı Sertoli hücreleri, geç spermatidler ve Leydig hücrelerinde pozitif, spermatogonyum, primer spermatositler ve erken spermatidlerde negatifti (Şekil 4.7.1 ve Şekil 12).



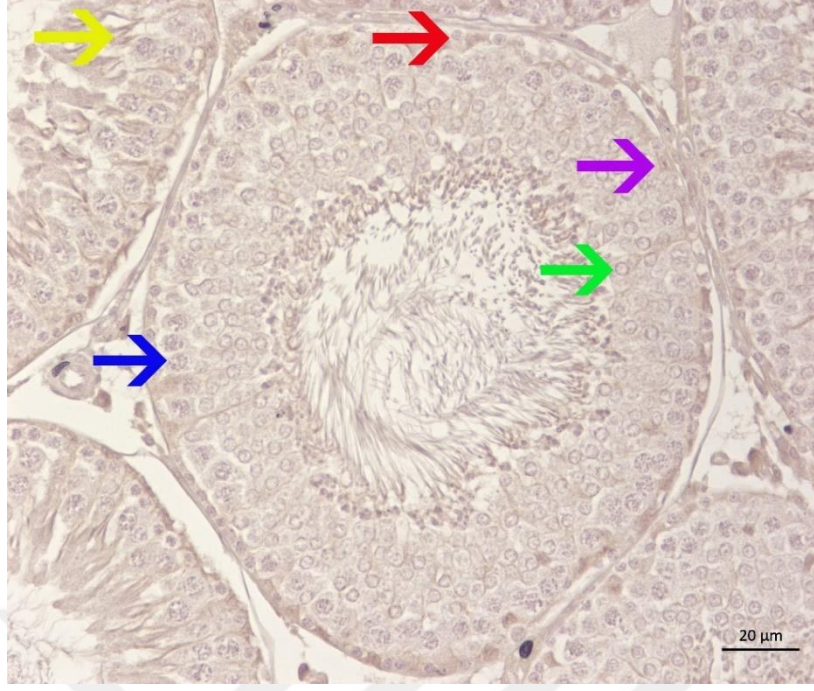
Şekil 4.7. Farklı gruplardaki Prdx6 immunohistokimyasal boyamasının temsili fotoğrafları. TQ; Timokinon, T/D; Torsiyon/Detorsiyon. Görüntü büyütmesi 40x'dir ve skala bar 20 µm'dir.



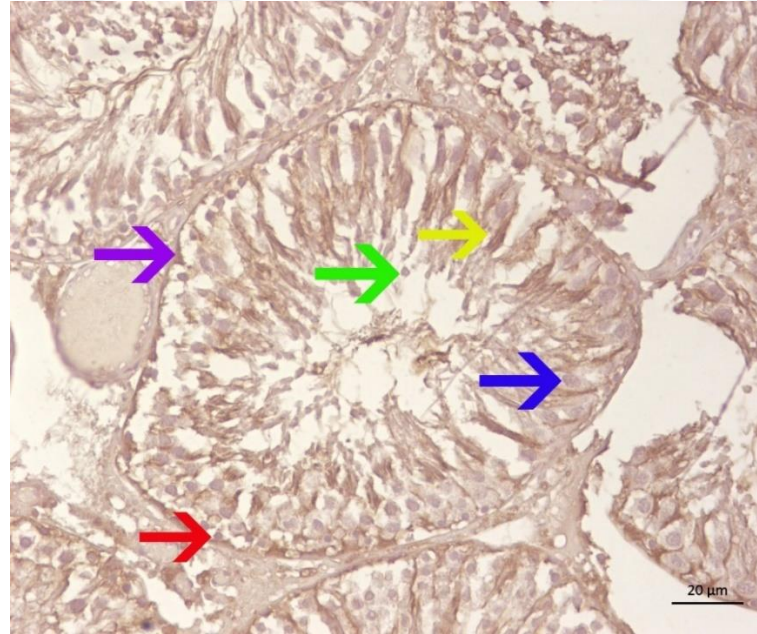
Şekil 4.8. Kontrol grubu Prdx6 ekspresyonu. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μm 'dir.



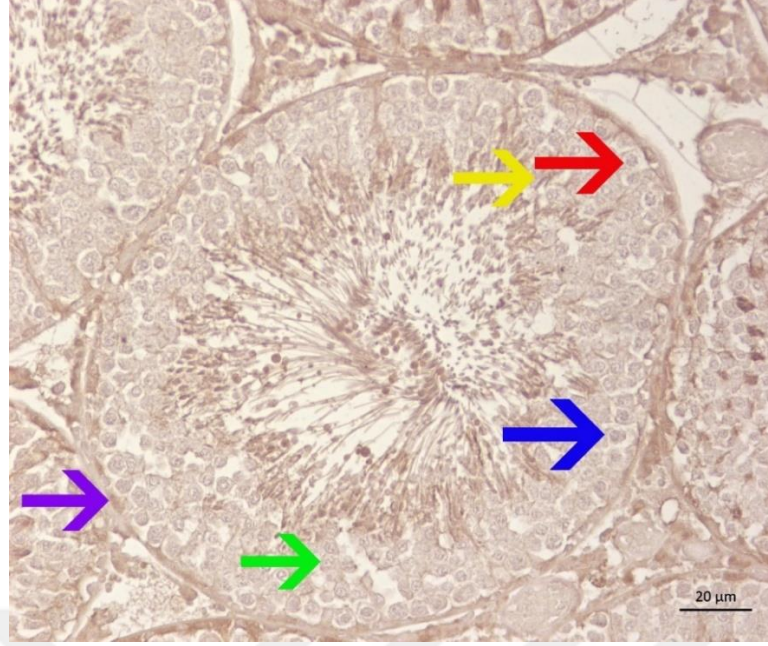
Şekil 4.9. Sham grubu Prdx6 ekspresyonu. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μm 'dir.



Şekil 4.10. Timokinon grubu Prdx6 ekspresyonu. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μm 'dir.



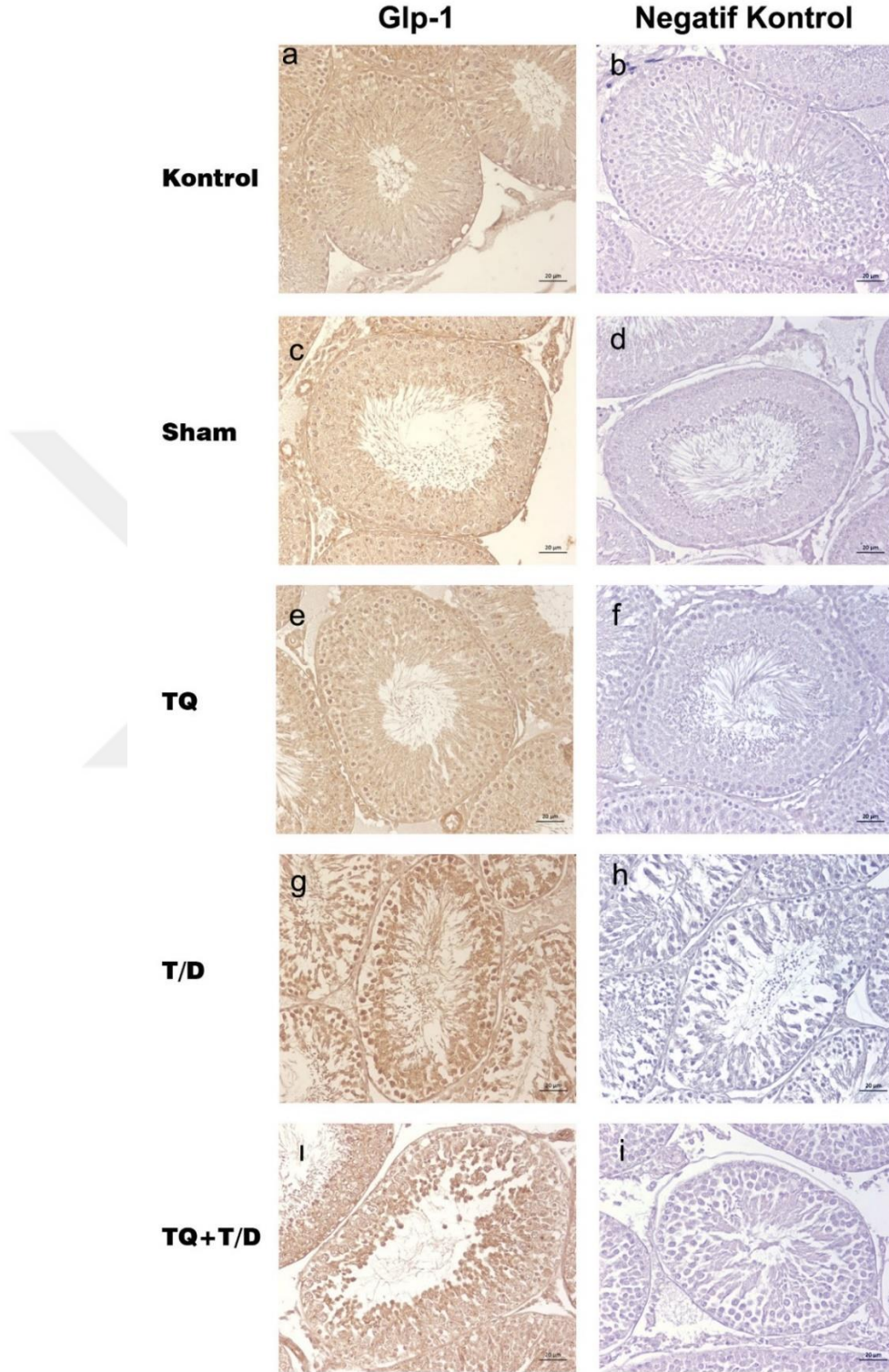
Şekil 4.11. Torsiyon/Detorsiyon grubu Prdx6 ekspresyonu. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μm 'dir.



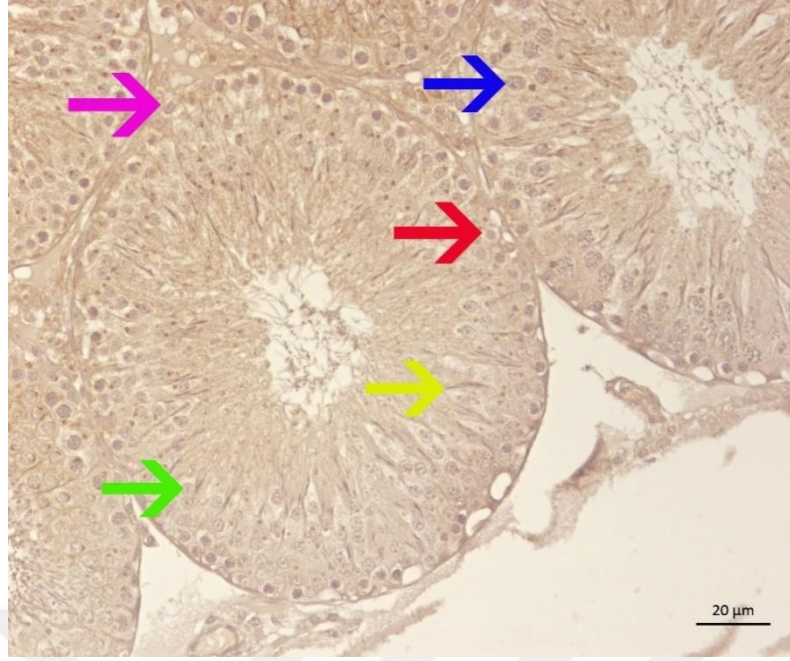
Şekil 4.12. Timokinin+Torsiyon grubu Prdx6 ekspresyonu. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.

Testiste Glp-1 ekspresyonu sitoplazmikti. Kontrol ve sham grupları arasında Glp-1 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0.8392$). Kontrol ve timokinin grupları arasında Glp-1 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0.8080$). Sham ve timokinin grupları arasında Glp-1 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0.8392$). Kontrol, sham ve timokinin grupları Glp-1 ekspresyonunun hücresel dağılımı sertoli hücreleri, geç spermatidler, spermatogonyum, primer spermatositler ve erken spermatidlerde negatifti. Leydig hücrelerinde ve erken spermatidlerin akrazomal keseleri yoğun pozitif (Şekil 4.13 a-c-e, Şekil 4.14, Şekil 5.15 ve Şekil 4.16). Torsiyon/Detorsiyon grubunda Glp-1 ekspresyonu kontrol, sham ve timokinin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı ($p<0.01$). Torsiyon/Detorsiyon grubunun Glp-1 ekspresyonunun hücresel dağılımı Sertoli hücreleri ve spermatogonyum negatifti, leydig hücreleri, primer smermatositler, erken spermatid ve geç spermatidlerde yoğun pozitif (Şekil 4.13 g, Şekil 4.17). Timokinin+Torsiyon/Detorsiyon grubunda Glp-1 ekspresyonu Torsiyon/Detorsiyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı ($p<0.01$). Timokinin+Torsiyon/Detorsiyon grubunda Glp-1 ekspresyonu hücresel

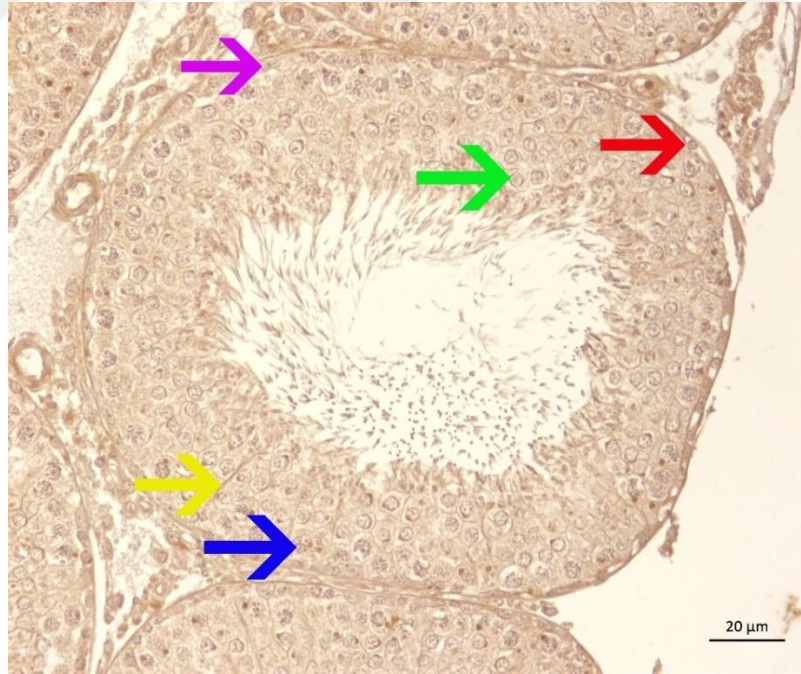
dağılımı sertoli hücreleri, geç spermatidler, spermatogonyum ve primer spermatositler negatifti, erken spermatid ve leydig hücreleri pozitif (Şekil 4.13 ı, Şekil 4.18).



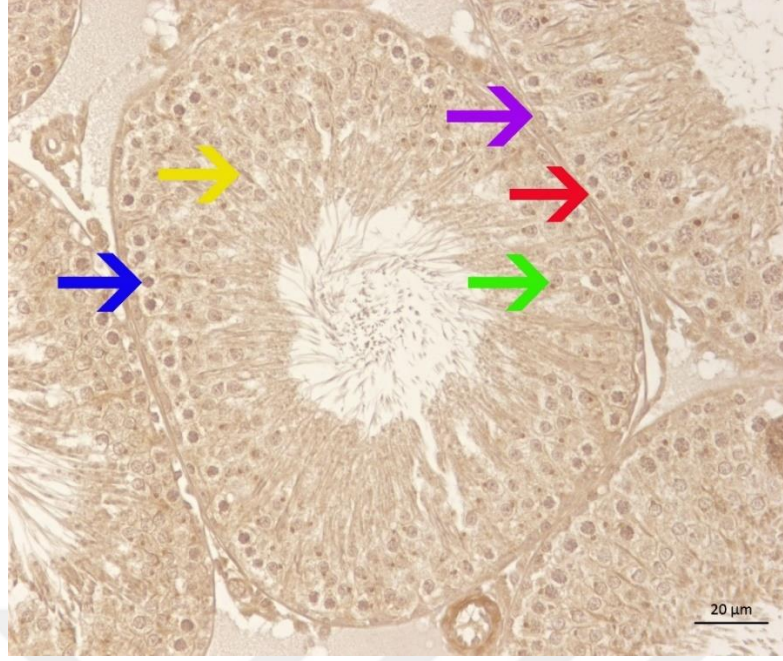
Şekil 4.13. Farklı gruplardaki GIp-1 immunohistokimyasal boyamasının temsili fotoğrafları. TQ; Timokinon, T/D; Torsiyon/Detorsiyon. Görüntü büyütmesi 40x'dir ve skala bar 20 µm'dir.



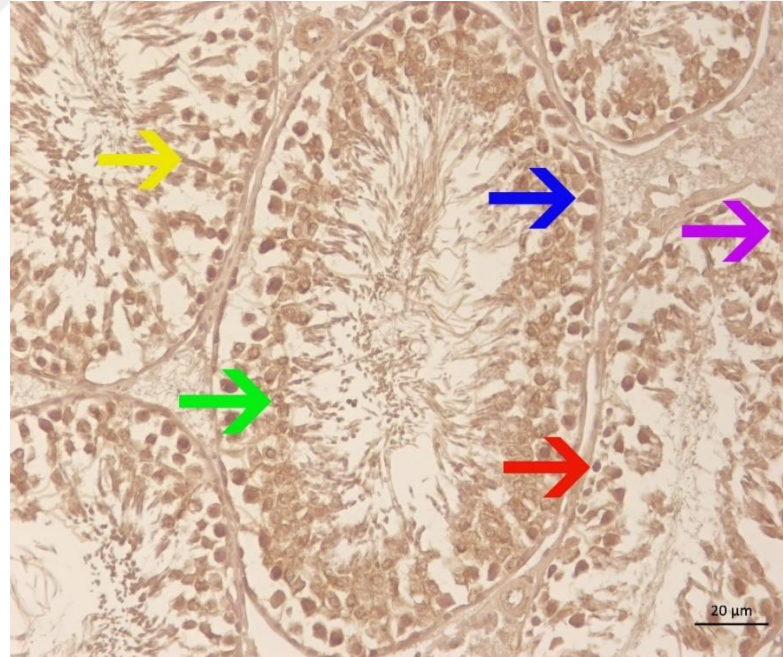
Şekil 4.14. Kontrol grubu Glp-1 ekspresyonu. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μm 'dir.



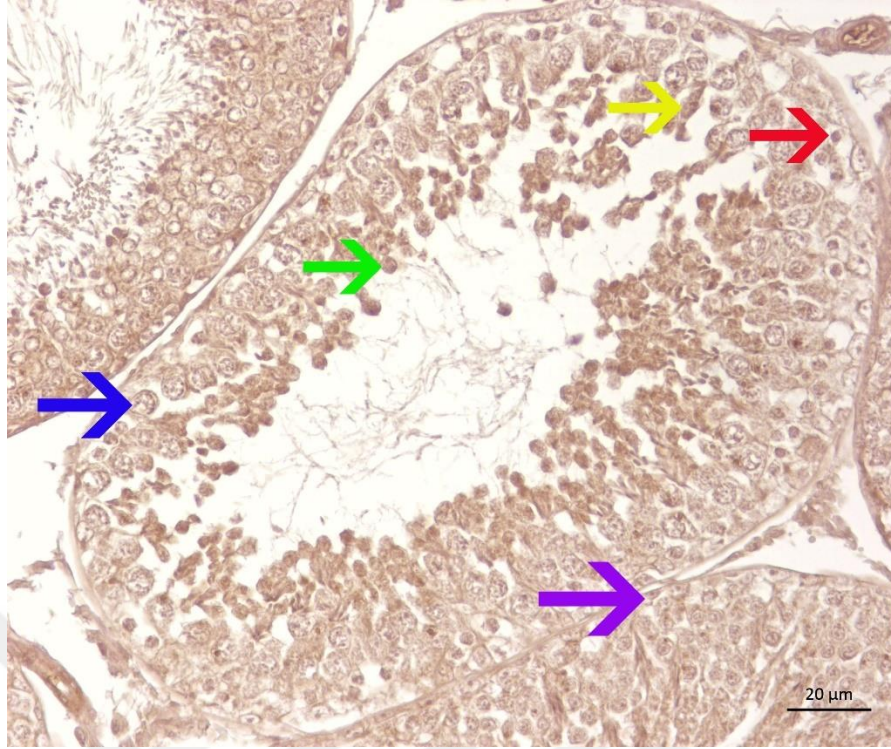
Şekil 4.15. Sham grubu Glp-1 ekspresyonu. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μm 'dir.



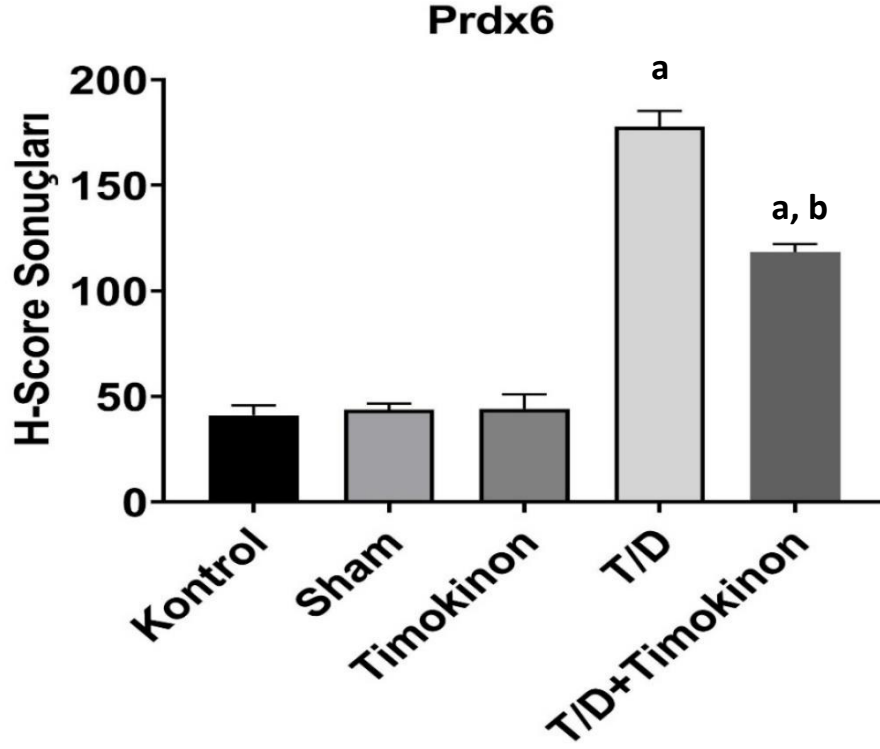
Şekil 4.16. Timokinon grubu Glp-1 ekspresyonu. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μm 'dir.



Şekil 4.17. Torsiyon/Detorsiyon grubu Glp-1 ekspresyonu. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μm 'dir.

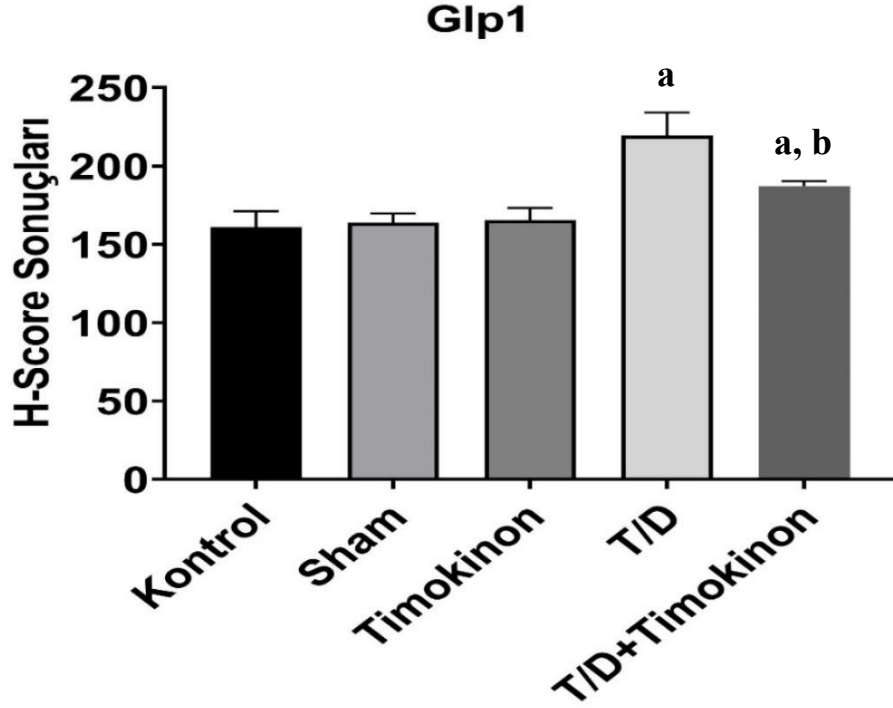


Şekil 4.18. Timokinin+Torsiyon/Detorsiyon grubu Gp-1 ekspresyonu. Kırmızı ok; spermatogonyum hücresi, mor ok; sertoli hücresi, mavi ok; primer spermatosit, yeşil ok; erken spermatid ve sarı ok, geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.



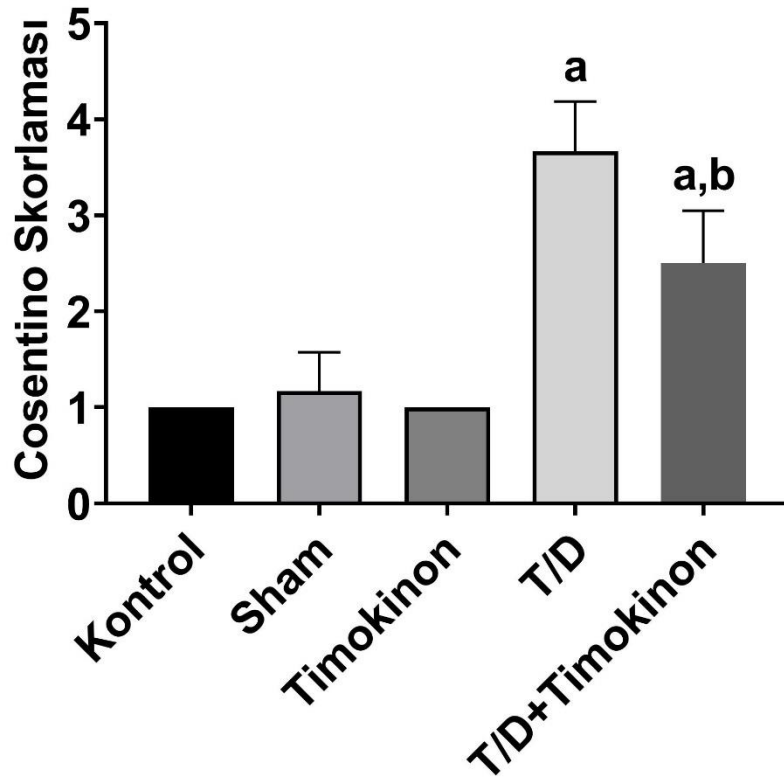
Şekil 4.19. Testiste Prdx6 ekspresyonunun Histolojik skor (H-score) sonuçları. T/D; Torsiyon/Detorsiyon. a, Kontrol, sham ve timokinona göre anlamlılığı, b ise T/D' ye göre anlamlılığı gösterir.

Kontrol ve sham grupları arasında prdx6 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0.7195$). Kontrol ve timokinon grupları arasında prdx6 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0.7195$). Sham ve timokinon grupları arasında prdx6 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0.8739$). Torsiyon/Detorsiyon grubunda Prdx6 ekspresyonu kontrol, sham ve timokinon gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı ($p<0.01$). Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon grubunda Prdx6 ekspresyonu Torsiyon/Detorsiyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı ($p<0.01$). Gruplardaki Prdx6 ekspresyonunun hücresel dağılımı Sertoli hücreleri, geç spermatidler ve Leydig hücrelerinde yoğun pozitif, spermatogonyum, primer spermatositler ve erken spermatidlerde negatifti.



Şekil 4.20. Testiste Glp-1 ekspresyonunun Histolojik skor (H-score) sonuçları. T/D; Torsiyon/Detorsiyon. a, Kontrol, sham ve timokinona göre anlamlılığı, b ise T/D' ye göre anlamlılığı gösterir.

Kontrol ve sham grupları arasında Glp-1 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0.8392$). Kontrol ve timokinon grupları arasında Glp-1 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0.8080$). Sham ve timokinon grupları arasında Glp-1 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0.8392$). Torsiyon/Detorsiyon grubunda Glp-1 ekspresyonu kontrol, sham ve timokinon gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı ($p<0.01$). Timokinon+Torsiyon/Detorsiyon grubunda Glp-1 ekspresyonu Torsiyon/Detorsiyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı ($p<0.01$).



Şekil 4.21. Cosentino Skor Sonuçları

Cosentino testiküler skorlamasına göre testis dokusunun histolojik analizleri yapıldı. Histolojik skorlama istatistiksel olarak analiz edildiğinde a, kontrol, sham ve timokinona göre anlamlı artışı gösterir. b, t/d+timokininun, t/d grubuna kıyasla anlamlı azalışını gösterir. Sol testiste: Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında anlamlı bir fark bulundu. ($p<0,01$)

4.2 TARTIŞMA

Testiste giden kan damarlarının bulunduğu spermatik kordun kendi eksenini etrafında dönmesi sonucu oluşan hastalığa testiküler torsiyon denir. Testise giden kan akışını durduran bir durumdur. Bu durum sonucunda testiste iskemi gelişir ve bu süreç, zamanında müdahale edilmediğinde kalıcı doku hasarı ile sonuçlanabilir. Testiküler torsiyon potansiyel infertilite riskine yol açabileceğinden dolayı acil müdahale gerektiren bir durumdur[93]. Testis torsiyonuna bağlı olarak oluşan iskemi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyesinde artışa sebep olur. ROS üretiminin artması DNA hasarına, endotel yıkımına ve testis germ hücresi apoptozuna neden olmaktadır. Bu durum, testiküler yapının ve fonksiyonların geri dönüşümsüz şekilde bozulmasına zemin hazırlamaktadır[94].

Nigella sativa'nın başlıca aktif bileşenlerinden biri olan timokinon, oksidatif stres kaynaklı hasarı azaltmada önemli bir yeri vardır. $C_{10}H_{12}O_2$ moleküler formülüne sahip, 164.2 g/mol moleküler ağırlığında, sarı renkli ve uçucu özellik gösteren bir kristalize monoterpendir[95]. Timokinon, güçlü antioksidan özelliklere sahip olup, reaktif oksijen türlerini (ROS) etkili bir şekilde temizleyebilmektedir[71].

Testiküler torsiyon/detorsiyon modelinde timokinonun koruyucu etkilerini değerlendiren çalışmalardan biri de Ahmet Gökçe ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, ratlarda oluşturulan testis iskemisi sonrasında 10 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulanan timokinonun, doku hasarını azalttığı bildirilmiştir. Histopatolojik incelemelerde, timokinon uygulanan grupta seminifer tübül yapısının daha düzenli olduğu, germinal hücre sıralanmasının korunduğu ve nekrotik alanların daha az olduğu gözlenmiştir. Ayrıca biyokimyasal olarak oksidatif stres belirteçlerinde iyileşme gözlemlenmiş ve timokinonun antioksidan savunma sistemini desteklediği belirtilmiştir[96]. Bu sonuçlar, timokinonun hem biyokimyasal hem de hücresel düzeyde testiküler doku hasarını hafiflettiğini ve koruyucu potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Timokinon, testis dışında da çeşitli dokularda iskemik reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etki göstermektedir. Örneğin, Karaciğerde yapılan çalışmada ise, timokinonun reperfüzyon sonrası mitokondriyal hasarı, endoplazmik retikulum stresini ve oksidatif stresi azalttığı, ayrıca dokunun histolojik görünümünü iyileştirdiği bildirilmiştir[97]. Xiao ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise, izole rat kalbinde yapılan iskemik reperfüzyon modelinde timokinon ön uygulaması ile kalp fonksiyonlarında belirgin

iyileşme, enfarkt boyutunda azalma, SOD aktivitesinde artış ve hücre ölümünde düşüş gözlemlenmiştir[98].

Sadece timokinonun değil antioksidan enzimlerinde vücudumuzda koruyucu rolleri vardır. Bu antioksidan enzimlerden biri olan Peroksiredoksin 6 (PRDX6), hem glutatyon peroksidaz benzeri peroksidaz aktivitesi hem de fosfolipaz A2 (PLA2) aktivitesi sayesinde çift yönlü bir koruyucu etki gösterir. Prdx6'nın bu çift yönlü koruyucu etkisi sayesinde diğer antioksidanlardan farklıdır ve çok fonksiyonlu kabul edilir[99]. Bu enzim, birçok dokuda ifade edilmekle birlikte, özellikle akciğerlerde yüksek düzeyde eksprese edilir. Memeli Peroksiredoksinleri (PRDX'ler), reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarını önleyen antioksidan enzimlerdir. Aynı zamanda çeşitli hücre ve doku tiplerinde fizyolojik düzenleyiciler ve sensörler olarak görev yaparlar[75].

Shi ve arkadaşlarının insan testis, epididim ve spermatozoasında peroksiredoksin (PRDX) ailesinin ekspresyonunu inceledikleri çalışmada, PRDX1, PRDX2, PRDX4, PRDX5 ve özellikle PRDX6'nın bu dokularda yaygın olarak ifade edildiği gösterilmiştir. Çalışmada PRDX'lerin, özellikle spermatozoa düzeyinde, reaktif oksijen türleri (ROS) kaynaklı hasarı önlemede önemli bir antioksidan savunma mekanizması olduğu vurgulanmıştır. İn vitro koşullarda sperm hücrelerine H₂O₂ uygulandığında membran yapısında belirgin bir bozulma gözlenmiş; ancak PRDX'lerin varlığı bu oksidatif hasarı anlamlı düzeyde azaltmıştır. Bu durum, PRDX ailesinin özellikle PRDX6'nın lipid peroksidasyonunu engelleyerek sperm hücrelerinin canlılık ve fonksiyonlarının korunmasında kritik rol oynadığını ortaya koymuştur.[100].

Moawad ve arkadaşları, farelerden elde edilen sperm hücrelerinde PRDX6 eksikliğinin ve bu enzimin fosfolipaz A₂ (PLA₂) aktivitesinin inhibisyonunun, sperm fonksiyonlarını ve döllenme yeteneğini in vitro ortamda olumsuz etkilediğini göstermiştir. Prdx6^{-/-} farelerde ve MJ33 inhibitörüyle işlenen sperm hücrelerinde motilite, canlılık, akrozom reaksiyonu ve blastosist oluşumu anlamlı şekilde azalmıştır. Ayrıca, bu gruplarda oksidatif stres belirteçleri artmış ve zona pellusida'ya bağlanma yeteneği azalmıştır. Çalışma, PRDX6'nın özellikle PLA₂ aktivitesiyle sperm fonksiyonu ve fertilite için kritik olduğunu ortaya koymaktadır[101].

PRDX6 (Peroksiredoksin 6), testis dışında pek çok dokuda eksprese edilen ve oksidatif stresle mücadelede önemli görevler üstlenen bir antioksidan enzimdir. Yapılan bir çalışmada ARPE-19 hücrelerinde (retinal pigmente epitel) PRDX6, PI3K/AKT sinyal yolunu aktive ederek H₂O₂ kaynaklı oksidatif stresi azalttığı ve hücre ölümüne karşı koruma sağladığı bulunmuştur[102]. 2009 yılında yayımlanan bir çalışmada, farelerde

karaciğerde ischemia-reperfusion (I/R) hasarı oluşturulduğunda PRDX6'nın mitokondriye taşınarak koruyucu rol üstlendiği gösterilmiştir. PRDX6-knockout farelerde hepatosit hasarı belirgin şekilde artmış, mitokondrial H₂O₂ üretimi artmış ve mitokondriyal fonksiyon bozulmuştur. Bu veriler, PRDX6 eksikliğinin oksidatif hasarı artırdığını ortaya koymaktadır[103]. Bir diğer çalışmada PRDX6 eksikliği (knock-out), kalpte iskemi/reperfüzyon sonrasında sol ventrikül fonksiyonunun azalmasına, infarkt boyutunun büyümesine, apoptotik hücre sayısının artmasına ve malondialdehit (MDA) gibi oksidatif stres belirteçlerinin yükselmesine neden olduğu bildirilmiştir[104]

Tüm bu bulgular, PRDX6'nın birçok dokuda iskemi reperfüzyon kaynaklı oksidatif stresi azalttığını ve hücre sel savunma mekanizmalarında önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir.

Glp-1 (Glukagon benzeri peptid-1) doğrudan antioksidan bir enzim olmamakla birlikte, çeşitli mekanizmalarla oksidatif stresi azaltma potansiyeline sahiptir. Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1), besin alımını takiben distal ileum ve kolon bölgelerinde bulunan enteroendokrin L hücreleri tarafından salgılanan bir inkretin hormonudur. İnsan aort endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada GLP-1, oksidatif stres kaynaklı endotel disfonksiyonunu ve aşırı uyarılmış otofajiyi engelleyerek, hücre içi reaktif oksijen türü (ROS) seviyelerini düşürmüştür[105]. Başka bir çalışmada GLP-1, travmatik beyin yaralanması sonrası oksidatif stres ve nöronal apoptozisi azaltarak, beyin dokusunda H₂O₂ ve ROS seviyelerini düşürmüş ve antioksidan faktörlerin (SOD, CAT, GSH) seviyelerini artırmıştır[106]

Demir aşırı yükü modeli üzerinde yapılan bir çalışmada, GLP-1 analogu exenatidin testisteki oksidatif stres belirteçlerini iyileştirdiği, malondialdehit (MDA) seviyelerini düşürüp süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini artırdığı bildirilmiştir. Aynı zamanda apoptotik enzimler olan caspase-3 ve caspase-8'in ekspresyonunda azalma gözlenmiştir; bu da exenatidin'in testis dokusunda oksidatif hasar ve hücre ölümünü azalttığını göstermektedir[107].

Başka bir çalışmada testiküler iskemi-reperfüzyon modelinde Glp-1 aganositisi olan semaglutid uygulaması, testiste oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozu azaltarak testiküler fonksiyonu iyileştirmiştir[108].

Timokinonun sadece iskemi reperfüzyonda oluşan oksidatif stres kaynaklı artan reaktif oksijen türlerini (ROS) süpürmediği; aynı zamanda katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon-S-transferaz (GST) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini koruduğu veya artırdığı yapılan çalışmalarda bulunmuştur[109]. Fakat timokinonun testiste prdx6

ekspresyonunu inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle biz araştırmamızda testiküler torsiyon sonrası iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan ratlarda timokinonun prdx6 ekspresyon seviyelerini immünohistokimyasal yöntemler ile göstermeyi planladık. Bu amaçla ratlar; kontrol (DMSO), sham (sadece operasyon), torsiyon/detorsiyon, timokinon ve timokinon + torsiyon/detorsiyon gruplarına ayrıldı. Timokinon ve timokinon + torsiyon/detorsiyon gruplarına 7 gün boyunca timokinon uygulandı ve akabinde torsiyon/detorsiyon modeli oluşturuldu. Model oluşturulduktan sonra testiküler dokuda gomori trikrom boyaması ile immünohistokimya tekniği uygulandı.

Gomori trikrom ile yapılan histolojik incelemelerde kontrol, sham ve yalnızca timokinon uygulanan gruplarda hücresel yapının korunduğu, histolojik mimarinin bozulmadığı ve sitoplazmada herhangi bir belirgin değişikliğin olmadığı gözlemlendi. Buna karşın, torsiyon grubunda germinal epitel tabakasında belirgin dökülme, hücre sayısında azalma ve seminifer tübüllerde sperm sayısında dikkate değer bir düşüş tespit edildi. Torsiyon sonrasında timokinon uygulanan grupta ise hücre sayısındaki azalma kısmen devam etse de germinal epitel tabakasında yapısal düzelmelerin başladığı ve sperm sayısında artış gözlemlendi. Bu bulgular, timokinonun testiküler doku üzerindeki iyileştirici etkilerini destekler nitelikteydi.

Bu çalışmada, testis dokusuna uygulanan torsiyon/detorsiyon modelinde PRDX6 düzeylerinin kontrol, sham ve timokinon grubuna göre anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Bu artışın, iskemi-reperfüzyon sürecinde oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimine karşı hücrenin endojen antioksidan yanıtı kapsamında geliştiği düşünülmektedir. PRDX6 hem hidrojen peroksit hem de fosfolipid peroksidleri detoksifiye edebilen çok işlevli bir antioksidan enzim olup, oksidatif hasara karşı hücre bütünlüğünü korumada önemli bir rol oynamaktadır. Torsiyon sonrası timokinon uygulanan grupta ise PRDX6 ekspresyon seviyesinin yalnızca torsiyon/detorsiyon uygulanan gruba kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum, timokinonun güçlü antioksidan etkisiyle oksidatif stres düzeyini azaltması sonucunda hücrenin PRDX6 üretimine duyduğu ihtiyacın azalmasıyla açıklanabilir. Elde edilen bu bulgular, timokinonun testis dokusunda iskemi-reperfüzyon kaynaklı oksidatif hasarı hafiflettiğini ve buna bağlı olarak PRDX6 ekspresyonunun regüle edildiğini göstermektedir.

Bu çalışmada, testis dokusuna uygulanan torsiyon/detorsiyon modelinde Glp-1 düzeylerinin kontrol, sham ve timokinon grubuna göre anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Bunun sebebini Glp-1'in anti-oksidan özelliğinden kaynaklı olduğunu

düşünüyoruz. Torsiyon sonrasında timokinon uygulanan grupta ise G1p-1 seviyeleri torsiyon/detorsiyon grubuna göre anlamlı azalış gösterdi. Bu azalma timokinonun oksidatif stresteeki baskılayıcı etkileri ile ilişkilendirilebilir.



5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, testiküler torsiyon/detorsiyon (T/D) modelinde meydana gelen oksidatif doku hasarına karşı timokinonun (TQ) olası koruyucu etkisi, Prdx6 ve Glp-1 sinyal yolları üzerinden histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiştir.

Yapılan gomori trikrom boyaması sonucunda T/D uygulanan farelerin testis dokusunda belirgin histopatolojik hasar, germinal epitelde hücre kaybı ve seminifer tübül yapısında bozulmalar gözlenmiştir. Timokinon tedavisi bu doku hasarlarını anlamlı düzeyde azaltmış, tübül bütünlüğünü koruyarak germ hücre organizasyonunu desteklemiştir.

İmmünohistokimyasal analizler sonucunda Prdx6 ve Glp-1 ekspresyonu torsiyon/detorsiyon grubunda artmıştır. Timokinon uygulanan torsiyon/detorsiyon grubunda ise torsiyon/detorsiyon grubuna göre düşmüştür.

Sonuç olarak testis dokusunda iskemi reperfüzyondan kaynaklı hasar sebebi ile Prx6 ve Glp-1 seviyeleri artış göstermiştir. Ancak timokinonun koruyucu etkilerinden dolayı Prdx6 ve Glp-1 seviyeleri düşmüştür. Buda timokinonun testis dokusunda torsiyon modelinde Prdx6 ve Glp-1 ekspresyon seviyeleri arttırarak antioksidan etkisini göstermektedir.

6. KAYNAKÇA

- [1] Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM. (2012). Testicular Torsion: Diagnosis, Evaluation, and Management. *Am Fam Physician*, 88(12), 835-840
- [2] Ta A, D'Arcy FT, Hoag N, D'Arcy JP, Lawrentschuk N. (2016). Testicular torsion and the acute scrotum: current emergency management. *Eur J Emerg Med*, 23(3),160-165.
- [3] Laher A, Ragavan S, Mehta P, Adam A. (2020) Testicular Torsion in the Emergency Room: A Review of Detection and Management Strategies. *Open Access Emerg Med*, 12, 237-246.
- [4] Kadish HA, Bolte RG. (1998). A retrospective review of pediatric patients with epididymitis, testicular torsion, and torsion of testicular appendages. *Pediatrics*, 1, 73-76.
- [5] Seçil Y. (2018) Deneysel Testis Torsiyonu Modelinde Hidrojen Sülfürün Etkinliğinin Araştırılması. (Yüksek lisans tezi). İstanbul: İstanbul Üniversitesi.
- [6] Moghimian M, Soltani M, Abtahi H, Shokoohi M. (2017). Effect of vitamin C on tissue damage and oxidative stress following tunica vaginalis flap coverage after testicular torsion,” *J Pediatr Surg*, 52(10),1651-1655.
- [7] Rhee SG, Kil IS. (2017). Multiple functions and regulation of mammalian peroxiredoxins. *Annu Rev Biochem*, 86, 749–775.
- [8] O’Flaherty, C. (2014). Peroxiredoxins: hidden players in the antioxidant defence of human spermatozoa. *Basic and Clinical Andrology*, 24, 4.
- [9] Rahman, S., Ismail, T., Zaidi, S. K., et al. (2018). Peroxiredoxin 6: A Multi-Tasking Enzyme in Cellular Signaling. *Antioxidants (Basel)*, 7(12), 172.
- [10] Liu, Y., & O’Flaherty, C. (2017). In vivo oxidative stress alters thiol redox status of peroxiredoxin 1 and 6 and impairs rat sperm quality. *Asian Journal of Andrology*, 19(1), 73–79.
- [11] Fernandez, M. C., & O’Flaherty, C. (2018). Peroxiredoxin 6 is the primary antioxidant enzyme for the maintenance of viability and DNA integrity in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 33(8), 1394–1407
- [12] Albakry, Z., Karrar, E., Ahmed, I. A. M., Oz, E., Proestos, C., El Sheikha, A. F., Oz, F., Wu, G., & Wang, X. (2022). Nutritional composition and volatile compounds of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed, fatty acid composition and tocopherols, polyphenols, and antioxidant activity of its essential oil. *Horticulturae*, 8(7), 575
- [13] Khader, M., Bresgen, N., & Eckl, P. M. (2009). In vitro toxicological properties of thymoquinone. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 129–133.

- [14] Ayan, M., Tas, U., Sogut, E., Caylı, S., Kaya, H., Esen, M., Erdemir, F., & Uysal, M. (2016). Protective effect of thymoquinone against testicular torsion induced oxidative injury. *Andrologia*, 48(2), 143–151.
- [15] Hajhashemi, V., Ghannadi, A., & Jafarabadi, H. (2004). Siyah kimyon tohumu esansiyel yağı, güçlü bir analjezik ve antienflamatuvar ilaç olarak. *Fitoterapi Araştırması*, 18(3), 195–199.
- [16] Nagi, M. N., & Mansour, M. A. (2000). Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacological Research*, 41(3), 283–289.
- [17] Ozbal, S., Ergur, B. U., Erbil, G., Tekmen, I., Bagryank, A., & Cavdar, Z. (2012). The effects of α -lipoic acid against testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *The Scientific World Journal*, 2012, 489248.
- [18] Drucker, D. J. (1998). Glucagon-like peptides. *Diabetes*, 47(2), 159–169.
- [19] Jensterle, M., Janez, A., Fliers, E., Devries, J. H., Vrtacnik-Bokal, E., & Siegelaaar, S. E. (2019). The role of glucagon-like peptide-1 in reproduction: from physiology to therapeutic perspective. *Human Reproduction Update*, 25(4), 504–517.
- [20] Caltabiano, R., et al. (2020). Glucagon-like peptide-1 receptor is expressed in human and rodent testis. *Andrology*, 8(6), 1935–1945.
- [21] Liang, F., Tian, X., & Ding, L. (2024). Daphnetin modulates GLP-1R to alleviate cognitive dysfunction in diabetes: implications for inflammation and oxidative stress. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1438926.
- [22] Zhang, E., et al. (2015). GLP-1 receptor agonist exenatide attenuates the detrimental effects of obesity on inflammatory profile in testis and sperm quality in mice. *American Journal of Reproductive Immunology*, 74(5), 457–466.
- [23] Nishiyama, Y., et al. (2018). Incretins modulate progesterone biosynthesis by regulating bone morphogenetic protein activity in rat granulosa cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 178, 82–88.
- [24] Dudek RW. *High-Yield Histology*. 2th ed. North Carolina: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
- [25] Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*. 11th ed. İstanbul: Nobel Kitap Evleri; 2006.
- [26] Ross MH, Pawlina W. *Erkek üreme sistemi, in Histoloji konu anlatımı ve atlas, ilişkili hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji*. 6th ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2014.
- [27] Kuehnel W. *Color atlas of cytology, histology, and microscopic anatomy*. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2003.
- [28] Gartner LP, Hiatt JL, Strum JM. *BRS Cell Biology & Histology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.

- [29] Mescher AL. *Temel Histoloji Konu ve Atlas*, Junqueira. 14th ed. İstanbul: Güneş Tıp Kitap Evleri;2019.
- [30] Klein RM, Enders GC. *Anatomy, Histology, and Cell Biology*. 3th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2007.
- [31] Gartner LP, Hiatt JL, *Color textbook of histology*. 2th ed. Philadelphia: Saunders Company; 2001.
- [32] Young B, Woodford P, O'Dowd G. *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*, 6th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2013.
- [33] Eroschenko VP. *Atlas of Hitology*. 12th ed. Almere: Wolters Kluwer; 2012.
- [34] Eroschenko VP. *DiFiore'nin Histoloji Atlası fonksiyonel ilişkileriyle*. 12th ed. Ankara: Palme Yayıncılık;2016.
- [35] Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*, 7th ed. Philadelphia: LWW; 2015.
- [36] Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text And Atlas: With Correlated Cell And Molecular Biology*. 7th ed. Baltimore: Wolters Kluwer Health; 2016.
- [37] Kerr, J. B. *Functional Histology*. 1th ed. Philadelphia: Elsevier;2016
- [38] Şeftalioğlu A. *Genel ve özel insan embriyolojisi*. 3th ed. Ankara: Feryal Matbaası; 1998.
- [39] Mao B, Bu T, Mruk D, Li C, Sun F, Cheng CY. Modulating the Blood-Testis Barrier Towards Increasing Drug Delivery. *Trends Pharmacol Sci*. 2020 Oct;41(10):690-700. doi: 10.1016/j.tips.2020.07.002.
- [40] Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology And Cell Biology: An Itroudction To Pathology*. 6th ed. Amsterdam: Elsevier Sauders; 2012.
- [41] Krause WJ. *Krause's essential human histology for medical students*. 3th ed. Colombia: 2005.
- [42] Singh V. *Textbook of Clinical Embryology*. 1th ed. New Delhi: İndia: Elseiver; 2012.
- [43] Moore KL, Persaud, T. V. N, Torchia MG. *Klinik yönleriyle insan embriyolojisi*. 10th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2016.
- [44] Tishler PV. Diameter of testicles. *N Engl J Med*. 1971 Dec 23;285(26)1489. doi 10.1056/NEJM197112232852622.
- [45] Langford, G. A, Heller, C. G. Fine Structure of Muscle Cells of the Human Testicular Capsule: Basis of Testicular Contractions. 1972;179(4073):573-575. doi: 10.1126/science.179.4073.57
- [46] Paulsen, F. W. J. *Atlas of Human Anatomy*. 15th ed. Canada-Munich: Elseiver; 2011.

- [47] Frank H, Netter MD. *İnsan Anatomi Atlası*. 5th ed. Ankara: Nobel Tıp Kitapevi;2020
- [48] Partin, A. W., Peters, C. A., Kavoussi, L. R., Dmochowski, R. R., & Wein, A. J. *Campbell-Walsh urology*. 12th ed. Amsterdam: Elsevier; 2020.
- [49] Zhao, L. C., Lautz, T. B., Meeks, J. J., & Maizels, M. (2011). Pediatric testicular torsion epidemiology using a national database: incidence, risk of orchiectomy and possible measures toward improving the quality of care. *Journal of Urology*, 186(5), 2009-2013.
- [50] Yağmur, İ., & Çiftçi, H. (2022). Testis torsiyonu. In Üroloji Akademisi (Ed.), *Güncel Üroloji* (ss. 1129–1136). İstanbul: Üroloji Akademisi Yayını.
- [51] Ringdahl, E., & Teague, L. (2006). Testicular torsion. *American Family Physician*, 74(10), 1739-1743.
- [52] Davis, J. E., & Silverman, M. (2011). Scrotal emergencies. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 29(3), 469-484.
- [53] Turner, T. T., & Brown, K. J. (1993). Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biology of Reproduction*, 49(2), 401-407.
- [54] Saunders, W. B. (1990). *Pediatric urology*. Philadelphia, 198(6), 792-795.
- [55] Kapoor, S. (2008). Testicular torsion: a race against time. *International Journal of Clinical Practice*, 62(5), 821-827.
- [56] Pentyala, S., Lee, J., Yalamanchili, P., Vitkun, S., & Khan, S. A. (2001). Testicular torsion: a review. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 5(1), 38-47.
- [57] Mäkelä, E., Lahdes-Vasama, T., Rajakorpi, H., & Wikström, S. (2007). A 19-year review of paediatric patients with acute scrotum. *Scandinavian Journal of Surgery*, 96(1), 62-66.
- [58] Moslemi, M. K., & Kamalimotlagh, S. (2014). Evaluation of acute scrotum in our consecutive operated cases: a one-center study. *International Journal of General Medicine*, 7, 75–78.
- [59] Sezgin, M. A. (2024). Testis torsiyonu oluşturulan rat modelinde misoprostol'ün detorsiyon sonrası iskemi reperfüzyon üzerine etkisi (Tıpta uzmanlık tezi). İstanbul: Sağlık Bilimleri Üniversitesi.
- [60] Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298, 229-317.
- [61] Eltzschig, H. K., & Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine*, 17(11), 1391-1401.
- [62] Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 4350965.

- [63] Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017 Jun 20; 86:715-748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.
- [64] Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715-748.
- [65] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012 Jan;5(1):9-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- [66] Güzelsoy, P., Aydın, S., & Başaran, N. (2018). Potential effects of thymoquinone the active constituent of black seed (*Nigella sativa* L.) on human health. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 7(2), 118–135.
- [67] El-Dakhakhny, M. (1963). Studies on the chemical constitution of Egyptian *Nigella sativa* the essential oil. *Planta Medica*, 11(4), 465-470.
- [68] Kanter, M. (2008). Effects of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on sciatic nerves in experimental diabetic neuropathy. *Neurochemical Research*, 33(1), 87-96.
- [69] Koç, M., Deniz, Ç. D., Eryilmaz, M. A., Tezcan, Y., & Gürbilek, M. (2023). Radioprotective effects of melatonin and thymoquinone on liver, parotid gland, brain, and testis of rats exposed to total body irradiation. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 53(4), 902-908.
- [70] Cakir, S. S. (2012). Varikosel ve oksidatif stres. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 5(3), 25-37.
- [71] Badary, O. A., Taha, R. A., Gamal El-Din, A. M., & Abdel-Wahab, M. H. (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and Chemical Toxicology*, 26(2), 87–98.
- [72] Dietz, K. J. (2011). Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(4), 1129-1159.
- [73] Chowhan, R. K., Rahaman, H., & Singh, L. R. (2020). Structural basis of peroxidase catalytic cycle of human Prdx6. *Scientific Reports*, 10(1).
- [74] Lee, Y. J. (2020). Knockout mouse models for peroxiredoxins. *Antioxidants (Basel)*, 9(2), 182
- [75] Woo, H. A., Yim, S. H., Shin, D. H., Kang, D., Yu, D. Y., & Rhee, S. G. (2010). Inactivation of Peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling. *Cell*, 140(4), 517–528.
- [76] Patel P, Chatterjee S. (2019). Peroxiredoxin6 in Endothelial Signaling. *Antioxidants (Basel)*, 8(3)63.
- [77] Wahlig, S., M. Lovatt, and J.S. Mehta. (2018) Functional role of peroxiredoxin 6 in the eye. *Free Radic Biol Med*, 126,210-220.
- [78] Chatterjee S. Endothelial Mechanotransduction. (2018). Redox Signaling and the Regulation of Vascular Inflammatory Pathways. *Front Physiol*, 9, 524.

- [79] O'Flaherty C. (2018). Peroxiredoxin 6: The Protector of Male Fertility. *Antioxidants (Basel)*, 7(12),173.
- [80] Özkösem, B., Feinstein, S. I., Fisher, A. B., & O'Flaherty, C. (2016). Absence of Peroxiredoxin 6 Amplifies the Effect of Oxidant Stress on Mobility and SCSA/CMA3 Defined Chromatin Quality and Impairs Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 94(3), 68.
- [81] Gong, S., Gabriel, M. C. S., Zini, A., Chan, P., & O'Flaherty, C. (2012). Low amounts and high thiol oxidation of peroxiredoxins in spermatozoa from infertile men. *Journal of Andrology*, 33(6), 1342–1351.
- [82] O'Flaherty, C., Boisvert, A., Manku, G., & Culty, M. (2020). Protective role of peroxiredoxins against reactive oxygen species in neonatal rat testicular gonocytes. *Antioxidants*, 9(1).
- [83] Bumanlag, E., Scarlata, E., & O'Flaherty, C. (2022). Peroxiredoxin 6 Peroxidase and Ca²⁺-Independent Phospholipase A2 Activities Are Essential to Support Male-Mouse Fertility. *Antioxidants (Basel)*, 11(2), 226.
- [84] O'Flaherty, C., & De Souza, A. R. (2011). Hydrogen peroxide modifies human sperm peroxiredoxins in a dose-dependent manner. *Biology of Reproduction*, 84(2), 238–247.
- [85] Fernandez, M. C., & O'Flaherty, C. (2018). Peroxiredoxin 6 is the primary antioxidant enzyme for the maintenance of viability and DNA integrity in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 33(8), 1394–1407.
- [86] Baggio, L. L., & Drucker, D. J. (2004). Clinical endocrinology and metabolism. Glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 18(4), 531-54.
- [87] Körner, M., Stöckli, M., Waser, B., & Reubi, J. C. (2007). GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(5), 736–743.
- [88] Pyke, C., et al. (2014). GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. *Endocrinology*, 155(4), 1280–1290.
- [89] Caltabiano, R., et al. (2020). Glucagon-like peptide-1 receptor is expressed in human and rodent testis. *Andrology*, 8(6), 1935–1945.
- [90] Wang, R., Lu, L., Guo, Y., Lin, F., Chen, H., Chen, W., & Chen, M. (2015). Effect of Glucagon-like Peptide-1 on High-Glucose-induced Oxidative Stress and Cell Apoptosis in Human Endothelial Cells and Its Underlying Mechanism. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 66(2), 135-40.
- [91] Cannarella, R., Calogero, A. E., Condorelli, R. A., Greco, E. A., Aversa, A., & La Vignera, S. (2021). Is there a role for glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the treatment of male infertility. *Andrology*, 9(5), 1499–1503.

- [92] MacLusky, N. J., Cook, S., Scrocchi, L., Shin, J., Kim, J., Vaccarino, F., Asa, S. L., & Drucker, D. J. (2000). Neuroendocrine function and response to stress in mice with complete disruption of glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Endocrinology*, 141(2), 752-62.
- [93] Cummings, J. M., Boullier, J. A., Sekhon, D., & Bose, K. (2002). Adult testicular torsion. *Journal of Urology*, 167(5), 2109-10. PMID: 11956451
- [94] Akhigbe, R. E., Odetayo, A. F., Akhigbe, T. M., Hamed, M. A., & Ashonibare, P. J. (2024). Pathophysiology and management of testicular ischemia/reperfusion injury: Lessons from animal models. *Heliyon*, 10, e27760.
- [95] Sakib, R., et al. (2023). Antioxidant properties of thymoquinone, thymohydroquinone and black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil: scavenging of superoxide radical studied using cyclic voltammetry, DFT and single crystal X-ray diffraction. *Antioxidants*, 12(3).
- [96] Gökçe, A., Oktar, S., Koç, A., Gonenci, R., Yalcinkaya, F., Yonden, Z., & Duru, M. (2010). Protective effect of thymoquinone in experimental testicular torsion. *Urologia Internationalis*, 85(4), 461-5.
- [97] Bouhlel, A., Bejaoui, M., Ben Mosbah, I., Abdallah, N. H., Ribault, C., Viel, R., Hentati, H., Corlu, A., & Ben Abdennebi, H. (2018). Thymoquinone protects rat liver after partial hepatectomy under ischaemia/reperfusion through oxidative stress and endoplasmic reticulum stress prevention. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12961>
- [98] Xiao, J., Ke, Z. P., Shi, Y., Zeng, Q., & Cao, Z. (2018). The cardioprotective effect of thymoquinone on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart via regulation of apoptosis and autophagy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(9), 7212–7217.
- [99] Fisher, A. B. (2011). Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(3), 831-44.
- [100] Shi, H., et al. (2018). Expression of peroxiredoxins in the human testis, epididymis and spermatozoa and their role in preventing H₂O₂-induced damage to spermatozoa. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 56(3), 141–150.
- [101] Moawad, A. R., et al. (2017). Deficiency of peroxiredoxin 6 or inhibition of its phospholipase A₂ activity impair the in vitro sperm fertilizing competence in mice. *Scientific Reports*, 7(1).
- [102] Zha, X., et al. (2015). PRDX6 protects ARPE-19 cells from oxidative damage via PI3K/AKT signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(6), 2217–2228.
- [103] Eismann, T., et al. (2009). Peroxiredoxin-6 protects against mitochondrial dysfunction and liver injury during ischemia-reperfusion in mice. *American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296, G266–G274.

- [104] Nagy, N., Malik, G., Fisher, A. B., & Das, D. K. (2006). Targeted disruption of peroxiredoxin 6 gene renders the heart vulnerable to ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 291, H1790–H1795.
- [105] Cai, X., et al. (2018). GLP-1 treatment protects endothelial cells from oxidative stress-induced autophagy and endothelial dysfunction. *International Journal of Biological Sciences*, 14(12), 1696–1708.
- [106] Wang, S., Liu, A., Xu, C., Hou, J., & Hong, J. (2024). GLP-1(7–36) protected against oxidative damage and neuronal apoptosis in the hippocampal CA region after traumatic brain injury by regulating ERK5/CREB. *Molecular Biology Reports*, 51(1).
- [107] Yeşil, S., et al. (2018). Exenatide reduces oxidative stress and cell death in testis in iron overload rat model. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(6), 4349–4356.
- [108] Abdullah, D. M., Alsemeh, A. E., & Khamis, T. (2022). Semaglutide early intervention attenuated testicular dysfunction by targeting the GLP-1–PPAR- α –Kisspeptin–Steroidogenesis signaling pathway in a testicular ischemia-reperfusion rat model. *Peptides*, 149, 170711.
- [109] Woo, C. C., Kumar, A. P., Sethi, G., & Tan, K. H. B. (2012). Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 83(4), 443–451.

7. EKLER

7.1 ETİK KURUL ONAY

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 "TESTİS TORSİYONUNDA TİMOKİNONUN PRDX6 EKSPRESYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ" isimli araştırma başvuru projesi etik yönden değerlendirilmiş olup; yönergemiz ilkelerine göre proje etiği açısından "UYGUN OLDUĞUNA" oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.

The research project entitled "EFFECT OF THYMOQUINO ON PRDX6 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: 17.04.2024

Karar No / Decisions No: 2024/04/05

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	
Assoc. Prof. Dr. Hakan SOYLU Üye / Member	Araştırmacıdır / Researcher	
Asst. Prof. Dr. Tolga ALTAŞ Veteriner Hekim / Veterinary Physician	Uygundur / Appropriate	
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

