

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Sıçan Testis Torsiyonu İskemi/Reperfüzyon
Hasarında, PI3K-AKT-mTOR Yolakları
Üzerinden CAPE ve EGCG'nin Koruyucu
Etkilerinin Değerlendirilmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yağmur SARICA

DANIŞMAN

Prof. Dr. V. Sevinç İNAN

MANİSA, 2014

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez projemi destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Tıp Fakültesi Dekanlığı'na; Yüksek lisans eğitim süresince sonsuz bir emek ve hoşgörülle, hem bilimsel hem de manevi desteğini esirgemeyen, her zaman engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Sevinç İNAN'a

Yüksek lisans eğitim sürecinde bilgi ve tecrübelerini bizlerle içtenlikle paylaşan Prof. Dr. Seda VATANSEVER ve Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN, her zaman ilgi ve yardımlarını gördüğüm tez çalışmamın istatistiksel verilerin düzenlenmesinde yardımını esirgemeyen Prof. Dr. İbrahim TUĞLU hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Deney hayvanlarının cerrahi işlemleri ve laboratuvar çalışmaları sırasında yardımını esirgemeyen Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Aydın ŞENCAN ve Dr. Aynur GÜLTEKİN UYANIK'a, tez çalışmamın biyokimyasal analizleri ve içten yardımı için Ege Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülinnaz ALPER ERCAN'a teşekkür ederim.

Şifa Üniversitesi Dekan'ı Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ'a, ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Vedat KÖKSAL'a verdikleri manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım maddi ve manevi destekleri olan tüm meslektaşlarım, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.'daki tüm uzman, asistan ve mezun olan arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca eğitimimin her anında maddi, manevi, sevgi, azim ve güçle besleyen en büyük destekçim canım Annem'e ve koca bir çınar ağacı gibi sırtımı yasladığım destekçim Babam'a, canımın en güzel parçaları kız kardeşlerime bu süreçte her türlü yardımları için sonsuz teşekkürler.

Yüksek lisans eğitimin yanında hayatımın her anında eğitimimde, sınavımda, mutluluğumda, hüznümde yanımda olacağını bildiğim bir kahve tadında sıcacık dostluğuyla kuzenim Ayşenur GÜRBÜZ'e sonsuz teşekkürler.

ÖZET

Testis torsiyonu, sıklıkla çocuklarda ve genç erkeklerde görülen, zamanında müdahale edilmediği zaman gonadal hasar ve infertiliteye yol açan ürolojik tıbbi acil durumdur.

Bu çalışmada, testis torsiyonu iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarında PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerinden Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) ve Epigallocatechin Gallate (EGCG)'ın koruyucu etkilerinin histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, Wistar Albino genç erişkin erkek sıçanlar kontrol, iskemi reperfüzyon (I/R), tek doz (TD) CAPE, TD EGCG, doyurma (DY) CAPE, DY EGCG, TD kompleks (KOMP), DY KOMP olmak üzere 8 gruba ayrıldı (n:56). I/R modeli sıçanların sol testislerine 720° rotasyon ile 2 saat torsiyon, 4 saat detorsiyon yapılarak oluşturuldu. Cerrahi işlem sonrasında sıçanların testis dokuları çıkarılarak bouin solüsyonunda 48 saat tespit edilerek, rutin parafin doku takibi ile parafine gömüldü. Kesitler H&E ile boyandıktan sonra histokimyasal olarak Johnsen skoruna göre değerlendirildi. Ek kesitler anti-PI3K, anti-AKT, anti-mTORC1, anti-FOXO1, anti-Kaspaz8 ve anti-Kaspaz9 primer antikoları ile avidin-biyotin-peroksidaz yöntemiyle immünohistokimyasal olarak, apoptotik hücreler TUNEL yöntemi ile belirlenerek karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. İmmünoreaktivite skorları hafif, orta ve şiddetli olarak yarı kantitatif yöntemle yapıldı, Sıçanlardan alınan kan örneklerinde MDA ve 8OHdG düzeyleri ELİSA yöntemi ile belirlendi. Sonuçlar One-Way ANOVA istatistik testi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Gruplar histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubunda testisin histolojik yapısının normal görünümde olduğu, I/R grubunda ise seminifer tübüllerin düzeninde bozulma ve interstisiyal alanda ödem ve hemoraji olduğu izlenmiştir. I/R ile kontrol grubu arasında Johnsen skoru karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlenmiştir (p<0.001). Antioksidan uygulama gruplarının histopatolojik değerlendirilmesinde, I/R grubuna göre istatistiksel olarak iyileşme gözlenmiş olup (p<0.001), kontrol grubuna en yakın histolojik görünümün TD EGCG antioksidan grubunda olduğu izlenmiştir. Bu çalışmada hücre yaşamı, hücre çoğalması üzerine etkili olan PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağına ait immünoreaktivite, kontrol grubunda

orta/şiddetli olarak izlenirken, I/R grubunda immünoreaktivitelerin azaldığı gözlenmiştir. Antioksidan uygulanan gruplarda, PI3K/AKT/mTOR immünoreaktiviteleri I/R grubuna göre artmış olarak izlenmiş olup, kontrol grubuna en yakın sonuçlar TD uygulamaları ile gözlenmiştir ($p>0.05$).

Kontrollü hücre ölümü göstergesi olan apoptozun ekstrinsek (Kaspaz 8) ve intrinsek (Kaspaz 9) yollarıyla, immünohistokimyasal değerlendirmeler ve TUNEL yöntemi sonuçları ile apoptotik hücrelerin yüzdesi en yüksek olarak I/R grubunda izlenmiş olup, antioksidan uygulamaları ile kontrol grubuna en yakın sonuçlar TD EGCG grubundan elde edilmiştir. Diğer antioksidan uygulamalarında ise istatistiksel olarak apoptotik hücrelerde azalma izlenmiştir. Biyokimyasal bulguların değerlendirilmesinde, I/R grubunda MDA ve 8OHdG düzeyleri, kontrol grubuna göre artmış olarak izlenmiş ve antioksidanların uygulamaları ile değerlerde azalma gözlenmiştir. MDA değerleri en düşük olarak DY CAPE'de izlenirken, 8OHdG değerleri ise kontrole en yakın olarak TD EGCG grubunda izlenmiştir.

Bu çalışma sonucunda, erkeklerde acil olarak gelişen ve infertilite ile sonuçlanabilen testis torsiyonu I/R hasarında, histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler sonucunda testis dokusu üzerine koruyucu etkisi en yüksek uygulamanın TD EGCG grubunda olduğu izlenmiştir. TD CAPE ve TD KOMP uygulamalarının da kontrole yakın koruyucu etkide oldukları izlenmiş olup, DY uygulamalarında beklenen yararlar gözlenmemiştir. Biyokimyasal olarak MDA ve 8OHdG düzeyleri karşılaştırıldığında histopatolojik değerlendirmeler ile korelasyon gösteren belirtecin 8OHdG olduğu görülmüş ve DNA hasarını gösteren bu parametrenin ölçümünün TUNEL sonuçları ile de uyumlu olduğu ve MDA düzeylerine göre histopatolojiyi daha iyi yansıttığı izlenmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda testis torsiyonu I/R hasarında acile başvuran hastalar için detorsiyon öncesi erken dönemde tek doz EGCG ve CAPE uygulamalarının hücre yaşamı, çoğalması yolunda önemli olan PI3K yolağı üzerinden etkili olduğu ve reperfüzyon hasarında koruyucu etkileri olduğu düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Testis torsiyonu, İskemi/reperfüzyon, CAPE, EGCG, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı

SUMMARY

Testicular torsion is an urological urgent medical condition seen commonly in children and young boys and if not intervened in time, it could result in gonadal damage and thus lead to infertility.

The aim of this study was to evaluate the protective effects of Epigallocatechin Gallate (EGCG) and Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), through PI3K/AKT/mTOR signal pathways by using histochemistry, immunohistochemistry, biochemistry and TUNEL methods.

In this study, Wistar-albino young adult male rats were divided into eight groups as control, ischemia/reperfusion (I/R), Single dose (SD) CAPE, SD EGCG, Saturation dose (ST) CAPE, ST EGCG, SD Complex (COMP) and ST COMP (n:56). I/R model was applied for 2 hours torsion by rotating the left testis 720° and then 4 hours detorsion. Afterwards, orchiectomy was performed and testicular tissues were fixed in Bouine's solution for 48 hours. They were then dehydrated and embedded in paraffin. Serial sections were deparaffinized, stained with hematoxylin-eosin (H&E) and evaluated histochemically according to Johnsen's Score. Tissue samples were analyzed by using an indirect avidin-biotin-peroxidase immunohistochemistry and TUNEL methods. Anti-PI3K, anti-AKT, anti-mTORC-1, anti-FOXO1, anti-Caspase 8 and anti-Caspase 9 primary antibodies were used. Staining intensities were evaluated as mild, moderate, strong using the semi-quantitative method.

Biochemically, 8OHdG and MDA values were analyzed using the ELISA method in the blood samples of the rats. One-way ANOVA statistical test was used to compare the results.

H&E stained testicular tissue samples from the groups were evaluated histochemically under a light microscope. While normal testicular histological appearance was observed in the control group, disruption in the seminiferous tubules with increased edema and hemorrhages in the interstitial area were seen in the I/R group. The Johnsen's Score was significantly different statistically in the I/R group when compared to the control group ($p < 0.001$).

In evaluating the antioxidant SD EGCG testicular samples, histological appearance was observed as similar to the control group. There was no significant difference statistically between the control and the SD EGCG group.

In this study, immunoreactivities of PI3K/AKT/mTOR signal pathway which play an important role in cell proliferation and cell survival, were seen as moderate to strong in the control group, whereas immunoreactivities were reduced in the I/R group.

The groups using antioxidants, EGCG and CAPE, were seen to have increased immunoreactivities in the PI3K/AKT/mTOR signal pathway when compared with the I/R group. The closest immunoreactivity to the control group was seen in the SD EGCG group ($p>0.05$).

Apoptosis which indicates controlled cell death was measured by using immunohistochemistry and TUNEL methods. The results of immunoreactivities of extrinsic (Caspase 8) and intrinsic (Caspase 9) pathways and TUNEL methods, showed that the highest percent of apoptotic cells were seen in the I/R group. In the groups using antioxidant, the closest results to the control group were seen in the SD EGCG group. The number of apoptotic cells was seen to have reduced statistically in the CAPE and Complex groups ($p<0,001$). In the evaluation of biochemical data, levels of MDA and 8OHdG increased in the I/R group when compared to the control group, and the values decreased in the groups using antioxidants. The lowest value of MDA was seen in the SD CAPE group, while the closest value of 8OHdG to the control group, was observed in the SD EGCG group.

The results of histopathological, immunohistochemistry and biochemically evaluations of this study showed that, I/R damage in the testicular torsion, being an emergency case in young man which might result in infertility. The highest prevention on testis tissue was observed in the group using SD EGCG. Also, groups using SD CAPE or SD COMP were seen to have nearly similar preventive effects as SD EGCG. The results of saturated antioxidant group, showed no beneficial effects, as expected. When the results of biochemical and histopathological evaluations were compared, the value of 8OHdG was observed as more suitable in showing DNA damage and correlated to our histopathological findings according to the value of MDA. Also, 8OHdG levels were observed to confirm with the TUNEL results.

As a result, in this study it was thought that patients who were admitted with emergency testicular torsion I/R damage, the use of a single doses of EGCG and/or CAPE antioxidants is advised before testis detorsion is performed so as to have protective effects on cell proliferation and cell survival through the PI3K signal pathway.

Keywords: Testis torsion, Ischemia/Reperfusion, CAPE, EGCG, PI3K/AKT/mTOR signal pathway



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP: Androjen Binding Protein / Androjen Bağlayıcı Protein

AMH: Antimüllerian Hormone / Antimülleriye Hormon

APAF1: Apoptosis-activating factor 1 / Apoptoz Aktivatör Faktör 1

ATP: Adenosine Triphosphate / Adenozin Trifosfat

BAD: Bcl-2-associated death promoter / Bcl-2 ilişkili ölüm öncülü

BMP-4: Bone Morphogenetic Faktör-4 / Kemik Morfogenetik Faktör-4

Bcl-2: B-cell lymphoma 2/ B hücre lenfoma gen üyesi proteini

CAPE: Caffeic Acid Phenethyl Ester / Kafeik Asit Fenil Ester

cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate / Siklik Adenozin Monofosfat

GMP: Cyclic Guanosine Monophosphate / SiklikGuanozin Monofosfat

CK: Creatin Kinase / Kreatin Kinaz

C-IAP1: Baculoviral IAP repeat-containing protein 2/ Bakulovirüs IAP içeren gen proteini 2

CARD: Caspase-activating recruitment domain /Kaspaz aktivatör bölge

DED: Death effector domain/Ölüm efektör bölgesi

D.E.R: Smooth endoplasmic reticulum/ Düz Yüzlü Endoplazmik Retikulum/

DY CAPE: Doyurma doz Kafeik Asit Fenil EsterAcid Phenethyl Ester

DY EGCG: Doyurma doz Epigallokateşin Gallat

DY KOMP: Doyurma doz Kafeik Asit Fenil Ester+ Epigallokateşin Gallat

EGCG: Epigallocatechin Gallate/ Epigallokateşin Gallat

eNOS: Endothelial Nitric Oxide Synthase/ Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz

EC: Epicatechin/ Epikateşin

EGC: Epigallocatechin/ Epigallokateşin

ECG: Epicatechingallate/ Epikateşingallat

ERK 1/2: Extracellular Signal Related Kinase 1 /2 / Hücre dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz 1/2

FGF9: Fibroblast Growth Factor 9 / Fibroblast Büyüme Faktörü 9

F.S.H: Follicle Stimulating Hormone / Folikül UyarıcıHormon

FOXO1: Forkhead Box protein O1

HCG: Human Chorionic Gonadotropin / Human Koryonik Gonodotropin

H₂O₂: Hydrogen Peroxide/ Hidrojen Peroksit
IL-6: Interleukin 6/ İnterlökin 6
IL-1 β : Interleukin 1 β / İnterlökin 1 β
I/R: Ischemia/ Reperfusion Damage/ İskemi/Reperfüzyon Hasarı
IRS-1: Insulin Receptor Substrate/ İnsulin Reseptör Substratı
iNOS: Induce Nitric Oxide Synthesis/ İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
L.H : Leydig Hücreleri
LH: Luteinizan Hormon
LDH: Lactate Dehydrogenase/ Laktat Dehidrojenaz
LOOH: Lipid Hydroperoxide/ Lipid Hidroperoksitleri
MDA: Malonaldehyde/ Malondialdehit
MIM: Mullerian Inhibiting Hormone/ Müllerian İnhibitör Hormon
MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1/ Monosit Kemotaktik Protein-1
MTORC-1: Mammalian Target of Rapamycin Kompleks 1/ Memelilerde Rapamisin'in Hedef Molekül Kompleksi -1
MTORC-2: Mammalian Target of Rapamycin Kompleks 2/ Memelilerde Rapamisin'in Hedefi LST8 Kompleksinin Alt Birimi
NO: Nitric Oxide/ Nitrik Oksit
NADPH: Nicotinamide Dinucleotide Phosphate/ Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NO₂: Azot dioxide/Azot dioksit
NOS: Nitric Oxide Synthesis/ Nitrik Oksit Sentaz
nNOS: Neuronal Nitric Oxide Synthesis/ Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
-O₂ : Superoxide / Süperoksit
-OH: Hydroxide radical/Hidroksil radikali
-ONOO: Peroxynitrite/ Peroksinitrit
-ONOOH: Peroxynitrite acid/ Peroksinitroz asit
PAF: Prostatic Acid Phosphatase/Prostatik Asidik Fosfataz
PDK1: Pyruvate Dehydrogenase Lipoamine/ Piruvat Dehidrojenaz Lipoamid Kinaz 1
PGH: Primordial Germ Cell/ Primordiyal Germ Hücreleri

PIKK: Phosphatidylinositol 3 Kinase-Related Kinase/ Fosfatidilinositol3 Kinaz İlişkili Kinaz

PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate/ Fosfatidilinositol-4,5 bifosfat

PIP3: Phosphatidylinositol Trisphosphate- Fosfatidilinositol Trifosfat

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase/ Fosfatidil inositol 3 kinaz

PKB: Protein Kinase- B/ Protein Kinaz B

PSA: Prostate-Specific Antigen/ Prostat Spesifik Antijen

PTEN: Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate 3-Phosphatase/ Fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfat 3-fosfat

RTK: Receptor Tyrosine Kinases/ Reseptör Tirozin Kinaz

RS: Tiyil radically/ Tiyil Radikali

R: Organic radically/ Organik radikal

RCOO: Organic peroxides /Organik peroksitler

SRY: Sex Determining Region Seks Belirleyici Bölge

SF1: Steroidogenesis factor1/ Steroidogenez faktör 1

SOX9: Transcription Factor9/ Transkripsiyon Faktör9

SOD: Super oxide Dismutase / Süperoksit Dismutaz

-SH: Sistein Grupları

T.T.: Testis Torsiyonu

T.A: Tunica Albuginea

TBF: Testis Determining Region/ Testis Belirleyici Bölge

TNF: Tumour Nekrosis Factor/ Tümör Nekrozis Faktör

NF- κ B: Nuclear Factor Kappa β / Nukleer Faktör Kappa β

TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances/ Tiyobarbutirik Asit Reaktifi

TSC1: Tuberous sclerosis Kompleks 1/ Tubero Skleroz Kompleks 1

TD CAPE: Tek Doz Kafeik Asit Fenil Ester

TD EGCG: Tek Doz Epigallokateşin Gallat

TD KOMP: Tek Doz CAPE+EGCG

8OHdG: 8Hydroxy-2-Deoxyguanosine/ 8Hidroksidezoksiganin

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1.A: Sol testis torsiyone edilmiş modeli görüntüsü

Resim 3.1.B: Sol testis 2 saat torsiyon sonrası görüntüsü

Resim 3.1.C: Sol testis 4 saat detorsiyon sonrası görüntüsü

Resim 4.1.1.A-B: Kontrol grubuna ait sıçan testis dokularından alınan kesitlerin H&E görüntüleri

Resim 4.1.2.A-B: İskemi/Reperfüzyon grubuna ait sıçan testis dokularından alınan kesitlerin H&E görüntüleri

Resim 4.1.3.A-B: TD CAPE gruplarına ait sıçan testis dokularından alınan kesitlerin H&E görüntüleri

Resim 4.1.3.C-D: DY CAPE gruplarına ait sıçan testis dokularından alınan kesitlerin H&E görüntüleri

Resim 4.1.4.A-B: TD EGCG gruplarına ait sıçan testis dokularından alınan kesitlerin H&E görüntüleri

Resim 4.1.4.C-D: DY EGCG gruplarına ait sıçan testis dokularından alınan kesitlerin H&E görüntüleri

Resim 4.1.5.A-B: TD KOMP gruplarına ait sıçan testis dokularından alınan kesitlerin H&E görüntüleri

Resim 4.1.5.C-D: DY KOMP gruplarına ait sıçan testis dokularından alınan kesitlerin H&E görüntüleri

Resim 4.3.1: Anti-PI3K primer antikoru kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri

Resim 4.3.2: Anti-AKT primer antikoru kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri

Resim 4.3.3: Anti-mTORC primer antikoru kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri

Resim 4.3.4: Anti-FOXO primer antikoru kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri

Resim 4.3.5: Anti-Kaspaz 8 primer antikoru kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri

Resim 4.3.6: Anti-Kaspaz 9 primer antikoru kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri

Resim 4.3.7: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre tayini ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri.



ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Şekil 1: Testislerin genel görünümü

Şekil 2: Spermatogenez

Şekil 3: Spermatidin matür sperme farklanma evreleri

Şekil 4: Erkek üreme sistemi endokrin düzenlemesi

Şekil 5: Genital boşaltım kanalları

Şekil 6: Oksidatif stres dengesi

Şekil 7: Caffeic Acid Phenethyl Ester moleküler yapısı

Şekil 8: Epigallocatechin Gallat moleküler yapısı

Şekil 9: PI3K/AKT/mTORC/FOXO yolağı

Şekil 10: Kaspaz yolağı düzenlemesi

Şekil 11: Apoptoz inhibisyon yolağı

Tablo 3.1: Tüm Deney Grupları

Tablo 3.3.1: Parafin Doku Takibi

Tablo 3.4.1: Hematoksilen-Eozin Protokolü

Tablo 3.5.1: Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

Tablo 3.5.2: Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Kullanılan Malzemeler

Tablo 3.6.1: İmmünohistokimya Protokolü

Tablo 3.7.2: Tunel Protokolü

Tablo 3.7.3: Tunel Yönteminde Kullanılan Malzemeler

Tablo 4.1.A: Johnsen skoruna göre grupların ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4.1.B: Gruplar arası Johnsen skor analizleri

Tablo 4.2.C: Johnsen skoruna göre gruplar arası istatistiksel sonuçları

Tablo 4.3.1.A: Anti-PI3K ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4.3.1.B: Anti-PI3K immünreaktivite değerlendirmesi

Tablo 4.3.1.C: Anti-PI3K istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 4.3.2.A: Anti-AKT immünreaktivite ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4.3.2.B: Anti-AKT immünreaktivite Değerleri

Tablo 4.3.2.C: Anti-AKT istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 4.3.3.A: Anti-mTORC1 ortalamala ve standart sapma değerleri

Tablo 4.3.3.B: Anti-mTORC1 immünreaktivite değerlendirmesi

Tablo 4.3.3.C: Anti-mTORC1 istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 4.3.4.A: Anti-FOXO1 ortalamala ve standart sapma değerleri

Tablo 4.3.4.B: Anti-FOXO1 immünreaktivite değerlendirmesi

Tablo 4.3.4.C: Anti-FOXO1 istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 4.3.5.A: Anti-Kaspaz 8 ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4.3.5.B: Anti-Kaspaz 8 immünreaktivite değerlendirmesi

Tablo 4.3.5.C: Anti-Kaspaz 8 istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 4.3.6.A: Anti-Kaspaz 9 ortalamala ve standart sapma değerleri

Tablo 4.3.6.B: Anti-Kaspaz 9 immünreaktivite değerlendirmesi

Tablo 4.3.6.C: Anti-Kaspaz 9 istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 4.3.7.A: Anti-TUNEL ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4.3.7.B: TUNEL ile Apoptotik hücre değerlendirmesi

Tablo 4.3.8: Tüm grupların (n:7) antikolların immünoreaktivite skorlaması

Tablo 4.4.1.A: MDA (nmol/ml) konsantrasyon ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4.1.1.B: Plazma MDA (nmol/ml) düzeyi grafiği

Tablo 4.1.1.C: Plazma (nmol/ml) MDA istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 4.4.2.A: 8OHdG (nmol/ml) konsantrasyon ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4.4.2.B: 8OHdG (nmol/ml) konsantrasyon düzey grafiği

Tablo 4.4.2.C: 8OHdG (nmol/ml) konsantrasyon düzey istatistiği

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	V
TABLolar DİZİNİ.....	VI
RESİMLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
ÖZET.....	XIII
SUMMARY (İNGİLİZCE ÖZET).....	XV
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Testis Embriyolojisi.....	3
2.2. Testis Anatomisi.....	6
2.3.Testis Histolojisi.....	8
2.3.1.Genel Yapı.....	8
2.3.2.Semifer Tübüller.....	9
2.3.3.Sertoli Hücreleri.....	10
2.3.4.Kan Testis Bariyeri.....	11
2.3.5. Spermatojeniz-Spermiyogenez.....	12
2.3.6.İntertisyel Alan.....	17
2.3.6.1. Leydig Hücreler.....	17
2.3.7.Spermatojenizi Etkileyen Faktörler.....	18
2.3.8.Testis İçi Genital Kanallar.....	19
2.3.9.Genital Boşaltım Kanalları.....	20
2.3.10.Yardımcı Genital Bezler.....	22
2.4.Testis Torsiyonu.....	24
2.4.1.Ekstravaginal Testis Torsiyonu.....	25
2.4.2.İntravaginal Testis Torsiyonu.....	25
2.4.3.İskemi ve Reperfüzyon Hasarı.....	28

2.5.Oksidatif Stress.....	29
2.6.Serbest Radikaller.....	30
2.6.1. Süperoksit Radikalleri (O ₂ ⁻).....	32
2.6.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	32
2.6.3.Hidroksil Radikali (-OH).....	33
2.6.4.Nitrik Oksit (NO)	33
2.6.5.Hücrede Reaktif Türlerinin Kaynağı.....	34
2.7.Antioksidan Maddeler.....	34
2.7.1. Doğal (Endojen) Radikaller.....	36
2.7.1.1. Enzim olanlar.....	36
2.7.1.1.1.Katalaz	
2.7.1.1.2.Malondialdehit (MDA)	
2.7.1.1.3.8 hidroksidezoksiganin (8 OH-dG):	
2.2.1.2.Enzim olmayanlar.....	36
2.7.2. Eksojen Radikaller.....	37
2.7.3.Gıda Antioksidanlar.....	37
2.8. CAPE(Caffeic Acid Phenethyl Ester).....	37
2.9.EGCG(Epigallocatechin gallate).....	39
2.10. PI3K/AKT.....	41
2.11. mTOR.....	43
2.12. FOXO(FKHR).....	47
2.13. KASPAZ Aktivitesi.....	48
3.MATERYAL-METOD.....	54
3.1.Cerrahi Uygulama.....	56
3.2.Biyokimyasal Analizler İçin Kan Alımı	57
3.3.Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi.....	58
3.4.Hematoksilen-Eozin Boyama.....	60
3.5.Modifiye Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru.....	62
3.6.Avidin-Biyotin Peroksidaz Yöntemi ile İndirek İmmünohistokimyal	
Değerlendirme.....	63
3.7.Tunel Yöntemi ile Apoptotik Hücre Değerlendirme.....	65

4.BULGULAR.....	69
4.1.Histokimyasal Bulgular.....	70
4.2.Johnsen Skorlaması.....	75
4.3.İmmünohistokimyasal Bulgular.....	78
4.3.1.Anti-PI3K İmmünreaktivitesi.....	79
4.3.2.Anti- AKT İmmünreaktivitesi.....	83
4.3.3.Anti- mTORC1 İmmünreaktivitesi.....	87
4.3.4.Anti- FOXO1 İmmünreaktivitesi.....	91
4.3.5.Anti -Kaspaz 8 İmmünreaktivitesi.....	95
4.3.6.Anti -Kaspaz 9 İmmünreaktivitesi.....	99
4.3.7.TUNEL Yöntemi Değerlendirilmesi.....	103
4.4.BiyokimyasalBulgular.....	110
4.4.1.Malondialdehit(MDA)Değerlendirmesi.....	110
4.4.2. 8-Hidroksideoksiguanin (8OHdG)	
Değerlendirmesi.....	112
5.TARTIŞMA.....	11
4	
6.SONUÇ.....	12
5	
7.KAYNAKLAR.....	12
6	

1. GİRİŞ

Testis torsiyonu spermatik kordun kendi etrafında dönmesine bağlı arteriyal ve venöz kan akımının bozulması ile ortaya çıkan ürolojik bir durumdur. Yenidoğan döneminde görülmekle birlikte sıklıkla pubertal dönemde gözlenmektedir. Acil müdahale edilmezse infertilite ile sonuçlanmaktadır (1).

Testis torsiyonu sonrası iskemi hasarı meydana gelirken, detorsiyon sırasında reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir. İskemi/reperfüzyon sonrası dokuda SOR (Serbest oksijen radikalleri) miktarı artmakta ve oksidatif stres oluşturmaktadır (2).

İskemi/reperfüzyon hasarı ile oluşan oksidatif stres, serebro-vasküler bozukluklar, ateroskleroz, diabetes mellitus, amfizem/bronşit, alkolik karaciğer hastalığı, akut ve kronik renal yetmezlik, gebelik preeklampsisi, yaşlanma, Parkinson hastalığı, serviks kanseri, retrolental fibroplazi, Down sendromu, Duchenne tipi musküler distrofi başta olmak üzere birçok hastalıkta önemli rol oynamaktadır (3). Doku harabiyetini azaltmak ve dokuyu korumak amaçlı antioksidan maddeler devreye girmektedir (2).

Propolisin aktif bileşenlerinden Kafeik Asit Fenil Ester (CAPE) antimikrobiyal, antienflamatuar, immünmodülatör, antioksidan ve antiproliferatif özellikleri bilinmektedir (4). Epigallocatechin Gallat (EGCG) zengin antioksidan içeriği ile yeşil çay'ın etken maddesi olmakla birlikte antiinflamatuvar, antioksidan, antikanser ve immün modülatör aktivitesi bulunmaktadır (5).

mTOR(mammalian target of rapamycin) birçok hücre içi önemli mekanizmaları düzenleyen önemli kinazlardan biridir. mTOR, serin-threonin kinaz ailesinden PI3K/AKT/mTORC sinyal yolağında önemli rol oynar. PI3K/AKT/mTORC sinyal yolağı hücre çoğalması, transkripsiyon, anjiogenez, apoptoz ve hücre sağ kalımında önemli rol oynar.(101)

Forkhead box proteinleri, transkripsiyon faktör ailesi üyeleri olup apoptoz, hücre büyümesi, hücre gelişimi, proliferasyonu ve sağ kalımında etkili olan genlerin ekspresyonunu kontrol ederler (6). Kaspaz ailesi apoptoz da önemli rol oynayan temel mekanizmalardan biridir. MDA ve 8OHdG hücre lipid peroksidasyonu ve DNA hasar belirteçleri olarak bilinmektedir.

Bu çalışmada, genç erişkin Wistar Albino sıçanlarda testis torsiyonu iskemi/reperfüzyon sonrası oluşan doku hasarında, P13K-AKT-mTOR sinyal ileti yollarının öneminin ve antioksidan ajanlar arasında yer alan Epigallokateşin-3-Gallat (EGCG) ve Kafeik Asit Fenil Ester(CAPE)'in testis hasarı üzerindeki koruyucu etkilerinin biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Biyokimyasal kan analizlerinde MDA ve 8-OHG düzeyleri ölçülerek DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu değerlendirilmiştir. Histopatolojik olarak testiste seminifer tübülü oluşturan spermatogenez sürecindeki tüm hücrelerin ve Sertoli hücreleri ile interstisyel Leydig hücreleri morfolojik olarak Johnson's skorlaması ile değerlendirilmiştir. Histopatolojik inceleme ile iskemi/reperfüzyon hasarında EGCG ve CAPE uygulamalarının koruyucu etkileri olup olmadığı ışık mikroskop altında değerlendirilmiştir. DNA hasarı TUNEL yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. TUNEL pozitif boyanan hücreler % olarak belirlenerek, sonuçlar gruplar arasında karşılaştırmalı olarak ANOVA istatistik testi ile yorumlanmıştır.

İmmünohistokimyasal olarak PI3K-AKT-MTOR yolağında yer alan primer antikoları ile apoptotik süreçte ekstrensek ve intrinsek yolların etkilenmelerini göstermek amacı ile kaspas 8 ve kaspas 9 primer antikoları ile indirek immünohistokimyasal yöntemle değerlendirme yapılmıştır. İmmünohistokimya boyanma skorları, yarı-kantitatif yöntemle hafif (1), orta (2), şiddetli (3) ve çok şiddetli (4) olarak belirlenerek h-Skor ile hesaplanmıştır. Toplam boyanan hücre sayıları belirlenerek yüzde olarak gruplar arasında ANOVA istatistik testi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışma sonunda, EGCG ve CAPE'in infertilite nedenlerinden biri olan testis torsiyonu iskemi/reperfüzyon hasarı üzerine etkileri moleküler düzeyde değerlendirilmiş vetedavinin koruyucu etkileri izlenerek, antioksidanların tek tek ya da birlikte kullanıldıklarında sinerjik etkilerinin önemi ortaya konulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Embriyolojisi

Primordiyal germ hücreleri (PGH), epiblastan köken alıp, primitif çizgi boyunca yol alarak 3.haftada vitellus kesesinin allontoise yakın duvarındaki hücrelerinin arasına yerleşirler. 4.haftada çoğalan bu hücreler ameboid hareketler ile son bağırsağın mezenterinden dorsal eksen boyunca ilerler. PGH hücreleri, 5. haftada mezonefrozun medialinde mezotel ve altındaki mezenşimin çoğalması ile bir kalınlaşma halinde gelişen gonadal kabartıya ulaşır. PGH'nin ulaşmasından hemen önce ve ulaşma zamanında gonadal kabartının epiteli altındaki mezenşim aralarına doğru çoğalarak, primitif cinsiyet kordonları olarak adlandırılan düzensiz şekilli kordonları oluştururlar (7). PGH'lerinin göçü Stella, Fragilis genleri ve BMP-4 tarafından düzenlenmektedir. Primitif cinsiyet kordonları hem erkek hemde dişi embriyolarda yüzey epiteline bağlıdır. 7. haftaya kadar olan bu dönemde erkek veya dişi gonadların birbirinden ayırt edilmesi mümkün değildir ve bu evre farklanmamış gonad evresi olarak adlandırılır. Gonadlar üç kaynaktan köken alarak gelişirler. Bu kaynaklar; posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel, altındaki mezenşim ve primordiyal germ hücreleridir. Farklanmamış gonadlar dışta korteks içte medulla olmak iki şekilde gelişir(8).

Testis gelişimi, gonadların medullasının gelişmesi ile farklanır, korteks bir takım kalıntılar dışında geriler ve dejenere olur. Erkek embriyo XY kromozomunu taşır. Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki **SRY** geni ve testis belirleyici faktörün (TBF) etkisiyle primitif cinsiyet kordonları çoğalmaya devam eder. **TBF** faktörü altında gonadal kordonlar seminiferöz kordonlara farklanır. Seminiferöz kordonların oluşumu **Sox9** ve **FGF9** genlerinin ekspresyonları ile sağlanır. SRY ve Sox9 testisten mezonefrik kanal tübüllerinin bir gonadal kabartı oluşumu için bir kemotaktik faktör işlev gören FGF9'un salınmasını başlatır (8).

Seminiferöz kordonların yüzey epiteli ile bağlantısı, kalın bir fibröz kapsül olan **Tunika albuginea** geliştikten sonra ortadan kalkar. Genişleyen testis zamanla mezonefrozdan ayrılır ve kendi mezenteri olan mezorçiyuma asılı hale gelir. Seminiferöz kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklanır (7).

Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar ve ilerleyen zamanlarda lümen gelişimi başlar. Seminifer tübül duvarında, Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler olmak üzere 2 tip hücre bulunur. Destek hücreleri olan Sertoli hücreleri, testisin yüzey epitelinden gelişirken, spermatogonik hücreler primordiyal germ hücrelerinden farklanırlar (9).

Fetal testiste, seminifer tübüllerdeki hücrelerin çoğunluğunu Sertoli hücreleri oluşturur. Fetal gelişme boyunca, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Seminer tübüller, düz tübül olan tübül  rekti ve ağ şeeklinde düzenlenen rete testis ile devam eder, 15-20 adet ince mezonefrik tübül olan duktus efferentes'ler aracılığı ile mezonefrik kanaldan gelişen duktus epididimis ile bağlantı kurar (9).

Seminifer tübüllerin arasında interstisyel bağ dokusu ile ayrılmışlardır. Bu bölgede gevşeek bağ dokusu, kollajen lifler, fibroblastlar ve Leydig hücreleri bulunmaktadır. 8. haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonlar olan testosteron ve androstenedion salgılamaya başlar. Bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genitallerin mask lin olarak farklanmasını uyarır. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu testesteron üretimini stimule eder. hCG hormon miktarı, 8-12 haftalık embriyonik dönemde en yüksek değerine ulaşır (9). Testesteron hormonuna ek olarak, fetal testisler, glikoprotein yapıda **antim llerin hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (M M)** adı verilen hormonu salgılamaktadır.

AMH, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır ve hormonun salınması puberteye kadar devam eder. AMH, Müller kanalından (paramezonefrik kanal) gelişecek olan uterus ve tuba uterina farklanmasını inhibe eder.

SRY ayrıca doğrudan yada dolaylı yolla Sertoli ve Leydig hücrelerinin diferansiyasyonunu indükleyen **steroidogenezis faktörü 1 (SF1)** yapımını da uyarır. SF1, Sox9 ile birlikte paramezonefrik kanalların gerilemesini sağlayan AMH'ın konsantrasyonunu artırır. SF1 ayrıca Leydig hücrelerinde testesteron sentezinde rol alan enzimlerle ilgili genleri uyarır. Hedef dokulardaki hücrelerin içine giren testesteron ya öylece kalır ya da 5 α redüktaz enzimi vasıtasıyla dihidrotestesterona dönüştürülür. Dihidrotestesteron erkek dış genital organlarının diferansiyasyonunda reseptörlere bağlanarak katkıda bulunur (8).

Erkek genital kanalların ileri farklanmasında mezonefrik kanallar (Wolffian kanallar) rol oynarken, paramezonefrik kanallar geriler. Mezonefrik kanalın proksimal kısmı kıvrıntılı bir hal alarak duktus epididimisi oluşturur. Mezonefroz dejenere olduğunda mezonefrik kanalların bazıları kalıntı halinde devam eder ve bu bölümden rete testis kordonlarıyla bağlantı kurarak duktus efferentisleri oluşturur. Mezonefrik kanal duktus epididimisin kuyruğundan seminal vezikül tomurcuğuna kadar kalın bir kas kılıfı ile sarılarak duktus deferens (vas deferens) oluşturur (7).

Mezonefrik kanalların, kaudal uçlarının lateralinden, dışa doğru vezikula seminalisler (seminal bezler) gelişir. Bezler ejakulat içindeki sıvının büyük kısmını oluştururlar ve spermilerin beslenmesi için sekresyon yaparlar. Seminal bezlerin kanalı ile uretra arasında kalan mezonefrik kanal bölümü, duktus ejakulatoryus olarak gelişmektedir (8). Uretranın prostatik parçasından çok sayıda endodermal çıkıntı meydana gelir. Bu çıkıntılar mezenşim içine doğru gelişerek prostatın glandüler bez gelişir. Glandüler bezin epiteli endodermal hücrelerden gelişirken, stroma ve düz kas kısmı ise mezenşimal kısımdan gelişir (8).

Bulbouretral bezler uretranın spongiöz parçasından bir çift olarak dışa doğru gelişen hücrelerden oluşur. Bezin stroması ve düz kas hücreleri mezenşimden köken alır.

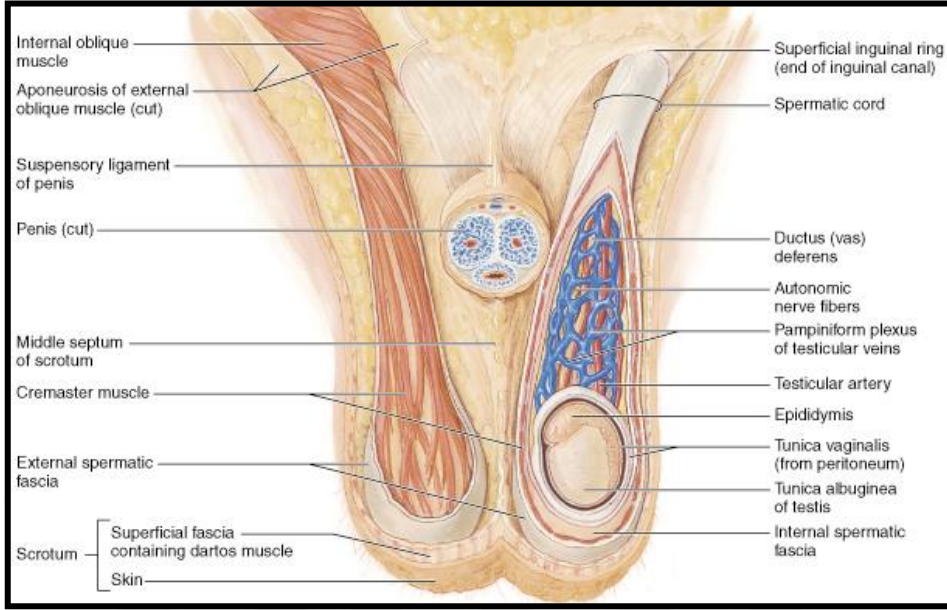
Mezonefrik gelişim sırasında bazı yapılar bu işleve ulaşamaz ve kalıntı halinde kalırlar. Mezonefrik tüplerden **paradidimis**, mezonefrik kanallardan **appendiks epididimis** kalıntı halinde yer alır (8).

3.- 4. haftada mezenşim çoğalarak kloaka membranın kranialinde genital tuberkulu oluşturur. Genital tuberkülü uzayarak fallus'u yapar. Kloaka membranın her iki yanında genital şişlikler ve uretral katlantılar oluşur. Uretral katlantılar öne doğru yönelir ve üretral oluğun kenarları oluşur. 3.ay sonunda iki üretral katlantı kapanarak penil uretrayı oluşturur. Böylece skrotum ve penis gelişir (8).

2.2.Testis Anatomisi

Erkek genital organları dış genital organlar ve iç genital organlar olarak genel olarak iki başlık altında toplanır. Dış genital organlar penis, üretra ve skrotumu içerip diaphragma ürogenitale ile arkus pubikus'un altında yer alırlar. İç genital organlar ise testis, duktus epididimis, duktus deferens, prostat, vesikulo seminalis ve bulbourethral bez'dir.

İntrauterin dönemde testisler karın boşluğunda ve böbreklerin altında yer alıp doğuma yakın dönemde testisler önce karın boşluğunda ve daha sonrada kanalis inguinalisten aşağıya doğru ilerler (8). Testisler funikulus spermatikusa asılı duran skrotum içine yerleşmiş bir çift organdır. Kıvrımlı deri yapısında olan skrotumun iç yüzü septum skroti ile ikiye ayrılır. Skrotum içinde; testis, epididimis ile funikulus spermatikus ve duktus deferens'in bir kısmını barındıran torba şeklinde bir yapıdır (10). Testisler oval şekilli olup yetişkinlerde yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2.5 cm eninde ve 3 cm genişliğindedir. Testislerin skrotum içindeki yerleşimleri vertikal yönde olmayıp organın uzun eksenini yukarıdan aşağı ve önden arkaya eğik, sol testis sağ testise göre biraz daha aşağıda pozisyonundadır (11). Testis'in facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü; margo anterior ve margo posterior olarak adlandırılan iki kenarı; extremitas superior ve extremitas inferior olarak iki ucu vardır. Margo anterior peritoneum viscerale'nin uzantısı olan epiorchium ile kaplıdır. Margo posterior'un medial bölümünde korpus epididimis yer alır. Margo posterior'un orta kısmında testis damar ve sinirleri ile spermin kanallarının geçtiği mediastinum testis denilen yapı bulunur. Extremitas superior üst uç olup kaput epididimise yerleşmiştir. Extremitas inferior testis'in alt ucu olup kauda epididimis ile örtülüdür (10).



Şekil 1: Testislerin Genel Görünümü (22)

Testislerin arteriyel kanlanması büyük ölçüde testiküler arterler tarafından sağlanır. Abdominal aorta'nın dalı olan testiküler arterler önemli yapılarla komşuluk yapar. İnguinal kanaldan geçerek skrotuma ulaşan testiküler arter, testis yüzeyinde dallanır. Bu dalların yerleşimi önemli olup girişimsel işlemler sırasında vasküler yapılara zarar verilmemesi bakımından önem taşır. Testiküler arterler dışında, diferansiyel arter ve kremasterik arter de testislerin arteriyel kanlanmasına katkıda bulunur. Testislerin venöz drenajı, mediastinumdan çıkan, birbirleriyle bağlantılı küçük venler aracılığıyla gerçekleşir (12).

Testisin posteriorundan çıkan testiküler venler, plexus pampiniformis olarak duktus deferensin önünden yukarı uzanır, inguinal kanaldan geçerek abdomene ulaşır. Abdomen içinde bu venler birleşerek testiküler arterin her iki yanında yükselen bir çift testiküler ven meydana gelir. Daha sonra her bir taraftaki bir çift ven birleşerek tek bir testiküler veni oluşturur. Sağ testiküler ven, renal venin hemen altından vena cava inferior'a açılırken; sol testiküler ven sol renal vene açılır (12).

Testisin anjiogenezinde temel yapı lenfatikler, paraaortik ve interaortokaval lenf nodüllerine drene olmasıdır. Testis ve epididimin innervasyonu iki yolla olur. Bir kısmı renal ve aortik pleksuslardan çıkar ve gonadal damarlarla innerve olur. Bir başka yol olan gonadal afferent ve efferent sinirler pelvik pleksustan çıkarak testis ve epididimisin innervasyonunu gerçekleştirmektedir (13). Bazı afferent ve efferent sinirler karşı taraf pelvik pleksusuna karışabilirler (14). Bu nöral çapraz komünikasyonlar, bir testiste patolojik olayların karşı taraf testisin fonksiyonlarını da etkileyebileceğini açıklar. Genitofemoral sinirin genital dalları, tunika vajinalis ve skrotumun duyarlılığını sağlar (15).

2.3. Testis Histolojisi

2.3.1. Genel Bilgi

Testisler, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Fetüsün gelişmesi sırasında göç ederler ve skrotum içinde spermatik kordonların uçlarında asılı olarak bulunurlar. Skrotum içinde yer alan testisler 15 gr. ağırlığında oval görünümlü olup, dıştan üç tabakalı kalın bir kapsül ile kuşatılmıştır. Kapsülün dış tabakası **tunika vajinalis (T.Vj.)**, orta tabakası **tunika albuginea (T.A.)** ve iç tabakası **tunika vasküloza (T.V.)** olarak isimlendirilir. Tek katlı mezotelyal hücrelerden oluşan tunika vajinalis genellikle preparatlarda görülmez. T.Vj., testisin ön ve yan yüzeylerini çevreleyen kapalı seröz kesenin visseral tabakası peritondan köken alır. Bazal lamina üzerine oturan visseral tabakası yüzeyde skrotum üzerine uzanarak bu tabakanın pariyetal tabakasını oluşturmaktadır. Visseral ve pariyetal tabakalar arasında seröz boşluk bulunmaktadır. Bu boşluk testisin serbest bir şekilde hareket etmesini sağlamaktadır (16).

Kapsülün en kalın ve belirgin tabakası, yoğun bir fibroelastik bağ dokusuna sahip olan tunika albugineadır (T.A.). T.A., bazal lamina ile tunika vaginalisten ayrılmıştır. Düz kas hücreleri testisin posterior yüzeyinde yoğunlaşmıştır. T.A., testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. T.V testiküler kapsülün en iç tabakasıdır. Kan damarlarından zengin gevşek bağ dokusundan oluşmuştur (16).

Kapsülden testisin içine uzanan T.A. ince bağ dokusu uzantılarıyla testisi yaklaşık 250 kadar lobüle ayırır. Lobüller içerisinde, toplam uzunluğu 280-400 m. olan 600-1200 seminifer tübül bulunur. Her testis lobülü kan, lenf damarları, sinirleri ve interstisyel hücreleri (**Leydig hücreleri-L.H.**)içeren gevşek bağ dokusu ile sarıdır (16).

Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan sperm üretirken, L.H. de testiküler androjenleri salgılar. Mediastinumda, seminifer tübüller tübüli rektive ve rete testise açılır. Buradan 12-15 adet duktuli eferentes ile devam eder. Bu kanallar testis sıvısını ve spermleri duktus epididimisin proksimal bölümüne aktarır (16,17).

2.3.2.Seminifer Tübül Histolojisi

Seminifer tübüller, 150 µm. genişliğinde ve 80 cm. uzunluğunda rete testise açılan tüplerdir. Seminifer tübülleri bazal membran, yassı miyoid hücrelerden oluşan bir tabaka ve bağ dokusu çevreler. Myoid hücreler, testis tübüllerinde spermin ilerlemesini sağlayacak kontraksiyondan sorumludur. Seminifer tübüllere desteklik yapan bağ dokusu yapısındaki membrana propria 4 tabakadan meydana gelmiştir (18).

1. **İç hücresel olmayan tabaka;** kollajen lifler, glikoprotein ve hyaluronik asidi içeren tabakadır.
2. **İç hücresel tabaka;** peritübüler düz kas hücreleri olarak adlandırılan, ince ve uzun şekilli miyoid hücreleri içeren tabakadır. Myoid hücreler mezenşimal hücreler olup ortama göre çeşitli hücre tüplerine dönüşürler. Bu hücreler her iki yüzeylerinde küçük girintiler içerir ve hücrelerin çekirdekleri ince, uzundur. Myoid hücre sitoplazmasında bol miktarda granüler endoplazmik retikulum, lipid damlacıkları, mikropinositotik veziküller ve miyofilamanlar bulunur.
3. **Dış hücresel olmayan tabaka;** glikoprotein yapısında, PAS (Periyodik Asit Schiff) pozitif boyanan en dıştaki bazal laminadır. Kalınlığı iç hücresel olmayan tabakanın sadece bir laminası kadar olup, Klinefelter sendromunda ve fazla ısıya maruz bırakıldığında oldukça kalınlaşır.
4. **Dış hücresel tabaka ise;** endotel hücrelerinden oluşmuştur (18).

Seminifer tübül epiteli çok katlı epitel özelliğinde olup, başlıca Sertoli hücrelerini ve farklı gelişim aşamalarındaki spermatogenik hücreleri içerir.

2.3.3.Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, destek hücreleri olup seminifer tübüllerde spermatogenik hücreler arasında yerleşim gösterirler. Testiste önemli fonksiyonları bulunur. Bu hücreler puberteye kadar seminifer tübüllerin en yoğun hücre tipidir, puberteden sonra hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Tübülün bazal laminası üzerine oturmuş olan Sertoli hücreleri tübül boyunca düzgün aralıklarla yerleşim gösterirler. Sertoli hücrelerinin sınırları düzensiz olup belirgin değildir. Soluk boyanan ve oval şekilli olan çekirdeği hücre tabanının biraz yukarısında gözlenir. Bir tarafında derin bir yarık bulunan çekirdeğin içerisinde, Sertoli hücrelerini spermatogenik hücrelerden ayırt etmeyi sağlayan oldukça belirgin bir çekirdekçik bulunur. Elektron mikroskopta, Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında dağınık halde serbest ribozomlar, primer ve sekonder lizozomlar ile çok iyi gelişmiş agranüler endoplazmik retikülüm ve az gelişmiş granüler endoplazmik retikülüm görülür. Lipid damlacıkları yönünden zengin bu hücrelerde tübüler tip mitokondriyonlar ve gelişmiş bir Golgi kompleksi gözlenir. Çoğu hayvan türlerinde gösterilemeyen, protein yapısında olan ve Sertoli hücre çekirdeği yakınında bulunan kristalloid cisimcik görülebilir. Bu yapıya **Charcot-Böttcher** kristali adı verilir (19,20).

Sertoli Hücre Fonksiyonları

1. Gelişen sperm hücrelerinin beslenmesi, desteklenmesi ve korunması,
2. Spermiyogenez sonunda oluşan sitoplazma artıklarının fagosite edilmesi,
3. Seminifer tübül lümenine olgun spermin salınımının sağlanması,
4. Seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılanması,
5. Seminifer tübül lümeninde spermatogenez için gerekli olan testosteron konsantrasyonunu arttıran androjen bağlayıcı proteinin (ABP) üretilmesi ve salgılanması,
6. Hipofiz bezinden FSH (folikül uyarıcı hormon) salınmasını önleyen inhibin hormonunun salgılanması,

7. Anti-Müllerian (Müllerian inhibe edici) hormonun üretilmesi ve salgılanmasıdır. Bu hormon üreme organlarının gelişimi sırasında Müller kanallarının gerilemesini sağlar. Testosteron ise Wolf (mezonefrik) kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlar.
8. Kan testis bariyerini sağlamak (20).

Kan Testis Bariyeri

Seminifer tübüllerin iç kısmıyla kan arasında bir bariyerin bulunması, testiküler sıvıda kandan gelen çok az madde bulunmasına yol açar. Testiküler kapiller pencere tiptedir ve büyük moleküllerin geçişine izin verir. Spermatogonyumlar kanda bulunan maddelere kolayca ulaşabilir. Ancak, Sertoli hücreleri arasında bulunan engelleyici bağlantılar, bir bariyer oluşturarak büyük moleküllerin Sertoli hücreleri arasındaki boşluğa taşınmasını engeller. Böylece, spermatogenezin daha ileri aşamalarındaki germ hücreleri, kandaki zararlı maddelere karşı korunmuş olur (20).

Kan-testis bariyerinde hücresel ayırım bazal ve luminal kompartmanda farkındalık oluşturur. Bazal kompartmanda spermatogonyumlar ve genç spermatositler (leptoten, zigoten), luminal kompartman da ise olgun spermatositler (pakiten), spermatidler ve spermiler bulunur (20).

Bazal kompartman, interstisyel damarlar ile spermatogenik hücreler arasında kısmen serbestçe madde değişimine olanak sağlarken adluminal kompartman ise madde değişimini engeller. Adluminal kompartmanda bulunan ve gelişmekte olan spermatosit ve spermatidlerin besin ve diğer maddelerden yararlanmaları Sertoli hücrelerine bağlıdır. Spermatositler ve spermatidler, bariyerin üzerinde, Sertoli hücrelerinin yan ve üst kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin kuyrukları geliştikçe, bunlar Sertoli hücrelerinin üst uçlarından çıkan saçaklar halinde görülürler. Sertoli hücreleri epitel döngüsünün ilişkilerinde önemli olan gap junction bağlantı birimleri ile bağlanmıştır ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır (20). Kan-testis bariyeri kan dolaşımı sırasında antijenlerin geçişini önler ve lümene yakın bölgede bulunan spermatogenik hücreleri immün sistemin etkilerinden koruyarak

bireyin kendi spermine karşı otoimmün cevap oluşumunu önler. Aynı zamanda kandan zararlı maddelerin germinal epitele geçişini de engeller. Bu bariyer sayesinde spermatogenik hücrelerin gelişimin mayoz safhasında dış etkenlerden daha fazla etkilenme riski olduğundan bu bariyer sayesinde spesifik korunurlar. Ayrıca, mayoz geçirdikten sonra haploid hale gelen germ hücrelerinin vücut immün sistemi tarafından tanınmaması nedeniyle yıkılmalarına engel olur (20).

Sertoli hücreleri, insanda ve diğer hayvanlarda üreme çağı süresince bölünmezler. Enfeksiyon, kötü beslenme, X- ışınlarına maruz kalma gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklı hücrelerdir ve bu zararlı etkilere maruz kaldıklarında sağ kalım oranları spermatogenik seri hücrelerine göre çok daha yüksektir. Memelilerde spermatozoonlar, Sertoli hücresinin apikal sitoplazmasında bulunan mikrotübüller ve mikrofilamentlerin katılımıyla, hücre hareketleri sonucu salınırlar (19,21).

2.3.4.Spermatogenik Hücreler

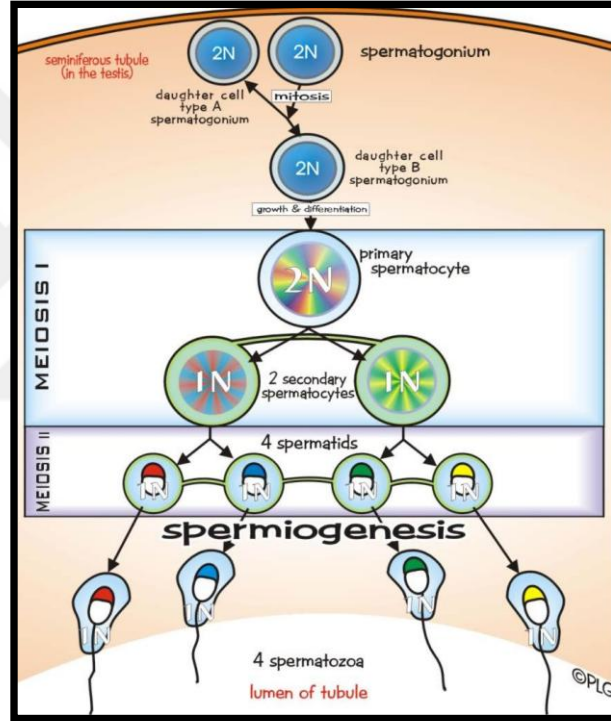
Spermatogenez ilkel germ hücresi olan spermatogonyumlardan, olgun germ hücresi olan sperm üretim sürecidir. Spermatogenik hücreler, insanda olgunlaşmasını 64 günde tamamlayan ve çoğalabilen hücrelerdir. Süreç ilkel primitif bir germ hücresi olan spermatogonyum ile başlar ve iki aşamada tamamlanır:

1. Spermatositogenez
2. Spermiyogenez

Spermatositogenez: Spermatogonyumlar, yaklaşık 12 µm çapında, bazal laminanın hemen üstünde yer alan hücre grubudur. Sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi sıkı bağlantıların altında yerleşim gösterdikleri için kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar. Üç temel morfolojik spermatogonyum tipi gözlenir: **Tip A** koyu spermatogonyumlar, seminifer epitelin kök (stem) hücreleridir. Yoğun bazofilik ve ince granüler kromatinli oval çekirdek içerir. Puberteden itibaren mitotik hücre bölünmeleri geçirecek koyu veya açık tip A spermatogonyumları oluştururlar. Tip A açık spermatogonyumlar, soluk boyanan, ince granüler kromatinli oval çekirdek içerirler.

Mitotik bölünmeleri sonucunda farklanarak Tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip B spermatogonyumlar, merkezi yerleşimli çekirdeciğe sahip oval çekirdek içerirler. Çekirdek kromatini çekirdekçik çevresinde ve çekirdek zarı boyunca yoğunlaşma gösterir (Şekil-2).

Spermatogonyum A hücreler kısmen sessiz hücrelerdir ve bu nedenle radyasyon ve kanser kemoterapisine dirençlidir (7). Mitotik olarak bölünen spermatogonyumlar, mayotik bölünen spermatositler ve farklılaşmakta olan spermatidler kanser kemoterapisine ve radyasyona duyarlıdır.



ŞEKİL2: Spermatogenezis (23)

Primer spermatositler, 46 kromozom (44+XY) ve 4n DNA içerir. Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmeleri sonucu oluşan primer spermatositler, DNA sentez fazını tamamladıktan sonra 1. mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Bu safhada leptotende her bir homolog kromozom 2 kardeş kromatidten oluşur, zigotende homolog kromozomların sinapsı başlar ve aralarında sinaptonemal kompleks oluştururlar, pakitene geldiklerinde kardeş olmayan kromozomlar arasında crossing-over başlar. Diploten de artık crossing-over sonlanırken kromozomlar arasında birden fazla kiyazma ile bağlantılı tetralar oluşur.

Diakinez safhasına ulaştıklarında kromozomlar kısalıp kalınlaşır, sinaptonemal kompleks dağılır ve bir mükrotübül ipliği gelişmeye başlar. Daha sonra kromozomlar metafazda ekvator düzleminde toplanırlar ve anafazda kardeş kromatidlerin her biri bir kutba doğru giderler. Bu bölünmede profazın yaklaşık 22 gün dolayında bir süre alması nedeniyle mikroskopta incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu bu fazda görülürler. Spermatogenik seride en büyük hücreler çekirdeklerindeki sinaptonemal kompleksin varlığıyla karakterize primer spermatositlerdir. Sinaptonemal kompleksin oluşumunda Box-20 geni önemli rol oynar. Birinci mayoz bölünmeden sonra oluşan **sekonder spermatositler** $2n$ DNA ve 23 kromozom ($22+X$ veya $22+Y$) içerir. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin görülmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa süre kalan ve hızla ikinci mayotik bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir (19,21).

Sekorder spermatositlerde kromozomlardaki bu sayıca azalmaya (46'dan 23'e) her hücredeki DNA miktarının eksilmesi ($4n$ 'den $2n$ 'e) eşlik eder. Sekonder spermatositlerin bölünmesi 23 kromozom içeren iki hücrenin, **spermatidlerin** oluşmasıyla sonuçlanır. Spermatositlerde birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında S fazı (DNA sentezi) görülmediği için, ikinci bölünmeden sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (n) hücreler meydana gelir.

Böylece, mayoz bölünme sürecinin sonunda haploid sayıda kromozom içeren hücreler oluşur. Fertilizasyonla bunlar normal diploid sayıya dönerler (20,21).

Spermiyogenez sperm üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan sperme dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermatidler, 7-8 μm çapında olup yoğunlaşmış kromatin bölgesi çekirdeği ile ayırt edilir. Seminifer tübüllerde lümen yakınında (juktalüminal) yerleşmişlerdir.

Spermiyogenez, akrozom oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, flagellum gelişmesini ve sitoplazmasının çoğunun kaybolmasını içeren karmaşık süreçtir. Yeni oluşmuş spermatid, merkezi yerleşimli bir çekirdek, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondriyonlara ve bir çift sentriyole sahiptir. Spermatidin matür sperme farklılaşma süreci 3 faz içerir. Bu fazlar, spermatidlerin özel bağlantılarla

Sertoli hücre membranına fiziksel olarak bağlandığında oluşurlar. Bu sürecin sonunda olgun spermiler oluşur (19,21).

Golgi fazı, spermatid sitoplazması, çekirdeğin yakınında yer alan belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriyonlar, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz yüzlü endoplazmik retikulum içerir. Proakrozomal granüller olarak adlandırılan küçük PAS-pozitif granüller Golgi kompleksinde birikir ve daha sonra birleşerek membranla sınırlı bir **akrozomal vezikülün** içinde yer alan tek bir **akrozomal granülü** oluştururlar. Sentriyoller göç ederek oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden çekirdeğe hareket ettikçe aksonemal bileşenleri çevresine sarar.

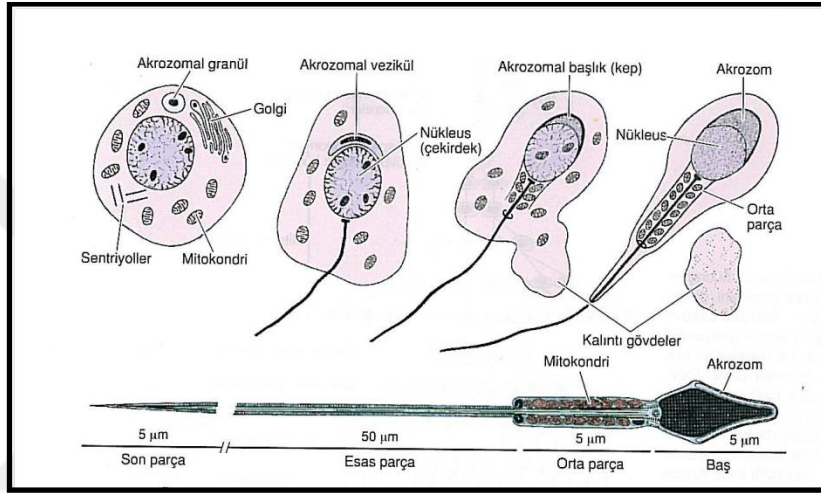
Akrozomal faz, akrozomal vezikül ve granül olarak, yoğunlaşan çekirdek ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra **akrozom** adını alır. Akrozom, hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer proteazlar gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden lizozomun özelleşmiş bir tipi olarak işlev görür. Bu enzimlerin, oositleri çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı erittiği bilinmektedir.

Spermiler bir oositle karşılaştığında, akrozomun dış membranı birçok bölgede sperm plazma zarı ile kaynaşarak akrozomal enzimlerin (proteaz, asit fosfataz, hiyaluronidaz ve nöraminidaz) hücre dışına boşalmasını sağlar.

Bu işlem **akrozomal reaksiyon** olarak bilinir ve oositi saran korona radyata ve zona pellusida'yı sperm girişini kolaylaştırmak için fertilizasyon anında salınır. Spermiyogenezin bu evresinde spermatid, seminifer tübülün merkezine doğru yönelir ve aksonem yönüne doğru uzanır. Ayrıca, çekirdek uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek distal sentriyolden **flagellumu** oluşturur. Flagellum keratin içeren dış yoğun lifler ve bir fibröz kılıf ile çevrili bir aksoneme (9+2 mikrotübül düzenine) sahiptir (20). Flagellumun proksimal kısmında mitokondriyonlar toplanarak **orta parça** adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge, sperm hareketlerinin enerji kaynağını oluşturur (21). Mitokondriyonların bu şekilde yerleşmesi, bu organellerin hücre hareketi ile ilgili ve yüksek enerji tüketimi

olan bölgelerde yoğunlaşmasının bir örneğidir. Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve **dynein** denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur (21).

Matürasyon (Olgunlaşma) fazı geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermler tübülün lümenine salınırlar ve bu olaya spermiyasyon adı verilir (şekil-3).



Şekil-3: Spermatidin matür sperme farklı evreleri (21)

Sperm, duktus epididimise **testis sıvısı** olarak adlandırılan ve Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilen uygun bir sıvı aracılığı ile aktarılır. Bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla ilişkili androjen bağlayan protein içerir.

Olgun bir sperm baş ve kuyruk elemanlarına sahiptir. **Baş bölgesi** çekirdek ve akrozom plazma membranı ile sarılıdır. **Bağlantı parçası** çekirdeğe tutunmuş proksimal sentriyol ve aksoneme kaynaklık eden distal sentriyolden oluşmaktadır. **Orta parça** sperm kuyruğunun baş bölgesinden sarmal şekilde dizilmiş mitokondriyal kılıfa kadar uzanır. 9+2 mikrotübüler aksonem kuyruğun merkezini kaplar. Mitokondriyal sarmal yapıdaki kılıfla aksonem arasında dokuz dıştan yoğun lif kılıfı bulunur. **Annulus** son halka kısmı ise mitokondriyon sarmalın son dönümünün altında yoğun bir halka bölgesi olup orta parçanın esas parçaya dönüştüğü bölgedir. **Esas parça** annulustan uzanır ve mitokondriyon içermez, iki uzunlamasına dairesel yerleşimli fibröz kılıf iskeleti yedi dış yoğun lif merkezi aksonemden oluşur. **Son parça** sadece hücre zarı ile sarılmış mikrotübül yapısındadır (20).

2.3.6.İnterstisiyel Alan

Testisin serminifer tübülleri arasındaki alanlar interstisiyel alan olarak isimlendirilir ve Leydig hücreleri, gev sek bağ dokusu elemanları olan fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajları, sinirler, kan ve lenfatik damarları içermektedir. Testiküler kapillerler pencerele tiptedir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine olanak sağlar. İnterstisiyel alanın, lenf damarlarından zengin olması, bu organdan alınan interstisiyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliğini açıklamaktadır (19).

Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri kan damarları ve lenfatik kanal veya sinozoidler yakınında, intertübüler alanda yerleşmiştir. Hücre yapısı yuvarlak ya da poligonal şekilli olup, eozinofilik bir sitoplazmaya sahip merkezi yerleşimli çekirdek kaba kromatin granülleri ve belirgin çekirdekçik içerir. Karakteristik tübüler kristalı mitokondriyonlar, lipid damlacıkları ve iyi gelişmiş düz y zly endoplazmik retikulum (DER) lipofuksin granülleri ile **Reinke** kristallerine sahiptir (16,19).

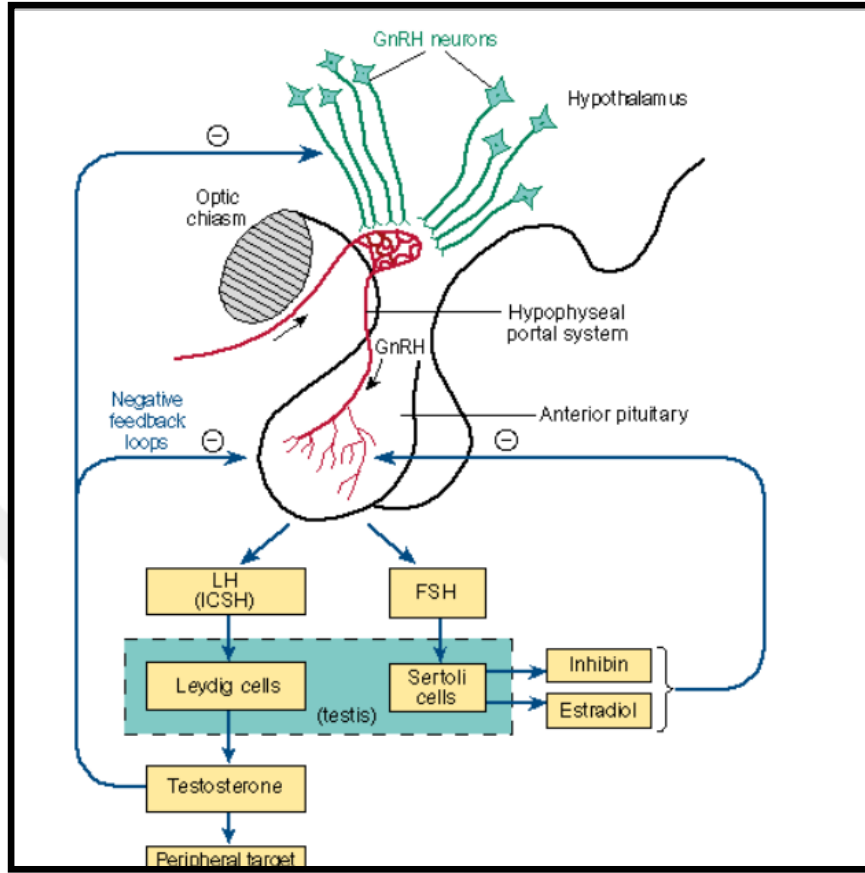
Leydig hücrelerindeki organellerin ve inklüzyonların çoğu testesteron sentezini ve salgısını düzenler. Testesteron öncüsü kolesterolden üretilir. Kolesterol ya doğrudan DER zarlarında sentezlenmekte ya da dolaşımdaki d şuk yoğunluklu lipoprotein moleküllerinden oluşmaktadır. Zarla sarılı olmayan lipid damlacıklarında gerektiğinde kullanılmak üzere kolesterol depolanır. Taşıyıcı proteinler kolesterolü mitokondriyonun i  zarına aktardıktan sonra mitokondriyonlar luteinizan hormon (LH) etkisi ile kolesterolü pregnanolona çevirir. Sentezlenen pregnanolon mitokondriyon zarından DER'e aktarılır. DER  zerindeki enzimler pregnanolon üzerinden başka değişiklikler gerçekleştirerek testesterona d n şt r rl r. Mikrovilluslar aracılığıyla hücre zarından hızla difüze edilir. Böylece hücre dışı aralığa salınan testesteron hızla dolaşımdaki steroid bağlayıcı proteinlere bağlanır. İnterstisiyel hücrelerin hem aktiviteleri ve hem de miktarları hormonal uyanlara bağlıdır. İnsanda gebelik sırasında üretilen plasental

gonadotropik hormon, maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten, fetal testiküler interstisiyel hücreleri uyarır. Androjenik hormonlar, gelişim sırasında, erkek genital organların farklılaşması için gereklidir (20,21).

2.3.5.Spermatogenezi Etkileyen Faktörler: Spermatogenez sürecinde en önemli rolü hormonlar oynar. Spermatogenez, hipofizden salgılanan FSH ve LH hormonlarının testis hücreleri üzerindeki etkisine bağlıdır. Bu hormonlar, spermatogenetik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron üretimini uyarırlar. FSH'ın Sertoli hücreleri üzerinde etkili olduğu ve adenilat siklazı uyararak cAMP düzeylerini artırdığı bilinmektedir. cAMP'nin artışı inaktif kolesterol esterazlarını aktive eder, lipid damlacıklarından serbest kolesterol açığa çıkar. Kolesterol mitokondri ve SER ile testesterona dönüştürülür. Kan testesteron seviyesi düşük ise FSH Sertoli hücrelerinden ABP (**androjen bağlayıcı protein**) salgılanmasını uyarır. ABP testesterona bağlanarak hormonun bu bölgeden ayrılmasını engeller. ABP Östrojene bağlanarak spermatogenezi engeller. Bu protein, testosteronu bağlayarak seminifer tübüllerin lümenine taşır (Şekil-4).

Testesteron erkek görünümü ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi, seminal veziküllerin, prostatın, bulbouretral bezlerin işlevleri için gereklidir. Bu hücreler 5 α -redüktaz üretir. Testesteron dihidrotestesterona dönüştürülür.

Ortalama vücut sıcaklığının (37°C) altındaki sıcaklıklarda gerçekleşen spermatogenezin düzenlenmesinde sıcaklık çok önemlidir. Testislerdeki sıcaklık yaklaşık 35°C'dir ve çeşitli mekanizmalar aracılığıyla kontrol edilir. Testiküler arteri zengin bir venöz ağ (**pampiniform pleksus**) sarar ve testislerdeki sıcaklığın korunmasında önemli olan, kanın karşı yönde işleyen bir sıcaklık değişimi ile soğutulmasıdır. Diğer etkenler, terin skrotumdan buharlaşmasıyla ısı kaybı ve spermatik kordonun kremaster kaslarının kasılmasıyla testislerin daha yüksek sıcaklıklarda kalabileceği inguinal kanala çekilmesidir (20).



Şekil-4: Erkek üreme sistemi endokrin düzenlemesi (24)

2.3.6. Testis İçi Genital Kanallar

Testis içi kanallar, **tubuli rekti**, **rete testis**, **duktuli efferentes**'lerdir. Bu kanallar seminifer tübüllerden gelen sıvıyı ve spermeleri duktus epididimise taşır. Seminifer tübüllerin çoğu kangal biçimde kıvrılmıştır ve her iki uçtan rete testise **tubuli rekti** olarak bilinen düz tübüllerle bağlanır. Spermatogenik hücrelerin giderek ortadan kaybolduğu bu tübüllerin başlangıç bölümü yalnızca Sertoli hücrelerinden oluşur. Bu başlangıç bölümü sıkı bağ dokusu ile desteklenen ve prizmatik epitel hücreleri ile döşeli ve oldukça fazla anastomoz içeren kanallar ağıdır. Düz seyirli seminifer tubüller mediastinum testiste yer alan **rete testise** açılır. Tunika albugineanın kalınlaşması ile oluşmuş mediastinum içinde bulunur. Rete testis tek katlı kübik veya alçak prizmatik epitel ile döşeli düzensiz, anastomozlaşan kanallardır. Epitel hücreleri tek bir apikal kinosilya ve birkaç mikrovillus içerir (21).

Epitelin yaslandığı bazal membran, mediastinumun bol kan damarları ve bağ dokusu ile sarıdır (21). Rete testisten 10-20 kadar **duktuli efferentes** çıkar. Bu kanallar, epididimis yönüne doğru hareket sağlayan kinosilyalı hücrelerle değişimli olarak kinosilyasız kübik hücre gruplarından oluşan bir epitele sahiptir. Bu, epitele deniz tarağı biçimindeki karakteristik görünümünü verir. Kinosilyasız hücreler seminifer tübüllerden salgılanan sıvının çoğunu emer. Kinosilyalı hücre aktivitesi ve sıvı emilimi, spermlerin epididimise doğru süpürülmesini sağlayan bir sıvı akımı sağlar. Epitelin bazal laminasının dışında sirküler olarak dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşan ince bir tabaka vardır. Duktuli efferentese doğru giderek birleşip epididimisin duktus epididimisini oluşturur (21).

2.3.7. Genital Boşaltım Kanalları

Testiste üretilen spermleri penise doğru taşıyan kanallar **duktus epididimis, duktus deferens (vas deferens)** ve **üretradır**.

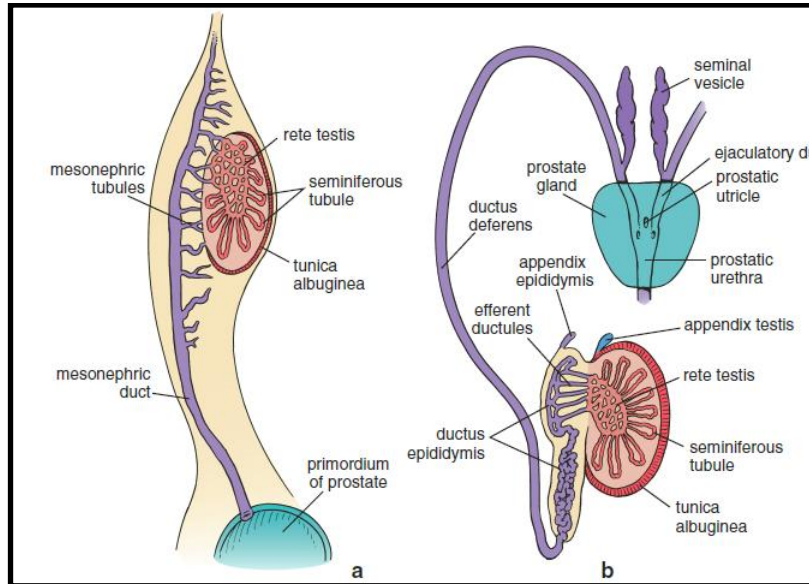
Duktus epididimis, yaklaşık 4-6 m uzunluğunda ve 400 µm çapında, tek ve oldukça kıvrıntılı bir kanaldır. Baş ve kuyruk kısımları bulunmaktadır. Kübik bazale yerleşimli hücreler ve yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Tek sıralı düz kas hücreleri ve kapiller damarlardan zengin bağ dokusu ile çevrelenmiş bir bazal lamina üzerine yerleşmiştir. Düz kas hücreleri peristaltik kasılmalarla spermin kanallar boyunca ilerlemesine yardım eder. Epitel hücrelerinin yüzeyleri **stereosilya** adı verilen, uzun, dallanmış düzensiz mikrovilluslar ile kaplanmıştır. Epitelde bazal ve esas hücreler yer alır.

Kuyruk kısmı spermlerin hareket yeteneğini kazandığı ve depolandığı yerdir. Ayrıca, gliserofosfokolin ve diğer glikoproteinlerin salgısı da duktus epididimiste gerçekleşerek spermlerin kadın üreme sistemine ulaşana kadar kapasitasyonu sağlanmış olur. Bu bölgede luminal sıvı geri emilimi ve sitoplazmik artıkların fagositozu sağlanır (16).

Epididimisten **duktus (vas) deferens** adı verilen kalın musküler duvarlı düz kanal devam ederek prostatik üretraya açılır. Bu kanalın tipik olarak dar bir lümeni ve kalın bir düz kas tabakası vardır. Mukozası uzunlamasına kıvrımlar oluşturur; çoğunlukla stereosilyalara sahip yalancı çok katlı prizmatik epitel ile kaplıdır.

Bazal laminanın altındaki bağ dokusu fibroelastik yapıdadır. Fibroelastik tabakayı içte ve dışta uzunlamasına ortada dairesel 3 düz kas tabakası, onu da ince gevşek bağ bir dokusu kuşatır (16,21).

Duktus deferens, spermatik kordonun bir parçasını oluşturur. Bu kordon testiküler arter, pampiniform pleksus ve sinirleri içerir. Duktus deferens prostata girmeden önce genişler ve **ampulla** denilen bölümü oluşturur. Bu alanda epitel kalınlaşır ve oldukça fazla kıvrımlanır. Ampullanın son kısmında vesikula seminalis'ler duktus deferense katılırlar. Bundan sonra duktus deferens prostata girer ve prostatik üretraya açılır. Prostata giren segmente **duktus ejakulatoryus** denir. Duktus ejakulatoryus basit prizmatik epitele sahiptir. Epitel altında bağ dokusu kıvrıntılı bir yapı göstermesi nedeniyle lümen düzensiz görünür. Duktus deferensin mukoza katmanı ampulla boyunca duktus ejakulatoryusun içine kadar devam ederken, kas tabakası ampulladan sonra bitmektedir. (16,21).



Şekil-5. Genital boşaltım kanalları (21)

2.3.8. Yardımcı Genital Bezler

Yardımcı genital bezler, erkeklerde üreme işlevinin sürdürülmesi için gerekli salgıları üretir. Bu bezler **vezikula seminalis**, **prostat bezi** ve **bulboüretal bezlerdir**.

Vezikula seminalis, uzunlukları 15 cm olan iki adet oldukça kıvrımlı kanaldır. Mesanenin arka yüzüne yerleşim gösterirler. Doku kesitleri alındığında aynı kanal farklı yönlerde gözlenebilir. Epiteli; yalancı çok katlı prizmatik epitel, altında fibroelastik bağ dokusu, içte dairesel dışta uzunlamasına düz kas tabakası en dışta da ince fibroelastik bağ dokusu ile sarılıdır. Vezikula seminalis viskoz, sarımsı renkte, Vitamin C, fruktoz, sitrat, inozitol, prostaglandinler ve çeşitli proteinler gibi spermleri aktive eden maddeleri içeren bir salgı üretir. Prostaglandinler servikal mukusla reaksiyona girerek, sperm hareketleri için uygun bir ortam oluşturur, Spermin ovuma ulaşması için uterus ve fallop tüplerine zıt yönde peristaltik kasılmalarını sağlar (19). Erkek üreme sistemi ile ilişkili bu bezler tarafından üretilen ve seminal sıvıya salınan karbonhidratlar, sperm hareketi için enerji kaynağını oluştururlar.

Fruktoz, bu karbonhidratlar içinde en fazla bulunan monosakkarittir. İnsan ejakülatının % 70'i seminal veziküllerden kaynaklanır. Seminal veziküllerdeki epitel hücrelerinin boyutları ve salgılama süreçlerinin işlevsellik derecesi testosteron düzeylerine bağlıdır (20,21).

Prostat en büyük yardımcı bezdir. 30-50 adet dallanmış tübüloalveoler bezden oluşur. Bezleri son derece zengin bir fibromüsküler stroma çevreler. Stroması kapsülden köken alır ve bağ dokusu ve düz kas hücreleri içerir. Prostat bezi kapsülü, damardan zengin, düzensiz sıkı bağ dokusu ve düz kas hücreleri içerir. Kapsülden çıkan septumlar bezin içine doğru uzanırlar ve bezi bölmelere ayırırlar; bu bölmeler erişkin erkekte kolayca seçilemez. Bu bezlerin kanalları prostatik üretraya boşalır. Prostatik bezler üç bölgede düzenlenmiştir. Periüretal mukozal bezler, periüretal submukozal bezler ve

esas bezler olarak adlandırılan periferel bileşik bezlerdir. Bezler tek katlı ya da çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Lümen glikoproteinden zengin ve bazen kalsiyum birikme alanı olan prostatik taşlar(corpora amilasea) içerir (25).

Hücreler bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksine sahiptir. Prostat sıvısı alkalen, yani baziktir. Prostat sıvısı; su, sitrik asit, asit fosfataz, amilaz, kolesterol, kalsiyum, çinko, tamponlayıcı tuzlar, fosfolipidler, prostaglandinler, fibrinojen, seminaplazmin adı verilen antibiyotik, β -mikroseminoprotein ve prostat spesifik antijen (PSA) içerir. Prostat salgısındaki elemanların yapısı net olarak bilinmemekle beraber işlevleri konusunda çeşitli fikirler mevcuttur. Örneğin; sitrat, osmotik dengenin sağlanmasında rol oynar. Çinkonun, bakteriyostatik işlevi olduğu düşünülmektedir. Prostatik asit fosfatazın (PAF) semendeki görevi net olarak bilinmemekle birlikte metastatik prostat kanseri hücreleri bu enzimi kana salgıladıkları için klinik önemi vardır (25,21). Prostat sıvısının alkalik özelliği, ovumun başarılı bir şekilde fertilizasyonu için çok önemli olabilir. Pıhtılaşma enzimi, seminal vezikülden gelen fibrinojeni etkileyerek zayıf bir pıhtı oluşturur. Bu olay servikste ve vajinanın derinliklerinde semenin tutunmasına yardım eder. Pıhtı, sonraki 15-30 dakika içinde, profibrinolizinden oluşan fibrinolizin ile çözünür ve eritilir. Pıhtının çözünmesi ile spermlerin yüksek hareketlilik kazandığı görülür (21).

Bulboüretal bezler (Cowper bezleri), çapları 3-5 μ m çapında ve üretranın membranöz kısmının proksimalinde yerleşerek buraya boşalan bezlerdir. Mukus salgılayan tek katlı prizmatik epitel ile döşeli tübüloalveoler bezlerdir. Her bezi loblara ayıran septumlarda iskelet ve düz kas hücreleri bulunur. Salgısı, kayganlaştırıcı işlevi gören berrak bir mukustur. Semene ilk karışan salgı bu bezin salgısı olup, asit idrarın geçtiği üretra alanını alkalileştirir ve kayganlaştırır (21) .

2.4. TESTİS TORSİYONU

Testis torsiyonu (TT), ilk olarak 1840'da *Delasiauve* tarafından tanımlanmış olup, yenidoğanlarda ilk kez 1897'de *Taylor* tarafından rapor edilmiştir. Testis torsiyonunun damarlanma açısından ve acil müdahale gerektiren bir durum olduğunun kabulü uzun zaman almıştır (26).

TT, çocukluk ve gençlik çağlarındaki erkeklerde akut skrotumun ana nedenlerinden biridir. TT, spermatik kord ve diğer yapıların kendi eksenine etrafında dönmesi sonucu testis kan akımının bozulmasıdır (27). Klinikte testis torsiyonları 360°-720° arasında görülmektedir. Tedavi edilmezse testis dokusunda nekroz gelişmektedir (28).

Testis ve eklerinde 25 yaşına kadar torsiyon görülme oranı 1/4000'dir (29). TT, her yaş grubunda görülebmesinin yanında, özellikle pubertal dönem ve ilk 1 yaşta pik yapar. Olguların büyük çoğunluğunu pubertal dönemde ve yeni doğan grubu oluşturur. Cerrahi endikasyon gerektiren akut skrotum semptomlu çocuklar değerlendirildiğinde, apendiks testis torsiyonu % 45-57, spermatik kord torsiyonu % 26-27, epididimitis ise yalnızca % 10-11 oranında gözlenmiştir (28).

Torsiyonun sebebi genellikle bilinmemekte olup, çeşitli hazırlayıcı etkenlerden söz edilmektedir. Pubertede testis hacminin beş-altı kat artışı, bu dönemde torsiyon görülme riskini artırmıştır. Yine kremaster veya dartos kaslarının kasılması da testis torsiyonu sebeplerinden olabilir. Çevre ısısının 2°C'nin altına düştüğü ortamlarda torsiyonun daha sık görüldüğü bildirilmiştir (30). TT'nun etiyolojisinde; hiper mobil testis, testis ve ekleri arasında zayıf veya anormal bağlantı ve poliorşidopati vardır. Kriptorşizm, testis tümörü, spermatosel, spermatik kord eklerinde anomali, kısa kord torsiyonu, "clapper bell deformitesi" torsiyon için ortam oluşturur. TT riskini artıran diğer faktörler ise; pampiniform pleksus venlerinin trombozu, vaz deferensin aşırı hareketliliği, hiperaktif kremaster refleksi, gelişmemiş gubernakulum, vasküler

malformasyonlar, geçirilmiş skrotal cerrahi ve orşidopeksi olarak sıralanabilir. Ayrıca günlük yaşam aktiviteleri arasında yer alan birçok fiziksel aktiviteler; yüzme, kayak sporu, cinsel aktivite, kalçaların ani fleksiyonu, ağırlık kaldırma gibi durumların da torsiyonu tetiklediği bildirilmiştir. Ayrıca, soğuk havalarda (özellikle 15°C'nin altında) torsiyon riski daha fazladır. Yaz aylarında torsiyon riski azalır (31). TT, genellikle sol testiste görülürken, olguların % 2'sinde iki taraflıdır. Sol testis daha uzun bir spermatik korda sahip olduğundan sağ testise oranla iki defa daha sık torsiyone olur. İnmemiş ve retraktıl testislerde torsiyon olasılığı artmıştır (32). Testis torsiyonu ekstravaginal ve intravaginal olmak üzere iki şekilde oluşmaktadır.

2.4.1. Ekstravaginal Testis Torsiyonu

Bu torsiyon modeli Perinatal dönemde daha yoğun görülen TT çeşididir. İntravaginal TT'na göre daha nadir görülür. Bu dönemde testisin skrotuma inişi ile testiküler fiksasyon tamamlanamamış olduğundan torsiyon meydana gelebilir. İntrauterin torsiyonlar "vanishing testis" sendromundan sorumlu tutulmaktadır. Asemptomatik seyrettiğinden sıklığı tam olarak bilinmemektedir. Ekstravaginal TT genellikle testiküler atrofi ile sonuçlanır. Bu olgularda da erken cerrahi girişim ve kontralateral testisin fiksasyonu önerilmektedir (32).

TT'da kritik zaman dilimi ilk altı saattir. Bu dönemde testisin kurtarılma oranı %85-97'dir (27). 6-12 saatte bu oran %55-85 ve 12-24 saat arasında %20-80 iken 24 saatten sonra %10'un altına inmektedir (33).

2.4.2. İntravaginal Testis Torsiyonu

İntravaginal TT adolosan dönemde daha fazla gözlenmektedir. Uzun mezorsiyum ile testisin serbest hareketliliği "Bell-Clapper deformitesi" adı verilen anatomik yapı bozukluğuna sebep olarak intravaginal TT'a sebep olabileceği ileri sürülmüştür. Bu malformasyonda periton testise normalde olması gereken yerden daha yukarıda yapışmaktadır. Sonuçta testis daha transvers pozisyonda, serbest bir biçimde tunika vaginalis içinde asılı durmakta ve kolaylıkla torsiyone olmaktadır. Bu anatomik anomali genellikle bilateral testisin yakınlarındadır. Hayn ve arkadaşları 47 erkek çocukta bu anomaliyi spermatik kord torsiyon durumundan kaynaklandığını ve kesilen kord torsiyonu her durumda alanı etkilediği ve kontrolateral testisin % 88-90'ında da

etkileri olduğunu göstermiştir (34). Aniden kremasterin kasılması spermatik kordun kasılarak spiral şekil alması, mekanik tepki, cinsel ve ısı uyarıları testisin geri çekilip rotasyonel etkisine neden olabilir (28).

TT'da en göze çarpan bulgu başlangıçlı ve ciddi bir skrotal ağrıdır. Skrotal ağrı kasığa ve aynı taraf karın alt kadrana yayılır. Olguların dörtte birinde ağrıya bulantı, kusma gibi diğer sindirim sistemi şikayetleri eşlik edebilir. Bazı hastalarda skrotal travma ya da skrotumu ilgilendiren başka bir hastalık öyküsü vardır (32).

Fiziki muayene bulgularında skrotal-inguinal ağrı, yüksek yerleşimli testis, yatay ve horizontal olarak skrotomun üst kısmına yerleşim gösterir. Skrotumda ödem, eritem ile ipsilateral tarafta kremasterik refleksin azaldığı zamanla kaybolduğu görülür (29,35). Testis ve epididimisin eklemlerinin torsiyonun ayırıcı tanısı olarak düşünülmelidir. Appendiks testis torsiyonunda skrotumda mavi nokta işareti mevcuttur ve skrotum içerisinde mobil, hassas, sert bir nodül ele gelir. Pollakiüri, disüri gibi üriner sistem semptomları olması ve idrar tahlilinde piyüri görülmesi epididimitisi destekler (32).

Torsiyon düşünülen olgularda yapılacak ultrasonografi, ilk saatlerden itibaren büyümüş ve hipoekojen testisi gösterir. Tanıda yardımcı olabilecek güvenilir diğer tetkikler, renkli doppler ultrasonografi ile testis sintigrafisidir. Technetium-99 m. ile radyoizotop görüntüleme karakteristik olarak testiste izotop tutulumunun olmadığı görülür. İnflamatuar yanıtın göstergesi olarak, tutulum olmayan bölgenin etrafında halka şeklinde skrotal perfüzyonun varlığı, gecikmiş torsiyonu işaret eder. Doppler ile normal kan akımı ve etkilenen tarafta artmış perfüzyon epididimis ve bazen de appendiks testis torsiyonu ile uyumlu olabilir. Tedavisi detorsiyon ve reperfüzyondur. Narkotik analjezikler yardımıyla manuel detorsiyon denenebilir (36).

TT'da kan akımında sirküler düzeni bozulmaktadır. Başlangıçta venöz tıkanıklık oluşur. Bu durum, testiste ödeme ve ağrıya yol açar. Testisin tunikası elastik olmadığından, oluşan venöz konjesyon arteriyel dolaşımı bozar. Kan akımının azalması tıpkı diğer dokularda olduğu gibi testiste de hipoksiye neden olur. Deneysel çalışmalarda testiküler iskemiye en duyarlı olan hücrelerin başında spermatogonyum ve spermatositler olmak üzere germ hücreleri olduğu gösterilmiştir. Germ hücre apoptozunun testis torsiyonu ve reperfüzyonundan 24 saat sonra doruk noktaya ulaştığı,

reperfüzyondan 48 saat sonra gerilemeye başladığı belirtilmiştir (37). İskemi hasarının Leydig ve Sertoli hücreleri üzerine de önemli etkileri olduğu bildirilmiştir (38).

İskemik dokularda canlılığı korumak için temel prensip torsiyone olmuş testisin reperfüze edilerek kurtarılmasıdır. Reperfüze edilen testis dokusunu skrotuma yerleştirirken de tekrar torsiyone olmaması durumuna dikkat edilmelidir. Bu nedenle testis torsiyonlu olgulara zaman geçirmeden müdahale edilmelidir. Torsiyonun başlangıcı ile testisin canlılığını kaybetmesi arasındaki süre hastadan hastaya farklılık göstermektedir. Gonad torsiyonunda testisin canlılığı iki parametreyle yakından ilgilidir. Bunlar torsiyonun derecesi (180°, 360° ve 720°) ve torsiyonun süresidir. Testis ilk 6 saat içinde uygun müdahale yapıldığı takdirde kurtarılabilir (39).

Yapılan çalışmalarda 360° üzerinde olan ve 24 saatten fazla süren torsiyonlarda testislerde ileri derecede atrofi saptanmıştır (40,41).

12 saatten az torsiyonda kalan testislerin % 4'ü nekroza giderken, torsiyon süresi 12 saatten fazla olan olgularda bu oran % 75'e kadar çıktığı; 24 saatten daha uzun süren olgularda ise, testiste geriye dönüşümsüz değişikliklerin olduğu bulunmuştur (41). Mc Combe ve Scobie'nin çalışmalarında, TT'lu hastaların % 38'inin 24 saatten sonra başvurdukları belirlenmiştir (42).

Detorsiyon sonrasında gelişebilecek olan reperfüzyon hasarı; nötrofil infiltrasyonu ve serbest oksijen radikallerinin (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri) artışıyla yakından ilişkilidir (43). Oluşan serbest oksijen radikalleri hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonuna, protein denaturasyonuna ve sonuçta DNA hasarına yol açar. Yapılan deneysel çalışmalarda, detorsiyon sonrası ortaya çıkabilecek bu hasar önlemek için değişik maddeler kullanılmıştır (38).

2.5. İSKEMİ VE REPERFÜZYON HASARI

İskemi, herhangi bir nedenle arteriyal ve venöz kan akımının bozulması ile dokudaki kan akımının, hücrel fonksiyonları karşılamak için gerekli olan düzeyin altına düşmesi durumu olarak tanımlanmaktadır. Aerobik organizmalar canlılıklarını devam ettirebilmek için oksijene gereksinim duymaktadırlar. İskemi hücrel oksidatif fosforilasyonu azaltır ve adenozintrifosfat (ATP), fosfokreatin gibi enerjiden zengin fosfatların depolarında yetmezlik oluşur. İskemide enerji eksikliğine bağlı olarak; asidoz, ATP yıkım ürünlerinin birikmesi, makromolekül sentezinin durması, iyon dengesinde bozulma gibi olaylar gelişir. İskemi proinflatuar durumda uyararak lökosit adezyon molekülleri, sitokinler, endotelin, tromboksan A2 gibi mediatörlerin salınmasına neden olur (44). Torsiyona uğramış testis de perfüzyonun azalmasına yol açar (45).

Reperfüzyonun ardından ortamda oluşan serbest oksijen radikalleri nedeniyle gelişen iskemi reperfüzyon hasarı ise testiküler doku yıkımının daha da artmasına neden olmaktadır (46). Reperfüzyon hasarı sonrası moleküler etkileşimler ile serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu, eikozonaid üretimi, nötröfil aktivasyonu ve infiltrasyon, hücre komplement aktivasyonu ve sitokin üretimi oluşur (47).

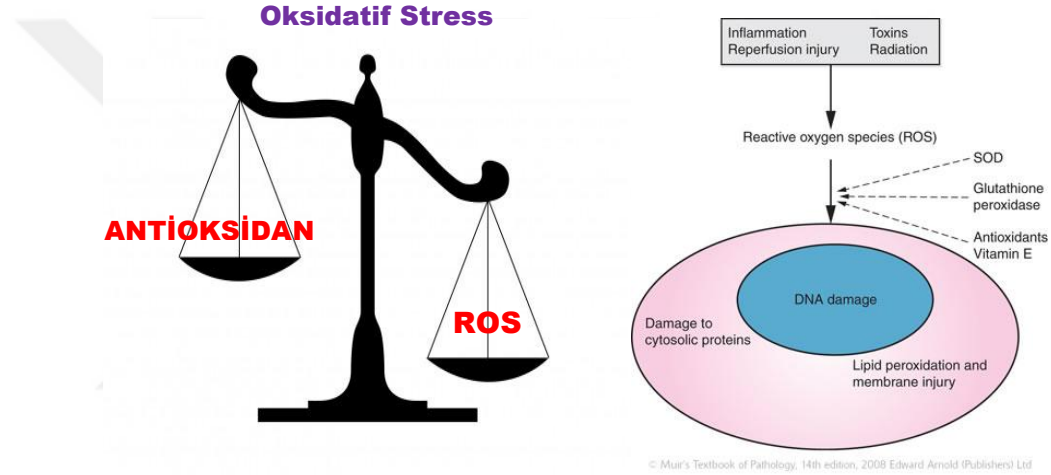
Serbest oksijen radikalleri, hücre komplementlerinden olan fosfolipilerin doymamış yağ asit kalıntılarını ortadan kaldırmak amaçlı oksidasyona yönelir. Serbest oksijen radikalleri, elemanları hücre membran lipid peroksidasyon patogeneğinde önemlidir. (48). İskemi sonrası, organa tekrar kan pompalanması geri dönüşümsüz hasarlanmayı önler. Organın tekrar kana kavuşması kanın akım hızı ile doğrudan etkilidir. Akım hızı arttıkça iskemiye bağlı oluşan hasar durumuna ek olarak kaybolan fonksiyonların bir kısmı tekrar geri kazanılır fakat oluşan serbest oksijen radikallerine ve kandaki aktive edilmiş kan hücrelerine bağlı olarak “reperfüzyon hasarı” oluşur. İskeminin derecesi ve süresine bağlı olarak dokuya tekrar oksijenizasyon olması hasarın daha şiddetli olmasına neden olabilir (49).

Parks ve Grader'e göre mezenterik iskemi hasarında reperfüzyon sırasında doku hasarının daha fazla olduğu bildirilmiştir (50). İskemi/Reperfüzyon hasarı(I/R), endotel

ve farklı hücre tipleri arasında farklı etkileşimlere, makrovasküler hasarlara hücre apoptozuna ve nekrozuna sebep olabilir (49).

2.6. TESTİSTE OKSİDATİF STRESS

İskemi/reperfüzyon hasarı ile oluşan oksidatif stres, serebro-vasküler bozukluklar, ateroskleroz, diabetes mellitus, amfizem/bronşit, alkolik karaciğer hastalığı, akut ve kronik renal yetmezlik, gebelik preeklampsisi, yaşlanma, Parkinson hastalığı, serviks kanseri, retrolental fibroplazi, Down sendromu, Duchenne tipi musküler distrofi başta olmak üzere birçok hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (3) (Şekil 6).



Şekil 6: Oksidatif stres dengesi(51)

Oksidatif stres hücresel düzeyde DNA, hücre membranı ve mitokondriyal hasara da neden olmaktadır.

Testis Torsiyonu (TT), testiste kalıcı hasar yapmamakla birlikte acil müdahale gerektiren bir durumdur. Uzun süreli TT iskemisi ve yüksek seviyeli oksidatif stres testiste Nitrik Oksit (NO) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) üretimine, lipid peroksidasyonu miktarının artışına, isoprostan birikimine, antioksidan enzim tüketimine ve mitokondri aracılı apoptotik germ hücrelerinin artışına neden olur (52,53).

2 saatten daha az süreli iskemi, testiste oksidatif stresin artışına, glutatyon seviyesinin azalmasına ve testiste spermatogenezde bozulmaya neden olur. Testiste, torsiyon ve detorsiyon sonrası peroksidasyon seviyesinde artış gözlenmiş olup, bu olay reperfüzyon hasarının indüklendiğini göstermektedir (54). Reperfüzyon hasarında,

oksidasyonun temel sistein grupları (-SH) ve proteolitik enzimler yardımıyla, ksantin dehidrogenaz, iskemi boyunca ksantin oksidaza oksitlenmektedir. Reperfüzyon sonrası dokuya hızla gelen kan akımı ile ksantin oksidaz aniden ksantini-hipoksantine oksitleyebilir ve bu da bol miktarda serbest oksijen radikalleri oluşumunu tetikleyebilmektedir. Ayrıca, yüksek oranda serbest kalan moleküllerin geçişi ile indüklenen oksidatif hasarlar oluşur. Kısa süreli testis iskemi sonrası oksidatif stresle aniden lipid peroksidasyonu indüklenirken endogenez antioksidan aktivitelerden SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz baskılanır (55, 56, 57).

TT sonrası detorsiyon ile indüklenen I/R hasarının, eksojen antioksidanlar olan selenyum, resveratrol, L-karnitin, kaffeik asit fenil ester, yeşil çay ve sarımsak ekstratı gibi ajanların kullanımları ile önemli ölçüde azaltılabileceği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (55, 57, 58, 59).

2.7. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabil ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da molekülden bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve içsel mekanizmalarla organizmayı etkileyecek zararlı etkilere karşı korur.

Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nütrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5 'i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren ve bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşmektedir. İnsan metabolizmasında her yıl 2 kg O₂ oluşturulduğu bildirilmiştir (60).

Serbest radikaller 3 şekilde ortaya çıkar;

1- Kovalent bağlı bir molekülün homolitik bölünmesi. Bu durumda ortaya çıkan her bir parçada ortak elektronlardan biri bulunur.

2- Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi.

3- Bir moleküle elektron eklenmesi şeklinde ortaya çıkabilirler (61).

Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında önemli rol alan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz enzimlerini içerirler.

Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenerek; aktive olmuş nötrofillerde ksantin-oksidad miktarının artması ile serbest oksijen radikallerinin salınımını başlatır. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokudaki oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen perokside dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerden salınan apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim, elastaz, kolajenaz ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır (60). Serbest radikaller organizmada rutin biyokimyasal reaksiyonların yanı sıra hipoksi, iskemi-reperfüzyon, ksenobiyotikler(sigara dumanı, asbest, ozon vb.) ile de oluşur. Nötrofil ve fagositik fonksiyonlarının bir bölümü olarak serbest radikaller sentez edildiği de gösterilmiştir. Hücre ve hücreler arası sıvıda oksijen ve nitrojenler bir dizi spontan ve enzimatik reaksiyonla serbest radikal haline dönüşürler (62).

İnsan spermatozomu tarafından üretilen serbest oksijen radikalleri ile sitoplazma yoğunluğu arasında pozitif korelasyon bulunur. Bu korelasyon plazma membranındaki NADPH oksidasyonu ile kolaylaşmış bir yolla mekanizması desteklenir (63). Serbest oksijen radikalleri insan vücuduna temel metabolik süreçlerde veya diğer dışsal kaynaklarla örneğin x-Ray, ozon, sigara kullanımı, hava kirliliği ve endüstriyel kimyasallar, bazı ilaçlar, pestisitler yoluyla ulaşır. Serbest oksijen radikalleri hücre içinde hem enzimatik yolla hemde enzimatik olmayan reaksiyonlarla oluşur. Enzimatik reaksiyonların kaynağı solunum zincirine katılan ekipmanlar, fagositozda, prostoglandin sentezinde, sitokrom p-450 sisteminde yer alır(64).

Hücre içinde üretilen serbest oksijen radikallerinin kaynağının çoğu; mitokondri, ksantinoksidaz, peroksidaz, inflamasyon, fagositoz, araşidonik yollar, egzersiz, iskemi/reperfüzyon hasarı yer alır (64).

2.6.1. Süperoksit Radikalleri (O_2^-)

Süperoksit radikali (O_2^-) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallere oksidasyonu süperoksit radikalini meydana getirebilir. Süperoksit radikali diğer bileşikler aracılığı ile etki edebilir. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyiciliği rolüyle göreve katılmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir ve oksidan perhidroksi radikali (HO_2^-) oluşturmak üzere protonlanır. Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur iken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir. Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin Ferrisitokrom C ya da nitroblue tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur. Süperoksit radikali epinefrinin oksidasyonunda oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenir (65).

2.6.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksidin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir (66).

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin (O_2^-) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da **süperoksit dismutaz (SOD)** enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon reaksiyonunda pH 4,8'de en hızlıdır,

enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir (3). Süperoksit radikalının lipid çözünürlüğü sınırlı olduğu halde hidrojen peroksit lipid çözünürlüğü yüksektir. Bu nedenle hidrojen peroksit kendisinin olduğu yerden uzakta olan fakat Fe^{2+} içeren membranlarda hasar oluşturabilir (66).

2.6.3. Hidroksil Radikali (-OH)

Hidroksil radikali (-OH), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur.

Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikalidir, yarılanma ömrü çok kısadır.

Hidroksil radikali serbest oksijen radikallerinin en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton eksilterek tiyil radikali (RS), karbon merkezli organik radikal (R), organik peroksit (RCOO) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve hücrede büyük hasara neden olur (3).

2.6.4. Nitrik Oksit (NO)

Bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır. NO'nun yarı ömrü 10-20 saniyedir (66).

NO metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp azot dioksit (NO_2) oluşturur. NO kolaylıkla kimyasal reaksiyona giren, biyolojik membranlardan hızla geçebilen bir serbest radikaldir. İskemi durumunda süperoksitle reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO), nitrojen dioksit (NO_2) ve peroksinitroz asit (ONOOH) gibi sitotoksik radikallere dönüşür.

Peroksinitrit doğal gaz formdadır ve iskemi sonrası dokuda hızla yayılır. Peroksinitrit protein nitrotirozinasyonunu geri dönüşümsüz kimyasal reaksiyonlarla nitrojen gruplarına ilaveten nitrotirzin-3 üretimi eklenir. Bu dönüşüm sonrası değişiklik genellikle patalojiktir (67).

NO'nun vücuttaki ROS'lar ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla -OH radikali

meydana getirdiği ifade edilmektedir. NO, hızla hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötrale edilir veya 10 saniye içinde nitrat veya nitritlere dönüştürülür (66, 68).

Nitrik oksit yarılanma ömrü kısa olmasına bağlı olarak vücutta kullanılabilir formlara dönüşmektedir

Nitrik oksit sentaz'ın (NOS) 3 temel formu bulunmaktadır.

1. Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. Düz kaslarda siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezini uyarıp damar gevşemesini sağlar (66).
2. Nöronal NOS (nNOS) nörotransmisyonunda etkilidir.
3. İndüklenebilir NOS (iNOS), hipoksi ve iskemi durumlarında artmaktadır.

Testis torsiyonu yapılan çalışmada iNOS ve nNOS'un Leydig ve infiltre olan makrofajlarda, eNOS'un ise hasarlanmış seminifer tübül içindeki germ hücrelerinde artmış olduğu immünohistokimyasal boyama ile gösterilmiştir. Testis I/R hasarının geç dönemlerinde her üç NOS aktivitesinin olduğu ve nekroz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (31).

2.6.5. Hücrede Reaktif Türlerinin Kaynağı

Mitokondriyal elektron transport zincirinden elektron sızıntısı, endoplazmik retikulum ve nükleer membranda bazı değişiklikler oluşur. Bu sızıntı ile membranda sitokromların oksidasyonu, ksantin oksidazın katalitik döngüsü, dihidro orotat dehidrojenaz, flavoprotein dehidrojenaz, aminoasit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimlerin katalitik döngüsü, araşidonik asit metabolizması, tiyollerden tiyil sentezini, H_2O_2 ve O_2 'den $-OH$ sentezini katalizlerler. Geçiş metalleri, lipid hidroperoksitleri'nin(LOOH) parçalanmaları ve lipid peroksidasyonu, aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama ve bazı yabancı toksin maddelerin etkileşimleri ile reaktif türleri meydana gelir (3).

2.7. ANTIOKSİDAN MADDELER

Antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda okside edilebilen ve diğer bir substratın oksidasyonunu azaltan veya engelleyen maddelerdir. Bu antioksidan mekanizmaları ile rutin biyokimyasal olaylarda ortaya çıkan serbest radikalleri ortadan

kaldırabilir. Daha önce sayılan çeşitli patolojik süreçler sonucu oksidan- antioksidan sistemin dengesi bozulabilir. Antioksidan denge metabolizması bozular veya zamanla tükenir (66).

Hücre içi metabolizmasında serbest oksijen radikallerinin miktar ve etkinliğinin artması ile hücre hasarı ve apoptoz ile sonuçlanır. Organizmada ya da dokuda meydana gelen hasara bağlı olarak ve genellikle oksijen kaynaklı serbest radikallerin başlattığı oksidatif hücre hasarı sürecine oksidatif stres denir. Meydana gelen hasar sonrası ya da hasar sırasında serbest radikallerin toksisitesi ya direkt olarak kendi radikal etkenleri aracılığı ile ortadan kaldırılır ya da indirekt olarak antioksidanlarla antagonize edilir. Direkt etkileyen radikaller, radikallerin başlattıkları zincirleme reaksiyonları ilk basamaklarda durdurarak radikallerin etkisinin artmasını önlerler. İndirek etkileyen radikaller ise radikal süpürücü etki ile reaksiyona girmeden daha zararsız moleküllere dönüştürerek veya diğer moleküllerden serbest radikal oluşmasını engelleyerek antioksidan oluşturur (66).

Antioksidanlar, oksidatif strese etki mekanizmaları 4 farklı şekilde gözlenir. α - tokoferol, lipit faz zincir kıran bir antioksidan olarak zincirleme şekilde ilerleyen lipit peroksidasyonu gibi serbest radikal üreten basamaklara etki ederek reaksiyonları parçalar. Glutasyon gibi antioksidan moleküller direk olarak serbest oksijen radikal yoğunluğunu azaltırlar. Süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler serbest radikal üretimini başlatan ilk radikali etkisiz hale getirirler. Bazı maddeler ise hücre sinyal molekülleri aracılığı ile etkilerini gösterirler. Bu yolla laktoferritin, transferrin ile ferritin demirle; seruloplazmin ve albumin ise bakır ile uyarılan oksidan stresi engellerler (66).

Bilinen antioksidanlardan bazıları şunlardır: Caffeic Acid Phenethyl Ester(CAPE) Epigallocatechin gallate (EGCG), ksenobiyotikler, Vitamin C, E, A, betakaroten, metallotionin, poliaminler, melatonin, NADPH, adenzin, koenzim Q-10, ürat, ubikuinol, polifenoller, flavonoidler, fitoöstrojenler, sistein, homosistein, taurin, metionin, s-adenozil-L-metionin, resveratrol, nitroksidlerdendir (64).

Serbest radikallerden GSH, glutasyon peroksidaz, katalaz, süperoksid dismutaz, tioredoksin redüktaz, nitrikoksid sintaz, hem oksijenaz-Lve eozinofil peroksidaz bu gruba girer (64, 69, 70).

2.7.1 Doğal (Endojen) Radikaller

2.7.1.1. Enzim olanlar:

Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, süperoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon redüktaz bu grup arasındadır.

2.7.1.1.1.Katalaz

Peroksizomlarda ve sitozolde bulunan ve yapısında -HEM grubu içeren bir protein olan katalaz, H_2O_2 'nin moleküler oksijen ve suya çevrilmesini katalizler. Katalaz metil hidroperoksit ve etil hidroperoksit gibi küçük moleküllerin indirgenmesini de sağlar, ancak büyük molekül ağırlıklı lipid hidroperoksitlere karşı etki göstermez (64, 3).

2.7.1.1.2.Malondialdehit (MDA):

Serbest oksijen radikallerinin dokulara etkisi ile oluşan, lipid peroksidasyonu esnasında bir dizi reaksiyon sonucu meydana gelen, aldehit metabolik ürünlerindedir. MDA, hücre zarlarından kolayca geçebileceği için hücre içindeki yapıları olumsuz yönde etkilemekte ve deformasyona neden olmaktadır (71). Plazma MDA düzeyinin belirlenebilmesi dokulardaki lipid peroksidasyonunun ve dolayısıyla oksidatif stresin hassas göstergelerinden birisidir (72, 73). MDA hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için toksik ve karsinojeniktir (74).

2.7.1.1.3.8-hidroksidezoksiganin (8OH-dG):

Oksidatif streste, hücre DNA yapısında oluşturulan hasarı analiz eden temel moleküllerden biri kabul edilir.

8 OH-dG, serbest oksijen radikallerinin DNA'da baz hasarına bağlı yaklaşık 23 tane oksidatif hasar ürününden en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinenidir. Guanin DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip bileşiktir. Bu sebeple serbest oksijen radikallerinin başlıca hedefidir. DNA replikasyonu sırasında GC'den AT'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi arttırır. Bu nedenle 8OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif DNA hasarını belirlemede en sık kullanılan belirteçtir (75).

2.7.1.2.Enzim olmayanlar:

I- Lipid fazda bulunanlar: Alfa tokoferol, beta karoten

II- Sıvı fazda bulunanlar: Askorbik asit, melatonin, urat, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, myogloblin, ferritin, hemogloblin, metionin, albumin, bilirubin, glutatyon bu grup arasındadır.

2.7.2 Eksojen Radikaller:

I-Ksantin oksidaz inhibitörleri: Tungsten, Allopurinol, Oksipurinol, Folik Asit, Pterin Aldehid, Soya fasülyesi kaynaklı inhibitörler.

II-NADPH oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvarlar, difenil iodonium, rekombinant süperoksit dismutaz, Trolox-C (E vitamini analogu)dir.

III-Eksojen antioksidan aktiviteyi arttıran maddeler: Ebselen, Asetilsistein.

IV-Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları: Mannitol.

V- Demir döngüsünün inhibitörleri: Desferoksamin, Seruloplazmin, Nötrofil adhezyon inhibitörleri

VI- Sitokinler: TNF, Barbitüratlar, interlökin-1, Demir Selatörleri bu grup arasındadır

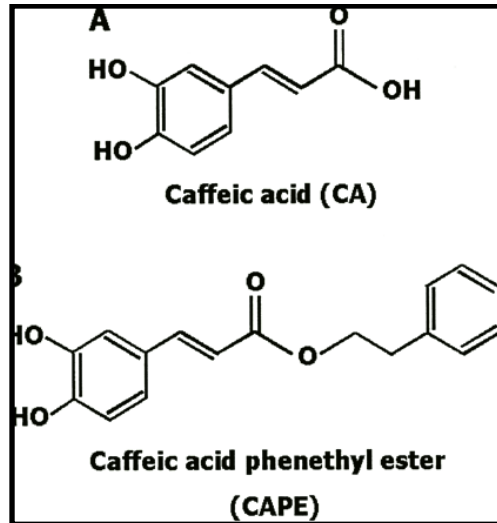
(73).

2.7.3.Diğer Radikaller:

Bütile hidroksitoluen, Bütile hidroksiyanisol, SodyumBenzoat, Etioksiquin, Propilgalat,Fe- Süperoksid dismutaz (73).

2.8. CAFFEİC ACİD PHENETHYL ESTER (CAPE)

CAPE, arıların bitkilerden topladığı özütün içerisinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis maddesinin aktif bileşenlerinden birisidir. Eski yıllarda propolis alternatif tıp çerçevesinde antibakteriyel ve antiinflamatuvar etkileri başta olmak üzere birçok sebeple tedavi amaçlı olarak kullanılmış, iyileştirici rolünün olduğunun gözlenmesi üzerine kullanımı yaygınlaşmıştır (76). Son yıllarda artan bir şekilde dünyanın değişik ülkelerinde sağlıklı içecek sınıfında ve günlük birkaç dozda alınabilecek kapsül ve tablet formlarında piyasaya sunulmakta ve bu geniş spektrumlu biyolojik etkileri nedeniyle halk tarafından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (76). Yapılan araştırmalarda bugüne kadar propolisin içinde 300'den daha fazla bileşen tespit edilmiştir (76). Propolisin aktif bileşenlerinin antimikrobiyal, antiinflamatuvar, immünmodülör, antioksidan ve antiproliferatif özellikleri keşfedilmiştir. CAPE ile birlikte propolisin aktif bileşenlerinden olan diterpenoidler ve diğer bazı fenolik bileşiklerin antitumor etkinlikleri oldukça belirgindir. CAPE'nin hücre membranlarını rahatlıkla geçmesine fırsat verecek fenil ve polihidrokarbon zinciri ile birlikte taşıdığı iki adet hidroksil grubuna (-OH) kuvvetli antioksidan özellik kazandırmaktadır (77).



Şekil 8- Caffeic acid phenethyl ester moleküler yapısı (76)

Başlangıçta kimyasal ekstraksiyon metodlarıyla ayrıştırılarak bilimsel araştırmalarda kullanılan CAPE,1990'lı yılların başında ticari preparat olarak piyasaya sunulmuştur. Bilimsel çalışmalarda kullanılan bu ürün, Molekül ağırlığı 284.31 gr./mol. olan liyofilize haldeki bu ürünün empirik formülü C₁₇H₁₆O₄ olarak kaydedilmiştir. -20C'de dikkatle saklanması gereken bir üründür, aksi olduğunda biyolojik aktivitesini tümü ile kaybetmektedir. Etil asetat, dimetilsülfoksit (DMSO) ve etanolde tamamen çözünmektedir. Biyokimyasal ve fizyolojik olarak en dikkati çeken etkisi nükleer transkripsiyon faktörü NF-kappa B'nin çok spesifik bir inhibitörü olmasıdır (77).

CAPE üzerine yapılan ilk çalışmalar, daha çok tümör hücreleri üzerine olan sitotoksisite, transformasyon ve ekspresyon üzerine olmakla birlikte daha sonraları apoptozis üzerine olan etkileri ile NF-kB üzerinden etkinlik gösterdiği tahmin edilen enflamasyon çalışmaları üzerine yoğunlaşmıştır. Daha sonra yoğun bir şekilde hücre kültürü ve deneysel hayvan çalışmalarında CAPE'nin antioksidan etkileri başta olmak üzere bütün etkileri üzerine araştırmalar yapılmıştır (78).

CAPE ve propolisin böbrek, akciğer ve meme kanserine karşı antikanserojen özellikleri vardır. Rat kolon kanserinde Propolis ve CAPE'nin etkisini araştırmak için yapılan çalışmada propolisin etkili olmadığı ancak CAPE'nin önemli oranda tümör oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir (76).

Birçok kanser türü üzerine yapılan çalışmalarda CAPE ekonomik oluşu, kolay elde edilebilirliğinden tercih edilip, zengin farmokolojik etkileri ile hücreleri apoptoza yönlendirerek kanser hücre tedavisinde ümit verici bulgulara ulaşılmıştır (79).

Beyin iskemi reperfüzyon hasarında, spinal kord iskemi hasarında, Parkinson hastalığında, yenidoğanlarda hipoksik iskemik beyin hasarında, hepatik ensefalopati, multipl sklerozda, konvulziyonlarda, beyin tümörlerinde, antikanser tedavilerde tedavi edici ajanın toksik etkilerine karşı ve gibi birçok çalışmada CAPE'nin koruyucu etkileri bulunmaktadır (76).

Testis torsiyon iskem/reperfüzyon hasarında (2/4 saat, 720 C°) CAPE uygulanan gruplarda TBARS ve miyeloperoksidaz seviyelerinde artış ile CAPE'nin testisi nötrofil hasarından koruduğu gösterilmiştir (80).

Başka bir çalışmada testis iskem/reperfüzyon süresi 2/24 saat olarak uygulanmıştır. CAPE 10 µm/kg olarak reperfüzyondan 30 dk önce uygulanmıştır. Çalışma sonucunda CAPE uygulanan gruplarda iNOS aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. CAPE'nin testis iskem hasarında nötrofil aracılığı ile germ hücrelerini koruduğu gösterilmiştir (58).

2.9. EPİGALLOKATECHİN-GALLATE (EGCG)

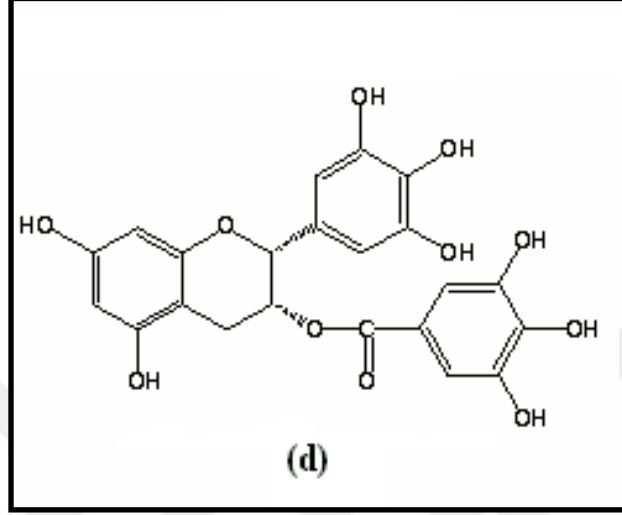
Günümüzde su tüketiminden sonra ikinci sırada tercih edilen en popüler içecek olan çay, güneybatı Çin ve kuzeydogu Hindistandan köken alan çay bitkisinin (*Camellia sinensis* L. (O) Kuntze), assamica ve sinensis çeşitlerinin taze yapraklarından elde edilmektedir. Yeşil çayın yapısında %80 polifenoller ve flavonoidler yer alır.

Polifenoller, yapılarında hidroksil veya karboksil grupları taşıyan halkalı organik yapıda bileşiklerdir. Bitkilerde yüksek oranda bulunan bileşenler olup günümüzde 8000'den fazla polifenol olduğu tespit edilmiştir. Bitkilerde özellikle de bitkisel çaylarda bol miktarda bulunan polifenoller biyolojik açıdan oldukça aktif yapılardır. Polifenolik maddelerin etki mekanizmaları antioksidan maddeler üzerinden gerçekleşmektedir. Antioksidan özellikleri ile serbest radikal oluşumunu engelleyerek hücrede kanserleşmeyi önler (82).

Yeşil çay polifenolleri antioksidan, antiinflamatuvar, antikarsinojenik, termojenik, probiyotik ve antimikrobiyal özelliklere sahiptir. Stres şartlarında hücreyi otofajiden korur, lipid birikimini önler, endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler hastalıkları ve iskem-reperfüzyon hasarlarını önler (83, 84).

Yeşil çay polifenollerinin antioksidan özelliği epigallokateşin-3-gallat'a (EGCG) dayanır. EGCG'lerin antioksidan etkinlikleri ise aromatik halkalara ve hidroksil gruplarına bağlıdır (Şekil 10). Böylece serbest radikalleri yakalar ve nötralize eder. Tümör başlangıcı ve yayılmasının biyokimyasal işaretçileri olan apoptoz indüksiyonu, hücre replikasyonunun inhibisyonu, neoplazmanın gelişimi ve büyümesini inhibe eder.

EGCG proteolitik enzim ürokinazı da inhibe ederek kanserli hücrelerin metastaz yapmak için kullanımını engeller (85).



Şekil 10:EGCG moleküler formülü (86)

Yeşil çay özellikle kateşinler ve kateşin türevlerini kapsayan flavonoidlerce zengindir. Epigallokateşin gallat (EGCG), epigallokatesin (EGC), epikatesin (EC) ve epikatesin gallat (ECG) yeşil çayda bulunan başlıca kateşinlerdir. Bu bileşikler yeşil çayda miktarca EGCG (toplam kateşin miktarının %60'ı) > EGC > EC > ECG şeklinde sıralanmaktadır (87).

Güçlü bir antioksidan olan yeşil çay polifenolleri reaktif oksijen ve nitrojen türlerini bağlar, ayrıca süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-redüktaz, katalaz, ve kinon redüktaz gibi hücre içinde bulunan (endojen) antioksidan enzimlerin sentezini tetikleyerek de dolaylı olarak antioksidan aktivite gösterir. Bu etkileriyle yeşil çay lipid peroksidasyonunu ve DNA yapısında oluşabilecek hasarları engeller.

Fraksiyonlarına ayrılmamış yeşil çay ve (-)-EGCG aynı zamanda metal iyonlarını bağlayarak, ileriki aşamalarda reaktif serbest radikallerin oluşumunu azaltır (88).

Testis iskemi/reperfüzyon hasarında EGCG'nin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 1 saat torsiyon 4 saat reperfüzyona maruz bırakılarak EGCG'nin testiste koruyucu etkisi ve mRNA ekspresyonu TNF-a, IL-6 ve IL-1 β ELİSA ile ölçülmüştür.

İnos'un mRNA ekspresyonu, MCP-1, p53, Bcl-2, Bax ve survivin protein ekspresyonu değerlendirilmiştir. EGCG'in testis torsiyonu sonrası iskemi hasarından germ hücrelerini koruduğunu ve hücrelerin apoptotik etkisini, inflamasyonunu engellediğini ve spermatogenezin hasarlanmasını engellediğini göstermiştir (89).

Bir diğer çalışmada EGCG'nin 4 saat torsiyon/4 saat reperfüzyon süreli testis iskemi reperfüzyon hasarında süperoksit dismutaz aktivitesi ile koruyucu etkisi incelenmiş ve seminifer tübül koruyuculuğunda EGCG'nin etkili olduğu gösterilmiştir (90).

2.10.PI3K/AKT Yolağı

Fosfotidil inositol 3 kinaz (PI3K) ailesi, hücre büyümesi, düzenlemesi, proliferasyonu, hücre canlılığı, sinyal iletimi ve tümörögenез ile ilişkilidir (119,120). PI3K'lar yapısına, bağlanma şekline, aktivasyonuna ve substratına göre PI3KI, PI3KII ve PI3KIII olmak üzere 3 gruba ayrılır. IA sınıfı enzimleri en iyi nitelendirilmiş PI3K grubudur. Class IA grubu PI3K lar iki alt üniteden oluşur. p110 katalitik alt ünite olanlar (p110 α , p110 β , p110 γ) ve p85 regülatör alt ünite olanlar (p85 α , p85 β , p55 γ , p55 α , p50 α) olarak ayrılmıştır (121).

Reseptör tirozin kinazların (RTK), aktivasyonu sitoplazmik tirozin rezidülerinin otofosforilasyonuna neden olur. Bu da PI3K'ın düzenleyici alt birimi P85 proteinini etkinleştirir. P85, insülin reseptör substratları (IRS-1, 2) tarafından indirek olarak da aktive edilebilirler. Sonrasında, PI3K katalitik alt birimi P110 proteini fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PIP2)'ı fosfatidilinositol-3 ,4,5-fosfata (PIP3) dönüştürür (122).

Mitojenik ligantlara yanıt olarak RTK'lar PI3K'ı aktive eder. PI3K'lar PIP2 (fosfatidil inositol (4,5) bifosfatı) fosforilleyerek PIP3 (fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfat) dönüştürür. Oluşturulan PIP3'ler membrana bağlı bağlanma bölgeleri şeklinde protein kinazları küçük GTP'az düzenleyicileri ve iskelet proteinlerini etkiler (99,120).

PI3K kinaz/ Protein kinaz B (PKB) sinyal iletim yolu kanserde etkilidir. Bu yolda fosfoinositol-3-fosfat (PIP-3) membran fosfolipidlerinin hücreye gelen uyarı sonucunda PI3K aracılığıyla fosforlanması ile aktive olur. Bu aktiflenme protein kinaz B (AKT proteini)'yi aktifleştirir. Çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri bu yolağı aktive ederek hücrenin yaşamsal faaliyetlerini düzenlerler. Tümör supresör genlerden PTEN

bu yolağın ilk adresi olan PIP-3 oluşumunu inhibe ederek düzenleyici bir görev yapar. PTEN mutasyonu sonucu proteinin tümör baskılayıcı etkisinin ortadan kalkması ile hücrede neoplazi gelişir (120).

PI3K yolağında, PKB olarak bilinen protein kinazlar PDK1 (Pyruvate Dehydrogenase Lipoamide Kinase Isozyme 1- Piruvat Dehidrogenaz Lipoamid Kinaz İzozim 1) ve AKT (PKB-Protein Kinase B- Protein Kinaz B) sinyal yolağı boyunca ilerler (123). AKT insan genomunun önemli kinazlarından biridir (124). AKT'ların AKT-1, AKT-2, AKT-3 olmak üzere 3 alt grubu bulunmaktadır. Aktive AKT, protein efektörlerini fosforilize ve sinyal kaskatlarını amplifiye ederek hücre proliferasyonunu uyarır, apoptozu inhibe eder. PI3K/AKT yolağı tümör süpresör gen PTEN ürünü ile antogonize edilir. PTEN fosfataz aktivitesi ile PIP3'ü defosforilize ederek PI3K/AKT yolağında sinyal iletimini sonlandırır (125). Sitokinler ve büyüme faktörleri AKT ve PI3K yolunu aktive ederek hücre için yaşam sinyalleri oluştururlar (120). AKT uyarısı apoptoz ile doğrudan ilişkilidir. AKT, proapoptotik BAD proteini ile kaspaz-9 üzerinde inhibitör etki gösterirken, NFkB uyarısı ile antiapoptotik cevabı desteklemektedir (120, 124).

AKT, Forkhead (FH ya da FOXO) transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu sağlar. Forkhead fosforilasyonu ile inaktifleşir ve apoptozun başlaması için gerekli transkripsiyonel aktivitenin azalmasına neden olur (126, 127). Miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarında SO₂ tedavisinde kanda LDH ve CK seviyelerinde azalma izlenirken kaspaz 3 ve 9 aktivitesi de tedavi ile azalmıştır. SO₂ ile tedavi öncesi PI3K ve p-AKT, p58 ekspresyon seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir (128).

İnsan göbek korbonu ven epitelyal hücre iskemi/reperfüzyonu üzerine EGCG tedavisi etkileri araştırılmıştır. I/R hasarlanmasında EGCG tedavisinde kaspaz3 ve Bax aktivasyonunun arttığı Bcl-2 aktivasyonunun azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca EGCG uygulanan gruplarda AKT fosforilasyonu ile FOXO1, FOXO3 ve ERK 1/2 ekspresyonu azalmıştır. Bu sonuçlarla EGCG'nin I/R bağlı yaralanmada AKT, ERK 1/2 inhibisyonu ile hücre büyümesini durdurduğu ve kaspaz aktivasyonu ile apoptozu geliştirdiği gösterilmiştir (129).

2.11. MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN COMPLEX 1 (MTORC1)

mTOR (mammalian Target Of Rapamycin - Rapamisin'in Memelilerdeki Hedef Molekülü), serin-threonin protein kinaz ailesinden PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının bir üyesidir (91).

mTOR, **FRAP1** geni tarafından kodlanan bir proteindir. mTOR; FRAP1, FKBP12 (FK506 Binding Protein- FK506 Bağlayıcı Protein) ve RAFT (FKBP Target-FKBP Hedef Molekülü) isimleri ile bilinir (92).

Sinyal ileti moleküllerinden olan mTOR, hücre içi moleküllerin düzenlenmesinde, protein sentezinde, transkripsiyon, enerji metabolizmasında, hücre proliferasyonu, büyüme, farklılaşma, biyoenerji, anjiyogenez, apoptoz ve otofajide rol oynar. mTOR molekülünün aktivasyonu, insulin, büyüme faktörleri, glukoz, fosfotidik asit, amino asit yoğunluğu (özellikle leucine) ve oksidatif stres ile gerçekleşir (93). mTOR bu anahtar basamaklarda protein translasyonu üzerine etkiyerek regülasyonu sağlar (94).

mTOR'un, Ribosomal Protein S6 Kinase Beta1 ve eIF4E (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 4E) olmak üzere en az iki proteini fosforilleği bilinmektedir (95).

mTOR S6K aktivasyonu ile S6 ribozomal proteinini aktive ederek, 5' mRNA'ların translasyonunu uyarır. Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 4E ile bağlanan proteini (4EBP) inaktive ederek, 4E'nin serbest hale gelmesini sağlar. Aktif hale gelen 4E ribozomal proteinlerin translasyonunu uyarır. 5'mRNA'lar, hücredeki RNA miktarının % 20' sini oluşturur ve translasyon işlevinde etkilidir. 4E proteini de bu mesajların translasyonunda etkilidir.

Sentezlenen proteinlerin, büyüme faktörleri, onkoproteinler veya hücre döngüsünün düzenleyici proteinleri olması mTOR'un önemini ortaya koymaktadır. Kinaz aktivitesine sahip olan bu proteinin, Rapamisin tarafından inhibe olduğu gösterilmiştir. Rapamisin mTOR sentez artışı görülen tümörlerde antitümör etki göstermektedir (96, 97, 99).

Bir serin-threonin kinaz inhibitörü olan ve kimyasal formülü C₅₁H₇₉N₁₃ olan **Rapamisin (Sirolimus)**, 1970'lerde Easter adasında (Rapa Nui), bir toprak örneğinin

35 güçlü antifungal etkiye sahip olan "*Streptomyces hygroscopicus*" adlı bakteri suşu içerdiği bulunmuştur. Bu metabolit saflaştırılmış ve keşfedildikten sonra Rapamisin olarak adlandırılan bir çeşit makrosiklik lakton grubu atibiyotiklere dahil olduğu bulunmuştur. Rapamisin'in immünosupresif özelliklere sahip olduğu ve memeli hücrelerinin proliferasyonunu engellediği gösterilmiştir. İmmünosupresif etkiyi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IGF, PDGF, VEGF sitokin salınım ile gerçekleştirmektedir.

(98).

Rapamisin 1999 yılında FDA onayı almıştır ve hücre siklusunun G1 fazında duraklaması ile apoptoza yol açmaktadır. Rapamisin, programlı hücre ölümünü ve T hücrelerinde apoptozu tetikleyerek immün sistemi bloke eder. Rapamisin, T hücrelerin zarına penetre olarak, FKBP12 adlı bir hücre içi reseptöre bağlanır. Bu kompleks daha sonra FRAP adlı hücre siklusunun G1 fazının regülasyonunu sağlayan bir proteine bağlanarak T hücrelerinin IL-2'ye olan proliferasyon şeklindeki cevabını inhibe eder. Bu şekilde Rapamisin hücre siklusunu G1 fazından tranzisyon fazına geçiş esnasında durdurur (96, 98).

Rapamisin'in formları; TOR1-1 ve TOR2-1, FKBP12 ile bir kompleks oluşturur ve bu kompleks daha sonra TOR'a bağlanır ve TOR'u inhibe eder (100).

Rapamisin analoglarına temsirolimus, everolimus, ridaforolimus ve deforolimustan örnek verilebilir. mTOR inhibitörü ilaçların meme, lenfoma, akciğer, mide ve sarkom kanserlerini içine alan çeşitli solid tümörlerde etkinliği gösterilmiştir (101).

Bugüne kadar, mayalar, algler, bitkiler, solucanlar, sinekler ve memelileri de içeren bütün ökaryot genomlarının TOR genini içerdiği tespit edilmiştir. Her iki TOR genini de içeren mayaların aksine, yüksek ökaryotlarda yalnızca bir tek TOR geni mevcuttur (102) .

Ökaryotlarda bulunan TOR'ların %40-60 oranında primer sekansları benzerdir ve yaklaşık 280 kDa ağırlığında büyük proteinlerdir, ayrıca PIKK (Phosphatidylinositol 3 Kinase-Related Kinase, Fosfatidilinositol Kinaz İle İlişkili Kinaz) ailesi olarak bilinen kinaz grubuna aittirler. PIKK ailesi üyeleri, PI3K'lar ve PI4K'ların katalitik etki alanına benzer karboksi-terminal serin/threonin protein kinaz domainini içerirler. TOR'un amino- terminal kinaz domaini, FKBP12-Rapamisin bağlayıcı domainidir. TOR'un

yüksek ökaryotlar arasında korunmuş olduğu tespit edilmiştir. TOR1 ve TOR2, %70 oranında tanımlanmıştır (103,104).

TOR ortologları; *Caenorhabditis elegans*'ta (105), *Drosophila melanogaster*'de (106(107), memelilerde (108,109) ve *Arabidopsis thaliana*'da (110) tanımlanmıştır.

Drosophila melanogaster'de TOR'un veya TOR'un substratının (S6 kinaz) inaktivasyonu, küçük hücre boyutu ve embriyonik letalite ile sonuçlanmaktadır. TOR yolağının hücre büyümesinin kontrolü için önemli rol oynadığı gösterilmiştir (111). mTOR, birçok kritik hücre içi olayları düzenleyen temel kinaz enzimlerinden biridir (112). mTOR aktivasyonu için gerekli temel moleküllerden olan kaskadın temel elemanı PI3K ile AKT aktivitesi mTOR aktivitesini güçlendirir (113).

mTOR molekülü, 2 kompartmandan oluşmaktadır. Bunlar mTORC1 ve mTORC2'dir. mTORC1 kompleksi, mTOR'un Regulatory associated protein of mTOR (Raptor), Mammalian LST8/G - protein β -subunit like protein (mLST8/G β L) içerir. mTORC2, rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor),G β L, mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 (m Sin1) içerir.

mTORC1'in ribozomal biyogenez ve protein sentezinde düzenleyici fonksiyonu vardır. Ribozomal protein S6 veya başlatıcı faktör eIF4E yoluyla etki eder. İkinci fonksiyonu ise, hücre büyümesi, çoğalması ve metabolizması üzerine etkili olmasıdır. mTORC1, Rapamisin ve analogları tarafından inhibe edilir (114). mTORC1'in, hücre içi iletim ve aminoasit düzenlemesinde de önemli etkisi bulunmuştur. PRAS40 ve Deptor mTORC1 substrat komponenti olmasının yanısıra defosforile olduğu aşamada mTORC1 aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (115, 114).

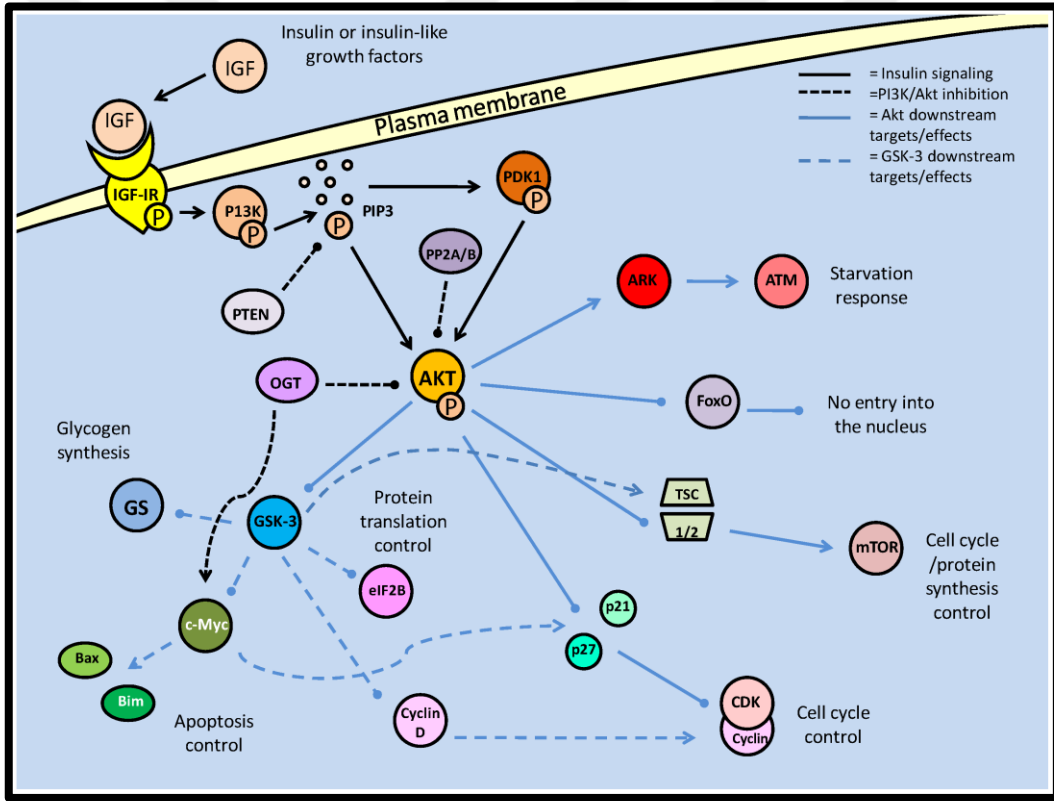
Tubero skleroz kompleks 1,2(TSC1,2) tarafından kodlanan Hamartin-tuberin proteinleri, GTP bağımlı Rheb aracılığı ile mTOR yolağı tarafından inhibe edilir.

Hamartin-Tuberin protein inhibisyonu mTOR yolağına bağlı çoklu yollar tarafından inhibe veya aktive olabilir. Örneğin enerji ve besin fazlalığı durumunda, büyüme faktörlerinden insülin aracılığı ile PI3K/AKT yolağı inhibe edilerek hücre büyüme ve metabolizmasında mTOR yolağının aktivasyonunu sağlar (114).

mTOR'un tümör hücre motilitesinde, anjiyogenezde ve kanser metastazlarının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (116).

Miyokardiyal iskemi hasarına karşı valsartanın koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada AKT/mTOR/S6K aracılığı ile miyokardiyal iskemide dokuyu otofajiden korumuş olduğu gösterilmiştir (117).

Başka bir çalışmada intestinal iskemi hasarı araştırılmış olup ghrelin ile tedavisinde mTOR/p76S6K yolağı incelenmiştir. Çalışma sonuçları göstermiştir ki ghrelin ile tedavi edilmiş akciğer ve bağırsak dokularında mTOR, p76S6K'nın fosforilasyonla arttığı belirtilmiştir. Bu bulgular sonucunda ghrelin tedavisinin mTOR/p76S6K yolağı aktivasyonu ile iskemi/reperfüzyon hasarında koruyucu etki olduğu gösterilmiştir (118).



Şekil 9: PI3K/Akt/mTORC/FOXO yolağı

2.12.FOXO (FKHR-Forkhead transkripsiyon faktörü)

Trankripsiyon faktör ailesi olan FOXO evrimsel olarak *Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis*'dan köken alıp günümüze kadar korunmuştur (6,130). Forkhead box proteinleri transkripsiyon faktör ailesi üyeleri olup apoptoz, hücre

büyümesi, hücre gelişimi, proliferasyonu ve sağ kalımında etkili olan genlerin ekspresyonunu kontrol ederler (6).

FOXO proteinlerinin esas belirleyici özelliği 80-100 aminoasit'ten oluşan "winged helix" olarak da bilinen hedef genlerin DNA'larına bağlanabilen forkhead box bölgesidir (131). Bu sayede hedef genlerin aktivasyonunu aktive ya da inhibe ederler (132). Birçok karmaşık gen düzenlemesinin FOXO aracılığı ile olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca DNA transkripsiyon faktörü olmanın yanında birçok koregülatör molekülere (nuklear hormon reseptör, CCAAT, katenin ve SMAD proteinleri gibi) aracılık ederek etki edebilir (133, 134).

Birçok FOXO proteininin embriyonik dönem gelişiminde ve immün modülatör olarak önemli fonksiyonu vardır (135). Akciğer endotel hücrelerinin ve timositlerin gen düzenlemesinde FOXO'nun katkısı olduğu gösterilmiştir (136).

Bir başka çalışmada pankreatik hücrelerde FOXO3a'nın aşırı ekspresyonu hücre çoğalmasını ve seçiciliğini bloka ettiğini, glukoz metabolizmasını bastırdığı bildirilirken FOXO1'de hücre sinyal iletimini ve hücre rejenerasyonunda desteklik sağlayarak etkisi olduğu bildirmiştir (137). FOXO1'in aşırı salınımının myoblast hücrelerinde füzyona, apoptotik stimülasyona ve myotübüllerde atrofiye neden olduğu gösterilmiştir (138).

Xenopus leaves türü kurbağalar dehidratasyon bağlı strese maruz kaldıkları durumda karaciğer dokularında FOXO1 proteini tarafından antioksidan düzenleme ile SOD, katalaz seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir (139).

Karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarına bağlı inflamasyon durumunda PTEN bağımlı AKT/ β -catenin/Foxo1 yolağının etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonunda toll like reseptör (TLR4) benzer etkili PTEN etkisi ile AKT/ β -catenin/Foxo1 yolağının antiapoptotik etki gösterilmiştir (140).

2.13.Kaspaz Aktivitesi

Fizyolojik ya da programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz, Yunanca'da apo (ayrı) ve ptosis (düşen) kelimelerinden meydana gelen apoptoz, sonbaharda yaprak dökümü anlamına gelmektedir. Apoptoz ile ilgili ilk bilgiler, 1885'te Fleming tarafından ileri sürülen kromatoliz kavramı ile başlamıştır. 1950'li yıllarda lizozomların ve 1960'lı yıllarda serbest radikallerin keşfedilmesi ile hücrenin kendi kendini öldürmesi kavramı kullanılmaya başlanmış ve 1970'li yıllarda da apoptoz ya da programlı hücre ölümü kavramı ortaya çıkmıştır (141). Apoptoz ile ilgili ilk çalışma 1972'de yapılmıştır (142). Daha sonra 1984'de hücre DNA kırıklarının jel elektroforezindeki karakteristik merdiven görünümü apoptotik hücreyi işaret etmiştir (143). Işık mikroskopi incelemelerinde apoptotik hücrelerde kromatinin nükleer membran etrafında toplanması ve yoğunlaşması, hücrede küçülme, plazma membranında kabarcık oluşumu ve hücre büzülmesi ile karakterizedir.

Apoptotik belirtilerden biri de membranla kaplı küçük parçalar halinde apoptotik cisimcik oluşumudur. Apoptotik cisimcikler hücrede inflamatuvar yanıtı tetiklemeksizin fagositozla ortadan kaldırılmaktadır (144).

Apoptozun en özgün yönü DNA'nın inter nükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının ortaya çıkmasına neden olur. Bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo baz çifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonunda görülebilir. DNA'yı parçalayan Ca/Mg bağımlı bir endonükleazdır. DNaz mayoz I ve II'de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin'in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır. Bu

mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (145).

Programlı hücre ölümünün moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktive olmasıyla başlamaktadır (146). Apoptoz mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir. Apoptozu etkileyen hücre içi uyaranlar genel olarak büyüme faktörleri, onkojenler, tümör supresör genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir. Büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, tümör nekroz faktör (TNF), TGF- β (Transforming Growth Factor- β), Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör supresör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve glukokortikoidler apoptozu uyarabilir (147). Özellikle protoonkojenlerin (c-myc gibi) apoptozun düzenlenmesinde yer aldığı kanıtlanmıştır. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de düşük dozlarda apoptozu tetikleyebilir (148).

1990'lı yıllarda apoptoz ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmış ve apoptozun oluşmasında rol oynayan proteaz ailesi olarak bilinen kaspaz'lar (Caspase) cysteine-aspartic acid protease ailesi tanımlanmıştır. Apoptozda, Kaspaz Aktivasyonu, apoptotik hücrelerin fagositozu ve mitokondriyal membran geçirgenliğindeki değişiklikler ortaya konmuştur (149, 145).

Hücreler 2 yolak ile apoptoza gidebilmektedir. Birinci yolak, ekstrensek: ölüm reseptörü yolağı olarak da bilinir. Bu yolak hücre dışı sinyallerle CD95 ligandına (Fas ligand= CD95L) bağlanan tümör nekrozis faktör alfa (TNF-alfa) ailesi tarafından uyarılmaktadır. Bu bağlanma, reseptörde ATP'den bağımsız değişikliklere neden olarak hücrede ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumuna neden olur. CD95 adaptör molekülü Fas reseptörü ile ilişkili ölüm ünitesi (FADD) ile bağlanır. FADD da prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 ile birleşerek DISC kompleksini oluşturmaktadır. Prokaspaz-8 aktifleşerek, kaspaz-3'ten proteoliz ile küçük alt ünitenin ayrılması yoluyla enzim aktivasyonunu başlatır. Bu yolak kaspaz-3 aktivasyonu üzerinden mitokondriyal yolak ile birleşerek apoptoz sinyalini güçlendirmektedir. Hücresel inhibe edici

proteinler (cFLIP, cFLIPL, cFLIPs) DISC ile birleşerek kaspaz-8 ve 10'un aktivasyonunu inhibe ederek apoptozu engelleyebilmektedir (150, 151).

İkinci yolak olan intrinsek yolak ölüm reseptörü yolağından farklı olarak hem hücre dışı sinyallerle (büyüme faktörü veya hormon azlığı, ultraviyole (UV) ışını, çeşitli sitokinler) ve DNA hasarına neden olan hücre içi sinyallerle indüklenebilir.

Hücre içi sinyal Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyelerini uyararak mitokondriye göçünü sağlarken, proapoptotik üyeler dış mitokondriyal membrana yerleşerek burada por (mitokondriyal geçiş kanalları) oluşturmaktadır. Bu porlar mitokondriden sitokrom-c ayrılmasına olanak sağlamaktadır. Sitokrom-c; APAF-1 (apoptosis-activating factor 1), ATP, dATP ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozu yol açar, apoptozom da kaspaz-3'ü aktive etmektedir. Başlangıçları farklı olsa da, her iki yolda sonuç olarak kaspaz-3 aktivasyonuna neden olmaktadır (152).

Kaspazlar, proteini aspartat amino asidinden sonra kesen, aktif merkezinde sistein bulunan proteazlar ailesidir. Bu kesme işlemi proteinin aktivasyon veya inaktivasyonuna neden olabilir. Kaspazlar zimojen olarak salınırlar. Tüm kaspazların yapısında büyük (p10) ve küçük (p20) katalitik alt üniteleri vardır (153). N-terminal bölgesi kaspazdan kaspaza değişiklik göstermektedir. Buna bağlı olarak uzun N-terminal ön bölgesi bulunanlar başlatıcı, kısa N-terminal ön bölgesi bulunanlar sonlandırıcı kaspaz olarak ayrılırlar. Kaspaz-1, 2, 4, 5, 8,- 13 başlatıcı kaspazlar olup, uzun N-terminal bölgesi içerirler (153).

Bu uzun N-terminal bölgelerinde kaspaz aktive edici toplayıcı bölge [caspase-activating recruitment domain (CARD)] veya ölümü etkileyen bölgeleri[death effector domain (DED)] mevcuttur (154). Kaspaz-3, 6, 7, 14 sonlandırıcı kaspazlar olup kısa N-terminal bölgesi içerirler. Başlatıcı kaspazlardan; kaspaz-1, 2, 4, 5, 9, 11, 12, 13 CARD domain, kaspaz-8,10 ise DED domain içermektedir.

Kaspaz-3, 6, 7,14 ise kısa N-terminal bölgeye sahip olup, CARD veya DED domain içermemektedir. Uzun N-terminal ön bölgesi protein-protein ilişkisi için zemin hazırlar. Bu sayede aktive edici protein kompleks oluşabilir (155).

Kaspaz-8 ve kaspaz-10, DISC içinde aktive olurlar. Kaspaz-9'un aktivasyon kompleksi apoptozom olarak adlandırılır. Kaspaz-2 hakkın da fazla veri yoktur. Sonlandırıcı kaspazlar iki aşamada aktive olurlar. DISC ile aktive olmuş başlatıcı

kaspaz-8 veya apopitozom ile aktive olmuş başlatıcı kaspaz-9; sonlandırıcı kaspaz-3'ten proteoliz ile küçük alt ünitenin ayrılmasına ve böylece aktivasyonuna neden olur.

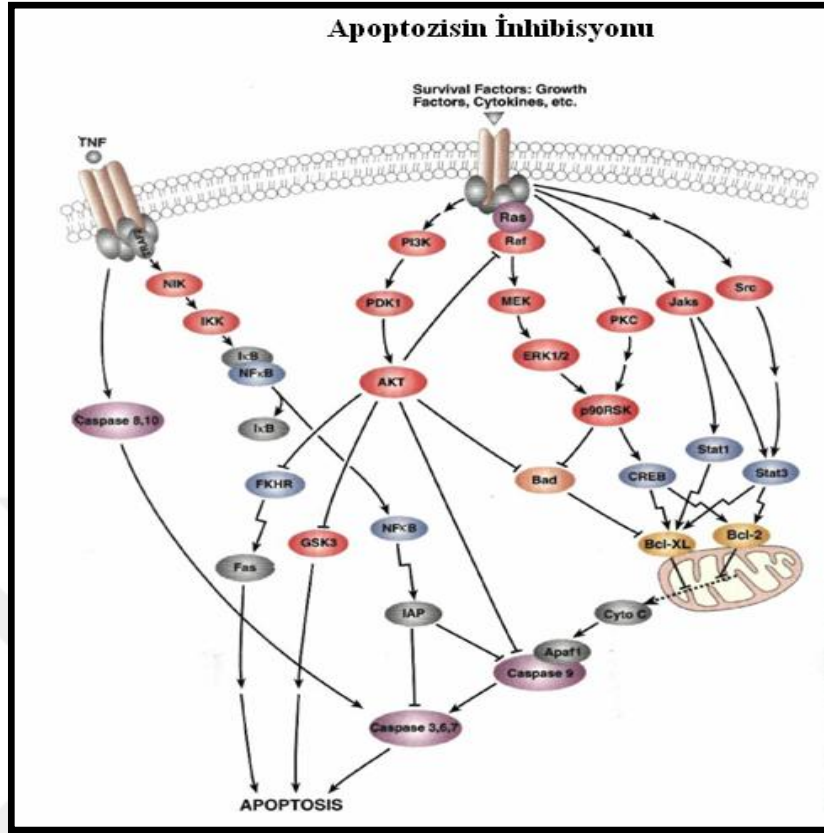
Başlatıcı Kaspazlar	Uygulayıcı Kaspazlar	Enflamatuvar Kaspazlar
Kaspaz-2 (ICH-1)	Kaspaz-3 (CPP32, apopain, yama)	Kaspaz-1 (ICE)
Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH)	Kaspaz-6 (Mch-2)	Kaspaz-4 (ICH-2, TX; ICE _{reIII})
Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6)	Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)	Kaspaz-5 (ICE _{reIII} , TY)
Kaspaz-10 (Mch-4)		Kaspaz-11 (murine)
		Kaspaz-12
		Kaspaz-13 (ERICE)
		Kaspaz-14 (MICE)

Şekil 10: Kaspaz ailesi üyeleri (141)

Efektör kaspazlardan biri olan kaspaz-3 etkin hale getirildiğinde hücre içinde son derece önemli işlevleri olan substratları etkisiz hale getirir (ör: ICAD, ROCK1, PARP, aktin, fodrin ve lamin). Etkin kaspaz-3 membranda kabarcık oluşumuna, DNA parçalanmasına ve hücre sel yapının kaybolmasıyla sonunda ölüme neden olur (141).

Kaspaz-8, öldürücü kaspaz olan ve multiple proteinleri bölüp bu şekilde hücrenin parçalanmasına yol açan Kaspaz-3'ü aktive eder. Benzer şekilde DNA hasarı gibi intrinsek stimülasyon da Kaspaz-3'ün aktivasyonuna yol açar.

Ancak, Kaspaz-8'in yerine kullanılabilen intrinsek stimülasyon, mitokondriden sitokrom c'nin salınımını ve bunu takiben Kaspaz-9'un aktivasyonunu başlatır. Kaspaz-9 apoptozise yol açan kaspaz 3'ü aktive eder. Sitokrom-c salınımı 3 gruptan oluşan Bcl-2 ailesindeki proteinler; anti-apoptotik proteinler (örn; Bcl-2, Bcl-xL), multidomain pro-apoptotik proteinler (örn; Bax ve Bak) ve BH3-baskın yalnızca proapoptotic proteinler (örn; Bim, Bid ve Bad) tarafından yönetilir. Kaspaz-8 aktivasyonu ayrıca Bid'in tBid'e ayrışmasını takiben de sitokrom-c salınımına yol açabilir. Sitokrom-c salınımıyla gerçekleşen ölüm, reseptör bağlantısının apoptotik sinyali başlattığını gösterir (152).



Şekil 11. Apoptoz inhibisyon yolağı (157)

Apoptoz çoklu düzenleyici enzimler tarafından kontrol altında tutulur. Apoptozdan kaçış, NF-κB (nuklear faktor kappa-B) ve PI3K (phosphoinositide 3-kinases)'in aktivasyonuna bağlıdır. Kaspaz transkripsiyon faktörleri, NF-κB ve inositol kinaz B(IκB)'nin bağlanmasına bağlı olarak sitosolde belirli bir düzeyde bulunur. Inositol kinaz (IKK) aktive olduğunda ve IκB'yi fosforilize edip NF-κB aktivasyonu görülür. Daha sonra IκB'nin ayrışımını takiben NF-κB, çekirdeğe doğru yer değiştirir ve c-Flip (kaspaz-8 aktivasyonunu inhibe eder), c-IAP1 ve c-IAP2 (kaspazları engeller ile sitokrom c salınımını önler) gibi antiapoptotik genleri kapsayan çoklu genlerin transkripsiyonunu indukler. Hücre yüzeyi reseptörleri yoğunlaşır ve PI3K'ın ligandlarına bağlanmasını aktive eder. Bir kez aktive olan PI3K, AKT/PKB'yi fosforilize eder ve proapoptotik Bcl-2 proteini olan Bad'ı ve pro-apoptotik genlerin transkripsiyonunun engellenmesi ile FOXO'yu inaktive eder. AKT/PKB, ayrıca NF-κB yanıtının aktivasyonu ile sonuçlanan IKK'yi da aktive eder. Bu şekilde enzimler hem NF-κB aracılığıyla hücreyi apoptozdan kurtarır hem de PI3K yardımıyla hücre yüzey reseptörlerini artırarak hücreyi apoptoza yöneltir (156, 157, 141) .

Çalışmada, erkek infertilitesinin önemli nedenleri arasında yer alan testis torsiyonu sonrasında oluşan iskemi/reperfüzyon'un testis dokusunda oluşturduğu hücresel ve DNA hasarı üzerine etkisi değerlendirilecektir. Oluşan bu hasarda, yeşil çayın etken maddesi olarak bilinen Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ve Caffeic acid phenethyl ester'in (CAPE-Propolis) koruyucu etkileri biyokimyasal, histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenecektir.

Kanda biyokimyasal olarak antioksidanların etkileri, MDA, katalaz ve 8-Hydroxy-Guanosine (8-OHG) değerlerinin gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi ile belirlenecektir. Histokimyasal olarak testiste seminifer tübüllerde oluşan hasar H&E boyama sonucunda Johnson's skorlaması ve TUNEL yöntemi ile değerlendirilecektir. İmmünohistokimyasal olarak PI3K, AKT ve mTOR yolağı ile ilişkili primer antikolar olan anti-P13K, anti-mTORC, anti-AKT ve anti-FOXO antikoları ile araştırılacaktır. Apoptotik süreçte yer alan intrinsek ve ekstrinsek yollar üzerinde etkili olan anti-kaspaz 8 ve anti-kaspaz 9 primer antikoları kullanılarak hücre hasarının oluş mekanizması ve hücre yaşaması için gerekli sinyal yolları üzerine antioksidanların koruyucu etkileri araştırılacaktır.

Bu antioksidan ajanların tek başına ya da sinerjik kullanımları ile koruyucu etkileri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunursa, testis hasarının önlenmesinde ve tedavisinde önemli sonuçlar elde edilmiş olacaktır. Antioksidanların koruyucu etkilerinin hangi moleküler sinyal ileti yolları üzerinde etkili oldukları kesin olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada testis torsiyonunda oluşan hücresel hasar ve antioksidan uygulamalarında rol oynadığı düşünülen moleküler yollardan PI3K-AKT-mTOR yolağının önemi araştırılmış olacaktır. Testis torsiyonuna bağlı oluşan iskemi/reperfüzyon hasarında koruyucu olarak EGCG ve CAPE'in kullanıldığı ve biyokimyasal, histopatolojik ve P13K-AKT-mTOR sinyal yolağı ile immünohistokimyasal yönden değerlendirilmiş bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmadan elde edilecek özgün veriler erkek infertilitesine moleküler yönden ışık tutacaktır

3. MATERYAL-METOD

Bu çalışmada, sıçan testis torsiyonu iskemi/reperfüzyon hasarında P13K-AKT-mTOR sinyal ileti yolları üzerinden Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ve Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)'ın koruyucu etkileri biyokimyasal, histopatolojik ve indirek immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiştir.

Histokimyasal olarak rutin parafin doku takibi sonrasında elde edilen testis doku örneklerinin Hematoksilen-Eozin boyaması ile değerlendirmesi yapılmıştır. Ardından ek kesitler anti-mTORC1, anti-PI3K, anti-AKT, anti-FOXO, anti-Kaspaz 8, anti-Kaspaz 9 primer antikoları kullanılarak avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile indirek immünohistokimyasal olarak incelenmiştir.

Çalışmada kullanılan histokimyasal, immünohistokimyasal inceleme ve değerlendirme için gerekli kimyasal malzemeler ve cihazlar Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2012/055 nolu proje ile desteklendi. Çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulu'nun 27.02.2012 tarihli, 2012-043 protokol numaralı onayı ile yapıldı.

Çalışmada genç erişkin, deneye girmemiş, 230-280 gr. ağırlığında, 56 adet Wistar albino adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 22°C oda ısısında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık dönemler şeklinde ayarlanmış ortamda, *ad-libitum* olarak beslenerek; stres ve gürültüden izole bir şekilde çalışmaya alındı. Deney hayvanları ele alıştıırma (handling) sürecinden geçirilerek torsiyon uygulamalarına alındı.

Çalışma için deney hayvanları, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesinde Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden temin edilerek, bakımları ve cerrahi uygulamaları merkezin ameliyathanesinde gerçekleştirildi.

Çalışma 8 grup altında gerçekleştirildi (n:7, herbiri).

GRUP 1: Kontrol	Kontrol
GRUP 2: İskemi/Reperfüzyon (I/R)	720 ^o 2 saat torsiyon 4 saat reperfüzyon
GRUP 3: Tek doz CAPE (TD CAPE)	Torsiyon sonrası, 30 dk reperfüzyon öncesi 10 µmol/kg (i.p)
GRUP 4: Tek doz EGCG (TD EGCG)	Torsiyon sonrası, 30 dk reperfüzyon öncesi 10 µmol/kg (i.p)
GRUP 5: Tek doz CAPE+EGCG (TD KOMP)	Torsiyon sonrası, 30 dk reperfüzyon öncesi 10 µmol/kg (i.p)
GRUP 6: Doyurma CAPE (DY CAPE)	Torsiyon öncesi 4 gün tek doz uygulama 10 µmol/kg (i.p)
GRUP 7: Doyurma EGCG (DY EGCG)	Torsiyon öncesi 4 gün tek doz uygulama 10 µmol/kg (i.p)
GRUP 8: Doyurma CAPE+EGCG (DY KOMP)	Torsiyon öncesi 4 gün tek doz uygulama 10 µmol/kg (i.p)

Tablo 3.1: Tüm Deney Grupları

3.1. Cerrahi Uygulama:

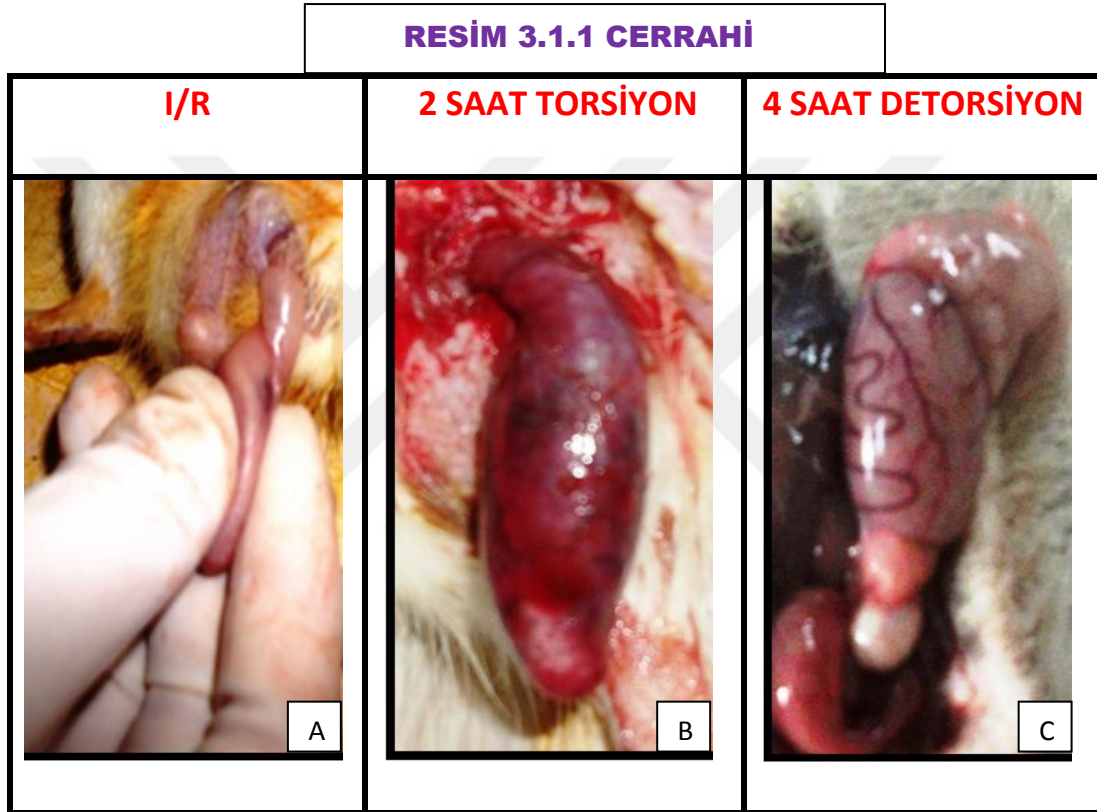
Kontrol grubu hayvanlara herhangi bir cerrahi uygulama yapılmadı. **İskemi/reperfüzyon (I/R) grubu deney hayvanlarına** Xylasin ve Ketamin (Xylazin 10 mg/kg, Ketamin 75 mg/kg, i.p.) anestezisi altında, ilioinguinal insizyon yapılarak torsiyon işlemi sol testislerin saat yönünde 720° döndürülmesiyle gerçekleştirildi (*Resim 3.1.1.A*). Skrotal boşlukta sağ testis tunika vaginalis ve spermatik kord ile birlikte gubernakulumdan künt diseksiyonla ayrılarak dışarıya alındı. Torsiyonun sürdürülebilmesi için testis döndürüldükten sonra tunika albugineasından skrotuma ipek sütür ile tespit edildi. İşlem sonrası insizyon kapatıldı. İskemi/reperfüzyon grubu için 2 saat torsiyon süresi sonunda (*Resim 3.1.1.B*) detorsiyon işlemi için insüzyon yeri açılarak testisler tespit edildiği yerden serbestleştirilerek detorsiyon edilip tekrar skrotum içine yerleştirilip insüzyon yeri kapatıldı. Cerrahi işlem boyunca enfeksiyonu önlemek amaçlı povidon iyot ile insizyon yerlerine pansuman yapıldı. 4 saat detorsiyon sonunda (*Resim 3.1.1.C*) kan örnekleri alındıktan sonra, testis dokuları çıkarılarak Bouin solüsyonuna alınıp deney hayvanları sakrifiye edildi.

Antioksidan uygulanan gruplar, I/R grubunda tanımlanan yöntem ile yapılan torsiyon öncesi 4 gün süre ile tek doz/gün 10 µmol/kg (i.p) antioksidan uygulaması olarak ya da torsiyon işlemi sonrasında, reperfüzyondan 30 dk önce tek doz/gün antioksidan uygulaması yapılarak gerçekleştirildi.

Tek doz antioksidan (TD-CAPE, TD-EGCG, TD-KOMPLEKS (CAPE+EGCG) uygulanan gruplarda I/R grubunda olduğu gibi torsiyon işlemi gerçekleştirilip detorsiyon öncesi (30 dk) 10 µmol/kg CAPE (Lot no:F2512 Santa Cruz), EGCG (Lot no:989-51-5 Santa Cruz) veya kompleks doz (10 µmol/kg CAPE+10 µmol/kg EGCG) antioksidan maddeler serum fizyolojik (S.F) içinde 1 ml olarak verildi.

Doyurma antioksidan (DY-CAPE, DY-EGCG, DY-KOMPLEKS (CAPE+EGCG) uygulanan gruplarda, 4 gün süre ile tek doz (10 µmol/kg) antioksidan her gün saat 11.00 de serum fizyolojik (S.F) içinde 1 ml olarak verildi. 5. gün I/R işlemi cerrahi olarak tanımlanan şekilde gerçekleştirilmiştir.

Detorsiyon süresi sonunda tüm deney hayvanlarından intrakardiyak kan örnekleri alınarak biyokimyasal olarak MDA ve 8-OHG düzeylerinin ELİZA yöntemi ile değerlendirilmesi için -80°C’da saklanırken, testis örnekleri parafin doku takip protokolüne uygun olarak takip edilmek üzere Bouine solüsyonu içine alındı ve tüm deney hayvanları deney sonunda sakrifiye edildi.



3.2.Biyokimyasal analizler için kan alımı: MDA, Katalaz ve 8OH-G değerlerinin ölçülmesi amaçlanmış ve intrakardiyak alınan örnekler 3500'de 10 dk devir ile santrifüj edilip serumlar toplanıp -80'de işlem gününe kadar bekletilmiştir.

MDA analizi Oxis research ürünü olan bioxytech MDA586 kiti plazma örneklerinde çalışılmıştır. Her tüpe 10 µl. probukol üzerine 200 µl standart veya sample buffer eklenmiştir. 640 µl. reaktif (R1) buffer eklenir ve vortekslenmiştir. Üzerine 150 µl reaktif 2(R2) eklenir ve vortekslenmiştir. 45°C 60 dakika inkübe edilmiştir. Santrifüjde 10,000 X g 10 dakika işleme alınmıştır. Supernatant kısmı küvete alınarak 586 nm. dalga boyunda spektrofotometrik yöntemle analiz edilmiştir.

8OHdG analizi Oxis research ürünü olan bioxytech kullanılmıştır. Primer Antibody ve antibody diluent kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir. 50 µl. sample veya standart buffer tüpe alınmıştır. Üzerine 50µl. primer antibody eklenir shakerda tamamen homojenize olması sağlanır ve 1 saat 37 °C inkübe edilmiştir. 250 µl. yıkama bufferi ile iki kere yıkanmıştır. Üzerine 100µl sekonder antibody eklenir shakerda tamamen homojenize olması sağlanır ve 1 saat 37 °C inkübe edilmiştir. 100µl. kromojen buffer ile 15 dakika muamele edilmiştir. Son olarak 100 µl. stop solüsyonu ile 3 dakika karıştırılıp 450 nm.'de sperktrofotometrik ölçümü yapılmıştır.

3.3.Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi:

Histokimyasal ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için alınan testis dokuları Bouin solüsyonuna alındı. Bütün testis dokusu halinde 24 saat, ikiye bölünerek 24 saat daha fikse edildi. Fiksatif miktarı, dokuların 10 katı olacak şekilde uygulandı.

Bouin solüsyonu ile 48 saat fiksasyon sonrasında, doku örnekleri % 70 alkol ile sarı renk akana kadar yıkandı. Derecesi giderek artan etil alkol serileri ile dehidratasyonları yapıp, iki değişim ksilen ile şeffaflaştırmaları sağlanıp, parafine emdirme aşamasından sonra parafine gömüldü (*Tablo 3.3.1.*). Elde edilen parafin bloklardan mikrotomla polilizin ile kaplı lamlara 5 µm kalınlığında alınan kesitler Hematoksilen-Eosin boyaması ile boyandı (*Tablo 3.4.1.*). Ek kesitler indirek immünohistokimyasal (*Tablo 3.6.1.*) ve TUNEL (*Tablo 3.6.2.*) yöntemleri ile boyandı. Histopatolojik ve immünoreaktivite değerlendirmeleri Olympus X40 ışık mikroskobu altında değerlendirildi ve resimleri çekild

TABLO 3.3.1.PARAFİN DOKU TAKİP PROTOKOLÜ

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
A.TESPİT	BOUİN SOLÜSYONU	48 SAAT
	%70 ALKOL ile sarı renk akana kadar yıkama	
B. DEHİDRATASYON	%70 ALKOL	1 GECE
	%70 ALKOL	1 SAAT
	%70 ALKOL	1 SAAT
	%70 ALKOL	1 SAAT
	%80 ALKOL	1 SAAT
	%100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
	%100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
C.ŞEFFAŞLAŞTIRMA	ALKOL-KSİLEN(1:1)	2 SAAT
	KSİLEN	1 GECE
	KSİLEN	1 SAAT
D.İNİFİLTASYON	KSİLEN-PARAFİN(1:1)	1 SAAT
	PARAFİN	3 SAAT
	PARAFİN	1 GECE
E.GÖMME	PARAFİN	

3.4. Hematoksilen Eozin Boyama

Elde edilen parafin bloklardan 5 µm. kalınlıkta alınan kesitler, bir gece 60°C etüvde deparafinize edildikten sonra, 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinizasyon işlemi uygulandı. Derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek suya getirilen kesitler önce Hematoksilen solüsyonu ile 5 dakika boyandı. Akar su altında yıkanan kesitler asit-alkol solüsyonu ile diferansiye edildikten sonra Eozin boyası ile 3 dakika boyandı. Kesitler alkol serilerinden geçirilerek ksilen içine alındı (**Tablo 3.4.1**). Kesitler entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskop altında (Olympus X-40) incelendi ve fotoğrafları çekildi.

H&E boyaması sonrasında elde edilen kesitler modifiye Johnsen testis biyopsisi skorlama yöntemine göre değerlendirildi ve skorlandı.

TABLO 3.4.1.H&E BOYAMA PROTOKOLÜ

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C ETÜVDE	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN 1/2	60 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	3 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
	%80 ALKOL	1 DAKİKA
	%95 ALKOL	1 DAKİKA
KURUTMA	HAVADA VEYA ETÜVDE	
	KSİLEN	1 SAAT
KAPAMA	ENTELLAN	

3.5.Modifiye Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

Her bir sıçandan alınan testis dokusu örneklerinin H&E ile boyanmış kesitlerinde, seminifer tübüllerde yer alan spermatogenik hücrelerin görünümüleri değerlendirilerek aşağıda belirtilen modifiye Johnsen testiküler biyopsi skoruna uygun olarak skorlandı. Her kesitte 10 adet yuvarlak seminifer tübülün enine kesiti değerlendirilerek her bir sıçana 1–10 arası değer verildi (**Tablo 3.5.1.**). Sonuçlar elde edildikten sonra grup ortalamaları alındı ve istatistiksel olarak gruplar arasında karşılaştırma yapıldı.

Skor	Histolojik Bulgular
10	Komplet spermatogenez, çok sayıda sperm, düzgün yükseklikte germinal epitel, normal çaplı tubular lümen
9	Çok sayıda sperm, disorganize germinal epitel, oblitere tubular lümen
8	Tubular kesit başına 5 ± 10 'dan daha az sperm
7	Sperm yok, çok sayıda spermatid, spermatosit ve spermatogonia
6	Sperm yok, 5 ± 20 spermatid, çok sayıda spermatosit ve spermatogonia
5	Sperm ve spermatid yok, çok sayıda spermatosit ve spermatogonia
4	Sperm ve spermatid yok, spermatosit 5'den az, fakat çok sayıda spermatogonia
3	Sadece spermatogonia
2	Germinal hücreler yok, sadece Sertoli hücreleri var (Sertoli cell- only sendromu)
1	Tübüllerde hiç hücre yok

3.6. Avidin-Biyotin Peroksidaz Yöntemi ile İndirek İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Aynı dokulardan yapılan ek kesitler indirekt immünohistokimyasal boyama için hazırlandı. Deparafinizasyon işlemi yapılan kesitler önce tripsinize edilip dakopen ile çevrelenerek, dokuda bulunan peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için % 3'lük hidrojen peroksidaz 5 dk. uygulandı. Fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kesitler spesifik boyanma sağlamak için bloklama solüsyonu uygulandı. Kesitler yıkanmadan bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve anti-mTORC1 (Raptor) (Mammalian Target of Rapamycin-1) (SC-27744, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase) (SC-1637, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-AKT (Protein Kinase B-PKB) (SC-135561, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-FOXO-1 (FKHR-Forkhead box protein O-1) (sc-374427 Santa Cruz Biotechnology Inc), anti-Kaspaz 8 (BS 0052R, Bioss Biotechnology Inc), anti-Kaspaz 9 (BS 0049R, Bioss Biotechnology Inc) primer antikoları 1:100 dilüsyonlarında kullanıldı. Gece boyunca +4°C'de nemli ortamda inkübe edildi. Sekonder kit olarak avidin-biyotin-peroksidaz sistemi (Invitrogen® - Histostain Plus Bulk Kit, Invitrogen® 2nd Generation LAB-SA Detection System, Cat no: 85-9043, Broad spectrum, Camarillo, CA) kullanıldı. PBS ile yıkanan kesitler biyotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz sekonder antikoru ile 30 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkanan kesitlere 30 dakika streptavidin uygulandı. İmmünoaktivitenin görünür hale gelebilmesi için DAB(Diaminobenzidine Kromojen, DAB Kit, Invitrogen® Cat. No: 00-2014) uygulanan kesitler, Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması yapılarak alkolden geçirilip, ksilen ile şeffaflaştırma yapılarak entellan ile kapatıldı. İmmünohistokimya protokolü **Tablo 3.6.1.** ve kullanılan malzemeler **Tablo 3.6.2.**'de verilmiştir.

İmmünoaktivitenin şiddetine göre semi-kantitatif olarak minimal (-/+), hafif (+), orta (++) , şiddetli (+++) ve çok şiddetli (++++) olarak skorlandı. Gruplardan elde edilen testis örneklerinin primer antikolarla elde edilen immünoaktivite sonuçları SPSS programına girilerek One Way-ANOVA istatistik testiyle karşılaştırılmıştır. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

TABLO 3.6.1. İMMÜNOHİSTOKİMYA PROTOKOLÜ

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	FOSFAT TAMPON SOLÜSYONU (PBS)	10 DAKİKA
DAMLA OLUŞTURMA	DAKO PEN	
	TRİPSİN 37°C etüvde	10 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
PEROKSİDAZ BLOK	% 3 HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BLOKLAMA	Non-İmmün bloklama solüsyonu	1 SAAT
PRİMER ANTİKORLAR	Anti-mTORC1, Anti-PI3K, Anti-AKT, Anti-FOXO, Anti-Kaspaz 8-9	18 SAAT (+4°C nemli ortamda)
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
SEKONDER ANTİKOR	BIYOTINLE İŞARETLİ SEKONDER	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BOYAMA	DAB (Diamino benzidine)	10 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3×5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	
İNCELEME	OLYMPUS MARKA IŞIK MİKROSKOBU	

3.7. TUNEL yöntemi ile Apoptotik Hücre Değerlendirme

Apoptotik hücre değerlendirmesi için TUNEL yöntemi uygulandı. Deparafinizasyon işlemi yapılan kesitler önce DNA tespiti için proteinaz K ile 37° nemli ortamda 30 dk. inkübe edildi.

Fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kesitler DNA kırıklarının analizi için TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) enzimi ile 37° nemli ortamda 60 dk. muamele edildi. kontrol pozitif kesitler üzeri cover slip ile kaplandı. Fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kesitler konverter ile ışık mikroskobu ile görülebilir duruma getirildi. Fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kesitler kesitler İmmünoreaktivitenin görünür hale gelebilmesi için DAB (Diaminobenzidine Kromojen, DAB Kit,) uygulanan kesitler, Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması yapılarak alkolden geçirilip, ksilen ile şeffaflaştırma yapılarak entellan ile kapatıldı. TUNEL protokolü **Tablo 3.7.2.** ve kullanılan malzemeler **Tablo 3.7.3.**'de verilmiştir.

TABLO 3.7.2. TUNEL PROTOKOLÜ

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	FOSFAT TAMPON SOLÜSYONU (PBS)	10 DAKİKA
DAMLA OLUŞTURMA	DAKO PEN	
	PROTEİNAZ K	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
	TDt ENZİM	60 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
	Konverter	1 SAAT
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BOYAMA	DAB (Diamino benzidine)	10 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3×5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	

Tablo 3.5.2. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Kullanılan Malzemeler

MALZEME	FİRMA	KAT. NO	ÜLKE
Etil Alkol	Sigma-Aldrich	Lot no:SZBA2560V	St.Louis,USA
Methanol	Lab-Kim	2513/3	
Ksilen	Sigma-Aldrich	Lot no: SZBB0910V	St. Louis, USA
Harris Hematoksilen Solüsyonu	İnvitrogen®	Lot no: 72922024A	Paisley, UK
Eozin Solüsyonu	Surgipath	Lot no: 071108	Cambridgeshire, UK
Boncuk Parafin	Surgipath		Cambridgeshire, UK
Mikrotom Bıçağı	Leica		
Lizinli Lam	Surgipath	Lot no: KN00000009156	Cambridgeshire, UK.
Dako pen	Invitrogen®	00-8877	Paisley, UK.
Tripsin	Invitrogen®	00-3008	Paisley, UK.
PBS	Sigma-Aldrich	041M8227	St. Louis, USA
H₂O₂	Merck	Lot no: K40391897 935	Darmstadt, Germany
CAPE(Caffeic Acid Phenethylester)	Santa Cruz	Lot no:F2512	United States
EGCG(epigallokateşin gallat)	Santa Cruz	Lot no: 989-51-5	China
Anti- mTORC1 (Raptor)	Santa Cruz	SC-27744 Goat Polyclonal Antibody	California, USA
Anti- PI3K	Santa-Cruz Biotechnology	SC-1637 Mouse Monoclonal Antibody	California, USA
Anti- AKT1	Santa-Cruz Biotechnology	SC-271149 Mouse Monoclonal Antibody	California, USA
FKHR(Foxo1)	Santa-Cruz Biotechnology	SC-374427 Mouse Monoclonal Antibody	California, USA
KASPAZ 9	Bioss Biotechnology	bs-0049R Rabbit polyclonal Antibody	Pearland,Texas
KASPAZ 8	Bioss Biotechnology		Pearland,Texas

Tablo 3.7.3. Tünel Yönteminde Kullanılan Malzemeler

Proteinaz K	Roche	kat no:11684817910	Germany
Tdt enzim	Roche	kat no:11684817910	Germany
Converter	Roche	kat no:11684817910	Germany
DAB	İnvitrogen	kat no:00-1111	U.S
Mayers	Merck	kat no:109249	Germany

4. BULGULAR

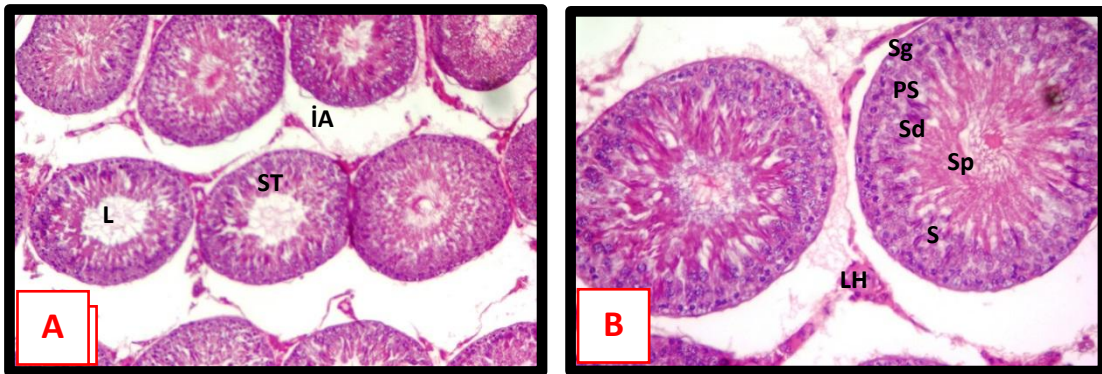
Çalışmada sıçanlarda oluşturulan Testis torsiyonu iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarında Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ve Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)'nin etkileri histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemler ile değerlendirilmiştir. Bouin solüsyonu ile tespit edilen ve parafine gömülen doku örneklerinden alınan kesitler Hematoksilen–Eozin ile boyanarak histopatolojik değerlendirme Johnsen skorlaması ile yapılmıştır. CAPE ve EGCG' nin apoptoz üzerine olan koruyucu etkileri anti-Kaspaz 8, anti-Kaspaz 9 primer antikoları ile mTOR yolağı ile ilişkisi anti-mTORC1, anti-PI3K, anti-AKT ve anti-FOXO1 primer antikoları ile değerlendirilmiştir. Biyokimyasal markerler olarak MDA, Katalaz, 8-OHG'in kan düzeyleri belirlenerek gruplar arasında antioksidan parametreler karşılaştırılmıştır.

Çalışmada genç erişkin sıçanlar 8 grup altında (n:7, her biri) değerlendirilmiştir. Kontrol grubu (Grup I, K) deney hayvanlarına hiçbir uygulama yapılmazken, Testis İskemi/Reperfüzyon grubu (Grup II, I/R) deney hayvanlarının sol testislerine 2 saat torsiyon ve ardından 4 saat reperfüzyon yapılmıştır. I/R grubu+ilaç uygulamaları gruplarında testis torsiyonu sonrasında, reperfüzyon öncesi 10 µmol./ kg., tek doz CAPE (Grup III, TD CAPE), Doyurma gruplarında ise I/R işleminden önceki 4 gün süre boyunca, günde bir kere, aynı dozlarda CAPE (Grup VI, DY CAPE), 10 µmol. /kg., tek doz EGCG (Grup V, TD EGCG), Doyurma gruplarından I/R işleminden önceki 4 gün süre boyunca, günde bir kere, aynı dozlarda EGCG (Grup VI, DY EGCG) tek doz kompleks CAPE+EGCG (Grup VI, TD KOMP) ve Doyurma gruplarından I/R işleminden önceki 4 gün süre boyunca, günde bir kere Kompleks (Grup VIII, DY KOMP) intraperitonel (i.p.) olarak uygulanmıştır. 4.gün sonunda I/R grubunda belirtildiği şekilde cerrahi işlem uygulanmıştır. Sol testislerine 2 saat torsiyon ve ardından 4 saat reperfüzyon yapılan deney hayvanlarından alınan doku ve kan örnekleri histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemler ile değerlendirilmiştir.

4.1. Histokimyasal Bulgular:

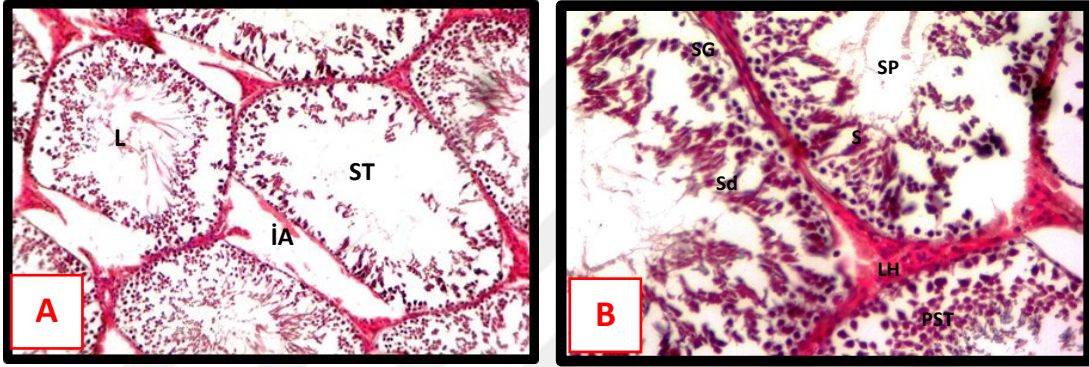
Bouin solüsyonu ile tespit edilen ve parafin doku takibi sonrası testis örneklerinden alınan kesitlerin H&E ile boyanarak ışık mikroskop altında değerlendirilmesinde;

Grup I, Kontrol grubunda, testisin dıştan sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea (TA) ile çevrelenmiş olduğu gözlemlendi. Kapsülden testis içerisine doğru uzanan septalar ile ayrılmış testis lobülleri içerisinde seminifer tubüller (ST) ve tubüller arasında yerleşmiş olan gevşek bağ dokusu yapısında, kan ve lenf damarlarından zengin interstisyel alan (İA) normal histolojik yapılarında izlendi. Seminifer tübül duvarında bazal membran (BM) üzerine oturmuş yuvarlak çekirdekli koyu ve açık spermatogonyumlar (Sg), tübülün en büyük hücresi olan kromatini yayılmış görünen primer spermatozoidler (PS) ve lümene yakın yerleşmiş küçük spermatidler izlendi. Tübülleri çevreleyen myoid hücreler yassı ve uzun çekirdekleri ile ayırt edildi. Tübüllerin merkezinde gelişmiş spermiler (Sp) izlendi. Spermatojenik hücreler arasında yer yer bazal membrandan lümene doğru uzayan Sertoli hücreleri (S) gözlemlendi. İnterstisyel alanda yer alan kapiller etrafında bulunan Leydig hücreleri (LH) düzensiz poligonal biçimli, asidofilik sitoplazmalı, büyük eksantrik çekirdek ve 1-2 çekirdekçik içeren hücreler olarak izlendi. İnterstisyel alanda inflamatuvar hücreler ve makrofajlar izlenmedi (**Resim 4.1.1.A-B**).



Resim 4.1.1.A-B: Kontrol grubuna ait sıçan testis dokularından alınan kesit görüntüleri. Seminifer Tübül (ST), Seminifer Tübül Lümeni (L), İnterstisyel Alan (İA), Spermatogonyum (Sg), Sertoli hücresi (S), Primer Spermatozoid (PS), Spermatid (Sd), Spermium (Sp), Leydig Hücresi (LH). X100 (A), X200 (B), H&E.

Grup II, İskemi /Reperfüzyon (I/R) grubunda, testis dokusunun 2 saat torsiyon ve 4 saat detorsiyonu sonrasında seminifer tübüllerde etkilenme, spermatogenik hücre düzenlenmesinde bozulma, sayıca azalma, hücreler arası bağlantı birimlerinde ayrılma, hücrelerde piknotik çekirdeklerin varlığı izlendi. Seminifer tubulusların bazal membrana oturmuş hücrelerde dağılma, intertisiyal alanda kapiller dilatasyon ve vaskülarizasyonda artma, hemoraji ve ödem gözlemlendi. Bu alanda inflamatuvar hücrelerin ve makrofajların varlığı izlendi (*Resim 4.1.2.A-B*).

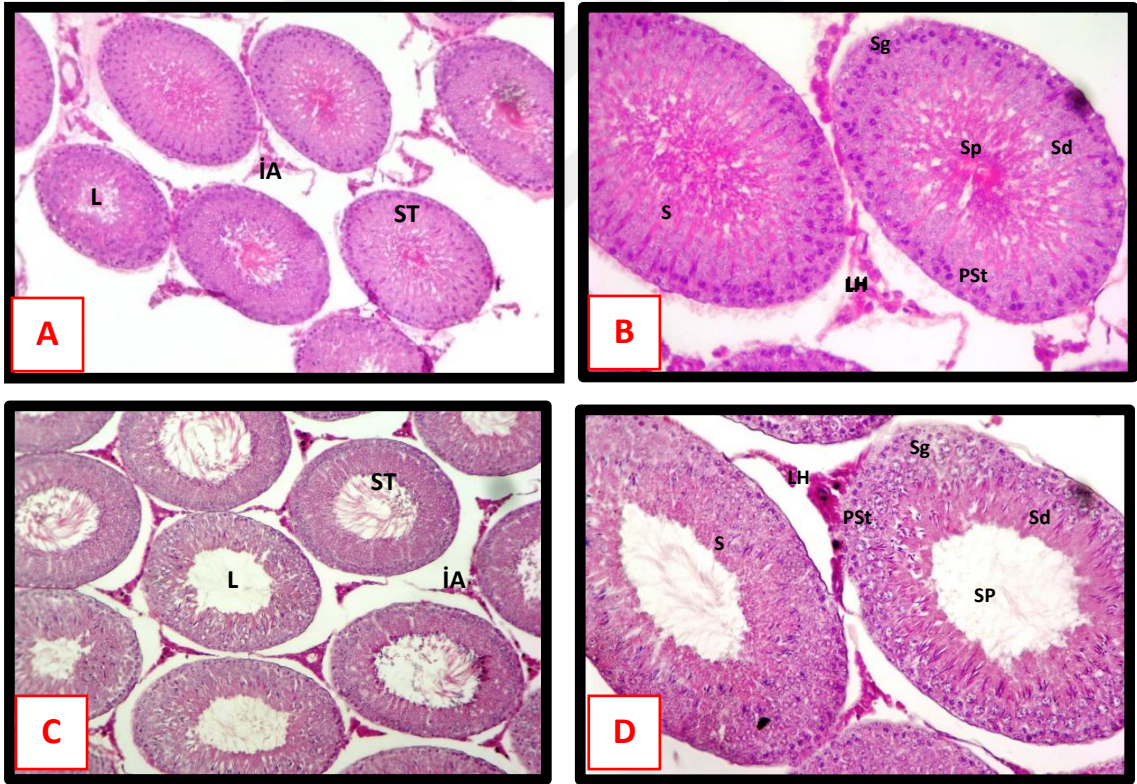


Resim 4.1.2.A-B: İskemi/Reperfüzyon grubuna ait sıçan testis dokularından alınan kesit görüntüleri. Seminifer Tübül (ST), Seminifer Tübül Lümeni (L), İnterstisiyel Alan (İA), Spermatogonyum (Sg), Sertoli hücresi (S), Primer Spermatozit (PS), Spermatozid (Sd), Spermium (Sp), Leydig Hücresi (LH). X100 (A), X200 (B), H&E.

Grup III, İskemi/Reperfüzyon sonrası tek doz CAPE (I/R+TD CAPE)

uygulanan gruptan elde edilen testis doku örneklerinde seminifer tübüllerin düzeninin I/R grubuna göre korunduğu, yer yer kontrole benzer normal görünümde seminifer tübüller olduğu izlendi. İnterstisiyel alanda ödem ve enflamatuvar hücrelerin azalmış olduğu ve minimal ödem ve hemoraji olduğu gözlemlendi (*Resim 4.1.3.A-B*).

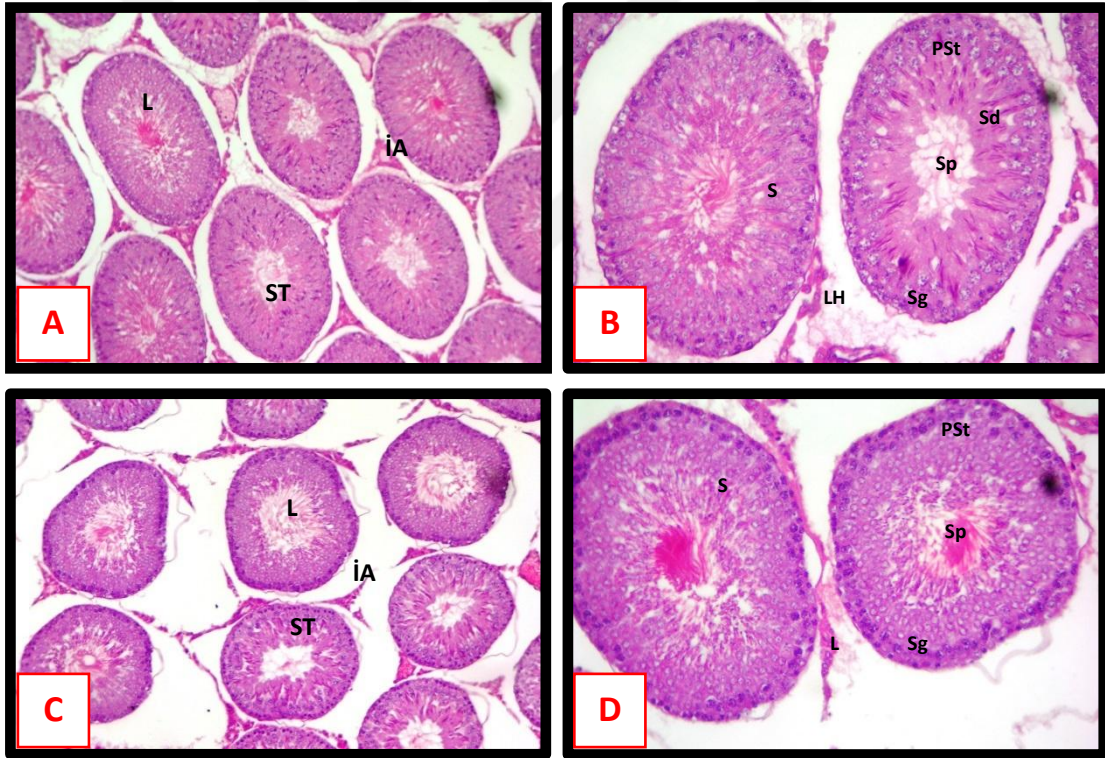
Grup IV, İskemi/Reperfüzyon öncesi 4 gün doyum dozda CAPE uygulanan (DY CAPE+I/R) gruptan elde edilen testis örneklerinde, seminifer tübül yapılarında ve epitel düzeninde yer yer bozulmaların devam ettiği izlendi. Tübül lümeninin kontrol grubuna göre geniş olduğu ve interstisiyel alanda I/R grubuna oranla azalmış olmakla birlikte orta derecede ödem ve hemorajinin varlığı izlendi (*Resim 4.1.3.C-D*).



Resim 4.1.3: TD CAPE(A-B) ve DY CAPE (C-D) gruplarına ait sıçan testis dokularından alınan kesit görüntüleri, Seminifer Tübül (ST), Seminifer Tübül Lümeni (L), İnterstisiyel Alan (İA), Spermatogonyum (Sg), Sertoli hücresi (S), Primer Spermatozoid (PS), Spermatid (Sd), Spermiyum (Sp), Leydig Hücresi (LH). X100 (A,C), X200 (B,D), H&E.

Grup V, İskemi/ Reperfüzyon sonrası tek doz EGCG (I/R+TD EGCG) uygulanan gruptan elde edilen testis doku örneklerinde, seminifer tübüllerin kontrol grubuna benzer morfoloji gösterdiği izlendi. Seminifer tübül epiteli düzenli olup lümen aralığı ve normal spermatogenik hücre yerleşimi olarak gözlemlendi. İnterstisiyal alanda hücre yerleşimi normal olup, hemoraji olmadığı izlendi (*Resim 4.14.A-B*).

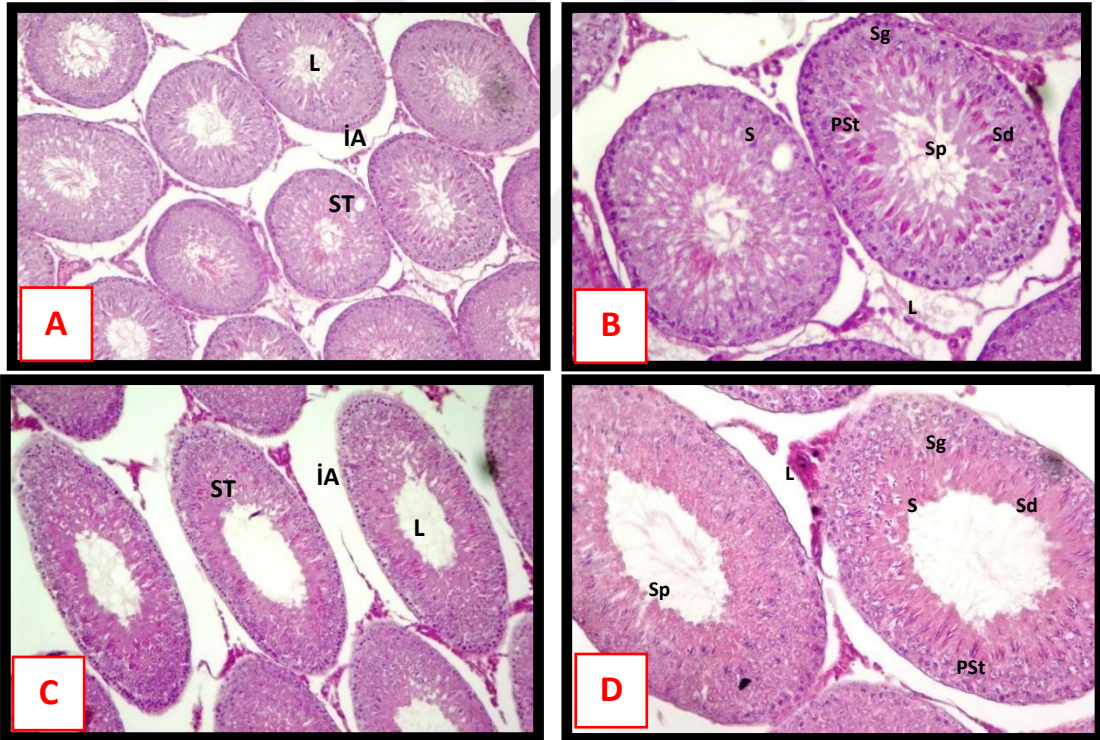
Grup VI, İskemi/Reperfüzyon öncesi 4 gün doyurma dozda EGCG (DY EGCG+I/R) uygulanan gruptan elde edilen testis doku örneklerinde, seminifer tübül epitelinin normal görünümde olduğu, lümen aralığının normale yakın görünümde olduğu, spermatogenik hücrelerin düzeninde yer yer bozulmalar olduğu izlendi. İnterstisiyal alanda genişleme ve ödem izlendi (*Resim 4.1.4.C-D*).



Resim 4.1.4: TD EGCG (A-B) ve DY EGCG (C-D) gruplarına ait sıçan testis dokularından alınan kesit görüntüleri. Seminifer Tübül (ST), Seminifer Tübül Lümeni (L), İnterstisiyal Alan (İA), Spermatogonyum (Sg), Sertoli hücresi (S), Primer Spermatozit (PS), Spermatozit (Sd), Spermium (Sp), Leydig Hücresi (LH). X100 (A,C), X200 (B,D), H&E.

Grup VII, İskemi/Reperfüzyon sonrası tek doz CAPE+EGCG (I/R+TD KOMP) uygulanan gruptan elde edilen testis doku örneklerinde, seminifer tübül epitelinde yer yer bozulmalar olmakla birlikte, normale yakın görünüm izlendi. Spermatojenik hücre yerleşimi düzenli olup lümen aralığının normal yapıda olduğu, intertisiyal alanda hemoraji olmadığı izlendi (*Resim 4.1.5.A-B*).

Grup VIII, İskemi/Reperfüzyon öncesi 4 gün doyurma dozda CAPE+EGCG uygulanan (DY KOMP+I/R) uygulanan gruptan elde edilen testis doku örneklerinde, seminifer tübül epitelinin yer yer düzeninin bozulduğu, lümenin normale göre geniş olduğu, spermatojenik hücre diziliminin bozulduğu ve lümeninde yer alan spermiumların azalmış olduğu izlendi. İntertisiyal alanda hemoraji izlenmemekle birlikte, genişleme ve ödem izlendi (*Resim 4.1.5.C-D*).



Resim 4.1.5.:TD KOMP (A-B) ve DY KOMP (C-D) gruplarına ait sıçan testis dokularından alınan kesit görüntüleri Seminifer Tübül (ST), Seminifer Tübül Lümeni (L), İntertisiyal Alan (İA), Spermatogonyum (Sg), Sertoli hücresi (S), Primer Spermatozoid (PS), Spermatozoid (Sd), Spermium (Sp), Leydig Hücresi (LH). X100 (A,C), X200 (B, D), H&E.

4.2. Johnsen Skorlaması

Kontrol, I/R ve I/R+ tek doz ve doyurma antioksidan uygulamalarına ait deney gruplarından (8 grup, n:7,herbiri) elde edilen testis kesitlerinin Hematoksilen&Eosin ile boyalı preparatlarının değerlendirilmesi *Johnsen skorlamasına* göre yapılmıştır. Seminifer tübül içerisindeki spermatogenik seri hücrelerinin düzeni, hangi aşamada olduğu ve tübüllerin yapısı, her bir kesitte 10 seminifer tübül değerlendirilerek, 1'den 10'a kadar sayısal değer verilerek skorlanmıştır.

Johnsen değerlendirmesinde; düzgün yükseklikte germinal epitel, çok sayıda spermatogenik hücreler, lümende çok sayıda sperm görülen normal çaplı seminifer tübüller **10**, epitel ve lümeninde minimal bozulma yanı sıra çok sayıda sperm görülen seminifer tübüller **9**, lümende 5-10'dan daha az sayıda sperm görülen seminifer tübüller **8**, epitelde çok sayıda spermatid, spermatozoid ve spermatogonyum gözlenen ancak lümende spermin görülmediği seminifer tübüller **7**, 5-20 spermatid, çok sayıda spermatozoid ve spermatogonyum gözlenen ancak spermin görülmediği seminifer tübüller **6**, çok sayıda spermatozoid ve spermatogonyum gözlenen ancak spermatid ve spermin görülmediği seminifer tübüller **5**, spermatozoidlerin 5'den az olduğu, çok sayıda spermatogonyum gözlenen, spermatid ve spermin görülmediği seminifer tübüller **4**, sadece spermatogonyum görülen seminifer tübüller **3**, germinal hücrelerin görülmediği, sadece Sertoli hücrelerinin bulunduğu seminifer tübüller **2**, ve seminifer tübüllerde hiç hücrenin olmaması **1** olarak skorlandı.

Johnsen skorlaması sonucunda elde edilen veriler, SPSS programına girilerek one-way ANOVA istatistiksel testi kullanılarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Grupların ortalamaları ile standart sapma değerleri *Tablo 4.2.A*'da grafik olarak *Tablo 4.2.B*'de istatistiksel olarak *Tablo 4.2.C*'de verilmiştir. Kontrol grubunda Johnsen skorlaması, ortalama $9,51 \pm 0,5$, I/R grubunda ortalama $5,06 \pm 0,42$ olarak saptanmıştır. İstatistiksel olarak değerlerin karşılaştırılmasında anlamlı farklılık belirlenmiştir ($p < 0.001^{***}$). İskemi sonrası tek doz antioksidan uygulandıktan sonra reperfüzyon yapılan gruplardan (TD CAPE, TD EGCG, TD KOMP) elde edilen Johnsen skorlamasında sırasıyla $8,08 \pm 0,77$; $9,00 \pm 0,85$; $8,04 \pm 0,72$ sonuçları elde

edilmiştir. İstatistiksel olarak kontrol grubu ile tek doz antioksidan uygulamaları karşılaştırıldığında TD EGCG uygulaması ile elde edilen değer kontrol grubuna yakın olduğu, istatistiksel olarak az anlamlı olarak farklı olduğu ($p < 0.05^*$) izlenmiştir.

İskemi öncesi 4 gün tek doz antioksidan uygulandıktan sonra iskemi/reperfüzyon yapılan gruplardan (DY CAPE, DY EGCG, DY KOMP) elde edilen Johnsen skorlamasında sırasıyla $7,41 \pm 0,96$; $7,86 \pm 1,04$; $7,49 \pm 0,67$ sonuçları elde edilmiştir. Bu gruptan elde edilen değerlerin I/R grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği izlenmiştir ($p < 0.001^{***}$).

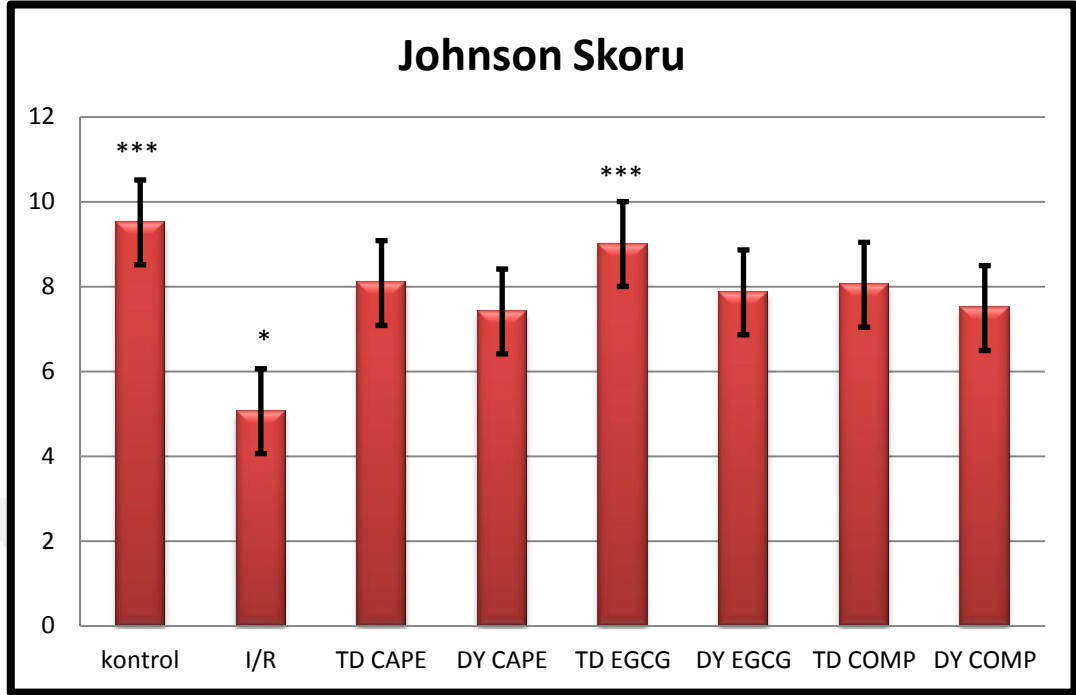
CAPE ve KOMP uygulamalarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olduğu görülmüştür ($p < 0.001^{***}$). Kontrol grubuna benzer anlamlılığı sırası ile diğer gruplar (TD CAPE, TD KOMP, DY EGCG, DY CAPE, DY KOMP) izlenmiştir.

Antioksidan uygulamalarının I/R grubu ile karşılaştırılmasında tüm grupların istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu ($p < 0,001^{***}$) ve antioksidan uygulamalarının testis dokusu üzerinde iyileşme yönünde olumlu etkisi olduğu izlenmiştir.

A

GRUPLAR	JOHNSEN KRİTERLERİ DEĞERLENDİRMESİ(ORT.±SD.)
Kontrol	9,51±0,5
I/R	5,06±0,42
TD CAPE	8,08±0,77
DY CAPE	7,41±0,96
TD EGCG	9,00±0,85
DY EGCG	7,86±1,04
TD COMP.	8,04±0,72
DY COMP.	7,49±0,67

Tablo 4.2.A. Johnsen skoruna göre grupların ortalama ve standart sapma değerleri

B

Tablo 4.2.B. Gruplar arası Johnson skor analizleri

C

GRUPLAR	p DEĞERİ
Kontrol vs I/R	*** p<0.001
Kontrol vs TD EGCG	*p<0.05
Kontrol vs TD CAPE, TD KOMP, DY EGCG, DY KOMP, DY CAPE	***p<0.001
I/R vs TD EGCG, TD CAPE, TD KOMP, DY EGCG, DY KOMP, DY CAPE	***p<0.001
TD CAPE vs TD KOMP, DY EGCG	p>0.05
DY CAPE vs DY EGCG, DY KOMP	p>0.05
DY EGCG vs DY KOMP, TD KOMP	p>0.05

Tablo 4.2.C Johnson skoruna göre gruplar arası istatistiksel sonuçları

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular:

Kontrol, I/R, I/R+tek doz ve doyurma CAPE ile EGCG antioksidan uygulamalarına ait deney gruplarından (8 grup, n:7,herbiri) elde edilen testis kesitlerinde, uygulamaların PI3K/AKT/mTOR yolağı ile ilişkisi anti-PI3K, anti-AKT, anti-mTORC1 ve anti-FOXO1 primer antikoları; apoptotik yollar ile ilişkisi anti-Kaspaz 8, anti-Kaspaz 9 primer antikoları kullanılarak indirek immünohistokimyasal yöntemle değerlendirilmiştir. Gruplardan elde edilen immünoreaktivite şiddetleri + (hafif), ++ (orta) +++ (şiddetli) olarak değerlendirildi. Gruplardan elde edilen ortalama değerler, standart sapmalar grafikler ve istatistiksel sonuçlar tablolar halinde gösterilmiştir.

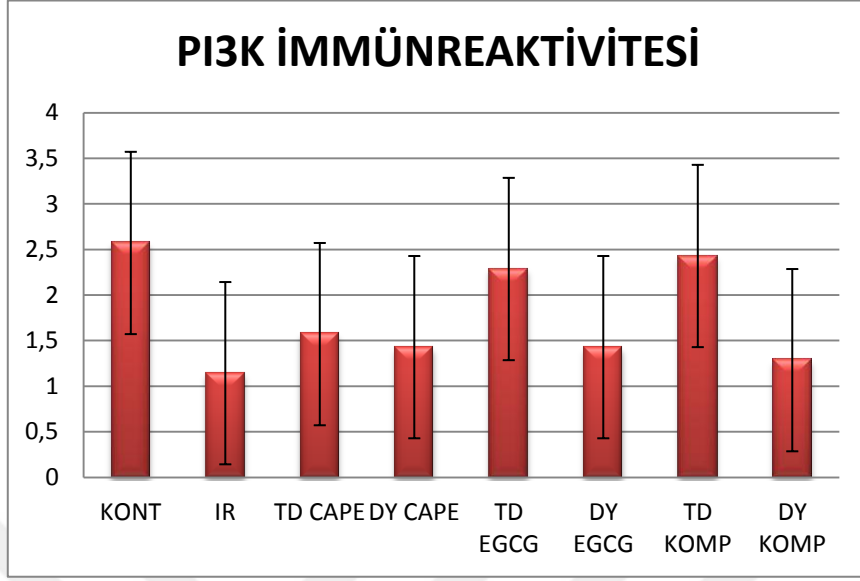
4.3.1. Anti-PI3K immünoaktivitesi:

Kontrol grubundan elde edilen testis örneklerini **anti-PI3K** primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntem kullanılarak değerlendirilmesinde; kontrol grubu Seminifer tubulus epitelinde bulunan spermatogenik hücreler, Sertoli hücreleri ve interstisiyel Leydig hücrelerinde orta/şiddetli (++) PI3K immünoaktivitesi izlendi. I/R yapılan gruptan elde edilen testis örneklerinde epitel düzeninin bozulmuş olduğu spermatogenik ve diğer hücrelerde immünoaktivitenin azalmış olduğu hafif immünoaktivite (+) izlenirken, sırasıyla TD EGCG ve TD KOMP uygulamalarda orta (++) TD CAPE, DY EGCG, DY CAPE ve DY KOMP gruplarında hafif/orta (+) immünoaktivite izlendi (**Resim 4.3.1.**).

Grupların ortalamaları ile standart sapma değerleri **Tablo 4.3.1.A**'da grafik olarak **Tablo 4.3.1.B**'de istatistiksel olarak **Tablo 4.3.1.C**'de verilmiştir

.GRUPLAR	PI3K İMMÜNREAKTİVİTESİ DEĞERLENDİRMESİ(ORT.±SD.)
Kontrol	2,57±0,53
I/R	1,14±0,37
TD CAPE	1,57±0,53
DY CAPE	1,42±0,53
TD EGCG	2,28±0,48
DY EGCG	1,42±0,53
TD COMP.	2,42±0,53
DY COMP.	2,28±0,48

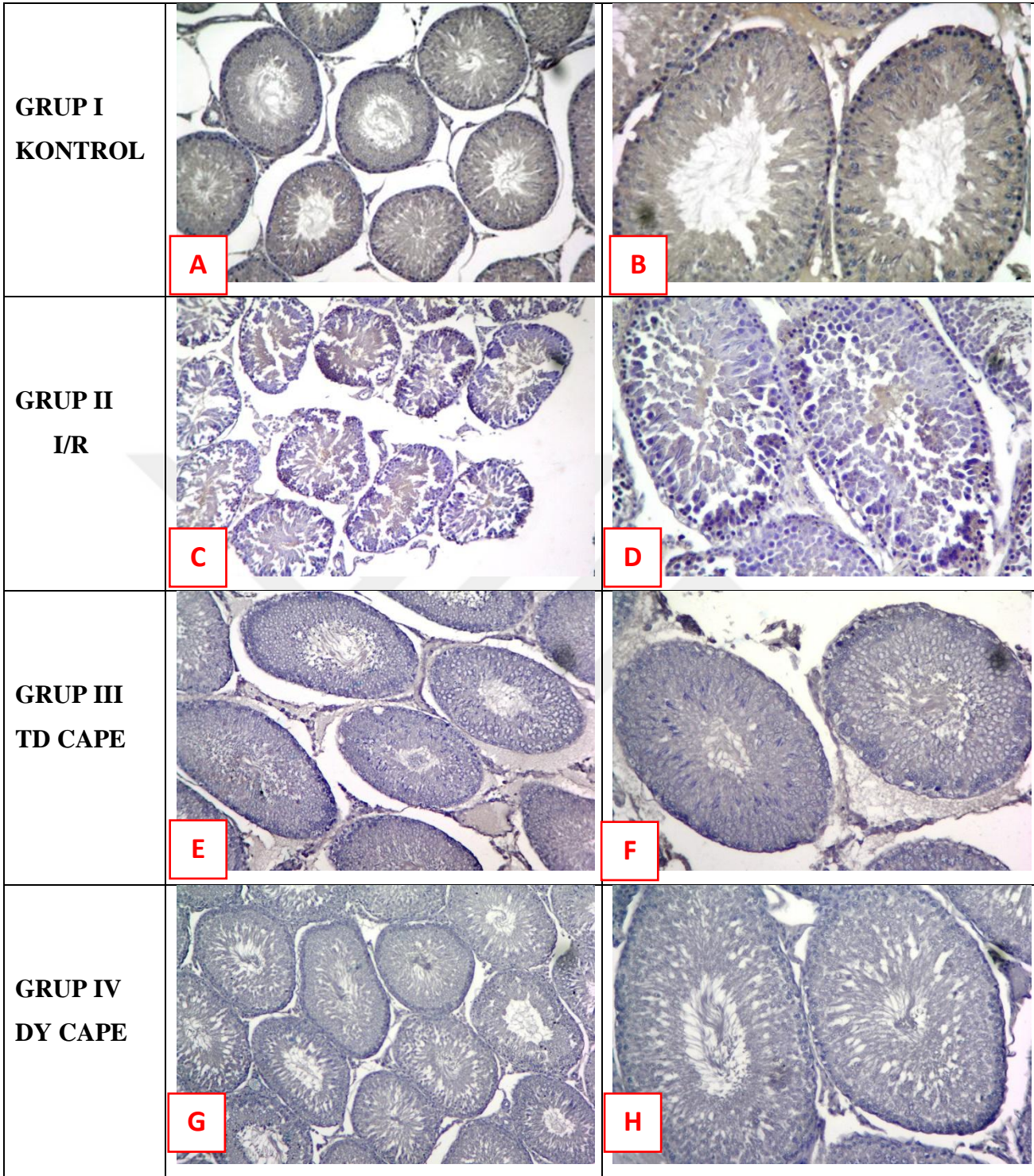
Tablo 4.3.1.A: Anti-PI3K ortalamaları ve standart sapma

B**Tablo 4.3.1.B:Anti-PI3K immünreaktivite değerlendirme****C**

GRUPLAR	p DEĞERİ
Kontrol vs I/R	*** $p < 0.001$
Kontrol vs TD EGCG	*$p < 0.05$
Kontrol vs TD KOMP	*$p < 0.05$
I/R vs TD EGCG, TD CAPE, TD KOMP, DY EGCG, DY KOMP, DY CAPE	***$p < 0.001$

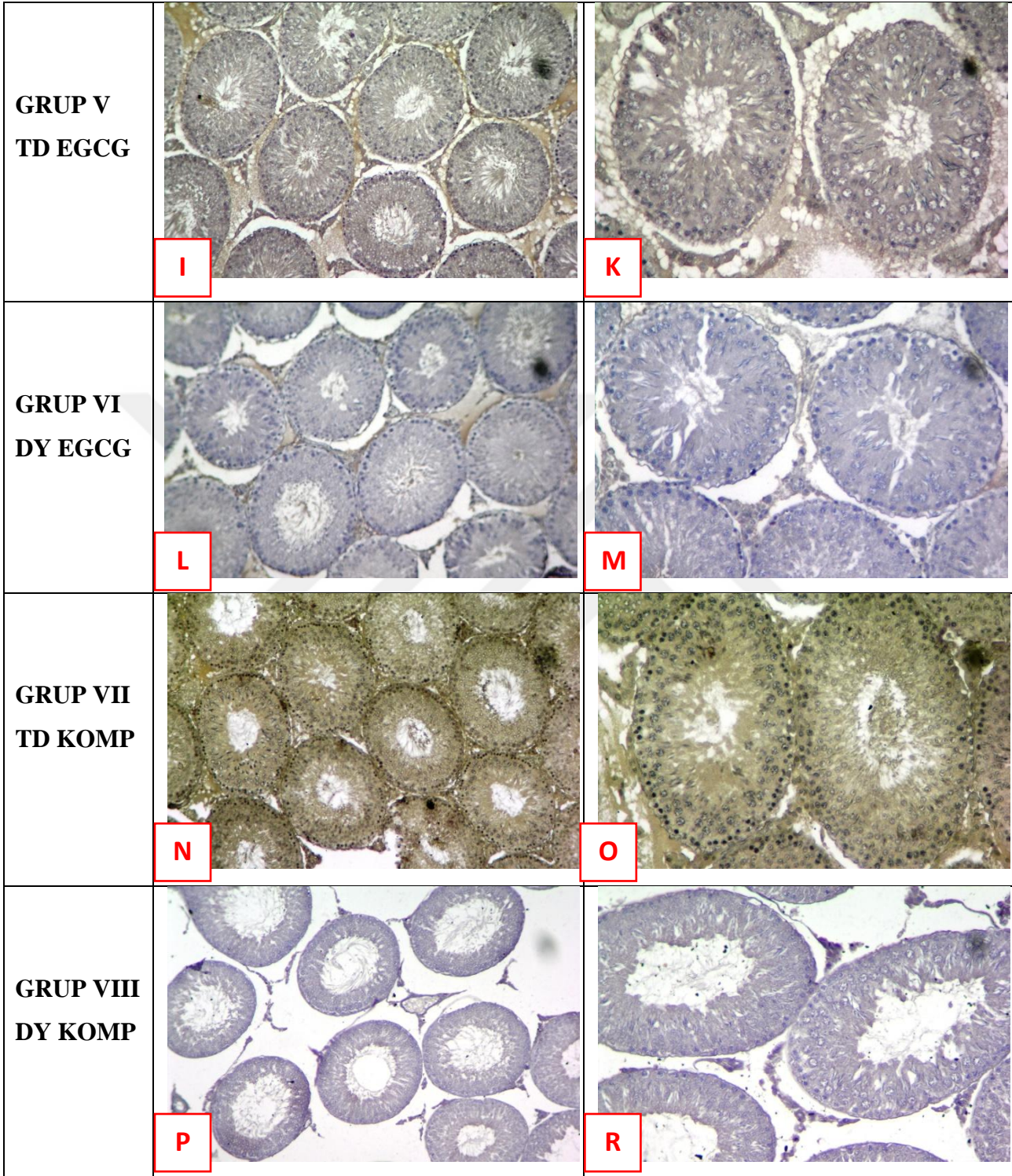
Tablo 4.3.1.C:Anti-PI3K istatistiksel değerlendirme

ANTI -PI3K İMMÜNOREAKTİVİTESİ



Resim4.3.1:Anti-PI3K primer antikoru kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri. Kontrol grubunda testiste seminifer tübüllerde yer alan spermatogenik hücrelerde orta-şiddetli(++/+++)(A,B), I/R grubu spermatogenik hücrelerde hafif(+)(C,D),TD ve DY CAPE grup hücrelerinde hafif/orta(+/++) (E,F,G,H)immünoreaktivite izlenmiştir

ANTI -PI3K İMMÜNOREAKTİVİTESİ



Resim 4.3.1:Anti-PI3K primer antikorunu kullanılarak yapılan indirek immunohistokimyasal boyama ile gruptardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri. TD EGCG ve TD KOMP grupları spermatogenik hücrelerde orta(++)(**I,K,N,O**), DY EGCG ve DY KOMP grup spermatogenik hücrelerde hafif/orta (+/++) (**L,M,P,R**)immünreaktivate izlenmiştir.

4.3.2. Gruplardan elde edilen testis örneklerinin **anti-AKT** primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntem kullanılarak değerlendirilmesinde;

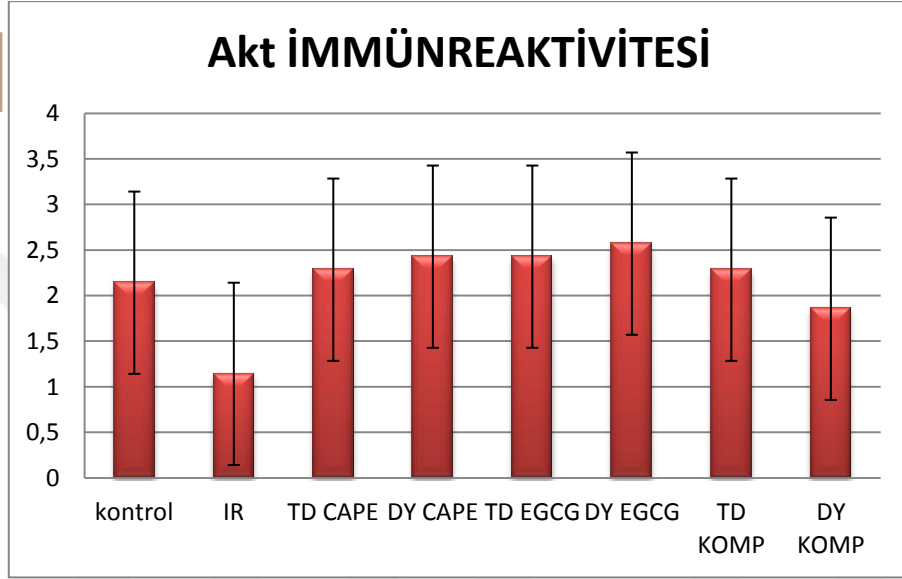
Kontrol grubunda, seminifer tubulus epitelinde bulunan spermatogenik hücreler, Sertoli hücreleri ve interstisiyel Leydig hücrelerinde orta (++) AKT immünreaktivitesi izlendi. I/R yapılan gruptan elde edilen testis örneklerinde epitel düzeninin bozulmuş olduğu spermatogenik ve diğer hücrelerde immünreaktivitenin azalmış olduğu hafif immünreaktivite (+) izlenirken, sırasıyla TD KOMP hafif/orta (+/++), TD CAPE, TD EGCG uygulamalarda orta (++) , DY EGCG, DY CAPE ve DY KOMP gruplarında orta/şiddetli (++/+++) immünreaktivite izlendi (*Resim 4.3.2.*).

Grupların ortalamaları ile standart sapma değerleri *Tablo 4.3.2.A*'da grafik olarak *Tablo 4.3.2.B*'de istatistiksel olarak *Tablo 4.3.2.C*'de verilmiştir.

A

GRUPLAR	AKT İMMÜNREAKTİVİTESİ DEĞERLENDİRMESİ(ORT.±SD.)
Kontrol	2,14±0,37
I/R	1,14±0,37
TD CAPE	2,28±0,48
DY CAPE	2,42±0,53
TD EGCG	2,42±0,53
DY EGCG	2,57±0,53
TD COMP.	2,28±0,48
DY COMP.	1,85±0,37

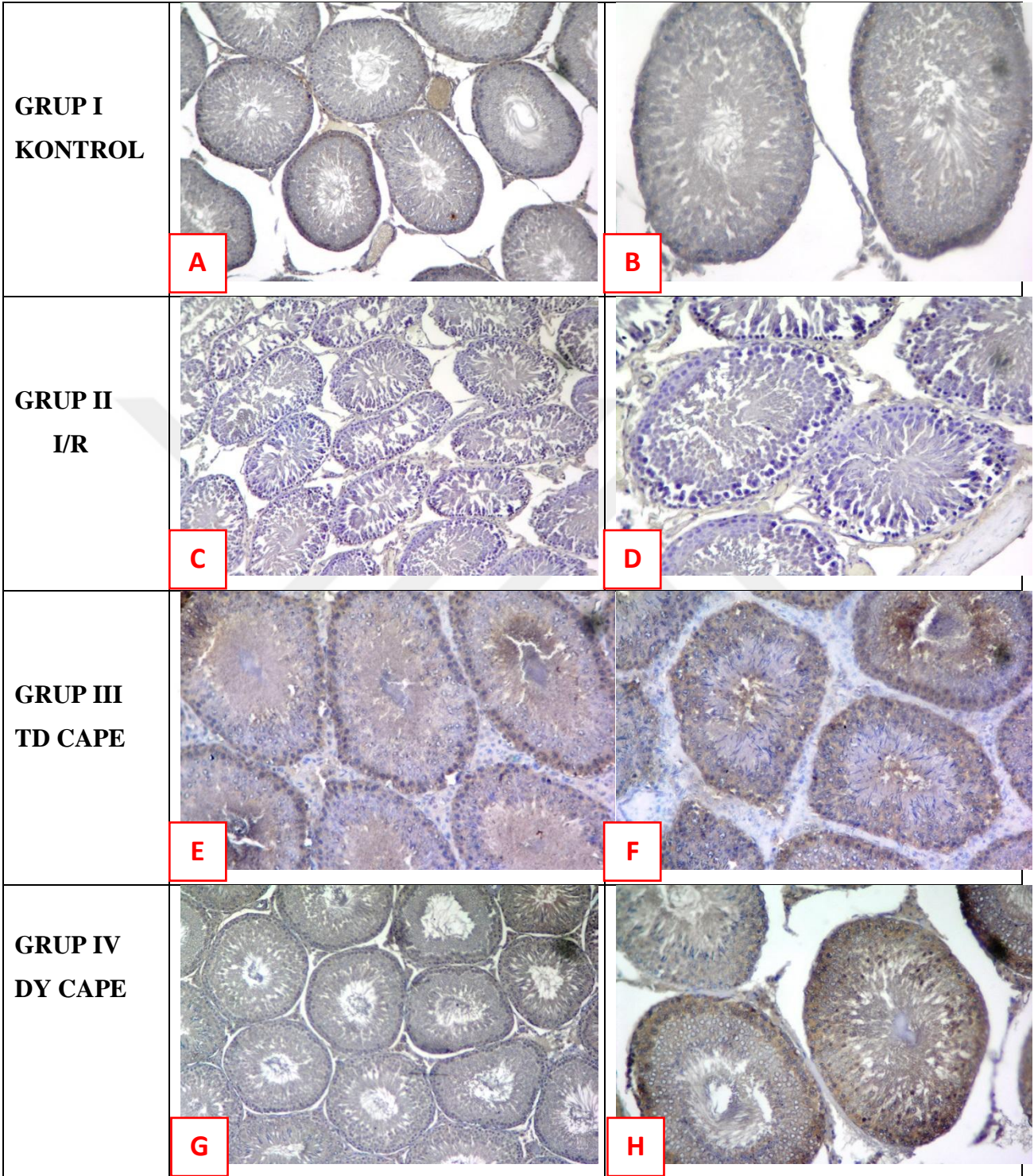
Tablo 4.3.2.A:Anti-AKT immünreaktivite ortalama ve standart sapma değerleri

B**Tablo 4.3.2.B:Anti-AKT immünreaktivite Değerleri****C**

GRUPLAR	p DEĞERİ
Kontrol vs I/R	*** $p < 0.001$
Kontrol vs DY EGCG	* $p < 0.05$
Kontrol vs TD CAPE ,TD EGCG, TD KOMP, DY EGCG, DY KOMP, DY CAPE	*** $p < 0.001$

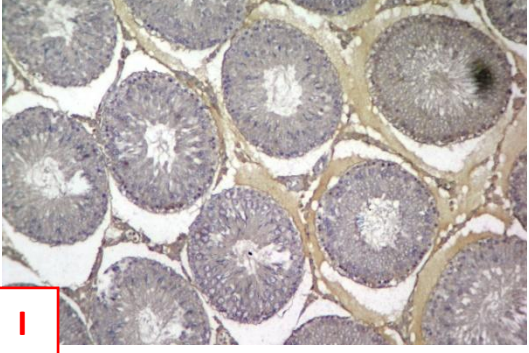
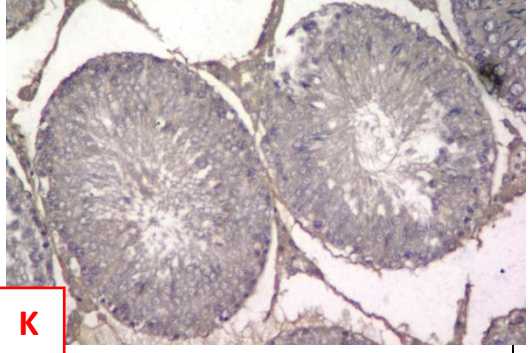
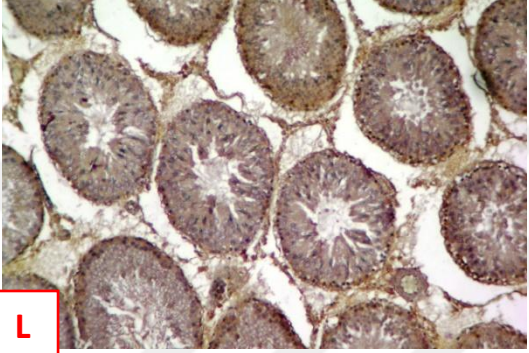
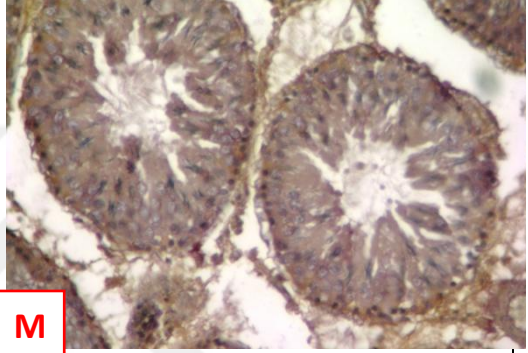
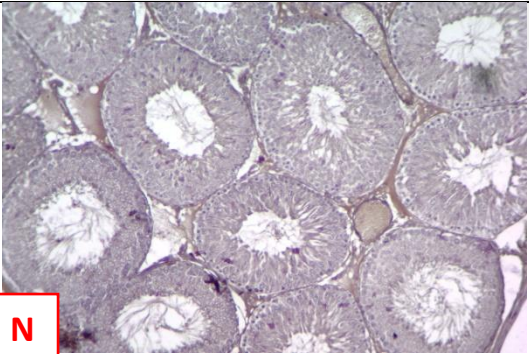
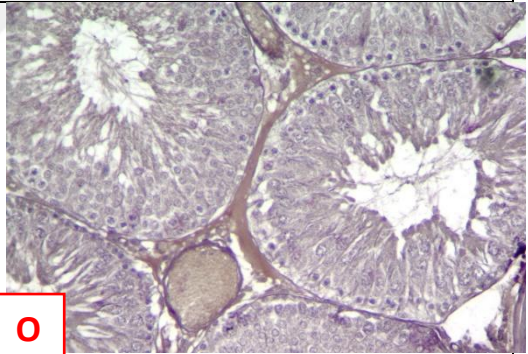
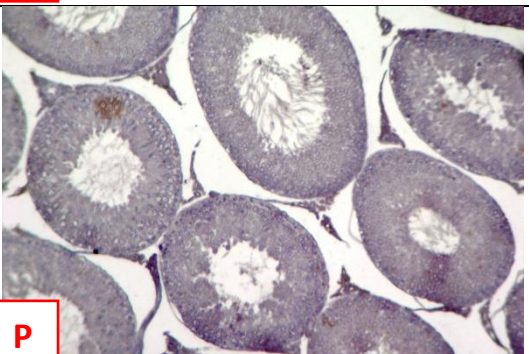
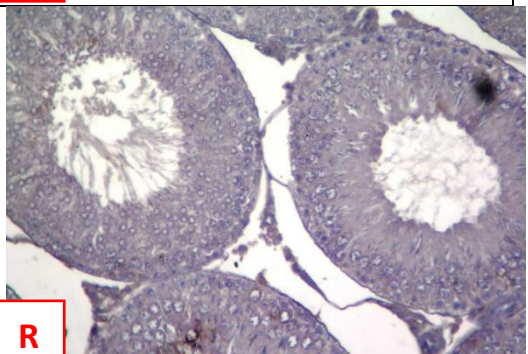
Tablo 4.3.2.C:Anti-AKT istatistiksel değerlendirmesi

ANTI -AKT İMMÜNOREAKTİVİTESİ



Resim 4.3.2:Anti-AKT primer antikoru kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri. Kontrol grubu spermatogenik hücrelerde orta(+ /++)(A,B) immünoreaktivite izlenirken,I/R grubu spermatogenik hücrelerde hafif(+)(C,D),TD CAPE grup spermatogenik hücrelerde orta(++)(E,F,)DY CAPE orta/şiddetli(++ /+++)(G,H) grup spermatogenik hücrelerde immünoreaktivite izlenmiştir.

ANTI-AKT İMMÜNOREAKTİVİTESİ

<p>GRUP V TD EGCG</p>	 <p>I</p>	 <p>K</p>
<p>GRUP VI DY EGCG</p>	 <p>L</p>	 <p>M</p>
<p>GRUP VII TD KOMP</p>	 <p>N</p>	 <p>O</p>
<p>GRUP VIII DY KOMP</p>	 <p>P</p>	 <p>R</p>

Resim 4.3.2:Anti AKT primer antikorunu kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri TD EGCG orta(++)(**I,K**) DY EGCG,DY KOMP grubu spermatogenik hücrelerde orta/şiddetli(++/+++)(**L,M, P,R**)immünreaktivite, ve TD KOMP grubunda(**N,O**) grubunda hafif/orta (+/++)immünreaktivite izlenmiştir.

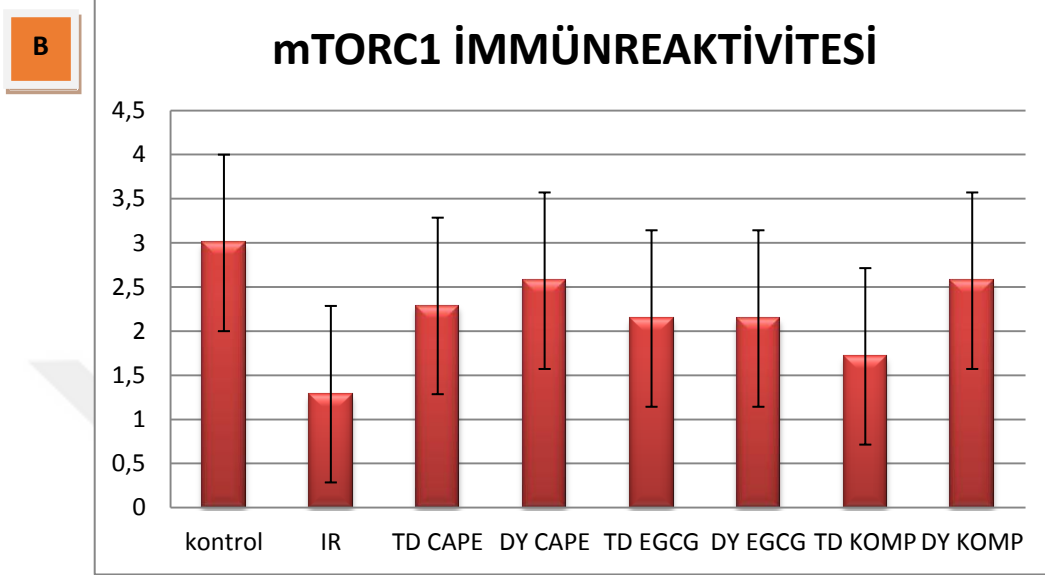
4.3.3. Gruplardan elde edilen testis örneklerinin **anti-mTORC1** primer antikoruna ile indirek immünohistokimyasal yöntem kullanılarak değerlendirilmesinde;

Kontrol grubunda, seminifer tubulus epitelinde bulunan spermatogenik hücreler, Sertoli hücreleri ve interstisiyel Leydig hücrelerinde şiddetli (+++) mTORC1 immünoreaktivitesi izlendi. I/R yapılan gruptan elde edilen testis örneklerinde epitel düzeninin bozulmuş olduğu spermatogenik ve diğer hücrelerde immünoreaktivitenin azalmış olduğu hafif (+) immünoreaktivite izlenirken, sırasıyla TD KOMP hafif (+), TD CAPE, TD EGCG, DY EGCG uygulamalarda orta (++) , DY CAPE ve DY KOMP gruplarında orta/şiddetli (++)/ (++++) immünoreaktivite izlendi (*Resim 4.3.3.*).

Grupların ortalamaları ile standart sapma değerleri *Tablo 4.3.3.A*'da grafik olarak *Tablo 4.3.3.B*'de istatistiksel olarak *Tablo 4.3.3.C*'de verilmiştir.

GRUPLAR	mTORC İMMÜNREAKTİVİTESİ DEĞERLENDİRMESİ(ORT.±SD.)
Kontrol	3±0
I/R	1,28±0,48
TD CAPE	2,28±0,48
DY CAPE	2,57±0,53
TD EGCG	2,14±0,53
DY EGCG	2,14±0,37
TD COMP.	1,71±0,48
DY COMP.	2,57±0,53

Tablo 4.3.3.A:Anti-mTORC1 ortalamala ve standart sapma değerleri



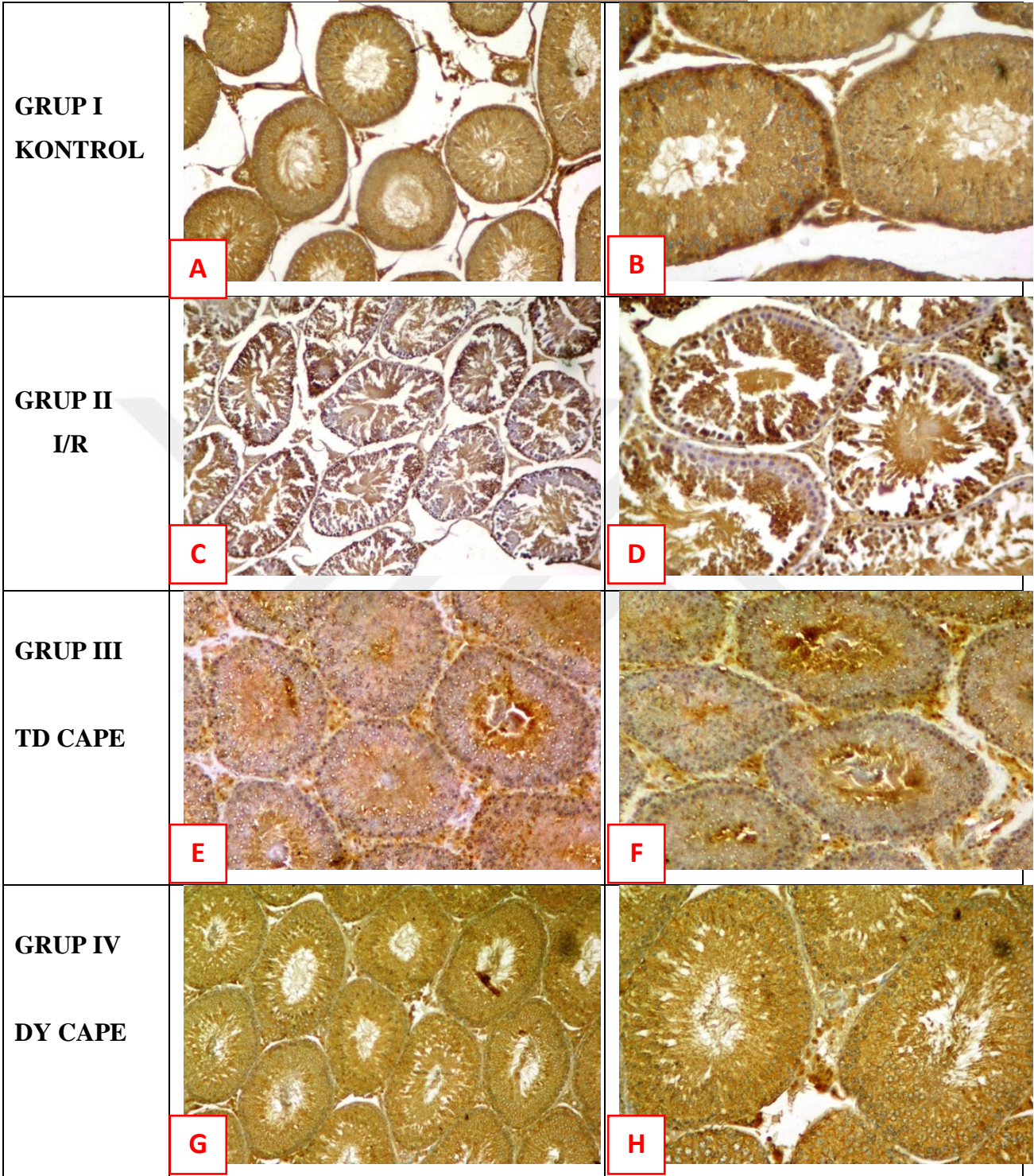
Tablo 4.3.3.B:Anti-mTORC1 immünreaktivite değerlendirmesi

C

GRUPLAR	p DEĞERİ
Kontrol vs I/R	*** p<0.001
Kontrol vs DY CAPE,DY KOMP	*p<0.05
Kontrol vs TD CAPE ,TD EGCG, TD KOMP, DY EGCG,	**p<0.01

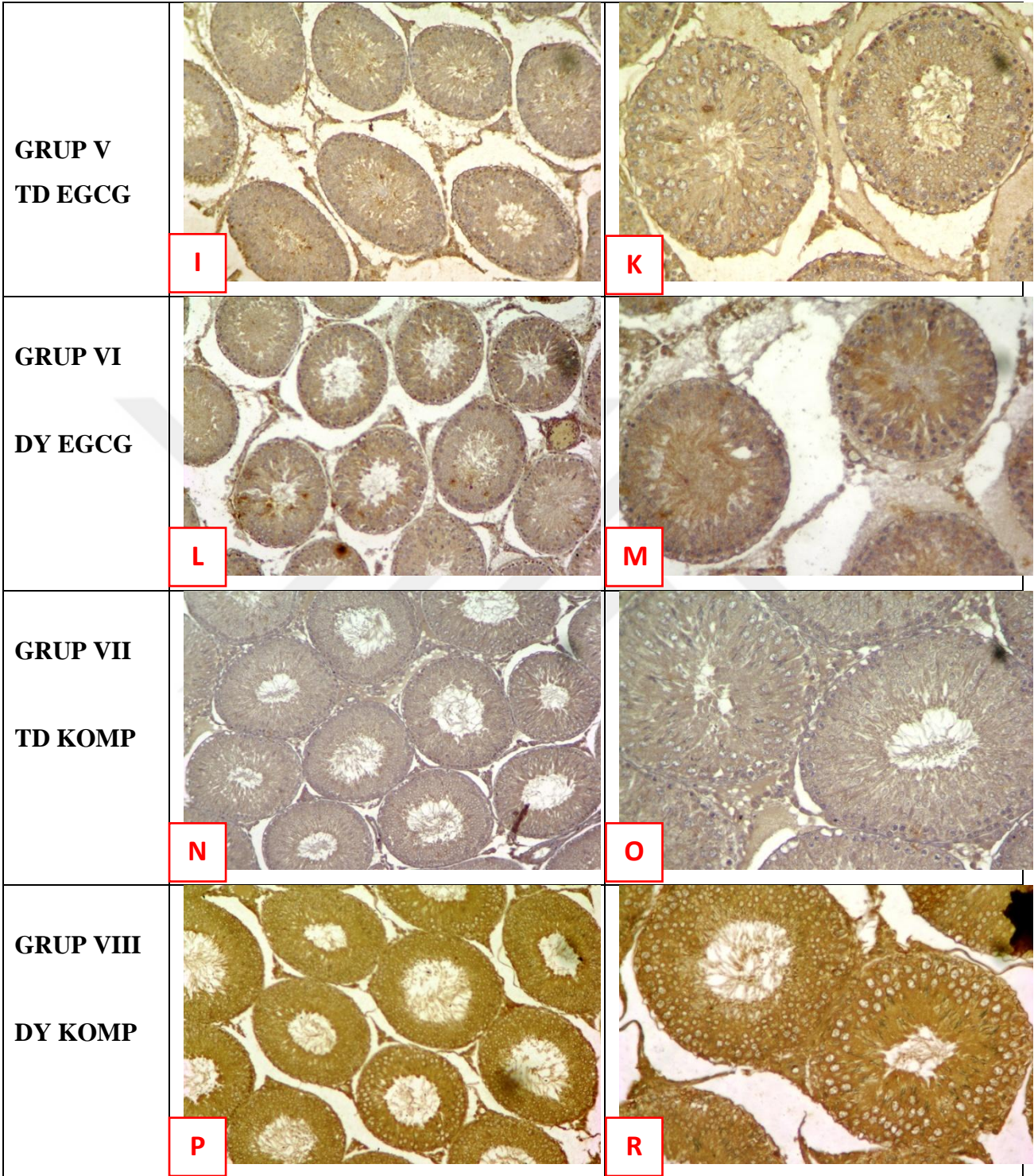
Tablo 4.3.3.C:Anti-mTORC1 istatistiksel değerlendirmes

ANTI-mTORC1 İMMÜNOREAKTİVİTESİ



Resim 4.3.3:Anti-mTORC primer antikorunu kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri Kontrol grubu spermatogenik hücrelerde şiddetli(+++)(A,B),I/R ve TD KOMP grupları spermatogenik hücrelerde hafif(+)(C,D,N,O) immünoreaktivite izlendi.

ANTI-mTORC1 İMMÜNOREAKTİVİTESİ



Resim 4.3.3:Anti-mTORC1 primer antikorunu kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri TD EGCG,TD CAPE ve DY EGCG grubunda orta(++)(**I,K,E,F,L,M**) ,DY CAPE,DY KOMP grup spermatogenik hücrelerde orta/ şiddetli(++/+++)(**G,H,P,R**) immünoreaktivite izlendi.

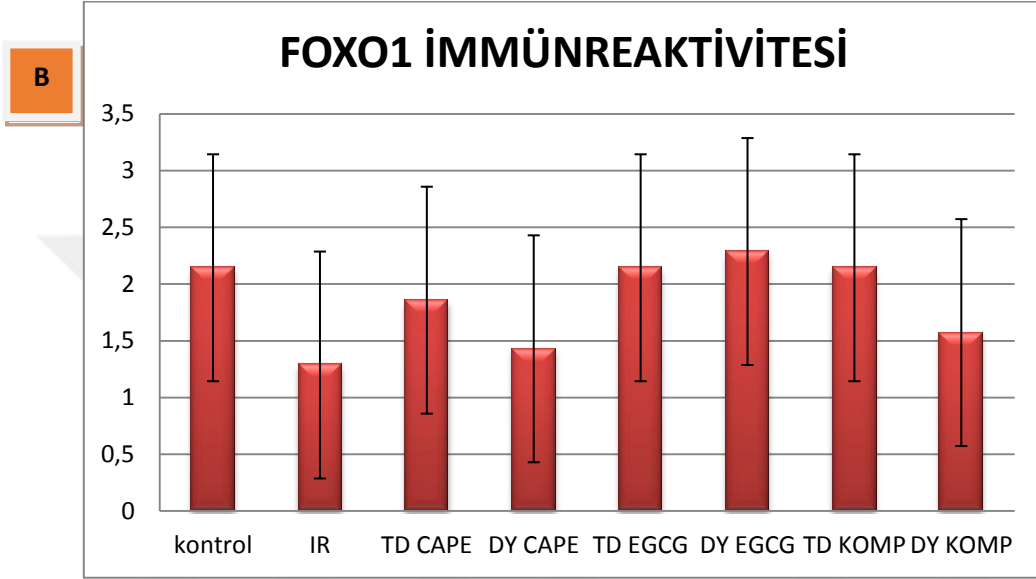
4.3.4. Gruplardan elde edilen testis örneklerinin **anti-FOXO1** primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntem kullanılarak değerlendirilmesinde;

kontrol grubunda, seminifer tubulus epitelinde bulunan spermatogenik hücreler, Sertoli hücreleri ve interstisiyel Leydig hücrelerinde orta (++) FOXO1 immünreaktivitesi izlendi. I/R yapılan gruptan elde edilen testis örneklerinde epitel düzeninin bozulmuş olduğu spermatogenik ve diğer hücrelerde immünreaktivitenin azalmış olduğu hafif (+) immünreaktivite izlenirken, sırasıyla DY KOMP ve DY CAPE gruplarında hafif/orta(+++),TD CAPE, TD EGCG, TD KOMP gruplarında orta (++)), DY EGCG gruplarında orta/şiddetli (++)/+++ immünreaktivite izlendi (*Resim 4.3.4.*).

Grupların ortalamaları ile standart sapma değerleri *Tablo 4.3.4.A*'da grafik olarak *Tablo 4.3.4.B*'de istatistiksel olarak *Tablo 4.3.4.C*'de verilmiştir.

GRUPLAR	FOXO1 İMMÜNREAKTİVİTESİ DEĞERLENDİRMESİ(ORT.±SD.)
Kontrol	2,14±0,37
I/R	1,28±0,48
TD CAPE	1,85±0,37
DY CAPE	1,42±0,53
TD EGCG	2,14±0,37
DY EGCG	2,28±0,48
TD COMP.	2,14±0,37
DY COMP.	1,57±0,53

Tablo 4.3.4.A:Anti-FOXO1 ortalamala ve standart sapma değerleri



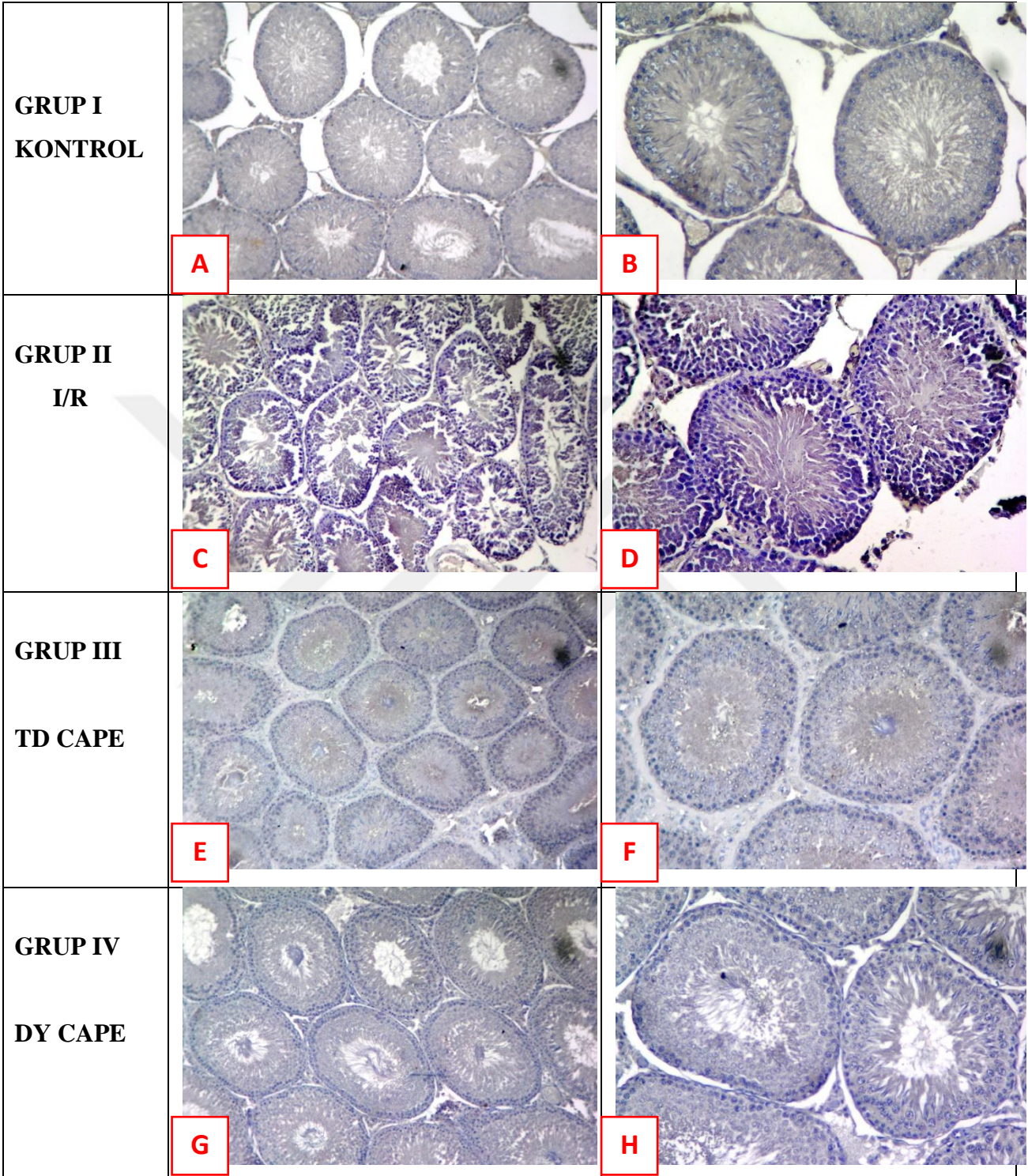
Tablo 4.3.4.B:Anti-FOXO1 immünreaktivite değerlendirmesi

C

<i>GRUPLAR</i>	<i>p DEĞERİ</i>
<i>Kontrol vs I/R</i>	<i>*** p<0.001</i>
<i>Kontrol vs TD EGCG,TD KOMP</i>	<i>*p<0.05</i>
<i>Kontrol vs TD CAPE , DY KOMP, DY EGCG,</i>	<i>**p<0.01</i>
<i>I/R VS DY CAPE</i>	<i>*** p<0.001</i>

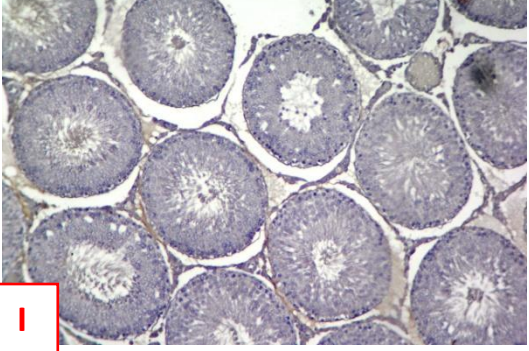
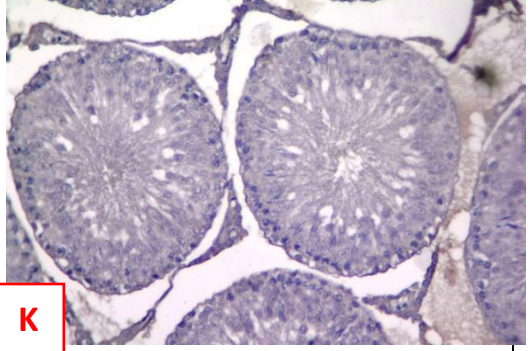
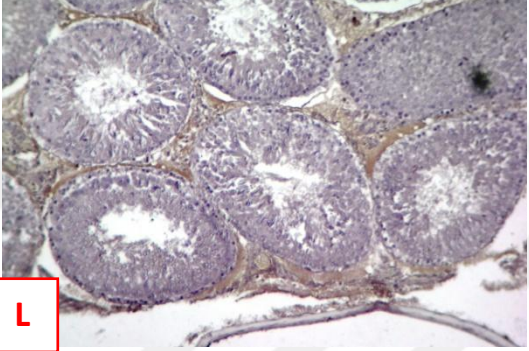
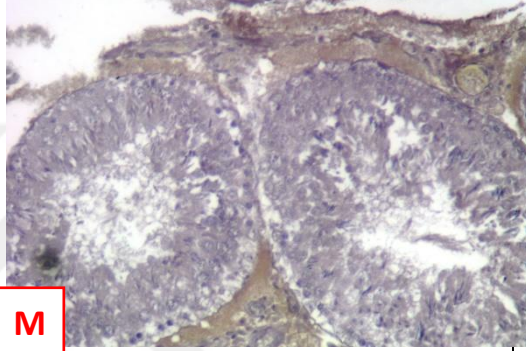
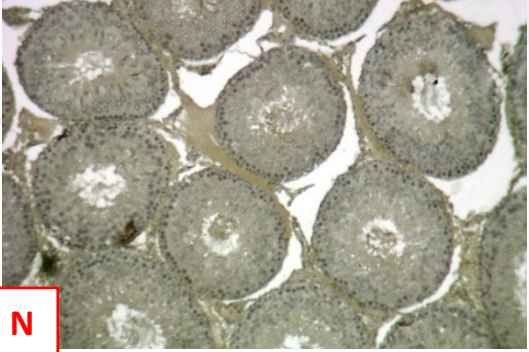
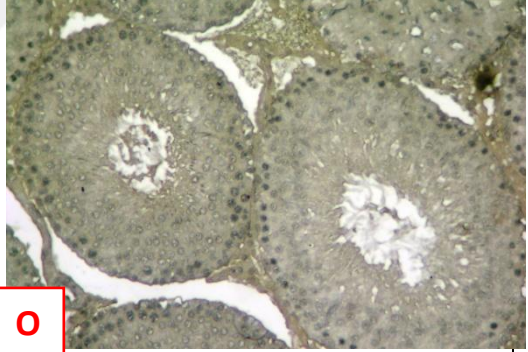
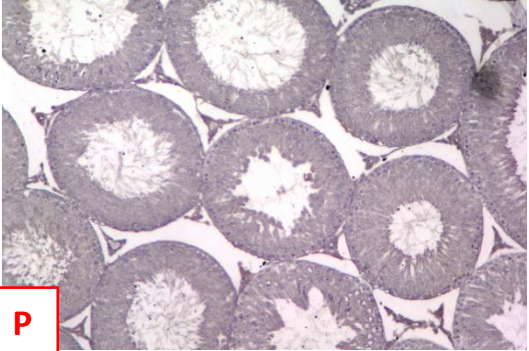
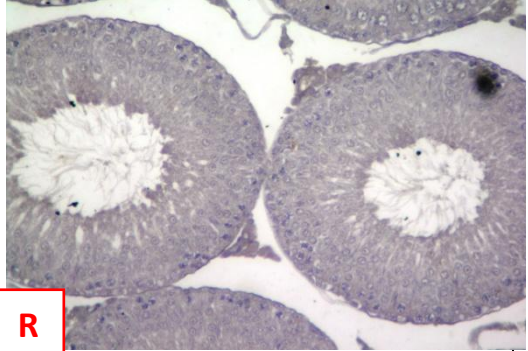
Tablo 4.3.4.C:Anti-FOXO1 istatistiksel değerlendirmesi

ANTI- FOXO1 İMMÜNOREAKTİVİTESİ



Resim 4.2.4: Anti-FOXO primer antikorunu kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruptan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri Kontrol grubu, TD CAPE, EGCG, KOMP gruplarında orta(++) (A,B,E,F,I,K,P,R) immünoreaktivite gözlenirken I/R grubu spermatogenik hücrelerde hafif(+) (C,D) derecede immünoreaktivite gözlemlendi.

ANTI- FOXO1 İMMÜNOREAKTİVİTESİ

<p>GRUP V TD EGCG</p>	 <p>I</p>	 <p>K</p>
<p>GRUP VI DY EGCG</p>	 <p>L</p>	 <p>M</p>
<p>GRUP VII TD KOMP</p>	 <p>N</p>	 <p>O</p>
<p>GRUP VIII DY KOMP</p>	 <p>P</p>	 <p>R</p>

Resim 4.3.4: Anti-FOXO primer antikorunu kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruptardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri. DY CAPE ve DY KOMP grubunda hafif/orta(+/++)(G,H,P,R), DY EGCG grubu spermatogenik hücrelerinde orta/şiddetli(+/+++)(L,M) immünoreaktivite izlendi.

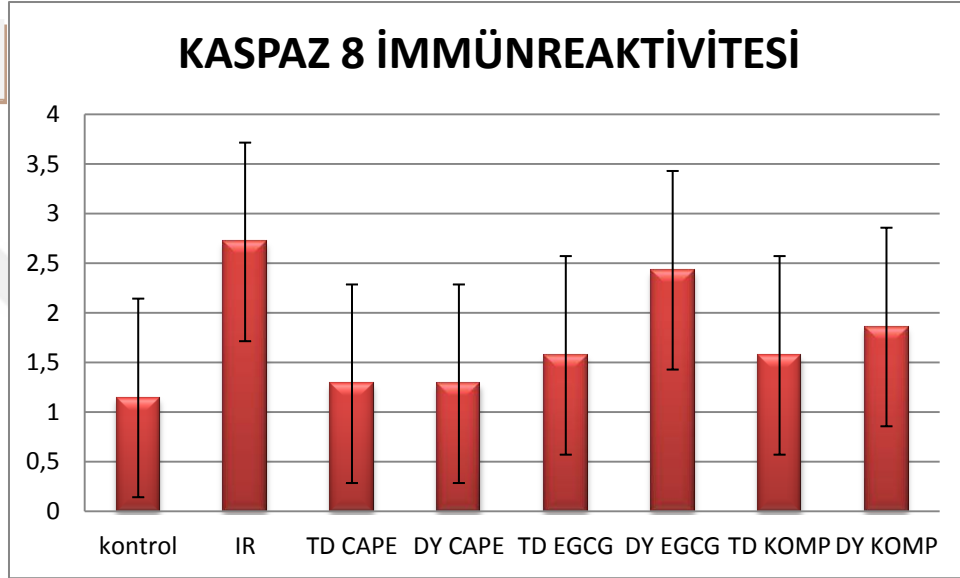
4.3.5. Gruplardan elde edilen testis örneklerinin anti-Kaspaz 8 primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntem kullanılarak değerlendirilmesinde;

kontrol grubunda, seminifer tubulus epitelinde bulunan spermatogenik hücreler, Sertoli hücreleri ve interstisiyel Leydig hücrelerinde hafif/orta (+/++) Kaspaz 8 immünreaktivitesi izlendi. I/R yapılan gruptan elde edilen testis örneklerinde epitel düzeninin bozulmuş olduğu spermatogenik ve diğer hücrelerde immünoreaktivitenin artmış olduğu orta/şiddetli (++)/ (++++) immünoreaktivite izlenirken, sırasıyla TD CAPE, TD EGCG, TD KOMP , DY CAPE gruplarında hafif/orta(+/++),DY KOMP grubu spermatogenik hücrelerinde orta (++)), DY EGCG gruplarında orta/şiddetli (++)/ (++++) immünoreaktivite izlendi (*Resim 4.3.5.*).

Grupların ortalamaları ile standart sapma değerleri *Tablo 4.3.5.A*'da grafik olarak *Tablo 4.3.5.B*'de istatikselsel olarak *Tablo 4.3.5.C*'de verilmiştir.

GRUPLAR	KASPAZ 8 İMMÜNREAKTİVİTESİ DEĞERLENDİRMESİ(ORT.±SD.)
Kontrol	1,14±0,37
I/R	2,71±0,48
TD CAPE	1,28±0,48
DY CAPE	1,28±0,48
TD EGCG	1,57±0,53
DY EGCG	2,42±0,53
TD COMP.	1,57±0,53
DY COMP.	1,85±0,37

Tablo 4.3.5.A:Anti-Kaspaz8 ortalamala ve standart sapma değerleri

B

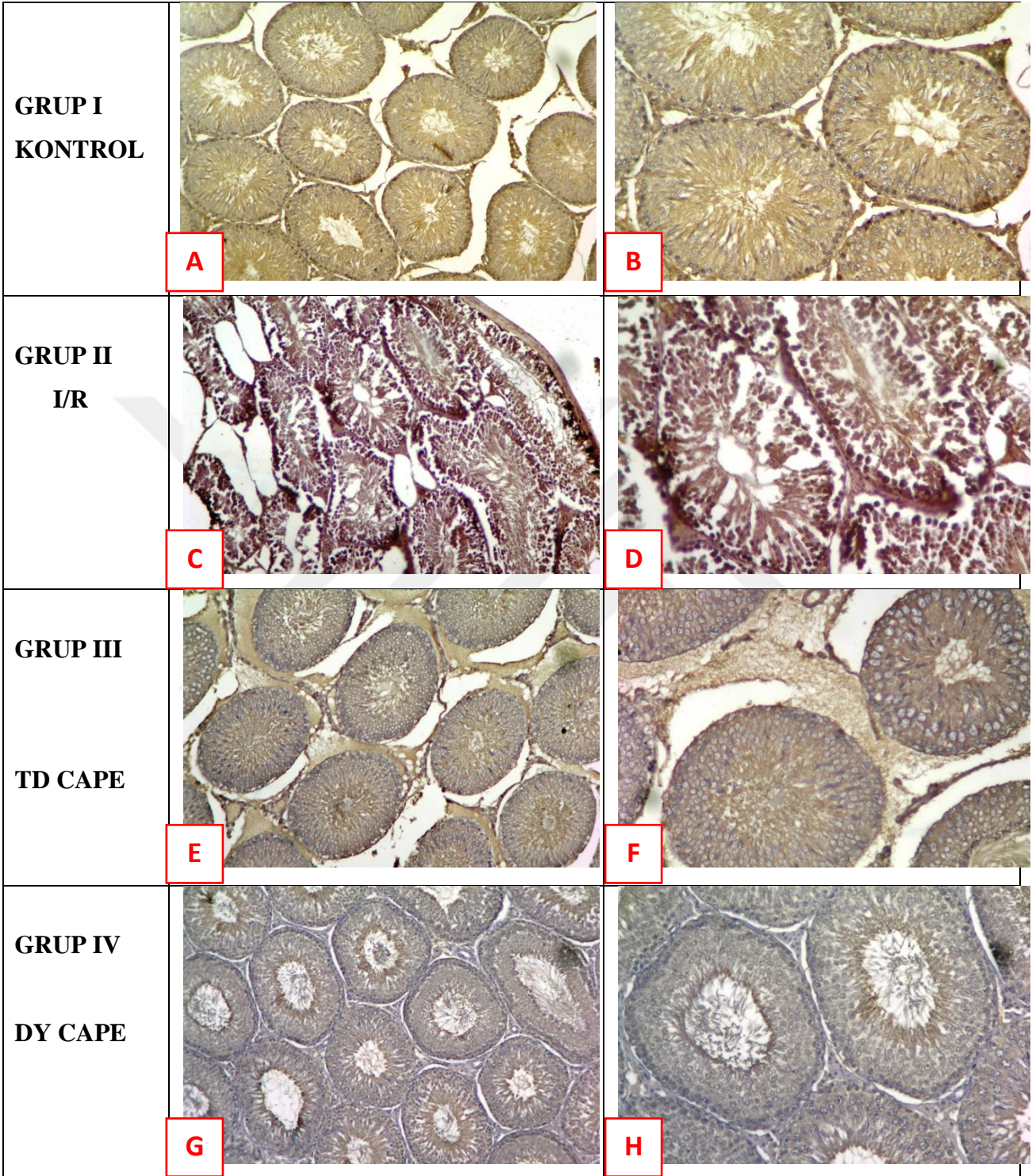
Tablo 4.3.5.B:Anti-Kaspaz 8 immünreaktivite değerlendirmesi

C

GRUPLAR	p DEĞERİ
Kontrol vs I/R,DY EGCG	*** p<0.001
Kontrol vs TD CAPE	*p<0.05
Kontrol vs TD EGCG,TD KOMP,DY KOMP	**p<0.01

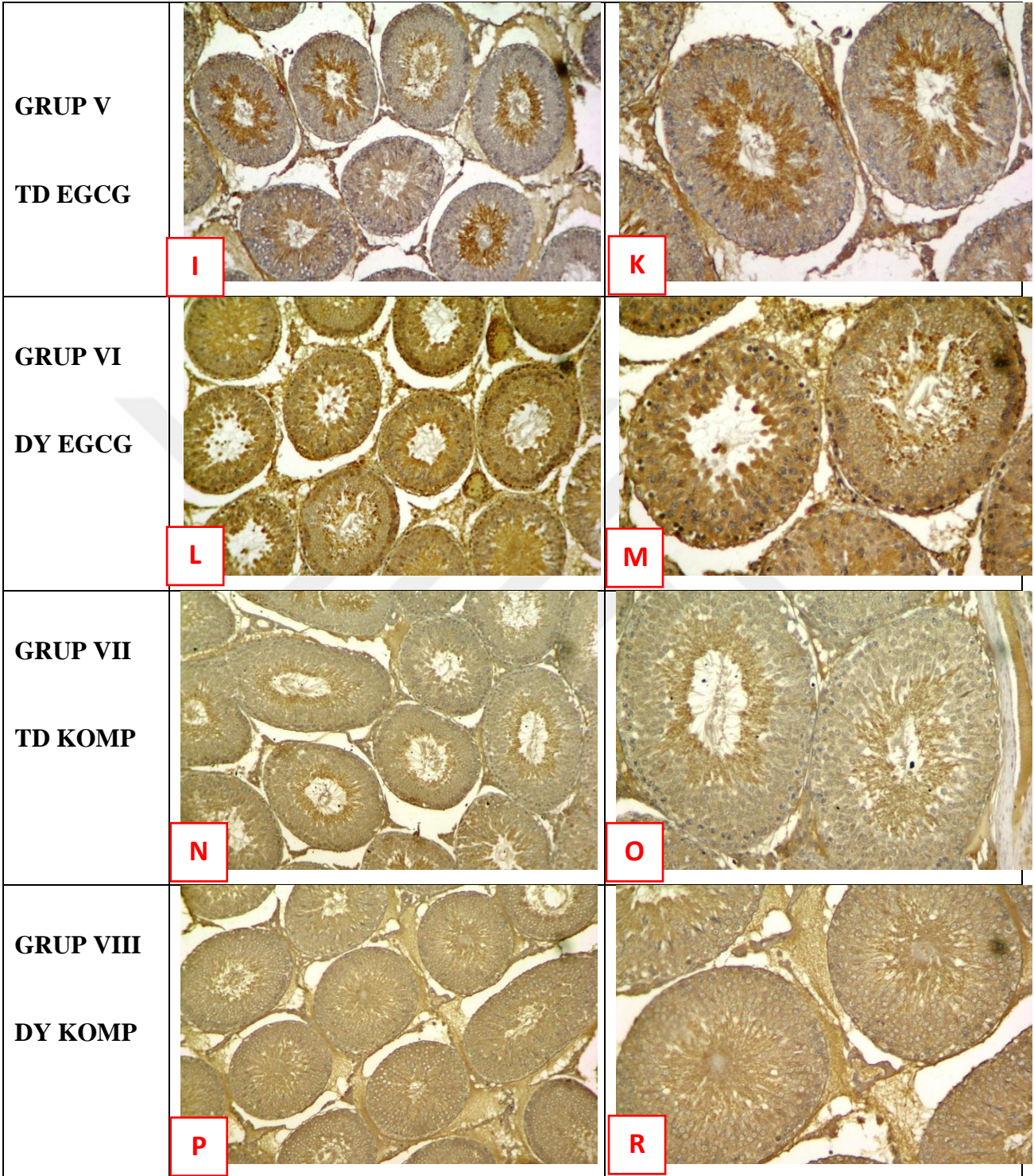
Tablo 4.3.5.C:Anti-Kaspaz 8 istatistiksel değerlendirme

ANTI-KASPAZ 8 İMMÜNOREAKTİVİTESİ



Resim 4.3.5:Anti-Kaspaz8 primer antikoru kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri kontrol grubu,TD CAPE,DY CAPE, spermatogenik hücrelerde hafif/orta(+/>**++**)(**A,B,E,F,G,H**),I/R grubunda orta/şiddetli (**++/+++**)(**C,D**) immünreaktivite izlendi.

ANTI-KASPAZ 8 İMMÜNOREAKTİVİTESİ



Resim 4.3.5:Anti-Kaspaz8 primer antikorunu kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruptan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri TD EGCG ve TD KOMP hafif/orta(++)(**I,K,N,O**) DY KOMP grup spermatogjenik hücrelerinde orta(++)(**P,R**) ,DY EGCG grubunda orta/şiddetli(++/+++)(**L,M**) immünreaktivite izlendi.

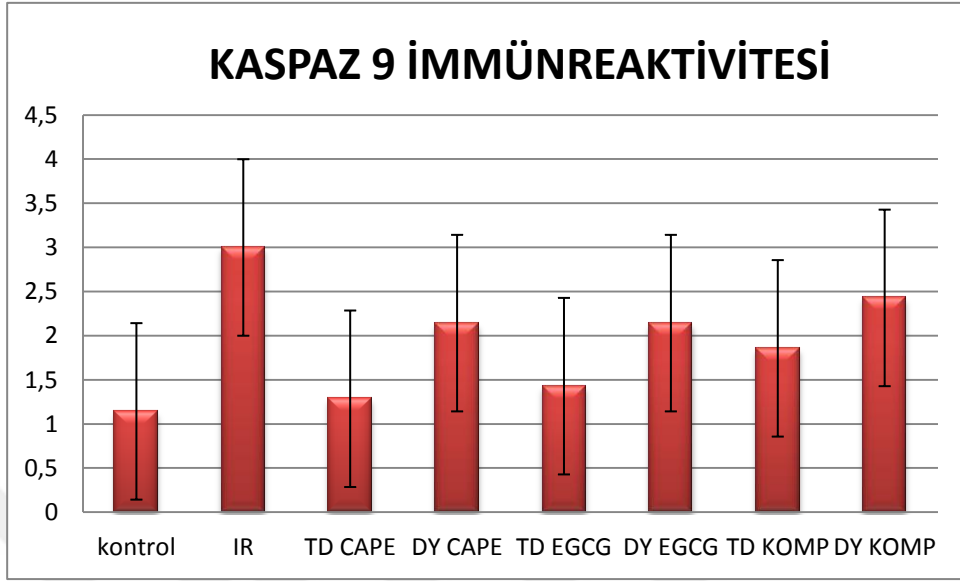
4.3.6. Gruplardan elde edilen testis örneklerinin anti-Kaspaz 9 primer antikoru ile indirek immünohistokimyasal yöntem kullanılarak değerlendirilmesinde;

kontrol grubunda, seminifer tubulus epitelinde bulunan spermatogenik hücreler, Sertoli hücreleri ve interstisiyel Leydig hücrelerinde hafif (+) Kaspaz 9 immünreaktivitesi izlendi. I/R yapılan gruptan elde edilen testis örneklerinde epitel düzeninin bozulmuş olduğu spermatogenik ve diğer hücrelerde immünoreaktivitenin artmış olduğu şiddetli (+++) immünoreaktivite izlenirken, sırasıyla TD CAPE hafif(+), DY CAPE gruplarında hafif/orta(+/+), DY EGCG ve TD KOMP grup spermatogenik hücrelerinde orta(++), TD EGCG ve DY KOMP grubu spermatogenik hücrelerinde orta/şiddetli (+/+++) immünoreaktivite izlendi (*Resim 4.3.6.*).

Grupların ortalamaları ile standart sapma değerleri *Tablo 4.36.A*'da grafik olarak *Tablo 4.3.6.B*'de istatikselsel olarak *Tablo 4.3.6.C*'de verilmiştir.

GRUPLAR	KASPAZ 9 İMMÜNREAKTİVİTESİ DEĞERLENDİRMESİ(ORT.±SD.)
Kontrol	1,14±0,37
I/R	3±0
TD CAPE	1,28±0,48
DY CAPE	2,14±0,37
TD EGCG	1,42±0,53
DY EGCG	2,14±0,53
TD COMP.	1,85±0,37
DY COMP.	2,42±0,53

Tablo 4.3.6.A:Anti-Kaspaz 9 ortalamala ve standart sapma değerleri

B

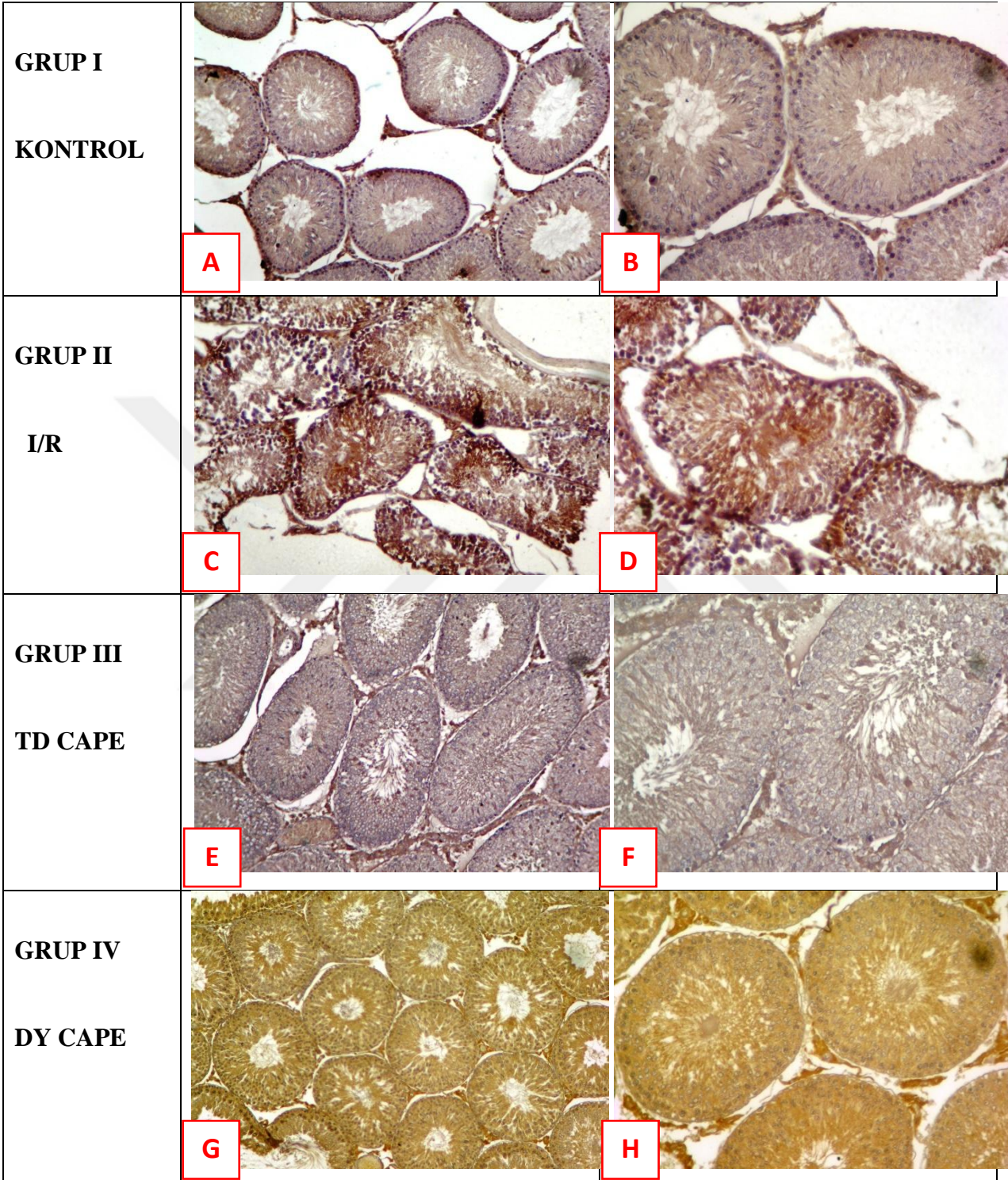
Tablo 4.3.6.B:Anti-Kaspaz 9 immünreaktivite değerlendirmesi

C

GRUPLAR	p DEĞERİ
Kontrol vs I/R	*** p<0.001
Kontrol vs TD CAPE,TD EGCG	*p<0.05
Kontrol vs TD EGCG , DY KOMP, DY CAPE, TD KOMP	**p<0.01

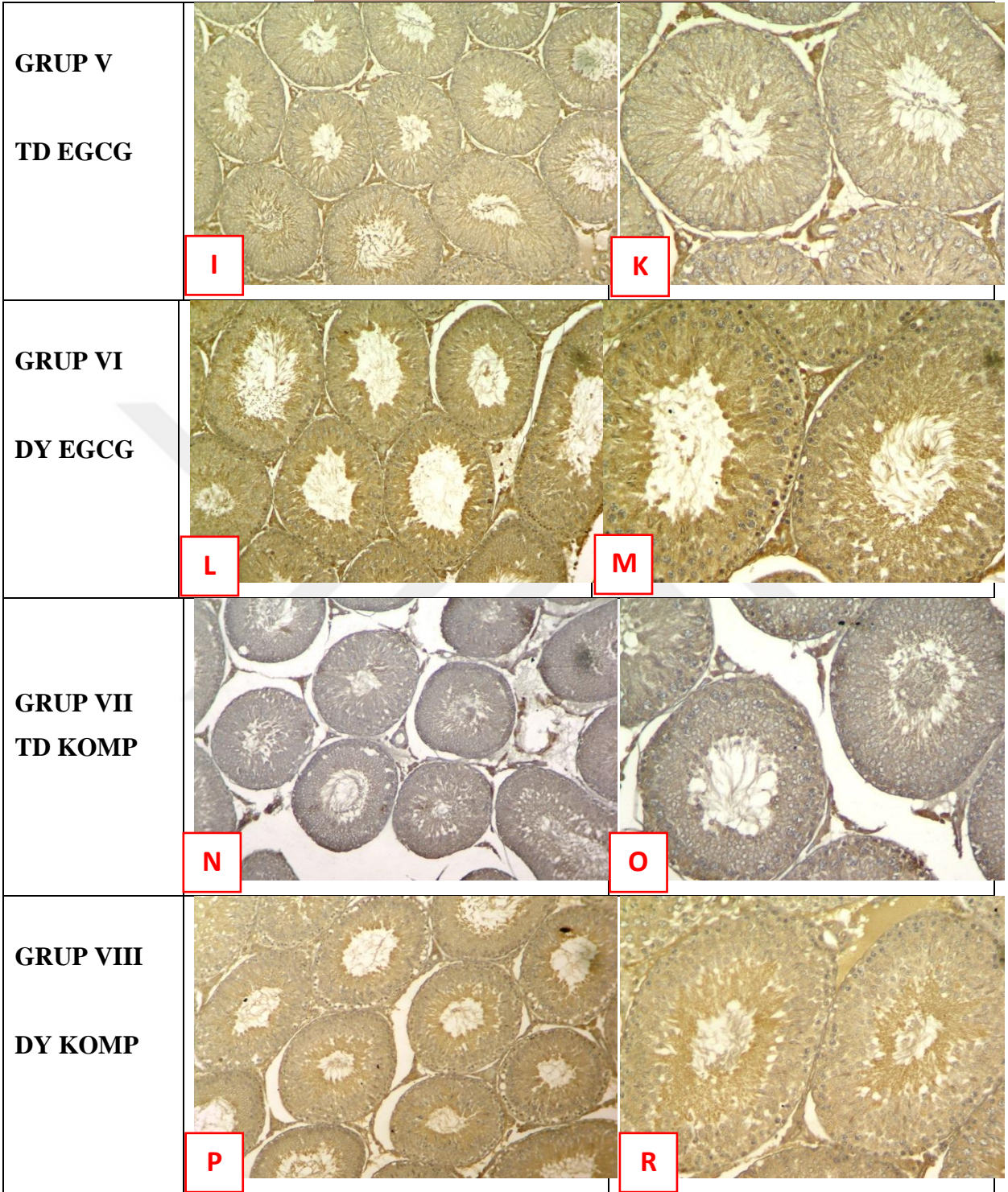
Tablo 4.3.6.C:Anti-Kaspaz 9 istatistiksel değerlendirmesi

ANTI-KASPAZ 9 İMMÜNOREAKTİVİTESİ



Resim 4.3.6: Anti-Kaspaz9 primer antikorunu kullanılarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruptan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri Kontrol grubu ve TD CAPE spermatogenez hücrelerinde hafif(+)(A,B,E,F), I/R grubunda şiddetli(++)(C,D), DY CAPE grubunda hafif/orta(++/+++)(G,H) immünreaktivite izlendi.

ANTI-KASPAZ 9 İMMÜNOREAKTİVİTESİ



Resim 4.3.6:Anti-Kaspaz 9 primer antikorunu kullanarak yapılan indirek immünohistokimyasal boyama ile gruptan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri TD EGCG,TD KOMP orta(+/+)(L,M,N,O),DY EGCG ve DY KOMP grubu spermatogenik hücrelerde orta/şiddetli(++/+++)(I,K,P,R) immünreaktivite izlendi.

4.3.7. Gruplardan elde edilen testis örneklerinin TUNEL yöntemi kullanılarak değerlendirilmesinde;

kontrol grubunda, seminifer tubulus epitelinde bulunan spermatogenik hücreler, Sertoli hücreleri ve interstisiyel Leydig hücrelerinde TUNEL pozitif hücre %11 olarak izlenirken, I/R grubunda %63, TD CAPE % 32, DY CAPE % 51, TD EGCG % 22, DY EGCG % 43, TD KOMP % 40, DY KOMP %54 olarak izlendi. (*Resim 4.3.2.*)

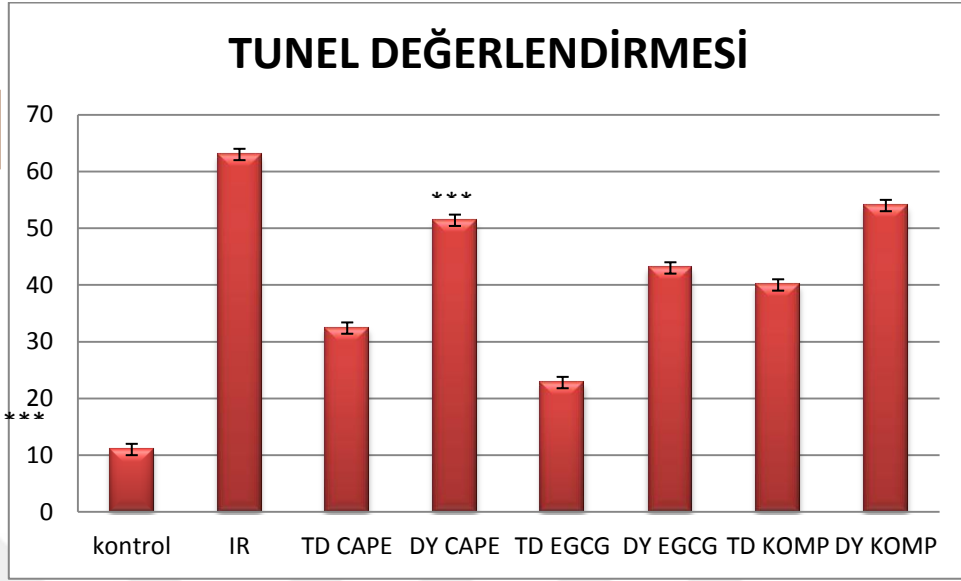
Testis iskemi/reperfüzyon hasarı sonrası iskemi gruplarında apoptotik hücrelerin seminifer tübüldeki germ hücrelerini , spermatogonyum ve spermatositleri kapsadığı gözlenmiştir. Testis torsiyonu sonrası tek doz antioksidan uygulamalarında reperfüzyon hasarı öncesi gruplarda, doyumra gruplarına oranla apoptotik hücreleri azalttığı görülmüştür. Tek doz antioksidan gruplarından TD-EGCG uygulamasının reperfüzyon hasarına karşı hücreyi apoptotik etkilerden koruduğu gözlenmiştir. Gruplar arası değerlendirmede TD EGCG uygulanmış grupta tüm gruplara oranla en az apoptotik hücre gözlemlendi.

Grupların ortalamaları ile standart sapma değerleri *Tablo 4.3.7.A*'da grafik olarak *Tablo 4.3.7.B*'de istatistiksel olarak *Tablo 4.3.7.C*'de verilmiştir.

GRUPLAR	TUNEL DEĞERLENDİRMESİ(ORT.±SD.)
Kontrol	11,57±1,81
I/R	63,85±2,54
TD CAPE	32,42±1,98
DY CAPE	51,42±1,39
TD EGCG	22,85±2,19
DY EGCG	43±1,73
TD COMP.	40,85±2,26
DY COMP.	54,28±1,704

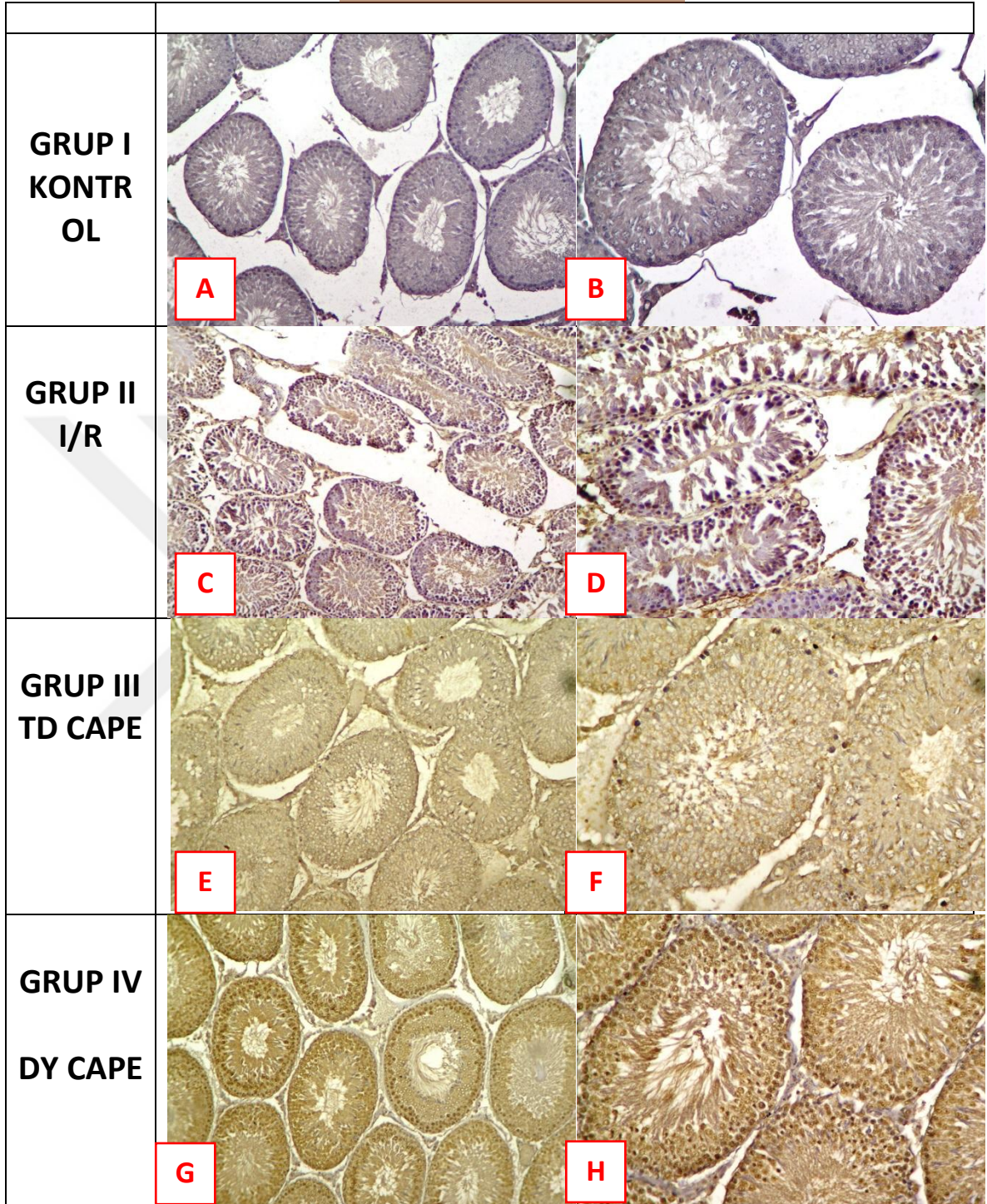
Tablo 4.3.7.A:Anti-TUNEL ortalamala ve standart sapma değerleri

B



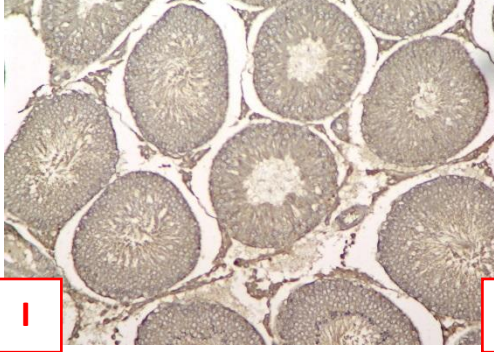
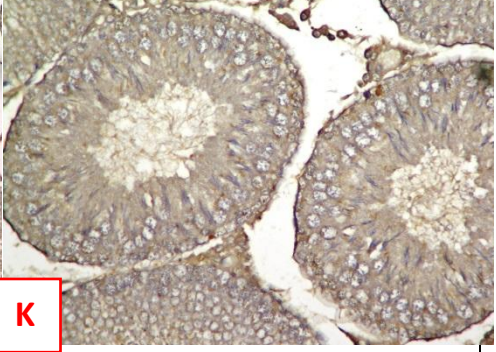
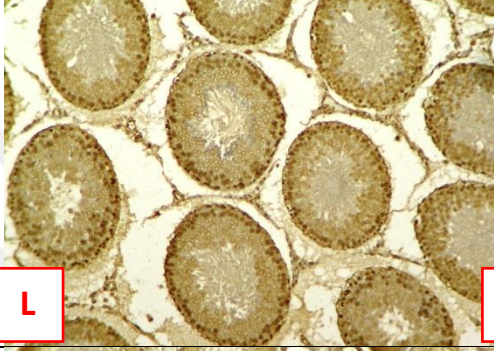
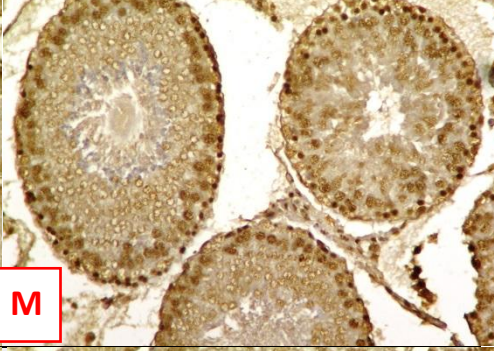

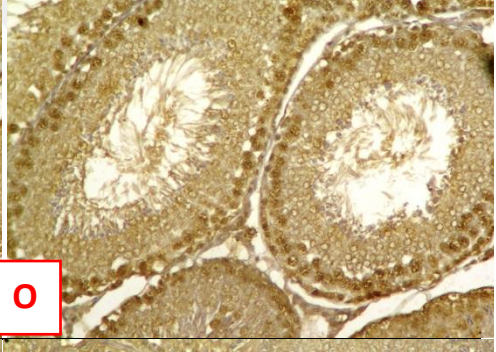
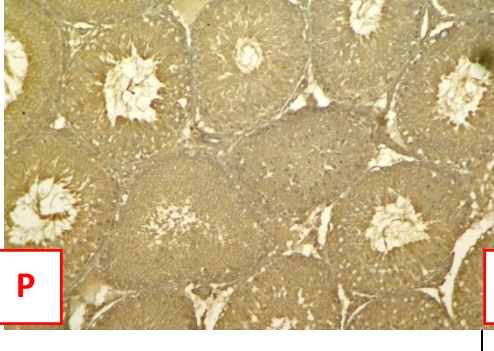
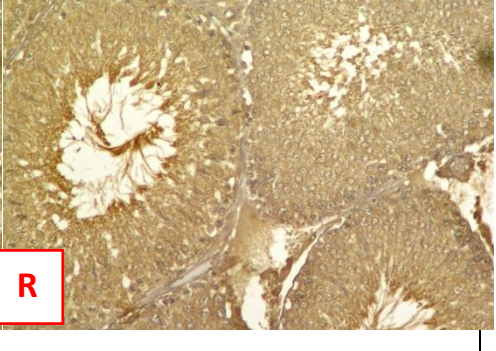
Tablo 4.3.7.B:TUNEL ile Apoptotik Hücre değerlendirme

TUNEL DEĞERLENDİRMESİ



Resim 4.3.7:TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre tayini ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri kontrol grup spermatogenik hücrelerde %11, I/R grubunda %63 , TD CAPE %32,DY CAPE %51 apoptotik hücre izlendi.

TUNEL DEĞERLENDİRMESİ

GRUP V TD EGCG		
GRUP VI DY EGCG		
GRUP VII TD KOMP		
GRUP VIII DY KOMP		
<p>Resim 4.3.7: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre tayini ile gruplardan elde edilen testis kesitlerinin görüntüleri TD EGCG grubunda spermatogenik hücrelerde %22,DY EGCG %43,TD KOMP %40,DY KOMP %54 apoptotik hücre gözlemlendi.</p>		

İMMÜNREAKTİVİTE VERİLERİ

Grup I Kontrol	PI3K	AKT	mTORC1	FOXO1	KASPAZ8	KASPAZ9	TUNEL
1.	2	2	3	2	1	1	10
2.	2	2	3	2	1	1	12
3.	2	2	3	2	1	1	15
4.	3	2	3	2	1	1	12
5.	3	2	3	2	1	2	12
6.	3	2	3	2	1	1	10
7.	3	3	3	3	2	1	10
Grup II IR							
1.	1	1	1	1	3	3	60
2.	1	1	1	1	3	3	64
3.	1	1	1	1	3	3	67
4.	2	1	1	1	3	3	67
5.	1	1	1	1	3	3	62
6.	1	1	2	2	2	3	63
7.	1	2	2	2	2	3	64
Grup III TD CAPE							
1.	1	2	2	2	2	2	30
2.	1	2	2	2	2	2	32
3.	1	2	2	2	1	1	30
4.	2	2	2	2	1	1	32
5.	2	2	2	2	1	1	34
6.	2	3	3	2	1	1	34
7.	2	3	3	1	1	1	35

Grup IV DY CAPE	PI3K	AKT	mTORC	FOXO	KASPAZ8	KASPAZ9	TUNEL
1.	1	2	2	1	2	2	50
2.	1	2	2	1	2	2	50
3.	1	2	2	1	1	2	53
4.	1	2	3	1	1	3	52
5.	2	3	3	2	1	3	53
6.	2	3	3	2	1	3	52
7.	2	3	3	2	1	2	50
Grup V TD EGCG							
1.	2	2	3	2	2	2	20
2.	2	2	2	2	2	2	20
3.	2	2	2	2	2	2	24
4.	2	2	2	2	2	2	25
5.	2	3	2	2	1	2	25
6.	3	3	2	2	1	2	24
7.	3	3	2	3	1	3	22
Grup VI DY EGCG							
1.	1	3	2	3	3	2	40
2.	1	3	2	3	3	2	42
3.	1	3	2	2	3	2	42
4.	1	3	2	2	2	2	44
5.	2	2	3	2	2	3	44
6.	2	2	2	2	2	3	44
7.	2	2	2	2	2	3	45

Grup VII TD KOMP	PI3K	AKT	MTORC1	FOXO1	KASPAZ8	KASPAZ9	TUNEL
1.	2	2	2	2	2	2	42
2.	2	2	2	2	2	2	42
3.	2	2	1	2	2	2	44
4.	2	2	1	2	2	2	40
5.	3	2	1	2	1	2	42
6.	3	3	1	2	1	2	38
7.	3	3	1	3	1	1	38
Grup VIII DY KOMP							
1.	1	2	3	2	2	3	54
2.	1	2	3	2	2	3	52
3.	1	2	3	2	2	3	55
4.	1	2	3	2	2	2	52
5.	1	2	2	1	2	2	56
6.	2	2	2	1	1	2	56
7.	2	1	2	1	2	2	55

Tablo 4.3.8:Tüm grupların(n:7) antikorların immünreaktivite skorlaması

4.4.Biyokimyasal Bulgular

4.4.1:Malondialdehit (MDA) Değerlendirmesi:

MDA lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan bir parametredir.

Kontrol grubu ile iskemi/reperfüzyon grubu arasında anlamlı ($p<0.001^{***}$) farklılık bulunmuştur. Kontrol grubu ile TD CAPE,TD EGCG ve TD KOMP grupları arasında anlamlı ($p<0.05$) farklılık azalmıştır. Kontrol grubu MDA seviyesi ile DY CAPE, DY EGCG ve DY KOMP grupları arasında anlamlı ($p>0.05$) farklılık bulunmamıştır. Tek doz antioksidan uygulamaları ile MDA seviyesinin kontrole yakın olduğu gözlemlendi.

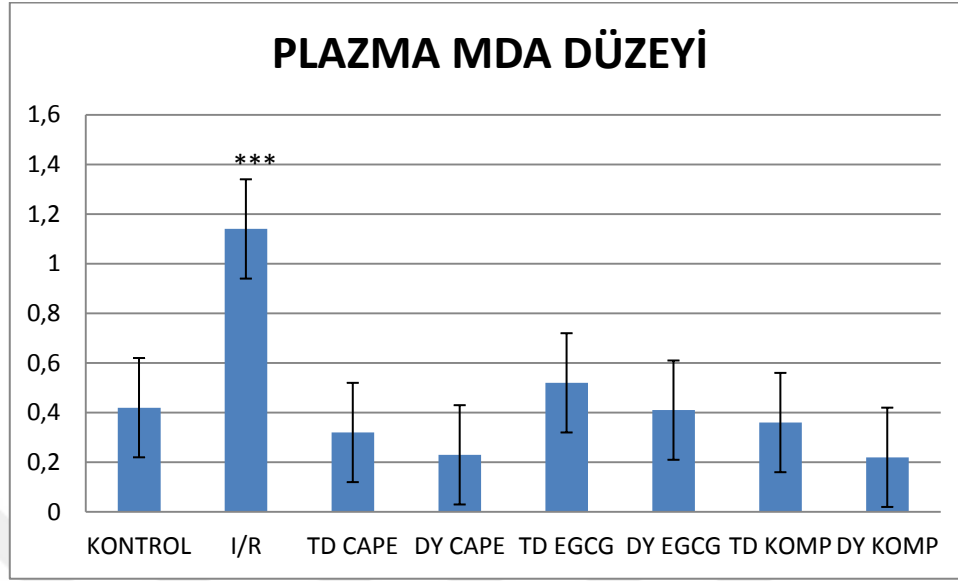
Antioksidan uygulamalarının I/R grubu ile karşılaştırılmasında tüm grupların istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu ($p< 0,001^{***}$) ancak tek doz uygulamalarının istatistiksel olarak kontrole daha yakın olduğu izlendi.

Grupların ortalama ve standart sapma değerleri **Tablo 4.4.1.A**'de grafik olarak **Tablo 4.4.2.B**'de İstatiksel olarak **Tablo 4.4.3.C**'de verilmiştir.

A

GRUPLAR	Konsantrasyon Değerlendirmesi(ORT.±SD.) (μ m)
Kontrol	0,02±0,07
I/R	0,04±0,11
TD CAPE	0,006±0,01
DY CAPE	0,02±0,070
TD EGCG	0,04±0,11
DY EGCG	0,06±0,15
TD COMP.	0,02±0,06
DY COMP.	0,06±0,17

Tablo 4.4.1.A:MDA(nmol/ml) konsantrasyon ortalamala ve standart sapma değerleri

B**Tablo 4.1.1.B:Plazma MDA(nmol/ml) Düzeyi Grafiği****C**

GRUPLAR	P DEĞERİ
KONTROL vs I/R	***p<0.001
KONTROL vs TD CAPE/EGCG/KOMP	** p<0.01
KONTROL vs DY CAPE/KOMP	*P<0.05
kONTROL vs DY EGCG	P>0.05

Tablo 4.1.1.C:Plazma MDA istatistiksel değerlendirmesi

4.4.2:8-Hidroksideoksiguanin (8OHdG) BULGULARI

8-OHG DNA'da Reaktif Oksijen Türleri (ROS) tarafından üretilen en önemli lezyonlardan biridir ve üzerinde en çok çalışılan DNA hasar tipidir. 8-OHG, hücrel oksidatif metabolizma, iyonize radyasyon veya kimyasal karsinojenlere maruziyet sonucunda DNA'da üretimi artar.

I/R grubunda 8OHdG düzeyinin artması ile DNA hasarı meydana geldiği göstermiştir. Kontrol grubu ile I/R grubu arasında anlamlı ($p<0.001^{***}$) farklılık bulunmuştur.

Antioksidan uygulama gruplarında TD EGCG'nin Kontrol grubuna en yakın anlamda ($p>0.05$) olduğu ve bu anlamlılığı ($p>0.05$) sırası ile TD KOMP ve TD CAPE izlemiştir.

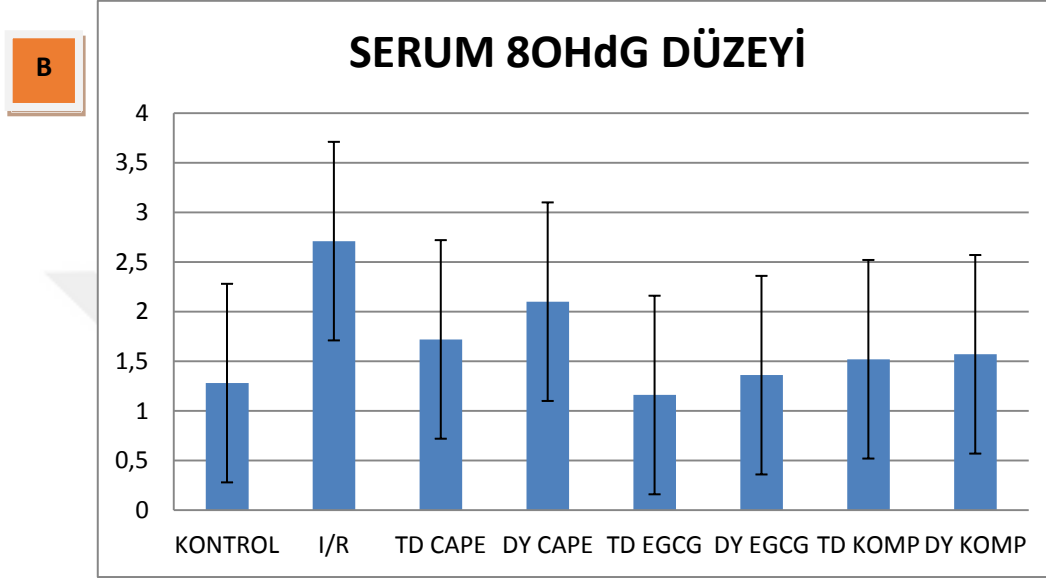
Kontrol grubuna ile DY CAPE grubu arasında daha az anlamlı ($p<0.01$) fark bulunmuştur.

Grupların ortalama ve standart sapma değerleri **Tablo 4.4.2.A**'de grafik olarak **Tablo 4.4.2.B**'de İstatiksel olarak **Tablo 4.4.2.C**'de verilmiştir.

A

GRUPLAR	Konsantrasyon Değerlendirmesi(ORT.±SD.) (ng/ml)
Kontrol	0,16±0,43
I/R	0,06±0,17
TD CAPE	0,04±0,12
DY CAPE	0,10±0,27
TD EGCG	0,14±0,21
DY EGCG	0,25±0,68
TD COMP.	0,13±0,34
DY COMP.	0,15±0,41

Tablo 4.4.2.A:8OHdG konsantrasyon ortalamala ve standart sapma değerleri



Tablo 4.4.2.B:8OHdG konsantrasyon düzey grafiği

C

GRUPLAR	P DEğERİ
KONTROL vs I/R	***p<0.001
KONTROL vs TD/DY CAPE	**p<0.01
KONTROL vs DY EGCG/ TD KOMP/DY KOMP	*p<0.05
KONTROL vs TD EGCG	p>0.05

Tablo 4.4.2.C: 8OHdG konsantrasyon düzey istatistiği

5. TARTIŞMA

Testis torsiyonu; puberte çağındaki çocuklarda gözlenen ürolojik acil durumlardan olup uygun müdahale yapılamaması durumunda infertiliteye neden olmaktadır. Torsiyonun testisler ve fertilité üzerine olan etkileri birçok araştırmacı tarafından araştırılmıştır. Ancak, torsiyonun etkileri ve bu etkilerin ne şekilde olduğu konusundaki bilgiler yetersizdir.

Bu çalışmada, sıçanların sol testislerinin saat yönünde 720° döndürülmesiyle oluşturulan 2 saat torsiyon sonrası, 4 saat detorsiyon yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde; CAPE ve EGCG'nin tek doz ve doyurma dozlarında uygulanmalarının testis dokusu üzerindeki olası koruyucu etkileri araştırılmıştır. Çalışmada H&E ile histokimyasal olarak; PI3K, AKT, mTOR1, FOXO1 primer antikorları ile immünohistokimyasal olarak; 8OHdG ve MDA düzeyleri ile biyokimyasal olarak inceleme yapılmıştır. İntrensek ve ekstrinsek apoptotik yollar üzerine etkileri Kaspaz 8, Kaspaz 9 primer antikorları ve TUNEL yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Testis torsiyonunda oluşan hasar üzerinde, torsiyon derecesi ve torsiyon süresi önemli rol oynamaktadır. Deneysel çalışmalarda, ekstravajinal testis torsiyonu modelinde, longitudinal aks boyunca testis 180°, 360°, 720° döndürülerek ve 1, 2, 4 saat boyunca torsiyon sonrası detorsiyon uygulanarak iskemik hasar değerlendirilmiştir (158, 159). Sıçan testis dokusunda iskemik değişikliklerin oluşması için, en az 1 saatlik torsiyon süresi olması gerektiği bildirilmiştir (160). Sıçan testis dokusunda 360° ve 1 saatlik torsiyonun yalnızca akut vasküler değişikliklere yol açtığı, 360° ve 2 saatlik torsiyonun orta derecede akut vasküler hasar oluşturduğu bildirilmiştir. Testiste doku hasarı için 540° torsiyon gerektiği, 720° ve 4 saatlik torsiyonun ise kan akımını bloke ederek fokal hemorajiye neden olduğu ve testiste nekroz ile sonuçlandığı bildirilmiştir (161). Torsiyon derecesi ve süresinin artmasına bağlı olarak 4-6 saat süre sonunda testiste geri dönüşümsüz nekrotik değişikliklerin oluştuğu belirtilmiştir (162, 163). 1080° üzerinde torsiyonda ise testiste arteriyel kan akımında da bozukluklar oluşmaktadır (164).

Çalışmamızda testiste iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı oluşturabilmek ve bu hasar üzerine antioksidanların koruyucu etkilerini değerlendirebilmek amacıyla, 720° torsiyon ve 2 saat torsiyon model uygulanmıştır. Bu deneysel model sonucunda tüm sıçanlarda testiste seminifer tubuluslarda I/R hasarı olduğu histopatolojik olarak gözlenmiştir.

Testis torsiyonu sonrası detorsiyon işleminde testisin tekrar kanlanma süresi de önemlidir. Detorsiyon işleminde ani yapılan reperfüzyon ile testisin fazla kan akımına maruz bırakılması testiste reperfüzyon hasarı oluşmaktadır (165).

Ovalı ve ark.'nın çalışmalarında deneysel testis torsiyon/reperfüzyon modelinde, perfüzyon BT incelemesinde torsiyon sonrası, 2 saat detorsiyon yapılmasının testis dokusunda kan akımının torsiyon durumundan farklı olmadığı ve detorsiyon süresinin yeterli olmadığı gösterilmiştir (166).

Gürdal ve ark.'nın çalışmalarında reperfüzyon hasarı ile reperfüzyon süresi ilişkilendirilmiş ve 720° torsiyon sonrası 1, 3, 5 saat detorsiyon değerlendirilmiş ve reperfüzyon hasarının her üç uygulamada da meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca 360° torsiyonda fertilitenin etkilenmediği ancak 720° ve üzeri torsiyonun infertilite durumunu oluşturduğu bildirilmiştir (165).

Bu çalışmada seçilen deneysel modelde, sıçanların sol testislerine 720° ve 2 saat süre ile torsiyon uygulandıktan sonra, 4 saat detorsiyon yapılarak orta derecede I/R hasarı oluşturulması amaçlanmıştır. Anatomik olarak sol testis funiculus spermatikusun daha uzun ve aşağıda olmasına bağlı, torsiyon olma olasılığının daha fazla olması nedeniyle, sol testiste iskemi/reperfüzyon modeli gerçekleştirilmiştir. Testis torsiyonu ile acil servise gelen hastalarda detorsiyon öncesi uygulanabilecek koruyucu tedavi yöntemlerinin olası fertilitite bozukluklarını önlemeye yönelik orta derecede I/R hasarı modeli seçilmiştir.

Testis torsiyonu ve torsiyone olan testisin detorsiyone edilmesiyle oluşan, iskemi ve reperfüzyon hasarına bağlı dokuda biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir (167, 168). Bu çalışmada histopatolojik değerlendirme, parafin bloklardan elde edilen ve H&E ile boyanan kesitlerin Johnsen skoruna göre değerlendirmesi ile yapılmıştır.

Kontrol grubundan elde edilen testis örneklerinde normal histopatolojik görünüm izlenirken, Johnsen skoru ortalama $9,51 \pm 0,5$ olarak saptanmıştır. I/R uygulanan grupta ise testislerde seminifer tubullerde ve lümen çapında genişleme, spermatogenik hücrelerin düzeninde bozulma, interstisiyel alanda damarlarda genişleme, hemoraji ve hücrel infiltrasyon bulguları izlenmiştir. Histopatolojik olarak I/R grubunda Johnsen skoru ortalama $5,06 \pm 0,42$ olarak saptanmıştır. İstatistiksel olarak kontrol ve I/R Johnsen değerlerinin karşılaştırılmasında anlamlı farklılık belirlenmiştir ($p < 0.001$). Bu sonuçlar 720° 2 saat torsiyon ve 4 saat detorsiyon sonucu tüm sıçanlarda elde edilen histopatolojik bulgular literatürle uyumlu olarak bulundu (169).

Testis torsiyonunda, testisin spermatik kord ile birlikte dönmesi sonucu, iskemiye bağlı gelişen doku hasarı ile tedavi amaçlı reperfüzyona bağlı oksijenizasyonun artışı ile çok fazla miktarda reaktif oksijen metabolitleri (ROS) ve serbest oksijen radikalleri (SOR) meydana gelir. Artan ROS miktarı, I/R hasarı olan dokuda hücrel DNA hasarı ile lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (46, 170).

Birçok çalışmada I/R hasarı ile bozulan oksidan/antioksidan dengenin düzenlenmesi, SOR'ların oluşumuna bağlı meydana gelen hasarların önlenmesi ve detoksifikasyonun sağlanması amacıyla organizmayı koruyan antioksidan maddelerle I/R hasarına karşı koruyucu etkiler araştırılmıştır (171, 172, 173, 174).

Çeşitli antioksidan ajanların (Vitamin E, Retinoik Asit, Melatonin, Zofenopril, Allopürinol, L-Karnitin, α -lipoik asit, Resveratrol vb.) I/R hasarında serbest oksijen radikalleri üzerine etkileri biyokimyasal ve histopatolojik incelemelerle gösterilmiştir (175, 176, 177, 2, 178, 179, 180, 181).

Bu çalışmada testiste oluşturulan I/R hasarında olası koruyucu işlevlerinin araştırıldığı antioksidanlardan biri olan *Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)* propolisin aktif maddesi olup zengin antioksidan içeriğiyle birçok mekanizmada önemli rol oynamaktadır. Bu mekanizmalar arasında yer alan I/R hasarıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri üzerinde birçok olumlu etkileri gözlenmiştir (76).

CAPE; antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, immün uyarıcı, kanser gelişimini ve reperfüzyon hasarını engelleyici özellikleri bulunan bir bileşiktir (182, 183).

CAPE; güçlü antioksidan özelliği ile miyokardiyal iskemide (184) beyin iskemisinde (185) renal böbrek hasarında (186), sigara maruziyetli karaciğer hasarında, koruyucu işlevleri olduğu gösterilmiştir (187).

CAPE'nin testis iskemi/reperfüzyon hasarında değişik dozlar ve sürelerde uygulanması sonucunda biyokimyasal ve histokimyasal etkileri değişik çalışmalarda gösterilmiştir (188, 58, 80).

Çalışmamıza benzer I/R modeli uygulanarak yapılan çalışmalarda testis I/R hasarında biyokimyasal olarak NO, glutatyon peroksidaz, MDA, LDH, MDH düzeyleri çalışılmış ve istatistiksel olarak I/R hasarında arttığı gösterilmiş ve CAPE'nin torsiyon sonrası tek doz 10-50 değişen dozlarda uygulanması ile biyokimyasal olarak ROS parametrelerinde azalma olduğu bildirilmiştir (188,58). CAPE'nin uygulanmasından sonra H&E boyalı testis preparatlarının değerlendirilmesinde ise histopatolojik düzelmelerin gözlemlendiği ve nötrofil infiltrasyonunun azalmış olduğu belirtilmiştir. Testis dokusunda CAPE uygulanması ile PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı ile ilgili immünohistokimyasal değerlendirmeye rastlanmamıştır.

Çalışmamızda, testis I/R hasarında CAPE'nin doyurma (DY) ve tek doz (TD) olmak üzere iki uygulaması araştırılmıştır. DY grubunda, torsiyon öncesi 4 gün süreyle 10 µmol/kg CAPE uygulanarak I/R hasarına karşı koruyucu etkisi; TD grubunda ise torsiyon sonrası reperfüzyondan 30 dk önce tek doz 10 µmol/kg uygulanarak reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Işık mikroskop altında histopatolojik değerlendirmede, CAPE uygulanan her iki grupta, I/R grubuna göre seminifer tübüllerin histolojik yapısının normale yakın olduğu izlenmiştir ($p<0,001$). TD CAPE uygulanan grupta, seminifer tübül morfolojisinin DY CAPE grubuna oranla daha iyi durumda olduğu gözlenmiştir. TD CAPE grubunda ödem ve inflamatuvar hücrelerin azalmış olduğu, DY CAPE grubunda interstisyel alanda minimal ödem ve hemorajinin devamlılık gösterdiği görülmüştür. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı farklılık ($p<0,001$) izlenmiştir. TD CAPE'nin torsiyon sonrası reperfüzyon öncesi uygulanması ile testisi I/R hasarından korumada daha etkili olduğu

görülmüştür. DY CAPE uygulamanın ise testis dokusunda I/R hasarını azalttığı ancak TD CAPE grubu kadar histopatolojik inceleme ile etkili olmadığını gözlenmiştir.

Son zamanlarda üzerinde çok araştırma yapılan Epigallacathecın gallate (EGCG) yeşil çayın en zengin polifenol-kateşin içeriği olan etken maddesidir. Yeşil çayın antioksidan, antienflamatuar, antikarsinojenik, termojenik, probiyotik ve antimikrobiyal özellikleri polifenollerin (EGCG) etkisi ile gerçekleşmektedir (83, 84).

EGCG'nin birçok çalışmada; hücre proliferasyonu, oksidatif stress ve inflamasyon üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. EGCG'nin antiapoptotik olduğu ve büyüme faktörleri reseptörlerini, hücre siklusunu ve araşidonik asit metabolizma inhibisyonu yaparak bu etkiyi gerçekleştirdiği izlenmiştir (189, 84).

EGCG'nin kalp iskemi/reperfüzyon hasarında (190), ve böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir (5).

Tek taraflı 1 saat torsiyon sonrası, detorsiyon 30 dk önce 50 mg/kg EGCG verilerek 4 saat sonra detorsiyeye edilmiş ve I/R hasarında seminifer tübüllerde vaskularizasyonun ve apoptotik etkilerin azaldığı gösterilmiştir (191).

Başka bir çalışmada I/R modelinde testis torsiyon sonrası reperfüzyon öncesi EGCG uygulanan tedavi grubunda I/R grubuna göre serum süperoksit dismutaz grubunda önemli azalma olduğu bildirilmiştir (90). Testise torsiyon müdahalesi boyunca uygulanan EGCG'nin spermatogenik hücreleri koruduğu gösterilmiştir (192).

Diğer bir çalışmada sıçan I/R modelinde EGCG uygulaması ile protein kinaz A(PKA) ve Protein kinaz C(PKC) yoluyla testesteron sentezi üretimini desteklediği bildirilmiştir (193).

Yapılan çalışmada testisin histopatolojik değerlendirilmesinde, I/R hasarına karşı uygulanan antioksidan grupları içinde, TD EGCG grubunda seminifer tübüllerin kontrol grubuna en yakın görünümde olduğu gözlenmiştir. İstatistiksel olarak kontrol grubu ile tek doz antioksidan uygulamaları karşılaştırıldığında TD EGCG uygulaması ile elde edilen verilerin kontrol grubuna yakın, istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p<0.05$) izlenmiştir. DY EGCG grubu ile kontrol grubu arasında histopatolojik değerlendirmede anlamlı farklılık ($p<0.001$) görülmüş ancak, TD EGCG ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p<0.05$).

Sonuç olarak EGCG uygulamasında tek doz uygulamasının histokimyasal ve johnsen skoru ile kontrol grubuna en yakın bulguları göstermesi ile doyurma grubu ve diğer tek doz antioksidan gruplarından daha etkili olduğunu göstermiştir. DY EGCG grubu diğer doyurma gruplarına göre kontrole en yakın doyurma grubu olarak bulunmuştur.

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ve epigallocatechin gallate'ın (EGCG) tek başına uygulandığında zengin antioksidan içerikleri ile I/R hasarına karşı koruyucu etkileri literatür değerlendirmesine uygun olarak yapılan çalışmada da gösterilmiştir. Bu çalışmada literatürde rastlanmayan eşit dozda CAPE+EGCG ile kompleks doz uygulaması yapılmıştır. Diğer antioksidan maddelerin uygulama modeli gibi doyurma ve tek doz olarak kompleks CAPE+EGCG uygulanmıştır. Kompleks doz uygulamalarının histopatolojik değerlendirmesinde TD KOMP grubunda, seminifer tübüllerde yer yer kontrol grubuna benzer görünüm izlenirken, DY KOMP grubunda seminifer tübül epitelinin yer yer düzeninin bozuk olduğu, bazı tübül lümenlerinin geniş olduğu, interstisiyel alanda ödem ve hücre infiltrasyonunun varlığı izlenmiştir. DY KOMP uygulamasının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok anlamlı ($p<0.001$) fark gözlenirken, TD KOMP ile DY KOMP arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) fark bulunmuştur.

Fosfotidilinositol 3 kinaz PI3K/AKT/mTOR ailesi, hücre büyümesi, hücre düzenlemesi, hücre proliferasyonu, hücre canlılığı, sinyal iletimi ve tümör gelişimi ile ilişkili bir sinyal yolağıdır (119,120).

AKT substratları hücre proliferasyon, apoptoz, glukoz homeostazı, hücre büyüklüğü ve DNA hasarı gibi birçok kritik hücrel işlevde rol oynamaktadır (194). AKT, PI3K tarafından uyarılarak aktifleşir. AKT'ın hedef molekülleri: Transkripsiyon faktörleri BAD, GSK3, IRS1, Fosfodiesteraz, **Forhead box ailesi**, **Caspase 9**, NF- κ B veya Protein kinazlar **mTOR**, eNOS, Raf, BRCA 1, p21'dir (195,196).

mTOR (mammalian Target Of Rapamycin - Rapamisin'in Memelilerdeki Hedef Molekülü), serin-threonin protein kinaz ailesinden PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının bir üyesidir (91).

Sinyal ileti moleküllerinden olan mTOR, hücre içi moleküllerin düzenlenmesinde, protein sentezinde, transkripsiyon, enerji metabolizmasında, hücre proliferasyonu, büyüme, farklılaşma, biyoenerjide, anjiyogenez, apoptoz ve otofajide rol oynar.

mTOR molekülünün aktivasyonu, insulin, büyüme faktörleri, glukoz, fosforik asit, amino asit yoğunluğu (özellikle leucine) ve oksidatif stres ile gerçekleşir (93). FOXO1 (FKHR), Forkhead box proteinleri transkripsiyon faktör ailesi üyelerinden olup apoptoz, hücre büyümesi, hücre gelişimi, proliferasyonu ve sağ kalımında etkili olan genlerin ekspresyonunu kontrol eder (6). FOXO1 erkek germ hücreleri ve diğer hücrelerin farklılaşmasında ve oksidatif stres direnç genlerini düzenleyici fonksiyonları bulunmaktadır (197).

Transkripsiyon faktörlerinden biri olan Forkhead box proteinlerinin aktivite olmaları AKT bağımlı fosforilasyon ile negatif olarak düzenlenir. Sonuç olarak AKT birçok proteini serin ve tirozinler üzerinden fosforilasyon yapmaktadır. Bu sayede hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve apoptozis gibi birçok metabolizmada kritik anahtar rol oynamaktadır (199).

FOXO1'in aşırı ekspresyonu apoptozise neden olmaktadır. Forkhead proteinler AKT'nin hücre çekirdeğine uyarısı ile aktifleşirler. PI3K tarafından aktive olan AKT yolağının düzenlenmesi FOXO1'i uyararak hücre proliferasyonu ve hücre canlılığını devam ettirir (199, 200).

Apoptoz, embriyogenez aşamasında istenmeyen dokuların ortadan kaldırılmasında ve dokunun yeniden şekillendirilmesinde, ileri dönem gelişiminde homeostazın sağlanması ve yaşlanmaya bağlı yada hasara bağlı transforme olmuş enfektif dokunun elimine edilmesinde fonksiyon gören programlanmış hücre ölümüdür (201). Apoptozda görevli yollardan biri olan Kaspaz yolağı sitoskeletal ve nükleer proteinlerin parçalanmasında önemli rol oynar (152).

Kamo ve arkadaşları fare karaciğer iskemi/reperfüzyona bağlı inflamasyon hasarında PI3K'un spesifik Akt/ β -katenin blokörü olup PTEN- β katenin aracılığıyla FOXO1 inhibisyonuna neden olarak kısmi olarak anti-apoptotik etkilerini göstermiştir (140). Diğer bir çalışmada AKT aktivasyonu ile FOXO1 inhibisyonu gerçekleştirerek hücre canlılığını ve proliferasyonunu artırdığı bildirilmiştir (198).

Karaciğer ve kalp iskemi hasarında PI3K aktivasyonu ile AKT aktivasyonunun hücre canlılığını devam ettirdiği gösterilmiştir (202, 203).

Zhang ve ark. miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarında sodyum tiyosulfatan (STS)'nin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada I/R grubunda PI3K/AKT/FOXO3 inhibisyonu gerçekleşirken tedavi grubunda PI3K aktivasyonuna bağlı AKT artışı olmuş, FOXO3 inhibisyonu ile apoptotik aktivasyona neden olmuştur (204).

Michele ve arkadaşları renal iskemi/reperfüzyon hasarında PI3K tarafından aktive olan AKT'in FOXO1 aktivasyonu ile renal epitel hücre çoğalması ve canlılığı üzerinde etkisini göstermişlerdir (205).

WU ve arkadaşlarının çalışmasında myokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarında valsartan'ın koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada AKT/mTOR/S6K yoluyla aracılığıyla otofajiyi önlediği gösterilmiştir (117).

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farelerde intestinal iskemi/reperfüzyon hasarında ghrelin'in mTOR sinyal yolu üzerinden iskemi hasarı azaltıcı etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda ghrelin ile tedavi edilen hayvanların akciğer ve ince bağırsak dokularında mTOR düzeyinin arttığı bildirilmiştir. Bu bulgular ghrelin uygulanan gruplarda mTOR/p70S6K sinyal yolunun aktivasyonunu uyararak I/R sonrasında bağırsak doku hasarını azalttığını göstermiştir (206).

Yapılan çalışmada anti-PI3K, anti-AKT, anti-mTORC1, anti-FOXO1 primer antikoları ile sinyal yolu, anti-Kaspaz8 ve anti-Kaspaz9 primer antikoları ile intrinsek ve ekstrinsek apoptotik yolların değerlendirilmesi indirek immünohistokimyasal yöntemle yapılmıştır. Bu çalışmada PI3K/AKT/mTOR sinyal yoluna ait primer antikolarla ait immünoreaktivite, kontrol grubunda orta/şiddetli olarak izlenirken, I/R grubunda immünoreaktivite azaldığı gözlenmiştir. Antioksidan uygulanan gruplarda, PI3K/AKT/mTOR sinyal yoluna ait primer antikolarla ait immünoreaktivite, I/R grubuna göre artmış olarak izlenmiş olup, kontrole en yakın olarak TD EGCG grubunda gözlenmiştir.

PI3K immünoaktivitesi en yüksek şiddetli olarak kontrol grubunda izlenirken, TD EGCG ile TD KOMP grubunda orta şiddetli olarak değerlendirilmiştir. **AKT immünoaktivitesi** DY gruplarının tümünde en yüksek şiddetli olarak izlenmiştir. **mTORC1 immünoaktivitesi** en yüksek şiddetli olarak kontrol grubunda izlenmiş olup, bunu takiben DY CAPE ile DY KOMP gruplarında gözlenmiştir. **FOXO1 immünoaktivitesi** en yüksek şiddetli DY EGCG grubunda izlenmiştir. Bütün primer antikorların immünoaktiviteleri en düşük I/R grubunda gözlenmiştir.

Apoptozun ekstrinsek (Kaspaz8) ve intrinsek (Kaspaz 9) yollarına ait primer antikorlarla ve TUNEL boyaması ile değerlendirilmesinde, I/R grubunda artan hücre hasarı ile ilişkili olarak pozitif hücre sayısının kontrole göre istatistiksel olarak artmış olduğu belirlendi. Antioksidan uygulanan gruplardan kontrol grubuna en yakın olan kaspaz 8, kaspaz 9 ve TUNEL bulgularının reperfüzyon hasarı öncesi TD EGCG uygulaması grubunda olduğu ve bu uygulamaya ile spermatik hücrelerin apoptotik etkilerden korunduğu gösterilmiştir.

Ekstrinsek yolağa ait Kaspaz 8 immünoaktivitesi en yüksek şiddetli I/R grubu ile DY EGCG grubunda izlenmiştir. Intrinsek yolağa ait **Kaspaz 9 immünoaktivitesi** en yüksek şiddetli I/R grubunda izlenmiş olup, DY CAPE ve DY KOMP gruplarında orta şiddetli olarak gözlenmiştir.

PI3K aktivasyonu hücre sağ kalımında önemli olup, TD EGCG ve TD KOMP gruplarında immünoaktivite şiddetinin I/R grubuna göre artmış olduğu görülmüştür. TD EGCG ve TD KOMP grupları reperfüzyon hasarına karşı hücre canlılığını devam ettirmiştir.

TD CAPE grubunda PI3K/AKT/mTORC1 yolağının korelasyonlu aktivasyonu I/R grubuna göre spermatogenik hücrelerde reperfüzyon hasarını azalttığı ve hücre canlılığı ve proliferasyonunu desteklemiştir. Ayrıca kaspaz 8 ve kaspaz 9 immünoaktivitesinin azaldığı hücreyi apoptotik etkiden koruduğunu tunel bulguları ile paralel olarak desteklemektedir.

Bu çalışmada DY CAPE ile DY KOMP gruplarında PI3K aktivasyonuna bağlı AKT aktivasyonu olurken, FOXO inhibisyonu ile apoptotik etkisi gösterilmiştir. Bu gruplarda AKT aktivasyonu ile mTORC1 ve kaspaz 9'un immünreaktivitesinde artış ile apoptotik etkiyi indüklediği gözlenmiştir. TUNEL sonuçları da bu bulguları desteklemektedir.

DY EGCG grubunda I/R hasarına karşı AKT aktivasyonuna bağlı FOXO1 immünreaktivitesinin artması hücre oksidatif hasarında hücre proliferasyonunu indüklediği ancak, Kaspaz 8 ekstrensek apoptotik etki ile hücreyi apoptotik etkiden kurtaramadığı gözlenmiştir. Ancak, PI3K tarafından indüklenen AKT aktivasyonuna bağlı FOXO1 aktivasyonu artmış ve kaspaz 9 inaktivasyonu ile hücreyi I/R hasarından korumuştur.

TD KOMP grubunda AKT ve mTORC1 immünreaktivitesindeki artış ve kaspaz 8 immünreaktivitesindeki azalış, spermatogonik hücreleri reperfüzyon hasarından koruyucu ve hücre sağkalımı açısından önemli olduğunu göstermiştir.

MDA (Malondialdehit), serbest oksijen radikallerinin dokuya ulaşması ile dokuda lipid peroksidasyonu reaksiyonları sonucu oluşan üründür. MDA, iskekiye bağlı oksidan dengenin bozulması ile en hızlı reaksiyon veren bir üründür. Birçok çalışmada iskekiye/reperfüzyon sonrası doku veya plazma MDA seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir (207, 208, 209, 5, 210). Testis iskekiye/reperfüzyon hasarında CAPE ve EGCG uygulamalarında MDA seviyesinde azalma olduğu gösterilmiştir (207, 208, 209, 5, 210).

Yapılan çalışmada, eliza yöntemiyle değerlendirilen kan MDA düzeylerinin I/R grubunda kontrol grubuna istatistiksel olarak anlamlı olarak artmış olduğu ($p<0,001$), CAPE ve EGCG uygulanan gruplarda ise I/R grubuna göre azalmış ($p<0,01$) olduğu görülmüştür. CAPE uygulanan gruplarda MDA düzeyinde farklılık olup TD CAPE grubunda MDA düzeyinin DY CAPE grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür. MDA düzeyi TD EGCG grubunda DY EGCG grubuna oranla daha yüksek seviyede izlenirken TD KOMP ile DY KOMP grupları arasında da benzer durum izlenmiştir. DY gruplarında MDA seviyesinde artış antioksidan metabolizmasının lipid peroksidasyonu üzerinde olumlu etkisi olduğunu göstermiştir.

MDA düzeylerinin antioksidan uygulanan tüm gruplarda azalmış olduğu izlenirken, kontrole en yakın değerin DY CAPE grubunda olduğu izlenmiştir. Bu grupta lipid peroksidasyonu yoluyla serbest radikal oksijenlerinin azaldığı düşünülmüştür.

8OHdG; Oksidatif strese, hücre DNA yapısında oluşturulan hasarı analiz eden temel moleküllerden biri kabul edilir.

Hiperglisemiye bağlı 90 dakika iskemi,120 dakikalık reperfüzyon modeli sonrası dokuda 8OHG, HNE, MMP2 ve MMP9 aktivasyonlarının azaldığı gösterilmiştir (211). Kardiak disfonksiyon sonrası I/R hasarında oksidatif stresle hücre reaktif artışına bağlı 8OHdG seviyesinin arttığı bildirilmiştir (212).

Biyokimyasal olarak 8OHdG düzeyi, I/R grubunda tüm gruplara göre artmış olarak gözlenirken ($p<0,001$), TD EGCG uygulanan grupta kontrol grubuna en yakın değer gözlenmiştir. Bunu takiben sırasıyla DY EGCG, TD KOMP, DY KOMP ve DY CAPE gruplarında kontrol grubuna yakın değerler izlenmiştir ($p<0,001$). Kandan elde edilen biyokimyasal Elisa 8OHdG değerleri histopatolojik bulguları desteklemekte olup, DNA hasarının göstergesi olan bu değer doku hasarını ve iyileşmesini daha iyi yansıttığı düşünülmüştür.

Biyokimyasal olarak MDA lipid peroksidasyonunu göstermekte olup, histopatolojik bulgularımızla I/R grubunda kontrol grubuna göre artmış olduğu bu yolla oluşturulan hasarda lipid peroksidasyonunun önemli olduğunu göstermiştir. Ancak antioksidan uygulamalarında histopatolojik skorlamada daha iyi görünümde olan TD EGCG grubunda MDA düzeyleri diğer gruplara göre daha yüksek izlenmiştir. Histopatolojik olarak antioksidanların etkilerinin değerlendirilmesinde DNA hasarı göstergesi olan 8OHdG 'nin daha etkili olabileceği ve kan ile doku uyumunun göstergesi olarak kullanılmasının daha doğru olacağı düşünülmüştür.

6.SONUÇ

Bu çalışmada sıçan testis torsiyonu I/R hasarında CAPE ve EGCG'nin koruyucu etkileri histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak değerlendirilmiştir. PI3K/AKT/mTOR/FOXO sinyal yolağı ve apoptotik yollar ile ışık mikroskop altında yapılan değerlendirmeler sonucunda TD EGCG uygulamasının diğer antioksidan uygulamalarına göre daha anlamlı olarak histopatolojik düzeltme yaptığı saptanmıştır.

Biyokimyasal olarak DNA hasar göstergesi olan 8OHdG'nin histopatolojik bulgularla uyumlu olduğu ve kan düzeyi ile dokunun histolojik görünümünü yansıttığı izlenmiştir.

DY antioksidan uygulama dozlarının etkileri, TD antioksidan uygulamalarına göre anlamlı iyileştirmeye neden olmadığı gözlenmiş olup, iskemiden sonra acil servise getirilen hastalarda klinik olarak TD EGCG uygulamasının daha iyi sonuç vereceği, CAPE uygulamasının da hastaya yeterli iyileşme sağlayacağı ve hasarı önlemede başarılı olabileceği düşünülmüştür. Kombine uygulamalar değerlendirildiğinde diğer tek doz antioksidan uygulamalara göre daha fazla bir iyileşme sağlamadığı izlenmiştir, bu yüzden son durumda bu kompleks TD doz uygulamanın yeterli olduğu düşünülmüştür. Sonuç olarak;

- TD EGCG uygulamasının histopatolojik ve 8OHdG değerlendirmelerinde en iyi sonuca ulaşıldığı,
- TD CAPE'nin histokimyasal bulgularca tedavide kullanılabileceği
- Kombine uygulamalara gerek olmadığı,
- Biyokimyasal belirteçlerden 8OHdG'nin immünohistokimyasal ve TUNEL bulguları ile grupları korelasyonlu desteklediği
- Doyurma gruplarında testis I/R hasarı tedavisi için beklenen yanıt alınamayıp kullanılmasına gerek olmadığı kanısına varıldı ve yüksek dozda verilmesinin ve eliminasyon hızları göz önüne alındığında toksik etkili olabileceği düşünülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. Bektaş H, Özzeybek D, Günenç F, Akkuş M, Bağrıyanık A, et al. Sıçanlarda Testiküler İskemi Reperfüzyon Modelinde İki Farklı Dozda Deksmetomidinin Etkileri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2012;32(3):766-74
2. Aktaş A, Tuncer C.M, Yıldırım A, Nergis Y, Akkuş M. Protective Effects of Melatonin on Testicular Torsion and Detorsion Damage in Sprague-Dawley Rats. *Int. J. Morphol.* 2011;29(1):7-15
3. Altınışık M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. 2000 AYDIN
4. Caffeic Acid Phenethyl Ester Causes p21Cip1 Induction, AKT Signaling Reduction, and Growth Inhibition in PC-3 Human Prostate Cancer Cells. *PLOS ONE.* 2012; Jan 5-12
5. Kakuta Y, Okumi M, Isaka Y, et al. Epigallocatechin-3-gallate protects kidneys from ischemia reperfusion injury by HO-1 upregulation and inhibition of macrophage infiltration *Transplant International* . 2011 European Society for Organ Transplantation. 2011; 24 :514–522
6. Hsin H, Kenyon C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature.* 1999; 399:362–366
7. Sadler TW (Çeviri: AC. Başaklar). *Langman's medikal embriyoloji.* 7. Baskı. Ankara Palme Yayıncılık. 2011; Baskı 11
8. Moore K. L, Persaud T. V. N. (Çeviri Edt; Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. *Klinik Yönleri İle İnsan Embriyolojisi.* Nobel Tıp Kitabevi. 2009; 8. Baskı
9. Ilona A Kopera, Barbara Bilinska, C Yan Cheng, Dolores D Mruk. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos. Trans. R. Soc. Lond, B, Biol. Sci.* 2010; 365(1546):1593-605
10. GÖKMEN GF: *Sistematik Anatomi.* İzmir Güven Kitabevi. 2008; 2. baskı
11. Sancak B. Cumhuriyet M. *Fonksiyonel Anatomi Baş Boyun ve İç Organlar,* 4. baskı, ODTÜ yayıncılık, Ankara, Türkiye. 2008; 291
12. TUNALI S, BAŞAR R. Testisin Vasküler Anatomisi: Türkiye klinikleri üroloji Özel Dergisi. 2012; cilt5. sayı 3
13. Rauchenwald M. Steers WD, Desjardins C: Efferent innervation of the rat testis. *Biol Reprod.* 1995; 52:1136-1143.
14. Taguchi K, Tsukamoto T, Murakami G: Anatomical studies of the autonomic nervous system in the human pelvis by the whole-mount staining method: Left-right communicating nerves between bilateral pelvic plexus. *J Urol.* 1999; 161:320-325.
15. Saunders WB. *Campbell Üroloji.* 2005; 76-78 8. Baskı.

16. William K. Ovale, PhD ve Patrick C. Nahirney, PhD. Netter basic histology. 2009;387
17. Polat S, Kaya M, , Tap Ö, Mete UÖ, Özgür H. Özel Histoloji Ders Notları. Adana, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları. 2006;156-161.
18. Ronald A. Bergman, Ph.D, Adel K. Afifi, M.D, Paul M. Heidger, Jr, Ph.D. Male Reproductive System. 2011;section 14.
19. Ross MH, Pawlina W. Histology A Text And Atlas. 6th Ed. Baltimore, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2011; 784-816.
20. Abraham L. Üreme Sistemi. Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara: Palme Yayıncılık. 2012;3. Baskı
21. Junquera LC, Carneiro J, Kelley RO. Erkek Üreme Sistemi. Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel Histoloji. 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 2005; 431-448.
22. Anatomy&Physiology Advanced with Chartrand at Waukesha County Technical Collage. 2013;13-56
23. The Spermatozon, in Gray's Anatomy".Spermatogenesis.jpg Retrieved. 2010;10-07.
24. Yılmaz A,Gökdal Ö. Allografting and Xenografting of Testis Tissue and Using Possibilities in the Future. Kafkas Unı Vet Derg.2010; 16 (6): 1073-1077
25. Kosova F,Arı Z. Prostat kanseri ve apoptozis ilişkisi. Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi/131Journal of Clinical and Experimental Investigations. 2011; 2, (1): 124
26. Riaz Ul-Haq M,MBB SFCPS, FEBPS;Mahdi Diaa eldin abdelhamid;Iran J Pediatr sep.2012;vol 22(No 3):PP281-289
27. Aydın ÇY, Pul M,İnan M et. al. Deneysel testisküler torsiyon modelinde N-asetilsistein doku hasarını önlemede rol oynaya bilirmi. Cumhuriyet Tıp Derg. 2012; 34: 462-471
28. Drlik M,Kocvara R.Torsion of spermatic cord in children: A review. Journal of Pediatric Urology.2013;9: 259-266
29. Önal F,Sağlam H,Erdem MR, Köse O,Önal ŞY.Testis torsiyonlu hastaların tanı ve tedavisindeki problemler,Preoperatif aralıklı testiküler ağrının önemi.Yeni Üroloji Dergisi. 2011;6 (1): 26-30
30. Korkeş F,Cabral P,Alves C,et al. Testicular torsion and weather conditions: analysis of 21,289 cases in Brazil.Division of Urology, ABC Medical SchoolVol. March. 2012;38 (2): 222-229
31. Görür S,Helli A,Orhan İ.Testis torsiyonu patofizyolojisi ve tedavisinde yenilikler. İnfertilite Dergisi Derleme.2011;4
32. Kılıç N,Balkan E.Çocuklarda akut skrotom patolojileri.Güncel Pediatri. 2004; 2 : 122-125

33. Noseworthy J. Testicular torsion. In: Ashcraft KW (Ed.). Pediatric surgery 3rd ed. Philadelphia: W.B.Saunders Co. 2000;p.674-80.
34. Hayn MH, Herz DB, Bellinger MF, Schneck FX. Intermittent torsion of the spermatic cord portends an increased risk of acute testicular infarction; J Urol. 2008;180:1729-32
35. Memik Ö, Kayıkçı A, Akyüz O, Yaşar M. Testis torsiyonu: olgu sunumu. konuralp tıp Dergisi. 2012;4(1):35-37 35
36. Erdoğan A, Günay E.C, Gündoğdu G, Avlan D. Testicular Torsion in the Left Inguinal Canal in a Patient with Inguinal Hernia: A Difficult Case to Diagnose. Molecular Imaging and Radionuclide Therapy. 2011;20(3): 108-110
37. Moon C, Yasuzumi F, Okura N, Kim H, Ahn M, Shin T. Enhanced expression of tyrosine kinase receptor a in germ cells of rat testis with acute experimental testicular torsion. Urol Int. 2005;74(1):79-85.
38. Lysiak JJ, Turner SD, Nguyen QT et al. Essential Role of Neutrophils in Germ Cell-Specific Apoptosis Following Ischemia/Reperfusion Injury of the Mouse Testis Biology of reproduction. 2001;65: 718–725
39. Rampaul MS, Hosking SW. Testicular torsion: most delay occurs outside hospital. Ann R Coll Surg Engl. 1998; 80: 169-172
40. Anderson JB, Williamson RC. Testicular torsion in Bristol: a 25-year review. Br J Surg. 1988;75: 988-992.
41. Yapanoğlu T, Aydın HR, Adanur Ş, et al. Our Thirteenth-year Experience with Testicular Torsion in Children. The Eurasian Journal of Medicine. EAJM. 2007;39:Aralık 165
42. McCombe AW, Scobie WG. Torsion of scrotal contents in children. Br J Urol. 1988; 61: 148-150.
43. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D: Antioxidant Therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol Rev. 2001;53: 135
44. Yapca Ö, Borekci B, Suleyman H. Ischemia-Reperfusion Damage. Eurasian J Med. 2013; 45:126-7
45. Ozturk H, Buyukbayram H, Ozdemir E, et al: The effects of nitric oxide on the expression of cell adhesion molecules (ICAM-1, UEA-1, and tenascin) in rats with unilateral testicular torsion. J Pediatr Surg. 2003;38:1621- 1627
46. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A: Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. Mol Aspects Med. 2004;25: 199-210
47. Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K, Ozgocmen S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. vascular pharmacology. 2007;47-108-112

48. Adaramoye O.A, Akinwonmi O, Akanni O. Effects of Propofol, a Sedative-Hypnotic Drug, on the Lipid Profile, Antioxidant Indices, and Cardiovascular Marker Enzymes in Wistar Rats. *ISRN Pharmacology* Volume.2013; Article ID 230261, 6 pages
49. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2005;20(4)
50. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*. 1986;250:G749-53
51. Levison D, Reid R, Burt A, Et Al. *Muir's Textbook of Pathology*; 2009.
52. Chaki SP, Ghosh D, Misro MM. Simultaneous increase in germ cell apoptosis and oxidative stress under acute unilateral testicular ischemia in rats. *Int J Androl*. 2003;26: 319-328
53. Lysiak JJ, Zheng S, Woodson R et al. Caspase 9 dependent pathway to murine germ cell apoptosis: Mediation by Oxidative stress, BAX and caspase 2. *Cell Tissue Res*. 2007;328:411-49
54. Guimaraes SB, Aragao AA, Santos JM et al. Oxidative stress induced by torsion of spermatic cord in young rats. *Acta Cir Bras*. 2007;22:30-33.
55. Avlan D, Erdogan K, Cimen B et al. The protective effect of selenium on ipsilateral and contralateral testes in testicular reperfusion injury. *Pediatr Surg Int*. 2005;21:274-278 55
56. Anim JT, Kehinde O, Prasad A et al. Morphological responses of the rabbit testis to ischemic/reperfusion injury due to torsion. *Urol Int*. 2005;75:258-263
57. Unsal A, Eroglu M, Avci A et al. Protective role of natural antioxidant supplementation on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *Scand J Urol Nephrol*. 2006;40:17-22
58. Atik E, Gorur S, Kiper AN. The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on histopathological changes in testicular ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res*. 2006;54:293-297
59. May Al-Maghrebi, Waleed M. Renno, Nada Al-Ajmi. Epigallocatechin-3-gallate inhibits apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from ischemia/reperfusion-induced inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012; 420 434-439
60. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi Reperfüzyon hasarı. *Klinik gelişim Fizyopatoloji Dergisi*. 2009;22/3
61. Roggensack AM, Zhang Y, Davidge ST. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension*. 1999;33: 304-308
62. Akkus İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. *Türk Toraks Dergisi*. 2008; Cilt 9/1. 013-016
63. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant Systems and oxidative stress in the chapter 9. 2008 ;

64. Lobo V, Patik a, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010; jul-Dec 4(8):118-126
65. Yılmaz E, TUNA L, Bürün B. Bitkilerin tuz stresi etkilerine karşı Geliştirdikleri tolerans stratejileri. *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi* ISSN 1305-1385 C.B.U. *Journal of Science.* 2011; 47-66
66. Caylak E. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi.* 2011; 9 (1) : 73-83
67. Tajes M, Raga G, Palomer E ET AL. Nitro-Oxidative Stress after Neuronal Ischemia Induces Protein Nitrotyrosination and Cell Death. *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume. 2013; Article ID 826143, 9 pages
68. Aladağ M.A, Türköz Y, Özerol H.Y. Nitric Oxide And Its Neurophysiopathological Effects *T Klin Tıp Bilimleri.* 2000; 20:107-111
69. Gültekin F, Delibas N, Yasar S, Kılınç. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch. Toxicol.* 2001; 75:88-96
70. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 2001; 53: 83-104.
71. Çetin İ, Muhtaroglu S, Ketici D, B. Et. al. Evaluation of Malondialdehyde Level and Paraoxonase 1 Activity in Obese Children. *Journal of Health Sciences.* 2013; 22(1) 64-69
72. Ocakoğlu Balcı H, Özkök A, Dinçer Y et al. Primer Açık Açılı Glokomlu ve Senil Kataraktlı Hastalarda Oksidatif Stresin Rolü *T. Oft. Gaz.* 2008; 38, 292-297
73. Yildirim O, Atel NA, Ercan B, Muşlu N, Unlü A, Tamer L, Atik U, Kanik A. Role of oxidative stress enzymes in open-angle glaucoma *Eye.* 2005; 19(5):580-3.
74. Eken A. Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif stress parametreleri. *Journal of Clinical and Analytical Medicine.* 2013; 69-70.
75. Yokuş B, Çakır DÜ. in vivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2' deoxyguanosine. *T Klin J Med Sci.* 2002; 22
76. Akyol S, Armutçu F, Yiğitoğlu R.M. The Medical Usage of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), an Active Compound of Propolis, in Neurological Disorders and Emergencies. *Spatula DD.* 2011; 1(1):37-42
77. Akyol S, Ozturk G, Ginis Z, et al. In Vivo and In Vitro Antineoplastic Actions of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE): Therapeutic Perspectives. *Nutrition and Cancer.* 2013; volume 65, Issue 4
78. Watanabe M.A, Amarante M.K, Conti B, J. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2011; 63: 1378-1386

79. Ozturk G, Ginis Z, Akyol S, et al. The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012 ;Dec 16(15):2064-8
80. UZ E, SÖGÜT S, ŞAHİN S, et al. The protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on testicular tissue after testicular torsion and detorsion *World J Urol.* 2002; 20: 264–270
81. Şahin H, Özdemir F. Yeşil Çayın Sağlık Üzerine Etkisi. Türkiye 9. Gıda Kongresi. 2006; 24-26 Mayıs Bolu
82. Chung SY, Landau JM. Effects of tea consumption on nutrition and health. *J Nutr.* 2000;130:2409–2412
83. KİM HS, MONTANA V et al. Epigallocatechin-gallate (EGCG) Stimulates Autophagy in Vascular Endothelial cells: A potential Role for Reducing Lipid Accumulation *JBC Papers in Press.* 2013; Published on June 10, as Manuscript M113.477505.
84. Park JW, Jang YH et al. Green Tea polyphenol (–)-epigallocatechin Gallate reduces neuronal cell damage And up-regulation of mmp-9 activity İn hippocampal ca1 and ca2 areas Following transient global Cerebral ischemia *Journal of Neuroscience Research.* 2009;87:567–575
85. Kılıçalp D, Yur F, Değer Y. Elektromanyetik Radyasyona Maruz Bırakılan Kobayların Serum Bakır ve Çinko Seviyelerine Yeşil Çayın Etkisi. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2008; (2) 53-56
86. Mochida I, Kawano S, Hironaka M, et al. Reduction of NO of Very Low Concentration in Air with NH₃ at Room Temperature over Calcined Active Carbon Fibers *Genes Nutr.* 2007;2:307-310
87. Yu Pl, Pu Hf, Chen Sy et al. Effects of Catechin, Epicatechin and Epigallocatechin Gallate on Testosterone Production in Rat Leydig Cells. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2010; 110:333–342
88. Orly Weinreb, Tamar Amit, Moussa B. H. Youdim Neuroprotective molecular mechanisms of (–)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties *Genes Nutr.* 2009; December:4(4)283-296
89. Maghrebi MA, Renno W.M, Ajmi N.A. Epigallocatechin-3-gallate inhibits apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from ischemia/reperfusion-induced inflammation *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2012; 420: 434–439
90. Sugiyama A, Chiba M, Nakagami T, Kawano S, Sanada Y, Tajiri T, Toki A. Beneficial effects of (–)-epigallocatechin gallate on ischemia-reperfusion testicular injury in rats. *J Pediatr Surg.* 2012; Jul; 47(7):1427-32.

91. Rohde J, Heitman J & Maria E. C. The TOR Kinases Link Nutrient Sensing to Cell Growth; *Journal of Biological Chemistry*.2001; 276: 9583–9586.
92. Schenoe S, Brullo C, Musumeci F, Radi M, Botta M. ATP-Competitive Inhibitors of mTOR: An Update. *Curr Med Chem*. 2011;8-12
93. Fingar D. C, Blenis J. Target of Rapamycin (TOR): An Integrator of Nutrient and Growth Factor Signals and Coordinator of Cell Growth and Cell Cycle Progression. *Oncogene*.2004; 23: 3151–3171.
94. Sehgal et al; *Biochemistry of Rapamycin*. *J. Antibiotics*.1975; 727-729
95. Patrick M, Martin and Ann E. Sutherland. Exogenous Amino Acids Regulate Trophoctoderm Differentiation In The Mouse Blastocyst Through An mTOR-Dependent Pathway. *Developmental Biology*.2001; 240:182-193
96. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations.2009;10.1038/nrc2664
97. Çoban Z.D,Güran Ş. The role of signal transducing mechanisms in cancer diagnosis and treatment. *Cumhuriyet Med J*. 2013; 35: 302-310
98. Heitman J, Movva N. R, Hall M. N. Targets For Cell Cycle Arrest By The Immunosuppressant Rapamycin In Yeast. *Science*.1991; 253:905–909.
99. Yuan TL, Cantley LC PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme . *Oncogene*. 2008; 27: 5497 – 5510.
100. Mc Alpine J. B, Swanson S. J, Jackson M, Whittern D. N. Rapamycin-Molecular Compound. *J. Antibiotics*.1991;44: 688-690
101. Küçük Öner M,İşıkdoğan A. Kanser tedavisinde mTOR sinyal yolağı ve mTOR inhibitörleri *Dicle Med J*. 2013; 40:156-16
102. Nicolaou K. C, Chakraborty T. K, Piscopio A. D, Minowa N, Bertinato P. Rapamycin (Cmestry) *J. Am. Chem. Soc*. 1993; 115:4419.
103. Keith C. T, and S. L. Schreiber. PIK-Related Kinases: DNA Repair, Recombination, And Cell Cycle Checkpoints. *Science*.1995; 270: 50–51
104. Kunz J, R. Henriquez U, Schneider M, Deuter-Reinhard N. R. Movva and M. N. Hall. Target Of Rapamycin In Yeast, TOR2,Is An Essential Phosphatidylinositol Kinase Homolog Required For G1 Progression. *Cell*.1993; 73: 585–596.
105. Long X, C, Spycher Z, Han A, Rose F, Muller and Avruch J. TOR Deficiency In C. Elegans Causes Developmental Arrest and Intestinal Atrophy By Inhibition Of MRNA Translation. *Curr Biol*.2002; 12: 1448
106. Oldham S, J Montagne, T Radimerski, G Thomas, and E Hafen. Genetic And Biochemical Characterization Of DTOR, The Drosophila Homolog Of The Target Of Rapamycin. *Genes Dev*. 2000;14: 2689–2694.
107. Zhang H, Stallock J. P, Reinhard J. C. Ng. C, and Neufeld T. P. Regulation Of Cellular Growth By The Drosophila Target Of Rapamycin dTOR. *Genes Dev*. 2000; 14: 2712–2724.

108. Brown E. J, Albers M. W, Shin T. B, Ichikawa K, Keith C. T, Lane W. S, Schreiber S. L. A Mammalian Protein Targeted By G1-Arresting Rapamycin-Receptor Complex. *Nature Sci.*1994; 369: 756–758
109. Chiu M. I, Katz H, Berlin V. RAPT1, A Mammalian Homolog Of Yeast Tor, Interacts With The FKBP12/Rapamycin Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*1994; USA 91: 12574–12578
110. Menand B. T, Desnos L, Nussaume F, Berger D, Bouchez C, Meyer, Robaglia C. Expression And Disruption Of The Arabidopsis TOR (Target Of Rapamycin) Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 6422–6427
111. Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, Kiyama H, Yonezawa K, Yamanaka S. mTOR is Essential for Growth and Proliferation in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology.*2004; 6710 6718.
112. Mavrommati I, Maffucci T. mTOR Inhibitors: Facing New Challenges Ahead. *Curr Med Chem.*2011; 18(18): 2743-62.
113. Astrinidis A, Henske EP. Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Oncogene Review.*2005;14;24(50):7475-81.
114. Wong M. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathways in Neurological Diseases. From the Department of Neurology and the Hope Center for Neurological Disorders, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA Received. 2012;
115. Sengupta S, Peterson T.R, Sabatini D.M. Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Molecular Cell.*2011;40, October 22,
116. Zhou H, S. mTOR signaling in cancer cell motility and tumor metastasis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*2010;20:1-16
117. Wu X, He L, Cai Y, Zhang G, et al. Induction of autophagy contributes to the myocardial protection of valsartan against ischemia-reperfusion injury. *Mol Med Rep.*2013; Dec;8(6):1824-30.
118. Zhang H, Cui Z, Luo G, Zhang J, Ma T, Hu N, Cui T. Ghrelin attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice by activating the mTOR signaling pathway. *Int J Mol Med.* 2013; Oct;32(4):851-9.
119. Mian C, Barollo S, Pennelli G, et al. Molecular characteristics in papillary thyroid cancers (PTCs) with no 131I uptake. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008; Jan 68(1):108-16.
120. Chang F, Lee J. T, Navolanic P. M, et al. Involvement Of PI3K/AKT Pathway In Cell Cycle Progression, Apoptosis, And Neoplastic Transformation: A Target For Cancer Chemotherapy. *Leukemia.*2003; 17: 590-603

121. Geering B, Cutillas PR, Nock G, Gharbi SI, Vanaesebroeck B. Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *PNAS*.2007; 104- 19- 7809-7814
122. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev*.2006;5:671- 8.
123. Pazarbaşı A, Kasap M, Kasap H. Kanser yolakları. *DEU ARŞİV*.2011; 20: 187.
124. Manning B. D, Cantley L. C AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 2007; 129: 1261-1274
125. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/AKT signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*.2004; Apr;30(2):193-204
126. Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, et al. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem*. 2002;Nov 22;277-47
127. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*.2002;Oct;2(10):725-34.
128. Zha MM, Yang JY, Wang XB, Tang CS, Du JB, Jin HF. The PI3K/AKT pathway mediates the protection of SO(2) preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. 2013;Apr 34(4):501-6.
129. Zhang T, Yang D, Fan Y, Xie P, Li H. Epigallocatechin-3-gallate enhances ischemia/reperfusion-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via AKT and MAPK pathways. 2009; Oct14(10):1245-54.
130. Guarente L, Kenyon C Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*. 2000;408:255–262
131. Fu Z, Tindall DJ. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(16):2312-9.
132. Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene*. 2008;27(16)2276-2288
133. Van Der Vos KE, Coffey PJ FOXO-binding partners: it takes two to tango. *Oncogene*.2008; 27:2289–2299107
134. Hang H, Muddiman DC, Tindall DJ Androgens negatively regulate forkhead transcription factor FKHR (FOXO1) through a proteolytic mechanism in prostate cancer cells. *J Biol Chem*.2004; 279:13866–13877
135. Peng SL. Foxo in the immune system. *Oncogene*.2008;27(16):2337-44.
136. Paik JH, Kollipara R, Chu G, DePinho RA ve et. Al. FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell*.2007; 128:309–323

137. Buteau J, Shlien A, Foisy S, Accili D Metabolic diapause in pancreatic b-cells expressing a gain-of-function mutant of the forkhead protein Foxo1. *J Biol Chem.* 2007;282:287–293
138. Gross DN, van den Heuvel AP, Birnbaum MJ The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene.*2008;27:2320–2336
139. Malik AI, Storey KB. Transcriptional regulation of antioxidant enzymes by FoxO1 under dehydration stress. *Gene.*2011;Volume 485, Issue 2, 114–119.
140. Kamo N, Ke B, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. PTEN-mediated β -catenin/Foxo1 signaling regulates innate immune responses in mouse liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.*2013;Jan;57(1):289-98.
141. İnci A, Yıldırım A, Yavuz A, Düzlü Ö. Bazı Protozoon Enfeksiyonlarda Apoptozis. *Erciyes Üniv Vet Fak Dergisi.*2009;6(2) 121-133
142. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AE . Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.*1972; 26: 239-257
143. Wyllie AH, Morris RG, Smith AI, Dunlop D, Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol.*1984;142: 67-77.
144. Arıcan G.Ö. Apoptosis signalling: A life or death decision. *Advances in Molecular Biology.*2008;(2): 57-66
145. Chang, H.Y. ve Yang, X, Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiology and Mol. Biol. Rev.*2000;64, 821–846
146. Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors.* 1998;8:1-5
147. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom.*2001;13:102-7.
148. Tomatır A.G. Apoptosis: Programmed Cell Death. *T Klin J Med Sci.*2003; 23:499-508
149. Majno G, Joris I, Apoptosis, oncosis, necrosis: An overview of cell death *Am J Pathol.* 1995;146: 3-15.
150. Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1644(2-3):125-32.
151. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol.*2003;15(3):185-93.
152. Yazıcı P, Alizadehshargh S, Akdoğan G. Apoptoz: Düzenleyici Moleküller, Hastalıklarla İlişkisi ve Apoptozu Saptama Yöntemleri *Türkiye Klinikleri J Med Sci.*2009;29(6)
153. Stennicke HR, Salvesen GS. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta.*2000;1477(1-2):299-306.

154. Clerk A, Cole SM, Cullingford TE, HarrisonJG, Jormakka M, Valks DM. Regulation of cardiac myocyte cell death. *Pharmacol Ther.*2003;97(3):223-61
155. Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int.* 2005;29(7):489-96
156. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann HS. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68, 383-424,122
157. Erwig LP, Henson PM, Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.*2008;15: 243-250
158. Prater JM, Overdorf BS. Testicular torsion: a surgical emergency. *Am Fam Physician.*1991;44: 834-40
159. Janetschek G, SchreckenberG F, Grimm W, Marberger M. Hemodynamic effects of experimental testicular torsion. *Urol Res.*1987;15:303-6
160. Turner TT, Brown KJ Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow.*Eur J Pediatr.*2000;159 (1-2): 103-107
161. Turner TT. Acute experimental testicular torsion: no effect on the contralateral testis. *J Andro.*1985; 6(1):65-72.
162. Cosentio MJ, Nishida M. Histological changes occurring in the contrilateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *J Urol.* 1985; 133: 906-11.
163. Kallerhoff M,Gross AJ, Bötöfür IC,Zöller G,Weidner W.İnfluence of temperature on changes in ph ,lactate and morphology during testicular ischaemia.*Br J U rol.* 1996;440-45
164. Heindel RM, Pakyz RE, Reinking LN, Cosentino MJ. The effect of various degrees of unilateral spermatic cord torsion on fertility in the rat. *J Urol.*1990, 144(2):366-9.
165. Gürdal M, Tekin A, Erol A, Onmuş H, Konukoğlu D., Şengör F. Torsiyone Rat Testisinde Gelişen İskemi-Reperfüzyon Hasarında Pentoksifilin Antioksidan Etkisi *Türk Üroloji Dergisi.* 2002;28 (3): 260-263
166. Ovalı GY, Yılmaz Ö, Tarhan S, Genç A, Demireli P, Tunçyürek Ö ve ark. Deneysel olarak oluşturulmuş testiküler torsiyon modelinde perfüzyon BT incelemesi. *Çocuk cerrahisi kongresi özet kitabı.*2006, P-72.
167. Aydın Ç. Y Pul M, İnan M.et al. Deneysel testiküler torsiyon modelinde N-asetilsistein doku hasarını önlemede rol oynayabilir mi? *Cumhuriyet Tıp Derg.* 2012; 34: 462-471
168. Filho A.U,İnouye C.M,Pontes J.C.et al. Propofol effects on the morphology of rat testes subjected to testicular ischemiareperfusion. *Acta Cirúrgica Brasileira.*2012; Vol. 27 (2).

169. Kurçer Z, Dengiz G, Baba F. et al. The Effects of Statins on Testicular Ischemia Reperfusion-Induced Histopathologic Injury. *F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.* 2012; 26 (1): 15 – 20.
170. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J Urol.* 1997; 157: 340 345.
171. Abasiyanik A, Dagdonderen L: Beneficial effects of melatonin compared with allopurinol in experimental testicular torsion. *J Pediatr Surg.*2004; 39: 1238 1241. -46.
172. Kehinde EO, Anim JT, Mojiminiyi OA, et al: Allopurinol provides long-term protection for experimentally induced testicular torsion in a rabbit model. *BJU Int.* 2005; 96: 175 180.
173. Romeo C, Antonuccio P, Esposito M, et al: Raxofelast, a hydrophilic vitamin E like antioxidant, reduces testicular ischemia reperfusion injury. *Urol Res.*2004; 32: 367 371
174. Ozkan KU, Boran C, Kilinc M, Garipardic M, Kurutas EB: The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia-reperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion-detorsion. *J Pediatr Surg.* 2004; 39: 91 95
175. Baloğlu H, Baykal K, Demirel D. et al. Testis torsiyonunda iskemi/reperfüzyon hasarının biyokimyasal ve morfolojik boyutları ve bu hasarın önlenmesinde E vitamininin Rolü. *Türk Patoloji Dergisi.* 1996;12-2;68-73
176. Akgür FM, Kılınç K, Aktug T. Reperfusion injury after detorsiyon of unilateral testicular torsion. *Urol Res.*1993; 21: 395,
177. Akgür FM, Kılınç K, Aktug T, et al: The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *J Urol.*1994;151:1715-1717
178. Altunoluk B, Söylemez H, Bakan V, et al Protective Effects of Zofenopril on Testicular Torsion and Detorsion Injury in Rats. *Urol J.* 2011;8:313-9
179. Cankorkmaz L, Köylüoğlu G, Özer H, et al. Deneysel tek taraflı testis torsiyonundaki karşı testis hasarında apoptozisin rolü ve karnitinin koruyucu etkisi. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.*2009;15(6):529-534
180. Ozbal S, Ergur B, Erbil G, et al. The effects of α -lipoic acid against testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *The scientific Worl journal.* 2012;10.1100-8
181. Yulug E, Türedi S, Karagüzel E. et al. The short term effects of resveratrol on ischemia-reperfusion injury in rat testis. *journal of pediatric surgery.* 2013;10.1016-7
182. Borelli F, Izzo, AA, Di Carlo G, Etal. Effect of a propolis extract and cafeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia.* 2002;73, 38-S43

183. Son S, Lewis BA. Freeradical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure activity relationship. *J. Agric. Food Chem.*2002;50: 468-472
184. Ozer MK, Parlakpınar H, Acet A. Reduction of ischemia–reperfusion induced myocardial infarct size in rats by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Clin Biochem.*2004;37:702-5
185. Khan M, Elango C, Ansari MA, Singh I, Singh AK. Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem.*2007;102:365-77
186. Oktem F, Ozguner F, Sulak O, Olgar S, Akturk O, Yılmaz H.R. Et all. Lithiuminduced renal toxicity in rats: Protection by a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Molecular and Cellular Biochemistry.*2005;277: 109- 115
187. Pekmez H, Kus I, Colakoglu N, Ogeturk M, Ozyurt H, Turkoglu AO, Sarsılmaz M. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against liver damage induced by cigarette smoke inhalation in rats. *Cell Biochem Funct.* 2007; Jul-Aug;25(4):395-400
188. U. Koltuksuz, M.K Irmak, A. Karaman, E. Uz, H. Özyurt, ö. akyol. caffeic acid phenethyl ester verilen ratlarda tek taraflı torsiyon-detorsiyon sonrası testiküler nitrik oksit seviyeleri. *Urol Res.*2000; Dec28(6):360-3
189. Darvesh A, Bishayee A. Chemopreventive and Therapeutic Potential of Tea Polyphenols in Hepatocellular Cancer. *Nutrition and Cancer:*2013; 65(3), 329–344
190. Darra E, Shoji K, Mariotto S. et al. Protective effect of epigallocatechin-3-gallate on ischemia/ reperfusion-induced injuries in the heart: STAT1 silencing flavonoid. *Genes Nutr.*2007; 2:307–310
191. Al-Maghrebi M, Renno W.M, Al-Ajmi N. Epigallocatechin-3-gallate inhibits apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from ischemia/reperfusion-induced inflammation; *Biochemical and Biophysical Research Communications.*2012;420;434–439
192. Al-Ajmi N, Al-Maghrebi M, Renno WM. (-)-Epigallocatechin-3-gallate Modulates the Differential Expression of Survivin Splice Variants and Protects Spermatogenesis During Testicular Torsion. *Korean J Physiol Pharmacol.*2013; Aug17(4):259-65.
193. Marina S. Figueiroa, Juliany S. B. et. Al. Green tea polyphenols inhibit testosterone production in rat Leydig cells, *Asian Journal of Andrology.*2009;11: 362–370.
194. Bryan T. Hennessy, Debra L. Smith, Prahlad T. Ram, Yiling Lu & Gordon B. Mills Exploiting The PI3K/AKT Pathway For Cancer Drug *Nature Reviews Drug Discovery.*2005;4, 988-1004

195. Steelman LS, Stadelman KM, Chappell WH, Horn S, et al. Akt as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*.2008;Sep;12(9):1139-65.
196. Catusus L, D'Angelo E, Pons C, Espinosa I, Prat J.Expression profiling of 22 genes involved in the PI3K-AKT pathway identifies two subgroups of high-grade endometriyal carcinomas with different molecular alterations. *Mod Pathol*.2010; May 23(5):694-702.
197. Goertz M,Wu Z,Gallardo T.et al.Foxo1 is required in Mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis. *J Clin Invest*.2011;121(9):3456–3466.
198. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, *et al*: AKT promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor *Cell*: 1999;857–868,
199. Paradis S, Ruvkun G: *Caenorhabditis elegans* AKT/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI 3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev*.1998;12:2488–2498,
200. Tang ED, Nunez G, Barr FG, Guan KL: Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by AKT. *J Biol Chem*.1999;274:16741–16746.
201. Khan N, Adhami VM, Mukhtar H. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Biochem Pharmacol*.2008;76(11):1333-9.
202. Ke B, Shen XD, Ji H, Kamo N, Gao F, Freitas MC, et al. HO-1- STAT3 axis in mouse liver ischemia/reperfusion injury: Regulation of TLR4 innate responses through PI3K/PTEN signaling. *J Hepatol*. 2012;56:359-366
203. Hua F, Ha T, Ma J, Li Y, Kelley J, Gao X, et al. Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J Immunol*.2007;178:7317-7324.
204. Zhang M,Zheng Y, Chen H.et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate protects rat myocardium against ischemia-reperfusion injury via activation of PI3K/AKT/FOXO3A/Bim pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*.2013;34:1386–1396
205. Andreucci M,Michael A,Kramers C.et al. Renal ischemia/reperfusion and ATP depletion/repletion in LLC-PK1 cells result in phosphorylation of FKHR and FKHL1. *Kidney International*.2003; Vol. 64 (pp. 1189–1198
206. Hongwei Zhang, Zhongyi Cui, Guangwei Luo, Jiaheng Zhang, Tao Ma, Na Hu, Tianpen Cui. Ghrelin attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice by activating the mTOR signaling pathway.*Int J Mol Med*.2013;Oct;32(4):851-9.

207. Parlaktas BS, Atilgan D, Ozyurt H, Gencten Y, Akbas A, Erdemir F, Uluocak N. The biochemical effects of ischemia-reperfusion injury in the ipsilateral and contralateral testes of rats and the protective role of melatonin. *Asian J Androl.*2013; Dec 19.
208. Karaguzel E, Sivrikaya A, Mentese A, Yulug E, et al. Investigation of tyrphostin AG 556 for testicular torsion-induced ischemia reperfusion injury in rat. *J Pediatr Urol.*2013;Sep 11. pi: S1477-5131(13)00219-2.
209. Bilommi R, Nawas BA, Kusmayadi DD, Diposarosa R, Chairul A, Hernowo BS. The effects of glutathione on malondialdehyde expression and seminiferous tubule damage in experimental testicular torsion-detorsion in Wistar rats. *J Pediatr Urol.*2013; Dec;9(6 Pt B):1059-63.
210. Wu KJ, Hsieh MT, Wu CR, Wood WG, Chen YF. Green Tea Extract Ameliorates Learning and Memory Deficits in Ischemic Rats via Its Active Component Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate by Modulation of Oxidative Stress and Neuroinflammation. *Evid Based Complement Alternat Med.*2012;163106
211. Chen CH, Manaenko A, Zhan Y, Liu WW, Ostrowki RP, Tang J, Zhang JH. Hydrogen gas reduced acute hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation in a focal ischemia rat model. *Neuroscience.*2010;Aug 11;169(1):402-14.
212. Inafuku H, Kuniyoshi Y, Yamashiro S, Arakaki K, Nagano T, Morishima Y, Kise Y. Determination of oxidative stress and cardiac dysfunction after ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts *Ann Thorac Cardiovasc Surg.*2013;19(3):186-94. Epub 2012 Aug 31