



T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA DENEYSEL TESTİS TORSİYONUNDAKİ İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARINDA GİNKGO BİLOBANIN LEYDİĞ VE
SPERM HÜCRELERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

EVALUATION OF THE EFFECTS OF GINKGO BILOBA ON SPERM
AND LEYDIG CELLS IN RATS WITH ISCHEMIA REPERFUSION
INJURY WITH EXPERIMENTALLY TESTICULAR TORSION

ÇİĞDEM BİÇER

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Fikret GEVREK

TOKAT-2016



T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA DENEYSEL TESTİS TORSİYONUNDAKİ İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARINDA GİNKGO BİLOBANIN LEYDİĞ VE
SPERM HÜCRELERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

EVALUATION OF THE EFFECTS OF GINKGO BILOBA ON SPERM
AND LEYDIG CELLS IN RATS WITH ISCHEMIA REPERFUSION
INJURY WITH EXPERIMENTALLY TESTICULAR TORSION

ÇİĞDEM BİÇER

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Fikret GEVREK

TOKAT-2016

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağımı gösterdiğimi beyan ederim.

(29/12/2016)

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı ve Soyadı

ÇİĞDEM BİÇER

İmzası

ÖZET

Testis torsiyonu genellikle puberte dönemi ve yeni doğanda görülen spermatik kordun kendi etrafında rotasyonu sonucu testisin kanlanması bozulması neticesinde testisin iskemiye gitmesi ile sonuçlanan ciddi acil bir durumdur. Torsiyon iskemik hasara, detorsiyon ise reperfüzyon hasarına yol açar. Bu çalışmadaki amacımız testis torsiyonu iskemi reperfüzyon hasarında Ginkgo bilobanın Leydig, sperm ve testiküler doku üzerine etkilerini araştırmaktır.

Çalışmamızda Wistar albino cinsi yetişkin 28 adet erkek sıçanlar her grupta 7 adet olacak şekilde kontrol, Egb 761 (ilaç grubu), tedavi ve torsiyon olmak üzere dört gruba ayrıldı. Torsiyon ve tedavi grubundaki sıçanlara deneysel testis torsiyonu yapıldı. Üç saatlik iskemi sonrası iki saat reperfüzyon sağlanarak testisler epididimisleri ile birlikte eksize edildi. Testislerden rutin histolojik takip sonrası elde edilen kesitler hematoksilin-eozin, immünohistokimya, TUNEL boyama sonrası mikroskopik olarak analiz edildiler. Epididimal spermeler ise diff-quick boyama sonrası morfolojik kriterler açısından değerlendirildi.

Torsiyonda testiküler doku histolojik hasarının artmış olduğu, tedavi grubunda hasarın kontrol lehinde azaldığı tespit edildi. Kontrol ve Egb 761 grubunda doku normal görünümde idi. Torsiyonda artmış olan apoptotik indeks tedavi ile azalmıştı. Torsiyonla azalmış olan Leydig hücre aktivitesi tedavi grubunda artmıştı. Sperm anomalileri de torsiyonla artmış tedavi ile azalmıştı. Leydig ve sperm hücrelerine ait parametrelerdeki iyileşmeler özellikle Egb 761 grubunda daha da belirgindi.

Bu sonuçlara göre Ginkgo bilobanın testiküler iskemi-reperfüzyon hasarında Leydig, spermatogenez ve sperm hücreleri için koruyucu ve tedavi edici olabileceğini söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Ginkgo biloba, Leydig, Sperm, Testis, Torsiyon

ABSTRACT

Testicular torsion is an emergency situation that results in testicular ischemia and deterioration of blood supply of testis do to rotation of spermatic cord around themselves generally seen in newborn and puberty period. Testicular torsion causes ischemic injury, detorsion causes reperfusion injury. In this study we aimed evaluation of effect of the Ginkgo biloba on Leydig, sperm and testicular tissues with experimentally testicular torsion and ischemia reperfusion injured.

28 adult male Wistar albino rats are divided into 4 groups as control, Egb 761, treatment, torsion 7 rats in each. Torsion and treatment rats were made experimentally testicular torsion. After three ours ischemia and for two ours reperfusion testicular tissues together epididymis were excised then routine histological procedures was performed. After these proces thin testicular tissue section slides were dyed with hematoxylin eosin, immunohistochemical and TUNEL technique then analyzed through light microscope. Epididymal sperm smears were dyed with diff-quick stain and then analyze morphologically.

Testicular tissues histological damages increased in torsion and mitigated in treatment group. In control and Egb 761 testicular tissue was in normal appears. Apoptotic index was higher in torsion than those in treatment. Leydig cell activity reduced in torsion increased in the treatment. Sperm anomaly was also seen to be increased in torsion and decreased in treatment group. Amelioration in Leydig and sperm cells was observed especially in the Egb 761 group.

According this finding we can state that Ginkgo biloba can be protective and curable effects on Leydig, sperm and spermatogenic cells in testicular torsion ischemia reperfusion injury.

Key words: Ginkgo biloba, Leydig, Sperm, Testis, Torsiyon

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin hem ders hem de tez aşamasında çok büyük katkıları olan ve tez çalışmamın tüm aşamalarını birlikte yaptığım, danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Fikret GEVREK'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Seda OCAKLI'ya ve yüksek lisans eğitimimde emeği geçen herkese,

Çalışmamızı destekleyen GOÜ BAP Başkanlığı ve personeline,

Her zaman her koşulda yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen ve sabırla eğitimimi tamamlamamı bekleyen anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ABSTRACT	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TABLolar LİSTESİ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.i
1. GİRİŞ ve AMAÇ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2. GENEL BİLGİLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.1. Testis Embriyolojisi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.2. Testisin Anatomisi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.3. Testisin Histofizyolojisi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4. Testis Histolojisi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4.1. Seminifer Tübüller	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4.1.1. Sertoli Hücreleri	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4.1.2. Spermatogonyumlar	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4.1.3. Primer ve Sekonder Spermatozoidler	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4.1.4. Spermatidler	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4.1.5. Spermatozoa	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4.2. İnterstisyel Doku.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4.2.1. Leydig Hücrelerinin Gelişmesi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4.2.2. Leydig Hücrelerinin Histolojisi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4.2.3. Miyoid Hücreler	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4.3. Spermatogenez.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.5. Testis Torsiyonu	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.6. İskemi ve Reperfüzyon.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.7. Ginkgo biloba (Egb 761)	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.8. TUNEL Tekniği.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.9. Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü).....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.9.1. Testiste Apoptozisin Rolü.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3. MATERYAL ve METOD	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

3.1. Materyal.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.1.1. Kimyasallar ve Ait Olduğu Kaynaklar	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.1.2. Kromojenler	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.1.3. Antikorlar, Ait oldukları Kaynaklar.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.1.4. Deney Aletleri ve Markaları	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2. Metod.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.1. Deneylede Kullanılan Örneklerin Elde Edilmesi ve Metod	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.2. Deneylede Kullanılan Solüsyonlar	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.3. Kullanılan Teknikler	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.3.1. Histokimya	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.3.2. İmmünohistokimya.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.3.3. TUNEL Prosedürü.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.3.4. Sperm Değerlendirmesi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.3. İstatistiksel Analiz	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4. BULGULAR	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.1. Histopatolojik Bulgular	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.2. Apoptotik Bulgular.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.4. Sperm Morfolojik Bulgular	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
KAYNAKLAR.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ.....	79

TABLOLAR LİSTESİ

- Tablo 2.7.1. Ginkgo biloba yapraklarının ana bileşenleri **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 3.1.1.1. Kimyasallar ve ait olduğu kaynaklar.....**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 3.1.2.1. Kromojenler**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 3.1.3.1. Antikorlar, ait oldukları kaynaklar.**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 3.1.4.1. Deney aletleri ve markaları**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 3.2.1.1. Doku takibi protokolü.**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 3.2.1.2. Diff-quick boyama protokolü.....**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 3.2.3.1.1. Hematoksilen eosin boyama protokolü. **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 3.2.3.1.2. Kruger strict kriterleri.....**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 3.2.3.1.3. Johnsen skorlama kriterleri**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 3.2.3.2.1. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 3.2.3.3.1. TUNEL boyama prosedürü.**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 4.1.1. Johnsen skorlaması ağırlıklı grup ortalama değerleri **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 4.2.1. Grupların ortalama apoptotik hücre indeksi değerleri **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 4.3.1. Grupların İHK boyanma şiddeti H-Skorları ortalama değerleri.....**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Tablo 4.4.1. Spermlerin Kruger strict morfoloji analizlerin grup ortalama değerleri ... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.4.1. Erkek üreme sistemi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 2.4.1.1. Seminifer tübüller.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 2.4.1.1.1.Seminifer tübülün enine kesiti.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 2.4.1.5.1. Spermatozoanın kısımları.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 2.9.1. Apoptozun şematik gösterimi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 2.9.2. Apoptozun iç ve dış yolakları	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.1.1. Kontrol grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.1.2. Egb 761 grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.1.3. Tedavi grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.1.4. Torsiyon grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.1.5. Johnsen skorlaması istatistik sonuçlarının grafiği.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.2.1. Kontrol grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.2.2. Egb 761 grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.2.3. Tedavi grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.2.4. Torsiyon grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.2.5. Apoptotik hücre indeksleri grup ortalama değerlerinin karşılaştırılmalı grafiksel görünümü.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.3.1. Kontrol grubu LH immün ekspresyonu	58
Şekil 4.3.2. Egb 761 grubu LH immün ekspresyonu	58
Şekil 4.3.3. Tedavi grubu LH immün ekspresyonu	59
Şekil 4.3.4. Torsiyon grubu LH immün ekspresyonu	59
Şekil 4.3.5. Grupların İHK boyanma şiddeti H-Skorları ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırılması.....	60

Şekil 4.4.1. Kontrol grubu sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü	63
Şekil 4.4.2. Egb 761 grubu sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü	63
Şekil 4.4.3. Tedavi grubu sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü	64
Şekil 4.4.4. Torsiyon grubu sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü	64
Şekil 4.4.5. Grupların anomalili sperm yüzdesinin grafiksel olarak karşılaştırılması.....	65

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABP: Androjen Bağlayıcı Protein
AMH: Antimüllerian Hormon
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
BSA: Bovine serum albümin
cAMP: Siklik adenozin monofosfat
DAB: Diaminobenzidine
DER: Düz endoplazmik retikulum
DNaz: Deoksiribonükleaz
Egb 761: Ginkgo biloba ekstraktı
FSH: Foliküler stimüle hormon
hCG: İnsan koryonik gonadotropin hormonu
HE: Hematoksilen eozin
ICAD: İnaktif kaspaz aktive edici DNaz
İHK: İmmünohistokimya
LH: Luteinizan Hormon
MIF: Müllerian inhibitör faktör
NGF: Nerve growth faktör
PAS: Periyodik asit schiff
PAF: Platelet aktive edici faktörü
PBS: Phosphate buffered saline
P53: tümör protein 53
ROS: Reaktif oksijen radikalleri
SOR: Serbest oksijen radikalleri

StAR: Steroidogenik akut regülatör protein

TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz

TNF: Tumor necrosis factor receptor

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transpherase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling

WHO: Dünya Sağlık Örgütü



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Testis torsiyonu, testisin iskemik kalmasına neden olan ve birkaç saat içerisinde acil cerrahi müdahale gerektiren bir durumdur. Testiküler torsiyon; spermatik kordun kendi eksenini etrafında dönmesi sonucunda testise kan akımının engellenmesi ile oluşmaktadır (Rowe ve ark., 1995). Testis torsiyonu sonucunda bir takım androlojik sorunlar ortaya çıkabilir. Bunlardan en önemlisi ve en çok bilineni erkek infertilitesidir. Testis torsiyonu genellikle çocuklarda ve ergenlerde daha sık görülmektedir (Akgül ve ark., 2008). Ancak yapılan çalışmalar sonucunda testis torsiyonu olan bütün vakaların yaklaşık %39'unun yetişkinlerde olduğu tespit edilmiştir (Cummings ve ark., 2002).

Testis torsiyonu ve detorsiyonu aslında bir iskemi reperfüzyon olayıdır. İskemi esnasında; oksijen miktarının metabolik gereksinimlere göre düşük oranlarda bulunması, hücresel enerji depolarında azalması ve toksik metabolitlerin birikiminin sonucunda germ hücrelerinin ölümü gerçekleşir (Moilgner ve ark., 2006). Bu sürecin ilerlemesi ile spermatogenezin bozulmasını takiben toksik moleküller dolaşıma katılmaktadır. Torsiyon esnasında testiste perfüzyonun azalması durumu söz konusudur. Reperfüzyon sonrasında ortamda meydana gelen serbest oksijen radikalleri (SOR) aracılığıyla gelişen iskemi-reperfüzyon hasarında testiküler doku yıkımı çok ilerlemektedir (Akgül ve ark., 2008).

Testisler, SOR hasarına karşı oldukça duyarlı organlardır. Torsiyonda ortaya çıkan SOR mitokondri ve hücre membranının yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyonu sonucu membran geçirgenliğinin artmasına ve membran bütünlüğünün bozulmasına sebep olur. Oksidatif stres, normal sperm üretimine ve sperm fonksiyonunda bozulmaya neden olur.

Testiküler iskemi, kan-testis bariyerini bozabilir ve kontralateral testiste kendi spermatogonyumlarına karşı otoimmünizasyon açısından potansiyel riske maruz bıraktığına dair kanıtlar vardır (Harrison ve ark., 1981). İskemik testiste zarar görmüş

sperm hücreleri ve tübüllerin bazal membranı antijen gibi davranmakta, bunlara karşı oluşan otoantikolar diğer testisin hasarlanmasına sebep olmaktadır (Ringdahl ve Teague, 2006). İskemi sonucu oluşan germ hücre hasarı daha da artar. İskemi ve reperfüzyon sırasında artmış olan serbest radikaller antioksidanlar sayesinde organizma tarafından uzaklaştırılmaktadır. Testiste meydana gelen iskemi-reperfüzyon hasarı SOR'ları tutucu antioksidan ilaçlarla iyileştirilebilir (Çakan ve ark., 2007).

Hem ipsilateral hem de kontralateral testisler iskemik reperfüzyona bağlı oksidatif hasara maruz kalmakta ve germ hücreleri apoptozis yoluyla ölmektedir. Bu olayları yönlendiren mekanizmaların anlaşılması için testisin histolojik ve fonksiyonel yapısı hakkında detaylı bilgiye ihtiyaç vardır (Moilgner ve ark., 2006).

Testiküler torsiyon olgularında tedavinin başarılı olabilmesi için patolojik mekanizmaların anlaşılması ve bunu yönlendiren moleküler araştırmalar ile iskemik hasarın testiküler dokuda görülmesinden sonra ilerleyen aşamalarda ne gibi durumlara sebep olabileceği ile ilgili bilgiler elde edilecektir (Nguyen ve ark., 1999).

Testis torsiyonu sonrasında spermatogenezde %36-39 olguda bozulma görülmektedir. Uzun sürede sadece %5-50 oranında sperm sayıları normale dönebilmektedir. Testis torsiyonunun tedavisinde başarı tanının erken konmasına ve en hızlı biçimde cerrahi olarak torsiyonunun kaldırılarak her iki testisin skrotuma uygun biçimde fiks edilmesiyle sağlanmaktadır (Akbal ve Şimşek, 2007).

Seminifer tübülüste olgun spermin yaşam süresi 5-7 gündür. Testis torsiyonu neticesinde meydana gelen iskemik hasarda infertilite beklenen bir sonuçtur. Testiküler torsiyon sonucunda vakaların %36'sında sperm sayısı 20 milyon/ml'nin altındadır. Son çalışmalarda hasarlı testise ek olarak antisperm antikor oluşumuna bağlı olarak diğer testisin de hasar gördüğü ortaya konmuştur (Hsiao ve ark., 2015).

Ginkgo biloba ekstraktı, Ginkgo biloba ağacının yeşil yapraklarından elde edilen quercetin, rutin ve kaempferide gibi flavanoidler ve terpenoid maddeler içeren aktif bileşiklerin standardize edilmiş olan bir karışımıdır (Wang ve ark., 2008). Ginkgo biloba bitkisinin yaprakları Çin de bitkisel ilaç olarak binlerce yıldır kullanılmaktadır. Son zamanlarda bu yapraklardan iki ana fonksiyonel bileşenleri içeren standart kimyasal bir ürün farmakolojik olarak hazırlanmıştır. Ginkgo biloba (Egb 761) özü yaygın olarak antioksidan ve anti-apoptotik özelliklerinden dolayı çok sayıda sinir sistemi hastalıkları, dolaşım hastalıkları ve hafıza kaybı hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Ginkgo bilobanın koruyucu etkileri: diyabetik kalp, karaciğer ve böbrekte ortaya konmuştur (Akgül ve ark., 2008). Ginkgo biloba, Alzheimer hastalığı ve bilişsel bozukluk tedavisinde de kullanılmaktadır. Ginkgo biloba ekstresi olan Egb 761 serbest radikal uzaklaştırıcı aktiviteye sahip bir bileşiktir (Yeh ve ark., 2009). Testis dokusunda torsiyon kaynaklı apoptoz ve histopatolojik durumlarda antioksidan olan Egb 761'in etkisini incelemeyi tasarladık.

Spermatogenik hücreler iskemiye duyarlı iken Leydig hücreleri iskemiye daha dayanıklıdır. Gebeliğin yaklaşık 15. gününde rat Fetal Leydig hücreleri görünür ve testosteron salgılamaya başlar (Niemi ve ark., 1980). Leydig hücrelerinin aktif androjen üretimi erken başlar ve normal erkeksi farklılaşması için esastır. Fetal testis faaliyeti yenidoğan döneminde kadar devam eder ve prepubertal testis karakteristik hormonal durgunluk takip eder. Testis endokrin aktivitesi ikinci aşaması ergenlik ile başlar ve yaşam boyu devam eder. Leydig hücrelerinin iki farklı popülasyonu ya da büyüme fazları testiküler steroidogenezisin fetal-neonatal ve yetişkin dönemlerinden sorumludur. İlk büyüme fazı fetal ve daha sonraki büyüme fazı ise yetişkin Leydig hücreleri olarak isimlendirilir. Ayrıca, testiküler androjenler fetus ve yetişkinde çok farklı fizyolojik

işlevlere sahiptir. Karakteristik ve fetal Leydig hücreleri için özgün yetişkin kişilerce karşılaştırıldığında, yeni doğan testiste varlıklarını sonuna doğru ilk görünüşü sürekli yapısal ve işlevsel değişiklikler vardır. Doğumdan sonra, fetal tip Leydig hücreleri yaklaşık ergenlik başlangıcı dönemlerinde yavaş yavaş yetişkin tipleri ile yer değiştirene kadar fonksiyonlarına devam eder (Huhtaniemi ve Pelliniemi, 1992). Yetişkin sıçan testisinde, Leydig hücre çoğalması yok denecek kadar azdır (Teerds ve ark., 1999).

Leydig hücrelerinin ve Sertoli hücrelerinin farklılaşabilmesi ve normal gelişimini devam ettirebilmesi için gonodotropinlere (Lutein hormon (LH) ve foliküler stimulan hormon (FSH)) ihtiyacı vardır (Christensen, 1975). LH Leydig hücrelerini etkilemesiyle normal spermatogenik seri hücrelerin gelişmesi için gereken testosteron yapımını uyarır. LH, etkisini Leydig hücreleri üzerinde bulunan LH reseptörü aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Bu hormonal aksta her hangi bir olumsuzluğa neden olabilecek torsiyon gibi iskemik durumlar sperm yapımını ve dolayısıyla fertilitiyi de ilgilendirecek bir takım olumsuzluklara neden olabilecektir.

Çalışmamızda testis torsiyonunda iskemi-reperfüzyon hasarında Ginkgo bilobanın Leydig hücreleri ve sperm aktivitesini koruyucu ve tedavi edici etkilerini belirlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Embriyolojisi

Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti sekonder oositi dölleyen spermin türüne göre fertilizasyon sonucunda ortaya çıkar. Her iki cinsiyetin gonadları da gebeliğin yedinci haftasından önce aynıdır ve farklılaşmamış gonadlar olarak isimlendirilirler. Gonadların farklılaşmaları XX, XY kromozom kompleksine bağlıdır ve gebeliğin yedinci haftasında erkek veya dişi olacağı belli olur (Şeftalioğlu, 1998). Gonadlar; mezotelyum (posterior abdominal duvarı döşeyen mezodermal epitelyum), mezenşim (mezotelyum altındaki embriyonik bağ dokusu), primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç embriyonel kaynaktan köken alırlar (Moore, 2002).

Primordiyal gonadın mezenşimal kısmı insan embriyosunun 10–12 dorsal segmentleri arasından gelişmektedir. Primordiyal germ hücreleri ise gelişimin üçüncü haftasında yol kesesi duvarında endoderm hücreleri arasında ve allantoise yakın bir yerde ortaya çıkmaktadır. Amibik hareketler ile son barsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerler, beşinci haftanın başında ise primitif gonadlara ulaşır. Altıncı haftada ise genital kıvrımlara tamamen yerleşirler. Sonuç olarak henüz farklılaşmamış gonad gebeliğin altıncı haftasında ortaya çıkmaktadır (Moore, 2002; Langman, 1996).

Genetiği XY olan bir embriyoda primitif germ kordonları Y kromozomu üzerindeki testis belirleyici faktör etkisiyle gebeliğin yedinci haftasının başında hızla çoğalırlar. Sonrasında bu kordonlar testis veya meduller kordonları oluşturmak üzere gonadın medulla bölgesini doldururlar. Bu kordonlar gonadın hilus bölgesinde ince ve küçük kordonlara parçalanıp ağ şeklini alarak rete testisi oluştururlar. Gelişme dönemi ilerledikçe testis kordonları testisin üzerinde yer alan tunika albuginea aracılığıyla yüzey epiteliyle olan

bağlantılarını kaybederler. Kordonlar puberte dönemine kadar kapalıdır. Bu dönemde lümen oluşarak seminifer tübüller ortaya çıkar. Seminifer tübüller rete testisin lümenine bağlanarak duktuli efferentes ile devam ederler. Bunlar ise Wolff kanalına dökülerek duktus deferens oluştururlar (Moore, 2002; Petorak, 1986). Başlangıçta lomber bölgesinde bulunan testisler, üçüncü aydan itibaren skrotuma doğru inişe geçerler. Leydig hücreleri ise 8–18. haftalar arasında interstisyel dokudaki mezenşimal hücrelerin değişimi sonucu ortaya çıkar. Gebeliğin ortalarına gelindiğinde, testisin %50'sini bu hücreler oluştururken doğuma doğru sayıları giderek azalır (Petorak, 1986). Leydig hücreleri testosteron ve andosteronu 8. haftadan itibaren salgılamaya başlarlar. Bu hormonlar mezonefrik duktusların ve dış genitalerin maskülin farklılaşmasını uyarırlar. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu testosteron üretimini stimüle eder ve hormon miktarını 8–12 haftalık periyotta en yüksek değerine ulaştırır. Fetal testisler antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör faktör (MIF) olarak da adlandırılan hormonu da salgılamaktadır. Sertoli hücreleri antimüllerian hormonu salgırlar. Hormonun salınması puberte dönemine kadar devam eder ve daha sonra seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik duktusların gelişimini baskırlar.

Seminifer tübüller puberte dönemine kadar solid bir şekilde kalırlar ve puberteyi takiben lümen gelişir. Seminifer tübül duvarında Sertoli hücreleri ve spermatogonik hücreler olmak üzere iki tip hücre bulunur. Testisin yüzey epiteli Sertoli hücrelerine farklırlar. Primordial sperm hücreleri olan spermatogonya, primordiyal germ hücrelerinden farklırlar. Fetal testiste, seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri çoğunluğu oluşturur. Sonraki gelişme esnasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktusları oluşturan 15–20 adet

mezonefrik túbüllerle devam ederler ve duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktusla bağlanırlar (Moore, 2002).

2.2. Testisin Anatomisi

Funikulus spermaticusa asılı durumda bulunan testisler; bir çift olup skrotum içinde bulunurlar. Testisin ön tarafı, her iki yüzü ve uçları düz ve konveks olup periton denilen bir örtü ile kaplıdır. Arka kenarın ise sadece lateral kısmı periton ile kaplıdır. Medial kısma epididimis bağlanır ve bu kısımdan damar, sinir ve kanallar geçer. Testisteki damar ve sinirler septalar aracılığıyla interstisyuma ulaşırlar. Testiküler lobüllerden her biri kıvrımlı 1- 4 adet túbül yapısı içerir. Bu túbüller kör bir uç ile başlayıp mediastinum testise kadar ulaşırlar. Her bir seminifer túbül 150–250 mm çapında olup 30–70 cm uzunluğuna sahiptir. Seminifer túbüller yaklaşık olarak testisin %66 kadarını oluştururlar. Erişkin bir erkek testisinin ağırlığı yaklaşık olarak 12 gr ve hacmi 15–20 ml'dir. Testisler yaklaşık olarak 4,5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve yaklaşık 30 gr ağırlığındadır.

Tunika albuginea testisi saran mavimsi beyaz renkli fibröz bir tabakadır. Tunika albugineanın hemen altında tunika vaskuloza denilen damar ağı tabakası vardır. Tunika albugineadan başlayan çok sayıda trabekül ve septalarla testis 200–300 adet lobüle ayrılır. Her lobülde 1–4 adet seminifer túbül vardır. Seminifer túbüller, rete testis denilen kanal sistemine açılırlar. Mediastinum testisin üst bölümünde rete testis sayıları yaklaşık olarak 10–15 olan kanallar şekline dönüşür. Daha sonra tek bir kanal olan epididimal kanal haline alır. Testisin arteriyal kanlanması, aortanın ventral yüzünde renal arterlerin 2–3 cm altından çıkan bir çift testiküler arter tarafından sağlanır. Spermatik kordla beraber seyreden testiküler arter daha sonra birkaç dala ayrılır. Testisin esas kanlanmasının testiküler arter tarafından sağlanmasına rağmen bu arterle kremasterik, vazal ve epididimal

arterler arasında çok sayıda anastomoz vardır. Testis ve epididim venleri öncelikle funikulus spermaticusu bir ağ şeklinde saran plexus pampiniformisi, daha sonrasında birbirleriyle birleşerek testiküler veni meydana getirirler. Sağ tarafta bulunan testiküler ven vena cava inferiora dökülürken; soldaki vena renalis ise sinistraya açılır. Kollateral venöz drenajı eksternal pudental ven, posterior skrotal ven ve kremasterik ven ayarlar.

Testisteki lenfatik drenaj testiküler vene paralel olarak paraaortik lenf nodlarına dökülür. Testisin innervasyonu esas olarak sempatik postganglionik ve visseral afferent liflerle olur. Lifler genellikle damar yapılarına paralel seyrederek Testise kadar ulaşan sinir tunika albuginea seviyesinde dallara ayrılarak interlobüler septayı innerve eder (Arıncı ve Elhan, 1995).

2.3. Testisin Histofizyolojisi

Spermatogenez vücut sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda oluşur ve spermatogenezin düzenlenmesinde ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35°C'dir, bu birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Pampiniform plexus her bir testiküler arterin etrafını sarar ve testiküler ısının devam ettirilebilmesi için bir karşı ısı akımı sağlar. Diğer faktörler ise skrotumdaki terin buharlaşması sonucunda ısı kaybı ve spermatik kordondaki kremaster kaslarının kasılmasıyla birlikte testislerin daha yüksek ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir.

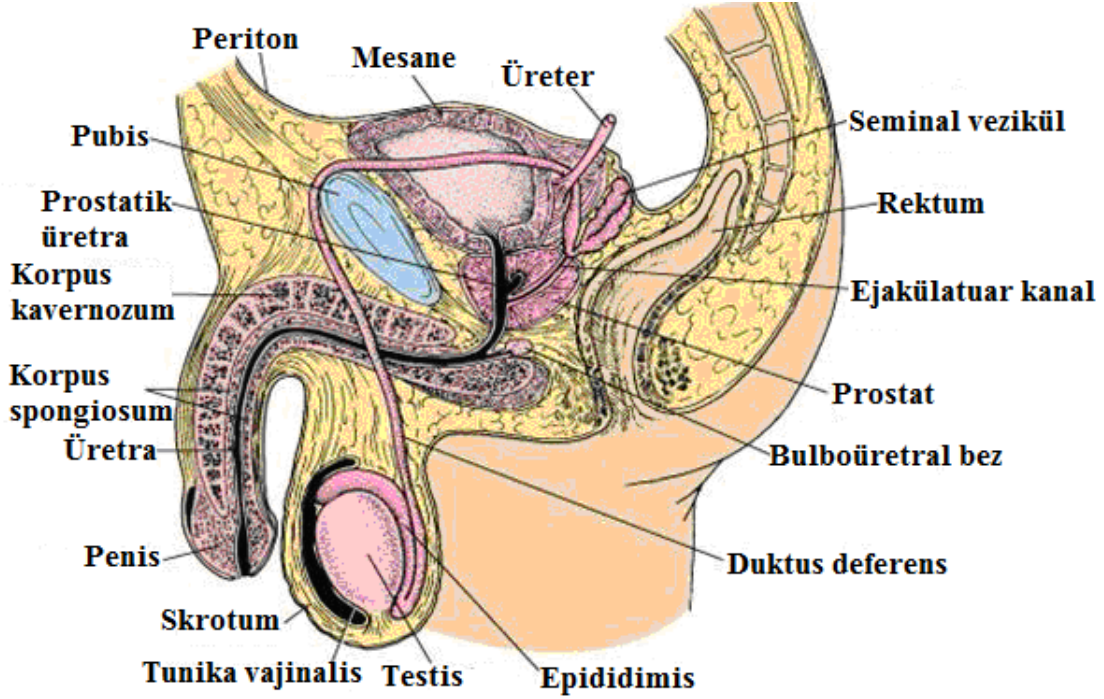
Spermatogenezde en önemli etkiyi endokrin faktörler meydana getirirler. Spermatogenez, hipofizin FSH ve LH'nin testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH interstisyel hücrelere etki ederek spermatogenez hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder. FSH ise Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını stimüle eder ve sonucunda cAMP'nin artışına sebep olur ve aynı zamanda

androjen bağlayıcı protein'in (ABP) sentez ve salgılanmasını sağlar. Androjen bağlayıcı protein testosteron ile bağlanır ve testosteronu seminifer tübüllerin lümenine kadar taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır, östrojen ve progesteronlarla inhibe edilir.

Spermatozoonlar, uygun bir medyum olan testiküler sıvı içerisinde epididimise kadar taşınırlar. Bu testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir ve bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteron ile birleşmiş ABP içermektedir (Janqueria ve ark., 1998).

2.4. Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi; testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmaktadır (Şekil 2.4.1). Testis spermatozoonları ve testosteronun sentezini sağlar. Testis, tunika albuginea olarak adlandırılan kalın bir kollajen bağ dokusuyla kaplıdır. Testisin arka tarafında tunika albuginea kalınlaşarak mediastinum testisi meydana getirir. Bezin içerisine giren fibröz septalar bu yapıyı testiküler lobüller denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırır. Her bir lobülde gevşek bağ dokusuyla sarılı 1–4 adet seminifer tübül bulunur. Gevşek bağ dokusunda bol miktarda kan ve lenf damarı, sinir ve Leydig bulunur. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olarak adlandırılan spermatozoaları üretirler. Leydig hücreleri ise testiküler androjenleri salgırlar (Janqueria ve ark., 1998).



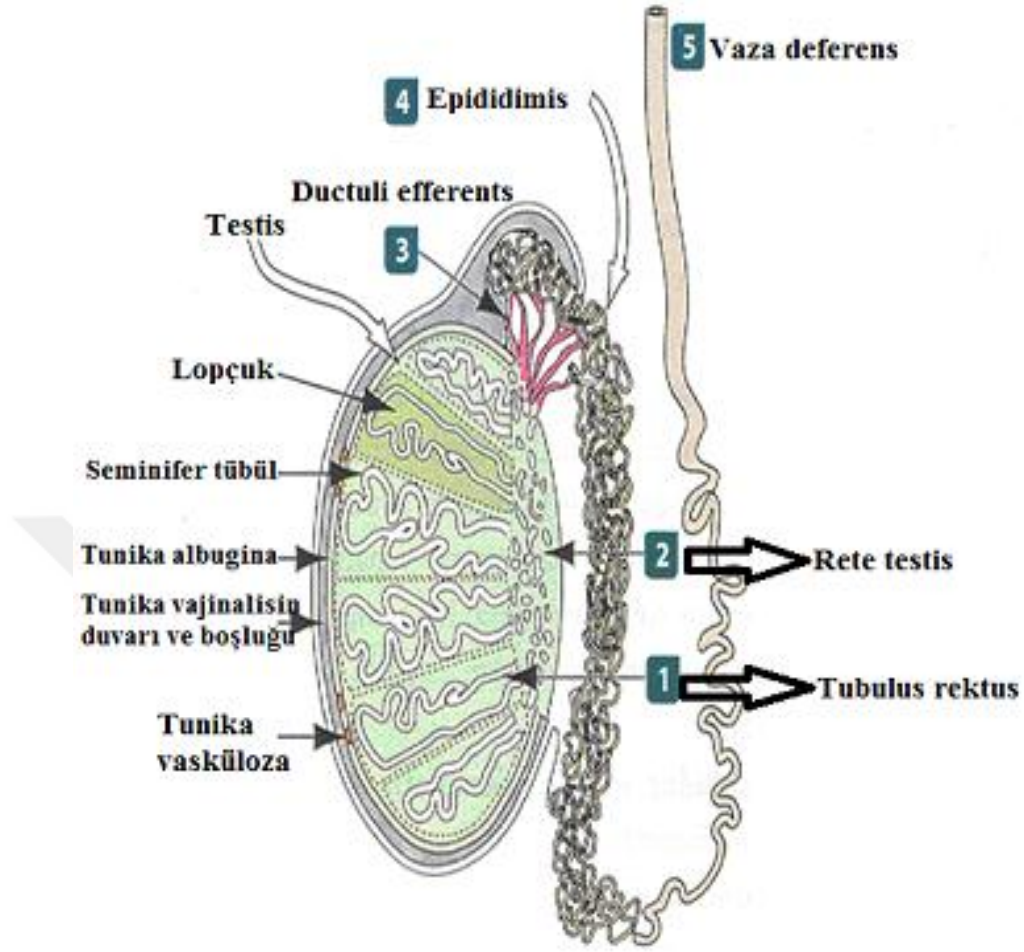
Şekil 2.4.1. Erkek üreme sistemi (Ross, 2006)

2.4.1. Seminifer Tübüller

Her bir seminifer tübül çok katlı epitel ile döşeli, yaklaşık 150–250 µm çapında ve 30–70 cm uzunluktadır. Testisteki seminifer tübüller kör uçludur ya da dallara ayrılırlar. Her bir tübül sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller veya tubuli rekti denilen kısa segmentler halinde devam ederler. Düz tübüller, rete testisin seminifer tübüllere bağlanmasını sağlarlar (Şekil 2.4.1.1). Rete testis, 10–20 duktus efferentes aracılığıyla epididimin baş tarafına bağlanmıştır.

Seminifer tübüller fibröz bağ dokusu kılıfı ile belirgin bir bazal lamina ve seminifer epitelden meydana gelir.

Tunika propria seminifer tübülü çevreleyen fibroblast katmanlarından meydana gelmiştir. Bazal laminaya birleşik olarak bulunan en içteki katman düz kas özellikleri sergileyen yassılaştırmış miyoid hücrelerden oluşur.



Şekil 2.4.1.1. Seminifer tübüller(Kierszenbaum, 2006)

Seminifer tübülün epiteli; Sertoli hücreleri ve spermatogenik seriyi oluşturan hücreler olmak üzere iki farklı hücre çeşitinden meydana gelmiştir. Spermatogenik seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduran 4–8 tabaka halinde oluşmuşlardır. Bu hücre tipleri, belirli sayıda bölünmelerden sonra farklılaşarak spermatozoayı oluştururlar. Bunlar erkek germ hücrelerinin devamlı farklılaşma sürecindeki farklı evrelerini temsil ederler (Janqueria ve ark., 1998).

2.4.1.1. Sertoli Hücreleri

Spermatogenik serideki hücreleri kısmen saran uzamış piramidal hücrelere Sertoli hücreleri denilmektedir. Sertoli hücrelerinin taban kısımları bazal laminaya oturur, apikal uçları ise seminifer tübül lümenine kadar uzanır. Sertoli hücrelerinin sınırları ışık mikroskopunda belirsiz olarak görülür. Çünkü bunların spermatogenik seri hücrelerini saran çok sayıda lateral uzantıları bulunmaktadır. Elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalarda hücrelerin bol miktarda düz endoplazmik retikulum, bir miktar granüllü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi kompleksi ve bol miktarda mitokondri ile lizozom içerdiği tespit edilmiştir. Genel olarak üçgen şeklinde olan uzamış çekirdekte çok sayıda kıvrılmalar, belirgin bir nukleolus ve az miktarda heterokromatin görülür. Sertoli hücreleri seminifer tübüllerde yan yana dururlar ve spermatogonyumlar seviyesinde sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır (Şekil 2.4.1.1.1). Bu sıkı bağlantılar seminifer epiteli bazal ve adluminal kompartman olmak üzere iki kısma ayırır. Spermatogonyumlar, kanda bulunan materyallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmana yerleşirler. Spermatogenez esnasında spermatogonyum serisi, sıkı bağlantılardan bir yolunu bularak geçerler ve adluminal kompartmana çıkarlar. Spermatogenezin daha ileri safhaları, kandan gelen ürünlerden kan-testis bariyeri sayesinde korunurlar. Kan-testis bariyeri Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarla oluşturulur. Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilere spermatositler ve spermatidler yerleşmişlerdir. Spermatidlerin kuyrukları geliştikçe bunlar Sertoli hücrelerinin apikal uçlarından çıkan püsküller şeklindeki çıkıntılar halinde görülürler. Sertoli hücreleri gap junction olarak adlandırılan bağlantılarla ilişki kurarlar ve bu bağlantılar sayesinde de hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır.

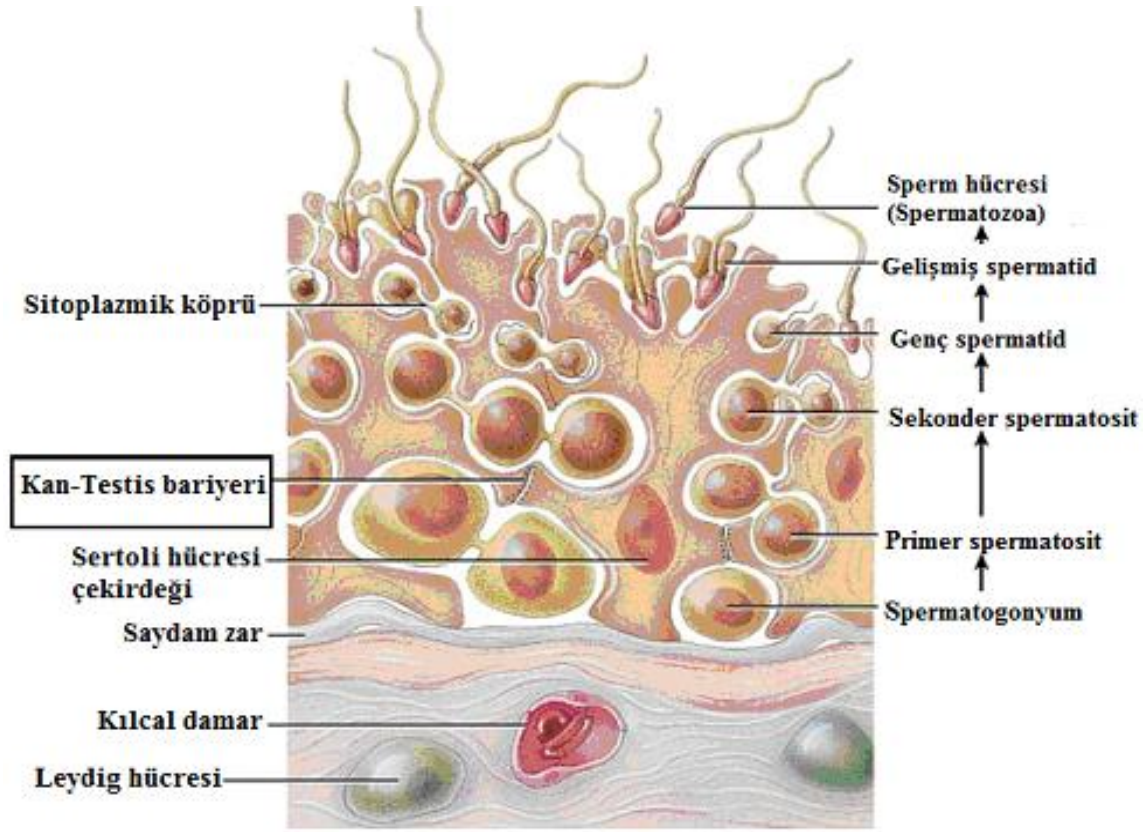
Sertoli hücrelerinin çok önemli dört fonksiyonu vardır:

Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmelerinin düzenlenmesi: Spermatisitler, spermatidler ve spermatozoonlar kan testis bariyerinden dolayı kan desteğinden mahrum olduğu için bu spermatogenik seri hücreler besin maddelerini ve metabolitleri alıp vermesinde Sertoli hücrelerinin aracılığına muhtaçtırlar.

Fagositoz: Spermiyogenez esnasında oluşan fazla spermatid sitoplazmaları artık cisimcikler şeklinde atılırlar. Sertoli hücrelerindeki lizozomlar sitoplazmik cisimcikleri fagosite ederler ve sindirirler.

Sekresyon: Sertoli hücreleri devamlı olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgırlar. ABP salgılanması Sertoli hücreleri aracılığıyla FSH ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. ABP, seminifer tübül içerisinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiol haline çevirebilirler. Bu hücreler, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin denilen bir peptid salgırlar.

Anti-Müllerian Hormon üretimi: AMH embriyonik gelişme esnasında erkek fetusta Müller kanalların gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise Wolf kanallarından köken almış yapıların gelişmesini sağlar.



Şekil 2.4.1.1.1. Seminifer tübülün enine kesiti (Gartner, 2011).

Sertoli hücreleri insanda ve hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Sertoli hücreleri özellikle kötü beslenme, enfeksiyon, x-ışını ışınımı gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdır. Bu zararlı etkiler karşısında Sertoli hücreleri spermatogonik seri hücrelerine göre çok daha dirençlidir. Memelilerde spermatozoonların salınımı hücre hareketleri ile gerçekleşir. Bu hücre hareketleri Sertoli hücrelerinin apesinde bulunan mikrotübüller ve mikrofilamentler sayesinde gerçekleşir (Janqueria ve ark., 1998).

2.4.1.2. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar 12 µm çapında bazal laminaya yerleşmiş germ hücreleridir. Bu hücreler nispeten küçüktür ve nükleusları az boyanmış kromatinler içermektedir. Seksüel

olgunlaşma sırasında spermatogonyumlar bir seri mitoz geçirirler. Yeni oluşan hücreler iki şekilde farklılaşabilirler. Bir ya da daha fazla mitotik bölünmeden sonra farklılaşmamış kök hücreler olan tip A spermatogonyumları veya süregelen mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip A spermatogonyumlar spermatogenik seri hücrelerinin kök hücreleridirler. Tip B spermatogonyumlar ise primer spermatositlere farklılaşan progenitor hücrelerdir (Janqueria ve ark., 1998).

2.4.1.3. Primer ve Sekonder Spermatositler

Primer spermatositler tip B spermatogonyumların en son mitotik bölünmesinin ardından ortaya çıkan yavru hücreler olup DNA sentezlerler (S fazı), G2 fazına ilerlerler ve $4n$ kromozom içerikleri ile birinci mayoz bölünmeye başlarlar. Birinci mayoz bölünme profaz olarak adlandırılan ve 10 gün süren bir safha ile karakterizedir. Spermatositler adluminal kompartmanda kan-testis bariyerinin hemen üzerine yerleşmişlerdir. Mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içerisinde gerçekleşir. Birinci mayoz bölünme uzun sürdüğü için primer spermatositler seminifer tübüllerde daha fazla görülen hücrelerdir ve spermatogenik serinin en büyük hücreleridirler.

Sekonder spermatositler küçük hücrelerdir ve histolojik kesitlerde gözlemlenmesi zordur. Sekonder spermatositler kısa bir sürede interfaz aşamasına girerler ve belirgin bir DNA sentezi olmayan ikinci mayoz bölünmeyi geçirirler (Kierszenbaum ve ark., 2006).

2.4.1.4. Spermatidler

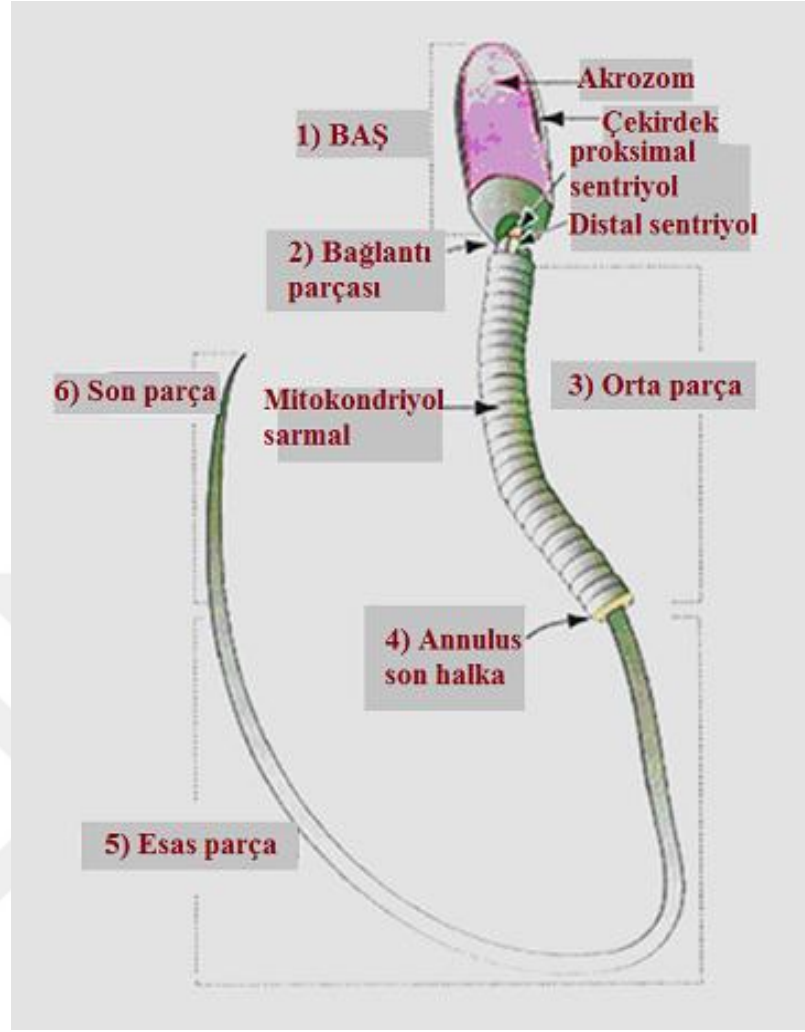
Sekonder spermatositlerin bölünmesi ile oluşan hücreler spermatidler olarak adlandırılırlar. En olgun spermatogenik hücreler spermatidlerdir. Spermatidler, küçük olup

yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan nükleusları ve seminifer tübüllerde lümen yakınında yerleşmeleri ile kolayca tanınırlar. Spermatidlerin metabolik ihtiyaçları Sertoli hücreleri tarafından sağlanır.

Sekonder spermatositler ikinci bir mayoz bölünme geçirerek haploid kromozomlara sahip olan spermatidleri oluştururlar. Spermatidler erken dönemlerde küçük, küresel şekilli hücrelerdir. Nükleusları ince kromatinlidir, arada yoğun kromatin yumakları vardır. Nükleus kısa bir süre içerisinde daha da küçülür. Sitoplazmada dağınık bir halde düz endoplazmik retikulum, küçük ve perifere dizili, yuvarlak, kristası belirgin olmayan mitokondriyumlar ve iyi gelişmiş golgi kompleksi görülür. Granüllü endoplazmik retikulum ise azdır. Mitokondriyumlar küçüktür ve hücre zarı altında dizilmiş olup spermatid sitoplazmasının tanınmasını kolaylaştırır. Spermatid olgunlaşması sırasındaki değişiklikler türlere göre farklılıklar gösterebilir genel özellikleri açısından benzerdirler (Kierszenbaum ve ark., 2006).

2.4.1.5. Spermatozoa

Spermatidler bir hücre farklılaşma süreci geçirerek spermatozoonları oluştururlar. Spermatozoa olgun bir germ hücresidir. Baş, kuyruk ve bağlantı parçası olmak üzere üç kısımdan oluşur. Kuyruk ise esas parça, orta parça ve son parçadan meydana gelmiştir. Spermin baş tarafında yassılaştırmış çekirdeğin ön yarısını akrozom kaplar. Döllenme esnasında oositi çevreleyen zona pellusida ve korona radyata hücrelerini aşması için gerekli hidrolitik enzimleri içerir. Bağlantı parçası, çekirdeğe tutunmayı sağlayan proksimal sentriyol ve aksoneme kaynaklık eden distal sentriyolden oluşmuştur. Baş ve kuyruk kısımları birbirlerine bağlantı parçasıyla bağlanmıştır (Şekil 2.4.1.5.1).



Şekil 2.4.1.5.1. Spermatozoanın kısımları (Kierszenbaum, 2006)

Kuyruğun orta kısmında iki sarmal şekilde dizilmiş mitokondriyon kılıfı bulunur. Mikrotübüller, 9+2 biçiminde aksonem kuyruğun merkezine yerleşmiştir. Aksonem ile mitokondriyal kılıf arasına 9 adet filamandan oluşmuş dış yoğun lifler yerleşmiştir. Kuyruğun esas parçası; en uzun parça olup annulustan oluşur ve mitokondriyon kılıfı yoktur. Esas parça; yedi dış yoğun lifler, fibröz bir kılıf ve merkezi aksonemden oluşmuştur. Son parça ise sadece plazma membranı ile çevrelenmiş 9+2 biçiminde mikrotübüler aksonem içerir (Ross ve ark., 2011; Janqueria ve ark., 1998).

2.4.2. İnterstisyel Doku

İnterstisyel doku, testis dokusunun yaklaşık %25-30'unu oluşturur. Seminifer tübüller arasında kalan interstisyel doku içerisinde fibroblastlar, kollajen lifler, kan ve lenf damarları, sinir lifleri, makrofajlar, mast hücreleri ve Leydig hücreleri bulunmaktadır. Mediastinum kısmından içeri giren kan damarları ve sinirler tekrar mediastinumdan çıkarlar. Leydig hücreleri, interstisyumda yer alır ve vakuollü bir görünüme sahip olup bazen iki çekirdek içerebilmektedir. Leydig hücrelerinin çekirdeğinin içerisinde belirgin bir çekirdekçik görülür. Leydig hücrelerinin sitoplazması içerisinde çubuk şekilli protein yapısında olan Reinke kristalleri bulunabilir. Ayrıca Leydig hücrelerinin sitoplazması lipid damlacıkları yönünden de zengindirler. Elektron mikroskopisinde Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında iyi gelişmiş düz endoplazmik retikulum ve tübüler tip krista içeren mitokondriyonlara yaygın olarak rastlanmaktadır (Kayalı, 1989; Sternberg, 1992).

2.4.2.1. Leydig Hücrelerinin Gelişmesi

Leydig hücreleri testisin testosteron üreten hücreleridir. Leydig hücreleri, gonadal kabarıklığın mezenşiminden köken alırlar (Langman, 1996; Şeftalioğlu, 1998). Leydig hücreleri iki farklı tiptir. Fetal tip Leydig hücreleri, fetal ve neonatal yaşam süresince primer seks karakterlerinin oluşmasından sorumludur. Sonrasında pubertal döneme ait özelliklerden sorumlu olan yetişkin tip Leydig hücreleri oluşmaktadır.

İlk fetal Leydig hücrelerinin gelişimi; testisin şekillenmesini takip eder ve nispeten daha da geç farklılaşırlar. Gonadlarda ilk olarak tanımlanabilecek olan yapı histolojik kesitlerden de görülebildiği seminifer tübüllerdir. Leydig hücreleri ise fetal testisin bu gelişim basamağından sonra ilk olarak görülmektedir.

Seminifer tübüller ratlarda 13. günde  killenmektedir. Germ hücrelerinin etrafında ve onları  vreleyen Sertoli hücre öncülleri ortaya çıkar. Gonadın anterior bölgesinde ba lar ve gonadın içerisine girinceye kadar genişleyerek devam eder ve 24 saatte sonuçlanır. Aynı zamanda spermatik kordların etrafında bazal membran aşama aşama  killenmektedir. Sonrasında Leydig hücreleri mezenşimal hücrelerden farklılaşarak interstisyel alanda 15,5 günde g r l rl r. Bu hücreler; tübüler kristalı büyük mitokondriler, lipit damlacıkları ve düz endoplazmik retikulum (DER) içerirler. Fetal rat testisleri testosteron üretmeye in vivo ve in vitro her durumda 15,5 günde ba lar. Fetal rat testislerinin gelişebilmesi luteinizan hormonunun (LH) ba lanması sayesinde olur ve bu hormona cevap 14,5 gün ile 15,5 gün arasında oluşur. Aynı dönemde testosteron sekresyonunda ba lar.

Fetal Leydig hücreleri doğumdan sonra ilk ve ikinci postnatal hafta boyunca azalı a geçer. Fetal Leydig hücrelerine postnatal 2. haftadan sonra ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Histolojik ve ultrastrüktürel gözlemlerden fetal Leydig hücrelerinin dejenere olarak yetişkin tip Leydig hücrelerine d n  t   (Kuopio ve ark., 1989) veya postnatal yaşam boyunca özel bir grup olarak kaldığı ileri sürülmektedir (Kerr ve Knell, 1988).

Yetişkin tip Leydig hücreleri; ratlarda, postnatal dönemde 10. gün dolaylarında g r l rl r ve 15. günden itibaren pubertenin sonuna kadar artmaya devam ederler. Leydig hücreleri mezenşimal hücrelerden  killenirler. Bunlar bir önce meydana gelen Leydig hücrelerinden farklıdırlar (Hardy ve ark., 1989). Leydig hücrelerinin artı ı LH ve FSH kontrolü altında gerçekleşmektedir (Kerr ve Sharpe, 1985).

2.4.2.2. Leydig Hücrelerinin Histolojisi

İnterstisyel alanda Leydig hücreleri düzensiz bir şekilde seminifer kordların etrafına yerleşmişlerdir. Burada kan damarları, lenfatikler, çeşitli hücresel elemanlar ve makrofajlar bulunur. Leydig hücreleri poligonal şekillidir ve yaklaşık olarak 15 µm çapındadır. Leydig hücreleri kan veya lenf damarlarının çevresinde kümeler oluştururlar. Bunlar tek çekirdek ve 1–2 çekirdekçik içerirler. İnsanların interstisyel hücrelerinde spesifik olarak, sitoplazmalarında Reinke kristalleri olarak isimlendirilen proteinler bulunur (Gartner ve Hiatt, 2003).

Genellikle Leydig hücreleri arasında 150–200 Å kalınlığında plazma membranı bulunur. Bununla birlikte sık sık intersellüler alanda 20 Å kalınlığındaki darlıklarda gap junctionlar bulunur (Christensen, 1975). Leydig hücreleri, lipit damlacıkları, karakteristik tübüler kristal mitokondriyonlar ve iyi gelişmiş düz endoplazmik retikulum içerirler.

Puberte döneminden sonra, bir siklik adenozin monofosfat (cAMP) aracılı mekanizma tarafından LH ile uyarılırlar ve Leydig hücreleri, 5-redüktaz enzimi ile dihidrotestosteron'a dönüştürülebilen, testosteron üretirler (Kierszenbaum, 2006). Leydig hücreleri sentezledikleri testosteron hormonunu, birlikte buldukları kan veya lenf kapillerlerine boşaltarak endokrin salınımı yaparlar (Eşrefoğlu, 2004). Serumda bulunan testosteronun yaklaşık %95'i (seks hormon bağlayıcı globulin, SHBG ve diğer proteinlere tutunmuş halde) Leydig hücreleri tarafından sentezlenir ve kalan testosteron adrenal korteks tarafından üretilir.

Leydig hücre toplulukları, tübüller arası alanda bulunan kan damarları ve lenfatik sinozoidlerle yakın ilişkide bulunmaktadırlar. Steroid üreten tüm hücreler gibi, Leydig hücreleri de bolca; lipit damlacıkları, düz endoplazmik retikulum, tübüler kristal mitokondriyonlara sahiptirler.

Steroidogenik akut regülatör proteinler (StAR) dış mitokondriyal membrandan iç mitokondriyal membrana kolesterolü taşırlar ve steroid sentezini ayarlarlar. Adrenal ve gonadal steroidlerin sentezinin bozuk olduğu (lipoid konjenital adrenal hiperplazi) kişilerde, StAR'ı kodlayan gende bir mutasyon görülmüştür. Leydig hücrelerinin işlevi ön hipofizin iki hormonu ile ayarlanır: LH, testosteron üretimini uyarır, prolaktin ise LH reseptör ekspresyonunu başlatır. Testosteron da, spermatogenez, erkek libidosunu ve erkek aksesuar bezlerinin (prostat ve seminal vezikül) fonksiyonlarını sürdürmektedir (Kierszenbaum, 2006).

2.4.2.3. Miyoid Hücreler

Miyoid hücrelerdeki bazal lamina bol miktarda aktin filamentleri içerdiği için düz kas hücreleriyle ilişkili özellikler gösterdiği görülmektedir. Miyoid hücreler, tipik fibroblastların yokluğunda kollajen sentezleme rollerinin belirtisi olan bir özellik olarak belirgin miktarda granüllü endoplazmik retikulum sergilemektedirler. Miyoid hücrelerinin ritmik kasılmaları spermatozoonların ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden boşaltım kanal sistemine akışına yardım eden peristaltik dalgalanmaları oluşturur. Yaşlılığın bir sonucu olarak tunika proprianın kalınlığında artış olur. Bu kalınlaşmaya sperm üretim hızında düşüş ve seminifer tübül boyutlarında genel bir azalma eşlik eder (Ross ve ark., 2011).

2.4.3. Spermatogenez

Spermatogenez bir gelişme olgusu olup, farklılaşmamış spermatogonyumlar, ileri derecede farklılaşmış spermiumlara dönüşmesidir. Spermatogenez üç faza ayrılabilir: spermatositogenez, mayoz ve spermioyogenez (Şeftalioğlu, 1996).

Spermatositogenez olarak adlandırılan evrede spermatogonyumlar bir dizi mitoz

geçirirler ve yeni oluşan hücreler ise iki yol izleyebilirler; bir ya da birkaç mitotik bölünmeyi takiben farklılaşmamış kök hücreler olan tip A spermatogonyumlar olarak devam ederler ya da devam eden mitotik bölünmeler sonucunda farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar.

Tip A spermatogonyumlar spermatogenik serinin kök hücreleridir. Tip B spermatogonyumlar ise primer spermatositlere farklılaşırlar. Bu hücreler oluştuktan hemen sonra birinci mayotik bölünmenin profazına geçerler. Bu esnada primer spermatositin 46 kromozomu var ve DNA'sı da $4N$ 'dir. Profazda hücreler leptoten, zigoten, pakiten ve diptoten olmak üzere dört faz geçirerek diyakinez safhasına ulaşırlar ve kromozomlar birbirinden ayrılırlar. Genlerdeki 'crossing over' mayozun bu safhalarında oluşmuştur. Sonra hücre metafaz safhasına girer ve kromozomlar bunu takip eden anafaz safhasında ise her biri bir kutba doğru giderler. Bu bölünme esnasında profazın yaklaşık 22 gün civarında bir süre alması sebebiyle incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu bu fazda görülürler.

Birinci mayotik bölünmeden sonra sekonder spermatositler olarak adlandırılan ve sadece 23 kromozom içeren daha küçük hücreler oluşurlar. Bu miktarca azalma her hücredeki DNA miktarının azalmasından dolayı olur. Sekonder spermatositlerin bölünmesi ile spermatidler oluşurlar ve bunlar 23 kromozomludurlar. Birinci ve ikinci mayotik bölünmeler arasında spermatositlerde S fazı görülmediğinden dolayı ikinci bölünmeden sonra her bir hücredeki DNA miktarının yarıya inmesi ile haploid hücreler meydana gelir. Fertilizasyonla haploid hücreler diploid hücrelere dönüşürler. Hücre bölünmesindeki mayotik süreç kromozom sayısının türler için sabit kalmasını sağlar.

Spermatidler spermiyogenez denilen farklılaşma süreci geçirirler. Bu süreçte akrozom oluşur, nükleus yoğunlaşıp uzar, flagellum gelişir ve sitoplazmanın da çoğu kaybolur. Seminifer tübülün lümeninde olgun spermatozoa meydana gelir.

Spermiyogenez üç fazda gerçekleşir:

Golgi fazı:

Spermatidlerin sitoplazmasında, nükleusun yakınında belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriler bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum tübülleri vardır. Küçük PAS pozitif proakrozomal granüller golgi kompleksinde birikirler ve hemen sonrasında ise birleşerek membranla sınırlanmış olan bir akrozomal vezikülün içinde yer alan tek bir akrozomal granülü oluştururlar. Sentriyoller, akrozomun olduğu bölgenin karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma göç ederler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar ve sentriyoller yeniden nükleusa doğru geri dönerken hareket ettikçe aksonemal komponentleri çevresine örter.

Akrozomal faz:

Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom hiyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu nedenle lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi işlev görür. Bu enzimlerin, korona radiata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir.

Matürasyon fazı:

Geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoalar tübülün lümenine doğru salınırlar. Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmayarak sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositle spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynarlar. Spermatogenez süreci bittiğinde sitoplazma ve

sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesinden dolayı spermatidler arasında bir ayrılma olur.

Testislere deneysel 3H-timidin injeksiyonu ile yapılan araştırmalarda insanda spermatogonyum safhası ile spermatozoa oluşumu arasındaki sürenin yaklaşık 64 gün olduğu saptanmıştır. Sürecinin yavaş olmasının yanı sıra, spermatogenez, eş zamanlı ya da eş güdümlü olarak her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez. Seminifer epitel siklusu germinal epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. İnsanda her bir siklus yaklaşık 16 gün sürer ve spermatogenez 4 siklustan sonra biter (Janqueria ve ark., 1998).

2.5. Testis Torsiyonu

Testis torsiyonu, spermatik kord yapılarının kendi eksenini etrafında dönmesinin sonucunda testis kan akımının bozulmasıdır. Testis torsiyonu 360-720 derece arasında dönmeler gerçekleştirilerek yapılmaktadır (Rowe ve ark., 1995; Hutson, 2006). Testiküler torsiyon-detorsiyon sebebiyle oluşan iskemi ve reperfüzyonun testiküler hasara neden olduğu bilinmektedir. İskemi esnasında oksijen miktarının metabolik ihtiyaçlara göre düşük seviyede olması, hücresel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolitlerin birikimine bağlı olarak germ hücrelerinin ölümü gerçekleşir (Moilgner ve ark., 2006).

Wistar-Albino sıçanlarda 720 derecelik saat yönünde çevirme ile torsiyon oluşturulmuş ve detorsiyon sonrasında pentoksifilin serbest oksijen radikallerini azaltarak koruyucu etkisinin olabileceği bildirilmiştir (Acar, 2005).

2.6. İskemi ve Reperfüzyon

İskemi, dokudaki kan akımının, hücrel fonksiyonları karşılamak için gerekli olan miktarın altına düşmesi durumudur (Langer ve ark., 1995). Testis torsiyonu sonrası testiküler hasarın gelişmesinde iskemi ve bunu takiben reperfüzyon sırasında ortaya çıkan SOR'da etkilidir (Prillaman ve Turner, 1997; Gürdal ve ark., 2002). SOR hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna yol açarak proteinleri denatüre eder ve hücre harabiyetine sebep olur (McCord, 1985).

Bir dokudaki kan akımı kesildiğinde, o dokudaki hücrelerin fonksiyon bozukluğuyla başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir takım kimyasal olay gerçekleşir. Hücrel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli olan en temel yakıt oksijendir. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. Oksijen yetersizliğinde ise anaerobik metabolizma devreye girer. Bunun sonucunda laktik asit ve toksik metabolitler birikir. Ortaya çıkan asidoz sebebiyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır (Grace, 1994; Lin ve ark., 1999; Semenza, 2000).

Reperfüzyon, iskemiye sebep olan etkenin ortadan kaldırılması sonucu dokuya kan akımının düzenlenmesidir. Reperfüzyon, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanmasını ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılmasını sağlar. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönmesi dokuya daha fazla zarar veren bir reaksiyon sürecini başlatır (Kuzu ve ark., 1998; Grace, 1994; Zimmerman ve ark., 1992).

Reperfüzyon hasarı SOR, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizma sonucunda gerçekleşir. Hasara neden olan asıl olayın endotel

hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir (Semenza, 2000; Terzi ve ark., 2000; Bathe ve ark., 1998).

Reperfüzyon hasarına doğrudan veya dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Bu maddelerin birbirleriyle etkileşimi sonucunda iskemi-reperfüzyon hasarının reperfüzyon kısmının aracısı olan SOR'ları ortaya çıkar.

Bu faktörler şunlardır:

I- Ksantin Oksidaz

II- Nötrofillerin aktivasyonu

III- Endotelial faktörler

1-Araşidonik asit metabolitleri

a)-Prostasiklin (PGI₂)

b)-Tromboksan A₂(TxA₂)

c)-Lökotrien B₄

2-Nitrik Oksit

3- Endotelin

IV- Trombosit aktive edici faktör (PAF)

V-Komplemanlar

VI-Sitokinler

VII-Prostaglandinler

VIII-Katekolamin oksidasyonu

2.7. Ginkgo biloba (Egb 761)

Anavatanı Çin olan Ginkgo biloba yapraklarını döken ve 30 m boyunda bir ağaçtır. Ginkgoiae sınıfının dünyada yetişen tek üyesidir. Ginkgo biloba; Mabet ağacı, Kızısaçı ağacı ve Japon Eriği olarak da bilinmektedir (Coşkun, 2004). Günümüzde Asya, Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda ve Arjantin'de yaygın olarak yetiştirilmektedir (Huh ve ark., 1992).

Ginkgo biloba (Egb 761) yapraklarından elde edilen bir bitki ekstresidir. Egb 761'in temel bileşenleri; %24 flavonoidler, %3,1 ginkgolidler, %2,9 bilobalidler ve %5–10 organik asitlerdir (Tablo 2.7.1). Egb 761, PAF'ı antagonize eden, serbest radikal uzaklaştırıcı aktivite gösteren ve vasküler relaksasyon sağlayan bir maddedir. PAF'ın neden olduğu platelet agregasyonunu önler ve lizozomal zarları stabilize eder.

Çok değişik organlarda değişik şekilde etki edebilir. Egb 761; aktivatör ya da inhibitör olarak etki eder. Organizmanın içinde bulunduğu duruma göre adaptasyonuna yardımcı regülatuar bir bileşiktir (Schutte ve ark., 2001; Christen ve Maixent, 2002; Braquet ve Koltai, 1994).

Flavonoid glikozitler ve terpenoidler gibi iki büyük fonksiyonel bileşimi içeren, standardize ve konsantre edilmiş kimyasal bir ürün olan Egb 761, son zamanlarda farmakolojik olarak hazırlanmıştır (Logani ve ark., 2000; Shen, 1998). Ginkgo biloba yaprak ekstraktının belirtilen terapötik etkisi muhtemelen terpen trilaktonlar (ginkgolidler ve bilobalid) ve flavanoid glikozitler ile sağlanmaktadır (Juretzek, 1997).

Tablo 2.7.1. Ginkgo biloba yapraklarının ana bileşenleri (van Beek, 2005).

Etken madde grubu	Bileşikler
Terpenoidler	Ginkgolidler A, B, C, J, M Bilobalid Steroller
Flavonoidler	Kaemferol, Rutin, Luteolin vs.
Biflavanoidler	Ginkgetin, İsoinkgetin vs.
Organik asitler	Benzoik asit türevleri (ginkgolik asit)vs.
Poliprenoller	di-trans-poli-sis-octadekaprenol
Diğerleri	Kardoller, Stereoidler, Fenoller vs.

Ginkgo biloba; kardiyovasküler sistemi hastalıkları, yaşlılığa bağlı hafıza kaybı, Alzheimer algılama kayıpları, bunama, performans bozuklukları, kulak çınlaması ve baş dönmesi gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarında kullanılmaktadır.

Testiküler germ hücre apoptozisi ile ilgili çalışmalar Egb 761'in testiküler hasara ve apoptozise karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir (Akgül ve ark., 2008). Egb 761'in apoptozisle ilişkili genlerin etkisini hafiflettiği, serbest radikallerin üretimini azalttığı ve çeşitli tipte doku ve hücrelerde antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı, eksojen toksik uyarımın sonucuna karşı ise hücre koruyucu ajan olarak kullanıldığı gösterilmiştir (Akgül ve ark., 2008).

2.8. TUNEL Tekniği

Apoptoz enerji gerektiren aktif hücre ölümüdür. Ölüm faktörleri, yaşam devamlılığı, eksternal büyüme gibi aktif cevaplardan kökenlenen efektör yollar veya çoklu sinyaller tarafından kontrol edilirler.

Apoptozun tanımlanan karakteristiği hücre morfolojinin tamamen değişmesidir. Elektron mikroskopik incelemelerde, hücrenin büzüşmesi, kromatin marjinasyonu, membran kabarcıklaşması, nükleer kondensasyon ve sonra segmentasyon ve apoptotik cisimlere bölünmesi ki bazen fagosite edilebilmesiyle karakterizedir. Apoptoziste DNA fragmentasyonu, hücre morfolojideki ultrastrüktürel değişikliklerle ilişkilidir. Apoptoziste ortaya çıkan DNA fragmentasyonunu göstermenin bir yolu da TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling) metodudur.

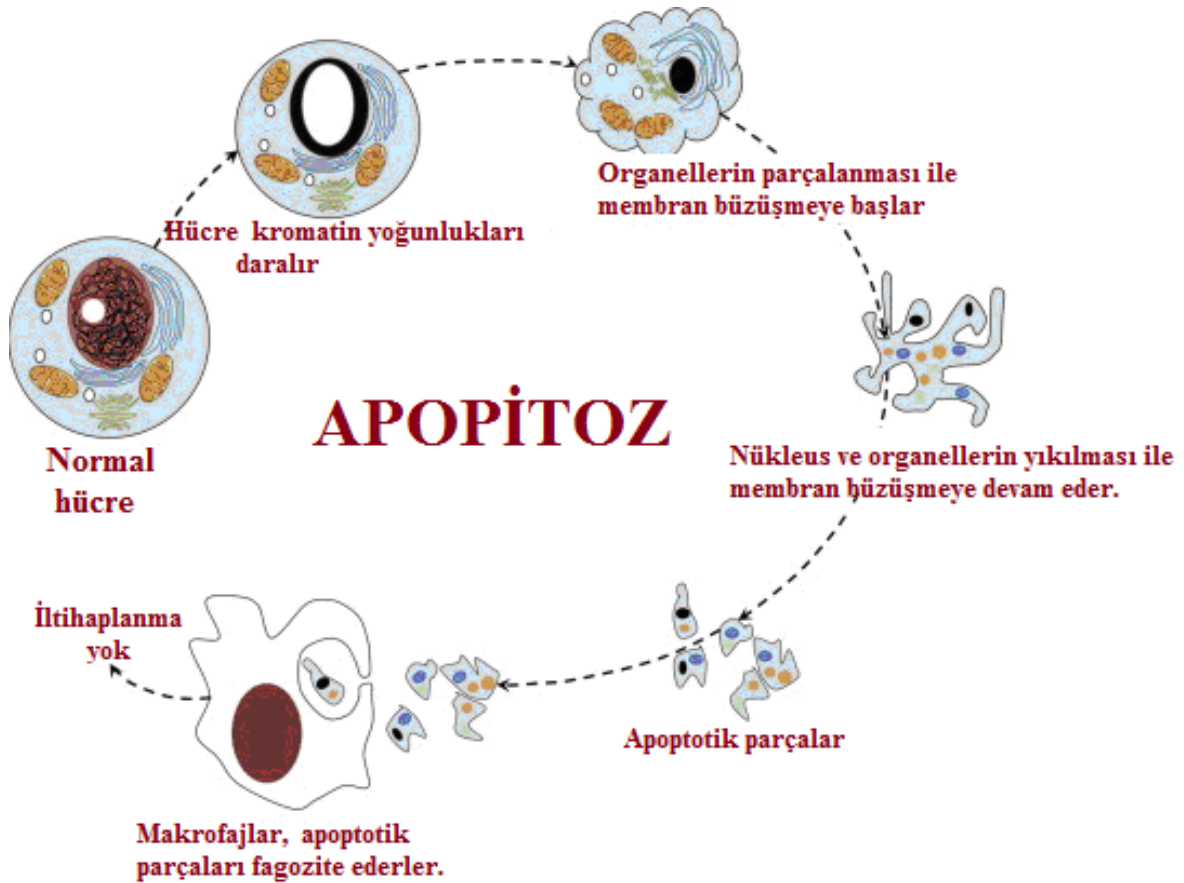
Nekroz enerjinin kullanılmadığı pasif hücre ölümüdür. Apoptozisin nekrotik hücre ölümünden çeşitli morfolojik ve biyokimyasal farklılıkları vardır. Bu yöntemle, DNA kırıklarının serbest 3'OH uçları modifiye nükleotidlerle enzimatik olarak işaretlenir. DNA fragmentasyonundan kökenlenen bu yeni DNA uçları, morfolojik olarak gözlenebilen çekirdekte ve apoptotik cisimciklerde bulunurlar. Bu yöntemle kromatin kondensasyonu oluşmuş ve DNA kırıkları bulunan erken evre apoptozise özgüdür. Daha sonra çekirdekte major morfolojik değişiklikler oluşmaya başlar (Attanasio ve ark., 1995; Chapman ve ark., 1995).

TUNEL metodu, kimyasal olarak işaretlenmiş ve işaretlenmemiş nükleotidler kullanılarak serbest 3'OH uçlarının işaretlenmesi prensibine dayanır. Reaksiyon tamponuna eklenmiş olan nükleotidler, terminal deoksinnükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak enzimatik olarak DNA'ya bağlanması sağlanır. TdT tek sarmallı ya da çift sarmallı DNA'nın 3'OH

uçlarına serbest olarak eklenen nükleotid trifosfatları katalizler. Serbest halde bulunan nükleotidler digoksinin-konjugat eklenmesiyle bir oligomer oluştururlar. Daha sonra digoksinin ile konjuge olan nükleotidler peroksidaz reaksiyonu verebilen anti-digoksinin antikoru ile bağlanması sağlanır. Böylece bağlanmış peroksidaz antikoru, immunohistokimya ve hassas görünüm sağlayan kromojenik substratlarla bağlanması sağlanır. Sonuç olarak apoptotik cisimciklerde daha yüksek miktarda bulunan 3'OH uçlarının hassas ve spesifik boyanması sağlanır.

2.9. Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü)

Apoptoz ilk olarak 19. yüzyılda Vogt tarafından keşfedilmiştir. Yapısal değişimler ilk olarak 1885'te Fleming tarafından tanımlanmıştır. Apoptoz terimini ilk kez Kerr 1972'de kullanmıştır. Apoptoz hücrelerin programlanmış elenmesidir (Rosti, 2011). Apoptoz fizyolojik ya da patolojik koşullarda uyarılabilir. Apoptoz; hücrelerin doğru yer, zaman ve sayıda olmasını sağlar ve mitoz ile dokuda sürekli bir denge durumundadır (Cummings ve ark., 2002). Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı ve fizyolojik hücre ölümü apoptoz ile aynı anlamda kullanılan tanımlardır (Majno ve Joris, 1995; Schwartzman ve Cidloski, 1993). Apoptoz üç evrede incelenir. Bunlar başlangıç, infaz ve bitiş evreleridir (Şekil 2.9.1). Hücrenin büzülmesi, çekirdekte kromatinin yoğunlaşması ve çekirdek zarı kenarına yerleşmesi, DNA parçalanması, karyoreksis, sitoplazmanın çok yoğun, organellerin daha sıkı bir halde paketlenmiş olması, hücre zarında balonlaşmaların oluşması apoptozun temel yapısal özellikleridir. Yapısal değişimler özellikle infaz evresinde dikkati çeker. Fosfatidilserin hücre zarının iç sitoplazmik yarımında yer alır. Apoptozda ise hücre dışına geçer. Bu değişim, apoptoza giden hücrenin makrofajlar ve diğer fagositoz yapan hücreler tarafından tanınmasını sağlar (Rosti, 2011).



Şekil 2.9.1. Apoptozun şematik gösterimi (<https://www.researchgate.net>)

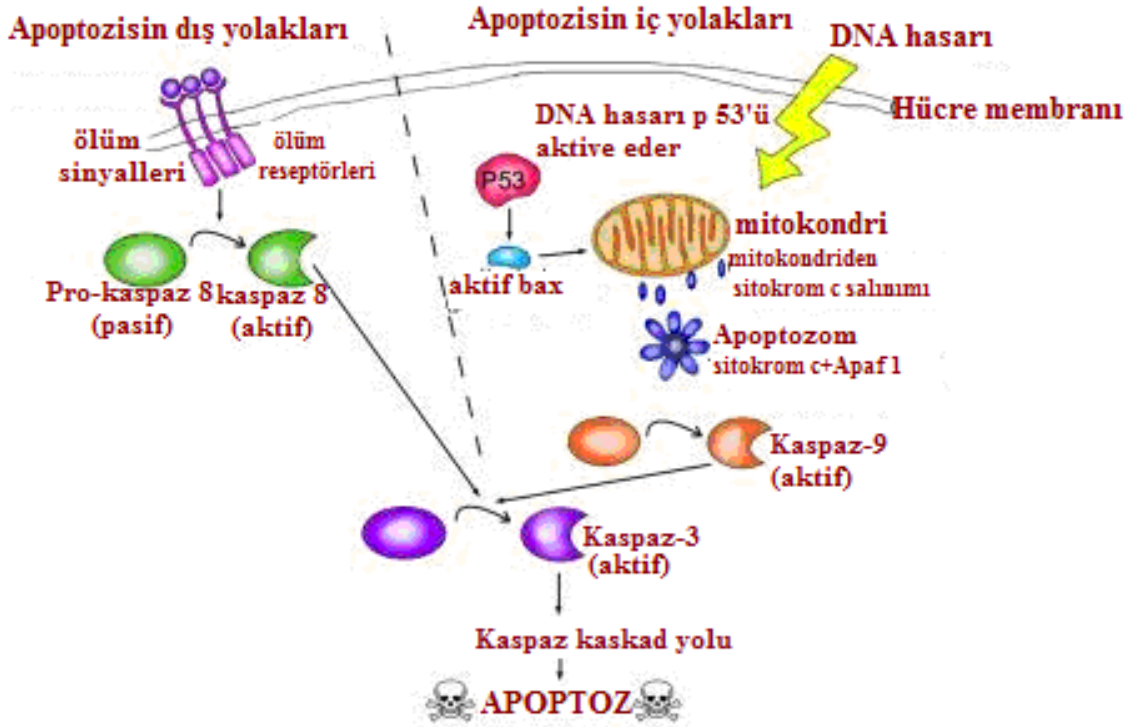
Apoptoz tek tek hücreleri ya da küçük hücre gruplarını etkiler. Apoptotik hücre yuvarlak ya da ovaldir. Koyu eozinofilik sitoplazması ve yoğun mor-mavi kromatin kümeleri içerir. Bu kümeler önce çekirdek zarı altında toplanır. Apoptotik cisimlerin oluşması tomurcuklanma olarak isimlendirilir. Apoptotik cisimlerin içindeki organellerin bütünlüğü korunmaya devam eder ve her cisim sağlam bir hücre zarı ile çevrilidir. Bitiş evresinde; ortaya çıkan hücre kalıntılarını içeren apoptotik cisimler makrofajlar ya da komşu parankima hücreleri tarafından fagosite edilirler. Bu makrofajlar lenfositlerin çoğalma ve seçiminin yoğun olarak gerçekleştiği lenf foliküllerinin germinal merkezlerinde ve timusun korteksinde bulunurlar. Apoptozda fagositozdan önce hücresel içerik hücrelerarası aralığa dökülmediği için inflamasyon gelişmez (Rosti, 2011).

Apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelirken nekroz ise fizyolojik bir ölüm şeklidir. Apoptotik hücrede kromatinin nükleus membranı agregasyon gösterir ve kondanase olur. Fakat nekrozda hücre büyür, en sonunda hücre zarı patlar ve hücre içeriği bulunduğu ortama yayılır, dolayısıyla enflamatuvar bir yanıtı da neden olur. Nekrozda sitoplazmada vakuoller, şişmiş ya da bütünlüğü bozulmuş mitokondriyonlar, genişlemiş endoplazma retikulumu, ayrılmış ribozomlar, şişmiş ya da parçalanmış lizozomlar, parçalanmış organel zarları ve en son olarak da hücre zarının bütünlüğünün bozulması görülür. Piknoz ve karyoreksise nekrozda da rastlanabilir. Nekrozda hücre, öldükten sonra parçalanır. Apoptoz ve nekrozun, ortak biyokimyasal mekanizmalardan kaynaklanan ortak yapısal görüntüleri de vardır.

Gelişimsel hücre ölümünde hem apoptoz hem de nekroz birlikte görülür. Örneğin, ekstremite tomurcuklarının interdigital bölgelerinde yalnızca apoptoz değil nekroz da vardır. ATP azalmaya başladığında apoptoz nekroza dönüşebilir. Uyarının yoğunluk ve süresine bağlı olarak, apoptoz ve nekroz aynı anda da görülebilir. Çünkü her hücrenin belli bir uyarana yanıtı farklıdır. Uyarının şiddeti, apoptoz ya da nekrozdaki hangisinin gerçekleşeceğini belirleyen en önemli parametredir. Devam etmekte olan apoptozu nekroza çevirebilecek en önemli faktörler ATP ve kaspazlardır.

Apoptoz dış ve iç yollar üzerinden gerçekleşir (Şekil 2.9.2). Dış yolak ölüm reseptörleri üzerinden çalışır. Ölüm reseptörleri TNF/NGF ailesindedir. Ölüm reseptörlerinde, sinyal iletimini sağlayan bir ölüm alt birimi bulunur. Dış yolda kaspazlar, bazı ölüm substratlarını yıkarak apoptozun gerçekleşmesini sağlarlar. Kaspazlar aracılığı ile hücre iskeleti ile hücre zarı arasındaki bağlantılar, tutunma noktaları koparılır. Bu ayrışma sonucunda hücre zarında balonlaşmalar meydana gelir. Ölüm reseptörleri

üzerinden, apoptozun engellenmesi de söz konusu olabilir. Bu olay, kaspaz-8'in baskılanması ile gerçekleşir.



Şekil 2.9.2. Apoptozun iç ve dış yolları (<https://blogs.scientificamerican.com>).

İç yolak ise mitokondriyon üzerinden işler. Bu yolak pro- ve anti-apoptotik proteinler tarafından düzenlenir. Bu proteinler mitokondriyonlarda bulunurlar. Apoptozda granzim B / perforin üzerinden çalışan üçüncü bir yolak da tarif edilmiştir. Granzim B, kaspazları aktive edebileceği gibi, kaspaz substratları da direkt olarak yıkabilir. Granzim-B, kaspaz-3'ü direkt olarak aktive ederek kısa yoldan infaz fazını başlatabilir. Granzim B ve kaspaz-3 aynı biyokimyasal bölgeye etkilidirler. Granzim-B, prokaspaz-10'u aktive edebilir ve ICAD denilen faktörü de parçalar. Mitokondriyon bozulması, granzim B aracılığı ile gerçekleşen ölümün vazgeçilmez ögesidir. Granzim-B sitokrom-c salınımını artırır. Granzim B, sitotoksik T hücrelerinde ve doğal öldürücü hücrelerde bulunur.

Granzim A ise DNaz üzerinden çalışır. Bu DNaz tümör hücresi apopitozuna yol açarak kanserden korunmayı sağlar. Apopitozun tüm yolları infaz evresinde birleşirler. İnfaz evresi, kaspaz 3'ün aktivasyonu ile başlar (Rosti, 2011).

2.9.1. Testiste Apoptozisin Rolü

Testisteki germ hücre dejenerasyonu gelişim döneminde ve erişkinde genellikle rastlanılan bir durumdur. Sıçanlarda doğurma zamanına kadar testisteki hücrelerin yarısının öldüğü bilinmektedir. Bu dejenerasyon sırasında apoptozis yoluyla ölüm en sık kullanılan mekanizmadır. Bu mekanizmanın içerisinde Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ailesi, kaspazlar, ölüm reseptörleri ve p53 gibi faktörler vardır. Doku canlılığında ve devamında, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptoz, testiküler dokuda da sık rastlanan bir durumdur.

Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun spermin oluşmasıdır. Normal spermatogenez içinde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilaveten germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda önemli rol oynar (Sinha ve ark., 1998; Sharpe, 1994). Apoptoz, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar (Beumer ve ark., 2000). Germ hücrelerindeki, hücre ölümü spermatozoanın normal gelişimi için mutlaka gerekli bir olaydır (Jefferson ve ark., 2000). Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptoz gerçekleştiği bildirilmiştir (Kerr, 1992).

Testiste, defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin %75'i apoptozise maruz kalır ve apoptozisin doğal bir mekanizma olarak normal spermatogenez sırasında sperm üretimini %25 ile %75 arasında değişen oranda

azalttığı bilinmektedir (Hsueh ve ark., 1996; Kerr ve ark., 1972; Huckins, 1978). Erken gelişimsel dönemde başlayan bu apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (Ayaşoğlu, 2001; Hikim ve ark., 2000; Rodriguez ve ark., 1997). Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artış görülebilir (Heiskanen ve ark., 1996; Ikeda ve ark., 1999).

Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozisin hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (Tapanainen ve ark., 1993; Yin ve ark., 1997). Hipofizektomize immatüre ratlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde masif apoptozis ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH veya HCG tedavileri sayesinde programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir (Heiskanen ve ark., 1996; Yin ve ark., 1997). Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere olan hassasiyetini de germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini artıran diğer bir faktördür (Blanco-Rodriguez ve Martinez-Garcia, 1998). Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptozis gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (Korsmeyer, 1996).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar ve Ait Olduğu Kaynaklar

Tablo 3.1.1.1. Kimyasallar ve ait olduğu kaynaklar.

Etanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Ksilen	Merck, Almanya
Methanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Formaldehit	Merck, Almanya
Picric Asit	Carlo Erba, İtalya
Gliasil Asetik Asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Sitrik Asit	Carlo Erba, İtalya
NaOH	Sigma-Aldrich, Almanya
Endojen Peroksit	ScyTek, Amerika
Blok Solüsyonu	ScyTek, Amerika
NaCl	Carlo Erba, İtalya
K ₂ HPO ₄	Carlo Erba, İtalya
KH ₂ PO ₄	Carlo Erba, İtalya
Kapatma Solüsyonu	ScyTek, Amerika
Parafin	Sigma, Amerika
Lam	İnvitro, Almanya
Lamel	Menzel, İtalya
Polilizinli Lam	Leica, İngiltere
Pap pen	Leica, İngiltere
Mayer's Hematoksilen	Sigma-Aldrich, Almanya
Entellan	Merck, Almanya
Diff-Quik boya seti	MidAtlantik, İngiltere
Tunnel Kit	Roche, Almanya

3.1.2. Kromojenler

Tablo 3.1.2.1. Kromojenler

DAB (Diaminobenzidine)	Sigma, Almanya
Fast Red Tablet	Sigma, Almanya
Fast Red Buffer	Abcam, İngiltere

3.1.3. Antikorlar, Ait oldukları Kaynaklar

Tablo 3.1.3.1. Antikorlar, ait oldukları kaynaklar.

Primer antikorlar	
Anti-hCG receptor antibody	Abcam, İngiltere
Sekonder antikorlar	
Biotinylated Antibody	ScyTek, Amerika
HRP Antibody	ScyTek, Amerika

3.1.4. Deney Aletleri ve Markaları

Tablo 3.1.4.1. Deney aletleri ve markaları

Hassas terazi	Korn ABJ, Türkiye
Mikrodalga fırını	Arçelik, Türkiye
Mini santrifüj	Biosan, Türkiye
Mikrotom	Leica, Almanya
Etüv	Nüve, EN500
Işık mikroskobu	Nikon, Almanya
pH metre	Adwa, AD1000
Manyetik karıştırıcı	Nüve, MK218

3.2. Metod

3.2.1. Deneyleerde Kullanılan Örneklerin Elde Edilmesi ve Metod

Çalışmada yapılan işlemler için hayvan etik kurulunun onayı alındı. Hayvanlar Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Birimi'nden temin edildi. 300–400 gram ağırlığında 28 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Her bir grupta yedişer adet olmak üzere sıçanlar rastgele aşağıdaki gibi dört gruba ayrıldılar.

Gruplar ve gruplarda yapılan işlemler şu şekildedir. Grup-1: Herhangi bir işlem yapılmayan sıçanlardan oluşan Kontrol grubu. Grup-2: Torsiyon yapılmadan bir saat önce Egb verilerek torsiyon kaynaklı iskemi reperfüzyon hasarının tedavi edilmesi işlemi yapılan Tedavi grubu (Egb 761, 50 mg/kg, oral). Grup-3: Torsiyon yapılmadan sadece tedavi grubundaki şekilde Egb verilen Egb-761 grubu. Grup-4: Testis torsiyonu oluşturularak iki saat sonrasında detorsiyon yapılan Torsiyon grubu. Tedavi ve Egb-761 grubundaki hayvanlara Ginkgo biloba ekstraktı olan Egb-761 (50mg/kg, oral) verildi. Kontrol ve torsiyon grubundaki sıçanlara ise aynı miktar ve yolla izotonik NaCl (salin) verildi. Bu uygulamadan bir saat sonra tedavi ve torsiyon grubundaki sıçanlar anestezik hale getirildikten sonra materyal metotta anlatıldığı şekilde testis torsiyonuna 2 saat maruz kaldılar. Anestezik olarak ksilazin ve ketamin (2:15) kullanıldı. Tedavi ve torsiyon gruplarına torsiyon yapıldıktan sonra 2 saat süre ile detorsiyon yapıldı. Testis torsiyonu ve detorsiyonu işlemleri sonrasında tüm sıçanlar derin anestezi altında testisleri epididimisleri ile birlikte çıkarılarak sakrifiye edildiler. Epididimisler testise bağlantılı olduğu kısımdan kesilerek testislerden ayrıldılar. Testisler histolojik analizler için Bouin tespit solüsyonu içerisine konularak tespit olması için iki gün süre ile bekletildiler. Epididimis içerisindeki spermeler Kruger strict morfoloji analizlerinin yapılması için temiz bir petri kutusu içerisine

konuldu. Epididimisler steril bistüri ile açılarak steril pastör pipet ile bir miktar semen içeriği falkon tüplerine alındı ve üzerine aynı miktarda serum fizyolojik ilave edilerek birebir oranında dilüe edildi. Dilüe edilmiş spermelerden steril pastör pipeti ile bir iki damla temiz bir lama damlatıldı. Başka temiz bir lam kullanılarak lam üzerine sperm yayması yapıldı. Testisler Bouin tespit olduktan sonra histolojik analizler için rutin histolojik doku takibi protokolüne göre (Tablo 3.2.1.1) takip edilerek parafin bloklara gömüldüler. Sperm morfolojik analizleri ise lamlara yayılmış olan epididimal spermelerin Diff-quick boyama protokolü (Tablo 3.2.1.2) uygulanarak boyanması ile hazırlanmış olan sperm yayma preparatlarının ışık mikroskopunda 40X'lık objektif altında değerlendirilmesi ile yapıldı.

Tablo 3.2.1.1. Doku takibi protokolü.

1.	Akarsuda yıkama	12 saat
2.	%70 Alkol	1 gece
3.	%80 Alkol	1 saat
4.	%90 Alkol	1 saat
5.	%96 Alkol	1 saat
6.	%100 Alkol	1 saat
7.	Ksilen	3x15 dakika
8.	Parafin	1 saat (58–60 °C) sonra 1 gece oda ısısında
9.	Parafin	2 saat (58–60 °C)
10.	Parafin	2 saat (58–60 °C)
11.	Bloklama işlemi	

Tablo 3.2.1.2. Diff-quick boyama protokolü

1.	%4'lük tamponlu nötral formalin	1-2 dakika
2.	Fiksatif	10 dakika
3.	Eosin solüsyonu	10 dakika
4.	Azur solüsyonu	10 dakika
5.	Distile su	5 dakika
6.	Kapatma	

3.2.2. Deneyleerde Kullanılan Solüsyonlar

Sitrat Solüsyonu

Hazırlama: 2,1 gr toz halindeki sitrik asit 1000 ml distile suda çözdürülür. Solüsyonun Ph'ı NaOH ile ayarlandıktan sonra 0,1 M ve Ph=6 solüsyon elde edilir.

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)

Hazırlama: 87,6 gr NaCl, 22,8 gr K_2HPO_4 ve 6,8 gr KH_2PO_4 1lt distile su içinde çözdürülür.

Bouin Fiksatif

Hazırlama: 75 ml Pikrik Asit, 5 ml Gliasil Asetik Asit, 75 ml formalin (%37) birleştirilir.

Asit Alkol

Hazırlama: %70'lik alkol 99.5 ml, konsantre HCl 0,5 ml birleştirilir.

Tamponlu Nötral Formalin

Hazırlama: %37-40'luk Formalin 100 ml, 900 ml distile su, 6,5 gr Na_2HPO_4 , 4 gr NaH_2PO_4 birleştirilir.

3.2.3. Kullanılan Teknikler

Tez çalışmamızda rutin histolojik tekniklerin yanısıra histokimyasal, immünohistokimyasal, TUNEL ve histopatolojik teknikler kullanılmıştır.

3.2.3.1.Histokimya

Hematoksilen eozin boyama yöntemiyle seminifer tübüllerin histokimyasal analizi yapıldı. Testisler Bouin fiksatifte tespit edildikten sonra 12 saat yıkama işlemi yapıldı. Ardından bir gece %70'lik alkolde bekletildi. %80, %90, %96, %100'lik alkollerde 1'er saat bekletildi. Temiz ksilen serilerinde 15 dakikadan 3 değişim yapıldı. Sonra dokular parafinde 1 gece oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra etüvde 58-60°C'de parafin eritilip süzülerek temiz parafinde 2'şer saatlik 2 değişim yapıldı. Temiz eriyik parafin içerisine konularak L demirler yardımıyla bloklandı. Parafin bloklar içerisindeki testis dokuları 4-5 µm kalınlıkta rotary mikrotom (Tablo 3.1.4.1) ile kesildikten sonra lamlara alınarak lama yapışması sağlandı. Doku kesitleri 58-60°C'deki etüvde deparafinize edildikten sonra 3 kez 15'er dakika ksilende bekletilmesinin ardından sırasıyla %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerinden geçirildi. Kesitler distile sudan geçirilerek ardından Mayer's hematoksilende 10-15 dakika bekletildi. Akar su altında 2-3 dakika bekletilip asit alkol solüsyonuna bir iki kez daldırılıp 5 dakika daha yıkandıktan sonra 2-3 dakika eosinde bekletildi ve distile sudan geçirildi. Sırasıyla %70 ve %80'lik alkollerde 1'er dakika, %90 ve %100'lük alkollerde ise 2'şer dakika bekletildikten sonra 3 kez 5'er dakika ksilende bekletildi. Ksilenden çıkarılan preparatlar entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı (Tablo.3.2.3.1.1).

Tablo 3.2.3.1.1. Hematoksilen eosin boyama protokolü.

1.	Ksilen	3x10 dakika
2.	%100 Alkol	5 dakika
3.	%90 Alkol	5 dakika
4.	%80 Alkol	5 dakika
5.	%70 Alkol	5 dakika
6.	Distile su	5 dakika
7.	Mayer's hematoksilen	10 dakika
8.	Akarsuda yıkama	5 dakika
9.	Asit alkol	1-2 kez (daldırma)
10.	Akarsuda yıkama	5 dakika
11.	Eosin	2 dakika
12.	Distile su	5 dakika
13.	%70 ve %80 Alkol	1 dakika
14.	%90 ve %100 Alkol	2 dakika
15.	Ksilen	3x5 dakika

Sperm yayma preparatları morfolojik değerlendirme için Diff-quick histokimyasal boyama yöntemi kullanıldı. Epididimal sıçan sperm yayma preparatları ilk olarak %4'lük tamponlu Nötral formalin tespit solüsyonunda 1-2 dakika bekletildi. Sonrasında Diff-quick boyama seti fiksatifinde 10 dakika beklendikten sonra eosin solüsyonu 10 dakika, 10 dakika azur solüsyonunda bekletildikten sonra distile sudan geçirildi. Preparatlar kurutulduktan sonra entellan damlatılarak 24-60'lık lameller ile kapatılarak mikroskopik incelemelere hazır preparatlar haline getirildiler. Bu preparatlar üzerinde Kruger strict kriterleri temelli olarak sperm hücreleri baş, boyun, kuyruk kısımlarının morfolojik değerlendirmeleri yapıldı (Tablo 3.2.3.1.2).

Tablo 3.2.3.1.2. Kruger strict kriterleri (WHO 2010)

Baş anomali	Akrozomsuz Küçük akrozom Büyük akrozom Amorf akrozom Nükleus anomali Amorf baş Yuvarlak baş Küçük baş Sivri baş Nokta baş Çift baş Büyük baş İğne baş Vakuol
Boyun anomali	Kalın boyun Amorf boyun Asimetrik boyun Boyunda incelmeye Boyunda kıvrılma Sitoplazma fazlalığı
Kuyruk anomali	Kuyruksuz Kıvrık kuyruk Uzun kuyruk Çift kuyruk Kısa kuyruk
Normal sperm sayısı	
Anomalili sperm sayısı	
Sperm anomali (%)	
Normal sperm (%)	
Kruger strict morfoloji kriterlerine göre fertilité oranı (>14=%88, %14-4=%49, ≤4=%7)	

Sıçanların testis dokularındaki iskemi reperfüzyon hasarının histolojik düzeyde tespit etmek için alınan ince kesitler hematoksil-eozin protokolüne (Tablo 3.2.3.1.1) göre boyandı. Hasarın seminifer tübül epiteline olan etkileri testislerdeki histolojik hasar analizi için modifiye Johnsen skorlama kriterleri (Tablo 3.2.3.1.3) referans alınarak testiküler doku kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

Bu amaçla yapılan histolojik analizler rastgele numaralandırma şeklinde kör çalışma şeklinde gerçekleştirildi. Her gruptaki sıçanlara ait on kesit ve her kesitte de ortalama 25 seminifer tübül değerlendirilmeye tabi tutuldu. Testiküler dokular Johnsen skorlama sistemi ile histolojik ve spermatogenik olarak değerlendirilerek ağırlıklı ortalama Johnsen skoru hesap edildi. Johnsen skorlama prensibi hasarın şiddetine göre birden ona kadar toplam 10 histolojik derecelendirme kriterden ibaret olup aşağıdaki gibidir.

Tablo 3.2.3.1.3. Johnsen skorlama kriterleri

Grade 1	Seminifer túbüller içinde hiçbir hücre yoktur.
Grade 2	Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücreleri vardır.
Grade 3	Germ hücreleri olarak sadece spermatogonyumlar vardır.
Grade 4	Spermatozoa ve spermatid yok, az sayıda spermatosit vardır.
Grade 5	Spermatozoa yok, spermatid yok, fazlaca spermatosit mevcuttur.
Grade 6	Spermatozoa yok, az sayıda (10'dan az) spermatid mevcuttur.
Grade 7	Spermatozoa yok, farklanma işareti olmaksızın fazla sayıda spermatid vardır.
Grade 8	Olgun spermatozoa olmaksızın geç spermatidler mevcuttur.
Grade 9	Germinal epitel çok sıralı ve disorganize, spermatogenezis hafifçe bozulmuş, çok sayıda spermatid, az sayıda spermatozoa var.
Grade 10	Germinal epitel çok sıralı ve organize olup çok sayıda spermatozoa var, tam spermatogenez mevcuttur.

3.2.3.2. İmmünohistokimya

Sıçanların testislerinden polilizinli lamlara alınan ince kesitlerde LH ekspresyonunu tespit etmek için indirekt immünohistokimyasal teknik protokolüne antijen antikor reaksiyon temelli olarak boyandılar. İmmünohistokimyasal boyama işlemi için lamlara alınmış olan kesitlerde sırası ile Tablo 3.2.3.2.1'deki işlemler gerçekleştirildi.

Tablo 3.2.3.2.1. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü

1.	Ksilen	3x15 dakika
2.	%100'lük Alkol	5 dakika
3.	%90'lık Alkol	5 dakika
4.	%80'lik Alkol	5 dakika
5.	%70'lik Alkol	5 dakika
6.	Distile Su	5 dakika
7.	0.1M sitrik asit solusyonu (pH: 6)	2x5 dakika mikrodalgada kaynatıldı.
8.	PBS	3x5 dakika
9.	Endojen peroksit bloklajı	20 dakika
10.	PBS	15 dakika
11.	Super block solusyonu	10 dakika
12.	Primer antikör	1 saat (oda ısısında)
13.	PBS	3x5 dakika
14.	Sekonder antikör	30 dakika
15.	PBS	3x5 dakika
16.	Peroksidaz işaretli streptavidin	20 dakika
17.	PBS	3x5 dakika
18.	DAB	10-15 dakika
19.	PBS	3x5 dakika
20.	Distile su	5 dakika
21.	Mayer hematoksilen ile zıt boyama	3-5 dakika
22.	Distile su	3-5 dakika
23.	%70'lik Alkol	1 dakika
24.	%80'lik Alkol	1 dakika
25.	%90'lık Alkol	1 dakika
26.	%100'lük Alkol	1 dakika
27.	Ksilen	3x5 dakika
28.	Kapatma solusyonu ile kapatma	

3.2.3.3. TUNEL Prosedürü

Yapılan işlemlerin testiküler doku hücrelerindeki apoptotik etkilerini incelemek için polilizinli lamlara alınan ince kesitler TUNEL yöntemi ile boyanarak analiz edildiler. Bu amaçla alınan kesitler aşağıdaki protokolden sırası ile geçirilmiştir (Tablo 3.2.3.3.1).

Tablo 3.2.3.3.1. TUNEL boyama prosedürü.

1.	Ksilen	15'X2
2.	%100, %90,%80,%70 Alkol	5'
3.	Distile su	5'
4.	Sitrik asitte 600W	2'
5.	80 ml distile su (oda sıcaklığında) sitrik asidin üzerine dökülür. (Ani soğutma)	
6.	PBS 3x5	
7.	30' BSA (oda sıcaklığında) Bloklama ağırları yapmak zorunda değiliz.	
8.	Daha sonra Vial1+Vial2 doku üzerine damlatılır. (1:9)	45' 37°C etüvde
9.	PBS	3x5' kez yıka.
10.	Vial 3	30' 37°C etüvde
11.	PBS	3 kez yıka
12.	Fast Red (Tablet / sıvı) Buffer ile sulandırılır.	(1:75)
13.	H.E. zıt boyama ve yıkama	
14.	Su bazlı medyumla kapama.	

3.2.3.4. Sperm Değerlendirmesi

Torsiyonun sperm hücrelerine muhtemel olumsuz etkileri ve Ginkgo biloba'nın antioksidan özelliğinden kaynaklanan koruyucu ve tedavi edici etkilerini gözlemleyebilmek için sıçanların epididimal spermleri Kruger strict kriterleri baz alınarak morfolojik olarak mikroskopta analiz edildiler.

Bu amaçla temiz lamalar üzerinde bir iki damla epididimal semen içeriğinin damlatılıp diğer temiz bir lam ile yayma yapıldı. Tamponlu nötral formalin solüsyonuna daldırılan sperm yayması yapılmış olan bu lamalar bir gece kurumaya bırakıldılar. Sonrasında Diff-quick boyama yapılarak mikroskopta incelenecek preparat haline getirildiler. Hazırlanan bu preparatlar modifiye Kruger strict morfoloji analizi kriterleri bakımından ışık mikroskobunda 40X'lık büyütmede Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2010 kararları referans alınarak sıçan sperm hücreleri baş, boyun, kuyruk anomalileri

bakımından değerlendirildiler. Her bir hayvan için hazırlanan preparatlardan en az 200 sperm sayıldı. Sayımlar iki kez tekrarlanarak bulunan sonuçların ortalamaları değerlendirildi.

3.3. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS 20 Windows İstatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Gruplar arası çoklu karşılaştırmalar One-way ANOVA sonrası post hoc çoklu karşılaştırma testlerinden TUKEY HSD, LSD ve Tamhane testleri ile yapıldı. Testislerin morfolojik ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması Tukey HSD testi ile yapıldı. Sperm Kruger strict morfoloji analiz sonuçlarının karşılaştırılması LSD ve Tamhane testleri uygulandı. Johnsen skorları karşılaştırmasında Tamhane testi uygulandı. Apoptotik indekslerinin karşılaştırılmasında Tukey HSD ve ayrıca Kruskal-Wallis H testi ile karşılaştırıldı. İstatistiksel analizler sonucunda p değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

Çalışmaya dahil edilen tüm sıçanlardan hazırlanan hematoxilen eozin boyalı preparatlar araştırma ışık mikroskopunda histopatolojik olarak analiz edildiler. Elde edilen sonuçlar ağırlıklı grup ortalamaları istatistiksel olarak karşılaştırılarak gruplara ait bulgular elde edildi (Tablo 4.1.1).

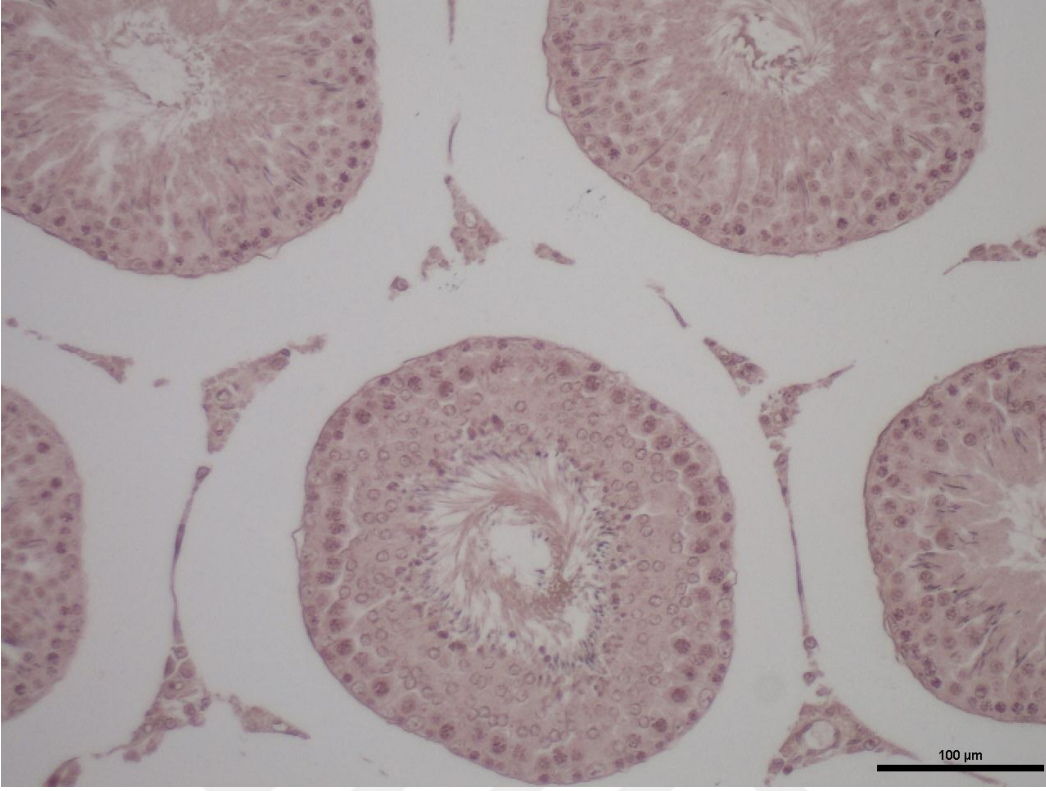
Kontrol grubundaki sıçanların testis mikroskopisi birkaç preparasyon artefaktı dışında genel olarak normal seminiferöz tübül morfolojisinde idi. Seminifer tübül epiteli bazal lamina üzerine oturmuş Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlardan başlayıp spermiyuma kadar olan spermatogenik seriye ait tüm hücrelerin normal sıra ve yapıda oldukları tespit edildi. Tübüller arası alandaki interstisyel dokudaki başta Leydig hücre olmak üzere diğer hücrelerin ve vasküler yapıların da normal düzen ve yapıda oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.1.1). Dolayısıyla kontrol grubunun Johnsen skorlarının ağırlıklı ortalamasının diğer gruplara göre yüksek olduğu (9.67) hesaplandı. İstatistiksel olarak torsiyon ve tedavi grubundan farklı oldukları tespit edildi ($p=0.001$) (Şekil 4.1.5).

Torsiyon grubunda seminifer tübül germinal epitel Sertoli ve spermatogenik seri hücrelerinde düzensizlik, dejenerasyon ve kayıpların olduğu görüldü. Seminifer tübüllerin çoğunun bütünlüğü bozulmuş olup kimisinin komple erozyona uğradığı, içerisinde boşaldığı ya da çok az seminifer epitel hücre içerdiği, kimisinin aşırı derecede büzülmüş olduğu, kimisinin lümeninde hiç spermatozoaların olmadığı ya da yok denecek kadar az olduğu, kimisinin lümenin koagulatif nekrozlu olduğu ve bazal lamina detaçmanlarının sık görüldüğü tübüller ile karakterize idiler. Tübüllerin arasındaki interstisyel doku ve hücrelerinde de histolojik hasarın olduğu dikkati çekmekteydi. Özellikle interstisyel doku

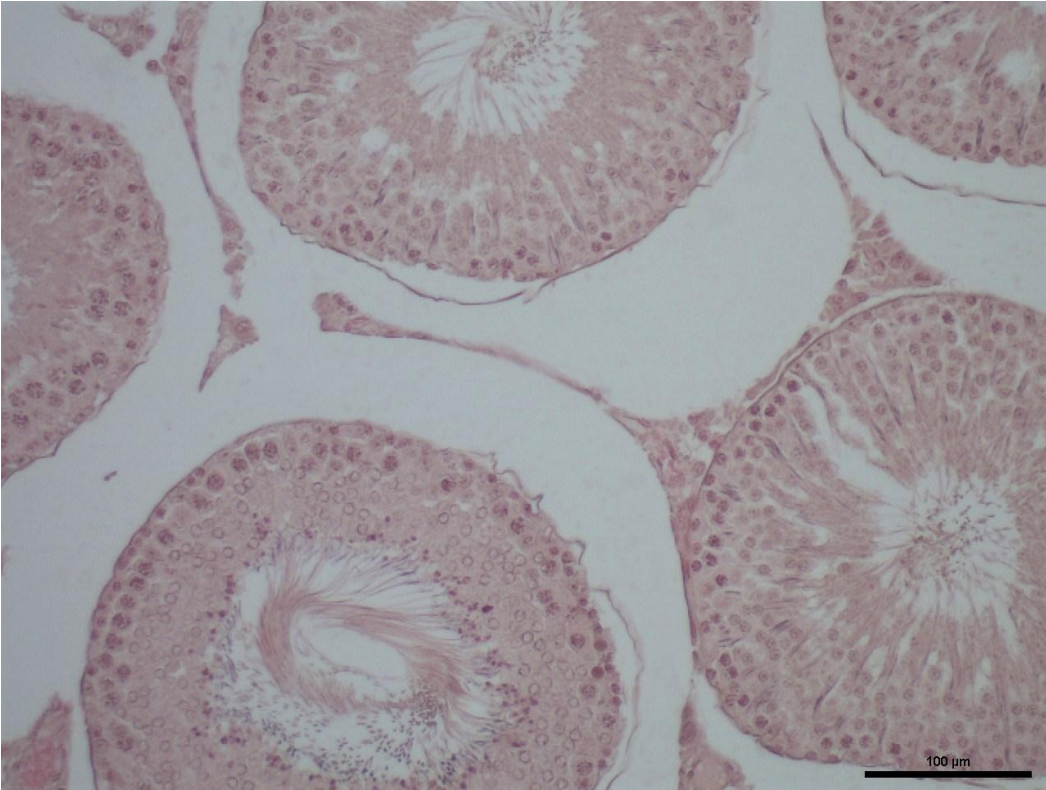
dilatasyonları ile yer yer şiddetli ödem, zeminde yoğun kan hücreleri, vasküler dilatasyonlar ve damarlarda konjesyon mevcuttu (Şekil 4.1.4). Bu bulgularla bağlantılı olarak grubun Johnsen skorlarının ağırlıklı ortalamasının diğer gruplara göre düşük olduğu (8.16) tespit edildi. İstatistiksel olarakta diğer tüm gruplardan farklı idi ($p<0.05$) (Şekil 4.1.5).

Ginkgo biloba verilerek tedavi edilen grupta torsiyon grubunda gözlenen histolojik hasarların hafiflemiş olduğu görüldü. Seminifer tübüllerin ve interstisyel doku bütünlüklerinin yer yer bozulmuş oldukları gözlemlense de hasarın torsiyon grubundaki kadar ciddi olmadıkları tespit edildi (Şekil 4.1.3). Bu histopatolojik bulgulara karşılık olarak grubun ağırlıklı Johnsen skorları ortalamasının kontrole göre düşük olduğu torsiyona göre yükselmiş olduğu (8.85) tespit edildi. İstatistiksel olarak hem kontrolden hem de kontrol lehinde olacak şekilde torsiyon grubundan farklı idi ($p<0.05$) (Şekil 4.1.5).

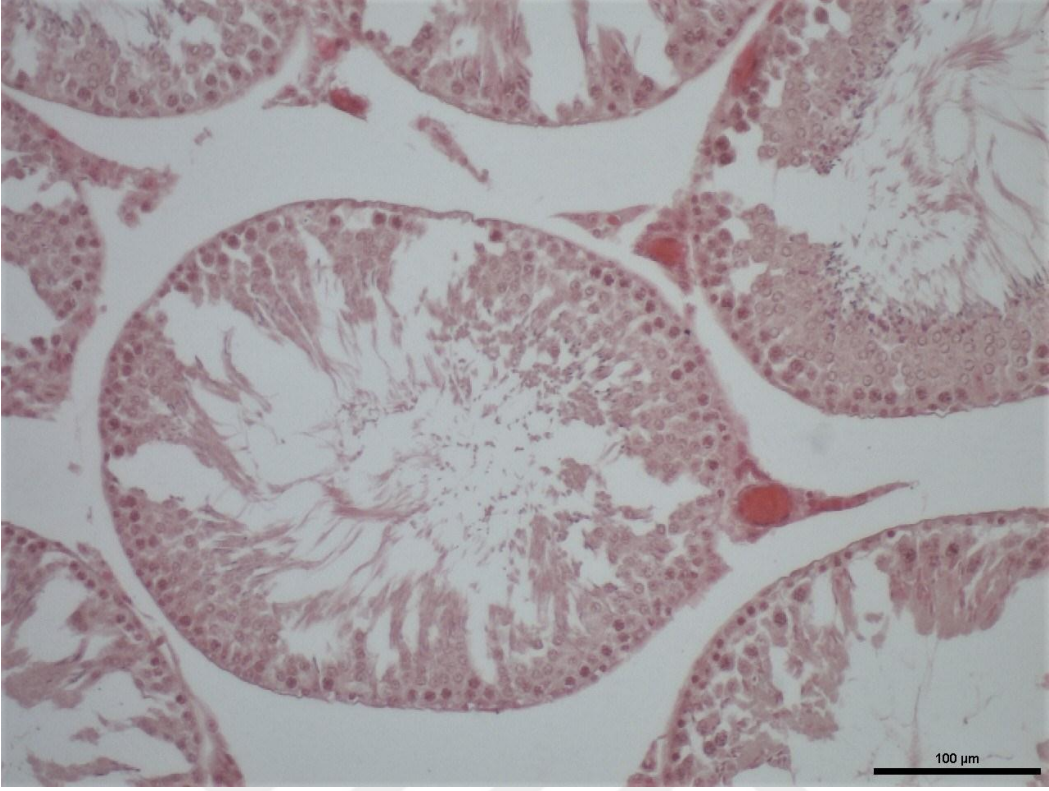
Herhangi bir işlem yapılmadan sadece Egb 761 verilerek Ginkgo bilobanın etkilerinin gözlemlendiği grupta testiküler doku histolojisinin kontrol grubundaki gibi olduğu gözlemlendi. Seminifer tübüllerin normal yapılarında oldukları, epitelde spermatogenik seri hücrelerinin tam olduğu, tübül lümeninde çok sayıda spermatozoa hücrelerinin mevcut olduğu gözlemlendi. Tübüller arası interstisyel dokunun da normal histolojik düzeninde oldukları tespit edildi (Şekil 4.1.2). Grubun ağırlıklı Johnsen skoru ortalamasının da kontrol grubundaki gibi yüksek olduğu (9.36) hesaplandı. İstatistiksel olarak kontrol grubu ile benzer oldukları tespit edildi ($p=0.25$) (Şekil 4.1.5).



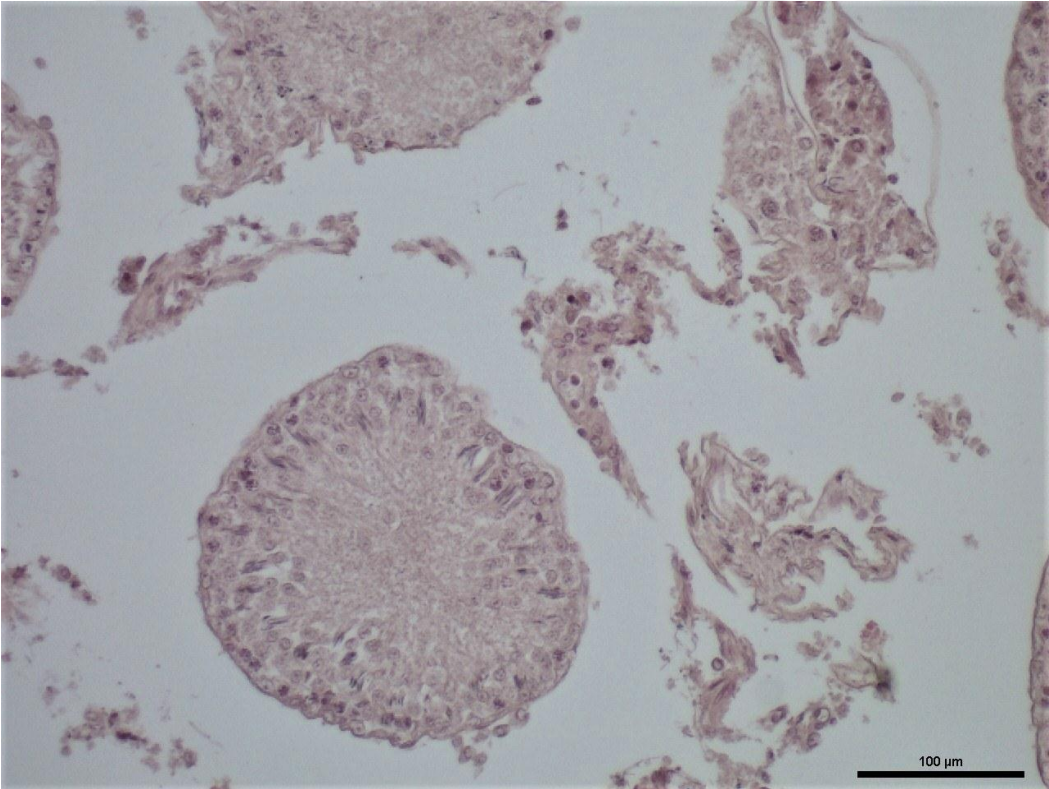
Şekil 4.1.1. Kontrol grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü (HE, 20XObj)



Şekil 4.1.2. Egb 761 grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü (HE, 20XObj)



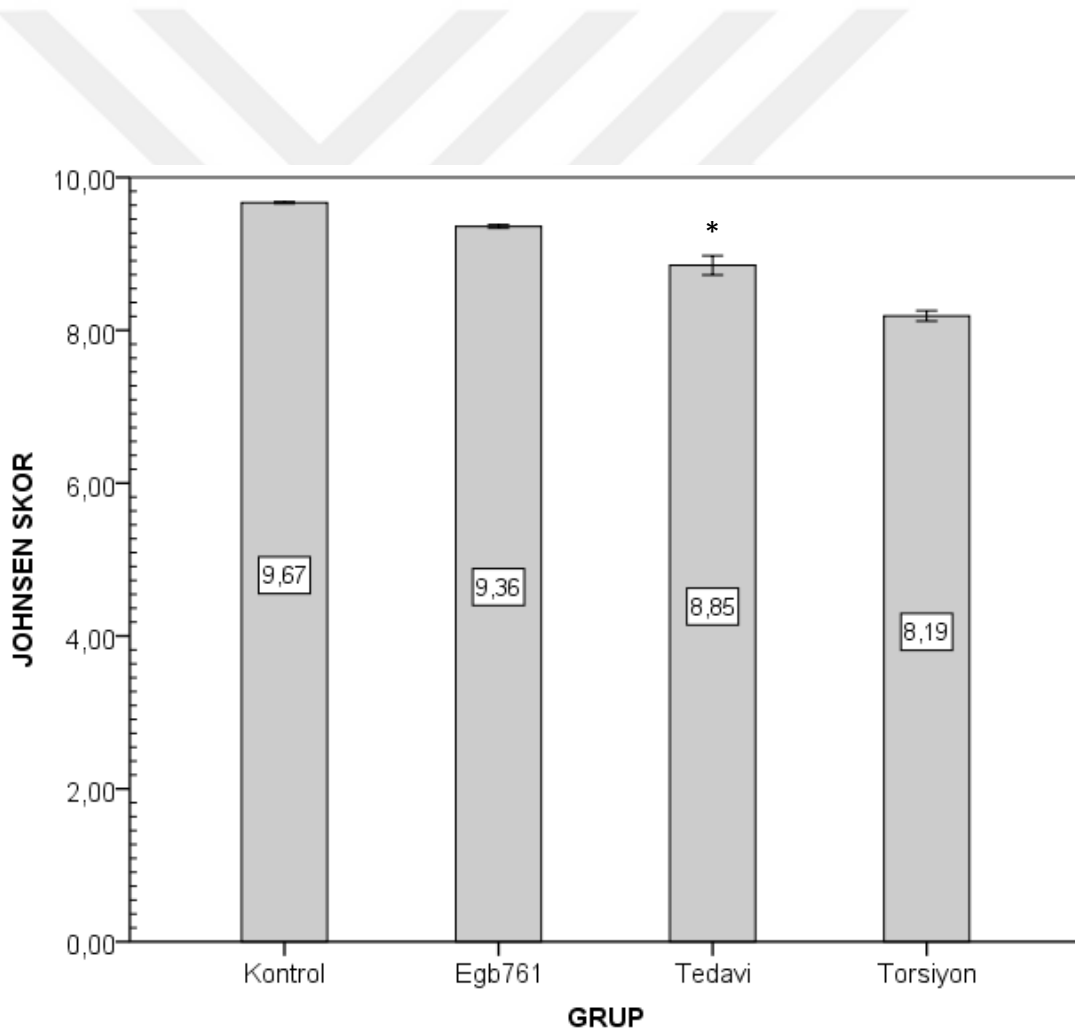
Şekil 4.1.3. Tedavi grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü (HE, 20XObj).



Şekil 4.1.4. Torsiyon grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü (HE, 20XObj).

Tablo 4.1.1. Johnsen skorlaması ağırlıklı grup ortalama değerleri (\pm Standart sapma, min: minimum, max: maksimum, değerler üzerindeki harfler istatistiksel anlamlılıkları gösterir.)

	GRUPLAR			
	Kontrol	Egb 761	Tedavi	Torsiyon
JOHNSEN SK	9.67 \pm 0.05 ^a	9.36 \pm 0.10 ^a	8.85 \pm 0.57 ^b	8.19 \pm 0.28 ^c
(min-max)	(9.74-9.56)	9.54-9.20	9.28-7.66	8.57-7.68



Şekil 4.1.5. Johnsen skorlaması istatistik sonuçlarının grafiği (*: p=0.001)

4.2. Apoptotik Bulgular

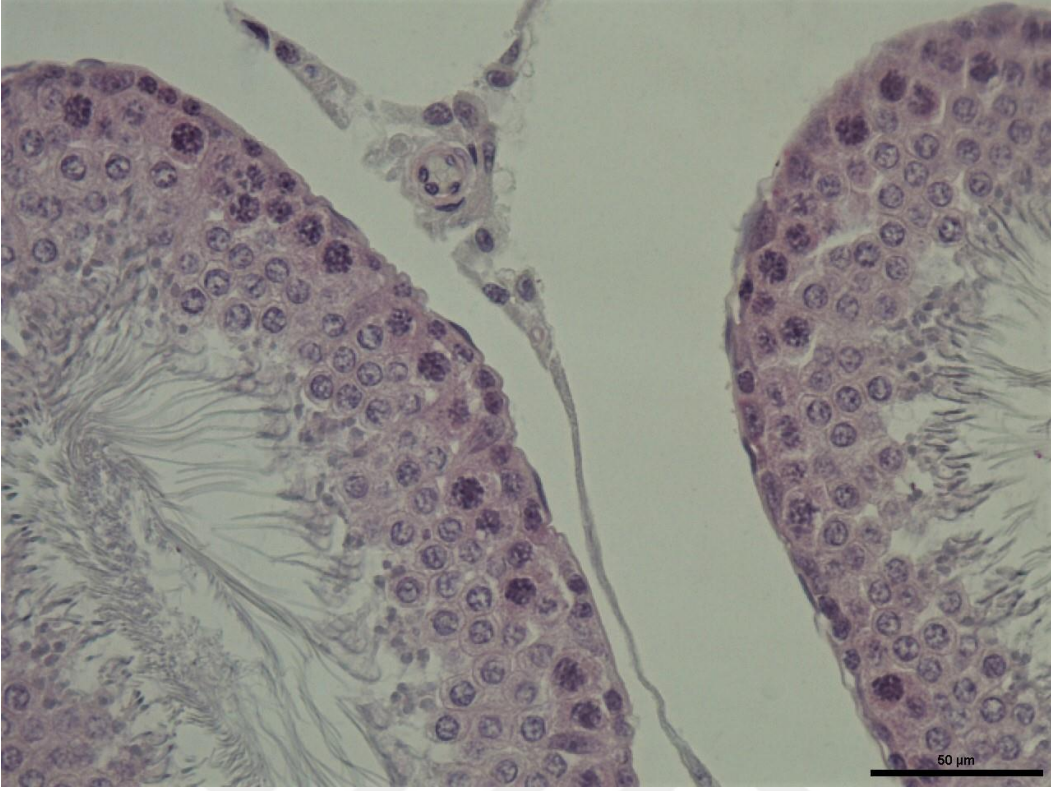
Çalışmaya dahil edilen tüm gruplardaki sıçanlardan elde edilen testislerden alınan ince kesitlerin TUNEL boyama yöntemi ile boyanarak apoptotik hücrelerin işaretlenmesi sağlandı. TUNEL boyama yöntemi hücre çekirdeğindeki DNA fragmentasyonu analiz etmemize yarayan bir yöntemdir. Bu boyama yöntemi sayesinde apoptoza giren hücreleri tespit etmek mümkündür. Apoptozise uğrayan hücrelerin fast red kromojeni vasıtası ile mikroskopta parlak kırmızı renk tonunda boyanmaları sağlanır.

Materyal metot bölümünde anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen grupların apoptotik hücre indekslerin grup ortalama sonuçları Tablo 4.2.1 ve Şekil 4.2.5’de gösterilmiştir.

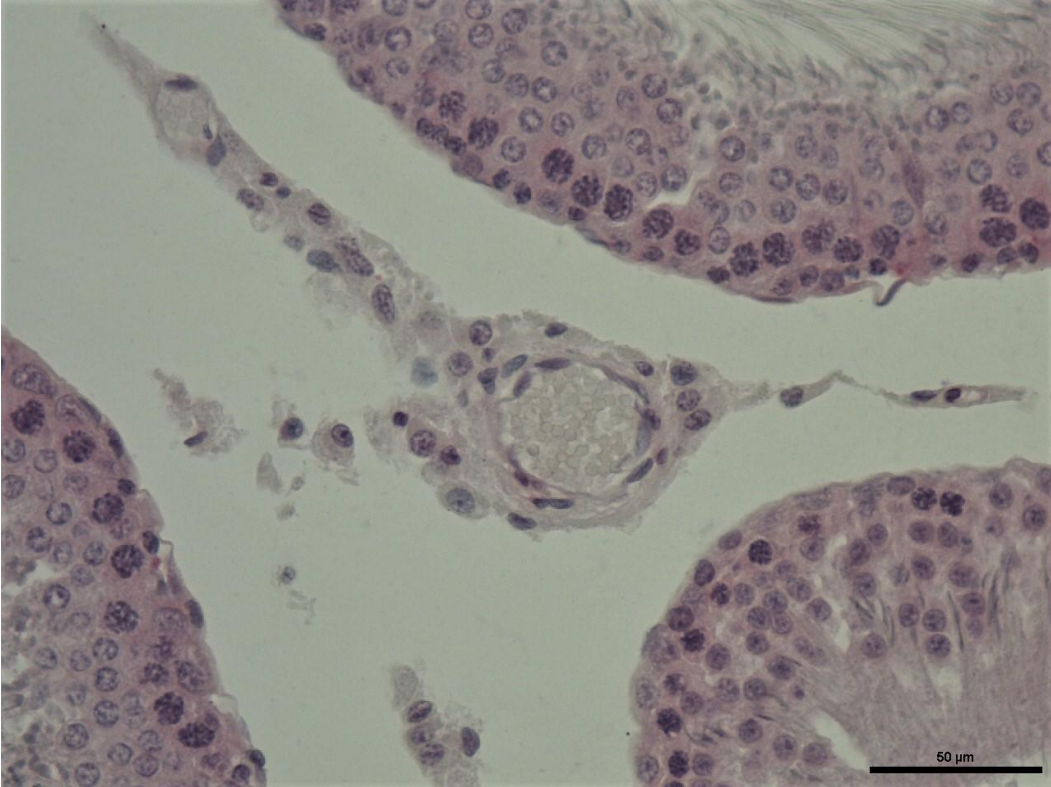
Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi histopatolojik sonuçlarla örtüşecek şekilde apoptotik hücre indekslerin torsiyon grubunda en yüksek olduğu (3.36) tespit edildi (Şekil 4.2.4). İstatistiksel olarak hem kontrol hem de diğer iki gruptan da farklı oldukları hesap edildi ($p<0.05$).

Kontrol grubunun apoptotik hücre indeksinin en düşük (0.82) olduğu (Şekil 4.2.1) tespit edildi. Egb 761 grubunda apoptotik hücre indekslerinin ortalamasının hafif artmış (1.22) gibi görünse de istatistiksel olarak kontrol ile aynı oldukları tespit edildi ($p=0.33$) (Şekil 4.2.4).

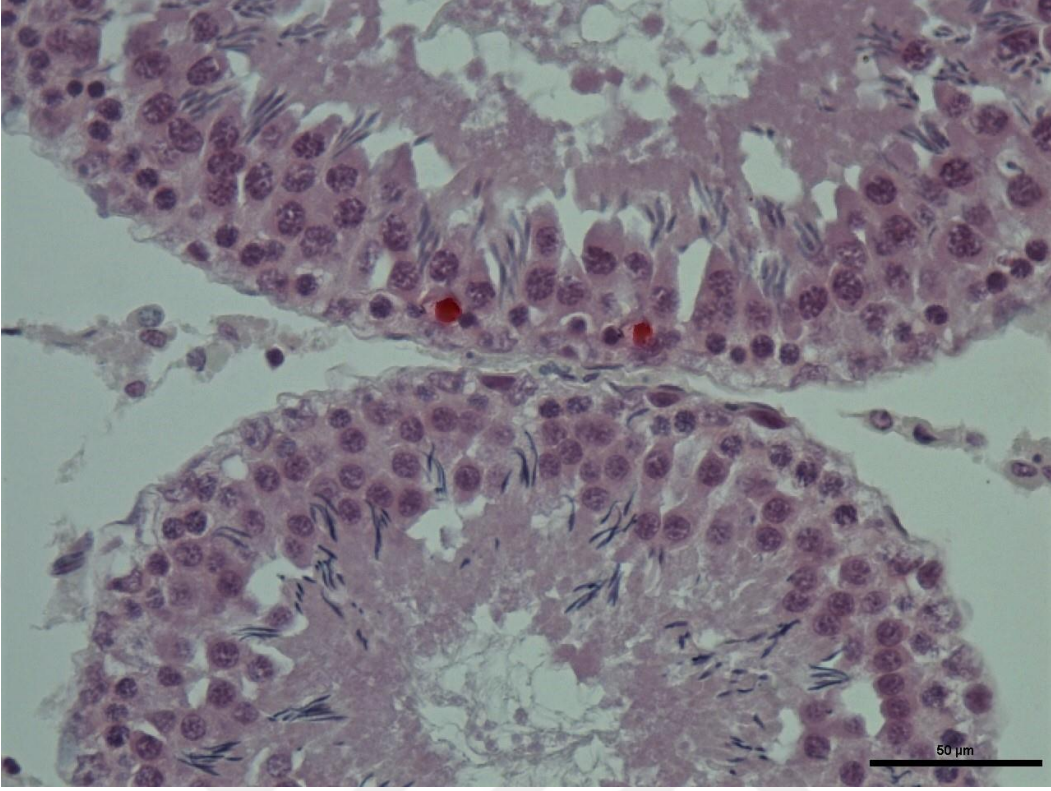
İskemi reperfüzyon hasarına karşı Egb 761’in koruyucu ve tedavi edici etkilerinin araştırıldığı deney grubunda ise apoptotik indeksin kontrol ve Egb 761 gruplarına göre artmış (1.34) torsiyon grubuna göre ise düşük olduğu tespit edildi (Şekil 4.2.2). İstatistiksel olarak torsiyondan farklı olduğu ($p=0.001$) diğer gruplar ile benzer oldukları ($p>0.05$) hesap edildi.



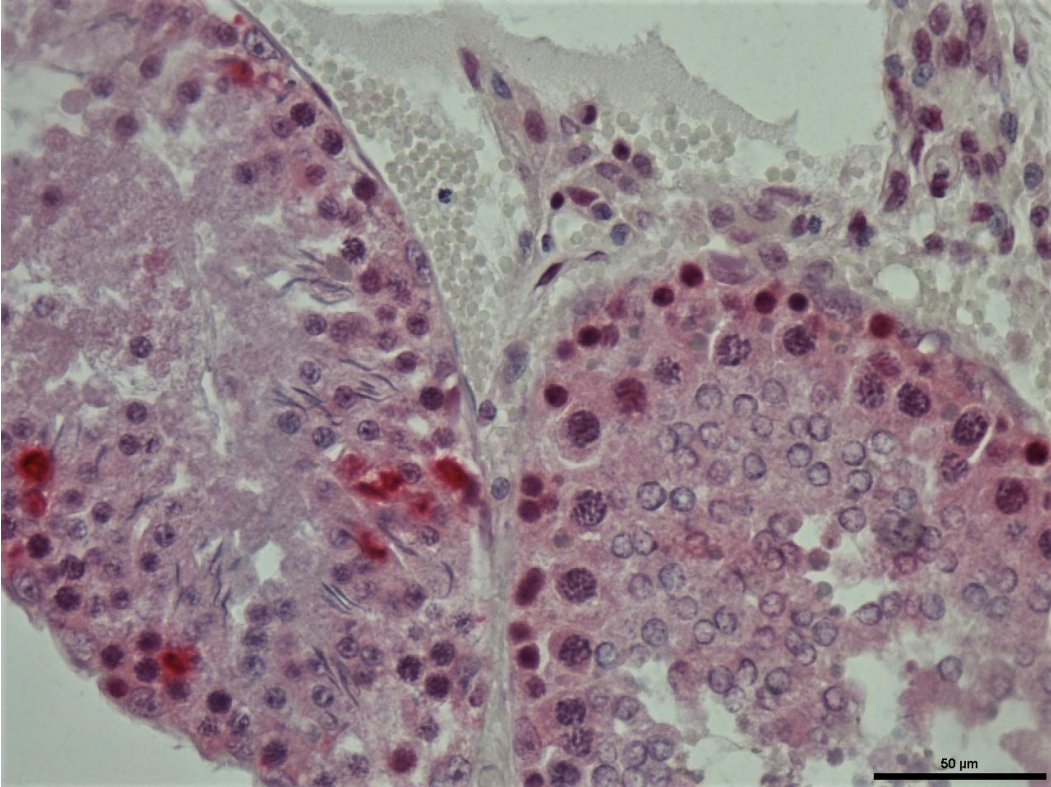
Şekil 4.2.1. Kontrol grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü (TUNEL, 40XObj).



Şekil 4.2.2. Egb 761 grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü (TUNEL, 40XObj).



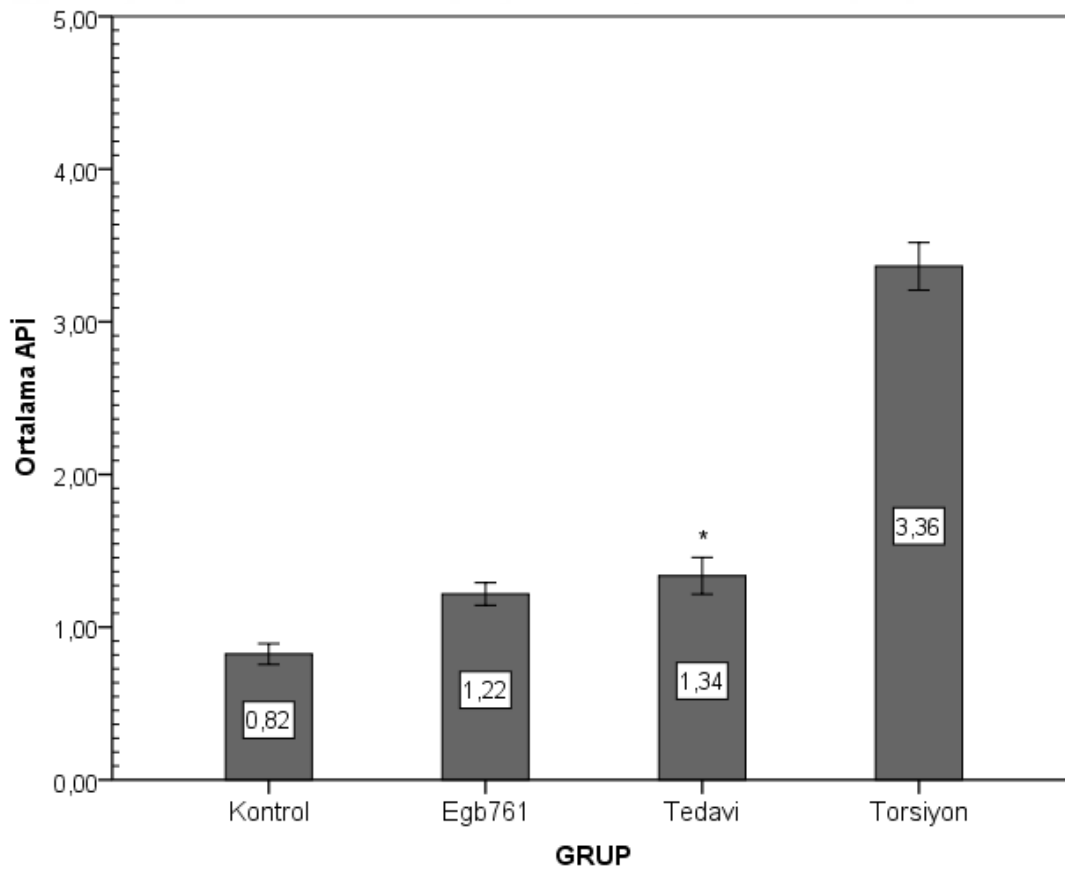
Şekil 4.2.3. Tedavi grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü (TUNEL, 40XObj).



Şekil 4.2.4. Torsiyon grubu testis dokusu mikroskopik görüntüsü (TUNEL, 40XObj).

Tablo 4.2.1. Grupların ortalama apopitotik hücre indeksi değerleri (\pm : SEM, APİ: Apopitotik indeks, min: minimum, max: maksimum, değerler üzerindeki harfler istatistiksel farkları gösterir)

	GRUPLAR			
	Kontrol	Egb-761	Tedavi	Torsiyon
APİ	0.82 \pm 0.07 ^a	1.22 \pm 0.07 ^a	1.34 \pm 0.12 ^{ab}	3.36 \pm 0.16 ^c
(min-max)	(1.00-0.60)	(1.60-1.00)	(1.68-1.00)	(4.40-2.64)

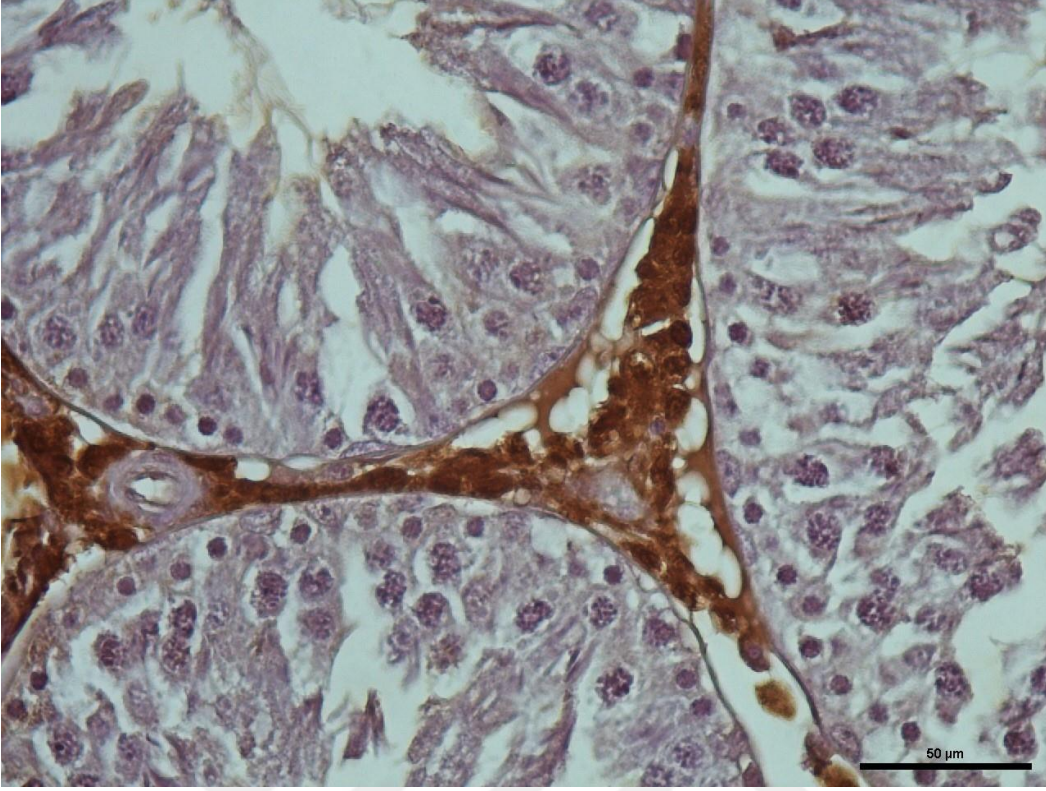


Şekil 4.2.5. Apopitotik hücre indeksleri grup ortalama değerlerinin karşılaştırılmalı grafiksel görünümü (*: $p < 0.05$)

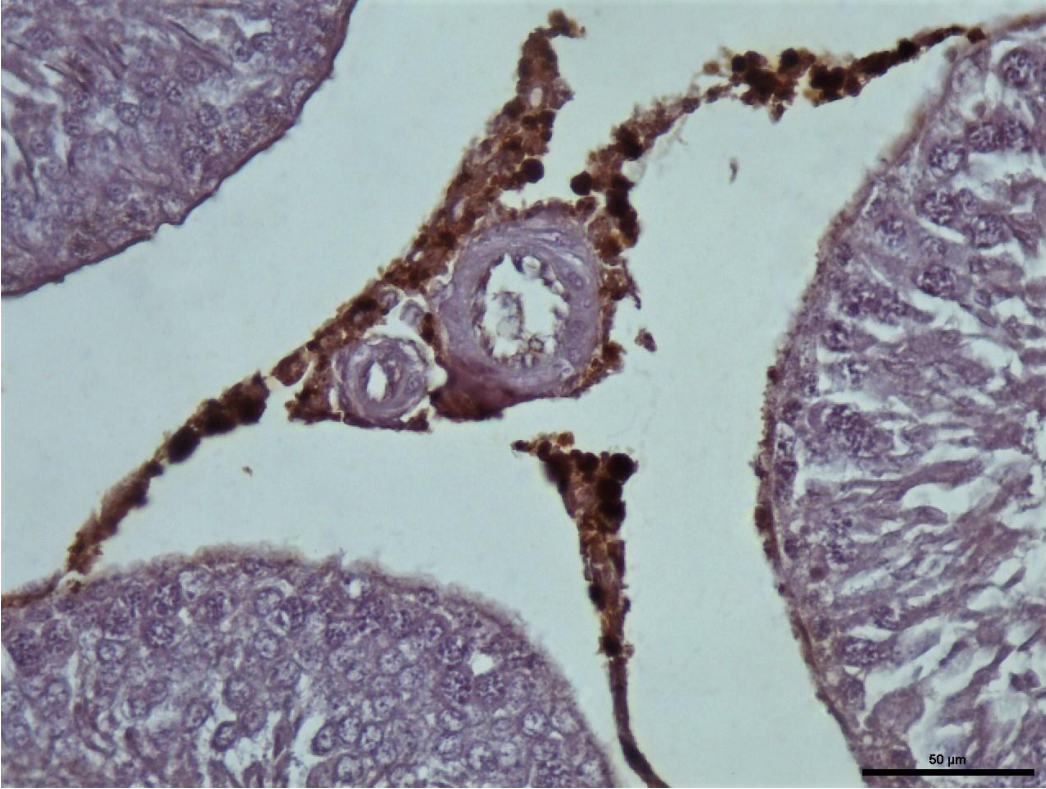
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmaya dahil edilen sıçanların testislerinden polilizinli lamlara alınan kesitler indirekt immünohistokimya protokolüne (Tablo 3.2.3.2.1) göre LH primer antikoru ile boyandılar. Boyanmanın beklendiği gibi seminifer tübüllerde olmayıp interstisyel dokuda Leydig hücrelerinde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3.1,2,3,4). Elde edilen preparatlar boyanma şiddeti reaksiyonuna göre analiz edildiler ve sonuçlar H-Skorlama sistemine göre semi kantitatif olarak derecelendirildi (Şekil 4.3.5)

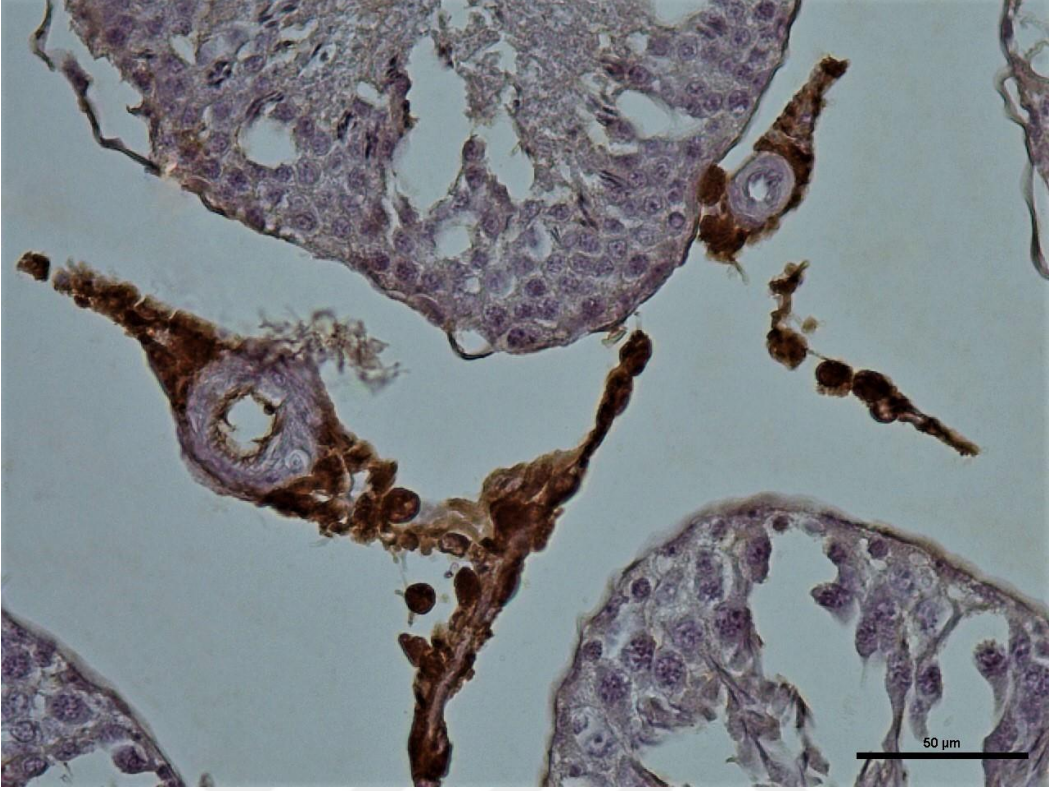
İmmün boyanma şiddetleri H-Skorları ağırlıklı ortalamalarının torsiyon grubunda biraz azalmış (167.57) ancak istatistiksel olarak kontrolden (173.02) farklı olmadığı tespit edildi ($p=0.057$). Tedavi grubunda immünreaktivitenin artışı söz konusu idi. Tedavi grubunun H-Skor ortalama değerinin (182.43) istatistiksel olarak kontrolle benzer ($p=0.11$) torsiyon grubununkinden ise farklı olduğu tespit edildi ($p=0.03$). İmmün boyanma şiddetlerinin en yoğun olduğu grup ise herhangi bir işlem yapılmaksızın sadece Egb 761 grubunda olduğu gözlemlendi. Dolayısı ile immün boyanma şiddetleri H-Skor ortalamasının yüksek olduğu (187.28) hesap edildi. İstatistiksel olarak analiz edildiğinde bu grubun tedavi grubu ile benzer ($p=0.66$) diğer gruplardan ise farklı olduğu belirlendi ($p=0.005$; $p=0.001$) (Tablo 4.3.1 ve Şekil 4.3.1,2,3,4).



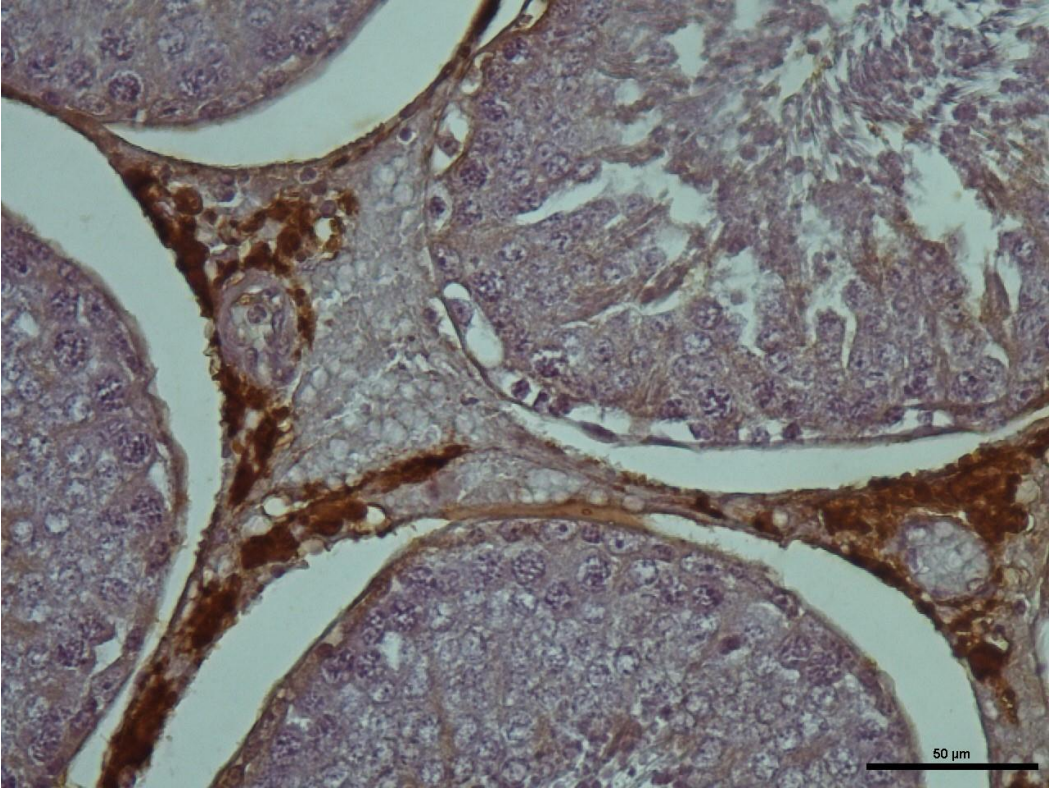
Şekil 4.3.1. Kontrol grubu LH immün ekspresyonu (İHK DAB, 40XObj)



Şekil 4.3.2. Egb 761 grubu LH immün ekspresyonu (İHK-DAB, 40XObj)



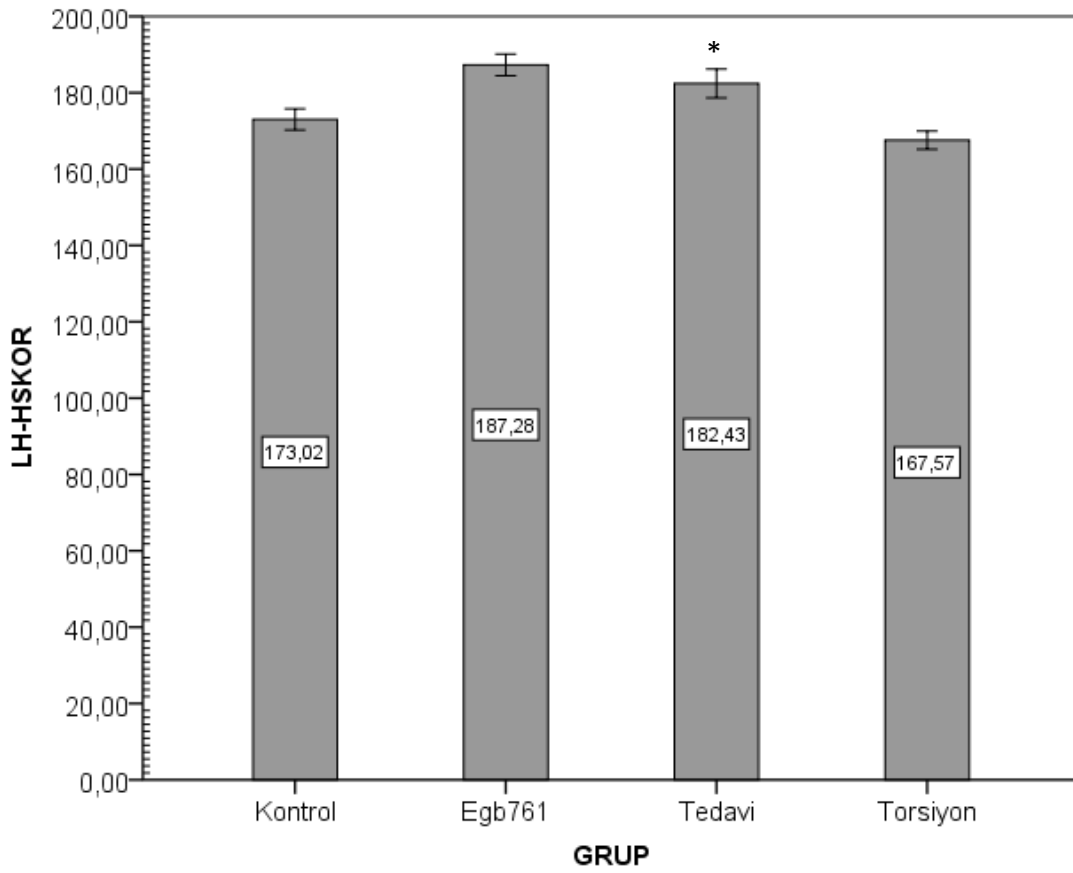
Şekil 4.3.3. Tedavi grubu LH immün ekspresyonu (İHK-DAB, 40XObj).



Şekil 4.3.4. Torsiyon grubu LH immün ekspresyonu (İHK-DAB, 40XObj).

Tablo 4.3.1. Grupların İHK boyanma şiddeti H-Skorları ortalama değerleri (SS: standart sapma, değerler üzerindeki harfler istatistiksel farkları gösterir)

	GRUPLAR			
	Kontrol	Egb 761	Tedavi	Torsiyon
H-SKOR	173.02 ^{ab}	187.28 ^{cd}	182.43 ^{cb}	167.57 ^a
SS	21.53	21.95	29.30	18.45



Şekil 4.3.5. Grupların İHK boyanma şiddeti H-Skorları ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırılması (*: $p < 0.05$)

4.4. Sperm Morfolojik Bulgular

Deney sonunda sıçanların epididimlerinden elde edilen spermelerin materyal metotta anlatıldığı şekilde lamlara yayılıp Diff-quick boyama ile boyanan sperm hücreleri modifiye Kruger strict kriterlerine göre mikroskopik olarak analiz edilerek her gruba ait aşağıdaki sonuçlar elde edildi (Tablo 4.4.1). Her gruba ait birer temsili mikroskopik görüntü aşağıda Şekil 4.4.1,2,3,4'te gösterilmiştir.

Normal sperm sayıları torsiyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde diğer gruplara göre belirgin bir azalmanın olduğu tespit edildi ($p=0.001$). Normal sperm sayılarının sırası ile tedavi, kontrol ve Egb761 gruplarında gittikçe artmıştı. Egb761 grubundaki artış kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0.003$). Tedavi grubunda ise kontrole göre anlamlı bir şekilde azalma ($p=0.019$), torsiyon grubuna göre ise anlamlı bir şekilde artış olduğu ($p=0.001$) tespit edildi.

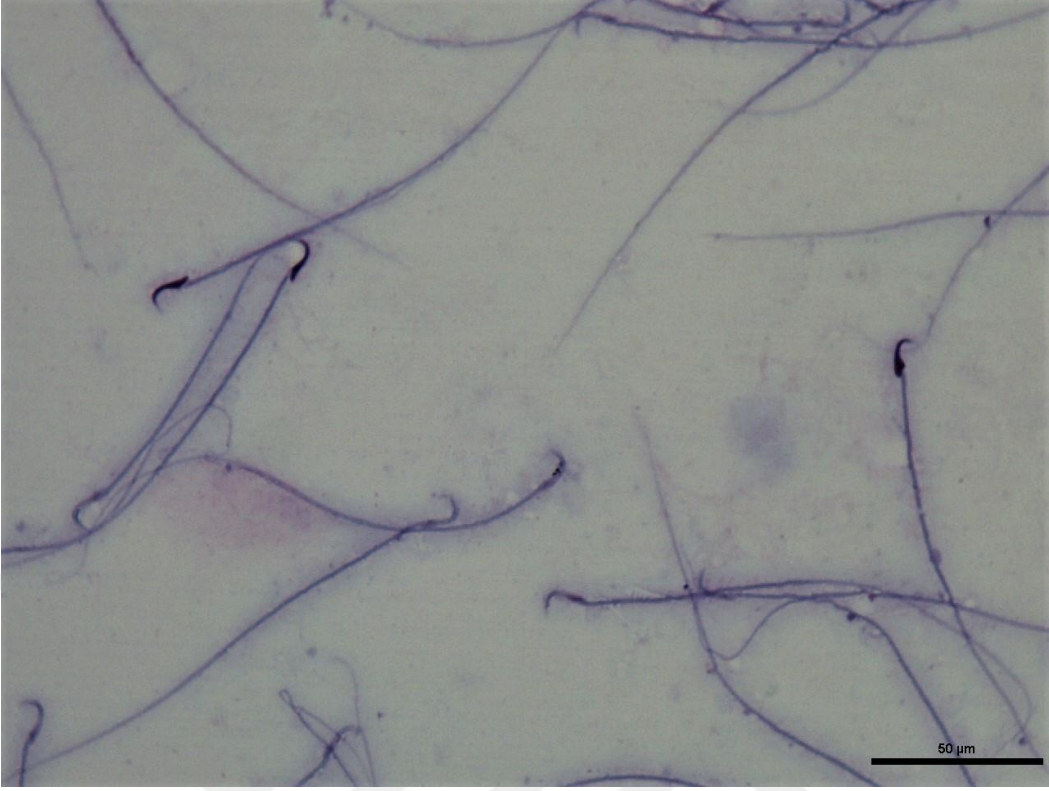
Baş anomalili spermelerin sayısının kontrol grubuna göre torsiyon grubunda istatistiksel anlamlı olacak şekilde artmış olduğunu ($p=0.050$) tespit ettik (Şekil 4.4.4). Diğer gruplar arasında ise baş anomalisi açısından istatistiksel olarak bir farklılık tespit edilemedi.

Boyun anomalili olan spermelerin sayısının torsiyon grubunda kontrol ve Egb gruplarına göre istatistiksel anlamlı olacak şekilde artmış olduğunu ($p=0.001$) tespit ettik. Tedavi grubunda ise torsiyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma tespit edildi ($p=0.410$). Kontrol ve Egb gruplarının ise istatistiksel olarak benzerdiler. ($p=0.406$).

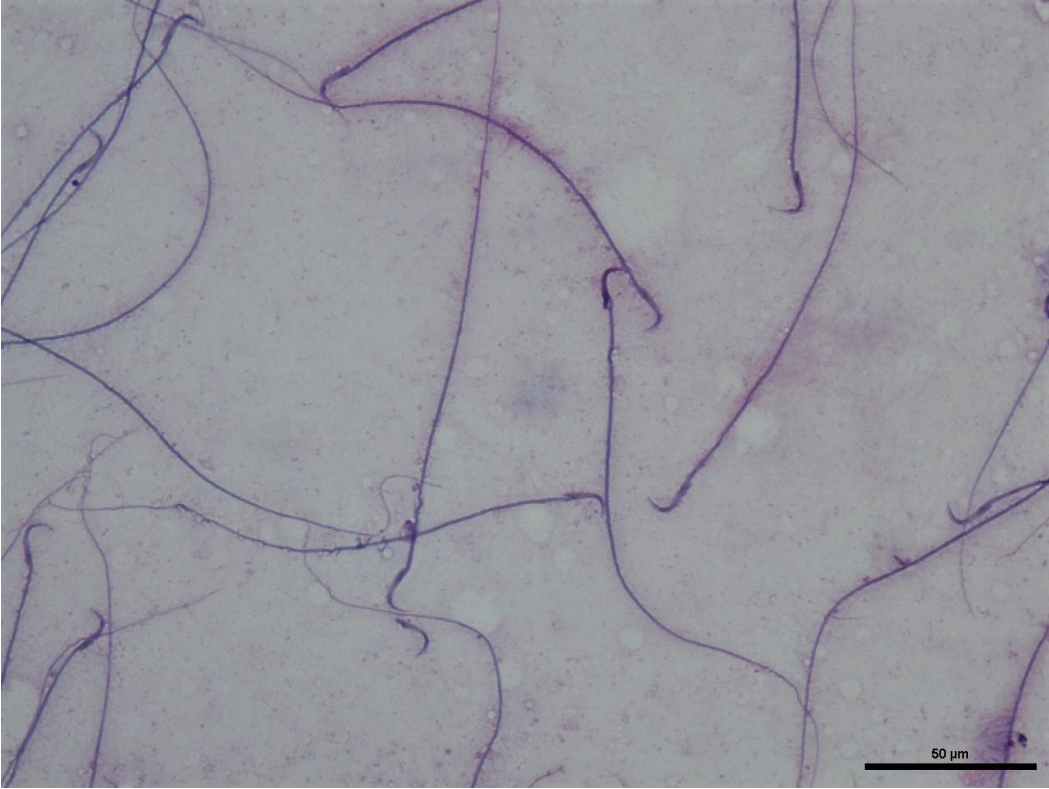
Kuyruk anomalili spermelerin torsiyon grubunda diğer gruplar ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardı ($p=0.000$). Tedavi grubunda (Şekil 4.3.3) kuyruk anomalili spermelerin sayısı torsiyona göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde

azalmış ($p=0.001$), kontrole göre ise istatistiksel olarak anlam ifade etmeyecek hafif bir artış mevcuttu ($p=0.993$). Egb 761 grubunda ise kuyruk anomalisinin en az olduğu tespit edildi (Şekil 4.4.2).

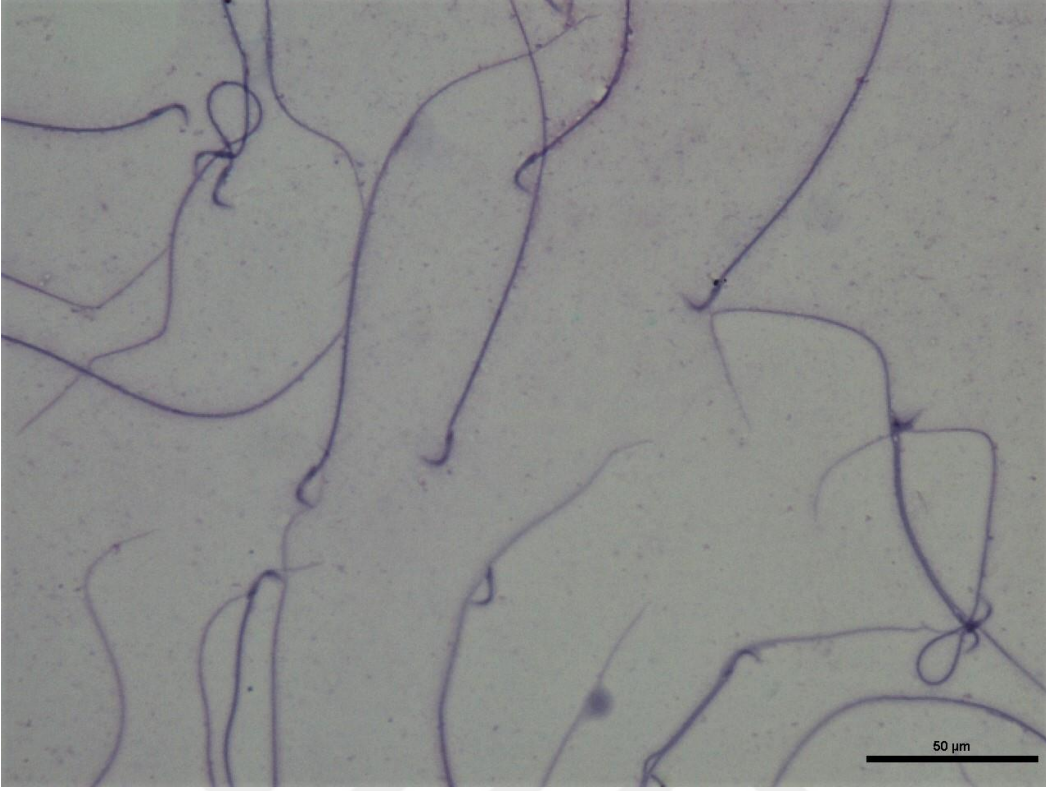
Anomaliler total olarak değerlendirildiklerinde ise gruplar istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde birbirlerinden farklı idiler. Torsiyon grubunda total anomalinin diğer gruplara göre en fazla artmış olduğu tespit edildi ($p=0.001$). Tedavi grubunda total anomalinin torsiyona göre istatistiksel olarak azalmıştı ($p=0.000$), kontrole göre ise yükselmişti ($p=0.021$). En fazla azalma ise istatistiksel olarak kontrolden bile farklı olacak şekilde Egb 761 grubunda tespit edildi ($p=0.003$) (Tablo 4.4.1, Şekil 4.4.1,2,3,4,5).



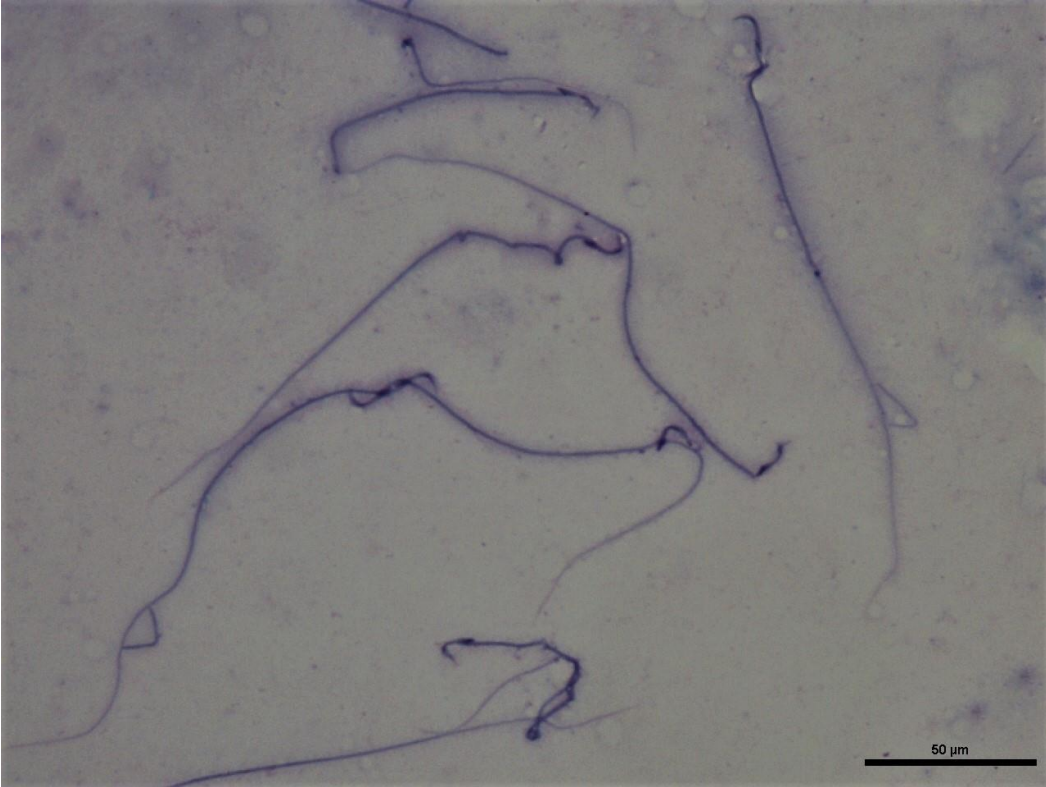
Şekil 4.4.1. Kontrol grubu sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quick, 40xObj).



Şekil 4.4.2. Egb 761 grubu sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quick, 40xObj).



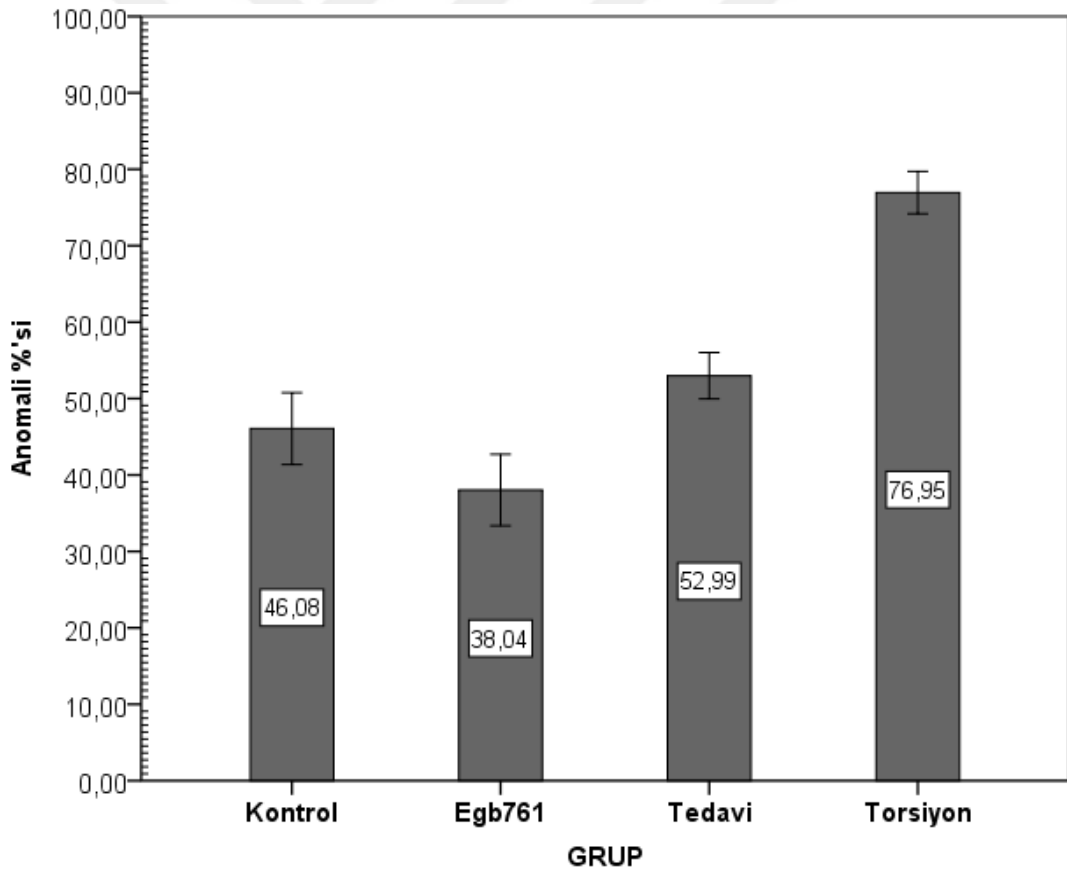
Şekil 4.4.3. Tedavi grubu sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quick, 40xObj).



Şekil 4.4.4. Torsiyon grubu sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quick, 40xObj).

Tablo 4.4.1. Spermilerin Kruger strict morfoloji analizlerin grup ortalama değerleri (\pm : SEM, değerler üzerindeki harfler her parametre açısından gruplar arasındaki istatistiksel farkları ifade eder)

	Normal	Anomali			
		Baş	Boyun	Kuyruk	Total
Kontrol	108.00 \pm 3.54 ^A	16.00 \pm 1.93 ^A	20.86 \pm 1.58 ^A	55.43 \pm 2.25 ^A	92.29 \pm 3.56 ^A
Egb 761	123.88 \pm 3.32 ^B	16.63 \pm 1.21 ^{BC}	16.13 \pm 1.81 ^{BA}	43.25 \pm 3.40 ^B	76.13 \pm 3.32 ^B
Tedavi	94.17 \pm 2.39 ^C	17.33 \pm 3.30 ^{BC}	32.33 \pm 3.03 ^{CD}	56.50 \pm 2.40 ^A	106.17 \pm 2.63 ^C
Torsiyon	46.13 \pm 1.96 ^D	23.88 \pm 1.88 ^C	37.25 \pm 2.20 ^D	92.88 \pm 2.09 ^C	154.00 \pm 1.98 ^D



Şekil 4.4.5. Grupların anomalili sperm yüzdesinin grafiksel olarak karşılaştırılması.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Testislerin gelişimi fetal hayatın 6–7. haftasında başlayıp ergenliğe kadar devam eder. Gubernakulum yedinci haftada ortaya çıkar. Fetal testis 8. haftada hormon sekresyonuna başlar. Testisler 23. haftaya kadar hareketsiz olup 24–30. haftalarda inguinal kanalı geçerek skrotuma iner (McAninch, 2000). Testislerin inişleri esnasında ya da hayatın herhangi bir döneminde değişik nedenlerden kaynaklanan torsiyon ortaya çıkabilir. Testislerin torsiyonuna bağlı olarak iskemi ve akabinde özellikle testiküler doku hasarları beklenen bir durumdur.

Testis torsiyonu sonucunda testiste meydana gelen hasar torsiyonun derecesine ve süresine bağlıdır. Bu nedenle testis torsiyonu acil müdahale gerektiren cerrahi bir durumdur. Erken müdahale testisin kurtarılma olasılığını artırır. Buna rağmen testislerin ancak %32'si kurtarılabilir (Krarup, 1978). Deneysel testis torsiyonunda tam iskemi oluşturabilmek için testisler 720° torsiyone edilmelidir. Çalışmamızda deneysel torsiyonla oluşturulan üç saatlik iskemi sonrası testislerin detorsiyon edilmesiyle reperfüzyon sağlanmıştır. Reperfüzyondan iki saat sonra hayvanların sol testisleri eksize edilmiştir.

Consentino ve ark. değişik sürelerde uyguladıkları torsiyondan sonra testisleri incelediklerinde, üç saat boyunca 720° torsiyondan sonra testiküler kan akımının geriye dönmediğini ve dokuda nekroza kadar ilerleyen ciddi değişikliklerin görüldüğünü tespit etmişlerdir (Consentino ve ark., 1985).

Testis torsiyonu doku hipoksisine ve germinal hücre nekrozuyla fertilitede azalmaya ya da infertiliteye sebep olmaktadır. Bazı çalışmalarda arteriyel tıkanıkta iki saat, venöz tıkanıklıkta ise altı saat içinde testis nekrozu geliştiği tespit edilmiştir (Melekos ve ark., 1988). İskemik durumlarda ilk 6 saat içerisinde tedavi edilmeyen testislerde geri dönüşümü olmayacak şekilde hasarların olduğu ve testislerin kaybedilebileceği

bildirilmektedir (Prater ve Overdorf, 1991). Araştırmalar ratlarda bir saat süren testis torsiyonunda spermatogenik seri bozulmasının ilk olarak seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerinde olduğunu göstermişlerdir (Harrison ve Weiner, 1949). Testis kan akımının devamlılığı testislerin yaşamı ve fonksiyonları ve dolayısıyla fertilité için mutlaka gereklidir. Deneysel testis torsiyonu merkezi kan basıncında testisin kan akımını azaltır. Sonucunda ise germ hücresinde apoptoz, testis atrofisi ve spermatogenezin bozulması ile sonuçlanır (Turner ve ark., 1996).

Testis torsiyonu çalışmamız iskemi-reperfüzyon formunda bir hasarlanmadır. Testis torsiyonu sırasında hasar iskemi ve doku hipoksisine bağlı olarak gelişir. İskemik dokularda ilk önce akut dönemde görülen vasküler yanıt gerçekleşir. Çalışmamızda da görüldüğü gibi; damar geçirgenliği artar ve buna paralel ekstrasvazasyon ile ödem ortaya çıkar. İskemik dokuda oksidatif metabolizma yerini hipoksik metabolizmayla devam eder. Dokularda hasar oluşumu sadece iskemi süresinin uzunluğuna bağlı olmayıp reperfüzyon süresi de hasarda kritik rol oynamaktadır. İskemi ve reperfüzyona bağlı serbest radikal oluşumu ile ilişkili apoptotik hücre hasarı oluşmaktadır (Zar ve ark., 1998). Yapmış olduğumuz bu çalışmamızda da apoptotik hücre indekslerinin yüksek düzeyde bulunması bu literatür bilgileri ile örtüşmektedir.

Reperfüzyon sonrası ortaya çıkan SOR hücrede özellikle hücre membranları üzerine olumsuz etki gösteriler. Bu yapılar üzerindeki fosfolipidlerle reaksiyona girerek peroksidasyona sebep olurlar. Nihayetinde hücre hasarlarının başlaması ile birlikte dokularda hasara neden olurlar. Testisteki hasarın derecesini belirlemek için en önemli ve güvenilir belirleyicilerden biri histopatolojik incelemedir. Johnsen skorlaması tübüllerdeki germ hücreleri ve Sertoli hücreleri hakkında bilgiler vermektedir. Dolayısıyla spermatogenezin etkilenip etkilenmediği veya etkilenme düzeyi hakkında veriler

vermektedir. Çalışmamızda da Johnsen skorlaması yapılarak seminifer tübül epitel hasarı ve spermatogenik seri hücreler hakkında veriler elde ederek spermatogenez kalitesi hakkında sonuçlar elde edildi. Çalışmamızın Johnsen skorlarının torsiyon grubunda artmış olduğu, antioksidan tedavi grubunda ise kontrol lehinde yüksek olarak tespit edildi. Bu sonuçlarımızın yapılan çalışmalar ile genel olarak uyumlu olduğu torsiyonla doku hasarının artmış olduğu görüldü.

Testisteki iskemi reperfüzyon hasarında germ hücrelerinin daha çok etkilenmiş olması oldukça toksik olan lipid peroksidasyon ürünlerinin peritübüler Leydig ve Sertoli hücrelerinden çok germ hücrelerinde olduğunu düşündürmektedir (Saba ve ark., 1997). Yapılan çalışmalarda Harrison ve arkadaşlarının söylediklerinin aksine ilk olarak hasar gören hücrelerin Sertoli hücrelerinden ziyade spermatogonya ve primer spermatositlerin olduğu bildirilmektedir (Markey ve ark., 1995; Somuncu ve ark., 2006; Lysiak ve ark., 2001).

İskemi veya hipoksiye maruz kalmış testisler bu duruma artmış damar geçirgenliğiyle birlikte hücre içi ve dışında ödem ile cevap verirler. Testisteki damar geçirgenliği bir saat torsiyon ve 24 saatlik reperfüzyon sonucunda artmaktadır (Turner ve ark., 1996). 24 saat süren reperfüzyon sonucunda toksik aldehit, hidroperoksid ve peroksilipid düzeyleri; artmış damar geçirgenliği ve antioksidan miktarındaki azalmaya bağlı olarak yükselmekte bu ise germ hücrelerinde ölüme kadar giden yıkıma yol açmaktadır (González-Flecha ve ark., 1993). Bunların neticesinde de hücre apoptozu ya da nekroz gelişmektedir (Zar ve ark., 1998). Çalışmamızın histolojik analizlerinde interstisyel alanlarda vasküler dilatasyonlar konjesyon ve yoğun ödem alanlarının torsiyon grubunda artış göstermiş olması ve apoptotik indekslerin yüksek olması bu literatür bilgileri ile örtüşmektedir.

Reperfüzyon detorsiyonla beraber O_2 ve besinlerin tekrar dokuya ulaşması demektir. 1980'lerin başlarında Mc Cord ve ark. çalışmalarında O_2 'nin tekrar dokuya dönmesinde dokuda meydana gelen hasarı arttırdığını gösterdiler (McCord, 1985). Peroksidanların ve antioksidanların dengesizliği oksidatif stres olarak adlandırılan potansiyel bir zarara yol açar. Spermatozoonlar oksidatif strese karşı oldukça hassastır. Bu süreç sperm plazma zarı ve DNA parçalanmasına hem nükleer ve hem de mitokondriyal genomlarında peroksidatif hasar kaynaklı bozulmaları indükler (Aitken ve Baker, 2006).

Germ hücre apoptozisi normal spermatogenezde sperm sayısının %25-75 oranında azalmasına neden olabilen spontan bir olgudur (Huckins, 1978). Apoptozise tüm germ hücrelerinde rastlanır (Allan ve ark., 1987; Kerr, 1992). %25 oranında tek testiküler torsiyonun infertiliteye neden olabildiği bildirilmiştir (Nguyen ve ark., 1999).

Çalışmalar testiste iskeminin kan-testis bariyerine de zarar verdiğini ve bunun sonucunda spermatogonya karşı oto-bağışıklık potansiyel riskine, ya da kontralateral testiküler hasara neden olduğunu göstermiştir (Arda ve ark., 2001). Turner ve ark. yapmış oldukları çalışmalarında testis torsiyonunun ilk saatini takiben 4 saatlik reperfüzyonda çalışmamız sonuçlarında da tespit edildiği gibi apoptozisi tetiklediğini ve antioksidan tedavi ile reperfüzyon hasarının azalmış olduğu sonucuna varmışlardır (Turner ve ark., 1996).

Yetersiz sperm fonksiyonu erkek infertilitesinin en yaygın nedenidir ve tedavisi zordur. ROS üretimi spermde normal fizyolojik bir süreç olup ROS özellikle immotil ya da morfolojik olarak anormal sperm hücreleri, lökositler ile morfolojik olarak normal ancak fonksiyonel olarak anormal spermatozoalar tarafından üretilmektedir (Köksal ve ark., 2012). Çalışmamızda iskemi-reperfüzyon sonrası sperm hücre üretiminin durumunu ve aynı zamanda Egb 761 tedavisi sonrasında sperm hücrelerinin sayısal ve morfolojik

analizleri sonucunda elde edilen veriler bu literatür sonuçları ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Antioksidan moleküller, anti-enflamatuar ve bağışıklık yanıtının modülasyonu dahil olmak üzere çeşitli biyolojik faaliyetlere ve farklı farmakolojik etkilere sahiptir. Egb 761 yoğun iltihap araçlarının ilişkili merkezi sinir sistemi hastalıkları, akut pankreatit, miyokardiyal ve intestinal iskemi / reperfüzyon hasarının tedavisinde kullanılır (Fouda ve ark., 2009).

Bazı çalışmalar, Ginkgo biloba yaprak özütünün kardiyovasküler, serebrovasküler nörolojik bozukluklar önlenmesi üzerinde yararlı etkileri olduğunu göstermiştir. İn vivo ve in vitro çalışmalar Egb 761 flavonoidler; serbest radikalleri temizlemek, lipid peroksidasyonu azaltmak ve antioksidan aktiviteleri artırabildiği ortaya konmuştur. Egb 761'in geniş spektrumlu serbest radikal uzaklaştırıcı olduğu iddia edilmiştir. Picemil ve ark. yaptıkları çalışma ile Egb 761 nin çok güçlü süperoksit radikal anyon süpürücü yeteneğini, SOD benzeri faaliyetlerini ve hepatik glutatyon düzeylerinde artışa sahip olduğunu bildirmişlerdir (Wang ve ark., 2008; Diwok ve ark., 1992). Shen ve arkadaşları Egb 761'in, iskemi sonrası miyokard fonksiyonlarını düzelttiği ve miyokard iskemi reperfüzyon hasarında kalbi koruyucu etkileri olduğu bildirmişlerdir (Shen ve ark., 1998).

Ginkgo biloba; antioksidan, serbest-radikal arayıcısı ve bir membran sabitleyici fonksiyon göstermesi nedeniyle hücreleri koruyucu bir madde olduğu düşünülmektedir. Ginkgo biloba hem genç ve yaşlı ratlarda hem de klinik olarak sağlıklı orta yaşlı erkeklerde hafıza performansını artırabildiği gösterilmiştir (Wesnes ve ark., 2000). Orhan ve ark. Tarafından Ginkgo biloba'nın torsiyon sonrası oluşacak iskemik hasarın önlenmesinde koruyucu etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Orhan ve ark., 2000). Bu çalışmamızda da literatür verileri ile örtüşecek şekilde testiküler doku hasarına karşı koruyucu ve tedavi

edici olduğu ve özellikle de sadece Egb 761 verilen sıçanların LH ekspresyonlarının ve sperm morfoloji kalitesinin belirgin olarak artmış oldukları tespit edildi. Bu sonuçlar iskemi-reperfüzyon ile uyarılan testis hasarına karşı Egb 761'in koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak yapmış olduğumuz çalışmada Egb 761'in bu anlatılan antioksidan özelliklerinden olsa gerek torsiyonla oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarına bağlı olarak ortaya çıkan testiküler doku hasarında koruyucu ve tedavi edici olduğunu söyleyebiliriz. Bu durum seminifer tübül epitel hücreleri ve interstisyel doku histopatolojik analizi, Johnsen skorlaması, apoptotik indeks ve Leydig hücre immün boyanması ile gösterilmiştir. Ayrıca, spermiyogram analizleri, sperm morfoloji testleri sonuçları ile de Egb 761'in torsiyona bağlı sperm anormali testleri ile ortaya konulmuştur. Her ne kadar araştırmamız deneysel hayvan çalışması olsa da üst düzey ayrıntılı analizler ile desteklendikten sonra bu tür vakalarda Egb 761'in klinik pratikte kullanılabilirliğinin gündeme gelmesine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Acar O. Ürogenital Deney Modelleri. In: Cantürk NZ, Sayek İ, editors. Cerrahi Araştırma. 1st ed. Ankara: Nobel Tıp Kitapevi 2005; 509.
2. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol.* 2006 16; 250(1–2): 66–9.
3. Allan DJ, Harmon BV, Kerr JFR. Cell death in spermatogenesis. In: *Perspec Mamm Cell death*, Oxford University Press, London, 1987; 289–258.
4. Arda IS, Özyaylalı I. Testicular tissue bleeding as an indicator of gonadal salvageability in testicular torsion surgery. *BJU Int.* 2001; 87(1) :89–92.
5. Arıncı, K., Elhan, A.:Anatomi, c.1, Güneş Kitabevi, Ankara,1995.
6. Fouda AA, Mohamed ES, Rizk AH, Salam GA, Bakr MH, Barakat AM, Badway RE. Ameliorative Effect of Ginkgo Biloba Extract on Gamma Radiation Injury. *Mansoura J. Forensic Med. Clin. Toxicol.* 2009; 17:2.
7. Attanasio A, Migheli A, Schiffer D. Ultrastructural detection of DNA strand breaks by in situ end-labelling techniques. *J Pathol.* 1995; 176(1):27–35.
8. Ayaşoğlu E. Apoptoz. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi.* 2001; 21: 57-62.
9. Bathe OF, Chow AW, Phang PT. Splachnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery.* 1998; 123(1): 79–88.
10. Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Lock TM, Kal HB, De Rooij DG. Apoptosis Regulation in the testis: involvement of Bcl- 2 Family members. *Mol Reprod Dev.* 2000; 56(3): 353–9.
11. Blanco-Rodríguez J, Martínez-García C. Apoptosis partern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *JAndrol* 1998; 19: (4):487–97.
12. Braquet P, Koltai M. Vasculoprotective effect of the platelet-activating factor antagonist ginkgolide B isolated from Ginkgo biloba leaves. Clostre F, DeFeudis FV (eds). 1994; 79–94.
13. Akbal C, Şimşek F. Testis ve Eklerinin Torsiyonu. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2007;3(20): 62–6.
14. Chapman RS, Chresta CM, Herberg AA, Bere HM, Heer S, Whetton AD, Hickman JA, Dive C. Further characterization of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) Assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drugsensitive leukemia cells. *Cytometry* 1995; 20: 245–56.

15. Christensen AK. Leydig cells. In: Handbook of Physiology. Washington, DC: American Physiological Society. 1975; 5: 7–94.
16. Christen Y, Maixent JM. What is Ginkgo Biloba extract Egb 761? An overview from molecular biology to clinical medicine. *Cell Mol Biol* 2002; 48(6): 601–11.
17. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histological changes occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *J Urol* 1985; 133(5): 906–11.
18. Cummings JM, Boullier JA, Sekhon D, Bose K. Adult testicular torsion. *J Urol* 2002; 167(5): 2109-10.
19. Coşkun M. Ginkgo biloba L (Ginkgoaceae) ve önemi. Başer KHC, Kırim N (Editörler). 14. Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı. Bildiriler. Eskişehir 2004; 31.
20. Eşrefoğlu M. Genel ve Özel Histoloji. Malatya; Pelikan Yayıncılık, 2004; 310.
21. Gartner LP, Hiatt JL. Color Text of Histology, Second Edition, USA; WB Saunders Company, 2003: 496–9.
22. González-Flecha BS, Cutrin J, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1993; 91: 456–64.
23. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery* 1994; 81: 637–647.
24. 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): 260–3.
25. Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL. Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology*. 1989; 124(2): 762-70.
26. Harrison RG, Lewis-Jones DI, Moreno de Marval MJ, Connolly RC. Mechanism of damage to the contralateral testis in rats with an ischaemic testis. *Lancet*. 1981 3; 2(8249): 723–5.
27. Harrison RG, Weiner JS. Vascular patterns of the mammalian testis and their functional significance. *J Exp Biol*. 1949; 26(3): 304–16.
28. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsallo A, Rapola J, Dunkel L. Apoptotic Cell Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: the Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatr Res*. 1996; 40(2): 351-6.

29. Hikim S, Amiya P, Wang C, Leung A, Swerdloff R S. Involvement of Apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antagonist treatment *Endocrinology*. 1995; 136(6): 2770–5.
30. Hsiao CH, Ji AT, Chang CC, et all. Mezenkimal kök hücrelerinin lokal injeksiyonu testis torsiyonuna bağlı germ hücre hasarını önler. *Stem Cell Res Ther*. 2015 30; 6: 113.
31. Hsueh A J W, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonadal Cell Apoptosis. *Recent Prog Horm Res*. 1996; 51: 433-55.
32. Huckins, C. The morphology and kinetics of spermatogonyal degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec*. 1978; 190(4): 905–26.
33. Huh H, Staba EJ. Botany and chemistry of Ginkgo biloba L. *J Herbs Spices Med Plants* 1992; 1(1-2): 91-124.
34. Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ. Fetal Leydig Cells: Cellular Origin, Morphology, Life Span, and Special Functional Features. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992; 201(2): 125–40.
35. Hutson JM. Undescended testes, torsion and varicocele. In O’Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG, eds, *Pediatric Surgery*. 5th edn. Chicago: Mosby 2006; 1087–109.
36. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by eat stress. *Biol Reprod*. 1999; 61(2): 393–9.
37. Janqueria LC, Carneiro J, Kelley OR. (1998). *Temel histoloji* (Çev: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışalı B), Barış kitabevi. 407–422.
38. Jefferson KP, Persad RA, Holly MP. Apoptosis and its Relevance to Urologists. *BJU Int*. 2000; 86(5): 598–606.
39. Johnsen SG. Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1970;1(1):2–25.
40. Juretzek W. *Recent advances in ginkgo biloba extract (Egb 761)*. Springer-Verlag Tokyo 1997; 341–358.
41. Kayalı H. *Özel histoloji*. İstanbul Üniversitesi Film Merkezi. İstanbul, 1989; 218-28.
42. Kerr J B. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil*, 1992; 95(3): 825–30.

43. Kerr JB, Knell CM. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 1988; 103(3): 535–44.
44. Kerr J.F.R. Wyllie A.H. Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*. 1972; 26(4): 239-57.
45. Kerr JB, Sharpe RM. Follicle-stimulating hormone induction of Leydig cell maturation. *Endocrinology*. 1985; 116(6): 2592–604.
46. Kierszenbaum AL. (Çeviri Editörü: Demir R.): *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.
47. Korsmeyer S J. Regulators of cell death. *Trends Genet*. 1995; 11(3): 101–5.
48. Köksal M, Oğuz E, Baba F, Eren MA, Çiftçi H, Demir ME, Kurcer Z, Take G, Aral F, Ocak AR, Aksoy N, Ulaş T. Effects of melatonin on testis histology, oxidative stress and spermatogenesis after experimental testis ischemia-reperfusion in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012; 16(5): 582–8.
49. Krarup T. The testes after torsion. *Br J Urol*. 1978; 50(1): 43–6.
50. Kuopio T, Tapanainen J, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I. Developmental stages of fetal type Leydig cells in prepubertal rats. *Development* 1989; 107(2): 213-20.
51. Kuzu MA, Koksoy C, Kale İT, Tanık A, Terzi C, Elhan AH. Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J Surg*. 1998; 176(4): 348–51.
52. Langer JC, Sohal SS, Blennerhasselt P. Mucosal permeability after subclinical intestinal ischemia/reperfusion injury: An exploration of possible mechanisms. *J Pediatr Surg*. 1995; 30(4): 568–72.
53. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. Schwartz SI (ed), *Principles of Surgery*. Mc Graw-Hill 7th Edition 1999; 1: 13–32.
54. Logani S, Chen MC, Tran T, Le T, Raffa RB. Actions of ginkgo biloba related to potential utility for the treatment of conditions involving cerebral hypoxia. *Life Sci*. 2000 11; 67(12): 1389–96.
55. Lysiak JJ, Turner SD, Nguyen QA, Singbartl K, Ley K, Turner TT. Essential Role of Neutrophils in Germ Cell-Specific Apoptosis Following Ischemia/Reperfusion Injury of the Mouse Testis. *Biol Reprod*. 2001; 65(3): 718–25.
56. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995; 146: 3-15.
57. Markey CM, Jequier AM, Meyer GT, Martin GB. Testicular morphology and androgen profiles following testicular ischaemia in rams. *J Reprod Fertil* 1994; 101(3): 643–50.

58. McAninch JW. Disorders of the testis, scrotum, and spermatic cord. In: Tanagho E A, McAninch JW. Smith's General Urology. McGraw-Hill 15th ed. Int ed. 2000; 684–98.
59. McCord JM: Oxygen derived free radicals in postischemic injury. Mechanisms of disease. N Eng J Med. 1985; 312: 159–63.
60. Melekos MD, Asbach HW, Markou SA. Etiology of acute scrotum in 100 boys with regard to age distribution. J Urol. 1988; 139(5): 1023-5.
61. Mogilner JG, Lurie M, Coran AG, Nativ O, Shiloni E, Sukhotnik I. Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. Pediatr Surg Int. 2006; 22(1): 99–105.
62. Moore, K.L., Dalley, A.F., 2002, Kliniğe yönelik anatomi, (Çev.:Şahinoğlu K), 6. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.
63. Çakan M, Çakan T, Aydos T, Yılmaz D, Ögüş E, Kılıç AS. Sıçan Testisindeki İskemi-Reperfüzyon Hasarı Sonucu Oluşan Oksidatif Stres ve Histopatolojik Değişiklikler Üzerine Ketoprofenin Koruyucu Etkisi. Türk Üroloji Dergisi 2007; 33(1): 50–5.
64. Nguyen L, Lievano G, Ghosh L, Radhakrishnan J, Fornell L, John E. Effect of unilateral testicular torsion on blood flow and histology of contralateral testes. J Pediatr Surg. 1999; 34(5): 680–3.
65. Niemi M, Ikonen M. Steroid-3 β -ol-dehydrogenase activity in fetal Leydig's cells. Nature. 1961; 18; 189: 592–3.
66. Orhan I, Onur R, Hayıt H, Ergin E, Semercioz A, Baydinç C. The effectiveness of Egb 761 ginkgo biloba in the prevention of testicular ischemic injury induced by testicular torsion. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2000; 6(1): 28–31.
67. Petorak İ. Medikal embriyoloji. İstanbul: Beta Basım Dağıtım A.Ş. 1986; 220-3.
68. Prater JM, Overdorf BS. Testicular torsion: a surgical emergency. Am Fam Physician 1991; 44: 834–40.
69. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. J Urol. 1997; 157(1): 340–5.
70. Rasim Özgür Rosti. Tıbbi Hücre Biyolojisi. 1. Baskı İstanbul 2011, 319.
71. Ringdahl E, Teague L. Testicular torsion. Am Fam Physician. 2006 15; 74(10): 1739–43.
72. Rodriguez I, Christiane O, Araki K, Garcia I, Vassali P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. EMBO J. 1997 1; 16(9): 2262–70.

73. Ross MH, Pawlina W. *Histology A Text And Atlas*. 6th Ed. Baltimore, Philadelphia, Lippincott Williams, Wilkins. 2011; 784–816.
74. Rowe MI, O'Neill JA, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG. *Essentials of pediatric surgery*. St. Louis: Mosby Year Book Inc. 1995; 457–9.
75. Saba M, Morales CR, De Lamirdane E, Gagnon C. Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *J Urol*. 1997; 157(3): 1149–54.
76. Sadler TW. (Çeviri: AC. Başaklar). *Langman's medikal embriyoloji*. 7. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık 1996; 274–5.
77. Schutte A, Topp SA, Knoefel WT, Brillhoff S, Mueller L, Rogiers X, Gundlach M. Influence of ginkgo biloba extract (Egb 761) on expression of EGR-1 mRNA and HSP-70 mRNA after warm ischemia in the rat liver. *Transplant Proc*. 2001; 33(7-8): 3724-5.
78. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*. 1993; 14(2): 133–51.
79. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res*. 2000 4; 86(2): 117–8.
80. Sharpe R M: Regulation of spermatogenesis. *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil E, Neill J D. Raven Press. New York 1994; 1364-1434.
81. Shen J, Wang J, Zhao B, Hou J, Gao T, Xin W. Effects of Egb 761 on nitric oxide and oxygen free radicals, myocardial damage and arrhythmia in ischemia-reperfusion injury in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1998 28; 1406: 228-36.
82. Sinha HAP, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH, Swerdloff RS. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83(1): 152-6.
83. Somuncu S, Cakmak M, Erdogan S, Caglayan O, Akman H, Kaya M. Protective effects of trapidil in ischemia-reperfusion injury due to testicular torsion and detorsion: an experimental study. *Int J Urol*. 2006; 13(5): 601–5.
84. Sternberg SS. *Histology for pathologist*. New York: Raven Press Lt. 1992: 731–9.
85. Şeftalioğlu A. *Genel ve özel insan embriyolojisi*. 3. Baskı. Ankara: Feryal Matbaası 1998: 346–50.
86. Tanyel FC, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A. Contralateral testicular blood flow during unilateral testicular torsion. *Br J Urol* 1989; 63(5): 522–4.

87. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol.* 1993; 7(5): 643–50.
88. Teerds KJ, Boer-Brouwer M, Dorrington HJ, Balvers M, Ivell R. Identification of markers for precursor and leydig cell differentiation in the adult rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration. *Biol Reprod.* 1999; 60(6): 1437–45.
89. Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K, Elhan A. Sıçanlarda intestinal iskemi modelinde profilaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi* 2000; 8(1): 10–6.
90. Akgül T, Ayyıldız A, Nuhoglu B, Karagüzel E, Ögüş E, Yağmurdur H, Üstün H, Germiyanoglu C. Ginkgo biloba (Egb 761) usage attenuates testicular injury induced by testicular ischemia/reperfusion in rats. *Int Urol Nephrol.* 2008; 40: 685–90.
91. Akgül T, Yağmurdur H, Ayyıldız A, Karagüzel E, Ögüş E, Üstün H. Testis Torsiyonunda Fosfodiesteraz 5 İnhibitörleri. *Turk J Urol* 2008; 34: 37–41.
92. Turner TT, Caplis LA, Rhoades CP. Testicular vascular permeability: effect of lesions associated with impaired testis function. *J Urol* 1996; 155(3): 1078–82.
93. van Beek TA. Ginkgolides and bilobalide: their physical, chromatographic and spectroscopic properties. *Bioorg Med Chem.* 2005 1; 13(17): 5001–12.
94. Wang W, Zhong XH, Ma A, Shi W, Zhang XS, Liu Y. Effects of Ginkgo Biloba on Testicle Injury Induced by Diethylstilbestrol in Mice. *Am J Chin Med.* 2008; 36(6): 1135–44.
95. Wesnes KA, Ward T, McGinty A, Petrini O. The memory enhancing effects of a ginkgo biloba/panax ginseng combination in healthy middle-aged volunteers. *Psychopharmacology (Berl).* 2000; 152(4): 353–61.
96. Yeh YC, Liu TJ, Wang LC, Lee HW, Ting CT, Lee WL, Hung CJ, Wang KY, Lai HC, Lai HC. A standardized extract of Ginkgo biloba suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *Br J Pharmacol.* 2009; 156(1): 48–61.
97. Yin Y, Hawkins KL, Devvolf WC, Morgantaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl.* 1997; 18: 159–65.
98. Zar HA, Tanigawa K, Kim YM, Lancaster JR Jr. Rat liver postischemic lipid peroxidation and vasoconstriction depend on ischemia time. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25(3): 255–64.
99. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surgical Clinics North America* 1992; 72(1): 65–83.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Çiğdem BİÇER

Doğum Tarihi: 20.03.1988

Medeni Hali: Bekar

Öğrenim Durumu: 2007-2011 Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji
Bölümü 2012-2016 Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji ve
Embriyoloji ABD

Yabancı Dil: İngilizce