

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TESTİSTE DENEYSEL TORSİYON/DETORSİYON
SONUCU OLUŞTURULMUŞ İSKEMİ/REPERFÜZYON
HASARINDA GANODERMA LUCIDUM İLE
YÖNLENDİRİLMİŞ KÖK HÜCRE'NİN
İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ

FULYA GÜLBAĞÇA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ FATMA ŞİMŞEK

2018-İZMİR

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TESTİSTE DENEYSEL TORSİYON/DETORSİYON
SONUCU OLUŞTURULMUŞ İSKEMİ/REPERFÜZYON
HASARINDA GANODERMA LUCIDUM İLE
YÖNLENDİRİLMİŞ KÖK HÜCRE’NİN
İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ

FULYA GÜLBAĞÇA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ FATMA ŞİMŞEK

2018-İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 03/07/2018

Tez Danışmanı :
Dr. Öğr. Üyesi Fatma ŞİMŞEK İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Üye :
Prof. Dr. Meltem KURUŞ İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Üye :
Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU Manisa Celal Bayar Üniversitesi

ONAY : Bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Ahmet KOYU
Enstitü müdürü

ETİK FORMU

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU


SAYI: 2018-001
KONU: Onay

28.02.2018

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda **“TESTİSTE DENEYSEL TORSİYON/DETORSİYON SONUCU OLUŞTURULMUŞ İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINDA GANODERMA LUCİDUM İLE YÖNLENDİRİLMİŞ KÖK HÜCRE’NİN İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ”** isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Yrd. Doç. Dr. Fatma ŞİMŞEK, İKÇÜ Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D.
Y.L.Öğr. Biyolog Fulya GÜLBAĞÇA, İKÇÜ Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D.
Yrd. Doç. Dr. Mustafa Onur ÖZTAN, İKÇÜ Çocuk Cerrahisi AD.
Doç. Dr. Selen BAHÇEÇİ, İKÇÜ Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D.
Prof. Dr. Meltem KURUŞ, İKÇÜ Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D.
Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU, CBÜ Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D.
Doç. Dr. Ezgi TURUNÇ, İKÇÜ Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D.

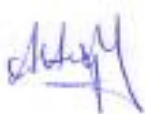
Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)


Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Prof. Dr. Aytül ÖNAL (KATILMADI)


Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU 


Prof. Dr. Haşmet CAĞIRGAN


Prof. Dr. Figen KIRKPINAR

Prof. Dr. Uğur KAYA (KATILMADI)


Yrd. Doç. Dr. Sumru SÖZER KARADAĞLI

Öğr. Gör. Dr. M. Ayberk OKTAY 

Vet. Hek. F. Emrah SOYLU 

Özcan NALBANTOĞLU 

Tingiz ÖZCAN (KATILMADI)

ÖNSÖZ

Bu çalışmam süresince her türlü yardım ve fedakarlığı sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmama ışık tutan başta değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatma ŞİMŞEK'e ve yardımlarını benden esirgemeyen, sorunlarımı sabırla çözüme ulaştıran, bu ve diğer çalışmalarda kendimi geliştirmemde büyük katkısı olan Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU'ya; Asistanlık eğitimimdeki katkılarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Meltem KURUŞ ve Doç. Dr. Selen BAHÇECİ'ye; Çalışmamda kullanılmak üzere tasarlanan deney modeli için destek sağlayan Yrd. Doç. Dr. Mustafa Onur ÖZTAN'a; Hem fiziksel hem ruhsal desteğini esirgemeyen, bilgi birikimlerinden faydalandığım ve çoğu tecrübeyi beraber yaşadığım canım arkadaşlarım Sinem KARA, Erdi KESELİK ve Kübra ÇİLENGER'e; Tüm eğitim hayatım boyunca sabır, sevgi ve desteğini benden esirgemeyen, canım dostum Eylül İLİK'e; Tez çalışmalarım sırasında maddi destek sağlayan İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne en içten dileklerle teşekkür ederim...

Kariyerimin bu zorlu yolculuğunda en telaşlı günlerimi benimle birlikte aynı tempoda yaşayan canım babam Hüseyin GÜLBAĞÇA ve canım annem Nebahat GÜLBAĞÇA'ya tüm kalbimle sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY FORMU.....	ii
ETİK KURUL ONAY FORMU	iii
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Testis	4
2.1.1. Testis Embriyolojisi	4
2.1.2. Testis Histolojisi	5
2.1.3. Testis Anatomisi	7
2.1.4. Testis Fizyolojisi	9
2.2. <i>Ganoderma Lucidum</i>	19
2.2.1. <i>Ganoderma Lucidum</i> 'un Morfolojik Özellikleri.....	20
2.2.2. <i>Ganoderma Lucidum</i> 'un Kimyasal Yapısı.....	21
2.3. Mezenkimal Kök Hücre (MKH)	23
2.3.1. MKH İzolasyonu, Çoğaltılması ve Karakterizasyonu	23
2.3.2. MKH Biyolojisi ve Fonksiyonu	24
2.4. Oksidatif Stres	26
2.4.1. Serbest Radikaller	26
2.4.2. Antioksidanlar	29
2.5. Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü).....	31
2.5.1. Tanımı ve Mekanizmaları	31

2.5.2.	Yöntemleri.....	35
2.6.	Sinyal Yolakları	37
2.6.1.	mTOR Sinyal Yolağı	37
2.6.2.	PI3K/Akt Yolağı	40
2.7.	İskemi/Reperfüzyon (İ/R).....	41
2.8.	AMAÇ	44
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1.	Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (YKMKH) Kültürü.....	47
3.1.1.	MKH Eldesi.....	47
3.1.2.	Kök Hücre Sayımı	48
3.1.3.	MKH Karakterizasyonu	49
3.2.	GL Hazırlanışı ve MTT	50
3.3.	Deney Grupları	52
3.4.	Cerrahi Uygulamalar	52
3.5.	Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi	54
3.5.1.	Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi.....	54
3.5.2.	Hematoksilen-Eozin Boyaması.....	55
3.5.3.	İndirekt İmmunohistokimya Boyaması.....	57
3.5.4.	TUNEL İmmunohistokimyası.....	59
3.5.5.	Johnsen Skorlaması ve Hücrelerin Tanımlanması.....	61
3.5.6.	Periyodik Asit-Schiff (PAS) ve Masson Trikrom (MT) Protokolü	62
3.5.7.	İstatistik.....	64
3.6.	Spermatozoon Analizleri	64
3.6.1.	Epididimisten Spermatozoon Eldesi	64
3.6.2.	Spermatozoon Morfoloji Analizi	65
3.6.3.	Spermatozoon Sayımı	66

3.7.	Biyokimyasal Yöntem	67
3.7.1.	Serum SuperoksitDismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini.....	67
3.7.2.	Serum Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Tayini.....	67
4.	BULGULAR.....	68
4.1.	MKH İzolasyon ve Karakterizasyon Bulguları	68
4.2.	MHK için GL etkisi.....	70
4.3.	Makroskobik Bulgular.....	70
4.4.	Mikroskobik Bulgular	72
4.4.1.	H-E Histokimya Bulguları	72
4.4.2.	Johnsen Skorlaması.....	74
4.4.3.	PAS Histokimya Bulguları.....	75
4.4.4.	MT Histokimya Bulguları	77
4.5.	İmmünohistokimyasal Bulgular	79
4.5.1.	eNOSİmmünohistokimyasal Boyamasına Ait Bulgular	79
4.5.2.	TUNEL Boyamasına Ait Bulgular.....	82
4.5.3.	mTOR İmmünohistokimyasal Boyamasına Ait Bulgular	85
4.5.4.	Akt İmmünohistokimyasal Boyamasına Ait Bulgular	88
4.5.5.	PI3K İmmünohistokimyasal Boyamasına Ait Bulgular.....	91
4.6.	Biyokimyasal Bulgular	94
4.6.1.	Kan Serum SOD Aktivitesine Ait Bulgular.....	94
4.6.2.	Kan Serum MDA Seviyesine Ait Bulgular.....	95
4.7.	Spermatozoon Analizlerine Ait Bulgular	96
4.7.1.	Spermatozoon Morfoloji Analizine Ait Bulgular	96
4.7.2.	Spermatozoon Sayı Analizine Ait Bulgular.....	100
4.7.3.	Spermatozoon Hareket Analizine Ait Bulgular	101
5.	TARTIŞMA.....	102

6. SONUÇ ve ÖNERİLER	111
7. ÖZET	112
8. ABSTRACT.....	114
9. KAYNAKÇA.....	116
10. ÖZGEÇMİŞ	130

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ABP:** AndrojenBinding Protein / Androjen Bağlayıcı Protein
- AMH:** AntimüllerianHormone / Antimülleriye Hormon
- APAF1:** Apoptosis-activatingfactor 1 / ApoptozAktivatör Faktör 1
- ATP:** AdenosineTriphosphate / Adenozin Trifosfat
- BAD:** Bcl-2-associated deathpromoter / Bcl-2 ilişkili ölüm öncülü
- BMP-4:** Bone Morphogenetic Faktor-4 / Kemik Morfogenetik Faktör-4
- Bcl-2:** B-celllymphoma 2/ B hücre lenfoma gen üyesi proteini
- CAPE:** CaffeicAcidPhenenethyl Ester / Kafeik Asit Fenil Ester
- cAMP:** CyclicAdenosineMonophosphate / Siklik AdenozinMonofosfat
- GMP:** CyclicGuanozinMonophosphate/ SiklikGuanozinMonofosfat
- CK:** CreatinKinase / KreatinKinaz
- C-IAP1:** Baculoviral IAP repeat-containing protein 2/ Bakulovirüs IAP içeren gen proteini 2
- CARD:** Caspase-activatingrecruitment domain /Kaspazaktivatör bölge
- DED:** Deatheffector domain/Ölüm efektör bölgesi
- D.E.R:** Smoothendoplasmicreticulum/ Düz Yüzlü Endoplazmik Retikulum/
- DMSO:**Dimetilsülfoksit
- eNOS:** EndothelialNitricOxideSynthase/ Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
- ERK 1/2:** ExtracellularSignalRelatedKinase 1 /2 / Hücre dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz 1/2
- FGF9:** FibroblastGrowthFactor 9 / Fibroblast Büyüme Faktörü 9
- F.S.H:** FollicleStimulatingHormone / FolikülUyarıcıHormon
- FOXO1:** Forkhead Box protein O1
- HCG:** Human ChorionicGonodotropin / Human KoryonikGonodotropin
- H2O2:** HydrogenPeroxide/ Hidrojen Peroksit
- IL-6:** Interleukin 6/ İnterlökin 6

IL-1 β : Interleukin 1 β / İnterlökin 1 β

IRS-1: InsulinReceptorSubstrate/ İnsulin Reseptör Substratı

iNOS: InduceNitricOxideSynthesis/ İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

İ/R: Ischemia/ ReperfusionDamage/ İskemi/Reperfüzyon Hasarı

L.H : Leydig Hücreleri

LH: Luteinizan Hormon

LDH: LactateDehydrogenase/ LaktatDehidrojenaz

LOOH: LipidHydroperoxide/ LipidHidroperoksitleri

MDA: Malonaldehyde/ Malondialdehit

MIH: MullerianInhibitingHormone/ Mülleriyan İnhibitör Hormon

MCP-1: MonocyteChemotactic Protein-1/ MonositKemotaktik Protein-1

MTORC-1: MammalianTarget of RapamycinKompleks 1/ Memelilerde Rapamisin'in Hedef Molekül Kompleksi -1

MTORC-2: MammalianTarget of RapamycinKompleks 2/ Memelilerde Rapamisin'in Hedefi LST8 Kompleksinin Alt Birimi

MTT:Thiazoly Blue TetrazoliumBromide

NO: NitricOxide/ Nitrik Oksit

NADPH: NicotinamideDinucleotidePhosphate/ NikotinamidAdeninDinükleotid Fosfat

NO₂: Azot dioxide/Azot dioksit

NOS: NitricOxideSynthesis/ Nitrik Oksit Sentaz

nNOS: NeuronalNitricOxideSynthesis/ Nöronal Nitrik Oksit Sentaz

-O₂ : Superoxide / Süperoksit

-OH: Hydroxideradical/Hidroksil radikali

-ONOO: Peroxynitrite/ Peroksinitrit

-ONOOH: Peroxynitriteacid/ Peroksinitroz asit

PAF: ProstaticAcidPhosphatase/Prostatik Asidik Fosfataz

PBS: Fosfat tampon solüsyonu

PGH: Primordial Germ Cell/ Primordiyal Germ Hücreleri

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

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

PIP3: Phosphatidylinositol Trisphosphate- Fosfatidilinositol Trifosfat

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase/ Fosfatidilinositol 3 kinaz

PKB: Protein Kinase- B/ Protein Kinaz B

PSA: Prostate-Specific Antigen/ Prostat Spesifik Antijen

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

RTK: Receptor Tyrosine Kinases/ Reseptör Tirozin Kinaz

RS: Tyrosylradically/ Tiyil Radikali

R: Organicradically/ Organik radikal

RCOO: Organicperoxides /Organik peroksitler

SG: Spermatogonyal Kök Hücre

SS: Spermatozoid

Mh: Miyoid Hücre Çekirdeği

Sh: Sertoli Hücre Çekirdeği

Sd: Spermatozoid

SRY: Sex Determining Region Seks Belirleyici Bölge

SF1: Steroidogenesis factor 1/ Steroidogenez faktör 1

SOX9: Transcription Factor 9/ Transkripsiyon Faktör 9

SOD: Superoxide Dismutase / Süperoksit Dismutaz

-SH: Sistein Grupları

TA: Tunica Albuginea

TBF: Testis Determining Region/ Testis Belirleyici Bölge

TNF: TumourNekrosisFactor/ Tümör Nekrozis Faktör

NF- κ B: NuclearFactorKappa β / Nukleer Faktör Kappa β

TBARS: ThiobarbituricAcidReactiveSubstances/ Tiyobarbutirik Asit Reaktifi

TSC1: TuberoussclerosisKompleks 1/ Tubero Skleroz Kompleks 1

TT: Testis Torsiyonu

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

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Testis Embriyolojisi

Resim 2: Testis Histolojisi

Resim 3: Testis Germ Hücreleri

Resim 4: Testis Anatomisi

Resim 5: Testis Fizyolojisi

Resim 6: Myoid ve Sertoli Hücreleri

Resim 7: Kan testis bariyeri ve kompartmanlaşma

Resim 8: Spermatogenik seri hücrelerinin şematik gösterimi

Resim 9: Spermatogenezde I. ve II. mayoz bölünme

Resim 10: Spermiyasyon sırasında yapısal farklılaşma

Resim 11: Rodentspermatozoonu

Resim 12: Sıçanlarda başlıca spermatozoon şekil anomalileri

Resim 13: Seminifertübül ve intersitisyel alan histolojisinin şematik gösterimi

Resim 14: Leydig hücrelerinin elektromikrografı. Lipid damlacıklar (L), Golgi kompleksi (G), Lizozom (Ly), Düz endoplazmikretikulum (rER) ve Leydig hücrelerinin yüzeyi ile temasta olan makrofaj hücresi (M) gösterilmiştir

Resim 15: Ganoderma lucidum'un Doğadaki Görüntüsü

Resim 16: Apoptosiz ve Nekrosiz

Resim 17: mTORC1 ve mTORC2'nin sinyal mekanizmaları

Resim 18: Kan testis bariyerininin mTORC1 ve mTORC2 ile düzenlenmesi

Resim 19: Torsiyon İskemisi

Resim 20: TT ile gerçekleşen İ/R mekanizmasının infertilitedeki yeri

Resim 21: MKH İnverted Mikroskop Görüntüsü

Resim 22: MKH tanımlaması hücre immünohistokimyası ile CD 90, Stro-1 ve CD45 antikorları ile yapılmıştır. MKH'leri CD90 ve Stro-1 pozitif, CD45 negatif hücrelerdir

Resim 23: TT uygulaması

Resim 24: Testisin seminifer tübüllerinde görülen hücreler

Resim 25: Erkek sıçandaki testis görüntüleri

Resim 26: MKH Kültür ortamında yerleşip, çoğalmış 4. pasajdaki hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri

Resim 27: MKH için Stro-1 antikor ile boyanmış pozitif immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması sağlandı. Oklar: Stro-1 pozitif hücreler

Resim 28: MKH için CD90 antikor ile boyanmış pozitif immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması sağlandı. Oklar: CD90 pozitif hücreler

Resim 29: MKH için CD45 antikor ile boyanmamış negatif immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması sağlandı. Oklar: CD45 negatif hücreler

Resim 30: Deney Gruplarının makroskopik görüntülerinde hasarın testiste oluşturduğu değişiklikler izlendi

Resim 31: Torsiyon Grubu HE boyamalarının mikroskopik görüntülerde hasarın testiste oluşturduğu değişiklikler ve uygulamaların anlamlı ve olumlu etkileri izlendi

Resim 32: Torsiyon Grubu PAS boyamalarının mikroskopik görüntülerde hasarın testiste oluşturduğu değişiklikler ve uygulamaların anlamlı ve olumlu etkileri izlendi

Resim 33: Torsiyon Grubu MT boyamalarının mikroskopik görüntülerde hasarın testiste oluşturduğu değişiklikler ve uygulamaların anlamlı ve olumlu etkileri izlendi

Resim 34: Deney gruplarına ait İHK görüntüleri (eNOS)

Resim 35: Deney gruplarına ait İHK görüntüleri (TUNEL)

Resim 36: Deney gruplarına ait İHK görüntüleri (mTOR)

Resim 37: Deney gruplarına ait İHK görüntüleri (Akt)

Resim 38: Deney gruplarına ait İHK görüntüleri (PI3K)

Resim 39: TESE ile görülen morfolojik anomaliler

Resim 40: TESE ile grupların morfolojik görüntüleri

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Bouin Protokolu

Tablo 2: Hematoksilen-eozin boyama protokolu

Tablo 3: İndirekt İmmünohistokimya Boyama Protokolu

Tablo 4: TUNEL Boyama Protokolu

Tablo 5: Johnson Skorlaması

Tablo 6: PAS-MT boyama protokolu

Tablo 7: Yayma preparatlar için Giemsa boyama protokolu

Tablo 8: Spermatozoon sayılarının hesap protokolu

Tablo 9: MKH belirteçler ile karakterizasyon morfometri

Tablo 10: GL toksisitesi için MTT değerleri

Tablo 11: Deney gruplarına ait morfometri için johnsen skorlaması değerleri ve istatistiği

Tablo 12: Deney gruplarına ait eNOS H-skor değerleri ve istatistiği

Tablo 13: Deney gruplarına ait apoptotik indeks değerleri ve istatistiği

Tablo 14: Deney gruplarına ait mTOR H-skor değerleri ve istatistiği

Tablo 15: Deney gruplarına ait Akt H-skor değerleri ve istatistiği

Tablo 16: Deney gruplarına ait PI3K H-skor değerleri ve istatistiği

Tablo 17: Deney gruplarına ait SOD aktivite değerleri ve istatistiği

Tablo 18: Deney gruplarına ait MDA aktivite değerleri ve istatistiği

Tablo 19: Deney gruplarına ait Spermatozoon morfolojik anomali analizine ait bulgu değerleri ve istatistiği

Tablo 20: Deney gruplarına ait Spermatozoon sayı analizine ait bulgu değerleri ve istatistiği

Tablo 21: Deney gruplarına ait Spermatozoon hareket analizine ait bulgu değerleri ve istatistiği

1. GİRİŞ

Testis torsiyonu testislerdeki spermatik kordların kendi etrafında dönmesine bağlı arteriyel ve venöz kan akımının bozulması ile ortaya çıkan ürolojik bir patolojidir. Yenidoğan döneminde görülmekle birlikte sıklıkla pubertal dönemde gözlenmektedir. Acil müdahale edilmezse infertilite ile sonuçlanmaktadır (1). Testis torsiyonu sonrası iskemi hasarı meydana gelirken, detorsiyon sırasında reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir. İskemi/Reperfüzyon (İ/R) sonrası dokuda SOR (Serbest oksijen radikalleri) miktarı artmakta ve oksidatif stres oluşturmaktadır. İ/R hasarı ile oluşan oksidatif stres, birçok hastalıkta görülmekte olup doku harabiyetini azaltmak ve dokuyu korumak amaçlı antioksidan maddeler devreye girmektedir (2).

Çin ve civarında sık yenilen bir mantar olan *Ganoderma Lucidum*(GL) ölümsüzlük mantarı olarak bilinip tamamlayıcı tıp uygulamalarında geniş bir yer bulmaktadır. Reishi olarak Çin tıbbında 120 civarındaki süper bitki içerisinde en saygın olanıdır. Ömrü uzattığı yaşlanmayı önlediği ve enerji verici olduğu düşünülmektedir. Enfeksiyon, immunolojik bozukluklar ve kanser tedavisinde kullanılmıştır. Ticari değeri 8 milyar dolar civarında olup tüm dünyada destek ve koruyucu sağlık ürünü olarak tüketilmektedir. Yapısında birçok farklı kimyasal bileşik içeren GL farmakolojik aktivitelerini triterpenler ve polisakkaritler üzerinden yapmaktadır. Aktif transkripsiyon faktörlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Alkolde çözünen triterpen içeriği hipertansiyon ve alerjik reaksiyonlarda kullanılmaktadır. Antibakteriyel etkisi olan GL önemli bir antioksidan ve neovaskularizandır. GL için polisakkarit içeriği hipoglisemik etki yapıp immun sistem üzerinde olumlu etki göstermektedir. Önemli özelliği özellikle sarkomalarda antikanser etkisinin bulunmasıdır. En etkili olduğu durum diyabettir. GL detoksifikasyonda etkili olup oksidatif strese karşı koruyucudur (3).

Kök Hücre (KH); kendilerini yenileyebilme, sınırsız çoğalabilme, kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme, hasarlı dokuya verildiğinde hasarlı yapıyı onarabilme özellikleri ile tanımlanan hücre tipidir. KH bol miktarda

bulunmaları, kolay elde edilebilmeleri, birçok hücre tipine farklılaşarak çoğalabilmeleri, alıcılara güvenli ve etkin bir şekilde nakledilebilmeleri nedeniyle rejeneratif tıp uygulamalarında tercih edilmektedir. Mezenkimal Kök Hücre (MKH) transplantasyonunun böbrek, kalp, barsak ve akciğer gibi dokulara uygulanmasıyla İ/R durumlarında antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptokik etkiye bağlı olarak doku hasarlarının azaldığı gösterilmiştir. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α), İnterferon Gama (IFN- γ), interlökin ve immün hücreler üzerinden İ/R testis hasarında etkili olabilmektedir. Testis dokusunda hasar sonrası KH kullanılması oksidatif stress ve apoptozu azaltarak germ hücresini korumakta ayrıca sertoli ve leydig hücrelerinde benzer etki ve olumlu katkı sağlayarak daha da önemli bir fonksiyon sağlamaktadır (4). GL için nöral KH çoğalmasını ve farklılaşmasını arttırdığı gösterilmiştir. Birlikte kullanımlarının beyin hasarı ve inmede yararlı olabileceği gösterilmiştir (5).

Testis torsiyonunda, testislerde hücrel disfonksiyona ve nihayetinde hücre ölümüne yol açabilecek bir dizi kimyasal reaksiyon başlatılır. SOR üretimi ilk aşamada ortaya çıkar ve doku hasarına yol açan temel hakarettir. Reperfüzyondan hemen sonra ortaya çıkan bu başlangıç fazı sırasında, tersinir hücrel hasar meydana gelir ve yaralanma, antioksidan savunmaların aktivasyonundan dolayı geçici niteliktedir. Tipik bir oksidatif stres görünümü ile birkaç saat sürer. Bununla birlikte, ROS üretiminin ikinci fazı geri dönüşümsüz hücrel hasar ve iltihap ile karakterize edilir. Oksidatif stresin apoptoz regülasyonunda temel bir rol oynayabileceği gerçeğini bir araya getiren İ/R kaynaklı oksidatif stresin neden olduğu germ hücre apoptozu, spermatogenezi bozan potansiyel bir mekanizmadır. Endothelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS), Nitrik Oksit (NO) sentezleyen üç izoformdan biridir. eNOS esas olarak vasküler endoteldeki NO oluşumundan sorumludur. Vasküler endoteldeki eNOS tarafından üretilen NO, vasküler ton, hücre proliferasyonu, lökosit adezyonu ve trombosit agregasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar ve reperfüzyonun erken safhalarında artmış hipoksi ve NO₂'nin vazodilatör etkisi ile gözlenir

Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi (mTOR), birçok hücre içi önemli mekanizmaları düzenleyen önemli kinazlardan biridir. mTOR, serin-threonin kinaz ailesinden PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağında önemli rol oynar.

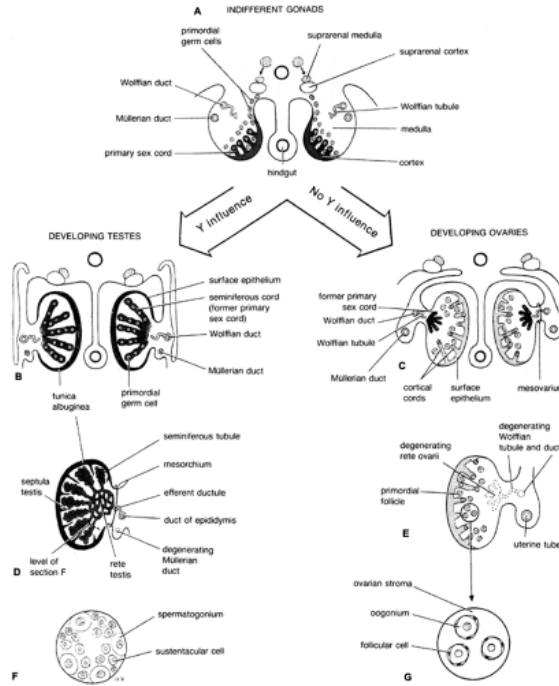
PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı hücre çoğalması, transkripsiyon, anjiogenez, apoptoz ve hücre sağ kalımında önemli rol oynar. mTOR, birçok kritik hücre fonksiyonunu koordine eden ve serin treonin kinaz ailesinden PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının bir parçası olan temel kinaz enzimlerinden biridir. mTOR hücre büyümesi, hücre proliferasyonu, proteinlerin sentezi ve transkripsiyonunu, anjiyogenez, apoptozu ve otofajiyi etkilemektedir. Yapılan çalışmalar, PI3K/AKT sinyalleşmesinin doğrudan veya dolaylı olarak mTOR yoluyla fosforilatlanmasıyla hücre apoptozunu engellediğini belgelemektedir. GL için kanser hücrelerinde apoptoza yol açan NF-κB, sitokrom c, ERK1/2, PI3K/AKT/mTOR yolağı üzerinden hücre ölümünü azalttığı, inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir. MKH için eksozomlar aracılığıyla deneysel modelde miyokard iskemisine bağlı reperfüzyon hasarını engellediğini, bunu apoptozu azaltarak yaptığını, AMPK/AKT/mTOR yolağı üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Periferik damar hastalıklarında mTOR ve AKT üzerinden otofajiyi azalttığı aktarılmıştır. Karaciğer iskemik reperfüzyonda ise MKH için ısı-şok proteinlerinin mTOR üzerinden otofajiyi engellediği saptanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis

2.1.1. Testis Embriyolojisi

Testisin gelişiminde genital organ taslakları başlangıçta aynıdır. Gonadlar, mezenteriyumun kökü ile mezonefroz arasında mezodermden gelişir. Burada kalınlaşan çöлом epiteli altındaki mezenşim ile blastem yapar. Bu, farklılaşmamış devirdeki gonad taslağıdır. Bu taslaktandereine ve mezenşim içine doğru çoğalan hücre kordonları anastomoz yaparak mezonefroz ile bağlantı yapar. Hücre kordonlarındanbiri küçük, kübik ya da prizmatik epitel hücreler diğeri isearadabulunan büyük, yuvarlak primordial hücrelerdir. Erkek cinsiyetinde yedinci haftada başlayan testis oluşumu görülür. Bu aşamada primordial hücreler spermatogoniumu oluşturur, küçük kübik hücreler ise Sertoli hücrelerini yapar. Mezonefroza yakın 3 ile 5 lumbal vertebralar düzeyindeyer alan testis taslakları, normalde buldukları yere göç ederler (6). İnguinal kanal içine intrauterin 4. ayda girip doğum öncesi skrotuma inerler (Resim 1).



Resim 1: Testis Embriyolojisi (<https://oncohemakey.com/reproductive-embryology/>)

2.1.2. Testis Histolojisi

Testisler sperm ve androjen üretiminden dolayı salgı bezi olarak bilinirler. Testislerin çalışmasında için hormonal düzenleme önemlidir. Hormonal düzenleme, hipofiz-Leydig ve Sertoli hücre ilişkisine bağlı olup endokrin ve parakrin yol ile yapılır (6). Seminifer tübüller yaklaşık 150 µm çapında ve 80 cm uzunluğundadır. U şeklinde olup rete testise açılır. Rete testis, sperm, salgısal proteinler ve iyonları toplayan kanallardan oluşur. Seminifer tübül; sertoli hücreleri ve spermatogenetik hücreler epitelyum ile merkezi bir lümeninden meydana gelir. Spermatogenetik hücreler spermatogonyumlar, spermatozoidler ve spermatozoidlerdir. Epitelde bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve myoid hücreler bulunur. Tübüller arasındaki boşluk alan kan damarları, lenfatik kanallar veya sinüzoidleri, makrofajları ve androjen üreten Leydig hücrelerini içermektedir (6).

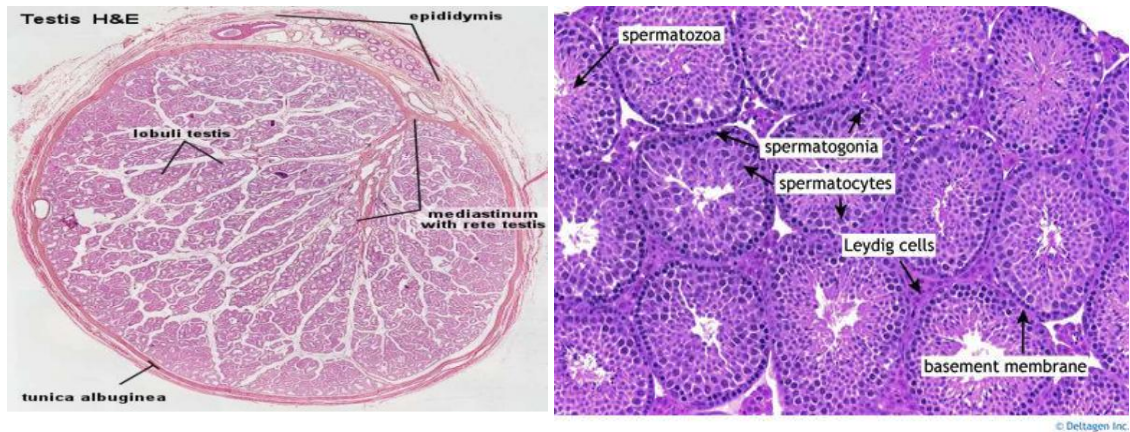
Puberte öncesi seminifer epitelde çok prizmatik sertoli hücresi bulunur. Puberte sonrası tübüllerde yaklaşık %10 civarında hücre vardır. Bazal laminadan tübül lümenine uzanan bu hücreler kan testi bariyerini yapar ve spermatogenetik hücrelere destek verir. Spermatozoid atıklarını fagosit ederler. Kasılmaları sağlayarak olgun spermatozoidlerin lümenine atılmasını ve lümenine protein ve iyonlarca zengin bir sıvı salgısını gerçekleştirir. İnhibin ve aktivin salgısının yanı sıra FSH Androjen-Bağlayıcı Protein (ABP) sentez ve sekresyonunu organize eder (7).

Gonositlerden kaynaklanan spermatogonyum, spermatozoid, spermatozoid ve spermatozoid kökenlerini primordial germ hücrelerinden alır. Bu hücrelerin ilk aşaması 4. haftada yolk kesesi endodermi duvarında olur ve gonad taslaklarına doğru göç eder. Gonadların ilk belirtileri 5. haftada başlar. Tübül bazal membranında oturan küçük diploid germ hücreleri olan spermatogonyumlar puberteden önce bölünmez. Fetal dönemde üç tür spermatogonyum gelişir. Açık tip A, koyu tip A ve B tipi spermatogonyumlardan B tipi spermatogonyumlar primer spermatozoidlerle devam eder. Primer spermatozoid oluşumu B spermatogonyumların son mitoz bölünmesinden sonra olur (7). İlkel spermatogonyum ile özelleşmiş spermatozoid arasındaki sürece spermatogenez denir (Resim 1).

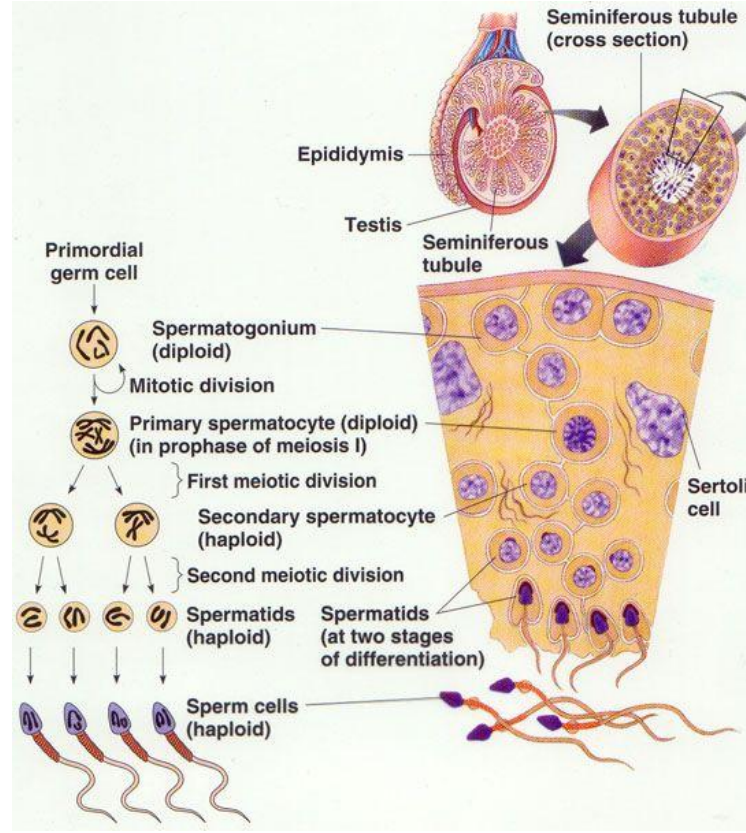
Açık veya soluk A tipi olanlar B tiplerinden daha az bulunup oval veya yuvarlak ve bazal lamina üzerine otururlar. Açık tip A spermatogonyumlar mitozla

primer spermatositleri oluşturur. Soluk veya açık A tipi olanlar kök hücre tipindedir ve bölünüp her iki hücreyi yaparlar. Primer spermatositler mayozun preleptoten, leptoten, zigoten, pakiten ve diploten evrelerini geçirerek sekonder spermatositleri yaparlar. Bunlar da ikinci bir mayoz ile haploid spermatidleri oluştururlar. Spermatidler bölünmeden spermatozoonu ve sonrasında olgun spermli yapar. B tipi spermatogonyumlar, mayoz ile spermatositleri yapar (8). Spermatositler ikinci mayoz ile haploid spermatidleri oluşturur (Resim 3).

Spermatidde oluşan kalıtsal özellikler spermiuma iletilir. Spermiumda akrozom, sperm oosite girmesini sağlar. Memelilerde spermatidten spermiuma geçiş basamaklıdır. Bu basamakların ilki olan Golgi fazında, önce spermatidin nükleusu etrafında veziküllü yapılar olan proakrozomal veziküller çoğalarak yerinibüyük boşluklu akrozom vezikülüne bırakır. Kromatid cisimcik karşıya geçerek flagellum yapımına katılır. Akrozomal granül akrozomu yapar ve nükleusun ön yüzü akrozom olur. Galaktoz, mannoz, fruktoz karbonhidratları ile hyaluronidaz, asit fosfataz, nükleoidaz enzimleri burada yoğunlaşır. Mitokondriler orta parçadadır. Spermiumogenезin son evresi olgunlaşma fazı olup spermatid son şeklini alır ve spermatidin çekirdeğinden spermiumun başı, sentrioller ile mitokondrilerden de kuyruk bölümü oluşur. Spermiumların metabolik ihtiyaçlarını sertoli hücreleri sağlar (8). Spermatogenez; çok sayıda spermatogonyum elde edilmesi, mayoz ile genetik çeşitliliğin oluşması, kromozom sayılarının yarıya inmesi ve herhangi bir zarara karşı sıkı paketlenme aşamalarını içermektedir (Resim 3).



Resim 2: Testis Histolojisi (<http://histology-world.com/photoalbum/displayimage.php?pid=1162>)



Resim 3: Testis Germ

Hücreleri(<https://www.pinterest.com.au/pin/224757837629122203/>)

2.1.3. Testis anatomisi

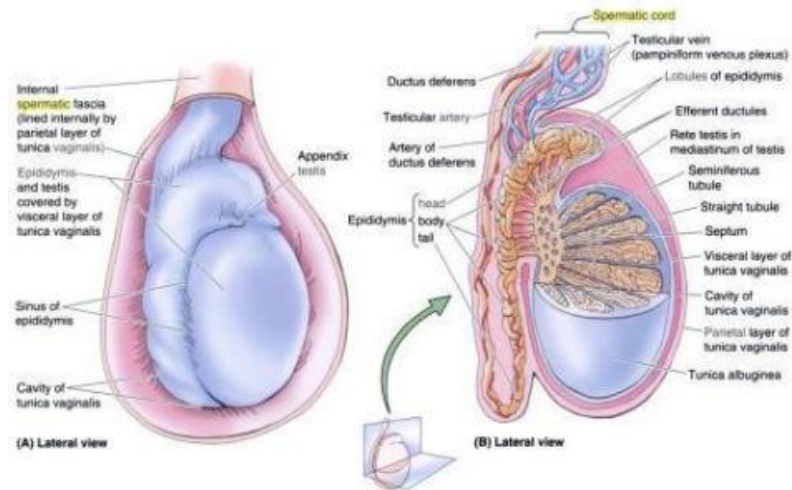
Testisler skrotum içinde sağlı sollu bir çift olarak funikulus spermatikusa asılı durumda bulunurlar (Resim 4). Periton ile kaplı olan testislerin ön kenarı, her iki yüzü ve uçları düz, konveks yapıdadır ve sadece arka kenarın lateral kısmı peritonla örtülüdür. Testisin damar, sinir ve kanalların geçtiği medial peritonsuz kısmında epididimis bulunur. Damar ve sinirler septalar yolu ile testis içindeki interstisyuma bağlantı yaparlar (9).

Tunica albuginea, testisler dıştan saran mavi-beyaz renkli fibröz özellikli bir tabakadır. Tunika vaskuloza, tunika albugineanın altındaki damar ağı tabakasıdır. Çok sayıda trabekül ve septalar, tunika albugineadan itibaren testisleri 200 - 300 adet lobüle ayırır. Kör bir uçla başlayıp, mediastinum testise bağlanan testiküler lobüller, 1

ile 4 adetten oluşan kıvrımlı, 30 ile 70 cm uzunluğa ve 150 ile 250 mm çapa sahip olan seminifer tübüllerden oluşur. Testisler erişkin erkek için, 2.5x3x4.5 cm boyutlarına, yaklaşık 12 gr ağırlığına ve 15- 20 ml hacimesahiptir (9). Lobülleri oluşturan seminifer tübüller rete testis denilen kanal sistemine bağlanırlar. Mediastinum testisin üst bölümünde bulunan rete testis, sayıları 10 ile 15 arasında değişen kanallar şeklinde devam eder ve daha sonra tek bir kanal olan epididimal kanala dönüşür.

Testislerin kanlanması, aortanın ventral yüzünde renal arterlerin 2- 3 cm altından çıkan spermatik kordla beraber seyreden testiküler arter ile sağlanır. Testiküler arter kremasterik, vazal ve epididimal arterler ile çok sayıda anastomoz yapar. Önce funikulus spermatikusun saran plexus pampiniformisi oluşturan testis ve epididim venleri, birbirleriyle birleşerek testiküler veni meydana getirirler. Sol taraftaki vena renalis sinistraya açılırken, sağ testiküler ven, vena cava inferiora dökülür (9). Kollateral venöz drenajı eksternal pudental ven, posterior skrotal ven ve kremasterik ven sağlar (Resim 4.).

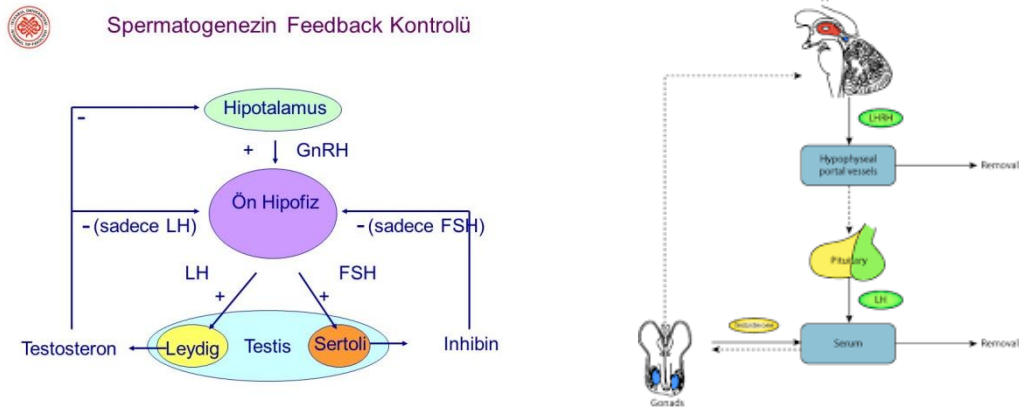
Lenfatik drenaj; derin ve yüzeysel olacak şekilde iki grupta toplanır ve testiküler vene paralel şekilde paraaortik lenf nodlarına açılır. Sinir innervasyonu ise sempatik visseral afferent ve postganglionik lifler ile olur. Testiküler lifler testiküler damarlara paralel seyrederek. Testise gelen sinir lifleri tunika albuginea tabakasında dallara ayrılır ve interlobüler septaya ulaşır (9).



Resim 4: Testis Anatomisi (<https://anatomytopics.wordpress.com/2009.01.04/the-anatomy-histology-and-development-of-the-testis-epididymis-and-ductus-deferens/>)

2.1.4. Testis Fizyolojisi

Testis fizyolojisinde spermatogenez önemlidir ve spermatogonyum ile başlayarak spermium aşamasına gelen germinal hücreler, testis, vezikula seminalis, epididimis ve prostat salgıları ile birleşerek ejakulatı oluşturur. Testosteron salgılanması interstisiyel Leydig hücreleri tarafından gerçekleştirilerek endokrin işlevinde rol oynar. Sertoli hücrelerinden de B-inhibin, FSH supresyonu ile salgılanır (Resim 5). Testisin fonksiyonları, hipofiz ön lobundan salgılanan FSH ve LH hormonlarının etkisi ve kontrolü ile hipotalamus yönetimindedir. Hipotalamustan salgılanan FSH (Folikül stimulan hormon) "FSH-releasing faktör" ile kontrol edilir ve seminifer tübüllerdeki primer spermatositleri, sekonder spermatozite dönüştürerek spermatogenez başlatır. İnterstisiyel hücrelerden salgılanan testosteron ve LH da spermatogenez için gereklidir. FSH, spermatogenez esnasında inhibin tarafından kontrol edilir. Leydig hücrelerinden testosteron salgılanmasını sağlayan LH (Luteinizan hormon, ICSH: İnterstisiyel hücre uyarım hormonu), hipotalamustan salgılanan "LH-releasing faktör" kontrolü altındadır. FSH ile birlikte uygulandığında etkisi artar ve salgılanması kan testosteron düzeyi ile ayarlanır (10).

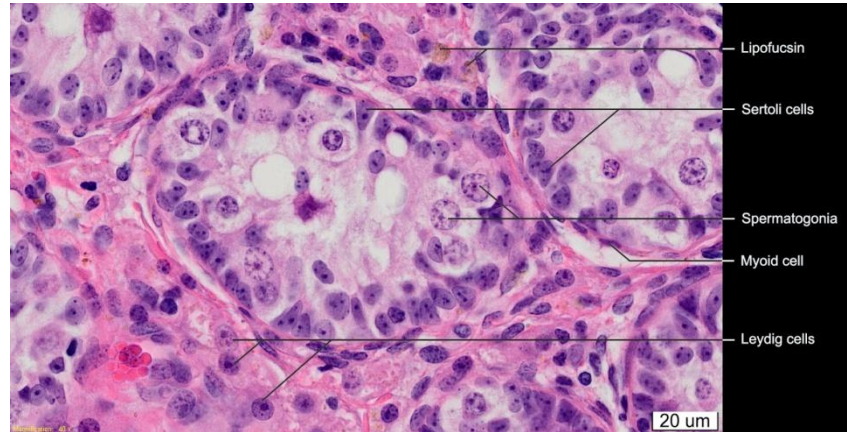


Resim 5: Testis Fizyolojisi

(<http://slideplayer.biz.tr/slide/3182605/release/woothee>,
<https://models.physiomeproject.org/exposure/0f99227387a90269934cb29b9848a49b>)

Sertoli Hücreleri ve Kan Testis Bariyeri

Sertoli hücreleri bazal membran üzerine oturan, silindirik ve düzensiz şekilli hücrelerdir (Resim 6). Genellikle armut, üçgen ya da oval şekilli bir nükleusa sahip bu hücrelerde nükleus ökromatik yapıdadır. Eozinofilik sitoplazmaları içerisinde, lipofuksin, lipit damlacıkları, uzun ve ince mitokondriler, düz ve granüllü endoplazmik retikulumlar, lizozomlar ve heterofajik vakuoller ihtiva eden bu hücreler ayrıca geniş bir Golgi aygıtına sahiptir. Kromatinden yoksun oldukları için ışık mikroskobunda soluk renkte görünmektedirler. Bazı Sertoli hücrelerinde, bu hücrelere özgü Charcot-Böttcher kristaloidleri bulunur. Bunlar ince, 10-25 µm uzunluğunda fusiform yapılarıdır ve bazen ışık mikroskobunda görülebilirler. Sertoli hücreleri, puberteye kadar testisin ana hücreleri olup, puberteden sonra seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluştururlar. Yaşlılıkla birlikte, germ hücrelerinin sayısı azalmaya başlar ve sertoli hücreleri tekrardan seminifer epitelin baskın bileşeni olmaya başlar (11).



Resim6:Myoid ve Sertoli Hücreleri

(<http://loriequinesection.blogspot.com/2016/04/a-cryptorchid-testicle-keywords.html>)

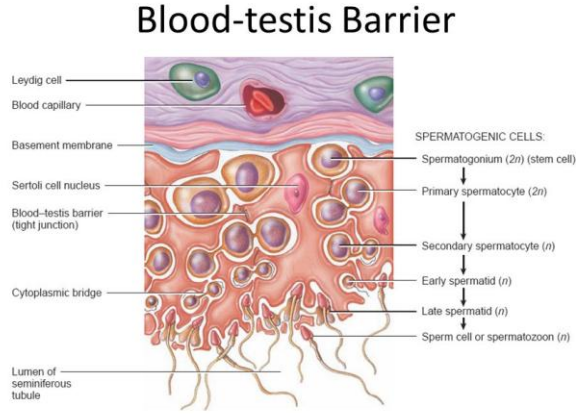
Sertoli hücrelerinin testisteki başlıca fonksiyonları şunlardır:

- Embriyolojik gelişimde Anti-Müllerian (Müllerian inhibe edici) hormonu üretmek.
- Spermatogenik hücrelerin embriyolojik gelişimini desteklemek, korumak ve beslemek

- Aktin bağlantılı kasılmalar ile olgunlaşmış spermatidlerin, spermiyasyon sürecindeki seminifer tübül lümenine salınımlarını kolaylaştırmak,
- FSH uyarımı ile testosteronun yoğunlaşmasında önemli olan androjen bağlayıcı proteini (ABP) sentezlemek,
- Hipofizden FSH uyarımını engelleyen; inhibin ve FSH salınımını uyarıcı aktivin peptidlerinin sentezlenmesi,
- Seminifer tübüllerin lümenine iyonlardan zengin bir sıvı ve proteinleri salgılamak,
- Spermiyogenezin sonunda atılan artık cisimcikleri fagosite etmek,
- Üreme hücrelerinde demir taşınımından sorumlu, testiküler transferrinin sentezlenmesi ve salgılanması,
- Birbirleri ile yaptıkları sıkı bağlantılar aracılığı ile kan-testis bariyerinin oluşturulması.

Sertoli hücrelerinin birbirleri ile yaptıkları, sıkı ve oluklu bağlantılar ve desmozomlar ile oluşturulan kan testis bariyerini, seminifer tübüllerdeki germ hücrelerinin gelişimi için ortam yaratmaktadır. Klaudinler, okludin ve JAM'lar (Junctional adhesion molecules), sertoli hücrelerindeki sıkı bağlantılarda bulunan proteinlerdir. Klaudin ailesinin 24 üyesi bulunmaktadır ve bu üyelerden klaudin-1, klaudin-8 ve klaudin-11 rat testislerinde tespit edilmiştir. Klaudin-11, sertoli hücrelerinde eksprese olmaktadır ve bu genin mutasyonu kan testis bariyerinde sıkı bağlantıların oluşmaması ile mayoz tamamlanamadığı için erkek infertilitesine neden olmaktadır. Okludin, klaudinler ile benzer olmasına rağmen, bu iki sıkı bağlantı proteini arasında dizi benzerliği yoktur. Yapılan araştırmalar, fokal adezyon kinaz (FAK) enziminin yokluğunda okludinin kuyruk kısmında fosforilasyon eksikliğinden dolayı sıkı bağlantı komplekslerinde bozulmaya neden olduğunu ortaya koymuştur (13). Hem sertoli hem de germ hücrelerinin sentezlediği ve spermatogenez sırasında germ hücrelerinin lümene doğru hareketinden sorumlu olduğu bilinen JAM'lar ise klaudin ve okludin'den farklıdır. Yapılan çalışmalar, JAM-C'nin yokluğunda spermiogenezin başarısız olmasına bağlı infertilite oluştuğunu göstermişlerdir (14, 15). Seminifer tübüller, kan testis bariyeri ile bazal ve adluminal olmak üzere iki

kompartmentına ayrılır (Resim 7). Adluminal; mayoz, spermiyogenezis ve spermiyasyon, bazal; spermatogonial hücre bölünmesi ve prelektoten spermatozidlere farklılaşma fonksiyonlarının görüldükleri yerlerdir (16).



Resim7:Kan testis bariyeri ve kompartmanlaşma

(<http://slideplayer.com/slide/10585236/>)

Seminifer epitelin, seminifer tübüller ve intersitisyel alanlar arasında bulunan kan damarları, kılcal damarlar, lenfatik damarlar ve sinirler ile bağlantılı olmamasından dolayı maddelerin bazal kompartmandan adluminal kompartmana geçişi, bariyerin fiziksel fonksiyonu ile kısıtlanmaktadır. Kan testis bariyerinin immünolojik rolü sayesinde, spermatogenik seri hücreler ile immün sistem arasında bir set oluşturarak immün yanıtın ortaya çıkmasının engellenmesi ve immünolojik infertilitenin ortaya çıkmasının engellenmesi sağlanmaktadır (18).

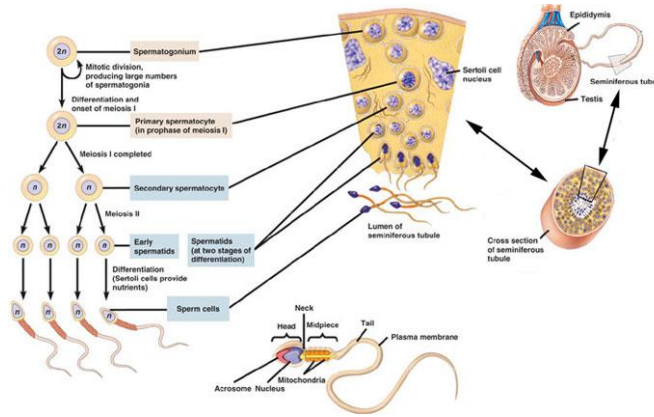
Spermatogenik Seri Hücreler ve Spermatogenezis

Spermatogenik seri hücreler seminifer tübüllerdeki fonksiyonel yapılardır. Spermatogenezis evrelerinde, farklı morfolojik görünümler aldıkları için spermatogonium, primer spermatozid, sekonder spermatozid, spermatid ve spermatozoon (sperm) gibi hücreler, bazal lamina ile lümen arasında yerleşik 4-8 tabaka halinde bulunmaktadır. Spermatogoniumların üç tipi bulunmaktadır (17, 18).

- **Koyu A tipi spermatogoniumlar:** Kubbe şeklindeki, seminifer epitelin kök hücreleri olan koyu A tipi spermatogoniumlar, mitoz ile bölünerek hem koyu hem de açık A tipi spermatogoniumları oluşturmaktadırlar.
- **Açık A tipi spermatogoniumlar:** Ökromatik belirgin nükleus, az miktarda Golgi kompleksi ve granüllü endoplazmik retikulum ve ribozomlara sahip olan bu hücreler testosteron etkisiyle mitozla bölünmeye girerek B tipi spermatogoniumları oluştururlar.
- **B tipi spermatogoniumlar:**Küre şeklinde merkezi nükleusa sahip olan bu hücreler, primer spermatositleri oluştururlar.

Spermatogenik serinin en büyük hücreleri olan Primer spermatositler oluşumlarından sonra adlüminal kompartmana geç eder ve 22.gün sonunda sekonder spermatidlere farklılaşırlar. Hızlı bir interfaz aşaması ve belirgin bir DNA sentezi olmayan hücre bölünmesi ile sekonder spermatositler, spermatidleri oluştururlar (6).

Spermatidler yaklaşık 7-8 µm çapında, küçük, yuvarlak şekilli ve haploid olan hücreler yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleusları ile ayrt edilirler (Resim 8).

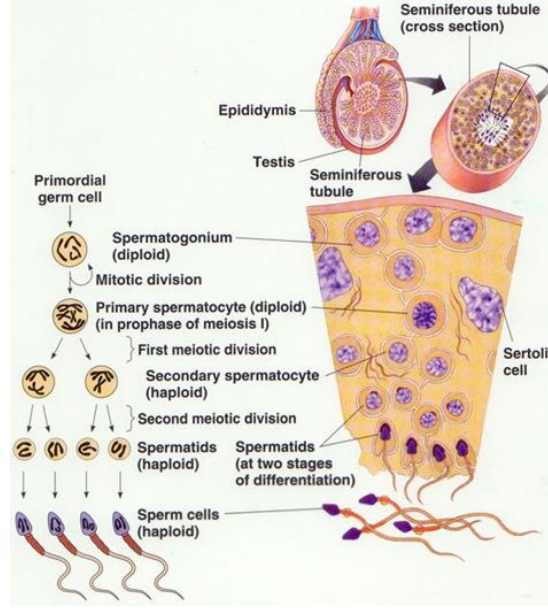


Resim8:Spermatogenik seri hücrelerinin şematik gösterimi
(http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/devel/animal_development.htm)

Spermatositogenezisde, kök hücre olan koyu A tipi spermatogoniumlar seri mitoz bölünmeler ile hem kendi yerlerine geçecek hücreleri, hem de primer spermatositlere farklılaşacak olan hücre popülasyonlarını oluştururlar. Mitoz bölünmeler ile oluşan B tipi spermatogoniumlar mitozla devam ederek primer spermatositleri oluştururlar ve bu aşamada spermatogenezis son bulur (20, 21). Ratlarda primer spermatositler açık A tipi spermatogonium 6 mitotik bölünme geçirirdikten sonra büyüme evresine girerek oluşmaktadır (22).

Mayoz bölünmede primer spermatositler kan testis bariyerinin adluminal kompartmanında I. mayoz bölünme ile sekonder spermatositlere dönüşürler. Birinci mayozun profazı insanda çok uzundur ve 24 güne kadar uzayabilir. Her primer spermatosit iki sekonder spermatositi oluşturmak üzere profazın sonunda bölünür. Replikasyon sonucunda kromozomlar, sentromerlerinden birbirine bağlı iki kromatid içermektedir. Her kromozom çifti ayrılır ve 23 kromozomdan oluşan iki grup oluşturur ve sekonder spermatositler çok kısa interfaz ve profazı olan II. mayoz bölünmeye girer. Kromozomlar II. mayozun metafazında sentromerlerinden bölünerek 23 kromozomdan oluşan iki adet kromozom meydana gelir. Bu kromozomlaranafazda, oluşacak olan spermatidlere rastgele dağıtılır. Telofaz safhasında ise haploid sayıda kromozoma sahip 2 spermatid meydana gelir (Resim 9).

II. mayoz bölünme sonucunda da sekonder spermatositler, haploid kromozom içeren spermatidleri oluştururlar (17, 20).



Resim9:Spermatogenezde I. ve II. mayoz bölünme

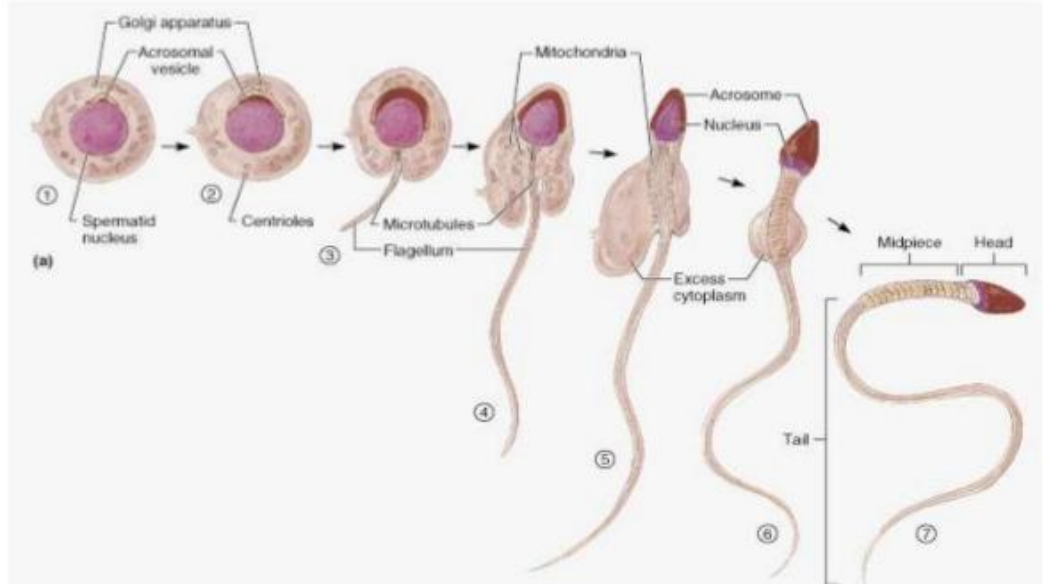
(<https://www.majordifferences.com/2013/06/difference-between-spermatogenesis-and.html#.Wxb8rzSFPIU>)

Spermiyogenez üç aşamada gerçekleşmektedir: **Golgi fazı**, **şapka fazı** ve **akrozom fazı**.

Spermatozoanın oosite girmesi için gerekli olan hidrolitik enzimler, **Golgi fazında**, granüller şeklinde birikir. Bunlar Golgi kompleksinde PAS-pozitif yapıda küçük proakrozomal olup birleşerek tek bir **akrozomal granülü** yapar. Hücre yüzeyinde sentriyoller yerleşipakrozomal granül oluşumunun karşısına gelir. Sentriyoller yeniden nükleusa gidip aksonemusarar.Bu sırada flagellar aksonem oluşturur.

Şapka fazında, akrozomal vezikül ve granül, nükleusun ön yarısını kaplayarakhiyalüronidaz, asit fosfataz ve proteaz gibi bazı hidrolitik enzimleri içeren **akrozom** adını alır.

Akrozom fazında, spermatid seminifer tübülün tabanına geçer. Sentriyollerden bir tanesi **flagellumu**yapar. Flagellumun proksimal kısmındaki mitokondriler **orta parçayı** yapar. Mikrotübüller ve ATPaz aktivitesine sahip **dinein** flagellum hareketini gerçekleştirir (17, 18, 20).

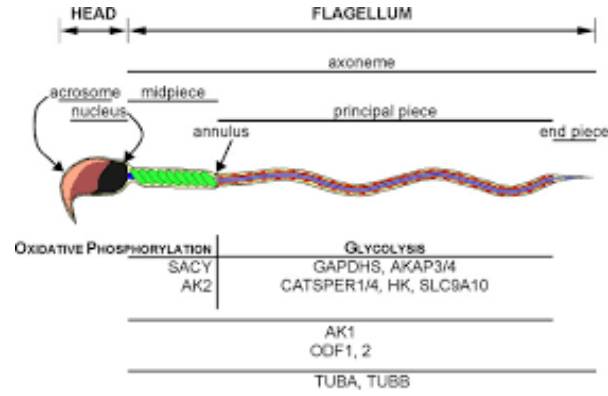


Resim10:Spermiasyon sırasında yapısal farklılaşma

(<https://www.slideshare.net/opkholwad/spermatogenesis-81924391>)

Spermiasyon evresinde spermatidler lümene salınır ve bu sıradaspermatozoanın sertoli hücresi ile ilişkisi ortadan kaybolur ve spermatid serbest kalır ve spermatozoon denir (Resim 10). Peritübüler myoid hücrelerin kasılması ile seminifer tübülün lümenine doğru ilerletilirler (17, 18).

Olgun spermatozoonlar, baş ve kuyruktan oluşan 60-65 µm uzunluğunda yapılardır. Baş kısımları yassı ve yoğun bir nukleus ile hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin olarak adlandırılan tripsin benzeri proteaz gibi hidrolitik enzimleri içermektedir. Sıçanlarda insanlardan farklı görünüme sahip olup baş kısmı kancalıdır (Resim 11). Olgun spermatozoonların kuyruk kısmı; boyun, orta parça, esas parça ve son olacak şekilde bölümlere ayrılır. Boyun kısmı sentriyolleri içerirken, orta parça mitokondrileri içerir ve kuyruğun hareketi için enerji sağladıkları için spermatozoonun hareketinden sorumlu olurlar. Esas parça kalın aksonemin dışındaki fibröz kılıfı içerir ve son parça yalnızca aksonemi içermektedir (24).



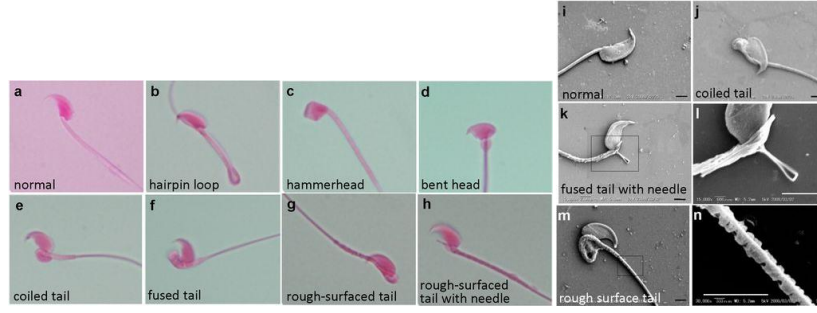
Resim11:Rodent spermatozoonu

(<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mrd.21393>)

Spermatozoonlar túbülün lümenine salındığında hareket yeteneğinden yoksundurlar ve testis içi kanallardan geçerek ductus efferente ve daha sonra ductus epididimisin proksimalineulaşarak hareket yeteneği kazanırlar. Spermatozoonlar, ductus epididimisinde bazı değişimler geçirerek olgunlaşırlar. Bu değişimler şunlardır (17, 18, 21):

- Nükleus içeriğinin yoğunlaşmasından dolayı spermatozoon baş kısmının boyutunun küçülmesi.
- Sitoplazmanın azalmasından dolayı spermatozoonların incelmeleri,
- Glikozilasyon ile birlikte plazma membranında değişimler,
- Fertilizasyon yeteneğinin inhibe edilmesi için yüzey-ilişkili dekapasitasyon fonksiyonunun dış akrozomal membrana eklenmesi.

Spermatozoa DNA anomalileri ve organellerin yanlış konumlanması baş bölgesinde anomalilereden olmaktadır. Sentrozom kompleksi ile ilgili sorunlar da orta bölgedekimorfolojik anormalliklere neden olmaktadır. Aksonem kompleksi ile ilgili sorunlar da kuyrukta meydana gelen morfolojik bozukluklara ve sperm motilitesinin düşmesine ya da yok olmasına neden olmaktadır (24, 25, 26).

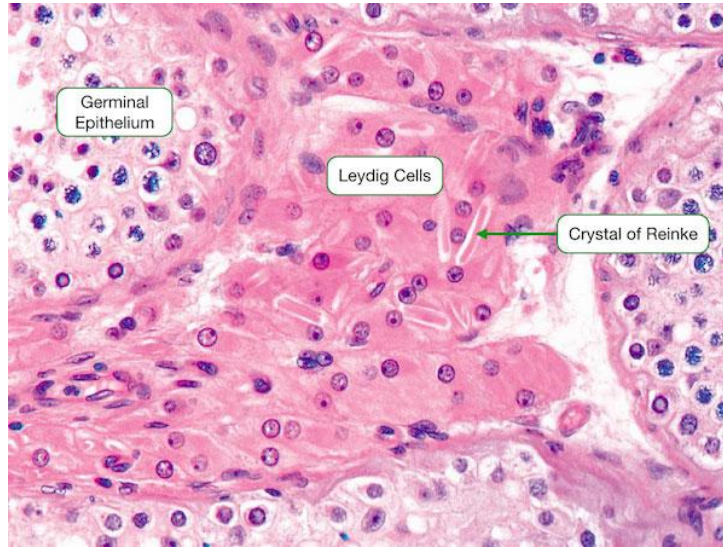


Resim12:Sıçanlarda başlıca spermatozoon şekil anomalileri

(<https://www.nature.com/articles/srep27409>).

İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri

Testislerde interstisyel alanlar, seminifer tübüllerin arasındaki boşluklardır. Androjen üretimi açısından mühim olan bu boşluklar; bağ dokusu, sinir, kan ve lenf damarları, fibroblastlar, mast hücreleri ve makrofajlar gibi hücrelerinden ve özellikle Leydig hücrelerinden oluşmaktadır. Leydigler pubertede fonksiyonel olup germ hücrelerinin gelişiminde rol alan testosteron üretiminden sorumlu hücrelerdir (24, 25) (Resim 13).

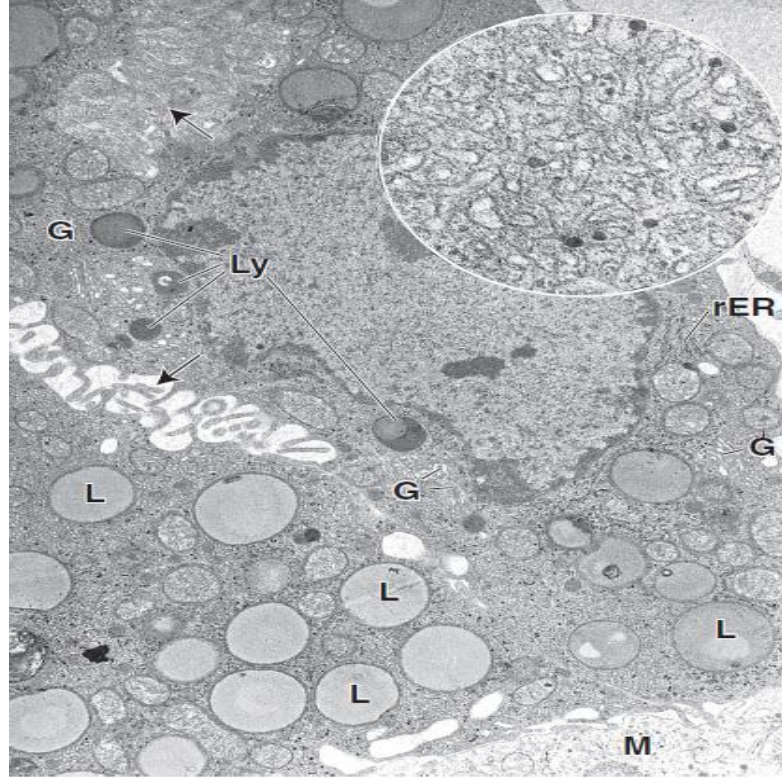


Resim 13:Seminifer tübül ve interstisyel alan histolojisinin şematik gösterimi

(http://medcell.med.yale.edu/histology/testis_sperm_development.php)

Poligonal ve eozinofilik olan Leydig hücreleri, lipid damlacıkları, merkezi ökromatik nükleus, golgi kompleksi ve 1 ya da 2 nükleolus ve ayrıca sitoplazmik

kristaller olan **Reinke Kristalleri** bulunmaktadır (Resim 13).Leydig hücreleri, testosteron sentezinde rol aldığından dolayı bol miktarda granülsüz endoplazmik retikuluma ve stereoid sentezleyen hücrelerin içerdiği tübüloveziküler kristali mitokondrileri de içermektedir (20).



Resim14:Leydig hücresinin elektromikrografı. Lipid damlacıklar (L), Golgi kompleksi (G), Lizozom (Ly), Düz endoplazmik retikulum (rER) ve Leydig hücresinin yüzeyi ile temasta olan makrofaj hücresi (M) gösterilmiştir (<http://slideplayer.com/slide/8804181/>).

2.2. *Ganoderma lucidum*

Çin, Kore ve Japonya ülkelerinde yüz yıllar boyunca tüketilebilir mantar olan *Ganoderma lucidum* (GL) tıbbi amaçlı kullanılan bir ilaç olarak kullanılmıştır. Japonca'da Reishi, Çince'de ise Ling Zhi olarak adlandırılan bu tıbbi

mantar"Ölümsüzlük Mantarı" olarak ta bilinmektedir.GL, Çin ve Japonya'nın geleneksel tıbbında, immünomodülatör ve adaptojenik özellikleri ile kullanılmakta olup Çin tıbbi ürünleri olarak yayınlanan eserde (Ben Cao Gang Mu" 1578 MS) 120 süper ot listelendiğinde (pin Shang) en saygın bitki olarak baş sırada yer almıştır (28).

GL için yapılan araştırmalar bu ilacın antiallerjik, antioksidan, anti-tümöral, antiviral, kardiyotonik ve karaciğer koruyucu özelliklerini ortaya koymuştur. Ayrıca, yüzyıllardır Çin ve diğer Asya ülkelerinde tümöral hastalıklar,kronik hepatitis, immünolojik bozukluklar, alerji, bronşit, ülser, hipertansiyon, hiperglisemi, yüksek kolesterol, yangı ve kanser gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (29).

Asya ülkelerinde, Japonya'da ve ABD'nin güney kesimlerinde üretilen GL'nin değerinin yıllık toplam 8.5 milyar dolar olduğu düşünülmektedir. Uluslararası piyasada ise gramı 1 dolara satılan, ekonomik değeri oldukça yüksek bir mantar türüdür. Bugün milyonlarca insan, enerjilerini arttırmak, sindirimi kolaylaştırmak ve iyi bir uyku için her gün Ganoderma'yı kullanmaktadır. Bunun yanı sıra Ganoderma birçok sağlık probleminin tedavisinde ve hastalıkların önlenmesinde de kullanılmaktadır. Ganoderma hala tedavi desteği ve sağlık koruyucu bir ürün olarak tüm dünyada tüketilmektedir (28).

GL, tıbbi şifalı bitkiler sınıfına giriyor olup tam anlamıyla ilaç olarak kabul edilmemektedir fakat 20 yılı aşkın bir süredir yürütülen deneysel çalışmalar ile farmakolojik etkinliği belirlendiğinden dolayı oldukça önemli bir biyoaktiviteye sahiptir. Şimdiye kadar bildirilen herhangi bir toksik ve yan etkisi ile karşılaşılmamıştır (29).

2.2.1.Ganoderma Lucidum 'un Morfolojik Özellikleri

Meşe ve diğer sert ağaçlar üzerinde bulunan GL; saplı, ikiye ayrılmış ya da böbreğe benzer bir şekilde olabilmektedir. Tohumları kalın, kuru ve kenarları sarıdır ama olgunlaşınca kenarları parlak kahverengiye dönmektedir. Eşeysiz üretilen GL'nin meyve kısımları spor üretmektedir ve hymenium, beyaz ve gözenekli görünüme sahiptir (30) (Resim 15).



Resim 15:Ganoderma lucidum'un Doğadaki Görüntüsü (<http://reishiturk.net/>)

2.1.2Ganoderma Lucidum'un Kimyasal Yapısı

GL'nin yapısında alkaloid, aminoasit, peptid, inorganik element, steroid, yağ ve organik asit gibi farklı kimyasal bileşikler bulunmaktadır ve bunlardan en önemlileri farmakolojik fonksiyonlara sahip triterpenler ve polisakkaritlerdir. GL, içerdiği triterpenler arasında ilk ekstrakte edilenler ganodermik asit A ve ganodermik asit B'dir. Sitotoksik, lipid düşürücü ve karaciğeri koruyucu özellikleri vardır. Aynı zamanda, trombosit agregasyonunu uyarıp, angiotensin konvertin çevirici enzimler ile histamin salgılanmasını baskıladıkları ileri sürülmüş ama mekanizma açıklanmamıştır.Yapılan araştırmalar, neovaskularizasyonun uyarılmasında ve anjiyogenez inhibisyonunda rol alan triterpenin ganoderik asit F olduğu görülmüştür.Monosakkaritlerden oluşan polimerler olan polisakkaritler, homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak ikiye ayrılır.Atomların en kararlı düzenlemesi hem molekül içi hem de molekül dışı güçlere bağlıdır. Yapısal nişasta olmayan polisakkaritler selüloz ve ksilan (xylan) gibi uzunlamasına konformasyonu, depo polisakkaritler ise amilopektin gibi geniş helikal konformasyonları tercih ederler.Polisakkaritlerin hipoglisemik etkileri olarak yapılan bir çalışmada, GL nin sıvı mantar kültürlerinin yapısındaki glikoproteinler ile farelerin dayanıklı yüzme kapasitelerinde önemli bir artış sağladığı tespit edilmiştir (28, 30).

Polisakkaritler için antitümoral etkiler immun sistemin güçlendirilmesi ile gerçekleşir. GL nin ise M-CSF ve TNF- α aktivasyonunu gerçekleştirerek bu etkiyi yaptıkları düşünülmektedir.Yapılan bir çalışmada subkutan olarak sarkoma 180 asitleri verilmiş farelere GL den izole edilen polisakkaritler uygulanmış ve sonuç olarak kanser hücrelerinin yayılmasının ve kontrolsüz üremenin azaldığı

gösterilmiştir. GL nin içerdiği polisakkaritler anti-tümoral aktivitelerini (1→3)-β-D-glukan şeklinde gösterirken, biyoaktivitelerini β-D-glukan olarak göstermektedirler. GL polisakkaritlerinin interlekin IL-1β, TNF-α, ve insan monosit makrofajlarında (IL-6) ve T- lenfositlerinde ki interferon (IFN)-γ üretimini uyardıkları tespit edilmiştir. Bu polisakkaritlerin, mitojenle-aktive protein kinaz (MAPK) ve protein kinaz C (PKC) uyararak nötrofillerin fagositik aktivitesini arttırdığı ve fosfatidilinositol yolunun aktivasyonunu sağlayarak faz-aracılı apoptoz oluşturdukları gözlenmiştir. Ayrıca glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesini indükleyerek bir “chemopreventive” olarak etki gösterdikleri de bildirilmiştir. GL nin aminopolisakkarit fraksiyonunun (G009), reaktif oksijen türlerini inhibe ettiği ve kanser fizyopatolojisinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. G009, oksidatif DNA hasarını azaltarak kemopreventif etki göstererek lipid peroksidasyonunu inhibe eder, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonlarını inaktif eder. GL nin suda çözünen formunun sitokin ekspresyonu ile dalak hücrelerinin proliferasyonunu uyardığı belirtilmiştir. GL, iki çeşit steroid içermektedir; kolesterol ve ergosterol. Anti-aterosklerotik ve yağ yakıcı özellikleri de olan GL’den izole edilen 20 farklı steroid belirlenmiştir. GL’un Ginsengteki germanyumdan 4–5 kat daha fazla germanyum içerdiği tespit edilmiştir. Germanyumun organik formlarının çok faydalı iken inorganik formu zararlı olduğu bildirilmiştir. Bunun çok güçlü bir antioksidan olduğu araştırmalar neticesinde bildirilmiştir; immun sistemi güçlendirici, toksin atıcı, yaşlanmayı geciktirici özelliklerinin yanı sıra adaptojen özelliği sayesinde kanın pH’sını dengeleme, potasyum, kalsiyum, trigliserit, bilirubin ve ürik asit seviyelerini normalleştirme, tiroid bezinin çalışmasını düzenleme ve damar tıkanıklığını engelleme gibi birçok faydası vardır, ayrıca HIV virüsünün çoğalmasını engellediği de ifade edilmektedir (29, 30).

2.3. Mezenkimal Kök Hücre (MKH)

2.3.1.MKH İzolasyonu, Çoğaltılması ve Karakterizasyonu

Hücre bölünmesi sırasında kendisini yenileyebilen vefarklı hücre tiplerine dönüşebilen hücelere "kök hücre" denir. Aldıkları sinyale göre farklı hücre türlerine dönüşürler. Hücre çekirdeğindeki genler, bir kök hücrenin hangi hücreye dönüşeceğini belirler. Kök hücreler,diğer hücreler ölünce veya hasar görünce, hangi hücre türüne ihtiyaç varsa o hücreye dönüşerek ölen hücrenin yerini alırlar. Bu işlem esnasında ilgili genler daha aktif hale gelirken, bazıları da baskılanır. Diğer hücre çeşitleri için kendisini yenileme gücüne sahip olan kök hücreler tükenmez bir kaynak görevi görür. Kök hücre ilk olarak insan embriyosundan 1998 yılında elde edilip hücre kültüründe çoğaltılmasından sonra kök hücre araştırmaları hızla devam etmiştir (31).

Vücutta apoptotik hücrelerin veya organların yerini doldurmak üzere laboratuarda kök hücrelerinden yeni hücreler, hatta son çalışmalara göre yeni bir organ elde edilebilmektedir. Ancak hücrelerin sinyalizasyonunu, genetik şifresini ve kontrol mekanizmalarını çok iyi bilmek gerekir. Kromozomların ucunda bulunan ve "telomer" denilen DNA zincirleri,hücrelerin bölünme kapasitesini belirleyen faktörlerden biridir. Telomeraz enzimi bu zincirlerin uzun kalmasını sağlar ve ne kadar aktifse telomer uzunluğu da o kadar korunabilir. Kök hücreler bu konuda oldukça kullanışlıdır çünkü çok aktif telomeraz faaliyeti ve bundan dolayı uzun telomer zinciri vardır. Böylece kök hücreler çok uzun süreler ile bölünerek kendilerini kopyalayabilirler (32, 33).

Kök hücreler; totipotent, pluripotent ve unipotent olarak 3 grupta incelenirler. Totipotent kök hücrelersınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğindeki kök hücrelerdir. Embriyo, organlar ve embriyo sonrası tüm doku ile embriyo dışı membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanırlar Organizmadaki birçok dokunun oluşmasına kaynak oluşturan kök hücreler Pluripotent kök hücrelerdir. Tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış hücreler Unipotent kök hücrelerdir.Kan hücrelerine dönüşebilen göbek kordonunda, periferik kanda ve kemik iliğinde bulunan, belli özel yöntemlerle

ve belli büyüme faktörlerinin yardımı ile çoğaltılan kök hücreler Hematopoetik Kök Hücre'dir. Bütün memelilerdeki tahminen kök hücre sayısının 2×10^4 olduğu bildirilmiştir. Hematopoetik Kök Hücre'lerin küçük bir kısmı sıklusa girer ve günlük 4×10^{11} olgun kan hücresi üretimini sağlar. Yapılan çalışmalar irradiye edilmiş hayvanlarda retroviral belirteçler kullanılarak Hematopoetik Kök Hücre'lerin intravenöz transplantasyonunda kanda görülme zamanlamalarına göre yeniden çoğalan hücreler olarak ayrıldığını göstermiştir. Ancak diğer deneysel yaklaşımlar Hematopoetik Kök Hücre'lerin heterojen bir grup olduğunu da saptamış ve periferik kanda düşük düzeyde bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca kemoterapi sonrası iyileşme döneminde ya da hematopoetik büyüme faktörlerinin uygulanmasında dolaşan kök hücrelerde 1000 kat artış olduğunun gözlemlenmesi önemli gelişme sağlamıştır. Kök hücrelere özgü belirteçlerden periferik kan kök hücrelerinin belirteçleri; CD34+/CD38-, Thy-1+'dır ve miyeloid veya lenfoid serilere özgü belirteçleri ekspres etmezler (34).

Doğru olarak kullanıldığında, embriyonik ve yetişkin kök hücreler insan vücudunda hastalık veya yaralanma nedeni ile hasarlanan hücrelerin yerini alma potansiyeline sahip hücrelerdir ve kök hücre araştırmalarından gelen bilgiler heyecan ile karşılanmaktadır. Ancak, insan hücreleri üzerindeki araştırmaların giderek ivme kazanması ve klinik kullanıma girmesi çeşitli yasal düzenlemeler gerekliliğini doğurmuştur. Özellikle insan embriyosundan elde edilen hücrelerin deneysel amaçlı kullanımı etik değerler açısından oldukça tartışma konusudur. En çok tartışılan başlık ise potansiyel olarak bir bireyin gelişiminin ilk evresi olan embriyolar üzerinde yürütülen araştırmaların hangi sınırlar çerçevesinde olması gerektiğidir. Bilgiye daha çabuk ulaşmak ve yürüyen çalışmalara ivme kazandırmak için araştırma merkezlerinin bilgilerini paylaşması ve işbirliği içinde olması gerekmektedir. Kök hücre temelli tedavilere geçilebilmesi için güvenilirliğinin doğrulanması ve yararlılığının gösterilmesi yönünde çalışmaların yapılması gerekmektedir (35).

2.3.2.MKH Biyolojisi ve Fonksiyonu

Kemik iliği farklı hücrelere dönüşebilen çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan hematopoietik hücreleri ve mezenşimal kök hücreleri barındırmaktadır. Dolaşımdaki hücrelerin kökeni kemik iliğidir. Kemik yıkımında rol oynayan

osteoklast hücreleri de hematopoiyetik gruptan köken alır.MKH, kemik iliğinin mezenşimalden köken alan hücreleridir ve yetişkin kök hücreler olarak ayrılır. Farklılaşmadan hızlı bir şekilde bölünebilen hücrelerdir ve bu özellikleri sayesinde kemik, kıkırdak, kan, tendon, adipoz dokuyu oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Belirli dönem ve belirli belirteçlerin uyarılması ile kültürlerde kemik iliği mezenşimal hücrelerinin adipositlere dönüştükleri gözlenmiştir. Adipositlerin de, kültür ortamında yağ depolama özelliklerini kaybedip, osteoblastlara da dönüşebildikleri saptanmıştır. Büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks ilişkisi, hücre hücre etkileşimi ve hücre içi kinetiklerin organizasyonu MKH'nın farklılaşmasını etkileyen faktörler arasındadır. Buradaki adezyon molekülleri ve onların reseptörleri hücreler arasında fiziksel bir ilişkinin oluşmasını gerçekleştirmektedir. Hasar sonrasındaki yara iyileşmesinde kök hücre çoğalma ve farklılaşma yeteneklerini kullanarak orijinal hücreye dönmekte ve tedaviyi çok daha etkin ve hızlı bir biçimde gerçekleştirmektedir. Bu hücreler CD14, CD34, CD45 ve integrinlerden alfa-1, alfa-5 ve beta-1'i tanımlamaktadırlar (37).

Kronik hastalıklardan kanser veya organ yetmezlikleri gibi sorunlar insan kaybına yol açan nedenlerin başında gelir. Bunların kişilerde yol açtıkları olumsuz psikolojik etkiler ve ekonomik kayıplar da eklenince kronik hastalıklar en büyük toplumsal sorunlardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ölüm nedenlerinin başlarında gelen kronik hastalıklar, organ yetmezlikleri ve kanserler tam olarak tedavi edildiği takdirde insan ömrünün uzayacağı, bilinen bir gerçektir. Sinir sistemini ve beyni etkileyen Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklar doğrudan ölüme yol açmasa da yaşam kalitesini düşürürler. Bu hastalıklarda görevini yapamayan veya ölen sinir hücreleri kendilerini yenileyemezler. Kök hücreler kullanılarak cerrahi müdahaleye gerek kalmadan, o organdaki hastalıklı veya ölü hücrelerin sağlıklı hücreler haline gelmesi mümkün olacaktır. Örneğin kök hücre nakli ile kalp krizi geçiren ve kalp kaslarının büyük kısmını kaybeden hastalarda, kök hücrelerden üretilen kalp kası hücreleri nakledilebilecektir. Cerrahi müdahaleye gerek kalmadan damardan enjekte edilerek verilen bu hücreler kalbe ulaşarak hastalıklı veya ölü hücrelerin yerini alabilecektir. Aynı şekilde böbrek veya karaciğer hastalarında da kullanılabilir. Kök hücrelerden elde edilen sağlıklı sinir hücreleri beyne yollandığında hastalıklı hücrelerin görevini üstlenebilmektedir. Kök hücre hakkında yapılan son çalışmalar plastisite denilen geniş bir farklılaşma potansiyelinin hem

pluripotent embriyonik hücreler hem de kemik iliği stromal kök hücreleri (KİSKH) için var olduğunu göstermiştir. Kök hücrenin biyolojik özelliklerini incelemek için kullanılan kültür ortamlarının matriks molekülleri, büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer farklılaşmayı etkileyen faktörlerin incelenmesinde büyük kolaylık sağladığı bilinmektedir (37, 38, 39, 40).

2.4.Oksidatif Stres

2.4.1.Serbest Radikaller

İlk kez 1980'de Furchgott ve Zawadski tarafından endotel kökenli vazodilatasyon etkili bir maddenin (Endothelial Derived Relaxing Faktor, EDRF) tanımlanması ile Nitrik Oksit (NO) 'in keşfedilmesi gerçekleşmiştir. Yapılan çalışmalar NO'un organizmada birçok önemli rolü olduğunu saptamıştır ve 1992'de yılın molekülü olarak NO tanımlanmıştır. Çalışmalarda endotel kaynaklı nitrik oksidin sürekli vasküler fizyolojik düzenleyici olduğu bildirilmiştir. Ek olarak vasküler düzenlenmenin yanında birçok hücrede sentezlendiğini ve bir mediatör olarak immün direnç, nörotransmisyon ve hücrese adezyonun düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik olayda birincil görevi olduğu bilinmektedir. Renksiz bir gaz şeklinde bulunan inorganik serbest bir radikal olan NO'nun yarı ömrü 2–10 saniyedir ve hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından sentezlendikten kısa bir süre sonra nötralize edilerek nitrat ve nitrite dönüşür. Düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol alan NO'nun L-arjinin'in terminal guanidin grubunun NOS enziminin katalize ettiği bir reaksiyon sonucu NO'ya çevrilmesi sonucu sentezlenmektedir (41).

Başlıca yapısal (konstitütif) ve uyarılabilir (indüklenebilir) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadırlar. Hücre içinde daima var olan ve vasküler tonuayarlanmasında ve nörotransmisyonda rolü olan, intermittan küçük miktarlarda nitrik oksit üretimini sağlayan yapısal olan enzim NOS'dur (cNOS, NOS1, NOS3). NOS türevleri olarak nöronlarda ekprese edilen; nNOS, vasküler endotel hücrelerinde ekprese edilen; eNOS, endokard, myokard ve trombositlerde bulunur. cNOS;Ca⁺²/kalmodülin bağımlı bir enzimdir ve fizyolojik sınırlar içinde geçici olarak intrasellüler iyonize Ca⁺² konsantrasyonunun (10⁻⁷mol/L) yükselmesi

sonucu aktive olur ve esansiyel miktarda NO sentezlenmesine yol açar. Arteriyel ve venöz endotel hücrelerinde bulunan membrana bağlı bir enzim olan eNOS'un (NOS-3) aktivitesi asetilkolin, bradikinin, adenozin trifosfat (ATP), elektriksel uyarı ve sıvı akımıyla uyarılabilmektedir. Beyin, cerebellum, nöroblastlarda bulunannNOS, nörotransmitter olarak görev yapar. Fonksiyonel olarak Ca^{+2} bağımsız olması nedeniyle indüklenebilir NOS (iNOS, NOS- 2),cNOS'dan farklıdır ve endotel hücrelerinin dışında düz kas hücreleri ve makrofajlarda da bulunmaktadır. İlgili hücrelerin sitokinler ile uyarılmasından sonra NOS'un gen tanımlaması başlayarak belirli bir sürede NOS sentez edilir. NO'nun başlıca sentezlenen makrofajlarda bulunmasına rağmen, vasküler düz kas hücreleri, renal tübül hücreleri, kupffer hücreleri, endotel hücreleri, monosit ve polimorf lökositlerde tespit edilmiştir. Ancak kalp yetmezliği gibi artmış sitokinlerin bulunduğu durumlarda endotelde bulunan iNOS sitotoksik rol oynayarak immün cevapta, antimikrobiyal ve antineoplastik aktivitesinde önemli rol almaktadır (42).

İnsan ve ratların testis, epididim, prostat ve seminal veziküllerinde NOS protein ve aktivitesi tesbit edilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda farelerin spermatozoa ve kuyruklarında NOS'un varlığı gösterilmiştir fakat hangi formları olduğu bilinmemektedir. Enfeksiyon ve inflamasyonun sonucunda sentezlenen NO sperm motilite ve fonksiyonunda bozukluklara neden olabilmektedir. NO ile indüklenen sperm hasarının mekanizmasının DNA inhibisyonu olduğu tahmin edilmektedir. Önceki çalışmalarda nitrik oksitin düşük konsantrasyonu sodyum nitropurid gibi NO salıcı bileşimin sperm motilite ve canlılığının korumada rol aldığı gibi fare sperminin hipeaktivasyonunda da rol aldığı gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarında ise sperm respirasyonunu inhibeetmesiyle sperm motilitesiniolumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. NO molekülünün düşük konsantrasyonda sinyal transdüksiyon işlevi görüp sperm motilitesini artırırken yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki yaratmaktadır. Sperm kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu üzerine yapılan çalışmalarda, NO salan bileşenlerin düşük konsantrasyonları ile inkübasyon sonucu sperm kapasitasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (43).

Testikülertorsiyon sonucunda, kan akımının azalması sonucunda iskemi gerçekleşmektedir. Tek taraflı testis torsiyonu yaygın bir cerrahi sorun olup, irreversible değişiklikler yaparak karşı testisi de etkileyerek hasar oluşturur. Mitokondri elektron transport oksidatif fosforilasyon sekansının inhibe edilmesi ile ATP ve kreatinin fosfat hücresel seviyede azalır. Böylece anaerobik glikoliz aktivasyonu ile hücresel fonksiyonların devam edilmesi sağlanır. Hücrede glikojen seviyeleri azalmasından dolayı laktik asit birikimi artar ve pH azalır. Testis torsiyonunda ATP ihtiyacının artmasından dolayı spermatik kanal hücreleri oksijene bağımlı serbest radikallerin üretimini artması ile hasarlanır. Kan akışı ile ATP miktarında artış olması beklenir. Lipidlerin peroksidasyonu hücre membranının geçirgenliğini ve hücre bütünlüğünü bozmaktadır ve sekonder membran hasarına yol açmaktadır. Bu sebepten dolayı testis torsiyonu vakalarında tedavilerin etkinliklerinin sağlanabilmesi için hem sitolojik ve patolojik mekanizmaların anlaşılması hem de bunları yönlendiren moleküler çalışmaların yapılması iskemiyeye bağlı hasar üzerine neler yapılabileceği ile ilgili bilgiyi bize verecektir (43, 44, 45).

Yapılan araştırmalarda immün sistemde rol alan mast hücrelerinin, NOS ve endojen NO ekspresyonuna etkisi olduğu gösterilmiştir. Çalışmalarda testiste yüksek iNOS varlığında önemli patolojik değişiklikler saptanmış ve intertisyel alanda mast hücre artışı ile iNOS artışı arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda NO artışı ve testisteki oksidatif strese bağlı hasarın histopatolojik dejenerasyona neden olduğu belirtilmiştir. Damar tonusunun fizyolojik düzenlenmesine katkı olarak intraselüler Ca artışı için eNOS ve nNOS testiste temel olarak bulunur. Leydig hücreleri, sertoli hücreleri, spermatogonia ve spermatozoidlerden eksprese edilen eNOS, iskemik testis ve 12 saatten daha az reperfüzyona uğramış testiste NO üretimini az da olsa düşürür. NO molekülü inflamatuvar hücreler tarafından üretilen birkaç sitokin etkisi ile düşmektedir. eNOS ya da nNOS nonspesifik bir şekilde reperfüzyonun erken safhalarında artmış hipoksi ve NO²⁻ nin vazodilatör etkisi ile gözlenir. 1 saat boyunca 720° torsiyon uygulanan grubun son safhalarında kan akımı, 3.gün reperfüzyon uygulanmış grup ile karşılaştırıldığında sham grubunda 5 kat fazla iken opere olan grupta 3 kat daha fazla bulunmuştur. 30 günlük detorsiyon uygulanmış kontrol grubunda kan akımı 40 kat artarken kontrol grubunda 3. gün sonu kan akımı ölçüldüğünde torsiyon sonuna göre 20 kat artış gözlenmiştir (46, 47).

Testis torsiyon uygulaması sonrasında oluşan oksidatif stres için testisi de içeren farklı organlardaki hasarın reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Uzak organ hasarı olarak bilinen bu hasar akciğer, kalp, böbrek ve karaciğer gibi organlarda gözlenmiştir. İskemi boyunca; serbest radikal reaksiyonlarında O^2 kullanılmaz. O^2 yeniden sağlanması ile mitokondri yeniden fonksiyonunu yerine getirmeye başlar fakat ROS üretiminin artışı ortaya çıkmıştır. 1 saat torsiyonun ardından 24 saatlik reperfüzyon uygulamasından sonra testislerde oksidize glutatyon ve total glutatyonun indirgendiği gözlenmiştir. Oksidatif streste ortaya çıkan oksidatif glutatyon için sadece 24 saatlik reperfüzyon uygulamasında önemli oranda azalma görülmüştür. Testis reoksijenasyonunda, katalaz aktivitesi artar ve uzun süreli iskemiye izleyen 6 saatlik ve 2 saati geçmeyen torsiyonlardan sonra azalmış süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesi ipsilateral testiste reperfüzyon uygulamasından sonra gözlenirken kontralateral testiste görülmemiştir (48, 49).

2.4.2. Antioksidanlar

Oksidatif hasar için engelleme, sınırlama veya tamir etme gibi işlevlerde rol alan moleküllere antioksidanlar denilmektedir. Antioksidanlar, endojen ve ekzojen olmak üzere iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler olarak iki farklı şekilde sınıflandırılırlar (50, 51, 52).

Enzim Yapısındaki Antioksidanlar

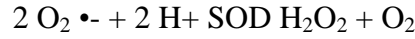
Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonu ile hücre yapılarının bozulmasıyla oluşan son metabolittir. Lipid peroksidasyonda ürünlerinin % 40'ını oluşturmaktadır. Buyüzden MDA, lipid peroksidasyonunun bir indeksi olarak kabul edilmektedir. Organ ve dokularda membran hasarının oluşumuyla, lipid peroksidasyonu aktive olur. Hasarlanan dokularda peroksidasyon artışı, antioksidanların aktivitelerinin kaybetmesi ve metal iyonlarının (Fe, Cu) hücre içinde serbest hale gelmelerinin sonucudur. Lipid peroksidasyonuna neden olan en önemli radikaller, O ve $OH\cdot$ radikalleridir. Lipid peroksidasyonu ile doymamış yağ asitlerinin çiftbağlarındaki oksidasyon hücre zarı akışkanlığında azalmaya, hücre zarı fonksiyonlarında düzensizliğe ve geçirgenliğinde bozulmaya sebep olur. Lipid

peroksidasyonunda birçok reaktif ara ürün oluşur. Peroksidasyon ile oluşan MDA, DNA ve proteinlere çapraz bağlanarak fonksiyon ve aktivitelerinde bozulmaya neden olabilir (53).

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksitin hidrojen peroksit ters değişimini katalize eden metallo enzim olan bir antioksidandır.



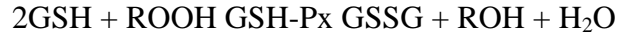
Vasküler endotelde bulunan süperoksit dismutaz enzimi, endotel hücreleri ile düz kas hücreleri arasında bol miktarda bulunmaktadır. Damarlardaki süperoksit radikallerini yok ederek lipit peroksidasyonunu ve ateroskleroz gelişimini engeller (33). SOD, etki mekanizmaları aynı olan sitozolde bulunan dimerik, kofaktörleri bakır ve çinko olan izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik, kofaktörü mangan olan izomer (Mn-SOD) şeklinde bulunmaktadır (53). Reaksiyon sonucu toksik H_2O_2 oluştuğu için SOD gerçek bir detoksifiye edici enzim değildir. Ancak bu olay, reaktif oksijen radikallerinin yok edilmesine giden yolun ilk basamağıdır ve H_2O_2 'nin katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından suya dönüşümü bu reaksiyondan sonraki basamaktır (54).

8-hidroksi-2'deoxyguanosine (8-OHdG)

Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde hasara yol açtığı bilinmektedir. DNA'da gerçekleşen bu oksidatif hasar mutasyon ve kanserin göstergesidir. DNA içerisindeki endüyük iyonasyona sahip baz Guanin'dir ve bu nedenle serbest radikallerin olumsuz etkilerine açıktır. Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2'deoxyguanosine, guanin'in 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının göstergesidir. GC=AT dönüşümüne neden olup premutajenik özellik göstererek mutasyonlara ve kanser oluşumuna neden olabilir (53).

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

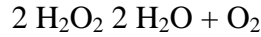
Eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidan glutatyon peroksidazdır. Reaksiyonda hidrojen peroksit ve lipit hidroperoksitlerin redüksiyonunu katalizler.



Karaciğer ve eritrositlerde aktivitesi oldukça yüksek olan selenyuma bağımlı GSH-Px, 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir ve %70'i sitozol, %30'u mitokondride bulunmaktadır (53).

Katalaz (CAT)

Oluşumunda dört tane “hem” grubu bulunan bir hemoprotein olan katalazın görevi H_2O_2 'i oksijen ve suya parçalamaktır. Karaciğer, böbrek ve eritrositlerde katalaz aktivitesi yüksektir (53).



Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)

Pentoz fosfat yolunun oksidatif faz hız kısıtlayıcı olan G6PDenzimi, selüler metabolizma ve oksidatif stres arasında anahtar rol oynamaktadır. Bu yol ATP üretmez fakat yağ asidi ve steroid biyosentezi gibi indirgeyici sentezler için NADPH üretmesi ve nükleik asit biyosentezi için 5 karbonlu üniteleri sağlaması gibi iki önemli görevi vardır (53).

Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz enzimi, NADPH varlığında GSSG (okside glutasyon)'nin tekrar redükte GSH'a dönüşümünü katalizleyerek antioksidan aktivitenin devamını sağlamaktadır (53).

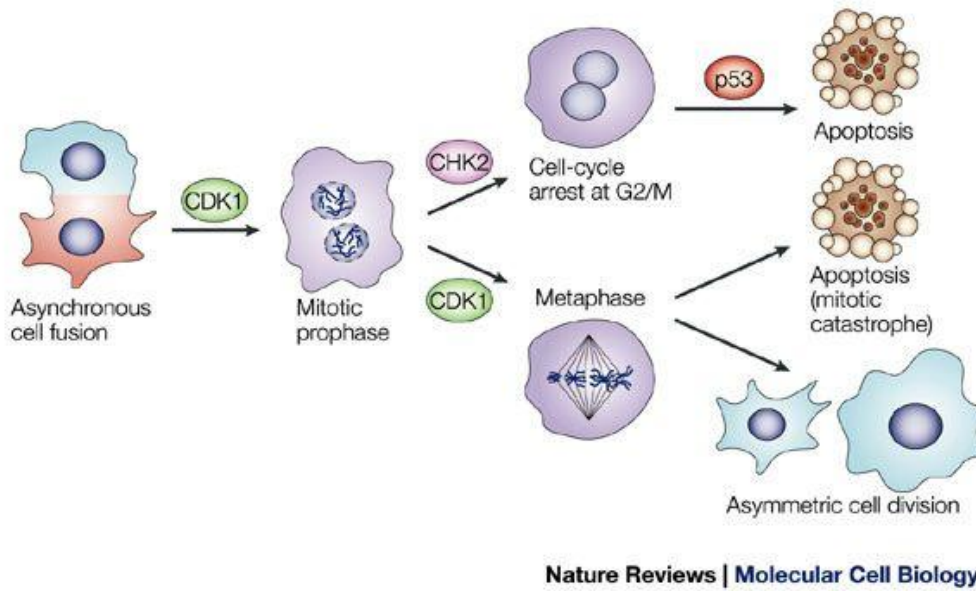
2.5. Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü)

2.5.1.Tanımı ve Mekanizmaları

İlk kez **programlanmış hücre ölümü** terimi 1965'te, **apoptoz** ise 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Apoptoz; fizyolojik hücre ölümü, programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı terimleri ile aynı anlamda kullanılmaktadır. Apoptoz esnasında hücrenin hücre yüzey farklılaşmaları ve diğer hücreler ile yaptıkları bağlar kırılır, yüzeysel yuvarlaklaşma meydana gelir. Diğer hücrelere göre daha küçük ve daha yoğun sitoplazması olan apoptotik hücrenin

endoplazmik retikulum haricinde diğer organeller yapılarını korur. Nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez ve çekirdek büzülür, kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Morfolojik değişimler; hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması şeklinde olurken fosfotidilserin açığa çıkar. Fosfotidilserin, plazma membranının içinde bulunurken apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (55, 56).

Apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik değişimlere neden olurken nekroz sadece fizyolojik bir ölüm şeklidir. Nekrozda hücre plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içi materyallerinin dışarı çıkışı gerçekleşir. Apoptozda hücre membranı intaktır ve inflamasyon oluşmaz; nekrozda ise, inflamasyon, hücresel şişme ve hücre zarının bozulması oluşur. Apoptozhasara yanıt olarak oluşur, nekroz ise hasar sonucu oluşur. Apoptozbelirli bir yol ile koordineli olarak oluşurken, nekroz biyokimyasal olaylardan bağımsız olarak gerçekleşir ve hücrede enerji stoklarının tükenmesi ile (56) aktifleşir (Resim16).



Resim16: Apoptoz ve Nekroz (https://www.nature.com/articles/nrm1443)

Apoptozun başlamasına neden olan ve soy hakkında bilgi içeren sinyaller inflamatuvar yangı sinyali ya da ekstrasellüler sinyallerdir. Ekstrinsik sinyaller apoptozu başlatır, ya da baskılar, programlı ölecek hücrelere yardımcı olabilir ve aynı sinyaller bir hücre tipinde kurtulmayı başlatabilir. Programlı hücre ölümü bazen hücre ölümünü intrinsek mekanizmalar yoluyla transkripsiyon ya da translasyonu, kısıtlama ile de baskılayabilir. Bir hücrede apoptoz mekanizması iki yolla düzenlenir: Hücre dışından kaynaklanan, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ile (Tümör nekrozis faktör süperailisi üyeleri ve bunların reseptörleri) düzenlenen şeklinde. Hücre içinden kaynaklanan, mitokondriyal yolla düzenlenmektedir. Hücre yüzeyi ölüm reseptörleri Tümör Nekrozis Faktör Reseptör (TNFR) süperailisine ait transmembran proteinlerinin bir familyasıdır. Bu reseptörler hücre dışındaki bölgelerde tekrar eden sistein zengin bölgelerde yer alırlar. Ölüm reseptörleri sitoplazmanın iç kısmında 'ölüm bölgesi' (death domain) denen protein zincirleri taşırlar. Ölüm bölgeleri, ölüm reseptörlerine ligand bağlandığı zaman apoptotik mekanizmayı uyarırlar ve hücre dışından gelen uyarıyı hücre içine iletirler. Apoptozu etkileyen hücre içi uyaranlar genel olarak büyüme faktörleri, onkojenler, tümör supresör genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir. Büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, Tümör Nekroz Faktör (TNF), TGF- β (Transforming Growth Factor- β), Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör supresör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyal enfeksiyonlar ve glukokortikoidler apoptozu uyarabilir (59, 60).

Mitokondrinin aktivasyonu ile sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi sonucu apoptotik süreç başlar. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör Bcl- 2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin sitoplazmaya saliverilmesi veya baskılanması gerçekleşir. Apoptoz indükleyici faktörün mitokondriden çekirdeğe geçmesi apoptoz başladığında ve AIF'nin salınımındaki artışı, mitokondrial transmembran potansiyelinin kaybolması, periferel kromatin kondenzasyonu ve plazma membranında fosfolipidlerin ortaya çıkmasına neden olur. Bunun sonucunda yüksek moleküler ağırlıklı (50 kbp) DNA fragmentasyonu gerçekleşir. DNA hasarına yanıt olarak PARP (poly ADP-ribose polymerase- 1) aktive olur. Bu etkiler kaspazlardan ve apoptoz başlatıcı faktör

(AIF)'nin oksidoredüktaz aktivitesinden bağımsızdır. AIF: Mitokondrinin iç membranında bulunan AIF 57 kD ağırlığında bir flavoprotein olup apoptoz başlangıcında mitokondriden çekirdeğe geçerek kromatin kondenzasyonu yoluyla DNA fragmentasyonunu sağlar. AIF oksidoredüktaz aktivitesi gösterir. Kaspaz aktivasyonundan bağımsız olan EndoG aktivasyonu, nükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olabilir. EndoG'nin salınımı, kaspaz aktivasyonuna paralel olarak apoptotik programı başlatabilir. Bax ve Bak, BH3-only proteinlerin mitokondriye hareket etmeleri ve sitokrom c salınımının düzenlenmesi için gereklidir. Hücrenin yaşayabilirlik durumu pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl- 2/Bax oranının bazı hematolojik malignansilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir. Bid proteini yaşayan hücrelerde sadece sitoplazmada bulunur. Aktivasyonları sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımını sağlar. Bad proteini: Bad, birçok normal hücrede bulunmaktadır. Bad'ın apoptotik veya yaşam sinyal yolağındaki etkisi proteinin fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile düzenlenir. Bim ve Bmf proteinleri Bim, normalde mikrotübüllerle ilişki içinde olan dynein motor kompleksi ile birlikte bulunur. Apoptoz indüksiyonu esnasında mitokondriye göç eder. Pro-apoptotik aktiviteye sahiptir ve Bmf, apoptozun tetiklenmesi sırasında mitokondriye göç eder ve Bcl- 2 ailesi ile etkileşime girerler (58, 59).

p53 tümör baskılayıcı bir gen dir ve % 50- 55 insan kanserleri ile ilişkilidir. p53, hücre siklusunun kontrol noktalarında yer alıp, hücre siklusunun G1 fazında durması ya da hücrede DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse programlı hücre ölümünü indüklenmesi sırasında aktive olur. Aktive olmuş p53, hücre siklusunun durması, hücre yaşlanma ve birçok tümör oluşumunun engellenmesinde rol oynamaktadır p53 geninin aktive olması p21 (WAF/CIPI-1), GADD45, MDM2, Bcl- 2, Bax gibi birçok genle ilişkilidir. Aynı zamanda p53'ü de negatif feed-back etkisi ile suprese edebilmektedir. GADD45,p21 ile ilişkili olup. p53'ün aktive ettiği işlevi tam bilinmemekle birlikte, hücre siklusunu baskıladığı ve apoptoz uyarıcı bir gen olduğu düşünülmektedir. p53 geni, mitozu engelleyip hücre diferansiasyonunu ve DNA onarımını p21 üzerinden yaparken, hücreyi apoptoza Bcl- 2 ekspresyonunu azaltarak, Bax salınımını ise artırarak yani Bcl- 2/Bax oranını değiştirerek yaptığı düşünülür (60, 61, 62).

Kaspazlar apoptoz mekanizmasında yer alan önemli protein grubudur. Hücre sitoplazmasında inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler. Aktif merkezlerindeki sisteinden dolayı sistein proteaz olarak adlandırılan enzim grubudur. Apoptozda hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler “effectors” olarak bilinirler. Bu güne kadar tanımlanan 14 kaspaz bulunmaktadır. Bunun haricinde kaspaz ailesi fonksiyonlarına göre başlatıcı kaspazlar ve ilerletici kaspazlar olarak iki alt kategoriye ayrılır. Başlatıcı kaspazlar, 90 aminoasitten fazla aminoasit içeren Kaspaz-gerektiren domain (CARD) bölümü ile ölüm domaini (DD) ve ölüm efektör domaini (DED) içeren N-terminal domain öncülü ile karakterizedir. Apoptotik sinyal yolunun erken safhasında etki gösterirler ve apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini ilerletici kaspazlara iletirler. Kaspaz inhibitörlerinden bazıları nın önemli olduğu durumlar nöro-dejeneratif hastalıklar, iskemi-reperfüzyon zedelenmesi ve otoimmün hastalıklardır. Kaspazlar potansiyel hedefleri oluşturarak bu hastalıkların tedavisinde inhibitör tedavide kullanılabilirler. Reseptörler aracılığıyla kaspaz aktivasyonuna ve apoptoza yol açarlar. Diğer yol mitokondriden Sitokrom-c sitozol içerisine bırakılır ve kaspaz aktivasyon proteinine (Apaf 1) bağlanır. Ardından Apoptozom olarak adlandırılan multiprotein yapısındaki kaspaz aktive eden kompleksin toplanmasına neden olur. Apoptoz; ışık, floresan, lazerli konfokal, elektron ve faz-kontrast mikroskopu ile incelenebilir. DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde agaroz Jel elektroforezi, enzimatik yolla DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi ISEL TUNEL, İn situ hibridizasyon tekniği ve Anneksin-V yöntemi ile apoptoza özgü proteinlerin saptanması ve flow sitometri yöntemi kullanılır (63, 64, 65).

2.5.2.Yöntemleri

Apoptoz çoklu düzenleyici enzimler tarafından kontrol altında tutulur. Apoptozdan kaçış, NF-kB (nuklear faktor kappa-B) ve PI3K (phosphoinositide 3-kinases)'in aktivasyonuna bağlıdır. Kaspaz transkripsiyon faktörleri, NF-kB ve inositol kinaz B(IkB)"nin bağlanmasına bağlı olarak sitosolde belirli bir düzeyde bulunur. Inositol kinaz (IKK) aktive olduğunda ve IkB"yi fosforilize edip NF-kB aktivasyonu görülür. Daha sonra IkB"nin ayrışımını takiben NF-kB, çekirdeğe doğru

yer değiştirir ve c-Flip (kaspaz-8 aktivasyonunu inhibe eder), c-IAP1 ve c-IAP2 (kaspazları engeller ile sitokrom c salınımını önler) gibi antiapoptotik genleri kapsayan çoklu genlerin transkripsiyonunu indukler. Hücre yüzeyi reseptörleri yoğunlaşır ve PI3K'ın ligandlarına bağlanmasını aktive eder. Bir kez aktive olan PI3K, AKT/PKB'yi fosforolize eder ve proapoptotik Bcl-2 proteini olan Bad'ı ve pro-apoptotik genlerin transkripsiyonunun engellenmesi ile FOXO'yu inaktive eder. AKT/PKB, ayrıca NF-kB yanıtının aktivasyonu ile sonuçlanan IKK'ı da aktive eder. Bu şekilde enzimler hem NF-kB aracılığıyla hücreyi apoptozdan kurtarır hem de PI3K yardımıyla hücre yüzey reseptörlerini artırarak hücreyi apoptoza yöneltir (64) .

DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi: DNA'nın 180- 200 baz çifti ve bunun katları şeklinde kırılması olarak ifade edilen DNA fragmentasyonu programlı hücre ölümünün belirleyici özelliğidir. DNA'nın bu özelliği agoroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Fakat bu yöntemlerle apoptozun kesinliği değil DNA'nın fragmentasyonunun anlaşılması için tanımlayıcıdır. Enzimatik yolla DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi: TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt]-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) yöntemi 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından doku kesitlerinde ve hücrelerde ilk defa kullanılmıştır. TdT enziminin aktivitesi için DNA'nın 3' ucu biotinlenmiş dUTP ile birleşir. İn situ olarak DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde ise (ISEL), çoğunlukla Kornberg polimeraz (E. Coli'den elde edilen DNA polimeraz) DNA polimeraz I'in Klenow fragmenti ve TdT kullanılmaktadır. Bu yöntemler, tek ya da çift iplikli DNA kırıklarına işaretlenmiş nükleotidlerin bağlanması esasına dayanır. DNA fragmentasyonunda DNA iplikleri internükleozomal bölgelerde kırılma olur ve DNA'nın 3'-OH ucu ortaya çıkar. Dana (calf) timus TdT'si ile apoptosisin belirlenmesi, serbest 3'-OH ucuna biotin, dioksijenin, floresan veya radioaktif olarak işaretlenmiş nükleotidlerin bağlanması esasına dayanır. Avidin peroksidaz tekniği için 3,3'-diaminobenzidine (DAB) veya 3-amino- 9-ethylcarbalzole (AEC) gibi kromojenler kullanılarak biotinlenmiş nükleotidler belirlenir. Dioksijenin- işaretli nükleotidler, alkalen fosfataz, biotin ya da peroksidaz işaretli sekonder antikorlar kullanılarak belirlenebilir. Hematoksilin, metilgreen ya da DAPI ile rutin artalan boyaması kullanılarak TUNEL veya ISEL reaksiyonları belirgin hale getirilebilir.

Ancak bu iki metodun zayıf tarafları vardır. Bunlardan birincisi apoptoz altındaki hücrelerde internükleozomal DNA fragmentasyonunun ölçülememesi, ikincisi ise DNA fragmentasyonunun apoptoz ile ilişkili olduğu veya DNA'nın rasgele olarak nekrozis ile parçalandığı fark edilemeyebilir. O nedenle apoptotik DNA fragmentasyonu biyokimyasal analizler ile desteklenmelidir (65).

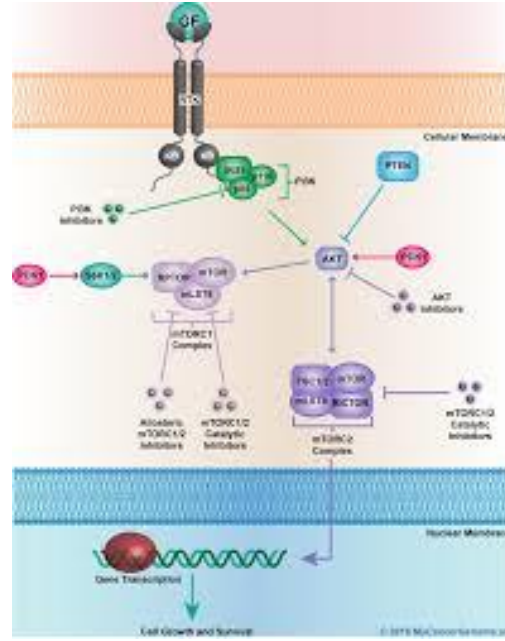
2.6.Sinyal Yolakları

2.6.1.mTOR Sinyal Yolağı

mTOR (mammalian Target Of Rapamycin – Rapamisin'in Memelilerdeki Hedef Molekülü), serin-threonin protein kinaz ailesinden PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının bir üyesidir (91).Keşfinden sonra mTOR üzerine yapılan çalışmalar bu kinazın, neredeyse bütün memelilerde eksprese edildiğini ve hücrel sinyalizasyon mekanizmasında vazgeçilmez bir yeri olduğunu ortaya koymuştur. FRAP1 geni tarafından kodlanan mTOR; FRAP1, FKBP12 (FK506 Binding Protein- FK506 Bağlayıcı Protein) ve RAFT (FKBP Target- FKBP Hedef Molekülü) terimler ile de bilinir. Moleküllerin düzenlenmesinde, protein sentezinde, transkripsiyon, enerji metabolizmasında, hücre proliferasyonu, büyüme, farklılaşma, biyoenerjide, anjiyogenez, apoptoz ve otofajide görev alır. mTOR molekülünün aktivasyonu, insulin, büyüme faktörleri, glukoz, fosfotidik asid, amino asit yoğunluğu (özellikle leucine) ve oksidatif stres ile gerçekleşir. mTOR'un, Ribosomal Protein S6 Kinase Beta1 ve eIF4E (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 4E) gibi iki proteinin fosforilasyonunu yaptığı bilinmektedir.S6K ve S6 ribozomal proteinini aktive eder, mRNA'ların ekspresyonunu uyarır. Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 4E ile bağlanan proteini (4EBP) inaktive ederek, 4E'nin serbest hale gelmesini sağlar. Aktif hale gelen 4E ribozomal proteinlerin ekspresyonunu uyarır. 5'mRNA'lar, hücredeki RNA miktarının % 20'sini oluşturur ve translasyon işlevinde etkilidir. Kinaz aktivitesine sahip olan bu proteinin, Rapamisin tarafından inhibe olduğu gösterilmiştir. Bir serin-threonin kinaz inhibitörü olan ve kimyasal formülü C51H79NO13 olan Rapamisin (Sirolimus), 1970'lerde Easter adasında (Rapa Nui), bir toprak örneğinin 35 güçlü antifungal etkiye sahip olan 'Streptomyces hygroscopicus' adlı bakteri suşu içerdiği görülmüştür.

İmmüno-supresif özelliklere sahip olan Rapamisin'in hücrelerde proliferasyonu engellediği ve bu etkiyi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IGF, PDGF, VEGF sitokin salınım ile gerçekleştirmektedir. T hücrelerinde apoptozu tetikleyerek immün sistemi bloke eder ve T hücrelerin zarında FKBP12 reseptöre bağlanır. FRAP hücre siklusunun G1 fazının regülasyonunu sağlayan proteine bağlanarak T hücrelerinin IL-2'ye olan yanıtını inhibe eder ve hücre siklusunu G1 fazında durdurur. mTOR inhibitörü ilaçların meme, lenfoma, akciğer, mide ve sarkom kanserlerini içine alan çeşitli solid tümörlerde etkinliği gösterilmiştir. Rapamisin'in bağlandığı TOR'ların %40-60 oranında primer sekansları benzerdir ve yaklaşık 280 kDa ağırlığında büyük proteinlerdir. PI3K'lar ve PI4K'ların katalitik etki alanına benzer karboksi-terminal serin/threonin protein kinaz domainini PIKK (Fosfatidilinositol Kinaz ile ilişkili Kinaz) ailesi olarak bilinen kinaz grubuna aittirler (66, 77, 68).

mTOR, birçok kritik hücre içi olayları düzenleyen temel kinaz enzimlerinden biridir. mTOR aktivasyonu için gerekli temel moleküllerden olan kaskadın temel elemanı PI3K ile AKT aktivitesi ile desteklenmektedir. mTOR molekülü, mTORC1 ve mTORC2'dan oluşmaktadır. mTORC1 kompleksi, mTOR'un Regulatory associated protein of mTOR (Raptor), Mammalian LST8/G - protein β -subunit like protein (mLST8/G β L), mTORC2, rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor), G β L, mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 (mSin1) içerir (Resim 17). Ribozomal biyogenezinde, hücre büyümesi, çoğalması, metabolizması ve protein sentezinde düzenleyici fonksiyonu olan mTORC1, ribozomal protein S6 veya başlatıcı faktör eIF4E yoluyla etki eder. Hücre içi iletim ve aminoasit düzenlemesinde de önemli etkisi bulunmuştur. mTOR yolağına bağlı çoklu yollar tarafından inhibe veya aktive olabilir. Enerji ve besin fazlalığı durumunda, büyüme faktörlerinden insülin aracılığı ile PI3K/AKT yolağı inhibe edilerek hücre büyüme ve metabolizmasında mTOR yolağının aktivasyonunu sağlar. Tümör hücre motilitesinde, anjiyogenezde ve kanser metastazlarının düzenlenmesinde de önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada intestinal iskemi hasarı araştırılmış olup ghrelin ile tedavisinde mTOR/p76S6K yolağı aktivasyonu ile İskemi/Reperfüzyon hasarında koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (69, 70).

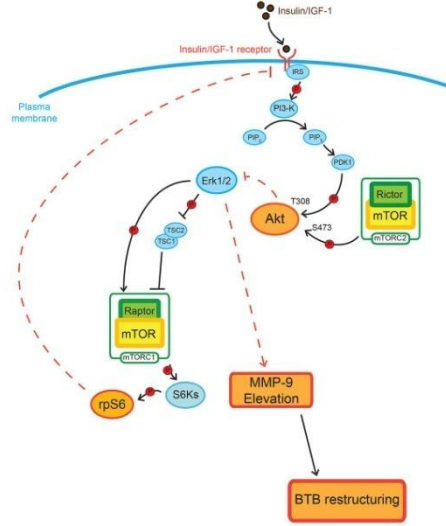


Resim17: mTORC1 ve mTORC2'nin sinyal mekanizmaları

(<https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/pathways/PI3K-AKT1-MTOR>)

Yapılan immünohistokimyasal ve immüno Floresan çalışmalar sonucunda, mTORC1'in seminifer epitelinde yoğun derecede eksprese edildiğinden dolayı kan testis bariyerinin regülasyonunda rol aldığı görülmüştür. mTORC1, aktin filamentleri ile ilişkili ZO-1 gibi adezyon moleküllerinin destabile olması ile ve Sertoli hücrelerinde, MMP-9 (matrix metallo proteinase 9) üretiminin indüklenmesi ile kan testis bariyerinin regülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Dolayısı ile aktin filamentlerinin bozulması ve sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların gevşemektir. MMP-9 ise kan testis bariyerindeki adezyon kompleksinde bulunan proteinlerin degrades olmasına böylece kan testis bariyerinin gevşemesine neden olmaktadır. Rapamisin ile mTORC1 inhibisyonu ile spermatogonia proliferasyonu ve farklılaşmasında bozulmaların meydana gelmesi, mTORC1'in spermatogenezdeki önemini göstermektedir. mTORC2, mTORC1'in aksine kan testis bariyerinin sıkı bir şekilde kalmasında rol oynamaktadır. mTORC2, aPKC(atypical protein kinase C)/Rac1 GTPaz ile sıkı bağlantı komplekslerindeki proteinlerin aktin filamentleri ile etkileşimini arttırmaktadır. mTORC2, kan testis bariyerinde oluklu bağlantı komplekslerinin yapısında bulunan konneksin 33 ve konneksin 43 gibi

proteinlerinin üretimini indüklemektedir. Yapılan çalışmalar, Sertoli hücrelerinde konneksin 43 gen ekspresyonunun susturulmasının, spermatogonialar ve spermatozoidlerde bölünme arrestine neden olduğunu bunun sonucunda infertilite meydana geldiğini göstermektedir (70) (Resim 18).



Resim18: Kan testis bariyerinin mTORC1 ve mTORC2 ile düzenlenmesi
(<http://jcs.biologists.org/content/127/22/4870>)

2.6.2.PI3K/Akt Yolağı

PI3K/Akt yolağı, metabolizma, büyüme, proliferasyon, apoptoz ve hücre migrasyonu dahil olmak üzere bir takım hücresel süreçleri düzenler.PI3K, yapılarına ve substrat spesifitesine göre üç ana sınıfa (I, II ve III) bölünmüş bir hücre içi lipit kinaz ailesidir. Sınıf I PI3K'ler, dış uyarılara bağlanır ve reseptör tirozin kinazlardan (RTK), integrinlerden ve Gprotein bağlı reseptörlerden sinyaller iletir. Ek olarak, PI3K'ler ayrıca PKC, Rac, Rho ve Src gibi hücre içi proteinler tarafından aktive edilir (47). PI3K, fosfatidilinositoller (PtdIns) olarak bilinen inositol içeren lipitlerin fosforilasyonunu katalize eder. Birincil in vivo substrat, önemli bir ikinci haberci molekülü olan fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat (PIP3)'e dönüştürülen fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfattır (PIP2). PIP3, plazma membranına katılan ve aktive edilen pleckstrin homoloji alanlarını içeren proteinlerin alt kümeleri için bir yerleştirme bölgesi olarak hizmet eder. PI3K'nin akım hedefleri arasında serin/treonin kinaz Akt (PKB) bulunur. Akt'in membrana translokasyonu, Akt

aktivasyonu için gerekli olan Thr 308'de Akt'i fosforile eden fosfoinositid bağımlı kinaz 1 (PDK1) gibi yukarı akış düzenleyici kinazlara yakınlaştırır. Bununla birlikte, maksimal aktivasyon, Seramb³'te rapamisine duyarlı mTOR kompleksi (mTORC2) tarafından ek fosforilasyon gerektirir. Aktive edilmiş Akt, bozunmasına yol açan pro-apoptotik Bad'i ve bunun katalitik aktivitesini inhibe eden kaspaz 9'u fosforile ettiği, böylece hücreleri apoptozdan koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca Akt, hücre ölümünü merkezi bir düzenleyici olan B'nin (NF-B) nükleer faktörünü dolaylı olarak etkileyerek hücre yaşamını etkileyebilir. Akt aktivasyonu, hücre döngüsü regülasyonu, p27Kipl ve p21Cipl/WAF1'in fosforilasyonu ve inaktivasyonu yoluyla ve siklin D1'in glikojen sintaz kinaz 3A'nın inaktivasyonu yoluyla bozunmasını önleyerek hücre döngüsü regülasyonu üzerindeki çoklu etkileri teşvik eder. PI3K/Akt yolağı, tümör süpresör protein PTEN (kromozom 10 üzerinde silinmiş olan fosfataz ve tensin homologu) tarafından negatif olarak düzenlenir. PTEN, PIP3'ü defosforile eden bir çift özgülük lipit ve protein fosfatazıdır. PTEN bulunmayan hücreler, PI3K/Akt yolunun yapısal olarak aktif hale getirilmesi için yüksek seviyelerde PIP3 ve fosforile Akt'e sahiptir. PTEN'in de p53 ile birleştiği ve protein düzeylerini ve aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (53). Ayrıca, PTEN'in hücre göçünü, protein fosfataz aktivitesine bağlı bir etkiyi kısıtlaması önerilmektedir. Son zamanlarda, PTEN'in c-Jun-N-terminal Kinaz (JNK)/stres-aktive protein kinaz (SAPK) yolunun Akt bağımsız bir şekilde düzenlenebileceği gösterilmiştir (70, 71, 72).

2.7. İskemi/Reperfüzyon

İskemi ve reperfüzyon(İ/R), testis torsiyonu (TT) ile spermatik kordun bükülmesine bağlı olarak ortaya çıkar ve hızlı tanı ve acil tedavisi gereklidir. Tanıdaki gecikme gonad ve infertilite kaybına neden olabilir. Renkli Doppler ultrason (CDUS), eksiksiz TT'nin tanısında en iyi sonuçları veren ilk çizgi görüntüleme yöntemidir. Kısmi veya eksik TT, spermatik kordun 360° veya daha az bükülmesine bağlıdır ve kan akışının varlığı nedeniyle CDUS ile teşhis edilmesi zordur. Testiküler kan akışında azalmalar, CDUS üzerinde tespit edilmesi genellikle zordur. CDUS'ta eksik TT tanısı için yüksek bir negatif oran vardır. Bu nedenle, tanıyı desteklemek için ek yöntemlere ihtiyaç vardır. Difüzyon ağırlıklı görüntüleme (DAG) ile görünen difüzyon katsayısının (ADC) ölçümü pahalı ve zaman alıcı bir

manyetik rezonans görüntüleme (MRI) sekansıdır. Tam TT tanısında başarılı olduğu gösterilmiştir (73). TT'de torsiyon derecesine göre testis kan akımı parsiyel ya da tam kesilerek erken ya da geç dönemde testis infarktüsüne neden olmaktadır. İatrojenik nedenlerde, testis kan akımı genelde aniden ve tam kesilerek, kısa sürede testis nekrozu ile sonuçlanmaktadır. Testis iskemisinin fizyopatolojisi olarak etiyojolojiye bakıldığında edinsel testiküler kanlanma bozuklukları, organın ya da gonadın torsiyonu, varikoseli, skrotuma inmesini gerçekleştirememesi ya da iatronejik nedenler sonucu oluşmaktadır. Testis torsiyonu oluştuğunda venöz akım bozulur. Buna bağlı olarak ödem, hemoraji ve arteriyel obstrüksiyon gelişir. Kan akımının azalması, tıpkı diğer dokularda gösterildiği gibi testiste de hipoksiye neden olur. İskemik dokularda canlılığı korumak için temel prensip reperfüzyonun sağlanmasıdır. Bu nedenle TT'li olgularda zaman geçirmeden müdahale edilmelidir. Akgür ve arkadaşları testiste iskemi gelişmesi ve ardından reperfüzyonunun sağlanmasının 'reperfüzyon hasarı'na neden olduğunu göstermişlerdir. İ/R hasarı nötrofil infiltrasyonu ve serbest oksijen radikalleri olan süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikal artışıyla yakın ilişkilidir. Oluşan ROS hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonu, protein denatürasyonu ve DNA hasarına yol açar (Resim 19). Bu sürenin en az 24 saat olacak kadar fazla, tutulmasına karşılık, son zamanlarda yapılan çalışmalar süreyi 2-6 saate kadar indirmiştir. 1 saatlik torsiyon sonuçları için ise 30 günlük tedavide günlük sperm üretiminin %50 oranında azalması beklenir. İki hafta sonra ise deney gruplarının %65'inde tedavi öncesine göre testisin ağırlığında %50 oranında bir azalma gözlenmiştir (74, 75).

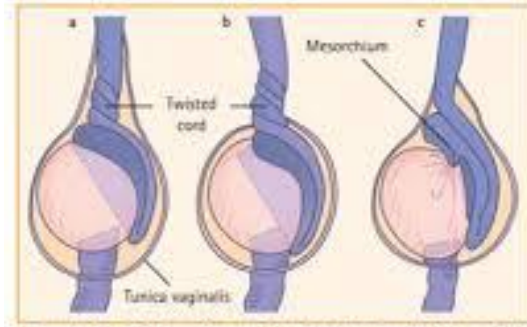
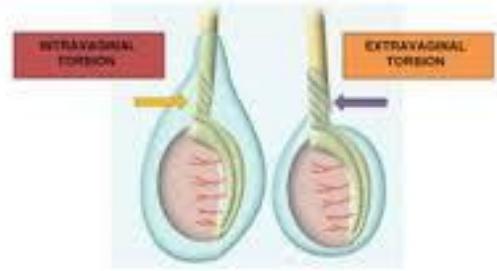


Figure 1. Classification of types of testicular torsion: (a) intravaginal torsion; (b) extravaginal torsion; (c) torsion due to long mesorchium



Resim 19: Torsiyon İskemisi (<https://www.onoluroloji.com/testis-torsiyonu>)

İ/R, herhangi bir nedenle, dokudaki kan akımının, hücresel fonksiyonların düşmesi durumudur. İskemi hücresel oksidatif fosforilasyonu azaltır ve adenozintrifosfat (ATP), fosfokeratin gibi enerjiden zengin fosfatların depolarında yetmezlik, enerji eksikliğine bağlı olarak; iyon dengesinde bozulma, ATP yıkım ürünlerinin birikmesi, makromolekül sentezinin durması, asidoz gibi olaylar gelişir. İ/R lökosit adezyon molekülleri, endotelin, tromboksan A2, sitokinler, gibi mediatörlerin salınmasına neden olur. İskemi sırasında hücresel ATP hipoksantinden indirgenmektedir. Normalde hipoksantin, ksantin dehidrogenaz ile ksantine oksitlenir. İskemi sırasında ise ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza çevrilir. Ksantin oksidaz iskemi sırasında hipoksantinden ksantine dönüşümü katalizleyemez ve dokularda aşırı hipoksantin birikir. Reperfüzyon sırasında ortama yeniden giren oksijen ve ksantin oksidaz, aşırı hipoksantin ile birlikte toksik serbest oksijen radikalleri oluşturur. Reperfüzyon ile gelen yüksek konsantrasyondaki moleküler oksijen, iskemi sırasında birikmiş olan NADH, FADH2 gibi indirgen moleküller ile de indirgenerek serbest oksijen radikalleri oluşturur (76, 77).

İ/R hasarı için lökositlerin reperfüzyon ile birlikte kemotaksis, lökosit endotel hücre yapışması ve göçü oluşturduğu görülmüştür. Lökositlerden salınan toksik ROS

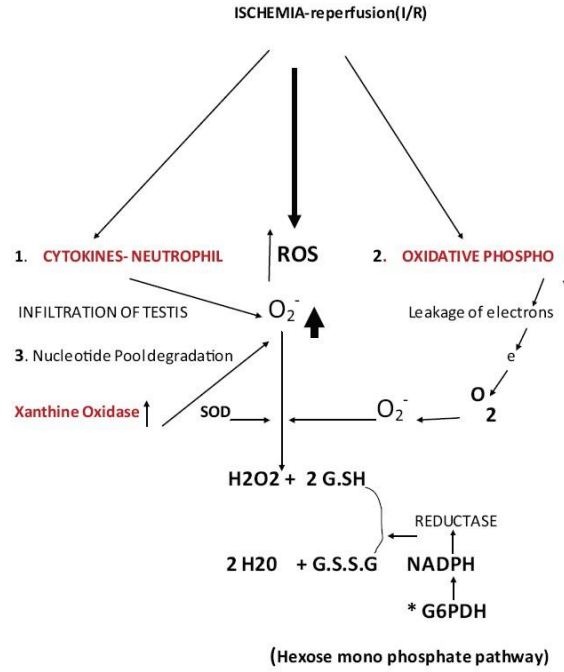
molekülleri, proteazlar ve elastazlar mikrovasküler geçirgenlikte artma, ödem trombozisi ve parankimal hücre ölümüne neden olurlar. İ/Rhasarı ve No-reflow Fenomeni Reperfüzyon sırasında ortaya çıkan ROS moleküllerinin, lökositlerin damar endoteline yapışıp kapiller yatakta tıkaçlar oluşarak dolanım bozulmaktadır. Nötrofiller, salgıladıkları proteaz, elastaz, jelatinaz gibi enzimler ile endotel hücrelerinin parçalanmasına, endotel devamlılığının bozulması ile trombositler ve nötrofillerin kapiller alana kemotaksisine yol açmaktadır (77, 78).

Testiste oldukça sık karşılaşılan germ hücre dejenerasyonu ile sıçanlarda doğurma zamanına kadar hücrelerin yarısının apoptoza uğradığı bilinmektedir. Mekanizmalarının içerisinde Bcl- 2 ailesi, kaspazlar, ölüm reseptörleri ve p53 gibi faktörler yer alır. Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır. Normal Spermatogenez içinde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve apoptozis, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar. Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, oluşan programlı hücre ölümlerinde artma bulunabilir. İmmatür ratlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde masif apoptoz ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da HCG tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir. Gonadotropin ve testosteron eksikliği dışında matürasyon arresti ve hipospermatogeneze yol açan tüm klinik durumlarda da apoptoz görülebilir. Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere olan sensitivitesi de germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini artıran diğer bir faktördür. Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptoz gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (79, 89).

2.8. AMAÇ

TT genç erişkinlerde görülen acil ürolojik bir problemdir. Torsiyonda oluşan iskemi kadar detorsiyon sonrası oluşan reperfüzyon hasarında oksidatif stresin etkili olduğu bilinmektedir. Bu etkide antioksidan defans sisteminin yeterince aktif olamaması gerektirir. ROS hücrelerde lipid peroksidasyonu yaparak membran

geçirgenliğini bozmakta ve ölüme neden olmaktadır. Spermilerin membranlarında yer alan yüksek içerikli poliansatüre yağ asitlerinden dolayı lipid peroksidasyonuna daha duyarlıdır. Bu neden ile TT sperm canlılık, motilite, kapasite, morfoloji ve akrozom reaksiyonlarını olumsuz olarak etkilemektedir (Resim 20). Antioksidan etkili bileşikler bu anlamda birçok dokuda olumlu etkileri ile bilinmektedir. GL ve MKH bu etkileri ile bilinen ürünlerdir (81, 82).



Resim 20: TT ile gerçekleşen İ/R mekanizmasının infertilitedeki yeri

(<http://www.indianjurol.com/article.asp?issn=0970->

1591;year=2011;volume=27;issue=4;spage=479;epage=484;aulast=Elshaari)

TT ile oluşan morfolojik hasar biyokimyasal değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir. Değişen SOD, MDA, GPx ve Katalaz parametreleri antioksidan dengenin oluşan hasarın etkisi için bilgi vermektedir. TT ile oluşan lipid peroksidasyonunda son ürün MDA olup oksidatif stresi tanımlarken SOD, GPx ve KAT antioksidan enzimleri temsil etmektedir. TT ile oluşan oksidatif stresin bir sonucu da apoptoz olup genellikle kaspas 3 belirteci ile incelenmektedir (83, 84).

Rapamisin (siralimus) streptomices higroskopis kaynaklı bir antibiyotik olup FDA tarafından onaylanmış bir immun baskılayıcıdır. Rapamisin iyi bilinen bir özgün serin tireonin kinaz inhibitörü olup memeli hedefli rapamisin kompleksi 1 (mTOR-1) baskılamaktadır. Rapamisin antioksidan savunma mekanizmasının mTORC1 sinyalinin inaktivasyonu ile gerçekleştiği bilinmektedir. Ayrıca rapamisinin mitokondriyal hücre ölüm yolağının aktivasyonunun ve p53 gibi proapoptotik proteinlerin fosforilasyonunu önleyerek apoptozu inhibe ettiği de düşünülmektedir. Ek olarak düzenleyici T hücreleri (Treg) İR üzerinden antiinflamatuvar etki gösterdiği de saptanmıştır. Rapamisinin indüklediği mTOR indüksiyonunun canlılık kinazları olan PI3K ve akt için artış sağlaması ile kinazların mitokondriyal potasyum ATP kanallarını aktive etmesi sonucu apoptoz engellenmektedir. Benzer biçimde bu kinazların oksidatif stresi azaltıcı etkileri de hücre ölümü için engelleyici olmaktadır (85, 86, 87).

Bu çalışmada, genç erişkin Wistar Albino sıçanlarda TT ile gerçekleşen İR sonrası oluşan doku hasarında, P13K-AKT-mTOR sinyal ileti yollarının öneminin ve eNOS üzerinden antioksidan ajanlar arasında yer alan GL ile MKH tedavisinin testis hasarı ve apoptoz ile hücre ölümü üzerindeki koruyucu etkilerinin biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak bakılması hedeflendi. Biyokimyasal kan analizlerinde malondialdehide (MDA) ve superoxide dismutase(SOD) düzeyleri ölçülerek DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu incelenmesi amaçlandı. Histopatolojik olarak testiste seminifer tübülü oluşturan spermatogenez sürecindeki tüm hücrelerin ve Sertoli hücreleri ile interstisyel Leydig hücreleri morfolojik olarak Johnsen's skorlaması ile değerlendirildi. Histopatolojik inceleme ile İ/R hasarında GL ve MKH uygulamalarının koruyucu etkileri ışık mikroskop altında değerlendirildi. DNA hasarı Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling(TUNEL) ile apoptotik indeks olarak bakıldı. Veriler Graphpad yazılımı ile istatistiksel olarak yorumlandı.

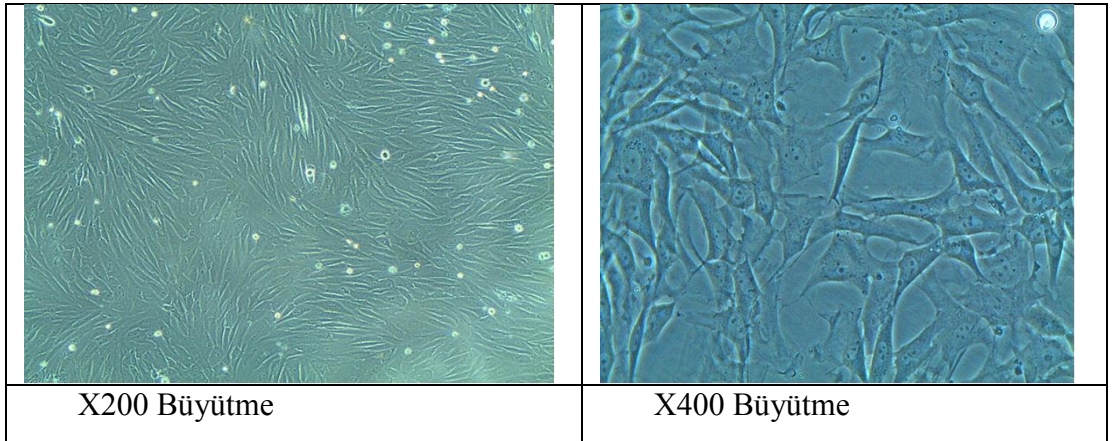
3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız; Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun, 28.02.2018 tarih ve 2018-001 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

3.1. Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (MKH) Kültürü

3.1.1. MKH Eldesi

Çalışmada Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücre (YDKH), sıçanın inguinal bölgesinden alınan yağ dokusu 25cm²'lik hücre kültür kabında ayrışmayı takiben % 15 fetal buzağı serumu (S0113, Biochrom, Berlin, Germany), 50 µgr./ml. Gentamisin (A2712, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml. penisilin ve 100 UI/ml. Streptomisin (A2213, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml. Amfoterisin (A2612, Biochrom, Berlin, Germany) ve 200 mM L-glutamin (K0282, Biochrom, Berlin, Germany) içeren α-MEM (F0915, Biochrom, Berlin, Germany) 370C'de kültür vasatı içerisinde ve %5 CO₂'li ortamdaki inkübatörde çoğalmaya bırakıldı. Kök hücreler 3 gün sonra yüzeye tutunmayan hücreler besi ortamının değiştirilmesi sonucu ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra hücre kültür kabına yapışan hücrelerin (Resim 21) vasatı konfluent olana kadar iki günde bir defa değiştirildi (38).



Resim 21: MKH İverted Mikroskop Görüntüsü

Yaklaşık 10-12 gün sonra, inverted mikroskop (IX71, Olympus, Japan) altında hücrelerin üremeleri kontrol edildi; kültür kabının tabanı %70-80 oranında hücre ile

doldurulduğunda (%70-80 konflüente ulaşıldığında) alt-kültür (pasaj) işlemine geçildi. Birincil kültür sıfırncı pasaj (P0) kabul edilerek, birincil kültürü takip eden her alt-kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3 şeklinde belirtildi. Laminar akışlı steril kabinde gerçekleştirilen pasaj işleminde; besi ortamı ve içindeki tutunmayan hücreler döküldükten sonra, flask yüzeyleri 3-4 ml steril PBS (L1815, Biochrom, Berlin, Germany) ile yıkandı. 1.5-2 ml %0.25 tripsin-EDTA (L2143, Biochrom, Berlin, Germany) solusyonu eklenerek, CO₂ inkübatörde 4-5 dk inkübe edildi. Mikroskopta hücrelerin tümünün yüzeyden ayrıldığı gözlemlendikten sonra, tripsinin inaktivasyonu için flaslara, 4 ml besi ortamı eklendi. Daha sonra hücreler 15 ml'lik konik tabanlı tüplere alındı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifuj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra, pelete 1 ml besi ortamı eklenip, pipetlenerek homojenizasyonun sağlanmasının ardından, hücre sayımı için eppendorf tüpüne mikropipetle 100 µl hücre süspansiyonu alındı. Hücre süspansiyonunun üzerine, mikropipetle 100 µl tripan mavisi solusyonu eklendi. Işık mikroskopunda hücre sayımı gerçekleştirildi. Sayımı gerçekleştirilen hücreler, uygun oranda besi ortamıyla seyreltilerek, 1x10⁶ hücre yoğunluğunda 75 cm²'lik hücre kültür flaslarna (T-75 kultur kaplarına) ekildi ve iki günde bir besi ortamı değiştirilerek kültür işlemi devam ettirildi (39).

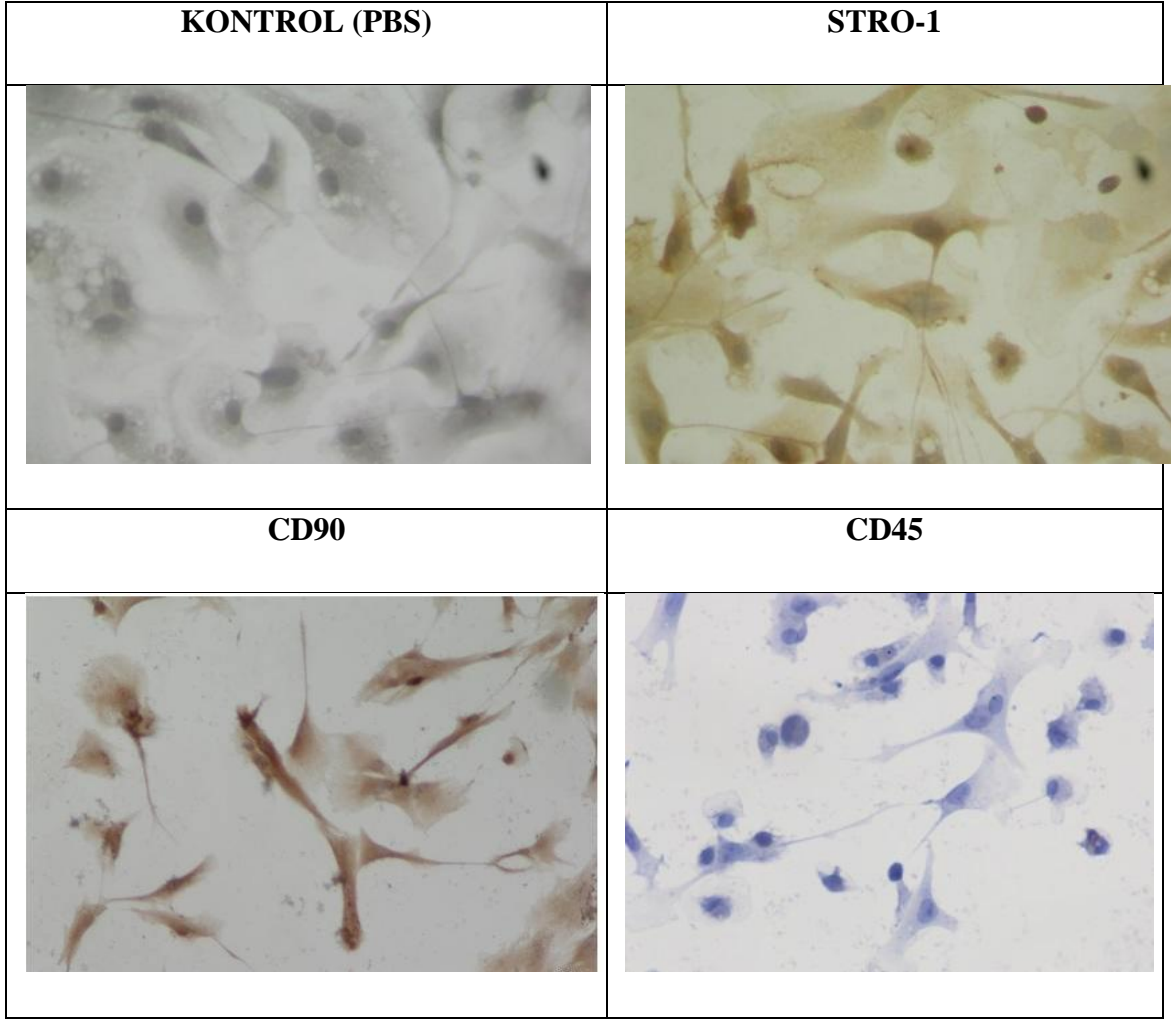
3.1.2. Kök Hücre Sayımı

Yağ dokudan izole edilen kök hücreler için her pasaj işlemi sırasında, dondurma ve çözdürme işlemleri sonrasında ve karakterizasyon işlemleri öncesinde gerçekleştirildi. Hücre sayımı için; tripsinizasyon işlemi ile tutunan hücreler yüzeyden kaldırıldıktan sonra süpernatant atılarak, pelete 1 ml besi ortamı eklendi ve pipetle homojenizasyon sağlandı. Eppendorf tüplerine 100 µl hücre süspansiyonu alındı. Hücre süspansiyonunun üzerine, mikropipetle 100 µl tripan mavisi solusyonu eklendi. Sayım kamarası olarak Thoma lamı kullanıldı. Thoma lamı, düz bir zemin üzerine alınarak, lamelin yapışması gereken sayım alanı çerçevesi üzerine lamel kapatıldı. Hazırlanan süspansiyondan 50 µl alınarak, Thoma lamının her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanında lamelin lam ile birleştiği noktaya pipetin ucu dayanarak tam orta noktasından yavaşça hücre solusyonu sayım alanına pipetlendi. Hücre sayımı, ışık mikroskopunda, x40 objektifte gerçekleştirildi. Toplam

hücre sayıları aşağıdaki formüle göre hesaplandı; $H_s \times D_o \times S_s$, H_s :Sayılan hücre sayısı, D_o :Seyreltme oranı, S_s :0,1 mm³'deki sayım sonucu 1 ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanıldı. Sabit sayı 10 000'dir (38).

3.1.3.MKHKarakterizasyonu

Alınan örnekler immunohistokimyasal boyama için Paraformaldehit (% 4)'te fiksasyon edildikten sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirilecektir. Ardından % 95'ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletilecektir. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulanacaktır. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solusyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edilecektir. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar CD90, STRO-1 ve CD45 ile bir gece inkübe edilecektir. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan örnekler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-9043 Zymed Histostain kit San Francisco,USA) ile 30'ar dakika boyanacaktır. Yine üç defa 5'er dakika tampon solusyonu solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dk boyanacaktır. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatılacaktır.



Resim 22:MKH tanımlaması hücre imminohistokimyası ile CD90, Stro-1 ce CD45 antikorları ile yapılmıştır. MKH'leri CD90 ve Stro-1 pozitif, CD45 negatif hücrelerdir (84)

3.2.GL Hazırlanışı ve MTT

GL mantar tozu içeren sığır jelatini içerisinde asit düzenlemesi yapılmış ilaç formatındaki kapsülün distile su içerisinde son konsantrasyonu 50 mg/mL olacak şekilde ekstraktı hazırlandı. Uygulamalardan önce taze olarak hazırlanmasına dikkat edildi (54).

MTT (Thiazoly blue tetrazolium bromide) 5 mg PBS 1 ml Solüsyon 0,45 µm' lik filtreden geçirilerek steril edilir. Elde edilen stok solüsyon bu haliyle + 4 °C' de

en fazla bir ay karanlık ortamda saklanabilir. MTT çalışma solüsyonu hazırlanacağı zaman, bu stok solüsyonundan alınır ve kültür medyumu ile karıştırılarak kullanılır (Deneylerde kullanılan kuyucuk sayısına göre kültür medyumu ile karıştırılacak olan MTT oranı hesaplanır). MTT'nin ışığa hassasiyeti nedeni ile işlemler karanlıkta yapılır.

Kolorimetrik metot olarak ilk kez Mossmann (1983) tarafından tanımlanan MTT yönteminde, sarı tetrazolium tuzu canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile tetrazolium halkasının kırılması sonucu formazan kristallerine dönüştürülür. Oluşan formazan kristalleri izopropanol ve DMSO gibi çözücülerde çözülmesi sonucu ortamda oluşan renk, spektrofotometrik yöntemle ölçülür ve ölçülen değer canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilidir. GL'nin etkisi MKH hücrelerinde MTT yöntemi ile aşağıdaki şekilde incelenmiştir: Bir falkon tüpe 2 ml % 10 FCS içeren DMEM F12 konulur ve üzerine 100000/ml hücre eklenir. İyi bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra 96 kuyulu mikroplağın 20 kuyucuğunun her birine bu süspansiyondan 100 µl eklenir. Mikroplak 37°C' de %5 CO₂'li inkübatörde 48 saat kültüre olması için inkübasyona bırakılır. 48 saat boyunca her 24 saatte bir kültürün yüzey kaplaması mikroskopta bakılarak gözlenir. 48 saatlik inkübasyon sonucunda farklı konsantrasyonlardaki toksik etkisi incelenecek olan ilaç süzülerek kuyucuklara eklenir. Hüresiz olarak medyum ile ilacın etkileşiminin değerlendirilebilmesi için, yine 20 kuyucuğa medyum ile farklı konsantrasyonlardaki ilaç miktarları eklenir. Aynı şekilde hüresiz mikroplak da 37°C' de %5 CO₂'li inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakılır. İlaç eklendikten 24 saat sonra hücreler mikroskopik olarak incelenerek meydana gelen sitopatolojik değişiklikler tespit edilir ve kontrol grupları ile karşılaştırılır. Mikroplağın 24 saatlik inkübasyonundan sonra, 25 µg MTT/50 µl hazırlanır ve hücreli ve hüresiz olarak her kuyucuğa hazırlanan MTT solüsyonundan 50 µl eklenir. Mikroplak tekrar 37°C' de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saatlik inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda mikroskopik olarak hücreler üzerinde meydana gelen formazan kristallerinin oluşumuna bakılır. Hücrelerde oluşan formazan kristalleri, hücreli ve hüresiz her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklenerek oda sıcaklığında pipetaj yapılarak çözülür. DMSO ile kristaller çözüldükten sonra mikroplak ELİSA ile 570 nm' de okutulur ve sonuçlar hesaplanır.

3.3. Deney Grupları

Tüm deney hayvanları Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilerek Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında 12:12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmıştır. Deneye başlanmadan önce hayvanların bir hafta boyunca karantinada tutularak ortam koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Çalışma süresince, yem ve su günlük olarak değiştirilmiştir. Hayvanlar, kenarları sert plastik ve üstünde çelik ızgara bulunan deney grubuna göre işaretlenmiş kafeslerde tutulmuştur. Hayvanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde aşağıda belirtilen gruplara rastgele dağıtılmıştır:

Kontrol-KR grubu; Bu grupta testisler uygulama veya cerrahi işlem yapılmadı. (n: 8)

Sham-Taklit grubu; TT yapıp beklemeden reperfüzyon sağlandı. (n: 8)

İ/R grubu; TT yapıp 2 saat sonrasında 4 saatlik reperfüzyon uygulandı. (n: 8)

İ/R + GL grubu; TT yapıp 2 saat sonrasında 4 saatlik reperfüzyon uygulandı ve reperfüzyon öncesi 30 dakikalık sürede iskemik periyottan önce intraperitoneal olarak GL (50 mg/kg) 100 µl distile su içerisinde uygulandı (n: 8)

İ/R + MKH grubu; TT yapıp 2 saat sonrasında 4 saatlik reperfüzyon uygulandı ve reperfüzyon öncesi 30 dakikalık sürede iskemik periyottan önce intraperitoneal olarak MKH (1×10^6 YKMKH) 100 µl besiyeri içerisinde uygulandı. (n: 8)

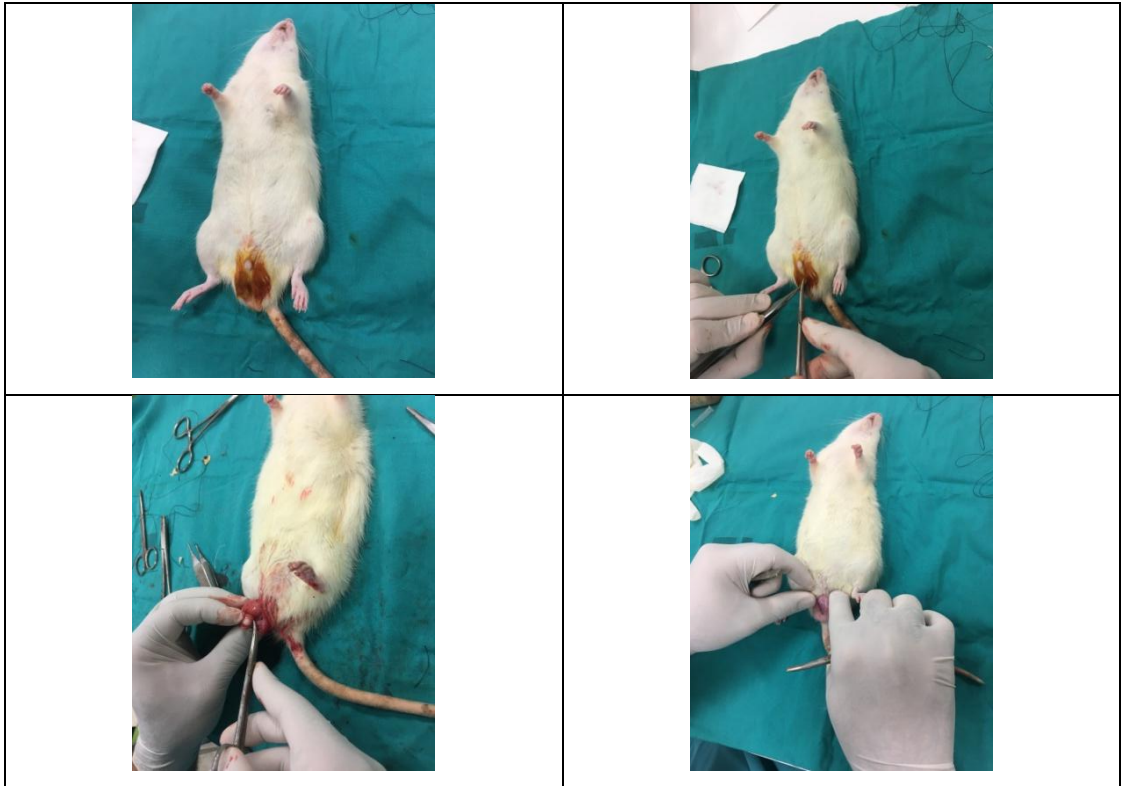
İ/R + GL + MKH grubu; TT yapıp 2 saat sonrasında 4 saatlik reperfüzyon uygulandı ve reperfüzyon öncesi 30 dakikalık sürede iskemik periyottan önce intraperitoneal olarak MKH (1×10^6 YKMKH) + GL (50 mg/kg) 100 µl besiyeri içerisinde uygulandı. (n: 8)

3.4. Cerrahi Uygulamalar

Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney sonunda kontrol ve deney gruplarına ait hayvanlara

intramüsküler olarak 10 mg.kg⁻¹ ksilazin ve 60 mg.kg⁻¹ ketamin anestezisi uygulanmıştır.

İ/R grubu deney hayvanlarına Xylasin ve Ketamin (Xylazin 10 mg/kg, Ketamin 75 mg/kg, i.p.) anestezisi altında, ilioinguinal insizyon yapılarak torsiyon işlemi sol testislerin saat yönünde 720° döndürülmesiyle gerçekleştirildi. Skrotal boşlukta sağ testis tunika vaginalis ve spermatik kord ile birlikte gubernakulumdan künt diseksiyonla ayrılarak dışarıya alındı. Torsiyonun sürdürülebilmesi için testis döndürüldükten sonra tunika albugineasından skrotuma ipek sütür ile tespit edildi. İşlem sonrası insizyon kapatıldı. İ/R grubu için 2 saat torsiyon süresi sonundadetorsiyon işlemi için insüzyon yeri açılarak testisler tespit edildiği yerden serbestleştirilerek detorsiyon edilip tekrar skrotum içine yerleştirilip insüzyon yeri kapatıldı. Cerrahi işlem boyunca enfeksiyonu önlemek amaçlı povidon iyot ile insizyon yerlerine pansuman yapıldı. 4 saat detorsiyon sonunda (Resim23) kan örnekleri alındıktan sonra, testis dokuları çıkarılarak Bouin solüsyonuna alınıp deney hayvanları sakrifiye edildi.



Resim 23: TT uygulaması

3.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi

Hayvanlar kombine ketamin-ksilazin anestezi altında uyutulduktan sonra sakrifiye edilerek deney sonlandırıldı. Sakrifikasyonun ardından sıçanların testis dokuları hızla çıkarıldı. Çıkarılan testis dokuları histokimyasal ve immünohistokimyasal çalışmalar için bouin fiksativi ile tespit edildikten sonra histolojik takibe alındı ardından histolojik ve histokimyasal incelemelere başlandı. Öte yandan, biyokimyasal incelemeleri için alınan doku örnekleri fikse edilmeksizin -80°C e kondu.

3.5.1. Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi

Bouin solüsyonu ile tespit edilen testis dokuları, fiksatifin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece %70 alkol içerisinde bekletildikten sonra 1'er saat % 70 alkolden 3 kere geçirildi. Sonrasında %80 alkolde 1 kere % 95 alkolde 2 kere 30'ar dakika tutuldu. Ardından 2 saat 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 1 gece ksilende tutuldu. Ertesi gün 1 saat ksilende tutulduktan sonra 60°C'lik etüv içerisinde 1 saat 1:1 oranında ksilen-parafin uygulanıp 3 saat parafin ile immersiyonu sağlandı. 1 gece daha parafinde tutulduktan sonra dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü. Özelliklerine göre etiketlenmesi gerçekleştirildi (Tablo 1).

Tablo 1: Bouin Protokolü

BOUİN SOLÜSYONU		
%75 PİKİRİK ASİT		
%25 FORMALDEHİT		
%5 ASETİK ASİT		
İŞLEM	MADDE	SÜRE
FİKSASYON	BOUİN SOLÜSYONU	48 SAAT
PİKİRİK ASİTİN	%70 ALKOL	1 GECE
	%70 ALKOL	1 SAAT
	%70 ALKOL	1 SAAT

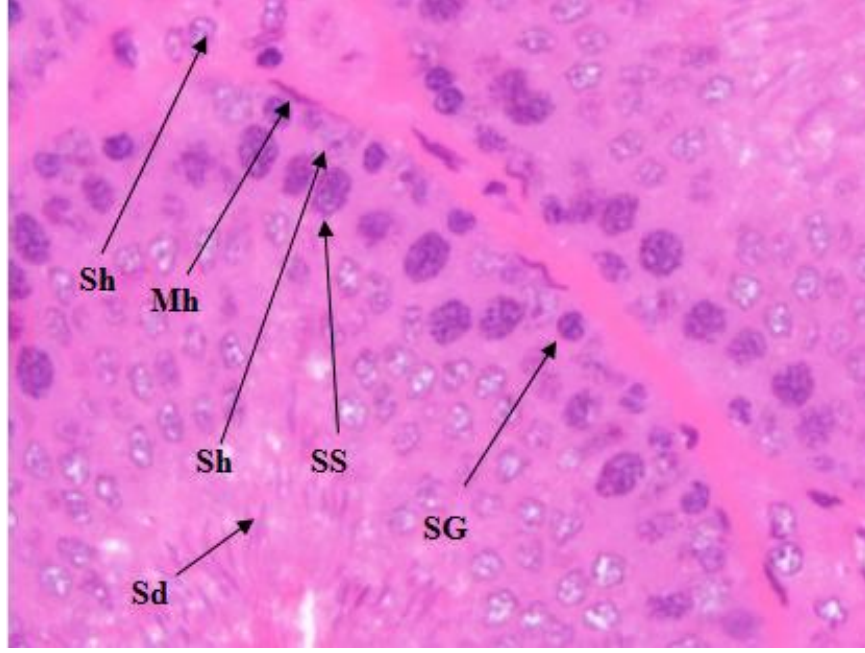
UZAKLAŞTIRILMASI	%70 ALKOL	1 SAAT
	%80 ALKOL	30 DAKİKA
	%95 ALKOL	30 DAKİKA
	%95 ALKOL	30 DAKİKA
ŞEFFAFLAŞTIRMA	KSİLEN- ALKOL	2 SAAT
	KSİLEN	1 GECE
	KSİLEN	1 SAAT
İNFİLTASYON	KSİLEN- PARAFİN	1 SAAT (60°C)
	PARAFİN	3 SAAT (60°C)
	PARAFİN	1 GECE (60°C)
BLOKLAMA	PARAFİN	

3.5.2. Hematoksilen-Eozin Boyaması

Tüm gruplardaki testis doku örneklerinden HE, MT, PAS ve immünohistokimya boyamaları için Rotary mikrotom (Leica RM2125RT, Nussloch; Germany) aracılığı ile alınan 5µm'lık parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüve bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için 2'şer dakika %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akarsu altında yıkandı. 2 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akarsuda yıkanan kesitler asit alkola batırılıp çıkarıldıktan sonra tekrar 5 dakika akarsuda yıkandı ve 30 saniye eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akarsu altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 2).

Tablo 2:Hematoksilen-eozin boyama protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON		60°C ETÜVDE1 GECE
	KSİLEN	30 DAKİKA
	KSİLEN	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	% 80 ALKOL	2 DAKİKA
	% 70 ALKOL	2 DAKİKA
	% 60 ALKOL	2 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	3 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
	% 80 ALKOL	1 DAKİKA
	% 90 ALKOL	1 DAKİKA
	KSİLEN	1 SAAT
KAPATMA	ENTELLAN	



Resim 24: Testisin seminifer tübüllerinde görülen hücreler (**SG:** Spermatogonial Kök Hücre, **SS:** Spermatozit, **Mh:** Miyoid Hücre Çekirdeği, **Sh:** Sertoli Hücre Çekirdeği, **Lh:** Leydig hücresi, **Sd:** Spermatisid)

3.5.3. İndirekt İmmunohistokimya Boyaması

Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 °C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95'ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidrasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solüsyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar eNOS (sc-651, Santa Cruz Biotechnology, Germany), PI3K (sc-1618, Santa Cruz Biotechnology, Germany), AKT (sc-48644, Santa Cruz Biotechnology, Germany) ve mTOR (sc-??, Santa Cruz Biotechnology, Germany) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikor (85-9043 Zymed Histostain kit San Francisco, USA) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu

solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla Diaminobenzidin (DAB) ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilin (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatıldı (Tablo 3).

H-Score Analizi Her bir kesit için ışık mikroskobu altında 40X büyütmede kesit düzleminde bulunan tüm primordiyal foliküllerinde oosit ve folikül hücrelerinin sitoplazmik veya nükleer ekspresyon yoğunluğuna göre [0 (boyanma yok), +1 (zayıf, fakat tespit edilebilir boyanma), +2 (orta şiddetli boyanma) ve +3 (yoğun boyanma)] araştırılan proteinlerin ekspresyon şiddeti hesaplandı. Hesaplama için HSCORE formülü kullanıldı. [$\sum P_i(i+1)$: 'i' boyanma yoğunluğu skorunu, 'P_i' boyanan hücrelerin yüzdesini gösterir].

Tablo 3:İndirekt İmmünohistokimya Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON		60°C ETÜVDE 1 GECE
	KSİLEN	30 DAKİKA
	KSİLEN	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	% 80 ALKOL	2 DAKİKA
	% 70 ALKOL	2 DAKİKA
	% 60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	PBS	10 DAKİKA
HAVUZ OLUŞTURMA	DAKO PEN	
	TRİPSİN	15 DAKİKA 37°C
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA

PEROKSİDAZ İNHİBİSYONU	%3 HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BLOKLAMA	NON-İMMUN BLOKLAMA SOLÜSYONU	1 SAAT
PRİMER ANTİKORLAR	Anti-eNOS, PI3K, Akt, mTOR	18 SAAT +4°C NEMLİ ORTAM
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
SEKONDER ANTİKOR	BİOTİN İLE İŞARETLİ	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3×5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
KAPAMA	ENTEMLAN	
İNCELEME	İŞIK MİKROSKOBU	

3.5.4. TUNEL İmmunohistokimyası

TUNEL Yöntemi İle apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega G7130 kiti kullanılarak 5 µm kalınlığındaki parafin bloklardan alınmış kesitlere uygulandı. Kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde ısı ile deparafinize edildi. Ardından 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinize edildi. Azalan alkol serileri ile 2'şer dakika (%95, %80, %70, %60) rehidratasyon uygulandıktan sonra dokular serum fizyolojik ile oda ısısında 5 dakika (%0.85 NaCl) muamele edildi. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. Doku kesitleri %4 paraformaldehit ile 15 dakika oda ısısında fiske edildi. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 1/500

oranında PBS ile dilüe edilen 20-µg/ml proteinase K 20 dakika doku kesitlerine uygulandı. PBS ile yıkamayı takiben %4'lük paraformaldehit ile 5 dakika yeniden fiksasyon yapıldı. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. Kesitler 5- 10 dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutuldu. TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37 °C de 60 dakika plastik cover slipler kesitleri kapatacak şekilde konarak tutuldu. 15 dakikalık SSC yıkamasının ardından 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 3- 5 dakika hidrojen peroksit uygulanması sonrası 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı ve 1/500 oranında PBS ile hazırlanan Streptavidin HRP solüsyonu ile 30 dakika oda ısısında inkübasyona tabi tutuldu. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandıktan sonra DAB ile boyama yapıldı ve birkaç kere distile su ile yıkandı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı.

Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptandı. Negatif kontrol için primer antikor yerine PBS kullanıldı. Ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirildi. Sayım işlemi kesit üzerinde X 40 oküler merceğinde her testiste nekroz alanları bulunmayan, homojen boyanmış 20 seminifer tübüldeki kahverengi boyanmış apoptotik germ hücreleri sayıldı. Her testiste tübül başına düşen apoptotik germ hücresi hesaplanarak apoptotik indeks oluşturuldu (38, 91) (Tablo 4).

Tablo 4:TUNEL Boyama Protokolü

İŞLEM	SÜRE
%95 ALKOL	2 DK
%80 ALKOL	2 DK
DİSTİLE SUDA YIKAMA	3 DK
%0.1 TRİTON X SOLÜSYONU	5 DK
DOKUNUN ETRAFINI ÇİZME	
PROTEAZ K EKLENEREK, COVER SLİP İLE KAPATMA	20 DK
PBS İLE YIKAMA	4 DK
VİAL 1 VE VİAL 2 BİRLEŞTİRİLEREK HAZIRLANAN SOLÜSYONDAN 50 µL EKLENEREK LAMLARIN ÜZERİ COVER SLİP İLE	60 DK

KAPATILIR. 37 ⁰ C'DE İNKÜBE EDİLİR	
PBS İLE YIKAMA	6 DK
DOKULARIN ÜZERİNE 50-100 µL DAB SUBSTRAT EKLENİR.	GÖZ İLE TAKİP
PBS İLE YIKAMA 3 KEZ	2 DK
MAYERS HEMATOKSİLEN İLE BOYAMA	1 DK
DİSTİLE SU İLE YIKAMA	2 DK
%80 ALKOL	DALDIR ÇIKAR
%95 ALKOL	DALDIR ÇIKAR

3.5.5. Johnsen Skorlaması ve Hücrelerin Tanımlanması

HE ile boyanan kesitler histopatolojikolarak değerlendirilerek Johnsen'in skorlamasına (Tablo 5)göre skorlandı(89, 90).

Tablo 5: Johnsen Skorlaması

Johnsen Skoru	
10	Komplet spermatogenez, çok sayıda spermatozoa, düzgün yükseklikte germinal epitel, normal çaplı seminifer tübül
9	Disorganize germinal epitel ve spermatogenez, çok sayıda spermatozoa, oblitere tübüler lümen
8	Tübülerde az sayıda spermatozoa varlığı
7	Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid, spermatosit ve spermatogonyum varlığı
6	Spermatozoa yok, az sayıda spermatid, çok sayıda spermatosit ve spermatogonyum varlığı
5	Spermatozoa ve spermatid yok, çok sayıda spermatosit ve spermatogonyum
4	Spermatozoa ve spermatid yok, az sayıda spermatosit, fakat çok sayıda spermatogonyum varlığı
3	Sadece spermatogonyum varlığı
2	Spermatogonik hücreler yok, sadece sertoli hücreleri varlığı
1	Tübüllerde hiçbir hücrenin bulunmadığı durum

3.5.6.Periyodik Asit-Schiff (PAS) ve Masson Trikrom (MT) Boyama Protokolü

Daha önce 37°C'lik etüvde bırakılarak lamlara daha iyi yapışması sağlanan doku kesitleri, parafinden arınması için bir gece boyunca ksilol içerisine bekletildi. Ksilolden çıkarılan kesitler, kurutulduktan sonra Tablo 6'daki protokol izlenerek PAS ile boyanmıştır (Tablo 6). MT için de 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Bouin solusyonunda 56 °C'de 15 dakika mordantlama yapıldı ve ardından sarı renk gidinceye kadar akarsuda yıkandı. Weigert demirli hematoksilene 10 dakika çekirdek boyaması yapıldı ve tekrar akarsuda 10 dak. yıkama yapıldı. Daha sonra Biebrich carlet-asit fuksin solusyonunda 5 dakika bekletilen kesitler kırmızı renk gidinceye kadar distile suda yıkandı. Fosfotungstik / fosfomolibdik asitte 5 dakika bekletildi ve ardından 5 dakika anilin mavisi ile boyanan örnekler %1'lik asetik asitte 2 dakika bekletildikten sonra 5 dakika distile suda yıkandı. Yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı.

Tablo 6: PAS-MT boyama protokolü

	İŞLEM	SÜRE
PAS BOYAMA AŞAMASI	DİSTİLE SU İLE YIKAMA	1 DK
	10 DAMLA A SOLÜSYONU DAMLATILIR	10 DK
	DİSTİLE SU İLE YIKAMA	10 SN
	10 DAMLA B SOLÜSYONU DAMLATILIR	20 DK
	DİSTİLE SU İLE YIKAMA	10 SN
	10 DAMLA C SOLÜSYONU DAMLATILIR	2 DK
	PREPARATLAR KURUTULUR	5-10 DK
	10 DAMLA D SOLÜSYONU DAMLATILIR	2 DK
	10 DAMLA E SOLÜSYONU DAMLATILIR	3 DK

	ÇEŞME SUYU İLE YIKAMA	5 DK
DEHİDRATASYON AŞAMASI	%80 ALKOL	1 DK
	%95 ALKOL	1 DK
	%100 ALKOL	1 DK

MT BOYAMA PROTOKOLÜ	
İŞLEM	SÜRE
KSİLEN 1	30 DK
KSİLEN 2	30 DK
%95 ALKOL	2 DK
%80 ALKOL	2 DK
%70 ALKOL	2 DK
%60 ALKOL	2 DK
AKAR SU	5 DK
56 ⁰ C	15 DK
AKAR SU	5 DK
DEMİRLİ HEMATOKSİLEN	10 DK
CARLET-ASİT FUKSİN	5 DK
DİSTİLE SUDA	5 DK
FOSFOMOLİBDİK ASİT	5 DK
ANİLİN MAVİSİ	5 DK
%1'LİK ASETİK ASİT	2 DK
DİSTİLE SUDA	5 DK
%80 ALKOL	1 DK
%95 ALKOL	1 DK
KSİLEN 1	30 DK
KSİLEN 2	30 DK
KAPATMA	

Dehidratasyon aşaması bittikten sonra kurutulmuş doku kesitleri, fazla boyanın akması ve preparatın temizlenmesi amacıyla 5 dk ksilole dizildi. Ksilolden çıkarılan preparatlar, kurutulduktan sonra, entellan ile kapatıldı. Sonuçlar:Nükleus: Mavi. Glikojen ve diğer PAS pozitif reaksiyon veren alanlar: Kırmızıdan mora değişen renklere saptanır.

3.5.7. İstatistik

Elde edilen veriler One Way-ANOVA istatistik testiyle GraphPad yazılımı ile karşılaştırıldı ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.6.Spermatozoon Analizleri

3.6.1.Epididimisten Spermatozoon Eldesi

Deney hayvanları laboratuvarından alınan bir erişkin erkek sıçan eter yardımı ile anestezi edildi ve laboratuvar koşullarında servikal dislokasyon yöntemi ile öldürüldü. Öldürülen erkek sıçanın testisleri çıkartıldı (Resim 25) ve %10'luk fötal bovin serum içeren(FBS) RPMI medyumuna atıldı. Hücre kültürü ortamına alınan bu medyum içerisinde testis örnekleri laminar air flow kabini içerisinde bir petri kabına alındı. Petri kabındaki testislerin etrafındaki fazla yağ kısmı ayıklandı. Temiz medyum ortamına alınan bu testisler bistüri ucu yardımı ile epididimislerinin uç kısımları kesilerek testis sıvazlandı. Daha sonrasında 1000 ml'lik pipet yardımı ile medyumdaki spermler 15 ml'lik tüp içerisine toplandı ve 1000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmındaki spermler alınarak lam üzerine yayıldı ve sayım yapıldı (90).



HASARSIZ TESTİS



HASARLITESTİS

Resim 25:Erkek sıçandaki testis görüntüleri

Spermatozoon Eldesinde Kullanılacak Örneklerin Hazırlanması

- Sakrifikasyon sırasında alınan testis dokusundan ayrılan ve yağlarından temizlenen epididimisin kaudal parçası 37 °C'ye ayarlanan ısıtıcı tabla üzerindeki petri kaplarına alındı.

- Bu parça bir bistüri yardımıyla birkaç bölgesinden kesilerek tübüller içerisindeki spermatozoanın dışarıya çıkışı sağlandı.
- 37 °C’de 15 dakika inkübasyona alınan örnekler, düzgün bir spermatozoa süspansiyonu elde etmek için birkaç kez yavaşça çalkalandı.
- İnkübasyondan sonra, spermatozoa süspansiyonu Pastör pipeti yardımıyla birkaç kez karıştırıldı.
- Bu şekilde oluşturulan 10 ml’lik süspansiyondan 0,5 ml’si alınarak daha önceden içerisine 2 ml PBS konulan 15 ml’lik falkon tüpleri içerisine konuldu.
- Süspansiyon 1000g’de 5 dk boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında süpernatant atılıp, pellet 1 ml PBS içerisinde çözdürüldü.

Bu şekilde hazırlanan örnekler, spermatozoa sayımı ve spermatozoon morfoloji analizleri için kullanıldı (92).

3.6.2. Spermatozoon Morfoloji Analizi

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan spermatozoon solüsyonundan, mikropipet yardımı ile 100 µl alınarak lamalar üzerine aktarılmıştır. Bir lamel yardımıyla lam üzerine homojen şekilde yayılan spermatozoon örnekleri havada kurutulularak boyamaya hazır hale getirilmiştir. Kurutulan örnekler Tabloda gösterilen protokol takip edilerek Giemsa boyası ile boyanmıştır (Tablo 7).

Tablo 7:Yayma preparatlar için Giemsa boyama protokolü

İşlem	Süre
Metanol ile tespit etme	3 dk
Akar su ile yıkama	2-3 saniye
Kurutma	5 dk
Giemsa çalışma solüsyonu (1:20 oranında dH ₂ O ile seyreltilmiş) ile boyama	35 dk

Akar su ile yıkama	1 dk
Kurutma	5 dk

Bu şekilde boyanan her preparatta, 250 spermatozoon morfolojik olarak incelenmiş ve anormal morfolojideki spermatozoon sayıları kaydedilerek yüzde hesaplamaları yapılmıştır (90, 91, 92).

3.6.3.Spermatozoon Sayımı

Hemositometrenin üzerine kuyucukların üzerini örtecek büyüklükte bir lamel yerleştirildikten sonra, spermatozoon süspansiyonunda 10 µl alınarak, ilk önce hemositometrenin sol kuyucuğu dolduruldu. Vortekslenerek yeniden homojenize olması sağlanan süspansiyondan 10 µl daha alınarak hemositometrenin sağ kuyucuğu dolduruldu. Mikroskop altına yerleştirilen hemositometrenin sol üstteki ikincil karesine odaklandıktan sonra sayım işlemine geçildi. Sayım işleminde her bir ikincil karenin sol ve üst köşesi üzerinde uzanan ya da herhangi bir bölümü bu bölgelere değen spermatozoonlar sayıma dahil edilirken, ikincil karelerin sağ ve alt köşesi üzerinde uzanan ya da bu bölgelere değen spermatozoonlar sayım dışı bırakılmıştır. Bu şekilde iki kez yapılan sayım sonuçları not edilerek bu sonuçların ortalamaları $(S1+S2/2)$ alındı ve aşağıdaki hesaplama sistemi kullanılarak her grup için spermatozoon sayıları hesaplandı (Tablo 8).

Tablo 8: Spermatozoon sayılarının hesap protokolü

Transfer Edilen Hacim = 0,5 ml

Sekonder Kare Sayısı = 25

Sekonder Karelerin Hacmi = 4×10^{-6} ml

Petri Kabındaki PBS Hacmi = 10 ml

Falkon Tüpündeki Total Hacim = 2,5 ml

Seyreltme Faktörü = $\frac{(\text{Petri Kabındaki PBS Hacmi}) \times (\text{Falkon Tüpündeki Total Hacim})}{(\text{Transfer Edilen Hacim}) \times (\text{Sekonder Karelerin Hacmi}) \times (\text{Sekonder Kare Sayısı})} = \frac{10^6}{2}$

Total spermatozoon sayısı = $\frac{S1+S2}{2} \times \frac{10^6}{2}$

3.7.Biyokimyasal Yöntem

3.7.1.Serum Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

Steril koşullarda toplanan sıçan kan örnekleri 1000 ×g hızında 15 dakika +4 °C’ de santrifüj edilmiş ve kan serumları elde edilmiştir. Deney yapılana kadar – 80 °C’ de saklanmışlardır. Her grup için sekizer hayvandan elde edilen örnekler, her grup kendi içinde birleştirilerek BioVision SOD aktivite kitinin direktiflerine uyacak şekilde hazırlanmış ve ELISA plaka okuyucu ile 450 nm dalga boyunda okutularak serum SOD aktiviteleri tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar OneWayANOVA ve post hoc test yöntemleri kullanılarak analiz edilmiş, p<0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir (93, 94).

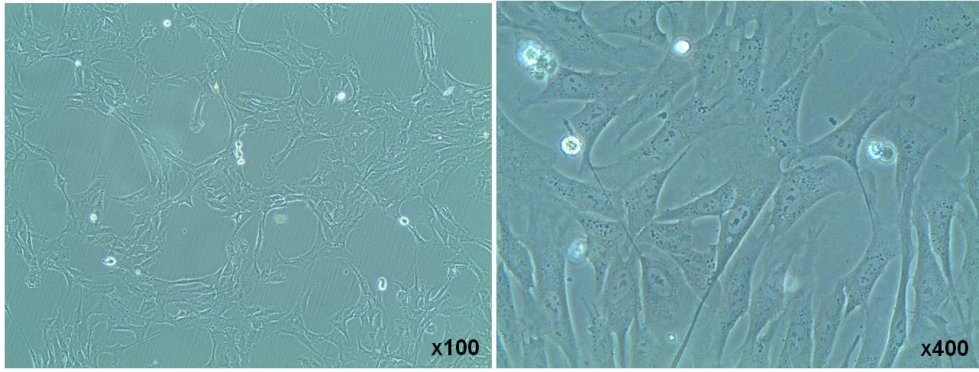
3.7.2. Serum Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Tayini

Steril koşullarda toplanan sıçan kan örnekleri 1000 ×g hızında 15 dakika +4 °C’ de santrifüj edilmiş ve kan serumları elde edilmiştir. Deney yapılana kadar – 80 °C’ de saklanmışlardır. Her grup için sekizer hayvandan elde edilen örnekler, her grup kendi içinde birleştirilerek BioVision kolorimetrik direktiflerine uyacak şekilde ELISA plaka okuyucu (PolarSTAR Omega, BMG LABTECH) ile 532 nm dalga boyunda okutulmuştur. Elde edilen sonuçlar OneWayANOVA ve post hoc test yöntemleri kullanılarak analiz edilmiş, p<0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir (93, 94).

4.BULGULAR

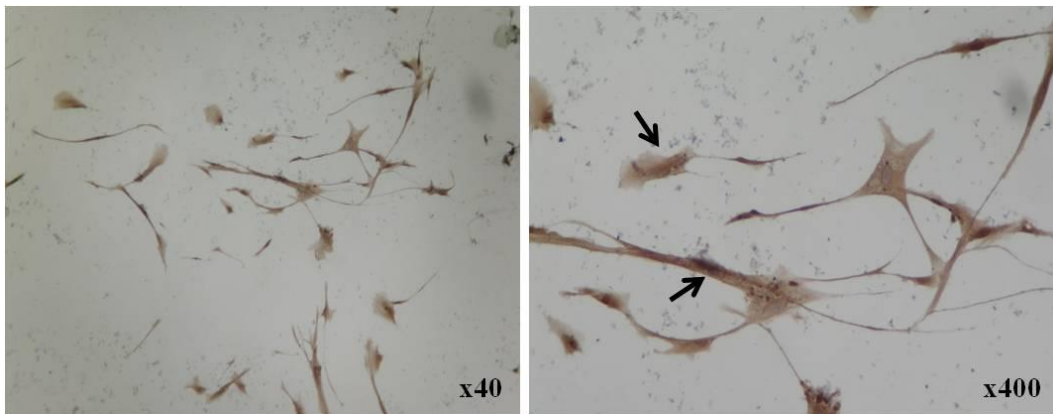
4.1. MKH İzolasyon ve Karakterizasyon Bulguları

Hücre kültürü, laboratuvar koşulları altında, sıçan yağ dokusundan izole edilen MKH'ler besiyeri ortamında konfluent oluncaya kadar kültüre edildi. Hücreler, 4. pasaja kadar pasajlama işlemi yapıldıktan sonra uygulamaya en uygun hale geldi (Resim 26).

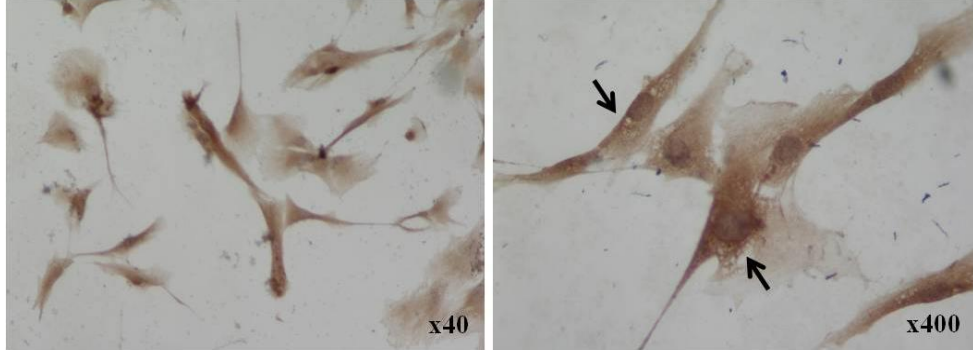


Resim 26: MKH Kültür ortamında yerleşip, çoğalmış 4. pasajdaki hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri.

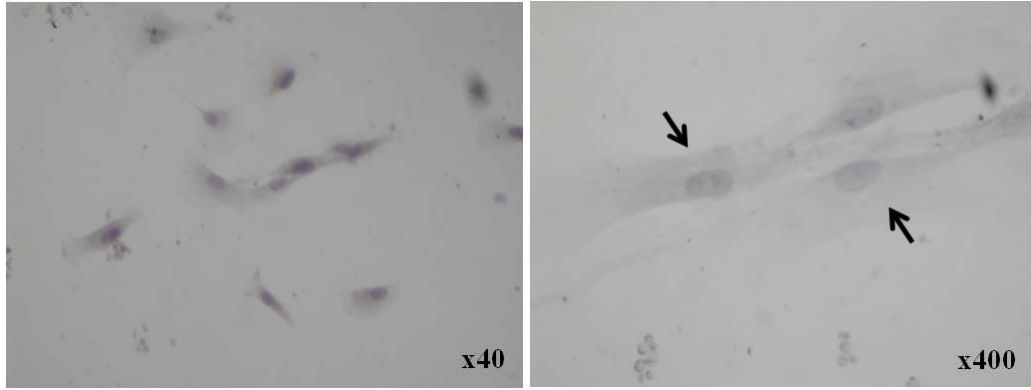
Kültür ortamında 4. pasajdaki MKH kültür kabında konfluent olduğunda, belirteç olarak STRO-1 (Resim 27) ile CD45 pozitifliği (Resim 28) ve CD90 negatifliği (Resim 29) kullanılarak immunohistokimyasal olarak doğrulandı.



Resim 27: MKH için Stro-1 antikor ile boyanmış pozitif immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması sağlandı. Oklar: Stro-1 pozitif hücreler.



Resim28: MKH için CD90 antikor ile boyanmış pozitif immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması sağlandı. Oklar: CD90 pozitif hücreler.



Resim 29: MKH için CD45 antikor ile boyanmamış negatif immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması sağlandı. Oklar: CD45 negatif hücreler.

Hücrelerin boyanmaları üzerinden yapılan skorlama ile büyük çoğunluğunun MKH oldukları işaretlenerek gösterildi (Tablo 9).

Tablo9:MKH belirteçler ile karakterizasyonu morfometrisi (% İşaretlenen Hücre Sayısı ± Standart Deviasyon).

	KONTROL	CD90	STRO-1	CD45
Belirteç yüzdesi	132,84 ± 2,11	110,45 ± 8,44	117,91 ± 8,44	30,60 ± 17,94

4.2. MHK için GL etkisi

GL tarafından MKH ile etkileşimi için toksisite deneyi yapıldı. GL, 6 değişik konsantrasyonda semikonfluent aşamasında MKH uygulandı. 96 lık plate okuyucuda yapılan incelemede en yüksek konsantrasyonda bile MKH için toksik etki yapmadığı bulundu (Tablo 10).

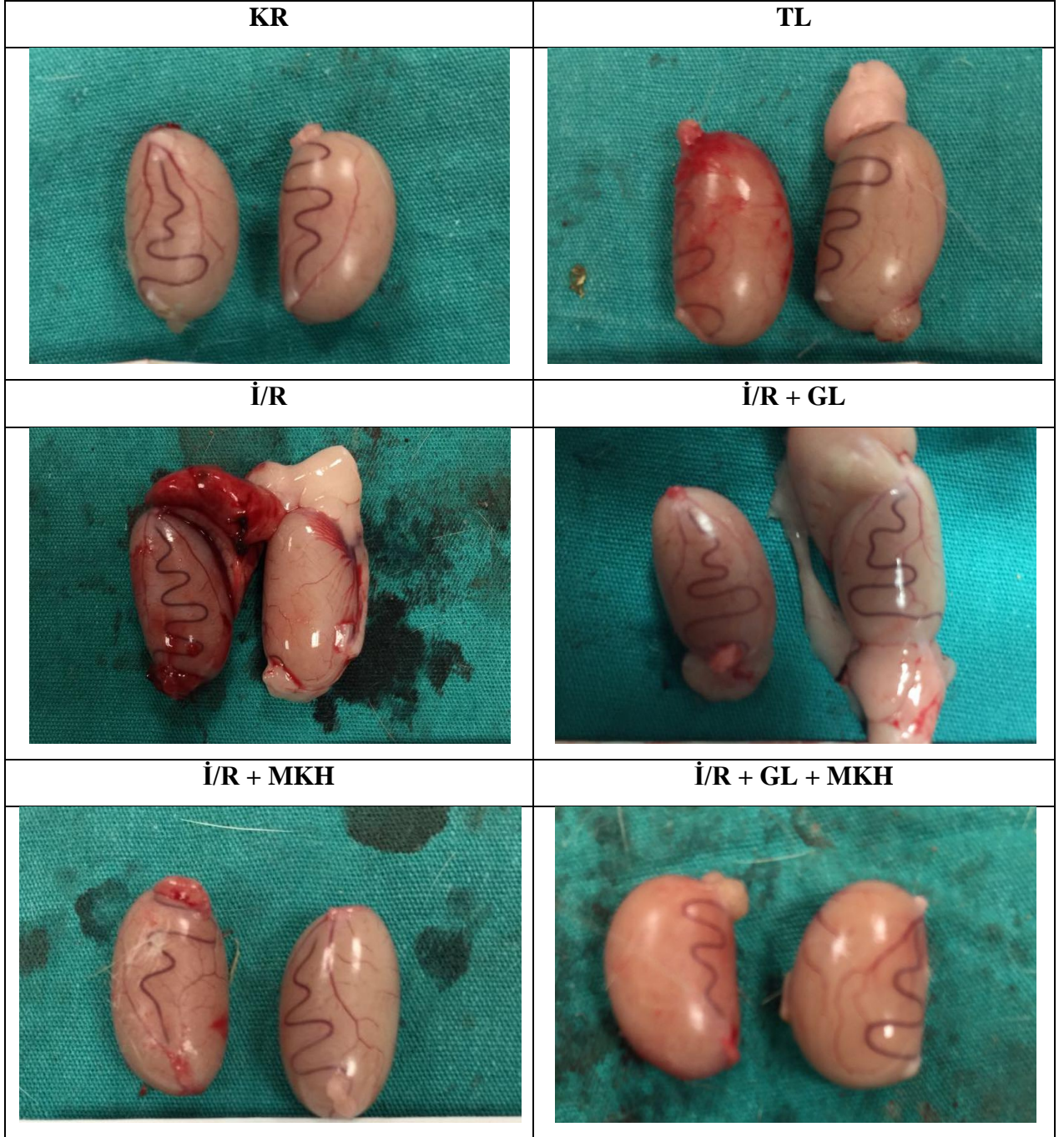
Tablo 10:GL toksisitesi için MTT değerleri

	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Absorbans	1124,45 ± 90,36	1085,66 ± 88,44	1175,56 ± 118,22	1088,88 ± 98,44	1128,66 ± 79,45	1015,78 ± 69,95

4.3. Makroskopik Bulgular

Örneklerin çekilen makroskopik görüntülerinde kontrol ve sham grupları arasında morfolojik olarak fark gözlenmezken (Resim 30) 2 saat torsiyon 4 saat reperfüzyon uygulanan gruplarda nekrotik alanlar da içeren hasar saptandı. GL, MKH ve GL+MKH uygulanan gruplarda birlikte kullanımlarının daha da anlamlı etki gösterdiği düzelmiş morfolojik görüntüler izlendi. (Resim 30).

TORSİYON TESTİSLERİNİN MAKROSKOBİK GÖRÜNTÜLERİ



Resim 30:Deney Gruplarının makroskopik görüntülerinde hasarın testiste oluşturduğu değişiklikler izlendi.

4.4. Mikroskopik Bulgular

4.4.1. H-E Histokimya Bulguları

Kontrol Grubu histolojik görüntülerde bu Tunika albuginea'nın, normal görünüm ve kalınlıkta olduğu görüldü. Testis dokularına ait stromal ve parankimal alanlar değerlendirildiğinde parankimal alanda esas seminifer tübüllerin normal olduğu gözlemlenmiştir. Seminifer tübüller içerisinde yer alan spermatogoniyalar, erken-geç spermatositler, spermatitler ve spermatozoalar gibi spermatogenik seri hücrelerin normal morfolojide olduğu izlendi. Stromal alanlardaspermatojenik hücreler arasında yer yer bazal membrandan lümeneye doğru uzayan Sertoli hücreleri ile Leydig hücrelerinin ve bağ dokunun normal görünümde olduğu saptandı.

Sham Grubu kontrol grubu ile tunika albuginea, stromal ve parankimal alanlar açısından değerlendirildiğinde benzer oldukları gözlemlendi (Resim 31).

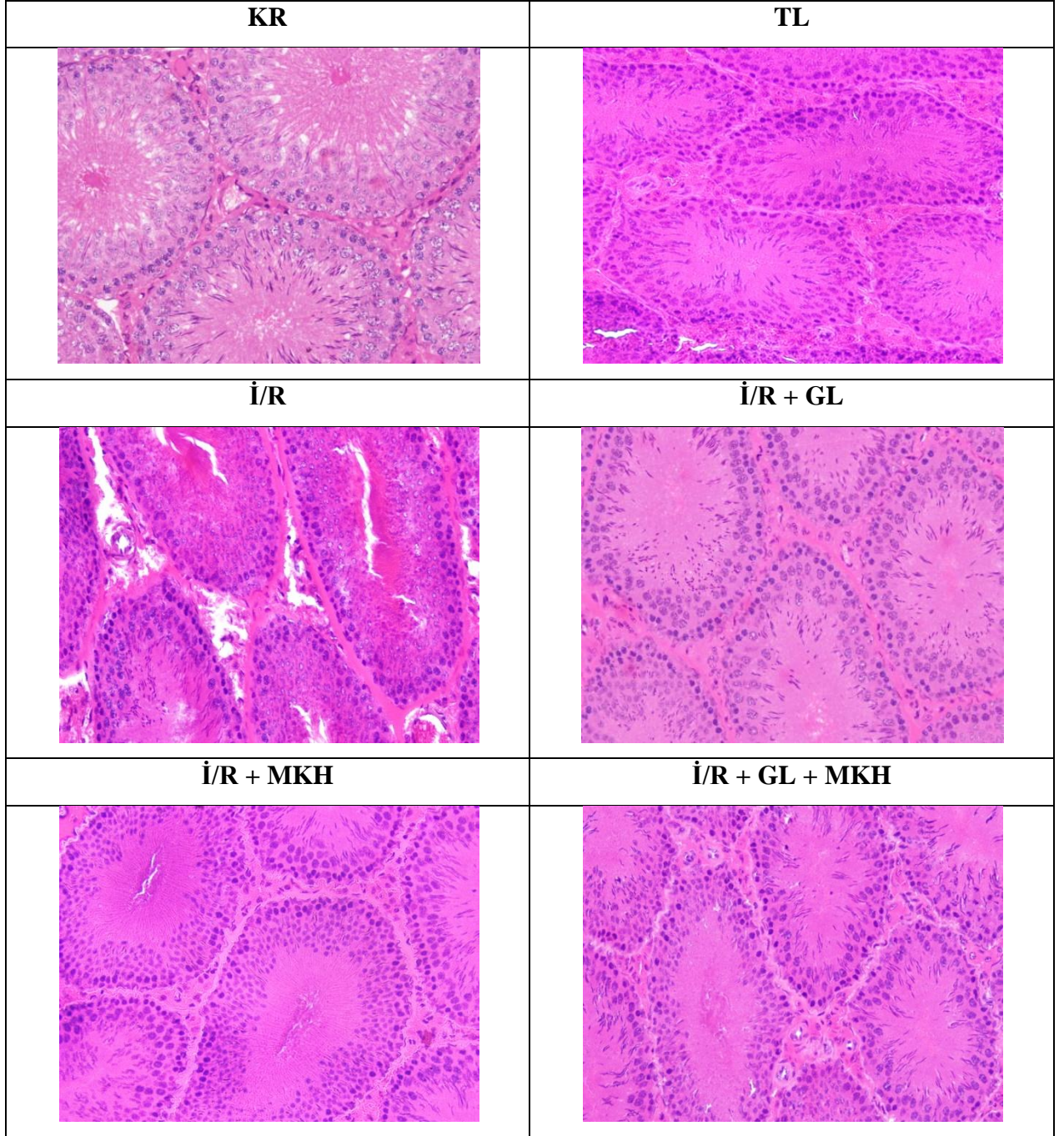
İ/R Grubu kontrol ve sham ile karşılaştırıldığında morfolojik ve histolojik olarak iskemik reperfüzyon ile uyumlu belirgin patolojik bulgular gösterdi. Seminifer tübüllerde içi boşalmış ve atrofik olmanın yanı sıra tübül çaplarında önemli ölçüde daralma gözlemlenmiştir. Seminifer tübüllerde, spermatojenik seri hücrelerde kayıplar, hücreler arasında ayrışmalar, dejenerasyonlar ve piknotik çekirdeklerin varlığı ile bazı tübüllerin lümeninde hücresel döküntüler gözlemlendi. Stromal alanlarda ise ödem, hiperemi, damarlarda dolgunluk ve kanama, hasarlı tübüllerin çevresindeki interstisyel alanlarda Leydig hücrelerinde kayıp saptandı. İnflamatuvar hücrelerin ve makrofajların varlığı izlendi Tunika albuginea kalınlığının arttığı ve daha gevşek olduğu bulundu (Resim 31).

İ/R + GL Grubu incelendiğinde torsiyon ile gerçekleşen iskemik histopatolojik bulguların çok azalmış olduğu izlendi (Resim 31). 2 saatlik torsiyonun son yarım saatlik bölümünde uygulanan GL ile testis morfolojisinde olduğu gibi histolojisinde de korunduğu saptandı (Resim 31).

İ/R + MKH Grubu GL uygulamasına benzer biçimde torsiyona bağlı oluşan histopatolojik bulguların gerilediği ve testis dokusunun korunduğu gözlemlendi.

İ/R + GL + MKH Grubu testis GL ve MKH uygulamalarının tek tek kullanılmasından çok daha iyi bir şekilde patolojik bulguların gerilemesinde ve testis dokusunun korunmasını sağladığı saptandı (Resim 31).

TORSİYON TESTİSLERİNİN MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLERİ (H-E)



Resim 31:Torsiyon Grubu **HE** boyamalarının mikroskopik görüntülerde hasarın testiste oluşturduğu değişiklikler ve uygulamaların anlamlı ve olumlu etkileri izlendi, X200

4.4.2. Johnsen Skoruması

Testis kesitlerinin Hematoksilen&Eosin ile boyalı preparatlarının değerlendirilmesi *Johnsen skorlamasına* göre yapıldı. Seminifer tübül içerisindeki spermatogenik seri hücrelerinin düzeni, hangi aşamada olduğu ve tübüllerin yapısı, her bir kesitte 10 seminifer tübül değerlendirilerek, 1'den 10'a kadar sayısal değer verilerek skorlandı (Tablo 11).

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

Tablo 11:Deney gruplarına ait **MORFOMETRİ**için **JOHNSEN SKORLAMASI**değerleri ve istatistiği

Group	Points	Mean	Deviation	Mean
KR	8	8.490	1.290	0.4561
TL	8	7.720	1.040	0.3677
İR	8	4.220	1.120	0.3960
İR+GL	8	6.850	1.340	0.4738
İR+MKH	8	6.450	1.120	0.3960
İR+GL+MKH	8	8.780	0.8500	0.3005

Comparison	Difference	q	P value
KR vs TL	0.7700	1.913	ns P>0.05
KR vs İR	4.270	10.611	*** P<0.001

KR vs İR+GL	1.640	4.076	ns P>0.05
KR vs İR+MKH	2.040	5.070	* P<0.05
KR vs İR+GL+MKH	-0.2900	0.7207	ns P>0.05
TL vs İR	3.500	8.698	*** P<0.001
TL vs İR+GL	0.8700	2.162	ns P>0.05
TL vs İR+MKH	1.270	3.156	ns P>0.05
TL vs İR+GL+MKH	-1.060	2.634	ns P>0.05
İR vs İR+GL	-2.630	6.536	*** P<0.001
İR vs İR+MKH	-2.230	5.542	** P<0.01
İR vs İR+GL+MKH	-4.560	11.332	*** P<0.001
İR+GL vs İR+MKH	0.4000	0.9940	ns P>0.05
İR+GL vs İR+GL+MKH	-1.930	4.796	* P<0.05
İR+MKH vs İR+GL+MKH	-2.330	5.790	** P<0.01

4.4.3. PAS Histokimya Bulguları

Kontrol Grubu histolojik görüntülerde seminifer tübüllerin bazal membranlarını, akrozomal granülleri ile sertoli ve leydig hücrelerinin boyandığı görüldü (Resim 32).

Sham Grubu kontrol grubu ile benzer boyama gerçekleştiği görüldü (Resim 32).

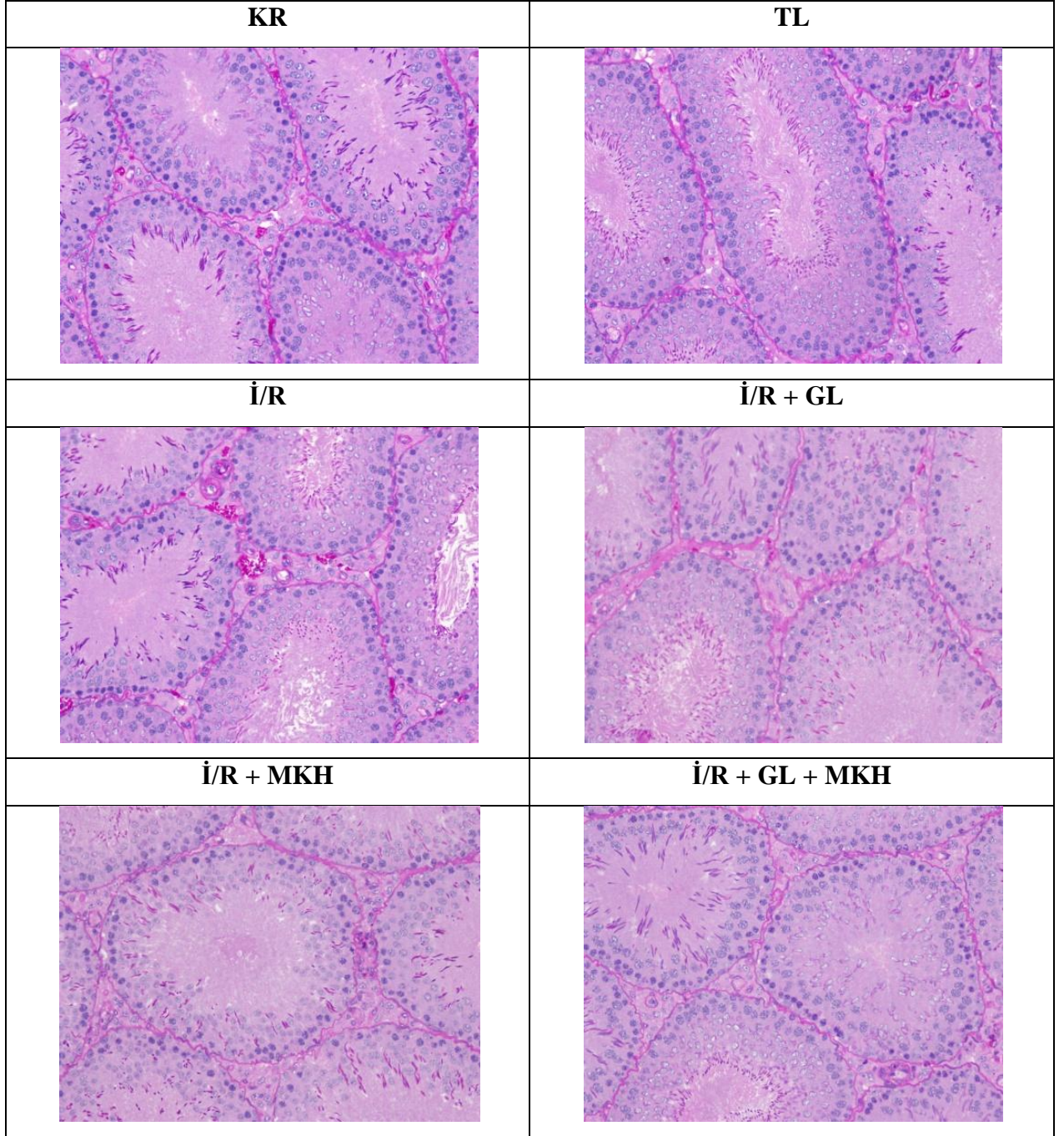
İR Grubu kontrol ve sham ile karşılaştırıldığında boyamaların kesintiye uğradığı ve bazal membran sürekliliğinin kaybolduğu ayrıca akrozom reaksiyonunun da İR hasarına bağlı azaldığı izlendi (Resim 32).

İR + GL Grubu incelendiğinde reperfüzyon hasarına bağlı oluşan boyama değişikliklerinin gerilediği görüldü (Resim 32).

İR + MKH Grubu GL uygulamasına benzer biçimde boyamaların korunduğu saptandı (Resim 32).

İR + GL + MKH Grubu testis GL ve MKH uygulamalarının tek tek kullanılmasından çok daha iyi bir şekilde boyama bulgularının korunduğu saptandı (Resim 32).

TORSİYON TESTİSLERİNİN MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLERİ (PAS)



Resim 32:Torsiyon Grubu PAS boyamalarının mikroskopik görüntülerde hasarın testiste oluşturduğu değişiklikler ve uygulamaların anlamlı ve olumlu etkileri izlendi. X200

4.4.4. MT Histokimya Bulguları

Kontrol Grubu histolojik görüntülerde normal kollajen lif, retiküler lifler ve sitoplazmik granüller şeklinde bağ dokusunun görüldüğü izlendi (Resim 33).

Sham Grubu kontrol grubu ile benzer boyama paterni gözlemlendi (Resim 33).

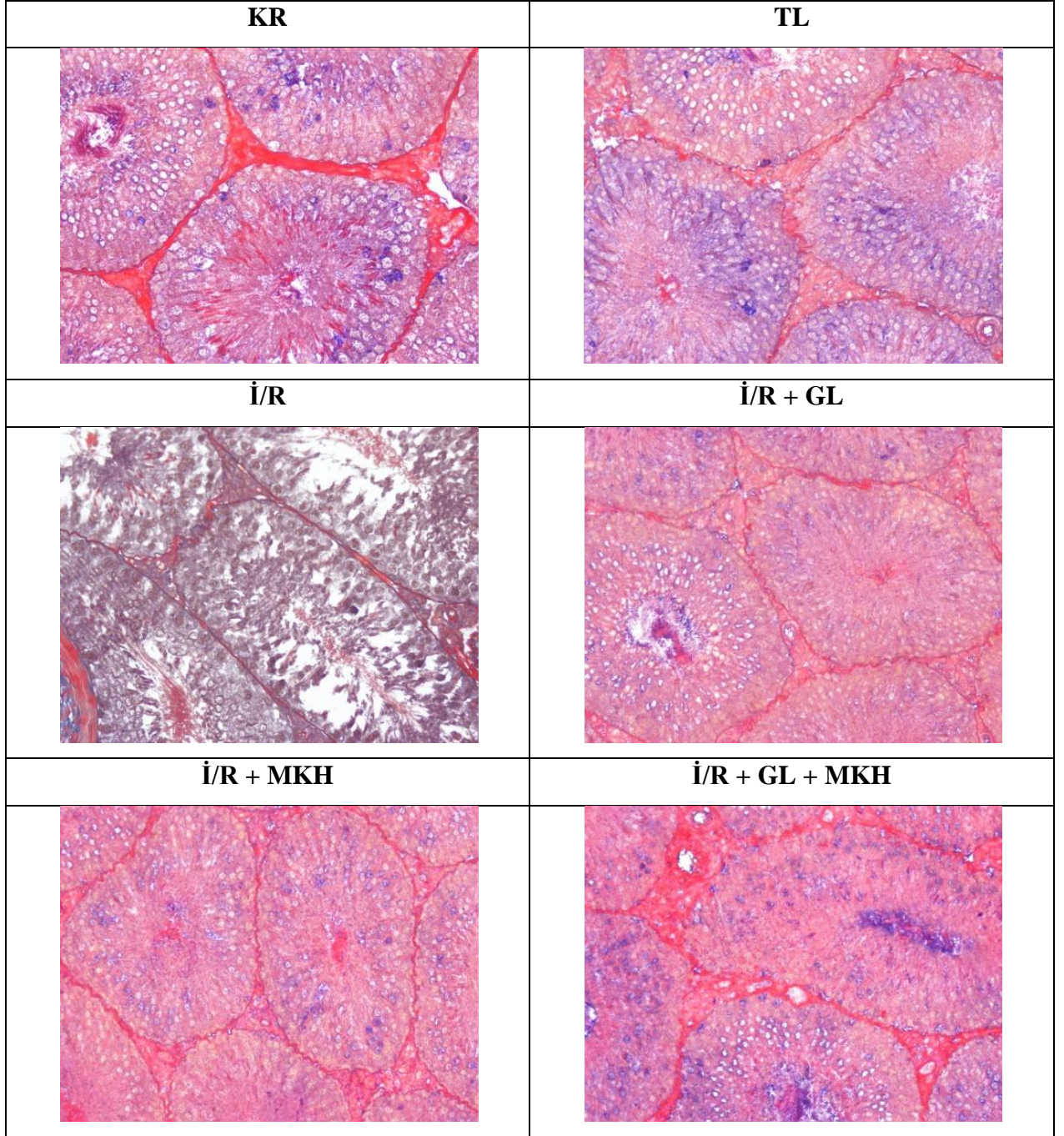
İ/R Grubu kontrol ve sham ile karşılaştırıldığında boyamaların azaldığı saptandı. Sitoplazmik granüllerde İ/R kaynaklı hasara bağlı olarak boyamanın azaldığı ve kollajen liflerin hasarlandığı boyamalar neticesinde saptandı (Resim 33).

İ/R + GL Grubu incelendiğinde bağ dokusundaki değişikliklerin gerilediği ve korunduğu bulundu (Resim 33).

İ/R + MKH Grubu GL uygulamasına benzer biçimde olduğu saptandı (Resim 33).

İ/R + GL + MKH Grubu testis GL ve MKH uygulamalarının tek tek kullanılmasından çok daha iyi bir şekilde patolojik bulguların gerilemesinde ve testis dokusunun korunmasını sağladığı saptandı (Resim 33).

TORSİYON TESTİSLERİNİN MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLERİ (MT)



Resim 33:Torsiyon Grubu MT boyamalarının mikroskopik görüntülerde hasarın testiste oluşturduğu değişiklikler ve uygulamaların anlamlı ve olumlu etkileri izlendi.X200

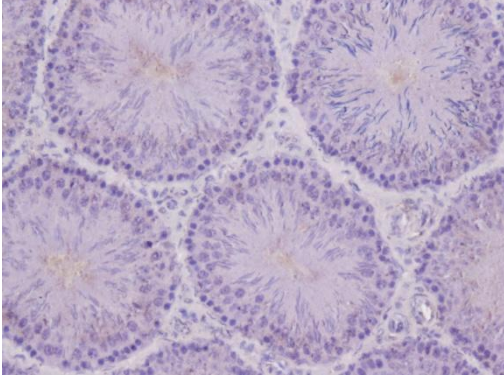
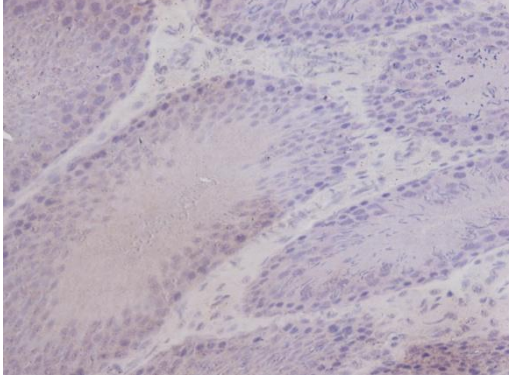
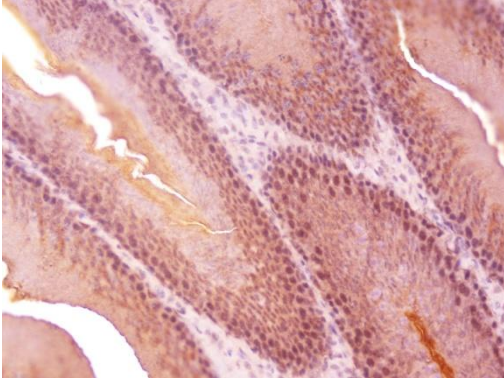
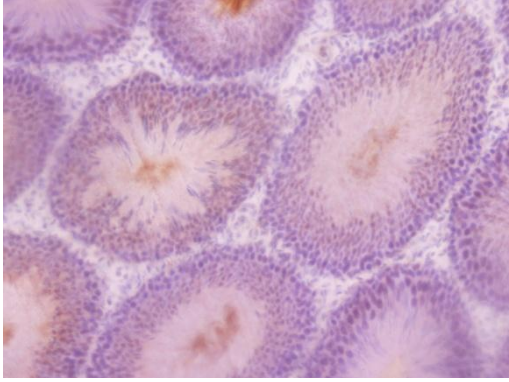
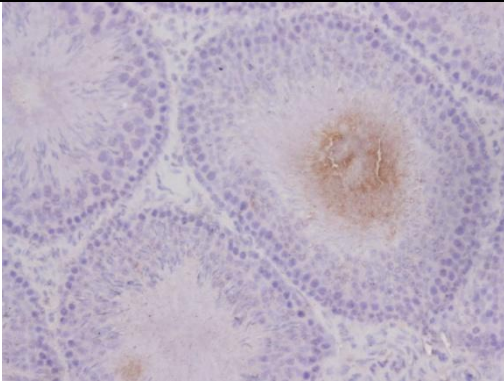
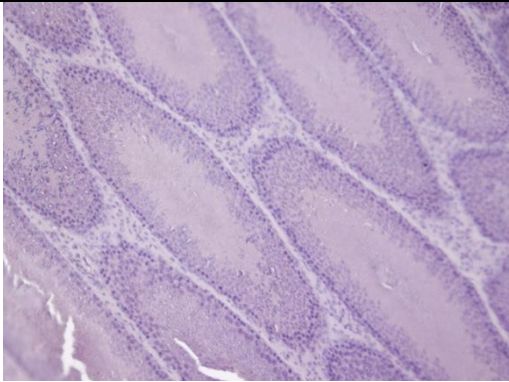
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.5.1. eNOS İmmünohistokimyasal Boyamasına Ait Bulgular

Gruplar stromal ve parankimal alanlar ile spermatogenik seri hücreler, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerindeki eNOS ekspresyon şiddetleri açısından değerlendirildi (Resim 34). H-skoru yapılarak sayısal hale getirilip istatistiği yapıldı (Tablo 12).

Kontrol Grubu, TL grubuna benzer şekilde bazal düzeyde eNOS ekspresyonunun olduğu görüldü. Torsiyon uygulaması ile azalan ekspresyonun **GL, MKH** ve **GL+MKH** gruplarında anlamlı bir şekilde yükselerek kontrol grubu düzeyine geldiği izlendi. Tüm gruplarda eNOS ekspresyonunun spermatositler ve primer spermatidlerde en fazla olduğu izlendi. Ayrıca interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde gruplar arasında artma ve azalmanın benzer olduğu saptandı (Resim 34).

TORSİYON TESTİSLERİNİN İHK GÖRÜNTÜLERİ (eNOS)

KR	TL
	
İ/R	İ/R + GL
	
İ/R + MKH	İ/R + GL + MKH
	

Resim 34:Deney gruplarına ait İHK görüntüleri (eNOS)

Tablo 12:Deney gruplarına ait eNOSH-skordeğerlerine istatistiği

Group	Points	Mean	Deviation	Mean
KR	8	65.540	22.320	7.891
TL	8	74.330	26.380	9.327
İR	8	225.36	35.640	12.601
İR+GL	8	112.36	24.360	8.613
İR+MKH	8	105.66	24.250	8.574
İR+GL+MKH	8	94.360	21.890	7.739

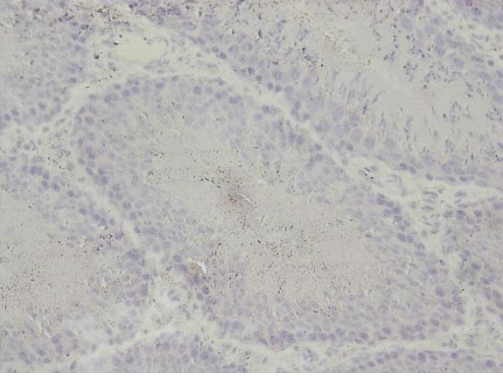
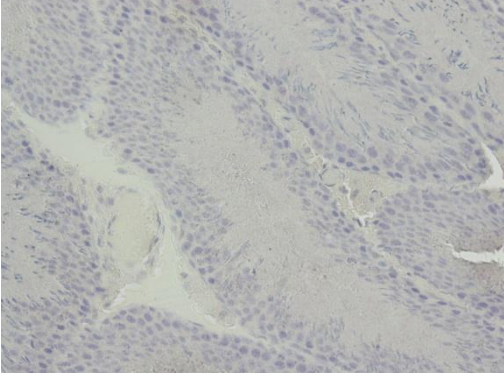
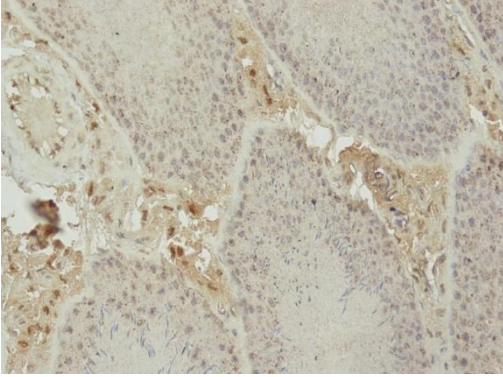
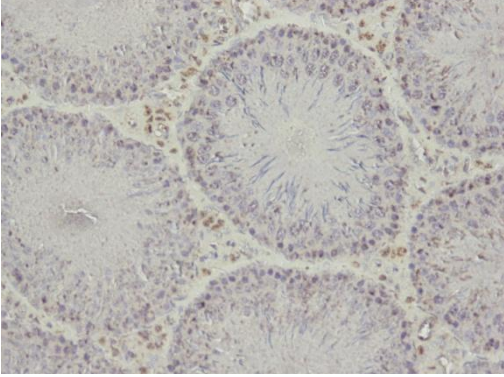
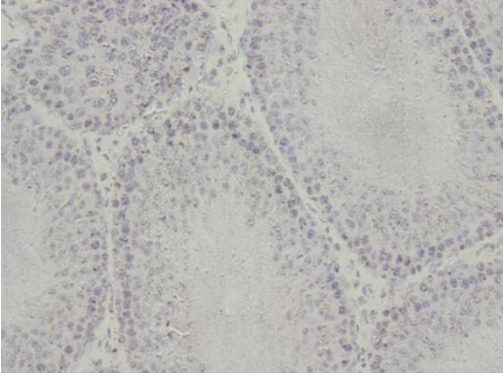
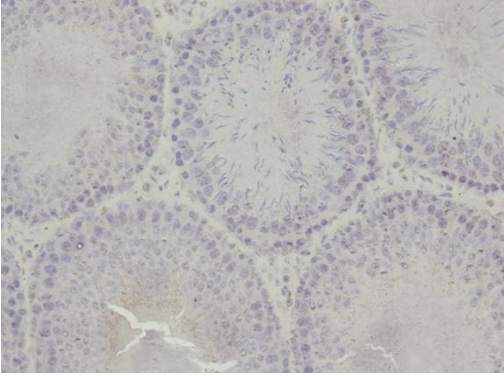
Comparison	Difference	q	P value
KR vs TL	-8.790	0.9482	ns P>0.05
KR vs İR	-159.82	17.240	*** P<0.001
KR vs İR+GL	-46.820	5.051	* P<0.05
KR vs İR+MKH	-40.120	4.328	* P<0.05
KR vs İR+GL+MKH	-28.820	3.109	ns P>0.05
TL vs İR	-151.03	16.292	*** P<0.001
TL vs İR+GL	-38.030	4.102	ns P>0.05
TL vs İR+MKH	-31.330	3.380	ns P>0.05
TL vs İR+GL+MKH	-20.030	2.161	ns P>0.05
İR vs İR+GL	113.00	12.190	*** P<0.001
İR vs İR+MKH	119.70	12.912	*** P<0.001
İR vs İR+GL+MKH	131.00	14.131	*** P<0.001
İR+GL vs İR+MKH	6.700	0.7227	ns P>0.05
İR+GL vs İR+GL+MKH	18.000	1.942	ns P>0.05
İR+MKH vs İR+GL+MKH	11.300	1.219	ns P>0.05

4.5.2. TUNEL Boyamasına Ait Bulgular

Torsiyona bağlı hücre ölümünün apoptoz ile gerçekleşen kısmını incelemek için TUNEL boyaması yapıp stromal ve parankimal alanlarda spermatogenik seri hücreler ve Leydig hücreleri değerlendirildi. Deney gruplarına ait apoptotik indeks değerleri (Tablo 13).

Kontrol grubu ile benzer şekilde **TL** grubunda az sayıda apoptotik hücre izlendi. Torsiyon ile oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir şekilde artan apoptotik hücre sayısı **TUNEL** pozitifliği ile gösterildi. **GL, MKH ve GL+MKH** uygulamalarında anlamlı ($p<0,05$) bir şekilde apoptotik hücre sayısının azaldığı saptandı (Resim 35).

TORSİYON TESTİSLERİNİN İHK GÖRÜNTÜLERİ (TUNEL)

KR	TL
	
İ/R	İ/R + GL
	
İ/R + MKH	İ/R + GL + MKH
	

Resim 35:Deney gruplarına ait İHK görüntüleri (TUNEL)

Tablo 13:Deney gruplarına ait **apoptotik indeks** değerlerine istatistiği

Group	Points	Mean	Deviation	Mean
KR	8	18.490	3.290	1.163
TL	8	17.720	4.040	1.428
İR	8	54.710	8.240	2.913
İR+GL	8	42.560	6.640	2.348
İR+MKH	8	37.700	7.290	2.577
İR+GL+MKH	8	29.190	5.050	1.785

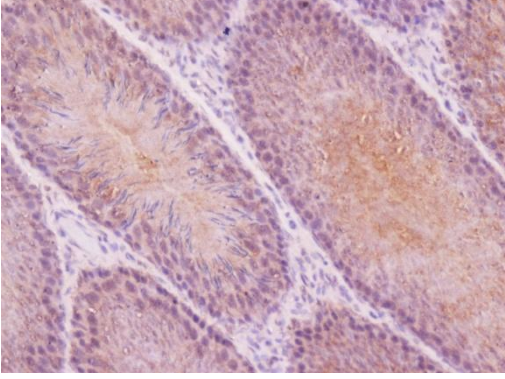
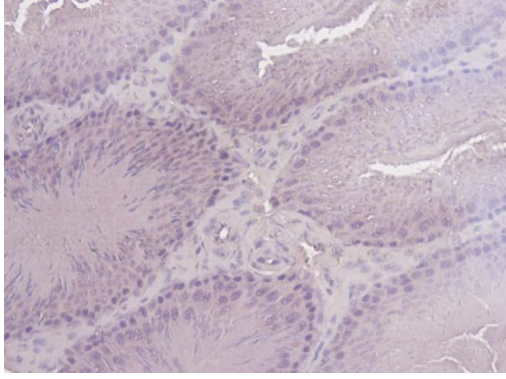
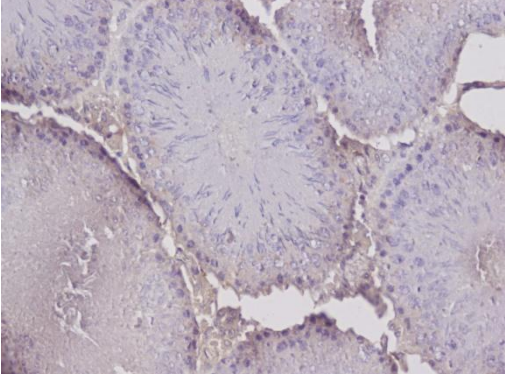
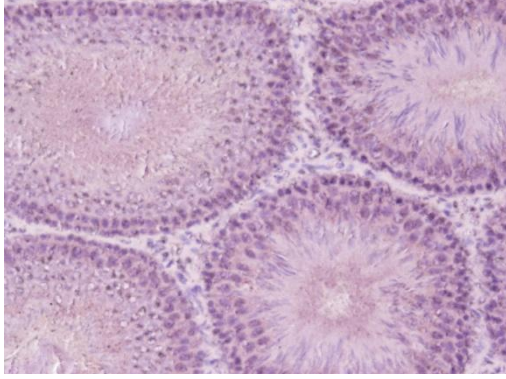
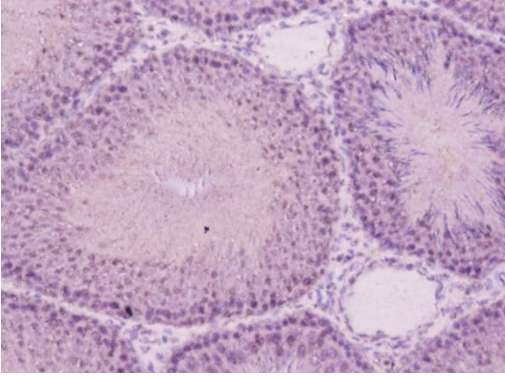
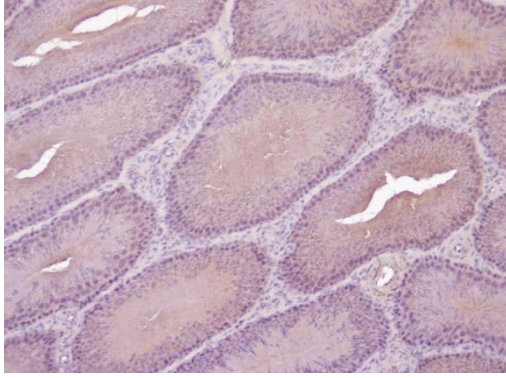
Comparison	Difference	q	P value
KR vs TL	0.7700	0.3615	ns P>0.05
KR vs İR	-36.220	17.004	*** P<0.001
KR vs İR+GL	-24.070	11.300	*** P<0.001
KR vs İR+MKH	-19.210	9.019	*** P<0.001
KR vs İR+GL+MKH	-10.700	5.023	* P<0.05
TL vs İR	-36.990	17.366	*** P<0.001
TL vs İR+GL	-24.840	11.662	*** P<0.001
TL vs İR+MKH	-19.980	9.380	*** P<0.001
TL vs İR+GL+MKH	-11.470	5.385	** P<0.01
İR vs İR+GL	12.150	5.704	** P<0.01
İR vs İR+MKH	17.010	7.986	*** P<0.001
İR vs İR+GL+MKH	25.520	11.981	*** P<0.001
İR+GL vs İR+MKH	4.860	2.282	ns P>0.05
İR+GL vs İR+GL+MKH	13.370	6.277	*** P<0.001
İR+MKH vs İR+GL+MKH	8.510	3.995	ns P>0.05

4.5.3. mTOR İmmünohistokimyasal Boyamasına Ait Bulgular

Gruplar stromal ve parankimal alanlar ile spermatogenik seri hücreler, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerindeki mTOR ekspresyon şiddetleri açısından değerlendirildi (Resim 36). H-skoru yapılarak sayısal hale getirilip istatistiği yapıldı (Tablo 14).

Kontrol Grubu,TL grubuna benzer şekilde bazal düzeyde **mTOR** ekspresyonunun olduğu görüldü. Torsiyon uygulaması ile azalan ekspresyonun **GL, MKH** ve **GL+MKH** gruplarında anlamlı bir şekilde yükselerek kontrol grubu düzeyine geldiği izlendi. Tüm gruplarda mTOR ekspresyonunun spermatositler ve primer spermatidlerde en fazla olduğu izlendi. Ayrıca interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde gruplar arasında artma ve azalmanın benzer olduğu saptandı(Resim 36).

TORSİYON TESTİSLERİNİN İHK GÖRÜNTÜLERİ (mTOR)

KR	TL
	
İ/R	İ/R + GL
	
İ/R + MKH	İ/R + GL + MKH
	

Resim 36:Deney gruplarına ait İHK görüntüleri (mTOR)

Tablo 14:Deney gruplarına ait **mTORH-skor** değerlerine istatistiği

Group	Points	Mean	Deviation	Mean
KR	8	228.49	23.290	8.234
TL	8	217.72	24.040	8.499
İR	8	114.72	18.240	6.449
İR+GL	8	242.56	16.640	5.883
İR+MKH	8	258.72	27.290	9.648
İR+GL+MKH	8	279.00	18.050	6.382

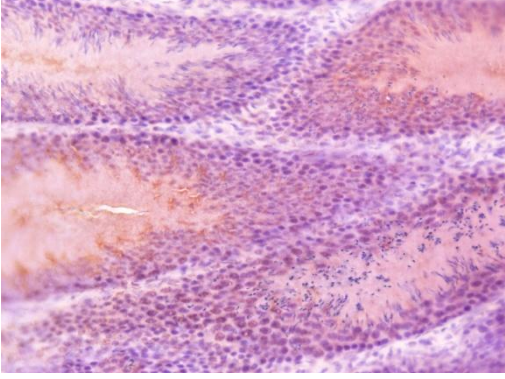
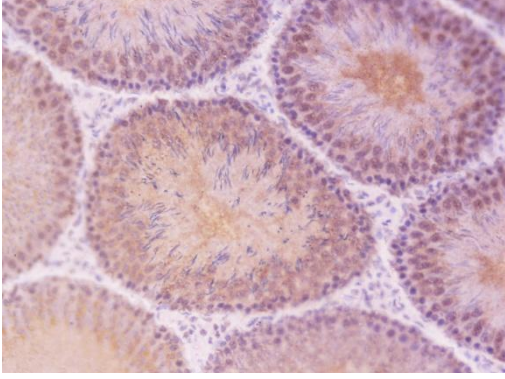
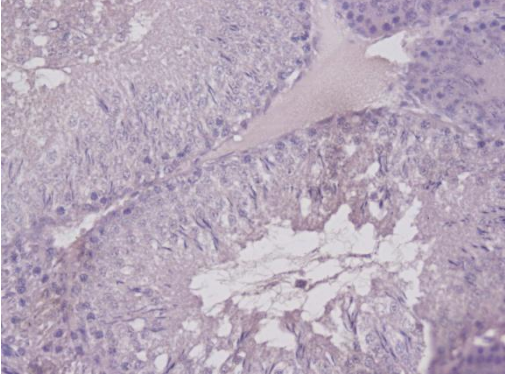
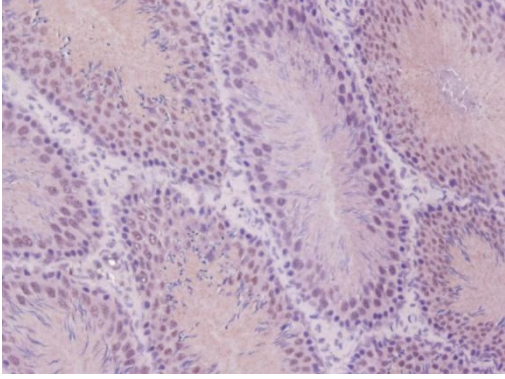
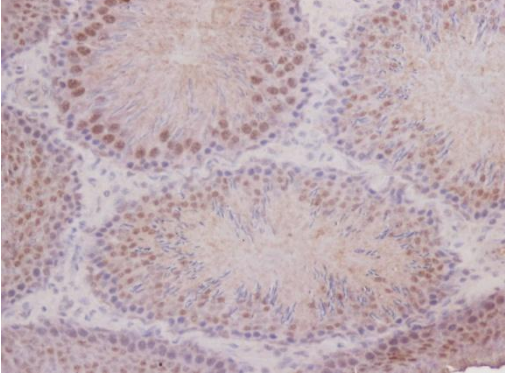
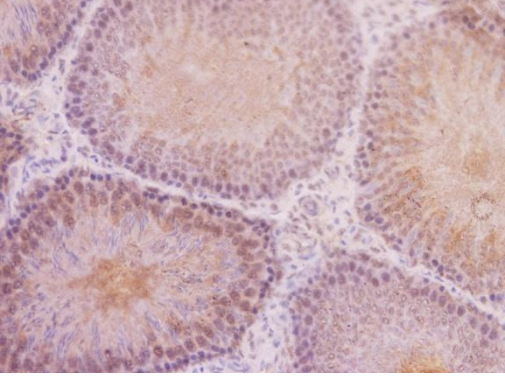
Comparison	Difference	q	P value
KR vs TL	10.770	1.410	ns P>0.05
KR vs İR	113.77	14.895	*** P<0.001
KR vs İR+GL	-14.070	1.842	ns P>0.05
KR vs İR+MKH	-30.230	3.958	ns P>0.05
KR vs İR+GL+MKH	-50.510	6.613	*** P<0.001
TL vs İR	103.00	13.485	*** P<0.001
TL vs İR+GL	-24.840	3.252	ns P>0.05
TL vs İR+MKH	-41.000	5.368	** P<0.01
TL vs İR+GL+MKH	-61.280	8.023	*** P<0.001
İR vs İR+GL	-127.84	16.737	*** P<0.001
İR vs İR+MKH	-144.00	18.852	*** P<0.001
İR vs İR+GL+MKH	-164.28	21.507	*** P<0.001
İR+GL vs İR+MKH	-16.160	2.116	ns P>0.05
İR+GL vs İR+GL+MKH	-36.440	4.771	* P<0.05
İR+MKH vs İR+GL+MKH	-20.280	2.655	ns P>0.05

4.5.4. Akt İmmünohistokimyasal Boyamasına Ait Bulgular

Gruplar stromal ve parankimal alanlar ile spermatogenik seri hücreler, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerindeki Akt ekspresyon şiddetleri açısından değerlendirildi (Resim 37). H-skoru yapılarak sayısal hale getirilip istatistiği yapıldı (Tablo 15).

Kontrol Grubu, TL grubuna benzer şekilde bazal düzeyde Akt ekspresyonunun olduğu görüldü. Torsiyon uygulaması ile azalan ekspresyonun **GL, MKH** ve **GL+MKH** gruplarında anlamlı bir şekilde yükselerek kontrol grubu düzeyine geldiği izlendi. Tüm gruplarda Akt ekspresyonunun spermatozoidler ve primer spermatoidlerde en fazla olduğu izlendi. Ayrıca interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde gruplar arasında artma ve azalmanın benzer olduğu saptandı (Resim 37).

TORSİYON TESTİSLERİNİN İHK GÖRÜNTÜLERİ (Akt)

KR	TL
	
İ/R	İ/R + GL
	
İ/R + MKH	İ/R + GL + MKH
	

Resim 37: Deney gruplarına ait İHK görüntüleri (Akt)

Tablo 15:Deney gruplarına ait **AktH-skor** değerlerive istatistiği

Group	Points	Mean	Deviation	Mean
KR	8	165.45	33.880	11.978
TL	8	178.64	36.420	12.876
İR	8	98.270	22.920	8.103
İR+GL	8	172.36	26.110	9.231
İR+MKH	8	168.33	27.150	9.599
İR+GL+MKH	8	225.25	21.170	7.485

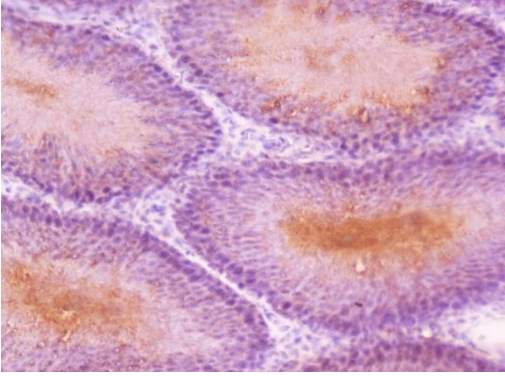
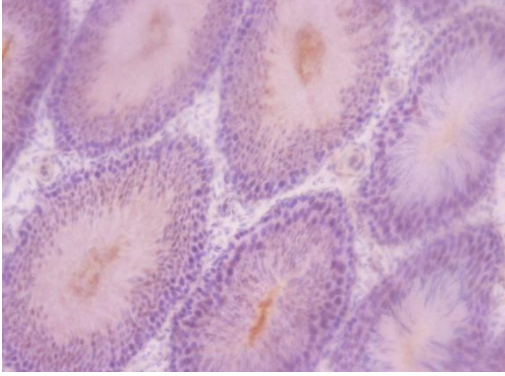
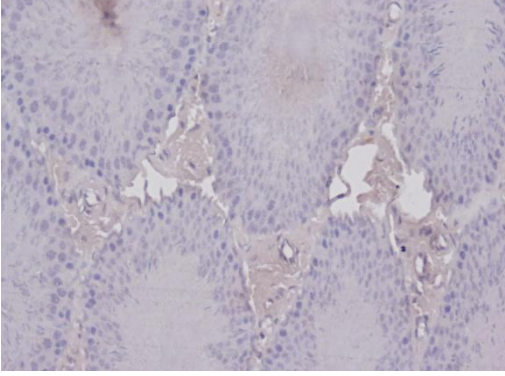
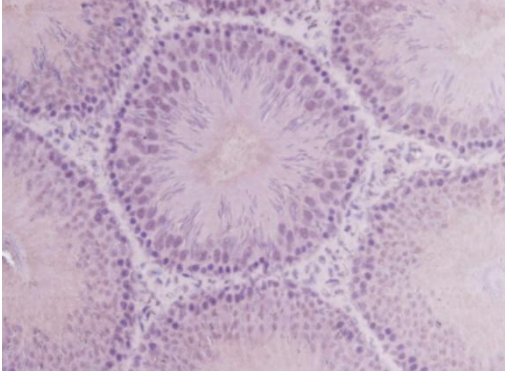
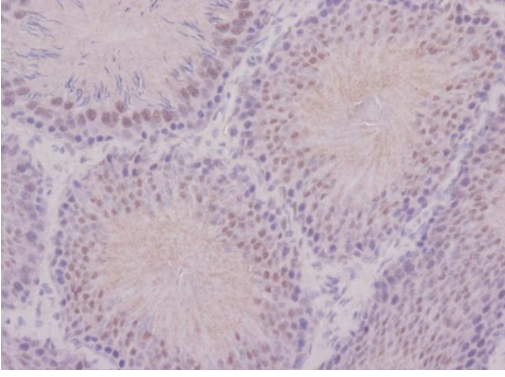
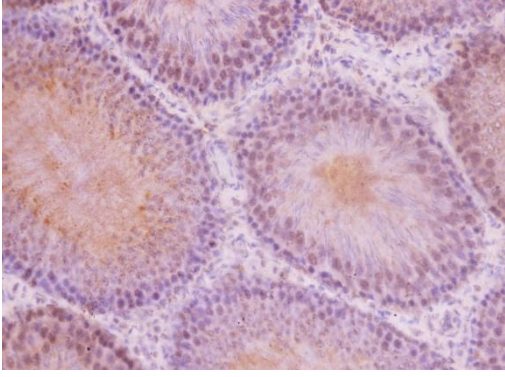
Comparison	Difference	q	P value
KR vs TL	-13.190	1.310	ns P>0.05
KR vs İR	67.180	6.672	*** P<0.001
KR vs İR+GL	-6.910	0.6863	ns P>0.05
KR vs İR+MKH	-2.880	0.2860	ns P>0.05
KR vs İR+GL+MKH	-59.800	5.939	** P<0.01
TL vs İR	80.370	7.982	*** P<0.001
TL vs İR+GL	6.280	0.6237	ns P>0.05
TL vs İR+MKH	10.310	1.024	ns P>0.05
TL vs İR+GL+MKH	-46.610	4.629	* P<0.05
İR vs İR+GL	-74.090	7.358	*** P<0.001
İR vs İR+MKH	-70.060	6.958	*** P<0.001
İR vs İR+GL+MKH	-126.98	12.611	*** P<0.001
İR+GL vs İR+MKH	4.030	0.4002	ns P>0.05
İR+GL vs İR+GL+MKH	-52.890	5.253	** P<0.01
İR+MKH vs İR+GL+MKH	-56.920	5.653	** P<0.01

4.5.5.PI3K İmmünohistokimyasal Boyamasına Ait Bulgular

Gruplar stromal ve parankimal alanlar ile spermatogenik seri hücreler, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerindeki PI3K ekspresyon şiddetleri açısından değerlendirildi (Resim 38). H-skoru yapılarak sayısal hale getirilip istatistiği yapıldı (Tablo 16).

Kontrol Grubu, TL grubuna benzer şekilde bazal düzeyde **PI3K** ekspresyonunun olduğu görüldü. Torsiyon uygulaması ile azalan ekspresyonun **GL, MKH** ve **GL+MKH** gruplarında anlamlı bir şekilde yükselerek kontrol grubu düzeyine geldiği izlendi. Tüm gruplarda PI3K ekspresyonun spermatoisitler ve primer spermatidlerde en fazla olduğu izlendi. Ayrıca interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde gruplar arasında artma ve azalmanın benzer olduğu saptandı (Resim 38).

TORSİYON TESTİSLERİNİN İHK GÖRÜNTÜLERİ (PI3K)

KR	TL
	
İ/R	İ/R + GL
	
İ/R + MKH	İ/R + GL + MKH
	

Resim 38: Deney gruplarına ait İHK görüntüleri (PI3K)

Tablo 16:Deney gruplarına ait **PI3KH**-skor değerlerine istatistiği

Group	Points	Mean	Deviation	Mean
KR	8	92.280	13.660	4.830
TL	8	88.320	14.260	5.042
İR	8	49.650	10.330	3.652
İR+GL	8	137.45	24.180	8.549
İR+MKH	8	142.75	22.440	7.934
İR+GL+MKH	8	172.36	25.450	8.998

Comparison	Difference	q	P value
KR vs TL	3.960	0.5806	ns P>0.05
KR vs İR	42.630	6.251	*** P<0.001
KR vs İR+GL	-45.170	6.623	*** P<0.001
KR vs İR+MKH	-50.470	7.400	*** P<0.001
KR vs İR+GL+MKH	-80.080	11.742	*** P<0.001
TL vs İR	38.670	5.670	** P<0.01
TL vs İR+GL	-49.130	7.204	*** P<0.001
TL vs İR+MKH	-54.430	7.981	*** P<0.001
TL vs İR+GL+MKH	-84.040	12.323	*** P<0.001
İR vs İR+GL	-87.800	12.874	*** P<0.001
İR vs İR+MKH	-93.100	13.651	*** P<0.001
İR vs İR+GL+MKH	-122.71	17.993	*** P<0.001
İR+GL vs İR+MKH	5.300	0.7771	ns P>0.05
İR+GL vs İR+GL+MKH	-34.910	5.119	** P<0.01
İR+MKH vs İR+GL+MKH	-29.610	4.342	* P<0.05

4.6. Biyokimyasal Bulgular

4.6.1. Kan Serum SOD Aktivitesine Ait Bulgular

Kan serum değerlerine bakıldığında **kontrol** ile karşılaştırıldığı zaman **taklit** grubunda anlamlı olmayan ($p>0,05$) bir artış saptanırken torsiyon grubunda oldukça anlamlı ($p<0,001$) düşüş buna karşılık **GL** ve **MKH** uygulamalarında anlamlı ($p<0,05$) ayrıca **GL+MKH** uygulanan grupta ise daha anlamlı ($p<0,001$) bir geri dönüş bulundu. Deney gruplarına ait kan serum **SOD** aktivitesinin belirlenmesi için yapılan ELISA testine ait veriler, Tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17:Deney gruplarına ait **SOD** aktivite değerlerine istatistiği

Group	Points	Mean	Deviation	Mean
KR	8	2.420	0.6600	0.2333
TL	8	2.240	0.4400	0.1556
İR	8	1.320	0.2200	0.07778
İR+GL	8	2.250	0.3600	0.1273
İR+MKH	8	2.180	0.3800	0.1344
İR+GL+MKH	8	2.550	0.4800	0.1697

Comparison	Difference	q	P value
KR vs TL	0.1800	1.147	ns $P>0.05$
KR vs İR	1.100	7.010	*** $P<0.001$
KR vs İR+GL	0.1700	1.083	ns $P>0.05$
KR vs İR+MKH	0.2400	1.529	ns $P>0.05$
KR vs İR+GL+MKH	-0.1300	0.8284	ns $P>0.05$
TL vs İR	0.9200	5.863	** $P<0.01$
TL vs İR+GL	-0.010000	0.06373	ns $P>0.05$
TL vs İR+MKH	0.06000	0.3824	ns $P>0.05$
TL vs İR+GL+MKH	-0.3100	1.975	ns $P>0.05$
İR vs İR+GL	-0.9300	5.926	** $P<0.01$
İR vs İR+MKH	-0.8600	5.480	** $P<0.01$

İR vs İR+GL+MKH	-1.230	7.838	*** P<0.001
İR+GL vs İR+MKH	0.07000	0.4461	ns P>0.05
İR+GL vs İR+GL+MKH	-0.3000	1.912	ns P>0.05
İR+MKH vs İR+GL+MKH	-0.3700	2.358	ns P>0.05

4.6.2. Kan Serum MDA Seviyesine Ait Bulgular

Kan serum değerlerine bakıldığında **kontrol** ile karşılaştırıldığı zaman **taklit** grubunda anlamlı olmayan ($p>0,05$) bir artış saptanırken torsiyon grubunda oldukça anlamlı ($p<0,001$) düşüş buna karşılık **GL** ve **MKH** uygulamalarında anlamlı ($p<0,05$) ayrıca **GL+MKH** uygulanan grupta ise daha anlamlı ($p<0,001$) bir geri dönüş bulundu. Deney gruplarına ait kan serum **MDA** aktivitesinin belirlenmesi için yapılan ELISA testine ait veriler, Tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 18:Deney gruplarına ait **MDA** aktivite değerlerine istatistiği

Group	Points	Mean	Deviation	Mean
KR	8	1.180	0.1800	0.06364
TL	8	1.260	0.2100	0.07425
İR	8	2.350	0.5300	0.1874
İR+GL	8	1.280	0.2200	0.07778
İR+MKH	8	1.340	0.1900	0.06718
İR+GL+MKH	8	1.220	0.1400	0.04950

Comparison	Difference	q	P value
KR vs TL	-0.08000	0.8159	ns P>0.05
KR vs İR	-1.170	11.932	*** P<0.001
KR vs İR+GL	-0.1000	1.020	ns P>0.05
KR vs İR+MKH	-0.1600	1.632	ns P>0.05
KR vs İR+GL+MKH	-0.04000	0.4079	ns P>0.05
TL vs İR	-1.090	11.116	*** P<0.001

TL vs İR+GL	-0.02000	0.2040	ns P>0.05
TL vs İR+MKH	-0.08000	0.8159	ns P>0.05
TL vs İR+GL+MKH	0.04000	0.4079	ns P>0.05
İR vs İR+GL	1.070	10.912	*** P<0.001
İR vs İR+MKH	1.010	10.300	*** P<0.001
İR vs İR+GL+MKH	1.130	11.524	*** P<0.001
İR+GL vs İR+MKH	-0.06000	0.6119	ns P>0.05
İR+GL vs İR+GL+MKH	0.06000	0.6119	ns P>0.05
İR+MKH vs İR+GL+MKH	0.1200	1.224	ns P>0.05

4.7. Spermatozoon Analizlerine Ait Bulgular

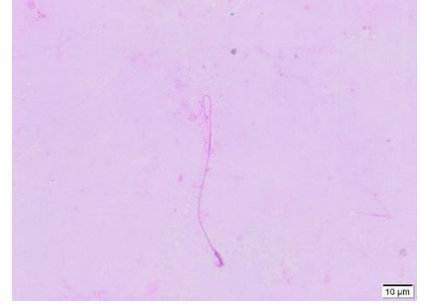
4.7.1. Spermatozoon Morfoloji Analizine Ait Bulgular

Torsiyona bağlı hasarda bozulan spermatozoon morfolojisinin **GL**, **MKH** ve **GL+MKH** uygulamaları ile düzelmesi etkisi Diff quick ve Giemsa boyası ile boyanan preparatlar her gruptan 250 spermatozoon sayılarak analiz edildi. **Kontrol** ile **TL** gruplarında normal morfoloji izlenirken torsiyona bağlı oldukça anlamlı morfolojik anomali, hareket bozukluğu ve canlılık azlığı saptandı (Tablo 19). Morfolojik anomali olarak baş, boyun ve kuyruk anomalileri izlendi. Uygulamaların anlamlı bir şekilde her 3 parametreyi geriletmediği görüldü (Resim 39).

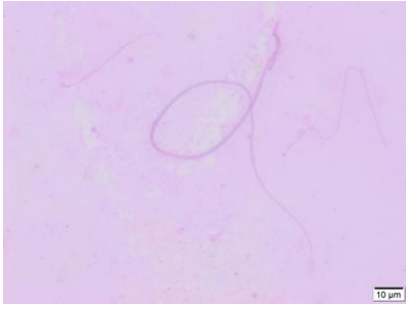
TESE İLE GÖRÜLEN MORFOLOJİK ANOMALİLER



NORMAL SPERM



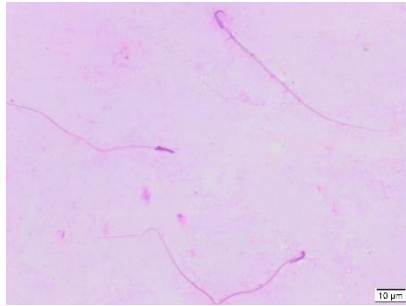
SAÇ TOKASI KUYRUK



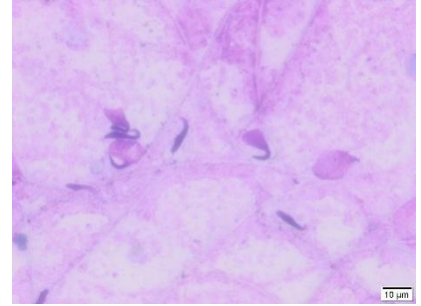
KIVRIK KUYRUK



BAŞTA VAKUOLİZASYON



ORTA PARÇADA AYRILMA



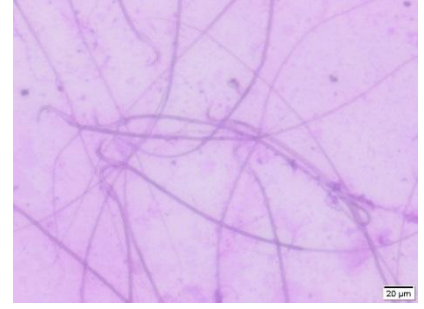
KUYRUKSUZ

Resim 39: TESE ile görülen morfolojik anomaliler

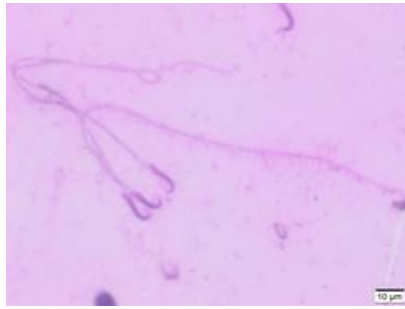
TESE İLE GRUPLARIN MORFOLOJİK GÖRÜNTÜLERİ



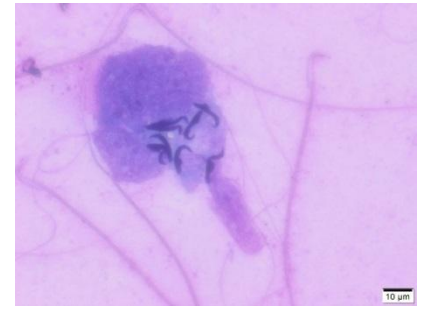
KR



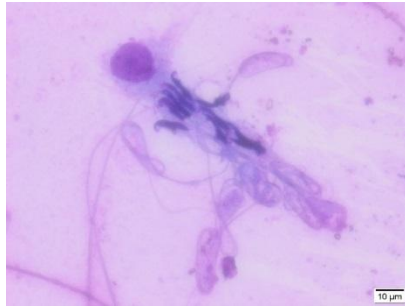
TL



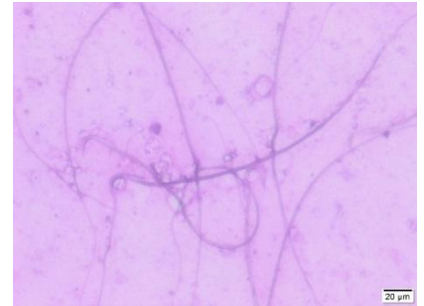
İ/R



İ/R + GL



İ/R + MKH



İ/R + GL + MKH

Resim 40: TESE ile grupların morfolojik görüntüleri

Tablo 19:Deney gruplarına ait Spermatozoon **MORFOLOJİK ANOMALİ** analizine ait bulgu değerleri ve istatistiği

Group	Points	Mean	Deviation	Mean
KR	8	81.420	9.360	3.309
TL	8	83.720	9.880	3.493
İR	8	117.44	16.440	5.812
İR+GL	8	86.560	8.780	3.104
İR+MKH	8	82.650	8.660	3.062
İR+GL+MKH	8	102.99	10.250	3.624

Comparison	Difference	q	P value
KR vs TL	-2.300	0.5969	ns P>0.05
KR vs İR	-36.020	9.348	*** P<0.001
KR vs İR+GL	-5.140	1.334	ns P>0.05
KR vs İR+MKH	-1.230	0.3192	ns P>0.05
KR vs İR+GL+MKH	-21.570	5.598	** P<0.01
TL vs İR	-33.720	8.751	*** P<0.001
TL vs İR+GL	-2.840	0.7371	ns P>0.05
TL vs İR+MKH	1.070	0.2777	ns P>0.05
TL vs İR+GL+MKH	-19.270	5.001	* P<0.05
İR vs İR+GL	30.880	8.014	*** P<0.001
İR vs İR+MKH	34.790	9.029	*** P<0.001
İR vs İR+GL+MKH	14.450	3.750	ns P>0.05
İR+GL vs İR+MKH	3.910	1.015	ns P>0.05
İR+GL vs İR+GL+MKH	-16.430	4.264	* P<0.05
İR+MKH vs İR+GL+MKH	-20.340	5.279	** P<0.01

4.7.2. Spermatozoon Sayı Analizine Ait Bulgular

Torsiyona bağlı hasarda **KR** ve **TL** ile karşılaştırıldığında azalan spermatozoon sayısının **GL**, **MKH** ve **GL+MKH** uygulamaları ile düzelmesi etkisi Diff quick ve Giemsa boyası ile boyanan preparatlar her gruptan 250 spermatozoon sayılarak korunduğusaptandı (Tablo 20).

Tablo 20: Deney gruplarına ait Spermatozoon **SAYI** analizine ait bulgu değerleri ve istatistiği

Group	Points	Mean	Deviation	Mean
KR	8	25.660	2.350	0.8309
TL	8	24.480	2.780	0.9829
İR	8	12.660	1.650	0.5834
İR+GL	8	19.660	2.670	0.9440
İR+MKH	8	17.250	2.760	0.9758
İR+GL+MKH	8	22.330	2.880	1.018

Comparison	Difference	q	P value
KR vs TL	1.180	1.309	ns P>0.05
KR vs İR	13.000	14.420	*** P<0.001
KR vs İR+GL	6.000	6.655	*** P<0.001
KR vs İR+MKH	8.410	9.328	*** P<0.001
KR vs İR+GL+MKH	3.330	3.694	ns P>0.05
TL vs İR	11.820	13.111	*** P<0.001
TL vs İR+GL	4.820	5.346	** P<0.01
TL vs İR+MKH	7.230	8.019	*** P<0.001
TL vs İR+GL+MKH	2.150	2.385	ns P>0.05
İR vs İR+GL	-7.000	7.764	*** P<0.001
İR vs İR+MKH	-4.590	5.091	* P<0.05
İR vs İR+GL+MKH	-9.670	10.726	*** P<0.001
İR+GL vs İR+MKH	2.410	2.673	ns P>0.05
İR+GL vs İR+GL+MKH	-2.670	2.962	ns P>0.05
İR+MKH vs İR+GL+MKH	-5.080	5.635	** P<0.01

4.7.3. Spermatozoon Hareket Analizine Ait Bulgular

Torsiyona bağılı hasarda **KR** ve **TL** ile karşılaştırıldığında azalan spermatozoon hareketinin **GL**, **MKH** ve **GL+MKH** uygulamaları ile düzelmesi etkisi Diff quick ve Giemsa boyası ile boyanan preparatlar her gruptan 10 değişik alanda spermatozoon hareketinin skorlanması ile korunduğu saptandı (Tablo 21).

Tablo 21:Deney gruplarına ait Spermatozoon **HAREKET** analizine ait bulgu değerlerive istatistiği

Group	Points	Mean	Deviation	Mean
KR	8	81.420	11.220	3.967
TL	8	83.720	14.350	5.073
İR	8	42.560	8.560	3.026
İR+GL	8	67.250	9.650	3.412
İR+MKH	8	59.360	6.890	2.436
İR+GL+MKH	8	74.360	7.360	2.602

Comparison	Difference	q	P value
KR vs TL	-2.300	0.6506	ns P>0.05
KR vs İR	38.860	10.993	*** P<0.001
KR vs İR+GL	14.170	4.008	ns P>0.05
KR vs İR+MKH	22.060	6.240	*** P<0.001
KR vs İR+GL+MKH	7.060	1.997	ns P>0.05
TL vs İR	41.160	11.643	*** P<0.001
TL vs İR+GL	16.470	4.659	* P<0.05
TL vs İR+MKH	24.360	6.891	*** P<0.001
TL vs İR+GL+MKH	9.360	2.648	ns P>0.05
İR vs İR+GL	-24.690	6.984	*** P<0.001
İR vs İR+MKH	-16.800	4.752	* P<0.05
İR vs İR+GL+MKH	-31.800	8.996	*** P<0.001
İR+GL vs İR+MKH	7.890	2.232	ns P>0.05
İR+GL vs İR+GL+MKH	-7.110	2.011	ns P>0.05
İR+MKH vs İR+GL+MKH	-15.000	4.243	* P<0.05

5. TARTIŞMA

Günümüzün moderleşen döneminde erkek infertilitesi giderek artan bir sorun olup maalesef gelişen teknoloji sorunu çözmek için yeterli olmamaktadır. Klasik ve rutin tedaviler belirli oranda başarı elde etseler de infertilite hala çözülememiş bir sorun olarak durmaktadır. Tıbbi şifalı bitki uygulamaları kullanılan tedavilere tamamlayıcı olarak eklendiklerinde birçok farklı hastalıkta önemli katkılar sağlamaktadır. GL, tarihi bir tıbbi şifalı bitki ekstraktı olup son zamanlarda geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Literatür incelemesinde erkek infertilitesi için kanıta dayalı tıp açısından çok az sayıda yayın bulunmaktadır. Benzer şekilde MKH, faz çalışmalarını geçmiş özellikle dermatoloji, plastik cerrahi, ortopedi ve göğüs kalp damar cerrahisinde bir ürün olarak tedavide kullanılmaktadır. GL ile MKH etkileşiminin ve bunların deneysel torsiyon modelinde tedavi edici etkileri bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda erişkin sıçan testisinde 2 saatlik torsiyon ve 4 saatlik reperfüzyon modelinde torsiyonun son yarım saatinde uygulamalar yapılarak klinik durum taklit edildi. Veriler doğrultusunda torsiyona bağlı iskemik reperfüzyon hasarında uygulamaların anlamlı bir şekilde hasarı geriletmediği ve hücreleri koruduğu görüldü. Birlikte kullanımlarının ise çok daha anlamlı ve olumlu katkı sağladığı bulundu. Özellikle germ hücrelerinin korunmasında bu katkının önemi saptandı. Uygulamaların antioksidan etki ile apoptozu geriletmediği ve bu etkinin mTOR/Akt/PI3K sinyal yolağının aktive edilmesi ile ilişkili olduğu gösterildi.

GL, Çin bitkisel tıbbının hazineleri arasındadır. Çinde yapılan farmasötik araştırmalar ve klinik araştırmalarla, GL nin belirli rahatsızlık türlerini önlemeye yardımcı olduğu ve kısmen bir antioksidan olarak insan hayatını uzatmaya yardımcı olduğu gösterilmiştir. İçerdiği polisakkaridler, triterpenler ve az miktarda amino asit ve vitamin insan vücudunda fizyolojik bir denge sağlamak için gerekli temel bileşenlerdendir. GL toksisitesi olmayan, diyet takviyesi olarak kullanılabilen güvenli bir bitki olarak onaylamıştır (96, 97). GL güçlü antioksidan özellikler göstermektedir. Eksojen antioksidanlardan olan GL, İ/R hasarında diğer dokularda oksidatif stresin sonuçlarını önlemek için kullanılmıştır. GL polisakkaritleri İ/R hasarına maruz bırakılan nöron, kalp, böbrek ve mesane gibi birçok hücrede

apoptozu inhibe ettiği ve önemli protektif etkilere sahip olduğu görülmüştür. GL tarihi bir bitki ekstraktı olup günümüzde kullanımı giderek artan bir üründür. GL için ana etkenleri olan terpanoidler, sakkaritler ve proteinlerinin plazma membran reseptörleri gibi kanser sinyal faktörlerinde hedef olan yapıları bilinmektedir. Sinyal yolağı olarak IGFR, VEGFR ve EGFR ile etkileştiği ve apoptoz için NF-κB, RAS-MAPK, PI3K/Akt/mTOR hedefleri ile etkileştiği gösterilmiştir. Bu ürünün kanıta dayalı tıpta birçok hastalıkta tamamlayıcı olarak gösterilmesine rağmen erkek infertilitesindeki yeri henüz bilinmemektedir (98). Önceki bir çalışmada GL meyvelerinden distile su ile elde edilmiş ekstrakt 10 gün boyunca 600mg/kg uygulanmış uygulanan doz ve süreden bağımsız olarak sıçan ovaryum, uterus ve tubasında histolojik veya biyokimyasal bir hasar görülmemiştir. Buna karşılık CCL4 ile oluşturulan karaciğer fibrozunda GL ekstraktının MDA ve hidroksiprolil üzerinden karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir. C vit ile oluşan antioksidan etkinin yaklaşık 100 kat fazlasını yaptığı gösterilmiştir. Diyabet ve kolesterol problemlerinde de etkili olduğu saptanmıştır. GL için uzun uygulama sonrası vücut ağırlığının anlamlı bir şekilde düştüğü görülmüştür. Bir başka çalışmada GL monokaryonlarının çalışıldığı bir başka çalışmada karaciğer ve böbrek dokusu incelendiğinde MDA ve p53 düzeylerini değiştirerek antioksidan ve antiapoptotik etki gösterdiği farelerde western blot ile saptanmıştır. MCF-7 meme kanseri hücre kültüründe GL ekstraktı 100µg/ml kullanıldığı miRNA profilini değiştirip telomerez aktivitesini düşürdüğü saptanmıştır. Bir başka çalışmada diyabet oluşturulmuş sıçanlarda 60-180 mg/kg GL ekstraktı ile açlık kan şekerlerinin ve lipit profilinin değişmediği ancak karaciğer ve pankreas dokularında total oksidan seviyelerinin anlamlı bir şekilde düşürüldüğü görülmüş ve histolojik olarak desteklenmiştir (99).

Bilomisin ile akciğer fibrozu oluşturulmuş sıçanlarda GL koruyucu rolü için yapılan bir çalışmada 28 gün boyunca 100-300 mg/kg GL uygulamasının fibrozis sonucu oluşan infalamatuar hücre infiltrasyonunun ve kollajen birikimini azalttığı ayrıca artmış Gpx, katalaz ve SOD ile azalan MDA ile hidroksiprolinin sağladığı gösterilmiştir (100, 101). DBMA ile indüklenmiş meme ve deri karsinomlarında ve ayrıca mcf-7 hücrelerindeki apoptozda GL nin apoptozu arttırdığı siklin D1, bcl-2, bcl-x azalması ve bax ile kaspaz 9 un artması ile gösterilmiştir. Sıçanlarda kafa travması çalışılan başka bir çalışmada ise 20 ml/kg gastrik yolla verilen günlük GL

için oksidatif stresi azaltarak hasarı engellediği gösterilmiştir. Hasarın azaltılmasında inflamasyonun ve ödemin engellenmesi nöron ve gliyaların dejenerasyonunun azaltılması ve VEGF üzerinden damarlanmanın artırılmasının önemli olduğu saptanmıştır (102).

Tavukta kadmiyum ile indüklenmiş testis hasarında 20 mg/ml GL uygulamasının testiste kadmiyum birikimini engellediği IL-1 β , IL-6 ve TNF- α miktarını azalttığı SOD ve GSH'ı artırırken MDA'ı azalttığı Bax, Kaspaz-3 Ve Bcl2 yi düşürerek apoptozu engellediği gösterilmiştir (103).

KH; kendilerini yenileyebilme, sınırsız çoğalabilme, kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme, hasarlı dokuya verildiğinde hasarlı yapıyı onarabilme özellikleri ile tanımlanan hücre tipidir. KH bol miktarda bulunmaları, kolay elde edilebilmeleri, birçok hücre tipine farklılaşarak çoğalabilmeleri, alıcılara güvenli ve etkin bir şekilde nakledilebilmeleri nedeniyle rejeneratif tıp uygulamalarında tercih edilmektedir. MKH transplantasyonunun böbrek, kalp, barsak ve akciğer gibi dokulara uygulanmasıyla İ/R durumlarında antiinflamatuvar, antioksidan, ve antiapoptotik etkiye bağlı olarak doku hasarlarının azaldığı gösterilmiştir. TNF alfa, interferon gama, interlökin ve immün hücreler üzerinden İ/R testis hasarında etkili olabilmektedir. Testis dokusunda hasar sonrası KH kullanılması oksidatif stress ve apoptozu azaltarak germ hücrelerini korumakta ayrıca sertoli ve leydig hücrelerinde benzer etki ve olumlu katkı sağlayarak daha da önemli bir fonksiyon sağlamaktadır. MKH farklılaşmamış hücre grubu olup kanıta dayalı tıpta faz çalışmalarını geçip özellikle dermatoloji, plastik cerrahi ve ortopedi olmak üzere tıbbın her alanında giderek artan bir şekilde hücresel tedavi ürünü olarak kullanılmaktadır. MKH için uluslar arası standart olarak CD73, 90 ve 105 i eksprese etmesi ancak CD11b, 14, 19, 34, 45 ve 79a yi eksprese etmemesi istenmektedir. Kİ kökenli germ hücrelerinin busülfan uygulanmış fare testislerinde 1 yıl boyunca kalabildikleri primodial germ hücreleri ile spermatogoniaların belirteçlerini eksprese ettikleri saptanmıştır (monsefi m ve ark 2013). Bir çalışmada 720⁰ ve 3 saatlik torsiyon sonrası son yarım saatte uygulanan 3x10⁴ MKH uygulaması 7 günlük reperfüzyon sonrasında Johnsen skorlamasında 10 yerine 7 değerine ulaşan bir İ/R hasarı ile tedavi sonrasında 8,5 değerini bulan bir düzelmeye görülmüştür. MDA için serumda TT ile ½ katı artma ve MKH ile 1/3 lük gerileme saptanmıştır. Dokudaki MDA için de aynısı bulunmuştur.

Hasara bağı azalan testosteron, artan LH ve FSH düzeylerinin MKH uygulaması ile anlamlı bir şekilde geriletildiği gösterilmiştir. Transplante edilen hücrelerin çoğunun leydig hücre etrafında yerleştiği ve kök hücre faktörleri salgılayıp spermatogenez düzelttiği gözlenmiştir. Erkek infertilitesinde Johnsen skorlamasının 10 ile normal olduğu, 9 ile çoğalan geç spermatidler hafifçe bozulan epitelyum, 8 ile tübül başına 5 spermatazoa ve geç spermatid olduğu gösterilmiştir. TT ile beklenen 6 ve aşağısındaki rakamlar olup tedavi etkinliğinin 8 in üzerine çıkması etkinliği yorumlanmıştır. Araştırmacılar TNF α , IFN γ , interlökinler ve immun sistem belirteçlerinin değişmemesinin MKH için bu hasarda antiinflamatuvar etkinin olmaması şeklinde yorumlamışlardır. Önceki çalışmalarda Kİ kökenli MKH için leydig hücreye farklılaşma gösterilmiştir. Çalışmada VASA+ hücrelerin bulunmaması MKH için olgun sperme farklılaşmadığını bununyerine fare spermatazoalarının farklılaştığı düşünülmüştür. Kök hücre faktörü (KHF, SCF) bir kit ligand olup sitokin gibi davranarak c-kit reseptörlerini bağlar. C-kit primordial germ hücre, spermatogonia ve primordial oositlerde KHF üzerinden sinyal göndererek hücrelerin devamlılığını sağlamaktadır. Bu KHF için germ hücrelerinin apoptozini engellediği saptanmıştır. Klinik yansıması olarak authorler çalışmanın üroloji acillerinde detorsiyone edilen testislerde yarım saat öncesi yapılacak MKH injeksiyonun anlamlı etkiler oluşturabileceği düşüncesine varmışlardır (104).

MKH etkisinin overdeki torsiyon uygulaması için yapılan bir çalışmada 1×10^6 MKH 2 saatlik torsiyon sonunda ovaryumlara enjekte edildiğinde medulla bölgesinde olan şiddetli hemorajin, primordial folikül sayısında azalmanın ve atriyal folikül sayısında artmanın yanı sıra apoptotik indekste ve MDA miktarında artış gibi bulguları tersine çevrildiği saptanmıştır. Bu anlamda en az bilinen etkisi üreme sisteminde olup erkek infertilitesi açısından daha da az bilgi bulunmaktadır. Yapılan bir sıçan deneyinde MKH transplantasyonu yapılarak steril testislerde etkisi incelenmiştir. Busülfan ile endojen spermatogenezin durdurulduğu testislerde BrDU ile işaretlenmiş hücreler testise transplante edildiğinde 25 spermatogonia 55 spermatozoid ve 5×10^6 spermatozoanın bulunduğu bir testis elde edilmiştir. Kontrol grubundaki 33 spermatogonia 64 spermatozoid ve 10×10^6 spermatozoanın sayıları ile karşılaştırıldığında MKH için oldukça anlamlı bir etkinin bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca spermatogenez üzerindeki etkisi çok daha etkili olup 32 sayısını 63e

çıkartmıştır. İşaretlenmiş hücrelerin spermatogonia ve spermatozoaya farkedildiği hem seminifer tübüller içerisinde hem de interstisyel hücreler arasında buldukları gösterilmiştir. Bir başka çalışmada 720⁰ ve 24 saatlik torsiyon uygulanan grupta 2x10⁶ MKH 0,5 ml insülin enjektörü ile testis içine enjekte edilerek 0 ile 3 arasında Johnsen skoru olarak oluşan hasar az miktarda düzelmeye göstermiştir. 2 saatlik torsiyonu takiben spermatogonial kök hücrelerin transplante edildiği farelerde 8 hafta sonrasında epididim sperm profilinin, Johnsen skorunun, pLzf, GFRA-1, SCF-1 ve TEKT ekspresyonlarının bozulan hasarlı testislerde geri döndürüldüğü saptanmıştır (105, 106). Benzer şekilde KI kökenli endotelial progenitor kök hücreler transplante edildiğinde de seminifer tübül epitelinin ve apoptotik hücrelerin düzeldiği gösterilmiştir (107).

Trombosit zengin plazmanın 4 saatlik torsiyon sonrası intraparankimal olarak 10 ul içerisinde 2 milyon hücre olarak uygulandığında 4 hafta sonrasında artan MDA ve kaspaz-3 aktivitesinin ve azalan SOD düzeyinin ve TGF- β nın düzelmesini sağladığı nötrofil infiltrasyonunu baskılanması ile oksidatif stresi azaltması etkili olarak görüldü (109).

Torsiyon hasarında literatürdeki verilere paralel şekilde, spermatogenik seri hücrelerde kayıp, hücreler arasında ayrışma, seminifer tübüllerde atrofi bazı tübüllerde hücre dökülme, seminifer tübül çaplarında daralma, bozulan tübüller ve dejenerasyon tübüllerin bazal membranlarında yırtılmalar gibi patolojik değişiklikler bulundu. Ayrıca ödem, mevcut kapiller damarlarda dolgunluk ve hiperemi, hasarlı tübüllerin çevresindeki interstisyel alanlarda ise Leydig hücrelerinde kayıp gözlemlendi. Uygulamaların torsiyonda görülen iskemik reperfüzyona bağlı tüm bu patolojik değişikliklerin gerilemesini sağlayarak testiküler hasarın düzelttiği görüldü (84, 85).

Torsiyon hasarında oksidatif stresin önemli parametrelerden biri olduğu gösterilmiştir. Başlangıçta venöz kan akışının ve sonunda arteriyel kan akımının bozulmasına bağlı oluşan torsiyon hasarı oksidatif stresin olduğu bir iskemik reperfüzyon hasarını gerçekleştirir. Oluşan reaktif oksijen ürünleri, proinflatuar sitokinler, nötrofil invazyonu, lipid peroksidasyonu, hipoksi ve anoksi ile apoptoz testiste infertilite riski oluşturacak kadar önemli zarar verir. Torsiyon olmayan testiste de mekanizması tam olarak anlaşılmamış şekilde hücre hasarı olduğu düşünülmektedir (84, 85, 110).

Oksidatif strese bağlı oluşan hasarın sonucu testis hücresinin apoptoza gitmeleridir. Bu süreçte stokrom c, APAF ve kaspaz gibi moleküllerin rol oynadığı karmaşık mekanizmalar yer alır. Sperme bağlı DNA hasarında TUNEL ve sperm kromatin yapı yöntemi kullanılabilen iki tekniktir. TUNEL ile tek ve çift sarmallı DNA fragmentasyonu serbest 3-HO gruplarının ölçülmesi ile gerçekleştirilir. Oksidatif strese bağlı apoptoz için de infertil erkeklerde kullanılan referans bir yöntemdir (111). ROS ile oluşan hasar erkek üreme sisteminde steroyodogenezis, morfolojik yapı ve epididimde sperm sayısının azalması ile görülen bir durumdur. Yapılan SEM analizlerinde artmış ROS miktarı infertilite ile ilişkilendirilmiştir (112).

Varikozel ile oluşturulmuş iskemik testiste sıçan spermatogenezini ve apoptozu incelendiği bir çalışmada HSP-70 artışının spermatogenezinin apoptoz ile ilişkili bir belirteç olduğu düşünölmüştür. İskemik testiste Bcl-2 ile ilgili x proteini B hücreli lenfoma (bax/bcl-2) oranının anlamlı bir şekilde azaldığı kaspaz 9, sitokrom-c ve kaspaz 3 ün intrinsek sinyal transdüksiyon yolağı ile azaldığı gösterilmiştir. Quercetin uygulamasının varikozeloktemiye bağlı koruyucu etkiyi bozduğu saptanmıştır (113). Varikozel oluşturulmuş sıçan örneklerinin otofoji için çalışıldığı bir diğer araştırmada HIF-1alfa/bcl-2 ile etkileşen protein (BNIP3)/(beclin-1) otofaji sinyal yolağında varikozel için TUNEL ile saptanmış apoptotik indeksin anlamlı bir şekilde arttığı HIF-1alfanın giderek arttığı bcl-2 nin azaldığı görölmüştür. BNIP3, beclin1 ve mikrotüböl ilişkili protein hafif zincir 3alfa (LC3), II-LC3-I ekspresyonunun arttığı görölmüştür. Bu oranın 30.güne kadar da korunduğu izlenmiştir. Ayrıca P62 boyamalarını 15. güne kadar arttığı ve 45. güne kadar da azaldığı izlenmiştir. Varikozelde oluşan hipoksinin HIF-1alfa/BNIP3/belcin-1 sinyal yolağı üzerinden otofajiyi arttırdığı sonucuna varılmıştır (114). Varikozele bağlı hipokside ROS, apoptoz ve proinflamatuvar sitokinlerin çalışıldığı bir başka çalışmada ise resveratrol (RES) antioksidan uygulamasının kaspaz-1, bax ve bcl-2 üzerinden infalamasyonu, oksidasyonu ve apoptozu engellediği saptanmıştır. Ferulik asit ile 2 saatlik torsiyonu takip eden 2 saatlik reperfüzyonda bazal membran undilasyonu ve incilmesi, germ epitelyum dejenerasyonu ve interstisyel alanda kan hücrelerinin göröldüğü ayrıca TUNEL, aktif kaspaz-3 ve İNOS üzerinden hasar oluştuğu SOD, Gpx, GSH ve MDA ile oksidatif stres ve apoptozun azaldığı

gösterilmiştir. Benzer şekilde L-karnitin uygulamasının da oksidatif stres ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir. Gingko globanın 3 saatlik torsiyonu takip eden 2 saatlik reperfüzyonda oluşan hasara apoptotik indeksin azaldığı azalın leydig hücreleri ve artan sperm anomalilerinin geriye döndürüldüğü bulunmuştur (115).

Kadmiyum ile hasara uğratılmış testislerde KİMKH ile tedavi amaçlı yapılan bir çalışmada mitokondriyal apoptozun haftada 5 kere 5 hafta boyunca uygulanan i.p. MKH için sıçanlarda kilo artışı sağlanmış ve apoptoz ile ilişkili proteinlerde bcl-2, bax, sitokrom-c, kaspaz-3, aktif kaspaz-3 ve AIF artarken bcl-2 nin azaldığı görülmüştür (116).

Diyabetik erkek infertilitesi için yapılan sıçan çalışmasında 60 mg/kg STZ uygulamasının 15 ve 30. günler için etkilerine bakıldığında johnsen skorlaması ile anlamlı bir hasarın olduğu semifer tübül çaplarının azaldığı fosfo-c-jun en-terminal kinaz (JNK) İHK ile boyamada artış saptanmış benzer şekilde IL-6 da artış ve JNK inhibisyonu ile bu tabloların geri döndürüldüğü saptanmıştır. Bir başka çalışmada STZ ile diyabet oluşturulmuş farelerde sperm toplaması yapılarak İVF amaçlı kullanılmıştır. Diyabetik grupta anormal sperm sayısının, hareketinin ve canlılığının çok daha fazla olduğu ve embriyo kalitesi ile canlı doğum yeteneklerinin kontrol ile karşılaştırıldığında düşük olduğu gösterilmiştir (117).

Sinyal yolağı olarak mTOR, birçok kritik hücre fonksiyonunu koordine eden ve serin treonin kinaz ailesinden PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının bir parçası olan temel kinaz enzimlerinden biridir. mTOR hücre büyümesi, hücre proliferasyonu, proteinlerin sentezi ve transkripsiyonunu, anjiyogenezi, apoptozu ve otofajiyi etkilemektedir. Yapılan çalışmalar, PI3K/AKT sinyalleşmesinin doğrudan veya dolaylı olarak mTOR yoluyla fosforilatlanmasıyla hücre apoptozunu engellediğini belgelemektedir. GL için apoptozu yol açan NF-κB, sitokrom c, ERK1/2, PI3K/Akt/mTOR yolağı üzerinden hücre ölümünü azalttığı, inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir. MKH için eksozomlar aracılığıyla deneysel modelde miyokard iskemisine bağlı reperfüzyon hasarını engellediğini, bunu apoptozu azaltarak yaptığını, AMPK/AKT/mTOR yolağı üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Periferik damar hastalıklarında mTOR ve AKT üzerinden otofajiyi azalttığı aktarılmıştır. Karaciğer iskemik reperfüzyonda ise MKH için ısı-şok proteinlerinin mTOR üzerinden otofajiyi engellediği saptanmıştır. Daha öncede bahsedildiği gibi

memeli hücrelerinde, mTORC1 ve mTORC2 olarak isimlendirilen ve işlevsel açıdan birbirinden farklı iki tane mTOR kompleksi bulunmaktadır. Bu komplekslerden mTORC1, spermatozoidlerin kan testis bariyerinin bazal kompartmanından, adlüminal kanala doğru göç ederek burada mayoz bölünmeye girmelerini sağlamak amacıyla, Sertoli hücrelerinde MMP-9 üretimini arttırarak adezyon moleküllerinin degradasyonuna böylelikle kan testis bariyerinin gevşemesine neden olur. Öte yandan mTORC2 ise, mTORC1'in aksine kan testis bariyerindeki sıkı bağlantı komplekslerinde bulunan Cx43 gibi proteinlerin ekspresyonunun artışına sebep olarak kan testis bariyerinin sıkı halde kalmasına neden olur. Testiste kan testis bariyerin, mTOR kompleksleri tarafından bu şekilde düzenlenmesi spermatogenezin devamlılığında önemli bir rol oynamaktadır. Öyle ki, birbirinden bağımsız olarak yapılan çalışmalar hem mTORC1'in hem de mTORC2'in Sertoli hücrelerinde ekspresyonlarının baskılanmasının, spermatogonia proliferasyonu ve farklılaşmasını bozduğunu ortaya koymuştur. Literatürde iskemik reperfüzyonda mTOR hasarın düzeltilmesinde önemli bir sinyal molekülü olarak kabul edilmektedir (84, 85). Çalışmamızda KR ve TL ile karşılaştırıldığında torsiyona bağlı anlamlı azalmanın uygulamalar ile geri döndürülmesi birçok çalışma ile uyumlu bulundu. Yapılan bir çalışmada obez farelere uygulanan fluvastatinin mTOR sinyal yolağını destekleyerek üreme organlarında koruyucu etki yaptığı saptanmıştır (117).

Akt için hücre proliferasyonunda ve canlılığında önemli bir sinyal molekülü olduğu düşünülmüştür. Torsiyonda ilk 6 saat ile 24 saat aralığında Akt artışının olduğu saptanmıştır. Özellikle sertoli hücrelerinde eksprese olan bu faktör spermatogenik hücrelerde de bulunmaktadır. Özellikle spermatozoidlerde eksprese edilen akt için torsiyonun erken fazında hücre yaşamı ile ilişkili olduğu saptanmıştır (112). Bir çalışmada CAPE uygulamasının mTOR aktivasyonunu baskılayarak apoptozu azalttığı saptanmıştır. CAPE etkisi ile MDA ve 8OHdG için torsiyon ile artarken uygulama ile azaldığı gösterilmiştir (84). Ürokortin uygulaması yapılan bir çalışmada ASTRESSİN uygulaması ile apoptotik germ hücre sayısının arttırıldığı ve bcl-2 ile bcl-x ekspresyonu azaldığı ayrıca buna fosforillenmiş ERK-1/2 azalması ile azalmayan fosforillenmiş Akt eşlik etmiştir (106). PI3K, mTOR ve Akt aracılı bir şekilde hücre apoptozini inhibe eden bir molekül olarak bilinmektedir (84).

Çalışmamızda erişkin sıçan testisinde 2 saatlik torsiyon ve 4 saatlik reperfüzyon modelinde torsiyonun son yarım saatinde uygulamalar yapılarak klinik durum taklit edildi. Veriler doğrultusunda torsiyona bağlı iskemik reperfüzyon hasarında uygulamaların anlamlı bir şekilde hasarı geriletmediği ve hücreleri koruduğu görüldü. Birlikte kullanımlarının ise çok daha anlamlı ve olumlu katkı sağladığı bulundu. Özellikle germ hücrelerinin korunmasında bu katkının önemi saptandı. Uygulamaların antioksidan etki ile apoptozu geriletmediği ve bu etkinin mTOR/Akt/PI3K sinyal yolağının aktive edilmesi ile ilişkili olduğu gösterildi.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçları, TT morfoloji ve Johnsen skorlaması ile önemli derece patolojik değişikliklerin oluştuğunu ve GL, MKH ve özellikle birlikte kullanımlarının anlamlı koruma sağladığını gösterdi.

İmmünohistokimyasal analizlerin verileri ise eNOS ile TT sonucu oluşan oksidatif stres ve TUNEL ile gösterilen apoptozun GL, MKH ve özellikle birlikte kullanımlarına bağlı anlamlı bir şekilde azaldığını saptadı.

TT ile oluşan makroskopi ile morfolojik, H-E, PAS ve Mason Trikrom ile histolojik ve SOD ve MDA ile biyokimyasal patolojik değişikliklerin immunohistokimyasal boyamalar ile mTOR/Akt/PI3K sinyal yolları ile ilişkili olduğu görüldü.

Biyokimyasal veriler GL, MKH ve özellikle birlikte kullanımlarına bağlı anlamlı bir şekilde serum SOD aktivitesini arttırmak ve MDA seviyesini ise azaltmak suretiyle antioksidan etkilerini saptadı.

Yaptığımız spermatozoon morfoloji ve sayım analizlerinde TT ile morfoloji, sayı ve hareket bozukluklarının GL, MKH ve özellikle birlikte kullanımlarına bağlı anlamlı bir şekilde düzeldiği ortaya kondu.

Bulgularımız klinikte önemli bir sorun olan TT hasarında GL, MKH ve özellikle birlikte kullanımlarının etkili bir tedavi olabileceğini gösterdi. Hasta yaşam kalitesi ve maliyetlerin azaltılması anlamında infertil olabilecek erkekler için sosyal yönü ile anlamlı bir katkı sağlayacakları düşünüldü.

Gelecek için önemli bir öneri olarak uygulamaların toksik ve yan etkisinin bulunmaması insan çalışmalarının başlatılması gerektirdiğine işaret etmektedir.

7. ÖZET

Testis torsiyonu (TT), erkek infertilitesinde önemli ürolojik tıbbi acil durumdur. TT iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı ile oksidatif stres ve apoptoz mekanizmalarını kullanarak zarar vermekte ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı ile ilişkilendirilmektedir. *GanodermaLucidum*(GL) ölümsüzlük mantarı olarak bilinip tamamlayıcı tıp uygulamalarında geniş bir yer bulmaktadır. Mezenkimal Kök Hücre (MKH) faz çalışmalarını geçmiş klinikte kullanılmakta olan önemli bir üründür. Her iki ürününde değişik dozlarda olumlu etkileri gösterilmişken TT üzerindeki etkileri ve sinyal yolağı ile olan ilişkileri bilinmemektedir. Bu çalışmada GL, MKH ve birlikte kullanımlarının İ/R hasarında koruyucu etkilerinin histokimyasal,immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi amaçladı.

Wistar Albino genç erişkin erkek sıçanlar kontrol (KR), Taklit (TL), İ/R, İ/R+GL, İ/R+MKH, İ/R+GL+MKH olarak 8 örnekte çalışıldı. 50 mg/kg i.p. GL, 1×10^6 Yağ dokusu MKH ve birlikte (GL+MKH) uygulamaları 100 µl sıvı içinde reperfüzyondan yarım saat öncesi uygulandı. İ/R modeli için sıçanların sol testislerine 720° rotasyon ile 2 saat torsiyon, 4 saat detorsiyon yapıldı. Testisler çıkarılarak bouin solüsyonunda 48 saat tespit edildi, rutin histolojik incelemeye alındı. Kesitler H-E, PAS ve MT ile histokimyasal boyandı ve Johnsen skoruna göre hasar ve uygulama etkisi değerlendirildi. Oksidatif stress için eNOS, apoptoz için TUNEL ve sinyal yolaqları için PI3K/AKT/mTOR immünohistokimyasal yöntem ile incelendi.İmmün boyamalar H-skor ile kantite edildi. Sıçanların kan örneklerinde SOD ve MDA ELİSA yöntemi ile belirlendi. Örneklerin TESE ile spermleri toplanıp morfolojik anamoli, canlılık ve hareket açısından analizi yapıldı. Sonuçlar One-Way ANOVA istatistik testi ile GrahPad yazılımında istatistiksel değerlendirildi.

Makroskobik ve histopatolojik verilerde TT ile oluşan İ/R örneklerinde patolojik değişikliklerin oldukça anlamlı olduğu, artan eNOS ve TUNEL ile azalan PI3K/AKT/mTOR immunohistokimya bulgularının GL, MKH ve özellikle birlikte kullanımlarının anlamlı bir koruma ve iyileşme sağlayarak KR ve TL grupları düzeyine döndüğü bulundu. Biyokimyasal verilerde İ/R grubunda oldukça anlamlı olarak azalan SOD ve artan MDA düzeylerinin GL, MKH ve özellikle birlikte

kullanımının anlamlı bir etki ile KR ve TL grupları düzeyine döndüğü saptandı.İ/R örneklerinde incelenen spermlerin artan anamoli ve azalan canlılık ile hareket değerlerinin düzeylerinin GL, MKH ve özellikle birlikte kullanımının anlamlı bir etki ile KR ve TL grupları düzeyine döndüğü saptandı.

Bulgularımıza göreTT ile gelişenİ/R hasarında, oksidatif stres, apoptoz ve sinyal yolağı ilişkili hasarda bitkisel ekstrakt ile birlikte hücrel tedavinin anlamlı bir katkı sağladığı gösterildi. Acil vakalarda detorsiyon öncesi erken dönemde yapılacak bu uygulamalarının reperfüzyon hasarında koruyucu olacağı, erkek infertilitesini engelleyici, yaşam kalitesini arttırıp maliyetleri azaltacağı ve sosyal etkileri ile önemli yararları olacağı ayrıca faz çalışmalarına başlanmasının uygun olduğu düşünöldü.

Anahtar Kelimeler:Testis Torsiyonu, Sperm, İskemi/Reperfüzyon, *GanodermaLucidum*, Mezenkimal Kök Hücre, PI3K/AKT/mTOR.

8.ABSTRACT

Testicular Torsion (TT) is an important urological medical emergency in male infertility. TT is damaged by Ischemia/Reperfusion (I/R) damage using oxidative stress and apoptosis mechanisms and is associated with the PI3K/ACT/mTOR signaling pathway. Ganoderma Lucidum (GL) is known as immortality mushroom and finds a wide range of complementary medical applications. Mesenchymal Stem Cell (MSC) is an important product used in clinical practice past phase studies. The effects on TT and the relationship with the pathway are not known, although positive effects are shown in the different noses in both cases. In this study, it was aimed to evaluate histochemical, immunohistochemical and biochemical protective effects of GL, MSC and co-administration on I/R injury.

Wistar Albino young adult male rats were studied in 8 samples as control (KR), sham (TL), I/R, I/R + GL, I/R + MSC and I/R + GL + MSC. 50 mg / kg ip. GL, 1×10^6 ADMSC and GL + MSC were administered in 100 μ l of the reperfusion half an hour before in the fluid. For the I/R model, the left testes of the rats were given 2 hours of torsion with 720° rotation and 4 hours of detorsion. The testes were removed and fixed in bouillon solution for 48 hours, and histologically examined routinely. The sections were histochemically stained with H-E, PAS and MT and the damage and application effect according to Johnsen score was evaluated. eNOS for oxidative stress, TUNEL for apoptosis and PI3K/AKT/mTOR immunohistochemistry for signaling pathways. Immunochromatography was quantified by H-score. SOD and MDA were determined by ELISA method in blood samples of rats. Samples were collected with TESE and analyzed for morphological anomaly, viability and movement. Results were statistically evaluated in GrahPad software with One-Way ANOVA statistical test.

The pathologic changes in I/R specimens with TT in macroscopic and histopathologic data were found to be quite significant, and increased PI3K/AKT/mTOR immunohistochemical findings with increasing eNOS and TUNEL showed significant protection and recovery of GL, MSC and combined use. Decreased SOD and increased MDA levels in the I/R group of biochemical samples were significantly reduced by GL, MSC and especially by the combined use of KR

and TL groups. It was determined that the levels of the increased anomaly and diminished vitality and movement values of the sperms examined in the I/R samples returned to the levels of KR and TL groups with a significant effect of GL, MSC and especially co-use.

According to our findings, I/R injury caused by TT showed a significant contribution of cellular therapy with herbal extracts in oxidative stress, apoptosis and signal pathway related injury. These applications to be performed before detortion period should be effective in preventing reperfusion injury, preventing male infertility, increasing quality of life and decreasing costs with social benefits where starting phase studies should start.

Key words: Testicular Torsion, Sperm, Ischemia/Reperfusion, Ganoderma Lucidum, Mesenchymal Stem Cell, PI3K/AKT/mTOR.

9. KAYNAKÇA

1. Manjunath AS, Hofer MD. Urologic Emergencies. *Med Clin North Am*. 2018Mar;102(2):373-385.
2. Hess RA, de Franca LR. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis 2009* (pp. 1-15). Springer New York.
3. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology*. 1993 Dec 15;123(6):1777-88.
4. Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of reproduction*. 2011 May 1;84(5):851-8.
5. Wen Q, Tang EI, Gao Y, Jesus T, Chu D, Lee WM, Wong CK, Liu YX, Xiao X, Silvestrini B, Cheng CY. Signaling pathways regulating blood-tissue barriers—lesson from the testis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2017 Apr 25.
6. Ross MH, Pawlina W. *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
7. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic histology text and atlas*. London: McGraw Hill, 2005; 2005 Sep 20.
8. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık, Çev. Ed: Prof. Dr. Ramazan Demir. Mosby Inc. 2006. Arıncı K ve Elhan A. 1995
9. Guyton H, Fizioloji T. Çeviri editörü: Çavuşoğlu H, 10. baskı. İstanbul, Nobel. 2001.

10. De Kretser DM, McLachlan RI, Robertson DM, Wreford NG. 5 Control of spermatogenesis by follicle stimulating hormone and testosterone. *Baillière's clinical endocrinology and metabolism*. 1992 Apr 1;6(2):335-54.
11. Jiang X, Zhang H, Yin S, Zhang Y, Yang W, Zheng W, Wang L, Wang Z, Bukhari I, Cooke HJ, Iqbal F. Specific deficiency of Plzf paralog, Zbtb20, in Sertoli cells does not affect spermatogenesis and fertility in mice. *Scientific reports*. 2014 Nov 14;4:7062.
12. Mruk DD, Cheng CY. The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation. *Endocrine reviews*. 2015 Sep 10;36(5):564-91.
13. Mok KW, Mruk DD, Cheng CY. Regulation of blood–testis barrier (BTB) dynamics during spermatogenesis via the “Yin” and “Yang” effects of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and mTORC2. *International review of cell and molecular biology*. 2013;301:291.
14. Wen Q, Tang EI, Gao Y, Jesus TT, Chu DS, Lee WM, Wong CKC, Liu YX, Xiao X, Silvestrini B, Cheng CY. Signaling pathways regulating blood-tissue barriers -Lesson from the testis. *Biochim Biophys Acta*. 2018 Jan;1860(1):141-153.
15. Uygur R, Aktas C, Tulubas F, Uygur E, Kanter M, Erboga M, Caglar V, Topcu B, Ozen OA. Protective effects of fish omega-3 fatty acids on doxorubicin-induced testicular apoptosis and oxidative damage in rats. *Andrologia*. 2014 Oct 1;46(8):917-26.
16. Hess RA, França LR. Structure of the Sertoli cell. *Sertoli cell biology*. 2005;19:40.
17. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık, Çev. Ed: Prof. Dr. Ramazan Demir. Mosby Inc. 2006.
18. Erdoğan D, Hatiboğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. *Özel Histoloji*. Baskı SBAD Yayınları, Ankara. 1996:179-86.

19. Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi, 4. Baskı. Alp Ofset Matbaacılık Ankara, 2003.
20. Hess RA, de Franca LR. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In Molecular Mechanisms in Spermatogenesis 2009 (pp. 1-15). Springer New York.
21. Wang CQ, Cheng CY. A seamless trespass: germ cell migration across the seminiferous epithelium during spermatogenesis. J Cell Biol. 2007 Aug 13;178(4):549-56.
22. Glikli G, Ebnet K, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Adams RH. Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C. Nature. 2004 Sep 16;431(7006):320-4.
23. Gartner LP, Hiatt JL. Color atlas and text of histology. Lippincott Williams & Wilkins; 2012 Oct 12.
24. Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Treviño CL. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. Physiological Reviews. 2011 Oct 1;91(4):1305-55.
25. Glikli G, Ebnet K, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Adams RH. Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C. Nature. 2004 Sep 16;431(7006):320-4.
26. Gholami M, Abbaszadeh A, Khanipour Khayat Z, Anbari K, Baharvand P, GharraviAM. Honey improves spermatogenesis and hormone secretion in testicular ischaemia-reperfusion-induced injury in rats. Andrologia. 2018 Feb;50(1).
27. Gömeç M, Sıçanlarda Ganoderma lucidumun mezenter iskemi- reperfüzyon hasarı üzerindeki iyileştirici etkileri, 2017
28. Eroğlu HA, Ganoderma lucidum monokaryon misel protein kalıplarının dikaryon misellerde görülme düzeyi ve Ganoderma lucidum sıcak su

ekstraktının fare doku hücrelerinde oksidatif dna hasarlarının önlenmesi ve p53 gen aktivitesi üzerine etkisi, 2013

29. Çayır Ü, Ganoderma lucidum'un insan periferik lenfositlerinde genotoksik ve mitomisin-C'ye karşı antigenotoksik etkileri, 2012)
30. Bishop AE, Polak JM. Pulmonary epithelium. *Methods Enzymol.* 2006;418:333-49.
31. Lee N, Thorne T, Losordo DW, Yoon YS. Repair of ischemic heart disease with novel bone marrow-derived multipotent stem cells. *Cell Cycle.* 2005Jul;4(7):861-4.
32. Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng.* 2004Jan;32(1):160-5.
33. Temeltas G, Dagci T, Kurt F, Evren V, Tuğlu I. Bladder function recovery in rats with traumatic spinal cord injury after transplantation of neuronal-glial restricted precursors or bone marrow stromal cells. *J Urol.* 2009
34. Brock DW. Is a consensus possible on stem cell research? Moral and political obstacles. *J Med Ethics.* 2006 Jan;32(1):36-42.
35. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Apr;36(4):568-84.
36. Dezawa M, Ishikawa H, Hoshino M, Itokazu Y, Nabeshima Y. Potential of bone marrow stromal cells in applications for neuro-degenerative, neuro-traumatic and muscle degenerative diseases. *Curr Neuropharmacol.* 2005 Oct;3(4):257-66.
37. Özdal-Kurt F, Tuğlu I, Vatansever HS, Tong S, Şen BH, Deliloğlu-Gürhan SI. The effect of different implant biomaterials on the behavior of canine bone marrow stromal cells during their differentiation into osteoblasts. *Biotech Histochem.* 2016 Aug;91(6):412-22.

38. Özdal-Kurt F, Şen BH, Tuğlu I, Vatansever S, Türk BT, Deliloğlu-Gürhan I. Attachment and growth of dental pulp stem cells on dentin in presence of extra calcium. *Arch Oral Biol.* 2016 Aug;68:131-41.
39. Özdal-Kurt F, Tuğlu I, Vatansever HS, Tong S, Deliloğlu-Gürhan SI. The effect of autologous bone marrow stromal cells differentiated on scaffolds for caninetibial bone reconstruction. *Biotech Histochem.* 2015;90(7):516-28.
40. Rinaldi M, Micali A, Marini H, Adamo EB, Puzzolo D, Pisani A, Trichilo V, Altavilla D, Squadrito F, Minutoli L. Cadmium, Organ Toxicity and Therapeutic Approaches: A Review on Brain, Kidney and Testis Damage. *Curr Med Chem.* 2017 Nov 20;24(35):3879-3893.
41. Oliveira JS, Silva AA, Silva VA Junior. Phytotherapy in reducing glycemic index and testicular oxidative stress resulting from induced diabetes: a review. *Braz J Biol.* 2016 Jul 11;0:0.
42. Ishikawa T, Kondo Y, Goda K, Fujisawa M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in transgenic mice accelerates testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *J Androl.* 2005 Mar-Apr;26(2):281-8.
43. Ross MH, Pawlina W. *Histology.* Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
44. Solomon EP. *İnsan anatomisine ve fizyolojisine giriş.* Birol; 2000.
45. Tortora GJ, Derrickson BH. *Principles of anatomy and physiology.* John Wiley & Sons; 2008 Apr 11.
46. Yip KH, Huang Y, Waye MM, Lau HY. Induction of nitric oxide synthases in primary human cultured mast cells by IgE and proinflammatory cytokines. *Int Immunopharmacol.* 2008 May;8(5):764-8.
47. Hassa H. *İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve İn vivo Laboratuar Uygulamaları.* Eskişehir:Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Basımevi; 2003.

48. Vaos G, Zavras N. Antioxidants in experimental ischemia-reperfusion injury of the testis: Where are we heading towards? *World J Methodol.* 2017 Jun 26;7(2):37-45.
49. Shimizu S, Tsounapi P, Dimitriadis F, Higashi Y, Shimizu T, Saito M. Testicular torsion-detorsion and potential therapeutic treatments: A possible role for ischemic postconditioning. *Int J Urol.* 2016 Jun;23(6):454-63.
50. Dokmeci D. Testicular torsion, oxidative stress and the role of antioxidant therapy. *Folia Med (Plovdiv).* 2006;48(3-4):16-21.
51. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med.* 2004 Feb-Apr;25(1-2):199-210.
52. Oksay T, Nazıroğlu M, Ergün O, Doğan S, Özatik O, Armağan A, Özorak A, Çelik Ö. N-acetyl cysteine attenuates diazinon exposure-induced oxidative stress in rat testis. *Andrologia.* 2013 Jun;45(3):171-7.
53. Diamantis A, Magiorkinis E, Sakorafas GH, Androutsos G. A brief history of apoptosis: from ancient to modern times. *Onkologie.* 2008 Dec;31(12):702-6.
54. Soria González JE, Orea Solano M. [Apoptosis]. *Rev Alerg Mex.* 2002 Jul-Aug;49(4):121-8
55. Hiramine C. [Definition and morphological features of apoptosis]. *Rinsho Byori.* 1997 May;45(5):459-69.
56. Akhtar F, Bokhari SRA. Apoptosis. 2018 May 3. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499821/>
57. Chung C. Restoring the switch for cancer cell death: Targeting the apoptosis signaling pathway. *Am J Health Syst Pharm.* 2018 May 14. pii: ajhp170607.

58. Wang Y, Zhong J, Bai J, Tonga R, An F, Jiao P, He L, Zeng D, Long E, Yan J, Yu J, Cai L. The application of natural products in cancer therapy by targeting apoptosis pathways. *Curr Drug Metab*. 2018 May 11.
59. 1: Wang Y, Zhong J, Bai J, Tonga R, An F, Jiao P, He L, Zeng D, Long E, Yan J, Yu J, Cai L. The application of natural products in cancer therapy by targeting apoptosis pathways. *Curr Drug Metab*. 2018 May 11.
60. Beyfuss K, Hood DA. A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle. *Redox Rep*. 2018 Dec;23(1):100-117.
61. Ou L, Lin S, Song B, Liu J, Lai R, Shao L. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *Int J Nanomedicine*. 2017 Sep 7;12:6633-6646.
62. Li J, Chen F, Chen Y, Wang Z. Mitochondrial- and Fas-L-mediated pathways involved in quineestrol induced spermatogenic apoptosis in adult rat testes. *Toxicol Mech Methods*. 2014 Dec;24(9):609-15.
63. Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 Jan 1;4:746-54.
64. Sinha Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003 Jun;85(2-5):175-82.
65. Duan P, Quan C, Huang WT, Yang KD. [PI3K-Akt/LKB1-AMPK-mTOR-p70S6K/4EBP1 signaling pathways participate in the regulation of testis development and spermatogenesis. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2016 Nov;22(11):1016-1020.
66. Jesus TT, Oliveira PF, Sousa M, Cheng CY, Alves MG. Mammalian target of rapamycin (mTOR): a central regulator of male fertility? *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2017 Jun;52(3):235-253

67. Oliveira PF, Cheng CY, Alves MG. Emerging Role for Mammalian Target of Rapamycin in Male Fertility. *Trends Endocrinol Metab.* 2017 Mar;28(3):165-167.
68. Li N, Cheng CY. Mammalian target of rapamycin complex (mTOR) pathway modulates blood-testis barrier (BTB) function through F-actin organization and gap junction. *Histol Histopathol.* 2016 Sep;31(9):961-8.
69. Mok KW, Mruk DD, Cheng CY. Regulation of blood-testis barrier (BTB) Dynamics during spermatogenesis via the "Yin" and "Yang" effects of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and mTORC2. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013;301:291-358.
70. 1: Duan P, Quan C, Huang WT, Yang KD. [PI3K-Akt/LKB1-AMPK-mTOR-p70S6K/4EBP1 signaling pathways participate in the regulation of testis development and spermatogenesis: An update]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2016 Nov;22(11):1016-1020.
71. Dianatpour A, Ghafouri-Fard S. Long Non Coding RNA Expression Intersecting Cancer and Spermatogenesis: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017 Oct 26;18(10):2601-2610.
72. Ufuk F, Herek D, Herek Ö, Akbulut M. Diffusion-Weighted Imaging and Color Doppler Ultrasound in Evaluation of Partial Testicular Torsion in Rat Model. *Pol J Radiol.* 2017 Sep 15;82:542-546
73. 1: Vaos G, Zavras N. Antioxidants in experimental ischemia-reperfusion injury of the testis: Where are we heading towards? *World J Methodol.* 2017 Jun 26;7(2):37-45.
74. : Shimizu S, Tsounapi P, Dimitriadis F, Higashi Y, Shimizu T, Saito M. Testicular torsion-detorsion and potential therapeutic treatments: A possible role for ischemic postconditioning. *Int J Urol.* 2016 Jun;23(6):454-63.
75. Tolba MF, Omar HA, Azab SS, Khalifa AE, Abdel-Naim AB, Abdel-Rahman SZ. Caffeic Acid Phenethyl Ester: A Review of Its Antioxidant

Activity, Protective Effects against Ischemia-reperfusion Injury and Drug Adverse Reactions. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016 Oct 2;56(13):2183-90.

76. Altavilla D, Romeo C, Squadrito F, Marini H, Morgia G, Antonuccio P, Minutoli L. Molecular pathways involved in the early and late damage induced by testis ischemia: evidence for a rational pharmacological modulation. *Curr Med Chem*. 2012;19(8):1219-24.
77. Dokmeci D. Testicular torsion, oxidative stress and the role of antioxidant therapy. *Folia Med (Plovdiv)*. 2006;48(3-4):16-21.
78. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med*. 2004 Feb-Apr;25(1-2):199-210.
79. Di Fiore MM, Santillo A, Falvo S, Longobardi S, Chieffi Baccari G. Molecular Mechanisms Elicited by d-Aspartate in Leydig Cells and Spermatogonia. *Int J Mol Sci*. 2016 Jul 14;17(7).
80. 1: Gevrek F, Erdemir F. Investigation of the effects of curcumin, vitamin E and their combination in cisplatin-induced testicular apoptosis using immunohistochemical technique. *Turk J Urol*. 2018 Jan;44(1):16-23.
81. Gevrek F, Biçer Ç, Kara M, Erdemir F. The ameliorative effects of Ginkgo biloba on apoptosis, LH-R expression and sperm morphology anomaly in testicular torsion and detorsion. *Andrologia*. 2018 Feb 7.
82. Cayli S, Ocakli S, Senel U, Karaca Z, Erdemir F, Delibasi T. Role of an endothelin type A receptor antagonist in regulating torsion-induced testicular apoptosis in rats. *Histol Histopathol*. 2016 May;31(5):585-94.
83. Atilgan D, Parlaktas B, Uluocak N, Gencten Y, Erdemir F, Ozyurt H, Erkorkmaz U, Aslan H. Pomegranate (*Punica granatum*) juice reduces oxidative injury and improves sperm concentration in a rat model of testicular torsion-detorsion. *Exp Ther Med*. 2014 Aug;8(2):478-482.

84. Shimizu S, Tsounapi P, Dimitriadis F, Higashi Y, Shimizu T, Saito M. Testicular torsion-detorsion and potential therapeutic treatments: A possible role for ischemic postconditioning. *Int J Urol*. 2016 Jun;23(6):454-63.
85. Reyes JG, Farias JG, Henríquez-Olavarrieta S, Madrid E, Parraga M, Zepeda AB, Moreno RD. The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev*. 2012 Sep 27. Review.
86. Turner TT, Bang HJ, Lysiak JL. The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. *J Urol*. 2004 Dec;172(6 Pt 2):2574-8.
87. Pınar N, Çakırca G, Özgür T, Kaplan M. The protective effects of alpha lipoic acid on methotrexate induced testis injury in rats. *Biomed Pharmacother*. 2018 Jan;97:1486-1492.
88. Gultekin A, Tanriverdi HI, Inan S, Yilmaz O, Gunsar C, Sencan A. The Effect of Tunica Albuginea Incision on Testicular Tissue After Detorsion in the Experimental Model of Testicular Torsion. *Urol J*. 2018 Jan 23;15(1):32-39.
89. Sohrabi M, Hosseini M, Inan S, Alizadeh Z, Vahabian M, Vahidinia AA, Lahoutian H. Effect of Antioxidants on Testicular iNOS and eNOS after High-Fat Diet in Rat. *Pak J Biol Sci*. 2017;20(6):289-297.
90. Dilber Y, Inan S, Ercan GA, Sencan A. The role of CAPE in PI3K/AKT/mTOR activation and oxidative stress on testis torsion. *Acta Histochem*. 2016 Jan;118(1):31-7.
91. Ayvaz S, Inan M, Aksu B, Karaca T, Cemek M, Ayaz A, Basaran UN, Pul M. Desferrioxamine effectively attenuates testicular tissue at the end of 3 h of ischemia but not in an equal period of reperfusion. *J Pediatr Urol*. 2014 Jun;10(3):550-8.

92. Taneli F, Vatansever S, Ulman C, Giray G, Genc A, Taneli C. Pre-ischemic administration of nitric oxide synthase inhibitors reduced germ cell apoptosis after spermatic vessel ligation in the rat testis. *Urol Int*. 2005;75(1):70-4.
93. Taneli F, Vatansever S, Ulman C, Yilmaz O, Giray G, Genç A, Taneli C. The effect of spermatic vessel ligation on testicular nitric oxide levels and germ cell-specific apoptosis in rat testis. *Acta Histochem*. 2005;106(6):459-66.
94. Taneli F, Aydede H, Vatansever S, Ulman C, Ari Z, Uyanik BS. The long-term effect of mesh bioprosthesis in inguinal hernia repair on testicular nitric oxide metabolism and apoptosis in rat testis. *Cell Biochem Funct*. 2005 May-Jun;23(3):213-20.
95. Zhang J, Gao X, Pan Y, Xu N, Jia L. Toxicology and immunology of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in Kunming mice and Wistar rats. *Int J Biol Macromol*. 2016 Apr;85:302-10.
96. Zhang J, Meng G, Zhai G, Yang Y, Zhao H, Jia L. Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides of spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum*. *Int J Biol Macromol*. 2016 Jan;82:432-9.
97. Cör D, Knez Ž, Knez Hrnčič M. Antitumour, Antimicrobial, Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Effect of *Ganoderma Lucidum* Terpenoids and Polysaccharides: A Review. *Molecules*. 2018 Mar 13;23(3).
98. Aktop S, Emekli-Alturfan E, Ozer C, Gonul O, Garip H, Yarat A, Goker K. Effects of Ankaferd Blood Stopper and Celox on the tissue factor activities of warfarin-treated rats. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2014 Jan;20(1):16-21.
99. Li K, Zhuo C, Teng C, Yu S, Wang X, Hu Y, Ren G, Yu M, Qu J. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on chronic pancreatitis and intestinal microbiota in mice. *Int J Biol Macromol*. 2016 Dec;93(Pt A):904-912.
100. Ouyang MZ, Lin LZ, Lv WJ, Zuo Q, Lv Z, Guan JS, Wang ST, Sun LL, Chen HR, Xiao ZW. Effects of the polysaccharides extracted from

- Ganoderma lucidum on chemotherapy-related fatigue in mice. *Int J Biol Macromol*. 2016 Oct;91:905-10.
- 101.Özevren H, İrtegün S, Deveci E, Aşır F, Pektanç G, Deveci Ş. Ganoderma Lucidum Protects Rat Brain Tissue Against Trauma-Induced Oxidative Stress. *Korean J Neurotrauma*. 2017 Oct;13(2):76-84.
- 102.Wang H, Zhang R, Song Y, Li T, Ge M. Protective Effect of Ganoderma Triterpenoids on Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Chickens. *Biol Trace Elem Res*. 2018 May 2.
- 103.Hsiao CH, Ji AT, Chang CC, Cheng CJ, Lee LM, Ho JH. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem Cell Res Ther*. 2015 May 30;6:113.
- 104.Azizollahi S, Aflatoonian R, Sadighi Gilani MA, Behnam B, Tajik N, Asghari-Jafarabadi M, Asgari HR, Koruji M. Alteration of spermatogenesis following spermatogonial stem cells transplantation in testicular torsion-detorsion mice. *J Assist Reprod Genet*. 2016 Jun;33(6):771-81
- 105.Azizollahi S, Aflatoonian R, Sedigi-Gilani MA, Jafarabadi MA, Behnam B, Azizollahi G, Koruji M. Recruiting testicular torsion introduces an azoospermic mouse model for spermatogonial stem cell transplantation. *Urol J*. 2014 Jul 8;11(3):1648-55.
- 106.Cao P, Xue JX, Jia RP, Xu LW, Li WC, Qian M, Chen B, Bo CJ. [Effects of endothelial progenitor cells on spermatogenic functions in testicular detorsion in rats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2011 Aug 16;91(30):2135-8.
- 107.Sekerci CA, Tanidir Y, Sener TE, Sener G, Cevik O, Yarat A, Alev-Tuzuner B,
- 108.Cetinel S, Kervancioglu E, Sahan A, Akbal C. Effects of platelet-rich plasma against experimental ischemia/reperfusion injury in rat testis. *J Pediatr Urol*. 2017 Jun;13(3):317.e1-317.e9.

109. Shimizu S, Tsounapi P, Dimitriadis F, Higashi Y, Shimizu T, Saito M. Testicular torsion-detorsion and potential therapeutic treatments: A possible role for ischemic postconditioning. *Int J Urol*. 2016 Jun;23(6):454-63.
110. Das U, Sakagami H, Chu Q, Wang Q, Kawase M, Selvakumar P, Sharma RK, Dimmock JR. 3,5-Bis(benzylidene)-1-[4-2-(morpholin-4-yl)ethoxyphenylcarbonyl]-4-piperidone hydrochloride: a lead tumor-specific cytotoxin which induces apoptosis and autophagy. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Feb 1;20(3):912-7.
111. Kourouma A, Keita H, Duan P, Quan C, Bilivogui KK, Qi S, Christiane NA, Osamuyimen A, Yang K. Effects of 4-nonylphenol on oxidant/antioxidant balance system inducing hepatic steatosis in male rat. *Toxicol Rep*. 2015 Oct 19;2:1423-1433.
112. Ning JZ, Li W, Cheng F, Rao T, Yu WM, Ruan Y, Yuan R, Zhang XB, Du Y, Xiao CC. The protective effects of GYY4137 on ipsilateral testicular injury in experimentally varicocele-induced rats. *Exp Ther Med*. 2018 Jan;15(1):433-439.
113. Zhu SM, Rao T, Yang X, Ning JZ, Yu WM, Ruan Y, Yuan R, Li CL, Jiang K, Hu W, Li HY, Cheng F. Autophagy may play an important role in varicocele. *Mol Med Rep*. 2017 Oct;16(4):5471-5479
114. Hosseini B, Nourmohamadi M, Hajipour S, Taghizadeh M, Asemi Z, Keshavarz SA, Jafarnejad S. The Effect of Omega-3 Fatty Acids, EPA, and/or DHA on Male Infertility: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Diet Suppl*. 2018 Feb 16:1-12.
115. Pilutin A, Misiakiewicz-Has K, Kolasa A, Baranowska-Bosiacka I, Marchlewicz M, Wiszniewska B. The immunoexpression of androgen receptor, estrogen receptors alpha and beta, vanilloid type 1 receptor and cytochrome p450 aromatase in rats testis chronically treated with letrozole, an aromatase inhibitor. *Folia Histochem Cytobiol*. 2014;52(3):206-17.

116.Liu H, Zhang L, Zhang X, Cui Z. PI3K/AKT/mTOR pathway promotes progestin resistance in endometrial cancer cells by inhibition of autophagy. *Onco Targets Ther.* 2017 Jun 6;10:2865-2871.

10.ÖZGEÇMİŞ-FULYA GÜLBAĞÇA

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı:	Fulya GÜLBAĞÇA
Doğum Tarihi:	25.03.1992
Doğum Yeri:	Ankara
Medeni Hali:	Bekar
Görevi :	Öğrenci

İLETİŞİM BİLGİLERİ

E-Posta : fulyagulbagca@gmail.com

Cep Telefonu : 0531 206 4035

ÖĞRENİM DURUMU:

<u>Derece</u>	<u>Eğitim Kurumu</u>	<u>Mezuniyet</u>
İlkokul	Necdet Seçkinöz İlköğretim Okulu/ ANKARA	2000
Ortaokul	Necdet Seçkinöz İlköğretim Okulu/ ANKARA	2006
Lise	Leyla Turgut Lisesi / ANKARA	2006-2010
Üniversite	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi / Biyoloji Bölümü / ANKARA	2011-2015
Yüksek Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı	2015-2016
Yüksek Lisans	İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı / İZMİR	2016-2018

BİLİMSEL FAALİYETLER LİSTESİ

1. Gümüştay M, **Gülbağça F**, Aydemir I, Saygılı S, Kaya A, Tuğlu MI.
Development of electromagnetic field system for providing wound healing on

- created wound model rat skin and sensor application.. IEEE National Conference on Electrical, Electronics and Biomedical Engineering (ELECO), 2016. IEEE, 2016, ISBN 9786050109238: 678-681
2. Gümüşay M, **Gülbağça F**, Sayğili S, Aydemir I, Kaya A, Tuğlu MI. Design of coils driven by pulsed electromagnetic field generator and the effect of wound healing in rats]. IEEE Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO), 2016]. IEEE, 2016, ISBN 9781509023868 doi:10.1109/TIPTEKNO.2016.7863096
 3. **Gülbağça F**, Sal DH, Sayğili S, Sönmez PK, Aydemir I, Özkut M, Öztürk Ş, Gümüşay M, Kaya A, Tuğlu MI, Effects of electromagnetic fields application on experimental varicocele model in rats. IEEE 20th National Biomedical Engineering Meeting (BIYOMUT), 2016. IEEE, 2016, ISBN 9781509058303 doi:10.1109/BIYOMUT.2016.7849393
 4. Suna Saygılı, Mehmet Gümüşay, **Fulya Gülbağça**, Dila Hatun Sal, Işıl Aydemir, Adnan Kaya, M. İbrahim Tuğlu (Izmir Katip Çelebi University, Izmir, Turkey). Effects of pulsed electromagnetic fields on the L929 cell behavior during *in vitro* wound healing, J Cell Neurosci Oxid Stress, Volume 8, Number 1, 2016 E-ISSN Number: 2149-7222, SözlüBildiri
 5. Mehmet Gümüşay, Suna Saygılı, **Fulya Gülbağça**, Dila Hatun Sal, Işıl Aydemir, M. İbrahim Tuğlu, Adnan Kaya (Izmir Katip Çelebi University, Izmir, Turkey). The functional effect of stem cells on the reproductive organs, J Cell Neurosci Oxid Stress, Volume 8, Number 1, 2016 E-ISSN Number: 2149-7222, SözlüBildiri
 6. Mehmet Gümüşay, Suna Saygılı, **Fulya Gülbağça**, Dila Hatun Sal, Işıl Aydemir, M. İbrahim Tuğlu, Adnan Kaya, Effects of pulsed electromagnetic fields on the behavior of neural wound healing in NA2B cells, 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, Turkey, 24-27 May, 2016,, J Cell Neurosci Oxid Stress, Volume 8, Number 1, 2016 E-ISSN Number: 2149-7222, SözlüBildiri

7. Saygılı Suna, Gümüşay Mehmet, **Gülbağca Fulya**, Sal Dila, Aydemir Işıl, Kaya Adnan, Tuğlu Mehmet İbrahim, Effects Of Pulsed Electromagnetic Fields On The L929 Cell Behavior During In Vitro Wound Healing, 6th World Congress Of Oxidative Stress, Calcium Signaling And Trp Channels, Isparta, Turkey, 24-27 May, 2016, J Cell Neurosci Oxid Stress, Volume 8, Number 1, 2016 E-ISSN Number: 2149-7222, Özet Bildiri
8. Aydemir Işıl, Kılıçaslan Pınar, Özkut Mahmud, Sal Dila, **Gülbağca Fulya**, Saygılı Suna, Tuğlu Mehmet İbrahim, The Effects Of Stem Cells Applications On The Oxidative Stress And Apoptosis During Implantation, 6th World Congress Of Oxidative Stress, Calcium Signaling And Trp Channels, Isparta, Turkey, 24-27 May, 2016, J Cell Neurosci Oxid Stress, Volume 8, Number 1, 2016 E-ISSN Number: 2149-7222, Sözlü Bildiri
9. Aydemir Işıl, Kılıçaslan Pınar, Sal Dila, **Gülbağca Fulya**, Özkut Mahmud, Tuğlu Mehmet İbrahim, Kök Hücrelerin İmplantasyon Sırasında Adezyon Moleküllerine Etkisi, 1. Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi, Manisa, Türkiye, Sözlü Bildiri
10. Kılıçaslan Pınar, Özkut Mahmud, **Gülbağca Fulya**, Aydemir Işıl, Sal Dila, Saygılı Suna, Tuğlu Mehmet İbrahim, Deneysel Yara İyileşmesinde Oleokantal İle Kombine Hematopoetik Kök Hücre Etkisi, 3. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi, Kayseri, Özet Bildiri
11. Kılıçaslan Pınar, Özkut Mahmud, Aydemir Işıl, **Gülbağca Fulya**, Sal Dila, Saygılı Suna, Tuğlu Mehmet İbrahim, Deneysel Yara İyileşmesinde Laminin İle Kombine Hematopoetik Kök Hücre Etkisi, XIII. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi, Çeşme, İzmir, Sözlü Bildiri
12. Saygılı Suna, Aydemir Işıl, Sal Dila, Kılıçaslan Pınar, **Gülbağca Fulya**, Temeltaş Gökhan, Tuğlu Mehmet İbrahim, Deneysel İnmemiş Testis Oluşturulmuş Sıçanlarda Oluşan Testis Hasarında Yağ Doku Kökenli Kök Hücrelerinin Oksidatif Stres Üzerine Etkileri, XIII. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi, Çeşme, İzmir, Özet Bildiri

13. Sal Dila, **Gülbağca Fulya**, Kılıçaslan Pınar, Aydemir Işıl, Özkut Mahmud, Var Ahmet, Tuğlu Mehmet İbrahim, Deneysel Hasarlı Sıçan Testislerinde Yağ Doku Kökenli Kök Hücre Etkilerinin Oksidatif Stres İle İlişkisinin Histolojik Ve Biyokimyasal Parametreler İle Karşılaştırılması, Xııı. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi, Çeşme, İzmir,Sözlü Bildiri
14. **Gülbağca Fulya**, Sal Dila, Saygılı Suna, Kılıçaslan Pınar, Aydemir Işıl, Özkut Mahmud, Tuğlu Mehmet İbrahim, Kolon Meme Ve Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Ökse Otu Ekstraktının Terapötik Etkisi, Xııı. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi, Çeşme, İzmir, Özet Bildiri
15. Aydemir Işıl,Kılıçaslan Pınar,Sal Dila,**Gülbağca Fulya**,Saygılı Suna,Özkut Mahmud,Tuğlu Mehmet İbrahim, Kök Hücre Uygulamalarının İmplantasyon Sırasında Adezyon Moleküllerine Etkisi, . Xııı. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi, Çeşme, İzmir, Sözlü Bildiri
16. Saygılı Suna, Gümüşay Mehmet, **Gülbağca Fulya**, Sal Dila Hatun, Aydemir Işıl, Tuğlu Mehmet İbrahim, Kaya Adnan, Effects Of Pulsed Electromagnetic Fields On The L929 Cell Behavior During İn Vitro Wound Healing, 6. Oksidatif Stres, Kalsiyum Sinyali Ve Trp Kanalları Dünya Kongresi,J Cell Neurosci Oxid Stress, Volume 8, Number 1, 2016 E-ISSN Number: 2149-7222,Sözlü Bildiri
17. Işıl Aydemir, Pınar Kılıçaslan Sönmez, Mahmud Özkut, Dila Hatun Sal, **Fulya Gülbağca**, Suna Saygılı, Mehmet İbrahim Tuğlu, The effects of stem cells applications on the oxidative stress and apoptosis during implantation, 6. Oksidatif Stres, Kalsiyum Sinyali Ve Trp Kanalları Dünya Kongresi, ,J Cell Neurosci Oxid Stress, Volume 8, Number 1, 2016 E-ISSN Number: 2149-7222, Sözlü Bildiri
18. Tuğlu Mehmet İbrahim, Aydemir Işıl, Özkud Mahmud, Fırat Fatma, Kılçarsalan Pınar, Sal Dila, Saygılı Suna, **Gülbağca Fulya**, P Mıs 127the

Functional Effect Of Stem Cells On Thereproductive Organs, Febs, Özet Bildiri

19. Aydemir Işıl, Kılıçaslan Pınar, Saygılı Suna, Sal Dila, **Gülbağca Fulya**, Özkut Mahmud, Tuğlu Mehmet İbrahim, P 05 03 3 039effects Of Stem Cells Applications On Growthfactors During Implantation, Febs, Özet Bildiri
20. Gümüşay Mehmet, **Gülbağca Fulya**, Saygılı Suna, Aydemir Işıl, Kaya Adnan, Tuğlu Mehmet İbrahim, Darbeli Elektromanyetik Alan Cihazı Tasarımı Ve Kontrollü Alanların Sıçan Derisinde Oluşturulan Yaraya Etkisi, Biyomut2016, Tam Metin Bildiri
21. Tuğlu Mehmet İbrahim, **Gülbağca Fulya**, Sal Dila, Saygılı Suna, Sönmez Pınar, Aydemir Işıl, Özkut Mahmud, Öztürk Şamil, Gümüşay Mehmet, Kaya Adnan, Keskin Nazan, Elektro Manyetik Alanların Hücre Davranışına Etkisi The Effect Of Electro Magnetic Fields On Cell Behaviour, Biyomut2016, Tam Metin Bildiri
22. **Gülbağca Fulya**, Sal Dila, Saygılı Suna, Sönmez Pınar, Aydemir Işıl, Öztürk Şamil, Gümüşay Mehmet, Kaya Adnan, Tuğlu Mehmet İbrahim, Sıçanlarda Deneysel Varikozel Modelinde Elektromanyetik Alan Uygulamalarının Etkisi, Biyomut2016, Tam Metin Bildiri
23. Gümüşay Mehmet, **Gülbağca Fulya**, Saygılı Suna, Aydemir Işıl, Kaya Adnan, Tuğlu Mehmet İbrahim, 75 Comprassion Of The Effect Of Pulsed Electromagnetic Field And Pulsedradio Frequency Energy On Wound Healing İn Rats, Tıptekno2016, Tam Metin Bildiri
24. Saygılı Suna, Aydemir Işıl, Kılıçaslan Sönmez Pınar, Sal Dila Hatun, **Gülbagca Fulya**, Tuğlu Mehmet İbrahim, Effect Of Adipose Derived Stem Cells In Experimentally Undescended Testes Rat Model, 15. International Cytochemistry And Histochemistry Congress, Özet Bildiri
25. Pınar Kılıçaslan Sönmez, **Fulya Gülbağca**, Mahmud Özkut, Mesut Mete, Fatma Şimşek, Tahir Burhan, Sevinç İnan, Mehmet İbrahim Tuğlu, Medicinal

Herbs Used as a Support for Cancer Treatment in Culture, MESMAP-4 ABSTRACTS April 18th - 22th, 2018 / Antalya – Turkey

26. **Fulya Gülbağça**, Pınar Kılıçaslan Sönmez, Mahmud Özkut, Mesut Mete, Fatma Şimşek, Tahir Burhan, Sevinç İnan, Mehmet İbrahim Tuğlu, The Effect of Different Medicinal Herbs on Diffucult Wound Healing in Experimental In Vitro Skin and Bone Formation Model, MESMAP-4 ABSTRACTS April 18th - 22th, 2018 / Antalya – Turkey
27. **Fulya Gülbağça**, Pınar Kiliçaslan Sönmez, Mahmud Özkut, Fatma Şimşek, Meltem Kuruş, Mehmet İbrahim Tuğlu, The antioxidant effect of ganoderma lucidum on the rat sperm for male infertility, 7th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels, 20-23 Apr. 2018-sözlü bildiri
28. **Fulya Gülbağça**, Pınar Kiliçaslan Sönmez, Mahmud Özkut, Fatma Şimşek, Meltem Kuruş, Mehmet İbrahim Tuğlu, The antioxidant effect of ganoderma lucidum on the rat sperm for male infertility, J Cell Neurosci Oxid Stress 2018; 10 (2)
29. Pınar Kılıçaslan Sönmez, **Fulya Gülbağça**, Mahmud Özkut, Mehmet İbrahim Tuğlu, Effect of stem cell treatment on experimental diabetic skin wound healing, 7th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels, 20-23 Apr. 2018-sözlü bildiri
30. Pınar Kılıçaslan Sönmez, **Fulya Gülbağça**, Mahmud Özkut, Mehmet İbrahim Tuğlu, Effect of stem cell treatment on experimental diabetic skin wound healing, J Cell Neurosci Oxid Stress 2018; 10 (2)
31. **Fulya Gülbağça**, Pınar Kılıçaslan Sönmez, Mahmud Özkut, Tahir Buran, Sevinç İnan, Mehmet İbrahim Tuğlu' Viscum album uygulamasının meme kanseri hücre hatlarında etkisi, III. Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi, 11-13 MAYIS 2018-sözlü bildiri
32. **Fulya Gülbağça**, Pınar Kiliçaslan Sönmez, Mahmud Özkut, Fatma Şimşek, Meltem Kuruş, Mehmet İbrahim Tuğlu, Kök hücreden farklandırılan osteoblastlarca oluşturulan kemik benzeri doku ile taklit edilen diyabet ve menopoza etkisine kültür ortamında yara iyileşmesinde kök hücre ve nişinin etkisi, II. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu-200218- sözlü bildiri

33. Pınar Kiliçaslan Sönmez, **Fulya Gülbağça**,Mahmud Özkut,Fatma Şimşek, Meltem Kuruş, Mehmet İbrahim Tuğlu, Kültür ortamında oluşturulan yara modelinde farklı kök hücrelerin I-929 fibroblast hücreleri ile iyileşme açısından karşılaştırılması, II. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu-200218-sözlü bildiri
34. Mahmud Özkut,**Fulya Gülbağça**,Pınar Kiliçaslan Sönmez,Fatma Şimşek, Meltem Kuruş, Mehmet İbrahim Tuğlu,Kültür ortamında diyabetik model ile sıçan sperminde oluşan hasara kök hücre nişinin etkisi, II. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu-200218-sözlü bildiri

BURS/ÖDÜL:

24-25 Mayıs 2018-FEBS Advanced Lecture Course 2018 - 50 Years of Molecular Life Sciences with FEBS Letters-bursiyer katılımcı kabulü