



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DENEYSEL TESTİKÜLER İSKEMİ
REPERFÜZYON MODELİNDE *p*-KUMARİK
ASİT'İN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Hüseyin Çınar ZİHNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2021



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DENEYSEL TESTİKÜLER İSKEMİ
REPERFÜZYON MODELİNDE *p*-KUMARİK
ASİT'İN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Hüseyin Çınar ZİHNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2021

ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Hüseyin Çınar ZİHNİ'nin hazırladığı “Deneysel Testiküler İskemi Reperfüzyon Modelinde p-Kumarik Asit'in Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı çalışma Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11.08.2021



Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne/...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

11.08.2021

Hüseyin Çınar ZİHNİ

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na ve yüksek lisans öğrenimimde emeği geçen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Tezin her aşamasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye ve Doç. Dr. Selim DEMİR'e, doku histopatolojik incelemelerini gerçekleştiren Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU'na ve ekibine, ratlarda cerrahi modeli uygulayan Dr. Öğr. Üyesi İlke Onur KAZAZ'a ve ekibine, deneysel aşamadaki katkılarından dolayı Öğr. Gör. Dr. Elif AYAZOĞLU DEMİR'e,

Başta Öğr. Gör. Nihal TÜRKMEN olmak üzere Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Hayatım boyunca her konuda yanımda olan bugünlere gelmemi büyük bir sabırla destekleyen canım aileme, en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Hüseyin Çınar ZİHNİ

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: THD-2020-8819

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)	3
2.1.1. Fenolik Asitler	3
2.1.2. <i>p</i> -Kumarik Asit	4
2.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Sistem	4
2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri	4
2.2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	6
2.2.2.1. Süperoksit Dismutaz	6
2.2.2.2. Glutasyon Peroksidaz	7
2.2.2.3. Katalaz	7
2.2.2.4. Glutasyon	7
2.2.3. Oksidatif Stres ve Biyomoleküllere Etkileri	8
2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı	9
2.3.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Oksidatif Stresin Rolü	12
2.3.1.1. Ksantin Oksidoredüktaz	13
2.3.1.2. NADPH Oksidaz	14
2.3.1.3. Mitokondri	14
2.3.2. İskemi Reperfüzyon Hasarında İnflamatuvar Süreç	15
2.3.3. No-reflow Fenomeni	16

2.4. Testis Torsiyonu	17
2.4.1. Testiküler İskemi Reperfüzyon Hasarı	17
2.4.2. Testis Antioksidan Sistemi	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri	20
3.2. Deneyin Planlanması	21
3.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	21
3.4. Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması	22
3.5. Biyokimyasal İncelemeler	23
3.5.1. Örneklerin Çalışmaya Hazırlanması	23
3.5.1.1. Serum Örneklerinin Hazırlanışı	23
3.5.1.2. Doku Örneklerinin Hazırlanışı	23
3.5.2. Doku Örneklerindeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi	23
3.5.3. MDA Seviyelerinin Belirlenmesi	24
3.5.3.1. Serum MDA Seviyesi Tayini	25
3.5.3.2. Doku MDA Seviyesi Tayini	27
3.5.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Seviyelerinin Belirlenmesi	28
3.5.5. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Seviyelerinin Belirlenmesi	29
3.5.6. Glutasyon (GSH) Seviyelerinin Belirlenmesi	31
3.5.7. Toplam Oksidan Durumun (TOS) Belirlenmesi	32
3.5.8. Toplam Antioksidan Durumun (TAS) Belirlenmesi	33
3.5.9. Oksidatif Stres İndeksi'nin (OSİ) Hesaplanması	34
3.6. Histopatolojik İncelemeler	34
3.7. İstatistiksel Yöntemler	35
4. BULGULAR	36
4.1. Biyokimyasal Bulgular	36
4.2. Histopatolojik Bulgular	39
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	43
6. KAYNAKLAR	50
EKLER	61
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	62
ÖZGEÇMİŞ	64

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri	5
Tablo 2. Kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları	20
Tablo 3. Kullanılan kimyasallar ve kitlerin üretici firma ve kodları	21
Tablo 4. Serum MDA seviyesi ölçümü için yapılan işlemler	26
Tablo 5. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan işlemler	27
Tablo 6. TOS tayini için yapılan işlemler	32
Tablo 7. TAS tayini için yapılan işlemler	33
Tablo 8. Johnsen testiküler biyopsi skorlaması	34
Tablo 9. Doku örneklerindeki biyokimyasal parametre sonuçları	37
Tablo 10. Serum örneklerindeki biyokimyasal parametre sonuçları	38
Tablo 11. Doku örneklerindeki histopatolojik parametre sonuçları	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. <i>p</i> -CA'nın kimyasal yapısı	4
Şekil 2. İ/R hasarındaki patolojik olaylar	10
Şekil 3. Reperfüzyon fazında mitokondri	12
Şekil 4. Ksantin oksidazdan süperoksit oluşumu	13
Şekil 5. Testiküler T/D'nin mekanizması	18
Şekil 6. Metodoloji ve değerlendirmelerin şematik diyagramı	22
Şekil 7. Protein tayininde kullanılan albumin standart grafiği	24
Şekil 8. Serum MDA tayininde kullanılan standart grafiği	26
Şekil 9. Doku MDA tayininde kullanılan standart grafiği	28
Şekil 10. SOD tayininde kullanılan standart grafiği	29
Şekil 11. GPx tayininde kullanılan standart grafiği	30
Şekil 12. GSH tayininde kullanılan standart grafiği	32

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	Kontrol grubuna ait testis kesiti	40
Resim 2.	İ/R grubuna ait testis kesiti	40
Resim 3.	Etanol grubuna ait testis kesiti	41
Resim 4.	İ/R+p-CA 50 mg/kg grubuna ait testis kesiti	41
Resim 5.	İ/R+p-CA 100 mg/kg grubuna ait testis kesiti	42



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

CAM	Hücre adezyon molekülü
CAT	Katalaz
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
4-HNE	4-hidroksi-2-nonenal
HOCl	Hipokloröz asit
HRP	Horseradish peroksidaz
ICAM-1	Hücreler arası adezyon molekülü-1
İMM	İç mitokondriyal membran
İ/R	İskemi/reperfüzyon
JTBS	Johnsen testiküler biyopsi skoru
MAPK	Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1
MDA	Malondialdehid
MPTP	Mitokondriyal geçirgenlik değişim gözeneği
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ antiportör
NHE	Na ⁺ /H ⁺ taşıyıcısı
NFκB	Nükleer faktör kappa beta
NOX/DUOX	NADPH oksidaz/Dual oksidaz
OSİ	Oksidatif stres indeksi
p-CA	<i>para</i> -Kumarik asit
PHGPx	Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
T/D	Torsiyon/detorsiyon
TAS	Toplam antioksidan durum
TOS	Toplam oksidan durum
TT	Testis torsiyonu

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
κ	Kappa
μ	Mikro
n	Nano
p	Para
Ψ	Psi

Formüller

$C_9H_8O_3$	<i>p</i> -Kumarik asit
H_2O	Su
H_2SO_4	Sülfürük asit
$H_3P(W_3O_{10})_4H_2O$	Fosfotungstik asit
H_3PO_4	Fosforik asit

ÖZET

Deneyisel Testiküler İskemi Reperfüzyon Modelinde *p*-Kumarik Asit'in Etkilerinin İncelenmesi

Testis torsiyonu (TT), spermatik kordun dönmesinin neden olduğu, kan akışının kesilmesine ve testiküler iskemiye neden olan ürolojik bir acil durumdur. Testiküler iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarının patofizyolojisinde reaktif oksijen türleri (ROS) önemli rol oynar. *p*-Kumarik asit (*p*-CA) kumarik asitin doğada en fazla bulunan izomeridir; anti-inflamatuar, antibakteriyel, antioksidan ve antidiyabetik gibi pek çok biyolojik etkilere sahiptir. Bu çalışmada *p*-CA'nın testis torsiyonu/detorsiyonu (T/D) ile oluşturulan İ/R modeli üzerindeki etkileri araştırıldı. Çalışmada 35 adet Sprague Dawley (250-300 g) erkek rat kullanıldı ve her grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna yalnızca laparotomi uygulandı. İ/R grubunda sol testise 720° 4 saat torsiyon (iskemi), 2 saat detorsiyon (reperfüzyon) uygulandı. Etanol grubuna anestezi başlangıcından 3.5 saat sonra intraperitoneal (i.p) etanol verildi. Tedavi gruplarına detorsiyondan 30 dk önce i.p 50 ve 100 mg/kg dozlarında *p*-CA uygulandı. Doku ve serumda oksidatif stres ve antioksidan parametrelerin düzeyleri ölçüldü, ayrıca doku örnekleri histopatolojik olarak değerlendirildi. *p*-CA tedavisi, serum ve dokuda İ/R hasarı ile artmış malondialdehit (MDA) seviyelerini anlamlı derecede düşürdü. Dokuda süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi ($p>0.05$). Glutasyon peroksidaz (GPx) ve glutasyon (GSH) seviyeleri İ/R grubunda kontrole göre düşüktü. Toplam oksidan durum (TOS) seviyeleri İ/R ile artış gösterirken, toplam antioksidan durum (TAS) seviyeleri İ/R grubunda kontrole göre düşüktü. Serumda GPx seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark yoktu. GSH seviyeleri İ/R grubunda kontrole göre anlamlı derecede düşüktü. TAS, TOS seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Histopatolojik incelemede Johnsen testiküler biyopsi skoru (JTBS), İ/R ve *p*-CA tedavi gruplarında kontrole göre daha düşüktü. İ/R+*p*-CA 100 mg/kg grubunda İ/R grubuna göre histopatolojik skor seviyesi anlamlı olarak düzeldi. Çalışmamızın sonuçlarına göre *p*-CA testiküler İ/R hasarında oksidatif stresi azaltarak koruyucu etki gösterdi.

Anahtar Sözcükler: İskemi, *p*-Kumarik asit, Reperfüzyon, Testis torsiyonu

ABSTRACT

Investigation of the Effects of *p*-Coumaric Acid in the Experimental Testicular Ischemia Reperfusion Model

Testicular torsion (TT) is a urological emergency caused by rotation of the spermatic cord, leading to interruption of blood flow and testicular ischemia. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in the pathophysiology of testicular ischemia-reperfusion (I/R) injury. *p*-Coumaric acid (*p*-CA) is the most abundant naturally occurring isomer of coumaric acid; it has many biological effects such as anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant, and antidiabetic. In this study, the effects of *p*-CA on the I/R model created by testicular torsion/detorsion (T/D) were investigated. 35 Sprague Dawley (250-300 g) male rats were used in the study and they were divided into 5 groups with 7 rats in each group. Only laparotomy was applied to the control group. In the I/R group, 720° 4 hours of torsion (ischemia) and 2 hours of detorsion (reperfusion) were applied to the left testis. Intraperitoneal (i.p) ethanol was given to the ethanol group 3.5 hours after the onset of anesthesia. i.p 50 and 100 mg/kg doses of *p*-CA were administered to the treatment groups 30 minutes before detorsion. The levels of oxidative stress and antioxidant parameters were measured in tissue and serum, and tissue samples were also evaluated histopathologically. *p*-CA treatment significantly decreased in serum and tissue I/R damage and increased malondialdehyde (MDA) levels. Tissue superoxide dismutase (SOD) levels did not differ significantly between the groups ($p>0.05$). Glutathione peroxidase (GPx) and glutathione (GSH) levels were lower in the I/R group compared to the control. While total oxidant status (TOS) levels increased with I/R, total antioxidant status (TAS) levels were lower in the I/R group compared to the control. There was no significant difference between the groups in serum GPx levels. GSH levels were significantly lower in the I/R group than in the control. There was no significant difference between the groups in TAS and TOS levels. In the histopathological examination, Johnsen testicular biopsy score (JTBS) was lower in the I/R and *p*-CA treatment groups compared to the control. Histopathological score level improved significantly in the I/R+*p*-CA 100 mg/kg group compared to the I/R group. According to the results of our study, *p*-CA showed a protective effect by reducing oxidative stress in testicular I/R damage.

Keywords: Ischemia, *p*-Coumaric acid, Reperfusion, Testicular torsion

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Testis torsiyonu (TT), spermatik kordun ve bileşenlerinin dönmesinden kaynaklanan ve etkilenen testiste kan akışının azalmasına, buna bağlı olarak testis atrofisine neden olan acil cerrahi durumlardan biridir (1). Spermatik kordun ve bileşenlerinin torsiyonu 4-6 saatte tedavi edilmezse orşiektomi, testis kaybı ve infertiliteye neden olabilmektedir. TT, testis ağrılarının diğer şikayetlerinden hızlı ve doğru bir şekilde ayrılmalı ve testis kaybı riski azaltılmalıdır (1, 2). Spermatik kord torsiyonu başlangıçta venöz basıncı ve konjesyonu artırır, ardından arteriyel kan akışında azalma ile testiküler iskemiye sebep olur (2). TT'yi düzeltmek için cerrahi müdahale, torsiyone testisin detorsiyonunu ve testis kan akışının restorasyonunu içerir. Bununla birlikte detorsiyon testiste reperfüzyon hasarına neden olabilir. Testis T/D'de torsiyon iskemik dönemi, detorsiyon ise infertilite riski ile sonuçlanan reperfüzyon hasarını içerir (3). İskemi dokuların hipoperfüzyonu olarak tanımlanır (4). Reperfüzyon sırasında oksijenli kanın yeniden dokuya gelişi ile ATP üretimi sağlanır bu durum hücrelerde bulunan biyomolekülleri etkileyerek daha fazla hücre fonksiyon bozukluğu oluşturabilen reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ile sonuçlanır (1). Testis hasarının altında yatan temel patolojik mekanizma tam olarak anlaşılamamasına rağmen, İ/R sırasında oluşan ROS'un bu süreçte önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (5).

Fenolik asitler yapılarında hidroksil grubu bulunan bir aromatik halka içerirler (6). Fenolik asitler hidroksisinnamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olarak iki gruba ayrılır (7). Kumarik asit, sinamik asidin bir hidroksi türevidir ve üç izomer halinde bulunur; *o*-kumarik, *m*-kumarik ve *p*-kumarik asit (*p*-CA). Doğada en fazla bulunanı ise *p*-CA'dır. Bu üç molekül arasındaki fark, aromatik halkadaki hidroksil grubunun farklı konumlanmasıdır (8). *p*-CA'nın güçlü bir antioksidan, ROS ve serbest radikal temizleyicisi olduğu belirtilmektedir (9). Antidiyabetik, antihiperlipidemik, antikanser, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, anti-ülser, anksiyolitik, antipiretik, analjezik, anti-artritik ve nöroprotektif etkilerin yanı sıra trombosit agregasyonunun önlenmesine yönelik etkileri de bildirilmektedir (10). *p*-CA'nın çeşitli deneysel İ/R modellerinde koruyucu etkisi gösterilmiştir (10-12). Yine *p*-CA'nın etanol indüklü erkek üreme toksisitesine karşı koruyucu etkisi de incelenmiştir (13). Fakat yapılan literatür taramasında *p*-CA'nın testis T/D modelindeki etkilerini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Deneysel testiküler İ/R modellerinde, oksidatif hasarı önlemek amacıyla yeni antioksidan ajanlar tedavide denenmektedir (14-16). Bu tez çalışması ile deneysel testis T/D

ile oluşturulan İ/R modelinde *p*-CA'nın etkisini bazı oksidatif hasar göstergeleri (malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx), toplam antioksidan durum (TAS), toplam oksidan durum (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ)) ve histopatolojik parametrelerle (Johnsen testiküler biyopsi skoru (JTBS)) değerlendirmeyi amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)

Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerin birçoğunda bulunan sekonder metabolitler olup, bitkilerin renk, koku ve tadından sorumludurlar (17). Fenolik bileşikler yapılarında bulunan hidroksil grupları eklenmiş bir veya daha fazla aromatik halka sayesinde antioksidan özellik gösterir (6, 18). Genel olarak flavonoidler ve fenolik asitler olarak iki gruba ayrılırlar. Polifenoller, polifenol radikalleri oluşturmak için radikallerle reaksiyona girebilir. Polifenol radikali, fenol grubunun ekstra elektronları absorbe etme kabiliyeti nedeniyle daha kararlı ve daha az reaktiftir. Polifenollerin çoğu, metabolizma sırasında metilasyon, sülfasyon veya glukuronidasyon ile konjuge edilir (6).

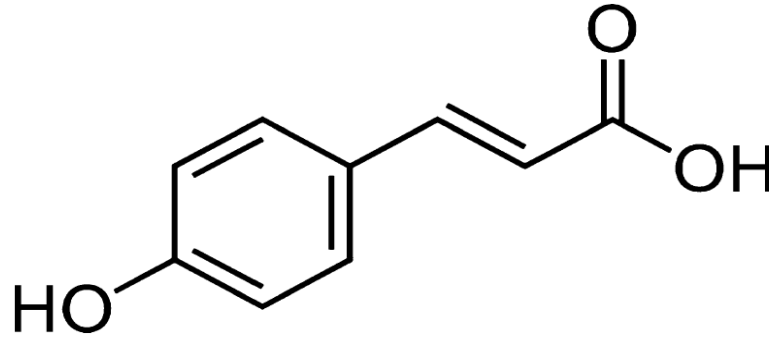
2.1.1. Fenolik Asitler

Fenolik asit terimi genellikle bir karboksilik asit grubuna sahip olan fenolik bileşikler tanımlar. Fenolik asitler veya fenolkarboksilik asitler bitkilerde doğal olarak ortaya çıkan aromatik karboksilik asitlerdir (19, 20). Karboksilik asitlerin sayısına bağlı olarak doğal fenolik asitler iki ana grupta sınıflandırılır: sırasıyla benzoik asit ve sinnamik asitten türetilen hidroksibenzoik asitler (C_6-C_1) ve hidroksisinnamik asitler (C_6-C_3) (7). En yaygın hidroksisinnamik asitler; ferulik, kafeik, *p*-kumarik ve sinapik asitlerdir. Yaygın olarak bulunan hidroksibenzoik asitler; *p*-hidroksibenzoik, protokatekuik, vanilik ve sirinjik asitlerdir (19).

Fenolik asitlerin antioksidan potansiyeli kimyasal yapılarına bağlıdır (8). Fenolik asitler, fenol grubu reaktivitesinden dolayı antioksidan özellik gösterir. Fenolik asitlerin hidrojen atomu verilmesi ile radikal süpürücü etkisinin antioksidan aktivitesi için ana yöntem olduğu düşünülmektedir. Fenolik asitlerde aromatik halka üzerindeki substitüentler, yapının stabilizasyonunu ve radikal bastırıcı özelliğini etkiler (19). Hidroksil veya katekol gruplarının sayısının artması, sülfidril veya amid gibi diğer hidrojen veren grupların varlığı, radikal süpürücü aktivitesini artırır (21). Fenolik asitler hem ROS hem de reaktif nitrojen türleri'nin (RNS) neden olduğu hücre hasarını, doğrudan serbest radikal temizleme aktivitelerinin yanı sıra, hem oksijenaz/biliverdin redüktaz (HO/BVR) sistemi, SOD ve katalaz (CAT) upregülasyonu ile de karşılar (20).

2.1.2. *p*-Kumarik Asit

Kumarik asitler, fenil grubu mono-hidroksile edilmiş sinnamik asit türevleridir. 4-hidroksisinnamik asit olarak da bilinen *p*-CA, kumarik asitlerin doğada en bol bulunan izoformudur. Domates, havuç, soğan, elma, armut, kahve, çilek, mısır ve buğday gibi pek çok meyvede, sebzede ve tahılda bulunur (8, 9). Bitkilerde serbest formda bulunabilir veya aminler, organik asitler, alkoller, mono veya oligosakkaritler ve lignin gibi diğer moleküllere konjuge edilebilir. Konjuge formlar daha fazla bulunur ve serbest *p*-CA'dan daha güçlü biyolojik aktivitelere sahiptir. *p*-CA (C₉H₈O₃), 164.16 g/mol moleküler ağırlığa ve 211.5 °C erime noktasına sahip sarımsı yeşil kristalimsi bir toz halindedir. Etanol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve dimetilformamid gibi organik çözücülerde çözünür; ancak suda veya sulu tamponlarda kolayca çözünmez. Konjuge *p*-CA'nın çözünürlüğü, asitin esterleştiği moleküllere bağlıdır (8). *p*-CA'nın kimyasal yapısı (Şekil 1), melanositlerde hücrel melanogenezde yer alan tirozinazın doğal substratı olan L-tirozine çok benzemektedir. *p*-CA'nın, insan tirozinazının güçlü ve seçici bir inhibitörü olduğu bulunmuştur (9). *p*-CA, antioksidan aktivitesinden sorumlu bir fenil hidroksil grubuna sahiptir (8).



Şekil 1. *p*-CA'nın kimyasal yapısı (Saibabu'dan, 20)

2.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Sistem

2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri

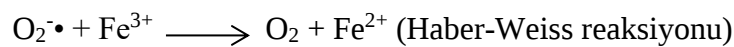
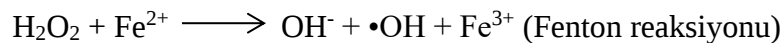
Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren reaktif moleküllere serbest radikaller denir. İki serbest radikal eşleşmemiş elektronlarını paylaştığında, radikal olmayan formlar oluşur (22, 23). ROS, oksijenin normal metabolizması sırasında doğal yan ürünler olarak oluşan eşleşmemiş elektronların varlığıyla karakterize edilen, küçük moleküller veya moleküler iyonlardır (24). Eşleşmemiş değerlik elektronlarının varlığından dolayı oldukça

reaktifler (25, 26). ROS terimi Tablo 1’de gösterilen radikal ve radikal olmayan molekülleri kapsayacak şekilde kullanılır (23, 27).

Tablo 1. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri (Karabulut’tan, 28)

Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$\cdot OH$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksil	$ROO\cdot$	Ozon	O_3
Alkoksil	$RO\cdot$	Singlet Oksijen	1O_2
Hidroperoksil	$HO_2\cdot$		
Lipid peroksil	$LOO\cdot$		

Moleküler oksijen (O_2) normalde iki eşleşmemiş elektron taşır, bu durum oksijeni radikal oluşumuna duyarlı hale getirir (29). ROS’un birincil formu, O_2 ’ye bir elektron eklenmesiyle oluşan süperoksit anyon radikalidir (24, 29, 30). Süperoksit radikalleri oldukça reaktif bileşiklerdir, *in vivo* olarak üretilebilirler (26). Süperoksit radikalleri, ikincil ROS oluşturmak için doğrudan veya diğer moleküllerle enzim veya metal katalizli reaksiyonlar yoluyla daha fazla etkileşime girebildikleri için çok kısa yarı ömre sahiptir (24). Süperoksit anyonu hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine dönüşebilir (29). Hidrojen peroksit, eşleşmemiş elektron içermediğinden serbest radikal değildir. En önemli özelliği, süperoksitin genellikle yapamadığı hücre membranlarından kolayca difüze olabilmesidir (24, 26). Hidrojen peroksit, Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikalini oluşturmak için indirgenmiş geçiş metalleri (Fe^{2+} veya Cu^+) ile reaksiyona girer (31). Süperoksit radikali Haber-Weiss reaksiyonu ile oksitlenmiş geçiş metalleri formuyla (Fe^{3+} veya Cu^{2+}) reaksiyona girerek indirgenmiş geçiş metal formunun üretimine yol açar bu durum redoks döngüsünün tekrar etmesini sağlar (32).



Hidroksil radikali ($\cdot OH$), hidroksit iyonunun nötr formudur (30). Güçlü oksitleme potansiyeline sahip oldukça reaktif bir ROS’tur ve bu nedenle toksik bir radikal olarak kabul

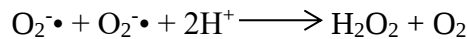
edilir. *In vivo*, hidroksil radikalının yarı ömrü kısadır ve oluşum yerlerinin yakınında reaksiyona girer (24). ROS patolojik etkilerinin çoğunu hidroksil radikal oluşumuna yol açarak gösterir. Bunun nedeni hidroksil radikalının, lipidler ve nükleotidler gibi canlı hücrelerde bulunan hemen hemen her tür molekülle son derece yüksek hızla reaksiyona girmesidir (31). Hidroksil radikali, spontan dismutasyon reaksiyonu sonucu süperoksit üreten herhangi bir biyolojik sistem tarafından üretilebilir (26).

2.2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, hücrede düşük konsantrasyonlarda bulunan ve substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya önleyen maddelerdir (33). Oksitleyici ajan, üzerine elektron alarak indirgenir ve reaktan, elektronları vererek oksitlenir. Antioksidanlar genellikle indirgeyici ajanlardır (34). Aerobik organizmalar, aerobik solunum ve substrat oksidasyonu sonucu üretilen ROS'u uzaklaştıracak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları içeren entegre antioksidan sistemlere sahiptir (22, 35). Enzimatik antioksidan savunma sisteminde SOD, GPx, CAT bulunur. Enzimatik olmayan antioksidanlar askorbik asit (Vitamin C), Vitamin E, GSH, karotenoidler, flavonoidler ve diğer antioksidanlardır (30).

2.2.2.1. Süperoksit Dismutaz

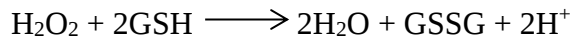
Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1), yüksek derecede reaktif süperoksit anyonunun O₂'ye ve daha az reaktif olan H₂O₂'ye dismutasyonunu katalize eden antioksidan enzimdir (35).



Kofaktörleri, inhibitörlere duyarlılıkları ve bulundukları doku bakımından üç tip SOD vardır (36). SOD'un sitozolik (Cu-ZnSOD, SOD-1), mitokondriyal (Mn-SOD; SOD-2) ve ekstraselüler (EC-SOD; SOD-3) formlarının tamamı ping pong tipi bir mekanizma ile enzimin aktif bölgesindeki geçiş metalinin art arda yükseltgenmesi-indirgenmesi yoluyla süperoksit anyonun dismutasyonunu katalize eder (25, 35). İnsandaki toplam SOD miktarı 3.5-4.0 g olarak kabul edilir. En yüksek aktivitesi karaciğerde iken en düşük aktivitesi adipoz dokuda görülür. Organizmadaki toplam SOD aktivitesinin %85-90'ının Cu-ZnSOD izomerinden kaynaklandığı kabul edilir (36).

2.2.2.2. Glutasyon Peroksidaz

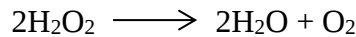
Glutasyon peroksidazlar (E.C. 1.11.1.9), selenyum içerir, enzim aktivitesi için gerekli dört özdeş alt birimin her birinde bir selenosistein rezidüsü bulunur (35). GPx'ler H_2O_2 'yi detoksifiye etmek için GSH'nin indirgeyici gücünü kullanır, sistein rezidüsünün sülfhidril grubu GPx aktivitesi için gereken indirgeyici gücü sağlar (37). Enzim, yüksek oranda GSH'ye spesifiktir. GPx, GSH'deki tiyol gruplarını H_2O_2 saldırısından korur. Düşük H_2O_2 konsantrasyonunda fizyolojik koşullarda, GPx, CAT'a kıyasla H_2O_2 için daha güçlü afinite sergiler (36).



GPx'in 5 izoenzimi vardır, her izoformun seviyeleri doku tipine göre değişir. GPx-1 ve fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PHGPx veya GPx-4) çoğu dokuda bulunur. GPx-4 hem sitozol hem de membran fraksiyonunda bulunur (35).

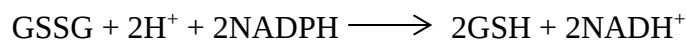
2.2.2.3. Katalaz

Peroksizomlarda lokalize olan CAT (E.C. 1.11.1.6) H_2O_2 'nin ayrışmasını katalizler. CAT, yalnızca serbest H_2O_2 moleküllerine afinite gösterir. Fizyolojik şartlarda CAT, H_2O_2 konsantrasyonunu kontrol ederek, hücrelerde birikmesini önler ve patolojilere yol açabilecek oksidatif saldırılardan korur. H_2O_2 konsantrasyonlarının kontrolünde CAT, GPx ile birlikte hareket eder (36).



2.2.2.4. Glutasyon

Glutasyon, ROS'a karşı en önemli hücre içi korumayı sağlar. Serbest radikalleri doğrudan temizleyen bir sülfhidril grubu içerir (29). GSH, tüm hücrelerde bol miktarda bulunur. GSH, antioksidan etkilerini çeşitli şekillerde gösterir. GPx'in etkisiyle hidrojen peroksit ve lipid peroksitleri detoksifiye eder. GSH, H_2O_2 'ye, elektron vererek H_2O ve O_2 'ye indirger. Yükseltgenmiş glutasyon (GSSG), elektron vericisi olarak NAD(P)H kullanan GSH redüktaz tarafından tekrar GSH'ye indirgenir. GSH, elektronları membran lipidlerine verir ve onları oksidan saldırılarından korur (22).



2.2.3. Oksidatif Stres ve Biyomoleküllere Etkileri

ROS, iç ve dış uyaranlara yanıt olarak aerobik organizmalarda sürekli olarak üretilir, stres altında seviyelerinde artış olur (35, 38). Normal koşullar altında ROS, redoksa duyarlı sinyal yolları ile birkaç önemli fizyolojik cevabı düzenledikleri için yararlı etkilere sahiptir. ROS hücrel büyüme, farklılaşmayı ve göçü kontrol eder, vasküler tonusu ve hücrel adezyonu düzenler, redoks bağımlı nükleer faktör- κ B (NF- κ B) veya mitojen ile aktive edilmiş protein kinazlar (MAPK) tarafından transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzeyde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) üretimine katkıda bulunur ve anjiyogenez ile apoptozu kontrol eder (39).

İyi dengelenmiş oksidan-antioksidan sistem, normal hücrel işlevler için faydalı oksidanların oluşumuna izin verir ve aynı zamanda aşırı oksidatif stresin zararlı etkilerini de önler (23, 29). Oksidan-antioksidan arasındaki dengenin oksidanların lehine kayması durumuna oksidatif stres denir (22). Oksidatif stres; kanser, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, ateroskleroz, obezite, insülin direnci, hipertansiyon, İ/R, diyabet, akut solunum sıkıntısı sendromu, idiyopatik pulmoner fibroz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, astım, kronik böbrek hastalığı dahil olmak üzere birçok patolojik durum ve yaşlanma gibi fizyolojik süreçle ilişkilendirilmiştir (22, 40).

Reaktif oksijen türleri'nin en reaktif hali olan hidroksil radikali, proteinlere, lipitlere, karbohidratlara ve DNA'ya zarar verebilir. Serbest radikaller, yan zincir metilen karbonundan bir hidrojen atomu çıkararak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını başlatabilir (22). Lipid peroksidasyonu başlatıldıktan sonra, son ürünler üretilinceye kadar zincir reaksiyonları devam eder. Bu nedenle MDA, 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) ve izoprostanlar gibi lipid peroksidasyonunun son ürünleri biyolojik sistemlerde birikir. MDA, peroksida çoklu doymamış yağ asitlerinden, özellikle araşidonik asitten oluşan üç karbonlu bir bileşiktir (38). 4-HNE hücre içi GSH'nin tükenmesine neden olur ve peroksit üretimini indükler (22). Ayrıca 4-HNE ve MDA kovalent olarak proteinlere ve DNA'ya bağlanarak sinyalleşme sürecini etkileyebilir (41).

Reaktif oksijen türleri, peptid zincirinin parçalanmasına, proteinlerin elektrik yükünün değişmesine, proteinlerin çapraz bağlanmasına ve spesifik amino asitlerin oksidasyonuna neden olur (22). Proteinlerin tüm amino asit rezidülerinin (özellikle triptofan, sistein ve metiyonin) yan zincirleri, ROS'un oluşturduğu oksidasyona duyarlıdır (33).

DNA bazları ROS oksidasyonuna çok duyarlıdır ve DNA bazlarının *in vivo* baskın saptanabilir oksidasyon ürünü 8-hidroksi-2-deoksiguanozin'dir. DNA bazlarının oksidasyonu hem nükleer hem de mitokondriyal DNA'da mutasyonlara ve delesyonlara neden olabilir. Mitokondriyal DNA, birincil ROS kaynağına yakınlığı ve nükleer DNA ile karşılaştırıldığında yetersiz onarım kapasitesi nedeniyle özellikle oksidatif hasara eğilimlidir (38).

Aktive edilmiş nötrofillerde, H₂O₂ klorür iyonu varlığında miyeloperoksidaz tarafından hipokloröz aside (HOCl) dönüştürülür. HOCl oldukça oksidatiftir, DNA ile reaksiyona girebilir, DNA-protein etkileşimlerini indükleyebilir, pirimidin oksidasyon ürünleri üretebilir ve DNA bazlarına klorür ekleyebilir (22).

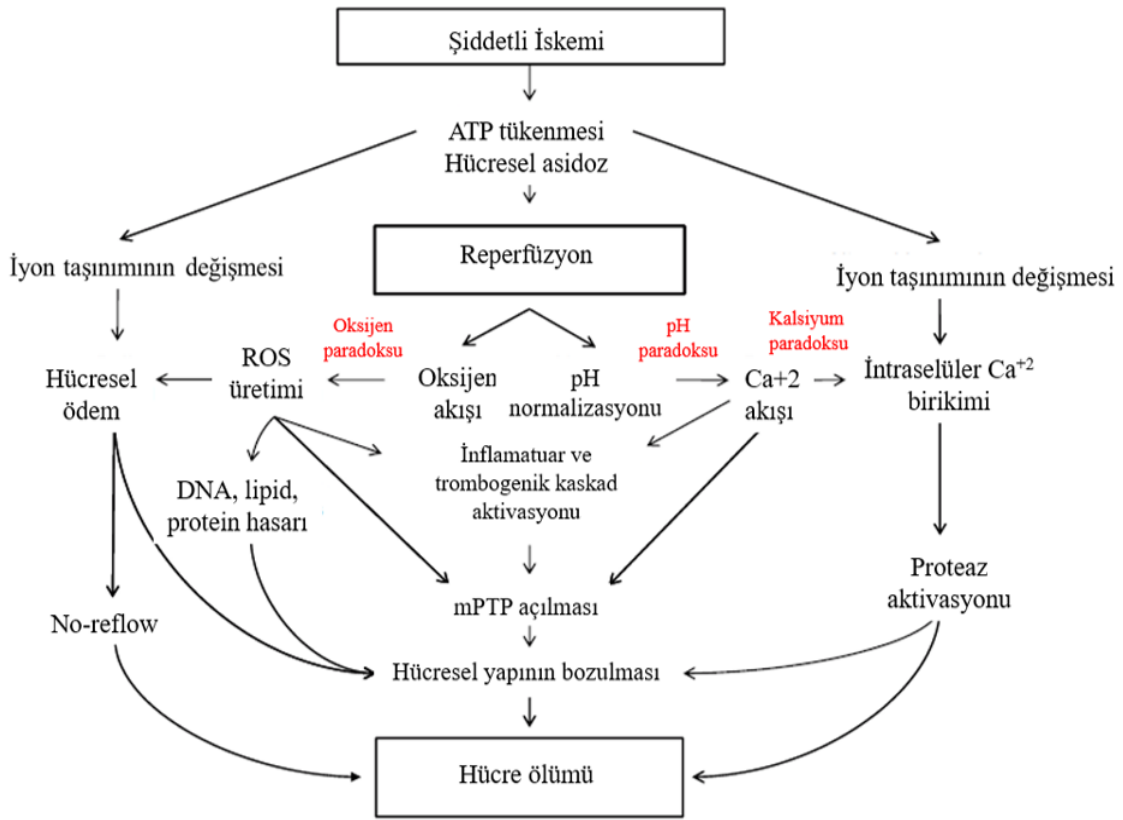
GSH/GSSG oranının yüksek olması hücrenin oksidatif hasardan korunması için önemlidir (22, 24). Bu orandaki bir azalma, indirgenmiş bir GSH formundan oksitlenmiş bir GSH formuna göreceli bir kaymayı gösterir, bu da oksidatif stresin hücresel veya doku seviyesinde varlığını gösterir (38). Bu durum inflamatuvar yanıtta rol oynayan NF-κB, aktive protein-1, aktive edilmiş T hücre nükleer faktörü ve hipoksi ile indüklenbilir faktör-1 (HIF-1) gibi redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olur (22).

2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi reperfüzyon hasarı, iskemi sonrası kan akışının restorasyonu sırasında belirgin fonksiyonel ve yapısal değişiklikleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. İskeminin tersine çevrilmesine ek olarak, kan akışının onarımı, geri dönüşümsüz olarak hasar görmüş hücrelerin nekrozu, hücresel ödem ve dokunun tüm kısımlarına üniform olmayan kan akışı gibi potansiyel olarak çok zararlı etkilere neden olabilir. İskemi veya doku hipoksisi sırasında metabolik bozuklukların oluşumu bilinmesine rağmen klinik ve deneysel kanıtlar hücre ve doku fonksiyon bozukluğuna yol açan önemli olayların çoğunlukla reperfüzyon ile ilgili olduğunu göstermektedir. İ/R hasarı lokal ve sistemik etkileri olan patofizyolojik mekanizmaları içerir. Bu süreç temel olarak iki aşamada gerçekleşir: ilk önce iskemi sırasında, hücre enerjisinin tükenmesi ve ikinci olarak reperfüzyon sırasında oksidatif stres ve mikrosirkülasyon bozukluğunun yanı sıra inflamasyon ve apoptozdur. Reperfüzyon hasarının aşamalı olarak ilerleyebilmesi için başlamadan önce minimum bir iskemi dönemi gerekir (42).

Uzamış iskemi, hücrede metabolik ve yapısal değişikliklere neden olur. Hücre tipleri arasındaki hipoksik tolerans farklılık gösterse de uzun süreli anoksi veya şiddetli hipoksiyi

kaçınılmaz olarak hücresel nekroz takip eder (43). İskemi, hücreleri doğrudan etkiler ve oksijen eksikliğinden dolayı Şekil 2’de gösterilen bir dizi olayı tetikler. Oksidatif fosforilasyon, oksijen yokluğunda mitokondride meydana gelmez (44). Hücresel oksidatif fosforilasyonda iskemi kaynaklı azalmalar, ATP ve fosfokreatin dahil olmak üzere enerji açısından zengin fosfatların yeniden sentezlenememesine neden olur (43). Mitokondride ATP üretiminin azalması ile anaerobik metabolizmaya geçilir. Anaerobik metabolizma, hücrelerde daha düşük antioksidan madde üretimine sebep olur (4). Laktat, H^+ birikimi ve NADPH’nin mitokondri oksidasyonundaki azalma, hücreyi asitleştirir ayrıca anaerobik glikolizi inhibe eder (45).



Şekil 2. İ/R hasarındaki patolojik olaylar (Kalogeris'den, 46)

İskemide ATPaz bağımlı iyon taşınımı azalır (46). $Na^+/K^+/ATPaz$ pompasının aktivitesindeki azalma, hücre içi Na^+ konsantrasyonunda artışa ve hücre dışında K^+ tutulmasına neden olur (4, 45). Endoplazmik retikulumdaki Ca^{2+} geri alımını sınırlayan kalsiyum pompaları ($Ca^{2+}/ATPaz$) da işlevsiz hale gelir (4). Na^+ iyonlarının hücre içi

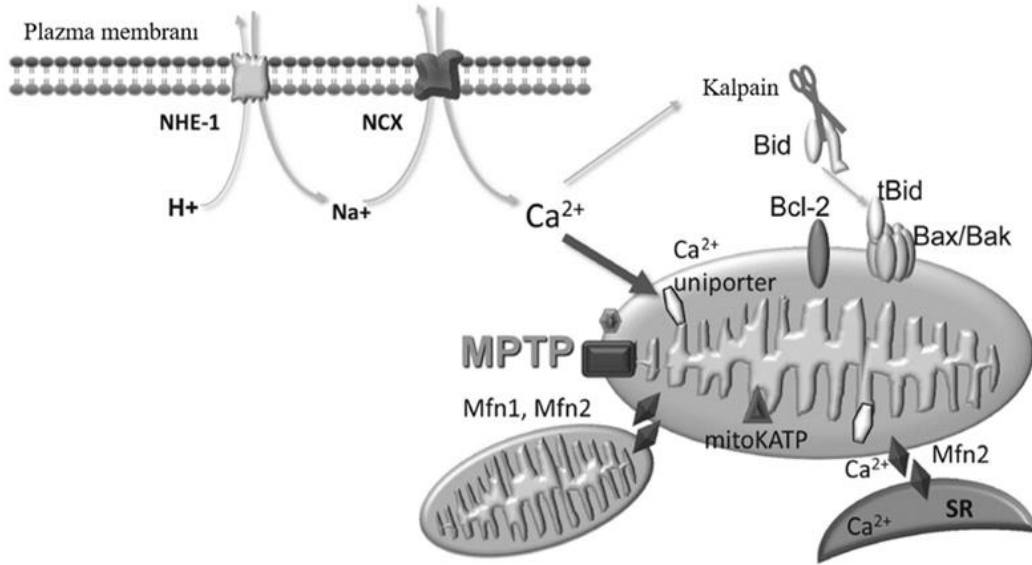
konsantrasyonundaki artış Na^+/H^+ taşıyıcısını (NHE) aktive eder (47). NHE, Na^+ karşılığında biriken H^+ 'yı ekstrüde eder. Na^+ iyonlarının akışı Na^+ ile Ca^{2+} arasında değişim yapan $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporturunu (NCX) aktive eder (46). NCX hücreden Na^+ ekstrüzyonunu sağlayarak Ca^{2+} hücre içi konsantrasyonunda artışa sebep olur (4, 45). İskemide hücrelerde H^+ , Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarının birikmesi, hiperosmolariteye neden olur; bu durum sitozole su girişi ve hücrel ödeme ile sonuçlanır. Hidrojen retansiyonu hücrel pH'yi düşürerek enzim aktivitesinde bozulmaya ve nükleer kromatinin birikimine yol açar. Ribozomların ayrılması, protein sentezini azaltır (4).

Reperfüzyonda ilk olarak moleküler oksijen, arteriyel kan yoluyla dokulara yeniden verilir böylece sitotoksik ROS üretimi için eksik olan substrat temin edilir (46). Reperfüzyon sırasında, laktatın hızla uzaklaştırılması ile fizyolojik pH renormalizasyonu paradoksal olarak artmış sitotoksisiteye yol açar (48, 49). Reperfüzyonda, NHE hücre içi protonları hücre dışı Na^+ ile değiştirir. Artan hücre içi Na^+ , NCX yoluyla ekstrüzyon için Ca^{2+} ile rekabet eder ve hücre içi Ca^{2+} birikmesine neden olur (50).

İskemi reperfüzyon esnasında Ca^{2+} 'nın sitozolik artışı Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı protein kinazları uyarabilir (1). Ayrıca fosfolipazlar (özellikle fosfolipaz A2) ve proteazlar (kalpainler ve diğerleri) gibi hidrolazları da aktive edebilir (51). Kalpain apoptozu tetiklemek için Bid'i proteolitik olarak aktive eder. Mitokondri, sarkoplazmik retikulumun özel bölgeleri (mitofusin-2) ile yakın etkileşim yoluyla kalsiyumu doğrudan alır (50). İ/R tarafından oluşturulan negatif $\Delta\Psi_m$ 'yi kullanan mitokondriyal Ca^{2+} uniporter, pozitif yüklü Ca^{2+} iyonlarının mitokondriyal matrikse hareketini sağlar (Şekil 3). Bu durum sitozolik Ca^{2+} 'yı azaltırken, mitokondriyal Ca^{2+} 'daki yükselmeler mitokondriyal geçirgenlik değişim gözenegi'nin (MPTP) açılmasını tetikler (46).

Hücrel hiperkalsemiye sekonder olan mitokondriyal hiperkalsemi, mitokondriyal ödemi indükler, iç mitokondri membranında (İMM) bulunan supramoleküler yapıları bozar ve membran potansiyelini ortadan kaldırır (45). Mitokondriyal transmembran potansiyelinin korunmasından sorumlu olan İMM, normalde iyonlara ve proteinlere karşı geçirgen değildir (48). Reperfüzyon ile İMM'deki MPTP 1.5 kDa'dan küçük tüm moleküllerin mitokondriyal matrikse serbestçe geçişine izin verir. İMM protonlara geçirgen hale geldikçe, oksidatif fosforilasyonu ve ATP üretimini bozar. MPTP'nin, iskemi sırasında duyarlılığı artar ancak H^+ MPTP'ye Ca^{2+} bağlanmasını inhibe eder ve por kapalı kalır (49, 52). MPTP'yi uyarıcıları arasında Ca^{2+} aşırı yükü, hızlı pH normalizasyonu ve oksidatif stres bulunur. ROS,

MPTP'nin açılmasını tetikleyebilir bu da mitokondriden ek serbest radikal salınımı ile sonuçlanan pozitif feedback'e sebep olur (ROS kaynaklı ROS salınımı) (48).



Şekil 3. Reperfüzyon fazında mitokondri (Gottlieb'den, 50)

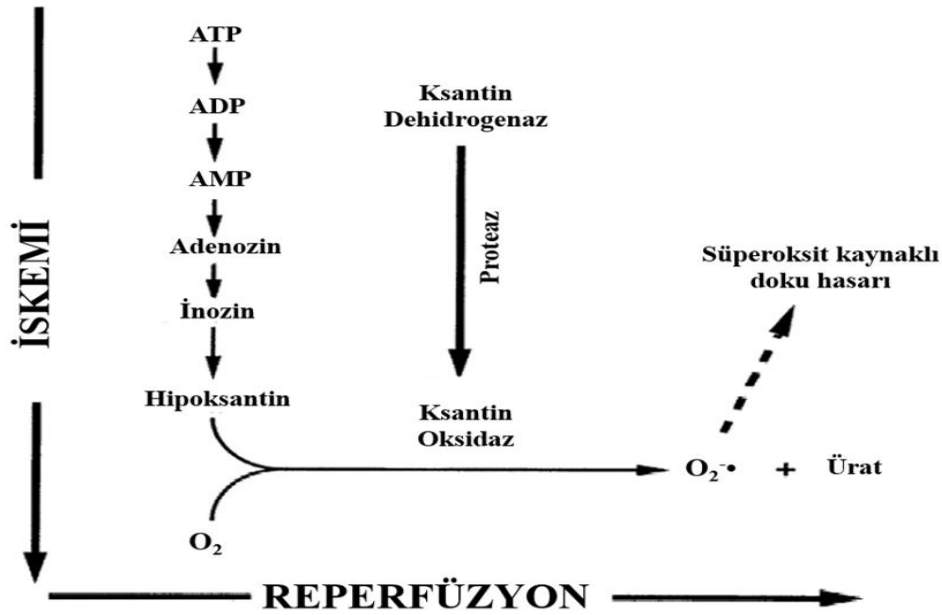
2.3.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Oksidatif Stresin Rolü

İskemi reperfüzyona maruz kalan dokularda ROS üretimi iki aşamada gerçekleşir. İlk aşama reperfüzyondan hemen sonra ortaya çıkan ve birkaç saat süren oksidatif stres durumu olup bu fazda mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif fosforilasyonun bozulması ile ROS'un mitokondriyal üretiminde artış görülür. Doku, ROS kaynaklı oksidatif strese karşı GSH azaldığından GPx sistemi ile karşı koymaya çalışır. Bu aşama hücresel hasar açısından geri dönüşümlüdür. Oksidatif stres kaynağına bağlı olarak saatlerce veya günlerce sürebilen ikinci faz ise, nötrofil infiltrasyonu ve makrofaj göçü ile geri dönüşümsüz doku hasarı ve inflamasyon ile ilişkilidir (53).

Oksidatif stres, enzimatik kaynaklardan ve enzimatik olmayan kaynaklardan üretilir. Yaygın enzimatik kaynaklar arasında ksantin oksidaz sistemi, NADPH oksidaz sistemi ve mitokondriyal elektron transport zinciri bulunur. Ekstremitte hasarında hemoglobin ve miyoglobin enzimatik olmayan minör oksidatif stres kaynağıdır (4).

2.3.1.1. Ksantin Oksidoredüktaz

Ksantin oksidoredüktaz pürin katabolizmasının hız kısıtlayıcı basamağını (ksantinin ürik asite hidroksilasyonu) kontrol eden kompleks molibdoflavoenzimdir (54). Birbirine dönüşebilen iki formda bulunur: ksantin dehidrogenaz ve ksantin oksidaz. Ksantin dehidrogenaz sağlıklı dokudaki baskın formdur, elektron alıcısı olarak NAD^+ kullanırken ksantin oksidaz O_2 kullanır (54, 55). Normal fizyolojik şartlarda hipoksantin ksantine oksidasyonu sırasında, ksantin dehidrogenaz ile NADH 'nin üretimi, NAD^+ veya O_2 'nin indirgenmesi ile eşzamanlı olarak gerçekleşir. Bununla birlikte, ksantin dehidrogenaz, iskemi sırasında ksantin oksidaza dönüştürülür (4). Ksantin dehidrogenaz'ın, ksantin oksidaza dönüşümü iki mekanizma ile gerçekleşebilir: ksantin dehidrogenaz, sülfhidril gruplarının oksidasyonu yoluyla ksantin oksidaza dönüştürülebilir veya ksantin dehidrogenaz, sitozolde miktarı artan kalsiyum tarafından aktive edilen proteazlar tarafından proteolize uğratılıp (Şekil 4) irreversibl şekilde ksantin oksidaza dönüştürülebilir (44).



Şekil 4. Ksantin oksidazdan süperoksit oluşumu (Maxwell'den, 56)

Ksantin oksidaz oksijen kullandığından iskemi sırasında hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize edemez, bu da dokuda hipoksantin seviyelerinin aşırı artışına neden olur (43, 48, 57). İskemik dokuya kan akışı yeniden sağlandığında, ksantin oksidazdan ksantin ve ürik asit oluşumu sırasında süperoksit ve H_2O_2 salınarak daha fazla oksidatif

strese neden olur. Ksantin oksidaz'ın ürettiği ROS, P-selektin ve hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi adezyon proteinlerinin ekspresyonu yoluyla sitokin kaskadlarına ve patolojik koşullara yol açar (4).

2.3.1.2. NADPH Oksidaz

NADPH oksidazlar, NADPH'den moleküler oksijene elektron taşınmasını katalize ederek ROS üretirler. Tüm izoformlarda iki hem grubu, bir FAD ve bir NADPH bağlanma bölgesi bulunur (58). NADPH Oksidaz/Dual Oksidaz (NOX/DUOX) ailesi, İ/R'yi takiben ROS üretiminde rol oynar. Bu multiprotein kompleksleri ailesi 7 üyeden oluşur. NOX-1, NOX-5 dual oksidazlardır, DUOX-1 ve DUOX-2 olarak adlandırılırlar. DUOX enzimleri ve NOX-4 ağırlıklı olarak H_2O_2 üretir (54). Diğer NOX izoenzimleri ise büyük ölçüde NADPH'den moleküler oksijene elektron taşınmasını katalize ederek, H_2O_2 'ye dönüşebilen süperoksit üretirler (55).

NADPH oksidaz solunum patlaması (respiratory burst) olarak bilinen moleküler oksijenin bir elektron tarafından indirgenmesi ile süperoksit anyon radikalinin oluşum reaksiyonunu katalizler; iki elektron ve bir proton salınarak NADPH'yi $NADP^+$ 'ya dönüştürülür. Proton sitozolde kalırken, iki elektron taşınarak iki oksijen molekülüne bağlanır hücre dışında iki süperoksit anyonu oluşturur (59). Süperoksit, membranda anyon kanallarının porlarından geçer, NO degradasyonu, peroksinitrit oluşumu ve protein tirozin nitrasyonuna yol açar. Post-iskemik dokuda NOX kaynaklı ROS, kalp, beyin, barsak, mide, akciğer ve iskelet kası gibi çeşitli organlarda inflamatuvar hücre birikimine neden olabilir (4).

NADPH oksidazlar hücreye spesifik yerleşim gösterir. NOX-2, fagositik hücrelerin (nötrofiller) ROS üretme kabiliyetini açıklar, enzim aynı zamanda kan damarlarının duvarlarını oluşturan tüm hücrelerde de mevcuttur. Bununla birlikte, NOX/DUOX'un mRNA ve protein seviyelerinin birçok dokuda tespit edilmesi bu enzimlerin İ/R gibi patolojik şartlarda önemli bir ROS kaynağı olduğunu kanıtlamaktadır (54).

2.3.1.3. Mitokondri

Mitokondri, farklı komplekslerde oksidatif fosforilasyon sırasında elektron transport zincirinden elektron sızıntısı yoluyla veya monoamin oksidazlar, p66Shc proteinini içeren daha az yaygın yollarla ROS oluşturur (58). Kompleks I ve III normal koşullar altında başlıca potansiyel kaynaklardır. Kompleks I, süperoksit anyonunu matrise, kompleks III ise hem matrise hem de membranlar arası boşluğa salar. Kompleks I ve III tarafından süperoksit

anyon radikalinin üretimi doğrudan membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) ve NADH/NAD⁺ redoks durumu ile ilişkilidir. İ/R sırasında tüm elektron transport zincir kompleksleri hem ROS'un üretim kaynakları hem de hedefleri haline gelir (54).

2.3.2. İskemi Reperfüzyon Hasarında İnflamatuar Süreç

İnflamatuar yanıt, iskemiye takiben reperfüzyon ile başlar. İnflamatuar yanıtta, makrofajlar, endotelial hücreler, nötrofiller, lenfositler, trombositler, parankimal hücreler ayrıca kompleman sistemi, kan pıhtılaşma kaskadı, ROS, NO, pro- ve anti-inflamatuar sitokinler dahil olabilir ve mikrovasküler perfüzyon bozulabilir (51).

Nötrofiller, İ/R'yi takiben uzun süreli inflammatuar yanıtta birincil tepki verenlerdir. Deneysel çalışmalar, iskemi bölgesinde nötrofil infiltrasyonunu ve nötropeniyi indüklemenin organları İ/R hasarından koruyabileceğini göstermektedir. İnflamasyon İ/R hasarının önemli bir mediatörüdür. Organa bağlı olarak değişen iskemi süreleri, metabolik ara ürünleri ve ROS'u aktive ederek, İ/R hasarına yol açan inflammatuar yanıtla sonuçlanır (60). İskemi endotelde, bazı proinflammatuar gen ürünlerinin (lökosit adezyon molekülleri, sitokinler) ve biyoaktif ajanların (endotelin, tromboksan A2) ekspresyonunu uyarmasına rağmen diğer koruyucu gen ürünlerini (cNOS, trombomodulin) ve biyoaktif ajanları (prostasiklin, NO) baskılar (43, 61). Bu nedenle iskemi, reperfüzyonda daha fazla hasarlanmaya karşı doku savunmasızlığını artıran proinflammatuar bir durumu indükler. İ/R, kompleman aktivasyonu (iC3b, C5b-9) ve anafilatoksinler (C3a, C5a) gibi inflammatuar mediatörlerin oluşumuyla sonuçlanır (43). Bunlar, inflammatuar hücreleri uyarır, endotel ve nötrofil yüzeyindeki vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), ICAM-1, E-selektin ve P-selektin ve gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır (45). C5a, IL-1, IL-6, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) dahil olmak üzere çeşitli pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini ve salınımını indükleyerek İ/R'ye inflammatuar yanıtı daha da artırabilir. iC3b, β 2-integrin CD11b/CD18 (Mac-1) yoluyla vasküler endotelyuma lökosit adezyonu için spesifik bir ligandır. C5b-9, lökosit adezyon molekülü transkripsiyonunu ve ekspresyonunu artırmak için endotelial NF- κ B'yi aktive eder, endotelial IL-8 ve MCP-1 salgılanmasını indükleyerek lökosit aktivasyonunu ve kemotaksiyi artırdığı da gösterilmiştir (43).

Lökositlerin yüzeyindeki hücre adezyon molekülleri, endotelial hücreler üzerindeki ligandlar ile etkileşime girer ve sonuçta kan akışından migrasyona yol açan oldukça koordineli olaylar dizisini başlatır. İlk olarak, lökositler endotel hücre yüzeyi boyunca

yuvarlanır (rolling). Bu geçici ilk etkileşime büyük ölçüde hem lökosit (L-selektin) hem de endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan selektin ailesine ait glikoproteinler (P- ve E-selektinler) aracılık eder (62).

Lökosit karşı reseptörü P-selektin glikoprotein-1 (PSGL-1) ile etkileşime giren endotel P-selektin yüzey ekspresyonunda İ/R'nin neden olduğu artışlarla ilk adım başlatılır ve düşük afiniteli etkileşimdir (43). Endotel P-selektin, endotel ROS, hiperkalsemi, kompleman veya trombin ile aktivasyonundan sonra eksprese edilir. En yüksek ekspresyonu, reperfüzyonun başlamasından 10-20 dakika sonra ortaya çıkar (45).

Nötrofil-endotel adezyonu, nötrofil ve endotel reseptör arasındaki reseptör-ligand mekanizması tarafından düzenlenir. Nötrofil adezyon molekülleri, integrinler olarak da bilinir; her integrin, ağır α ve hafif β zincirinden oluşan heterodimerik yapıdadır. Bir inflammatuar uyarana yanıt olarak hücre adezyon moleküllerinin (CAM) ekspresyonu, endotel ve inflammatuar hücreler içindeki spesifik düzenleyici proteinler tarafından koordine edilen bir süreçtir. NF- κ B, gen düzenleyici proteindir, çoğu inflammatuar yanıtta rol oynar ve özellikle TNF- α ve IL-1'e yanıt verir. Aktive edildikten sonra bu protein, proinflammatuar aracı CAM'ın genetik ekspresyonunun upregülasyonunu sağlar. ICAM'lar, kan hücreleri üzerindeki integrinlere bağlanan endotel hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen glikoproteinlerdir (63). ROS, PAF ve lökotrien (LTB₄), hücre içi granüllerden β 2-integrinlerin nötrofiller tarafından ekspresyonunu uyarır. Bu membran proteinleri ailesi, CD11a/CD18, CD11b/CD18 ve CD11c/CD18'den oluşur ve ekspresyonu TNF- α ve IL-1 tarafından artırılan ICAM-1 endotel proteini ile etkileşime girer. Bu etkileşim, nötrofil endotel hücrelerinin yüzeyine bağlar (45).

Son aşama interstisyel boşluğa lökosit transmigrasyonu, endotel hücre bağlantıları boyunca yapısal olarak eksprese edilen trombosit endotel hücre adezyon molekülü-1 (PECAM-1) tarafından kolaylaştırılır. Aktive edilmiş lökositler ekstrasvasküler kısıma ulaştığında, toksik ROS, proteazlar ve elastazlar salgılar bu durum mikrovasküler geçirgenlikte artış, ödem, tromboz ve parankimal hücre ölümüne neden olur (43).

2.3.3. No-reflow Fenomeni

İskemik dokuların reperfüzyonu sıklıkla, arteriyollerde bozulmuş endotele bağlı dilatasyon, kapillerde sıvı filtrasyonu artışı ve lökosit tıkanıklığı, postkapiller venüllerde lökosit ve plazma proteini ekstrasvazasyonu olarak ortaya çıkan mikrovasküler disfonksiyon ile ilişkilidir. Endotel hücreleri, hem hipoksinin (iskemi) hem de reoksijenasyonun

(reperfüzyon) zararlı etkilerine karşı savunmasızdır (61). Hipoksiye maruz kaldıklarında, endotel hücreleri hücre iskelet morfolojilerini değiştirerek küçük hücreler arası gözenekler oluşturur ve bu gözeneklerin varlığı doku ödemi oluşumu ile endotelin geçirgenliğini artırır (44). Mikrosirkülasyonun tüm kısımlarında aktive edilmiş endotel hücreleri, reperfüzyonu takip eden ilk dönemde fazla miktarda süperoksit radikali daha az miktarda NO üretir bu durum inflamatuvar mediatörlerin salınımına sebep olur. Reperfüzyon sonucunda salınan inflamatuvar mediatörler, iskemiye maruz kalmayan uzak organlarda endotelyal hücreleri aktive eder. İ/R'nin bu uzak etkileri en sık akciğerde ve kardiyovasküler sistemde gözlenir. İ/R'ye verilen bu uzak yanıt, çoklu organ disfonksiyon sendromunun özelliği olan lökosit bağımlı mikrovasküler hasara neden olur (61). Perfüzyonun kötüleşmesi, vazokonstriktör ve vazodilatatör faktörlerin üretimindeki dengesizlik ile artar. Mikrosirkülasyonda yetersizlikler görülmeye başlar bu durum non-reperfüzyon (no-reflow) olarak adlandırılır (44).

2.4. Testis Torsiyonu

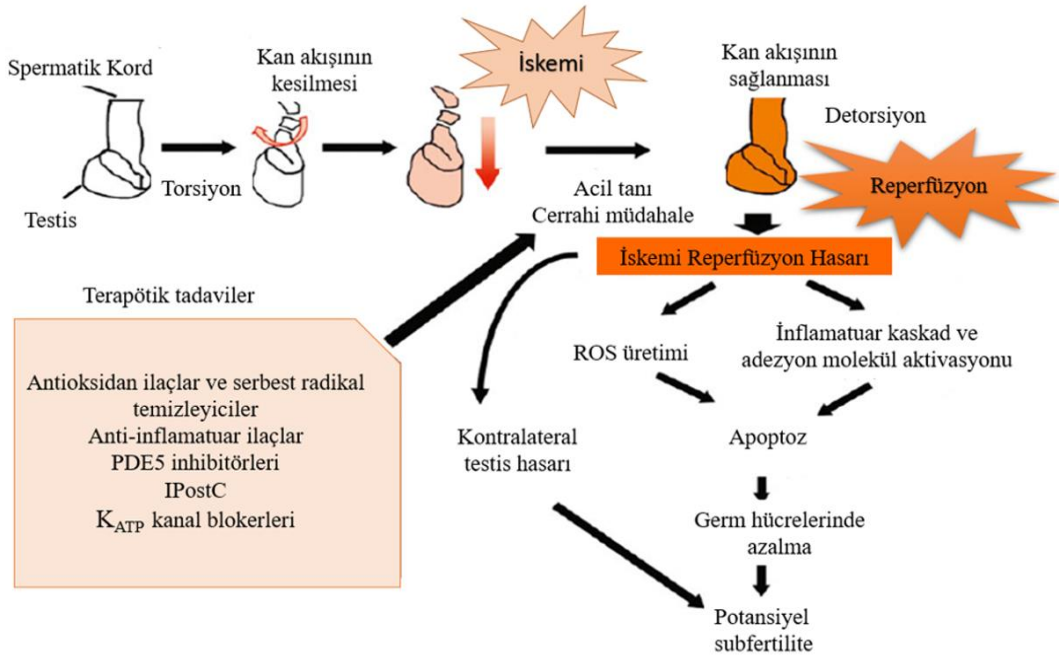
Testiküler torsiyonun ilk yayınlanmış raporu 1840'ta Delasiauve'ye aittir. Taylor, 1897'de yenidoğan torsiyonunu ilk kez açıklamıştır. Testis eklentilerinin torsiyonu 1922'de Colt tarafından tanımlanmıştır (64). TT'nin yıllık insidansının 25 yaşın altındaki 4 000 erkekte 1 olduğu bildirilmiştir ancak son çalışmalarda insidansın 100 000 erkekte yıllık 3.8-4.5 arasında olduğu ortaya konmuştur (65). Testisin torsiyonu 180° ile 720° arasında olabilir (2, 66). Testis genellikle lateralden mediale doğru torsiyone olur, 540° ile 720° arası torsiyonlara komplet torsiyon denir (67). Torsiyon derecesi ne kadar yüksek olursa iskemi başlangıcı o kadar hızlı olur (2, 66, 68). 6 saatten daha uzun torsiyonlarda testis sağkalımı azalır. Yüksek dereceli torsiyonlarda 4 saatte nekroz gelişir (65, 69). Spermatik kordun detorsiyonu torsiyon başlangıcından 6 saatten daha kısa bir sürede yapılırsa testis kurtarma oranı %90'dır. Bununla birlikte, 12 saat sonra bu oran %50'ye ve 24 saat sonra <%10'a düşer (2, 70).

2.4.1. Testiküler İskemi Reperfüzyon Hasarı

Testis torsiyonu ana patofizyolojik sonucu, dokuyu iskemik hale getiren spermatik kordun dönmesi ve ardından dönen kordun eski haline getirilmesi (reperfüzyon) ile oluşan İ/R hasarıdır. İ/R hasarı; nötrofil göçü, ROS üretimi, proinflamatuvar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin üretimi, lipid peroksidasyonu, apoptoz, anoksi ve mikrovasküler kan akışında

değişiklikleri içerir. İ/R hasarında, ROS üretimi koruyucu antioksidan kapasiteyi aşabilir (70).

Testiküler iskemide ROS'un kaynağı, vasküler endotele yapışan olgun granülositlerdir. Granülositler, nötrofillerin testiküler subtunikal venüllere göçü, germ hücresine spesifik apoptozun indüklenmesi ayrıca sperm kök hücrelerinin azalması veya kaybı ile infertiliteye neden olur. Bir diğer ROS kaynağı ise hipoksantinden süperoksit radikali üreten ksantin oksidazdır (3). ROS, testis hücrelerinin hücre iskeletine ve hücre membranına zarar verir (70). TT'den kaynaklanan testiküler iskemik olay sırasında, oksijen ihtiyacı ve karşılanması arasında bir dengesizlik gelişir ve bu da doku hipoksisine neden olur (3). Hipoksi, lipid peroksidasyonunda, inflamatuvar yollarının aktivasyonunda, testiste germ hücresine spesifik apoptozda ve testiste protein profilindeki değişikliklerde önemli bir rol oynar (3, 70). TT, testiküler venöz endotelde hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükler ve lökositlerin testiküler damar duvarlarına adezyonuna yol açar (3). Testiküler İ/R hasarı sırasında apoptotik yollar, inflamasyon ve ROS tarafından aktive edilir bu durum germ hücresine spesifik apoptoza sebep olur (Şekil 5). Ayrıca TT kontralateral (torsiyone olmayan, karşı testis) testiste infertiliteye sebep olabilir (53).



Şekil 5. Testiküler T/D'nin mekanizması (Shimizu'dan, 3)

2.4.2. Testis Antioksidan Sistemi

Testisin yüksek metabolik hız ve replikasyon oranlarına sahip olması oksidatif strese karşı antioksidan kapasitesini önemli kılar (25). Testisler antioksidan enzim gruplarına zengindir ve oksidatif stres durumunda, spermatogenik ve steroidogenik fonksiyonların etkilenmemesini sağlamak için serbest radikalleri temizlerler. Ancak uzun süreli stres koşulları, antioksidan enzim seviyelerinin düşmesine ve savunma sisteminin bozulmasına neden olur, daha sonra testis iç ortam homeostazı bozulur (71).

Testislerde hem enzimatik hem de enzimatik olmayan bileşenleri içeren antioksidan sistem bulunur. GPx ve SOD mRNA'nın NF- κ B aracılı indüksiyonu ile testiste oksidatif stresi azaltıcı cevap oluşturur. Testisler SOD'un sitozolik ve mitokondriyal formlarının yanı sıra ekstraselüler formunu da içerir. Testislerde CAT'ın önemi sınırlı olmasına rağmen, bu dokuda H₂O₂'yi suya indirmek için elektron kaynağı olarak GSH kullanan birkaç GPx izoformu vardır. PHGPx, testislerde en önemli GPx izoformlarından biridir ve hem spermatogenik hücrelerde hem de Leydig hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir (72).

Günümüzde sağlık bilimleri alanında birçok hastalığın tamamlayıcı ve alternatif tedavisi için doğal ürünlerin kullanımı tartışılmaktadır. Bu durum doğal ürünlere olan ilgiyi gittikçe artırmaktadır. Bu doğal ürünler içerisinde fenolik bileşikler önemli bir grubu oluşturmaktadır. Bu durum göz önüne alınarak biz bu çalışmada fenolik bileşiklerin önemli bir grubunu oluşturan fenolik asitlerden biri olan *p*-CA'nın testis T/D modelindeki koruyucu etkilerini araştırmayı amaçladık.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve üretici firmaları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları

Kullanılan Cihazlar	Üretici Firma
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204-S
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Socorex, Ependorf
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5810
Santrifüj tüpleri	Isolab
Vorteks	IKA Vortex Genius 3
Magnetik karıştırıcı	Ikamag RH
Mikropleyt okuyucu	Molecular Devices Versa Max
Çalkalayıcı inkübatör	Nüve SL 350
Derin dondurucu (-80° C)	Forma ULT Freezer
Etüv	Gallenkamp
Biyokimya tüpleri	BD Vacutainer
Homojenizatör	IKA-Ultra Turrax T18
Işık mikroskobu	Olympus BX-51, Olympus
Kamera	Olympus DP 71, Olympus
Mikrotom	Leica RM 2255, Leica Instrument
pH metre	Hanna Instruments, HI 9321

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar ve kitler Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasallar ve kitlerin üretici firma ve kodları

Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	Üretici Firma ve Kodu
Sülfürik Asit (H ₂ SO ₄)	Merck, K39098713 833 (Almanya)
Fosfotungstik Asit	Sigma P4006 (ABD)
Tiyobarbitürik Asit (TBA)	Sigma, T5500 (ABD)
Asetik Asit	Tekkim TK.010030.02500 (Türkiye)
Triton X-100	Merck, K2351869 (Almanya)
KCl	Sigma, P9333 (ABD)
Fosforik Asit (H ₃ PO ₄)	Sigma, 04107 (ABD)
TOS tayin kiti	Rel Assay Diagnostics, RL0024 (Türkiye)
TAS tayin kiti	Rel Assay Diagnostics, RL0017 (Türkiye)
Rat GSH ELİSA kiti	BT Lab, E1101Ra (Çin)
Rat GPx ELİSA kiti	BT Lab, E1242Ra (Çin)
Rat SOD ELİSA kiti	BT Lab, E0168Ra (Çin)
BCA protein tayin kiti	Thermo Scientific Pierce, 23227 (ABD)
p-Kumarik Asit	Sigma, C9008 (ABD)

3.2. Deneyin Planlanması

Çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 20.02.2020 tarihinde 2020/7 protokol numaralı onay (EK 1) alındıktan sonra KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ile Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

3.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada denek olarak Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen 6-8 haftalık 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar çelik kafeste, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsü sağlanarak, (21±2 °C) oda sıcaklığında tutularak barındırıldı. Standart pelet yem ve su *ad libitum* verildi. Operasyon öncesi herhangi bir yem ve su kısıtlamasına gidilmedi. 35 rat randomize edilerek her grupta 7'şer hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Operasyon öncesi ratlara intramusküler 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin uygulanarak genel anestezi sağlandı.

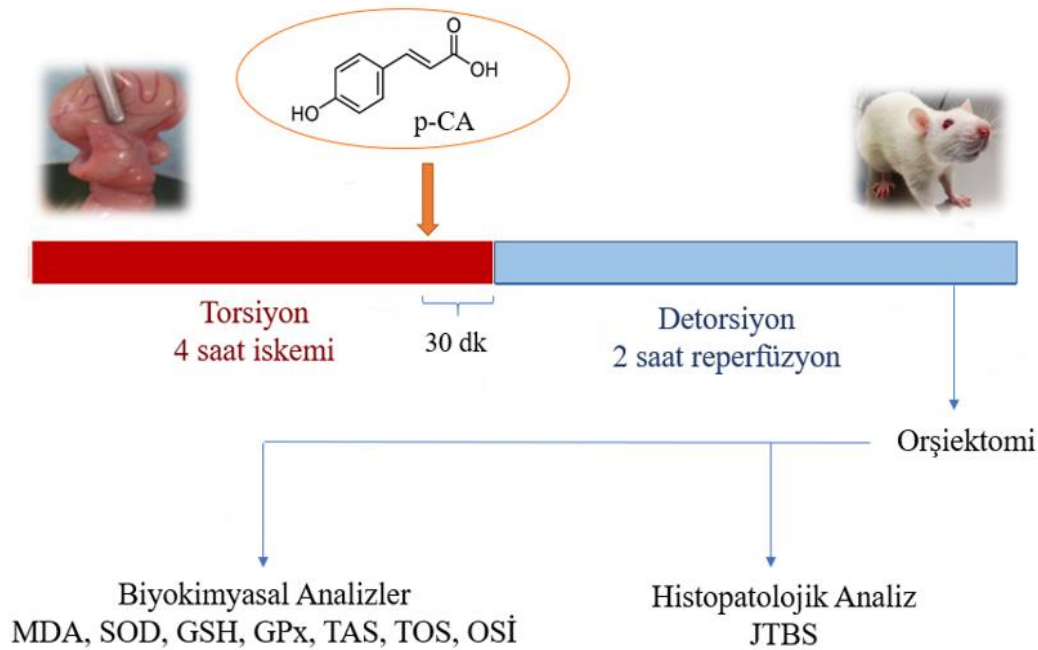
Grup 1 (Kontrol): Yalnızca laparotomi uygulandı, 6 saat sonra kan ve testis doku örnekleri alındı.

Grup 2 (İ/R): Laparotomi uygulandıktan sonra sol testis torsiyon oluşturmak üzere 720° saat yönünde döndürüldü ve 4 saatlik torsiyon ile iskemi oluşturuldu. Süre sonunda 2 saatlik detorsiyon ile reperfüzyon oluşturuldu.

Grup 3 (Etanol): 6 saatlik anestezi periyodu başlangıcından 3.5 saat sonra ratlara i.p. yolla 0.5 mL hacimde etanol verildi.

Grup 4 (İ/R+p-CA 50 mg/kg): İ/R grubu ile aynı prosedür uygulandı, farklı olarak detorsiyondan 30 dakika önce i.p yolla 50 mg/kg p-CA verildi.

Grup 5 (İ/R+p-CA 100 mg/kg): İ/R grubu ile aynı prosedür uygulandı, farklı olarak detorsiyondan 30 dakika önce i.p yolla 100 mg/kg p-CA verildi (Şekil 6).



Şekil 6. Metodoloji ve değerlendirmelerin şematik diyagramı

3.4. Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması

Operasyon sonunda ratlar, anestezi altındayken sol orşiektomi uygulandıktan sonra intrakardiyak kan alımı ile sakrifiye edildi. Alınan doku örneklerinin bir kısmı biyokimyasal analizler için serum fizyolojik (%0.9'luk NaCl) ile yıkandıktan sonra mikro hacimli kapaklı

tüplere aktararak çalışmanın yapılacağı güne kadar -80 °C’de saklandı. Dokuların bir kısmı ise histopatolojik incelemede kullanılmak üzere Bouin çözeltilisine konuldu. Antikoagülan içermeyen, seperatör jelli kan tüplerine alınan kan örnekleri oda sıcaklığında 20 dakika bekletilerek pıhtılaşmaları sağlandı. Süre sonunda tüpler 3000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenerek serum kısımları ayrıldı. Serum örnekleri mikro hacimli kapaklı tüplere aktararak çalışılınca kadar -80 °C’de saklandı.

3.5. Biyokimyasal İncelemeler

3.5.1. Örneklerin Çalışmaya Hazırlanması

3.5.1.1. Serum Örneklerinin Hazırlanışı

-80 °C’de saklanan serum örnekleri oda sıcaklığına getirilerek çözülmeleri sağlandı. Çözülen örnekler vortekslenerek homojen hale getirildikten sonra ilgili parametrelerin ölçümü gerçekleştirildi.

3.5.1.2. Doku Örneklerinin Hazırlanışı

Çıkarılan testis dokularının her birinden yaklaşık 100 mg’lık kesimler yapıldı. Sonrasında bu dokular homojenizatör yardımıyla 1 mL’lik homojenizasyon tamponu içerisinde 30 s süreyle, buz küvetinde 9500 rpm’de homojenize edildi. Homojenatlar 4000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlarda ilgili parametrelerin ölçümü gerçekleştirildi.

3.5.2. Doku Örneklerindeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi

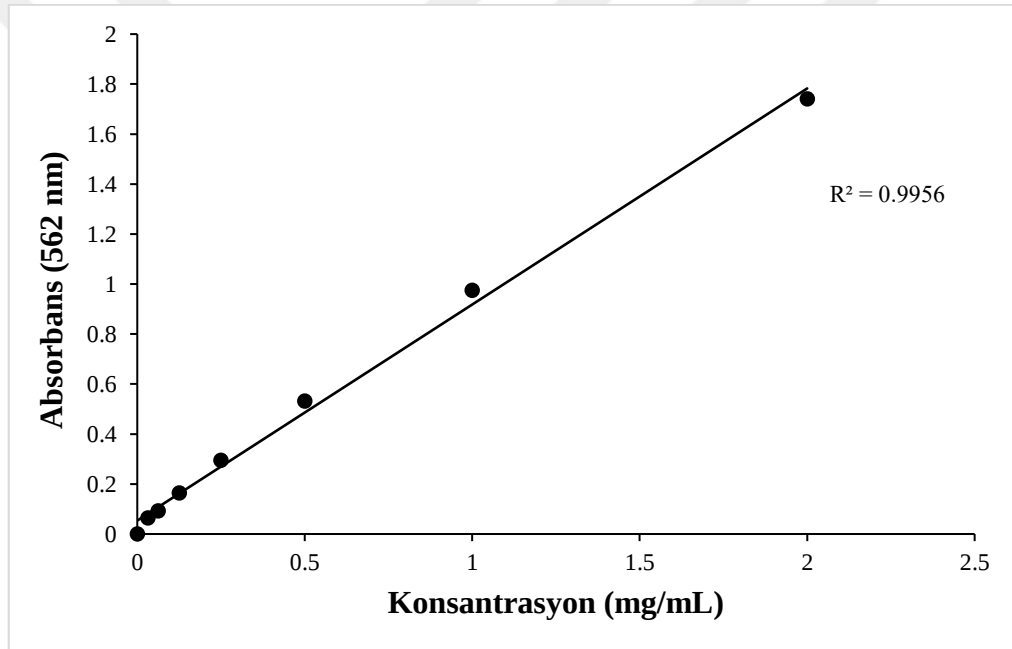
Doku örneklerindeki protein miktarları üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ticari kit kullanılarak belirlendi ve sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı. Dokularda ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) kitleri kullanılarak ölçülen tüm biyokimyasal parametrelerin seviyeleri ve doku MDA seviyeleri standardize olması açısından hesaplanan örnek protein miktarlarına oranlanarak mg protein başına olacak şekilde verildi.

Deneyin Yapılışı

- BSA standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı ve hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 25’er µL pipetlendi.
- Her kuyucuğa 200 µL çalışma reaktifi eklendi ve pleyt çalkalayıcıda 30 s boyunca karıştırıldı.

- Sonrasında pleyt, folyo ile kapatılarak 37 °C’de çalkalayıcıda 30 dakika inkübe edildi.
- Pleyt oda sıcaklığına geldikten sonra örnek ve standart absorbansları mikroyet okuyucu spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda okundu.
- 562 nm’deki standart ve bilinmeyen örnek absorbanslarından görün absorbansı çıkarıldı.

BSA standart konsantrasyonlarına karşı elde edilen net absorbans değerleri kullanılarak standart eğri oluşturuldu (Şekil 7). Örneklerdeki protein konsantrasyonu bu standart eğri kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar mg/mL cinsinden verildi.



Şekil 7. Protein tayininde kullanılan albumin standart grafiği

3.5.3. MDA Seviyelerinin Belirlenmesi

Seperatör jelli tüplerden elde edilen serumda ve testis dokularında MDA tayini malondialdehidin asidik ortamda tiyobarbütirik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli şelatın (TBARS) 532 nm’deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanılarak yapıldı (73, 74).

3.5.3.1. Serum MDA Seviyesi Tayini

Serum örneklerindeki MDA düzeyleri Yagi tarafından geliştirilen TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) metodu kullanılarak tayin edildi (73).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1. 0.042 M Sülfürik Asit (H_2SO_4) çözeltisi: %98'lik H_2SO_4 'den 228 μL alınıp, içerisinde bir miktar distile su bulunan balon jojeye pipetlendi, son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. %10'luk Fosfotungstik Asit ($H_3P(W_3O_{10})_4H_2O$) çözeltisi: 1.11 g fosfotungstik asit 10 mL distile suda çözüldü, günlük hazırlandı.
3. %0.67'lik Tiyobarbitürik Asit (TBA) çözeltisi: 0.335 g TBA tartıldı, 25 mL distile suya ilave edildi. Karıştırıcıda ısıtılarak magnetik bar yardımıyla çözüldü, soğuduktan sonra üzerine 25 mL glasiyel asetik asit eklendi, günlük hazırlandı.
4. Standart çözeltiler: 82.5 μL 1,1,3,3-tetrametoksipropan 0.01 M 50 mL HCl çözeltisine ilave edildi. Çözelti 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Hazırlanan ana stok çözeltisinden dilüsyonlar yapılarak 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 ve 0.78 nmol/mL'lik standart çözeltiler ve kör hazırlandı.

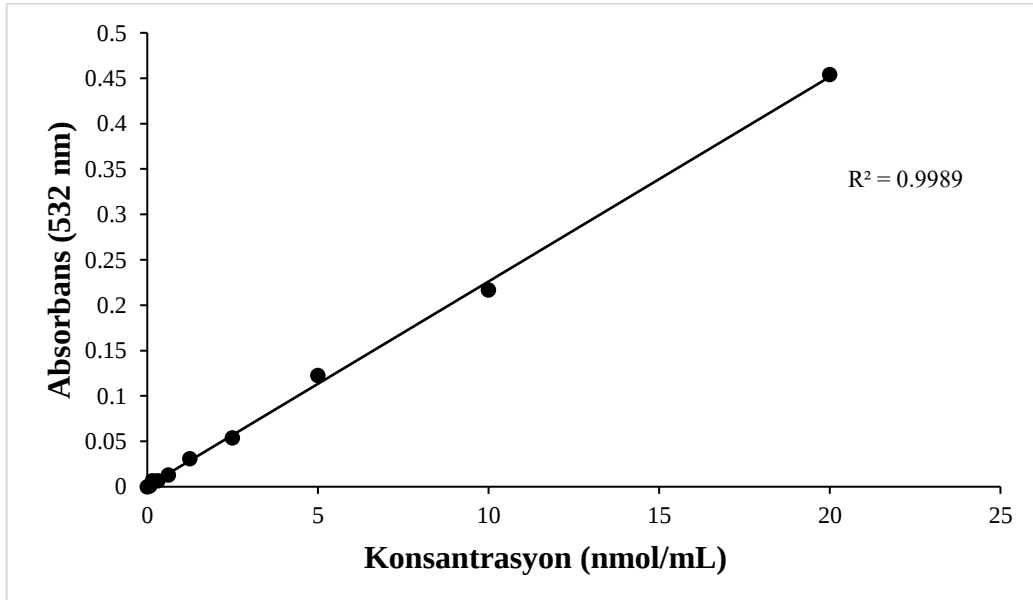
Deneyin Yapılışı

Serum MDA ölçümü Tablo 4'te verilen deney prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Tablo 4. Serum MDA seviyesi ölçümü için yapılan işlemler

Reaktifler	Örnek (µL)	Standart(µL)
Numune	150	-
H ₂ SO ₄	1200	-
Fosfotungstik Asit	150	-
Vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi 4000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi, süpernatant atıldı		
Distile su	2000	-
Standart	-	2000
Pellet vortekslenerek çözünmesi sağlandı		
TBA	500	500
100°C’de 1 saat inkübe edildi 3000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi Süpernatantlardan 250’şer µL pleyte yüklendi 532 nm’de mikropleyt okuyucu spektrofotometre ile absorbands ölçüldü		

Elde edilen standart absorbands sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek MDA standart grafiği çizildi (Şekil 8). Bu grafikten yararlanılarak serum MDA miktarı nmol/mL olarak hesaplandı.



Şekil 8. Serum MDA tayininde kullanılan standart grafiği

3.5.3.2. Doku MDA Seviyesi Tayini

Testis dokusunda MDA ölçümü, Uchiyama ve Mihara yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirildi (74).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1. Doku homojenizasyon tamponu: 5.75 g KCl hassas terazide tartıldıktan sonra 0.125 mL Triton X-100 eklendi ve son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı, günlük hazırlandı.
2. %1'lik H_3PO_4 çözeltisi: Bir miktar distile su üzerine 11.77 mL %85'lik H_3PO_4 ilave edildi, son hacim distile suyla 1 L'ye tamamlandı.
3. TBA çözeltisi (%0.67'lik): 1.34 g TBA hassas terazide tartıldı ve 100 mL distile su eklendi. Magnetik bar yardımıyla 10 dakika karıştırılıp çözünmesi sağlandı. Ardından üzerine 100 mL asetik asit eklendi. Günlük hazırlandı.
4. Standart çözeltiler: 82.5 μ L 1,1,3,3 tetrametoksiopropan, 0.01 M 50 mL HCl çözeltisine ilave edildi. Çözelti 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Hazırlanan ana stok çözeltisinden dilüsyonlar yapılarak 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nmol/mL'lik standart çözeltiler ve kör hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Doku MDA ölçümü Tablo 5'te verilen deney prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Tablo 5. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan işlemler

Reaktifler	Örnek (μ L)	Standart (μ L)
Örnek	500	-
Standart	-	500
Fosforik Asit	3000	3000
TBA	1000	1000

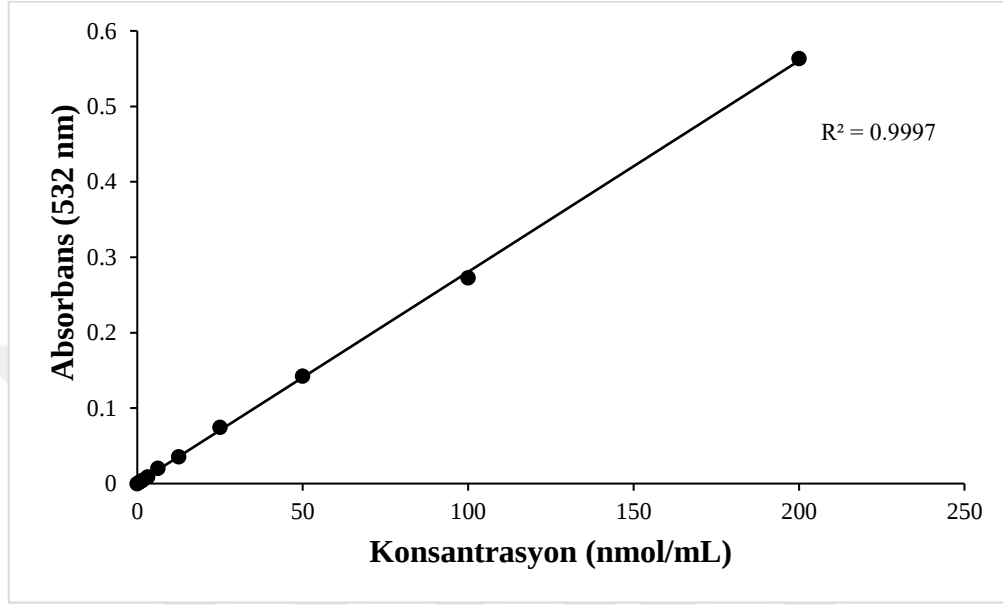
Vortekslendikten sonra 100°C'de 50 dakika inkübe edildi

3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi

Süpernatantlardan 250'şer μ L pleytlere yüklendi

532 nm'de mikropleyt okuyucu spektrofotometre ile absorbans ölçüldü

Elde edilen standart absorbens sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek MDA standart grafiği çizildi (Şekil 9). Bu grafikten yararlanılarak doku MDA miktarı nmol MDA/mg protein olarak hesaplandı.



Şekil 9. Doku MDA tayininde kullanılan standart grafiği

3.5.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Seviyelerinin Belirlenmesi

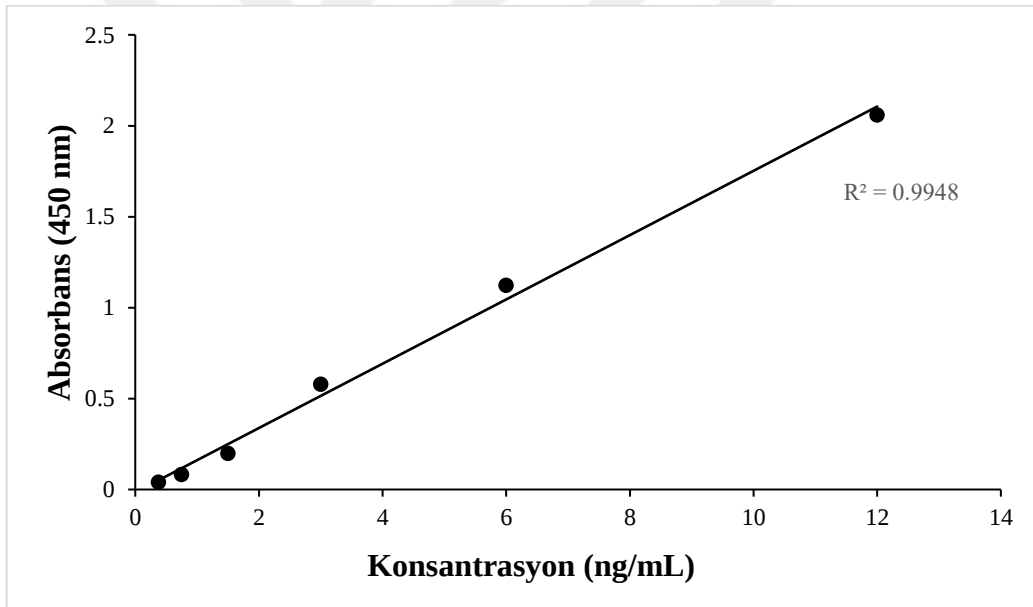
Doku ve serum örneklerindeki SOD seviyeleri, rat uyumlu ticari ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda belirlendi.

Deneyin Yapılışı

- Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve örnekler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
- SOD standartları (12-0.75 ng/mL) kit prosedürüne uygun olarak hazırlandı.
- Standart kuyucuğuna 50 µL standart eklendi.
- Numune kuyucuklarına 40 µL numune eklendikten sonra 10 µL anti-SOD antikoruna eklendi.
- Her bir kuyucuğa 50'şer µL streptavidin-HRP (horseradish peroksidaz) eklendi.
- Pleyt, folyo ile kapatılarak 37 °C'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.

- Her bir kuyucuğa 50'şer μL substrat solüsyonu A ve 50'şer μL substrat solüsyonu B eklendi.
- Pleyt folyo ile kapatılarak, 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa 50'şer μL stop solüsyonu eklendi, numunelerin renginin sarıya dönüştüğü gözlemlendi.
- Stop solüsyonu ekledikten sonra 10 dakika içinde örnek ve standart absorbansları mikropleyt okuyucu spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okundu.

Standart konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri oluşturuldu (Şekil 10). Örneklerdeki SOD seviyeleri bu standart eğri kullanılarak hesaplandı ve serum sonuçları ng/mL, doku sonuçları ng/mg protein cinsinden verildi.



Şekil 10. SOD tayininde kullanılan standart grafiği

3.5.5. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Seviyelerinin Belirlenmesi

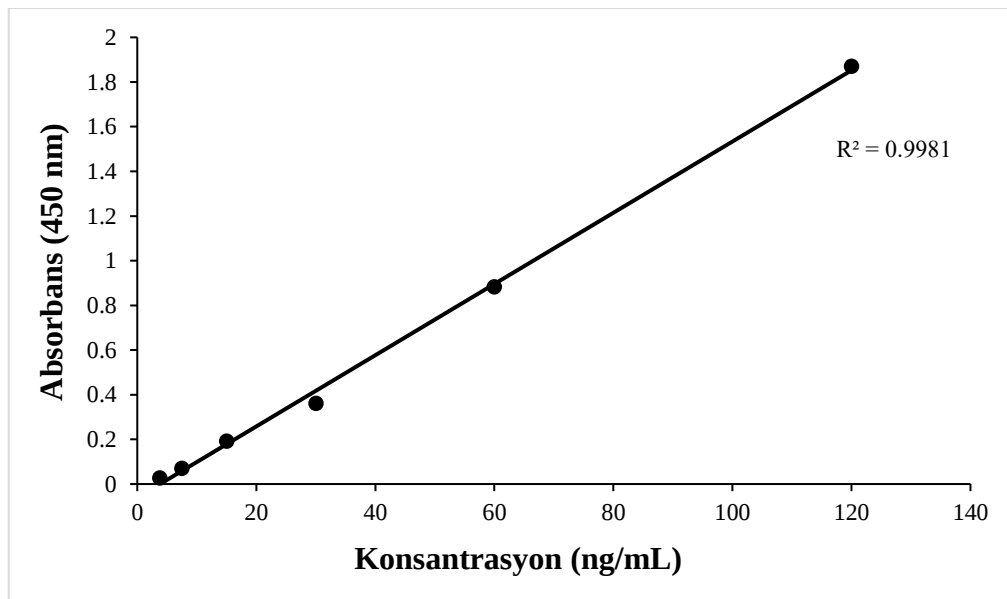
Doku ve serum örneklerindeki GPx seviyeleri rat uyumlu ticari ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda belirlendi.

Deneyin Yapılışı

- Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve örnekler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.

- GPx standartları (120-7.5 ng/mL) kit prosedürüne uygun olarak hazırlandı.
- Standart kuyucuğuna 50 µL standart eklendi.
- Numune kuyucuklarına 40 µL numune eklendikten sonra numune kuyucuklarına 10 µL anti-GPx antikoru eklendi.
- Her bir kuyucuğa 50'şer µL streptavidin-HRP eklendi.
- Pleyt, folyo ile kapatılarak 37 °C'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 50'şer µL substrat solüsyonu A ve 50'şer µL substrat solüsyonu B eklendi.
- Pleyt folyo ile kapatılarak, 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa 50'şer µL stop solüsyonu eklendi, numunelerin renginin sarıya dönüştüğü gözlemlendi.
- Stop solüsyonu ekledikten sonra 10 dakika içinde örnek ve standart absorbensları mikropleyt okuyucu spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okundu.

Standart konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorbens değerleri kullanılarak standart eğri oluşturuldu (Şekil 11). Örneklerdeki GPx seviyeleri bu standart eğri kullanılarak hesaplandı ve serum sonuçları ng/mL, doku sonuçları ng/mg protein cinsinden verildi.



Şekil 11. GPx tayininde kullanılan standart grafiği

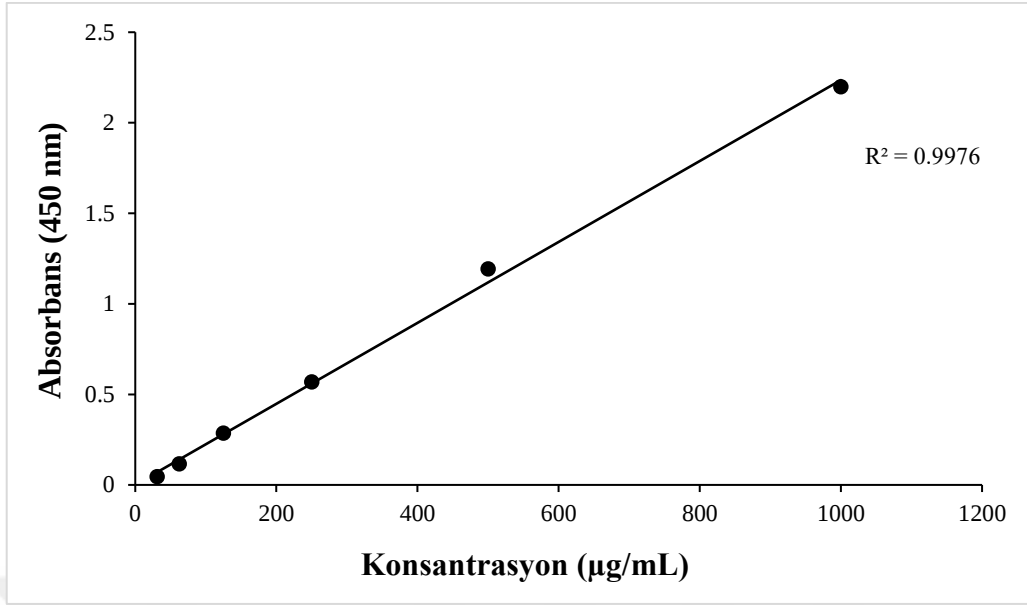
3.5.6. Glutasyon (GSH) Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku ve serum örneklerindeki GSH seviyeleri rat uyumlu ticari ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda belirlendi.

Deneyin Yapılışı

- Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve örnekler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
- GSH standartları (1000-62.5 mg/L) kit prosedürüne uygun olarak hazırlandı.
- Standart kuyucuğuna 50 µL standart eklendi.
- Numune kuyucuklarına 40 µL numune eklendikten sonra numune kuyucuklarına 10 µL anti-GSH antikoru eklendi.
- Her bir kuyucuğa 50'şer µL streptavidin-HRP eklendi.
- Pleyt, folyo ile kapatılarak 37 °C'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda pleyt yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 50'şer µL substrat solüsyonu A ve 50'şer µL substrat solüsyonu B eklendi.
- Pleyt folyo ile kapatılarak, 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa 50'şer µL stop solüsyonu eklendi, numunelerin renginin sarıya dönüştüğü gözlemlendi.
- Stop solüsyonu ekledikten sonra 10 dakika içinde örnek ve standart absorbanları mikropleyt okuyucu spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okundu.

Standart konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorban değerleri kullanılarak standart eğri oluşturuldu (Şekil 12). Örneklerdeki GSH seviyeleri bu standart eğri kullanılarak hesaplandı ve serum sonuçları µg/mL, doku sonuçları µg/mg protein cinsinden verildi.



Şekil 12. GSH tayininde kullanılan standart grafiği

3.5.7. Toplam Oksidan Durumun (TOS) Belirlenmesi

Doku ve serum örneklerindeki TOS seviyeleri ticari kolorimetrik kit kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda belirlendi ve sonuçlar $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri birimiyle verildi. Analizin prensibi numunede bulunan oksidanların, Fe^{2+} -o-dianisidin kompleksindeki Fe^{2+} iyonunu Fe^{3+} iyonuna oksitlemesi ve asidik ortamda Fe^{3+} iyonunun ksilenol turuncuyla oluşturduğu renkli kompleksin renk yoğunluğunun spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (75).

Deneyin Yapılışı

Tablo 6’da verilen şekilde pipetlenmeler yapılarak deney gerçekleştirildi.

Tablo 6. TOS tayini için yapılan işlemler

Reaktifler	Örnek (µL)	Standart (µL)
Standart	-	45
Örnek	45	-
Reaktif I	300	300
Çalkalayıcıda karıştırma		
30 s sonra mikropleyt okuyucu spektrofotometrede 530 nm’de ilk absorbans (A_1) okuma		
Reaktif II	15	15
Çalkalayıcıda karıştırma		
Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyon ve 530 nm’de ikinci absorbans (A_2) okuma		

Hesaplama

530 nm’de her bir örnek ve standart için elde edilen A_2 absorbansından A_1 absorbansı çıkarılarak absorbans değişimi hesaplandı ($\Delta A = A_2 - A_1$).

$$\text{Sonuç} = [(\Delta A \text{ Örnek}) / (\Delta A \text{ Standart})] \times \text{Standart Konsantrasyonu}$$

3.5.8. Toplam Antioksidan Durumun (TAS) Belirlenmesi

Doku ve serum örneklerindeki TAS seviyeleri ticari kolorimetrik kit kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda belirlendi ve sonuçlar mM troloks eşdeğeri birimiyle verildi. Bu yöntem örnekteki antioksidanların, renkli 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna dönüştürmesi prensibine dayanır (76).

Deneyin Yapılışı

Tablo 7’de verilen şekilde pipetlenmeler yapılarak deney gerçekleştirildi.

Tablo 7. TAS tayini için yapılan işlemler

Reaktifler	Örnek (µL)	Standart (µL)	H ₂ O (µL)
Deiyonize su	-	-	18
Standart	-	18	-
Örnek	18	-	18
Reaktif I	300	300	300
Çalkalayıcıda karıştırma			
30 s sonra mikropleyt okuyucu spektrofotometrede 660 nm’de ilk absorbans (A_1) okuma			
Reaktif II	45	45	45
Çalkalayıcıda karıştırma			
Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyon ve 660 nm’de ikinci absorbans (A_2) okuma			

Hesaplama

660 nm’de her bir örnek, standart ve distile su için tespit edilen A_2 absorbansından A_1 absorbansı çıkarılarak absorbans değişimi hesaplandı ($\Delta A = A_2 - A_1$). Deiyonize su renksiz olduğu ve antioksidan içermediği için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

$$\text{Sonuç} = [(\Delta A \text{ H}_2\text{O} - \Delta A \text{ Örnek}) / (\Delta A \text{ H}_2\text{O} - \Delta A \text{ Standart})] \times \text{Standart Konsantrasyonu}$$

3.5.9. Oksidatif Stres İndeksi'nin (OSİ) Hesaplanması

Serum ve doku örneklerindeki OSİ seviyeleri TOS ve TAS değerleri kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$OSİ = [(TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}) / (TAS, \mu\text{mol troloks eşdeğeri/L}) \times 100] (77).$$

3.6. Histopatolojik İncelemeler

Histopatolojik değerlendirme için alınan her bir testis dokusu; numaralanmış cam kavanozlardaki Bouin solüsyonunda tespit edildi. Tespit işlemi ardından Bouin solüsyonunu gidermek için %70'lik alkolde yıkanan dokular, daha sonra rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan, mikrotom yardımı ile 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitler, ışık mikroskopik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama yöntemi ile boyandı ve entellan kullanılarak lamelle kapatıldı. Testis hasarını belirlemek için her bir preparatta 20 seminifer tübül değerlendirildi ve mikroskoba entegre kamera ile fotoğraflandı. Testiküler tübüller, Tablo 8'de gösterildiği gibi JTBS kullanılarak puanlandı (78).

Tablo 8. Johnsen testiküler biyopsi skorlaması (JTBS)

Skor	Histolojik Bulgular
10	Tam spermatogenez ve düzenli tübül yapısı
9	Çok sayıda spermatozoa ve düzensiz germinal epitel
8	Az sayıda spermatozoa
7	Spermatozoa yok ve çok sayıda spermatid
6	Spermatozoa yok- az sayıda spermatid
5	Spermatozoa ve spermatid yok-çok sayıda spermatosit
4	Spermatozoa ve spermatid yok-az spermatosit
3	Sadece spermatogonyumlar
2	Sadece Sertoli hücreleri
1	Seminifer epitel hücrelerinin yokluğu

3.7. İstatistiksel Yöntemler

Veriler SPSS 23.0 (New York, ABD) programında istatistiksel olarak değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uyan ikiden fazla bağımsız grubu karşılaştırmada ANOVA, post-hoc Tukey testi kullanıldı. Normal dağılıma uyan veri setleri aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Doku ve serum örnekleri için biyokimyasal parametre sonuçları sırası ile Tablo 9 ve Tablo 10'da verilmiştir.

Lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeyleri serum ve dokuda İ/R grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla $p=0.013$ ve $p=0.0001$). p -CA tedavisi, serum ve dokuda İ/R hasarı ile artmış MDA seviyelerini anlamlı derecede düşürdü. Anlamlılık düzeyleri; serumda İ/R+ p -CA 50 mg/kg için $p=0.001$, İ/R+ p -CA 100 mg/kg için $p=0.0001$ ve dokuda İ/R+ p -CA 50 mg/kg için $p=0.001$, İ/R+ p -CA 100 mg/kg için $p=0.0001$ olarak belirlendi.

Doku SOD düzeyleri İ/R grubunda kontrole göre azaldı, p -CA gruplarında ise İ/R grubuna göre artış olsa da gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0.05$). Serum SOD düzeyleri İ/R+ p -CA 100 mg/kg grubunda İ/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p=0.003$).

Doku GPx düzeyleri İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ($p=0.031$) iken İ/R+ p -CA 100 mg/kg grubunda İ/R grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($p=0.041$). Serum GPx düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

GSH düzeyleri serum ve dokuda İ/R grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü (sırayla $p=0.046$ ve $p=0.001$). İ/R+ p -CA 100 mg/kg grubunda İ/R hasarı ile azalan GSH düzeylerinde anlamlı derecede artış görüldü (sırayla $p=0.0001$ ve $p=0.013$). Serum İ/R+ p -CA 50 mg/kg grubunda, İ/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü.

Doku TOS düzeyleri İ/R grubunda kontrole göre anlamlı derecede yüksekti ($p=0.0001$), p -CA tedavi gruplarında İ/R grubuna göre anlamlı azalış görüldü. Doku TAS düzeyleri İ/R grubunda kontrole göre anlamlı olarak düşüktü ($p=0.035$). Serum TAS, TOS düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Doku OSİ değeri İ/R grubunda kontrole göre anlamlı artış gösterirken ($p=0.002$), İ/R+ p -CA 100 mg/kg grubunda İ/R grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p=0.002$). Serum OSİ değeri İ/R+ p -CA 100 mg/kg grubunda İ/R grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p=0.042$).

Tablo 9. Doku örneklerindeki biyokimyasal parametre sonuçları (n=7)

Parametreler	Kontrol	i/R	Etanol	i/R+ p-CA 50 mg/kg	i/R+ p-CA 100 mg/kg
MDA (nmol/mg protein)	8.05±0.78	25.3±7.44 ^a a(p=0.0001)	8.29±1.57	16.3±2.96 ^{a,b} a(p=0.002) b(p=0.001)	12.0±1.89 ^b b(p=0.0001)
SOD (ng/mg protein)	0.19±0.05	0.11±0.03	0.18±0.10	0.15±0.05	0.17±0.03
GPx (ng/mg protein)	1.99±0.29	1.34±0.15 ^a a(p=0.031)	2.05±0.56	1.77±0.37	1.92±0.47 ^b b(p=0.041)
GSH (µg/mg protein)	11.4±3.38	5.34±0.42 ^a a(p=0.001)	10.6±2.41	8.99±2.80	10.0±2.54 ^b b(p=0.013)
TOS (µM H ₂ O ₂ Eşdeğeri)	22.5±5.77	55.5±18.8 ^a a(p=0.0001)	21.3±9.13	31.5±9.71 ^b b(p=0.006)	21.6±11.8 ^b b(p=0.001)
TAS (mM troloks Eşdeğeri)	1.03±0.55	0.68±0.22 ^a a(p=0.035)	0.99±0.13	0.86±0.34	0.98±0.23
OSİ	2.18±0.56	9.82±6.14 ^a a(p=0.002)	2.13±0.80	5.05±4.08	2.19±1.05 ^b b(p=0.002)

^aNegatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı (p<0.05) gösterir.^bi/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı (p<0.05) gösterir.

Tablo 10. Serum örneklerindeki biyokimyasal parametre sonuçları (n=7)

Parametreler	Kontrol	$\dot{I}/R$	Etanol	$\dot{I}/R + p\text{-CA } 50 \text{ mg/kg}$	$\dot{I}/R + p\text{-CA } 100 \text{ mg/kg}$
MDA (nmol/mL)	4.51±0.27	5.10±0.27 ^a a(p=0.013)	4.44±0.30	4.32±0.31 ^b b(p=0.001)	3.97±0.44 ^{a,b} a(p=0.030) b(p=0.0001)
SOD (ng/mL)	1.78±0.37	1.35±0.43	1.70±0.47	1.82±0.18	2.36±0.71 ^b b(p=0.003)
GPx (ng/mL)	22.7±4.98	15.4±6.90	21.7±4.03	17.9±5.31	20.6±4.22
GSH (μg/mL)	91.7±9.20	73.3±10.5 ^a a(p=0.046)	91.0±11.6	101.8±15.7 ^b b(p=0.002)	108.4±15.1 ^b b(p=0.0001)
TOS (μM H ₂ O ₂ Eşdeğeri)	11.7±2.27	15.6±6.10	11.6±1.85	11.2±1.38	10.9±4.84
TAS (mM troluks Eşdeğeri)	0.65±0.17	0.56±0.12	0.68±0.13	0.76±0.27	0.77±0.19
OSİ	1.71±0.39	3.01±1.72	1.75±0.41	1.70±0.83	1.49±0.77 ^b b(p=0.042)

^aNegatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı (p<0.05) gösterir.^b $\dot{I}/R$ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı (p<0.05) gösterir.

4.2. Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait kesitlerde seminifer tübüllerin ve peritübüler dokunun normal görünümde olduğu görüldü. Seminifer tübüllerde gelişimlerinin farklı aşamalarındaki germinal hücreler ve tübül lümeninde çok sayıda spermatozoa mevcuttu (Resim 1).

İ/R grubuna ait kesitlerde seminifer tübül epitelinde belirgin vakuolizasyon ve ayrılmalar mevcuttu. Çoğu tübül lümeninde germinal epitele ait olgunlaşmadan dökülmüş germ hücreleri görüldü (Resim 2).

Etanol grubuna ait kesitlerde seminifer tübül epiteli kontrol grubuna benzer şekilde ve normal görünümdeydi. Seminifer tübüller; çok sayıda farklı gelişim aşamasında germinal hücre içeriyordu ve lümenlerinde çok sayıda spermatozoa mevcuttu. Peritübüler dokuda çok hafif bir ödem dışında kontrole benzer görünümdeydi (Resim 3).

İ/R+p-CA 50 mg/kg grubuna ait kesitlerde seminifer tübül germinal epitelindeki vakuolizasyon ve ayrılmaların azalmakla birlikte devam ettiği ve tübül genel yapısının biraz düzeldiği görüldü (Resim 4).

İ/R+p-CA 100 mg/kg grubuna ait kesitlerde seminifer tübül yapısının belirgin olarak düzelmiş olduğu, vakuolizasyonların ve ayrılmaların oldukça azaldığı görüldü. Tübül lümenine dökülmüş olgunlaşmamış germinal hücrelerin ve olgunlaşmamış hücre içeren tübüllerin oldukça azaldığı ve lümeninde spermatozoa bulunan tübüllerin ise arttığı görüldü (Resim 5).

JTBS, İ/R ve p-CA tedavi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (sırayla $p=0.0001$, $p=0.0001$ ve $p=0.005$). İ/R+p-CA 100 mg/kg grubunda İ/R grubuna göre histopatolojik skor seviyesi anlamlı olarak düzeldi ($p=0.005$) (Tablo 11).

Tablo 11. Doku örneklerindeki histopatolojik parametre sonuçları

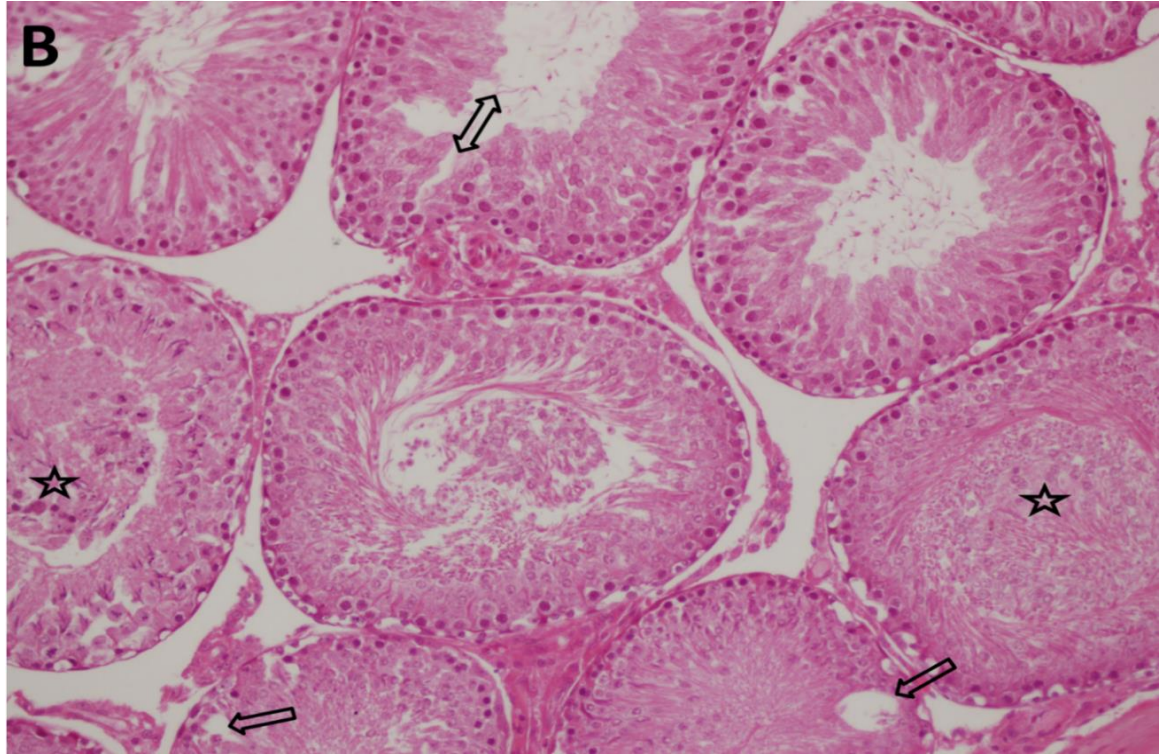
Parametre	Kontrol	İ/R	Etanol	İ/R+ p-CA 50 mg/kg	İ/R+ p-CA 100 mg/kg
JTBS	9.57±0.35	6.57±0.35 ^a ^a ($p=0.0001$)	9.47±0.42	7.65±0.90 ^a ^a ($p=0.0001$)	8.27±1.17 ^{a,b} ^a ($p=0.005$) ^b ($p=0.005$)

^aNegatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0.05$) gösterir.

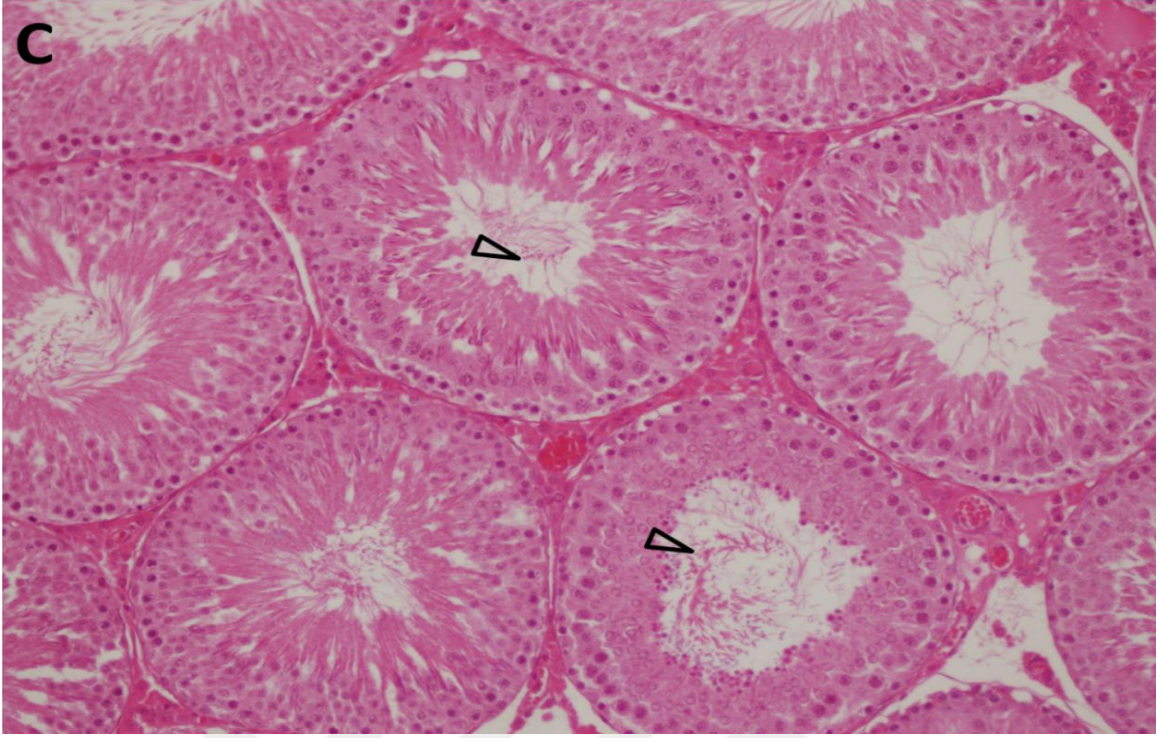
^bİ/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p<0.05$) gösterir.



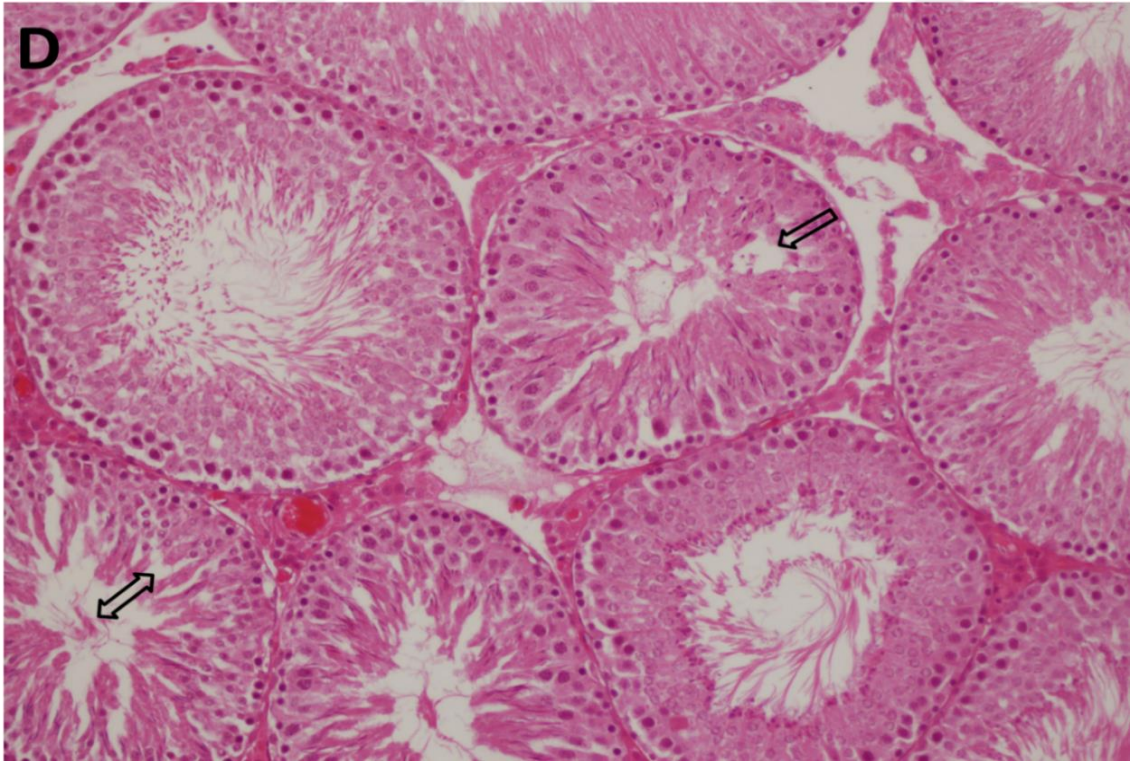
Resim 1. Kontrol grubuna ait testis kesiti. Seminifer tübül lümeninde spermatozoa (ok başı) (H&E x200).



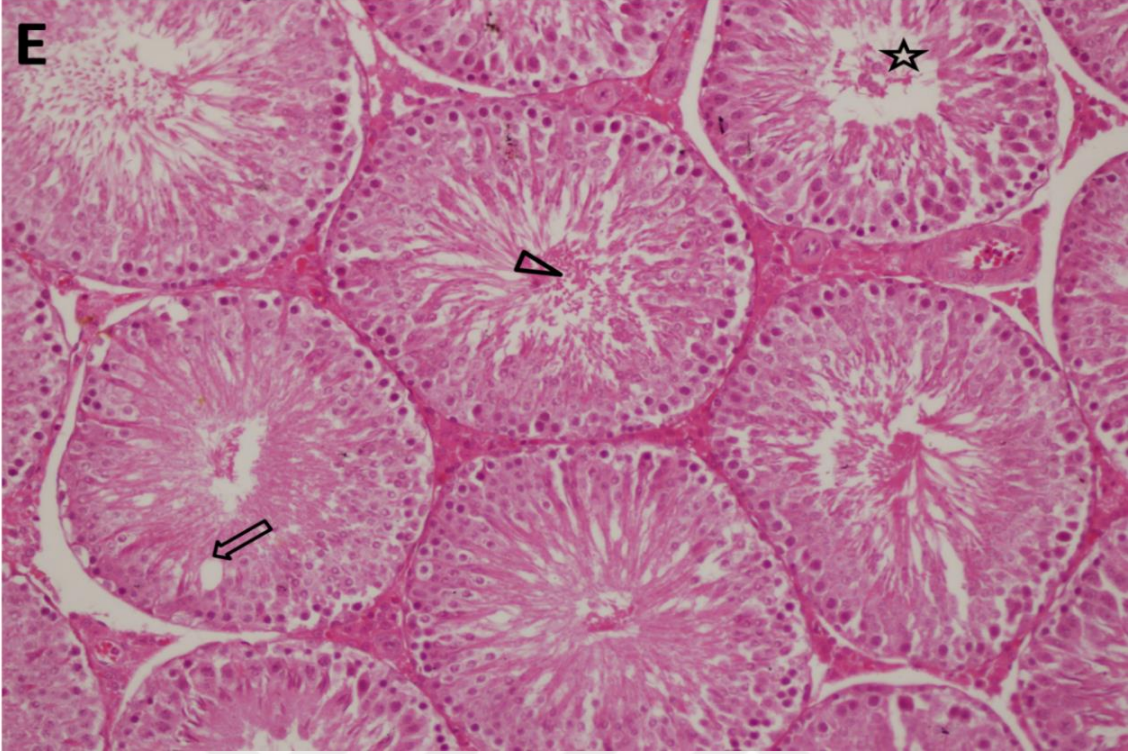
Resim 2. İ/R grubuna ait testis kesiti. Seminifer tübül lümeninde olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri (yıldız), tübül epitelinde vakuolizasyon (ok) ve ayrılmalar (çift başlı ok) (H&E x200).



Resim 3. Etanol grubuna ait testis kesiti. Seminifer tübül lümeninde spermatozoalar (ok başı) (H&E x200).



Resim 4. İ/R+p-CA 50 mg/kg grubuna ait testis kesiti. Seminifer tübül epitelinde vakuolizasyon (ok) ve ayrılmalar (çift başlı ok) (H&E x200).



Resim 5. İ/R+p-CA 100 mg/kg grubuna ait testis kesiti. Seminifer tübül lümeninde olgunlaşmamış germinal epitel hücreleri (yıldız), tübül epitelinde vakuolizasyon (ok), seminifer tübül lümeninde spermatozoalar (ok başı) (H&E x200).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Testis torsiyonu, testisin ve spermatik kordun rotasyonunu içerir. Etkilenen testiste kan akışını sınırlayarak testis atrofisine neden olur. Testislerdeki arterlerin anastomoz oluşturmaması ve tunika albuginea'nın elastik olmayan yapısı travma sırasında testisin telafi edici genişlemesini sınırladığından doku iskemik hasara karşı hassas hale gelir. Testiküler İ/R hasarı, TT'nin temel patofizyolojisini oluşturur (70). TT'nin derecesi, iskemi ve reperfüzyon periyodlarının süresi, dokunun doğal hassasiyeti ve İ/R hasarının ciddiyeti gibi faktörler testiküler hasara sebep olmakla birlikte testiküler hasarı belirleyen en önemli iki faktör, semptomların başlamasından spermatik kordun detorsiyonuna kadar geçen zamanın uzunluğu ve kordun dönme derecesidir (69, 79). Yapılan deneysel bir çalışmada rat testislerinin 180°, 360° ve 720° torsiyonu sonucu, 180°'de akut vasküler değişim görülmediği, 360°'de 2 saatlik torsiyon sonrası orta şiddette iskemi olduğu, 720°'de 4 saatlik torsiyon sonrası tam infarkt olduğu ortaya konmuştur (80). Sol testisin sol spermatik kordun uzunluğuna bağlı olarak sağ testisten daha fazla torsiyone olduğu tespit edilmiştir (81). Reperfüzyon süresinin, İ/R sonrası ROS artışına eşlik eden oksidatif strese kaynaklanan kontralateral testis hasarını belirlediği gösterilmiştir (53). Kontralateral testis dokuları çalışmamız kapsamında olmadığından, reperfüzyon süresi kısa tutulmuştur. Bizde çalışmamızda, ratlarda 4 saatlik 720° sol ipsilateral testis torsiyonundan sonra 2 saat detorsiyon ile İ/R modelini oluşturduk ve deney sonrası ipsilateral orşiektomi ile elde edilen sol testis dokuları ve serum örneklerinde çalışmayı gerçekleştirdik.

Testis dokusunda hücre bölünmesi ve mitokondriyal oksijen tüketiminin yüksek olmasına ilaveten diğer dokulara göre nispeten daha yüksek oranda doymamış yağ asitleri (özellikle 20:4, 22:6) içermesi ve potansiyel ROS üreten sistemlerin varlığı, testisleri oksidatif strese karşı savunmasız hale getirir (34, 82). Ayrıca testislerdeki kapiller basınç diğer organlardakinden daha düşüktür. Seminifer tübüllerdeki yüksek metabolik aktivite, düşük oksijen ve düşük vasküler perfüzyon basınç ortamına uygundur ve normal koşullar altında, damarların yayılımı testise yeterli miktarda besin ve oksijen sağlayabilir. Testislerde vaskülarizasyon zayıftır (34). Bu nedenle oksijen basıncı düşüktür ve oksijen için ciddi bir hücre rekabeti vardır. Testis hücrelerinin fonksiyonlarını yerine getirmesi için üretilen serbest radikaller ile metabolizması arasında bir denge oluşturmak gerekir çünkü testis biyolojik sistemi serbest radikallerin olumsuz etkilerini detoksifiye edemez veya onarmazsa, hücreler ve doku ciddi şekilde hasar görür. Bu bağlamda, antioksidanlar serbest

radikallere karşı koyarak veya testiküler hücrelerde oluşumlarını engelleyerek bu hasarı önleyebilir (82).

Testis torsiyonu vakalarında klinisyenler, cerrahi detorsiyon öncesinde reperfüzyon hasarının sebep olduğu oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı akut koruyucu tedbir olarak iskemik dönemde farmakolojik ve antioksidan ajan enjeksiyonu gibi medikal tedaviler uygulayarak doku hasarını azaltmayı amaçlamaktadırlar. Çünkü dokuda İ/R'den kısa bir süre sonra oksidatif hasar maksimuma ulaşır bu nedenle, detorsiyon öncesi maksimum oksidatif korumaya sahip olmak önemlidir (83). Literatürde detorsiyon öncesinde veya sonrasında, i.p, intratestiküler, intravenöz ve oral yollarla antioksidan ajan uygulayan çalışmalar olmakla birlikte en yaygın yöntem olarak detorsiyon öncesinde i.p ajan enjeksiyonu kullanılmaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda kullandığımız antioksidan ajan *p*-CA, dokuda yeterli konsantrasyona ulaşabilmesi için detorsiyondan 30 dk önce i.p olarak uygulandı. Ayrıca çalışmamızda antioksidan ajan olarak araştırılan *p*-CA'nın literatürde mevcut olan farklı İ/R modelleri göz önüne alınarak 50 mg/kg ve 100 mg/kg olacak şekilde iki doz halinde uygulanmasına karar verildi (11, 84). Literatürdeki deneysel çalışmalarda İ/R hasarı ile ilişkili patolojik durumların tespitinde oksidatif stres ile ilişki parametreler, inflamatuvar parametreler ve histopatolojik değerlendirme sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada İ/R hasarının derecesi JTBS kullanılarak histopatolojik olarak, doku ve serumda oksidatif hasar göstergeleri kullanılarak da biyokimyasal olarak belirlendi ve *p*-CA'nın bu hasar üzerindeki etkileri incelendi.

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda antioksidan özellikleri ile dikkat çeken *p*-CA'nın etkisi, İ/R hasarı oluşturulan birçok dokuda yapılan çalışmalarla değerlendirildiği görülmekle birlikte TT oluşturulan deney hayvanları üzerinde etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tanyeli ve ark. (12) sol renal arter klemplemesi ile oluşturdukları renal İ/R modelinde, *p*-CA'yı iskemiden 60 dk önce ve reperfüzyondan 30 dk önce olacak şekilde iki doz halinde uyguladıkları çalışmada; shama göre İ/R grubunda TAS ve SOD seviyesinde azalma, TOS, MDA ve OSİ değerlerinde yükselme tespit etmişlerdir. *p*-CA uygulanan gruplarda TAS ve SOD değerinde artış, TOS ve MDA değerlerinde ise düşüş tespit etmişlerdir. Ve yine Tanyeli ve ark.'nın (85) gerçekleştirdiği deneysel intestinal İ/R modelinde İ/R grubunda oksidatif hasara bağlı olarak MDA seviyesi, TOS ve OSİ değerlerinin arttığı, TAS değeri ve SOD aktivitesinin azaldığı, *p*-CA gruplarında ise İ/R grubuna göre MDA seviyesi, TOS ve OSİ değerlerinin azaldığı, TAS değeri ve SOD

aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Parvizi ve ark. (86) tarafından oluşturulan hepatik İ/R modelinde 100 mg/kg *p*-CA'nın 7 gün i.p enjeksiyonunun ratlarda antioksidan seviyelerini (SOD, GSH ve CAT) artırdığı, karaciğer fonksiyonel enzimlerini (ALT, AST, ALP) ve kaspaz-3'ün gen ekspresyonlarını azaltarak karaciğeri İ/R hasarına karşı koruduğu saptanmıştır. Sakamula ve ark. (10) 2 hafta oral yoldan 100 mg/kg *p*-CA uygulaması sonrası bilateral ana karotis arter oklüzyonu ile serebral İ/R oluşturulan farelerde; MDA seviyelerinin, beyin enfarktüs volümünün ve hipokampal nöronal ölümün azaldığını, CAT ve SOD aktivitesinin arttığını tespit etmiştir.

Çalışmamıza konu olan deney hayvanları ile oluşturulan TT modellerinde ise farklı antioksidan maddeleri kullanılarak yapılmış birçok çalışma mevcuttur (87-89). Deneysel akut TT çalışmalarında sonuçlar deneylerde kullanılan torsiyon oluşturma yöntemine, torsiyon derecesi ve süresine, hayvan türüne ve yaşına, gözlem süresine ve çalışılan parametrelere göre farklılık göstermektedir (90).

Testis torsiyonu çalışmalarında oksidatif stresin biyokimyasal belirteçleri, ciddi fizyolojik ve morfolojik değişiklikler oluşmadan önceki erken hücrel değişiklikleri saptamada kullanılır (53). MDA lipid peroksidasyon derecesini temsil eder ve dolaylı olarak İ/R hasar derecesini gösterir (91). Literatürde MDA seviyeleri bakımından gruplar arası fark bulamayan az sayıda çalışma olmakla birlikte (90, 92), çoğunda İ/R sonucu MDA seviyelerinde artış gözlenmiştir (93-96). Çalışmamızda doku ve serum MDA seviyelerini değerlendirdiğimizde literatürdeki çalışmalarla benzer olarak İ/R grubunda MDA seviyelerinde kontrole göre artış gözlemlendi. *p*-CA tedavisi sonrası doku ve serumda İ/R grubuna göre MDA seviyelerindeki azalışın sebebi *p*-CA'nın lipid peroksidasyonunu önleyerek MDA birikimini azaltmasına bağlı olabilir.

GPx ve SOD normal şartlar altında oluşan ROS'un zararlı etkilerine karşı enzimatik antioksidan savunma sisteminde yer alır. GSH ise hücrelerde bol bulunan protein olmayan tiyoldür ve rat testislerinde yüksek konsantrasyonlarda olduğu bildirilmiştir (97). Wei ve ark. (96) sol testisin 720° 2 saat torsiyon 4 saat detorsiyonu modelinde SOD aktivitesinin azaldığını belirtmişlerdir. Ayan ve ark. (14) 2 saat iskemi 30 dk detorsiyon sonrası torsiyon grubundaki SOD ve GPx aktivitelerini sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Testisteki SOD ve GPx enzim aktivitelerinin artışının hücrel oksidatif stresi yansıtabileceğini veya bu enzimlerin kompensatuar mekanizmalara dahil olabileceği için artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Abbasoğlu ve ark. (98) sol testis 720° 2 saat torsiyon 2 saat

detorsiyon modelinde gruplar arası SOD ve GPx aktivitelerinde farklılık olmadığını tespit etmişlerdir. Chi ve ark. (99) İ/R sonucu doku GPx seviyelerinde azalma olduğunu saptamışlardır, benzer şekilde Shamsi-Gamchi ve ark. (100) TT ve T/D uygulanan gruplarda kontrole göre GPx seviyelerinde azalma olduğunu belirtmişlerdir. Atılğan ve ark. (101) serum ve doku SOD seviyelerini İ/R grubundaki ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. 2 saat torsiyon, 24 saat detorsiyon ile oluşturulan İ/R modelinde Qiao ve ark. (102) T/D'nin SOD aktivitesi üzerinde belirgin bir etkisi olmamasına karşın GPx aktivitesinin azaldığını belirtmişlerdir. 4 saat torsiyon 4 saat detorsiyon uygulanan başka bir İ/R modelinde İ/R hasarı ile SOD aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (102). Guimaraes ve ark. (103) İ/R sonucu dokuda GSH seviyesinde düşüş tespit etmişlerdir. Bodur ve ark. (104) T/D grubunda kontrole kıyaslandığında GPx aktivitesinde artış, gruplar arasında SOD aktivitelerinde ve GSH düzeylerinde farklılık saptamamışlardır. Prepubertal ratlarda yapılan çalışmada İ/R grubunda ipsilateral testislerde SOD ve GPx aktivitelerinde artış tespit edildiği bildirilmiştir (105). Çelik ve ark. (106) yapmış oldukları deneysel çalışmada kontrol ve diğer gruplara göre T/D grubunda SOD, GSH düzeylerinin azaldığını ortaya koymuşlardır. 2 saat torsiyon 2 saat detorsiyon modelinde İ/R grubunda SOD enzim aktivitesinin azalması yetersiz antioksidan kapasite ile ilişkilendirilmiştir (91). Uz ve ark. (107) sol testisin 720° 2 saat torsiyon 4 saat detorsiyonu ile oluşturulan İ/R modelinde antioksidan uygulanan grupta SOD aktivitesinde azalma, GPx aktivitesinde artış tespit etmişlerdir. Fouad ve ark. (108) T/D sonrası sham operasyon grubuna kıyasla GPx ve SOD aktivitelerinde azalma ayrıca tedavi sonrası GPx ve SOD aktivitesinde artış tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda doku SOD düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermezken, serum SOD düzeylerinin İ/R sonucu azalışı anlamlı değildi ayrıca 100 mg/kg *p*-CA uygulaması ile SOD düzeyleri İ/R grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir. Çalışmamızda İ/R sonucu doku GPx düzeylerinde anlamlı düşüş tespit ettik, 100 mg/kg *p*-CA uygulaması ile doku GPx düzeyleri İ/R grubuna göre anlamlı artış gösterdi. Serum GPx seviyelerinde İ/R sonucu düşüş, *p*-CA tedavisi sonrası artış tespit edilse de gruplar arasında istatistiksel açıdan fark yoktu. Çalışmamızda endojen antioksidan molekül GSH düzeyi serum ve dokuda İ/R sonucu anlamlı düzeyde azalmıştır. *p*-CA tedavisi beklediğimiz gibi azalan GSH seviyelerini artırmıştır. Çalışmamızda İ/R grubundaki MDA seviyelerinde artış GSH, GPx seviyelerinde azalma, testis T/D sonrası artan ROS üretiminin, testislerde endojen antioksidanların inaktivasyonuna yol açtığını düşündürmektedir. Reperfüzyon öncesi *p*-CA

enjeksiyonu ipsilateral testislerde GPx ve GSH miktarını önemli ölçüde artırmıştır. Bu sonuçlar, p-CA'nın testislerde bu antioksidan enzimlerin seviyelerini artırarak ROS'u temizleyebileceğini düşündürmektedir.

Oksidatif stres oksidanlarda artış ve/veya antioksidanlarda azalış ile kendini gösterir, bu nedenle vücudun genel veya net oksidatif durumunu değerlendirmek için toplam oksidan ve antioksidan seviyelerin aynı anda ölçülmesi gerekir. Farklı biyolojik numunelerin farklı antioksidanları içermesi ve potansiyel etkileşimleri, her bir antioksidanı ayrı ayrı ölçmeyi zorlaştırdığından bu tip bir ölçüm vücudun genel antioksidan durumunu temsil etmez. TAS olarak bilinen tüm antioksidanların birleşik aktivitelerinin ölçümü genel antioksidatif durumu tahmin etmek için kullanılır. Benzer şekilde, TOS genel oksidasyon durumunu ölçmek için kullanılır (109). TAS ve TOS'un, GPx, MDA ve CAT gibi oksidan ve antioksidan parametrelerin bir kombinasyonu olduğu belirtilmiştir (99).

Köksal ve ark. (92) 1 saat iskemi ve 24 saat perfüzyondan sonra tüm gruplarda TAS ve TOS değerleri arasında fark tespit edememişlerdir. Gökçe ve ark. (110) C57BL/6 farelerde 720°, 2 saat torsiyon ve 4 saat detorsiyon modelinde kontrol grubuna kıyasla T/D grubunda TOS ve OSİ seviyelerinin anlamlı derecede yükseldiğini bildirmişlerdir. Shamsi-Gamchi ve ark. (100) T/D uygulanan gruplarda TT uygulanan gruplara kıyasla TAS seviyesinde artış tespit etmiş, TAS'ın tek başına testislerdeki gerçek antioksidan durumu temsil etmediğini ve TAS düzeyindeki artışın, resirküle edilen oksijenli kanın antioksidan içeriğiyle ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yuluğ ve ark. (15) sol testis 720° 4 saat torsiyon uygulanan ratlarda detorsiyondan 24 saat sonra elde edilen numuneler ile yapılan çalışmada serum TOS ve OSİ seviyeleri T/D ile önemli artış gösterirken, TAS seviyeleri azalmıştır. Chi ve ark. (99) T/D grubunda serum TAS seviyelerinde azalma ile birlikte serum OSİ ve TOS seviyelerinde artış tespit etmişlerdir. Guimaraes ve ark. (103) İ/R sonucu plazma TAS seviyelerinde gruplar arasında fark bulamamışlardır. Tusat ve ark. (111) T/D grubunda kontrol grubuna göre serum TOS ve OSİ düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğunu ancak serum TAS düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadığını belirtmişlerdir. Demir ve ark. (112) T/D sonrası OSİ ve TOS seviyelerinde kontrole göre artış olduğunu tedavi grubunda ise TAS seviyelerinin T/D grubuna göre yüksek olduğunu ancak aralarında istatistiksel açıdan fark olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda İ/R grubunda doku TOS ve OSİ seviyelerinin yükselişi, TAS seviyelerinin düşmesi oksidan maddelerin aşırı üretimine veya atılımının azalmasına bağlı olabilir ayrıca

bu durum akut testiküler hasarın oluştuğunu destekler nitelikteydi. Serumda kontrol ve İ/R grubu arasında TAS/TOS/OSİ seviyelerinde önemli farklılıkların olmaması, akut spermatik kord T/D sonucu dokuda hasar oluşturan mediatörlerin, kandaki antioksidan sistemi etkilemediğini düşündürmektedir.

İskemi reperfüzyon hasarının histopatolojik değerlendirmesinde mikroskopik skorlama sistemi yaygın olarak kullanılır (113). Johnsen skorlaması seminifer tübüllerin yanısıra gözlemlenen hücrelerin profiline göre spermatogenezi değerlendirmek için kullanılan skorlama sistemidir, germinal epiteldeki progresif dejenerasyonun değerlendirilmesi ile histopatolojik hasar ölçülür. Testiste histopatolojik hasar arttıkça skor azalır (78). Literatürdeki birçok çalışmada JTBS'nin T/D uygulanan grupta kontrole göre düşük olduğu gösterilmiştir (15, 94, 98, 99). Şeker ve ark. (94) tarafından yapılan deneysel bir çalışmada, İ/R grubunda seminifer tübüllerde ve germ hücrelerinde dejenerasyonlar görüldüğünü belirtmişlerdir. Kim ve ark. (114) İ/R grubunda anormal morfoloji ve bozulmuş spermatogenez tespit etmiştir. Mirhoseini ve ark. (115) T/D grubunda kontrole kıyasla seminifer tübül çapının önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuştur. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak İ/R grubunda JTBS kontrole göre düşüktü, 100 mg/kg *p*-CA uygulaması ile İ/R grubuna göre JTBS'de artış gözlemlendi. Ayrıca kontrol grubunda seminifer tübüller normal görünümde iken, İ/R grubunda tübül epitelinde vakuolizasyon ve ayrılmalar mevcuttu, *p*-CA tedavisi ile vakuolizasyon ve ayrılmalarda azalma tespit edildi. Bu durum *p*-CA'nın histopatolojik hasarı önlediğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda testiste T/D ile oluşturulan testiküler İ/R hasarında *p*-CA'nın yüksek doz uygulamasının testiküler hasara karşı koruyucu etkisinin olduğu ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar, içeriğinde *p*-CA bulunan, aralarında bölgemizde de sıklıkla üretilen ve kullanılan kuşburnu, karayemiş, Türk propolisi'nin de yer aldığı birçok doğal ürünün TT vakalarında kullanımının olumlu sonuçlar doğurabileceğini düşündürmektedir. Ancak torsiyon sonrası moleküler belirteçler veya histolojik derecelendirme pratik ve anlık veriler sağlamanın yanında dolaylı ölçüm olduklarından uzun vadeli fonksiyonel sonuçları yansıtmazlar. Histolojik ölçümlerin torsiyon sonrası insanlarda pratik olarak elde edilememesi bu ölçüm kullanılarak sunulan hayvan deneyi sonuçlarının insan sonuçlarıyla ilişkilendirilmesini mümkün kılmamaktadır (116). Bu bağlamda çalışmamızda *p*-CA'nın İ/R kaynaklı testis hasarı üzerindeki etkinliği

ve ilişkili doku hasarını azaltması konusunda elde ettiğimiz sonuçların klinik araştırmalarla desteklenmesi gerekmektedir.



6. KAYNAKLAR

1. Vaos G, Zavras N (2017). Antioxidants in experimental ischemia-reperfusion injury of the testis: Where are we heading towards? *World J Methodol* 7(2): 37-45.
2. Kroger-Jarvis MA, Gillespie GL (2016). Presentation of testicular torsion in the emergency department. *Adv Emerg Nurs J* 38(4): 295-299.
3. Shimizu S, Tsounapi P, Dimitriadis F, Higashi Y, Shimizu T, Saito M (2016). Testicular torsion-detorsion and potential therapeutic treatments: A possible role for ischemic postconditioning. *Int J Urol* 23(6): 454-463.
4. Wu MY, Yiang G, Liao WT, Tsai APY, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ (2018). Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem* 46(4): 1650-1667.
5. Çay A, Alver A, Küçük M, Işık O, Eminağaoğlu MS, Karahan SC, Değer O (2006). The effects of N-Acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *J Surg Res* 131(2): 199-203.
6. Simonyi A, Wang Q, Miller RL, Yusof M, Shelat PB, Sun AY, Sun GY (2005). Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Mol Neurobiol* 31(1-3): 135–147.
7. Mark R, Lyu X, Lee JJL, Parra-Saldívar R, Chen WN (2019). Sustainable production of natural phenolics for functional food applications. *J Funct Foods* 57: 233-254.
8. Ferreira PS, Victorelli FD, Fonseca-Santos B, Chorilli M (2019). A review of analytical methods for *p*-coumaric acid in plant-based products, beverages, and biological matrices. *Crit Rev Anal Chem* 49(1): 21-31.
9. Boo YC (2019). *p*-Coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: A review focusing on its antimelanogenic effects. *Antioxidants (Basel)* 8(8): 275.
10. Sakamula R, Thong-Asa W (2018). Neuroprotective effect of *p*-coumaric acid in mice with cerebral ischemia reperfusion injuries. *Metab Brain Dis* 33(3): 765-773.
11. Guven M, Aras AB, Akman T, Sen HM, Ozkan A, Salis O, Sehitoglu I, Kalkan Y, Silan C, Deniz M, Cosar M (2015). Neuroprotective effect of *p*-coumaric acid in rat model of embolic cerebral ischemia. *Iran J Basic Med Sci* 18(4): 356-363.

12. Tanyeli A, Guzel D (2018). Protective effect of *p*-coumaric acid as free oxygen radical scavenger in experimental renal ischemia-reperfusion model. *Sakarya Med J* 8(3): 625-631.
13. Nishi K, Ramakrishnan S, Gunasekaran, VP, Parkash K, Ramakrishnan A, Vijayakumar N, Ganeshan M (2018). Protective effects of *p*-coumaric acid on ethanol induced male reproductive toxicity. *Life Sci* 209: 1-8.
14. Ayan M, Tas U, Sogut E, Caylı S, Kaya H, Esen M, Erdemir F, Uysal M (2016). Protective effect of thymoquinone against testicular torsion induced oxidative injury. *Andrologia* 48(2): 143-151.
15. Yuluğ E, Türedi S, Karagüzel E, Kutlu O, Menteşe A, Alver A (2014). The short term effects of resveratrol on ischemia-reperfusion injury in rat testis. *J Pediatr Surg* 49(3): 484-489.
16. Ekşi E, Yalçın Cömert HS, Imamoğlu M, Alver A, Aydın Mungan S, Sarıhan H (2020). Effects of myricetin on testicular torsion-detorsion injury in rats. *Andrologia* 52(10): e13775.
17. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20(7): 933-956.
18. Minatel IO, Borges CV, Ferreira MI, Gomez HAG, Chen CYO, Lima GPP (2017). Phenolic compounds: functional properties, impact of processing and bioavailability. *Phenolic Compounds-Biological Activity* 1st ed. 1-24.
19. Kumar N, Goel N (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep* 24: e00370.
20. Saibabu V, Fatima Z, Khan LA, Hameed S (2015). Therapeutic potential of dietary phenolic acids. *Adv Pharmacol Sci* 2015(1): 823539.
21. Gunia-Krzyzak A, Sloczynska K, Popiol J, Koczurkiewicz P, Marona H, Pekala E (2018). Cinnamic acid derivatives in cosmetics: current use and future prospects. *Int J Cosmet Sci* 40(4): 356-366.
22. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5(1): 9-19.

23. Poljsak B, Suput D, Milisav I (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 956792.
24. Braunersreuther V, Jaquet V (2012). Reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury: from physiopathology to therapeutic approaches. *Curr Pharm Biotechnol* 13(1): 97-114.
25. Turner TT, Lysiak JJ (2008). Oxidative stress: A common factor in testicular dysfunction. *J Androl* 29(5): 488-498.
26. Ma A, Qi S, Chen H (2008). Antioxidant therapy for prevention of inflammation, ischemic reperfusion injuries and allograft rejection. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 6(1): 20-43.
27. Aruoma OI (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* 75(2): 199-212.
28. Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Serbest radikaller. *MAKÜ Sag Bil Enst Derg* 4(1): 50-59.
29. Ko EY, Sabanegh Jr ES, Agarwal, A (2014). Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril* 102(6): 1518-1527.
30. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.
31. Kurutas EB (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J* 15(1): 71.
32. Ayala A, Munoz MF, Argüelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 360438.
33. Kunwar A, Priyadarsini KI (2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J Med Allied Sci* 1(2): 53-60.
34. Dare BJ, Oyeniyi F, Olaniyan OT (2014). Role of antioxidant in testicular integrity. *Annual Research & Review in Biology* 4(7): 998-1023.

35. Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32(8): 595-603.
36. Kulikowska-Karpinska E, Moniuszko-Jakoniuk J (2004). The antioxidative barrier in the organism. *Pol J Environ Stud* 13(1): 5-13.
37. Davies K (2001). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50: 279-289.
38. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int* 2014: 761264.
39. Minutoli L, Puzzolo D, Rinaldi M, Irrera N, Marini H, Arcoraci V, Bitto A, Crea G, Pisani A, Squadrito F, Trichilo V, Bruschetta D, Micali A, Altavilla D (2016). ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation in brain, heart, kidney, and testis ischemia/reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 1-10.
40. Jansen EH, Ruskovska T (2013). Comparative analysis of serum (anti)oxidative status parameters in healthy persons. *Int J Mol Sci* 14(3): 6106-6115.
41. Barrera G, Pizzimenti S, Daga M, Dianzani C, Arcaro A, Cetrangolo GP, Giordano G, Cucci MA, Graf M, Gentile F (2018). Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. *Antioxidants (Basel)* 7(8): 102.
42. Soares ROS, Losada DM, Jordani MC, Evora P, Castro-e-Silva O (2019). Ischemia reperfusion injury revisited: an overview of the latest pharmacological strategies. *Int J Mol Sci* 20(20): 5034.
43. Eltzschig HK, Collard CD (2004). Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 70: 71-86.
44. Ferrari RS, Andrade CF (2015). Oxidative stress and lung ischemia-reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev* 2015: 590987.
45. Gourdin MJ, Bree B, De Kock M (2009). The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol* 26(7): 537-547.
46. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ (2016). Ischemia/reperfusion. *Compr Physiol* 7(1): 113-170.

47. Cebova M, Pechanova O (2020). Protective effects of polyphenols against ischemia reperfusion injury. *Molecules* 25(15): 3469.
48. Turer AT, Hill JA (2010). Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am J Cardiol* 106(3): 360-368.
49. Ferrari R, Balla C, Malagù M, Guardigli G, Morciano G, Bertini M, Biscaglia S, Campo G (2017). Reperfusion damage a story of success, failure, and hope. *Circ J* 81(2): 131-141.
50. Gottlieb RA (2011). Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 16(3-4): 233-238.
51. De Groot H, Rauen U (2007). Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc* 39(2): 481-484.
52. Morciano G, Bonora M, Campo G, Aquila G, Rizzo P, Giorgi C, Wieckowski MR, Pinton P (2017). Mechanistic role of mPTP in ischemia-reperfusion injury. *Adv Exp Med Biol* 982: 169-189.
53. Filho DW, Torres MA, Bordin ALB, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A (2004). Spermatoc cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia–reperfusion injury. *Mol Aspects Med* 25(1-2): 199-210.
54. Granger DN, Kvietys PR (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol* 6: 524-551.
55. Cadenas S (2018). ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic Biol Med* 117: 76-89.
56. Maxwell SRJ, Lip GYH (1997). Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol* 58(2): 95-117.
57. Zweier JL, Hassan Talukder MA (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 70(2): 181-190.
58. Kleikers PW, Wingler K, Hermans JJ, Diebold I, Altenhöfer S, Radermacher KA, Janssen B, Görlach A, Schmidt HH (2012). NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. *J Mol Med (Berl)* 90(12): 1391-1406.

59. McCann SK, Roulston CL (2013). NADPH oxidase as a therapeutic target for neuroprotection against ischaemic stroke: Future perspectives. *Brain Sci* 3(2): 561-598.
60. Schofield ZV, Woodruff TM, Halai R, Wu MC, Cooper MA (2013). Neutrophils a key component of ischemia-reperfusion injury. *Shock* 40(6): 463-470.
61. Carden DL, Granger DN (2000). Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190(3): 255-266.
62. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA (2002). Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 105(2): 248-258.
63. Girn HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AI, Homer-Vanniasinkam S (2007). Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. *Vasc Endovascular Surg* 41(4): 277-293.
64. Bowlin PR, Gatti JM, Murphy JP (2017). Pediatric testicular torsion. *Surg Clin North Am* 97(1): 161-172.
65. Feher AM, Bajory Z (2015). A review of main controversial aspects of acute testicular torsion. *J Acute Dis* 5(1): 1-8.
66. Ringdahl E, Teague L (2006). Testicular torsion. *Am Fam Physician* 74(10): 1739-1743.
67. Lavalley ME, Cash J (2005). Testicular torsion: evaluation and management. *Curr Sports Med Rep* 4(2): 102-104.
68. Cuckow PM, Frank JD (2000). Torsion of the testis. *BJU Int* 86(3): 349-353.
69. Drlik M, Kocvara R (2013). Torsion of spermatic cord in children: a review. *J Pediatr Urol* 9(3): 259-266.
70. Karaguzel E, Kadihasanoglu M, Kutlu O (2014). Mechanisms of testicular torsion and potential protective agents. *Nat Rev Urol* 11(7): 391-399.
71. Siva Kumar T, Neeraja P. (2019). Factors associated with oxidative stress in the testes and the mitigating role of antioxidants: A review. *Intern Jour Recent Innov Medicine and Clinical Research* 1(1): 6-12.
72. Aitken RJ, Roman SD (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 1(1): 15-24.

73. Yagi K (1984). Assay of blood plasma or serum. *Methods Enzymol* 109: 328-331.
74. Uchiyama M, Mihara M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86(1): 271-278.
75. Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38(12): 1103-1111.
76. Erel O (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 37(2): 112-119.
77. Aycicek A, Erel O, Kocyigit A (2005). Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. *Pediatr Int* 47(6): 635-639.
78. Johnsen SG (1970). Testicular biopsy score count – A method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1(1): 2-25.
79. Sekerci CA, Tanidir Y, Sener TE, Sener G, Cevik O, Yarat A, Alev-Tuzuner B, Cetinel S, Kervancioglu E, Sahan A, Akbal C (2017). Effects of platelet-rich plasma against experimental ischemia/reperfusion injury in rat testis. *J Pediatr Urol* 13(3): 317.e1-317.e9.
80. Turner TT (1985). Acute experimental testicular torsion: No effect on the contralateral testis. *J Androl* 6(1): 65-72.
81. Fonkalsrud EW (1987). Testicular undescend and torsion. *Pediatr Clin North Am* 34(5): 1305-1317.
82. Asadi N, Bahmani M, Kheradmand A, Rafieian-Kopaei M (2017). The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: a review. *J Clin Diagn Res* 11(5): IE01-IE05.
83. Turner TT, Bang HJ, Lysiak JL (2004). The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. *J Urol* 172(6 Pt 2): 2574-2578.
84. Güzel D, Tanyeli A (2018). *p*-Coumaric acid reduces renal ischemia reperfusion-induced acute lung injury. *Sakarya Med J* 8(3): 644-649.

85. Tanyeli A, Ekinçi Akdemir FN, Eraslan E, Güler MC, Sebin SÖ, Gülçin İ (2020). Role of *p*-coumaric acid in alleviating of the intestinal ischemia/reperfusion injury. *Kocaeli Med J* 9(1): 166-173.
86. Parvizi F, Yaghmaei P, Rohani SAH, Mard SA (2020). Hepatoprotective properties of *p*-coumaric acid in a rat model of ischemia-reperfusion. *Avicenna J Phytomed* 10(6): 633-640.
87. Aktoz T, Kanter M, Aktas C (2010). Protective effects of quercetin on testicular torsion/detorsion-induced ischaemia-reperfusion injury in rats. *Andrologia* 42(6): 376-383.
88. Erol B, Sari U, Amasyali AS, Ozkanli S, Sogut S, Hanci V, Efiloglu O, Danacioglu YO, Engin P, Yencilek F, Atis G, Yildirim A, Alkoc OA, Caskurlu T (2017). Comparison of combined antioxidants and thymoquinone in the prevention of testis ischemia- reperfusion injury. *Andrology* 5(1): 119-124.
89. Aktaş BK, Bulut S, Bulut S, Baykam MM, Ozden C, Senes M, Yücel D, Memiş A (2010). The effects of N-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Pediatr Surg Int* 26(3): 293-298.
90. Turan C, Küçükaydın N, Bekerecioğlu A, Kazez A, Doğan P, Küçükaydın M (1996). The effect of vitamin E on ipsilateral and contralateral testis following unilateral testicular torsion in rats. *Res Exp Med (Berl)* 196(4): 243-246.
91. Topdağı Ö, Tanyeli A, Ekinçi Akdemir FN, Eraslan E, Güler MC (2020). Barbaloin attenuates oxidative testicular injury induced by ischemia reperfusion via antioxidant effects. *TJOS* 5(1): 28-33.
92. Koksall M, Oğuz E, Baba F, Eren MA, Ciftci H, Demir ME, Kurcer Z, Take G, Aral F, Ocak AR, Aksoy N, Ulas T (2012). Effects of melatonin on testis histology, oxidative stress and spermatogenesis after experimental testis ischemia-reperfusion in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16(5): 582-588.
93. Wei SM, Wang RY, Chen YS (2020). Sesamol protects testis from ischemia-reperfusion injury through scavenging reactive oxygen species and upregulating CREM τ expression. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 9043806.

94. Seker U, Nergiz Y, Aktas A, Akkus M, Ozmen MF, Uyar E, Soker S (2020). Trolox is more successful than allopurinol to reduce degenerative effects of testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *J Pediatr Urol* 16(4): 465-e1.
95. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J (2007). Beneficial effect of taurine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Urology* 70(6): 1237-1242.
96. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J (2011). Protective effect of rutin on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 46(7): 1419-1424.
97. Payabvash S, Salmasi AH, Kiumehr S, Tavangar SM, Nourbakhsh B, Faghihi SH, Dehpour AR (2007). Salutary effects of N-acetylcysteine on apoptotic damage in a rat model of testicular torsion. *Urol Int* 79(3): 248-254.
98. Abbasoğlu L, Kalaz EB, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M (2012). Beneficial effects of taurine and carnosine in experimental ischemia/reperfusion injury in testis. *Pediatr Surg Int* 28(11): 1125-1131.
99. Chi KK, Zhang WH, Wang GC, Chen Z, He W, Wang SG, Cui Y, Lu P, Wang XJ, Chen H (2017). Comparison of intraperitoneal and intraepididymal quercetin for the prevention of testicular torsion/detorsion-induced injury. *Urology* 99: 106-111.
100. Shamsi-Gamchi N, Razi M, Behfar M (2018). Testicular torsion and reperfusion: evidences for biochemical and molecular alterations. *Cell Stress Chaperones* 23(3): 429-439.
101. Atilgan D, Parlaktas B, Uluocak N, Gencten Y, Erdemir F, Ozyurt H, Erkorkmaz U, Aslan H (2014). Pomegranate (*Punica granatum*) juice reduces oxidative injury and improves sperm concentration in a rat model of testicular torsion-detorsion. *Exp Ther Med* 8(2): 478-482.
102. Qiao H, Ma H, Cao W, Chen H, Wei J, Li Z (2017). Protective effects of polydatin on experimental testicular torsion and detorsion injury in rats. *Reprod Fertil Dev* 29(12): 2367-2375.
103. Guimaraes SB, Aragao AA, Santos JM, Kimura Ode S, Barbosa PH, Vasconcelos PR (2007). Oxidative stress induced by torsion of the spermatic cord in young rats. *Acta Cir Bras.* 22(1): 30-33.

104. Bodur A, Alver A, Kahraman C, Altay DU, İnce İ (2016). Investigation of N-acetylcysteine on contralateral testis tissue injury by experimental testicular torsion: long-term effect. *Am J Emerg Med* 34(6): 1069-1074.
105. Parlaktas BS, Atilgan D, Ozyurt H, Gencten Y, Akbas A, Erdemir F, Uluocak N (2014). The biochemical effects of ischemia-reperfusion injury in the ipsilateral and contralateral testes of rats and the protective role of melatonin. *Asian J Androl* 16(2): 314-318.
106. Celik E, Oguzturk H, Sahin N, Turtay MG, Oguz F, Ciftci O (2016). Protective effects of hesperidin in experimental testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Med Sci* 12(5): 928-934.
107. Uz E, Söğüt S, Sahin S, Var A, Ozyurt H, Güleç M, Akyol O (2002). The protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *World J Urol* 20(4): 264-270.
108. Fouad AA, Qutub HO, Jresat I (2017). Dose-dependent protective effect of baicalin against testicular torsion-detorsion in rats. *Andrologia* 49(1): 1-8.
109. Feng JF, Lu L, Zeng P, Yang YH, Luo J, Yang YW, Wang D (2011). Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients. *Int J Clin Oncol* 17(6): 575-583.
110. Gökçe A, Oktar S, Koc A, Gonenci R, Yalcinkaya F, Yonden Z, Duru M (2010). Protective effect of thymoquinone in experimental testicular torsion. *Urol Int* 85(4): 461-465.
111. Tusat M, Mentese A, Demir S, Alver A, Imamoglu M (2017). Medical ozone therapy reduces oxidative stress and testicular damage in an experimental model of testicular torsion in rats. *Int Braz J Urol* 43(6): 1160-1166.
112. Demir S, Kazaz IO, Aliyazicioglu Y, Kerimoglu G, Teoman AS, Yaman SO, Arslan A, Mentese A (2020). Effect of ethyl pyruvate on oxidative state and endoplasmic reticulum stress in a rat model of testicular torsion. *Biotech Histochem* 95(4): 317-322.
113. Ayvaz S, Aksu B, Inan M, Uzun H, Aydin S, Bilgi S, Umit HC, Pul M (2009). The effects of N-acetylcysteine on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Saudi Med J* 30(1): 24-29.

114. Kim HJ, Lee JW, Hwang BR, Lee YA, Kim JI, Cho YJ, Jhun HJ, Han JS (2016). Protective effect of pterostilbene on testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 51(7): 1192-1196.
115. Mirhoseini M, Talebpour Amiri F, Karimpour Malekshah AA, Rezanejad Gatabi Z, Ghaffari E (2017). Protective effects of melatonin on testis histology following acute torsion-detorsion in rats. *Int J Reprod Biomed* 15(3): 141-146.
116. Thaker H, Nelson CP (2020). Adjuvant pharmacological and surgical therapy for testicular torsion: Current state of the art. *J Pediatr Urol* 16(6): 807-814.





EKLER

EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi



EK 1. (Devam)



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : ZİHNİ, Hüseyin Çınar :

Uyruğu

Doğum Tarihi ve Yeri

E-Posta

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2021
Lisans	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	2016
Lise	Beşikdüzü Anadolu Lisesi	2009

YABANCI DİL

İngilizce