



**TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON  
HASARINA KARŞI PHOENİXİN'İN KORUYUCU  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**2023  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ANATOMİ**

**Jemal HUDAYKULİYEVA**

**Tez Danışmanı  
Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ**

**TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON HASARINA KARŞI  
PHOENİXİN'İN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Jemal HUDAYKULİYEVA**

**Tez Danışmanı**

**Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ**

**T.C.**

**Karabük Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Anatomi Anabilim Dalında**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Olarak Hazırlanmıştır**

**KARABÜK**

**Eylül 2023**

Jemal HUDAYKULIYEVA tarafından hazırlanan “TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON HASARINA KARŞI PHOENİXİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ

.....

Tez Danışmanı, Anatomi Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Anatomi Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 18/09/2023

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Doç. Dr. Şeyma TOY (KBÜ)

.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ (KBÜ)

.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Rukiye ÇİFTÇİ (GİBTÜ)

.....

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Program Seçim derecesini onamıştır.

Doç. Dr. Zeynep ÖZCAN

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

*“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan eder”*

Jemal HUDAYKULİYEVA

## ÖZET

**Yüksek Lisans Tezi**

### **TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON HASARINA KARŞI PHOENİXİN'İN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Jemal HUDAYKULİYEVA**

**Karabük Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Anatomi Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı**

**Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ**

**Eylül 2023, 56 sayfa**

Özellikle perinatal ve pubertal dönemlerde sık karşılaşılan klinik bir durum olan testiküler torsiyon, testis dokusunda hasara ve infertiliteye neden olabilmektedir. İskemik hasara karşı oldukça dayanıksız olan testis dokusunda hasarı en aza indirmek için erken tanı ve müdahale önem arz etmektedir. Phoenixin (PNX), üreme fonksiyonlarında rol oynadığı bilinen bir peptittir. Hem merkezi olarak hipotalamus'ta ve nucleus arcuatus'ta hem de periferik olarak kardiyak ve gastrointestinal dokularda eksprese edilen PNX, gonadotropin salgılatıcı hormon aracılığıyla üreme hormonlarının salgısını düzenlemektedir. Bu çalışmanın amacı; PNX'in testis dokusundaki oksidatif hasar, inflamatuvar yanıt ve serum testosteron seviyesi üzerine etkileri incelenmesidir. Ayrıca testis dokularında meydana gelebilecek histopatolojik değişiklikler üzerine PNX'in etkilerinin seminifer tübül çapı, epitel kalınlığı, bazal membran kalınlığı gibi histopatolojik özelliklerin de incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, 48 adet erkek sıçan kullanıldı ve sıçanlar 4 gruba (Sham, TTD, TT+PNX+TD, TTD+PNX) (n=12) ayrıldı. Sham grubundaki sıçanlara sham testis torsiyon detorsiyon cerrahisi uygulanırken diğer üç gruptaki sıçanlara testis torsiyon detorsiyon cerrahisi uygulanacaktır. TT+PNX TD grubundaki sıçanlara torsiyonun 90. dakikasında, TTD+PNX grubundakilere de detorsiyon başlangıcında tek doz intraperitoneal PNX (50 µg/kg) uygulandı. Sham ve TTD gruplarındaki sıçanlara herhangi bir enjeksiyon uygulanmadı. Detorsiyondan 24 saat sonra tüm gruplardaki sıçanlar dekapite edilerek kan ve testis dokusu örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinden serum testosteron seviyeleri ELISA yöntemiyle belirlendi. Doku örneklerinin oksidatif hasarı belirlemek için SOD, MDA, TAS ve TOS düzeyleri; inflamatuvar hasarı belirlemek için ise TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeyleri belirlendi. Ayrıca testis dokusunda iskemi sonrası meydana gelebilecek histopatolojik değişiklikler rutin Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama yöntemiyle ve immünohistokimyasal yöntemler ile incelendi. İmmünohistokimyasal analizler kapsamında spermatogonyum kök hücreleri, Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri spesifik antikorlarla boyanıp hücre sayımı yapıldı ve gruplar arasında karşılaştırıldı.

TTD grubunda testis dokusunda SOD enzim aktivitesi ve TAS seviyesinin sham grubuna göre belirgin derecede azalmış olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Bunun yanı sıra testis dokusunda torsiyon detorsiyon hasarına bağlı olarak MDA, TOS, TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyelerinde belirgin bir artış görüldü ( $p<0.05$ ). PNX uygulanan gruplarda ise uygulama zamanından bağımsız olarak SOD enzim aktivitesi ve TAS seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ( $p<0.05$ ). Diğer taraftan PNX uygulamasının torsiyon detorsiyon hasarına bağlı olarak artan MDA, TOS, TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyelerinde azalım meydana getirdiği tespit edildi ( $p<0.05$ ). Yapılan histomorfolik analizler sonucunda PNX uygulanan gruplarda seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı TTD grubuna göre anlamlı derecede artmış bulunurken ( $p<0,05$ ) sham grubuna göre benzer bulundu ( $p>0,05$ ). Spermatogonia sayısı TTD grubunda sham grubuna göre anlamlı derecede azalmış bulundu ( $p<0,05$ ). PNX uygulanan gruplarda ise TTD grubuna göre artış gözlenirken ( $p<0,05$ ), sham grubuna göre benzer bulundu ( $p>0,05$ ). Spermatogonia sayımı yapılan tübüllerin çap ölçümleri de daha önceki seminifer tübül ölçümlerinde olduğu gibi TTD grubunda diğer gruplara göre azalmış bulundu ( $p<0,05$ ).

Bu alışma sonucunda, PNX uygulamasının testis dokusunu torsiyon detorsiyon hasarına karşı koruyucu bir etki gosterdiği belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Testis, torsiyon/detorsiyon, Phoenixin, oksidatif stres, histopatoloji

**Bilim Kodu** : 1005

## **ABSTRACT**

**Master Thesis**

### **INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF PHOENIXIN AGAINST ON TESTICULAR TORSION/DETORSION INJURY**

**Jemal HUDAYKULIYEVA**

**Karabük University  
Institute of Graduate Programs  
Department of Anatomy**

**Thesis Advisor**

**Assist. Prof. Dr. Nesibe YILMAZ**

**September 2023, 56 pages**

Testicular torsion, which is a common clinical condition especially in perinatal and pubertal periods, can cause damage to testicular tissue and infertility. Early diagnosis and intervention are important to minimize the damage to the testicular tissue, which is highly vulnerable to ischemic damage. Phoenixin (PNX) is a peptide known to play a role in reproductive functions. Expressed both centrally in the hypothalamus and nucleus arcuatus and peripherally in cardiac and gastrointestinal tissues, PNX regulates the secretion of reproductive hormones through gonadotropin-releasing hormone. The aim of this study; The effect of PNX on oxidative damage, inflammatory response and serum testosterone level in testicular tissue. In addition, it is aimed to examine the effects of PNX on histopathological changes that may occur in testicular tissues and histopathological features such as seminiferous tubule diameter, epithelial thickness, basement membrane thickness.



In the study, 48 male rats were used and the rats were divided into 4 groups (Sham, TTD, TT+PNX+TD, TTD+PNX) (n=12). While sham testicular torsion detorsion surgery will be applied to the rats in the sham group, testicular torsion detorsion surgery will be applied to the rats in the other three groups. A single dose of intraperitoneal PNX (50 µg/kg) was administered to rats in the TT+PNX TD group at the 90th minute of torsion, and at the beginning of detorsion to those in the TTD+PNX group. The rats in the Sham and TTD groups did not receive any injections. After 24 hours of detorsion, rats in all groups were decapitated and blood and testicular tissue samples were taken. Serum testosterone levels from blood samples were determined by ELISA method. SOD, MDA, TAS and TOS levels of tissue samples to determine oxidative damage; TNF- $\alpha$  and IL-6 levels were determined to determine inflammatory damage. In addition, histopathological changes that may occur in testicular tissue after ischemia were examined with routine Periodic Acid Schiff (PAS) staining method and immunohistochemical methods. Within the scope of immunohistochemical analysis, spermatogonium stem cells, Sertoli cells, Leydig cells were stained with specific antibodies, cell counts were made and compared between groups.

It was observed that SOD enzyme activity and TAS level in testicular tissue were significantly decreased in the TTD group compared to the sham group ( $p<0.05$ ). In addition, a significant increase was observed in MDA, TOS, TNF- $\alpha$  and IL-6 levels due to torsion detorsion damage in testicular tissue ( $p<0.05$ ). A statistically significant increase in SOD enzyme activity and TAS levels was determined in the PNX-treated groups, independent of the time of application ( $p<0.05$ ). On the other hand, it was determined that PNX application caused a decrease in MDA, TOS, TNF- $\alpha$  and IL-6 levels, which increased due to torsion detorsion damage ( $p<0.05$ ). As a result of histomorphologic analysis, seminiferous tubule diameter and epithelial thickness were found to be significantly increased in the PNX-treated groups compared to the TTD group ( $p<0.05$ ), while they were found to be similar compared to the sham group ( $p>0.05$ ). The number of spermatogonia was found to be significantly decreased in the TTD group compared to the sham group ( $p<0.05$ ). While an increase was observed in the PNX applied groups compared to the TTD group ( $p<0.05$ ), it was found to be similar compared to the sham group ( $p>0.05$ ). The diameter measurements of the tubules in which spermatogonia were counted were also found to be decreased in the

TTD group compared to the other groups, as in the previous seminiferous tubule measurements ( $p < 0.05$ ).

As a result of this study, it was determined that PNX application had a protective effect on testicular tissue against torsion detorsion damage.

**Keywords** : Testis, torsion/detorsion, Phoenixin, oxidative stress, histopathology

**Science Code** : 1005

## TEŞEKKÜR

Karabük Anatomi Anabilim Dalı'nda aldığım eğitimim boyunca emeği geçen, hiçbir zaman benden desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini paylaşan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ'a, Doç. Dr. Şeyma TOY'a, Arş. Gör. Yusuf SEÇGİN'e, Arş. Gör. Rukiye Sümeyye BAKICI'ya, Arş. Gör. Necati Emre ŞAHİN'e ve üniversitedeki beni seven bütün arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler ederim.

Her zaman kalbimde olan, her konuda bana güvenen, beni büyütüp bu günlere getiren, maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen canım aileme çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmalarım esnasında maddi destek sağlayan Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: KBÜBAP-22-YL-112) teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	x
İÇİNDEKİLER .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xv
BÖLÜM 1 .....	1
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2 .....	3
GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. TESTİS ANATOMİSİ .....	3
2.2. TESTİS'İN KATMANLARI .....	5
2.3. TESTİS'LERİN HİSTOLOJİSİ .....	6
2.4. TESTİSLER'İN ARTER VE VENLERİ .....	8
2.5. TESTİS TORSİYONU VE DETORSİYONU .....	9
2.5.1. Epidemiyoloji ve Etiyolojisi .....	9
2.5.2. Patofizyolojisi .....	11
2.6. İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI.....	12
2.7. PHOENİXİN .....	13
BÖLÜM 3 .....	17
MATERYAL VE METOT .....	17
3.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	17
3.2. TESTİS TORSİYON/DETORSİYON (TTD) MODELİNİN OLUŞTURULMASI .....	18
3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER VE PROTEİN MİKTARI TESPİTİ .....	20

## Sayfa

3.3.1. Testis Dokusunda SOD, MDA, TAS VE TOS Değerlerinin Tespit Edilmesi.....	20
3.3.2. Serum Örneklerinde TNF- $\alpha$ ve IL-6 Değerlerinin Tespit Edilmesi .....	21
3.3.3. Serum Örneklerinde Testosteron Seviyesinin Tespit Edilmesi .....	23
3.4. HİSTOLOJİK ANALİZLER.....	24
3.4.1. Histolojik Doku Takibi .....	24
3.4.2. Histomorfolojik Analizler.....	25
3.4.3. İmmünohistokimyasal Analizler.....	26
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER .....	27
BÖLÜM 4 .....	29
BULGULAR.....	29
4.1. BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	29
4.1.1. PNX-14'ün Testis Dokusundaki SOD Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri.....	30
4.1.2. PNX-14'ün Testis Dokusundaki MDA Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri.....	31
4.1.3. PNX-14'ün Testis Dokusundaki Tas ve Tos Seviyeleri Üzerine Etkileri .....	32
4.1.4. PNX-14'ün Serum TNF- $\alpha$ ve IL-6 Seviyeleri Üzerine Etkileri .....	33
4.1.5. PNX-14'ün Serum Testosteron Seviyesi Üzerine Etkileri .....	35
4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR .....	36
4.2.1. Histomorfometrik Bulgular .....	36
4.2.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	38
BÖLÜM 5 .....	40
TARTIŞMA .....	40
KAYNAKLAR .....	45
EK AÇIKLAMALAR A. ETİK KURUL İZİNİ.....	54
ÖZGEÇMİŞ .....	56

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Testis'lerin scrotum içerisindeki konumu.....	3
Şekil 2.2. Testis ve epididymis .....	4
Şekil 2.3. Testis'in katmanları .....	5
Şekil 2.4. Testis'in iç yapısı .....	6
Şekil 2.5. Spermatogenez süreci .....	8
Şekil 2.6. Testis damarları.....	9
Şekil 2.7. Testis torsiyon tipleri .....	12
Şekil 2.8. PNX öncü peptidinin amino asit dizisi. Smim20 ve iki ana PNX izoformu: PNX-20 ve PNX-14 .....	14
Şekil 3.1. Testis Torsiyon/Detorsiyon Modelinin Oluşturulması ve PNX enjeksiyonu.....	19
Şekil 3.2. TNF- $\alpha$ ELISA kitine ait standart solüsyonun dilue edilmesi.....	21
Şekil 3.3. IL-6 ELISA kitine ait standart solüsyonun dilue edilmesi.....	22
Şekil 4.1. PNX-14'ün gruplar arasında SOD enzim aktivitesine etkisi. ....	30
Şekil 4.2. PNX-14'ün gruplar arasında MDA enzim aktivitesine etkisi.....	31
Şekil 4.3. PNX-14'ün gruplar arasında TAS seviyesine etkisi. ....	32
Şekil 4.4. PNX-14'ün gruplar arasında TOS seviyesine etkisi. ....	33
Şekil 4.5. PNX-14'ün gruplar arasında serum TNF- $\alpha$ seviyesine etkisi.....	34
Şekil 4.6. PNX-14'ün gruplar arasında serum IL-6 seviyesine etkisi.....	35
Şekil 4.7. PNX-14'ün gruplar arasında serum testosteron seviyesine etkisi. ....	36
Şekil 4.8. Semifer tübül çapı ve epitel kalınlığı.....	37
Şekil 4.9. İmmünohistokimyasal spermatogonia boyanması.....	39

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 3.1. Histolojik doku takibi prosedürü .....	25
Çizelge 3.2. PAS boyama prosedürü.....	26
Çizelge 3.3. İmmünohistokimya boyama prosedürü.....	27
Çizelge 4.1. Kontrol ve deney gruplarında ölçülen SOD enzim aktivitesi, MDA düzeyi, TAS, TOS, serum TNF- $\alpha$ , serum IL-6 ve serum testosteron seviyeleri.....	29
Çizelge 4.2. Seminifer tübül çap ölçümü .....	37
Çizelge 4.3. İmmünohistokimya (spermatogonia) analizi .....	38

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### KISALTMALAR

- PNX : Phoenixin  
SOD : Süperoksit Dismutaz  
MDA : Malondialdehit  
TAS : Toplam Antioksidan Düzeyi  
TOS : Toplam Oksidan Düzeyi  
LH : Lüteinizan Hormon  
FSH : Folikül Stimülan Hormon  
GnRH : Gonadotropin Salgılatıcı Hormon  
ATP : Adenozin Trifosfat  
SOR : Süperoksit Radikalleri  
ROS : Reaktif Oksijen Türleri  
DNA : Deoksiribonükleik Asit  
İ/R : İskemi/Reperfüzyon  
HE : Hematoksilen Eozin  
IHC : İmmunohistokimya  
TNF- $\alpha$  : Tümör Nekroz Faktörü-alfa  
IL-6 : İnterlökin-6  
TT : Testis Torsiyonu  
TTD : Testis Torsiyon Detorsiyonu  
TD : Testis Detorsiyonu  
ELISA : Enzim bağımlı immnusorbent assay



## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Testis torsiyonu; funiculus spermaticus'un kendi etrafında dönmesi sonucu testis ve etrafındaki yapıların kan akışının bozulmasına ve testis dokusunda iskemik hasara neden olabilen akut seyirli ürolojik durumdur (1, 2). En sık olarak yenidoğan döneminde ortaya çıkan bu klinik durum, her yaş grubunda da meydana gelebilmektedir. Erken tanı koyulmadığı ve müdahale edilmediği sürece testis dokusunda nekroza neden olabilen bu durum, testiste fonksiyon kaybına ve infertiliteye yol açar. Bu nedenle de acil ürolojik cerrahi gerektiren önemli bir klinik sorundur (3). Her ne kadar torsiyonun süresi ortaya çıkacak hasar açısından önemli olsa da torsiyonun derecesi de bir o kadar önem arz etmektedir. Artan torsiyon derecesinin gonadların canlılığını azalttığını belirtilmiştir. Torsiyon derecesi 360°'den fazla olan vakalarda, a. testicularis'te tamamen bir tıkanma ortaya çıkmakta ve buna bağlı olarak da testis dokusunda çok kısa bir süre içerisinde nekroz meydana gelmektedir (4) . Testis dokusunda leydig hücreleri ile karşılaştırıldığında seminifer tübül germinal epitel hücrelerinin iskemiye karşı çok daha dayanıksız olduğu bilinmektedir. Spermatogenetik seri hücreleri ve sertoli hücreleri 6 saat sonunda kaybedilirken, leydig hücreleri 10 saatin sonunda yok olmaktadır (5). Testis torsiyonu kadar sonrasında meydana gelecek detorsiyon süreci de hücrelerde hasara yol açmaktadır. Detorsiyon ile testis dokusuna tekrar kan akışının sağlanmasının (reperfüzyon), dokuda serbest oksijen radikallerinin artmasına ve bunun sonucunda da hücresel hasara neden olduğu bilinmektedir (6).

Phoneixin (PNX), 2013 yılında Yostan ve arkadaşları tarafından İnsan Genomu Raporu verilerine dayalı biyoinformatik bir algoritma ile keşfedilmiş bir nöropeptittir (7) . 20 amino asitten oluşan bir peptit olan PNX'in en yaygın izoformları 14 ve 20 amino asitten oluşan peptitler olup memelilerde birçok biyolojik role sahiptirler. PNX

tüm biyolojik rollerini GPR173 (G-Protein Coupled Receptor 173) adı verilen reseptörünü aktive ederek göstermektedir (7-9).

PNX'in ortaya çıkarılan ilk biyolojik etkisi dişi üreme süreçlerinde modülatör olarak rol oynamasıydı. Hem merkezi olarak hipotalamus'ta ve nucleus arcuatus'ta hem de periferik olarak kardiyak ve gastrointestinal dokularda eksprese edilen PNX, gonadotropin salgılatıcı hormon aracılığıyla üreme hormonlarının salgısını düzenlemektedir (10). Memelilerde PNX'in GnRH aracılı LH salınımı, gelişen yumurtalık foliküllerinde granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve östradiol üretiminde rolü olduğu bildirilmiştir (11). Yüksek LH ve progesteron seviyeleri ile ilişkili olan PCOS dişilerinde PNX seviyelerinin önemli ölçüde artmış olduğu gözlenmiştir (12). Bunun yanı sıra PNX davranış, hafıza, duyuşal süreçler, sıvı homeostazı, gıda alımı ve glukozun yanı sıra lipit metabolizmasında da rol oynadığı gösterilmiştir. PNX'in gonadotropinlerin ve steroid hormonlarının salgılanmasını desteklediği açıktır (13). PNX'in iskemik dokulardaki etkisi mikrogliya hücrelerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre PNX'in sitotoksisiteye bağılı iskemi/reperfüzyon hasarını inhibe ettiği bildirilmiştir (14). Bununla birlikte, PNX'in rolünü karakterize etmek ve PNX'in ve reseptör(ler)inin insan hastalıklarındaki terapötik potansiyelini açıklamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Mevcut araştırmalar PNX'in pleiotropik etkilerini gösterse de, PNX'in in vivo koşullarda, özellikle insanlarda rolünü doğrulayan çalışmalar hala eksiktir.

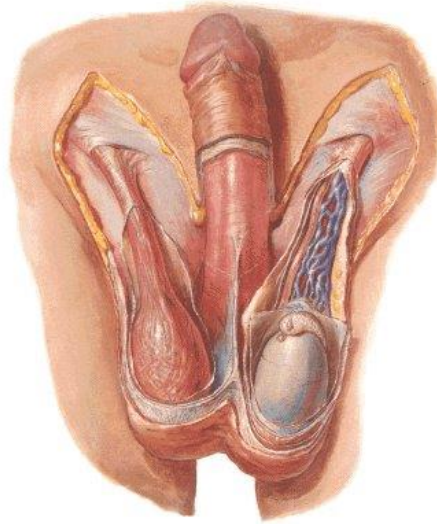
Bu çalışmada testis torsiyon/detorsiyon modeli oluşturulan prepubertal sıçanlarda intraperitoneal olarak uygulanan PNX'in, testis dokusundaki oksidatif hasar ve inflamatuvar yanıt üzerine etkileri incelendi. Bunun yanı sıra üreme sistemi üzerine önemli etkileri olduğu bilinen bu peptidin, testis dokularında meydana gelebilecek histopatolojik değişikler üzerine etkileri de değerlendirildi. Çalışmadan elde edilecek veriler doğrultusunda PNX'in torsiyon/detorsiyon hasarına karşı üreme fonksiyonları üzerine olan etkileri açıklanmaya çalışıldı.

## BÖLÜM 2

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1. TESTİS ANATOMİSİ

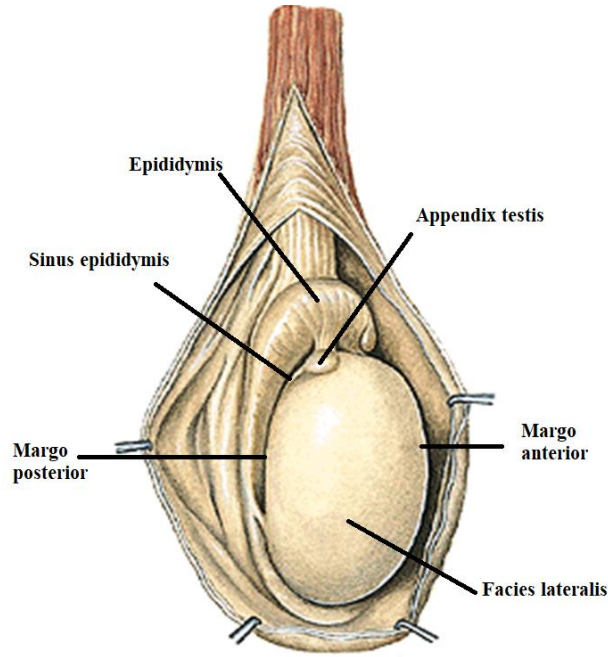
Erkekler üreme hücresi olan spermiumların üretildiği organ olan testisler, sağlı sollu bir çift olup scrotum denilen bir torba içerisinde yer almaktadırlar (Şekil 2.1) (15). Testisler oval şekillidirler ve scrotum içerisinde üst uçları anterolaterale, alt uçları ise anteromediale bakacak şekilde oblik pozisyonda bulunmaktadırlar (16, 17). İntrauterin dönemde karın boşluğu içerisinde, periton ile fascia transversalis arasında gelişirler. Fetüsün 12. Haftasında canalis inguinalis'e gelen testisler, 28. Haftada canalis inguinalis'ten geçip, 32. Haftada scrotum'a ulaşmaktadır. Testislerin scrotum'a tam olarak inmesi 35. Haftada tamamlanmaktadır (18, 19).



Şekil 2.1. Testis'lerin scrotum içerisindeki konumu (20).

Testislerin facies medialis ve facies lateralis denilen iki yüzü, margo anterior ve margo posterior denilen iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior denilen iki de uçları bulunmaktadır (Şekil 2.2) (21). Üst uçlarına tutunan küçük yassı kistik yapı

appendix testis adını almaktadır (18). Bu yapı Müller kanalının üst ucunun kalıntısı olup, kadınlarda tuba uterina, cervix uteri ve vagina'nın 2/3'ük üst kısmına karşılık gelmektedir (22). Testis'lerin margo posterior'unun dış kısmı boyunca uzanan epididymis, spermiumların iletilmesini ve depo edilmesini sağlamaktadır (23). Epididymis, testis'i ductus deferens'e bağlayan bir kanal sistemidir (24). Testis'lerin margo anterior'ları, her iki yüzü ve uçları peritoneum viscerale (epiorchium) ile sarılı iken margo posterior'larının sadece dış kısmı periton ile örtülüdür (25). Testis'lerin margo anterior'larının peritonsuz medial kısımlarına ise epididymis yerleşir ve buradan funiculus spermaticus, testisin damar-sinir paketi ve kanal sistemleri geçmektedir (26). Testis'in margo posterior'u ile corpus epididymis arasında kalan boşluğa sinus epididymis denilmektedir (Şekil 2.2) (27).



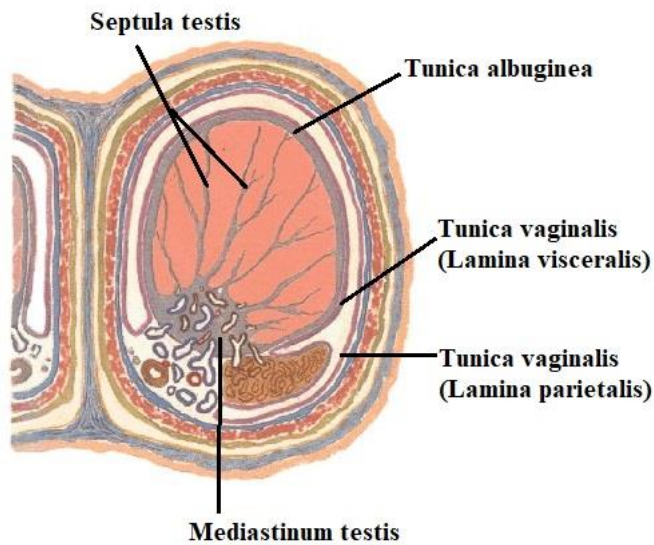
Şekil 2.2. Testis ve epididymis (28).

Yenidoğanlarda 16x14 mm boyutlarında olan testisler, puberteye ulaşıncaya kadar yavaş bir şekilde büyür. Puberteden sonra büyüme hızı artarak 12 yaş civarında uzun eksenini yaklaşık 3-4 cm'ye, 16 yaş civarında ise 6 cm'ye ulaşır (29).

## 2.2. TESTİS'İN KATMANLARI

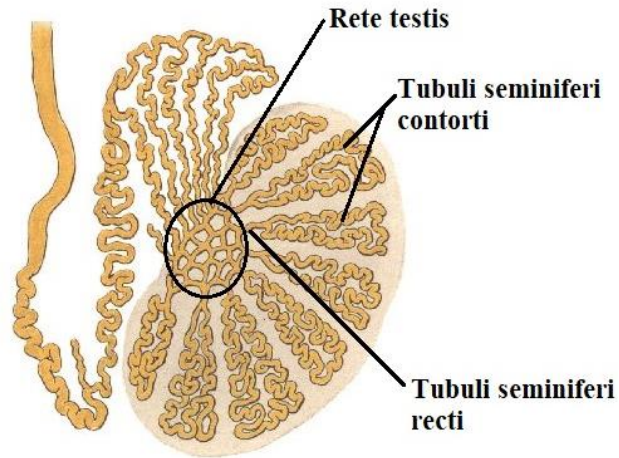
Testis'ler dıştan içe doğru; tunica vaginalis testis, tunica albuginea ve tunica vasculosa olmak üzere üç yapı tarafından sarılmıştır. Testis'leri saran peritoneal bir tabaka olan tunica vaginalis testis, processus vaginalis'in kalıntısıdır. Bu tabakanın lamina visceralis (epiorchium) ve lamina parietalis (periorchium) olmak üzere iki tabakası bulunmaktadır (Şekil 2.3). Testis'lerin ön kenarını ve her iki yüzlerini örten lamina visceralis, arka kenarında lamina parietalis ile devam eder. Lamina parietalis ise fascia spermatica interna ile bitişik olup testis'lerin alt uçlarından üst kısmına doğru funiculus spermaticus'u da içine alacak şekilde uzanır (30). İki tabaka arasında cavum serosum testis denilen potansiyel bir seröz boşluk bulunur ve bu boşluk testis'lerin rahat bir şekilde hareket etmesine olanak sağlar.

Tunica albuginea, sert ve kalın bir fibröz tabakadır. Mavimsi-beyaz renkte olan bu tabakanın genişleme ve elastikiyet özelliği olmayıp testis'lerin esas bütünlüğünü sağlamaktadır. Tunica vaginalis testis'in lamina visceralis'inin hemen altında yer alan bu tabaka, arka kenarlarından testis'lere girerek testis içerisinde mediastinum testis (Corpus higmore) denilen vertikal bir bölme oluşturur (Şekil 2.3. Bu kısımdan ayrıca testis'lerin damar ve sinirleri ile ductus deferentis'ler girip çıkarlar) (31, 32).



Şekil 2.3. Testis'in katmanları (20).

Mediastinum testis'in ön ve yan kısımlarından septula testis denilen bölmeler ayrılır. Bu bölmeler, testis dokusunu 200-300 adet piramit şekilli lopçuklara (lobuli testis) böler. Her bir lopçuk içerisinde tubuli seminiferi contorti denilen kıvrımlı kanalcıklar bulunur. Her bir lopçukta 1-4 adet bulunan tubuli seminiferi contorti'lerin testis içerisindeki yaklaşık sayısı 400-600 kadardır (33). Tubuli seminiferi contorti'ler mediastinum testis'e yaklaşırken birbirleri ile birleşir ve düz kanalcıklara dönüşürler. Yaklaşık 25 adet olan bu düz kanalcıklara tubuli seminiferi recti adı verilmektedir. Tubuli seminiferi recti'ler ise mediastinum testis içerisine girerek birbirleriyle anastomoz yapar ve rete testis (Haller ağı) denilen ağı meydana getirirler (Şekil 2.4). Testis'lerin lopçukları içerisinde üretilen spermium'lar bu ağdan ductuli efferentes testis denilen kanallara geçerek epididymis'e taşınır (34).



Şekil 2.4. Testis'in iç yapısı (20).

Capsula testis'in en iç kısmını oluşturan tunica vasculosa, areolar bağ doku içerisine yerleşmiş, damar pleksuslarından oluşan tabakadır. Tunica albuginea tabakasının iç yüzüne döşeyen bu ince tabaka, septula testis'lerin de iç yüzünü sarması nedeniyle testis lopçuklarının çevresinde bir katman oluşturmaktadır (35).

### 2.3. TESTİS'LERİN HİSTOLOJİSİ

Septula testis'ler aracılığıyla lopçuklara ayrılan testis dokusunun her bir lopçuğu içerisinde kan ve lenf damarları, sinirler ve testosteron salgılanmasından sorumlu Leydig hücrelerinin de bulunduğu bağ dokusu ve sperm üretiminde rol oynayan

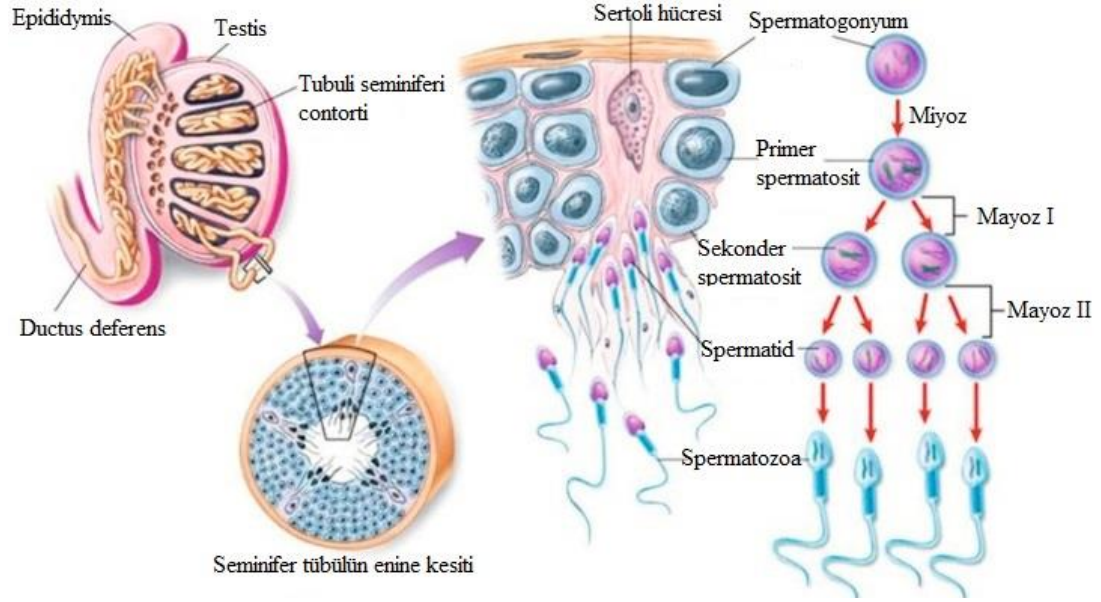
seminifer túbüller bulunmaktadır (36, 37). Sperm üretimi yapan hücreleri sayesinde ekzokrin fonksiyon gösterirken aynı zamanda testosteron hormonu salgılayan testis'ler endokrin fonksiyona da sahiptirler. Puberteden itibaren salgılanmaya başlayan testosteron hormonu, sperm üretiminin başlamasına ve ikincil seks karakterlerinin gelişmesini sağlamaktadır (38).

Seminifer túbüller, testis'lerin hem yapısal hem de fonksiyonel birimi olup testis dokusunun büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Seminifer epitel dokusu veya germinal epitel ile döşeli olan bu yapılar arasında kalan alanın büyük kısmı Leydig hücreleri tarafından doldurulmuştur. Leydig hücrelerinin yanı sıra kan ve lenf damarları ile makrofajlar da seminifer túbüller arasındaki boşlukta yer almaktadır (37).

Spermatogenez olayının meydana geldiği seminifer túbüller çok katlı seminifer epitel dokudan oluşmaktadır. Bazal lamina üzerine oturan seminifer epitel ile bazal lamina arasında sertoli hücreleri ve spermatojenik hücreler bulunmaktadır (39). Destek hücreler olan sertoli hücreleri, spermatojenik hücreleri sararak aralarındaki boşluğu doldurmaktadır. Puberteden sonra çoğalma özelliği gösteremeyen bu hücreler, seminifer epitel boyunca epitel boyunca birbirleriyle sıkı bağlantı halindedirler ve bu bağlantıları kan-testis bariyerinin de temelini oluşturmaktadır (36). Spermatojenik hücrelerin korunmasını, desteklenmesini ve beslenmesini sağlayan Sertoli hücreleri, spermiyogenez sürecinde de spermatid plazmasındaki atıkları, dejenere hücreleri fagosite eder (37).

Sertoli hücreleri arasında yer alan ve sperm üretiminden sorumlu olan spermatojenik hücreler, bazal laminadan hücre lümenine doğru spermatogonyum, spermatosit, spermatid ve spermatozoa olarak dizilmişlerdir (40). Olgunlaşmamış bir spermatojenik hücre olan spermatogonyum, puberteden sonra testosteron hormonunun etkisiyle hücre döngüsüne girer. Koyu tip A, açık tip A ve ip B olmak üzere üç tip spermatogonyum hücresi bulunmaktadır (36). Tip B spermatogonyum hücresi mitoz bölünme sonucu primer spermatositi meydana getirmektedir. Primer spermatosit de bir mayoz bölünme geçirir ve bunun sonucunda da iki sekonder spermatosit oluşur. Daha sonra sekonder spermatosit de mayoz bölünme geçirerek spermatid hücrelerini oluşturur. Bu ikinci mayoz bölünme sonucu meydana gelen spermatidler, hücre

morfolojilerinde meydana değişiklikler sonucunda spermatozoa hücrelerine dönüşür. Mitoz ve mayoz bölünmeler sonucu olgun spermatoza'ların oluştuğu bu biyolojik süreç spermatogenez olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.5) (39).



Şekil 2.5. Spermatogenez süreci (41).

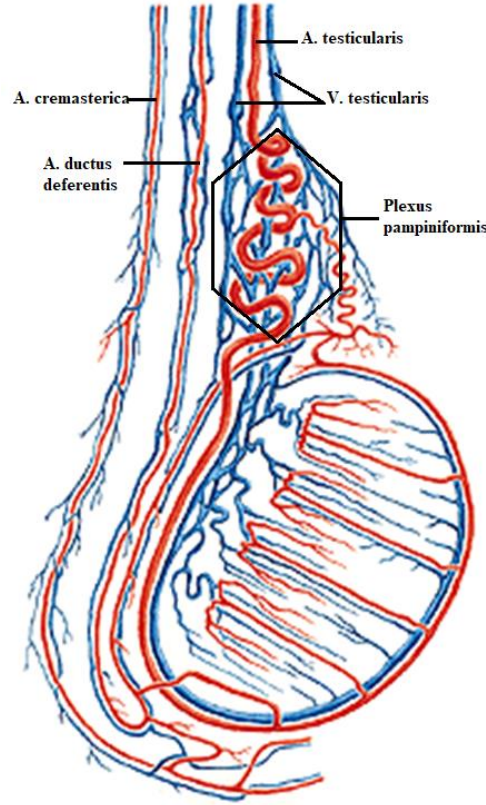
## 2.4. TESTİSLER'İN ARTER VE VENLERİ

Testis'leri başlıca aorta abdominalis'in dalı olan a. testicularis'ler beslemektedir. Ayrıca a. cremasterica, a. ductus deferentis ve a. pudenda externa'lar da testis'lerin beslenmesine katkı sağlamaktadır. L2-L3 seviyesinde aorta abdominalis'ten ayrılan ve sağlı sollu birer tane olan a. testicularis'ler testis'lerin beslenmesinin yaklaşık 2/3'ünü sağlamaktadır. Her iki tarafta n. genitofemoralis, a. iliaca interna ve üreterlerin yüzeyinde, m. psoas major'ün de ön yüzünden aşağıda-dışa doğru ilerleyerek pelvis'e gelirler (42, 43). A. testicularis sinistra, posteriordan colon descendens, a. colica sinistra ve v. mesenterica inferior'u geçerek pelvise ulaşır. A. testicularis dextra ise a. ileocolica ve a.colica media'nın arkasından, ilium'un alt-arka kısmından ve v. cava inferior'un da önünden geçer. Her ikisi de aynı taraflı anulus inguinalis profundus'dan geçerek funiculus spermaticus içindeki yerini alıp, canalis inguinalis'ten scrotum içine kadar devam ederek mesorchium'dan testis'e girer. Her bir a. testicularis, testis'lerin margo posterior'undan ipsilateral olarak mediastinum



testis'e, buradan da tunica vasculosa tabakasına girip lobuli testis'leri besleyen iki terminal dallara ayrılır (44, 45).

Testis'ten çıkan birkaç küçük ven ile epididymis'ten gelen venöz dallar arasında meydana gelen anastomoz sonucu plexus pampiniformis denilen venöz ağ oluşmaktadır. Çoğu zaman bu pleksus, anulus inguinalis profundus seviyesinde birleşerek sağlı sollu v. testicularis'leri oluşturur. Testis'in veöz drenajını sağlayan bu iki venden biri olan v. testicularis dextra, v. cava inferior'a dökülürken, v. testicularis sinistra ise v. renalis sinistra'ya dökülür (Şekil 2.6) (46-50).



Şekil 2.6. Testis damarları (51).

## 2.5. TESTİS TORSİYONU VE DETORSİYONU

### 2.5.1. Epidemiyoloji ve Etiyolojisi

Funiculus spermaticus'un içindeki yapılarla birlikte kendi etrafında dönmesi sonucu testis'lere giden kan akımının bozulması ile karakterize klinik durum testis torsiyonu

olarak adlandırılmaktadır. İlk olarak 1800'lü yıllarda Hunter tarafından saptanan testis torsiyonu, 1894 yılında Lauenstein tarafından sınıflandırılmış olup ilk şematik ve orijinal çizimler yayınlanmıştır (52, 53).

Bütün yaş gruplarında görülebilen bu klinik durum, özellikle yenidoğan döneminde ve puberte öncesi daha sık ortaya çıkmaktadır. Vakaların geneline bakıldığında %65'inin puberte öncesi bireylerden ve genellikle 13 yaş grubundan oluştuğu görülmektedir (54, 55). Testis torsiyonu çoğunlukla tek taraflı olarak görülmekte ve özellikle sol testis'te meydana gelmektedir (56).

Testis torsiyonun ortaya çıkmasında çan tokmağı deformitesi (Bell clapper), inmemiş testis durumu, aşırı artmış testosteron düzeyi ve travmalar gibi bir çok risk faktörü bulunmaktadır (57). Ani bir şekilde başlayan testis ağrısı ve şişkinlik ile ortaya çıkan testis torsiyonu acil müdahale gerektirmektedir. Tedavi duruma göre, manuel ya da cerrahi olarak testis'lerin detorsiyon ile normal konumuna getirilmesidir. Manuel tedavi ile testis normal konumuna getirilse bile çok geçmeden cerrahi ile fiksasyon da yapılmalıdır. Klinik bulguların ortaya çıkmasından sonraki ilk 4 saat içerisinde yapılacak olan tedavi oldukça önem arz etmektedir. Bu süre içerisinde tedavi edilen testis'lerin endokrin ve ekzokrin fonksiyonlarında meydana gelebilecek hasar büyük oranda önlemiş olmaktadır. 10. saatten sonra vakaların neredeyse yarısında testis'lerde fonksiyon kayıpları görülmeye başlanırken 24 saat sonra yapılan müdahalelerde ise vakaların tamamında kalıcı hasarlar ortaya çıkmaktadır (55).

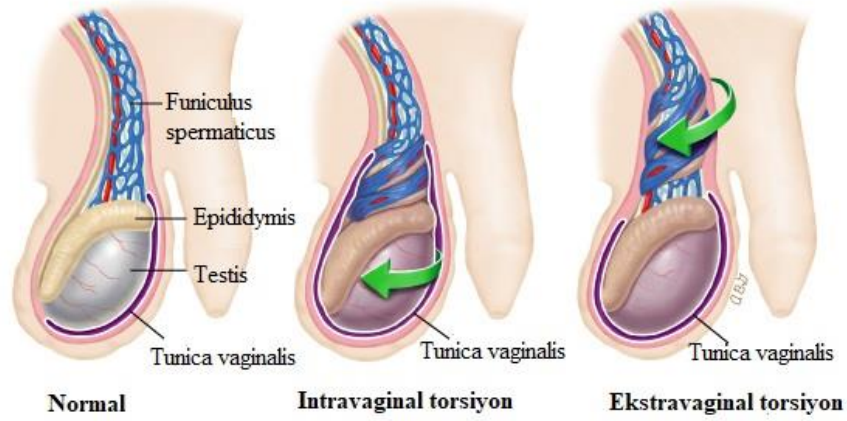
Testis torsiyonu sonucu ortaya çıkan hasarda torsiyon süresi ne kadar önemli ise torsiyonun derecesi de bir o kadar önemlidir. Testis'in beslenmesini sağlayan a. testicularis'in kan akımının tamamen bozulması ve testis dokusunda tam bir nekrozun gerçekleşmesi için 720°'lik torsiyonun meydana gelmesi gerekmektedir. Vakaların çoğunda 360-720°'lik torsiyonların gerçekleştiği görülmektedir (58). Torsiyon sonucu testis dokusunun korunmasında kritik rol oynayan torsiyon süresi ve derecesi testis'te ortaya çıkabilecek hasarın boyutları hakkında da bilgi vermektedir.

### 2.5.2. Patofizyolojisi

Genellikle testis'lerin extremitas inferior'ların tunica vaginalis'e yeterince fikse olmadığı ya da alt ucun geniş tabanlı olmadığı durumlarda testis'ler rahatlıkla funiculus spermaticus üzerinde dönme eğilimi göstermektedirler. Bir travma ya da fiziksel darbe sonucu ortaya çıkabilen bu durum kendiliğinden de gelişebilmektedir (59). Testis'lerin bu şekilde dönmesi sonucu funiculus spermaticus içerisinde geçen damar yapıları da (a. ve v. testicularis) obstrüksiyona uğrar. Bunun sonucunda testis dokusunu gelen arteriyel kan akımının azalması, venöz dönüşün engellenmesi dokuda iskemije neden olmaktadır. Erken tedavi edilememesi durumunda bireyler infertiliteye yol açmaktadır.

Ekstravaginal testis torsiyonu ve intravaginal testis torsiyonu olmak üzere iki tip torsiyon tanımlanmıştır (Şekil 2. 7). Daha nadir olarak görülen ekstravaginal testis torsiyonu vakaların %10'unu oluşturmaktadır. Prenatal (%72) ve postnatal (%28) dönemlerde ortaya çıkan bu torsiyon tipinin genellikle testis'lerin scrotum kesesine indiği ancak scrotum'a fikse olmadan önce ortaya çıktığı düşünülmektedir (60).

Vakaların %90'ını oluşturan intravaginal testis torsiyonu, testis'lerin tunica vaginalis'e yeterince fikse olamaması sonucu ortaya çıkmaktadır. Tunica vaginalis'e yeterince fikse olamayan testis, scrotum kesesi içinde enine bir şekilde durur ve bu pozisyonunu da hareket yeteneğinin artmasına neden olur. Bell clapper denilen çan tokmağı deformitesi intravaginal testis torsiyonun ortaya çıkmasındaki en yaygın patolojidir. Funiculus spermaticus'un sol tarafta daha uzun olması nedeniyle sol testis'te daha sık olarak görülmektedir (61, 62).



Şekil 2.7. Testis torsiyon tipleri (62).

Testis’lerde meydana gelen torsiyon testis dokusunda iskemik hasara neden olmaktadır ve bu hasarı ortadan kaldırmak için yapılması gereken ilk müdahale detorsiyon ile testis’lerin normal konumuna geri döndürülmesidir. Fakat detorsiyon olayı da testis dokusunda reperfüzyon hasarına yol açmaktadır (6).

## 2.6. İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI

Dokulara gelen kan akımının bozulması sonucu ortaya çıkan iskemi hasarı, dokuların yeterince beslenememesine ve oluşan metabolitlerin de dokulardan uzaklaştırılmamasına neden olmaktadır (63). İskemi sonucu hipoksiye maruz kalan dokularda ciddi hasarlar meydana gelmektedir. Dokulara yetersiz kan akımı gelmesi oksidatif fosforilasyonun azalmasına neden olur. Azalan adenozin trifosfat (ATP) da fosfofruktokinazı uyararak anaerobik glikoliz ile glikojenden ATP sentezlenmesini sağlar (64). Hücrede ATP miktarının azalması aynı zamanda hücre zarında yer alan  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaz}$  pompasının da işlevini bozulmasına ve hücre içinde iyon dengesizliğini oluşmasına neden olmaktadır (65). İyon seviyelerindeki bu değişim, proinflatuvar sitokinlerde artışa neden olur ve bunun sonucunda da antiinflatuvar sitokinler ve antioksidan enzimlerin üretimi azalır (66). İskemi süresince dokularda ATP üretimi dursa da hücre ATP kullanmaya devam eder. ATP’den sırasıyla ADP (adenozin difosfat), AMP (adenozin monofosfat) ve son olarak da adenozin elde edilir. Hücre dışına geçen adenozin, hipoksantin’e dönüşür ve iskemik dokularda biriken hipoksantin de ksantin dehidrogenaz’ın ksantin oksidaz’a

dönüşmesine neden olur. Reperfüzyon ile iskemik dokulara tekrar oksijen gelmesi ile ksantin oksidaz aracılığıyla hipoksantin ksantin'e, ksantin de ürik asite dönüşür. Bu reaksiyon sırasında oksijen alıcısı olarak moleküler su kullanılır ve süperoksit radikalleri (SOR) ortaya çıkar (67).

İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarının başlıca nedeni, reperfüzyon ile tekrar dokuya giren moleküler oksijen nedeniyle oluşan serbest oksijen radikalleridir. Hücrelerin yapısında ve fonksiyonlarında hasara neden olan SOR'lar, özellikle membrandaki yağ asitlerine, proteinlere ve nükleik asitlere ve DNA molekülüne zarar vermektedir. Membrandaki yağ asitleri ile reaksiyona giren SOR'lar lipid peroksidasyonuna sebep olur. Bu olay sonucunda membran potansiyelinde azalmaya ve membran geçirgenliğinde artışa neden olarak hücrel hasara yol açar (68).

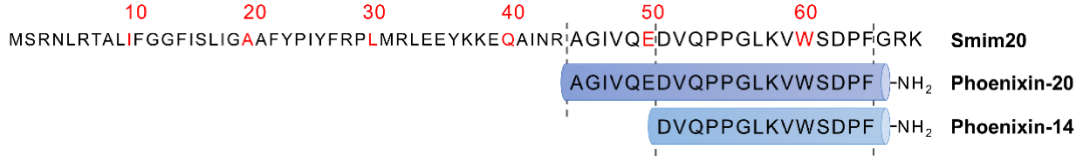
SOR'lar protein oksidasyonuna neden olarak proteinlerin fonksiyonlarını ve enzimatik aktivitelerini bozulmasına sebep olur (69).

Testis dokusunda iskemi sonucu serbest oksijen radikalleri ortaya çıkmaktadır. Detorsiyon sonucu kan akımının tekrar sağlanması artan bu serbest oksijen radikallerinin yeniden dolaşıma katılmasını sağlamak ve hücreye giren oksijen ile reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olacaktır. Bu nedenle de reperfüzyon hasarı, iskemik hasardan daha fazla dokuya zarar vermektedir (70).

## **2.7. PHOENİXİN**

2013 yılında Yostan ve arkadaşları tarafından tanımlanmış bir nöropeptit olan phoenixin (PNX), küçük integral membran proteini 20'den (SMIM-20) ayrılan 20 amino asitlik bir peptittir ve memelilerde birçok biyolojik role sahiptir (Şekil 2.8) (7, 71). En sık görülen isoformları 14 ve 20 aminoasitten oluşan amidlenmiş peptitler olup buna ek olarak 42, 36, 26, 20, 17 ve 14 amino asit izoformları da bulunmaktadır (7, 72). Phoenixin-14 amid (PNX-14) ve phoenixin-20 amid (PNX-20) aynı biyolojik aktiviteler gösterirken, amidlenmemiş PNX ise inaktiftir (7). PNX'in amino asit dizisi, türler açısından yakından korunur ve insanlarda, sıçanlarda, farelerde, sığırlarda ve domuzlarda aynıdır. PNX-20'de insanlar ve kemirgenler arasında yalnızca bir amino

asit farklıdır. Türler arasında peptit dizilerinin yüksek derecede korunmuş olması PNX'in evrimsel olarak da önemli olabileceğini göstermektedir (7).



Şekil 2.8. PNX öncü peptidinin amino asit dizisi. Smim20 ve iki ana PNX izoformu: PNX-20 ve PNX-14 (73).

Sıçanlarda en yüksek PNX ekspresyonu hypothalamus'ta tespit edilmiştir. Nuc. paraventricularis, nuc. supraopticus, zona incerta, nuc. arcuatus, dorsal ve ventromedial hypothalamus'ta PNX bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu peptit, eminentia mediana, adenohipofiz ve neurohipofiz'te de gözlenmiştir. Hypothalamus'tan magnoselüler nöronlar ile kana PNX peptiti salgılanmaktadır (7, 74). Diğer taraftan PNX peptiti kalp, timus, özefagus, mide, duodenum, jejunum, colon, pancreas adacıkları, yağ doku, ovaryumlar, dermiş ve epidermis gibi periferel dokularda da bulunduğu gösterilmiştir (73). PNX-20 peptiti beyinde hakim olmasına rağmen, omurilikte, kalpte ve bir çok periferel dokuda eksprese edilen PNX-14'tür (7, 75).

PNX'in tanımlayan ilk çalışmada, bu peptit yeni bir üreme peptiti olarak adlandırılmıştır. PNX'in adenohipofiz'te eksprese edildiği ve gl. hypophysialis'te GnRH reseptörünün ekspresyonu arttırdığı gözlenmiştir (73). Yapılan bir çalışmada, intraserebroventriküler PNX infüzyonunun erkek sıçanlarda sadece LH sekresyonunu indüklemekle kalmamış, aynı zamanda GnRH seviyesinde herhangi bir değişikliği neden olmadan serum FSH ve testosteron konsantrasyonlarını da arttırdığı gösterilmiştir (76). Tüm bu çalışmalar PNX'in gonadotropin sekresyonunun kontrolünde rol oynayabileceğini göstermektedir.

PNX biyolojik fonksiyonlarına GPR173 reseptörünün aktivasyonu öncülük eder. PNX, gonadotropin salgılatıcı hormon aracılığıyla LH sekresyonunu ve östrus siklusunu kontrol edip, kadın üreme sisteminde de önemli bir role sahiptir. Yumurta

olgunlaşmasını uyarır ve yumurtlayan oosit sayısını çoğaltır. Bununla birlikte, PNX sadece üreme sistemini düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda anksiyolitik, anti-inflamatuar ve hücre koruyucu etkiler de sağlar. Bu peptit davranış, gıda alımı, duyuşsal algı, hafıza ve enerji metabolizması ile de ilgili fonksiyonlar göstermektedir (73).

Bazı hayvan modellerinde inflamasyonu ve oksidatif stresi inhibe ederek yararlı etkiler ürettiğine dair sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle, anti-inflamatuar ve antitümör ilaçların geliştirilmesinde de umut kaynağı olabilir (77). PNX'in İ/R hasarındaki rolü de yapılan çalışmalarda ortaya koyulmuştur. Rocca ve arkadaşları (78) İ/R'nun reperfüzyon fazında uygulanan PNX'in kardiyoprotektif etki gösterdiğini, daha küçük enfarkt boyutuna ve daha iyi bir sistolik iyileşmeye yol açtığını göstermişlerdir.

İ/R hasarının, akut inflamatuvar yanıtı yol açtığı ve mikroglialarda proinflamatuvar sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin salgılanmasını artırdığı gösterilmiştir. Ma ve arkadaşları PNX'in bu hücreleri nöronal hasara karşı koruduğunu ve hücre ölümünü inhibe ettiğini belirtmişlerdir (79).

PNX'in anti-enflamatuar aktivitesinin, tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ve interlökin-6 (IL-6) dahil olmak üzere sitokinlerin azalmış ekspresyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca PNX'in, ROS salınımını azalttığı ve anti-inflamatuar glutasyon üretimini arttırdığı da gösterilmiştir (79).

Özet olarak PNX'in üreme, davranış, hafıza, duyuşsal süreçler, gıda ve sıvı alımı, glikoz ve lipit metabolizmaları gibi birçok biyolojik süreçte rol oynadığı görülmektedir. Üreme sistemlerinde gonadotropinlerin ve steroid hormonların salgılanmasını teşvik etmekle beraber, İ/R hasarı gibi patolojik durumlarda da hücreler üzerinde koruyucu rol oynadığı açıktır. Mevcut çalışmalar PNX'in pleiotropik etkilerini gösterse de PNX'in ve PNX reseptörlerinin rolleri daha iyi açıklayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bugüne kadar intraperitoneal olarak PNX uygulamasının testis torsiyon/detorsiyon hasarı üzerine etkisi incelenmemiştir. Bu çalışmada testis torsiyon/detorsiyon modeli oluşturulan prepubertal sıçanlarda intraperitoneal olarak uygulanacak olan PNX'in,

testis dokusundaki oksidatif hasar, inflamatuvar yanıt ve serum testosteron seviyesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bunun yanı sıra üreme sistemi üzerine önemli etkileri olduğu bilinen bu peptidin, testis dokularında meydana gelebilecek histopatolojik değişiklikler üzerine etkileri seminifer tübül çapı, dev hücre varlığı, dejenere hücre varlığı gibi histopatolojik özellikler de değerlendirilerek PNX'in torsiyon/detorsiyon hasarına karşı üreme fonksiyonları üzerine olan etkileri açıklanmaya çalışılmıştır.



## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Karabük Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 07.07.2022 tarihli ve 2022/7/10 no'lu etik kurul kararı ile yürütüldü. Çalışmada yer alan tüm uygulamalar etik kurulun belirttiği protokole uygun olarak, Karabük Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarı ve İnönü Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

#### 3.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Çalışmada ortalama 180-220 gr ağırlığında, yaklaşık 35 günlük (prepubertal erkek sıçan), 48 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların deneye başlama ağırlık ortalaması yaklaşık 200 gr, standart sapması 25 gr, %4 sapma, tip 1 hata ( $\alpha$ ) 0.05 ve tip 2 hata ( $\beta$ ) (Güç=0.80) olduğunda ve sıçanların 4 gruba ayrılması durumunda her bir grupta en az 12 sıçanın olması gerektiği güç analizi (Power Analiz) ile belirlendi.

Sıçanlar; sham, TT, TT+PNX+TD ve TTD+PNX olmak üzere 4 gruba (n=12) ayrıldı. Deneyler süresince  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve 12 saat ışık/karanlık periyoduna sahip ortamda tutulan sıçanlar, normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile *ad libitum* olarak beslendi.

**Sham Grubu:** Bu gruptaki sıçanlara sham testis torsiyon cerrahi operasyonları yapıldı.

**Testis Torsiyon-Detorsiyon (TTD) Grubu:** Bu gruptaki sıçanlara 2 saat torsiyon yapıldıktan sonra 24 saat detorsiyon sağlandı (80). Detorsiyon sonrası sıçanlardan kan örnekleri ve doku örnekleri alınıp sıçanlar sakrifiye edildi.

**Testis torsiyon (TT)+PNX+Testis detorsiyon (TD):** Bu gruptaki sıçanlara testis torsiyon ve detorsiyon modeli oluşturuldu. Torsiyonun 90. dakikasında (son yarım saatte) tek doz intraperitoneal olarak PNX-14 (50 µg/kg) uygulandı (Şekil 3.1) (81). 2 saatlik torsiyonun ardından 24 saat detorsiyon sağlandı (80). Detorsiyon sonrası sıçanlardan kan örnekleri ve doku örnekleri alınıp sıçanlar sakrifiye edildi.

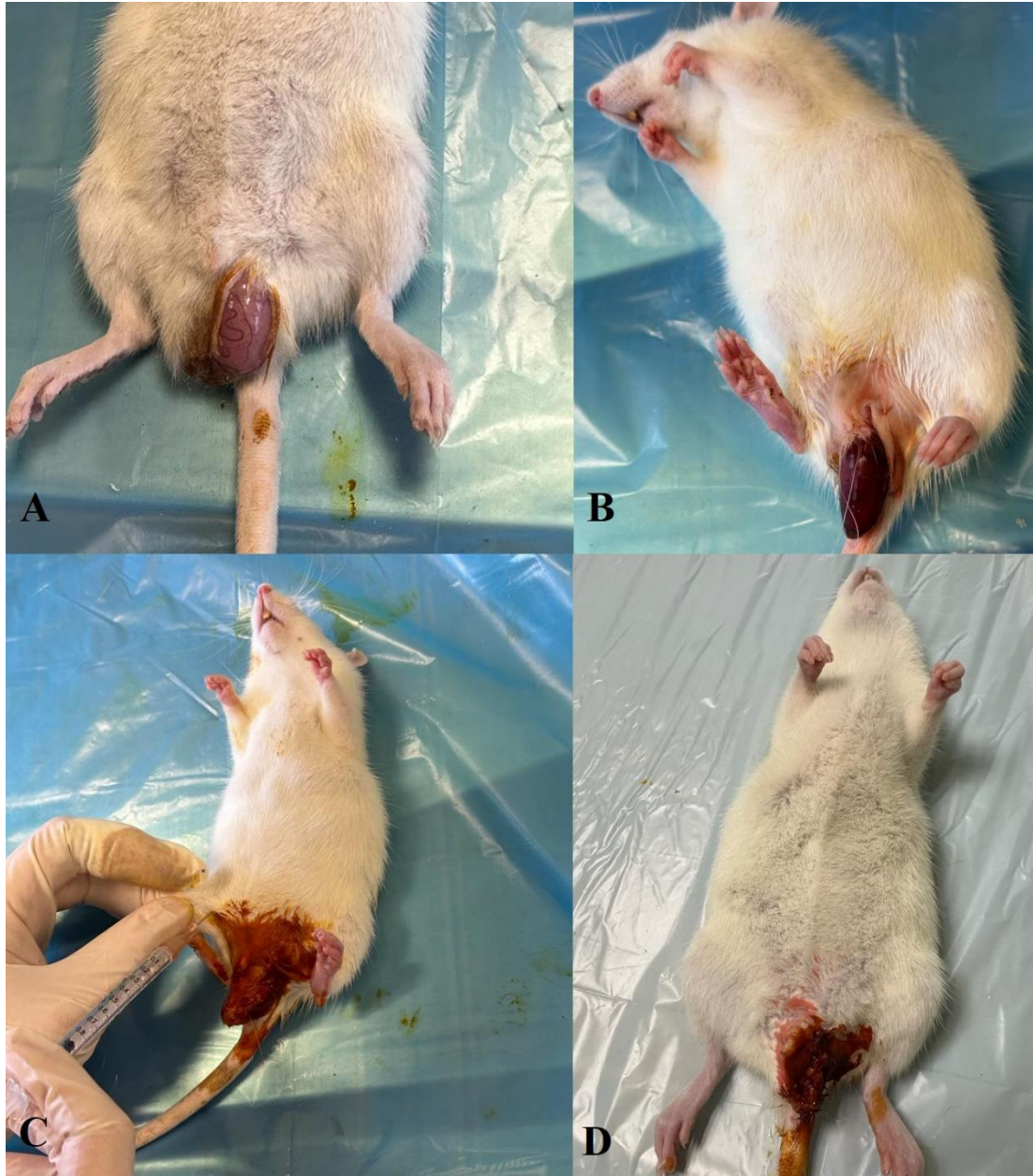
**Grup 4- Testis torsiyon-detorsiyon (TTD)+PNX:** Bu gruptaki sıçanlara testis torsiyon ve detorsiyon modeli oluşturuldu. 2 saatlik torsiyon süresinin bitiminde detorsiyon başlangıcında tek doz intraperitoneal olarak PNX-14 (50 µg/kg) uygulandı ve ardından 24 saat detorsiyon sağlandı (Şekil 3.1) (80, 81).

### **3.2. TESTIS TORSİYON/DETORSİYON (TTD) MODELİNİN OLUŞTURULMASI**

Testis torsiyon/detorsiyon modelinin oluşturulabilmesi için ilk olarak sıçanlar, intramuskuler 70 mg/kg ketamin ve 8 mg/kg xylazine enjeksiyonu ile anestezi altına alındı. Anestezi, sıçanlar deney süresince ağrıya yanıtız olacak ve spontan solunumlarına devam edecek şekilde ayarlandı. Scrotum üzerinden yapılan sol vertikal insizyon ile sol testis'e ulaşıldı ve testis vasküler yapıları ile beraber çıkarıldı. Sol testisin saat yönünde 720 derece rotasyonu ile testis torsiyonu yapılarak detorsiyon oluşmaması için 4/0 ipek sütür ile fiksasyon sağlandı. Testis skrotum içerisinde tekrar yerleştirildi ve üzerine nemli bir pamuk kapatıldı. İşlemden 2 saat sonra sütürler açıldı, testis ve vasküler yapıları çevrilierek normal pozisyonuna getirilerek detorsiyonun başlaması sağlandı. Detorsiyon başlangıcından sonra testis scrotum içerisine yeniden yerleştirildi ve scrotum derisi 4/0 ipek sütür ile kapatıldı. 24 saat detorsiyonun ardından sıçanlara orişektomi yapılarak doku ve kan örnekleri alınıp, sıçanlar sakrifiye edildi (Şekil 3.1) (80).

Sıçanlardan alınan kan örnekleri 4500 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Elde edilen serum örnekleri TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyelerinin belirlenmesi amacıyla ELISA analizlerinin yapılacağı güne kadar -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Alınan testis dokularının yarısı (her gruptan 6 adet) PNX-14'ün oksidatif stres üzerine olan etkilerini değerlendirebilmek için toplam antioksidan kapasite (TAS),

topl m oksidan kapasite (TOS), süperoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehit (MDA) seviyeleri belirleneceği güne kadar 80 °C'de derin dondurucuda saklanırken, diğer yarısı (her gruptan 6 adet) ise etraf dokulardan temizlendikten sonra histopatolojik analizler için %10'luk formaldehit solüsyonu içerisine alındı. Formaldehitin testis dokusu içerisine daha iyi nüfuz edebilmesi için iğne ile testis üzerine 5-6 delik açıldı.



Şekil 3.1. Testis Torsiyon/Detorsiyon Modelinin Oluşturulması ve PNX enjeksiyonu.

### **3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER VE PROTEİN MİKTARI TESPİTİ**

Çalışma sonunda alınan ve analiz gününe kadar -80 °C’de saklanan testis dokuları çalışma gününden bir gün önce derin dondurucudan çıkarıldı ve +4 °C’ye alınarak kontrollü bir şekilde 24 saat boyunca buzlarının çözünmesi sağlandı. Çalışma gününde ilk olarak dokular tartıldı ve tüp içerisine konuldu. Her bir tüpe, içerisindeki yaş doku ağırlığının yaklaşık 10 katı olacak şekilde soğuk Tris-HCl tamponu (pH=7,4) ilave edildi. Numuneler 16000 rpm’de 3 dk boyunca homojenize edildikten sonra Homojenat vortekslendi ve ependorf tüplere alındı.

Homojenatlardaki protein miktarının tespiti Lowry metoduna uygun olarak yapıldı (82). Alkali özellik gösteren bir çözeltide bakır protein kompleksi oluşturarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifinin (Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi) indirgenmesiyle mavi renk oluşmasına dayanan bu metotta, rengin koyuluğu protein miktarı ile doğru orantılı olarak değişim göstermektedir. Protein miktarı mg/ml olarak verildi.

#### **3.3.1. Testis Dokusunda SOD, MDA, TAS VE TOS Değerlerinin Tespit Edilmesi**

Elde edilen homojenatlarda MDA ölçümü en çok tercih edilen lipid peroksidasyon tayin metodu olan Esterbauer ve Cheeseman’ın metodu referans alınarak yapıldı (83). Sonuçlar  $\mu\text{mol/g}$  doku şeklinde verildi.

MDA ölçümü tamamlandıktan sonra homojenatlar +4 °C’de soğutmalı bir santrifüj kullanılarak 1 saat süresince 2200 g’de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı ayrıldı ve süpernatantlarda TAS, TOS ve SOD değerleri ölçüldü.

Sun ve arkadaşlarının yöntemi referans alınarak SOD enzim aktivitesi tespit edildi (84). Elde edilen sonuçlar U/mg protein şeklinde verildi.

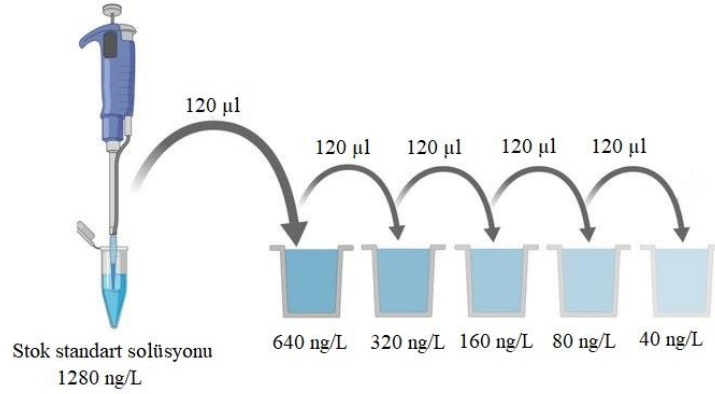
Testis dokusunda TAS ve TOS seviyeleri ticari olarak satın alınan rat spesifik ELISA kitleri (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak yapıldı. Analizler kitlerinin

önerdiği protokole uygun olarak ve Thermo Scientific Multiskan FC microplate reader ile gerçekleştirildi.

### 3.3.2. Serum Örneklerinde TNF- $\alpha$ ve IL-6 Değerlerinin Tespit Edilmesi

Sıçanlardan alınan serum örneklerinde TNF- $\alpha$  seviyesi ticari olarak satın alınan rat spesifik ELISA kiti kullanılarak gerçekleştirildi (SunRed Biotechnology, China, Katalog no: 201-11-0765). Kitin protokolü aşağıda özetlenmiştir;

- Standart solüsyonu kitin talimatlarına göre seyreltildi (Şekil 3.2).



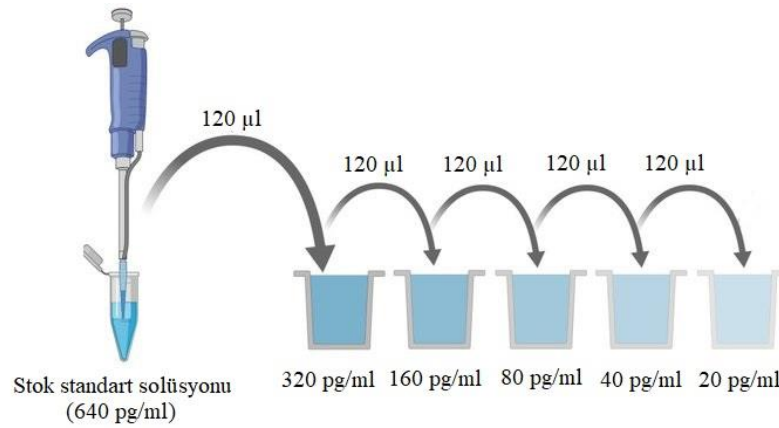
Şekil 3.2. TNF- $\alpha$  ELISA kitine ait standart solüsyonun dilue edilmesi.

- 50 µl standart solüsyon, kör ve örnekler plate kuyucuklarına koyuldu. Kör kuyucuğuna yalnızca kromojen A, kromojen B ve stop solüsyonu eklendi. Standart kuyucuğuna 50 µl standart solüsyonu ve 50 µl Streptavidin HRP eklendi. Standart solüsyonu biyotin antikoru içerdiği için antikor eklenmesine gerek görülmedi. Örneklerin olduğu kuyucuklara da 40 µl örnek, 10'ar µl her iki TNF- $\alpha$  antikoru ve 50 µl Streptavidin HRP eklendi. Standart kuyucuklarına 50 µl standart solüsyonu ve 50 µl Streptavidin HRP eklendi.
- Plate'in üzeri şeffaf bir etiket ile kapatıldı ve hafifçe çalkalandıktan sonra 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
- 30X yıkama solüsyonu 30 kat seyreltildi. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından plate üzerindeki etiket dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve plate içerisindeki sıvı döküldü.

- Her kuyucuğa yıkama solüsyonu eklendi ve plaka kağıt havlu üzerine ters çevrilerek kuyucukların boşaltılması sağlandı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
- Yıkamanın ardından kuyucuklara önce 50 µl kromojen A solüsyonu, daha sonra da 50 µl kromojen B solüsyonu ilave edildi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37 °C’de karanlık bir ortamda 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra her kuyucuğa 50 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi. Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 15 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okuma yapıldı ve değerler kaydedildi.
- Elde edilen OD değerlerinden sonra kitin belirttiği hesaplamaya göre serum TNF-α seviyeleri hesaplandı.

Sıçanlardan alınan serum örneklerinde IL-6 seviyesi de ticari olarak satın alınan rat spesifik ELISA kiti kullanılarak gerçekleştirildi (SunRed Biotechnology, China, Katalog no: 201-11-0765). Kitin protokolü aşağıda özetlenmiştir;

- Standart solüsyonu kitin talimatlarına göre seyreltildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. IL-6 ELISA kitine ait standart solüsyonun dilue edilmesi.

- 50 µl standart solüsyon, kör ve örnekler plate kuyucuklarına koyuldu. Kör kuyucuğuna yalnızca kromojen A, kromojen B ve stop solüsyonu eklendi. Standart kuyucuğuna 50 µl standart solüsyonu ve 50 µl Streptavidin HRP eklendi. Standart solüsyonu biyotin antikoru içerdiği için antikor eklenmesine gerek görülmedi. Örneklerin olduğu kuyucuklara da 40 µl örnek, 10’ar µl her

iki IL-6 antikoru ve 50 µl Streptavidin HRP eklendi. Standard kuyucuklarına 50 µl standart solüsyonu ve 50 µl Streptavidin HRP eklendi.

- Plate'in üzeri şeffaf bir etiket ile kapatıldı ve hafifçe çalkalandıktan sonra 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
- 30X yıkama solüsyonu 30 kat seyreltildi. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından plate üzerindeki etiket dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve plate içerisindeki sıvı döküldü.
- Her kuyucuğa yıkama solüsyonu eklendi ve plaka kâğıt havlu üzerine ters çevrilerek kuyucukların boşaltılması sağlandı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
- Yıkamanın ardından kuyucuklara önce 50 µl kromojen A solüsyonu, daha sonra da 50 µl kromojen B solüsyonu ilave edildi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37 °C'de karanlık bir ortamda 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra her kuyucuğa 50 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi. Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 15 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okuma yapıldı ve değerler kaydedildi.
- Elde edilen OD değerlerinden sonra kitin belirttiği hesaplamaya göre serum IL-6 seviyeleri hesaplandı.

### 3.3.3. Serum Örneklerinde Testosteron Seviyesinin Tespit Edilmesi

Serum testosteron seviyesi ticari olarak satın alınan rat spesifik ELISA kiti (BT LAB, Katalog no: EA0023Ra) kullanılarak yapıldı. Kit içerisinde çıkan standart solüsyonu, 48 ng/ml'lik standart stok solüsyonun elde etmek için 150 uL konsantrasyona olan standart/numune seyreltici kullanılarak sulandırıldı. Stok solüsyonu 1:2 oranında seyreltilerek 24ng/mL, 12ng/mL, 6ng/mL, 3ng/mL ve 1,5ng/mL çözeltiler üretildi. Kit içerisinde çıkan diğer çözeltiler ve örnekler de oda sıcaklığına getirildikten sonra kitin önerdiği protokol izlenerek serum testosteron seviyesi belirlendi. Kit protokolü aşağıda özetlenmiştir;

- Tüm örnekler 10 ul örnek, 40 ul örnek seyreltici ilave edilerek kuyucuklara dağıtıldı. 50 ul standart, negatif ve pozitif kontrol de kuyucuklara eklendikten sonra plakanın üzeri şeffaf etiket ile kapatıldı.

- Sonra etiket çıkarıldı, kuyucuklara 300 ul yıkama solüsyonu eklendi ve 30 sn-1dk kadar kuyucukların yıkanması sağlandı. Bu işlem 5 kez tekrarlandıktan sonra plaka kağıt havlu üzerine çevrildi. Kuyucukların tamamen kuruması sağlandı.
- Kör hariç her kuyucuk içerisine 50 ul HRP eklendi ve etiket ile kapatıldıktan sonra 37 °C’de 30 dk boyunca inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra etiket çıkarıldı. 2. basamakta anlatılan yıkama işlemi tekrar yapıldı.
- Her bir kuyucuğa ilk olarak 50 ul substrat solüsyonu A, ondan sonra da substrat solüsyonu B eklendi. Plaka iyice karıştırıldıktan sonra 37 °C’de 10 dk boyunca inkübe edildi.
- Son olarak her bir kuyucuğa 50 ul durdurma solüsyonu eklendi. Mavi renk hemen sarıya döndü. Bu işlemden sonra 15 dk içerisinde 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda absorbans değerleri okundu. Belirlenen optik yoğunluk değerleri (OD) kaydedildi.
- Elde edilen OD değerlerinden sonra kitin belirttiği hesaplama göre serum testosteron seviyeleri hesaplandı.

### **3.4. HİSTOLOJİK ANALİZLER**

#### **3.4.1. Histolojik Doku Takibi**

Anestezi altında sıçanlardan çıkarılan testis dokusu örnekleri histolojik incelemeler ve histomorfometrik analizler için %10’luk formaldehit içerisine alındı. Formolün testis dokusu içerisine nüfuz edebilmesi için iğne ile testis üzerine 5-6 delik açıldı. Oda sıcaklığında 24 saatlik tespit süresi sonrasında testis örnekleri trimlenerek (iki parçaya ayrılarak) Tissue-Tek VIP/SAKURA doku takip cihazı ile doku takip işlemi uygulandı (Çizelge 3.1). Doku takip işlemlerinin ardından testis doku örnekleri katı parafin içerisine gömüldü.



Çizelge 3.1. Histolojik doku takibi prosedürü.

<b>Doku takibi prosedürü</b>	
<b>1. Musluk suyu</b>	1 saat
<b>2. Musluk suyu</b>	1 saat
<b>3. %80 alkol</b>	1 saat
<b>4. %96 alkol</b>	1 saat
<b>5. %96 alkol</b>	1 saat
<b>6. Absolü alkol</b>	1 saat
<b>7. Absolü alkol</b>	1 saat
<b>8. Ksilen</b>	1 saat
<b>9. Ksilen</b>	1 saat
<b>10. Ksilen</b>	1 saat
<b>11. Parafin I</b>	1 saat
<b>12. Parafin II</b>	1 saat
<b>13. Parafin III</b>	1 saat
<b>14. Parafin IV</b>	1 saat

### 3.4.2. Histomorfolojik Analizler

Histomorfolojik ölçümler için testis parafin bloklarından mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesit işleminin ardından kesitler Periyodik Asit Schiff (PAS) ile boyandı (Çizelge 3.2).

PAS ile boyanan doku kesitlerinde testis tübül çapı ve epitel kalınlığı ölçümü yapıldı. Çap ölçümü için testis dokularında iki farklı derinlikte toplam 100 seminifer tübülün en kısa ekseninde ölçüm yapıldı (Şekil 3.4). Epitel kalınlığı ise her kesitte düzgün konturlu 10 farklı seminifer tübülde, 2 farklı alanda, bazal membranından lümeneye kadar uzanan Sertoli hücreleri ve germ hücrelerini kapsayacak şekilde ölçüldü. Her grup için seminifer tübül çapı, epitel kalınlığı ve epitel kalınlığı/seminifer tübül çapı oranları hesaplandı.

Çizelge 3.2. PAS boyama prosedürü.

<b>HE boyama prosedürü</b>	
<b>1. İnkübasyon (65°C)</b>	1 saat
<b>2. Ksilen</b>	5 dk x 3
<b>3. %96 alkol</b>	3 dk
<b>4. %96 alkol</b>	3 dk x 2
<b>5. Absolü alkol</b>	3 dk x 2
<b>6. Musluk suyu</b>	5 dk
<b>7. Periodic acid solution</b>	5 dk
<b>8. Distile su</b>	5 dk x 3
<b>9. Schiff solüsyonu</b>	20 dk
<b>10. Musluk suyu</b>	10 dk
<b>11. Hematoksilen</b>	1 dk
<b>12. Musluk suyu</b>	5 dk
<b>13. %70 alkol</b>	3 dk
<b>14. % 80 alkol</b>	3 dk
<b>15. % 90 alkol</b>	3 dk
<b>16. %96 alkol</b>	3 dk
<b>17. Absolü alkol</b>	3 dk
<b>18. Ksilen</b>	5 dk x 3
<b>19. Kapama</b>	

### 3.4.3. İmmünohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimyasal (IHC) uygulamalar için testis parafin bloklarından mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. İmmünohistokimyasal olarak spermatogonia spesifik MAGE A4 immünreaktivitesi çalışıldı. Kesitler rutin kromojenik immünohistokimyasal boyama protokolüne göre MAGE A4 primer antikor ve HRP kiti (Thermo Fisher) kullanılarak yapıldı (Çizelge 3.3). Spermatogonia sayımı her bir testis örneğinde rastgele seçilen düzgün-dairesel konturlu 10 tübülde yapıldı. Aynı tübüllerde bazal membrandan birbirine dik iki çizgi çekilerek ortalaması alınıp tübül çapı ölçümü yapıldı. Her kesit için ortalama spermatogonia, tübül çapı ve spermatogonia/tübül çapı hesaplandı.

Çizelge 3.3. İmmünohistokimya boyama prosedürü

<b>IHC boyama prosedürü</b>	
<b>1. Deparafinizasyon</b>	
<b>2. Antijen Retrival</b>	15dk, 95°C
<b>3. Distile Su</b>	1 dk
<b>4. PBS</b>	1 dk
<b>5. Hidrojen Peroksit</b>	10 dk
<b>6. PBS</b>	1 dk
<b>7. Protein Blok</b>	5 dk
<b>8. Primer Antikor</b>	40 dk
<b>9. PBS</b>	5 dk
<b>10. Sekonder Antikor</b>	20 dk
<b>11. PBS</b>	5 dk
<b>12. Streptevadin Peroksidaz (HRP)</b>	10 dk
<b>13. PBS</b>	1 dk
<b>14. Kromojen</b>	10 dk
<b>15. PBS</b>	1 dk
<b>16. Distile Su</b>	1 dk
<b>17. Hematoksilen</b>	2 dk
<b>18. Musluk Suyu</b>	1 dk x 3
<b>19. Distile Su</b>	1 dk

Boyanan doku kesitlerinde tüm analizler için Nikon Eclipse E200 ışık mikroskobu, DS-Fi-1 camera (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) ve NIS-Elements BR 2.30 görüntü analiz sistemi (Nikon Corp., Tokyo, Japan) kullanıldı. Tüm histolojik analizler grup bilgisinden habersiz histolog tarafından yapıldı.

### **3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER**

Çalışmanın istatistiksel analizleri IBM SPSS 22.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluk gösterip göstermedikleri Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösterdiği belirlenen değişkenlerin gruplar arası

karşılaştırmaları tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında ise varyansların homojen ise Tukey testi, varyansların homojen değil ise Tamhane'nin T2 testi kullanıldı. Tüm veriler ortalama±standart sapma olarak verildi.  $p<0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BÖLÜM 4

### BULGULAR

#### 4.1. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Kontrol ve deney gruplarında ölçülen SOD enzim aktivitesi, MDA düzeyi, TAS, TOS, serum TNF- $\alpha$ , serum IL-6 ve serum testosteron seviyeleri Çizelge 4.1’de gösterildi.

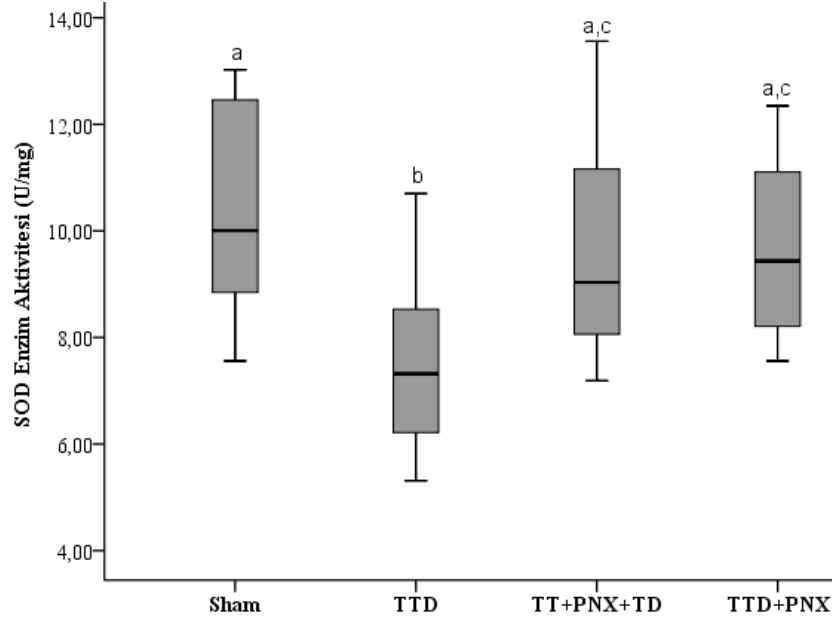
Çizelge 4.1. Kontrol ve deney gruplarında ölçülen SOD enzim aktivitesi, MDA düzeyi, TAS, TOS, serum TNF- $\alpha$ , serum IL-6 ve serum testosteron seviyeleri.

Değişkenler	Gruplar			
	Sham	TTD	TT+PNX+TD	TTD+PNX
<b>SOD</b> (U/mg)	10,43±1,98 <sup>a</sup>	7,49±1,52 <sup>b</sup>	9,65±2,04 <sup>a,c</sup>	9,64±1,65 <sup>a,c</sup>
<b>MDA</b> ( $\mu$ mol/g doku)	2,67±0,64 <sup>a</sup>	6,01±2,53 <sup>b</sup>	3,02±1,11 <sup>a,c</sup>	3,15±0,99 <sup>a,c</sup>
<b>TAS</b> ( $\mu$ mol Trolox Equivalent /L)	11,10±2,86 <sup>a</sup>	5,65±1,95 <sup>b</sup>	9,18±2,48 <sup>a,c</sup>	8,67±2,21 <sup>a,c</sup>
<b>TOS</b> ( $\mu$ mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> equivalent/L)	3,80±2,00 <sup>a</sup>	7,53±2,50 <sup>b</sup>	4,11±1,99 <sup>a,c</sup>	4,34±1,69 <sup>a,c</sup>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (ng/L)	559±110,49 <sup>a</sup>	719,17 ±91,02 <sup>b</sup>	579,75±87,29 <sup>a,c</sup>	529,17±104,27 <sup>a,c</sup>
<b>IL-6</b> (pg/ml)	357,83±91,96 <sup>a</sup>	598,25 ±98,01 <sup>b</sup>	393,50±171,51 <sup>a,c</sup>	389,83±99,92 <sup>a,c</sup>
<b>Testosteron</b> (ng/L)	184,44±47,21 <sup>a</sup>	115,26±12,80 <sup>b</sup>	166,56±40,08 <sup>a,c</sup>	179,48±44,45 <sup>a,c</sup>

(Verilerin değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Grupların çoklu karşılaştırılmasında varyanslar homojen ise Tukey testi, değilse Tamhane'nin T2 testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. Farklılık gösteren gruplar farklı harflerle gösterildi. <sup>a,b,c</sup> p<0.05).

#### 4.1.1. PNX-14'ün Testis Dokusundaki SOD Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

Testis torsiyon/detorsiyon hasarında PNX-14 uygulamasının deney gruplarının testis dokularındaki SOD enzim aktivitesinde meydana getirdiği değişiklikler şekil 4.1'de gösterildi.



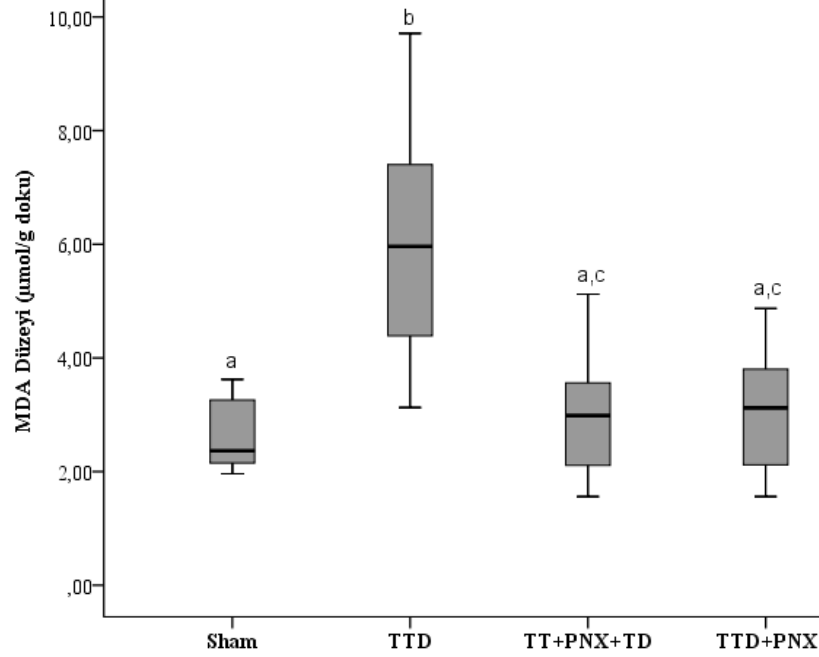
Şekil 4.1. PNX-14'ün gruplar arasında SOD enzim aktivitesine etkisi.

(Verilerin değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Grupların çoklu karşılaştırılmasında Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. Farklılık gösteren gruplar farklı harflerle gösterildi. <sup>a,b,c</sup> p<0,05).

Testis dokusunda torsiyonun 90. dk'sında ve detorsiyon başlangıcının hemen başında uygulanan tek doz PNX-14 uygulanan gruplarda SOD enzim aktivitesinin TTD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği görülmektedir (p=0,046; p=0,016; sırasıyla). TTD grubunda SOD enzim aktivitesinin sham grubuna göre de belirgin derecede azaldığı belirlenmiştir (p= 0,003). PNX-14'ün torsiyon sırasında ya da sonrasında uygulanması ise SOD enzim aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (p=1,000) (Çizelge 4.1).

#### 4.1.2. PNX-14'ün Testis Dokusundaki MDA Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

PNX-14 uygulamasının testis dokusunda MDA seviyelerinde meydana getirdiği değişiklikler şekil 4.2'de gösterildi.



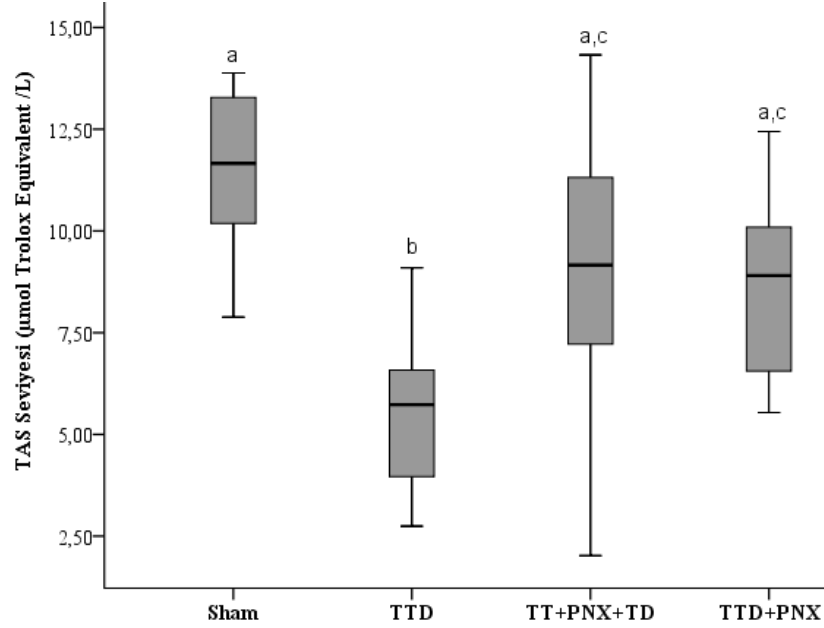
Şekil 4.2. PNX-14'ün gruplar arasında MDA enzim aktivitesine etkisi.

(Verilerin değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Grupların çoklu karşılaştırılmasında Tamhane'nin T2 testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. Farklılık gösteren gruplar farklı harflerle gösterildi. <sup>a,b,c</sup>  $p < 0.05$ )

TTD grubunda MDA enzim aktivitesinin sham, TT+PNX+TD ve TTD+PNX grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği görüldü ( $p=0,0001$ ). PNX-14 uygulamasının torsiyon sırasında ya da sonrasında yapılmasının MDA enzim aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi ( $p=1,000$ ) (Çizelge 4.1).

#### 4.1.3. PNX-14'ün Testis Dokusundaki Tas ve Tos Seviyeleri Üzerine Etkileri

Gruplar arasında TAS seviyeleri karşılaştırıldığında, en düşük TAS seviyesinin TTD grubunda olduğu görüldü. PNX-14 uygulanan gruplarda ise TAS seviyesinin TTD grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi (Şekil 4.3) (Çizelge 4.1).

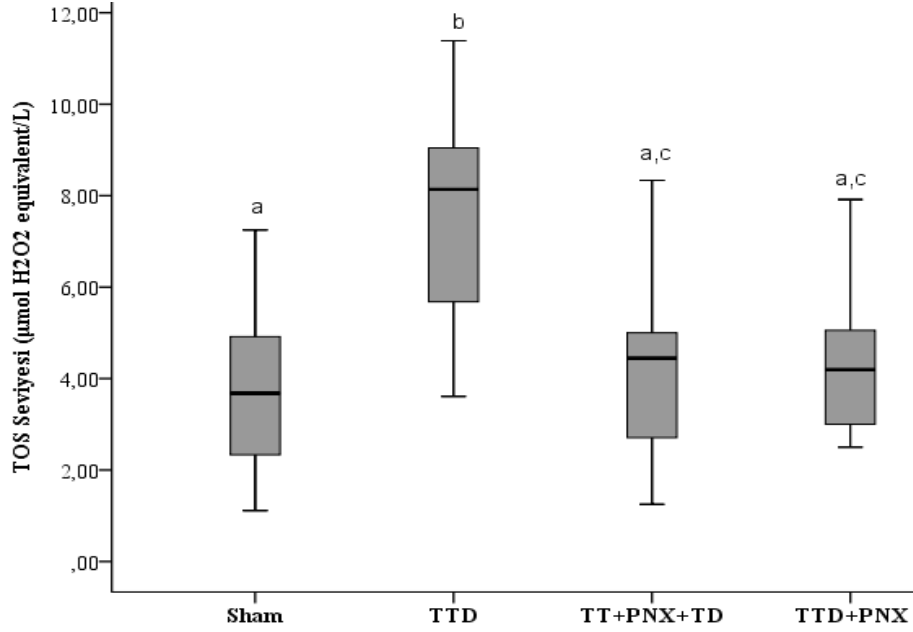


Şekil 4.3. PNX-14'ün gruplar arasında TAS seviyesine etkisi.

(Verilerin değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Grupların çoklu karşılaştırılmasında Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. Farklılık gösteren gruplar farklı harflerle gösterildi. <sup>a,b,c</sup> p<0.05).

Gruplar arasında testis dokularındaki TOS seviyeleri karşılaştırıldığında TTD grubunda TOS seviyesinin sham, TT+PNX+TD ve TTD+PNX gruplarına göre belirgin bir artış gösterdiği görüldü (p=0,0001; p=0,001; p=0,003; sırasıyla). PNX-14 uygulanan gruplarda TOS seviyesinde anlamlı bir azalma meydana gelirken uygulamanın torsiyon sırasında ya da detorsiyon başlangıcında yapılmasının TOS seviyesini etkilemediği belirlendi (p=0,992) (Çizelge 4.1) (Şekil 4.4).





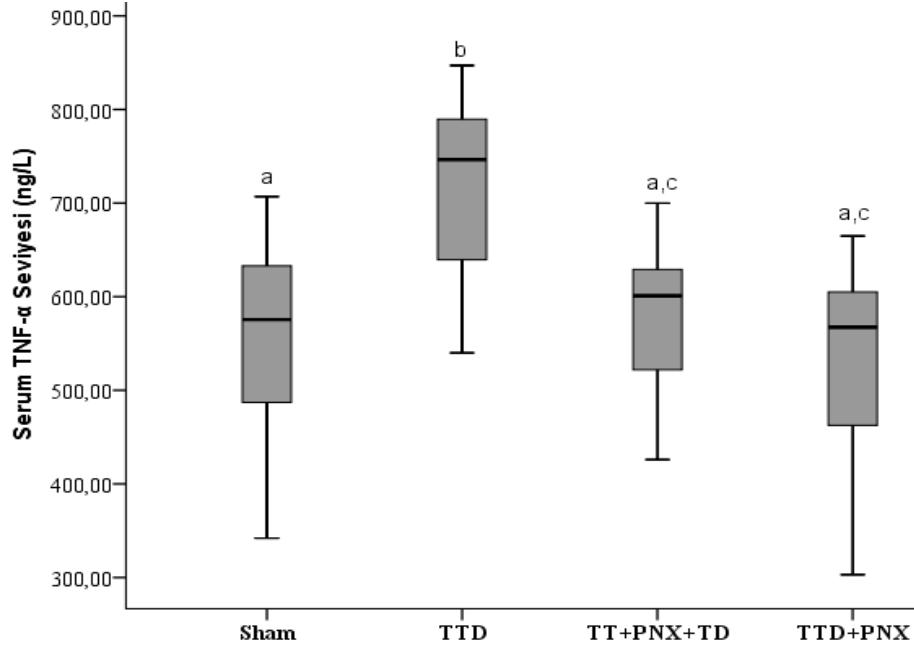
Şekil 4.4. PNX-14'ün gruplar arasında TOS seviyesine etkisi.

(Verilerin değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Grupların çoklu karşılaştırılmasında Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. Farklılık gösteren gruplar farklı harflerle gösterildi. <sup>a,b,c</sup> p<0.05).

#### 4.1.4. PNX-14'ün Serum TNF- $\alpha$ ve IL-6 Seviyeleri Üzerine Etkileri

Deney grupları arasında serum TNF- $\alpha$  seviyeleri arasında meydana gelen değişiklikler şekil 4.5'te gösterildi.

TTD grubundaki sıçanların serum TNF- $\alpha$  seviyesinin sham, TT+PNX+TD ve TTD+PNX grubundaki sıçanların serum TNF- $\alpha$  seviyelerinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görüldü (p=0,001; p=0,006; p=0,0001; sırasıyla). PNX-14 uygulamasının torsiyon sırasında ya da detorsiyon başlangıcında yapılmasının serum TNF- $\alpha$  seviyeleri arasında bir farklılık oluşturmadığı belirlendi (p=0,596) (Çizelge 4.1)

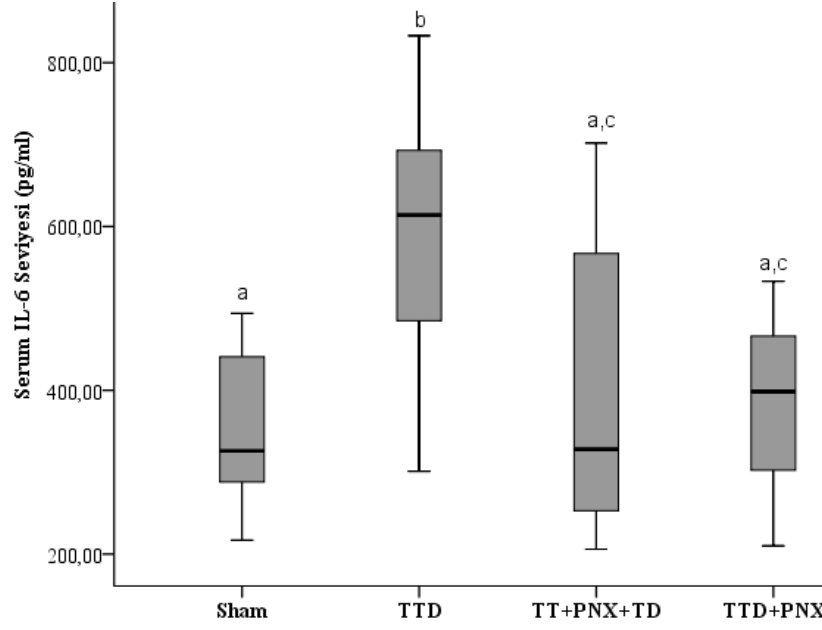


Şekil 4.5. PNX-14'ün gruplar arasında serum TNF- $\alpha$  seviyesine etkisi.

(Verilerin değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Grupların çoklu karşılaştırılmasında Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. Farklılık gösteren gruplar farklı harflerle gösterildi. <sup>a,b,c</sup>  $p < 0.05$ ).

Deney grupları arasında serum IL-6 seviyeleri arasında meydana gelen değişiklikler şekil 4.6'da gösterildi.

TTD grubundaki sıçanların serum IL-6 seviyesinin sham, TT+PNX+TD ve TTD+PNX grubundaki sıçanların serum IL-6 seviyelerinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görüldü ( $p=0,0001$ ;  $p=0,003$ ;  $p=0,002$ ; sırasıyla). PNX-14 uygulamasının torsiyon sırasında ya da detorsiyon başlangıcında yapılmasının serum IL-6 seviyeleri arasında bir farklılık oluşturmadığı belirlendi ( $p=0,596$ ) (Çizelge 4.1).



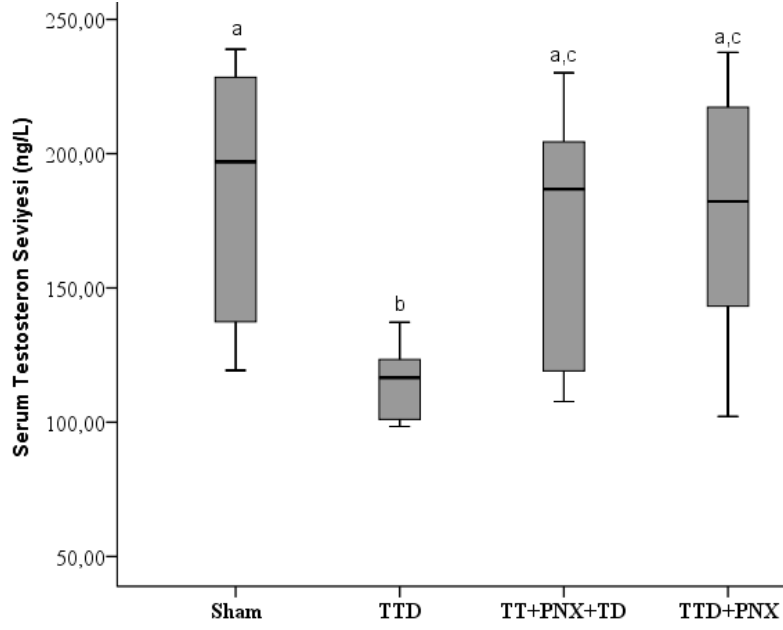
Şekil 4.6. PNX-14'ün gruplar arasında serum IL-6 seviyesine etkisi.

(Verilerin değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Grupların çoklu karşılaştırılmasında Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. Farklılık gösteren gruplar farklı harflerle gösterildi. <sup>a,b,c</sup>  $p < 0.05$ ).

#### 4.1.5. PNX-14'ün Serum Testosteron Seviyesi Üzerine Etkileri

Deney grupları arasında serum testosteron seviyeleri arasında meydana gelen değişiklikler şekil 4.7'te gösterildi.

TTD grubundaki sıçanların serum testosteron seviyesinin sham, TT+PNX+TD ve TTD+PNX grubundaki sıçanların serum testosteron seviyelerinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu görüldü ( $p=0,001$ ;  $p=0,016$ ;  $p=0,002$ ; sırasıyla). PNX-14 uygulamasının torsiyon sırasında ya da detorsiyon başlangıcında yapılmasının serum testosteron seviyeleri arasında bir farklılık oluşturmadığı belirlendi ( $p=0,861$ ) (Çizelge 4.1).



Şekil 4.7. PNX-14'ün gruplar arasında serum testosteron seviyesine etkisi.

(Verilerin değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Grupların çoklu karşılaştırılmasında Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. Farklılık gösteren gruplar farklı harflerle gösterildi. <sup>a,b,c</sup> p<0.05).

## 4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR

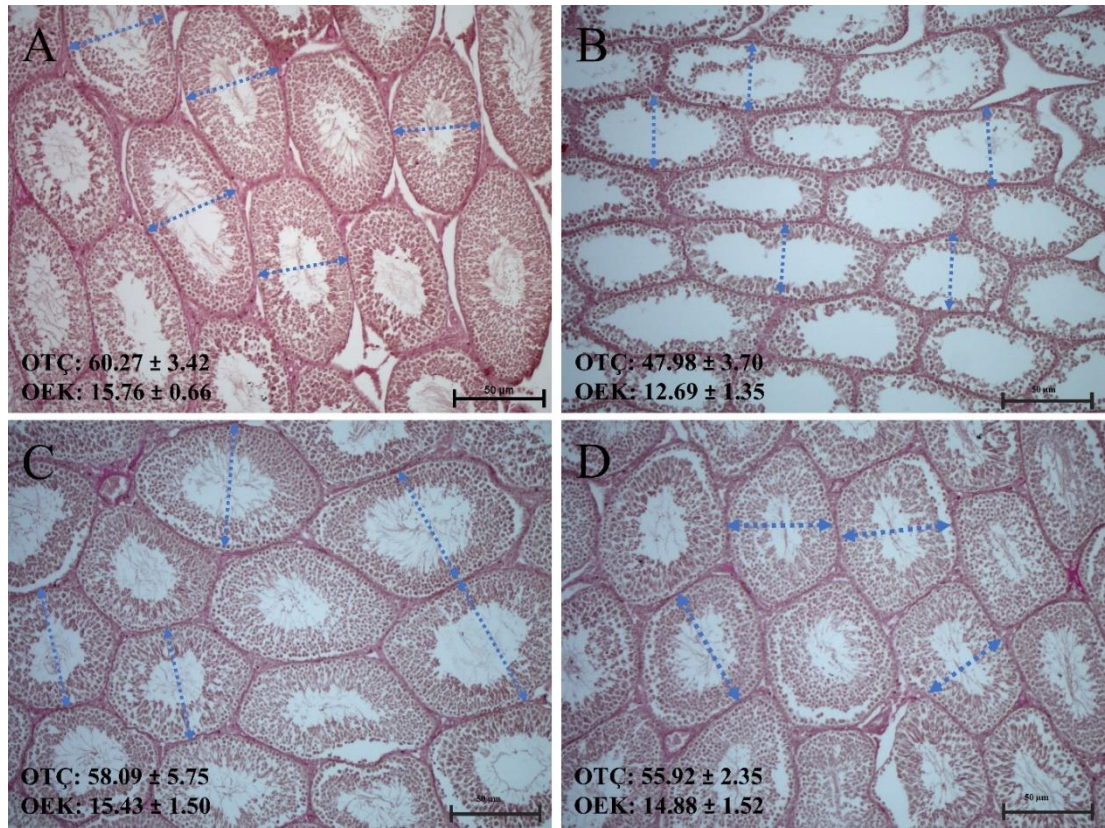
### 4.2.1. Histomorfometrik Bulgular

Yapılan morfometrik ölçümlere göre, TTD grubunda hem seminifer tübül çapı hem de seminifer epitel kalınlığı sham grubuna göre anlamlı derecede azalmış bulundu ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte, TT+PNX+TD ve TTD+PNX grupları aynı parametreler için TTD grubuna göre anlamlı derecede artmış bulunurken ( $p<0,05$ ) sham grubuna göre benzer bulundu ( $p>0,05$ ). Epitel kalınlığı/seminifer tübül çapı oranı ise tüm gruplarda benzer bulundu ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.2, Şekil 4.7).

Çizelge 4.2. Seminifer tübül çap ölçümü.

Gruplar	Seminifer epitel kalınlığı	Seminifer tübül çapı	Kalınlık/Çap
Sham	15.76 ± 0.66	60.27 ± 3.42	0.25 ± 0.02
TTD	12.69 ± 1.35 <sup>a</sup>	47.98 ± 3.70 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.04
TT+PNX+TD	15.43 ± 1.50 <sup>b</sup>	58.09 ± 5.75 <sup>b</sup>	0.27 ± 0.04
TTD+PNX	14.88 ± 1.52 <sup>b</sup>	55.92 ± 2.35 <sup>b</sup>	0.27 ± 0.02

<sup>a</sup>Sham grubuna göre azalış (p<0.05), <sup>b</sup>TTD grubuna göre artış (p<0.05).



Şekil 4.8. Seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı.

(A. Sham grubu testis kesiti. Normal histolojik görünümde seminifer tübüller gözlenmektedir. B. TTD grubu testis kesiti. Sham grubuna göre daralmış seminifer tübül çapı ve azalmış epitel kalınlığı görülmektedir. C. TT+PNX+TD grubu testis kesiti. Sham grubuna benzer histolojik yapıda ve çapta seminifer tübüller gözlenmektedir. D. TTD+PNX grubu testis kesiti. Sham grubuna benzer histolojik yapıda ve çapta seminifer tübüller gözlenmektedir. Kesikli mavi çizgiler: seminifer

tübül çapı. OTÇ: ortalama tübül çapı. OEK: ortalama epitel kalınlığı. PAS boyama, 20x.).

#### 4.2.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

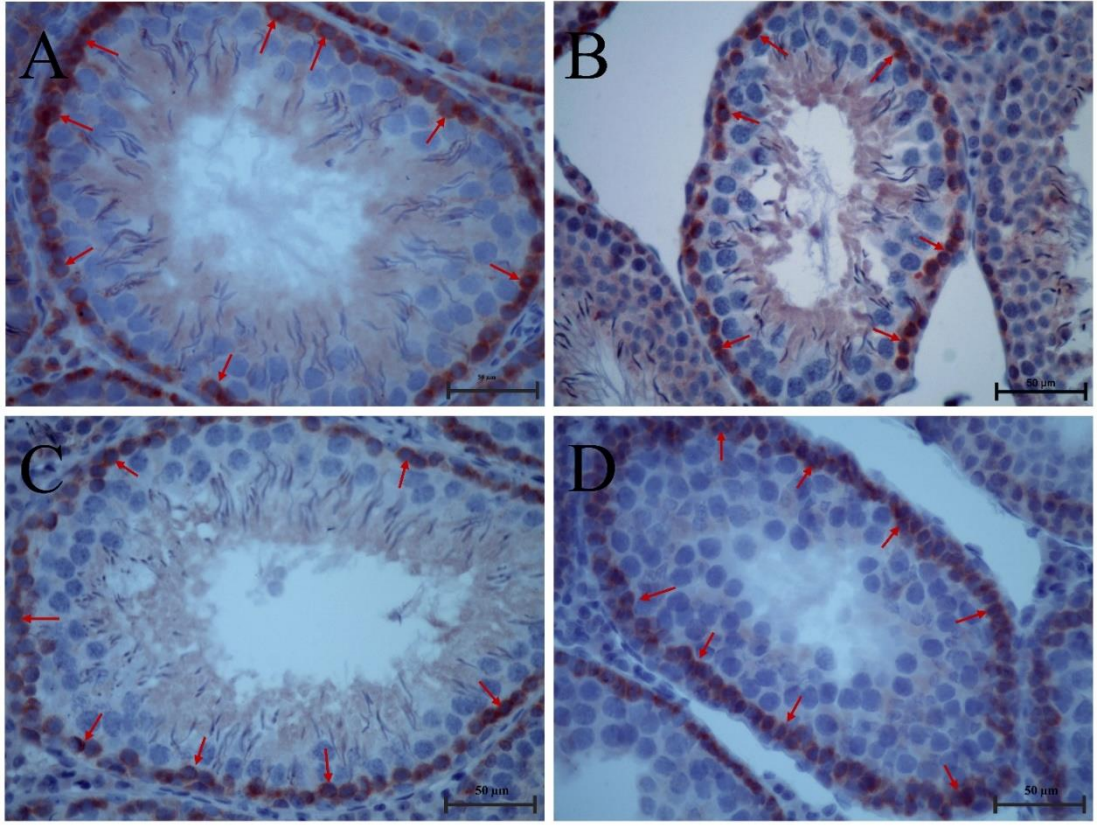
Yapılan immünohistokimyasal analizlere göre, spermatogonia sayısı TTD grubunda sham grubuna göre anlamlı derecede azalmış bulundu ( $p<0,05$ ). TT+PNX+TD ve TTD+PNX gruplarında ise TTD grubuna göre artış gözlenirken ( $p<0,05$ ), sham grubuna göre benzer bulundu ( $p>0,05$ ). Spermatogonia sayımı yapılan tübüllerin çap ölçümleri de daha önceki seminifer tübül ölçümlerinde olduğu gibi TTD grubunda diğer gruplara göre azalmış bulundu ( $p<0,05$ ). Ancak spermatogonia/tübül çapı oranı sonuçları ise tüm gruplarda benzer bulundu ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.3, Şekil 4.8).

Çizelge 4.3. İmmünohistokimya (spermatogonia) analizi.

Gruplar	Spermatogonia Sayımı	(SPG)	Tübül çapı	SPG/Tübül çapı
Sham	76.33 ± 2.58		69.60 ± 2.82	1.10 ± 0.05
TTD	66.17 ± 5.98 <sup>a</sup>		54.50 ± 4.67 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.15
TT+PNX+TD	75.17 ± 6.40 <sup>b</sup>		62.37 ± 4.56 <sup>b</sup>	1.21 ± 0.12
TTD+PNX	75.83 ± 3.06 <sup>b</sup>		65.71 ± 4.95 <sup>b</sup>	1.16 ± 0.07

<sup>a</sup>Sham grubuna göre azalış ( $p<0.05$ ).

<sup>b</sup>TTD grubuna göre artış ( $p<0.05$ ).



Şekil 4.9. İmmünohistokimyasal spermatogonia boyanması.

(A. Sham grubu testis kesiti. Normal histolojik görünümde seminifer tübül bazal membranında döşeli yoğun MAGE A4+ spermatogonialar (kırmızı oklar) gözlenmektedir. B. TTD grubu testis kesiti. Sham grubuna göre azalmış seminifer tübül çapı ve azalmış sayıda MAGE A4+ spermatogonialar (kırmızı oklar) görülmektedir. Oklarla işaretli tübül komşuluğundaki tübüllerde de seyrek spermatogonia varlığı dikkati çekmektedir. C. TT+PNX+TD grubu testis kesiti. Sham grubuna benzer histolojik yapıda ve seminifer tübül bazal membranında döşeli yoğun MAGE A4+ spermatogonialar (kırmızı oklar) gözlenmektedir. D. TTD+PNX grubu testis kesiti. Sham grubuna benzer histolojik yapıda ve seminifer tübül bazal membranında döşeli yoğun MAGE A4+ spermatogonialar (kırmızı oklar) gözlenmektedir. MAGE A4+ IHC boyama, 40x.)

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA

Uzun süreli testis torsiyonu, testis dokusunda iskemiye ve yüksek düzeyde serbest radikallerin üretimine yol açmaktadır. Detorsiyonu takiben ise testis dokusunda ROS kaynaklı oksidatif strese bir artış ortaya çıkmaktadır (85, 86). Oksidatif stres, memeli spermatozoalarının oksidatif hasara karşı çok duyarlı olması nedeniyle sperm fonksiyonlarının zayıflamasına neden olmaktadır (87). İskemi ayrıca nötrofillerin testislere sızmasına neden olan sitokinlerin salınmasını da tetikler ve geçici testis iskemisinin patofizyolojik sonuçlarına aracılık etmek için kontrolsüz serbest radikal üretiminin bir başka iyi kaynağını temsil edebilir (88). Üreme fonksiyonları üzerine oldukça yaygın bir etkisi olduğu bilinen PNX-14, insülin aktivitesi, kaygı, ağrı, hafıza ve yiyecek alımı gibi birçok olayda da rol oynamaktadır (89-91). PNX'in dokularda oksidatif strese karşı olası etkileri de literatürde gösterilmiştir. Diyabetik farelerin kalp dokularında diyabete bağlı oksidatif hasar üzerine PNX-14'ün koruyucu etkileri incelendiğinde, PNX-14 uygulamasının kalp dokusunda aktive edilmiş oksidatif stresi önemli derecede iyileştirdiği görülmüştür (92). Astrositlerde lipopolisakkaritlerin neden olduğu oksidatif hasara karşı PNX-14'ün koruyucu etkileri incelendiğinde hem astrositlerdeki ROS miktarını belirgin derecede azaltırken SOD enzim aktivitesini de taban çizgisine yakın bir seviyeye getirdiği görülmüştür (93). Gestasyonel diyabetli farelerde PNX-20 uygulamasının oksidatif stres parametrelerinde iyileşmeye neden olduğu da gösterilmiştir (94). Zandeh-Rahimi ve arkadaşları da yaptıkları çalışmalarında PNX-14'ün antioksidatif etkilerini ortaya koymuşlardır (95). Araştırmacılar, indometazin ile indüklenmiş duodenal ülserde PNX tedavisinin MDA seviyelerini azaltıp SOD enzim aktivitesini arttırarak dokuları oksidatif hasarın zararlı etkilerini iyileştirdiğini belirtmişlerdir. Yüksek yağlı diyetle indüklenmiş karaciğer hasarında PNX-14 uygulamasının hepatik SOD aktivitesinde artış, GSH üretiminde artış ve MDA düzeyinde azalma meydana getirerek yüksek yağlı diyetin neden olduğu hasarı ve karaciğer yağlanmasını önemli derecede iyileştirdiği de yapılan çalışmada



ortaya koyulmuştur (96). Hu ve arkadaşları (97) PNX-14'ün, M17 nöron hücrelerinde ROS üretimini azaltarak ve SOD aktivitesini ise artırarak morfinin neden olduğu oksidatif stresi azalttığını göstermişlerdir. Mevcut çalışmamız testis torsiyon/detorsiyon hasarında PNX-14'ün oksidatif strese karşı iyileştirici bir rol oynadığını göstererek bu alanda yapılan diğer çalışmaların bulgularını da genişletmiştir. Torsiyon sırasında ve sonrasında uygulanan PNX, testis dokusunda SOD enzim aktivitesini ve TAS düzeyini belirgin derecede artırırken MDA ve TOS düzeylerini de azaltarak dokuları oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı korumuştur. Elde ettiğimiz bu bulgular PNX'in güçlü anti-oksidatif etkilerini ortaya koymaktadır.

Son gelişmeler PNX'in merkezi sinir sistemi, kalp, endotel ve karaciğer gibi birçok farklı doku ve hücrede antiinflamatuvar özellikleri olduğunu ortaya koymuştur (98). Lysiak ve arkadaşları (99), İ/R hasarından sonra TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin uyarıldığını göstermişlerdir. Hayvan modellerinde testis torsiyon detorsiyon hasarından sonra TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'nin artan ifadeleri yapılan çalışmalarda dorğulanmıştır (100). Hem TNF- $\alpha$ 'nın hem de IL-1 $\beta$ 'nin sertoli hücrelerinde ve seminifer peritübüler hücrelerde inflamasyonu indüklediği ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerinin salınımını aktive ettiği de bildirilmiştir (101, 102). Diş pulpa hücrelerinde lipopolisakkarit kaynaklı inflamasyona karşı PNX'in etkilerinin incelendiği bir çalışmada PNX-20'nin IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerinin salınımını azalttığı gösterilmiştir (103). Yao ve arkadaşları (92) STZ ile indüklenmiş diyabetik farelerin kardiyak dokularında PNX'in tedavi edici özelliklerinin incelemişlerdir. Araştırmacılar, PNX-14 ile tedavi edilen grupta serum TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyelerinin dramatik bir şekilde azaldığını belirlemişlerdir. Bu veriler doğrultusunda, diyabetik farelerin kalp dokularındaki şiddetli inflamasyonun Phoenixin-14 tarafından çarpıcı biçimde hafifletildiğini ortaya koymuşlardır. İndometazin ile indüklenmiş duodenal ülserde de PNX tedavisi sonrası hem TNF- $\alpha$  hem de IL-6 seviyelerinde azalma meydana geldiği görülmüştür (95). Yaşlanmış beyinlerde Alzheimer, Parkinson, iskemi gibi hastalıklara bağlı olarak nöroinflamasyonun ortaya çıktığı bilinmektedir. Ma ve arkadaşları (79) mikroglia hücrelerinde PNX-14'ün TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu düzenlediğini, ROS üretimini azalttığını ve bu hücrelerde glutatyon seviyesini arttırarak İ/R hasarını azalttığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda,

intraperitoneal tek doz PNX-14 uygulamasının testis dokusunda İ/R hasarına bağlı inflamasyonu önemli derecede iyileştirdiği belirlendi. Torsiyon sırasında ya da detorsiyon başlangıcında PNX-14 tedavisinin, torsiyon detorsiyon hasarına bağlı olarak testis dokusunda artan TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyelerinde belirgin bir azalışa neden olarak dokudaki inflamasyonu iyileştirdiği görülmüştür. Elde ettiğimiz veriler PNX-14'ün antiinflamatuvar özelliklerini ortaya koymakta ve literatürdeki diğer çalışmalarla da uygunluk göstermektedir. Tüm bu bulgulara dayanarak PNX'in iskemik felç, gastrointestinal inflamatuvar bozukluklar ve diğer merkezi sinir sistemi bozuklukları için yeni bir potansiyel terapötik ajan olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Literatürdeki çalışmalar PNX'in üreme hormonları üzerinde önemli roller oynadığını göstermektedir. PNX'in serum GnRH seviyesinde herhangi bir değişikliği yol açmadan FSH, LH ve testosteron seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (76). Periferel dokularda çok daha aktif olan PNX-14'ün FSH ve testosteron salınımını uyardığı bilinmektedir (104). PKOS'lu hastalarda serum PNX seviyelerinin serum LH, testosteron ve progesteron seviyeleri ile pozitif korelasyon gösterdiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (105). Cündübey ve arkadaşları (104) da PKOS'lu hastalarda serum PNX-14 ve serum testosteron seviyeleri arasında pozitif ve güçlü bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Testis hasarının anormal spermatogeneze yol açtığı bilinmektedir (106). Testis torsiyon/detorsiyonun testiküler testosteron üretiminde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (107, 108). Birçok çalışmada da testis dokusunda meydana gelen İ/R hasarına bağlı olarak serum testosteron seviyesinin belirgin bir derecede azaldığı ortaya koyulmuştur (109, 110). Testis torsiyon/detorsiyonu sonucunda serum testosteron seviyelerini karşılaştırdığımızda bizler de torsiyon/detorsiyon uygulanan grupta serum testosteron seviyesinin belirgin bir derecede azaldığını gördük. Bunun nazaran PNX-14 ile tedavi ettiğimiz gruplarda ise serum testosteron düzeyi hasar grubuna göre anlamlı derecede artış göstermişti. Literatürdeki diğer çalışmalara benzer şekilde mevcut çalışmada da PNX-14'ün serum testosteron seviyeleri ile pozitif bir korelasyon gösterdiği ortaya koyulmuştur. Yapılan tüm bu çalışmalara rağmen PNX'in hem serum testosteron hem de serum FSH düzeylerini artırmasının mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle de bu anlamda yapılacak çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda PNX-14'ün dokuları iskemik hasara karşı koruyucu bir etkisinin olduğu da gösterilmiştir (111, 112). Ma ve arkadaşları (79), intraserebroventriküler PNX-14 infüzyonun beyin dokusunda İ/R bağlı hasarı azalttığını göstermişlerdir. Araştırmacılar PNX-14 uygulanan gruplarda infarkt alanı ve mikroglia aktivasyonunun belirgin bir derecede azaldığını gözlemlemişlerdir. Middle serebral arter oklüzyonu olan farelerde PNX-20 infüzyonun da beyin dokusunda infarkt alanını önemli ölçüde azalttığı gibi nörolojik defisit skorunu da iyileştirdiği gösterilmiştir (113). Yapılan literatür taramalarında testis torsiyon/detorsiyon hasarında PNX'in koruyucu ya da iyileştirici etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Mevcut çalışmada PNX'in testis torsiyon/detorsiyon hasarına karşı iyileştirici etkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla testis dokusundaki histomorfolojik ve immünohistokimyasal değişiklikler detaylı bir şekilde incelenmeye çalışılmıştır. Histomorfolojik değerlendirmeler sonucunda torsiyon/detorsiyon grubunda seminifer tübül çapında ve epitel kalınlığında belirgin bir azalma olduğu görülmüştür. Torsiyon/detorsiyon hasarının seminifer epitelde yer alan spermatojenik hücre hatlarını etkilediği, epitel de yer yer kayıplara neden olduğu düşünülmektedir. PNX-14 ile tedavi edilen gruplarda ise seminifer epitel kalınlığında ve tübül çapında belirgin bir iyileşme göze çarpmıştır. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda TTD grubunda spermatogonia sayısında meydana gelen azalma da oldukça dikkat çekmektedir. PNX-14 ile tedavi edilen gruplarda spermatogonia sayısı da artış göstermiştir. Bu gruplarda spermatogonia sayısında meydana gelen bu artışın seminifer epitel kalınlığında da artışa neden olduğu görülmektedir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde PNX-14 tedavisinin torsiyon/detorsiyon hasarına karşı iyileştirici roller oynayabileceği akla gelmektedir.

## BÖLÜM 6

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızdan elde edilen tüm veriler PNX-14 tedavisinin torsiyon/detorsiyonun testis dokusunda meydana getirdiği hasarı iyileştirmede etkili bir ajan olabileceğini ortaya koymaktadır. PNX-14'ün iyileştirici etkisinin temel olarak antiinflamatuvar ve antioksidatif özelliklerinden kaynaklandığı ve İ/R sonrası oksidatif stres sonucunda artan inflamasyonu azaltarak dokularda meydana gelen olumsuz Çizelgeyi ortadan kaldırdığı düşünülmektedir. Fakat literatürde PNX'in her ne kadar üreme fonksiyonları üzerine olan etkileri ortaya koyulmuş olsa da hala bu konuda birçok mekanizma aydınlatılmamıştır. İskemik hasara karşı PNX'in etkilerini inceleyen çok daha fazla çalışmaya gerek duyulmaktadır. Bizim çalışmamız iskemik hasarda testis dokusunda PNX'in iyileştirici etkilerini açıklamaya çalışsa da hala eksiklikleri bulunmaktadır. Sperm sayısı, sperm hareketliği gibi detaylı morfolojik incelemelere de gerek duyulmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçların literatüre bu konuda katkı sağlayacağı şüphesizdir. Ama çalışmamızın daha kapsamlı çalışmalar ile de desteklenmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Ransler CW, 3rd, Allen TD. Torsion of the spermatic cord. *The Urologic clinics of North America*. 1982;9(2):245-50.
2. Nussbaum Blask AR, Bulas D, Shalaby-Rana E, Rushton G, Shao C, Majd M. Color Doppler sonography and scintigraphy of the testis: a prospective, comparative analysis in children with acute scrotal pain. *Pediatric emergency care*. 2002;18(2):67-71.
3. Turner TT, Brown KJ. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biol Reprod*. 1993;49(2):401-7.
4. Prater JM, Overdorf BS. Testicular torsion: a surgical emergency. *American family physician*. 1991;44(3):834-40.
5. Smith GI. Cellular changes from graded testicular ischemia. *The Journal of urology*. 1955;73(2):355-62.
6. Mogilner JG, Elenberg Y, Lurie M, Shiloni E, Coran AG, Sukhotnik I. Effect of dexamethasone on germ cell apoptosis in the contralateral testis after testicular ischemia–reperfusion injury in the rat. *Fertility and sterility*. 2006;85:1111-7.
7. Yosten GL, Lyu RM, Hsueh AJ, Avsian-Kretchmer O, Chang JK, Tullock CW, et al. A novel reproductive peptide, phoenixin. *Journal of neuroendocrinology*. 2013;25(2):206-15.
8. Dennerlein S, Oeljeklaus S, Jans D, Hellwig C, Bareth B, Jakobs S, et al. MITRAC7 Acts as a COX1-Specific Chaperone and Reveals a Checkpoint during Cytochrome c Oxidase Assembly. *Cell reports*. 2015;12(10):1644-55.
9. Cowan A, Lyu R-M, Chen Y-H, Dun S, Chang J-K, Dun NJ. Phoenixin: A candidate pruritogen in the mouse. *Neuroscience*. 2015;310:541-8.
10. Clarke SA, Dhillo WS. Phoenixin and Its Role in Reproductive Hormone Release. *Seminars in reproductive medicine*. 2019;37(4):191-6.
11. Nguyen XP, Nakamura T, Osuka S, Bayasula B, Nakanishi N, Kasahara Y, et al. Effect of the neuropeptide phoenixin and its receptor GPR173 during folliculogenesis. *Reproduction* (Cambridge, England). 2019;158(1):25-34.
12. Ullah K, Ur Rahman T, Wu DD, Lin XH, Liu Y, Guo XY, et al. Phoenixin-14 concentrations are increased in association with luteinizing hormone and nesfatin-1 concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2017;471:243-7.

13. Billert M, Rak A, Nowak KW, Skrzypski M. Phoenixin: More than Reproductive Peptide. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
14. Ma H, Su D, Wang Q, Chong Z, Zhu Q, He W, et al. Phoenixin 14 inhibits ischemia/reperfusion-induced cytotoxicity in microglia. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2020;689:108411.
15. Moore Keith L, Persaud T. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Editör: Dalçık H, Yıldırım M, *Nobel tıp Kitabevi*. 2009:243-56.
16. Atal S. "Erişkin erkek sıçanlarda metotreksat kaynaklı testis hasarında kurkuminin etkisi". Yüksek Lisans Tezi, *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi*; 2014.
17. Dogra VS, Gottlieb RH, Oka M, Rubens DJ. Sonography of the scrotum. *Radiology*. 2003;227(1):18-36.
18. Hız İ. "Sıçanlarda testis iskemisi/reperfüzyon hasarı üzerine nimodipine'in koruyucu etkisinin morfolojik yöntemlerle araştırılması". Tıpta Uzmanlık Tezi, *ESOGÜ*; 2021.
19. Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF, et al. Targeted disruption of the Insl3 gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol*. 1999;13(5):681-91.
20. Netter FH. Atlas of human anatomy, Professional Edition E-Book: including NetterReference. com Access with full downloadable image Bank: *Elsevier health sciences*; 2014.
21. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. Ankara: *Güneş Tıp Kitabevi*; 2006.
22. Gören H. "Sıçanlarda capsaisin'in testis torsiyonundaki koruyucu etkisi". Doktora Tezi, *ESOGÜ*; 2020.
23. Atasoy N. "Çinko Oksit Nanopartikülleri ve Siklofosfamidin Sıçanlarda Testis Histolojisi, Apoptozis ve Oksidan-Antioksidan Değerler Üzerine Etkisi". Yüksek Lisans Tezi, *Necmettin Erbakan Üniversitesi*; 2016.
24. Haspolat YK, Aktar F, Yolbaş İ. Erkek adolesan sorunları: *Cinius Yayınları*; 2015.
25. Hundeiker M. Vascularization of the epididymium in man. *Gegenbaurs Morphol Jahrb*. 1966;108(4):624-8.
26. Kavram K. "Metotreksat uygulanan sıçanlarda aposinin'in testisler üzerindeki etkilerinin biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmesi". Yüksek Lisans Tezi, *Kocaeli Üniversitesi*; 2016.
27. Ilgaz C. "Hiperterminin duktus epididymis yapısına etkisi", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi*; 2011.
28. F P. In: Arıncı K, editor. *Sobotta İnsan Anatomisi Atlası*, 2008; 188 p.

29. Çiftçi M. "Ele gelmeyen testiste laparoskopik eksplorasyonun tanı ve tedavideki önemi". Tıpta Uzmanlık Tezi, *ESOGÜ*; 2013.
30. Arıncı K, Elhan A. Anatomi: kemikler, eklemler, kaslar, iç organlar: *Güneş Tıp Kitabevleri*; 2014. 330-2 p.
31. Kahraman S. "Erkeklerde Kan ve Seminal Plazmada Çinko, Bakır, Kurşun ve Kadmiyum Düzeylerinin Sperm Parametreleri Üzerine Etkileri". Tıpta Uzmanlık Tezi, *ESOGÜ*; 2008.
32. Şentürk İY. "Pioglitazasyonun testis iskemisi reperfüzyon hasarı üzerine olan etkisinin incelenmesi". Tıpta Uzmanlık Tezi, *Trakya Üniversitesi*; 2020.
33. Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1 Cilt. *Güneş Kitapevi*; 2006.
34. Major AT, Estermann MA, Smith CA. Anatomy, Endocrine Regulation, and Embryonic Development of the Rete Testis. *Endocrinology*. 2021;162(6).
35. Leeson TS, Cookson FB. The mammalian testicular capsule and its muscle elements. *J Morphol*. 1974;144(2):237-53.
36. Ross MH, Pawlina W. Histoloji konu anlatımı ve atlas. Çev Ed: Baykal B. Ankara: *Nobel Tıp Kitapevleri*; 2014;6:784-5.
37. Mescher A. Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitap. Çeviren: Solakoğlu S. Ankara: *Güneş Tıp Kitapevleri*; 2015;13:429-48.
38. AL K. Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş. Çeviri Editörü: Prof Dr Ramazan Demir. Ankara: *Palme Yayıncılık*. 2006:531-64.
39. Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update*. 2009;15(2):213-27.
40. Shima Y, Miyabayashi K, Haraguchi S, Arakawa T, Otake H, Baba T, et al. Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes. *Molecular endocrinology*. 2013;27(1):63-73.
41. Mcmanus LM, Mitchell RN. Pathobiology of human disease: a dynamic encyclopedia of disease mechanisms: *Elsevier*; 2014.
42. Jarow JP. Clinical significance of intratesticular arterial anatomy. *J Urol*. 1991;145(4):777-9.
43. Ozdemir MB, Celik HH, Aldur MM. Altered course of the right testicular artery. *Clin Anat*. 2004;17(1):67-9.
44. Asala S, Chaudhary SC, Masumbuko-Kahamba N, Bidmos M. Anatomical variations in the human testicular blood vessels. *Ann Anat*. 2001;183(6):545-9.

45. Xue HG, Yang CY, Ishida S, Ishizaka K, Ishihara A, Ishida A, et al. Duplicate testicular veins accompanied by anomalies of the testicular arteries. *Ann Anat.* 2005;187(4):393-8.
46. Mostafa T, Labib I, El-Khayat Y, El-Rahman El-Shahat A, Gadallah A. Human testicular arterial supply: gross anatomy, corrosion cast, and radiologic study. *Fertil Steril.* 2008;90(6):2226-30.
47. Guyton A, Hall J. Tıbbi Fizyoloji Ders Kitabı. Ankara: *Güneş Tıp Kitapevleri*; 2006;1001 p.
48. Netter F. İnsan Anatomisi Atlası. Ankara: *Güneş Tıp Kitapevleri*; 2014.
49. Favorito LA, Costa WS, Sampaio FJ. Applied anatomic study of testicular veins in adult cadavers and in human fetuses. *Int Braz J Urol.* 2007;33(2):176-80.
50. Sinnatamby C SR. Last's anatomy. *Churchill Livingstone/Elsevier*, Edinburgh; 2011. 229-80 p.
51. Friedrich Paulsen JW. Sobotta Atlas of Human Anatomy. 15 ed: *Elsevier Health Sciences Germany*; 2013.
52. Shaeer K, Shaeer O, Ragab M. Testicular torsion in adolescents. *Human Andrology.* 2016;6:79-85.
53. Noske HD, Kraus SW, Altinkilic BM, Weidner W. Historical milestones regarding torsion of the scrotal organs. *J Urol.* 1998;159(1):13-6.
54. Dunne PJ, O'Loughlin BS. Testicular torsion: time is the enemy. *Australian and New Zealand Journal of Surgery.* 2000;70(6):441-2.
55. Partin AW, Wein AJ, Kavoussi LR, Peters CA, Dmochowski RR. Campbell Walsh Wein Urology, E-Book: *Elsevier Health Sciences*; 2020.
56. Ekşi E. "Ratlarda testis torsiyon-detorsiyonuna myricetinin etkisi", Tıpta Uzmanlık Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi*; 2019.
57. Palmer L, Palmer J, Wein A, Kavoussi L, Partin A, Peters C. *Campbell-Walsh urology.* 2016.
58. Williamson RC, Thomas WE. Sympathetic orchidopathia. *Ann R Coll Surg Engl.* 1984;66(4):264-6.
59. Eyre RC. Acute scrotal pain in adults. Up-To-Date [database on the Internet] *Wolters Kluwer*; 2020.
60. Kass EJ, Lundak B. The acute scrotum. *Pediatr Clin North Am.* 1997;44(5):1251-66.
61. Jones DJ. Recurrent subacute torsion: prospective study of effects on testicular morphology and function. *J Urol.* 1991;145(2):297-9.



62. Hittelman AB. Neonatal testicular torsion. Uptodate com. 2014.
63. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery*. 2004;24(6):468-75.
64. Huether SE, McCance KL, Parkinson CF. Study guide for understanding pathophysiology-E-book: *Elsevier Health Sciences*; 2011.
65. Green C, Gower J, Healing G, Cotterill L, Fuller B, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free radical research communications*. 1989;7(3-6):255-64.
66. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology*. 2012;298:229-317.
67. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.
68. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(9):1482-95.
69. Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar A, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni*. 2001;2(4):154-67.
70. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2001;94(6):1133-8.
71. Dennerlein S, Oeljeklaus S, Jans D, Hellwig C, Bareth B, Jakobs S, et al. MITRAC7 acts as a COX1-specific chaperone and reveals a checkpoint during cytochrome c oxidase assembly. *Cell reports*. 2015;12(10):1644-55.
72. Cowan A, Lyu RM, Chen YH, Dun SL, Chang JK, Dun NJ. Phoenixin: A candidate pruritogen in the mouse. *Neuroscience*. 2015;310:541-8.
73. Billert M, Rak A, Nowak KW, Skrzypski M. Phoenixin: more than reproductive peptide. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(21):8378.
74. Palasz A, Rojczyk E, Bogus K, Worthington JJ, Wiaderkiewicz R. The novel neuropeptide phoenixin is highly co-expressed with nesfatin-1 in the rat hypothalamus, an immunohistochemical study. *Neurosci Lett*. 2015;592:17-21.
75. Lyu RM, Huang XF, Zhang Y, Dun SL, Luo JJ, Chang JK, et al. Phoenixin: a novel peptide in rodent sensory ganglia. *Neuroscience*. 2013;250:622-31.

76. Guvenc G, Altinbas B, Kasikci E, Ozyurt E, Bas A, Udum D, et al. Contingent role of phoenixin and nesfatin-1 on secretions of the male reproductive hormones. *Andrologia*. 2019;51(11):e13410.
77. Liang H, Zhao Q, Lv S, Ji X. Regulation and physiological functions of phoenixin. *Front Mol Biosci*. 2022;9:956500.
78. Rocca C, Scavello F, Granieri M, Pasqua T, Amodio N, Imbrogno S, et al. Phoenixin-14: detection and novel physiological implications in cardiac modulation and cardioprotection. *Cellular and molecular life sciences*. 2018;75:743-56.
79. Ma H, Su D, Wang Q, Chong Z, Zhu Q, He W, et al. Phoenixin 14 inhibits ischemia/reperfusion-induced cytotoxicity in microglia. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2020;689:108411.
80. Ganjiani V, Ahmadi N, Divar MR, Sharifiyazdi H, Meimandi-Parizi A. Protective effects of crocin on testicular torsion/detorsion in rats. *Theriogenology*. 2021;173:241-8.
81. Zandeh-Rahimi Y, Panahi N, Hesaraki S, Shirazi-Beheshtiha SH. Protective Effects of Phoenixin-14 Peptide in the Indomethacin-Induced Duodenal Ulcer: An Experimental Study. *Int J Pept Res Ther*. 2022;28(1):43.
82. Lowry O, Rosebrough N, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
83. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*. 186: Elsevier; 1990. p. 407-21.
84. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*. 1988;34(3):497-500.
85. Taneli F, Vatanserver S, Ulman C, Yılmaz Ö, Giray G, Genç A, et al. The effect of spermatic vessel ligation on testicular nitric oxide levels and germ cell-specific apoptosis in rat testis. *Acta histochemica*. 2005;106(6):459-66.
86. Guimarães SB, Aragão AA, Santos JMV, Kimura OdS, Barbosa PHU, Vasconcelos PRLd. Oxidative stress induced by torsion of the spermatic cord in young rats. *Acta cirurgica brasileira*. 2007;22:30-3.
87. Mishra M, Acharya UR. Protective action of vitamins on the spermatogenesis in lead-treated Swiss mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2004;18(2):173-8.
88. Tian W-N, Braunstein LD, Apse K, Pang J, Rose M, Tian X, et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1999;276(5):C1121-C31.

89. Billert M, Kołodziejcki PA, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Phoenixin-14 stimulates proliferation and insulin secretion in insulin producing INS-1E cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2019;1866(12):118533.
90. Hofmann T, Weibert E, Ahnis A, Elbelt U, Rose M, Klapp BF, et al. Phoenixin is negatively associated with anxiety in obese men. *Peptides*. 2017;88:32-6.
91. Jiang J, He Z, Peng Y, Jin W, Wang Z, Mu L, et al. Phoenixin-14 enhances memory and mitigates memory impairment induced by A $\beta$ 1-42 and scopolamine in mice. *Brain research*. 2015;1629:298-308.
92. Yao B, Lv J, Du L, Zhang H, Xu Z. Phoenixin-14 protects cardiac damages in a streptozotocin-induced diabetes mice model through SIRT3. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2021:1-9.
93. Wang J, Zheng B, Yang S, Tang X, Wang J, Wei D. The protective effects of phoenixin-14 against lipopolysaccharide-induced inflammation and inflammasome activation in astrocytes. *Inflammation Research*. 2020;69:779-87.
94. Chi X, Li Z, Zhang L, Xie X, Huang M. Phoenixin-20 ameliorates gestational diabetes mellitus (GDM) symptoms and placental insults in an experimental mouse model. *International Immunopharmacology*. 2021;101:108171.
95. Zandeh-Rahimi Y, Panahi N, Hesaraki S, Shirazi-Beheshtiha SH. Protective effects of phoenixin-14 peptide in the indomethacin-induced duodenal ulcer: An experimental study. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2022;28(1):43.
96. Yang F, Huang P, Shi L, Liu F, Tang A, Xu S. Phoenixin 14 Inhibits High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Experimental Mice. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:3865-74.
97. Hu Y, Shen X, Liu F, Zhu W. Phoenixin-14 Ameliorates Cellular Senescence Against Morphine in M17 Neuronal Cells. *Neurotox Res*. 2022;40(2):498-507.
98. McIlwraith EK, Zhang N, Belsham DD. The regulation of phoenixin: A fascinating multidimensional peptide. *Journal of the Endocrine Society*. 2022;6(2):bvab192.
99. Lysiak JJ, Nguyen QAT, Kirby JL, Turner TT. Ischemia-reperfusion of the murine testis stimulates the expression of proinflammatory cytokines and activation of c-jun N-terminal kinase in a pathway to E-selectin expression. *Biology of reproduction*. 2003;69(1):202-10.
100. Wei S-M, Yan Z-Z, Zhou J. Taurine reduces testicular ischemia/reperfusion-induced neutrophil recruitment to testis probably by downregulation of pro-inflammatory cytokines and E-selectin. *Urology*. 2008;72(2):464-5.

101. Al-Maghrebi M, Renno WM, Al-Ajmi N. Epigallocatechin-3-gallate inhibits apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from ischemia/reperfusion-induced inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;420(2):434-9.
102. Sperling H, Krege S, Lümmer G, Rübber H. Testicular perfusion injury: Cytokines and cell adhesion molecules in humans. *Der Urologe*. 2007;46:1033-40.
103. Sun G, Ren Q, Bai L, Zhang L. Phoenixin-20 suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in dental pulp cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2020;318:108971.
104. Cundubey C, Cam S. Serum Phoenixin-14 levels of women with polycystic ovary syndrome increase proportionally with BMI. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2023;27(8):3519-25.
105. Ullah K, ur Rahman T, Wu D-D, Lin X-H, Liu Y, Guo X-Y, et al. Phoenixin-14 concentrations are increased in association with luteinizing hormone and nesfatin-1 concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *Clinica chimica acta*. 2017;471:243-7.
106. Ameli M, Moghimian M, Saeb F, Bashtani E, Shokoohi M, Salimnejad R, et al. The effect of clomiphene citrate and human chorionic gonadotropin on the expression of CatSper1, CatSper2, LHCGR, and SF1 genes, as well as the structural changes in testicular tissue of adult rats. *Molecular reproduction and development*. 2019;86(6):738-48.
107. Turner TT, Bang HJ, Lysiak JJ. Experimental testicular torsion: reperfusion blood flow and subsequent testicular venous plasma testosterone concentrations. *Urology*. 2005;65(2):390-4.
108. Shokoohi M, Shoorei H, Soltani M, Abtahi-Eivari SH, Salimnejad R, Moghimian M. Protective effects of the hydroalcoholic extract of *Fumaria parviflora* on testicular injury induced by torsion/detorsion in adult rats. *Andrologia*. 2018;50(7):e13047.
109. Sekerci CA, Tanidir Y, Sener TE, Sener G, Cevik O, Yarat A, et al. Effects of platelet-rich plasma against experimental ischemia/reperfusion injury in rat testis. *J Pediatr Urol*. 2017;13(3):317.e1-e9.
110. Elmimehr R, Motamed-Sanaye A, Brazvan B, Abtahi-Eivary SH, Moghimian M, Fani M. Effects of hypothermia and pentoxifylline on the adnexal torsion/detorsion injuries in a rat testis model. *Andrologia*. 2021;53(8):e14143.
111. Rocca C, Scavello F, Granieri MC, Pasqua T, Amodio N, Imbrogno S, et al. Phoenixin-14: detection and novel physiological implications in cardiac modulation and cardioprotection. *Cellular and molecular life sciences*. 2018;75:743-56.

112. Zhang B, Li J. Phoenixin-14 protects human brain vascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced inflammation and permeability. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2020;682:108275.
113. Wang S, Liang R, Liu H. Phoenixin-20 ameliorates brain infarction by promoting microglia M2 polarization in an ischemic stroke model. *Metabolic Brain Disease*. 2022;37(5):1517-26.

**EK AÇIKLAMALAR A.**

**ETİK KURUL İZİNİ**



T.C.  
KARABÜK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : E-55212866-050.99-143815  
Konu : 2022/7/10 Nolu Karar

07.07.2022

Sayın Dr. Öğr.Üyesi Nesibe YILMAZ

Karabük Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna proje yürütücüsü olarak sunmuş olduğunuz "*Testiküler torsiyon/detorsiyon hasarına karşı Phoenixin'in koruyucu etkisinin incelenmesi*" başlıklı Yüksek Lisans projeniz 07.07.2022 tarihinde yapılan etik kurul toplantısında amaç, gerekçe ve uygulamayla ilgili olarak Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre incelenmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR  
Kurul Başkanı

## ÖZGEÇMİŞ

Jemal HUDAYKULIYEVA, ilk, orta ve lise'yi Türkmenistan'da birincilikle tamamladı. 2017-2021 tarihleri arasında Karabük Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Fizyoterapi ve Rehabilitasyon bölümünü tamamladıktan sonra Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.