



**PREPUBERTAL SIÇANLARDA PROKİNETİCİN-
2'NİN TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON
HASARINA KARŞI OLASI ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

**2024
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANATOMİ**

İlayda ATAY

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

**PREPUBERTAL SIÇANLARDA PROKİNETİCİN-2'NİN TESTİKÜLER
TORSİYON/DETORSİYON HASARINA KARŞI OLASI ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

İlayda ATAY

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

**T.C.
Karabük Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anatomi Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**KARABÜK
Haziran 2024**

İlayda ATAY tarafından hazırlanan “PREPUBERTAL SIÇANLARDA PROKİNETİCİN-2’NİN TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON HASARINA KARŞI OLASI ETKİLERİNİN 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. 27/06/2024

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Doç. Dr. Şeyma TOY (KBÜ)

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

Üye : Doç. Dr. Rukiye ÇİFTÇİ (GİBTU)

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans 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”

İlayda ATAY

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PREPUBERTAL SIÇANLARDA PROKİNETİCİN-2'NİN TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON HASARINA KARŞI OLASI ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

İlayda ATAY

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anatomi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ

Haziran 2024, 62 sayfa

Günümüzde oldukça sık karşılaşılan ve her yaş grubunu etkileyen testiküler torsiyon/detorsiyon oldukça önemlidir ve acil müdahale gerektirmektedir. Puberte öncesi dönemde çok daha fazla görülen bu klinik durum, testislerin morfolojik ve fizyolojik özelliklerini olumsuz yönde etkileyerek etkilenen bireyler kısırlığa kadar neden olan sorunlar ortaya çıkarmaktadır. Özellikle merkezi sinir sisteminde ve testislerde yer alan steriodojenik olmayan hücrelerinde ifade edilen PROK2, üreme fonksiyonlarının nöroendokrin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca diploid spermatozoidlerde PROK2 ifade edilmesi, PROK2'nin spermatogenezin son basamağında rol oynadığını düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında, testiküler torsiyon/detorsiyon hasarında PROK2'nin tedavi edici etkisinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda PROK2'nin testis dokusundaki oksidatif stres ve inflamasyon üzerine etkileri, serum testosteron düzeyi üzerine etkisi araştırıldı.

Ayrıca testis dokusundaki morfolojik değişiklikler üzerindeki etkisi de histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler ile değerlendirildi.

Henüz puberteye girmemiş, Wistar albino cinsi, 48 adet erkek sıçan dört gruba ayrıldı; sham, testis torsiyon/detorsiyon (TTD), testis torsiyonu+PROK2+testis detorsiyonu (TD+PROK2+TD) ve testis torsiyon/detorsiyonu+PROK2. Sham grubundaki sıçanlar hariç diğer gruplardaki sıçanlara testiküler torsiyon/detorsiyon cerrahisi yapıldı. Sham grubunda ise sadece testis dokusu scrotum içerisinde çıkarıldı, torsiyon yapılmadan tekrar aynı konumuna yerleştirilerek kesi yeri kapatıldı. TT+PROK2+TD grubuna torsiyonun bitimine 30 dk kala, TTD+PROK2 grubuna ise detorsiyonun hemen başında tek doz PROK2 (60 nmol/kg) intraperitoneal olarak verildi. 24 saatlik detorsiyonun ardından sıçanlardan kan ve testis dokusu örnekleri alındı ve sıçanlar sakrifiye edildi. Serum testosteron düzeyinin belirlemek için alınan kan örnekleri hızlı bir şekilde serumlarına ayrıldı ve ELISA yöntemiyle analiz edildi. Testis dokularının yarısında (her bir grupta 6 tane) toplam antioksidan kapasite (TAS), toplam oksidan kapasite (TOS), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) seviyeleri ELISA yöntemiyle belirlendi. Dokuların diğer yarısında ise hematoksilen-eozin (HE) boyama ve immünohistokimyasal analizler ile histopatolojik değerlendirmeler yapıldı.

Serum testosteron hormon düzeyi TTD grubunda diğer gruplara göre oldukça düşüktü ($p<0.05$). PROK2 uygulanan gruplarda ise serum testosteron hormon düzeyinde artış meydana geldi ($p<0.05$). En düşük TAS seviyesi ve en yüksek TOS seviyesi TTD grubunda belirlendi. PROK2 tedavisinin TAS seviyesini arttırırken TOS seviyesini azalttığı görüldü ($p<0.05$). TTD grubunda artış gösteren TNF- α ve IL-6 düzeylerinde PROK2 tedavisi sonrası bir iyileşme tespit edildi ($p<0.05$). Histolojik analizler sonucunda seminifer epitel kalınlığı ve tübül çapının TTD grubunda azaldığı, PROK2 uygulanan gruplarda ise arttığı belirlendi ($p<0.05$). TTD grubunda yoğun bir hemoraji görüldü. Sham ve PROK2 gruplarında hemoraji TTD grubuna göre belirgin derecede azalmıştı ($p<0.05$). Johnsen's skoru da TTD grubunda diğer gruplara kıyasla daha düşüktü ($p<0.05$). PROK2 tedavisi Johnsen's skorunu da arttırmıştı. Torsiyon/detorsiyon hasarı sonucu TTD grubunda

spermatogonia sayısı diğer gruplardan daha dūřüktü ($p<0.05$). PROK2 gruplarında ise spermatogonia sayısı TTD grubuna göre artmışken sham grubu ile benzerdi.

Sonuçlarımız, PROK2 tedavisinin testiküler torsiyon/detorsiyon hasarının azaltılmasında etkili bir tedavi yöntemi olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler : PROK2, torsiyon/detorsiyon, oksidatif stres, inflamasyon, histomorfometri.

Bilim Kodu : 1005

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE EFFECTS OF PROKINETICIN-2 AGAINST TESTICULAR TORSION/DETORSION DAMAGE IN PREPUBERTAL RATS

İlayda ATAY

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

Thesis Advisor

Assist. Prof. Dr. Nesibe YILMAZ

June 2024, 62 pages

Testicular torsion/detorsion, which is very common today and affects all age groups, is very important and requires urgent intervention. This clinical condition, which is more common in the pre-pubertal period, negatively affects the morphological and physiological characteristics of the testicles, causing problems leading to infertility in affected individuals. PROK2, which is especially expressed in non-steriodogenic cells located in the central nervous system and testicles, is known to play a role in the neuroendocrine regulation of reproductive functions. Additionally, the expression of PROK2 in diploid spermatocytes suggests that PROK2 plays a role in the last step of spermatogenesis. In this thesis study, it was aimed to examine the therapeutic effect of PROK2 in testicular torsion/detorsion injury. For this purpose, the effects of PROK2 on oxidative stress and inflammation in testicular tissue and its effect on serum testosterone level were investigated. In addition, its effect on morphological

changes in testicular tissue was evaluated by histopathological and immunohistochemical analyses.

48 male rats of the Wistar albino breed, who had not yet entered puberty, were divided into four groups; sham, testicular torsion/detorsion (TTD), testicular torsion+PROK2+testicular detorsion (TD+PROK2+TD), and testicular torsion/detorsion+PROK2. Except for the rats in the sham group, testicular torsion/detorsion surgery was performed on rats in other groups. In the sham group, only the testicular tissue was removed from the scrotum, and the incision was closed by placing it back in the same position without torsion. A single dose of PROK2 (60 nmol/kg) was given intraperitoneally to the TT+PROK2+TD group 30 minutes before the end of torsion, and to the TTD+PROK2 group at the very beginning of detorsion. After 24 hours of detorsion, blood and testicular tissue samples were taken from the rats and the rats were sacrificed. Blood samples taken to determine serum testosterone levels were quickly separated into serum and analyzed by ELISA method. Total antioxidant capacity (TAS), total oxidant capacity (TOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) levels were determined by ELISA method in half of the testicular tissues (6 in each group). On the other half of the tissues, histopathological evaluations were performed with hematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemical analyses.

Serum testosterone hormone level was significantly lower in the TTD group compared to the other groups ($p < 0.05$). There was an increase in serum testosterone hormone levels in the PROK2 applied groups ($p < 0.05$). The lowest TAS level and the highest TOS level were determined in the TTD group. It was observed that PROK2 treatment increased the TAS level and decreased the TOS level ($p < 0.05$). An improvement was detected in TNF- α and IL-6 levels, which increased in the TTD group, after PROK2 treatment ($p < 0.05$). As a result of histological analysis, it was determined that seminiferous epithelial thickness and tubule diameter decreased in the TTD group and increased in the PROK2 applied groups ($p < 0.05$). Extensive hemorrhage was seen in the TTD group. Hemorrhage was significantly reduced in the Sham and PROK2 groups compared to the TTD group ($p < 0.05$). Johnsen's score was also lower in the TTD group compared to the other groups ($p < 0.05$). PROK2

treatment also increased Johnsen's score. As a result of torsion/detorsion injury, the number of spermatogonia in the TTD group was lower than the other groups ($p < 0.05$). In the PROK2 groups, the number of spermatogonia increased compared to the TTD group and was similar to the sham group.

Our results suggest that PROK2 treatment may be an effective treatment method in reducing testicular torsion/detorsion damage.

Keywords : PROK2, torsion/detorsion, oxidative stress, inflammation, histomorphometry

Science Code : 1005

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimin ve tez sürecim boyunca benden hiçbir zaman bilgisini ve desteğini esirgemeyen, varlığını her daim hissettiğim canım hocam Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ'a ve laboratuvar araştırmalarımız boyunca tüm katkıları ve yardımlarından dolayı sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Ümit YILMAZ'a tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Karabük Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı'nda aldığım yüksek lisans eğitimin boyunca emeği geçen değerli hocam Doç. Dr. Şeyma TOY'a ve anabilim dalı asistanlarımıza teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, her konuda bana güvenen, beni büyütüp bu günlere getiren, maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen canım anneme, kardeşime ve bu süreçte bana yürekten inanan ve bunu hep hissettiren kalbimdeki herkese çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmalarım esnasında maddi destek sağlayan Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: KBÜBAP-23-YL-076) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	x
İÇİNDEKİLER	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
GENEL BİLGİLER	3
2.1. TESTİS'LERİN EMBRİYOLOJİK GELİŞİMİ.....	3
2.2. TESTİS'LERİN ANATOMİK YAPISI	4
2.3. TESTİS'LERİN VASKÜLER YAPISI.....	8
2.4. TESTİS'LERİN HİSTOLOJİK YAPISI	10
2.4.1. Sertoli Hücreleri.....	12
2.4.2. Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenezis	13
2.4.3. Leydig Hücreleri.....	14
2.5. TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYONUN EPİDEMİYOLOJİSİ VE ETİYOLOJİSİ	15
2.6. TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYONUN PATOFİZYOLOJİSİ	16
2.7. İSKEMİ VE REPERFÜZYON HASARI	18
2.7.1. İskemik Hasar	18
2.7.2. Reperfüzyon Hasarı	20
2.8. PROKİNETİCİN KOMPLEMENTER SİSTEMİ.....	20

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 3	25
MATERYAL VE METOT	25
3.1. ÇALIŞMANIN DİZAYNI	25
3.2. TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON MODELİ	26
3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	28
3.3.1. Testis Dokusunun Homojenize Edilmesi, TAS ve TOS Düzeylerinin Belirlenmesi	28
3.3.2. TNF- α ve IL-6 Seviyelerinin Belirlenmesi.....	29
3.3.3. Testosteron hormon düzeyinin belirlenmesi.....	30
3.4. HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER.....	30
3.4.1. Dokuların Takip Edilmesi ve Histopatolojik Analizler	30
3.4.2. İmmünohistokimyasal (IHC) Analizler	31
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	32
BÖLÜM 4	33
BULGULAR.....	33
4.1. TORSİYON/DETORSİYON HASARINDA PROK2’NİN OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ	33
4.2. TORSİYON/DETORSİYON HASARINDA PROK2’NİN İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİSİ	35
4.3. PROK2 TEDAVİSİ SONRASI GRUPLARIN SERUM TESTOSTERON SEVİYELERİ.....	37
4.4. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	39
4.5. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL SPERMATOGONİA ANALİZİ.....	42
BÖLÜM 5	44
TARTIŞMA	44
BÖLÜM 6	49
SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50
EK AÇIKLAMALAR A. ETİK KURUL İZİNİ	60

	<u>Sayfa</u>
ÖZGEÇMİŞ	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Testis'lerin scrotum içerisindeki konumu.....	5
Şekil 2.2. Epididymis'in konumu ve testis ile bağlantısı.....	6
Şekil 2.3. Testis'leri saran katmanlar.....	7
Şekil 2.4. Testis'lerin vasküler yapısı.....	10
Şekil 2.5. Testis'lerin iç yapısı.....	11
Şekil 2.6. PROK2'lerin erkek üreme sistemindeki şematik gösterimi.....	22
Şekil 3.1. TTD modelinin yapılması.....	27
Şekil 3.2. Sıçanlara PROK2 enjeksiyonunun yapılması (1), kan (2) ve testis örneklerinin (3) alınması.....	28
Şekil 4.1. PROK2 tedavisi sonrasında gruplar arasındaki TAS düzeylerinin karşılaştırılması.....	34
Şekil 4.2. PROK2 tedavisi sonrasında gruplar arasındaki TOS düzeylerinin karşılaştırılması.....	35
Şekil 4.3. PROK2 tedavisi sonrasında gruplar arasındaki TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması.....	36
Şekil 4.4. PROK2 tedavisi sonrasında gruplar arasındaki IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması.....	37
Şekil 4.5. PROK2 tedavisi sonrasında gruplar arasındaki serum testosteron düzeylerinin karşılaştırılması.....	38
Şekil 4.6. Seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı.....	40
Şekil 4.7. TTD grubu ileri düzey hemoraji.....	41
Şekil 4.8. IHC boyamalar.....	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1. TAS ve TOS düzeyleri.....	33
Çizelge 4.2. TNF- α ve IL-6 düzeyleri.....	36
Çizelge 4.3. PROK2 tedavisi sonrası grupların serum testosteron düzeyleri.	38
Çizelge 4.4. Histomorfometrik bulgular.	39
Çizelge 4.5. Histopatolojik bulgular ve hemoraji.	41
Çizelge 4.6. Johnsen's skoru.....	42
Çizelge 4.6. İmmünohistokimya (spermatogonia) analizi.	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KISALTMALAR

PROK2	: Prokineticin-2
TT	: Testis torsiyonu
TD	: Testis detorsiyon
TTD	: Testis torsiyon/detorsiyon
TAS	: Toplam Antioksidan Düzeyi
TOS	: Toplam Oksidan Düzeyi
ATP	: Adenozin Trifosfat
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
İ/R	: İskemi/Reperfüzyon
HE	: Hematoksilen-Eozin
IHC	: İmmunohistokimya
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü-alfa
IL-6	: İnterlökin-6
ELISA	: Enzim bağımlı immnusorbent assay

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Testiküler torsiyon (TT); funiculus spermaticus'un kendi eksenini etrafında farklı derecelerdeki rotasyonuna bağlı olarak testislerde kan akışının bozulmasına, dokudaki oksijen miktarının azalmasına ve buna bağlı olarak iskemik hasarla sonuçlanmasına neden olan akut seyirli, ürolojik acil bir durumdur (1, 2). Görülme sıklığının postnatal 25. yıla kadar 1/4000 olduğu ifade edilmiştir (3). Testiküler torsiyon her yaş grubunda görülebilmekle birlikte sıklıkla perinatal, neonatal ve adolesan; özellikle de 13 yaş grubunda karşımıza çıkmaktadır (2).

Testiküler torsiyona bağlı olarak oluşan iskemi süreci testis dokusunda hasara neden olurken, detorsiyon sonrasında iskemik olan testis dokusuna yeniden kan akımının sağlanması ile başlayan reperfüzyon süreci ve bu süreçte yeniden sağlanan kan akışı ile arteriyel kanla birlikte gelen fazla oksijen miktarı, iskemik olan testis dokusunda serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına neden olarak çok daha ciddi bir hasara yol açtığı bilinmektedir (4, 5).

Prokineticin komplementer DNA (cDNA)'ları 2001 yılında ilk defa Li ve arkadaşları tarafından kurbağa derisi salgı proteini (Bombina Variegata, Bv8) ve kara mamba yılanı zehrinin toksik olmayan bir bileşeni (Mamba Intestinal Toxin 1, MIT-1) olan sekans benzerlikleri ile keşfedilmişlerdir (6, 7). Prokineticin'ler iki G-protein reseptörüne bağlanarak biyolojik aktivasyon gösterirler. Bunlar; intestinal motilite ve kontraksiyonların sağlanması, sirkadiyen ritim kontrolü, nöronal sağ kalım, spermatogenez, anjiyogenez, immün yanıtlar, hematopoez, koku alma, beslenme davranışı, ağrı algısı (hiperaljezi) ve vasküler fonksiyonların düzenlenmesi şeklindedir (8, 9).

Prokineticin-2 (PROK2); diğer ismi olan Bv8 olarak da adlandırılır. Bv8 ağırlıklı olarak testislerde eksprese edilir ve testislerde anjiyogenezi stimüle ederek bu tepkiyi destekler (8, 10). Bunun yanında yapılan çalışmalarda; Prokineticin-2'nin aynı zamanda merkezi sinir sisteminde bulunan nöronlarda eksprese edildiği ve buna bağlı olarak nörolojik açıdan bu nöronların sağkalımını desteklemekte de önemli bir rol oynadığı ve Prokineticin-2 ve reseptör sinyalinin nöroenezin devam ettiği koku alma ampullası üzerinde de progenitörler için kemotaktik aktiviteyi düzenleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir (11, 12).

Bugüne kadar intraperitoneal olarak uygulanan Prokineticin-2'nin günümüzde sıklıkla karşılaşılan bir klinik durum olan testis torsiyon/detorsiyonu üzerine etkisi incelenmemiştir. Mevcut araştırmalar, Prokineticin-2'nin pleitropik etkilerini gösterse de Prokineticin-2 ve reseptörlerini olası etkilerini detaylı bir şekilde analiz edecek çok fazla çalışma yapılmalıdır.

Sunulan bu tez çalışması, testiküler torsiyon/detorsiyon yapılan puberte öncesi sıçanlarda PROK2'nin oksidatif stres, inflamatuvar yanıt, serum testosteron seviyesi ve testis dokusundaki histopatolojik değişikliklerin incelenmesini amacıyla yapıldı. Çalışmanın bulguları doğrultusunda PROK2'nin testis dokusundaki iskemik hasara karşı olası terapötik etkileri açıklanmaya çalışıldı.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİS'LERİN EMBRİYOLOJİK GELİŞİMİ

Fertilizasyon veya döllenme; dişi üreme hücresi olan oosit ile erkek üreme hücresi olan spermin birleşmesi sonucunda oluşan zigot oluşumu ile başlar (13). Üreme hücreleri kökenlerini; fertilizasyondan sonraki ikinci hafta içerisinde embriyonun gövdesini oluşturacak olan epiblast içerisinde gelişen ve sonrasında vitellus kesesine (yolk sak) doğru yol alan primordiyal germ hücrelerinden (PGH) almaktadır. Primordiyal germ hücreleri (PGH) yaklaşık olarak üçüncü haftada vitellus kesesinin allantoise yakın olan duvarında bulunan endoderm hücrelerinden gelişir ve dördüncü haftadan itibaren vitellus kesesinde gelişmekte olan gonadlara göç ederek primitif gonadal kabarıntıya gelir ve gelişimin yaklaşık olarak beşinci haftasında gonadlara yerleşir. Bu yerleşimlerinden sonra mitozla bölünerek sayıları artan primordiyal germ hücrelerinin bu davranışı, mitotik aktivitelerini de artırır (14). 6. haftadan itibaren genital kabarıntıya ulaşamayan germinal hücreler herhangi bir gelişme gösteremezken, mezenşimal bağ doku içerisine parmak gibi uzanan primordiyal germ hücreleri (PGH), seks kordonları ile birleşerek primitif cinsiyet kordonlarını meydana getirir. Seks kordonları hem dişi hem de erkek embriyosunda yüzey epiteline bağlı olduğundan, dişi ve erkek gonadlarının da morfolojik olarak birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün değildir. 7. haftaya kadar süren bu evreye *farklılaşmış evresi* denir ve *farklılaşmamış gonad* hücreleri bu evrede bulunur. (15).

Embriyo genetik olarak erkek ise –ki fonksiyonel bir Y kromozomunun varlığı erkek fenotip için gereklidir- primordiyal germ hücreleri (PGH) XY kromozom kompleksini taşır. Y kromozomu ve üzerindeki SRY (Sex determining Region on Chromosome) geninin ürünü olan TDF (Testis Different Factor-Testis Belirleyici Faktör) varlığında 7. haftada ara mezodermden testis gelişimi başlar. TDF'nin varlığı

aynı zamanda fetal gonadda var olan presertoli ve prefolliküler hücre adı verilen destek hücre serilerinin gelişimini de etkiler. Eğer TDF yoksa veya yeterli miktarda değilse; destek hücre serileri de ya çok az miktarda ya da oldukça geç bir dönemde gelişme gösterir, ancak TDF zamanında eksprese edildiğinde, presertoli hücreleri farklılaşarak önce testis kordonları oluşur ve gelişim erkek cinsiyet yönünde olur (16).

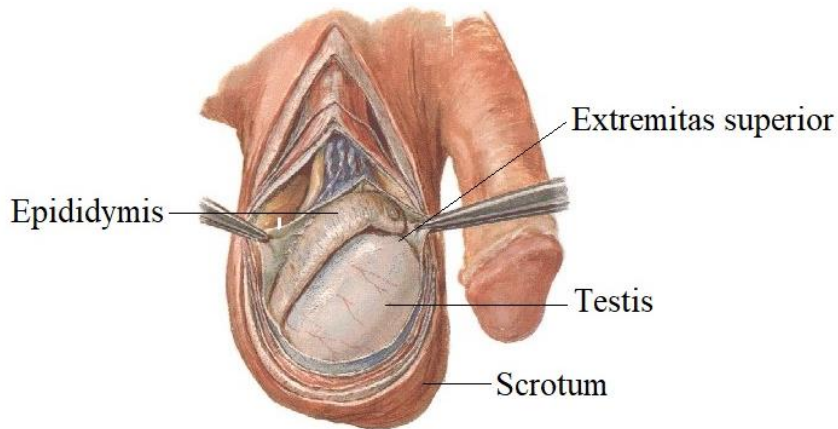
Embriyonun cinsiyetinin morfolojik açıdan belirlenememesinden dolayı postnatal ilk yedi hafta indifferent *dönem* olarak adlandırılmaktadır. Bu dönemden sonra erkek ve dişi embriyolarında bulunan iki çift genital kanaldan; mezonefrik (Wolffian) kanal gelişiminin devam ettiği ancak paramezonefrik (Müllerian) kanal gelişiminin daha geride kaldığı durumlarda cinsiyet farklılaşması erkek embriyo yönünde olurken, paramezonefrik (Müllerian) kanal gelişiminin devam ettiği ancak mezonefrik (Wolffian) kanal gelişiminin daha geride kaldığı olgularda ise cinsiyet farklılaşması dişi embriyo yönünde olmaktadır. Gelişimin erkek cinsiyet yönünde olmasının ilk basamağı Sertoli hücreleri ile başlar. Sertoli hücreleri bipotent gonadal taslaklarda bulunan germinal hücrelerin sperm ana hücrelerine (spermatogonium) dönüşümünü uyararak, MIF-AMH (Müllerian İnhibe Edici Faktör-Anti Müllerian Hormon) salgılanmasını uyarır ve bu da Müllerian kanalın gelişimini olumsuz yönde etkileyerek mezenşim hücrelerinin aktif bir şekilde testosteron hormonu salgılayan Leydig hücrelerine dönüşümünü uyarır. Böylece canlılarda bipotansiyel gonadlarda SRY kontrolü altında testisler gelişmiş olur ve gebeliğin yaklaşık olarak 8. haftasında testislere ait olan Leydig hücreleri testosteron hormonunu salgılamaya başlar. SRY geninin varlığı bipotansiyel gonadların testislere farklılaşmasından sorumlu olan ana faktör olduğu için, SRY kontrolü ortadan kalktığında bipotent gonadlar ovaryumlara dönüşecektir (17, 18).

2.2. TESTİS'LERİN ANATOMİK YAPISI

Testis'ler; erkek üreme hücresi (spermium) ve erkek cinsiyetine özgü hormonu (testosteron) üreten organlar olup septum scroti adı verilen bir bölme ile iki ayrı odacığa ayrılmış olan scrotum adlı torbanın içinde bulunan erkek iç genital organlarından biridir. Her odacığın içinde bir testis ile o testis'e ait olan vasküler

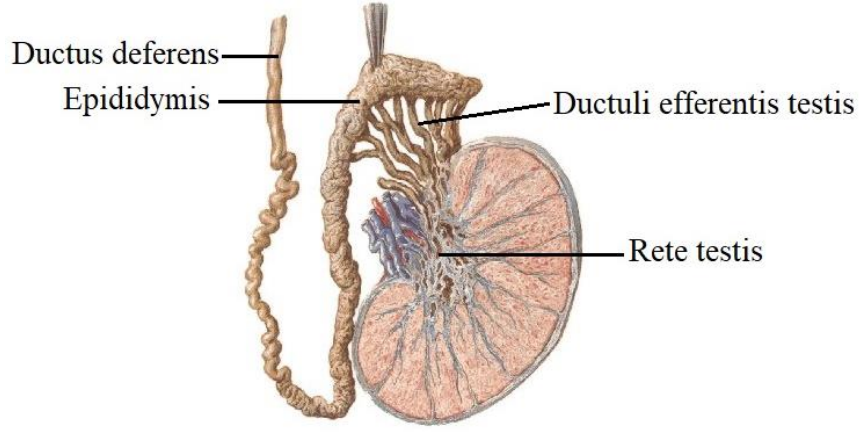
damarlar ve innervasyonundan sorumlu olan sinirler ile eşey hücrelerinin (spermium) iletiminden sorumlu olan kanal bulunmaktadır. Scrotum iç ısısı intraabdominal ısıya göre ortalama 2-2,5 derece daha düşüktür ve testis'lerin normal fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için bu sıcaklığın normal şartlar altında olması oldukça önemlidir. Scrotum duvarında bulunan tunica dartos isimli tabaka; içeriğinde barındırdığı elastik ve düz kas lifleri sayesinde kasılma ve gevşeme özelliğine sahip olup scrotum'a, ortam sıcaklığının değiştiği durumlarda şekil değiştirebilmesine imkan vererek; testis'lerin normal fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan sıcaklığın ayarlanmasında yardımcı olmaktadır (19, 20).

Funiculus spermaticus adı verilen, içeriğinde birtakım vasküler ve kanal yapılarını barındıran bir kordona asılı halde bulunan testis'ler, yanlardan basık oval şekilli bir çift üreme organıdır (21). Testis'lerin facies medialis adı verilen bir iç yüzeyi ile facies lateralis adı verilen bir dış yüzeyi bulunmaktadır. Facies medialis adı verilen iç yüzeyi septum scroti'ye bakmaktadır (22, 23). Extremitas superior adı verilen üst uçları anterolaterale doğru, extremitas inferior adı verilen alt uçları ise anteromediale doğru oblik bir pozisyonda olacak şekilde uzanmaktadır. Margo anterior adı verilen konveks ön kenarın ön ve arka yüzleri ile uçları düzdür ve visseral peritonla (epiorchium) kaplı olup ve biraz dışa-aşağı doğru bakar. Margo posterior adı verilen arka kenarı ise daha düz olup yukarı-içe doğru bakar ve sadece lateral yüzeyi peritonla kaplıdır. Peritonsuz olan medial yüzeyine ise epididymis tutunur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Testis'lerin scrotum içerisindeki konumu (24).

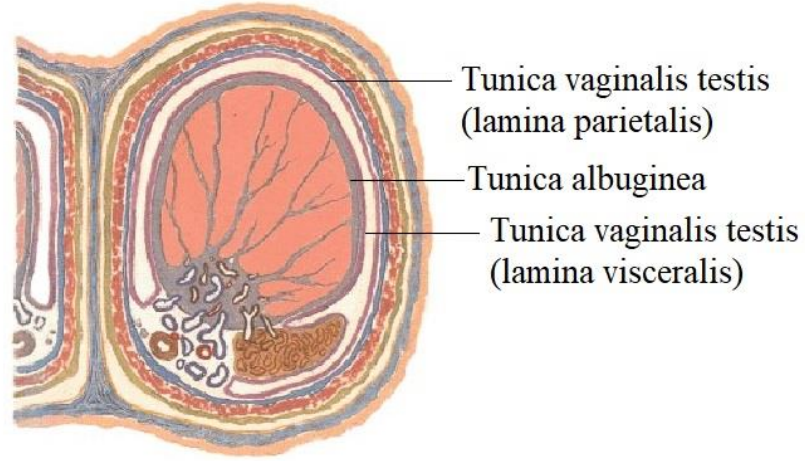
Epididymis; ductus epididymis'lerin birleşiminden meydana gelen ve testis'leri ductus deferens'e bağlayan bir kanal sistemidir. Spermium'ların ilk toplandıkları yer epididymis olduğundan; aslında epididymis'ler spermium'ların dışarıya iletilmesini sağlayan kanalın başlangıç kısmıdır (25). Margo posterior'dan ayrılan ductuli efferentis testis adı verilen kanallar ile testis'lere ait vasküler ve innervasyonundan sorumlu olan yapılar da epididymis'lere açılmaktadır (Şekil 2.2) (20, 21, 26).



Şekil 2.2. Epididymis'in konumu ve testis ile bağlantısı (24).

Gelişimin yaklaşık olarak 12. haftasından itibaren, testis'lerin scrotum içine inme süreci başlar. Testis'lerin intraabdominal kısma geçiş evresi embriyolojik sürecin 10-15. haftalarına denk gelir ve bu kısımda testis'ler canalis abdominalis içerisinde böbreklerin alt uçları hizasında canalis inguinalis'e doğru hareket ederler ve gelişimin 28. haftasında canalis inguinalis'e inmiş olurlar. Bu dönemden sonra testis'lerin inguinoscrotal evreye göç etme dönemi başlar ve canalis inguinalis'ten geçerek gelişimin 32. haftasında scrotum'a inmiş olurlar. Böylelikle testis'lerin tam olarak scrotum içerisine inme süreci 35. haftada tamamlanmış olur (27).

Testis'ler dıştan içe doğru; lamina visceralis (epiorchium-tunica vaginalis testis), tunica albuginea, tunica vasculosa adı verilen üç tabaka ile sarılmış bir halde scrotum içinde bulunurlar (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Testis'leri saran katmanlar (24)

Tunica vaginalis testis: Embriyolojik gelişim sürecinde cavitas abdominalis'i döşeyen parietal ve visseral periton tabakaları scrotum'a bir çıkıntı gönderirler. Proksimal kısmı tıkanma sonucu kapanır, distal kısmı ise tunica vaginalis testis tabakasını oluşturur. Bu tabakanın testisleri örten bölümüne lamina visceralis (epiorchium) denir. Diğer parça lamina parietalis adını alır internal spermatik fasyaya yapışır. Bu iki yaprak arasında oluşan boşluk cavum serosum scroti'yi oluşturur ve içeriğinde bir miktar kaygan, seröz bir sıvı bulunur (28).

Tunica albuginea: Testis'leri saran oldukça kalın, sıkı ve sağlam yapılı, genişleme ve esneme özelliğine sahip olmayan kompakt bir bağ dokudur. Fibroblast ve kollajenden zengin, oldukça yoğun bir doku olan bu tabakanın üzerinde tunica vaginalis testis bulunmaktadır. Tunica albuginea tabakası tunica vaginalis testis'in arka kenarından testis içine doğru vertikal ve kalın bir bölme şeklinde uzantı gönderir. Bu uzantıya corpus highmori (mediastinum testis) adı verilir. Bu uzantının ön ve yan kısımlarından çıkan fibröz bölmeler septula testis adını alır ve testis'leri piramit şeklinde olan bölmelere ayırarak testislerin içinde lobuli testis adı verilen odacıkları oluşturur.

Bu lobuli testis'lerin her bir tanesi sayıları bir-dört arasında değişen, sıkı bir şekilde katlanmış, kalın ve karmaşık yapılı çok katlı epitel ile döşenmiş, tubuli seminiferi (sperm taşıyan) contorti (seminifer tübüller) adı verilen ve testis'lerden alınan kesitlerde longitudinal, enine ve oblik bir şekilde bulunan, "sperm fabrikaları"

olarak da isimlendirilen uzun ve kıvrımlı bir kanal sistemine sahiptir. Bu kanal sistemindeki tubuli seminiferi contorti'ler yapısal açıdan incelendiğinde fibröz bir bağ dokusuna, hem konnektif hem de elastik yapıda olan belirgin bir bazal membrana ve karmaşık bir epitele sahip olduğu görülmektedir (29). Bazal membranın üzerine sperm üretiminden sorumlu olan spermatojenik hücreler ile bölünme yeteneği olmayan ve sperm hücrelerinin beslenmesinden sorumlu olan sertoli hücreleri oturmaktadır. Seminifer tübüllerin etrafını saran bağ dokusu yumuşak olup, aralarındaki stroma konnektif dokudan oluşmaktadır. Bu dokunun içinde de interstisyel endokrin hücreleri olan leydig hücreleri bulunmaktadır. Her bir tubuli seminiferi contorti'nin etrafı da üç-dört tabakadan oluşan, düz kas benzeri myoid hücreler ile sarılıdır ve bu hücrelerin kontraksiyonları sayesinde sperm ve testiküler sıvı tübüllerin lümenine doğru ilerleyerek testis dışına gönderilir (30-32).

Tubuli seminiferi contorti'ler kıvrımlı bir yapıya sahip olup, birbirlerine doğru yaklaşarak tubuli seminiferi recti adı verilen düz tübüller şeklinde segmentler halinde devam ederler ve mediastinumda birleşerek rete testis (Haller ağı)'i oluştururlar. Böylece sperm hücreleri de rete testis'e iletilir. Rete testis'e iletilen sperm hücreleri buradan testis'leri terk ederek ductus efferentes testis'e geçer ve epididymis'e ulaşır. Henüz olgunlaşmamış, immatür düzeyde olan sperm hücresi öncelikle epididymis'in caput kısmına geçer ve ardından da ejakülasyona kadar epididymis'in cauda kısmında depolanır (29, 33).

Tunica vasculosa: Tunica albuginea'nın iç tarafında bulunan ve içeriğinde kan damarlarını bulduran gevşek bir bağ dokusu olup, testis'lerin içinde bulunan septasyonları ve tüm yüzeyleri kaplar (28).

2.3. TESTİS'LERİN VASKÜLER YAPISI

Testis ve epididymis'leri besleyen arterler aorta abdominalis'ten çıktıktan sonra retroperitoneal bölgede, internal inguinal halkaya ulaşabilmek için seyrederek. İnternal inguinal halka seviyesinde ise bu arterler; n. genitofemoralis'in lateral dalı, n. ilioinguinalis, a. cremasterica, vas deferens ve onun arteri ile birleşirler. Testis ve

epididymis'leri besleyen bu arterler başlıca üç kaynaktan köken alırlar (34). Bunlar: a. testicularis, a. cremasterica ve deferensiyel (vazal) arter şeklinde sıralanabilir.

A. testicularis (internal spermatik arter), a. renalis'lerin hemen altında bulunan pars abdominalis aorta'dan çıkar ve canalis inguinalis'in içinden geçerek funiculus spermaticus'a katılır ve buradan testis'lere ulaşır. Sağ a. testicularis vena cava inferior'un önünden, geçerken sol a. testicularis ise colon descendes'in distal bölümünün arkasından geçer. Sağ ve sol testiküler arterler inguinal kanal içerisinden geçerek scrotum'a gelir. Bir kısım dalları epididymis'in beslenmesini sağlarken dallarının büyük kısmı ise testis'leri besleyerek testis'lerin kan akımının 2/3'lük kısmını karşılar. Testis dokusuna (100 mg) dakikada 9 mg kan getirebilme özelliğine sahip olan a. testicularis'ler, testis'lerin ana arteridir (35, 36).

A. cremasterica (eksternal spermatik arter); inguinal halka içinde, a. hypogastrica inferior'dan çıkar. Esas olarak testis'lerin tunica vaginalis tabakasını besleyen bu arter, testis'lerin kan akımının %15-20'lik kısmını karşılar (37, 38).

Deferensiyel arter (vazal arter); a. a. vesicalis superior ya da a. vesicalis inferior'dan çıkar. Vas deferens ve epididymis'e verdiği dallar ile testis'lerin kan akımının 1/6'lık kısmını karşılar (39).

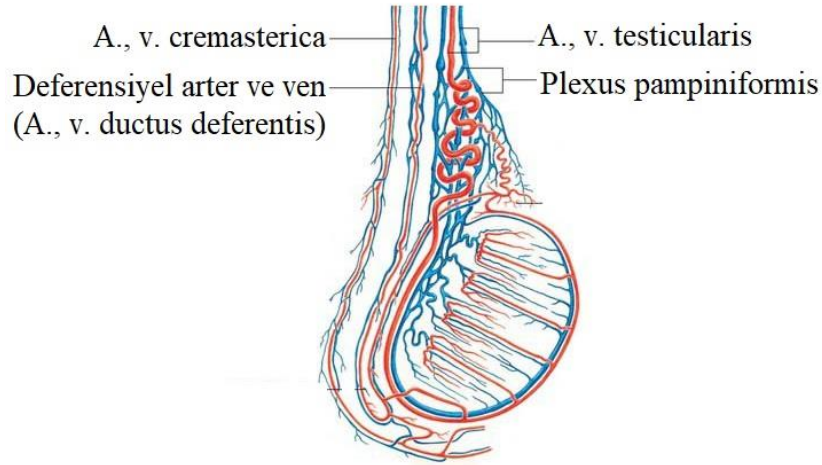
Her artere eşlik eden bir de ven bulunmaktadır. Bunlar;

V. testicularis (internal spermatik ven): A. testicularis'e eşlik eder ve sağda tarafta v. cava inferior'dan, sol tarafta ise v. renalis sinistra'ya dökülür.

V. cremasterica (eksternal spermatik ven): Funiculus spermaticus'un posteriorunda yer alan ve a. cremasterica'ya eşlik eden bu ven; v. epigastricus inferior'un derinine v. iliaca externus'a açılır.

Deferensiyel ven (vazal ven): Vas deferens'e eşlik eden bu ven v. vesicalis superior ve inferior'lar aracılığıyla v. iliaca internus'a açılır.

Vv. testicularis adı verilen küçük venler ise a. testicularis'lerin çevresinde bulunan, testis'lerin arka kenarından çıkan ve testis'lerin yüzeyel venlerine ve haller ağında bulunan hiler venlere açılan sayıları da yaklaşık olarak 12 adet olan venlerdir. Bu venler funiculus spermaticus'ta bulunan yapıları sararak plexus pampiniformis adı verilen anatomik bir ağ oluşturur. Bu ağ yapısı; bir yandan sahip olduğu ters akım özelliği ile ısı değişikliğine neden olarak a. testicularis içerisindeki kanı soğutarak, ductus deferens'lerin içerisindeki spermium'lar için vücut ısısına yakın bir ortam oluşturarak sperm hücrelerinin canlılığının korunmasına yardımcı olurken bir yandan da küçük tanecikli moleküllerin karşılıklı olarak yer değişimlerine imkân verir. Venler yukarıya doğru birleşerek çıkar ve sayıları üç veya dört arasında değişen v. testicularis; canalis inguinalis' girmeden önce, sayıları iki olan v. testicularis de cavitas abdominalis'e girmeden önce birleşir. Biraz daha yukarıda ise birleşen bu venler kendi aralarında birleşerek tek bir dal şeklinde seyir göstermektedir. V. testicularis sağ tarafta dar bir açı ile v. cava inferior'a drene olurken, sol tarafta dik bir açı ile v. renalis sinistra'ya drene olarak sonlanır (28, 40) (Şekil 2.4).



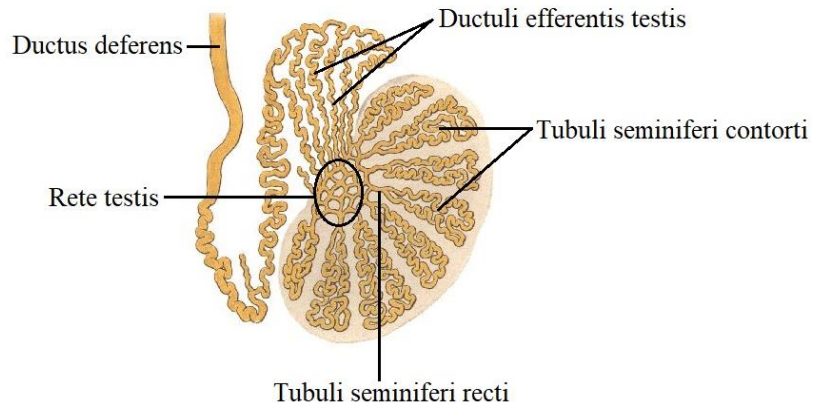
Şekil 2.4. Testis'lerin vasküler yapısı (41).

2.4. TESTİS'LERİN HİSTOLOJİK YAPISI

Testis'ler; hücre içine testosteron hormonu salgılayarak endokrin bez fonksiyonu görürken, ekzokrin bez fonksiyonlarını da hücre dışına spermatozoa salgılayarak göstermektedir. Dolayısıyla testis'ler sahip oldukları interstisyel hücreler (Leydig hücreleri) sayesinde testiküler androjenlerin üretiminde, endokrin fonksiyonları

sayesinde testosteron hormonu salgılayarak sperm üretiminde ve sekonder seks karakterlerinin oluşmasında ve sonraki gelişimsel dönemde bu karakterlerin korunmasında görev alan bir çift organdır. Scrotum içerisinde bulunan testis'ler üç tabakadan oluşan bir kapsül ile sarılı olup; bu kapsülden testis dokusu içerisine uzanan ve lobuli testis adı verilen ince bağ dokusu uzantıları içermektedir. Bu uzantıların sayısı 200-300 arasında değişmekte olup her bir lobül kendi içerisinde vasküler yapıları, sinirleri ve içeriğinde interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) barındıran, gevşek bağ dokusu ile sarılı ve sayıları bir ile dört arasında değişen seminifer tübülleri bulundurmaktadır (42, 43).

Seminifer tübüller "U" harfi şeklinde, bir testis parankimindeki sayısı 250-1000 arasında değişmekte olan, erkek üreme hücresi olarak bilinen spermatozoan'ların üretildiği ve seyirleri kıvrımlı olan tübüllerdir. Seyirleri kıvrımlı olan bu tübüllerin lümenleri lobül tepelerine doğru gittikçe daralır ve kısa segmentler halinde, seyirleri daha düz olan tubuli recti'leri oluşturur ve sonrasında her iki tübül mediastinum testis'te birleşerek rete testis olarak da bilinen Haller ağı'nı oluşturur. Oluşan rete testis'ler de birleşerek ductuli efferentes testis'leri oluşturup epididymis'lerin caput kısmına açılırlar (44, 45) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Testis'lerin iç yapısı.

Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusuna sahip olan, etraflarının bazal membran ve gevşek bir bağ dokusu ile sarılı olduğu ve içeriğinde sertoli hücreleri ile germ hücrelerini bulunduran yapılardır. Bu bazal membranın iç kısmında ve seminifer tübüllerin duvarında germinal epitel olarak da bilinen modifiye çok katlı kübik epitel

bulunurken; etraflarını saran gevşek bağ dokusu ise içeriğinde kan damarları ile testiküler androjenlerin üretiminden sorumlu olan, kümeler halinde sıralanmış leydig hücrelerini barındırmaktadır. Bazal membranın hemen üzerindeki ilk sırada bulunan hücreler ise geniş tabanlı sertoli (endordermal) hücreleri ile bu hücrelerin arasında çok sayıdaki spermatogenetik (mezodermal) hücrelerdir (46).

2.4.1. Sertoli Hücreleri

Testis'lerin fonksiyonları açısından oldukça önemli bir işleve sahip olan, destek hücreleri olarak da bilinen, bazal membran üzerinde oldukça geniş bir yüzeye sahip olan piramidal hücrelerdir. Tabanları bazal laminaya tutunan ve püskül şeklinde sonlanan apikal uçları ile seminifer tübüllerin lümenlerine doğru uzanan sertoli hücreleri; puberte döneminden sonra reproduktif evre boyunca bölünme özelliklerini kaybeden ancak olası bir hasar sonucunda kendilerini yenileyebilen bir yapıya sahip olan, oldukça dayanıklı ve sağlam hücrelerdir. Elektron mikroskobu altında yapılan incelemelerde sahip olduğu organeller arasında; çok sayıda düz endoplazmik retikulum ile az sayıda granüllü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi cisimciği ve çok sayıda mitokondri ile lizozom olduğu gösterilmiştir. Bu organeller aralarında sıkı bağlantı olarak da bilinen zonula okludens tipi bir bağlantı kompleksi oluşturarak seminifer tübüllerin etrafını aralık bırakmayacak şekilde çepeçevre sarar ve kandan gelen maddelerin lümeden geçerek içeri girmesine engel olan kan-testis bariyerini meydana getirir (47, 48).

Sertoli hücrelerinin sahip olduğu görevler aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Gelişmekte olan eşey hücrelerinin (spermatozoon'lar) korunması, desteklenmesi ve beslenme davranışlarının desteklenip, düzenlenmesi bu hücreler tarafından gerçekleştirilir.
- Spermatid hücrelerinin olgunlaştığı ve hareketli spermatozoa'lara dönüştüğü, spermatogenez'in son evresi olan spermiyogenez aşamasında dejenere olan spermatid hücrelerinin sitoplazmaları sertoli hücrelerinin içeriğindeki lizozomlar tarafından fagosite edilir.

- Organelleri arasında oluşan sıkı bağlantı kompleksinin meydana getirdiği kan-testis bariyeri sayesinde kan ile birlikte gelen maddelerin lümen içine girmesine engel olarak bir yandan spermatozoon'leri kandaki zararlı maddelere karşı koruma görevini üstlenirken bir yandan da spermatozoon'leri otoimmün cevaplara karşı koruma görevini üstlenir.
- Sertoli hücreleri, devamlı olarak spermiyum (spermatozoon) geçişine destek olan potasyumdan zengin bir sıvı salgırlar. Gerçekleştirdikleri bu sekresyon işlemi ile salgılamış oldukları bu sıvı sayesinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun seminifer tübül içinde yoğunlaşmasını sağlar.
- Anti-Müllerian Hormon (AMH) üretimini gerçekleştirerek embriyolojik gelişim esnasında Müller kanallarının erkek fetusta gerilemesini sağlamaktadır.
- Sertoli hücreleri hipofiz bezinin ön lobundan salgılanan Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) tarafından uyarılarak spermatogenez'i başlatmada ve bu hormonun etkisi ile testosterona karşı yüksek duyarlılığı olan Androjen Bağlayıcı Protein (ABP) sentezinde önemli bir rol oynarlar.
- Spermatogenez'in düzenlenmesinde oldukça önemli bir rol oynayan transferrin, büyüme hormonu ve seruloplazmin gibi pek çok maddenin sentezini gerçekleştirirler.
- Salgılamış oldukları inhibin ve aktivin hormonları sayesinde hipofiz bezinin ön lobundan gonadotrop hormonların salgılanmasını önleyerek FSH üzerine olumlu ve olumsuz geribildirimlerde bulunurlar (49-51).

2.4.2. Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenezis

Spermatogenik hücreler; erkek eşey hücresini meydana getirecek en temel hücre olan spermatogony (spermatogonyum), primer spermatozoon'ler, sekonder spermatozoon'ler ve spermatid'lerden oluşur. Spermatid'ler ise spermiyogenezis ile değişime uğrayarak spermatozoon'leri oluşturur. Spermatogenik hücrelerin farklılaşarak spermatozoon'a dönüşmesi işlemine spermatogenezis adı verilir. Spermatogony'dan başlayarak spermatozoon (spermiyum) oluşuncaya kadar geçen süreçte meydana gelen olaylar dizisi aşağıdaki şekildedir:

- Çoğalma evresi
- Büyümesi evresi
- Maturasyon (Olgunlaşma) evresi
- Başkalaşma evresi

Spermatogonyum'ların mitoz bölünme ile çoğalarak sayılarının arttığı ve aynı zamanda 'goniyogenezis' olarak da adlandırılan evre 'çoğalma' evresidir. Bazal membranda yer alan spermatogonyum A hücreleri; kök hücreleri oluştururken, spermatogonyum B hücreleri bazal membrandan ayrılarak lümen yüzeyine doğru yönelip daha da büyürler. Bu evre de 'büyüme' evresi olarak adlandırılır ve bu evrede bulunan spermatogonyum B hücreleri mitoz bölünme ile bölünerek 'primer spermatozoid' hücrelerini meydana getirir. Bu hücreler spermatogenetik hücrelerin en iri hücreleridir. Artık primer spermatozoid'lerin oluşmasından itibaren 'maturasyon (olgunlaşma)' evresi başlar. Primer spermatozoid hücreleri mayoz bölünme geçirerek 'sekonder spermatozoid' hücrelerini oluşturur. Sekonder spermatozoid hücreleri de ikinci bir mayoz bölünme geçirerek 'haploid spermatid' hücrelerini meydana getirir. Bölünmenin tamamlanmasından sonra spermiyogenezis dönemi başlar, bu dönem haploid spermatid hücrelerinin farklılaşarak spermatozoon'lara (spermiyum) dönüştüğü 'başkalaşma' evresidir. Spermatozoon (spermiyum) hücresi artık gelişimini tamamlamış, ancak olgunluğunu epididym içinde kazanacak olan erkek eşey hücresidir (52-54).

2.4.3. Leydig Hücreleri

Testis'lerin endokrin bez fonksiyonu görmesini sağlayan bu hücreler seminifer tübüllerin arasındaki, gevşek bağ dokusu ile kaplı olan intertübüler alanda bulunan interstisyel hücrelerdir. Bu hücreler seks karakterlerinin oluşması ve bu seksüel olgunlaşmanın tamamlanması sonucunda anabolik (doku geliştirici) ve androjenik etkileri olan steroid yapıdaki testosteron hormonunu salgırlar. Bu androjenik etki de sekonder erkek karakter özelliklerinin (sakal, bıyık, koltuk altı ve pubik kıllar, sesin kalınlaşması gibi) gelişmesine yardımcı olur. Spermatogenez'in kontrolünde ve erkek genital bezlerinin gelişiminde ve devamlılığında da oldukça önemli bir rolü

olan testosteron hormonu salgısı hipofiz bezinin ön lobundan salgılanan Luteinizan Hormon (LH) tarafından kontrol edilir (55, 56).

2.5. TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYONUN EPİDEMİYOLOJİSİ VE ETİYOLOJİSİ

Testiküler torsiyon veya akut funiculus spermaticus (spermatik kord) torsiyonu; funiculus spermaticus ve beraberindeki kan damarları ve diğer yapılarının, dolaşımı olumsuz etkileyecek bir şekilde, kendi eksenini etrafındaki rotasyonel hareketi ile meydana gelen ve acil müdahale gerektiren, ancak hemen müdahale edilmediği takdirde de subfertilite ve testis dokusunda hasara ve nekroza neden olan ürolojik, akut seyirli, acil bir durumdur. Yapılan çalışmalarda cerrahi girişimlerin başarılı olduğu çizelelerde bile hastaların %40-60'ında infertilite ve testiküler atrofinin geliştiği gösterilmiştir (57). Testiküler torsiyon ilk defa 1776 yılında Hunter tarafından; torsiyon sonrasında gelişen, atrofiye uğramış testis dokulu bir olgu ile tanımlanmış ve devamında bunu 1840 yılında 9 yıl boyunca takipte olduğu bir olguyu yayınlayan Fransız asıllı bir psikiyatrist olan Delasiaue izlemiştir. Kriptorşitizm (inmemiş testis) vakalarında görülen torsiyon sıklığına Nicoladoni adlı bir bilim insanı dikkat çekmiş ve bunun devamında ise 1897 yılında Taylor isimli bir araştırmacı neonatal dönemde de görülebilen testis torsiyonunu rapor etmiştir (58-60).

Testiküler torsiyon tüm yaş gruplarında ve tüm gelişimsel dönemlerde görülebilmekle birlikte en sık puberte evresinde ve neonatal dönemde pik yapmaktadır. Olguların %65'lik büyük bir çoğunluğuna bakıldığında ise testiküler torsiyonun puberte döneminde görüldüğü ve yaş ortalamasının da 13 olduğu, ancak daha sonrasında görülme sıklığının yavaş yavaş azaldığı ve sol taraftaki testis parankiminin daha uzun bir funiculus spermaticus'a sahip olması sebebiyle sağ taraftaki testis parankimine göre daha sık torsiyona uğrayabileceği bildirilmiştir (61-63). Yapılan çalışmalarda 25 yaş altındaki olgularda testis ve tüm eklerinde torsiyon görülme sıklığı 1/160 olarak gösterilirken, bu oran sadece testis parankimi için 1/4000 olarak gösterilmektedir (64-66).

Testiküler torsiyonun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, torsiyona neden olabilecek çeşitli zemin hazırlayıcı faktörlerden bahsedilmektedir. Bu faktörleri; puberte döneminde görülen testis dokusu volümünde artış, kriptorşitizm (inmemiş testis), travma ve egzersizin normalden fazla olması, testosteron seviyesinin olması gereken seviyenin üzerinde olması ve çevredeki ısının 2 derecenin altına düştüğü ortamlar şeklinde sıralamak mümkündür (67). Klinik çizelgeye eşlik eden klinik bulgular ise; bir taraf testis dokusunda başlayan ani başlangıçlı, oldukça şiddetli hemiskrotal ağrı ve bu ağrıyla birlikte görülebilen bulantı, kusma, iştahsızlık ve alt abdomen ağrısıdır. Testis dokusunun yukarı kaldırılması ile birlikte vasküler tıkanıklığın ve ağrının artması ‘Prehn bulgusu’ na işaret eder (68, 69).

2.6. TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYONUN PATOFİZYOLOJİSİ

Testiküler hasar; testis’lerin extremitas inferior adı verilen alt uçlarının tunica vaginalis testis’e olan fiksasyonlarının zayıf olması veya extremitas inferior’larının yeterince geniş olmamasına bağlı olarak testis’lerin funiculus spermaticus üzerinde kolaylıkla rotasyonel hareketler yapabilmesi ve bu rotasyonel hareketlerin meydana getirdiği testiküler torsiyon-detorsiyon nedeniyle arteriyel ve venöz kan akımının bozulması ve buna bağlı olarak doku ve organ oksijenizasyonundaki azalma ile sonuçlanan iskemi ve reperfüzyon süreci sonucunda oluşur (70). Testiküler dolaşımın bozulması ile perfüzyon yetersizliğinin oluşması; doku ve organların metabolik olarak ihtiyaç duyduğu oksijen miktarının azalmasına, hücrelerin mitokondriyal depolarının tükenmesine, metabolik atıkların atılamaması ve buna bağlı olarak toksinlerin birikmesine, oluşan bu toksik atıkların birikimi de germinal epitel hücrelerin (germ hücreleri) ölümüne neden olur (70). Oluşan testiküler hasar; zamanında tanı konulmadığı ve müdahale yapılmadığı sürece, testis dokusunun nekrozuna yol açabileceği gibi, testis’leri fonksiyonel olarak olumsuz yönde etkileyerek işlevselliğini yitirmelerine, orşiektomi ve infertilite ile sonuçlanmasına neden olabilir. Dolayısıyla ortaya çıkabilecek testiküler hasar bakımından; meydana gelen testiküler torsiyonun süresi ve derecesi büyük bir önem taşımaktadır (71). Torsiyon derecesinin 360°’den fazla olduğu ve torsiyon süresinin de 24 saatin üzerinde olduğu olgularda; testislerde küçülmeler, sperm motilitesinde azalmalar, iskemi ve sonrasında sağlanan reperfüzyon sürecine bağlı olarak semen kalitesinin

düşüklüğü ve testis dokusunda meydana gelen nekroza bağlı olarak testis kaybı görülebilmektedir (72).

Testiküler iskemi üzerine yapılan deneysel çalışmalarda iskemiye en fazla duyarlı olan hücreler arasında leydig hücrelerinin yanı sıra germinal epitel hücreler (germ hücreleri) olduğu gösterilmiştir (73, 74). Yapılan bu çalışmalarda; bazal lamina ve tübül lümenin arasını dolduran spermatogenik seri hücreler ile özellikle germ hücrelerine desteklik sağlayıp, besin ve koruma rollerini de üstlenen sertoli hücrelerinin; 6 saat sonunda, seminifer tübülleri saran bağ dokusunda bulunan ve aynı zamanda testosteron hormonu salgılayan leydig hücrelerinin ise 10 saat sonunda yok olduğu gözlemlenmiştir (75).

Funiculus spermaticus'un rotasyonuna bağlı olarak farklı torsiyon şekilleri bulunmaktadır. Bunlar intravajinal (testis zarı içi), ektravajinal (testis zarı dışı) torsiyon ve testis ve eklerinin torsiyonu (mesorşial) olarak ayrılmaktadır (1).

İntravajinal torsiyon (testis zarı içi) testis'lerin ve eğer testis ile funiculus spermaticus'un arasındaki bağlantı kuvvetli ise funiculus spermaticus'un; testis'i saran tunica vaginalis içerisinde farklı derecelerdeki rotasyonu sonucunda oluşan ve funiculus spermaticus'un yapıştığı bölgenin distalinde meydana gelen torsiyon şeklidir. İntravajinal torsiyon çoğunlukla testislerin sol tarafında ortaya çıkmaktadır. İntravajinal torsiyon peripubertal dönemde sıklıkla görülmekle birlikte; 30 yaş altındaki kişilerde; özellikle de 10-14 yaş arası grupta sıklıkla görülmektedir. Testiküler torsiyonun ergenlik dönemi ve ileri yaş gruplarındaki sıklıkla görülen tipidir (1, 76-78).

Ektravajinal torsiyon (testis zarı dışı); funiculus spermaticus'un tunica vaginalis adı verilen testis'leri saran kesenin dışındaki rotasyonuna bağlı olarak gelişen ve tunica vaginalis ile birlikte tüm testis ve epididymis dokusunu da içeren torsiyon çeşididir. Yani processus vaginalis de dahil olmak üzere tüm funiculus spermaticus ve yapılarının kendi etrafındaki rotasyonel hareketi sonucunda meydana gelir. Sıklıkla antenatal ve erken postnatal dönemde gözlemlenen bir torsiyon çeşidi olduğu için; bebek torsiyonu (neonatal torsiyon) olarak da adlandırılabilen bu torsiyon çeşidi

%85-90 oranla sıklıkla neonatal dönemde; testis'lerin cavitas abdominalis'ten scrotum'lara inişi esnasında ortaya çıkmaktadır (1-3) . Bunun sebebi aslında testis'lerin inferior kısımlarının testis'leri saran keseğe yapışmamış olmasından kaynaklanır. Bu yapışma olmadığı için de testis'ler; testis'leri saran kesenin içinde sabit değildir. Bununla birlikte ekstrasvajinal torsiyonla sadece neonatal dönemde değil perinatal dönemde de karşılaşılabilmektedir ve bu dönemde görülen torsiyona da perinatal torsiyon adı verilmektedir (1, 2, 77, 79, 80).

Hormonal uyarılmaya ve kitlelerin büyümesine bağlı olarak adolesan dönemde (16 yaş ve üzerinde) ortaya çıkan, appendix testis ve appendix epididymis'in yani testis ve eklerinin rotasyonu sonucunda oluşan torsiyona mesorşial torsiyon adı verilir. Çocukluk dönemindeki akut scrotum'un sık görülen sebeplerinden biri olan bu torsiyona creamestar kasının spazmının yol açtığı düşünölmekle birlikte, ödemli ve inflamasyonlu appendix testis parankimi scrotum içerisinde mavi renkte görünebilir ki, tanı koydurucu olan bu bulguya "mavi nokta (blue dot)" bulgusu denir (81-84).

2.7. İSKEMİ VE REPERFÜZYON HASARI

2.7.1. İskemik Hasar

Testiköler torsiyonun gelişmesi esnasında meydana gelen testiköler hasarı iki ayrı dönemde inceleyebiliriz:

- Arteriyel kan akımının bozulması sonucunda (torsiyon sonrasında) dokulara yeterince oksijen sağlanamamasına bağlı olarak meydana gelen iskemik hasar dönemi
- Yeniden kan akımının sağlanmasıyla birlikte (detorsiyon sonrasında) açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin (SOR) neden olduğu reperfüzyon hasarı dönemi

Hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri için gerekli olan en temel bileşen oksijendir. Ancak torsiyon sonrasında arteriyel ve venöz kan akımının bozulmasına bağlı olarak dokulara yeterli perfüzyonun sağlanamaması; doku veya

organların oksijenizasyonunda bozulmaya neden olduğu gibi, etkilenen doku ve organlarda ödem, hemoraji, arteryel obstrüksiyon (tıkanıklık) meydana gelir ve tüm bu belirtilerin gelişmesi sonucunda doku ve organların oksijen ve diğer metabolik gereksinimlerinin dolaşım sistemi tarafından yeterince sağlanamaması ve aynı zamanda oluşan atık metabolitlerin de vücuttan uzaklaştırılamaması sonucunda iskemi meydana gelir (85, 86).

İskemik hasar döneminde; etkilenen hücrelerde çeşitli yapısal ve metabolik açıdan değişiklikler görülür. Doku ve organlara gelen kan akımının bozulması, oksijenizasyonda da azalmaya neden olacağı için bu durum hücrelerde hasara ve hatta hücrelerin ölümüne neden olan hipoksiyi meydana getirir. Meydana gelen bu hipoksi durumu sonucunda özellikle aerobik solunum yapan canlılarda, hücre içindeki oksijen miktarının azalması sebebiyle solunum fonksiyonları da zayıflayacağından bu hücrelerin mitokondrilerindeki oksidatif fosforilasyon da olumsuz yönde etkilenecektir. Oksidatif fosforilasyonun azalması; ATP (adenozin trifosfat) ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat depolarında sentez yetersizliğine ve $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaz}$ aktivitesinde azalmaya neden olur. Bu enerji yetersizliğine bağlı olarak hücre içinde asidoz, ADP ve inorganik fosfat gibi ATP yıkım ürünlerinin birikmesine ve iyon dengesizliğine neden olur. Özellikle $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaz}$ aktivitesindeki azalmaya ve hücre içerisindeki enerji depolarının boşalmasına bağlı olarak $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaz}$ pompası inhibe olur ve bunun sonucunda hücre içindeki sodyum ve kalsiyum iyonlarının derişimi artarken; potasyum iyonlarının derişiminin azalmasına bağlı olarak hücre içindeki potasyum dışarı atılır. Ayrıca iskemi sırasında ATP; hipoksantin adı verilen düşük enerjili bir yıkım ürününe indirgenir. Hipoksantin de normal şartlar altında ksantin dehidrogenez varlığında kantine oksitlenir. Fakat meydana gelen iskemi sonucunda ksantin dehidrogenezin ksantin oksidaza dönüşmesinden dolayı hipoksantin dokularda gereğinden fazla miktarda olacak şekilde birikir. Tüm bu metabolik değişimlerle birlikte, potasyumun dışarı atılması ve suyun hücre içine girmesi, bir yandan da meydana gelen metabolik olaylar sonucunda katabolitlerin birikmesi hücrenin şişmesine neden olur. Buraya kadar meydana gelen hücresel değişiklikler geri dönülebilir düzeyde olan değişikliklerdir, ancak iskemi süresinin devam etmesi; mitokondriyal ve lizozomal düzeyde görülen ve geri dönüşümü olmayan hücresel zedelenmelere neden olmakla

birlikte, dokularda geri dönüşümsüz hücrel hasarın ortaya çıkmasına kadar gereken iskemi süresi olan tolerans zamanının aşması dokuların nekrozuna ve hücrelerin ölümüne neden olur (87-90).

2.7.2. Reperfüzyon Hasarı

İskemiye uğramış olan dokuya hem hücrelerin yenilenmesi hem de hücre içinde birikmiş olan toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımının olması gerekir. İşte bu kan akımının yeniden sağlanması ile birlikte doku oksijenizasyonunun tekrar başlaması hücrelerin geri dönüşümsüz hasarına engel olur ve dolayısıyla iskemiyile birlikte kaybedilmiş olan fonksiyonlar tekrar kazanılır. Fakat detorsiyon sonrasında yeniden kan akımının sağlanması ile oluşan bu reperfüzyon dönemi sırasında dokulara yeniden oksijenin girmesi ile birlikte oksijen ve ksantin oksidaz, hipoksantin ile tepkimeye girerek serbest oksijen radikallerini (SOR) meydana getirir. Dolayısıyla bu tepkime sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri sebebiyle iskemik dokunun reperfüzyonu, dokularda iskemi sebebiyle oluşan hasara göre daha fazla bir hasar meydana getirir (91, 92).

İskemi/reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde pek çok faktör rol oynamakla birlikte özellikle; serbest oksijen radikallerinin, polimorf nüveli lökositlerin (PMNL), kompleman sistemlerinin ve endotel hücrelerinin önemli düzeyde etkilediği ve yapılan araştırmalarda reperfüzyon hasarına en duyarlı olan hücreler arasında da; hücrel yapıların, proteinler, nükleik asitler, zar lipitleri ve deoksiribonükleik asit moleküllerinin olduğu bulunmuştur (89, 93).

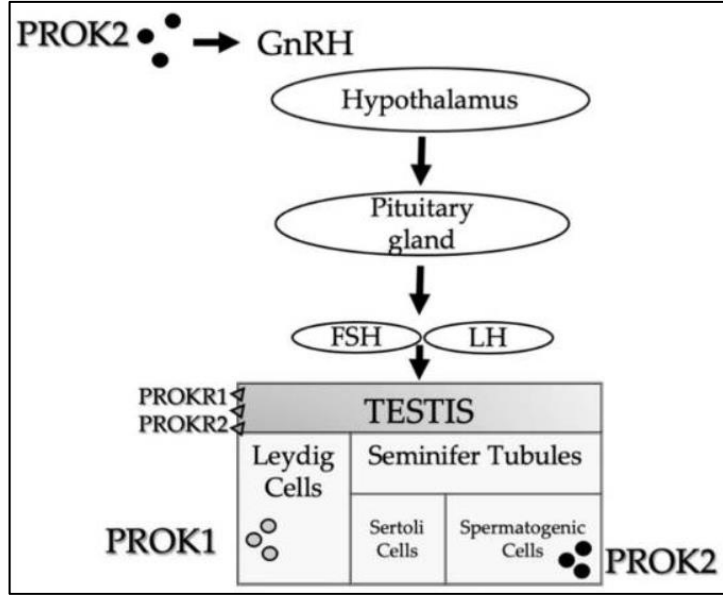
2.8. PROKİNETİCİN KOMPLEMENTER SİSTEMİ

Prokineticin komplementer DNA (cDNA)'ları 2001 yılında ilk defa Li ve arkadaşları tarafından kurbağa derisi salgı proteini (Bombina Variegata, Bv8) ve kara mamba yılanı zehrinin toksik olmayan bir bileşeni (Mamba Intestinal Toxin 1, MIT-1) olan sekans benzerlikleri ile keşfedilmişlerdir (6, 7). Bu komplementer sistem insanlarda 86 ve 81 aminoasitlik iki proteini kodlar (94).

Prokineticin'ler iki G-protein reseptörüne bağlanarak biyolojik aktivasyon gösteren komplementer sistemleri olmakla birlikte; PROK ligandları (PROK-1 ve PROK-2) büyük bir oranda endotel hücrelerin proliferasyonunda ve testiküler doku parankiminde anjiyojenik ve mitojenik anlamda, bu hücrelerin hayatta kalma faktörleri olarak kabul edilirler. Bunun yanında prokineticinler; intestinal motilite ve kontraksiyonların sağlanması, sirkadiyen ritim kontrolü, nöronal sağ kalım, spermatogenez, anjiyogenez, immün yanıtlar, hematopoez, koku alma, beslenme davranışı, ağrı algısı (hiperaljezi) ve vasküler fonksiyonların düzenlenmesi gibi fonksiyonlarda da oldukça önemli bir rol üstlenmektedir (8, 9).

Prokineticin-1 (PROK1); endokrin bezler üzerindeki seçici anjiyojenik etkisiyle bu bezlerden türetilmiş olan küçük çaplı endotel hücrelerini uyarır ve çoğunlukla plasenta, over, testis, adrenal cortex gibi steroidojenik organlarda eksprese edilir. Endokrin bez kaynaklı küçük çaplı endotel hücrelerinde meydana gelen bu güçlü mitojenik tepkiyi indükleyen büyüme faktörüne, endokrin bezi türevli- vasküler endotelial büyüme faktörü (endocrine gland derived- vascular endothelial growth factor, EG-VEGF) adı verilmiştir. Prokineticin-1 (PROK1) de bu büyüme faktörünün göstermiş olduğu etkilere benzer etkiler göstermesi sebebiyle zaman zaman diğer ismi olan EG-VEGF ile anılmaktadır (11, 95) (Şekil 8).

Prokineticin-2 (PROK2); diğer ismi olan Bv8 olarak da adlandırılır. Bv8 ağırlıklı olarak testis'lerde eksprese edilir ve testis'lerde anjiyogenezi stimüle ederek bu tepkiyi destekler (8, 10). Bunun yanında yapılan çalışmalarda; Prokineticin-2'nin aynı zamanda merkezi sinir sisteminde bulunan nöronlarda eksprese edildiği ve buna bağlı olarak nörolojik açıdan bu nöronların sağkalımını desteklemekte de önemli bir rol oynadığı ve Prokineticin-2 ve reseptör sinyalinin nörogenezin devam ettiği koku alma ampullası üzerinde de progenitörler için kemotaktik aktiviteyi düzenleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir (11, 12) (Şekil 2.7).



Şekil 2.6. PROK'ların erkek üreme sistemindeki şematik gösterimi (8).

Yapılan çalışmalarda Prokineticin-2 sisteminin hipoksiye bağlı olarak oluşan testiküler hasarda germinal epitel hücre ölümünü engellemek amacıyla endotel proliferasyonunu indükleyerek koruyucu bir rol üstlendiği ve varikosel varlığında meydana gelen oksidatif stresin Prokineticin-2 ekspresyonunu artırarak spermatogonyum'dan üretilen erkek gamet hücrelerinin ölümüne yol açtığı çalışmalarla desteklenmiştir (8, 96).

Bazı deneysel hayvan modellerinde Prokineticin-2 sisteminin testis iltihabı olarak da bilinen orşitte, testiküler ekspresyonu azalttığı bulunmuştur. Bu nedenle Prokineticin-2; özellikle erkek kısırlığı için potansiyel anti-inflamatuar ve tedavi edici özelliği nedeniyle ilaçların geliştirilmesinde oldukça umut kaynağı olan bir madde olarak kullanılabilir (97).

Yapılan çeşitli çalışmalarda, kromozom 3p13'e denk gelen PROK-2 ile bunun eşleniği olan ve 20p12.3'e denk gelen ve PROK-2'nin G-protein eşli reseptörünün; hem insanlarda hem de farelerde koku alma ve hipotalamik nöroenezde oldukça önemli bir rol oynadığı ve gonadotropin (GnRH) salgılayan sinir hücrelerinin ve koku alma ampullalarının yokluğunda da hipogonadotropik hipogonadizm (HH)'nin bulunduğu deneysel fare modeli tanımlanmıştır (98). Sonraki yıllarda yapılan araştırmalarda da bu genlerin varyasyonlarının insanlarda görülen İdiyopatik

hipogonadotropik hipogonadizm (İHH)'in patogenezinde rol oynadığı bulunmuştur (99).

PROK-2 ve reseptörünü (PROK-R2) kodlayan iki genin gonadotropin eksikliğinin neden olduğu koku duyusunun kusurlu olması (anosmi veya hipozmi) ile ilişkili; İHH'nin konjenital bir formu olan Kallman Sendromu (KS)'ndaki mutasyonel değişikliklere yol açtığı ve gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgılayan nöron göçündeki rolü ve koku alma ampullalarının nörogenezindeki rolü nedeniyle Kallman Sendromu'ndaki fenotipi bulunmuştur (100-102).

Erkek hipogonadizminin en sık görülen genetik formu olan, testis atrofisi, testosteron düzeyinin düşük olması, geç ergenlik veya ergenlik belirtilerinin eksik olması, kas zayıflığı, jinekomasti, vücutta ve yüzde görülen kılların zayıf gelişimi ve doğurganlığın az olması gibi bulgularla kendisini gösteren Klinefelter Sendromu'nda da ergenlik öncesi ve yetişkinlik dönemindeki Klinefelter Sendrom'lu hastalarda PROK-2 serum seviyeleri araştırılmış ve bu çalışma sonucunda ergenlik öncesindeki Klinefelter Sendrom'lu hastalardaki PROK-2 serum seviyelerinin genç ve sağlıklı bireylere göre oldukça yüksek olduğu ancak yetişkin yaşta daha düşük olduğu bulunmuştur. Bulunan bu veriler PROK-2'nin Klinefelter Sendromu'na sahip olan bireylerdeki infertilite durumu araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu doğurmuştur (103).

Özet olarak PROK-2 ve prokineticin proteinlerinin anjiyogenez, sirkadiyen ritim kontrolü, hipotalamik hormon salgılanması, üreme ve kanserdeki rolü, endotel hücre geçirgenliğinin düzenlenmesi, yeme ve içme gibi karmaşık olan hareketlerin modüle edilmesi, nörogenez, kemik iliği, lökosit ve lenfoid organlarda gösterdikleri yüksek ekspresyon seviyeleri ile bu peptid içerikli proteinlerin immün yanıtlarda, hematopoezde ve inflamatuvar süreçlerde biyolojik olarak aktivasyon gösterdiği açıkça görülmektedir. Mevcut olan çalışmalar PROK-2'nin pleiotropik etkilerini gösterse de PROK-2 ve reseptörlerinin rollerini daha iyi açıklayabilmek adına daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Günümüzde sıklıkla karşılaşılan bir klinik durum olan testis torsiyonu, testis'lerde fonksiyon kaybına ve infertiliteye neden olması açısından oldukça önemlidir. Özellikle neonatal dönemde ve erken yaşlarda karşılaşılan bu durum, testis'lerde üretim bozukluğuna ve dolayısıyla da infertiliteye neden olabileceği için günümüzde deneysel olarak yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Ancak literatürde PROK-2 tedavisinin testiküler iskemik hasar patogenezindeki etkilerini inceleyen çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle de bu tezde, testiküler iskemi reperfüzyon patogenezinde PROK2 tedavisinin terapötik etkileri araştırıldı. PROK2'nin oksidatif stres sürecindeki rolü, inflamasyona yanıtı ilgili belirteçler ile araştırıldı. Testis'lerden salgılan testosteron hormonun serumdaki seviyesi değerlendirildi. Hasar sonrası PROK2 tedavisinin testis dokusunda histolojik düzeydeki etkisi de detaylı analizlerle incelendi. Bulgularımız sonucunda PROK2 tedavisinin etkinliği sunulmaya çalışıldı.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması Karabük Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 28.03.2023 tarihli, 2023/3/6 sayılı kararı ile yapılmıştır. Kullanılan sıçanlar Karabük Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilmiş olup sıçan bakımı ve sıçanlara uygulanacak işlemlerin tamamı bu kurumda gerçekleştirilmiştir.

3.1. ÇALIŞMANIN DİZAYNI

Bu çalışma Wistar albino cinsi, henüz puberteye girmemiş yaklaşık 35 günlük, ortalama 180-220 gr ağırlığında 48 adet erkek sıçan ile gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılacak sıçan sayısı güç analizi ile belirlendi. Sıçanlar vücut ağırlıklarının ortalaması aynı olacak şekilde randomize 4 gruba (n=12) ayrıldı.

Grup 1 (Sham): Sıçanlara sahte torsiyon/detorsiyon cerrahisi uygulandı.

Grup 2 (TTD): 120 dk torsiyon yapıldıktan sonra 24 saat süreyle detorsiyon sağlandı (Şekil 3.1) (104). Detorsiyon bitiminde kan ve testis dokusu örnekleri alındı ve sıçanlar sakrifiye edildi (Şekil 3.2).

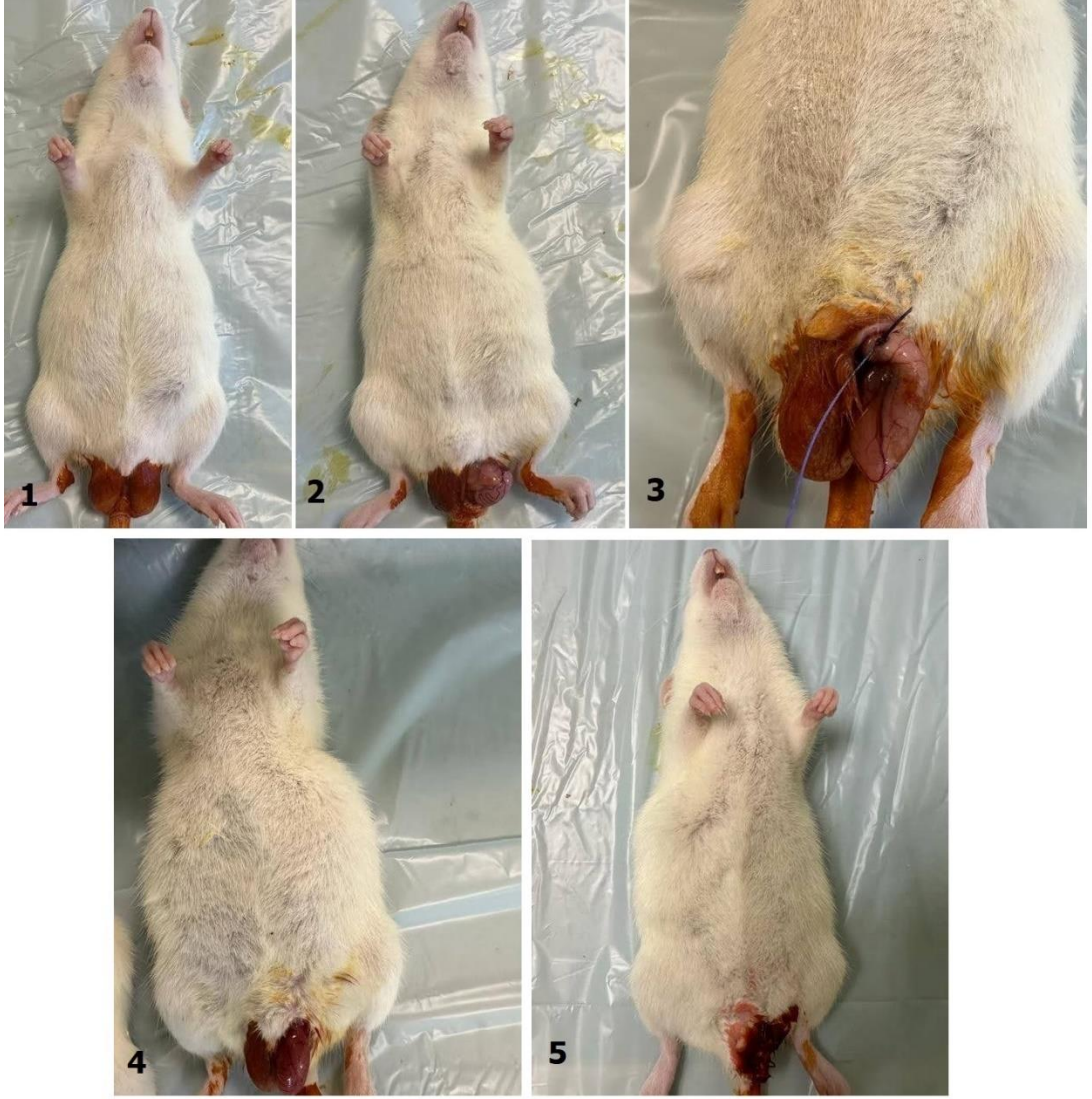
Grup 3 (TT+PROK2+TD): 120 dk'lık torsiyonun 90. dakikasında intraperitoneal tek doz 60 nmol/kg PROK2 uygulandı. 120 dk torsiyon süresi tamamlandıktan sonra 24 saat detorsiyon sağlandı. Kan ve testis doku örnekleri alınarak sıçanlar sakrifiye edildi (Şekil 3.2) (104, 105).

Grup 4 (TTD+PROK2): 120 dk'lık torsiyon sonunda, detorsiyonun hemen başında sıçanlara tek doz 60 nmol/kg PROK2 intraperitoneal olarak verildi. Detorsiyon

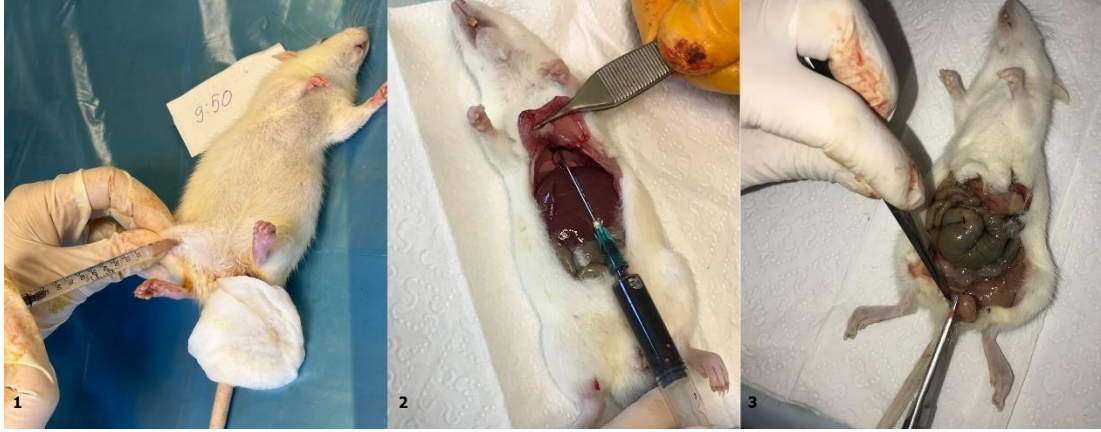
tamamlandıktan sonra da kan ve testis dokuları alınarak sıçanlar sakrifiye edildi (Şekil 3.2) (104, 105).

3.2. TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON MODELİ

Anestezi altına alınan (70 mg/kg ketamin ve 8 mg/kg xylazine) sıçanların sol scrotum'ları üzerinde vertikal bir insizyon yapıldı. Bu insizyon yerinden sol testis tüm vasküler yapıları ile çıkarıldı. Çıkarılan sol testis ve vasküler yapıları saat yönünde olacak şekilde 720° döndürülerek torsiyon yapıldı. Yapıların 120 dk boyunca torsiyon durumunda sabit kalabilmesi için 4/0 ipek sütur ile hafifçe sabitlendi ve çıkarılan tüm yapılar tekrar scrotum içerisine geri yerleştirildi. Kesi yerinin üzeri nemli bir ıslak pamuk ile kapatılarak 120 dk torsiyon süresi beklendi. 120 dk'nın sonunda testis ve vasküler yapıları tekrar scrotum içerisinden dışarı çıkarıldı ve yapıları sabitlemek için atılan süturlar açıldı. Testis ve tüm vasküler yapıları çevrilerek normal konumlarına getirildi ve böylece detorsiyon sürecinin başlanması sağlandı. Detorsiyonun başladığından emin olunduktan sonra testis ve yapıları tekrar scrotum içerisine yerleştirildi. Kesi yeri 4/0 ipek sütur ile dikildi ve sıçanlar kafeslerine alınarak 24 saat detorsiyon sağlandı. 24. saatin sonunda sıçanların anestezi altına alındı, kalplerinde kan ve sol testis dokuları alınarak sakrifiye edildi (104, 106) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. TTD modelinin yapılması.



Şekil 3.2. Sıçanlara PROK2 enjeksiyonunun yapılması (1), kan (2) ve testis örneklerinin (3) alınması.

3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Çalışma sonunda alınan kan örnekleri hemen 4500 rpm hızda 10 dk süre ile santrifüj edilerek serumlarına ayrıldı. Serumlar tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve interlökin 6 (IL-6) seviyelerinin belirlenmesi için kullanıldı ve çalışma gününe kadar -40°C’de saklandı. Sıçanlardan alınan testis dokuları ise biyokimyasal ve histolojik analizler için ayrıldı. Her gruptan 6 hayvana ait testis dokusu biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere çalışma gününe kadar -80°C’de saklandı. Diğer 6 doku ise %10’luk formaldehit içerisinde alındı ve histopatolojik ve immnohistokimyasal analizlerde kullanıldı. Biyokimyasal analizlerde kullanılacak testis dokularından oksidatif stres belirteçleri çalışıldı.

3.3.1. Testis Dokusunun Homojenize Edilmesi, TAS ve TOS Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışma gününden 24 saat önce dondurucudan çıkarılan testis dokularının +4°C’de kontrollü bir şekilde çözünmesi sağlandı. Çözünen dokular hassas terazi ile tartılarak tüplere alındı ve üzerlerine Tris-HCL tampon (\approx doku ağırlığının 10 katı kadar, pH=7,4) ilave edildi. 16000 rpm hızda 3 dk süre ile homojenize edilen örnekler vortekslendi ve yeni tüplere alındı. 2000 g hızda 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrıldı. PROK2’nin torsiyon/detorsiyon hasarı sonucu meydana gelecek oksidatif stress üzerine etkilerini değerlendirebilmek için ayrılan süpernatantlardan

toplam antioksidan kapasite (TAS) ve toplam oksidan kapasite (TOS) düzeyleri belirlendi.

Dokudaki TAS (Rel Assay Diagnostic, Türkiye, Katalog no: EK21122A) ve TOS (Rel Assay Diagnostic, Türkiye, Katalog no: EK21135O) düzeyleri ticari olarak satın alınan sıçan spesifik ELISA kitleri kullanılarak ve kitlerin önerdiği protokole uyularak tespit edildi. Thermo Scientific Multiskan FC microplate reader ile okuma gerçekleştirildi.

3.3.2. TNF- α ve IL-6 Seviyelerinin Belirlenmesi

TNF- α ve IL-6 düzeyleri sıçanlara özgü üretilen ELISA kitleri ile belirlendi (SunRed Biotechnology, China, TNF- α için Katalog no: 201-11-0765, IL-6 için Katalog no: 201-11-0765). Kit protokolünün basamakları sıra ile takip edildi. İlk olarak kit içerisinde yer alan stok solüsyonu uygun şekilde seyreltildi. Kör kuyucuğuna distile su, kromojen A ve B ile durdurma solüsyonu koyuldu. Standard kuyucuğuna standart solüsyonu (50 μ l) ile Streptavidin HRP (50 μ l) koyuldu. Diğer kuyucuklara 40 μ l örnek, üzerlerine de TNF- α antikorunu (her ikisinden 10 μ l) ve Streptavidin HRP (50 μ l) eklendi. Tüm kuyucuklar tamamlandıktan sonra plaka şeffaf film kapatıldı ve nazikçe çalkalanarak inkübe edildi (37 °C'de 60 dk) İnkübasyondan sonra şeffaf film açıldı, kuyucuklardaki sıvılar döküldü ve her kuyucuğa 30 kat seyreltilmiş yıkama solüsyonu koyuldu. Daha sonra plaka kağıt bir havlu üzerine ters çevrilerek içindeki sıvı boşlatıldı. 5 defa aynı şekilde yıkama işlemi tekrarlandı. Beşinci yıkamanın ardından kuyucuklara sırasıyla kromojen A ve kromojen B koyulduktan sonra karanlıkta 37 °C'de 10 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. 10 dk'lık inkübasyondan sonra kuyucuklara durdurma solüsyonu (50 μ l) eklendi. Plakalar optik okuyucuya yerleştirildi ve 450 nm dalga boyunda okutuldu. Okuma sonrası elde edilen OD değerleri kaydedildi ve kitin önerdiği hesaplama kullanılarak TNF- α ve IL-6 düzeyleri hesaplandı.

3.3.3. Testosteron hormon düzeyinin belirlenmesi

Testosteron hormon düzeyi de sıçanlara özgü üretilen ELISA kiti ile tayin edildi (BT LAB, Katalog no: EA0023Ra). Tüm adımlar kit protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Kit içerisinde bulunan stok standard solüsyonu standard örnek solüsyonu kullanılarak uygun şekilde seyreltildi. Daha sonra hazırlanan standard stok solüsyonu tekrar ½ oranında seyreltilerek çözeltiler hazırlandı. Plaka kuyucuklarına 10 ul numune ve 40 ul numune seyrelticiyi koyuldu. Standard solüsyonu (50 ul), pozitif ve negative controller de kuyucuklara ilave edildikten sonra plakanın üzeri şeffaf film ile kapatıldı. Plaka hafifçe çalkalandı ve koyulan maddelerin karışması sağlandı. Bu işlemden sonra şeffaf film açıldı ve tüm kuyucuklara yıkama solüsyonu (300 ul) eklendi. Ortalama 30 sn ila 1 dk boyunca kuyucukların yıkandı. Yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı. Yıkama tamamlandıktan sonra kağıt bir havlu üzerine çevrilen plakalardaki kuyucukların tamamen kurutuldu. Daha sonra kuyucuklara (kör kuyucuk hariç) 50 ul HRP ilave edildi. Plakanın üzeri tekrar şeffaf film ile kapatılarak 37 °C’de 60 dk inkübe edildi. Daha sonra yıkama işlemi tekrar yapıldı ve sonrasında tüm kuyucuklara sırasıyla substrat A ve B solüsyonları (50 ul) ilave edildi. Plaka nazikçe çalkanarak içerisindeki solüsyonların karışması sağlandı ve 37 °C’de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde tüm kuyucuklara durdurma solüsyonu eklendi. Durdurma solüsyonunun eklenmesiyle birlikte kuyucuklardaki mavi renk hızlı bir şekilde sarıya döndü. Plakalar optik okuyucuya yerleştirildi ve 450 nm dalga boyunda okutuldu. Okuma sonrası elde edilen OD değerleri kaydedildi ve kitin önerdiği hesaplama kullanılarak testosteron hormon düzeyleri hesaplandı.

3.4. HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER

3.4.1. Dokuların Takip Edilmesi ve Histopatolojik Analizler

%10’lık formaldehit solüsyonunda 24 saat boyunca oda sıcaklığında tespit edilen testis dokuları histopatolojik ve histomorfometrik analizlerde kullanıldı. 24 saatlik fiksasyon sonrasında testis dokuları iki eşit parçaya bölündü ve manuel doku takibine alındı ve takibi tamamlanan testis dokuları parafin içerisinde gömüldü.

Parafin içerisine gömülmüş olan testis bloklarından mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler polilizinli lamlar üzerine alındı. Histomorfolojik ölçümler için kesitler hematoxilen eozin (HE) ile boyandı.

HE ile boyanan testis dokusu kesitlerinde seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı ölçümü, hemoraji skorlaması ve Johnsens' skorlaması yapıldı. Çap ölçümlerinde iki farklı derinlikte rastgele seçmiş olduğumuz 50 adet seminifer tübülün en kısa eksenini belirlenerek buradan ölçüldü (Şekil 3.2). Her kesitte düzgün kontura sahip 50 adet seminifer tübülde, iki farklı alanda, sertoli ve germ hücrelerini de içine alacak şekilde bazal laminadan lümene kadar uzanan bölgede seminifer epitel kalınlığı ölçüldü. Seminifer tübül çapı, seminifer epitel kalınlığı ve seminifer epitel kalınlığının seminifer tübül çapına oranı her bir grup için ayrı ayrı hesaplandı.

Hemoraji analizi her testis örneğinin farklı iki derinliğinde alınan ve HE boyanan kesitlerde rastgele seçilen 10 alanda yapıldı. Hemoraji izlenmeyen alanlar 0, hafif hemorajik alanlar 1, orta şiddette hemorajik alanlar 3, ileri hemorajik alanlar 4 olarak skorlandı. HE boyaması yapılan kesitlerde ayrıca Johnsen's skorlaması yapıldı (107). Bu amaçla her bir kesitte rastgele seçilen transvers 20 seminifer tübül kesitinde analiz yapıldı.

3.4.2. İmmünohistokimyasal (IHC) Analizler

İmmünohistokimyasal olarak germ hücresi saymak amacıyla spermatogonia belirteci olan MAGE A4 primer antikoru kullanıldı. Germ hücre analizi rutin AEC kromojenik boyanma esasına dayalı immünohistokimyasal boyama yöntemine (Çizelge 3.2) göre MAGE A4 primer antikoru (Santa Cruz Biotechnology, Katalog no: sc-20034) ve horseradish peroxidase kiti (HRP) (Thermo Fisher) kullanıldı. Spermatogonia hücrelerinin sayımı her deneğe ait doku kesitinde randomize seçilen transvers kesitli 10 seminifer tübülde yapıldı. Spermatogonia sayımı yapılan aynı seminifer tübüllerde bazal tabakadan birbirine karşılıklı dik iki ölçüm çizgisi çekildi ve ortalaması belirlenip tübül çapının da ölçümü yapıldı. Sayım ve ölçüm verilerine dayanarak her kesit için ortalama spermatogonia sayısı, tübül çapı ve spermatogonia/tübül çapı oranı hesaplandı.

Boyamaların analizlerinde ışık mikroskobu (Nikon Eclipse E200), DS-Fi-1 camera (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) ve NIS-Elements BR 2.30 görüntü analiz sistemi (Nikon Corp., Tokyo, Japan) kullanıldı.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışmadan elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorow-Smirnov testi ile değerlendirildi. Biyokimyasal ve histolojik analizlerden sonunda elde edilen tüm verilerin normal dağılım gösterdiği görüldü. Bu nedenle de değişkenlerin gruplar arasındaki karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) testi yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmaları değerlendirebilmek için uygun post-hoc testler kullanıldı. Varyansların homojen olduğu değişkenler Tukey testi ile varyansların homojen olmadığı belirlenen değişkenlerde ise Tamhane's testi ile sonuçlar değerlendirildi. Testler sonucunda veriler ortama±standard sapma şeklinde verildi ve $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizler IBM SPSS Statistics 22.0 programı ile yapıldı.

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1. TORSİYON/DETORSİYON HASARINDA PROK2'NİN OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ

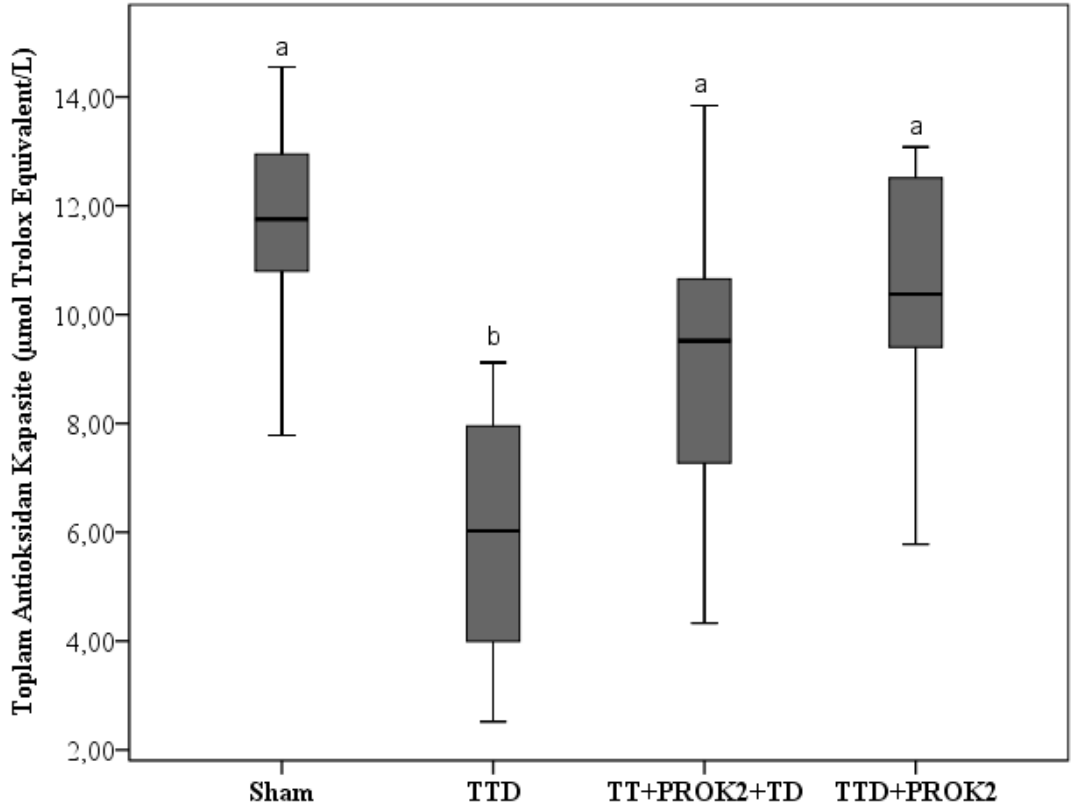
Çalışmamızda testis dokusunda torsiyon/detorsiyon hasarı sonrasında ortaya çıkabilecek oksidatif strese karşı PROK2'nin etkilerini değerlendirmek için testis dokularında TAS ve TOS düzeyleri değerlendirildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. TAS ve TOS düzeyleri.

Parametreler	Gruplar			
	Sham	TTD	TT+PROK2+TD	TTD+PROK2
TAS ($\mu\text{mol Trolox}$ Equivalent /L)	11,77 \pm 1,88 ^a	6,02 \pm 2,19 ^b	9,29 \pm 2,71 ^a	10,33 \pm 2,37 ^a
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L)	5,16 \pm 2,05 ^a	8,67 \pm 1,84 ^b	4,09 \pm 1,26 ^a	4,43 \pm 1,65 ^a

(Gruplar arası karşılaştırmalar one-way ANOVA testi ile yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında varyanslar homojen olduğu için Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ort \pm SS olarak verildi. $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi. TAS için; ^a TTD grubuna göre anlamlı artış, ^b Sham grubuna göre anlamlı azalış. TOS için; ^a TTD grubuna göre anlamlı azalış, ^b Sham grubuna göre anlamlı artış)

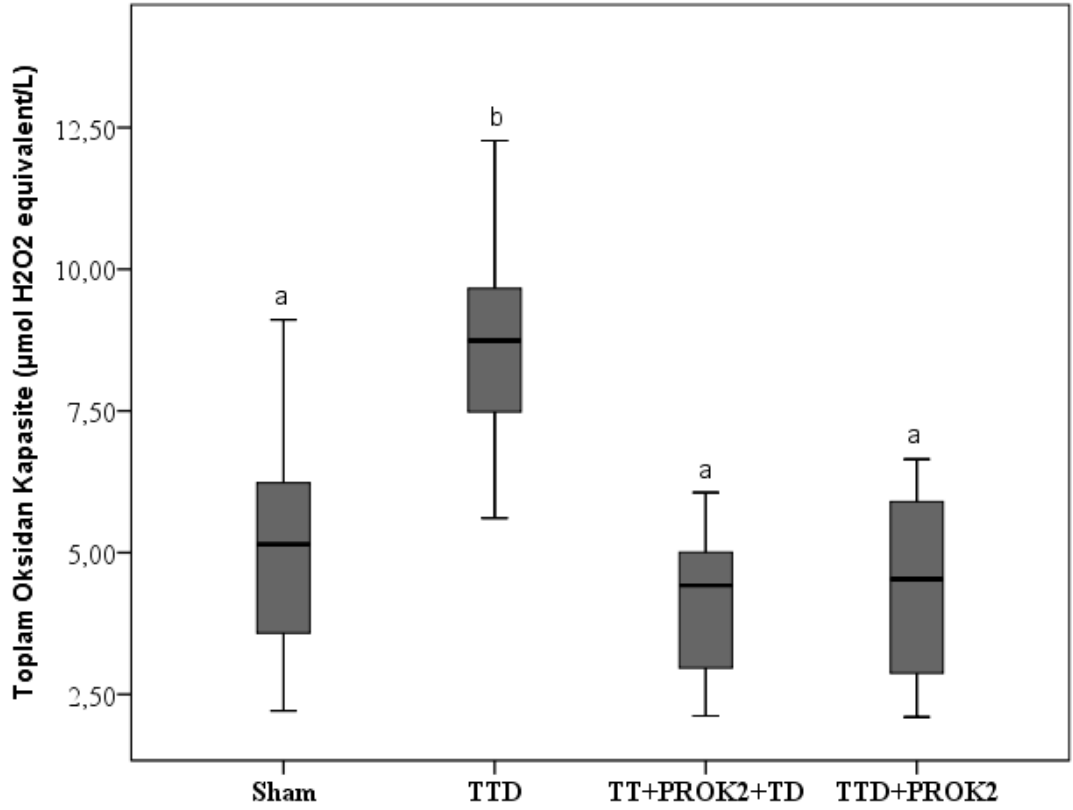
Analizler sonucunda TAS düzeyinin hasar grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak düşük olduğu belirlendi. PROK2 ile tedavi edilen gruplarda ise TAS düzeyi TTD grubuna kıyasla artmıştı ($p < 0.05$) (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. PROK2 tedavisi sonrasında gruplar arasındaki TAS düzeylerinin karşılaştırılması.

(Gruplar arası karşılaştırmalar one-way ANOVA testi ile yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında varyanslar homojen olduğu için Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SS}$ olarak verildi. $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi. ^a TTD grubuna göre anlamlı artış, ^b Sham grubuna göre anlamlı azalış)

TOS düzeyleri açısından karşılaştırma yapıldığında ise en yüksek TOS düzeyi TTD grubunda saptandı. PROK2 uygulanan gruplarda ise TOS düzeyi belirgin bir düşüş gösterdi. Sham, TT+PROK2+TD ve TTD+PROK2 gruplarının TOS düzeylerinin benzer olduğu, gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık olmadığı belirlendi. Buna karşın TTD grubundaki artış diğer gruplara göre istatistiksel olarak da anlamlıydı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. PROK2 tedavisi sonrasında gruplar arasındaki TOS düzeylerinin karşılaştırılması.

(Gruplar arası karşılaştırmalar one-way ANOVA testi ile yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında varyanslar homojen olduğu için Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ort \pm SS olarak verildi. $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi. ^a TTD grubuna göre anlamlı azalış, ^b Sham grubuna göre anlamlı artış)

4.2. TORSİYON/DETORSİYON HASARINDA PROK2'NİN İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİSİ

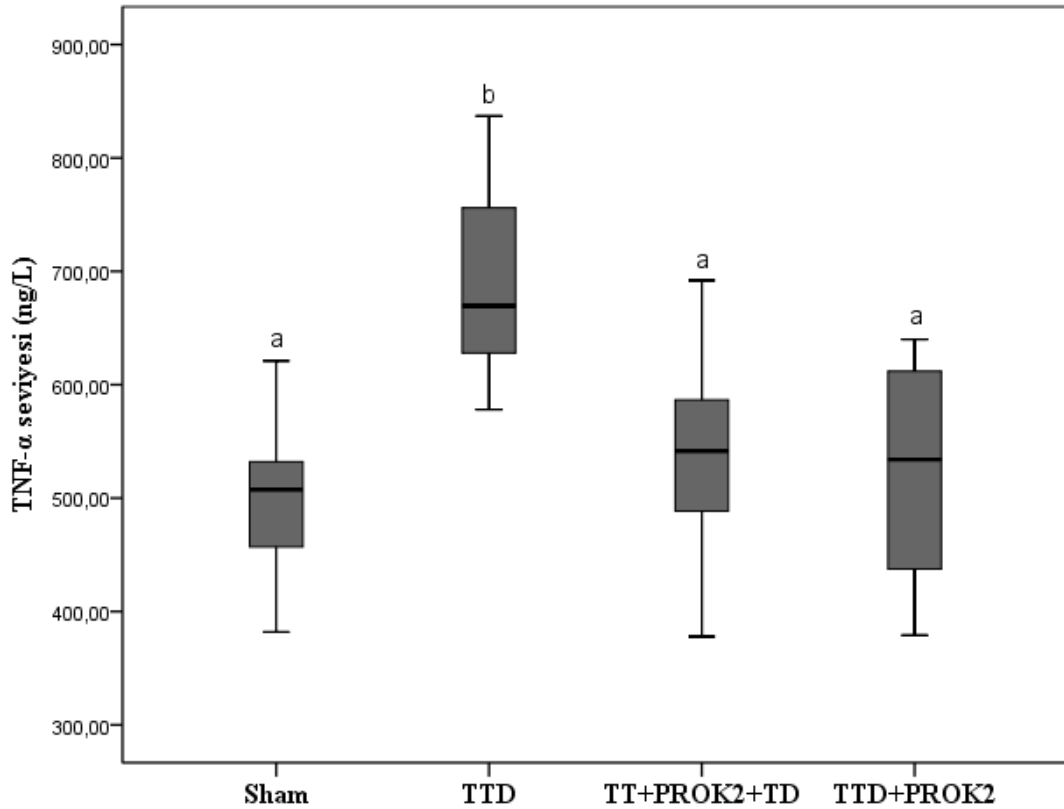
Çalışmamızda torsiyon/detorsiyon hasarının testis dokusunda oluşturduğu inflamasyon üzerine PROK2'nin etkilerini değerlendirmek için testis dokularında TNF- α ve IL-6 düzeyleri değerlendirildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. TNF- α ve IL-6 düzeyleri.

Parametreler	Gruplar			
	Sham	TTD	TT+PROK2+TD	TTD+PROK2
TNF- α (ng/L)	512,67 \pm 81,62 ^a	691,22 \pm 88,95 ^b	537,67 \pm 83,37 ^a	522,17 \pm 97,05 ^a
IL-6 (pg/mL)	319,50 \pm 39,99 ^a	497,92 \pm 109,73 ^b	351,75 \pm 91,99 ^a	364,08 \pm 99,54 ^a

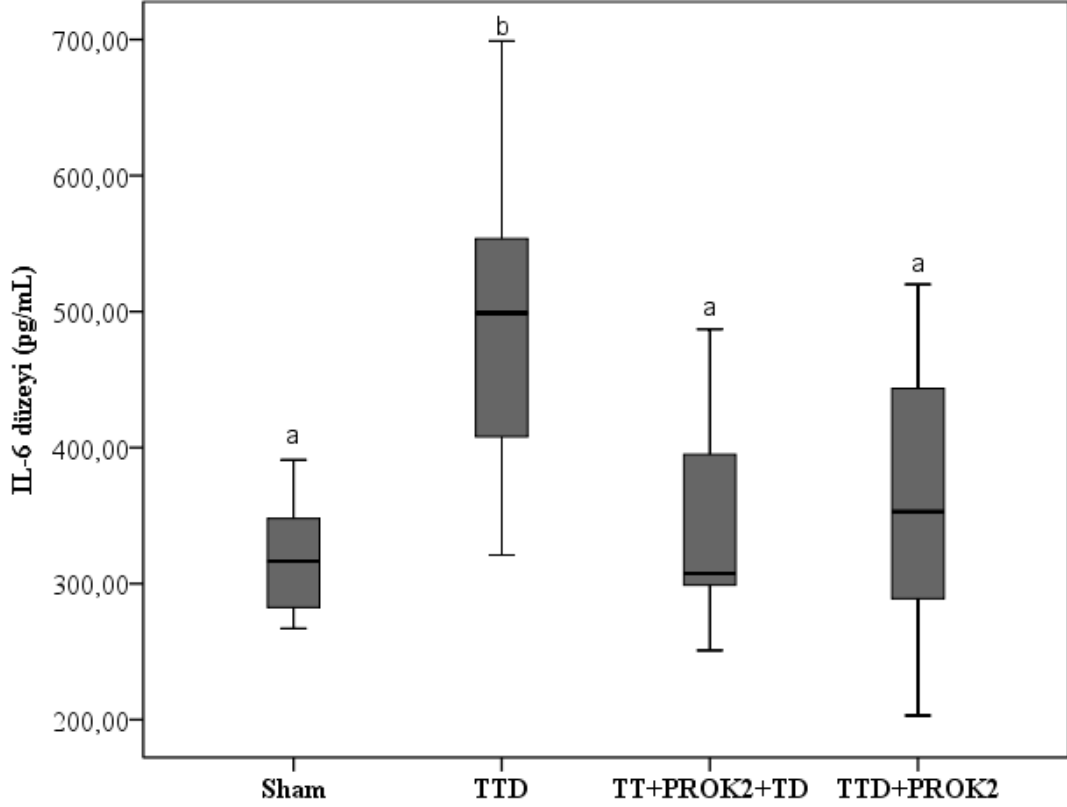
(Gruplar arası karşılaştırmalar one-way ANOVA testi ile yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında varyanslar homojen olduğu için Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ort \pm SS olarak verildi. p<0.05 düzeyi anlamlı kabul edildi. ^a TTD grubuna göre anlamlı artış, ^b Sham grubuna göre anlamlı azalış)

TNF- α ve IL-6 düzeylerinin TTD grubunda en yüksek düzeyde olduğu belirlendi. Torsiyon sırasında ve detorsiyonun başlangıcında PROK2 ile tedavi edilen gruplarda ise TNF- α (Şekil 4.3) ve IL-6 (Şekil 4.4.) düzeyleri TTD'ye göre belirgin bir düşüktü (p<0.05). Sham grubu ile PROK2 ile tedavi edilen gruplarda ise her iki parametre açısından da bir farklılık yoktu.



Şekil 4.3. PROK2 tedavisi sonrasında gruplar arasındaki TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması.

(Gruplar arası karşılaştırmalar one-way ANOVA testi ile yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında varyanslar homojen olduğu için Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ort±SS olarak verildi. p<0.05 düzeyi anlamlı kabul edildi. ^a TTD grubuna göre anlamlı azalış, ^b Sham grubuna göre anlamlı artış)



Şekil 4.4. PROK2 tedavisi sonrasında gruplar arasındaki IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması.

(Gruplar arası karşılaştırmalar one-way ANOVA testi ile yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında varyanslar homojen olduğu için Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ort±SS olarak verildi. p<0.05 düzeyi anlamlı kabul edildi. ^a TTD grubuna göre anlamlı azalış, ^b Sham grubuna göre anlamlı artış)

4.3. PROK2 TEDAVİSİ SONRASI GRUPLARIN SERUM TESTOSTERON SEVİYELERİ

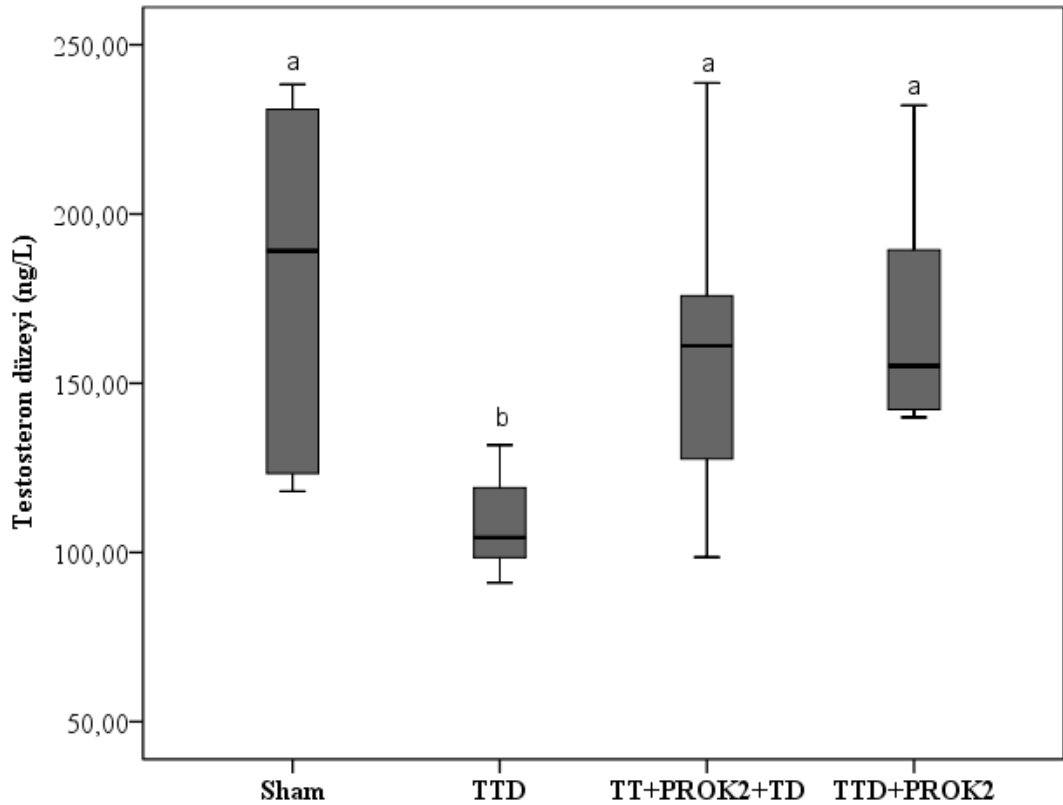
Testiküler torsiyon/detorsiyon hasarında PROK2 tedavisi sonrası grupların serum testosteron düzeylerine Çizelge 4.3'te verildi. Torsiyon/detorsiyon hasarının

sıçanların serum testosteron seviyelerinde anlamlı ölçüde düşüğe neden olduğu saptandı. PROK2 ile tedavi edilen gruplarda da ise serum testosteron seviyesi belirgin bir artış gösterdi ($p<0.05$). PROK2 tedavisinin torsiyon anında ya da detorsiyonun hemen başlangıcında uygulanması serum testosteron seviyeleri üzerinde bir farklılık meydana getirmedir.

Çizelge 4.3. PROK2 tedavisi sonrası grupların serum testosteron düzeyleri.

	Gruplar			
	Sham	TTD	TT+PROK2+TD	TTD+PROK2
Testosteron (ng/L)	178,88±51,14 ^a	107,54±12,84 ^b	157,85±43,26 ^a	167,99±31,29 ^a

(Gruplar arası karşılaştırmalar one-way ANOVA testi ile yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında varyanslar homojen olmadığı için Tamhane's testi kullanıldı. Sonuçlar ort±SS olarak verildi. $p<0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi. ^aTTD grubuna göre anlamlı artış, ^bSham grubuna göre anlamlı azalış)



Şekil 4.5. PROK2 tedavisi sonrasında gruplar arasındaki serum testosteron düzeylerinin karşılaştırılması.

(Gruplar arası karşılaştırmalar one-way ANOVA testi ile yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında varyanslar homojen olmadığı için Tamhane's testi

kullanıldı. Sonuçlar ort±SS olarak verildi. p<0.05 düzeyi anlamlı kabul edildi. ^a TTD grubuna göre anlamlı azalış, ^b Sham grubuna göre anlamlı artış)

4.4. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Histomorfometrik ölçümlerde, hasar grubunda seminifer tübül çapı da seminifer epitel kalınlığı da sham ve tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak azalmıştı (p<0,001). Tedavi gruplarında ise hasar seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı açısından hasar grubuna göre belirgin bir iyileşme saptandı (p<0,001). (Çizelge 4.4, Şekil 4.6).

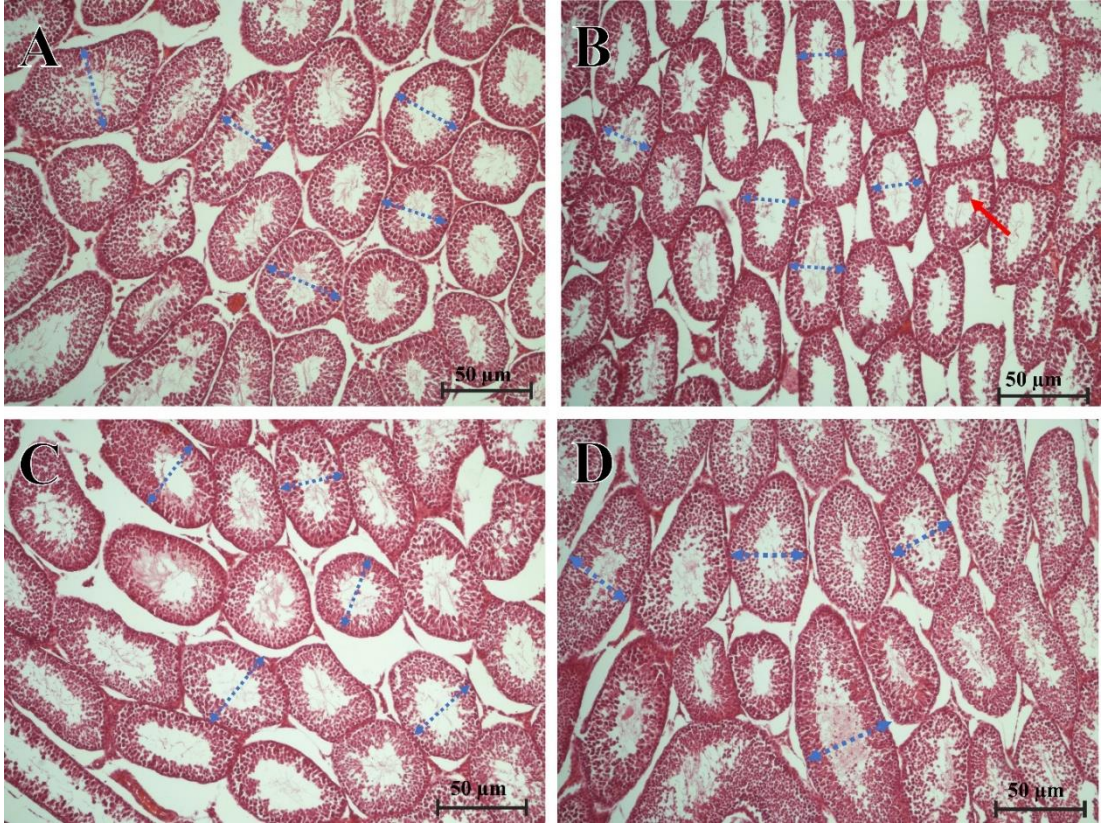
Çizelge 4.4. Histomorfometrik bulgular.

Gruplar	Seminifer kalınlığı	epitel	Seminifer çapı	tübül	Kalınlık/Çap
Sham	15.59 ± 0.87		60.27 ± 2.11		0.26 ± 0.02
TTD	13.57 ± 0.68 ^a		48.80 ± 5.45 ^a		0.28 ± 0.04
TT+PROK2+TD	14.97 ± 0.50 ^b		56.70 ± 3.33 ^b		0.26 ± 0.02
TTD+PROK2	15.25 ± 0.97 ^b		57.02 ± 3.06 ^b		0.27 ± 0.03

(Gruplar arası karşılaştırmalar one-way ANOVA testi ile yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında varyansların homojenitesine göre Tamhane's veya Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ort±SS olarak verildi. p<0.05 düzeyi anlamlı kabul edildi)

^a Sham grubuna göre azalış (p<0.05).

^b TTD grubuna göre artış (p<0.05).



Şekil 4.6. Seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı.

(**A: Sham**; seminifer tübüller normal seminifer tübüllere sahiptir. **B: TTD**; Seminifer tübüllerin çapı sham'e göre daralmış görünüyor. Yer yer tübül lümeninde hücre kümeleri dikkati çekmektedir (kırmızı ok). **C: TTD+PROK2+TD** ve **D: TTD+PROK2**; Seminifer tübüller sham'e benzer histolojik yapı göstermektedir. Seminifer tübüllerin çap ölçümleri mavi renkli kesikli çizgiler ile gösterilmiştir. HE boyama, 20x.).

Histopatolojik incelemede, yoğun hemoraji görülen TTD grubu, hemoraji açısından diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak yüksekti ($p < 0,001$). Sham, TT+PROK2+TD ve TTD+PROK2 ise birbirine benzer bulundu. Hemoraji açısından TTD grubunda bazı deneklerde ileri düzey anomali gözlemlendi (Şekil 4.7). Bu deneklerde seminifer tübüllerin çap olarak küçüldüğü ve seminifer tübüllerde hücre yoğunluğu dikkati çekti (Şekil 4.7). Ayrıca TTD grubunda diğer gruplara kıyasla hem seminifer tübüller içerisinde hem tübüller arasında hücre infiltrasyonları ve piknotik hücreler dikkati çekti. Piknotik nükleusların yanısıra, bu grupta seminifer epitelde yer yer hücre

dilatasyonu izlendi. Seminifer tübül lümeni içerisinde yuvarlak şekilli hücre kümeleri gözlemlendi (Şekil 4.6-B).

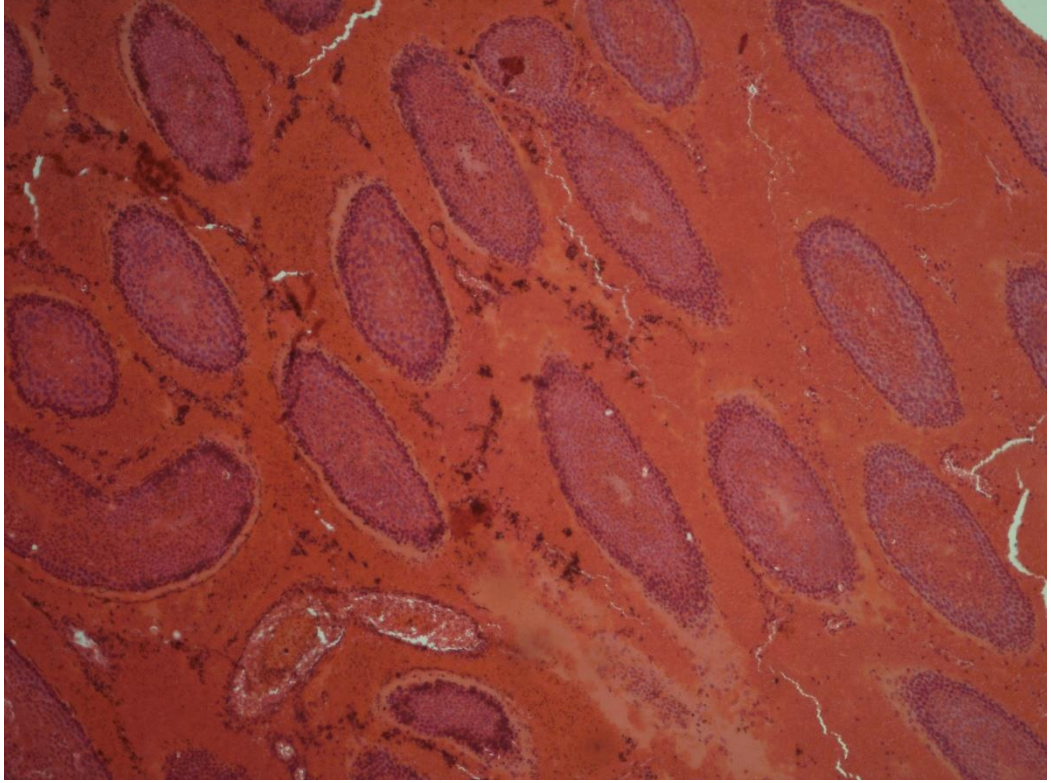
Çizelge 4.5. Histopatolojik bulgular ve hemoraji.

	Sham	TTD	TT+PROK2+TD	TTD+PROK2	p değeri
Hemoraji	0.88±0.50 ^a	2.12±0.62 ^b	1.32±0.26 ^a	1.17±0.28 ^a	<0.001

(Gruplar arası karşılaştırmalar one-way ANOVA testi ile yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında varyansların homojenitesine göre Tamhane's veya Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ort±SS olarak verildi. p<0.05 düzeyi anlamlı kabul edildi)

^a Sham grubu ile benzer (p<0.001)

^b Sham grubuna göre belirgin artış (p<0.001)



Şekil 4.7. TTD grubu ileri düzey hemoraji.

(TTD grubunda bazı deneklerde yoğun hemoraji izlendi. Seminifer tübül lümenlerinin hücre yoğunluğu, tübüllerin birbirinden ayrıldığı ve histolojik bütünlüğün bozulduğu görülmektedir.)

Gruplar arası Johnsen's skorları kıyaslandığında, TTD grubu sham'e kıyasla istatistiksel olarak düşüktü. TT+PROK2+TD ve TTD+PROK2 Johnsen's skoru ise TTD grubuna göre yüksek bulundu (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Johnsen's skoru.

	Sham	TTD	TT+PROK2+TD	TTD+PROK2	p değeri
Johnsen's skoru	9.42±0.15 ^a	7.36±0.5 ^b	8.60±0.59 ^a	8.63±0.77 ^a	<0.001

(Gruplar arası karşılaştırmalar one-way ANOVA testi ile yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında varyanslar homojen olmadığı için Tamhane's testi kullanıldı. Sonuçlar ort±SS olarak verildi. p<0.05 düzeyi anlamlı kabul edildi)

^a Sham grubu ile benzer (p<0.001)

^b Sham grubuna göre belirgin azalış (p<0.001)

4.5. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL SPERMATOGONİA ANALİZİ

Yapılan germ hücre spesifik immünohistokimyasal boyamalar, spermatogonia sayısının hasar grubunda sham'e kıyasla istatistiksel olarak azalmış olduğunu gösterdi (p<0,05). TT+PROK2+TD ve TTD+PROK2 grupları ise hasar grubuna göre yüksek bulundu (p<0,05). Spermatogonia sayımı yapılan aynı tübüllerin çap ölçümleri ve tübül başına düşen ortalama spermatogonia sayısı kıyaslandığında gruplar arası fark gözlenmedi (Çizelge 4.6, Şekil 4.8).

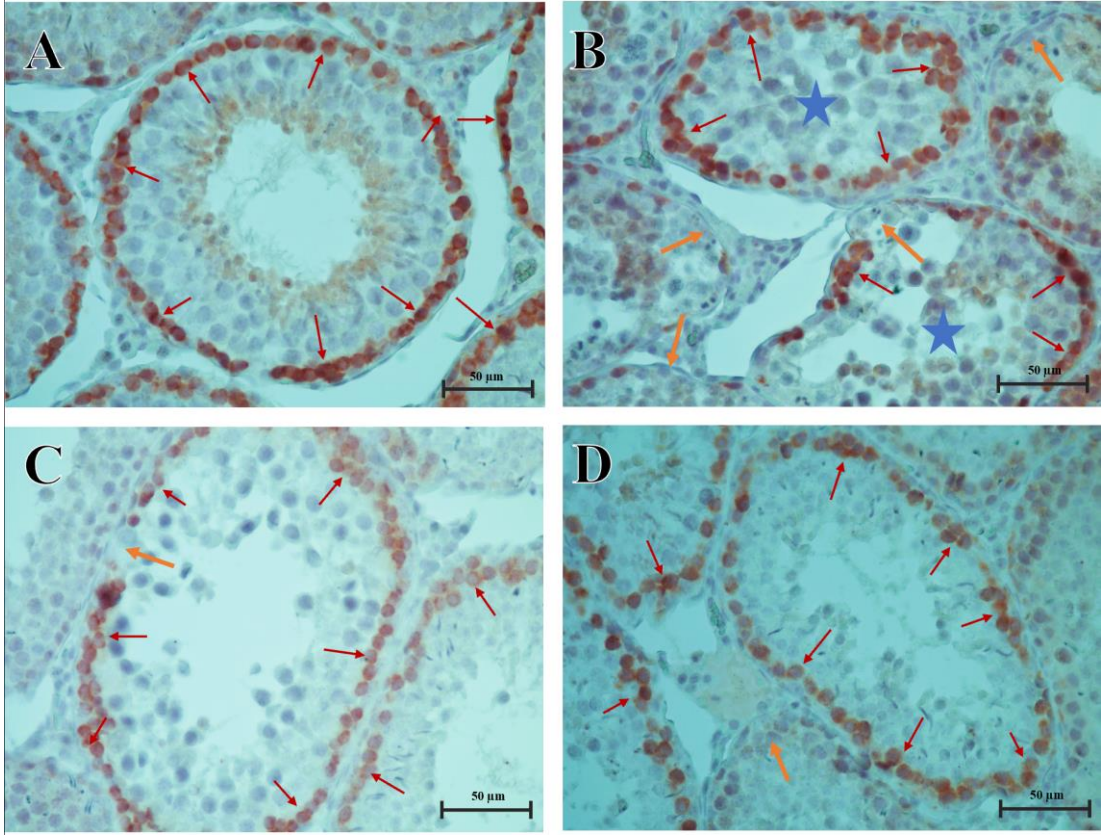
Çizelge 4.6. İmmünohistokimya (spermatogonia) analizi.

Gruplar	Spermatogonia Sayımı	(SPG)	Tübül çapı	SPG/Tübül çapı
Sham	82.33 ± 5.68		55.00 ± 5.12	1.38 ± 1.18
TTD	66.67 ± 5.54 ^a		53.00 ± 4.28	1.27 ± 0.15
TT+PROK2+TD	75 ± 3.52 ^b		54.92 ± 5.66	1.53 ± 0.25
TTD+PROK2	76.33 ± 4.97 ^b		56.00 ± 5.25	1.37 ± 0.14

(Gruplar arası karşılaştırmalar one-way ANOVA testi ile yapıldı. Değişkenlerin çoklu karşılaştırmalarında varyansların homojenitesine göre Tamhane's veya Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ort±SS olarak verildi. p<0.05 düzeyi anlamlı kabul edildi)

^a Sham grubuna göre azalış (p<0.05).

^b TTD grubuna göre artış (p<0.05).



Şekil 4.8. IHC boyamalar.

(**A: Sham**; seminifer tübüller normal histolojik görünümüne sahip ve bazalinde bulunan yoğun MAGE A+ spermatogonia hücreleri (kırmızı renkli oklar ile gösterilmiş) görülmektedir. **B:TTD**; seminifer tübül çapı sham'e göre azalmış, kontürleri düzensiz hale gelmiş ve MAGE A+ spermatogonia hücrelerinin de (kırmızı renkli oklar ile gösterilmiş) daha az olduğu görülmektedir. Oklarla gösterilen Komşu tübüllerde spermatogonia hücrelerinin seyrek olması da dikkat çekicidir. Tübül bazalinde dōşeli spematogoniaların sıklıkla kesintiye uğradığı izlenmektedir (sarı renkli oklar ile gösterilmiş). **C: TT+PROK2+TD** ve **D: TTD+PROK2**; seminifer tübüller her iki grupta da normal histolojik yapıya benzemektedir. Seminifer tübüllerin bazal membranlarında MAGE A+ spermatogonia hücreleri yoğun bir şekilde yer almaktadır (kırmızı renkli oklar ile gösterilmiş). TTD grubundaki gibi bazal membranda bazı yerlerde spermatogonia sayısı kesintiye uğramıştır. MAGE A IHC boyama, 40x.)

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Testiküler torsiyonun; testislerin ve funiculus spermaticus'un rotasyonuna bağlı olarak, etkilenen testisteki vaskülarizasyonun bozulmasına ve testis atrofisine neden olduğu bilinmektedir. Özellikle testisleri besleyen arterlerin anastomoz oluşturmaması ve tunica albuginea adı verilen testiküler tabakanın elastik olmayan yapısı nedeniyle testislerin bu yapısal özellikten dolayı yeterince genişleyememesi testis dokusunu iskemik hasara karşı oldukça duyarlı hale getirir. Testiküler torsiyonun temel patofizyolojisini; testiküler İ/R hasarı oluşturmaktadır (108). Testiküler hasara neden olan faktörler arasında; testiküler torsiyonun derecesi, iskemi ve reperfüzyon aralıklarının süresi, testiküler dokunun hassasiyeti ve İ/R hasarının ciddiyeti gibi maddeler rol oynasa da testiküler hasara neden olan ve bu hasarı önemli ölçüde belirleyen iki faktörden birincisi; belirtilerin başlamasından itibaren funiculus spermaticus'un detorsiyonuna kadar geçen sürenin uzunluğu iken, ikincisi; funiculus spermaticus'un dönme derecesidir (109, 110). Sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen deneysel bir çalışmada 180°, 360° ve 720°'lerdeki testiküler torsiyonlar sonucunda, 180°'lik torsiyonda vasküler anlamdaki akut değişikliklerin görülmediği, 360°'lik torsiyondan sonraki iki saatlik detorsiyon işlemi sonucunda orta şiddette bir iskemi olduğu, 720°'lik torsiyondan sonraki dört saatlik detorsiyon sonucunda ise testis dokusunda tam anlamda bir infarkt olduğu ortaya konmuştur (111). Bu çalışmalar sonucunda ise özellikle 360° ve 720°'lerdeki torsiyonlar sonucunda testiküler hasar ile karşılaşıldığı (112, 113) ve sol testisteki funiculus spermaticus'un uzunluğunun sağ testisteki funiculus spermaticus'un uzunluğuna göre daha fazla olması sebebiyle sol testisin iki kat daha fazla torsiyona uğradığı tespit edilmiştir (114). Yine deneysel olarak Heindel ve ark. (115) tarafından sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada testislerin 360°'lik torsiyona uğraması sonucunda herhangi bir değişikliğe uğramadığı, fakat 720°'lik ve daha fazla açılardaki torsiyon işleminin özellikle fertilité üzerinde olumsuz bir etkiye sahip

olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada klinikte en fazla karşılaşılan türün torsiyon olması ve İ/R hasarı için de olabilecek en uygun modelin olması sebebiyle torsiyon işlemi sol testise uygulanmış ve testiküler hasarlanma için gerekli olan torsiyon derecesi literatür üzerinde de bildirilen 720° olarak seçilmiştir.

İskemi reperfüzyon sürecinde TNF- α , IL-6 ve IL-1 β gibi inflamatuar sitokinlerin serbestleşmesi, nötrofil infiltrasyonu, süper oksit anyonu gibi oksijen radikallerinde artış ve zar lipidlerinin serbest radikallerle yükseltgenmesi sonucunda oluşan lipit peroksitinin, hücresel özellikli yapılar da hasar oluşturduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (74, 116-118). Özellikle torsiyon işlemi ile birlikte meydana gelen oksidatif hasarın detorsiyon işlemi sonrasında testis dokusu üzerinde oksidatif bir stres oluşturması ve bu stresin de spermatozoonların işlevlerini olumsuz yönde etkileyerek sperm fonksiyonlarını zayıflatması; oksidatif stresin testis dokusu üzerindeki etkilerini açıkça göstermektedir (119). Yapılan çok sayıdaki çeşitli çalışmalar; lökosit temelli beyaz kan hücrelerinin ve makrofaj ve IL-1 β gibi biyoaktif maddelerin orşitin (testislerin enfekte olması) oluşmasında ve ilerlemesinde önemli rol oynadığını göstermiştir (120, 121). TTD hasarı sonrasında testis dokusunda inflamasyonun belirgin bir şekilde arttığı, testiküler torsiyon/detorsiyon yapılan gruplarda artan TNF- α ve IL-6 düzeyleri ile de gösterilmiştir (104).

İnflamatuar hastalıklar da dahil olmak üzere testis dokusunun herhangi bir patolojik durumu; testislerin fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilediği gibi testislerde meydana gelen steroidogenezi ve spermatogenezi de olumsuz yönde etkileyerek hem sperm sayısını hem de spermlerin kalitesini azaltır ve böylelikle fertilitiyi bozarak erkek kısırlığı olarak da bilinen varikozel izelgesunu karşımıza çıkartır (122-124).

Salgılayıcı ve proinflamatuar bir madde olan Prokineticin-2 yüksek bir düzeyde primer spermatozoidlerde eksprese edilerek üreme, nöroenez, anjiyenez, hücre g, hücre çoğalması ve apoptoz gibi biyolojik süreçler, inflamasyon sonucunda oluşan iltihabi durumlar ve immün yanıtlarda önemli ölçüde rol oynadığı yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır (100, 125). İskemi sonrası testiküler dokuda oluşan ROS (reaktif oksijen ürünleri), azalan SOD düzeyleri ve artan MDA aktivitesi sonucunda; bu antioksidanlar arasında meydana gelen dengesizlikten doğan oksidatif

stres; sperm sayısını, sperm kalitesini azaltarak ve spermelerin motilitesini bozarak fertilizasyonu olumsuz yönde etkilemekte ve kısırlığa yol açmaktadır (126). Varikoselin patogeneğinde var olan TNF- α , IL-1 α , IL-6 gibi proinflatuar sitokinlerin artış gösterdiği ve bu artışın neden olduğu oksidatif stres varlığında Prokineticin-2'nin; apoptotik sinyalin alınmasından sonraki (proapoptotik) süreçte önemli derecede rol oynadığı gösterilmiştir. Bu özelliğinden dolayı da modölatör ve potansiyel bir biyobelirteç olabileceği ve varikosele karşı yeni bir bakış açısının geliştirilmesinde, anti-inflatuar süreçlerde ve terapötik hedeflerin belirlenmesinde yardımcı olabileceği yine çalışmalarla doğrulanmıştır (127, 128).

Yapılan literatür taraması sonucunda testis iltihabı olarak da bilinen orşitin patogeneğinde, varikoselde olduğu gibi; proinflatuar sitokin dengesizliği, apoptoz, ROS ve antioksidan maddeler arasında meydana gelen dengesizlik ve Prokineticin-2'nin rol oynadığı bulunmuş ve Chen ve ark. (129) tarafından yapılan bir çalışmada Prokineticin-2'nin çoklu proinflatuar etkiler göstererek inflamasyonun düzenlenmesinde ve gelişmesinde önemli rol oynadığı ve bu özelliğini lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı inflamasyonda da gösterdiği bulunmuştur (130-132). Kardiyomiyositlerde hipoksi/reoksijenizasyonun tetiklediği hasara karşı PROK2 tedavisinin hücrelerde oksidatif stresi ve apoptozisi baskılayarak hücreleri hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (133). Buna karşılık E. coli kaynaklı orşitlerin PROK2 antagonisti ile tedavi edilmesi sonucunda testis dokusunda inflamasyonun önemli ölçüde azaldığı da literatürde belirtilmiştir (134). Moschetti ve arkadaşları (135), bortezomib enjeksiyonu ile periferik nöropati oluşturdukları sıçanları Prokineticin reseptör antagonisti uygulayarak 14 gün boyunca tedavi etmişler ve PROK2 aktivasyonunun bloke edilmesinin periferik sinirlerde inflamasyonu azalttığını ifade etmişlerdir.

PROK2'nin in vitro serebral iskemi ve iskemik modellerde de ERK1/2 ve Akt transdüksiyon yollarının aktivasyonu yoluyla endojen bir nöroprotektif faktör olarak görev yapabileceğini gösterilmiştir (136). Bir başka çalışmada ise tam tersi bulgular elde edilmiş ve PROK2'nin serebral iskemide enfarkt hacmini ve inflamasyonu arttırdığı ortaya konulmuştur (137).

Literatürde PROK2'nin inflamasyon ve oksidatif stres üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar da oldukça farklılık göstermektedir. Bu çalışmada torsiyon sırasında ve detorsiyon başlangıcında tek doz PROK2 tedavisinin testis dokusunda meydana gelen torsiyon/detorsiyon hasarını hafiflettiğini gözlemledik. PROK2 ile tedavi ettiğimiz her iki grupta da TNF- α ve IL-6 seviyelerinde belirgin bir azalışa meydana getirerek inflamasyonu hafifletmişti. Ayrıca çalışmamız PROK2'nin iskemik hasar sonrası ortaya çıkan oksidatif stres üzerine de olumlu etkilerini ortaya koymaktadır. PROK2 ile tedavi ettiğimiz sıçanlarda oksidatif stres parametrelerinde belirgin bir iyileşme tespit ettik.

Erkek üreme sistemi üzerinde önemli rolleri olduğu düşünülen PROK2'nin serum testosteron seviyeleri üzerine etkisi de çok az çalışmada değerlendirilmiştir. İntraserebroventriküler olarak uygulanan PROK2'nin sıçanlarda hipotalamus-hipofiz-testis aksını uyararak serum testosteron seviyesini arttırdığı belirtilmiştir (138). Ergenlik çağına girmemiş, koku duyusu olmayan, testosteron ve gonadotropin seviyeleri düşük bir bireyde PROK2 reseptör geninde mutasyon tespit edilmiştir. Bu çalışma da gösteriyor ki PROK2 reseptör geninde meydana gelebilecek bir mutasyon ya da PROK2 ifade seviyesindeki azalma bireyler serum testosteron seviyelerini etkilemektedir (139).

PROK2 tedavisinin iskemik hasar sonrası dokudaki etkilerini histolojik ve immünohistokimyasal analizler ile değerlendiren detaylı bir çalışmaya rastlanılmadı. İntraserebroventriküler uygulanan PROK2'nin sperm konsantrasyonu üzerinde bir değişikliğe neden olmazken testis dokusunda seminifer epitel kalınlığında artışa neden olduğu gösterilmiştir (138). Çalışmamız, testiküler torsiyon/detorsiyon hasarında PROK2 tedavisinin testis dokusundaki değişiklikleri histopatolojik ve histomorfometrik analizlerle detaylı bir şekilde değerlendiren ilk çalışma olması açısından oldukça önemlidir. PROK2 tedavisinin seminifer tübül epitel kalınlığı ve tübül çapı üzerine etkileri değerlendirildiğinde hem seminifer tübül çapında hem de epitel kalınlığında bir artış meydana getirmiştir. TTD grubunda yoğun bir hemoraji görülürken PROK2 tedavisinin hemorajiyi de azalttığı belirlenmiştir. Torsiyon/detorsiyon hasarının şiddetinin gruplar arasındaki farklılıkları Johnsen's skorlaması ile değerlendirildi. PROK2 tedavi ile gruplarda hasar şiddetinde de

belirgin bir iyileşme sağladığı tespit edildi. Ayrıca çalışmamız, immünohistokimyasal analizlerle daha da detaylandırıldı. Spermatogonia hücrelerine spesifik antikorlar kullanılarak yapılan immünohistokimyasal analizlerde spermatogonia sayısı, spermatogoniaların tübül çapı ve spermatogonia sayısının tübül çapına oranını değerlendirildi. Testiküler torsiyon/detorsiyon hasarında azalan spermatogonia sayısının PROK2 tedavisi ile arttığı görüldü. Elde ettiğimiz tüm bu sonuçlar, PROK2'nin testiküler torsiyon/detorsiyon hasarının iyileştirilmesinde önemli roller oynayabileceğini düşündürmektedir.

BÖLÜM 6

SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatürde PROK2'nin fizyolojik etkilerini inceleyen çalışmalarda çok farklı sonuçların ortaya konulduğu görüldü. PROK2'nin İ/R hasarı üzerine etkilerini değerlendiren çok az çalışma yer almaktaydı. Bu tez çalışması, testiküler torsiyon/detorsiyon hasarında PROK2'nin oksidatif stres, inflamasyon ve testis morfolojisi üzerine etkilerini detaylı bir şekilde inceleyen ilk çalışma olması açısından önemlidir. Literatürde yer alan çalışmalarda hem oksidatif stres hem de inflamasyon süreçlerinde PROK2'nin etkileri ile ilgili ortaya konulan bulgular oldukça çelişkilidir. Bu nedenle de bu anlamda çok daha fazla çalışma yaparak PROK2'nin etkilerinin çok daha net bir şekilde ortaya koyulması gerektiğini düşünmekteyiz. Çalışmamızın sonuçları PROK2'nin antioksidatif ve antiinflamatuvar özellikler göstererek torsiyon/detorsiyon hasarını iyileştirmede önemli bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir. Sonuçlarımızın bu anlamda yapılacak birçok yeni çalışma için önemli bir kaynak olacağı ve katkı sağlayacağı şüphesizdir. Farklı iskemi/reperfüzyon hasarlarında ve toksik maddelerin dokularda meydana getirdiği hasarlarda PROK2'nin olası koruyucu etkileri mutlaka yeni çalışmalarla ortaya koyulmalıdır. Şüphesiz ki literatürde önemli rolleri olduğu belirtilen ve yeni bir peptid olan PROK2'nin etkilerinin detaylı bir şekilde sunulabilmesi için bu konuda yapılacak çok daha fazla çalışmaya gerek duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kylat RI, Ahmed MN. Neonatal testicular torsion. *Afr J Paediatr Surg.* 2022;19(1):1-4.
2. Jacobsen FM, Rudlang TM, Fode M, Ostergren PB, Sonksen J, Ohl DA, et al. The Impact of Testicular Torsion on Testicular Function. *World J Mens Health.* 2020;38(3):298-307.
3. Ringdahl E, Teague L. Testicular torsion. *American family physician.* 2006;74(10):1739-43.
4. Meštrović J, Pogorelić Z, Drmić-Hofman I, Vilović K, Todorčić D, Popović M. Protective effect of urapidil on testicular torsion–detorsion injury in rats. *Surgery today.* 2017;47:393-8.
5. AYDOĞDU N, KAYMAK K, YALÇIN Ö. Sıçanlarda böbrek iskemisi/reperfüzyon hasarında nasetilsisteinin etkileri. *Fırat Tıp Dergisi.* 2005;10(4):151-5.
6. Lattanzi R, Miele R. Non-Peptide Agonists and Antagonists of the Prokineticin Receptors. *Curr Issues Mol Biol.* 2022;44(12):6323-32.
7. Maftai D, Vellani V, Artico M, Giacomoni C, Severini C, Lattanzi R. Abnormal Pain Sensation in Mice Lacking the Prokineticin Receptor PKR2: Interaction of PKR2 with Transient Receptor Potential TRPV1 and TRPA1. *Neuroscience.* 2020;427:16-28.
8. Petrella C, Spaziani M, D'Orazi V, Tarani L, Terracina S, Tarani F, et al. Prokineticin 2/PROK2 and Male Infertility. *Biomedicines.* 2022;10(10).
9. Brouillet S, Hoffmann P, Alfaidy N, Feige JJ. [Prokineticins: new regulatory peptides in human reproduction]. *Med Sci (Paris).* 2014;30(3):274-9.
10. LeCouter J, Lin R, Tejada M, Frantz G, Peale F, Hillan KJ, et al. The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2685-90.
11. Maldonado-Pérez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(2):66-72.
12. Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou QY. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science.* 2005;308(5730):1923-7.

13. Frydman R, Grynberg M. Introduction: Male fertility preservation: innovations and questions. *Fertil Steril*. 2016;105(2):247-8.
14. Titi-Lartey OA, Khan YS. Embryology, Testicle. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2024.
15. Haseltine FP, Ohno S. Mechanisms of gonadal differentiation. *Science*. 1981;211(4488):1272-8.
16. McLaren A. Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. *Bioessays*. 1991;13(4):151-6.
17. TOKMAK A, SARIKAYA E. Mülleryan Kanal Anomalileri. *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*. 2015;12(2):83-8.
18. Demirtaş A, Pişkin İ. Memelilerde cinsiyet gelişimi ve hormonal kontrolü. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*. 2009;80(3):23-8.
19. Pilmane M, Plavina L, Kavak V. Embriology and Anatomy for Healty Sciences. Riga Stradins University, Riga, Latvia, ISBN 978-9984-793-91-7 2016. 2016.
20. Kavak V. TESTİS (ORCHİS) ANATOMİSİ. ÇOCUK VE ERGENLERDE GONAD HASTALIKLARI.5.
21. Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister LH. *Gray's Anatomy*. Churchill Livingstone. Edinburgh-London-Melbourne-New York. 1989.
22. Dogra VS, Gottlieb RH, Oka M, Rubens DJ. Sonography of the scrotum. *Radiology*. 2003;227(1):18-36.
23. Atal S. Erişkin erkek sıçanlarda metotreksat kaynaklı testis hasarında kurkuminin etkisi: Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2014.
24. Netter FH. *Netter's atlas of human anatomy*: Saunders Elsevier; 2010.
25. YURTCU A, ILGAZ C. HİPERTERMİNİN DUKTUS EPİDİDİMİS YAPISINA ETKİSİ. 2011.
26. YILMAZ S, SOFİKERİM M, Niyazi A, NİSARİ M, DEDEOĞLU F, ERTEKİN T, et al. İNTRAABDOMİNAL İNMEMİŞ TESTİS OLGUSU. *Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2017;26(3):291-3.
27. Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF, et al. Targeted disruption of the *Ins13* gene causes bilateral cryptorchidism. *Molecular endocrinology*. 1999;13(5):681-91.
28. Standring S, Gray H. *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. (No Title). 2022.
29. Aktümsek A. *Anatomi ve fizyoloji:(insan biyolojisi)*: Nobel Yayın Dağıtım; 2004.

30. Favorito LA, Riberio Julio-Junior H, Sampaio FJ. Relationship between Undescended Testis Position and Prevalence of Testicular Appendices, Epididymal Anomalies, and Patency of Processus Vaginalis. *Biomed Res Int.* 2017;2017:5926370.
31. Martinez-Berganza M, Sarria L, Cozcolluela R, Cabada T, Escolar F, Ripa L. Cysts of the tunica albuginea: sonographic appearance. *AJR American journal of roentgenology.* 1998;170(1):183-5.
32. Bayatli F. Torsiyon detorsiyon sonucunda sıçan testisinde oluşan hasar üzerine üzüm çekirdeği ekstresinin etkilerinin araştırılması: Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
33. Sarsılmaz M. İnsan Anatomisi, Akademi Basın ve yayıncılık. İstanbul; 2014.
34. Helfenberg K. The analysis of beeswax and propolis. *Chemiker Zeitungm.* 1908;31:987-98.
35. Jarow JP. Intratesticular arterial anatomy. *J Androl.* 1990;11(3):255-9.
36. Ozdemir MB, Celik HH, Aldur MM. Altered course of the right testicular artery. *Clin Anat.* 2004;17(1):67-9.
37. Topcu T. Bisfenol A uygulanan Wistar Albino sıçanlarda testis histolojisi e apoptoz üzerine likopenin etkisi: Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
38. Agger P. Scrotal and testicular temperature: its relation to sperm count before and after operation for varicocele. *Fertil Steril.* 1971;22(5):286-97.
39. Lennox B, Ahmad K. The total length of tubules in the human testis. *Journal of anatomy.* 1970;107(Pt 1):191-.
40. Pathology B, Kumar C, Türkcisi R. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti Temmuz. 2000;2:283-9.
41. Sobotta J. Sobotta atlas of human anatomy I: Williams & Wilkins; 2001.
42. Taşci A. Testis torsiyonu sonrasında detorsiyon+ fiksasyon ve orşiektominin testisler üzerine etkilerinin deneysel olarak araştırılması.
43. Jangueria L, Carneiro J, Kelley O. Temel histoloji (Çev: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B.). Barış kitabevi. 1998:407-22.
44. Aydın S. İnsan anatomisi ve fizyolojisi: Anadolu Üniversitesi; 2000.
45. Johnson KE. Histology and embryology. (No Title). 1984.
46. Gartner P. HJ. Color Text Book of Histology. 3. Baskı. Philadelphia, WB Saunders Co; 2006.
47. Aydıner ÇY. Deneysel testis torsiyonunda doku hasarının önlenmesinde N-asetilsisteinin rolü. 2005.

48. Junqueira L, Carneiro J. Temel histoloji (Çev. Y. Aytekin & S. Solakoğlu). Nobel Tıp Kitabevleri. 2006.
49. KURUŞ M. HİSTOLOJİ Teknikler-Hücre-Doku-Sistemler Moleküller-Laboratuar-Klinik Yönleriyle Yaklaşımlar: Akademisyen Kitabevi; 2020.
50. Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. Text/atlas of histology. (No Title). 1988.
51. Skakkebek NE, Hammen R, Philip J, Rebbe H. QUANTIFICATION OF HUMAN SEMINIFEROUS EPITHELIUM: III. Histological Studies in 44 Infertile Men with Normal Chromosome Complements. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section A Pathology. 1973;81(2):97-111.
52. Hadžiselimović F, Snyder H, Duckett J, Howards S. Testicular histology in children with unilateral testicular torsion. The Journal of urology. 1986;136(1):208-10.
53. Neutra M, Padykula H. Histology, Cell and Tissue Biology. Elsevier Biomedical: New York; 1983.
54. Fawcett D. Bloom and fawcett. A Text Book of Histology. 1994.
55. Farooqui M, Chandrapal A, Prakash A. Histological and histochemical studies on the prenatal development of testis in goat (Capra hircus). International Journal of Morphology. 2012;30(4):1408-21.
56. Dym M, Djakiew D, Hadley M, Byers S. The Blood-Testis Barrier in Culture. Annals of the New York Academy of Sciences. 1987;513(1):405-8.
57. Krarup T. The testes after torsion. British journal of urology. 1978;50(1):43-6.
58. Noske H-D, Kraus SW, Altinkilic BM, Weidner W. Historical milestones regarding torsion of the scrotal organs. The Journal of urology. 1998;159(1):13-6.
59. Napolez A. Unilateral testicular torsion in a neonate. The American journal of emergency medicine. 2001;19(6):524-5.
60. Driver, Losty. Neonatal testicular torsion. British journal of urology. 1998;82(6):855-8.
61. Bartsch G, Marberger H, Mikuz G. Testicular torsion: late results with special regard to fertility and endocrine function. The Journal of Urology. 1980;124(3):375-8.
62. Melekos MD, Asbach HW, Markou SA. Etiology of acute scrotum in 100 boys with regard to age distribution. The Journal of urology. 1988;139(5):1023-5.
63. Cuckow P, Frank J. Torsion of the testis. BJU international. 2000;86(3):349-53.

64. Williamson R. Torsion of the testis and allied conditions. *British Journal of Surgery*. 1976;63(6):465-76.
65. Yildiz M. Ratlarda testis iskemi-reperfüzyon hasarında pyrrolidine dithiocarbamatem etkinliği.
66. Barada JH, Weingarten JL, Cromie WJ. Testicular salvage and age-related delay in the presentation of testicular torsion. *The Journal of urology*. 1989;142(3):746-8.
67. Shukla R, Kelly D, Daly L, Guiney E. Association of cold weather with testicular torsion. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982;285(6353):1459-60.
68. Khatun P, Das K. Gross Anatomy of epididymis and ductus deferens of adult Khaki Campbell duck (*Anas platyrhynchos domesticus*) in Bangladesh. *Journal of Bioscience and Agriculture Research*. 2019;22(01):1805-9.
69. Bowlin PR, Gatti JM, Murphy JP. Pediatric Testicular Torsion. *Surg Clin North Am*. 2017;97(1):161-72.
70. Hayri Bektaş M. Deneysel testiküler iskemi reperfüzyon modelinde farklı iki dozda uygulanan deksmedetomidinin etkisinin araştırılması: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2011.
71. Turner TT, Brown KJ. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biol Reprod*. 1993;49(2):401-7.
72. Prater JM, Overdorf BS. Testicular torsion: a surgical emergency. *American family physician*. 1991;44(3):834-40.
73. Becker EJ, Jr., Turner TT. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *J Androl*. 1995;16(4):342-51.
74. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*. 2001;53(1):135-59.
75. Hinman Jr F, Smith GI. Spermatogenesis following experimental testicular ischemia. *Fertility and Sterility*. 1955;6(5):443-9.
76. Witherington R, Jarrell TS. Torsion of the spermatic cord in adults. *J Urol*. 1990;143(1):62-3.
77. Estremadoyro V, Meyrat BJ, Birraux J, Vidal I, Sanchez O. [Diagnosis and management of testicular torsion in children]. *Rev Med Suisse*. 2017;13(550):406-10.
78. Jones DJ. Recurrent subacute torsion: prospective study of effects on testicular morphology and function. *J Urol*. 1991;145(2):297-9.

79. Riaz-Ul-Haq M, Mahdi DE, Elhassan EU. Neonatal testicular torsion; a review article. *Iran J Pediatr.* 2012;22(3):281-9.
80. Bowlin PR, Gatti JM, Murphy JP. Pediatric testicular torsion. *Surgical Clinics.* 2017;97(1):161-72.
81. Kass EJ, Lundak B. The acute scrotum. *Pediatr Clin North Am.* 1997;44(5):1251-66.
82. Dresner ML. Torsed appendage. Diagnosis and management: blue dot sign. *Urology.* 1973;1(1):63-6.
83. Edelsberg JS, Surh YS. The acute scrotum. *Emerg Med Clin North Am.* 1988;6(3):521-46.
84. Toker A, Demiray M, ÜNİÜEr SE, KoÇAslan R, ÖZcan E, ToktaŞ GM, et al. Apendiks testis torsiyonu: Olgu sunumu. *İstanbul Tıp Dergisi.* 2012;13(1):36-8.
85. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *Journal of Investigative Surgery.* 2009;22(1):46-55.
86. Cotran RS, Robbins SL, Kumar V. *Temel Patoloji Basic Pathology.* Nobel Tıp Kitabevleri. 2000;7:294-8.
87. Davies S, Reichardt-Pascal S, Vaughan D, Russell G. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Experimental nephrology.* 1995;3(6):348-54.
88. 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.
89. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundamental & clinical pharmacology.* 2001;15(5):293-306.
90. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society.* 1992;32(S1):S33-S42.
91. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Universitatis Carolinae Medica Monographia.* 1990;137:1-53.
92. Langer JC, Sohal SS, Blennerhassett P. Mucosal permeability after subclinical intestinal ischemia-reperfusion injury: an exploration of possible mechanisms. *Journal of pediatric surgery.* 1995;30(4):568-72.

93. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion J, Gough M. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *European journal of vascular and endovascular surgery*. 1997;14(3):195-203.
94. Hang LH, Luo H, Li SN, Shu WW, Chen Z, Chen YF, et al. Involvement of Spinal Bv8/Prokineticin 2 in a Rat Model of Cancer-Induced Bone Pain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015;117(3):180-5.
95. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, et al. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*. 2001;412(6850):877-84.
96. Agerberg G, Helkimo M. Symptomatology of patients referred for mandibular dysfunction: evaluation with the aid of a questionnaire. *Cranio*. 1987;5(2):157-63.
97. Su Y, Zhang Y, Hu Z, He L, Wang W, Xu J, et al. Prokineticin 2 via calcium-sensing receptor activated NLRP3 inflammasome pathway in the testicular macrophages of uropathogenic *Escherichia coli*-induced orchitis. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:570872.
98. Matsumoto S-i, Yamazaki C, Masumoto K-h, Nagano M, Naito M, Soga T, et al. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(11):4140-5.
99. Dodé C, Rondard P. PROK2/PROKR2 signaling and Kallmann syndrome. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4:19.
100. Ng KL, Li J-D, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou Q-Y. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science*. 2005;308(5730):1923-7.
101. Pitteloud N, Boepple PA, DeCruz S, Valkenburgh SB, Crowley Jr WF, Hayes FJ. The fertile eunuch variant of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: spontaneous reversal associated with a homozygous mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(6):2470-5.
102. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li J-D, Raivio T, Cole LW, et al. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(44):17447-52.
103. Fiore M, Tarani L, Radicioni A, Spaziani M, Ferraguti G, Putotto C, et al. Serum prokineticin-2 in prepubertal and adult Klinefelter individuals. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2021;100(2):151-7.
104. Yilmaz N, Hudaykuhiyeva J, Gul S. Phoenixin-14 may ameliorate testicular damage caused by torsion-detorsion by reducing oxidative stress and inflammation in prepubertal rats. *Tissue & cell*. 2024;88:102405.

105. Burroughs S, Schwindinger WF, Venditti JJ, Trautwein T, Dalsania A, Klingerman CM. Prokineticin-2 and ghrelin robustly influence the sexual and ingestive behaviors of female Syrian hamsters. *Horm Behav.* 2018;106:135-43.
106. 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.
107. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones.* 1970;1(1):2-25.
108. Karaguzel E, Kadihasanoglu M, Kutlu O. Mechanisms of testicular torsion and potential protective agents. *Nature reviews Urology.* 2014;11(7):391-9.
109. Drlik M, Kocvara R. Torsion of spermatic cord in children: a review. *J Pediatr Urol.* 2013;9(3):259-66.
110. 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.
111. Turner TT. Acute experimental testicular torsion. No effect on the contralateral testis. *J Androl.* 1985;6(1):65-72.
112. Hutson M. Undescended testis, torsion and varicocele. *Pediatric surgery.* 1998.
113. Rowe HM. *Essentials of pediatric surgery.* (No Title). 1994.
114. Fonkalsrud EW. Testicular undescend and torsion. *Pediatr Clin North Am.* 1987;34(5):1305-17.
115. Heindel RM, Pakyz RE, Reinking LN, Cosentino MJ. The effect of various degrees of unilateral spermatic cord torsion on fertility in the rat. *The Journal of urology.* 1990;144(2):366-9.
116. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med.* 2004;25(1-2):199-210.
117. Cadenas E. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology:* Springer; 1995. p. 1-61.
118. Zar HA, Tanigawa K, Kim Y-M, Lancaster Jr JR. Rat liver postischemic lipid peroxidation and vasoconstriction depend on ischemia time. *Free Radical Biology and Medicine.* 1998;25(3):255-64.
119. 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.

120. Schuppe HC, Meinhardt A, Allam J, Bergmann M, Weidner W, Haidl G. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia*. 2008;40(2):84-91.
121. Guazzone VA, Jacobo P, Theas MS, Lustig L. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: a brief review. *Microscopy research and technique*. 2009;72(8):620-8.
122. O'Bryan MK, Schlatt S, Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP. Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology*. 2000;141(1):238-46.
123. Reddy MM, Mahipal SV, Subhashini J, Reddy MC, Roy KR, Reddy GV, et al. Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. *Reproductive Toxicology*. 2006;22(3):493-500.
124. Haidl G, Allam J, Schuppe HC. Chronic epididymitis: impact on semen parameters and therapeutic options. *Andrologia*. 2008;40(2):92-6.
125. Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Melchiorri P. Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. *Life sciences*. 2007;81(14):1103-16.
126. Li Y, Zhou T, Su Y-F, Hu Z-Y, Wei J-J, Wang W, et al. Prokineticin 2 overexpression induces spermatocyte apoptosis in varicocele in rats. *Asian Journal of Andrology*. 2020;22(5):500-6.
127. Choi WS, Kim SW. Current issues in varicocele management: a review. *The world journal of men's health*. 2013;31(1):12.
128. Negri L, Ferrara N. The prokineticins: neuromodulators and mediators of inflammation and myeloid cell-dependent angiogenesis. *Physiological reviews*. 2018;98(2):1055-82.
129. Chen B, Yu L, Wang J, Li C, Zhao K, Zhang H. Involvement of prokineticin 2 and prokineticin receptor 1 in lipopolysaccharide-induced testitis in rats. *Inflammation*. 2016;39:534-42.
130. Martucci C, Franchi S, Giannini E, Tian H, Melchiorri P, Negri L, et al. Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, induces a proinflammatory phenotype of mouse macrophages. *British journal of pharmacology*. 2006;147(2):225-34.
131. Giannini E, Lattanzi R, Nicotra A, Campese AF, Grazioli P, Screpanti I, et al. The chemokine Bv8/prokineticin 2 is up-regulated in inflammatory granulocytes and modulates inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(34):14646-51.
132. Franchi S, Giannini E, Lattuada D, Lattanzi R, Tian H, Melchiorri P, et al. The prokineticin receptor agonist Bv8 decreases IL-10 and IL-4 production in mice

- splenocytes by activating prokineticin receptor-1. *BMC immunology*. 2008;9:1-13.
133. Su G, Sun G, Liu H, Shu L, Zhang W, Liang Z. Prokineticin 2 relieves hypoxia/reoxygenation-induced injury through activation of Akt/mTOR pathway in H9c2 cardiomyocytes. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2020;48(1):345-52.
 134. Li Y, Su Y, Zhou T, Hu Z, Wei J, Wang W, et al. Activation of the NLRP3 Inflammasome Pathway by Prokineticin 2 in Testicular Macrophages of Uropathogenic *Escherichia coli*- Induced Orchitis. *Front Immunol*. 2019;10:1872.
 135. Moschetti G, Amodeo G, Maftai D, Lattanzi R, Procacci P, Sartori P, et al. Targeting prokineticin system counteracts hypersensitivity, neuroinflammation, and tissue damage in a mouse model of bortezomib-induced peripheral neuropathy. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):89.
 136. Landucci E, Lattanzi R, Gerace E, Scartabelli T, Balboni G, Negri L, et al. Prokineticins are neuroprotective in models of cerebral ischemia and ischemic tolerance in vitro. *Neuropharmacology*. 2016;108:39-48.
 137. Cheng MY, Lee AG, Culbertson C, Sun G, Talati RK, Manley NC, et al. Prokineticin 2 is an endangering mediator of cerebral ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(14):5475-80.
 138. Yilmaz N, Yildiz A. Intracerebroventricular PROK2 infusion could increase the secretion of male reproductive hormones by stimulating the HPG axis. *Mol Biol Rep*. 2024;51(1):656.
 139. Sinisi AA, Asci R, Bellastella G, Maione L, Esposito D, Elefante A, et al. Homozygous mutation in the prokineticin-receptor2 gene (Val274Asp) presenting as reversible Kallmann syndrome and persistent oligozoospermia: case report. *Hum Reprod*. 2008;23(10):2380-4.

EK AÇIKLAMALAR A.

ETİK KURUL İZİNİ

Evrak Tarih ve Sayısı: 28.03.2023 - E.233032



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

Sayı : E-55212866-050.99-233032
Konu : Etik Kurul İzni Hakkında.(2023/3/6
Sayılı Karar)

28.03.2023

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ

Karabük Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna proje yöneticisi olarak sunmuş olduğunuz "*Prepubertal Sıçanlarda Protekineticin-2'nin Testis Torsiyon/Detorsiyon Hasarı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi* " başlıklı Yüksek Lisans projeniz 28.03.2023 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. Bilgilerimi rica ederim.

Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR
Kurul Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu: BSC606KBNL

Belge Doğrulama Adresi : <https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=4043&eD=BSU606K5MF&eS=233032>

Adres: Karabük Üniversitesi Demir Çelik Kampüsü Merkez/Karabük

Bilgi için: Beyza Nur KALAYCI

Telefon: 444 0478

Unvanı: Memur

e-Posta: iletisim@karabuk.edu.tr İnternet Adresi: <http://www.karabuk.edu.tr>

Kep Adresi: karabukuniversitesi@hs01.kep.tr



ÖZGEÇMİŞ

İlayda ATAY ilk, orta ve lise'yi Karabük'te derecelikle bitirdi. 2015-2017 yılları arasında Başkent Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu'ndan "Yüksek Onur" derecesiyle mezun oldu. Ardından 2018-2021 yılları arasında Karabük Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Fizyoterapi ve Rehabilitasyon bölümünü de "Yüksek Onur" derecesiyle tamamladıktan sonra Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.