T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA TESTİSLERDEKİ İSKEMİ- REPERFÜZYON HASARININ İNCELENMESİNDE ANASON'UN KORUYUCU ETKİLERİ

EDA YILDIZHAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN: PROF. DR. MURAT AKKUŞ

DİYARBAKIR

2022

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA TESTİSLERDEKİ İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ İNCELENMESİNDE ANASON'UN KORUYUCU ETKİLERİ

EDA YILDIZHAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN: PROF. DR. MURAT AKKUŞ

DİYARBAKIR

2022

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından **TIP.21.008** Numaralı proje ile desteklenmiştir.

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı** doktora öğrencisi **Eda Yıldızhan**'ın hazırladığı **"Ratlarda Testislerdeki İskemi-Reperfüzyon Hasarının İncelenmesinde Anason'un Koruyucu Etkileri"** başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 09/05/2022

Danışman: **Prof. Dr. Murat AKKUŞ** **İmza**

Jüri Üyeleri

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Murat AKKUŞ ……..

Üye: Prof. Dr. Engin DEVECİ …….

Üye: Prof. Dr. Mehmet Cudi TUNCER …….

Üye: Prof. Dr. Özlem Durin DABAK …….

Üye: Doc. Dr. Tuncay KULOĞLU ……..

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun …/…/… ve … sayılı kararıyla onaylanmıştır.

… /.../…

Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYAN

Bu doktora tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

09/05/2022

Eda YILDIZHAN

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin her aşamasında ve yüksek lisans eğitimim süresince, eğitim hayatıma büyük katkıları olan, herzaman yanımda olan ve bana her daim zaman ayıran ve beni destekleyen, ilgi ve bilgisini benden esirgemeyen, başta danışmam hocam sayın Prof. Dr. Murat AKKUŞ'a,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bana aktaran,eğitim sürecimde bana yol gösteren ve her zaman yanımda olan, eş danışmanım olarak gördüğüm, değerli hocam Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Engin DEVECİ'ye,

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın çok değerli ve kıymetli hocaları Prof. Dr. Sevda SÖKER'e, Prof. Dr. Ayfer AKTAŞ'a, Prof. Dr. Selçuk TUNİK'e, Doç. Dr. Cenap EKİNCİ'ye ve Dr. Öğr. Üyesi Ebru GÖKALP ÖZKORKMAZ'a,
Tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, ilgi, öneri ve yardımlarıyla, eğitim hayatıma büyük katkıları olan, Genel Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Burak Veli ÜLGER'e,
Tez izleme komisyonunda yer alarak katkılarını esirgemeyen Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi ve bölüm başkanı Prof. Dr. Mehmet Cudi TUNCER'e,
Tez çalışmamın yürütülmesi konusunda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve herdaim yanımda olarak bana destek olan arkadaşım ve aynı zamanda bölümümüzün Araştırma Görevlisi Fırat AŞIR'a,
Tez çalışma sürecimde desteklerini esirgemeyen bölümümüz asistanları Süreyya ÖZDEMİR BAŞARAN'a,
İlgisi ve özverisini herzaman hissettiğim, yaptığı fedakarlıklarla desteğini esirgemeyen mesai arkadaşım Mine ÇELİK'e,
Tez çalışmamız sırasında bilimsel desteğini esirgemeyen Diyarbakır Tarım Meslek Yüksekokulu, Organik Tarım Bölümü hocası Prof. Dr. Özlem TONÇER'e
Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve her daim yoluma ışık tutan rahmetli babama, herzaman yanımda olup attığım her adımda arkamda durarak beni destekleyen eşim İbrahim YILDIZHAN'a ve dünyadaki en kıymetli varlığım olan kızım Şebnem Şimal YILDIZHAN'a,
Ve bu tezde emeği geçen ve ismini sayamadığım tüm özel ve tüzel kişiliklere teşekkürü bir borç bilir ve sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığınca **TIP.21.008** numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1.Beyan	**i**
2.Teşekkür	**ii**
3.İçindekiler	**iii**
4.Kısaltma ve Simgeler Listesi	**iv**
5.Şekiller Listesi	**vii**
6.Tablolar Listesi	**xi**
7.Grafikler	**xi**
8.Özet	**1**
9.İngilizce Özet	**3**
10.Giriş ve Amaç	**5**
11.Genel Bilgiler	**7**
12.İskemi Reperfüzyon	**19**
13.Serbest Oksijen Radikalleri	**22**
14.Anason	**26**
15.Gereç ve Yöntem	**31**
16.Bulgular	**43**
17.Tartışma	**74**
18.Sonuç	**77**
19.Kaynaklar	**79**
20.Özgeçmiş	**94**
21.Ekler	**96**

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

c AMP: Siklik adenozinmonofosfat

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

IL-1β: İnterlökin- 1 βeta

TNF-α: Tümör Nekrotizan Faktör–α

DNA: Deoksiribonükleik asit

NO: Nitrik Oksit

AMH: Anti Müllerian Hormon

TBF: Testis Belirleyici Faktör

SRY: SexDeterminingRegion on the Y chromosome

hCG: KoryonikGonadotropin Hormon

g: gram

cm: santimetre

m: metre

µm: Mikrometre

FSH: Folikül Stimülan Hormon

ABP: Androjen Bağlayıcı Protein

H&E: Hematoksilen& Eozin

nm: Nanometre

GER: GranüllüEndoplazmikRetikulum

EM: Elektron Mikroskobu

AGER: Agranüler Endoplazmik Retikulum

ICSH: Interstisyel Cell Stimülan Hormon

mg: miligram

AMP: Adenozinmonofosfat

LH: Luteinleştirici Hormon

TEM: TransmissionElektron Mikroskobu

ATP: Adenozintrifosfat

ADP: Adenozindifosfat

Na^+: Sodyum

K^+: Postasyum

CO_2: Karbondioksit

H_2CO_3: Karbonikasit

Ca^{++}: Kalsiyum

SOR: Serbest Oksijen Radikalleri

SOD:SüperoksitDismutaz

H_2O_2: Hidrojen peroksit

O_2: Oksijen

LP: Lipit peroksidasyonu

I/R: İskemireperfüzyon

PMNL: Polimorfnüveli lökositler

OH^-: Hidroksil

GP: Glutatyon peroksidaz

mm: milimetre

DÜHADEK: Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

DÜSAM: Dicle Üniveritesi Sabahattin Payzın Araştırma Merkezi

°C: Santigrat derece

p.o.: peroral

mL: mililitre

L: Litre

kg: kilogram

dak: dakika

ı.m.: intramüsküler

ı.p.: intraperitonal

TAS: Toplam Antioksidan Kapasitesi

TOS: Toplam Oksidan Kapasitesi

TAİ: Toplam Ağırlık İndeksi

PAS: Periyodik asit- Schiff

µmol: Mikromolar

mmol: Milimolar

WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Erkek genitalsistemi'nin genel görünümü

Şekil 2. Testislerin embriyonik gelişim sırasındaki evreleri

Şekil 3. Seminifertübüllerin, Sertoli hücrelerinin histolojik olarak genel görünümü. Boyama: Hematoksilen&Eozin (H&E)

Şekil 4. Spermatogenik hücrelerin dizilimi ve Sertoli hücreleri ile aralarındaki ilişkiler

Şekil 5. Leydig hücresinin Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) görüntüsü. Reinke kristalleri (ok) ve mitokondri (ok başı)

Şekil 6. Serbest Oksijen radikallerinin hücrelerde oluşturduğu hasarın şematik yapısı

Şekil 7. Serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki denge

Şekil 8. Anason bitkisinin çiçek açmış görünümü

Şekil 9. Anason bitkisine ait tohumların kurutulmuş görünümü

Şekil 10. Deney hayvanlarına uygulanan iskemi-reperfüzyon hasarının aşamaları.

Şekil 11. TAS değerlerinin homojenlik analiz grafiği (μmol/L).

Şekil-12. Atrofik (siyah ok) ve normal görünümdeki testis dokuları (kırmızı ok).

Şekil 13. Kontrol grubuna ait testis dokusunun transversal kesiti. Lümene yakın serbest halde dolaşan spermiyumlar (yeşil ok), normal görünümlü Leydig hücreleri (sarı ok) (H&E, Bar 50 μm).

Şekil 14. Kontrol grubuna ait testis dokusu. Normal görünümlü seminifer tübüller (S), normal kalınlıkta bazal membran (siyah ok) (PAS, Bar: 50 μm).

Şekil 15. Anason grubuna ait testis dokusunun transversal kesiti. Normal görünümlü seminifer tübüller, lümende serbest halde dolaşan spermiyumlar (yeşil ok), normal görünümlü Leydig hücreleri (sarı ok) (H&E, Bar 50 μm).

Şekil 16. Anason grubuna ait testis dokusu. Normal görünümlü seminifer tübül (S), normal kalınlıkta bazal membran (siyah ok) (PAS, Bar: 50 μm).

Şekil 17. İskemi reperfüyon (I/R) grubuna ait testis dokusunun transversal kesiti. Genel olarak seminifer tübül bütünlüğünde dejenerasyon (S), piknotik spermatogonia hücreleri (turuncu ok) (H&E, Bar 50µm).

Şekil 18. İskemi reperfüyon (I/R) grubuna ait testis dokusu. Bazal membran kalınlığında artış (siyah ok) (PAS, Bar: 50 µm).

Şekil 19. Anason+I/R uygulanan testislerin transversal kesiti. I/R grubuna göre daha az dejenere seminifer tübüller (S), konjesyon (beyaz ok), interstisyel ödem (mavi ok) (H&E, Bar 50 µm).

Şekil 20. Anason+I/R grubuna ait testis dokusu. Bazal membran kalınlığında artış (siyah ok), (PAS, Bar: 50 µm).

Şekil 21. I/R+Anason grubuna ait testis dokusunun transversal kesiti. Seminifer tübül bütünlüğünde dejenerasyon ve kopma (siyah ok), normal görünümlü Leydig hücreleri (sarı ok) (H&E, Bar 50 µm).

Şekil 22. I/R+ Anason grubuna ait testis dokusu. Normal görünümde bazal membran kalınlığı (siyah ok) (PAS, Bar: 50 µm).

Şekil 23. Anason+I/R+Anason grubuna ait testis dokusunun transversal kesiti. Normale yakın görünümde seminifer tübüller (S), lümene yakın serbest halde dolaşan spermiyumlar (yeşil ok), normal görünümlü Leydig hücreleri (sarı ok) (H&E, Bar 50 µm).

Şekil 24. Anason + I/R + Anason grubuna ait testis dokusu. Normale yakın görünümde seminifer tübüller (S) ve normal bazal membran kalınlığı (siyah ok) (PAS, Bar: 50 µm)

Şekil 25. Kontrol grubu testis IL-6 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) negatif IL-6 ekspresyonları. **Boyama:** IL-6 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

Şekil 26. Anason grubu testis IL-6 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) negatif IL-6 ekspresyonları. **Boyama:** IL-6 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

Şekil 27. I/R grubu testis IL-6 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Sertoli hücrelerinde (siyah ok) yoğun pozitif IL-6 ekspresyonları. Damar endotelinde (mavi ok) ve interstisyel stromal hücrelerde (kırmızı ok) pozitif IL-6 ekspresyonları. **Boyama:** IL-6 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μm.

Şekil 28. Anason+I/R grubu testis IL-6 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Sertoli hücrelerinde (siyah ok) orta seviyede pozitif IL-6 ekspresyonları. Damar endotelinde (mavi ok) ve interstisyel stromal hücrelerde (kırmızı ok) pozitif IL-6 ekspresyonları. **Boyama:** IL-6 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μm

Şekil 29. I/R+Anason grubu testis IL-6 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Sertoli hücrelerinde (siyah ok) pozitif IL-6 ekspresyonları. Damar endotelinde (mavi ok) ve Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) pozitif IL-6 ekspresyonları. **Boyama:** IL-6 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μm.

Şekil 30. Anason+IR+Anason grubu testis IL-6 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) tek tük pozitif IL-6 ekspresyonları, Sertoli hücrelerinde (siyah ok) pozitif IL-6 ekspresyonları. Damar endotelinde (mavi ok) negatif IL-6 ekspresyonları ve Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) çok hafif IL-6 pozitif ekspresyonları. **Boyama:** IL-6 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μm.

Şekil 31. Kontrol grubu testis BCL-2 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok), Sertoli hücrelerinde (siyah ok) ve Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) negatif BCL-2 ekspresyonları. **Boyama:** BCL-2 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μm.

Şekil 32. Anason grubu testis BCL-2 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok), Sertoli hücrelerinde (siyah ok) ve Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) negatif BCL-2 ekspresyonları. **Boyama:** BCL-2 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μm.

Şekil 33. I/R grubu testis BCL-2 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Sertoli hücrelerinde (siyah ok) yoğun pozitif BCL-2 ekspresyonları. Damar endotelinde (mavi ok) ve interstisyel stromal hücrelerde (kırmızı ok) pozitif BCL-2 ekspresyonları. **Boyama:** BCL-2 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μm.

Şekil 34. Anason+ I/R grubu testis BCL-2 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Sertoli hücrelerinde (siyah ok) orta seviyede pozitif BCL-2 ekspresyonları. Damar endotelinde hafif pozitif (mavi ok) BCL-2 ekspresyonları ve interstisyel stromal hücrelerde (kırmızı ok) orta seviyede pozitif BCL-2 ekspresyonları. **Boyama:** BCL-2 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μm.

Şekil 35. I/R+ Anason grubu testis BCL-2 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Sertoli hücrelerinde (siyah ok) hafif BCL-2 ekspresyonları. Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) orta seviyede pozitif BCL-2 ekspresyonları. **Boyama:** BCL-2 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μm.

Şekil 36. Anason+I/R+Anason grubu testis BCL-2 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) tek tük pozitif BCL-2 ekspresyonları, Sertoli hücrelerinde (siyah ok) hafif pozitif BCL-2 ekspresyonları. Damar endotelinde (mavi ok) çok hafif BCL-2 ekspresyonları. **Boyama:** BCL-2 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 μm.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo-1. Enzimatik ve Enzimatik olmayan antioksidanlar

Tablo-2. 1990-2019 yılları arasındaki anason bitkisininekim alanı ve toplam üretim miktarı

Tablo-3. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin içeriği

Tablo-4. Histolojik doku takibinin aşamaları

Tablo-5. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Tablo-6. İstatistiksel analizi yapılan TAS µmol/L değerlerinin biyokimyasal analiz sonuçlarının ortalama±standart sapma, minimum, maksimum ve median sonuçları.

Tablo-7: İstatistiksel analizi yapılan TOS mmol/L değerlerinin biyokimyasal analiz sonuçlarının ortalama±standart sapma, minimum, maksimum ve median sonuçları.

Tablo-8: İstatiksel analizi yapılan verilerin ortalaması ± standart sapma değerleri

Tablo-9: Johnsen Skorlaması yapılan verilerin, ortalama± standart sapma, minimum, maksimum ve toplam değerleri.

GRAFİKLER

Grafik-1: TAS değerlerinin homojenlik analiz grafiği (µmol/L).

Grafik-2: TAS değerlerinin ortalama analiz grafiği (µmol/L).

Grafik-3: TOS değerlerininin homojenlik analiz grafiği (mmol/L).

Grafik-4: TOS değerlerinin ortalama analiz grafiği (mmol/L).

Grafik-5: Gruplar arası Johnsen skorlamasının homojenlik analiz grafiği.

Grafik-6: Johnsen skorlamasının ortalama istatiksel analiz grafiği.

1.ÖZET

Ratlarda Testislerdeki İskemi Reperfüzyon Hasarının İncelenmesinde Anason'un Koruyucu Etkileri

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Eda YILDIZHAN

Danışman: Prof. Dr. Murat AKKUŞ

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

1.1 TÜRKÇE ÖZET

Amaç: Testis torsiyonu klinik olarak sık görülen ve kalıcı hasarlara yol açabilen, acil tedavi ve cerrahi müdahale gerektiren patolojik bir durumdur. Bugüne kadar testis torsiyonu sonucu oluşan iskemireperfüzyon hasarını önlemek veya tedavi etmek amacıyla birçok deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada rat testis dokusunda oluşturalaniskemireperfüzyon hasarına bağlı olası değişikliklerin tedavi edilmesinde Anason'nun biyokimyasal ,Histopatolojik ,Immunohistokimyasal etkilerini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada 48 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar 6 eşit gruba ayrıldı Grup 1 kontrol grubu (n=8) olup deney süresince herhangi bir işlem uygulanmadı. Grup-2; 30 gün süreyle sulu ekstresinden gavajla 5mL/kg/gün peroral (p.o.) Anason uygulaması yapılan grup (n=8), Grup 3 Skrotum bölgesi 90 derecelik döndürme ile 3 kez 270° bilateral testislere uygulama yapılarak 30 dakika (dk) iskemi modeli ardından ters döndürme ile 30 dakika reperfüzyon oluşturuldu.. Grup 4 30 dakikalık iskemi ve reperfüzyon sonrası 30 gün süre ile anason'un sulu ekstresinden gavajla 5mL/kg/gün p.o. verildi. Grup 5'in ratlarına ise 30 gün anason'un sulu ekstresinden gavajla 5mL/kg/gün p.o. verildikten sonra, 30 dk iskemi ve 30 dk reperfüzyon uygulandı. Grup 6'ya ise 30 gün anason'un sulu ekstresinden gavajla 5mL/kg/gün p.o. verildikten sonra, 30 dk iskemi ve 30 dk reperfüzyon hasarı uygulandı, sonrasında yine 30 gün daha anason verildi.

Bulgular: Kontrol ve Anason gruplarının histopatolojik değerlendirilmesinde aralarında bir fark olmadığı görüldü. İskemireperfüzyon grubunda ise hasarın en fazla

olduğu tespit edildi. I/R+Anason grubunda bazal membrandakikırılmma ve ayrışmaların yer yer devam ettiği izlenirken, spermatogenik hücre sayısında I/R grubuna kıyasla çoğalma olduğu gözlendi. Anason+I/R grubunda ise ödem ve konjesyonun devam ettiği görüldü. Anason+I/R+Anason gurubu ise Kontrol ve Anason grubuna oldukça yakın görünümde izlendi.

Sonuç: Anason'un sıçan testislerinde oluşturulan iskemiye bağlı hasarın tedavisinde antiapoptotik ve antiinflamatuar gibi yararlı etkilerinin olduğunu saptadık.

Anahtar kelimeler: Anason, Testis, İskemi, Reperfüzyon

TheExamination of ProtectiveEffects of Aniseon IschemiaReperfusion Injury Of Testiciles InRats

Student'sSurnameand Name: YILDIZHAN Eda

Advisor: AKKUŞ Murat Professor, PhD.

Department: Histology ve Embriology

1. 2. ABSTRACT

ABSTRACT

Aim: Testicular torsion is a clinically common pathological condition that can lead to permanent damage and requires urgent treatment and surgical intervention. To date, many experimental studies have been conducted to prevent or treat ischemia-reperfusion injury resulting from testicular torsion. In this study, we aimed to examine the biochemical, histopathological, and immunohistochemical effects of anise in the treatment of ischemia-reperfusion injury in rat testis tissue.

Material and Methods: In this study, 48 male Wistar Albino rats were used. The animals were divided into 6 equal groups: Group 1 is the control group (n=8) and no procedure was applied during the experiment. Group-2; (n=8), rats were administered 5mL/kg/day peroral (p.o.) anise by gavage for 30 days. Group 3: Rats testices were rotated 270^{o} and testis ischemia was applied for 30 minutes. Then, reperfusion was supplied by derotation of the testicles. Group 4: Following 30 minutes of testicular ischemia and 30 minutes of reperfusion, rats were administered 5mL/kg/day peroral (p.o.) anise by gavage for 30 days. Grup 5: Rats were administered 5mL/kg/day peroral (p.o.) anise by gavage for 30 days, then 30 minutes of testicular ischemia and 30 minutes of reperfusion was applied tor at testicles. Grup 6: Rats were administered 5mL/kg/day peroral (p.o.) anise by gavage for 30 days, then 30 minutes of testicular ischemia and 30 minutes of reperfusion was applied tor at testicles, then rats were administered 5mL/kg/day peroral (p.o.) anise by gavage for another 30 days.

Results: There was no difference in the histopathological evaluation of the control and anise groups. In the ischemia-reperfusion group, the damage was found to be the

highest. In the I/R+Anise group, it was observed that the breakage and separation of the basement membrane continued in some places, while there was an increase in the number of spermatogenic cells compared to the I/R group. In the anise+I/R group, edema and congestion persisted. Anise+I/R+Aniseed group, on the other hand, was observed to be very close to the Control and Anise groups.

Conclusion: We found that anise has beneficial effects such as anti-apoptotic and anti-inflammatory in the treatment of ischemia-related damage in rat testicles.

Key Words: Anise, Testicle, Ischemia, Reperfusion

2. GİRİŞ ve AMAÇ

İskemiarteriyal kan akımındaki azalmaya bağlı olarak gelişen kan akımının azalması durumudur. Reperfüzyon ise kanlanmanın ve oksijenlenmenin yeniden artması olayıdır (1). İskemi sırasında kan akımındaki azalmaya bağlı olarak arterialemboli gelişebilir ve bunun sonucunda diyabet, hiperlipidemi, yaş faktörüne bağlı olarak inflamatuar alanda doku hipoksisigelişebilir (2).

Reperfüzyon; erken ve geç olmak üzere iki dönemde incelenir. Adenilatsiklaz enzimi aracılığıyla salınan cAMP (siklikadenozinmonofosfat) seviyelerinin azalması sonucu Reaktif oksijen türleri (ROS) gibi serbest radikaller meydana gelir (3). Kan akımının yeniden başlaması iskemik dokulara nötrofilinfiltrasyonu, ROS'un birikimi, hücrelerdeki iyon dengesinin bozulması ve bu durumları takiben inflamatuar yanıtlarla birlikte hücre ölümünün gerçekleşmesine sebep olur (4). Ayrıca reperfüzyon Interlökin-1β (IL-1β) ve Tümör nekrotizan faktör-α (TNF-α) gibi çeşitli proinflamatuarsitokinlerin üretimine neden olur. Bütün bunlara bağlı olarak testis parankimasında makrofaj ve nötrofilinfiltrasyonu gözlenebilir (5-8). İskemive reperfüzyon bölgesel hasarların yanında, sistemik inflamatuaryanıt ve çoklu organ yetmezliği ile de sonuçlabilir (4).

Testisler, anatomik yapıları (anostomoz olmayan terminal arterlerden dolayı) ve Tunikaalbuginea'nın esnek olmayan yapısı nedeniyle yeterince genişleyemediğinden, iskemi durumuna daha çok yatkındırlar (9). Testikülertorsiyonspermatik kordun dönmesinden kaynaklı, başlangıçta testikülerven akışının daha sonra da arteriyel kan akışının kesintiye uğramasıyla sonuçlanan ve sıklıkla testislerde iskemiye yol açan patolojik bir durumdur (10-14). Testikülertorsiyon, geçici iskemiye sebep olabileceği gibi, başarılı bir detorsiyon yapılsa bile kalıcı hasarlara sebep olabilir (5). Bu yüzden cerrahi müdahale gerektiren en ciddi durumlardan biridir (15, 16). Başlıca çocukları ve genç yetişkin erkekleri etkiler (5-8, 10-14). Başarılı cerrahi müdahalelere rağmen testikülertorsiyon durumunda; atrofi ve inferetilite gelişme olasılığı %40-60 oranında gösterilmiştir (17). Detorsiyon sonrası testis reperfüzyonuROS'un artmasına neden olur ve bu durumda Deoksiribonükleik asit (DNA) ve proteinlerin hasar görmesi ile sonuçlanır (5-8). Bu patofizyolojik değişiklikler germ hücrelerinin apoptozisine, Sertoli hücrelerinin fonksiyonlarında bozulmaya ve testikületrofiye yol açabilir (10, 15, 16).

Bitkiler ve onların özütleri fitokimyasal çalışmalar için eşsiz bir fırsattır. Bu bağlamda aromatik bitkiler ve onların özütleri bazı hastalıklarda geleneksel olarak uzun yıllardan beri dünya genelinde kullanılmaktadır (18). Anason beyaz yapraklı, sarı-yeşil tohumları olan bir bitki olup, İran, Türkiye, Hindistan, Mısır gibi dünyanın sıcak bölgelerinde yetişmektedir (19, 20).

Fitokimyasal çalışmalar, anason'un Nitrik oksit (NO) ve superoksit gibi radikallerin aktivitesini inhibe ettiğini ve çok sayıda antioksidanlar içerdiğini göstermiştir (21). Anason sindirim sistemi, jinekolojik, nörolojik ve solunum yolu hastalıkları gibi bazı hastalıkları da tedavi edici etkiye sahiptir (22). Ayrıca hepatoprotektif, tiroidtoksisitesini tedavi edici gibi farklı amaçlarla da kullanılmaktadır (23). Yapılan çalışmalarda anasonun analjezik, antimikrobiyal, antifungal, antiviral, antibakteriyel, antikonstipasyon, kadınlarda menopoza bağlı sıcak basmaları ve dismenore, diabetik hastalarda hipoglisemi ve hipolipidemi ve kas gevşetici gibi çok sayıda farmakolojik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (24-26).

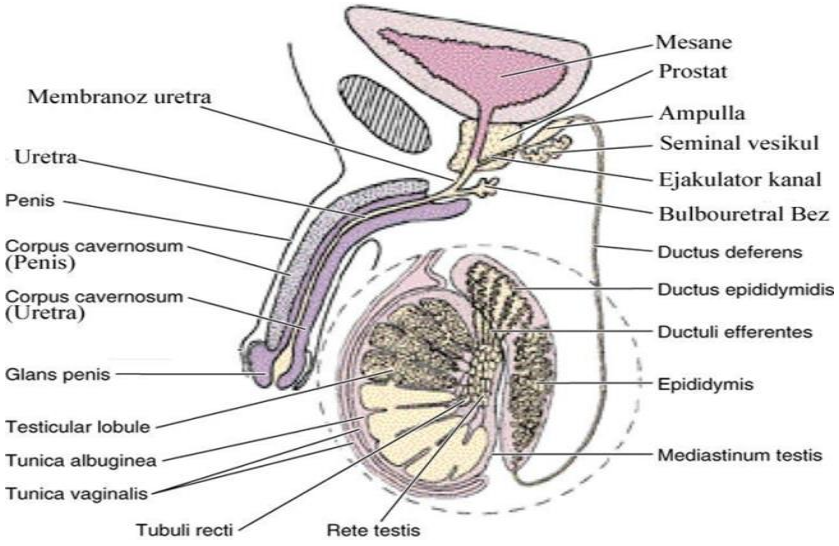
Testis torsiyonu klinik olarak sık görülen ve kalıcı hasarlara yol açabilen, acil tedavi ve cerrahi müdahale gerektiren patolojik bir durumdur. Bugüne kadar testis torsiyonu sonucu oluşan iskemireperfüzyon hasarını önlemek veya tedavi etmek için pekçok çalışma yapılmıştır. Çalışmamızın amacı; testküler dokuda oluşturrulan iskemi vereperfüzyon hasarına bağlı oluşan değişikliklerin önlenmesinde ve tedavi edilmesinde anason'nunrat testislerinde ki koruyucu etkisini incelemektir. Böylece anason'un testiküler dokuda gelişebilecek veya gelişse bile tedavi edici özelliğinin olup olmadığını ortaya koymayı amaçladık.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Erkek Genital Sistemi

Erkek üreme sistemi iki bölümden oluşur:

1. Testisler,
2. Testis içi ve dışı genital kanallar,
    I. Tubulirekti,
    II. Rete testis,
    III. Duktuliefferentes,
    IV. Duktusepididimis,
    V. Duktusdeferens,
    VI. Duktusejekulatoryus
3. Yardımcı bezler
    I. Seminal vezikül (glandulavezikuloza),
    II. Prostat,
    III. Bulboüretral (Cowper) bezleri ve
4. Penisten meydana gelir (27, 28).



Şekil 1. Erkek genitalsistemi'nin genel görünümü (29, 30).

3.1.1. Testisler

Testisler, sperm üretimi ve salgılanmasından sorumlu holokrin bir bez olup, başlıca ekzokrin fonksiyonu testosteron hormonu salgılamaktır. Ayrıca testosteron dışında bazı androjen hormonları Anti Müllerian Hormon (AMH), estradiol ve inhibin gibi hormonları da salgılayan endokrin özellikte bir organdır. Testisler, erkek üreme sisteminin esas üreme organlarıdır (31). Vezikulaseminalis, bulbouretral bez, prostat bezi ile penilüretraepitelinden gelişen Tyson bezleri ise ekzokrin salgı yapan bezlerdir. Penis ise ince bir deriyle kaplı, güçlü bağ dokusuyla sarılı, bir çift erektör dokunun oluşturduğu çiftleşme organıdır (29, 32, 33).

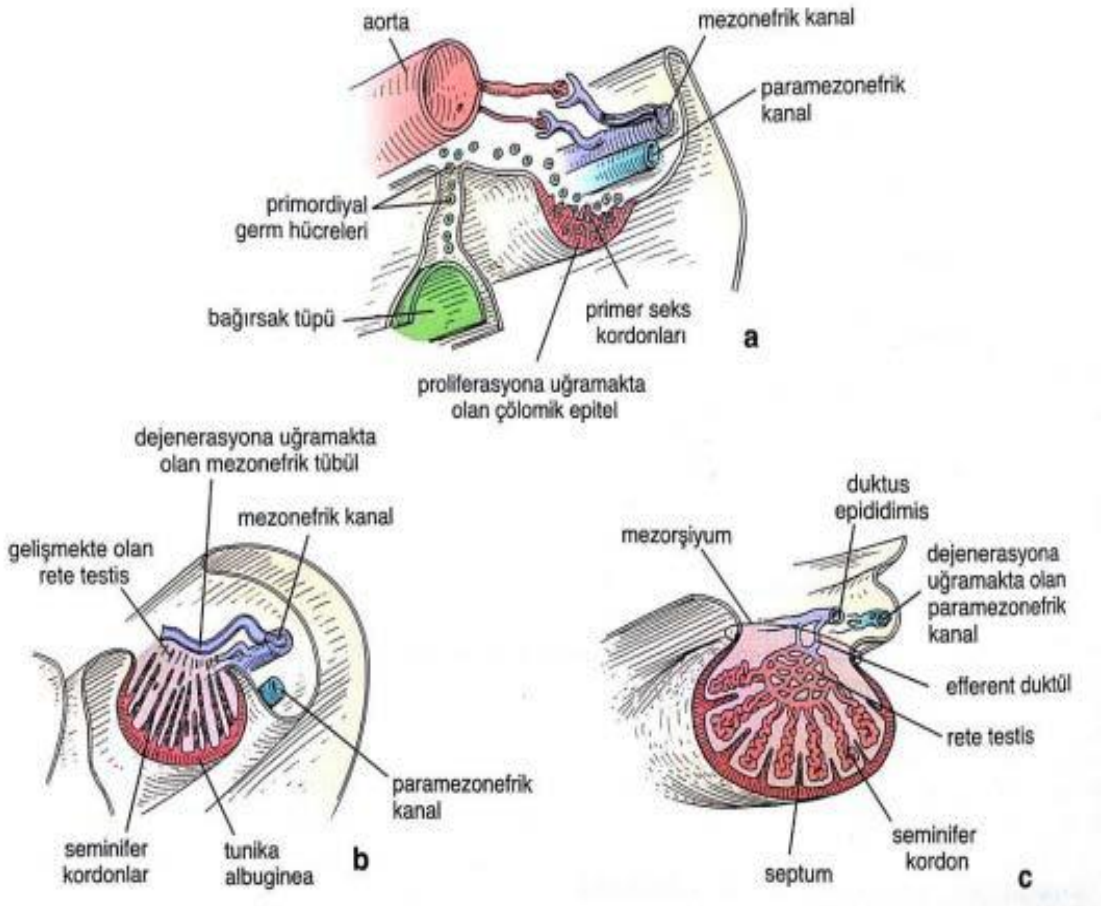
3.1.1.1. Testislerin Embriyolojik Gelişimi

Testisler bir dizi genin indüksiyonu sonucu Y kromozumu taşıyan embriyolardan gelişmektedir (34, 35). Embriyonun kromozom yapısı ve cinsiyeti cinsiyeti embriyoyu dölleyen sperm türüne bağlı olarak fertilizasyonla birlikte belirlenir (36). İntrauterin yaşamın 2. haftasında epiblastlardan göç eden hücreler (primordialgerm hücreleri), gelişimin 3. ve 4. haftalarında sekondervitellus kesesi endodermi içinde gözlenirler. Bu primordialgerm hücreleri, gelişimin 5. ve 6. haftalarında dorsalmezenter aracılığıyla ve ameboid hareketler yaparak ilkel gonadlara ulaşırlar. Ancak Y kormozomu taşıyan primordialgerm hücrelerinin gelişimi 6. haftaya kadar intraembriyonik kordonların içerisine giremediğinden, embriyonun cinsiyeti 7. haftadan itibaren gelişmeye başlar ve bu gelişim intrauterin yaşamın 10. hafatasına kadar devam eder (36, 37).

7. haftaya kadargonadların görünümü hem dişi hemde erkek embriyolarda benzer olduğundan bu duruma “farklanmamış evre” denir (34). Embriyonun erkek cinsiyetinde gelişmesi için Y kromozomu gereklidir. Testislerin farklanmasını belirleyen Testis belirleyici faktörün (TBF) olması halinde fetüsün cinsiyeti erkek, yokluğunda ise kadın olarak gelişir (36, 37). Gelişen embriyo XX cinsiyet kromozomuna sahipse, farklanmamışgonadın korteksti overefarklanır ve medullası geriler. Embriyo genetik olarak erkek ise ilkel cinsiyet hücreleri XY seks kromozom kompleksine sahip olur. TBF’i kodlayan Y kromozomu üzerindeki

SexdeterminingRegion on the Y chromosome (SRY) geninin etkisi ile ilkel cinsiyet kordonları testis kordonlarını ya da medullar kordonları oluşturmak için çoğalmaya devam ederek medullanın derinliklerine kadar ilerler. Daha sonra bu kordonlar testis bezinin hilusuna doğru uzanarak, rete testis tübüllerini oluştururlar (36, 38).

Ara mezodermden köken alan İnterstisyel hücreler (Leydighücreleri) ise testis kordonlarının arasında yer alır (38, 39). Esas fonksiyonu testosteron üretmek olan Leydig hücreleri, hamileliğin 8 haftasında hormon üretmeye başlar. Ürettiği testosteron hormonu sayesinde dış genital organların cinsiyeti belli olmaya başlar (36, 40, 41). Üretilen testosteron 8-12. haftalarda en yüksek değere ulaşarak, KoryonikGonadotropinHormon'unu (hCG) uyarır (36, 40).



Şekil2. Testislerin embriyonik gelişim sırasındaki evreleri (40).

3.1.1.2. Testislerin Anatomik Yapısı

Testisler skrotum içinde spermatik kord ile asılı, septumskroti ile ayrılı bir çift birleşik tübüler bezlerdir (27, 42-44).Yanlardan basık iri badem şeklinde ve yaklaşık 15 gram (g) ağırlığındadırlar (38, 45). Ortalama uzunlukları 3,5-4,5 santimetre (cm), genişliği ise 3-4 cm'dir (45). Skrotum içinde hafif eğik pozisyondadırlar. Kan stazına bağlı olarak sol testis ortalama 1 cm kadar daha aşağıda yer alır (43, 46).

Testisler hem dış hemde iç salgı yapan mix tip (karışık) bezlerdir. Ekzokrin işlevleri; testis sıvısı ve spermiyum üretmek olup, endokrin işlevleri ise steroid yapıdaki testosteron hormonunu üretmektir (27, 42). Testislerin vücut boşluğu dışında bulunması, skrotum yüzeyinde gerçekleşen terleme ile daha soğuk bir ortamda kalmalarını da sağlar (45).

Testislerin anterolaterali 2/3 kısmı serbest olup, posterolateral yüzü epididim, bağ doku ve damarlarla örtülüdür (47). Mediastinumdanışınsal olarak ortalama 250 adet lobül oluşur. Lobüller içerisinde seminifer tübüller bulunur. Her kesitte toplam uzunluğu 280-400 metre (m) arasında olan 600-1200 seminifertübül bulunur. Bu yapılar spermlerin oluşum yeridir. Spermler seminifer tübüllerden başka bir kıvrımlı tüp olan epididim'e girer. Epididim de vaz deferense açılır. Seminifer tübüller tubuli rekti ve rete testise boşalır. Rete testisler'den sayıları 6-8 adet olan duktuliefferentes oluşur (38). En son kısmı vücut dışına açılan üretra oluşturur (48).

3.1.1.3. Testislerin Histolojik Yapısı

Testisler dıştan oldukça kalın bir kapsülle çevrilidirler. Bu kapsül dıştan içe doğru üç tababakadan meydana gelir. Bunlar;

1. Tunika vajinalis,
2. Tunika albuginea ve
3. Tunika vaskuloza'dır (28,43,49).

- **Tunika vajinalis:** Tunika albugineayı örten, iki katlı periton tabakasıdır (28, 43, 47, 50).Fasicaspermatikanın iç, testisin de dış yüzünü saran prosesusvajinalis'in alt ucudur. Testisin anterolateral yüzeyinde bulunur, mezotel ile döşelidir.

- **Tunika albuginea:** Testisleri saran kapsülün en kalın ve en belirgin tabakasıdır. Mavimsi-beyaz renkli, yoğun fibroelastik bağ dokudan oluşur (49). Tunika albuginea'nın sıkı bağ dokusu, testisin arka yüzünde kalınlaşarak ve herbir testis içerisine doğru uzanarak mediastinum testisi oluşturur (43, 47, 50). Testisler, tunika albuginea'dan uzanan septallar aracılığıyla lobüllere ayrılır (51).
- **Tunika vaskuloza:** En içteki damardan zengin, gevşek bağ dokusu tabakasıdır (28).

Testisler histolojik yönden;

1. İnterstisyum ve
2. Seminifer tübüller olarak iki kısımda incelenir (40).

İnterstisyumda kan damarları, sinirler, lenfatikler, Leydig hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri bunurken (40), seminifer tübüller ise parankimayı oluşturur (39).

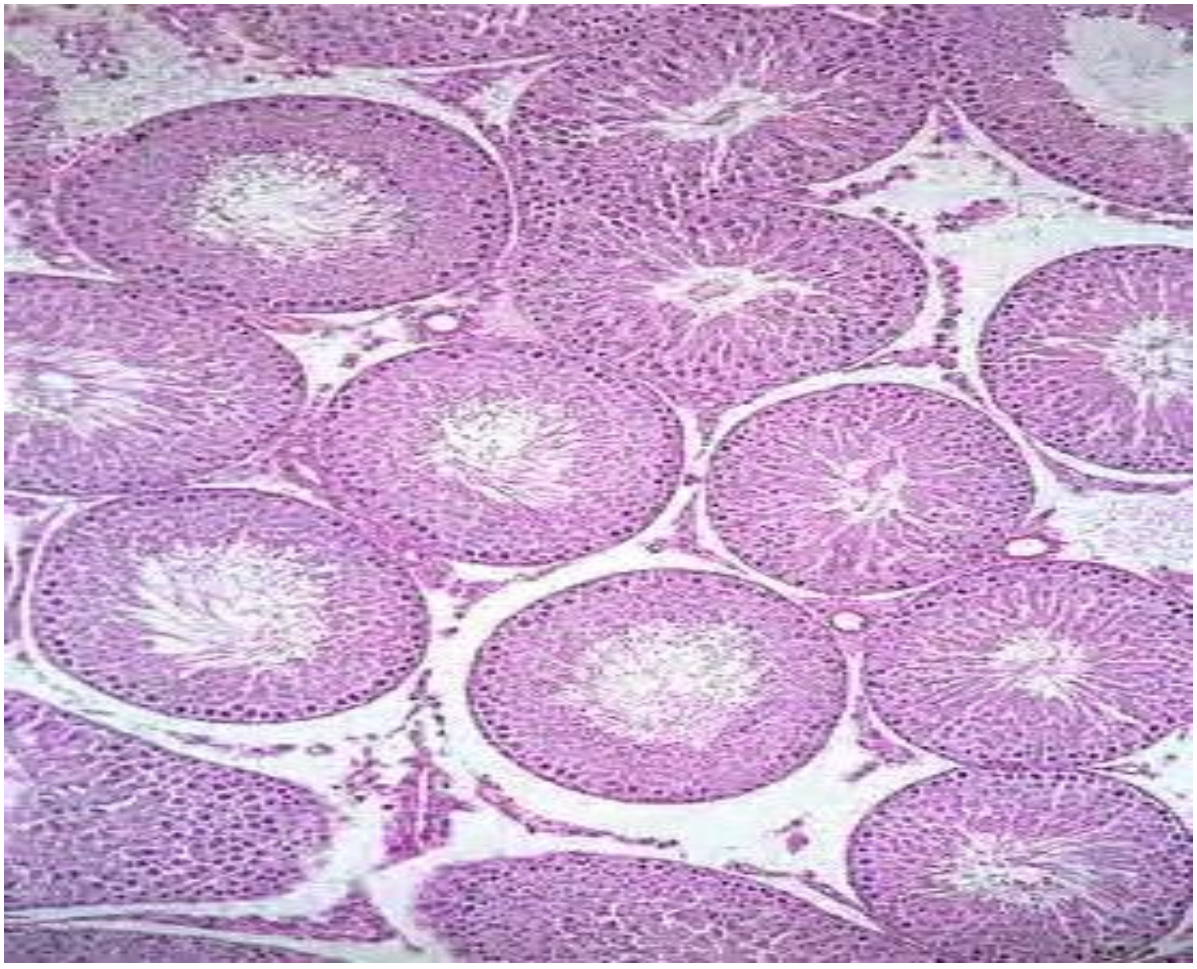
3.1.1.3.1. Seminifer Tübüller

Testisler hacminin büyük bir kısmını oluşturan kıvrımlı bir yapıya sahip kanalcıklardan oluşurlar (30, 52). Yaklaşık 30-80 cm uzunluğunda, 150-250 µm (mikrometre) kalınlığında oldukça kıvrımlı kanalcıklardır (28, 51, 53). Her bir testiste yaklaşık 250 adet kadar lobül ve her bir lobülde de ortalama 1-4 adet seminifertübül bulunduğu düşünülmektedir. Bunların yaklaşık olarak uzunluğu 280-400 m, 250-1000 adet arasındadır (32, 38, 52). Bu yapılar spermlerin oluşum yeridir (54).

Seminifer tübüller çok katlı epitel tabakası ile örtülü olup, epiteli oluşturan bazal membran ve bağ dokudur. Seminifer tübülleri oluşturan bu epitele tohum epiteli (epitelyum seminalis) denir (55). Bağ dokusu Tip I kollajenler, fibroblastlar ve miyoid hücrelerle çevrelenmiştir (38, 44). Seminifer tübüllerdeki miyoid (miyo epitelyal) hücreler hareketsiz haldeki spermiyumları rete testislere doğru iterek, kasılma hareketi yapar ve böylece spermiyumların ilerlemesini sağlayan hücrelerdir. Spermiyumlar, duktus epididimisten geçtikten sonra hareket yeteneği kazanırlar (44).

Seminifertübül lümeni iki tip hücreden oluşur. Biri çoğalma yeteneğine sahip Spermatogenik (germ) seri hücreler, diğeri ise çoğalma yeteneği olmayan Sertoli (destek) hücreleri'dir (38,56,57).

Seminifer tübüllerin görevi; Spermatozoon üretimi olup bu olaya da Spermatogenez denir (42). Ayrıca hipofiz bezinden Folikül Stimülan Hormon (FSH)' nın salgılanmasını düzenleyen inhibin ve spermiyumların genital kanallara girişine yardımcı olan Androjen bağlayıcı protein (ABP)'i de salgılarlar (27).



Şekil 3. Seminifertübüllerin, Sertoli hücrelerinin histolojik olarak genel görünümü. Boyama: Hematoksilen&Eozin (H&E) (57,58)

3.1.1.3.2.Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik hücreler primordial germ hücrelerinden köken alırlar (59). Seminifertübülepitelinin büyük çoğunluğunu oluştururlar. Birbirini izleyen hücre sıraları şeklinde düzenlenmiş, farklı gelişim aşamasındaki hücrelerdir (57,60).

Spermatogenik hücreler seminifertübül duvarını döşeyen hücrelerin çoğunluğunu oluşturur. Bu hücre gruplarından spermatogonyumlar bazale en yakın ve yuvarlak çekirdekli olanlardır. Yine yuvarlak çekirdekli fakat kromatini spagettiye benzeyenler ise primer spermatositlerdir. Sekonder spermatositler ise seyrek görülür, oluşur oluşmaz bölünerek spermatidleri oluştururlar (39). Spermatidler en olgun hücreler olup Sertoli hücrelerinin apikalkısmına tutunarak tübül lümeninin kenarlarını oluştururlar (60). Seminifer tübül lümeninde ise olgun spermatozoonlar bulur (57, 58).

Spermatogonia ve primerspermatositler bazalden lümene doğru yavaşça hareket ederek farklılaşır ve en sonunda da spermatozoonlara dönüşürler. Her bir spermatogenik hücrenin biçimi farklı olduğundan tübül lümeninin düzensiz görünmesine neden olur (56,61).

3.1.1.3.3.Sertoli Hücreleri

Seminifer tübül duvarında yer alan sertoli hücreleri intra embriyonik sölom epitelinden gelişen uzun ve sütuna benzeyen hücrelerdir (29,39). Sertoli hücreleri bazal laminadan başlayarak seminifer tübül lümenine kadar uzanan prizmatik şekilli hücrelerdir. Tübüller arası boşluklar ile seminifer tübül lümeni arasında köprü hücre olarak görev yaparlar (32).

Transvers kesitlerde eozinofilik stoplazmaları, bazale yerleşmiş bir veya iki ökromatik nukleusları ve belirgin nukleolusları vardır fakat buna rağmen ayırt edilmesi zordur (28, 32, 45, 62). Organel bakımından zengin olan bu hücreler 7-9 nanometre (Nm) kalınlığında bir flaman kılıfı çekirdeğini organellerden ayırır. Stoplazmada granüllü endoplazmik retikulum (GER), mitokondriyon, lizozomlar, lipid damlacıkları, yaygın bir golgi aygıtı ve hücre iskeletinden zengindir (31). Sertoli hücreleri spermatogenik hücrelere göre daha dayanıklı olmalarına rağmen mitotikaktivitleri olmadığından çoğalamazlar (44).

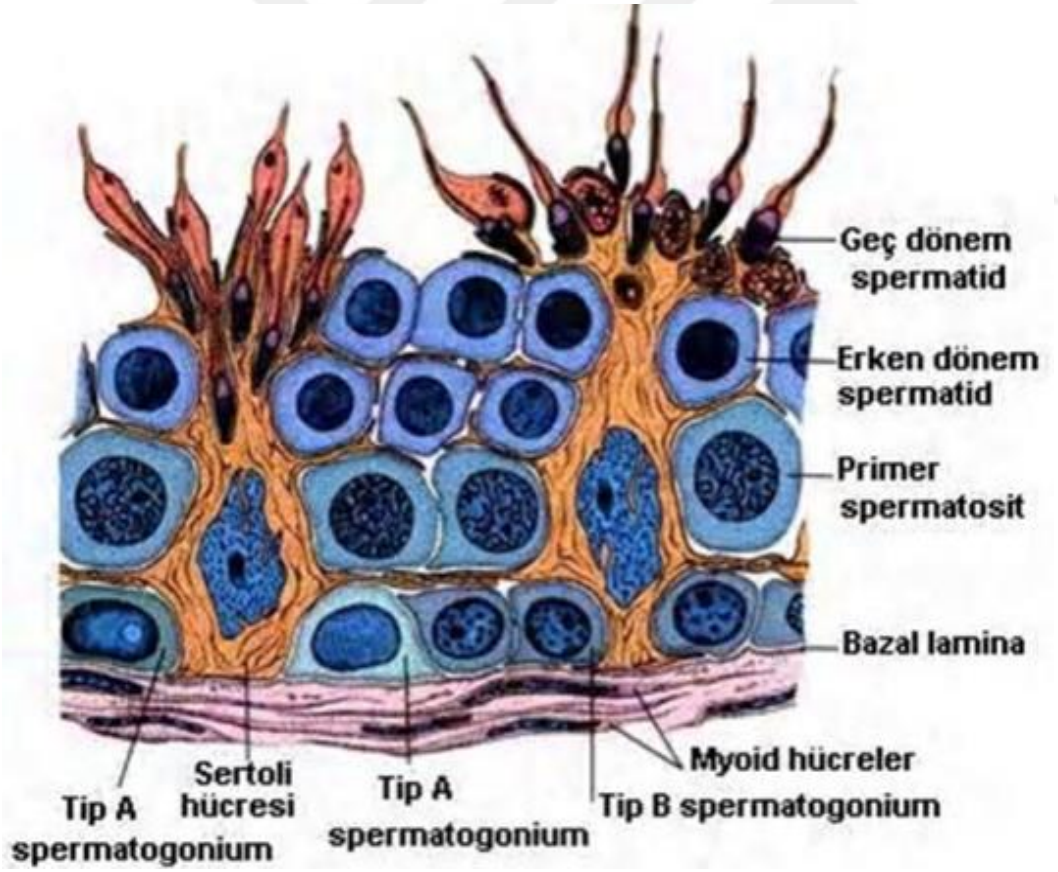
Sertoli hücreleri gelişmekte olan spermiyumları destekleyen, koruyan ve besleyen önemli hücrelerdir (28). Ayrıca olgunlaşmamış veya apoptoza giden hücreleri spermatogenik hücreleri fagosite ederek ortadan kaldırabilirler (28,63).

Sertoli hücreleri, FSH ve ABP salgılarlar ve sıkı bağlantılarla bağlandıklarından makromoleküllerin geçişine izin vermezler (kan- testis bariyeri) (39,64).

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelyumun dominant hücre tipidir. Puberteden sonra, spermatogenik hücre sayısında artış olacağından seminifer tübüllerdeki oranları giderek azalır. Fakat ileri yaşlarda spermatogenik hücre sayısı azaldığındansertoli hücreleri tekrar seminifer epitelyumun dominant hücresi haline gelirler (44).

Puberteye kadar solid halde bulunan ve içi testosterondan zengin bir sıvıyla dolu olan testis kordonları pubertede testosterondan zengin sıvının absorbe edilmesi ile birlikteseminifertübüllere dönüşürler. Seminifer tübüller oluşur oluşmaz, rete testisler ile birleşerek duktuli efferenteslere bağlanırlar (36,40,41).

Ortalama 26. haftada testisler skrotuma doğru göç etmeye başlarlar. 28. haftada kendi periton örtüsü olan prosessus vajinalisle birlikteinguinal kanaldan geçerek 32. haftada sktrotuma ulaşırlar (36,39,40).



Şekil 4. Spermatogenik hücrelerin dizilimi ve Sertoli hücreleri ile aralarındaki ilişkiler (53,57).

Sertoli hücrelerinin görevleri;

- Spermatogenik hücreleri destekler, besler ve korurlar,
- Spermatidstoplazmasının bir kısmını fagosite ederler, gelişimlerini tamamlamış spermatogenik hücreleri fagosite ederler,
- Spermlerin kanala taşınması için kullanılan bir sıvı salgılarlar, spermatogenik hücrelere mekanik destek vererek, hücrelerin bazalden lümene doğru aktif olarak hareket etmesini sağlarlar,
- Spermatogenik hücrelerin boşaltım kanalına taşınmaları ve beslenmesi için lazım olan fruktozdan zengin bir sıvı salgılarlar,
- Androjen bağlayan bir protein, inhibin, plazminojenaktivator ve transferrin salgılarlar,
- FetustaMüller kanalının gerilemesini sağlayan bir hormon olan AMH salgılarlar. Bu hormon glikoprotein yapıda olup, fetüsün erkeksi karakterinin gelişmesini sağlar.
- Kan-testis bariyerini oluştururlar (28, 45, 62).

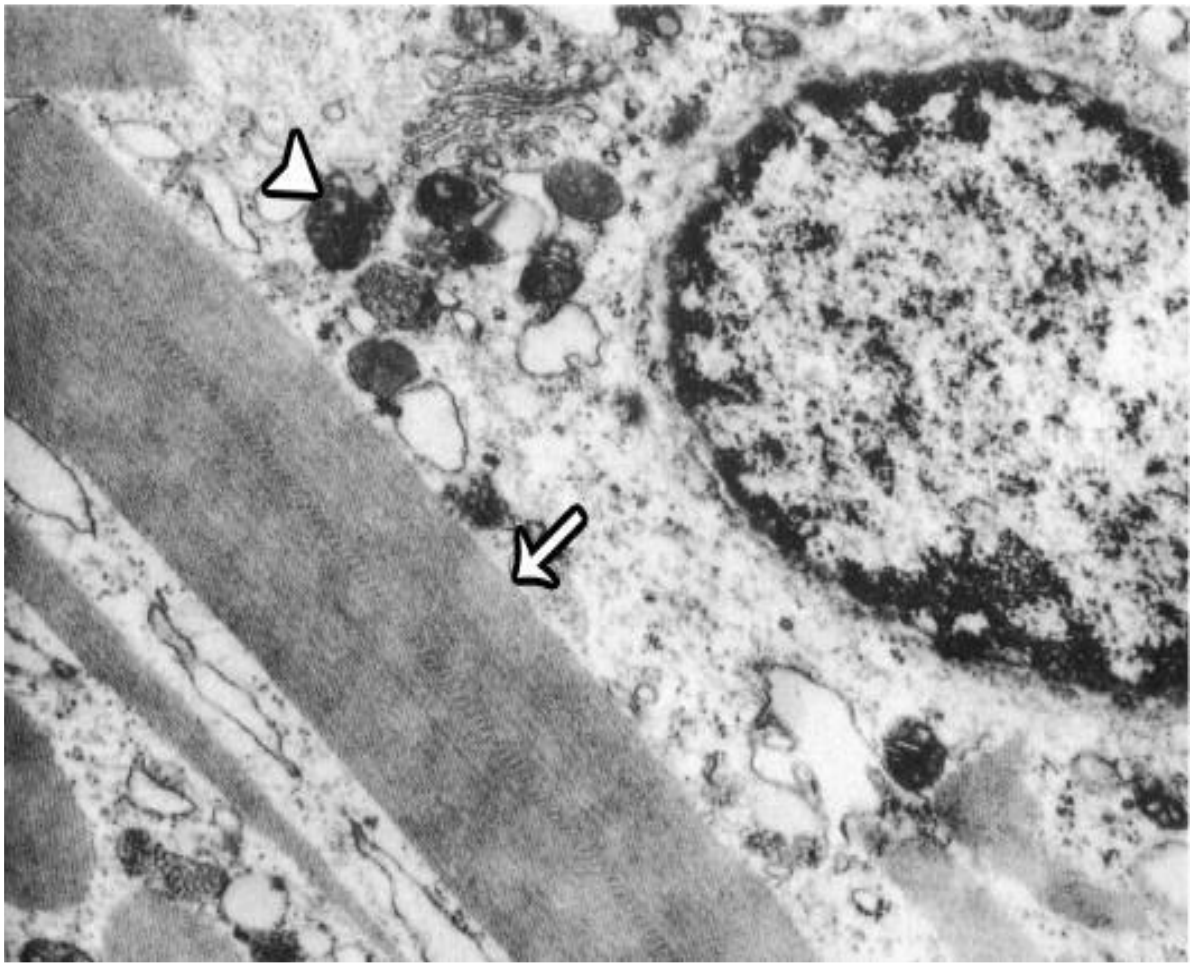
3.1.1.3.4. Leydig hücreleri

Leydig hücreleri, testis ağırlığının yaklaşık %30'unu oluştururlar. Seminifertübüller arasındaki interstisyel bağ dokusu içinde ve kapilleretrafında yer alırlar (27, 45). Yuvarlak çekirdekli, büyük polimorf şekilli merkezde bir yada iki çekirdekleri bulunan hücrelerdir. Lipit damlacıklarından zengin, asidofilik bir stoplazmaya sahiptirler. Elektron mikroskobik (EM) düzeyde incelendiklerine en belirgin özellikleri, stoplazmalarında iyi gelişmiş granülsüzendoplazmikretikulumun (AGER) bulunmasıdır (27). Hücre yüzeyinde çok sayıdaepitel hücrelerinin yaptığı sitoplazmik uzantıları vardır (38). Leydig hücreleri, seminifertübüller arasındaki üçgen bölgede yer alırlar (62).

Leydig hücreleri İnterstisyel hücreleri stimüle eden hormon (ICSH) ve hipofiz ön lobu hormonu olan FSH tarafından kontrol edilirler (52). Leydig hücreleri günlük ihtiyaca göre yaklaşık 7 mg (miligram) testosteron hormonu üretirler ve salgı granülleri olmadığından ürettikleri bu hormonu bekletmeden direk kana verirler. Ayrıca östrojen gibi etkili olan östradiyol salgılarlar (27,52). Kanda bulunan testosteron miktarının

%95'i Leydig hücreleri tarafından üretilir (44, 45). Üretilen testosteron, embriyonal gelişim, cinsel olgunluk ve üreme fonksiyonları için gereklidir (65).

Leydig hücreleri, pubertede geçici bir süre Gonadotropik hormonların stimülasyonuna uğrarlar (65). Puberteden sonra bir Adenozinmonofosfat (AMPH) aracılığıyla Luteinleştiricihormon (LH) uyarılarak testosteron üretmeye başlar ve yaşam boyunca da aktif kalırlar (44,45,65).



Şekil 5. Leydig hücresinin Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) görüntüsü. Reinke kristalleri (ok) ve mitokondri (ok başı) (66).

3.1.1.4. Testislerin Damar Yapıları

Testisler arterlerini aorta abdominalis'ten alırlar. Arteriatestikularis testisin arka yüzünden testis içine girer ve mediastinum testise birçok dallar verir. Bu dallar testis içine dağılır ve dokuyu beslerler (58,67).

Testis venleri ise duktusdeferensin çevresinde pleksuspampiniformis denilen bir ağ oluştururlar (58,68,69).

3.1.2. Testis İçi ve Dışı Genital Kanallar

3.1.2.1. Rete Testis

Testisin mediastinumu içindeki düzensiz şekilde anasotomozlaşan tek katlı kübik veya prizmatik epittelle döşeli kanallardır. Bazal membranı çok sayıda kan damarları içeren bağ doku ile sarılıdır. Kan damarlarının duvarını fibroblastlar ve miyoid hücreler oluşturur (28,44,62).

3.1.2.2. DuktuliEfferentes

Rete testisin açıldığı, yaklaşık 10-20 adet kıvrımlı seyreden, yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşeli kanallardır. Uzun boylu prizmatik hücreleri silyumlu olmalarına rağmen, kısa boylu hücreleri ise silyum içermez fakat çok sayıda mikrovillus bulundurur. Seminifertübüllerden salgılanan sıvının büyük bir kısmı burada absorbe edilir (28,44).

Bu epitel üç tip hücre içerir;

- Sterosilyalı esas hücreler,
- Silyalı hücreler,
- Bazal hücreler

Bazal membrana komşu yerleşen kübik şekilli hücreler ise kök hücrelerdir. Epitelde lenfositlere de rastlanır. Spermiyumun bu kanallar boyunca ilerlemesini silyumların hareketi ve kas tabakası gerçekleştirir (28,44).

3.1.2.3. DuktusEpididimis

Testislerin arka yüzünde yer alan baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşan 4-6 m uzunluğunda kıvrımlı bir tübüldür. Duktusefferentes, epididimisin baş kısmında, duktusepididimis ise epididimisin gövde ve kuyruk kısmında yer alır.

Epitelisterosilyumlu yalancı çok katlı prizmatik epiteldir. Epiteli bazal hücreler ve prizmatik şekilli esas hücrelerden oluşur. Esas hücreler; spermiyumların

olgunlaşmasını sağlayan siyalik asit, gliserofosfokolin ve glikoproteinleri salgılamakla görevlidir. Bazal hücreler ise; kök hücre görevi görürler. Epitel içinde lenfositlere (Halo hücreleri) de rastlanabilir (28).

Spermiyumlar döllenme yeteneği kazanabilmeleri için gerekli olan hareket etme ve olgunlaşma yeteneklerini epididimiste kazanırlar. Spermlerin olgunlaşma süreleri ortalama 2-12 gündür (44,49).

3.1.2.4. DuktusDeferens

Duktus epididimisin kuyruk bölümününden sonraki kısımdır. Kalın duvarlı ve kaslı olup, boru şeklindedir. Uzunlamasına mukoza katlantıları içerir. Mukozası lümene doğru katlantılar yaptığından lümeni düzensiz görülür. Testisin arka yüzünden aşağıya doğru uzanarak inguinal kanaldan geçer ve karın boşluğuna ulaşır. Karın boşluğunda mesane seviyesinde genişleyerek ampullayı oluşturur. Ampullanın son bölümünde vezikula seminalisin kanallarıyla birleşerek,ejekulatuarduktus olarak üretraya açılır (28,44,45).

3.1.2.5.DuktusEjekulatoryus

Basit prizmatik veya yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Epitelin altında yer alanfibröz bağ doku tabakası olup (28), prostatiküretraya açılır (44).

4. İSKEMİ REPERFÜZYON

4.1. İskemi

Doku veya organlardaki arter ve/veya venöz kan akımının azalması sonucu, iskemik bölgenin yeterince kanlanamaması, hücre içindeki enerji depolarının boşalması ve tüm bunların sonucunda hücrelerde toksik madde birikiminin oluştuğu bazen geri dönüşümlü bazen de geri dönüşümsüz hücre veya doku ölümüdür. İskemi sonrası iskeminin olduğu bölge hipokside kalır ve bunun sonucunda da hipoksiye bağlı olarak doku hasarı meydana gelir (70). İskemik hasarın derecesine bağlı olarak hipoksinin derinliği ve şiddeti değişir. İskemiye bağlı olarak gelişen doku hasarı sonucunda hücrelerin enerji depoları boşalır ve toksikmetabolitlerin birikmesi sonucu hücre ölümü gerçekleşir (71). Reperfüzyon ise; hücre hasarı oluşumunu engellemek için kan akımının tekrar başlaması durumudur. İskemive reperfüzyon arteriyal kan akımındaki azalmayı takiben tekrar kanlanmanın ve yeniden oksijenlenmenin gerçekleşmesidir (1).

İskemi insanlarda kan akımındaki azalmayla birlikte genellikle arterialemboli sonucu oluşur, böyle bir durumda diyabet, hiperlipidemi ve yaşlılık gibi farklı risk faktörlerine ek olarak inflamatuar çevrede var olan doku hipoksisi başlar (2). İskemi sırasında hücre içindeki enerji depolarının tükenmesi sonucu, oksijen yokluğu ortaya çıkar. Böylece mitokondrilerdeki elektron transportu ve oksidatiffosforilasyon kapasitesi giderek azalır. Adenozin trifosfat (ATP) kullanımı ve ATP hidrolizi sonucu oluşan Adenozindifosfat (ADP) düzeyi artar (72).

İskemi sonucu hücrelerin ihtiyacı olan enerjinin sağlanamaması, ATP bağımlı Sodyum/Potasyum (Na^+/K^+) iyonlarının pompalamasında yeterli fonksiyonların yerine getirilememesine neden olur. İyon dengesizliği sonucu hücre içinde su birikimi ve bunun sonucunda da akut hücre şişmesine sebep olur. Anaerobik glikolizin neden olduğu asidoz, Karbondioksit (CO_2) birikimi sonucu oluşan Karbonik asit (H_2CO_3) ile daha da yoğunlaşır (73, 74).

Hücre içi Kalsiyum(Ca^{++})veproteolitik enzim artışı sonucu fosfolipazlar aktif hale gelirler. Fosfolipazlar'ın aktifleşmesi sonucunda ise araşidonik asit meydana gelir.

Araşidonik Asit doğrudan mitokondrideki enzimleri inhibe eder böylece serbest radikal oluşumunu arttırır (75).

Eğer hipoksidurumu devam ederse, hücre membranındaki geçirgenlik daha da artar ve mitokondriyal fonksiyonlar giderek durma noktasına gelir. Hücrelerin yüzeyel kısmında bir tomurcuklanma oluşmaya başlar fakat bu durum geçicidir (73). Oksijen alımı tekrar sağlanınca düzelir, fakat sağlanamazsa stoplazmikvakuolasyonlar oluşmaya başlar, böylece mitokondrilerde şişme ve hücre membranında hasar oluşur. Bu aşamadan sonra oluşan hasar artık geri dönüşümsüzdür (76).

4.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon erken ve geç dönemde olmak üzere iki kısımda gerçekleşir (3).Reperfüzyon sonrası meydana gelen doku hasarı oluşmasında hücre içine oksijen girişi ile birlikte meydana gelen Serbest oksijen radikal (SOR)'ler anahtar rol oynamaktadır. Reperfüzyon sonrası hasar gören en hassas yapılar ise lipitler, proteinler, DNA ve nükleik asittir (77).

Reperfüzyon sonrası sitotoksik etkiler ciddi bir şekilde oluşmaya başlar. Bu durumu başlatan en önemli faktör ise SOR'dur (78). Oksijen dokulara ulaşmaya başlayınca Ksantinoksidaz enzimi SOR'u oluşturur (79). SOR'da, Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi sayesinde Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve Oksijen'e (O_2) dönüştürülür (80). SOR; lipit peroksidasyonuna (LP) ve protein hasarına neden olarak hücrelerin normal işlevlerini yerine getirmesine engel olur ve böylece dokularda nekroz meydana gelir (78). Hücrelerdeki SOR birikimi, iyon dengesinin bozulması, sonrasında inflamatuar yanıt ve çoklu organ yetersizliği sendromunun gelişimi ile sonuçlanarak ciddi sonuçlara yol açabilir (4).

Testikülertorsiyonspermatik kordun dönmesinden kaynaklı, başlangıçta testikülerven akışının daha sonra da arteriyel kan akışının kesintiye uğramasıyla sonuçlanır ve bu durum sıklıkla testislerde iskemiye yol açar (5-8,10-14). Testisler bu iskemik sonuçlara, anatomik yapıları (anostomoz olmayan terminal arterlerden dolayı) ve Tunikaalbugineanın esnek olmayan yapısı, testisin yeterince genişlemesini engellediğinden dolayı, yatkındırlar.Testiküler torsiyon, geçici iskemiye sebep olabileceği gibi, başarılı bir detorsiyon yapılsa bile kalıcı hasarlara neden olabilir (5).

İskemi reperfüzyon (I/R) hasarı durumunda dokulara iskemiden daha çok reperfüzyonun hasar verdiğ bilinmektedir. I/R hasarı ile ilgili tam olarak bir tedavi protokolü bugüne kadar geliştirilememiştir bu yüzden hala yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Reperfüzyon IL-1β ve TNF-α gibi çeşitli proinflamatuarsitokinlerin üretiminde artışa neden olurken bu durum testikülerparankimdemakrofaj ve nötrofillerininfiltrasyonuna neden olur. Reperfüzyon sonrası testislerde ROS'un artışı sonucu DNA, proteinler ve testiküler hücrelerin lipitlerinde hasarlar meydana gelir (5-8). Bu patofizyolojik değişiklikler germ hücrelerinin apoptozisine (5,7,8), Sertoli hücrelerinin fonksiyonlarında bozulmaya (5,8), spermatogenezisde bozulmaya ve testiküleratrofiye yol açar (5,8,10). Başarılı cerrahi müdahalelere rağmen testikülertorsiyon durumunda, testiküleratrofi ve inferetilite oranı % 40 ve % 60 oranında gösterilmiştir (17).

İskemi/ reperfüzyon (I/R) hasarının fizyopatolojisisinde rol oynayan faktörler:

1.Serbest oksijen radikalleri (SOR)

2.Polimorf nüveli lökositler (PMNL)

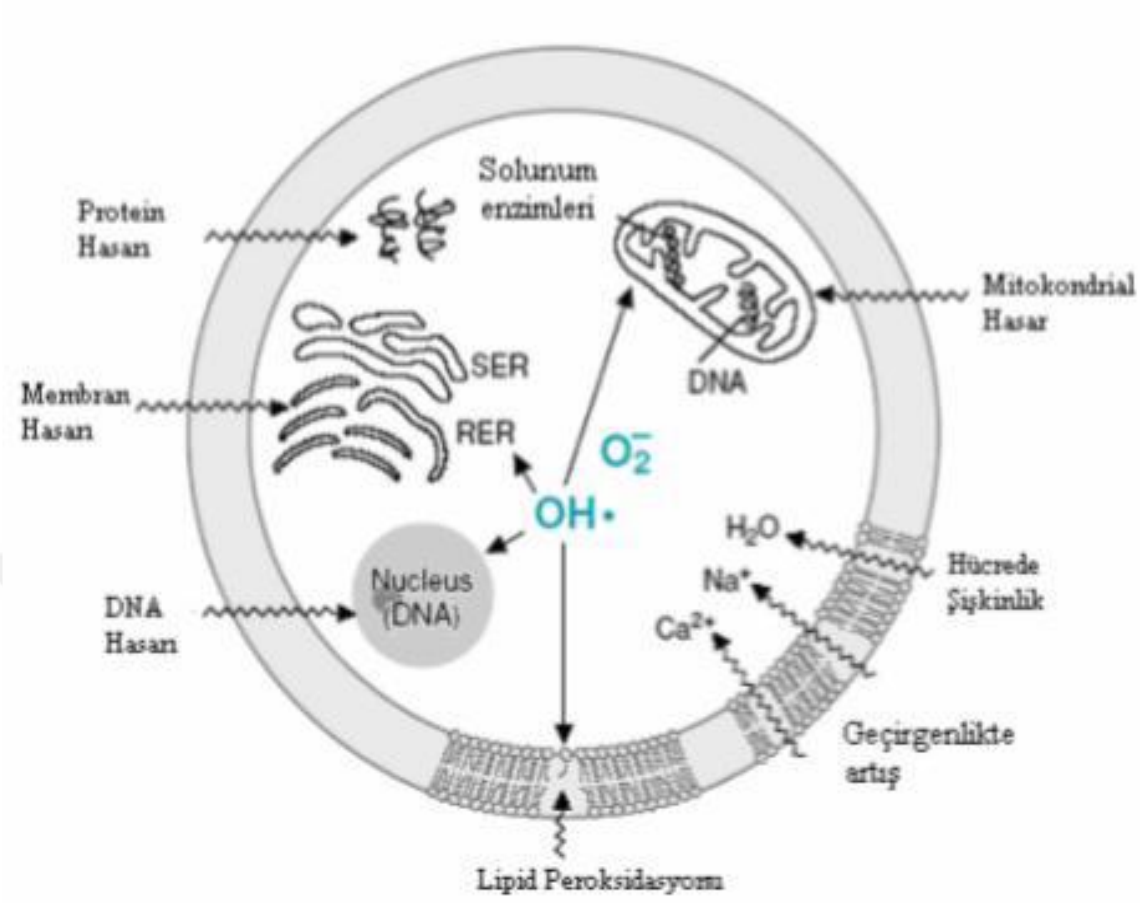
3.Kompleman sistemi
4.Endotel hücreleri'dir (81-83).

5. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ (SOR)

Atomlarda tek çekirdek ve çekirdeği çevreleyen orbitallerde yörüngelerin etrafında gezinen elektronlar vardır. Bazen yüksüz, bazende bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren moleküllere (hidroksil, nitrik oksit, süperoksit ve lipid peroksit) veya atomlara Serbest Oksijen Radikaller (SOR) denir. Serbest radikaller pozitif, nötr veya negatif yüklü olabildiği gibi, organik veya inorganik halde de bulunabilirler (84-86). Serbest radikaller sigara tüketimi, alkol alımı, hava kirliliğine maruziyet, bazı ilaç grupları ve radyasyon maruziyeti sonucunda oluşabilirler (87,88).

Elektronlar O_2 molekülü ile bağlanınca süperoksit radikaller oluşur ve aslında zararlı olan bu form değildir. Süperoksit radikaller reaksiyonlara girerek H_2O_2, hidrojen peroksitte O_2 ile reaksiyona girerek başka bir serbest oksijen radikali olan hidroksil (OH^-) radikalini oluşturmaktadır (89). H_2O_2 hücre membranlarından kolay geçebilen bir serbest radikal değildir fakat reaktif oksijen türleri arasında yer alır (90). Hidroksiller ise eşleşmemiş elektronu olmadığından serbest radikal grubuna girmez fakat serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına sebep olurlar (90,91).

Aktif durumdaki serbest radikaller hücre bileşenleriyle hızlıca etkileşime girerek elektron sayılarındaki azalma sonucu reaktif duruma gelirler (85,92). Serbest radikaller diğer moleküllerden aldığı elektronlar ile kararlı hale gelirken, oluşan yeni serbest radikaller zincirleme bir reaksiyon başlatır (92,93). İskemi sonrası reperfüzyon durumunda dokulardaki işlev kaybının tekrar gelmesi ile SOR oluşmaya başlar ve böylece daha ciddi doku hasarları meydana gelir (94). Kontrolsüz bir şekilde çoğalan serbest radikallerin organizmadaki ilk hedefi hücre zarıdır. Hücre zarını hedef alarak (92, 93), hücre içerisindeki lipitlere ve proteinlere hatta bazen DNA'ya bile zarar verirler (95, 96) ve böylece hücrelerin disfonksiyonuna neden olurlar. Bu nedenle dokularda oluşan serbest radikallerin giderilmesi, doku hasarı önlemek açısından oldukça önemlidir (97).



Şekil 6. Serbest Oksijen radikallerinin hücrelerde oluşturduğu hasarın şematik yapısı (98).

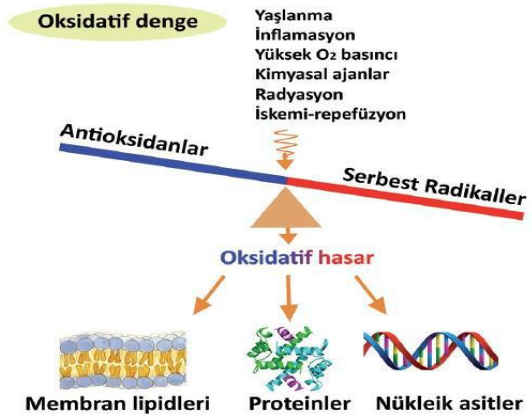
Serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması durumunda oksidatif stres meydana gelir (94). Oksidatif stresin meydana getirdiği hasarı ortadan kaldırmak içinse serbest radikalleri etkisiz duruma getirmek gerekir. Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkileri iki yolla dengelenebilir:

Tablo-1. Enzimatik ve Enzimatik olmayan antioksidanlar (99,100)

Enzimatik antioksidanlar	**Enzimatik olmayan antioksidanlar**		
SüperoksitDismutaz(SOD)	**Suda Çözünenler**	**Yağda çözünenler**	**Metal iyonu Bağlayanlar**
GlutatyonPeroksidaz(GP)	Glutatyon	Vitamin E	Transferin

GlutatyonRedüktaz	Vitamin C	Beta-karoten	Seruloplazmin
Katalaz(KAT)	Sistein	Bilurubin	Haptoglobülin
Glukoz 6-P-Dehidrogenaz	Ürik asit	Flavonoidler	Albumin
Glutatyon-S-Transferaz	Resveratrol	Flavonoidler	Hemopeksin
			Ferritin

Antioksidanlar hücrelerde oksidatif hasarın oluşmasını engelleyen veya olası hasarı ortadan kaldıran maddelerdir (101,102). Antioksidan savunma sistemi ile serbest oksijen radikalleri (SOR) üretimi arasındaki denge bozulduğunda, SOR seviyesi artar. Diyabet, ateroskleroz, karsinogenez, iskemi reperfüzyon hasarı,enfeksiyon ve inflamasyonların SOR seviyesinde artışa neden olduğu bilinmektedir (103-106). Hücrelerde artan serbest oksijen radikalleri antioksidanlar tarafından temizlenmektedir (107).



Şekil 7. Serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki denge (108).

5.1. Antioksidanlar

Antioksidanlar tüm metabolizmayı etkileyen, yokluğunda veya yetersiz olduğu durumlarda ise fizyolojik fonksiyonların durmasına ya da önemli ölçüde azalmasına neden olan maddelerdir (109,110). Prooksidanlar ise lipidler, proteinler ve nükleik

asitlerde oksidatif hasar oluşturan ve böylece çeşitli patolojik hastalıklara yol açan zararlı maddelerdir (111). Antioksidanlar; hem doğrudan hem de dolaylı yollarla ilaçların, kanserojenlerin ve çok sayıda toksik maddelerin oluşturduğu hücre hasarına karşı oluşan bir savunma mekanizmasıdır (112,113).

Vücuttaki metabolik fonksiyonlar normal şekilde devam ederken, sürekli SOR oluşur ve bu durumda endojen antioksidanlar tarafından temizlenir (114). Serbest radikallere karşı ilk savunma SOD tarafından gerçekleştirilir. SOD, O_2'i metabolize ederek OH^- radikalinin oluşumuna engel olur. Katalaz tüm hücrelerde bulunur ve içerisinde bir hemoprotein vardır (115). Glutatyonperoksidaz (GP) ise serbest radikallerin detoksifiye edilmesini sağlayan ve LP' yi önleyen en önemli mekanizmalardan biridir.

Antioksidanların, oksidanları etkisiz hale getirebilmeleri dört yola gerçekleşir:

1. Süpürme etkisi: Oksidanları zayıf moleküllere dönüştürerek etkisiz hale gelmelerini sağlar.

2. Söndürme etkisi: Oksidanlara bir hidrojen vererek inaktive eder ve etkisiz hale gelmelerini sağlar.

3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır metal oksidanlarını kendilerine bağlayarak inaktive hale getirir.

4. Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülleri onararak etkilerini gösterirler (116, 117).

6. ANASON (*Pimpinella anisum*)

Anason (Pimpinella anisium) Umbelliferae (Maydanozgiller) familyasından olup tek yıllık, 30-70 cm boylarında, zayıf kazık köklere sahip uzun gün bitkilerindendir. Anason yaprakları farklı pozisyonlarda düzenlenmiş durumdadır. Anason çiçeği küçük ve beyazdır (118). Anason bitkisinin üç farklı yaprak çeşidi vardır. Kök tarafındaki yapraklar; uzun saplı, yuvarlak veya kalp şeklindedir. Orta kısımdaki yapraklar; birkaç parçadan oluşup köklere doğru daralırlar. Yüzeyel kısımdaki yapraklar ise; kısa saplı ve mızrak şeklinde olup, üç parçadan oluşurlar.

Anason dallarının uç kısmında şemsiye şeklinde çiçek kümeleri bulunmaktadır. Çiçekler küçük, beyaz renkli olup, beş taç yaprak, beş çanak yaprak, bir dişi organ ve beş erkek organdan oluşmaktadır. Anason bitkisinin meyveleri armut biçiminde yeşilimsi- gri renkte olup, 3-6 milimetre(mm) boyunda ve 1-3 mm genişliğindedir (119).



Şekil 8. Anason bitkisinin çiçek açmış görünümü(120).

Anason bitkisinin kökeninin Orta Doğu'ya dayandığı bilinmektedir. Anasonun üretiminin en yaygın olduğu ülkeler arasına Hindistan, Çin, Meksika, Rusya ve İran gelmektedir. Orta doğu ve Doğu Akdeniz havzasında doğal olarak yetiştiriciliği yapılan anason Türkiye, Suriye, Mısır, Fas, İtalya ve İspanya gibi ülkelerde üretilen en eski bitkilerden biridir (121-123). Ülkemiz coğrafi konumu itibariyle, aromatik bitkiler için önemli bir ekim alanına sahiptir. Önemli bir anason ithalatçısı olan Amerika Birleşik Devletleri(ABD)'nin, yıllık ihtiyacının %50'den fazlasını Türkiye'den karşıladığı bilinmektedir (124, 125). Türkiye'nin 2016 yılında anason ihracatı 3.250.540 kg olmuştur (126). Ülkemizde üretilen anasonun büyük bir kısmı rakı fabrikalarına satılırken, kalan kısmı ihracat amacıyla yada ülke içinde kullanılmak üzere baharatçılara satılmaktadır (127). Anason meyveleri ticari ismiyle anason tohumu olarak da bilinmektedir (128, 129). Anason meyveleri ayrıca Türkiye için ekonomik getirisi olan bir bitkidir (130).

Tablo-2. 1990-2019 yılları arasındaki anason bitkisininekim alanı ve toplam üretim miktarı (131).

Yıllar	**Alan (Dekar)**	**Üretim (Ton)**
1990	164. 000	9 500
1995	360 000	25 000
2000	360 000	20 000
2005	165 000	9 500
2010	186 450	13 992
2011	211 542	14 879
2012	194 430	11 023
2013	152 431	10 046
2014	140 506	9 309
2015	138 118	9 050
2016	136 552	9 491
2017	121 833	8 418
2018	124 455	8 664
2019	239 171	17589

Anason yetiştiriciliği öncelikli olarak tohum elde etmek için yapılmaktadır. Türkiye'de anason ekiminin % 42'si Ege, % 52'si Akdeniz ve % 6' sı Marmara bölgesinde yapılmaktadır. Üretiminin ise % 50.7'si Akdeniz, % 41.2'si Ege bölgesinde % 6.3'ü de Marmara bölgesinde yapılmaktadır (132). Üretim alanının 71.640'ı Akdeniz bölgesinde, 57.262'si Ege bölgesinde, 7.650'i ise Marmara bölgesinde bulunmaktadır. Toplam üretimin ise 4.810 ton'u Akdeniz bölgesinden, 4.118 ton'u Ege bölgesinden, 563 ton'u ise Marmara bölgesinden elde edilmektedir (133). Türkiye'de Pimpinella cinsine ait yaklaşık olarak 23 farklı tür bulunmaktadır (134).

6.1. Anason'un Bileşenleri

Fitokimyasal çalışmalar, anason'un NO, superoksit, 1,1- difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) gibi radikallerin aktivitesini inhibe eden ve etkinliğini azaltan çok sayıda aktif bileşen ve antioksidanlar içerdiğini göstermiştir (21). Anason kahverengi-sarımsı tohumlara sahip olup, tohumların içeriğinde %1,5-5 oranında uçucu yağ, %10-20 sabit yağ, %18'de protein bulunmaktadır (20). Uçucu yağın büyük bir kısmını ise trans anethol oluşturur (135, 136). Trans anethol'ün kendine özgü kokusu vardır ve tatlımsı bir tadı vardır. Anasonda estragol, anisaldehit, matilkavikol,öjenol, anisalkol ve monoterpenler bulunmaktadır (21). Anasonun bir diğer bileşeni ise metilkavikol'dur. Metilkavikol anasona acımsı bir tat verip ayrıca koku sağlar. Anason tohumlarında ayrıca, % 10-20 sabit yağ, % 18 protein bulunmaktadır (125,136).

Aromatik bitkilerden uçucu yağ elde etmek için kullanılan yöntemler;

- Su distilasyonu,
- Buhar distilasyonu,
- Çözgen ekstraksiyonu,
- Süperkritik akışkan ekstraksiyonu,
- Katı faz mikro ekstraksiyon gibi yöntemlerdir (137).

Elde edilen bu uçucu yağların yıllarca değerli olması; ilaç, gıda, parfüm ve kozmetik sanayiinde yaygın olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır (138).

Anason Yunanca "aniemi" sözcüğünden köken alıp, Yunanca da "anison" ve Arapça da "anysum" anlamına gelmektedir (139). Türkiye'de ise Gaziantep bölgesinde "nanhan" olarakta adlandırıldığı bilinmektedir (140).



Şekil 9. Anason bitkisine ait tohumların kurutulmuş görünümü (120).

6.2. Anason' un Kullanım Alanları

Bitkiler ve onların özütleri bazı hastalıklarda geleneksel olarak uzun zamandan beri dünya çapında kullanılmaktadır (18). Anason aromatik bir bitkidir, bir çok ülkede yetiştirilir fakat, Türkiye, İran ve Hindistanda endemik olarak bulunur (19). Anason çok eski bir bitki türü olup, tedavi amaçlı kullanıldığı zamanların çok eski yıllara dayandığı tahmin edilmektedir. Çok çeşitli kullanım alanlarına sahip olduğu bilinen bitkinin çeşitli hastalıklarda tıbbi amaçlarla kullanıldığı bilinmektedir (141, 142).

Hidrofobik yüzeylerde ayarlanabilir şekillere ve yüksek gözenekliliğe sahip büyük miktarda suprapartikül üretmek için ilaç endüstrisinde de kullanılır (143). Anason sindirim, jinekolojik, nörolojik,dispepsi, kronik bronşit ve solunum yolu hastalıkları gibi bazı hastalıklarda tedavi edici etkiye sahiptir (22). Ayrıca antioksidan,

hepatoprotektif, hipofiz tiroid ekseni toksisitesi gibi farklı amaçlarla kullanılmaktadır (23).

Anason bitkisi ülkemizde yaklaşık olarak 10.000 ton civarında üretilmektedir. Bu miktarın yedi bin tonu rakı üretiminde kullanılırken, üç bin tonu ihraç edilmektedir (144, 145).

Anason tohumları iştah açıcı, gaz giderici, uyku verici özelliklere sahiptir. Elde edilen uçucu yağ, renksiz ve tatlımsı olup gıda sanayide, tıp ve eczacılıkta, kozmetiklerin kötü kokularını azaltmak için parfümlerde, sabunlarda, deterjanlarda, kremlerde ve losyonlarda, diş macunu ve diş temizleyicilerin yapımında ve bunların tatlandırılmasında, kullanılır (146,147).

Anason uçucu yağı; gaz giderici, stimülan, spazmolitik, zayıf antibakteriyel, ekspektoran (balgam söktürücü) etkilerinden dolayı öksürük ilaçları ve pastillerin yapımında, süt arttırıcı, diüretik (idrar söktürücü) ve terlemeyi arttırıcı, dispeptik şikâyetlerde, antikaser (147), antiülser (148), antiosteoporozis (149), antihemolitik, antiinflamatuar (21, 150), hafif ve orta dereceli depresyon hastalarında (151), tarımsal uygulamalarda böcek öldürücü veya güve ve uyuza karşı gibi birçok tedavi ve amaçlarda kullanılır.Ayrıca yapılan araştırmalarda anasondan elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal (152), antifungal, analjezik, antiviral, antioksidan, antispazmolitik etkilere sahip olduğu da bilinmektedir (153-160).

Anason, ilaç olarak kullanımı dışında gıda maddesi ve baharatlarda da kullanılabilir. Ekmek, simit, kraker, çörek, pasta, marmelat ve bazı peynir çeşitlerine koku ve aroma verici olarak eklenebilir. Bazı Avrupa ülkelerinde genç bitkinin yaprak ve sürgünleri salataya lezzet vermesi için de kullanılır (142, 161, 162).

7. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için, Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığından (DÜHADEK) 30/09/2020 tarih ve 2020/29 protokol numarası ile izin alınmıştır. Dicle Üniveritesi Sabahattin Payzın Araştırma Merkezi'nden temin edilen (DÜSAM) 8-10 haftalık 48 adet Wistar Albino cinsi erkek ratlar üzerinde yapılmıştır. Çalışmanın deneysel bölümü DÜSAM hayvan bakım merkezinde; histolojik doku takipleri ve analizler Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarında; biyokimyasal çalışmalar Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında yapılmıştır.

Anason'un Sulu Ekstresinin Hazırlanması

Yaklaşık 1-1,5 kg anason kuru tohumu yerel bir satıcıdan temi edildi. Diyarbakır Tarım Meslek Yüksekokulu, Organik Tarım Bölümü hocası Prof. Dr. Özlem TONÇER'e teyit edilerek doğruluğu kanıtlandı. Uygulanan anason karışımı Gamberini'nin protokolüne göre hazırlandı (163). 100 gr Anason tohumu 1 L distile suda 70 °C de, 30 dk bekletilip demlendirildi. Daha sonra bu sulu özütten günlük 5mL/ kg/ gün peroral (p. o.) verildi.

7.1. Deney Hayvanları Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü

Çalışmada ortalama 8-10 haftalık, ağırlıkları 320-400 gr aralığında değişen 48 adet Wistar Albino cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar paslanmaz çelik kafeslerde 22±2 ºC de, % 60 nemli ortamda, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ışık periyodunda, normal diyet ile herhangi bir hareket veya yem/su kısıtlaması yapılmaksızın beslendi. Yemler; çelik kaplarda, suları ise; cam biberonlarda çeşme suyu olarak verildi. Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda, özel olarak hazırlanmış kafeslerde 8'li gruplar halinde 6 grup olarak ayrıldı. Davranışsal değişiklikleri, fiziksel görünümleri günlük olarak gözlemlenip kaydedildi. Her bir sıçan ayrı ayrı tartılıp ağırlıkları belirlenerek, literatürlere uygun hesaplanan ilaç dozları belirlendi. Deneyde kullanılacak olan bütün ratların bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Tablo-3. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin içeriği

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29,4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0,6
Kavimix VM 23-Z (%) *	0,2
Methionin (%)	0,2
DCP (%)**	1,6

* 1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D_3, 12 mg E, 0,8 mg K_3, 0,8 mg B_1, 2,4 mg B_2, 1,2 mg B_6, 0,006 mg B_{12} vitaminleri, 16 mg Nicotinamid, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0,32 mg Folicacid, 0,02 mg D-Biotin, 50 mg CholinChloride, 20 mg ZincBacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.
** % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur.

7.2. Deney Gruplarına Yapılan Uygulamalar

Deneysel aşamaya geçildiğinde hayvan refahı korunarak testis iskemi-reperfüzyon işleminden önce bütün deney hayvanlarına 90 mg/kg Ketamin hidroklorür (Ketalar; Prizer, İstanbul, Türkiye) intraperitonal (i.p.) ve 10 mg/kg Xylazine (Rompun; Bayer, İstanbul, Türkiye) i.p. uygulanarak genel anestezi sağlandı. Sedasyon kontrolü cilt veya parmak kıstırma hareketine bakılarak düzenli aralıklarla yapıldı. Cerrahi işlemlere başlamadan önce profilaktik olarak 50 mg/kg dozdan Sefriakson grubu antibiyotik intramüsküler (ı.m.) yapıldı. Tüm ratlar anestezi uygulamasından sonra operasyon masasına sabitlenerek supin pozisyonunda, skrotum bölgesi traşlanarak %10 povidon- iyot ile temizlendikten sonra skrotum cildine orta hattan insizyon yapıldı. Daha sonra periton açılıp testisler skrotum dışına çıkarıldı ve her iki testis 270^o uzun ekseni etrafında döndürülerek testis iskemisi başlatıldı. 30 dakika (dak) iskemi periyodunun sonunda testisler detorsiyone edilip 30 dakika reperfüzyon süresi beklendi. Sonrasında iskemi- reperfüzyonu tamamlanan testisler batın içerisine redükte edildi. Periton 3/0 vcriyl ile onarıldı. Cilt ise 3/0 prolen ile kapatıldı. İşlemler sonrası hayvanlara analjezi için 20 mg/kg'dan asetominofen p.o. verildi ve 7 gün boyunca günlük pansumanları yapıldı.

Grup 1 (n=8): Kontrol grubu olup, hayvanlara deney süresince herhangi bir invaziv işlem uygulanmadı. 2. ayın sonunda ratlar ekzanguinasyon ile sakrifiye edilip, kan örnekleri ve testisler inceleme amacıyla alındı.

Grup 2 (n=8): Anason grubu olup, deney hayvanlarına 30 gün boyunca Gamberini' nin protokolüne göre hazırlanan anasonun sulu ekstresinden gavajla 5 mL/kg/gün p.o. verildi. 30. Günün sonunda ratlar ekzanguinasyon ile sakrifiye edilip, kan örnekleri ve testisler inceleme amacıyla alındı.

Grup 3 (n=8): Testis iskemi- reperfüzyon grubu olup, deneyin ilk günü, hayvanlar genel anesteziye alındıktan sonra skrotum orta hattı küçük bir insizyonla açılarak bilateral testisler skrotum dışına çıkarıldı ve her iki testis 270^{o} uzun ekseni etrafında döndürülerek testis iskemisi başlatıldı. 30 dak iskemi periyodunun sonunda testisler detorsiyone edilip 30 dak reperfüzyon süresi beklendi. Reperfüzyon süresinin dolmasını müteakiben hayvanlar ekzanguinasyon ile sakrifiye edilip, kan örnekleri ve testisler inceleme amacıyla alındı.

Grup 4 (n=8): Testis iskemi-reperfüzyon+ Anason grubu olup, deneyin ilk günü, hayvanlar genel anesteziye alındıktan sonra skrotum orta hattı küçük bir insizyonla açılarak bilateral testisler skrotum dışına çıkarıldı ve her iki testis 270^{o} uzun ekseni etrafında döndürülerek testis iskemisi başlatıldı. 30 dak iskemi periyodunun sonunda testisler detorsiyone edilip 30 dak reperfüzyon süresi beklendi. Reperfüzyon süresinin dolmasını müteakiben testisler batın içerisine redükte edildi. Periton 3/0 vcriyl ile onarıldı. Cilt ise 3/0 prolen ile kapatıldı. Sonrasında ise 30 gün boyunca anasonun sulu ekstresinden gavajla 5mL/kg/gün p.o. verildi. 30. günün sonunda başka herhangi bir uygulama yapılmadan ratlar yine genel anestezi altında ekzanguinasyon ile sakrifiye edilip, kan örnekleri ve testisler inceleme amacıyla alındı.

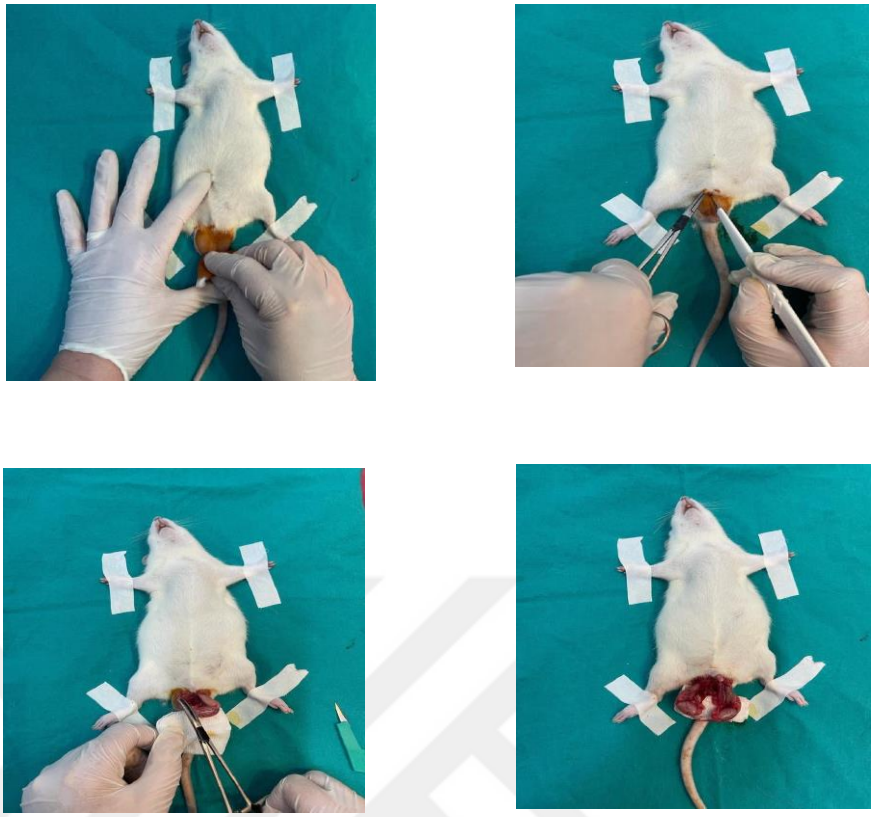
Grup 5 (n=8): Anason+ Testis iskemi-reperfüzyon grubu olup, deney hayvanlarına 30 gün boyunca Gamberini' nin protokolüne göre hazırlanan anasonun sulu ekstresinden gavajla 5 mL/kg/gün p.o. verildi. 30. günün sonunda hayvanlar genel anesteziye alınıp, skrotum orta hattı küçük bir insizyonla açılarak bilateral testisler skrotum dışına çıkarıldı ve her iki testis 270^{o} uzun ekseni etrafında döndürülerek testis

iskemisi başlatıldı. 30 dak iskemi periyodunun sonunda testisler detorsiyone edilip 30 dak reperfüzyon süresi beklendi. Reperfüzyon süresinin dolmasını müteakiben hayvanlar ekzanguinasyon ile sakrifiye edilip, kan örnekleri ve testisler inceleme amacıyla alındı.

Grup 6 (n=8): Anason+ Testis iskemi-reperfüzyon+ Anason grubu olup, deney hayvanlarına 30 gün boyunca Gamberini' nin protokolüne göre hazırlanan anasonun sulu ekstresinden gavajla 5 mL/kg/gün p.o. verildi. 30. günün sonunda hayvanlar genel anesteziye alınıp, skrotum orta hattı küçük bir insizyonla açılarak bilateral testisler skrotum dışına çıkarıldı ve her iki testis 270^{o} uzun ekseni etrafında döndürülerek testis iskemisi başlatıldı. 30 dak iskemi periyodunun sonunda testisler detorsiyone edilip 30 dak reperfüzyon süresi beklendi. Reperfüzyon süresinin dolmasını müteakiben testisler batın içerisine redükte edildi. Periton 3/0 vcriyl ile onarıldı. Cilt ise 3/0 prolen ile kapatıldı. Sonrasında ise 30 gün boyunca anasonun sulu ekstresinden gavajla 5mL/kg/gün p.o. verildi. 30. günün sonunda başka herhangi bir uygulama yapılmadan ratlar yine genel anestezi altında ekzanguinasyon ile sakrifiye edilip, kan örnekleri ve testisler inceleme amacıyla alındı.

Deney sonlandırılmadan hemen önce, tüm deney gruplarının bilateral testis ağırlıkları alındı ve hassas terazi ile ağırlıkları ölçülüp kaydedildi. Oluşan atıklar, imha edilmek üzere toplama poşetlerine alınarak görevli personele teslim edildi.

Alınan kan örnekleri Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAS) ve Toplam Oksidan Kapasitesi (TOS) ölçümü için EDTA'lı tüplere alınarak, 3000/dak devirde, +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Plazma örnekleri ayrılarak çalışma süresine kadar -80°C'de saklandı. Testis dokuları ise % 10 tamponlamış formaldehit solüsyonunda tespit edildi.



Şekil 10. Deney hayvanlarına uygulanan iskemi-reperfüzyon hasarının aşamaları.

7.3. Vücut ve Organ Ağırlıklarının Ölçümü

Çalışma gruplarındaki bütün deney hayvanlarının canlı ağırlıkları deney sürecinin başlangıcında ve sonunda tartılarak kaydedildi. Deney sonunda sıçanlar dekapite edilip, alınan sağ ve sol testisler yağ dokuları ve çevre dokulardan iyice temizlendikten sonra Tech master marka hassas terazide tartılarak ölçüldü. Toplam testis ağırlık indeksi (TAİ) aşağıda verilen formül ile hesaplandı (164).

$$\text{TAİ} = \frac{\text{Ortalama (Sağ+Sol) testis ağırlığı (g)}}{\text{Vücut ağırlığı (g)}} \times 100$$

7.4. Rutin Histolojik Takip

Sakrifiye edilen hayvanlardan alınan testis örnekleri %10 formalin (Sigma #SZBE2450V) içerisinde 24 saat fiksasyona tabii tutulduktan sonra, küçültülen

dokular 24 saat daha fikse edildi. Fiksasyon sonrası 12 saat çeşme suyunda yıkanan doku örnekleri dehidrasyon için artan alkol serilerinden geçirildi.

Tablo-4. Histolojik takibinin aşamaları

Sıra	İşlem	Süresi
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1.5 saat
3	% 96 Alkol I	30 dakika
4	% 96 Alkol II	30 dakika
5	% 100 Alkol I	30 dakika
6	% 100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylene I	25 dakika
9	Xylene II	25 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylene	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 Saat
12	Yumuşak parafin – Sert parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat
14	Gömme	

7.5. Histokimyasal Metodlar

Pozitif şarjlı lamlara alınan doku örneklerine boyama öncesi 1 saat 58℃'deki etüvde parafin depolimerizasyonu sağlanmıştır. Etüvden alınan kesitlere, histolojik değerlendirme için Hematoksilen & Eozin (H&E), bazal membran değişiklikleri için Periyodik asit Schiff (PAS) boyama protokolleri uygulandı.

7.5.1. Hematoksilen& Eozin Boyama Protokolü

1. Alınan kesitler Xylolde 2x15 dakika bekletilerek deparafinize edildi.
2. Kesitler azalan alkol serilerinin her birinde (%100, %100, %96, %90, %80, %70) 5 dakika geçirilerek distile suya kadar getirildi.

3. Çekirdek boyaması için Harris Hematoksilen solüsyonunda 7 dakika boyunca bekletildi.

4. Akarsuda 5 dakika kadar yıkanan kesitler %90'lık etil alkole daldırıldı.

5. Zıt boyama olarak %1 alkolik Eozin de 2 dakika boyunca boyandı.

6. Ardından kesitler artan alkol serilerinden geçirildi.

7. Daha sonra Xylolde 2x15 dakika bekletilerek şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi.

8. Son olarak bütün kesitlerentellan ile kapatıldı.

7.5.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü

1. Pozitif şarjlı lamlara alınan kesitler 2x15 dakika Xylolde bekletilerek deparafinize edildi.

2. Azalan alkol serilerinden; %100 Alkolde 10 dakika, %96'lık alkolde 5 dakika, %90'lık alkolde 5 dakika, %70'lik alkolde 2 dakika ve %50'lik alkolde 2 dakika bekletilerek distile suya kadar getirilip, 5 dakika bekletildi.

3. Kesitler PAS (BioOptica, lot# 08211) kit prosedürü takip edilerek boyandı.

4. Kesitlerin üzerine A solüsyonundan 10 damla dökülerek 30 dakika bekletildi.

5. Kesitlerin üzerindeki solüsyon döküldü ve yıkanmadan üzerine 15 damla B solüsyonundan damlatılarak 10 dakika beklendi.

6. Kesitler çeşme suyunda 5 dakika yıkandıktan sonra, distile suda 2 dakika yıkandı.

7. Kesitlerin üzerine 10 damla C solüsyonu damlatılıp 10 dakika bekletildikten sonra distile suda yıkandı.

8. Kesitler üzerine 10 damla D solüsyonu damlatılıp 20 dakika bekletildi sonra distile suda yıkamaya alındı.

9. Kesitler üzerine 10 damla E solüsyonu damlatılıp 2 dakika bekletildi.

10. Kesitleri yıkamadan üzerindeki solüsyon dökülerek, üzerlerine F solüsyonundan 10 damla damlatıldı ve 3 dakika beklendikten sonra distile suda yıkandı.

11. Kesitlerin üzerine 10 damla G solüsyonundan damlatılarak 2 dakika bekletildikten sonra çeşme suyunda mavi boya gidinceye kadar yaklaşık 5 dakika yıkandı.

12. Kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. %100'lük alkolde de 1 dakika bekletildi.

13. Dehidre edilen kesitler 2x15 dakika xylol serilerinden geçirilerek şeffaflaştırıldı.

14. Daha sonra entellan ile kapatıldı.

7.6. İmmunohistokimyasal Metodlar

Rutin histolojik doku takibi sonrasında testislerden alınan kesitlerde antikor boyaması olarak ve IL-6 uygulaması yapıldı.

7.6.1. İnterlökin-6 (IL-6) İmmunohistokimyası

1. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı.

2.Xylolde 2x15 dakika bekletilerek deparafinize edildi.

3. Daha sonra xylolden temizleme işlemi ve dehidrasyon için azalan alkol serilerinin (%100, %100, %96, %90, %80, %70) her birinde 5 dakika bekletilip distile suya kadar getirildi.

4. Kesitler, antijen retrevial işlemi için etilen daimin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonuna alındı ve mikrodalga fırında 3x6 dakika ısıtıldı.

5. Kesitler mikrodalga fırından alınarak 15 dakika oda sıcaklığında soğuma işleme alındı.

6. Kesitler 3x5 dk tamponlanmış fosfat salin (PBS) çözeltisi içine alınarak yıkama işlemi gerçekleştirildi.

7. Yıkama işlemi sırasında kesitlerin kurumaması için immunohistokimya barı hazırlanıp nemli bir ortam sağlandı. Ardından hidrofobik kalem ile kesitlerdeki dokular çizilip bara dizildi.

8. Kesitlerin üzerine metanol içerisinde hazırlanan %3'lük H_2O_2'de damlatılarak 20 dakika süreyle endojen peroksit blokajı gerçekleştirildi.

9. Kesitler PBS'e alınarak 3x5 dakika süreyle yıkandı.

10. Kesitlere Ultra V Block solusyonunda (Thermo, catno: TA-125-UB) damlatılarak 7 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından Blocking solüsyonu kesitlerden uzaklaştırıldı.

11. Örnekler yıkamaya alınmadan antibody diluent (Thermo, catno: TA-125-UD) ile 1/250 oranında dilüe edilen primer antikor IL-6(SantaCruz) ile +4 °C'de gece boyunca inkubasyona bırakıldı.

12. Ertesi gün kesitler oda ısısında (28 °C) 1 saat ek inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra kesitler PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

13. Kesitler anti rabbit sekonder antikor ile (Thermo, catno: TP-125-BN) 30 dakika süreyle inkübe edildi.

14. Sekonder antikordan alınan kesitler PBS ile 3x5 dakika süreyle yıkandı.

15. Kesitler 30 dk süreyle oda ısısında streptavidin peroksidaz (Thermo, catno: TS-125-HR) ile enzim bağlanması için inkübe edildi.

16. Strepatavidin peroksidaz inkübasyonu sonrası PBS ile 3x5 dk yıkandı.

17. Kesitler 3,3'diaminobenzidine (DAB) kromojen (Thermo, catno: TA-125-HD) ile reaksiyona tabi tutuldu.

18. Mikroskop altında reaksiyon izlendi ve spesifik tutunum gözlendiğinde kesitler PBS'e alınarak reaksiyon sonlandırıldı.

19. Kesitler 40 saniye süreyle Mayerhematoksilen ile zıt boyamaya yapıldı.

20. Çeşme suyunda 5 dakika kadar yıkama işlemi gerçekleştirildi.

21. Kesitler artan alkol serilerinde 5'er dakika bekletildi.

22. Kesitler Xylol'de 2x15 dakika bekletilerek şeffaflandırma işlemi gerçekleştirildi.

23. Ardından kesitler entellan ile kapatıldı ve oda ısısında kurumaya bırakılan kesitler daha sonra analiz edilmek üzere kapalı lam kutularında muhafaza edildi.

7.6.2. BCL-2 İmmunohistokimyası

1. Parafin bloklardan alınan 5 μm kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Xylolde 2x15 dakika bekletilerek deparafinize edildi.

2. Kesitler xylolden temizleme işlemi ve rehidrasyon için azalan alkol serilerinin (%100, %100, %96, %90, %80, %70) her birinde 5 dakika bekletilip distile suya getirildi.

3. Kesitler, antijen retrevial işlemi için sitrik asit tamponu (ph:6.0, 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit) içine alınarak 10 dakika mikrodalga fırında 750 watta tutuldu.

4. Kesitler mikrodalga fırından alınarak 20 dakika oda sıcaklığında soğuma işleme alındı.

5. Kesitler 3x5 dk tamponlanmış fosfat salin (PBS) çözeltisi içine alınarak yıkama işlemi gerçekleştirildi.

6. Yıkama işlemi sırasında kesitlerin kurumaması için immunohistokimya barı hazırlanıp nemli bir ortam sağlandı. Ardından hidrofobik kalem ile kesitlerdeki dokular çizilip bara dizildi.

7. Kesitlerin üzerine metanol içerisinde hazırlanan %3'lük H_2O_2'de damlatılarak 25 dakika süreyle endojen peroksit blokajı gerçekleştirildi

8. Kesitler PBS'e alınarak 3x5 dakika süreyle yıkandı

9. Kesitlere Ultra V Blocksolusyonunda (Thermo, catno: TA-125-UB) damlatılarak 7 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından Blocking solüsyonu kesitlerden uzaklaştırıldı.
10. Örnekler yıkamaya alınmadan antibodydiluent (Thermo, catno: TA-125-UD) ile 1/100 oranında dilüe edilen BCL-2 antikoru (SantaCruz) ile +4 ℃'de gece boyu inkübe edildi.
11. Ertesi gün kesitler oda ısısında (28 °C) 1 saat ek inkübasyona tabi tutuldu.
12. Daha sonra kesitler PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
13. Kesitler biyotinli rabbit sekonder antikoru (Vector Lab, catno: BA 1000, 1:400 dilüsyon) ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
14. Sekonder antikordan alınan kesitler PBS ile 3x5 dakika süreyle yıkandı.
15. Kesitler 40 dakika süreyle oda ısısında Streptavidin peroksidaz **(**SCYTEK, catno: ABG125) ile enzim bağlanması için inkübe edildi.
16. Strepatavidin peroksidaz inkübasyonu sonrası PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
17. Kesitler 3,3'diaminobenzidine (DAB) kromojen (SİGMA, catno: D4168) ile reaksiyona tabi tutuldu.
18. Mikroskop altında reaksiyon izlendi ve spesifik tutunum gözlendiğinde kesitler PBS'e alınarak reaksiyon sonlandırıldı.
19. Kesitler 40 saniye süreyle Mayer hematoksilen ile zıt boyamaya yapıldı.
20. Çeşme suyunda 5 dakika kadar yıkanan kesitler artan alkol serilerinde 5'er dakika bekletildi.
21. Kesitler Xylol'de 2x10 dakika bekletilerek şeffaflandırma işlemi gerçekleştirildi.
22. Kesitler entellan ile kapatıldı ve oda ısısında kurumaya bırakılan kesitler daha sonra analiz edilmek üzere kapalı lam kutularında muhafaza edildi.

7.7. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS)

Güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur. Bu çalışmada tüm gruplardaki ratlardan alınan venöz kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak, 3000/dak devirde +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Plazma örnekleri ayrılarak çalışma süresine kadar -80°C'de saklandı. Çalışma başlamadan önce kitlerin ve serum örneklerinin oda ısısına (+25 °C) gelmesi beklendi. Serum örneklerinde TAS µmol/L düzeyleri ölçümü Rel Assay Diagnostic Türkiye kiti (Lot:NN21117A) ile çalışıldı. TAS µmol/L (mikromolar/litre) ölçü birimi olarak

µmol/L ve okuma cihazı olarak Beckman Coulter marka AU5800 model cihaz kullanıldı. Erel tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem kullanıldı (165).

7.8. Total Oksidan Kapasitesi (TOS)

Bu çalışmada tüm gruplardaki ratlardan alınan venöz kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak, 3000/dak devirde +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Plazma örnekleri ayrılarak çalışma süresine kadar -80°C'de saklandı. Çalışma başlamadan önce kitlerin ve serum örneklerinin oda ısısına (+25 °C) gelmesi beklendi. Serum örneklerinde TOS düzeyleri ölçümü Rel Assay Diagnostic Türkiye kiti (Lot: NN211290)olarak çalışıldı. TOS'un ölçü birimi olarak mmol/L (milimolar/litre) ve okuma cihazı olarak Beckman Coulter marka AU5800 model cihazkullanıldı. Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntem kullanıldı (166).

7.9. Morfolojik ve İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS for Windows version 20 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) istatistik programında yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini değerlendirmek için Shapiro Wilk testi uygulandı. Bütün grupların TAS µmol/L ve TOS mmol/L değerleri, deney başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları, TAİ (toplam ağırlık indeksi) ve testis ağırlıkları karşılaştırıldı.

Test sonucuna göre normal dağılım kriteri olarak çarpıklık (skewness) ve basıklık (kurtosis) değerlerinin -1,5 ve +1,5 arasında olması ve Shapiro-Wilk testinin $p>0,05$ olması baz alındı. Normal dağılım gösteren verilere, parametrik testlerden Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) testi uygulandı. Gruplar arası karşılaştırmada ise aralarındaki farklılıkları tespit etmek amacıyla, Post- Hoc Tamhane's T2 ve Tukey testleri kullanıldı. İstatistiksel olarak $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

Normal dağılım göstermeyen verilere ise Non-parametrik testlerden Kruskal Wallis-H testi uygulandı. Anlamlı çıkan değişkenler arasındaki farklılıkları tespit etmek için ise Mann Whitney-U testi yapıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ değeri durumunda anlamlı olarak kabul edildi.

Histopatolojik değerlendirmede H&E ve PAS ile boyanan dokular ışık mikroskobu ile değerlendirilerek ayrıca her gruptan rastgelene alınan 10 seminifer tübül sayımı yapıldı. Bu tübüller Johnsen testiküler biyopsi skorlamasına tabi tutuldu (167).

Tablo-5. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması (167).

Değerlendirme	**Skor**
Düzenli ve tam spermatogenezis ve tubül yapısı mevcut	10
Lumende yoğun spermatozoa ancak spermatogenik hatta düzensizlik ve epitelyum organizasyonunda bozulma mevcut	9
Lumende az miktarda spermatozoa ve geç spermatid mevcut	8
Lumendespermatozoa yok ancak spermatidler mevcut	7
Çok az sayıda spermatid mevcut	6
Spermatozoa ve spermatid yok ancak yoğun spermatosit mevcut	5
Çok az sayıda spermatosit mevcut	4
Yalnızca spermatogonia mevcut	3
Germ hücresi bulunmuyor sadece Sertoli hücreleri mevcut	2
Germ hücresi veya Sertoli hücresi bulunmuyor	1

8. BULGULAR

8.1. TAS ve TOS Bulgular

Yapmış olduğumuz deneysel çalışmamızın TAS düzeylerinin normallik analizini değerlendirmek amacıyla uygulanan Shapiro- Wilk testinin p>0,05 olması kriter kabul edildi. Normal dağılım göstermeyen TAS düzeylerinin homojenlik analiz grafiği Grafik-1'de gösterildi. Bunun sonucunda Non parametrik testler kullanıldı. Kruskal Wallis-H testinin anlamlı çıkması (p<0,05) üzerine, gruplar arası ikili karşılaştırmada Mann Whitney- U yapıldı. TAS düzeylerinin biyokimyasal analiz sonuçlarının ortalamaları Tablo-6 ve Grafik-2'de gösterildi. Yapılan gruplar arası karşılaştırmada TAS düzeyleri açısından;

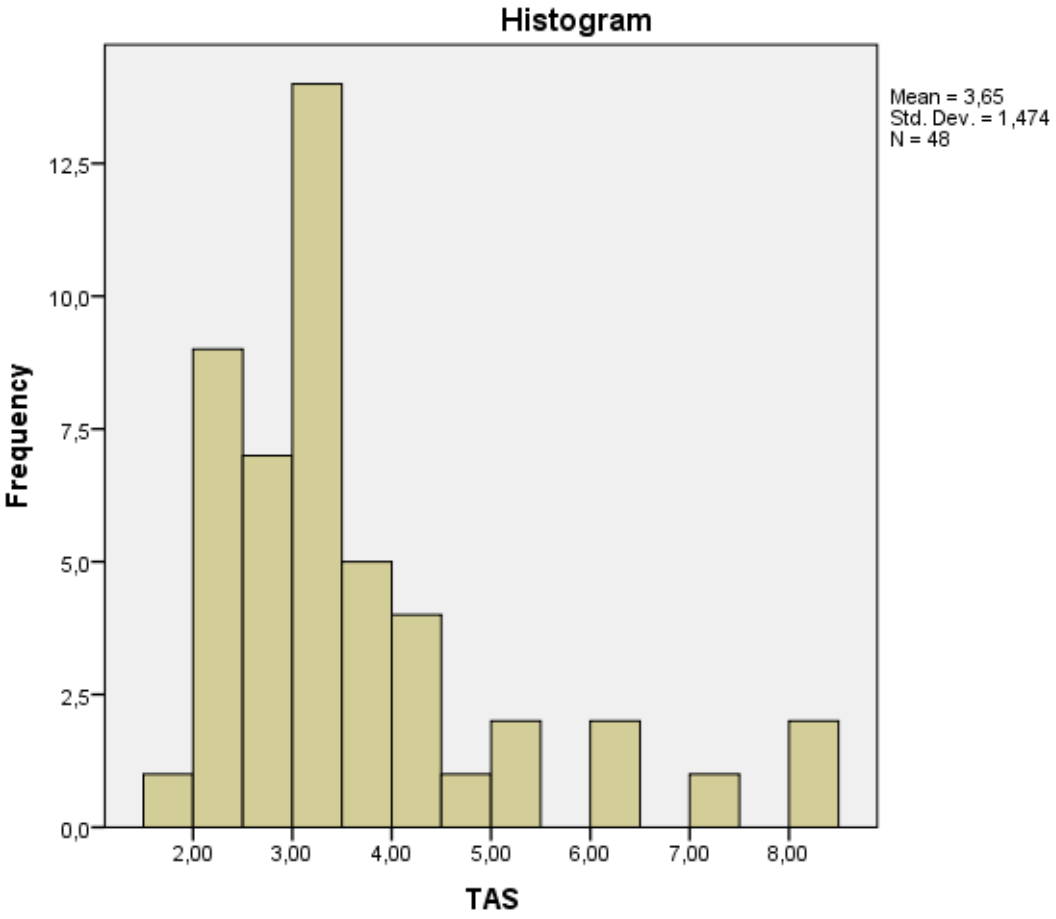
Kontrol grubu ile Anason grubu arasında serum TAS düzeyleri açısından anlamlı fark olduğu görülürken (p<0,05), kontrol grubu ile diğer çalışma grupları arasında anlamlı fark olmadığı izlendi (p>0,05).

Anason grubu ile Anason+ I/R+ Anason grubu arasında anlamlı fark olmadığı (p>0,05) görülürken, anason grubu ile diğer gruplar arasında fark olduğu görüldü (p<0,05).

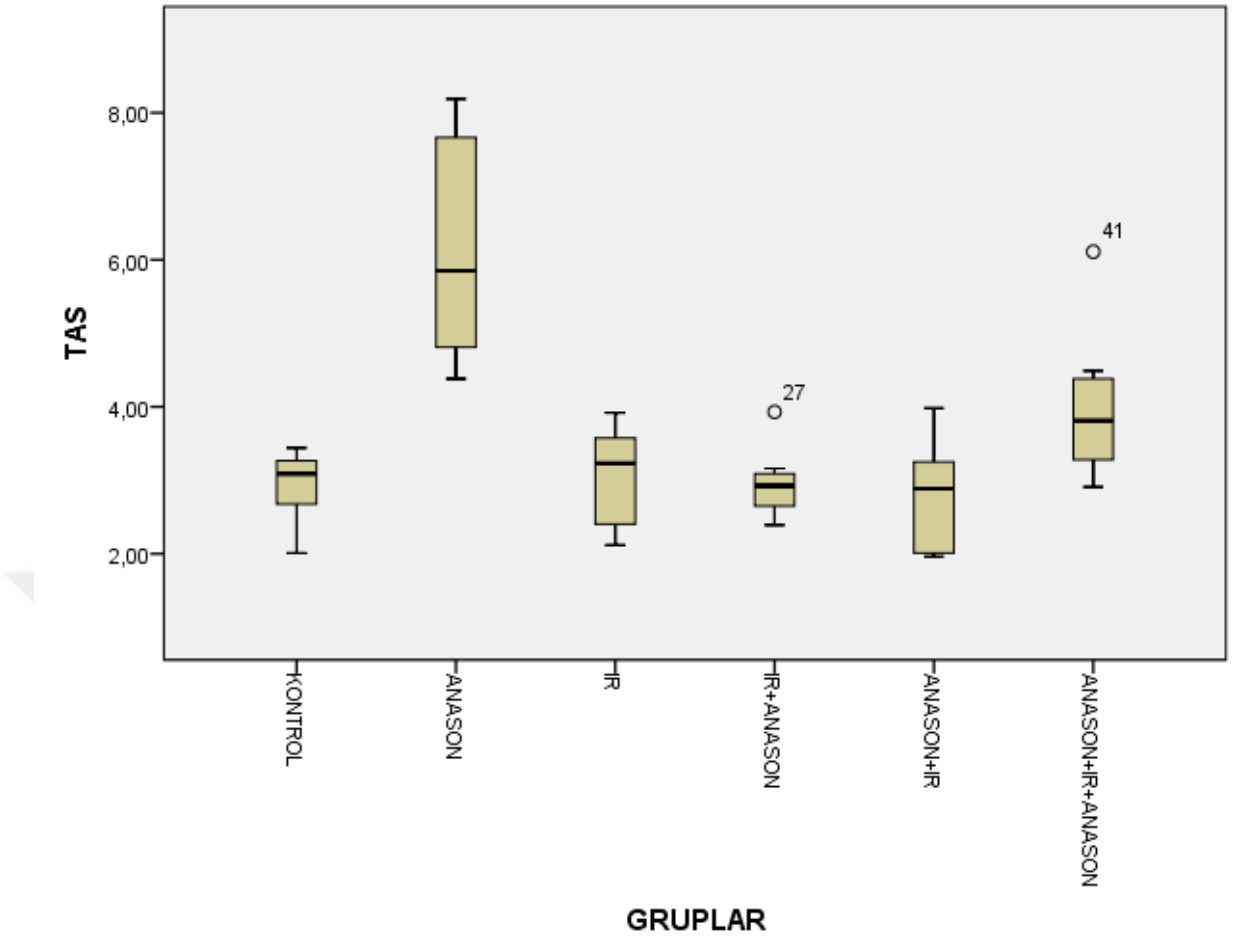
I/R grubunun serum TAS düzeylerinin sadece anason grubundan farklı olduğu izlendi (p<0,05)

Tablo-6. İstatistiksel analizi yapılan TAS µmol/L değerlerinin biyokimyasal analiz sonuçlarının ortalama± standart sapma, minimum, maksimum ve median sonuçları.

Gruplar	N	Ortalama ±	Std. Sapma	Min.	Max.	Median
Kontrol	8	2,93 ±	0,47	2,01	3,44	3,09
Anason	8	6,15 ±	1,55	4,38	8,19	5,85
I/R	8	3,05 ±	0,67	2,12	3,92	3,23
I/R+ Anason	8	2,95 ±	0,47	2,39	3,93	2,92
Anason + I/R	8	2,77 ±	0,73	1,96	3,98	2,88
Anason + I/R + Anason	8	3,99 ±	1,01	2,91	6,11	3,81



Grafik-1: TAS değerlerinin homojenlik analiz grafiği (µmol/L).



Grafik-2: TAS değerlerinin ortalama analiz grafiği (µmol/L).

Yapmış olduğumuz deneysel çalışmamızın TOS düzeylerinin normallik analizini değerlendirmek amacıyla uygulanan Shapiro- Wilk testinin p>0,05 olması kriter kabul edildi. Normal dağılım göstermeyen TOS düzeylerinin homojenlik analiz grafiği Grafik-3'de gösterildi. Bunun sonucunda Non-parametrik testler kullanıldı. Kruskal Wallis-H testinin anlamlı çıkması (p<0,05) üzerine, gruplar arası ikili karşılaştırmada Mann Whitney- U yapıldı. TOS düzeylerinin biyokimyasal analiz sonuçlarının ortalamaları Tablo-7 ve Grafik-4'de gösterildi. Yapılan gruplar arası karşılaştırmada TOS düzeyleri açısından;

Kontrol grubu ile Anason ve Anason+ I/R+ Anason grubu arasında istatiksel olarak anlamlı fark olmadığı (p>0,05), fakat diğer çalışma grupları arasında anlamlı fark olduğu görüldü (p<0,05).

Benzer şekilde Anason grubu ile Anason+ I/R+ Anason grubu arasında da istatiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0,05$), fakat diğer gruplar arasında fark olduğu görüldü ($p<0,05$).

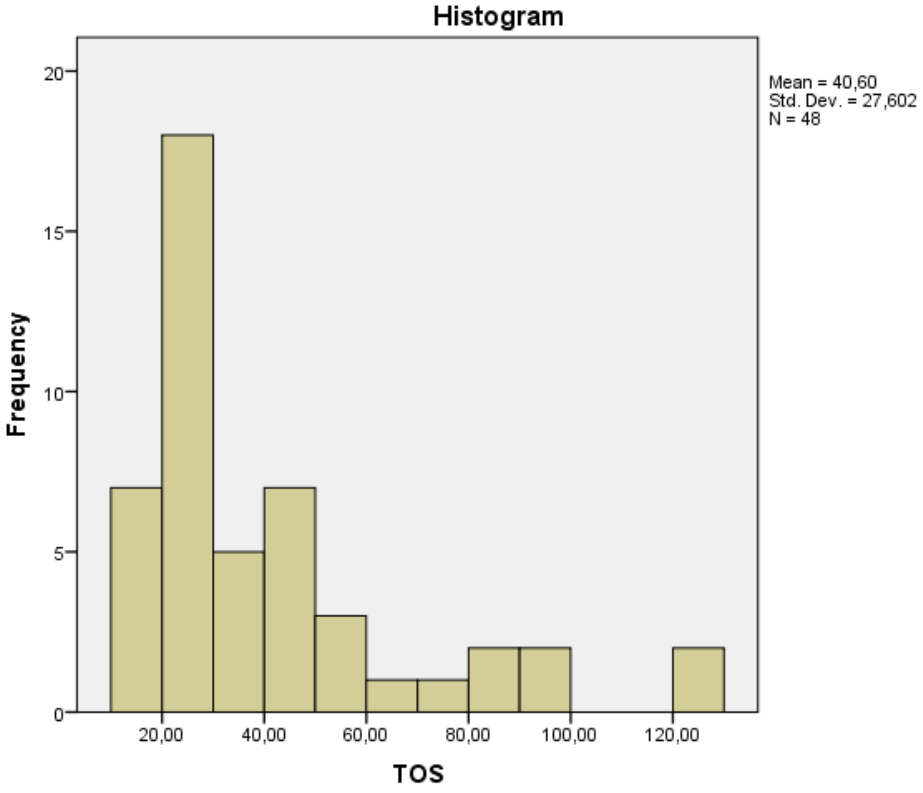
I/R grubu ile diğer çalışma gruplarının serum TOS düzeyleri açısından istatiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu görüldü ($p<0,05$).

I/R+ Anason grubu ile Anason+ I/R grubu arasında istatiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0,05$), fakat Anason+ I/R+ Anason grubundan anlamlı derecede farklı olduğu görüldü ($p<0,05$).

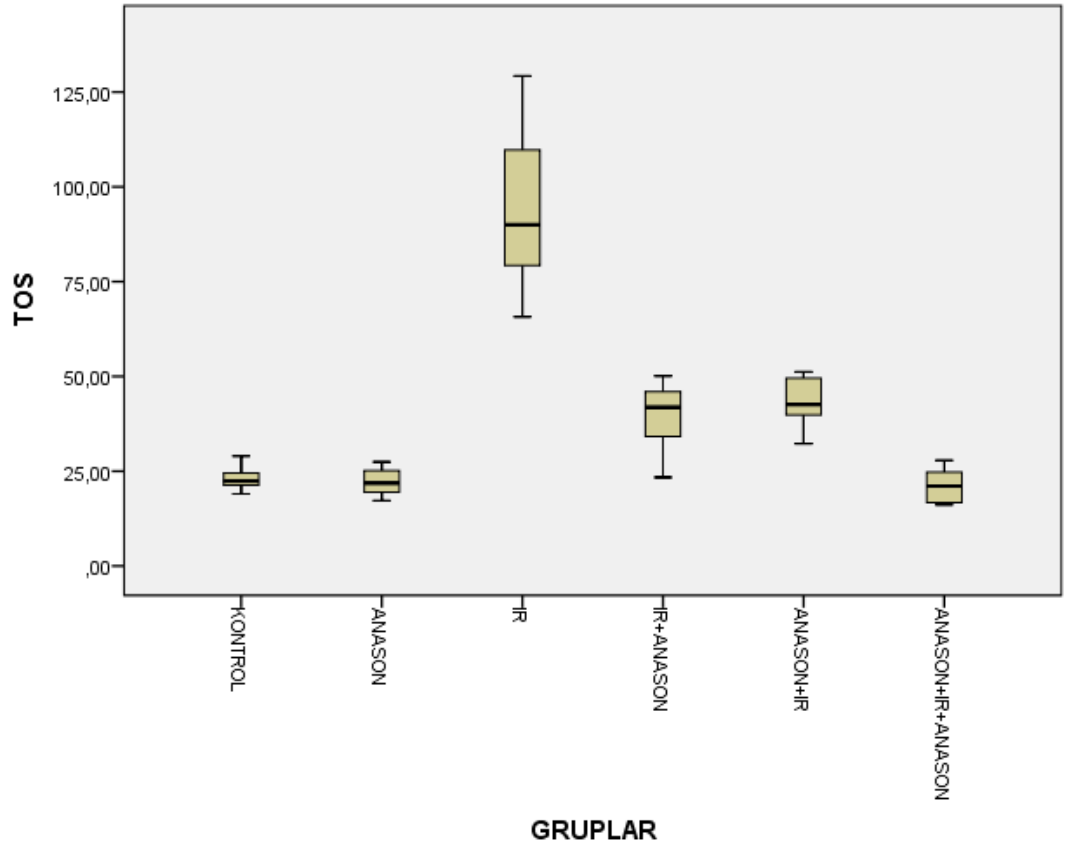
Anason+ I/R grubu ile Anason+ I/R+ Anason grubu arasında istatiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$).

Tablo-7: İstatistiksel analizi yapılan TOS mmol/L değerlerinin biyokimyasal analiz sonuçlarının ortalama± standart sapma, minimum, maksimum ve median sonuçları.

Gruplar	N	Ortalama ±	Std. Sapma	Min.	Max.	Median
Kontrol	8	23,07 ±	3,12	19,03	29,01	22,42
Anason	8	22,21 ±	3,61	17,24	27,44	21,89
I/R	8	94,11 ±	22,23	65,69	129,27	89,97
I/R+ Anason	8	39,67 ±	9,08	23,39	50,09	41,85
Anason + I/R	8	43,41 ±	6,48	32,27	51,19	42,58
Anason + I/R + Anason	8	21,13 ±	4,44	16,14	27,82	21,09



Grafik-3: TOS değerlerininin homojenlik analiz grafiği (mmol/L).



Grafik-4: TOS değerlerinin ortalama analiz grafiği (mmol/L).

8.2. Vücut ve Organ Ağırlıkları Bulguları

Çalışmanın başında ortalama ağırlıkları 320-400 g arasında değişen erkek ratlar kullanıldı. Deneyin başında ve sonunda ortalama vücut ağırlıkları, bilateral testis ağırlıkları ve toplam testis ağırlık indeksleri (TAİ) ölçülen ratların ortalama değerleri± standart sapmaları Tablo-8'de gösterilmiştir.

Deneyin başlangıç aşamasında ölçülen vücut ağırlıkları analizi için yapılan ANOVA testinde istatiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$). Gruplar arası karşılaştırmada ikili gruplar arasına Post-Hoc Tukey testinin istatiksel analizinde gruplar arası anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p<0,05$).

Deneyin bitiş aşamasında ölçülen vücut ağırlıkları analizi için yapılan ANOVA testinde istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$). Gruplar arası karşılaştırmada ikili gruplar arasına Post-Hoc Tukey testinin istatiksel analizinde;

Anason+ I/R grubu ile I/R+ Anason grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p<0,05$),

Anason grubu ile I/R+ Anason grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p<0,05$) görüldü.

Vücut ağırlıkları arasındaki farklar incelendiğinde ise en fazla kilo artışının Anason grubunda olduğu izlendi. I/R grubu deneyin ilk günü sakrifiye edildiğinden ağırlık farkı izlenmedi. Anason grubundan sonra ikinci sırada ise Anason+ I/R+ Anason grubunun kilo aldığı görüldü. I/R+ Anason grubunda ise deney sonunda kilo kaybı görüldü.

Tüm grupların testis ağırlıklarının istatiksel analizinde ise; ANOVA testinde istatiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$). Gruplar arası karşılaştırmada ikili gruplar arasına Post-Hoc Tukey testinin istatiksel analizinde testis ağırlıkları arasında;

Kontrol grubu ile Anason ve Anason+ I/R grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) izlendi.

Anason grubu ile diğer çalışma grupları arasında istatiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$). Ortalama testis ağırlıkları birbirine oldukça yakındı. Anason grubunun testis ağırlığı bütün gruplara kıyasla en yüksekti.

I/R grubu ile Kontrol, Anason ve Anason+ I/R grupları arasında istatiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$). I/R grubunun testis ağırlığı bu gruplara kıyasla daha düşüktü.

I/R+ Anason grubu ile Kontrol, Anason ve Anason+ I/R grupları arasında istatiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$). I/R+ Anason testis ağırlığı bu gruplara kıyasla daha düşüktü.

Anason+ I/R grubu ile sadece Kontrol grubu arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) izlendi. Kontrol grubuna oldukça yakındı ve Anason grubundan sonra ikinci sırada yüksek testis ağırlıklarına sahipti.

Anason+ I/R+ Anason grubu ile Kontrol, Anason ve Anason+I/R grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p<0,05$). En düşük testis ağırlığı ortalamasına sahipti ve bu ortalama değer I/R+ Anason grubuna oldukça yakındı.

Tablo-8: İstatiksel analizi yapılan verilerin ortalaması ± standart sapma değerleri (TAİ: Testis Ağırlık İndeksi).

Gruplar	N	Başlangıç vücut ağırlığı (gr)	Bitiş vücut ağırlığı (gr)	Vücut ağırlıkları farkı (gr)	Testis ağırlıkları (gr)	TAİ
Kontrol	8	337,37±15,29	344,00±21,28	6,62±15,88	2,67±0,16	0,77±0,04
Anason	8	336,62±11,99	362,12±14,29	25,87±24,50	3,02±0,26	0,83±0,09
I/R	8	352,87±12,79	352,87±12,79	0,00±0,00	2,11±0,15	0,59±0,05
I/R+ Anason	8	343,62±20,80	326,00±20,16	-17,75±9,57	1,91±0,15	0,58±0,07
Anason + I/R	8	355,75±13,62	373,75±13,19	18,00±5,75	2,57±0,21	0,68±0,05
Anason + I/R + Anason	8	345,12±21,49	356,87±14,98	11,75±12,18	1,90±0,20	0,54±0,06



Şekil 12. Atrofik (siyah ok) ve normal görünümdeki testis dokuları (kırmızı ok).

8. 3. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik incelemelerde H&E ve PAS ile boyanan dokular ışık mikroskobu altında değerlendirilerek, her gruptan rastgelene alınan 10 seminifer tübül sayımı yapıldı. Bu tübüller Johnsen testiküler biyopsi skorlamasına tabi tutuldu. Seminifer tübüllerin normallik analizini değerlendirmek amacıyla uygulanan Shapiro-Wilk testinin $p>0,05$ olması kriter kabul edildi. Normal dağılım göstermeyen Johnsen testiküler biyopsi skorlaması düzeylerinin homojenlik analiz sonuçları Tablo-9, Grafik-5 ve Grafik-6'da gösterildi. Bu veriler doğrultusunda Kruskal Wallis-H testi uygulandı ve testin çıkması ($p<0,05$) üzerine, gruplar arası ikili karşılaştırmada Mann Whitney- U yapıldı. Yapılan gruplar arası karşılaştırmanın istatistiksel analizi sonucunda;

Kontrol grubu testis dokularında düzgün bir spermatogenezin olduğu, seminifer tübüller ile bazal laminanın, spermatogenik hücrelerin ve Sertoli hücrelerinin normal görünümde olduğu izlendi. Lümende ise serbest halde dolaşan spermiyumların olduğu görüldü. İnterstisyel alanda ikili üçlü gruplar halinde normal görünümlü Leydig hücrelerinin yer aldığı izlendi. Ayrıca Kontrol grubuna ait testis dokuları en yüksek Johnsen biyopsi skorlaması ortalamasına sahipti. Gruplar arası ikili karşılaştırmada Kontrol ile Anason grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı

($p>0,05$), fakat Kontrol grubu ile diğer çalışma grupları arasında Johnsen biyopsi skorlaması açısından istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğu izlendi ($p<0,05$).

Anason grubunun testis dokularının transversal kesiti incelendiğinde ise Kontrol grubuna benzer şekilde seminifer tübüllerin yapısı ve bazal membran kalınlığının normal görünümde olduğu görüldü. Spermatogenik ve Sertoli hücreleri normal görünümde izlendi. İnterstisyel alanda asidofilik boyanan poligonal şekilli normal görünümlü Leydig hücreleri ve düzgün lümenli kapiller damarlar izlendi. Anason grubunun istatiksel analizinde sadece kontrol grubu ile aralarında istatiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) diğer çalışma grupları ile aralarında istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$).

I/R grubunun testis dokularının transversal kesitinde seminifer tübüllerin yapısal bütünlüğünde bozulmalar, dejenerasyon, spermatosit kaybı ve spermiyumların gelişiminde önemli azalmalar olduğu, Sertoli hücrelerinde dejenerasyon ve spermatogenik hücrelerde piknozis ve atrofik tübüller geliştiği görüldü. Ayrıca spermatogenik hücrelerde deskuamasyon ve konjesyon izlendi. İnterstisyel alanda ise ödem ve bazal membranda bir kalınlaşma olduğu görüldü. I/R grubunun istatiksel analizinde tüm gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$). Ayrıca IR grubuna ait testis dokularının en düşük biyopsi ortalamasına sahip olduğu görüldü.

Anason+ I/R uygulanan grubun testis dokuları incelendiğinde Anason'un antioksidan etkisine bağlı olarak I/R grubuna nazaran bazal membran kalınlığında artış ve dejenerasyonun kısmen normalleşmeye başladığı, fakat interstisyel alanda ödemin devam ettiği görüldü. Seminifer tübüllerdeki dejenerasyonlarda azalmalar, Sertoli ve spermatogenik hücrelerde normalleşmeler olduğu izlenirken, konjesyonun devam ettiği görüldü. Anason+ I/R grubu, I/R ve I/R+ Anason grupları ile kıyaslandığında aralarında istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$).

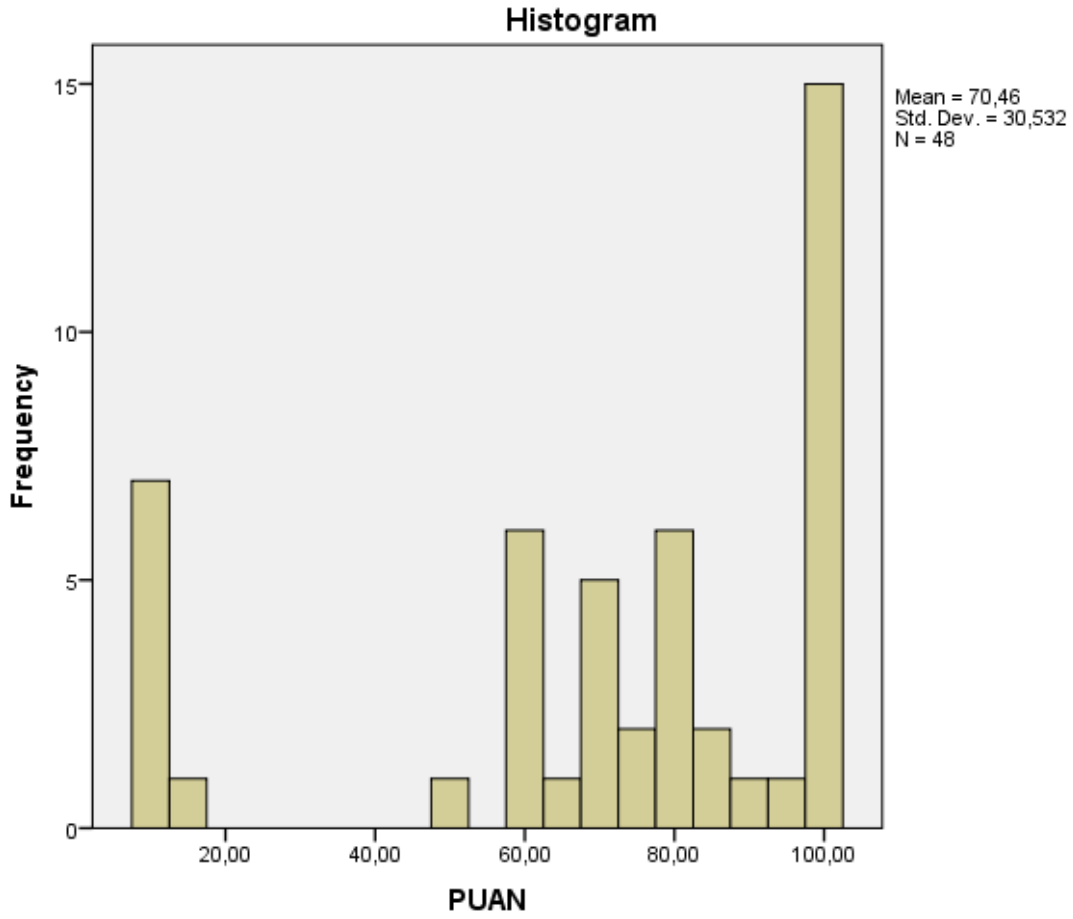
I/R+ Anason grubuna ait testislerin transversal kesiti incelendiğinde iskemi reperfüzyona bağlı oluşan hasarın kısmen daha fazla düzelmeye başladığı görüldü. Bazal membranda yer yer kırılmalar görülürken, spermatogenik hücre saysında çoğalmalar ve spermiyum oluşumunun başladığı gözlemlendi. Sertoli hücreleri bazale

yakın yerleşimli ve normale yakın görünümde izlenirken, interstisyel alanın normalleşmeye başladığı ve bu alanda yer alan Leydig hücrelerinde histopatolojik değişikliklerin olmadığı görüldü. I/R+ Anason grubu, I/R ve Anason+I/R grubuplarına kıyasla daha normal görünümde olduğu izlendi. I/R+Anason grubuna ait testis dokularının istatiksel analizinde bütün çalışma grupları ile aralarında istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$).

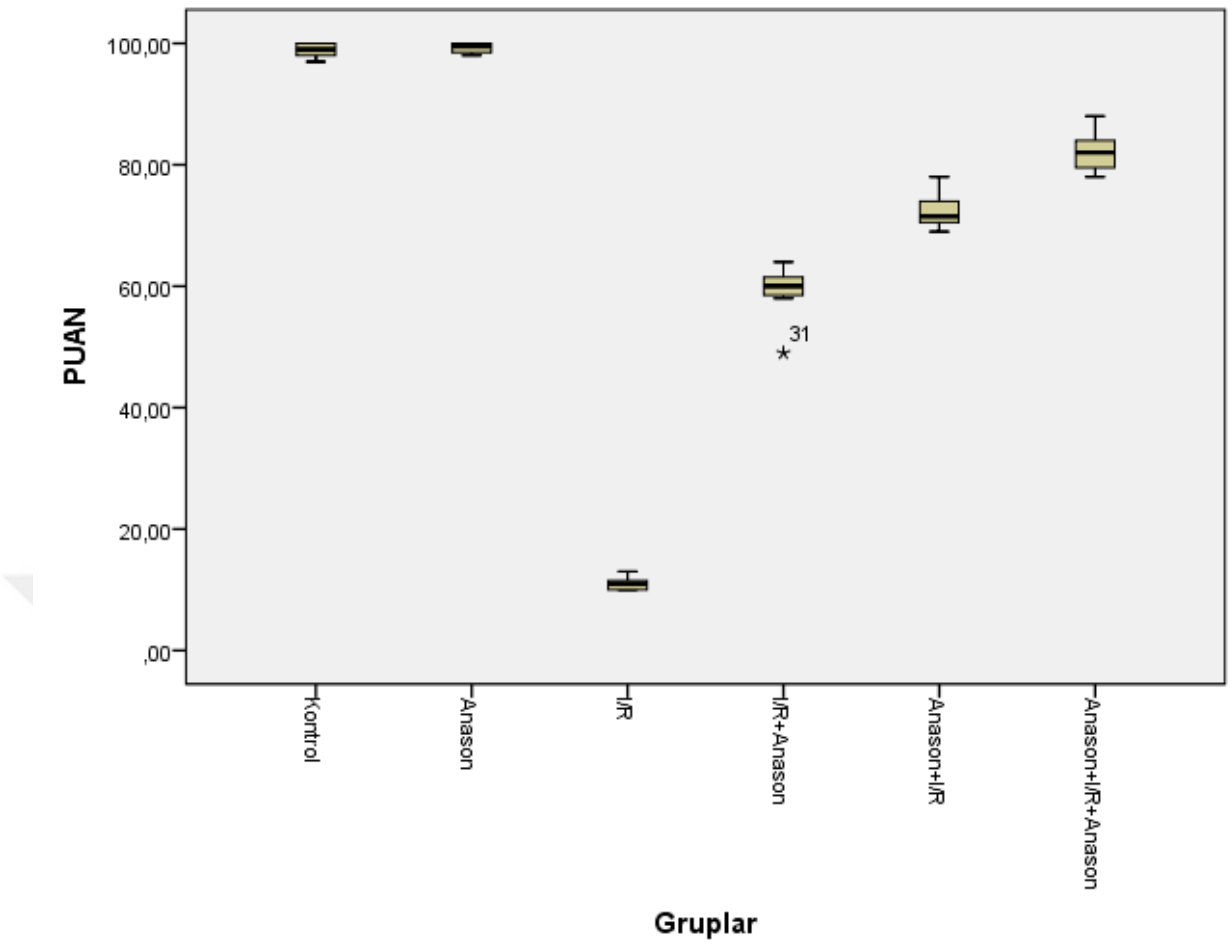
Anason+I/R+Anason grubuna ait testis dokuları incelendiğinde anasonun hem iskemi rerperfüzyon öncesi hemde sonrasında verilmiş olmasından dolayı testiküler hasarın oldukça iyileştiği görüldü. Seminifer tübüllerin kontrol grubuna benzer görünümde olduğu ve bazal membran kalınlığının normale yakın olduğu izlendi. Spermatogenik hücre sayısında artış izlenirken, interstisyel alanda Leydig hücreleri normal görünümdeydi. Anason+ I/R+ Anason grubunun istatiksel analizinde ise diğer gruplar ile aralarında istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$).

Tablo-9: Johnsen Skorlaması yapılan verilerin, ortalama± standart sapma, minimum, maksimum ve toplam değerleri.

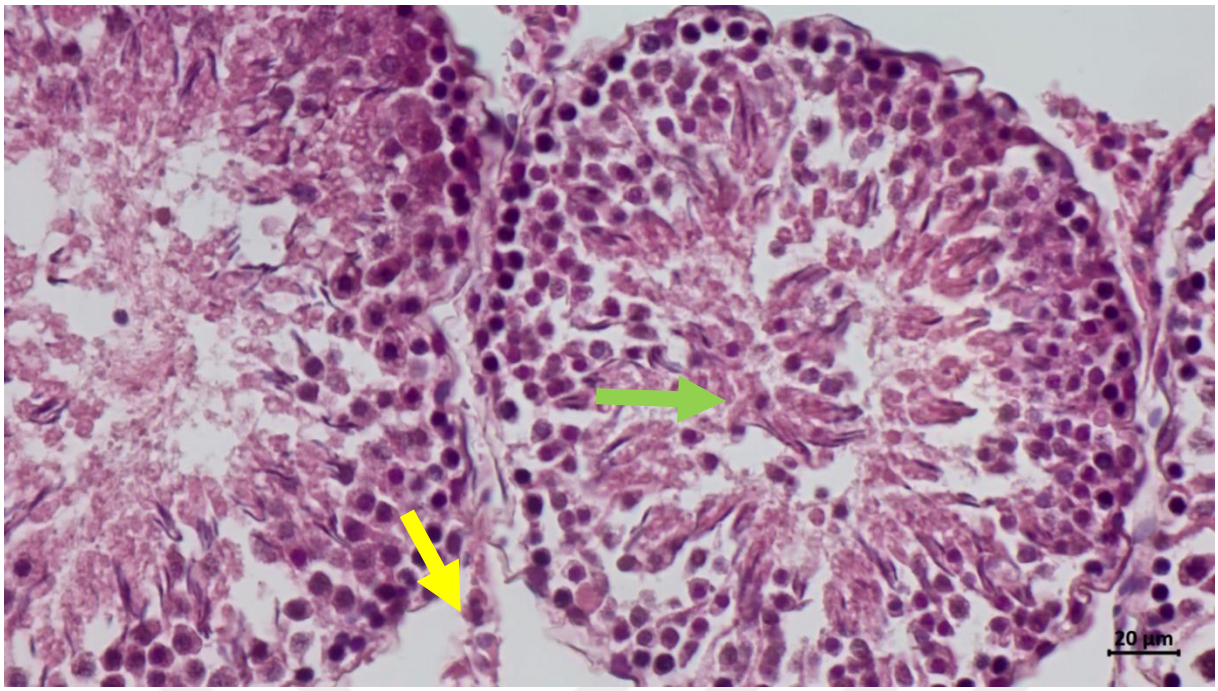
Gruplar	NxToplam Tübül	Ortalama ±	Std. Sapma	Min.	Max.	Toplam
Kontrol	80	98,87	1,12	97,00	100,00	791,00
Anason	80	99,25	0,88	98,00	100,00	794,00
I/R	80	11,00	1,06	10,00	13,00	88,00
I/R+ Anason	80	59,12	4,48	49,00	64,00	473,00
Anason + I/R	80	72,37	2,87	69,00	78,00	579,00
Anason + I/R + Anason	80	82,12	3,22	78,00	88,00	657,00



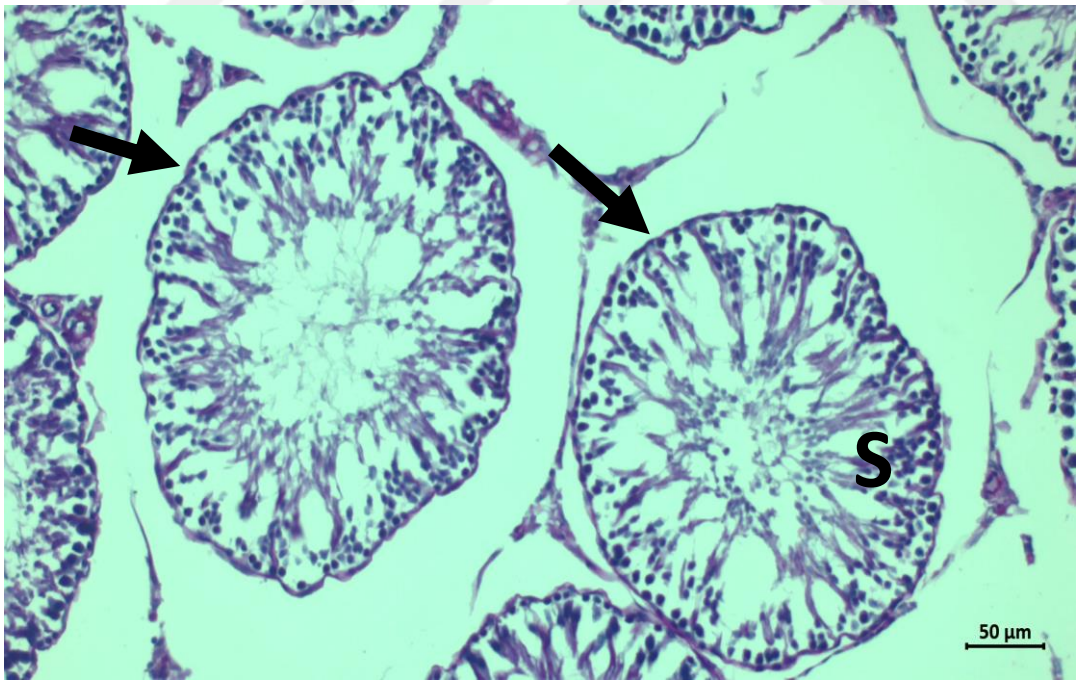
Grafik-5: Gruplar arası Johnsen skorlamasının homojenlik analiz grafiği.



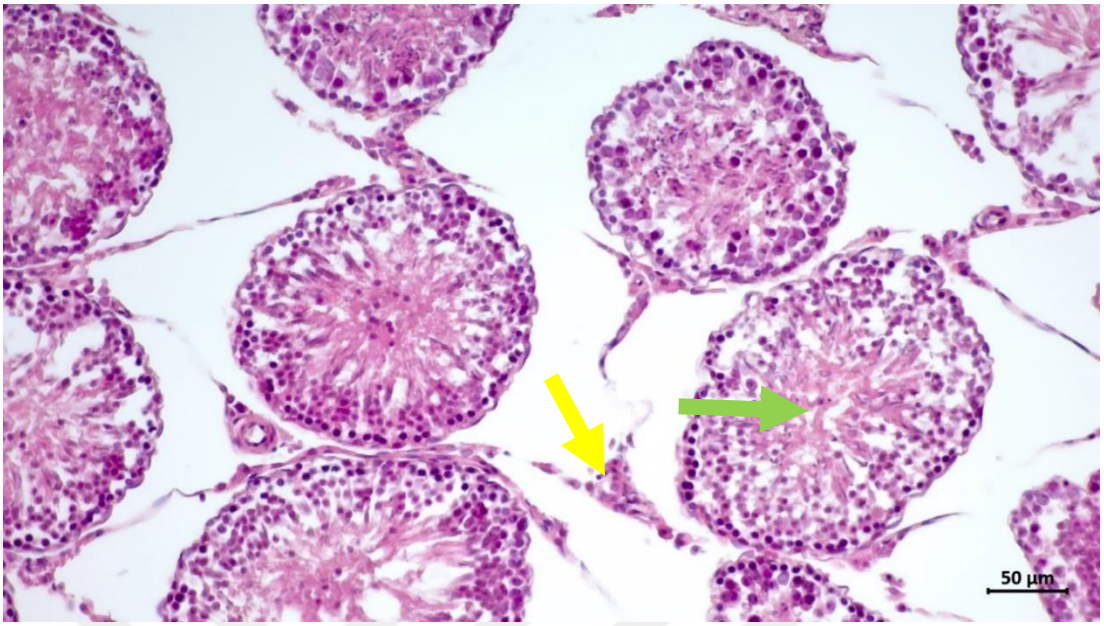
Grafik-6: Johnsen skorlamasının ortalama istatiksel analiz grafiği.



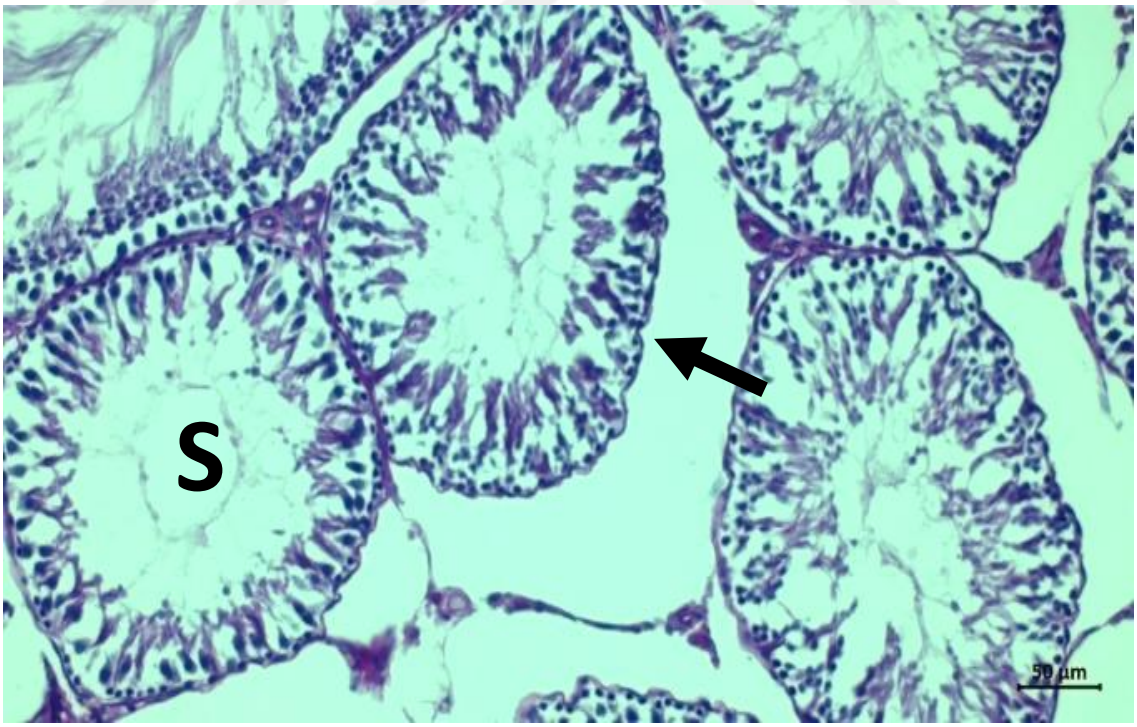
Şekil 13. Kontrol grubuna ait testis dokusunun transversal kesiti. Lümene yakın serbest halde dolaşan spermiyumlar (yeşil ok), normal görünümlü Leydig hücreleri (sarı ok) (H&E, Bar 50 µm).



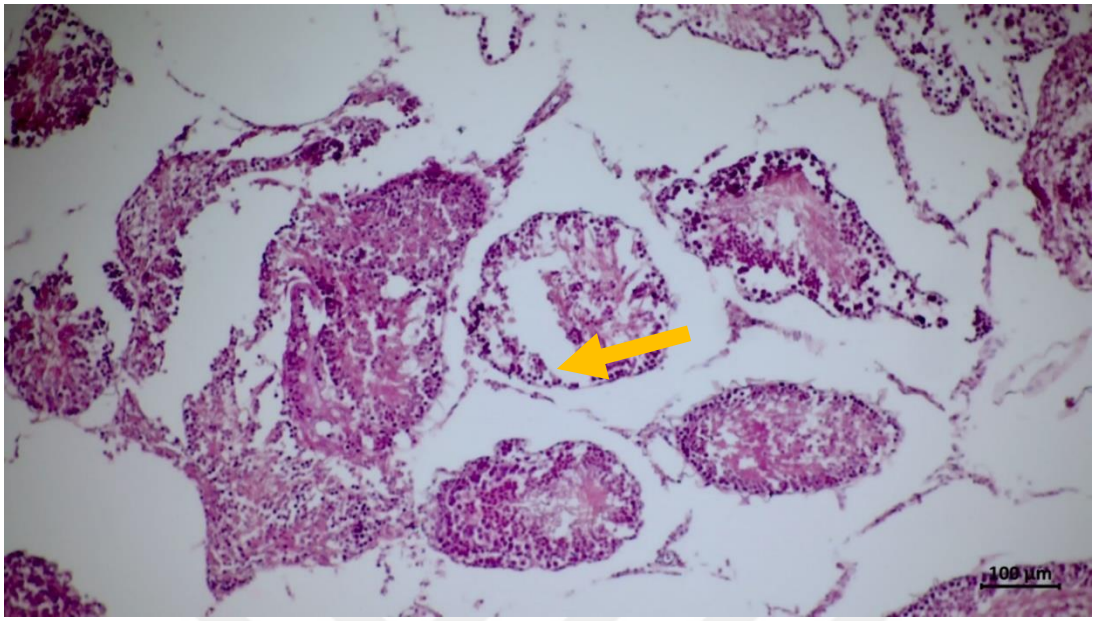
Şekil 14. Kontrol grubuna ait testis dokusu. Normal görünümlü seminifer tübüller (S), normal kalınlıkta bazal membran (siyah ok) (PAS, Bar: 50 µm).



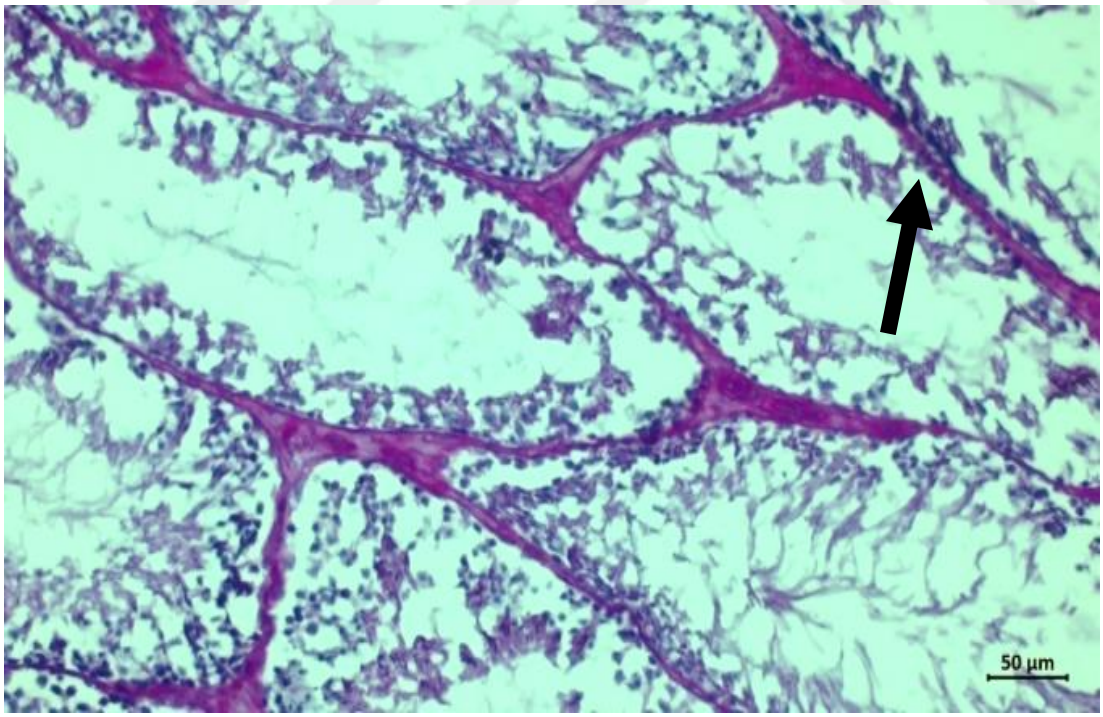
Şekil 15. Anason grubuna ait testis dokusunun transversal kesiti. Normal görünümlü seminifer tübüller, lümende serbest halde dolaşan spermiyumlar (yeşil ok), normal görünümlü Leydig hücreleri (sarı ok) (H&E, Bar 50 µm).



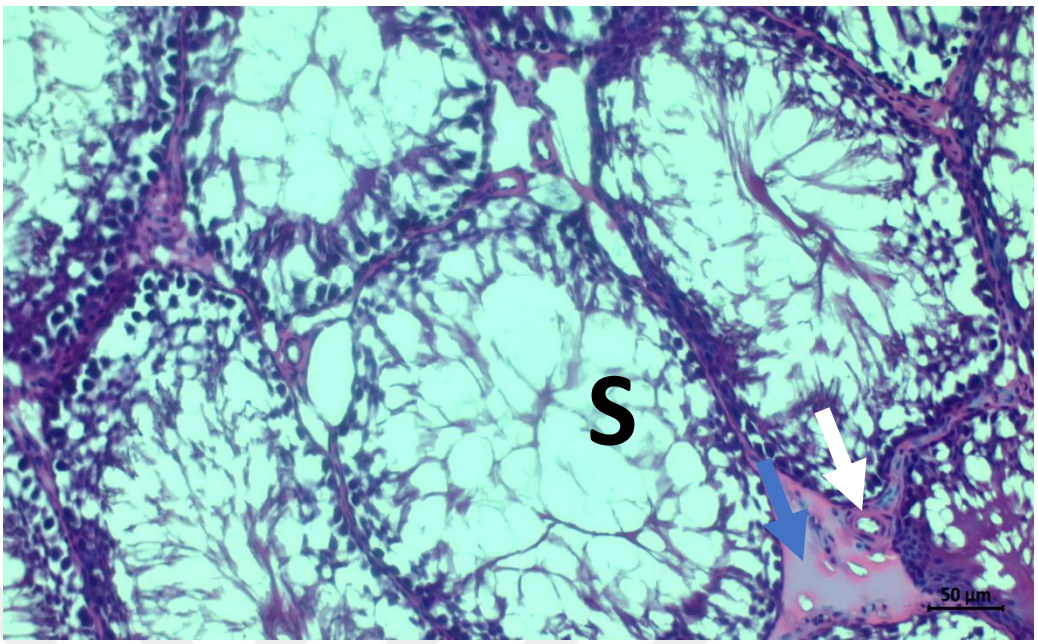
Şekil 16. Anason grubuna ait testis dokusu. Normal görünümlü seminifer tübül (S), normal kalınlıkta bazal membran (siyah ok) (PAS, Bar: 50 µm).



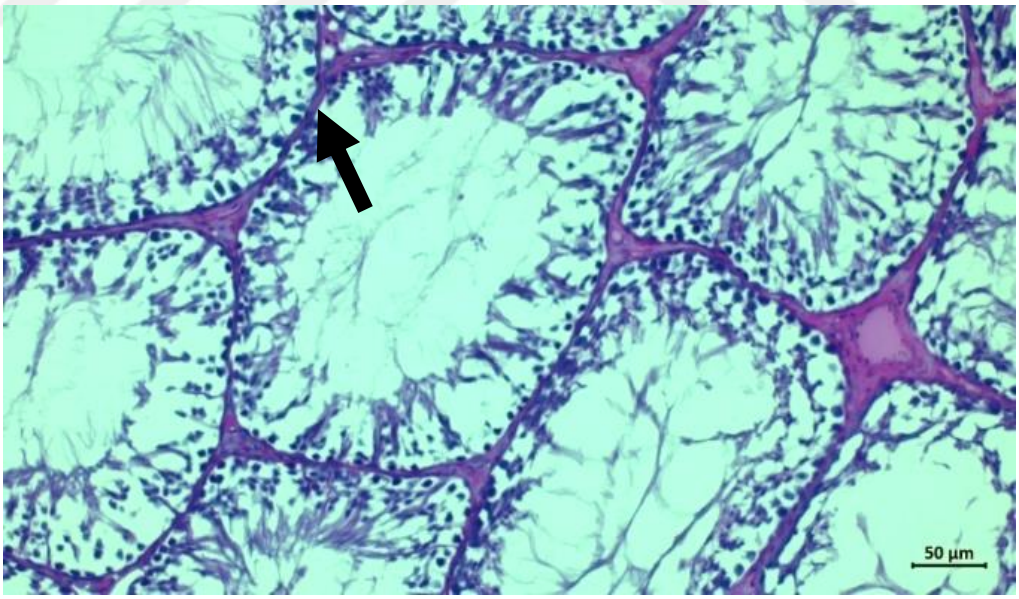
Şekil 17. İskemi reperfüyon (I/R) grubuna ait testis dokusunun transversal kesiti. Genel olarak seminifer tübül bütünlüğünde dejenerasyon, piknotik spermatogonia hücreleri (turuncu ok) (H&E, Bar 50µm).



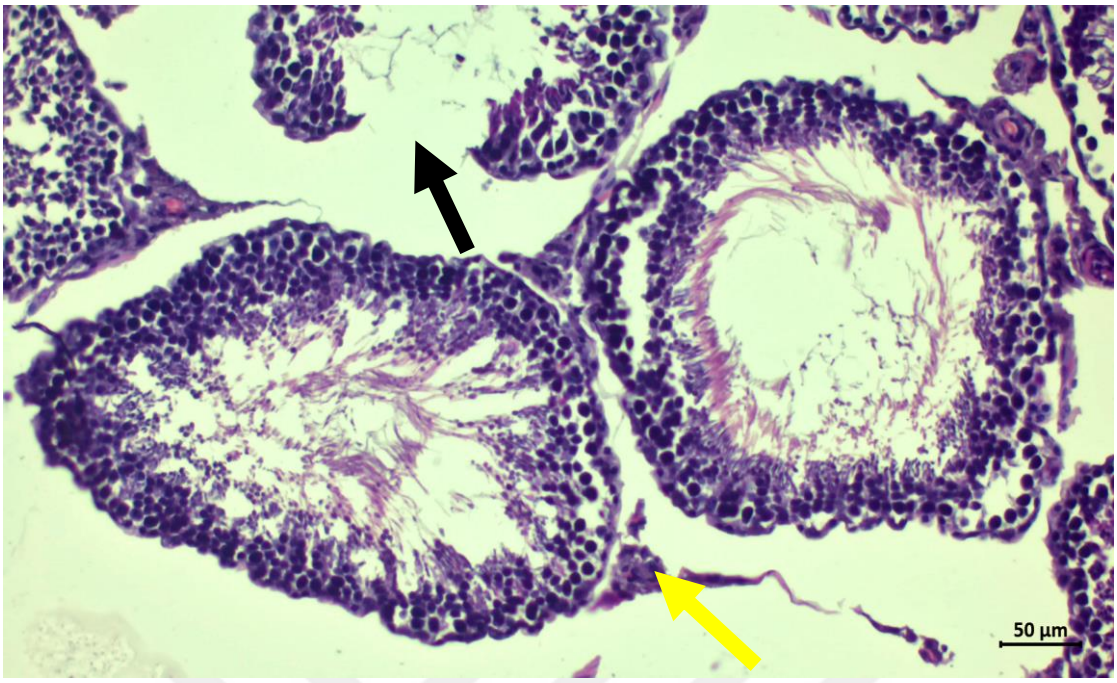
Şekil 18. İskemi reperfüyon (I/R) grubuna ait testis dokusu. Bazal membran kalınlığında artış (siyah ok) (PAS, Bar: 50 µm).



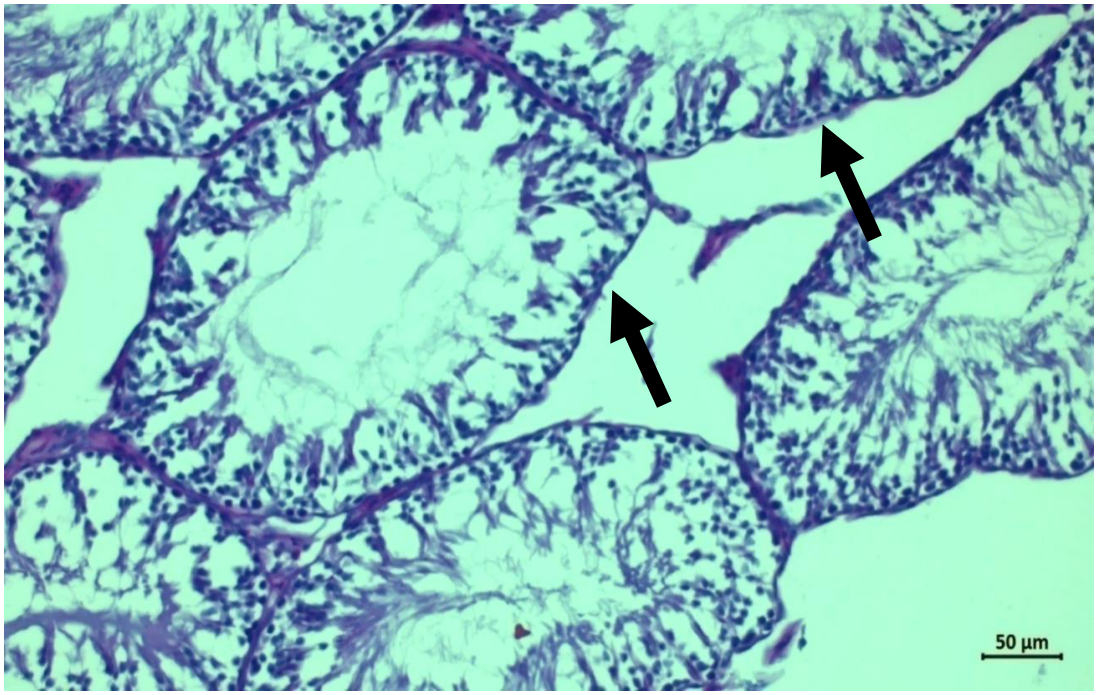
Şekil 19. Anason+I/R uygulanan testislerin transversal kesiti. I/R grubuna göre daha az dejenere seminifer tübüller (S), konjesyon (beyaz ok), interstisyel ödem (mavi ok) (H&E, Bar 50 µm).



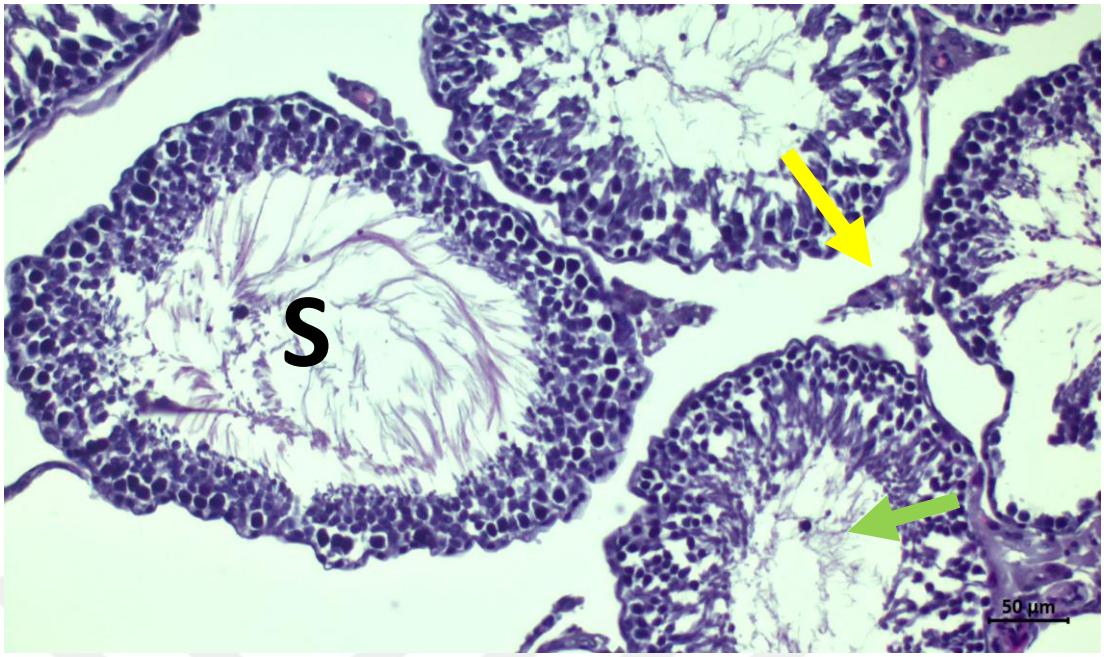
Şekil 20. Anason+ I/R grubuna ait testis dokusu. Bazal membran kalınlığında artış (siyah ok), (PAS, Bar: 50 µm).



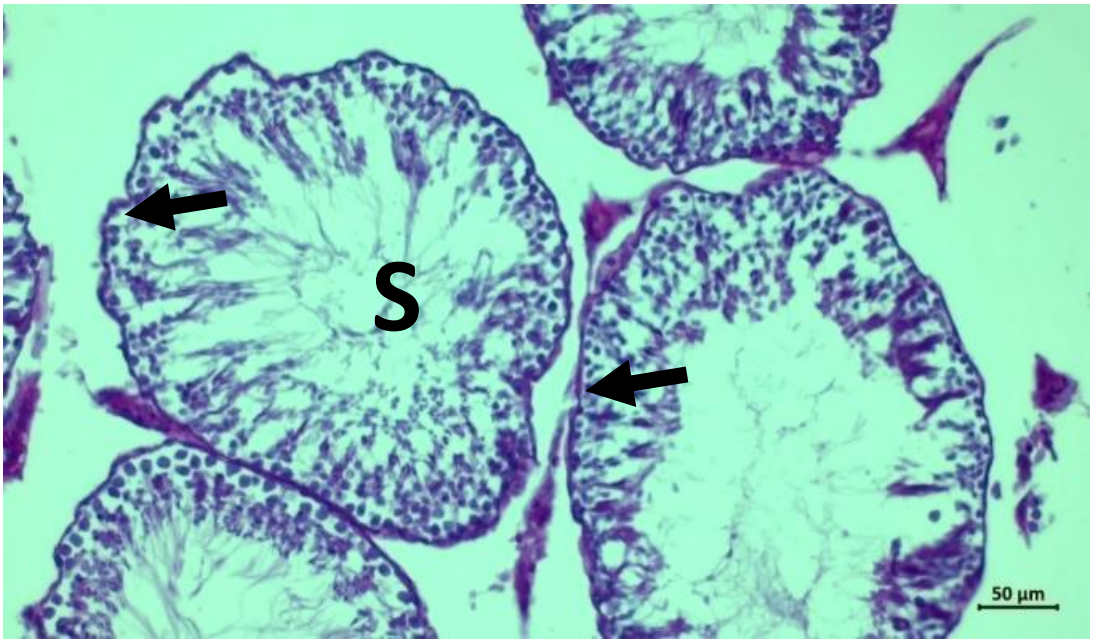
Şekil 21. I/R+Anason grubuna ait testis dokusunun transversal kesiti. Seminifer tübül bütünlüğünde dejenerasyon ve kopma (siyah ok), normal görünümlü Leydig hücreleri (sarı ok) (H&E, Bar 50 µm).



Şekil 22. I/R+ Anason grubuna ait testis dokusu. Normal görünümde bazal membran kalınlığı (siyah ok) (PAS, Bar: 50 µm).



Şekil 23. Anason+ I/R+ Anason grubuna ait testis dokusunun transversal kesiti. Normale yakın görünümde seminifer tübüller (S), lümene yakın serbest halde dolaşan spermiyumlar (yeşil ok), normal görünümlü Leydig hücreleri (sarı ok) (H&E, Bar 50 µm).

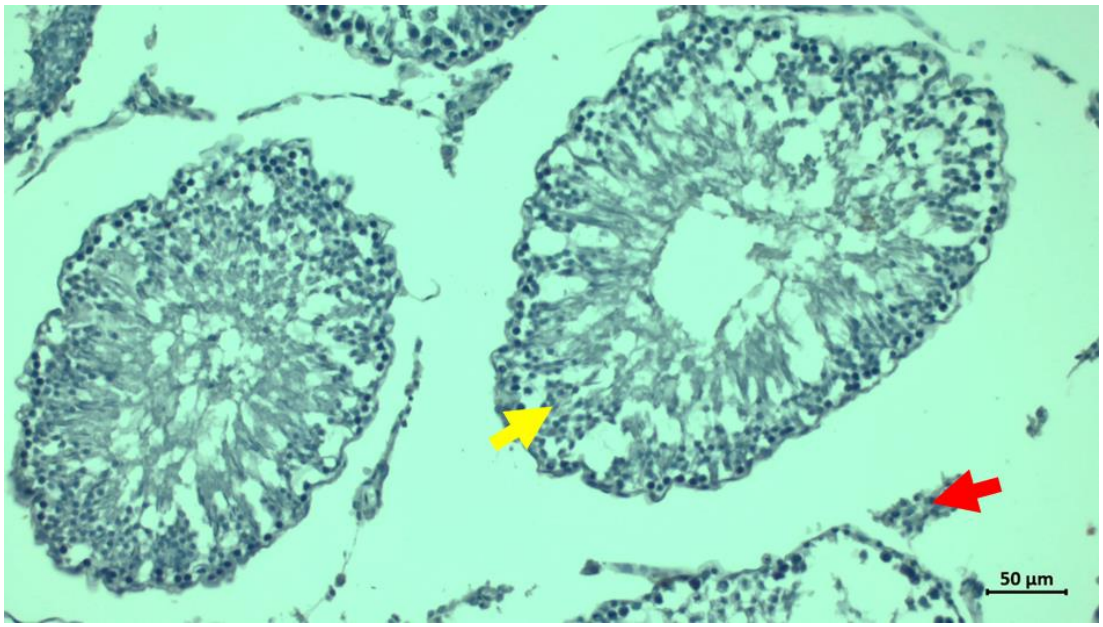


Şekil 24. Anason + I/R + Anason grubuna ait testis dokusu. Normale yakın görünümde seminifer tübüller (S) ve normal bazal membran kalınlığı (siyah ok) (PAS, Bar: 50 µm)

8.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

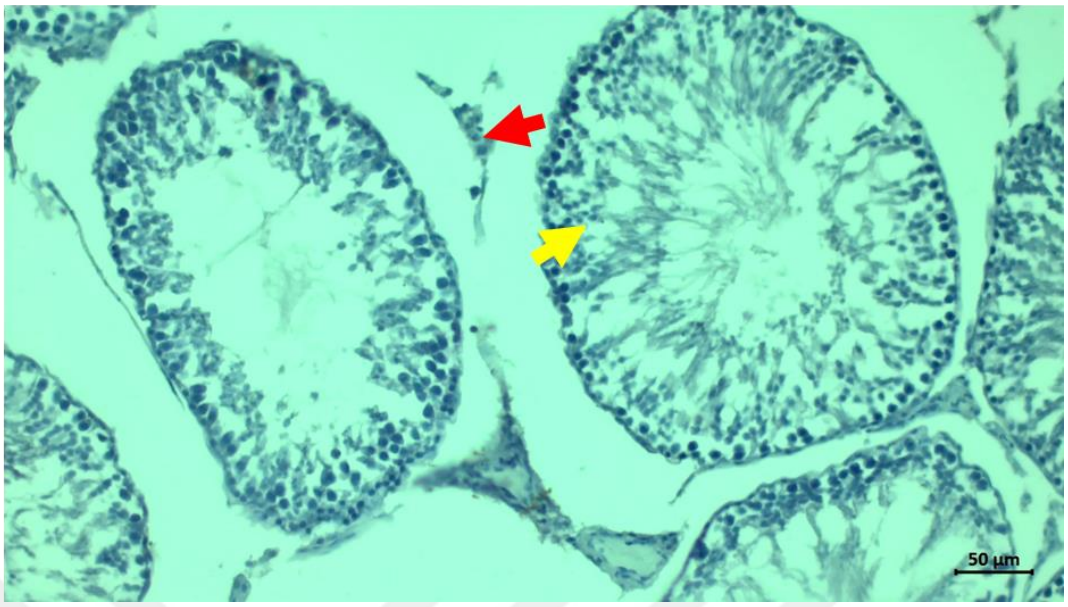
8.4.1. IL-6 Bulgular

Kontrol grubunda seminifer tübüllerin transversal kesitinde; Seminifer tübül yapısında yer alan spermatogenik hücrelerde ve Leydig hücrelerinde IL-6 ekspresyonlarının negatif olduğu görüldü (Şekil 25).



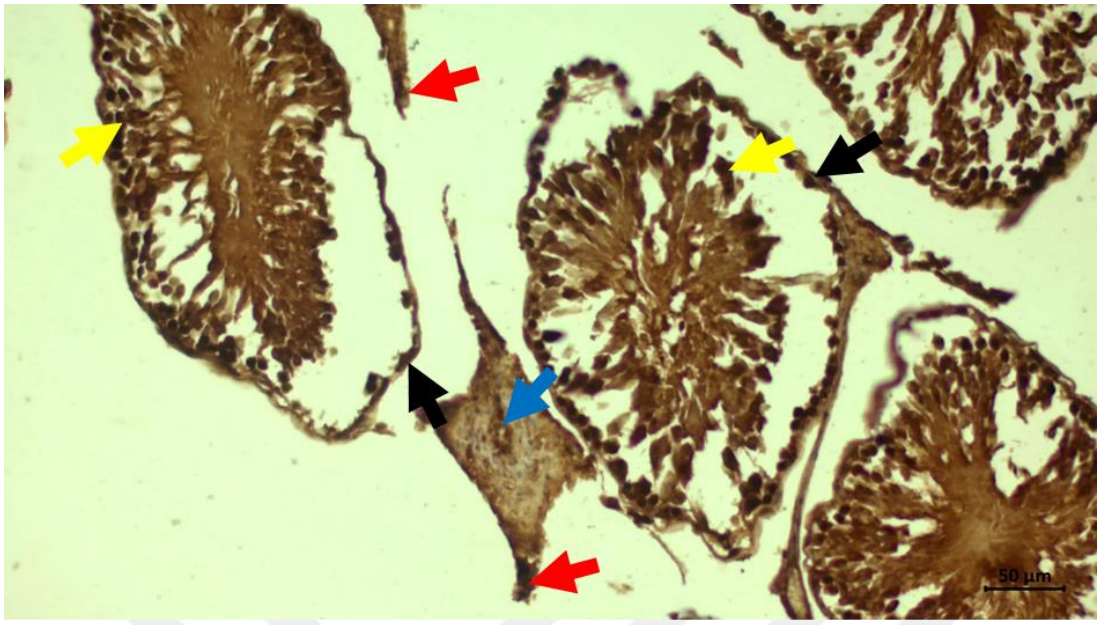
Şekil 25. Kontrol grubu testis IL-6 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) negatif IL-6 ekspresyonları. **Boyama:** IL-6 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

Anason grubundaki seminifer tübüllerin transversal kesitinde; spermatogenik hücrelerin bazal membrana yakın yerlerinde ve intertübüler alanda negatif IL-6 ekspresyonları izlendi (Şekil 26).



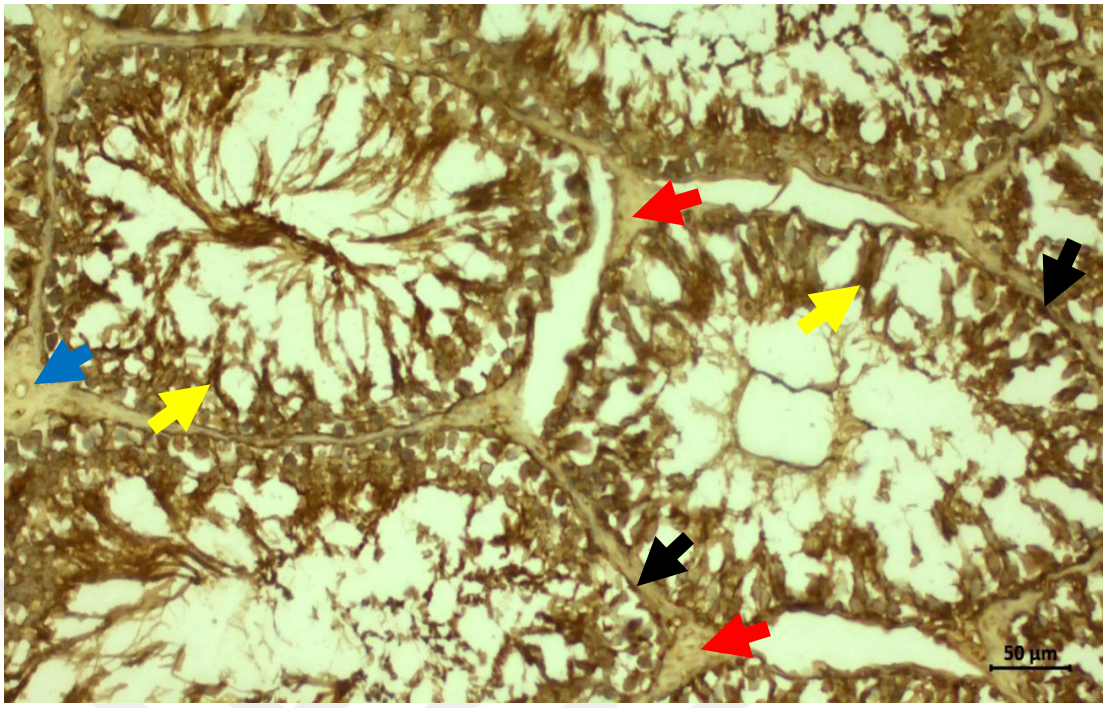
Şekil 26. Anason grubu testis IL-6 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) negatif IL-6 ekspresyonları. **Boyama:** IL-6 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

İskemi reperfüzyon (I/R) grubundaki seminifer tübüllerin transversal kesitinde; spermatogenik hücrelerde yoğun pozitif IL-6 ekspresyonları görülürken, Sertoli hücrelerinde de ekspresyonlar yoğun pozitiflik gösterdi. Bazal membrana yakın inflamatuar hücrelerde artış görüldü. İnterstisyel alanda kapiller endotelinde ve Leydig hücrelerinde pozitif IL-6 ekspresyonu izlendi (Şekil 26).



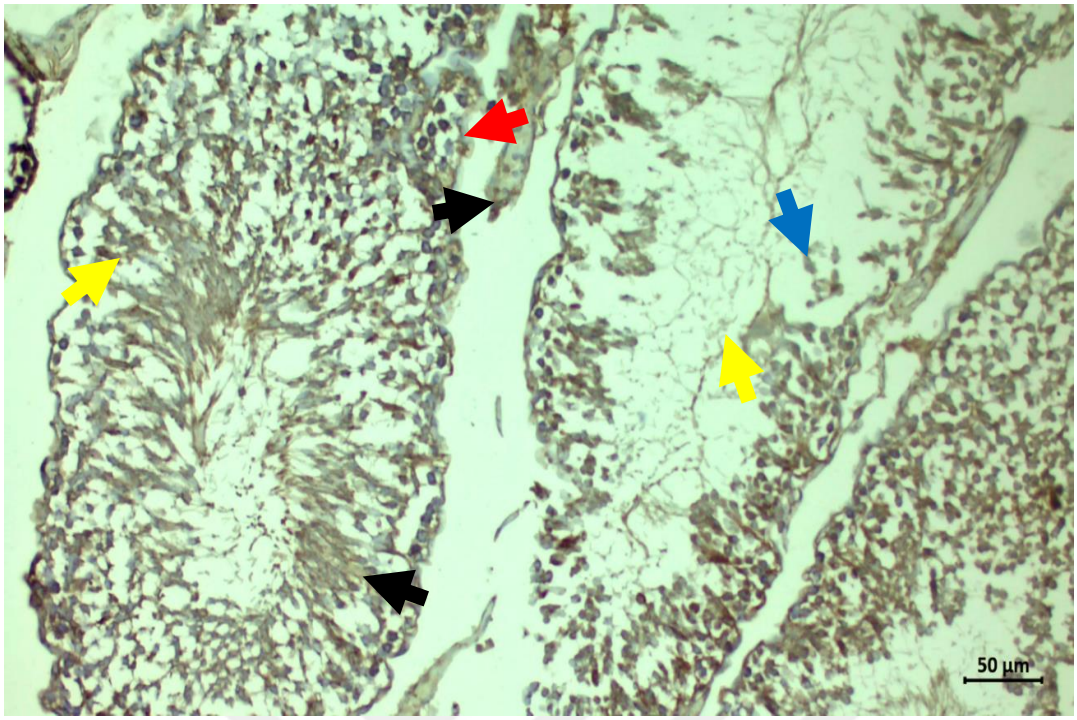
Şekil 27. I/R grubu testis IL-6 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Sertoli hücrelerinde (siyah ok) yoğun pozitif IL-6 ekspresyonları. Damar endotelinde (mavi ok) ve interstisyel stromal hücrelerde (kırmızı ok) pozitif IL-6 ekspresyonları. **Boyama:** IL-6 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

Anason+I/R grubunda seminifer tübüllerin transversal kesitinde; bu gruptaki ratların iskemi reperfüzyon öncesi anason almaları ve anasonun da antioksidan özelliğe sahip olması, testiküler iskemi reperfüzyon durumunda iskemi reperfüzyon grubuna kıyasla inflamatuar hücre sayılarında azalma görüldü. Spermatogenik hücrelerde ve Sertoli hücrelerinde orta seviyede pozitif IL-6 ekspresyonu izlendi. Fakat tübüller arası kapiller damar endotelinde yoğun pozitif IL-6 ekspresyonu görülürken, Leydig hücrelerinde orta seviyede pozitif IL-6 ekspresyonu izlendi. Anason+ I/R grubunun I/R grubuna kıyasla ekspresyonların daha hafif düzeyde olduğu, fakat I/R+ Anason grubuna kıyasla da daha az olduğu görüldü (Şekil 28).



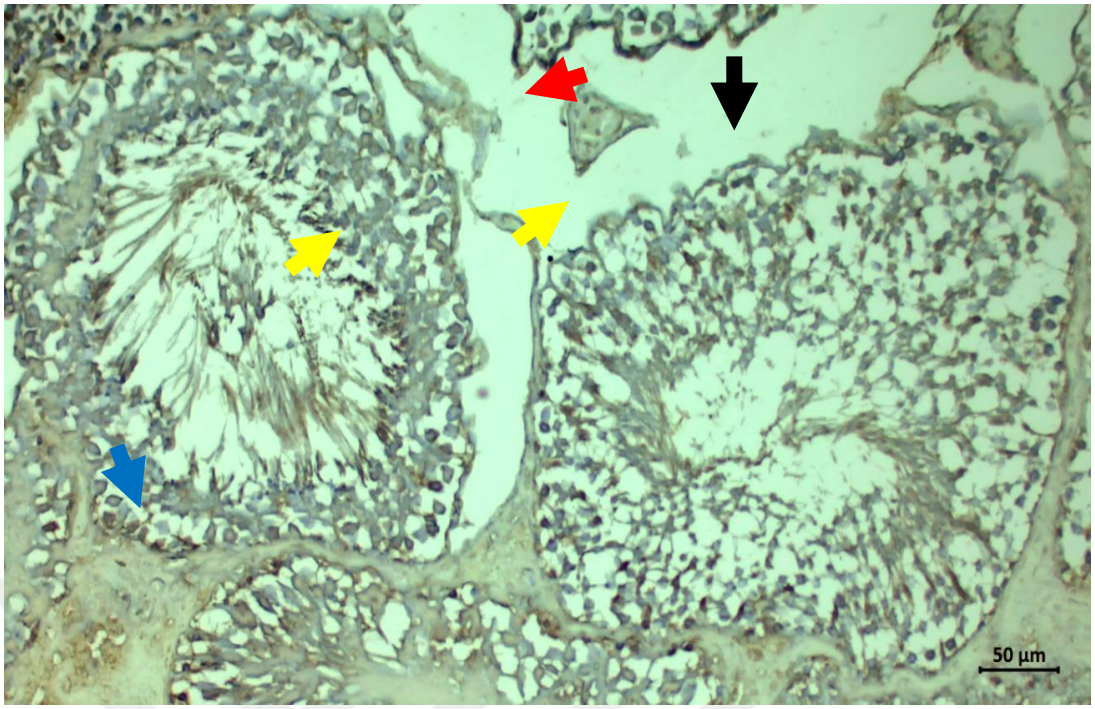
Şekil 28. Anason+I/R grubu testis IL-6 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Sertoli hücrelerinde (siyah ok) orta seviyede pozitif IL-6 ekspresyonları. Damar endotelinde (mavi ok) ve interstisyel stromal hücrelerde (kırmızı ok) pozitif IL-6 ekspresyonları. **Boyama:** IL-6 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

I/R+Anason grubunda seminifer tübüllerin transversal kesitinde; bu gruptaki ratların iskemi reperfüzyon sonrası Anason almaları, testiküler iskemi reperfüzyon durumundaki inflamatuar hücre sayılarında daha fazla azalma görüldü. Spermatogenik hücrelerde ve Sertoli hücrelerinde oldukça hafif düzeyde pozitif IL-6 ekspresyonu izlendi. Tübüller arası kapiller damar endotelinde tek tük IL-6 pozitif ekspresyonu görülürken, Leydig hücrelerinde de orta seviyede pozitif IL-6 ekspresyonu izlendi. Bu gruptaki inflamatuar hücrelerin Anason+ I/R grubuna kıyasla daha hafiflediği izlendi (Şekil 29).



Şekil 29. I/R+Anason grubu testis IL-6 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Sertoli hücrelerinde (siyah ok) pozitif IL-6 ekspresyonları. Damar endotelinde (mavi ok) ve Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) pozitif IL-6 ekspresyonları. **Boyama:** IL-6 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

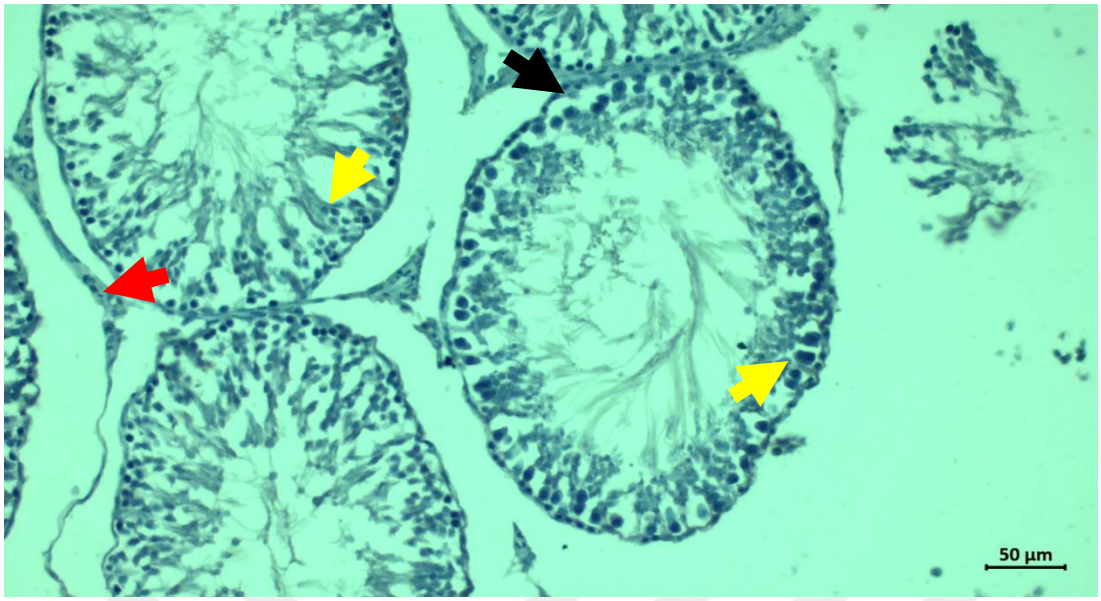
Anson+I/R+Anason grubunda seminifer tübüllerin transversal kesitinde; Spermatogenik hücrelerde tek tük pozitif IL-6 ekspresyonları görülürken, Sertoli hücrelerinde ekspresyonların devam ettiği görüldü. Damar endotelinde IL-6 ekspresyonları negatiflik göterdi. Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) çok hafif IL-6 pozitif ekspresyonları görülmeye devam etti. Anason'un hem I/R öncesinde hem de I/R sonrasnda verilmesi inflamatuar hücre yolaklarını oldukça iyileştirdiği görüldü (Şekil 30).



Şekil 30. Anason+IR+Anason grubu testis IL-6 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) tek tük pozitif IL-6 ekspresyonları, Sertoli hücrelerinde (siyah ok) pozitif IL-6 ekspresyonları. Damar endotelinde (mavi ok) negatif IL-6 ekspresyonları ve Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) çok hafif IL-6 pozitif ekspresyonları. **Boyama:** IL-6 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

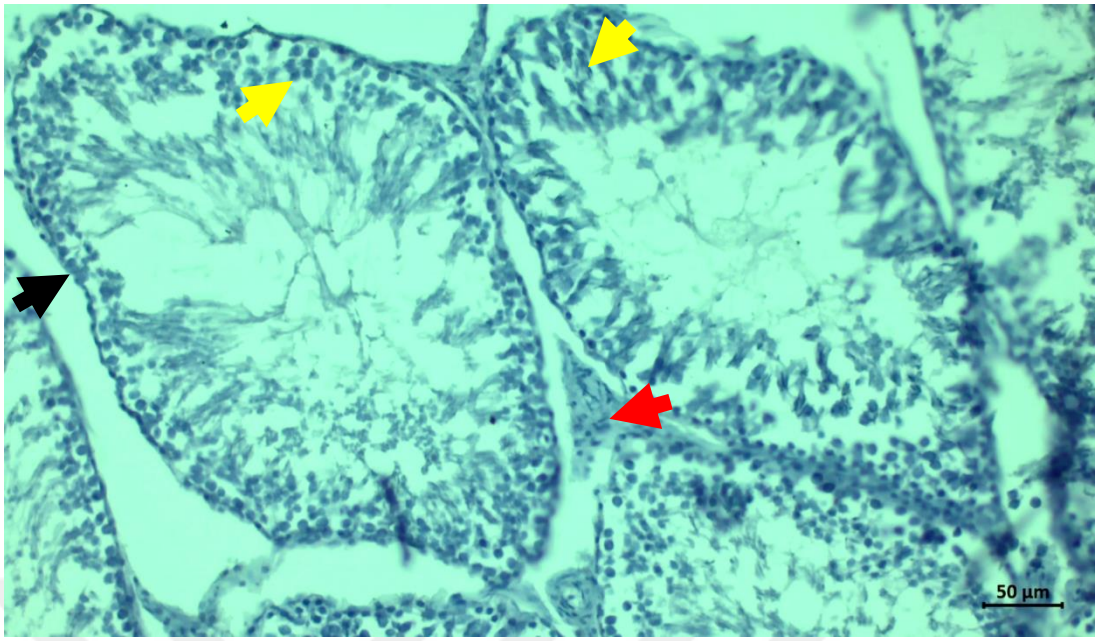
8.4.2. BCL-2 Bulgular

Kontrol grubunda seminifer tübüllerin transversal kesitinde; Seminifer tübül yapısında yer alan spermatogenik hücrelerde ve Sertoli hücrelerinde apoptotik ekspresyonların görülmediği, ayrıca Leydig hücrelerinde de BCL-2 ekspresyonlarının negatif olduğu görüldü (Şekil 31).



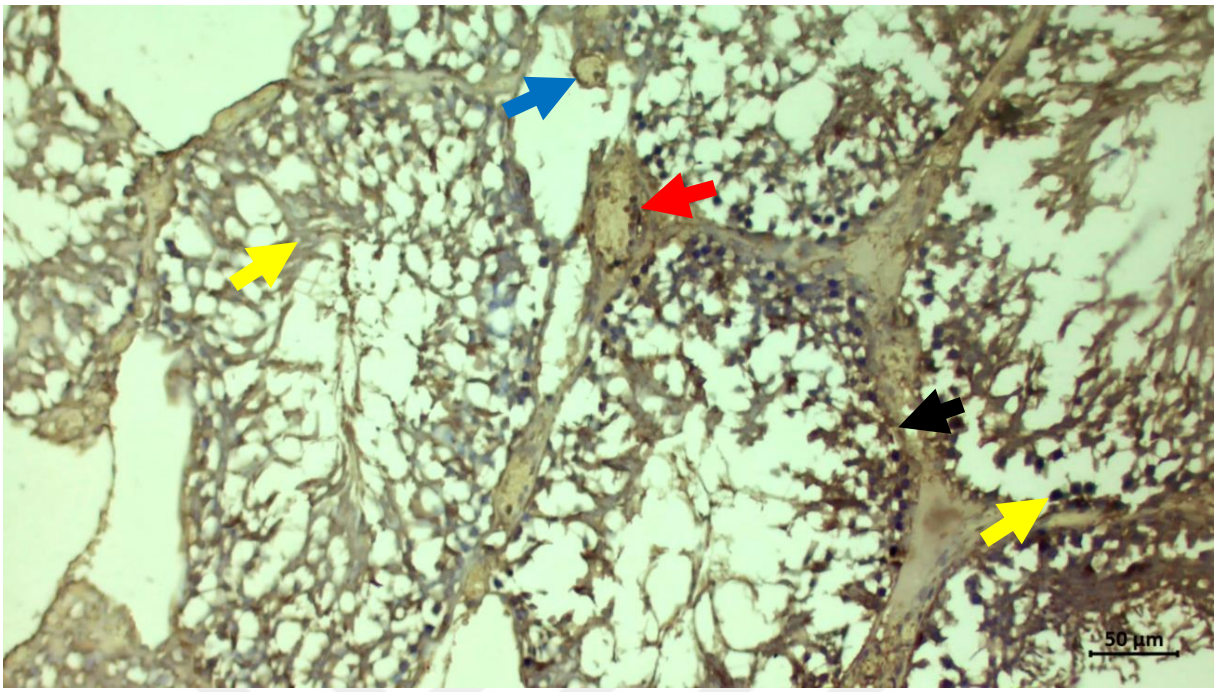
Şekil 31. Kontrol grubu testis BCL-2 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok), Sertoli hücrelerinde (siyah ok) ve Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) negatif BCL-2 ekspresyonları. **Boyama:** BCL-2 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

Anason grubundaki seminifer tübüllerin transversal kesitinde; Anason grubunda seminifer tübüllerin transversal kesitinde; spermatogenik hücrelerin çoğunda negatif BCL-2 ekspresyonu görülürken, birkaç spermatogenik hücrede BCL-2 ekpresyonu pozitif izlendi (Şekil 32).



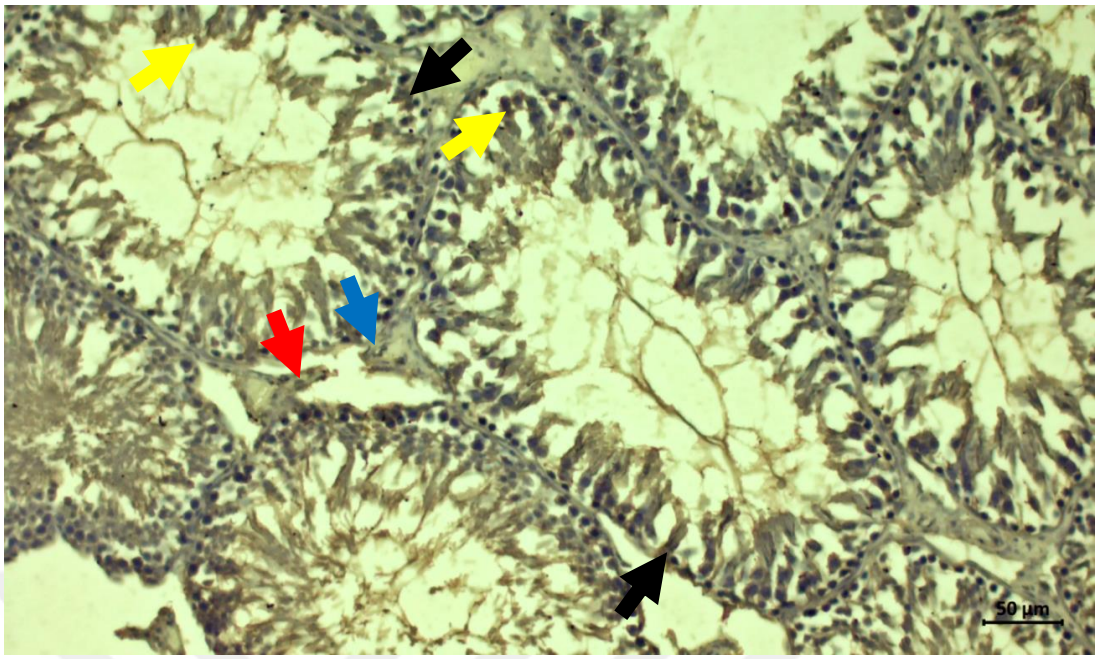
Şekil 32. Anason grubu testis BCL-2 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok), Sertoli hücrelerinde (siyah ok) ve Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) negatif BCL-2 ekspresyonları. **Boyama:** BCL-2 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

İskemi reperfüzyon grubunda (I/R) seminifer tübüllerin transversal kesitinde; spermatogenik hücrelerde ve Sertoli hücrelerinde yoğun pozitif BCL-2 ekspresyonu görüldü. Ayrıca interstisyel alanda yer alan kapiller damar endotelinde ve Leydig hücrelerinde yoğun pozitif BCL-2 ekspresyonu izlendi (Şekil 33).



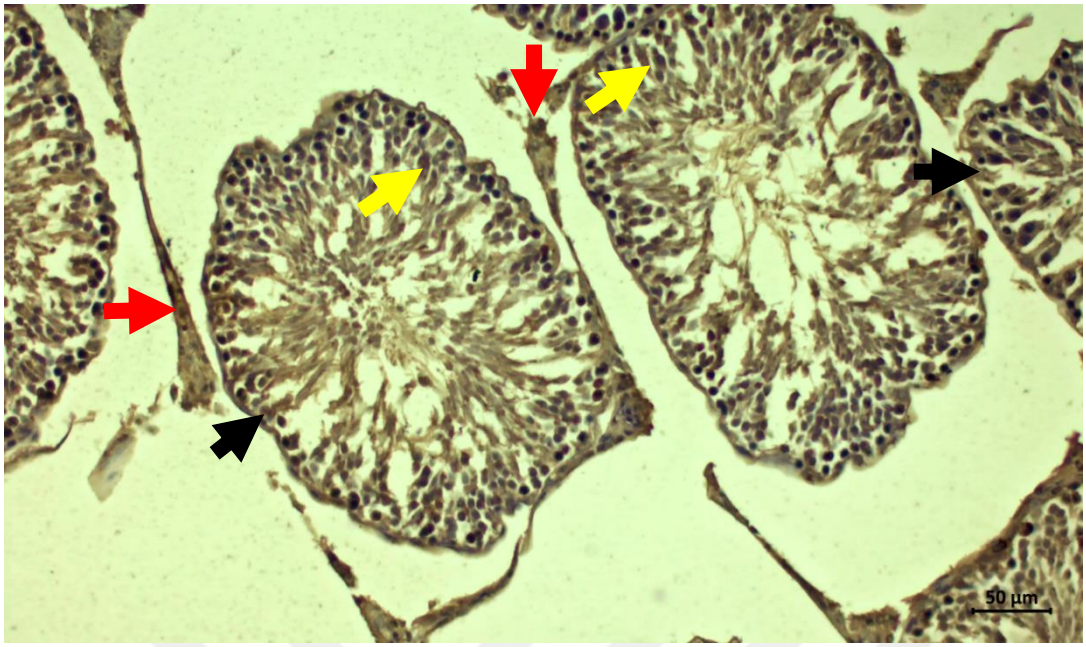
Şekil 33. I/R grubu testis BCL-2 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Sertoli hücrelerinde (siyah ok) yoğun pozitif BCL-2 ekspresyonları. Damar endotelinde (mavi ok) ve interstisyel stromal hücrelerde (kırmızı ok) pozitif BCL-2 ekspresyonları. **Boyama:** BCL-2 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

Anason+I/R grubunda seminifer tübüllerin transversal kesitinde; bu gruptaki ratların iskemi reperfüzyon öncesi anason almaları dolayısıyla, apoptotik hücre sayısında hafif azalmalar görüldü fakat tam olarak iyileşme görülmedi. Spermatogenik hücrelerde ve Sertoli hücrelerinde orta seviyede pozitif BCL-2 ekspresyonu izlendi. Tübüller arası kapiller damar endotelinde hafif pozitif BCL-2 ekspresyonu görülürken, Leydig hücrelerinde orta seviyede pozitif BCL-2 ekspresyonu izlendi. I/R grubuna kıyasla ekspresyonların daha hafif düzeyde olduğu, fakat I/R+Anason grubuna kıyasla da daha fazla olduğu görüldü (Şekil 34).



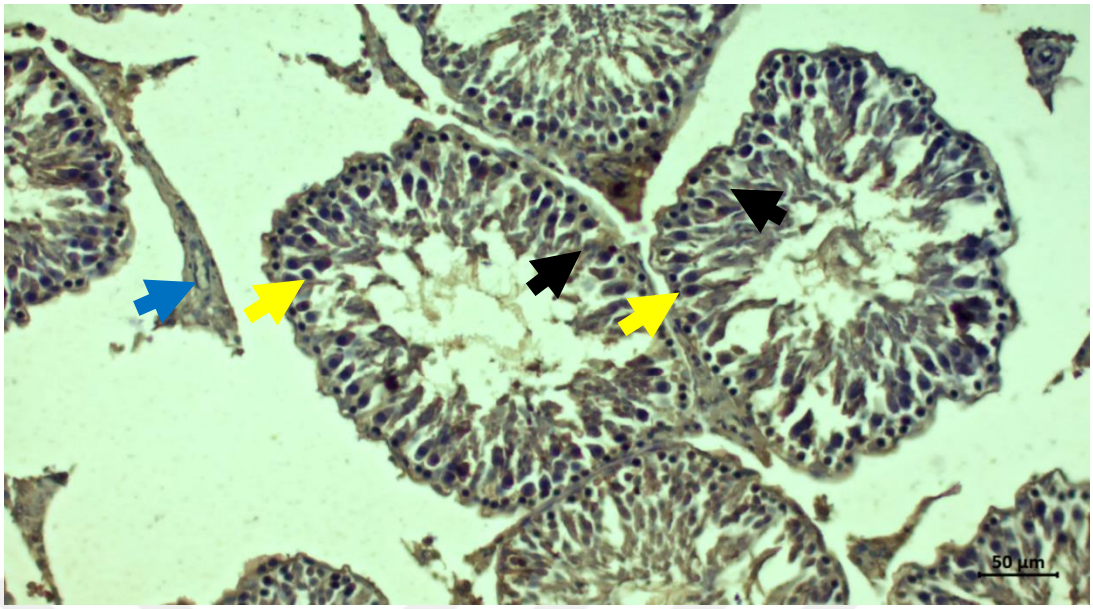
Şekil 34. Anason+ I/R grubu testis BCL-2 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Sertoli hücrelerinde (siyah ok) orta seviyede pozitif BCL-2 ekspresyonları. Damar endotelinde hafif pozitif (mavi ok) BCL-2 ekspresyonları ve interstisyel stromal hücrelerde (kırmızı ok) orta seviyede pozitif BCL-2 ekspresyonları. **Boyama:** BCL-2 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

I/R+Anason grubunda seminifer tübüllerin transversal kesitinde; bu gruptaki ratların iskemi reperfüzyon sonrası Anason almalarının, testiküler iskemi reperfüzyon durumundaki inflamatuar hücre sayılarında daha fazla azalmalara neden olduğu görüldü. Spermatogenik hücrelerde ve Sertoli hücrelerinde oldukça hafif düzeyde pozitif BCL-2 ekspresyonu izlendi. Tübüller arası kapiller damar endotelinde tek tük BCL-2 pozitif ekspresyonu görülürken, Leydig hücrelerinde de orta seviyede pozitif BCL-2 ekspresyonu izlendi. Bu gruptaki apoptotik hücrelerin Anason+I/R grubuna kıyasla daha hafif olduğu izlendi (Şekil 35).



Şekil 35. I/R+ Anason grubu testis BCL-2 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) ve Sertoli hücrelerinde (siyah ok) hafif BCL-2 ekspresyonları. Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) orta seviyede pozitif BCL-2 ekspresyonları. **Boyama:** BCL-2 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

Anson+I/R+Anason grubunda seminifer tübüllerin transversal kesitinde; Spermatogenik hücrelerde tek tük pozitif BCL-2 ekspresyonları görülürken, Sertoli hücrelerinde ekspresyonların hafif düzeyde devam ettiği görüldü. Damar endotelinde BCL-2 ekspresyonları oldukça hafifti. Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) ise negatif BCL-2 ekspresyonları görülmeye devam etti. Anason'un hem I/R öncesinde hem de I/R sonrasında verilmesi apoptotik hücre yolaklarını oldukça iyileştirdiği görüldü (Şekil 36).



Şekil 36. Anason+I/R+Anason grubu testis BCL-2 immunohistokimya mikrografı. Spermatogenik hücrelerde (sari ok) tek tük pozitif BCL-2 ekspresyonları, Sertoli hücrelerinde (siyah ok) hafif pozitif BCL-2 ekspresyonları. Damar endotelinde (mavi ok) çok hafif BCL-2 ekspresyonları. **Boyama:** BCL-2 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 50 µm.

9.TARTIŞMA

Testis iskemi reperfüzyonu, ciddi sağlık sorunlarına yol açabilecek acil bir tıbbi durumdur. Bu konu ile ilgili birçok deneysel ve klinik çalışmalar yapılmaktadır. Moshkelani ve ark. yaptıkları deneysel çalışmada, iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda reaktif oksijen ürünlerinin düzeyinin arttığını, buna karşın Glutatyon Peroksidaz ve Süperoksit Dismutaz gibi antioksidan etkili enzimlerin seviyelerinin azaldığını saptamışlardır. İskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlara Magnezyum Sülfat verildiğinde ise, oksidatif hasarı azaltacak şekilde, reaktif oksijen türlerinin düzeyinde azalma, antioksidan enzimlerin düzeyinde ise artış olduğunu bulmuşlardır (168). Fakourive ark. yaptıkları çalışmada, iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda MDA seviyelerinin anlamlı derecede arttığını, SOD seviyelerinin de anlamlı derecede azaldığını saptamışlardır. Bununla birlikte, iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlara Folik asit verilmesinin, doz bağımlı bir şekilde MDA seviyelerinde azalmaya ve SOD seviyelerinde artışa neden olduğunu bulmuşlardır (169). Moghadam ve ark. yaptıkları çalışmada, farelerde busulfan'a bağlı oluşan testiküler hasarda, MDA seviyelerinin anlamlı şekilde yükseldiğini, melatonin ve ozon verilmesinin ise MDA seviyelerini düşürerek, busulfan verilmesiyle oluşan ROS'nin neden olduğu lipid peroksidasyonu ve permeabilite artışını azaltabileceğini göstermişlerdir. Busulfanın, ayrıca SOD enzim seviyesinde düşmeye neden olduğunu, ancak melatonin ve ozon verilmesinin SOD seviyelerinde yükselmeye neden olduğunu bulmuşlardır. Bunun yanında, Busulfan'ın TAS seviyesinde anlamlı şekilde azalmaya neden olduğunu da göstermişlerdir (170). Jafari ve ark. yaptıkları deneysel çalışmalarında, testis iskemi reperfüzyon grubunda kontrol grubuna göre MDA seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu saptadılar. Bununla birlikte Topiramat ile tedavi edilen grupta, MDA seviyelerinin iskemi reperfüzyon grubundan anlamlı derecede düşük olduğunu gösterdiler. Testis iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlara anason verilmesinin ise, TAS düzeylerini anlamlı şekilde yükselttiğini ve TOS düzeylerini ise anlamlı şekilde azalttığını saptadık. İskemi reperfüzyon grubunda (I/R), Katalaz ve SOD aktivitesinin anlamlı derecede azalmış olduğu, ancak Topiramat uygulamasının bu enzim aktivitelerini iskemi reperfüzyon grubuna göre anlamlı derecede arttırdığını göstermişlerdir (171). Bu çalışmaların sonuçlarıyla benzer

şekilde, biz de yaptığımız bu çalışmada, ratlarda testislerde iskemi reperfüzyon hasarının, TOS düzeylerini ise anlamlı derecede artırdığını tespit ettik.

Doaa ve ark. yaptıkları çalışmalarında, testis torsiyonuna bağlı istenmeyen etkilerin önlenmesinde Vitamin D_3'ün etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında testis iskemi reperfüzyonuna bağlı olarakdeney sonunda vücut ağırlığı, relatif testis ağırlığı ve mutlak testis ağırlığını ölçmüşlerdir. Çalışmalarının sonucunda, I/R+Vit D_3 grubunun son vücut ağırlığının, kontrol ve sham grubuna göre anlamlı derecede artmış olduğunu tespit etmişlerdir (172). Bizim çalışmamızda ise, en fazla vücut ağırlığı artışı Anason grubunda saptanmış iken, I/R grubunda ağırlıkta bir değişim saptanmamıştır. I/R+Anason grubunda ağırlıkta azalma olduğu saptanmışken, Anason+I/R+Anason grubu ile Anason+I/R grubunda ağırlık artışı saptanmıştır. Ayrıca, testis I/R hasarının, kontrol ve sham grubuna göre testis ağırlığında anlamlı bir azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bu ağırlık azalmasının torsiyon süresince kan akımının azalmasına, detorsiyon döneminde de oksidatif strese ve lökosit infiltrasyonuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Bunun göstergesi olarakta testiküler MDA ve MPO seviyelerinin yüksek olmasını ileri sürmüşlerdir (172). Bizim çalışmamızda da bu sonuçlara benzer şekilde, testis ağırlığı iskemi reperfüzyon grubunda en düşük bulunmuştur. Testis ağırlığı Kontrol, Anason ve Anason+I/R gruplarında benzer bulunmuştur.

Wei ve ark. çalışmalarında, testis iskemi reperfüzyon grubunda testis ağırlığında, seminifer tübül çapında, germ hücre katmanlarının sayısında ve Johnsen testis biyopsi skorunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalma olduğunu göstermişlerdir. Susam ile tedavi edilen grupta ise, bu 4 parametrenin de testis iskemi reperfüzyon grubuna göre anlamlı şekilde iyileştiğini bildirmişlerdir (173). Qin ve ark. ratlarda testis iskemi reperfüzyon hasarında çinkonun koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında histopatolojik inceleme sonucunda, iskemi reperfüzyon grubunda konjesyon, hemoraji, germ hücre kaybı, seminiferepitelde bütünlük kaybı olduğunu gözlemlemişlerdir. Buna karşın, iskemireperfüzyon uygulanan ratlara düşük doz çinko verilen grupta, iskemireperfüzon grubuna göre histolojik görünümde iyileşme olduğunu gözlemlemişleridir (174). Lee ve ark. testikülerіskemireperfüzyon hasarı oluşturulan ratlardatopikalnitrit uygulamasının etkilerini araştırdıkları çalışmada, aynı taraftaki testislerde iskemireperfüzyon grubunda Johnsen skorunun ve germ hücre

tabakalarının sayısının anlamlı şekilde daha düşük olduğunu saptamışlardır. Buna karşın, topikalnitrit uygulanan grrupta, testislerdeki yapı ve morfolojinin normale yakın olduğu saptanmıştır (175). Bizim çalışmamızda da bu sonuçlara benzer şekilde, Johnsen skoru açısından I/R grubu en kötü skora sahipken, sırasıyla Anason+I/R, I/R+Anason ve Anason+I/R+Anason gruplarında Johnsen skorunun giderek arttığını gözlemledik. Kontrol ve Anason gruplarında Johnsen skoru en yüksek olarak değerlendirildi.

Qin ve ark. ratlarda yapmış oldukları testis iskemireperfüzyon hasarında çinkonun koruyucu etkilerini araştırmış, iskemireperfüzyon grubunda testikülerapopitotik hücre sayısının anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte, düşük doz çinko verilen grupta, iskemireperfüzyon grubuna göre apopitotik hücrelerin oranının anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca yapılan TUNEL boyamasında, çinkonun testikülerapopitozinsidansını anlamlı şekilde azalttığını göstermişlerdir (176). Doğan ve ark. ratlardatestikülerіskemireperfüzyonhasarında Ganodermalucidum'un koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, sham grubunda spermatogenik hücrelerde Bcl-2 ekspresyonunun negatif olduğu saptanırken, iskemi reperfüzyon grubunda spermatogenik hücrelerde yoğun Bcl-2 ekspresyonu ve tubullerin bazal tabakalarında güçlü mitotik aktivite izlemişlerdir. Bazı sertoli hücrelerinin lüminal yüzlerinde de güçlü Bcl-2 ekspresyonu olduğunu gözlemlemişlerdir. Buna karşın, iskemi reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, G. Lucidum ile tedavi edilen grupta Bcl-2 pozitif germinal hücre sayısının da daha az olduğunu gözlemlemişlerdir (177). Bu bulgulara paralel şekilde, bizim çalışmamızda da iskemireperfüzyon grubunda testis dokusunda yoğun IL-6 ekspresyonu izlendi. Ayrıca bazal membrandainflamatuar hücreler izlendi. Buna karşın, Anason+I/R, I/R+Anasonve Anason+I/R+Anason gruplarında hem IL-6 ekspresyonu, hem de inflamatuar hücrelerde azalma olduğu saptandı. Ayrıca, I/R grubunda Bcl-2 ekspresyonunun yoğun pozitif olduğu saptandı. Buna karşın, apopitotik hücre sayılarının sırasıyla Anason+ I/R, I/R+Anason ve Anason+I/R+Anason gruplarında giderek azaldığı gözlendi.

10. SONUÇ

Çalışmamızda; Kontrol grubu, Anason ve Anason+IR+Anason grupları arasındaki istatiksel analiz sonuçlarına bakıldığında serum TOS değerlerinin farklılık göstermediği gözlemlendi. I/R yapılan grupta ise TOS değerlerinin diğer çalışma gruplarından anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi.

Serum TAS düzeylerinin ortalamalarına bakıldığında ise en yüksek TAS düzeyinin Anason grubunda olduğu görülürken, Anason+I/R+Anason ve Anason gruplarında ise TAS düzeylerinin ortalamalarının oldukça yakın olduğu izlendi. Kontrol, I/R, Anason+I/R ve I/R+Anason gruplarında ortalamalarının oldukça yakın değerler olduğu görüldü. TOS değerlerinin ortalamalarına bakıldığında ise; TAS düzeyleriyle paralellik gösterdiği gözlendi. TOS düzeyleri en düşük Anason, Kontrol ve Anason+I/R+Anason gruplarında saptandı. En yüksek TOS değerleri I/R grubunda izlenmekteydi. Anason+I/R grubu ile I/R+Anason gruplarının ortalama TOS değerleri karşılaştırıldığında birbirlerine oldukça yakın olduğu gözlendi.

Çalışmamızdaki rat vücut ağırlıkları incelendiğinde; Anason grubuna ait ortalama vücut ağırlıklarının en yüksek olduğu saptanırken, kilo kaybının ise en çok I/R+Anason grubunda olduğu izlendi. I/R uyguladığımız gruplarda testiküler dokuların bazılarında atrofiler gözlendi. Yine bu bulgulara paralel olarak en yüksek testis ağırlıklarının Anason grubunda olduğu izlenirken, Anason+I/R+Anason grubunda en düşük ağırlık tespit edildi.

Histopatolojik ve immunohistokimysal incelemeler sonucunda; Anason grubu ile Kontrol grubu arasında değişiklik olmadığı, Anason+I/R grubundaki inflamatuar ve apoptotik hücre sayısının I/R grubundan az olduğu, ancak I/R+Anason grubunda daha fazla olduğu tespit edildi. Anason+ I/R+ Anason kombine tedavisininI/R+Anason veya Anason+I/R grubuna göre oldukça iyi sonuç verdiği izlendi.Sonuç olarak; Anason+ I/R+ Anason tedavisinde gelişen testiküler I/R uygulamasının inflamasyon yolaklarını Anason'un güçlü bir şekilde baskıladığı, proinflamatuar moleküllerin ekspresyonunu azaltarak histolojik dokuları restore ettiği ve koruyuculuk etkisini en yüksek düzeyde gösterdiği gözlendi.

Anason’un antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuar etkilerinin olduğunu saptadık. Ancak Anason ile ilgili bakmış olduğumuz parametrelere ek olarak moleküler düzeyde değerlendirilmesi, farklı doz ve sürelerde uygulanarak çalışmaların geliştirilmesi kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. Eltzschigand HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion from mechanism to translation. Nature Medicine. 2011;17(11):1391–1401.

2. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M and Korthuis RJ. Cell biology of ischemia reperfusion injury. International Review of Cell and Molecular Biology. 2012;298:229–317.

3. Lei X, Chao H, Zhang Z et al. Neuro protective effects of quercetin in a mouse model of brain ischemic reperfusion injury via anti-apoptotic mechanisms based on the Akt pathway. Molecular Medicine Reports. 2015;12(3):3688–3696.

4. Cardenand DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury. The Journal of Pathology. 2000;190(3):255–266.

5. Turner TT, Bang HJ and Lysiak JL. The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. J Urol. 2004;172:2574-2578.

6. Altavilla D, Romeo C, Squadrito F, Marini H, Morgia G, Antonuccio P and Minutoli L. Molecular pathways involved in the early and late damage induced by testis ischemia: Evidence for a rational pharmacological modulation. Curr Med Chem. 2012;19:1219- 1224.

7. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski Pasa TB and Boveris A. Spermatic torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia reperfusion injury. Mol Aspects Med. 2004; 25:199-210.

8. Lysiak JJ. The role of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 in the mammalian testis and their involvement in testicula torsion and auto immuneorchitis. Reprod Biol Endocrinol. 2004; 2: 9.

9. Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM. Testicular torsion: diagnosis, evaluation, and management. Am Fam Physician. 2013; 88: 835-840.

10. Kapoor S. Testicular torsion: A raceagainst time. Int J Clin Pract. 2008; 62: 821-827.

11. Gatti JM and Patrick Murphy J. Current management of the acute scrotum. Semin Pediatr Surg. 2007; 16: 58-63.

12. Ringdahl E and Teague L. Testicular torsion. Am Fam Physician. 2006; 74: 1739-1743.

13. Mellick LB. Torsion of the testicle: It is time to stop tossing thedice. Pediatr Emerg Care. 2012; 28: 80- 86.

14. Reyes JG, Farias JG, Henríquez Olavarrieta S, Madrid E, Parraga M, Zepeda AB and Moreno RD. The hypoxic testicle: Physiology and pathophysiology. Oxid Med Cell Longev. 2012; 929285. doi: 10.1155/2012/929285

15. Moslemi MK, Kamalimotlagh S. Evaluation of acute scrotum in our consecutive operated cases: a one-center study. Int J Gen Med. 2014; 7: 75-78.

16. Karaguzel E, Kadihasanoglu M, Kutlu O. Mechanisms of testicular torsion and potential protective agents. Nat Rev Urol 2014; 11: 391-399.

17. Krarup T. The testes after torsion. Br J Urol. 1978; 50(1): 43-6. doi: 10.1111/j.1464-410x.1978.tb02764.x.

18. Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, et al. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Anim Feed Sci Technol. 2008; 145: 209–28.

19. Kucukkurt G, Avci A, Eryavuz I, et al. Uyarlar effects of supplementation of aniseed (Pimpinella anisum L.) at various amounts to diets on lipid peroxidation, Pimpinella anisum oil protects cerebellum. Informa Healthcare USA, Inc. Antioxidant activity and some biochemical parameters inlaying quails (Coturnix coturnix japonica) Kocatepe. Vet J. 2009; 2: 1–5.

20. Pourgholami MH, Majzoob S, Javadi M, Kamalinejad M, Fanaee GH, Sayyah M. The fruit essential oil of Pimpinella anisum exerts ant iconvulsant effects in mice. J Ethnopharmacol. 1999; 66 (2): 211–215. https://doi. org/10.1016/S0378-8741(98)00161-5

21. Gulcin I, Oktay M, Kırecci E, Kufrevıoglua OI. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (Pimpinella anisum L.) seed extracts. Food Chem. 2003; 83: 371–382.

22. Aboabrahim Z, Zakhirah K. Tehran: National Works Publications. 1970;2.

23. El-Haliem NGA. The effect of aspartame on the pituitary thyroid axis of adult male albino rat and the possible protective effect of Pimpinella anisum oil: Histological and immuno histo chemical study. Egypt J Histol. 2013; 36: 195–205.

24. Shojaii A, Fard MA. Review of pharmacological properties and chemical constituents of Pimpinella anisum. Int. Sch. Res. Netw. Pharm. 2012; 8. doi: 10.5402/2012/510795

25. Özcan MM, Chalchat JC. Chemical composition and antifungal effect of anise (Pimpinella anisum L.) fruit oil at ripening stage. Ann Microbiol. 2006; 56 (4): 353–358.

26. Ghoshegir SA, Mazaheri M, Ghannadi A, Feizi A, Babaeian M, Tanhaee M et al. Pimpinella anisum in the treatment of functional dyspepsia: A double-blind, randomized clinicaltrial. J Res Med Sci. 2015; 20 (1): 13–21

27. Şeftalioğlu A. Genel & Özel İnsan Embriyolojisi. 3. Baskı, Ankara, 1998: 8-11

28. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2. Baskı, İstanbul, 2016: 335

29. Junquerıa, LC, Carneıro J. Temel Histoloji Text&Atlas. Aytekin Y, Solakoğlu S (Çeviri Editörleri). 10. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. Ankara. 2009; 431- 438

30. Şahin E.Varikosel olgularında sperm dondurma-çözme işlemini (kriyo prezervasyon) zamana bağlı olarak sperm parametreleri ince yapısı ve hücre ölümü üzerine etkileri. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul. 2010; 66.

31. Thompson MW, Mclnnes RP, Willard HE. Thompson&Thompson Genetics in Medicine. 5 th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1991.

32. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyololojisi. Demir R. (Çeviri Editörü). 1.Baskı. Ankara: Palme yayıncılık, 2006: 53-232.

33. Seçkin İ, Erimşah S, Uludağ S, İrez T. Sperm Morfolojisi ve Kromatin Kondemsasyon Defektleri Arasındaki Korelasyon. Cerrahpaşa Tıp Dergisi. 2008; 39 (4): 128-135.

34. Moore KL, Persaud TVN. Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri. Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F (Çeviri Editörleri). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2009: 176-178.

35. Thompson MW, Mclnnes RP, Willard HE. Thompson&Thompson Genetics in Medicine. 5 th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1991.

36. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Dalkıç H. (Çeviri Editörleri). 8. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2009: 262-265.

37. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Başaklar AC. (Çeviri Editörü), 9. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 2005: 506
38. Saunders Elsevier. Netter Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çeviri Editörleri). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri. 2009: 379-386
39. Klinisyen. Fizyoloji- Histloji- Embriyloji. Dağdeviren A, Selçukbiricik S (Çeviri Editörleri). 3. Baskı, İstanbul: Tusdata Ltd. Şti. 2007: 319- 325
40. Ross HM, Pawlina JL. Histology a textand atlas. Çeviren: Baykal B. Histoloji konu Anlatımı ve Atlas. 6. Basım. Palme Yayıncılık, İstanbul; 2014; 603-625.
41. Aktaş C. Skrotal hipertermi uygulanan sıçanların leydig hücrelerinin morfolojik olarak incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Edirne: Trakya üniversitesi, sağlık bilimleri enstitüsü, 2007.
42. Leeson TS, Leeson CR, Paparo A. A Text/ Atlas of Histology. Philadelphia: W. B. Saunders Co. Jangueria Lc, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y (Çeviri Editörü). İstanbul: Nobel Kitabevi, 2003.
43. Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1. Cilt. 2. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi. 1997; 417-420.
44. Kierszenbaum AL. MD. PHD. Histology and Cell Biology. Sophie Davis Biyomedikal Eğitim Okulu, New York Tıp Okulu, Şehir Üniversitesi, New York. 2006; 607
45. Tekelioğlu M. Özel Histoloji. 1. Baskı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 2002; 231-244,
46. Çimen A. Anatomi. Uludağ Üniversitesi Basım Evi. Bursa. 1987; 396
47. Kuran O. Sistematik Anatomi. 3. Baskı, İstanbul: Filiz Kitabevi, 1993.
48. Yiğit G. Tıbbi Fizyoloji. 11. Baskı. Yüce yayınları A.Ş.&Nobel tıp kitabevleri Ltd. Şti. 2006: 996.
49. Eroschenko VP. Di Fore's Atlas of Histology with Functional Correlations 12/E. Lippincott Williams&Wilkins 2001 Market Street. Philadelphia. 2013: 785; 603.
50. Trainer TD.Histology of the normal testis. Am J Surg Pathol. 1987; 11: 797-809
51. Abraham L. Üreme sistemi. Histoloji ve hücre biyolojisi. Demir R. (çeviren).1. baskı, Ankara: Palme yayıncılık. 2006.
52. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology A Text and Atlas. 4. Th Edition, Philedelphia, Lippincott: Wiliam&Wilkins. 2003: 689 - 696.

53. Tutşi Y. Anti host uygulaması sonucu sperm membran fonksiyonel bütünlüğünün ışık ve elektron mikroskop düzeyde incelenmesi. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitütüsü. Diyarbakır. 2009: 85

54. Yiğit G. Tıbbi Fizyoloji. 11. Baskı, Yüce Yayımları A. Ş & Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 2006: 996.

55. Moore KL, Dalley AF. Clinically Oriented Anatomy. Williams&Wilkins, Inted. 1995: 307-313.

56. Eşrefoğlu M. Renkli Resimli Genel ve Özel Histoloji. Malatya. 2004:356.

57. Gartner LP, Hıatt JL. Color Text Book of Histology. Lippincott Williams&Wilkins. W.B. Saunders Company. Baltimore London. 2001: 403- 439.

58. Koyuncu İ. Varikoselli Hastalarda Spermiyum Morfolojisinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Kayseri. 2008; 55

59. Özel HB. Tek Taraflı Testis Torsiyonuna Karşı Testiste Testiküler Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Aktivitesindeki Değişimlerin Histolojik ve Histoşimik Olarak Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitütüsü. 2009.

60. Karagöz E. Özel Histoloji. Isparta, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fak. Yayını. 2002; 196-199.

61. WHO Laboratuvar el kitabı İnsan semeni ve Sperm-Servikal Mukus Etkileşimi Değerlendirilmesi. Günalp S.(Çeviri editörü). Tıp Teknik Kitabevi. 4. Baskı. Ankara. 2002: 76.

62. Erkoçak A. Özel Histoloji. Ankara üniversitesi tıp fakültesi yayınları, Ankara, 2. Baskı. 1990: 166-194.

63. Nakagawa A,Shiratsuchi A, Tsuda K, Nakanishi Y. Invivo analysis of Phagocytosis of Apoptotic cells by testicular Sertoli cells. Mol Reprod Dev. 2005; 71 (2): 77-166

64. Kenehara H, Song K, Ueda H, Shiota N, Azuma H, Katsuoka Y, Miyazaki H, Miyazaki M. Involvement of Angiotensin II Receptor Subtypes During Testicular Development in Rats. Int J. Androl. 1998; 21 (4):186-195.

65.Ross MH, Kaye GI and Pawlina W. Histology: A Textand Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. Taylor C, Scogna KH, Ajello JP (Çeviri Editörleri). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2006: 710-730.

66. Paniagua R, Amat P, Nistal M and Martin A. Ultrastructure of Leydigcells in human ageing testes. Journal of anatomy. 1986; 146: 173.

67. Şermin, P. Histoloji. Uludağ Üniversitesi Yayınları, 1. Baskı. 1990; 260-287.

68. Snell RS. Tıp Fakültesi Öğrencileri için Fonksiyonel Anatomi. (Çeviri Editörü: Yıldırım, M.), Nobel Tıp Kitabevleri ve Yüce Yayımcılık, İstanbul. 2. Baskı. 1998; 357-361.

69. April EW. Klinik Anatomi. (Çeviri Editörü: Yıldırım M), Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. 3. Baskı. 1998; 425-461.

70. Ozan E, Koyutürk L, Sapmaz T. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarında Antioksidan Olarak Prostoglandin E1 (PGE1) Kullanımının İncelenmesi: Deneysel Çalışma. Fırat Tıp Dergisi. 2004; 9(3): 67-71.

71. Anaya Prado R, Toledo Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. J SurgRes. 2002; 105: 58-248.

72. Ateş B, Yılmaz HR, Selamoğlu Z, Iraz M, Yılmaz Ş. Melatonin'in intestinal iskemi reperfüzyonda 6-fosfoglukonat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi. S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2004; 11(3): 8-11.

73. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Temel Patoloji (Basic Pathology). Çeviri editörü: Çevikbaş U. 5th edition, İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti. 1995: 5-9, 36-38, 497.

74. Zimmerman BJ andGranger DN. Reperfusion Injury. Surg Clin North. 1992; 72 (1):65-83.

75.Murata M, Monden M, Umeshita K, Nakano H ve ark. Role of intercellular calcium in superoxide-induced hepatocyte injury. Hepatology. 1994; 19: 1223-28.

76. Huether SE, Mc Cance KL. Understanding Pathophysiology. 3rd edition, St. Louis, Mo. Mosby. 2004: 71.

77. Wilhelm J. Metabolica Aspects of Membrane Lipid Peroxidation. Acta Univ Carol Med Monogr. 1990; 137:1-53.

78. Özçelik N, Dursun V, Pekmezci S. Mezenter iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde Allopurinol, Süperoksit Dismutaz ve Dimetil sülfoksitin etkisi. Kolon rektum dergisi. 2006; 61:8- 21.

79. Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM ve ark. Hydrogen peroxide stimulate sthesynthesis of platelet activating factorby endothelium and induces endothelial cell dependent neutrophil adhesion. J. Clin. Invest. 1988; 82(6): 2045-55. doi: 10.1172/JCI113825.

80. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. Crit Care Med 1993; 21: 1376-1386

81. Cuzzocrea S, Chatterjee P, Mazzon E, Dugo L, De Sarro A, Vande Loo FAJ, Caputi AP, Thiemermann C. Role of induced nitricoxide in the initiation of the inflammatory response after post ischemic injury Shock. 2002; 18: 169-176.

82. Homer Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post ischaemic organ dysfunction: A review. Eur J Vasc Endovasc Surg. 1997; 14: 195-203.

83. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: Strategiest inhibit complement. Fundam Clin Pharmacol. 2001; 15: 293-306.

84. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? Lancet. 1994; 344 (8924):721-4.

85. Kehrer JP. Free radicals in biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. Natural antioxidants in human health and disease. 1994: 25-62.

86. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. The American journal of medicine. 1991; 91(3): 23-30.

87. Machlın LJ, Bendıch A. Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. Faseb. 1987; 1: 441-445.

88. Fang YZ, Sheng Y, Wu G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. 2002; 18: 872-879

89. Grace PA. Ischemia reperfusion injury. Br J Surg. 1994;81:637-47.

90. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları. 1995: 3-10

91. Grisham MB, Mc Cord JM. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: Physiology of oxygen radicals. Ed: Taylor AE, Malton S, Ward PA. American Phsiology Society. Maryland, USA. 1986: 1-18.

92. Demir AY, Metin A. Akne Vulgaris ve Oksidatif Stres. Turkiye Klinikleri Journal of Dermatology. 2011; 21(2):75-82.

93. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri Hacettepe Tıp Dergisi. 2002; 33(2): 110-8.
94. Slavikova H, Lojek A, Hamar J et al. Total antioxidant capacity of serum increased in early but not late period after intestinal ischemia in rats. Free Rad Biol Med. 1998; 25: 9–18.
95. Valko M, Leıbfrıtz D, Moncol J, Cronın MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry& Cell Biology. 2007; 39: 44-84
96. Fu W, Chen J, Caı Y, Leı Y, Chen L, Peı L, Zhou D, Lıang X, Ruan J. Antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective potential of the extract from Parat helypterisnipponica (Franch. et Sav.) Ching. Journal of Ethno pharmacology. 2010; 130: 521–528.
97. Akça A. Biber çeşitlerinin antioksidan kapasiteleri ve bileşenleri açısından değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. 2012.
98. Antmen Ş. Beta talasemide oksidatif stres. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana. 2005.
99. Kopanı M, Celec P, Danısovıc I, Mıchalka P, Bıro C. Oxidative stres and electron spin resonance, Clinica Chimica Acta. 2006; 364: 61-66.
100. Karabiga M. A Protein'in Deneysel Aortik İskemi Reperfüzyon Modelinde Böbrek Hasarı Üzerine Etkisi. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta. 2006
101. Shahıdı F. Natural Antioxidants Chemistry Health Effects and Applications. AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996.
102. Hallıwell B, Gutterıdge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University. Press, Oxford. 2007
103. Young IS and Woodside JV. Antioxidants in Health and Disease. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54; 176-186.
104. Yarıktaş M, Döner F, Doğru H, Aynalı G, Yönden Z ve Delibaş N. Baş- Boyun Malign Tümörlerinde Malondialdehit Düzeyleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2003; 10(4): 65-66.
105. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC ve Mecocci C. Potential Markers of Oxidative Stress in Stroke. Free Radical Biology&Medicine. 2005; 39: 841-852.

106. Halifeoğlu İ, Karataş F, Çolak R, Canatan H. ve Telo S. Tip 2 Diyabetik Hastalarda Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum. Fırat Tıp Dergisi. 2005; 10 (3): 117-118.

107. Bektaşoğlu B. Hidroksil radikal süpürülmesine dayalı antioksidan aktivite ölçümünde yeni bir yöntem geliştirilmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2007

108. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. Journal of Clinical and Experimental Investigations. 2015;6 (3): 331-6.

109. Yıldız L, Başkan K, Tütem E, Apak R. Combined HPLCCUPRAC (cuprici on reducing antioxidant capacity) assay of parsley celery leaves and netle. Talanta. 2008; 77: 304–313.

110. Keleştemur GT, Özdemir Y. Balıklarda antioksidan savunma ve oksidatif stres. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. 2011; 4 (1): 69-73.

111. Cao G, Prıor RL. The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. Methods in Enzymology. 1999; 299: 50- 62.

112. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi. 2004; 15(1-2): 91-96.

113. Halifeoğlu İ, Karataş F, Çolak R, Canatan H. ve Telo S. Tip 2 Diyabetik Hastalarda Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum. Fırat Tıp Dergisi. 2005; 10 (3): 117-118.

114. Akgür FM, Olguner M, Yenici O, Gökden M ve ark. The effect of allopurinol pre treatment on intestinal hypo perfusion encountered after correction of intestinal volvulus. J Pediatr Surg.1996; 31: 1205-7.

115. Shah PC, Brolin RE, Amenta PS, Deshmukh DR. Effect of aging on intestinalis chemia and reperfusion injury. Mech Ageing Dev. 1999; 107 (1): 37-50.

116. Gökpınar Ş, Koray T, Akçiçek E, Göksan T, Durmaz. Algal antioksidanlar. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi. 2006; 23: 85-89

117. Erdoğan MK. T*anacetum balsamita* L. *subsp. balsamita* bitki ekstrelerinin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. 2012

118. Youngken HW. Text book of pharmacognosy, 6th ed. Philadelphia, PA: Blakiston, 1950:116–20.

119. Baytop I. Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İstanbul Üniversitesi Yayını No: 3255, Eczacılık Fakültesi. İstanbul. 1984; 40:164-165.

120. Jodral MM. Illicium, Pimpinella and Foeniculum (Medicinal And Aromatic Plants). Crc Press. 2004; 231.

121.Hemphill J, Hemphill R. Herbs Their Cultivation and Usage. Bland ford Press, London. 1988.

122. Kucukkurt G, Avci A, Eryavuz I et al. Uyarlar effects of supplementation of aniseed (Pimpinellaanisum L.) at various amount stodiets on lipid peroxidation, Pimpinella anisum oil protects cerebellum Informa Healthcare USA, Inc. Antioxidant activity and some biochemical parameters inlaying quails (Coturnix coturnix japonica) Kocatepe. Vet J. 2009;2: 1–5

123.Pourgholami MH, Majzoob S, Javadi M, Kamalinejad M, Fanaee GH, Sayyah M. The fruit essential oil of Pimpinella anisum exerts anticonvulsant effects in mice. J Ethnopharmacol. 1999; 66(2):211–215. https://doi. org/10.1016/S0378-8741(98)00161-5

124. Baydar H. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Isparta. 2016; 51(5): 200.

125. Ceylan A. Tıbbı Bitkiler II. (uçucu yağ içerenler) Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Yayını. Bornova/İzmir. 1987; 481: 305.

126. Anonim c. Türkiye'nin 2015 Yılı Toplam İhracat ve İthalatı ile İlgili İstatistik Verileri. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2016. 15/12/2017

127. Bayram E. Türkiye'de Kültür Anasonları Üzerinde Agronomik ve Teknolojik Araştırmalar, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi. İzmir. 1992; 136.

128. Arslan N, Gürbüz B, Sarıhan EO, Bayrak A, Gümüşçü A. Variation in Essential Oil Content and Composition in Turkish Anise (*Pimpinellaanisum* L.) Populations. Turkish Journal Agriculture And Forestry. 2004; 28: 173-177.

129. Gülçın İ, Oktay M, Kıreçcı E, Küfrevıoğlu Öİ. Screening of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Anise (*Pimpinella anisum* L.) Seed Extracts. Food Chemistry. 2003; 83: 371-382.

130. Doğan G, Hayta Ş, Demirpolat A, Bağcı E. Doğu Anadolu'da Yetişen Bir Anason Türünün (*Pimpinella tragium* Subsp. *Lithophila*) Uçucu Yağ Analizi. Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi. 2015; 3: 236-240.

131. TÜİK, 2020. Anason üretimi. https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr (Erişim tarihi: 03.01.2020).

132. Anonim a 2016. Bölgeler Ekim alanı www.tuik.gov.tr/www.bruni.tuik.gov.tr 15.12.2017.

133. Anonim b 2016. Üretim Miktarı ve Toplam Ekim Alanı www.tuik.gov.tr./pre tablo.doc 15/12/2017.

134. Davis PH (ed.).Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh.1972; 4.

135. Anonim d. Batem Tıbbı ve Aromatik Bitki İşletmeleri Yapısal Analiz. 2012. http//:www.arastırma.tarım.gov.tr. 15/12/2017.

136. Akgül A, Ayar A. Antioxidant Effects of Turkish Spices. Doğa Turkish J. Agric. For. 1993; 17: 1061-1068.

137. Kılıç S. Küresel iklim değişikliği sürecinde su yönetimi. İstanbul Üniversitesi Siyasal Bilgiler Fakültesi Dergisi. 2008; 39: 161-186.

138. Albayrak S, Aksoy A, Sagdıc O, Albayrak S. Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices in turkey. Journal of Food Biochemistry. 2011; 36: 547-554.

139. Madaus G. Lehrburch Der Biologischen Heilmittel. Band I Georg Olms Verlag Hildesheim Yay. Newyork.1979; 544-550,

140. Rahmanoğlu ND. Anason Bitkisine Farklı Sevilerde Uygulanan Potasyumun Bu Bitkinin Verim ve Kimi Kalite Ögelerine Etkisi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 2007; 70.

141. Anonim e2015. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü. www.tepge.gov.tr.dosyalar/yayınlar. 15/12/2017

142. İlisulu K. İlaç ve Baharat Bitkileri, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Baskı Ofset Ünitesi. Ankara. 1992; 1256: 302

143. Tan H, Wooh S, Butt HJ, Zhang X, Lohse D. Poroussu praparticle assembly through self-lubricating evaporating colloidal ouzo drops. NatCommun. 2019;10: 478.

144. Samojlik I, Mijatovic V, Petkovic S, Skrbic B, Bozin B. The Influence of Essential Oil of Aniseed (*Pimpinella anisum* L.) on Drug Effects on The Central Nervous System. Fitoterapia. 2012; 83: 1466-1473.

145.Tabanca N, Demirci B, Ozek T, Kırımer N, Baser KHC, Bedır E, Khan IA, Wedge DE. Gas Chromatographic Mass Spectrometric Analysis of Essential Oils From Pimpinella Species Gathered From Central And Northern Turkey. Journal Of Chromatography A. 2006; 1117:194-205.

146. Arslan N, Gürbüz B, Gümüşçü A. Ankara Ekolojik Şartlarında Farklı Orjinli Anason (*Pimpinellaanisum* L.) Popülasyonlarında Verim ve Verim Özelliklerinin Araştırılması. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, Ankara.2000; 9: 1-2.

147. Kadan S. Anti cancer activity of anise (Pimpinellaanisum L.) seed extract. Open Nutraceuticals J. 2013; 6(1): 1–5.

148.Al Mofleh IA,Alhaider AA, Mossa JS et al. Aqueous suspension of anise "Pimpinella anisum" protects rats against chemically induced gastric ulcers. World J Gastroenterol. 2007; 13(7): 1112–1118,

149. Hassan WN, Saed AM. Protective effect of anise fruit (Pimpinella anisum) against osteoporosis in rat model. Am J BiomedScien. 2013; 1: 49–56.

150. Iyer SR,Ullagaddi RC, Bondada A. Anti hemolytic and antiinflammatory activities of aniseed (Pimpinella anisum). L. J Adv Pharmac Res Biosc. 2013; 1(2): 52–59.

151. Mosaffa Jahromi M,Tamaddon AM, Afsharypuor S, Salehi A, Seradj SH, Pasalar M. et al. Effectiveness of anise oil for treatment of mild to moderate depression in patients with irritable bowel syndrome: A randomized active and placebo controlled clinical trial. J. Evid Based Complementary Altern Med. 2017; 22:41–6.

152. Da RochaNeto AC, Beaudry R, Maraschin M, DiPiero RM, Almenar E. Ouble bottom antimicrobial packaging for apple shelf life extension. Food Chem. 2019; 279:379–88.

153. Janahmadi M,Niazi F, Danyali S&Kamalinejad M. Effects of the fruit essential oil of Cumin seed Linn. (Apiaceae) on pentyl enetetrazol induced epileptic form activity in F1 neurons of Helixaspersa. Journal of Ethnopharmacology. 2006; 104(1-2): 278–282.

154.Acimuvi M, Olijaca Se. Belgrad Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tıbbi Bitkileri Araştırma Enstitüsü Belgrad/Sırbistan**.** 1991.

155. Başer KHC. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin İlaç ve Alkollü İlaç Sanayilerinde Kullanımı. Anadolu Üniversitesi, T.B.A.M. İstanbul Ticaret Odası. İstanbul**.** 1997;39.

156. Ceylan A. Tıbbı Bitkiler II. (uçucu yağ içerenler) Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü. Bornova/İzmir. 1987;481: 305.

157. Haşimi N, Tolan V, Kızıl S, Kılınç E. Anason (Pimpinella anisum L.) ve Kimyon (Cuminum cyminum L.) Tohumlarının Uçucu Yağ Kompozisyonu ile Antimikrobiyal ve Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi Tarım Bilimleri Dergisi. J. of Agri cultural Sciences. 2014; 20:19-26.

158. Özcan MM,Chalchat JC. Chemical composition and anti fungal effect of anise (Pimpinella anisum L.) fruit oil at ripening stage. Ann Microbiol. 2006;56(4):353–358. https://doi.org/10.1007/BF03175031

159. Ghoshegir SA, Mazaheri M, Ghannadi A, Feizi A, Babaeian M, Tanhaee M et al. Pimpinella anisum in the treatment of functional dyspepsia: A double blind, randomized clinicaltrial. J ResMed Sci. 2015;20 (1):13–21.

160. Shojaii A, Fard M.A. Review of pharmacological properties and chemical constituents of Pimpinella anisum. Int Sch. Res. Netw. Pharm. 2012; 2012:1–8. http://dx. doi.org/10.5402/2012/510795, ID510795**.**

161. İncekara F. Endüstri Bitkileri ve Islahı, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi. İzmir. 1979; 84:171-175.

162. Khan A, Zaidi SH. Introductuon of pinpinella anisum to judgeits performance and Effect of Various Row To Row Spacing on the Growth and seed yield. Pakisten journal of Forestry. 1983; 33(3): 139-141.

163. Gamberini MT, Rodrigues DS, Rodrigues D, Pontes VB. Effects of the aqueous extract of Pimpinella anisum L. seeds on exploratory activity and emotional behavior in rats using the open field an delevated plus maze tests. J. Ethnopharmacol. 2015;168: 45–49.

164. Sahinturk V,Guclu C&Baycu C. Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. Asian Journal of Andrology. 2007; 9(1): 117-124.
165. Erel O.Anovel auto mated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. Clin Biochem. 2004;37(2):112-9.
166. Erel O:A new auto mated colorimetric method formeasuring total oxidant status. Clin Biochem. 2005; 38: 1103–11.
167. Johnsen SG.Testicular Biopsy Score Count. A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. Horm Res Paediatr. 1970;1(1):2–25.
168. Moshkelani S, Asghari A, Abedi G, Jahandideh A, Mortazavi P. Effects of Magnesium Sulfate Administration on Testicular Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. Arch Razi Inst. Winter. 2020;75(1):83–91.
169. Fakouri A, Asghari A, Ghasem Akbari G, Mortazavi P. Effects of folic acid administration on testicular ischemia/reperfusioninjury in rats. Acta Cir Bras. 2017;32(9):755-766.
170. Moghadam MT, Dadfar R, Khorsandi L. The effects of ozone and melatonin on busulfan-induced testicular damage in mice. JBRA Assisted Reproduction. 2021; 25(2):176-184.
171. Jafari A, Ghasemnejad Berenji H, Nemati M, Ghasemnejad Berenji M. Topiramate: A novel protective agentagainst ischemia reperfusion induced oxidative injury after testicular torsion/detorsion. American Journal of Emergency Medicine. 2021;44:257–261,
172. Doaa IM, Doaa AA, Samar FE, Hanaa FA, Hebatallah HAN, Hosam AS, Amir EM and Essa MS. Vitamin D_3 Prevents the Deleterious Effects of Testicular Torsion on Testis by Targeting mRNA-145 and ADAM17: In Silico and InVivo Study. Pharmaceuticals (Basel). 2021;14(12): 1222.
173. Wei SM, Wang RY, Chen YS. Sesamol Protects Testis from ischemia reperfusion Injury through Scavenging Reactive Oxygen Species and Upregulating Expression. Oxid Med Cell Longev. 2020: 9043806.
174. Qin Z, Zhu K, Xue J, Cao P, Xu L, Xu Z, Liang K, Zhu J, Jia R. Zinc induced protective effect for testicular ischemia reperfusion injury by promoting antioxidation

via micro RNA 101-3p/Nrf2 pathway. Aging (Albany NY). 2019;15:11(21): 9295–9309

175. Lee JW, Hwang ET, Han JS. Protective Effects of Topical Application of Nitrite on Testicular Ischemia Reperfusion Injury in Rats. Oxid Med Cell Longev. 2021; 5514537.

176. Qin Z, Zhu K, Xue J, Cao P, Xu L, Xu Z, Liang K, Zhu J, Jia R. Zinc-induced protective effect for testicular ischemia-reperfusion injury by promoting antioxidation via micro RNA-101-3p/Nrf2 pathway. Aging (Albany NY). 2019; 11(21): 9295–9309

177. Doğan G, İpek H. The protective effect of Ganodermalucidum on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion (I/R) injury. Acta Cir Bras. 2020; 35(1): e202000103.

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı	EDA	Soyadı	YILDIZHAN
Doğum Yeri	DİYARBAKIR	Doğum Tarihi	
Uyruğu	TC	Tel	
E-posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD	2015
Lisans	Bitlis Eren Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu	2010

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Sağlık Personeli /Hemşire	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi /Diyarbakır	(2010 – Halen)

Yabancı Dil Sınav Notu								
YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	62 (2017/Bahar)							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (30.12.2016)	71,10	66,16	55,77

12.EKLER

Ek 1– Mezuniyet Yayını

SİİRT UNIVERSITY
INTERNATIONAL SIIRT SCIENTIFIC RESEARCH CONGRESS
5-7 November 2021
SIIRT, TURKEY

RATLARDA TESTİS İSKEMİ REPERFÜZYON SONRASI ANASON'UN KORUYUCULUĞUNUN İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF ANASON'S PROTECTION AFTER TESTICULAR ICHEMIA REPERFUSION IN RATS

Eda YILDIZHAN
Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, blgc_eda@hotmail.com

Murat AKKUŞ
Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, drmakkus@gmail.com

Fırat AŞIR
Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, firatasir@gmail.com

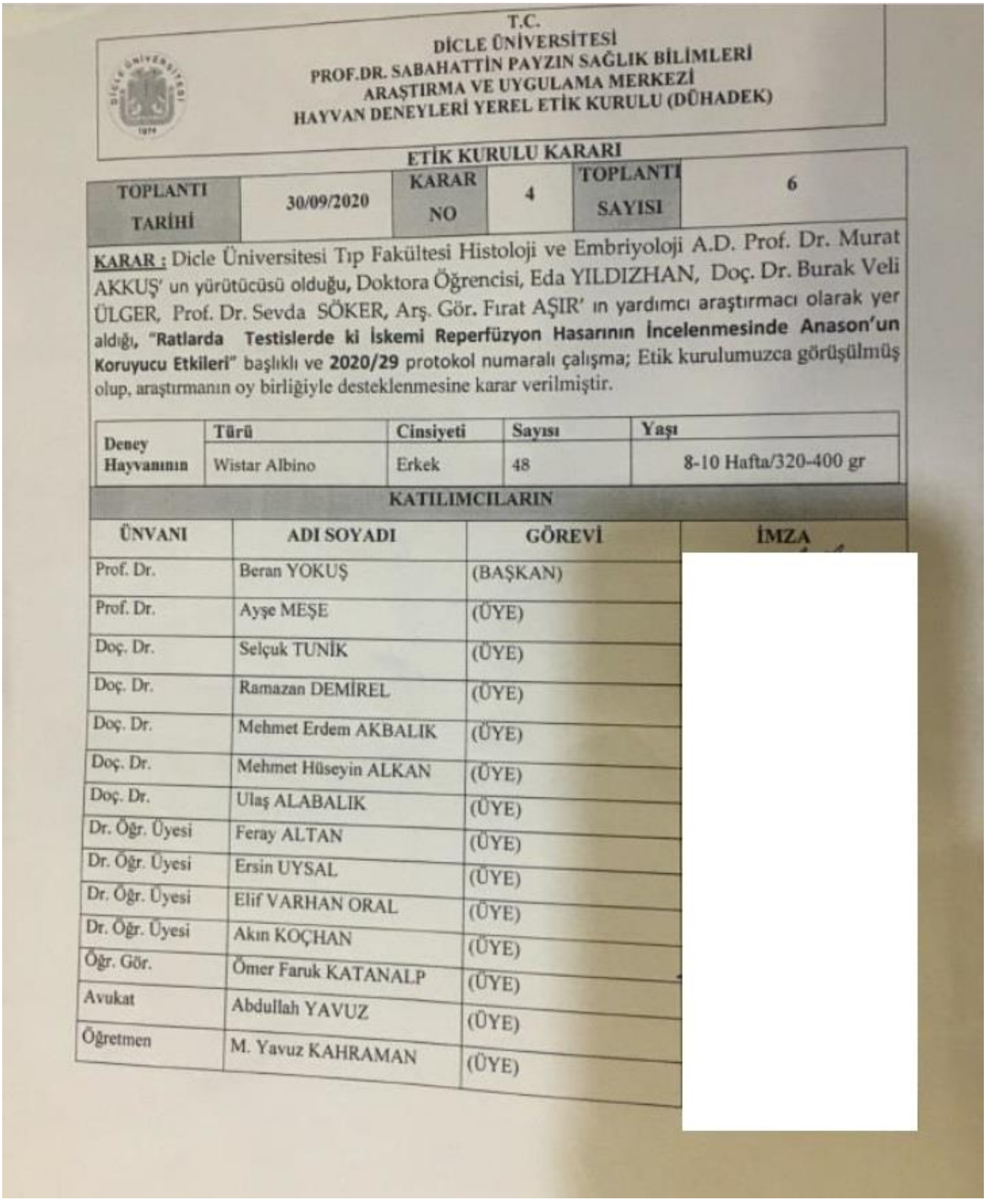
Burak Veli ÜLGER
Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, bvulger@gmail.com

Sevda SÖKER
Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ipeksoker@hotmail.com

ÖZET

İskemi reperfüzyon arteriyal kan akımındaki azalmayı takiben tekrar kanlanmanın ve yeniden oksijelenmenin gerçekleşmesidir. Normal koşullarda Serbest Oksijen Radikaller (ROS) yararlı tepkilere aracılık eder. ROS'un üretimi uzadığında kendine özgü hücresel değişikliklere neden olarak zararlı olayları başlatır. Özellikle I/ R sırasında doku inflammasyonunu uyararak, NLRP3 inflamatuar aktivasyonunu indükler. Anason beyaz yapraklı, sarı-yeşil tohumları olan bir bitki olup, İran Türkiye, Hindistan Mısır ve dünyanın diğer sıcak bölgelerinde yetişir. Yapılan çalışmalarda anasonun analjezik, antimikrobiyal, antifungal, antiviral, antibakteriyel, antikonstipasyon kadınlarda menopoza bağlı sıcak basmaları ve dismenore, diabetik hastalarda hipoglisemi ve hipolipidemi ve kas gevşetici gibi çok sayıda farmakolojik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca antioxidan, hepatoprotektif, hipofiz tiroid ekseni toksisitesi gibi farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Testiküler torsiyon spermatik kordun dönmesinden kaynaklı, başlangıçta testiküler ven akışının daha sonra da arteriyel kan akışının kesintiye uğramasıyla sonuçlanan ve sıklıkla testislerde iskemiye yol açan patolojik bir durumdur. Testiküler torsiyon, geçici iskemiye sebep olabileceği gibi, başarılı bir detorsiyon yapılsa bile kalıcı hasara da sebep olabilir. Bugüne kadar testis torsiyonu sonucu oluşan iskemi reperfüzyon hasarını önlemek veya tedavi etmek amacıyla birçok deneysel çalışmalar yapılmıştır. Biz de iskemi reperfüzyon hasarına bağlı oluşan değişikliklerin önlenmesinde Anason'nun rat testislerindeki koruyuculuğu incelemeyi amaçladık. Bu çalışmada toplam 32 adet erkek rat kullanılıp ratlar dört eşit gruba ayrıldı. Gruplar; kontrol, anason, iskemi reperfüzyon, ve iskemi reperfüzyon sonrası anason grubu olarak ayrıldı. İskemi reperfüzyon grubuna 30' ar dakika iskemi ve sonrasında 30 dakika reperfüzyon uygulandı. Anason grubuna ise 30 gün boyunca Anason'un sulu ekstresinden gavajla 5mL/kg/gün p.o. verildi.

Ek 2- Etik Kurul İzin Belgesi



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
PROF.DR. SABAHATTİN PAYZIN SAĞLIK BİLİMLERİ
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (DÜHADEK)

ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	30/09/2020	KARAR NO	4	TOPLANTI SAYISI	6

KARAR : Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D. Prof. Dr. Murat AKKUŞ' un yürütücüsü olduğu, Doktora Öğrencisi, Eda YILDIZHAN, Doç. Dr. Burak Veli ÜLGER, Prof. Dr. Sevda SÖKER, Arş. Gör. Fırat AŞIR' ın yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, **"Ratlarda Testislerde ki İskemi Reperfüzyon Hasarının İncelenmesinde Anason'un Koruyucu Etkileri"** başlıklı ve **2020/29** protokol numaralı çalışma; Etik kurulumuzca görüşülmüş olup, araştırmanın oy birliğiyle desteklenmesine karar verilmiştir.

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Wistar Albino	Erkek	48	8-10 Hafta/320-400 gr

KATILIMCILARIN

ÜNVANI	ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof. Dr.	Beran YOKUŞ	(BAŞKAN)	
Prof. Dr.	Ayşe MEŞE	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Selçuk TUNİK	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Ramazan DEMİREL	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Mehmet Erdem AKBALIK	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Mehmet Hüseyin ALKAN	(ÜYE)	
Doç. Dr.	Ulaş ALABALIK	(ÜYE)	
Dr. Öğr. Üyesi	Feray ALTAN	(ÜYE)	
Dr. Öğr. Üyesi	Ersin UYSAL	(ÜYE)	
Dr. Öğr. Üyesi	Elif VARHAN ORAL	(ÜYE)	
Dr. Öğr. Üyesi	Akın KOÇHAN	(ÜYE)	
Öğr. Gör.	Ömer Faruk KATANALP	(ÜYE)	
Avukat	Abdullah YAVUZ	(ÜYE)	
Öğretmen	M. Yavuz KAHRAMAN	(ÜYE)	

Ek 3- Orjinallik Raporu

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 16-Nis-2022 12:49 +03
NUMARA: 1811983459
Kelime Sayısı: 11259
Gönderildi: 1

RATLARDA TESTİSLERDEKİ İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ İNCELENMESİNDE ANASON'UN KORUYUCU ETKİLERİ Eda Yildizhan tarafından

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik	
%20	Internet Sources:	%19
	Yayınlar:	%3
	Öğrenci Ödevleri:	%4

9% match (04-Ara-2021 tarihli internet)
http://acikerisim.dicle.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11468/7684/SEVAL%20KAYA%20DOKTORA%20TEZ%c4%b0.docx?isAllowed=y&sequence=1

2% match (16-Mar-2022 tarihli internet)
https://openaccess.firat.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11508/12730/385310.pdf?sequence=1

1% match (29-Kas-2017 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam University on 2017-11-29

1% match (03-Oca-2021 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Fırat Üniversitesi on 2021-01-03

1% match (28-Nis-2019 tarihli internet)
http://veteriner.fusabil.org/pdf/pdf_FUSABIL_1204.pdf

1% match (23-Nis-2021 tarihli internet)
http://acikerisim.dicle.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11468/5083/562792.pdf?isAllowed=y&sequence=1

1% match (18-Mar-2022 tarihli internet)
https://www.gecekitapligi.com/Webkontrol/uploads/Fck/sglk2_2.pdf

< 1% match (17-Oca-2022 tarihli internet)
https://openaccess.firat.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11508/13478/427250.pdf?isAllowed=y&sequence=1

< 1% match (17-Oca-2022 tarihli internet)
https://openaccess.firat.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11508/13378/366039.pdf?isAllowed=y&sequence=1

< 1% match (17-Oca-2022 tarihli internet)
https://openaccess.firat.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11508/13302/344088.pdf?isAllowed=y&sequence=1