

NKUBAP.00.20.AR.14.11 nolu proje

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
TESTİKÜLER İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINA KARŞI URTİCA DİOİCA'NIN
KORUYUCU ETKİSİNİN APOPTOTİK VE
PROLİFERATİF
OLARAK İNCELENMESİ**

Yürütücü:

Yrd. Doç. Dr. Birol TOPÇU

Araştırmacılar:

Doç. Dr. Cevat AKTAŞ

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ERBOĞA

Arş. Gör. Zeynep FİDANOL ERBOĞA

Arş. Gör. Dr. Yeliz BOZDEMİR DÖNMEZ

2015

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ BİRİMİ**

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN TESTİKÜLER İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINA KARŞI URTİCA DİOİCA'NIN KORUYUCU ETKİSİNİN APOPTOTİK VE
PROLİFERATİF OLARAK İNCELENMESİ**

ARAŞTIRMA PROJESİ

Yürütücü:

Yrd. Doç. Dr. Birol TOPÇU

Araştırmacılar:

Doç. Dr. Cevat AKTAŞ
Yrd. Doç. Dr. Mustafa ERBOĞA
Arş. Gör. Zeynep FİDANOL ERBOĞA
Arş. Gör. Dr. Yeliz BOZDEMİR DÖNMEZ

Proje No: NKUBAP.00.20.AR.14.11

2015 – TEKİRDAĞ

ÖNSÖZ

Çalışmamız, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan testiküler iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarına karşı *Urtica dioica*'nın (UD) koruyucu etkisinin apoptotik ve proliferatif olarak araştırılması amacıyla yapıldı. Çalışmamız Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklendi (Proje No: NKUBAP.00.20.AR.14.11). Projemizin amacı doğrultusunda gerekli malzemeler proje bütçesinden alınarak çalışmamız tamamlandı.

Çalışmamızda 24 adet erkek Sprague Dawley cins rat 3 gruba ayrıldı: Kontrol grubu, İ/R grubu ve İ/R+UD (2 ml/kg) grubu. Dört saat torsiyon ve 4 saatlik detorsiyon süresi sonunda sıçanlar ketamin-xylozin anestezisi altında sakrifiye edildi ve testis dokusu çıkartılarak histopatolojik incelemelerde kullanıldı. Işık mikroskopik incelemeler için alınan testis dokusu Bouin solüsyonu içinde fikse edilerek parafin inklüzyonu yapıldıktan sonra, elde edilen bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak histolojik yapı değişikliklerinin incelenmesi için hematoksilin-eozin (H&E) ile boyandı. Ayrıca yine parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitlere immünohistokimyasal yöntemle hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi için proliferatif hücre çekirdek antijeni (PCNA) ve apoptozisin belirlenmesi için TUNEL yöntemi uygulandı.

Çalışmamızda İ/R sonucunda, STÇ ve JTBS'nun düştüğü görüldü. UD tedavisinin ise İ/R sonrası düşen STÇ ve JTBS'nu yükselttiği görüldü. İ/R sonrasında testislerin interstisyel yapısında bozulma, seminifer tübül yapılarında düzensizlik ve germ hücre dökülmesi gözlemlendi. Testisteki bu yapısal bozulmaların UD tedavisi sonrasında hafiflediği görüldü. Ayrıca İ/R sonucunda seminifer tübüllerin duvarında çok sayıda TUNEL pozitif apoptotik hücre izlendi. UD tedavisinin ise TUNEL pozitif hücre sayısını düşürdüğü görüldü. İ/R sonucu oluşan testis hasarında PCNA pozitif hücre sayısı azalırken UD verilen grupta PCNA pozitif hücre sayısının UD verilmeyen gruba kıyasla arttığı tespit edildi.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Özet.....	1
Abstract.....	2
1.Giriş.....	3
2.Materyal Metod.....	4
3.Bulgular.....	8
4.Tartışma.....	16
5.Kaynaklar.....	21

RESİMLER

	Sayfa
Resim 3.1. Grupların seminifer tübül çapları.....	9
Resim3.2. Johnsen testiküler biyopsi skoru	9
Resim 3.3. Kontrol grubuna ait ışık mikroskopik görüntüsü.....	10
Resim 3.4. İ/R grubuna ait ışık mikroskopik görüntüsü.....	11
Resim 3.5. İ/R+ UD grubuna ait ışık mikroskopik görüntüsü.....	11
Resim 3.6. Kontrol grubuna ait PCNA boyama görüntüsü.....	12
Resim 3.7. İ/R grubuna ait PCNA boyama görüntüsü.....	12
Resim 3.8. İ/R+UD grubuna ait PCNA boyama görüntüsü.....	13
Resim 3.9. Kontrol, İ/R ve İ/R+UD gruplarına ait PCNA indeks değerleri.....	13
Resim 3.10. Kontrol grubuna ait TUNEL boyama görüntüsü.....	14
Resim 3.11. İ/R grubuna ait TUNEL boyama görüntüsü.....	15
Resim 3.12. İ/R+ UD grubuna ait TUNEL boyama görüntüsü.....	15
Resim 3.13. Kontrol, İ/R ve İ/R+UD gruplarına ait apoptotik indeks değerleri.....	16

TABLÖLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. Histolojik takip basamakları.....	5
Tablo 2.2. Hematoksilen - Eozin boyama protokolü.....	5-6
Tablo 2.3. Johnsen testiküler biyopsi skoru	6

ÖZET

Amaç: Testis torsiyonu çocukluk çağın akut skrotum tablosuna yol ačan önemli sebeplerden biridir. Zamanında ve uygun tedavi edilmediği takdirde organ kaybıyla sonlanan ağır bir acil cerrahi problemdir. Testis torsiyonunun tedavisinde amaç İ/R'nin bozucu etkilerini azaltmak veya yok etmektir. Burada hücre membran bütünlüğünü koruyan etkili ajanlardan birisi antioksidanlardır. Bu çalışmada sıçanlarda deneysel testiküler İ/R modelinde antioksidan özellikleri olan *Urtica dioica*'nın (UD) antiapoptotik ve proliferatif olarak etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 24 adet erkek Sprague Dawley cinsi rat 3 gruba ayrılmıştır: Kontrol grubu, İ/R grubu ve İ/R+UD (2 mg/kg) grubu. Dört saat torsiyon ve 4 saatlik detorsiyon süresi sonunda sıçanlar anestezisi altında sakrifiye edildiler ve testis dokuları çıkartılarak histopatolojik değerlendirmeler yapıldı. Histopatolojik olarak STÇ ölçümü, Johnsen skorlaması, Hematoksilen-Eozin boyaması, proliferatif hücre çekirdek antijeni (PCNA) immünboyaması ve bir apoptozis belirteçi olan TUNEL boyaması yapıldı. Ayrıca tüm verilerin istatistiksel analizi ve gruplar arası karşılaştırmaları da yapıldı.

Bulgular: *Urtica dioica* tedavisinin, İ/R sonrası düşen STÇ ve JTBS'nu yükselttiği görüldü. İ/R sonrasında testislerin interstisyel yapısında bozulma, seminifer tübül yapılarında düzensizlik ve germ hücre dökülmesi gözlemlendi. Testisteki bu yapısal bozulmaların UD tedavisi sonrasında hafiflediği görüldü. Ayrıca UD tedavisinin İ/R sonucu azalan PCNA aktivitesini yükselttiği, artan TUNEL pozitif hücre sayısını ise düşürdüğü görüldü.

Sonuç: Antiapoptotik ve koruyucu etkileri olan UD'nın, İ/R hasarının sıçan testislerinde neden olduğu histopatolojik değişiklikleri ve apoptozisi önlediği görüldü.

Anahtar Kelimeler: İ/R, *urtica dioica*, testis, apoptozis, sıçan.

ABSTRACT

Protective Effects of *Urtica dioica* on Experimental Testicular Ischemia Reperfusion Injury in Rats

Objective: Testicular torsion is one of the most important reasons that cause to acute scrotum table in childhood and it is an urgent surgical problem that result in losing the organ as long as not treating timely and appropriately. The aim is to reduce or eliminate the disruptive effects of ischemia reperfusion (I/R) in the treatment of the testicular torsion. Antioxidants are the one of the effective agents that protect the integrity of the cell membrane. In this study, it is aimed to examine the effects of urtica dioica (UD) that have antioxidant feature in the experimental testicular I/R model in rats in terms of antiapoptatic and proliferative.

Material and Method: In our study, 24 male rats have been divided into three groups: control group, I/R group and I/R+ UD (2 mg/ kg) group. At the end of the four hourly torsion and detorsion process, the rats have been sacrificed under anaesthesia and histopathological evaluations have been made by removing the testicular tissues. Seminiferous tubule caliber measurement, Johnson score, Haematoxylin-Eosin staining, proliferative cell nucleus antigen (PCNA) immunohistochemical staining and TUNEL as histopathological have been conducted

Results: It has been observed that the treatment of UD has increased the Johnson score and seminife tubule caliber that decrease after I/R, and deterioration in the interstitial structure of testicular, irregularities in the seminife tubule structure, and germ cell loss have been seen after I/R. This structural deterioration in the testicular has reduced after the treatment of UD. It has also observed that the treatment of the UD has increased the activity of PCNA that decreases as a result of I/R and this treatment has also reduced the number of the TUNEL positive cells that increase.

Conclusion: It has observed that the protective effects of UD and histopathological changes in the testicular of the rat have been prevented the apoptosis and histological damage.

Keywords: I/R, urtica dioica, testis, apoptosis, rat.

1. GİRİŞ

Testis torsiyonu yüz elli yılı aşkın bir süredir, ürolojinin organ kaybı ve infertilite ile sonuçlanabilen acil bir hastalığı olarak bilinir. Bu hastalık ilk defa 1840 yılında Delasiauve tarafından tanımlanmıştır (Delasiauve, 1840; Saba ve ark., 1997). Testisin, damarsal pedinkülü etrafında dönüş yapması sonucu dolaşımının bozulmasıyla karakterizedir (Murphy, 2003) .

Çocukluk çağında akut skrotumun en sık nedeni olmamasına rağmen, en önemlisidir. Pediyatrik akut skrotal hastalıkların %25-35'ini oluşturur. 25 yaş altı erkeklerde görülme sıklığı yaklaşık 4000'de birdir; neonatal dönemde ve 13 yaş civarında pik yapmaktadır. Nekroz insidansı yüksek olduğundan cerrahi bir acildir. Tanı geciktiği zaman testiste fonksiyon kaybına ve infertiliteye yol açabilir (Turner ve Brown, 1993; Casa ve ark., 1980; Williamson, 1985) .

Testiküler torsiyon-detorsiyon nedeniyle oluşan iskemi ve reperfüzyon (İ/R) testiküler hasara neden olmaktadır. Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir (Robinowitz ve Hulbert, 1995). Reperfüzyon ise iskemik dokuya yeniden kan akımıyla birlikte oksijenin sağlanması olayıdır. Reperfüzyon, iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar. Reperfüzyon hasarından serbest oksijen radikal (SOR) türevleri başta olmak üzere, polimorf nüveli lökositler, kompleman sistemi ve endotel hücreleri sorumlu tutulmaktadır (Vedder ve ark., 1989). Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar, zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir (Anderson ve Williams, 1990).

Urtica dioica, Urticaceae bitki ailesine ait bir bitkidir. Türkiye'nin bazı bölgelerindeki birçok halk hekimliğinde, UD tohumları yaygın olarak ileri kanser tedavisinde ve çeşitli hastalıklarda alternatif tedavi olarak kullanılmaktadır. İlâveten literatürlerde antimikrobial, antiinflamatuvar, analjezik ve antioksidant özellikleri ile ilgili çalışmalar vardır (Özkoç ve ark., 2011; Genc ve ark., 2011; Yener ve ark., 2009; Sayhan ve ark., 2012; Kanter ve ark., 2005; Meral ve ark. 2003). Bunlar içinde

UD'nin testis üzerine koruyucu etkilerini araştıran çalışmalar da vardır (Ghafari ve ark., 2011; Golalipour ve ark., 2011). Ancak UD'nin testis İ/R hasarına etkilerini araştıran bir çalışmaya literatürde rastlayamadık.

Testis torsiyonunun tedavisinde amaç İ/R'nun sebep olduğu hasarı azaltmaktır. Çalışmamızda, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan testis torsiyon/detorsiyon modelinde, meydana gelen testiküler hasara karşı UD'nin apoptotik ve proliferatif etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL METOD

Araştırmamız Çanakkale Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylanmıştır ve çalışma süresince etik kurallara uygun olarak çalışılmıştır (Sayı: B.30.2.AÜ.0.05.06-050.04-16 Tarih: 14.02.2014).

2.1. Deneysel Hayvanlarının Bakımı

Çalışmamızda Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında üretilmiş ve standart laboratuvar koşullarında (22±1 0C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulan 24 adet Sprague Dawley türü sıçanın ağırlıkları birbirine yakın olanları (250±10 g) aynı grupta olacak şekilde üç grup oluşturuldu. Deneklerin gruplandırılması aşağıdaki şekilde yapıldı;

Grup 1 (Kontrol, n=8): Bu gruptaki deneklerde torsiyon ve detorsiyon işlemi uygulanmamıştır.

Grup 2 (İ/R, n=8): Bu gruptaki deneklerin anestezi altında sol testisleri kord elemanlarıyla birlikte saat yönünde olacak şekilde 720° döndürölerek deneysel ekstravaginal testis torsiyonu modeli oluşturulmuştur. Torsiyone testis 6/0 propilen dikişlerle skrotum iç yüzüne tespit edilmiştir. Dört saatlik torsiyon süresi sonunda detorsiyon gerçekleştirilmiştir. Testis yeniden skrotum içine yerleştirildi ve dört saatlik reperfüzyon sonucunda deneklere bilateral orşiektomi yapılmıştır.

Grup 3 (İ/R+UD, n=8): Bu gruptaki sıçanlara İ/R işlemi uygulanıp buna ilaveten detorsiyondan 30 dakika önce tek doz 2 ml/kg UD yağı, intraperitoneal yoldan verilmiştir.

Dört saat torsiyon ve 4 saatlik detorsiyon süresi sonunda sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildiler ve testis dokuları çıkartılarak histopatolojik değerlendirmeler yapıldı. Histopatolojik olarak ST ölçümü, JTBS skorlaması, Hematoksilen-Eozin

boyaması, proliferatif hücre çekirdek antijeni (PCNA) immünboyaması ve apoptotik hücreleri gösteren bir yöntem olan TUNEL boyaması yapıldı.

2.2. Histolojik Uygulamalar

Işık mikroskopik incelemeler için alınan testis dokusu örnekleri Bouin fiksatifinde tespit edilerek trimleme işlemi yapıldı. Elde edilen doku trimleri 2 gün % 70'lik alkolde yıkandıktan sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek parafine gömüldü (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Histolojik takip basamakları

Sıra No	Kullanılan Madde	Süre
1	% 70 Alkol	1 saat
2	% 90 Alkol I	1 saat
3	% 90 Alkol II	1 saat
4	% 96 Alkol I	1 saat
5	% 96 Alkol II	1 saat
6	% 100 Alkol I	45 dk
7	% 100 Alkol II	45 dk
8	% 100 Alkol III	45 dk
9	Ksilol I	1 saat
10	Ksilol II	1 saat
11	Ksilol III	1 saat
12	Yumuşak Parafin	1 saat
13	Y. Parafin + Sert Parafin	1 saat
14	Sert Parafin	3 saat

Histopatolojik inceleme için mikrotomda 5 µm kalınlığında kesitler alınarak, hematoksilin-eozin (H&E) ile boyandı (Tablo 2.2). Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japan) incelenerek 40X büyütmede fotoğrafları çekildi. Testisteki histolojik yapı değişiklikleri incelendi.

Tablo 2.2. Hematoksilin - Eozin boyama protokolü

Kullanılan Madde	Süre
Ksilen (I)	10 dk
Ksilen (II)	10 dk
Ksilen (III)	10 dk
% 100 (Absolü) Alkol	2 dk
% 96 Alkol	2 dk
% 80 Alkol	2 dk
% 70 Alkol	2 dk
Çeşme Suyu	2 dk
Hematoksilen	5 dk
Çeşme Suyu	4 dk

Eozin	30 s
% 80 Alkol	2 kez daldır çıkar
% 96 Alkol	2 kez daldır çıkar
% 100 (Absolü) Alkol	5 dk
Ksilen (I)	10 dk
Ksilen (II)	10 dk
Ksilen (III)	10 dk
Entellan ile kapat	

2.3. Seminifer Tübül Çapları

Seminifer tübüllerdeki etkilenmeyi saptamak için araştırma mikroskopunda ve mikroskoba uyarlanan oküler mikrometre yardımıyla bütün gruplara ait 100'er seminifer tübülün çapları (STÇ) ölçüldü. Her tübülün çapı dörder defa ölçülüp, ortalaması alındı.

2.4. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

Johnsen testiküler biyopsi skoru Tablo 2.3'teki ölçütlere göre derecelendirildi (Johnsen 1970). Her grup için ayrı ayrı 100 adet seminifer tübül değerlendirilerek ortalama Johnsen testiküler biyopsi skoru (JTBS) hesaplandı.

Tablo 2.3. Johnsen testiküler biyopsi skoru (JTBS).

Skor	Histolojik Bulgular
1	Tübüllerde hiçbir hücre yoktur
2	Sadece Sertoli hücreleri vardır
3	Sadece spermatogonyumlar vardır
4	Az sayıda (5/ tübül) spermatozoid vardır
5	Fazla sayıda spermatozoid mevcuttur
6	Az sayıda (5/ tübül) spermatid mevcuttur
7	Farklanma işareti olmaksızın fazla sayıda spermatid vardır
8	Olgun spermatozoa olmaksızın geç spermatidler mevcuttur
9	Az sayıda (5/ tübül) spermatozoa vardır
10	Fazla sayıda spermatozoanın görüldüğü tam spermatogenez mevcuttur

2.5. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling) Yöntemi

Apoptozisin belirlenmesi amacı ile TUNEL tekniğinden yararlanıldı. Apoptotik germ hücrelerinin belirlenmesi için apoptozis kiti (TUNEL Universal Apoptosis Detection Kit-Biotin-labeled POD, Cat. No. L00290, GenScript USA Inc., Piscataway, USA) kullanıldı.

TUNEL tekniğinde apoptotik hücreler şu şekilde belirlenir; apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılığı ile biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine, işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Metil yeşili ile ters boyama yapılarak işlem sonlandırılır. Böylelikle dokulardaki apoptotik hücreler mikroskopik olarak görüntülenebilir.

Bu işlemlerden geçirilerek boyanan testis dokusu kesitleri araştırma mikroskobu (Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japan) ile değerlendirildi. Gruplardaki apoptotik germ hücreleri ve normal yapıdaki germ hücreleri sayıldı, apoptotik hücrelerin gruplara göre yüzdesi apoptotik indeks olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

2.6. İmmünohistokimyasal inceleme (PCNA)

Yapılan immünohistokimyasal incelemeler Hsu ve ark. (1981) tarafından açıklanan metoda göre yapıldı. İmmünohistokimyasal inceleme için testis dokusundan 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işlemini takiben kesitler suya indirildi. Suya indirilen kesitler antijen retrieval içinde mikrodalga fırında 20 dk kaynatıldı. Oda ısısında 20 dk soğumaya bırakıldıktan sonra kesitler Fosfat Buffer Solusyonu (PBS; pH 7.6) (PBS) ile yıkandı. Bu aşamadan sonra hidrojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için metanolde (Riedel-de Hæn 24229) hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 20 dk muamele edildi. Distile su içinde çalkalanarak kesitler PBS ile yıkandı. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere %1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) uygulandı. Daha sonra kesitler nemli chamber içinde 1/100 oranında sulandırılmış primer antikor (Mouse monoclonal anti-PCNA antibody, ab2426-1, abcam, USA) ile 1 saat süre ile inkübe edildi. Kesitler 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 20 dk sekonder antikor solüsyonunda (Biotinylated Goat Anti-Mouse, LabVision, TM-015-BN) tutuldu. 3 kez PBS'de yıkanan kesitlere 20 dk streptavidin peroksidaz solüsyonu (Streptavidin Peroxidase, LabVision, TS-015-HR) uygulandı. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk 3-amino 9 etil karbazol kromojen solüsyonu (LabVision, TA-002-HAC) uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 5 dk Mayer hematoksilen uygulanarak zıt boyama yapıldı. Akar

suda 5 dk yıkanan kesitler kapatma solüsyonu (Mounting Medium, LabVision, TA-060-UG) konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda değerlendirmeye alındı.

Gruplardaki PCNA-pozitif germ hücreleri sayılarak, PCNA-pozitif hücrelerin gruplara göre yüzdesi istatistiksel olarak değerlendirildi.

2.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde "PASW® Statistics 18 for Windows" (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatistik paket programı kullanıldı. Grupların dağılımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Veriler normal dağılım göstermediği için non-parametrik testler kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis testi ile, alt grup karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Elde edilen "p" değerinin <0,05 olması istatistiksel olarak anlamlılık ifadesi olarak kabul edildi.

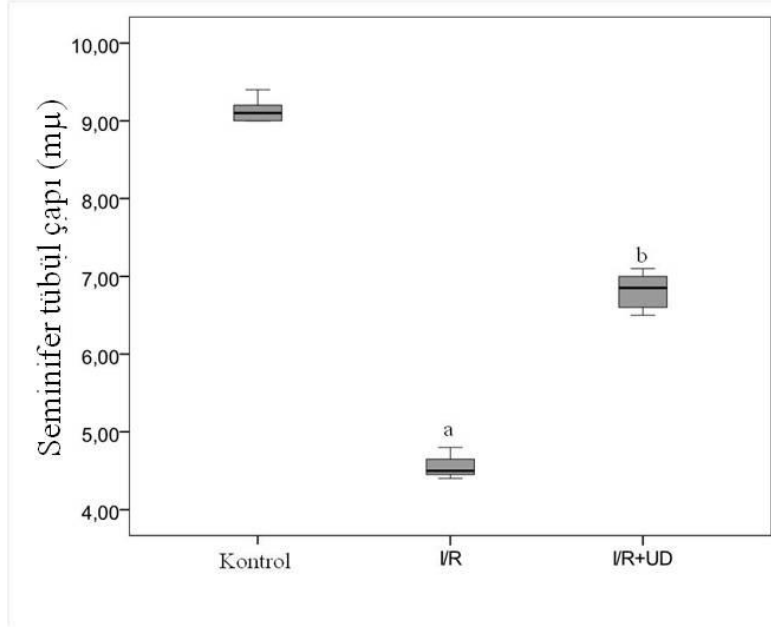
3. BULGULAR

3.1. Seminifer Tübül Çapları ve Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

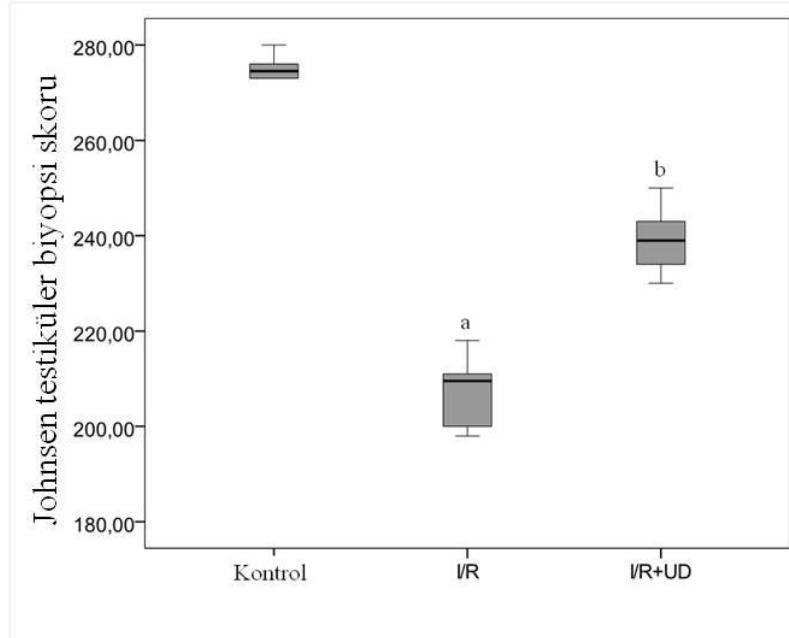
Kontrol, İ/R ve İ/R+UD gruplarına ait deneklerin STÇ ve JTBS değerleri Resim 3.1 ve Resim 3.2'de gösterilmiştir.

Seminifer tübül çapı her testis için ayrı ayrı değerlendirilip grupların aritmetik ortalamaları hesaplandı. STÇ'leri açısından gruplar incelendiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı. İ/R grubu STÇ'leri kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu ($p<0,01$). İ/R+UD grubu STÇ'leri İ/R grubunun değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğu tespit edildi ($p<0,01$) (Resim 3.1).

Johnsen testiküler biyopsi skorları her testis için ayrı ayrı değerlendirilip grupların aritmetik ortalamaları hesaplandı. JTBS'leri açısından gruplar incelendiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı. İ/R grubu JTBS'leri kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu ($p<0,01$). İ/R+UD grubu JTBS'leri İ/R grubunun değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğu tespit edildi ($p<0,01$) (Resim 3.2).



Resim 3.1. Kontrol, I/R ve I/R+UD gruplarına ait seminifer tübül çap değerleri. a: $p < 0.01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, b: $p < 0.01$ kontrol grubu ve I/R grubu ile karşılaştırıldığında.

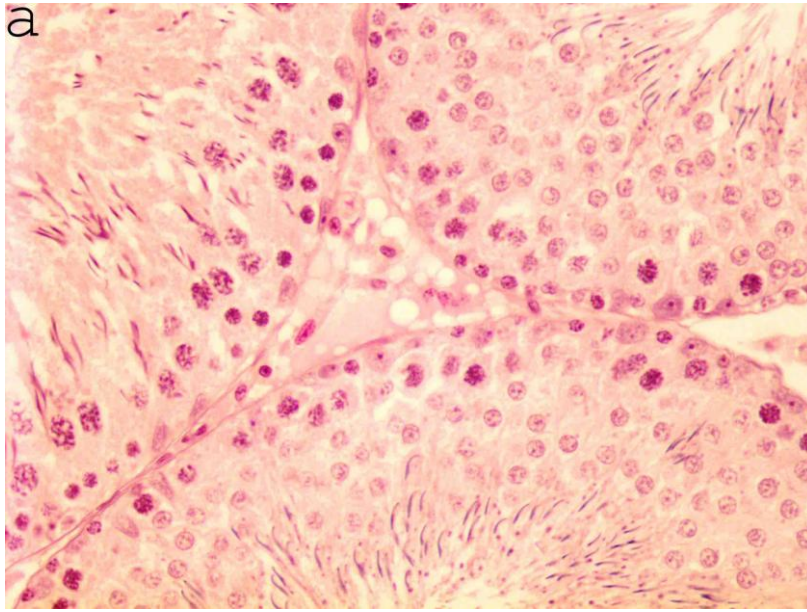


Resim 3.2. Kontrol, I/R ve I/R+ UD gruplarına ait Johnsen testiküler biyopsi skorları. a: $p < 0.01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, b: $p < 0.01$ kontrol grubu ve I/R grubu ile karşılaştırıldığında.

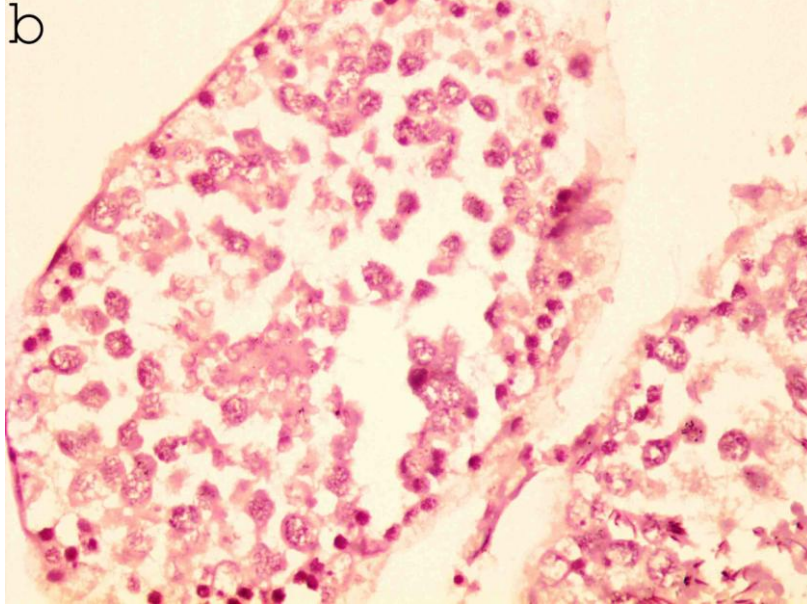
3.2. Işık Mikroskopik Bulgular

Histopatolojik değerlendirme için kesitler H&E ile boyanarak hazırlandı, ortaya çıkan bulgular resimlendirildi ve Resim 3.3, Resim 3.4 ve Resim 3.5,'de gösterildi.

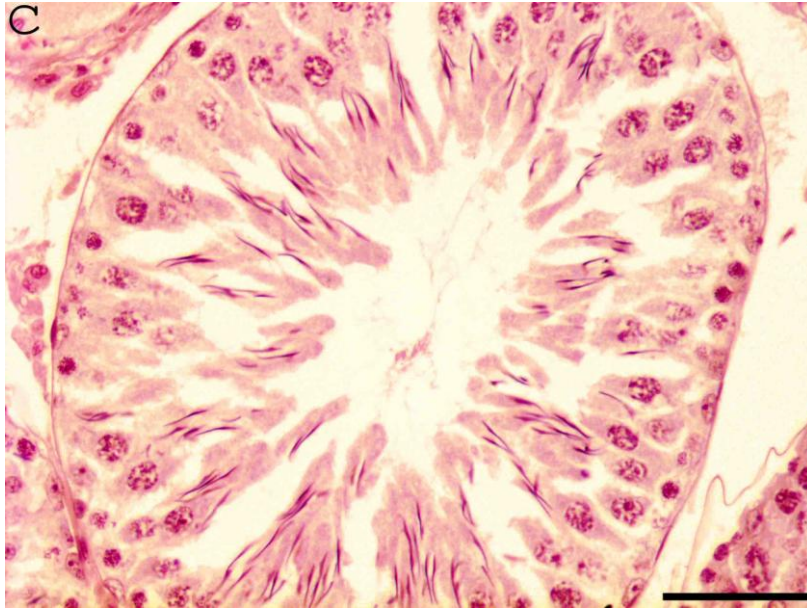
İ/R uygulaması sonucunda, testislerin seminifer tübül ve interstisyum yapılarında hasarlanma görülmüştür. Ayrıca seminifer tübüllerdeki spermatogenik seriye ait hücre sayısında azalma gözlemlendi. Yine İ/R grubu testislerinde seminifer tübülü oluşturan hücrelerin bir kısmının lümene döküldüğü tespit edildi. Testisteki tüm bu yapısal bozulmaların UD tedavisi sonrasında hafiflediği görüldü.



Resim 3.3. Kontrol grubuna ait ışık mikroskopik görüntü. H&E, X400.



Resim 3.4. İ/R grubuna ait ışık mikroskopik görüntü. H&E, X400.

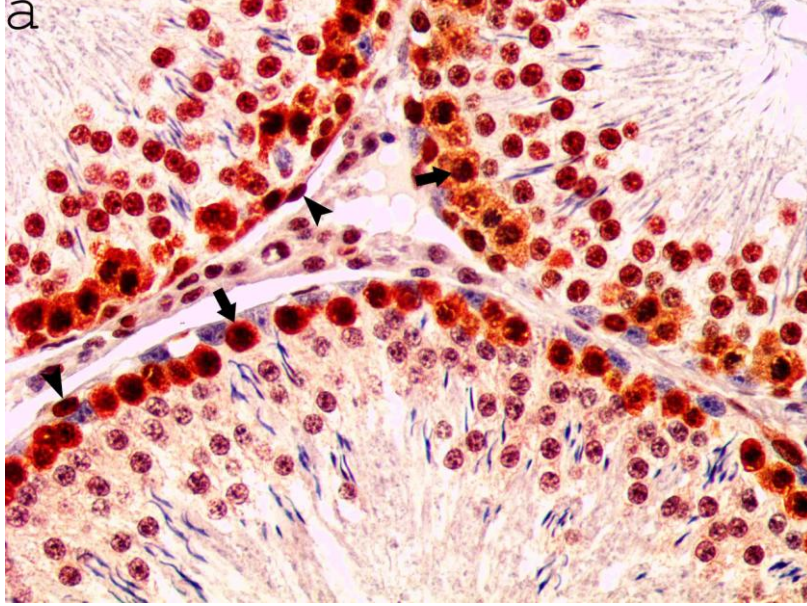


Resim 3.5. İ/R+urtica dioica grubuna ait ışık mikroskopik görüntü. H&E, X400.

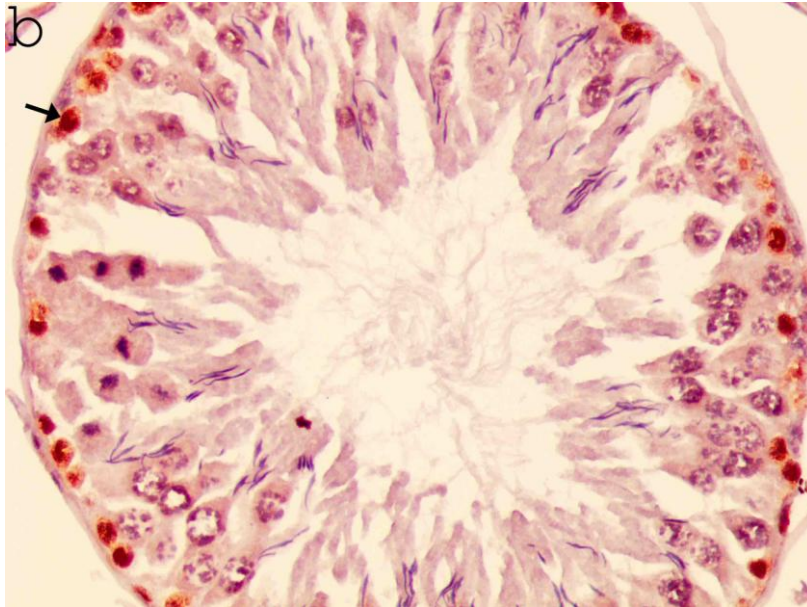
3.3. İmmunohistokimya (PCNA) Bulguları

Çalışmamızda kontrol, İ/R ve İ/R+UD gruplarının testis dokularında hücre proliferasyonunu değerlendirmek için immunohistokimyasal PCNA metodu kullanıldı (Resim 3.6, Resim 3.7 ve Resim 3.8). İ/R sonucunda PCNA pozitif hücre sayısında azalma izlendi. UD tedavisinin ise PCNA pozitif hücre sayısını arttırdığı görüldü.

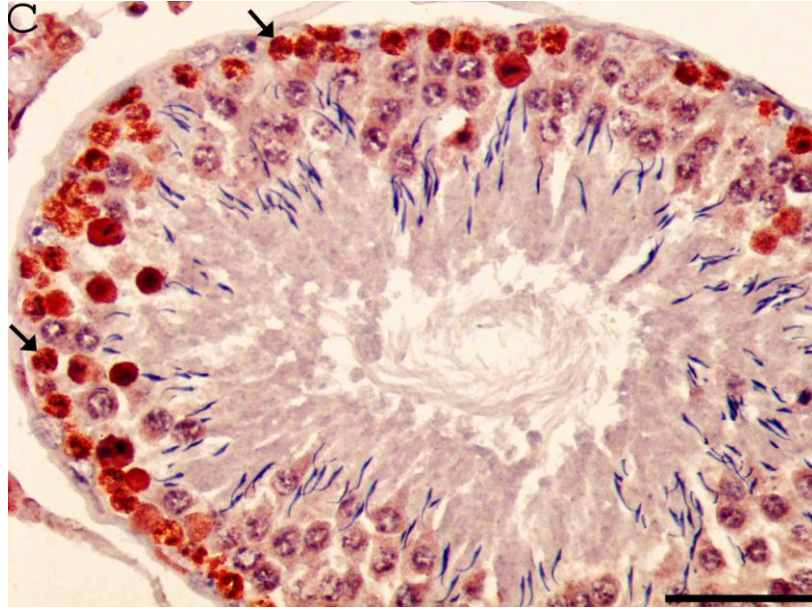
PCNA pozitif hücreler sayılarak gruplara ait PCNA indeks değerleri hesaplandı. Çalışmamızın sonucunda İ/R grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PCNA indeks değerinin azaldığı, İ/R+UD grubunda ise PCNA indeks değerinin İ/R grubu değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi (Resim 3.9).



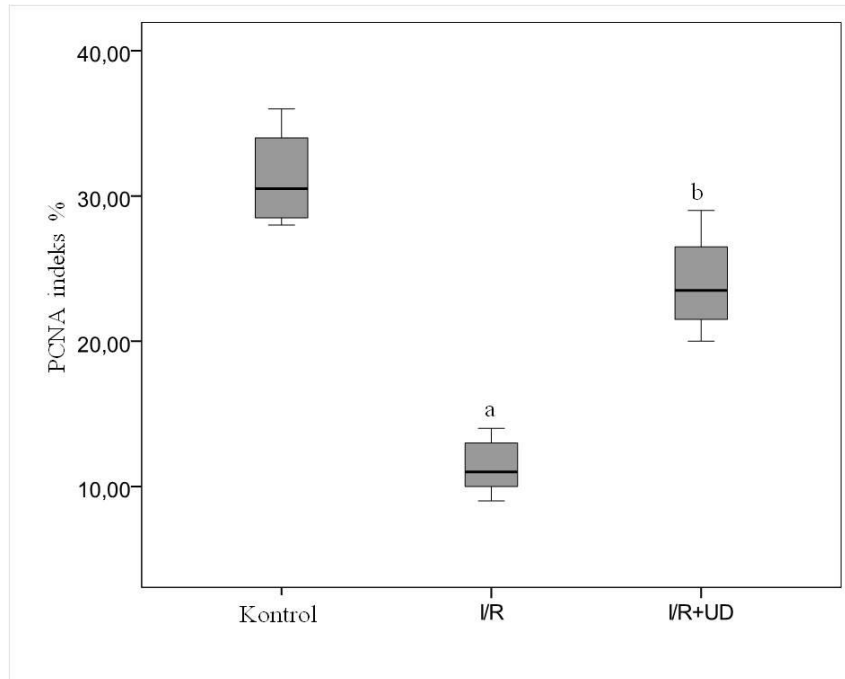
Resim 3.6. Kontrol grubuna ait PCNA boyama görüntüsü. (Ok: PCNA pozitif germ hücreler). X400.



Resim 3.7. İ/R grubuna ait PCNA boyama görüntüsü. (Ok: PCNA pozitif germ hücreler). X400.



Resim 3.8. İ/R+UD grubuna ait PCNA boyama görüntüsü. (Ok: PCNA pozitif germ hücreler). X400.

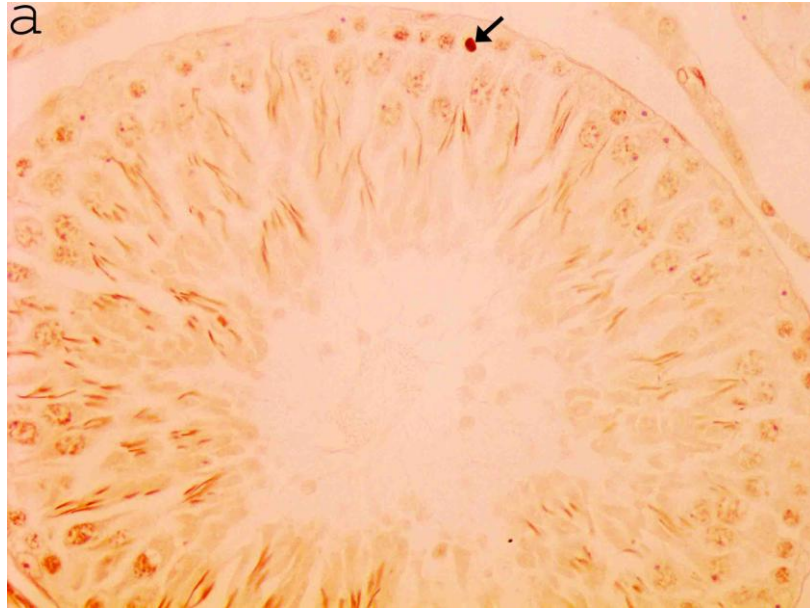


Resim 3.9. Kontrol, İ/R ve İ/R+ UD gruplarına ait PCNA indeks değerleri. a: $p < 0.01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, b: $p < 0.01$ kontrol grubu ve İ/R grubu ile karşılaştırıldığında.

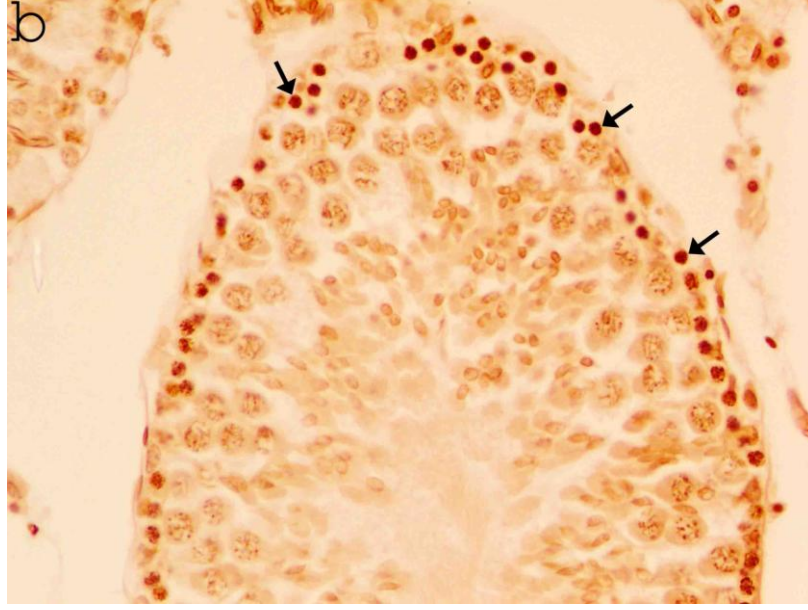
3.4. TUNEL Bulguları

Çalışmamızda kontrol, İ/R ve İ/R+UD gruplarının testis dokularında apoptozisi belirlemek için TUNEL metodu kullanıldı (Resim 3.10, Resim 3.11 ve Resim 3.12). İ/R uygulaması sonucunda seminifer tübüllerin duvarında çok sayıda TUNEL pozitif apoptotik hücre izlendi. UD tedavisinin ise TUNEL pozitif hücre sayısını düşürdüğü görüldü.

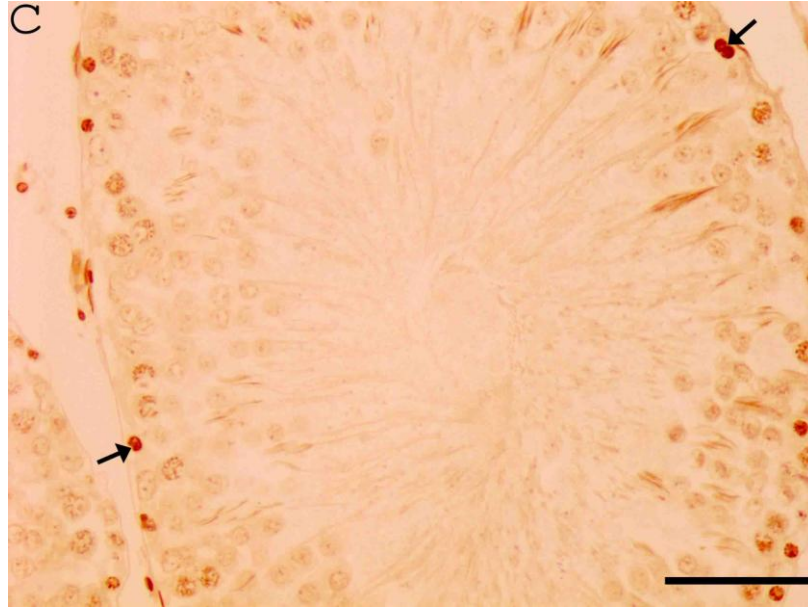
TUNEL pozitif işaretlenen hücreler sayılarak gruplara ait apoptotik indeks değerleri hesaplandı. Çalışmamızın sonucunda İ/R grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptotik indeks değerinin arttığı, İ/R+UD grubunda ise apoptotik indeks değerinin İ/R grubu değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı (Resim 3.13).



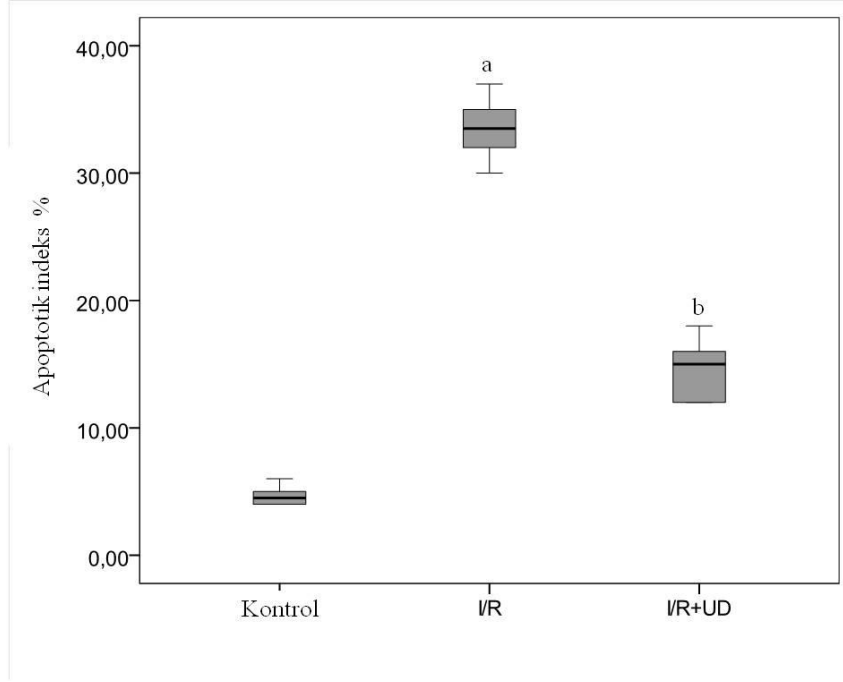
Resim 3.10. Kontrol grubuna ait TUNEL boyama görüntüsü. (Ok: TUNEL pozitif işaretlenen apoptotik hücreler). X400.



Resim 3.11. İ/R grubuna ait TUNEL boyama görüntüsü. (Ok: TUNEL pozitif işaretlenen apoptotik hücreler). X400.



Resim 3.12. İ/R+ UD grubuna ait TUNEL boyama görüntüsü. (Ok: TUNEL pozitif işaretlenen apoptotik hücreler). X400.



Resim 3.13. Kontrol, I/R ve I/R+UD'nin gruplarına ait apoptotik indeks değerleri. a: $p<0.01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, b: $p<0.01$ kontrol grubu ve I/R grubu ile karşılaştırıldığında.

4. TARTIŞMA

Testis torsiyonu, çocukluk çağında akut skrotuma yol açan spermatik kord ve yapılarının kendi eksenini etrafında dönmesi sonucunda kan akımının engellenmesi ile oluşan acil cerrahi girişim gerektiren önemli bir ürolojik sorundur. Testis torsiyonu geç çocukluk ya da erken adolesan döneminde daha fazla görülmekle beraber, bu oranın 25 yaş altındaki erkekler için 1:4000 olduğu bildirilmektedir (Güneş ve ark, 2015; Karagüzel ve ark, 2012; Tsounapi ve ark, 2012). Testis torsiyonu sonucunda, testiste hasar oluşumunu engellemek için acil olarak detorsiyon işlemi yapılmalıdır. Fakat cerrahi işlem gerçekleştirilse bile testiste atrofi gelişerek infertiliteye neden olabilir (Karagüzel ve ark, 2012; Turner ve ark, 2004). Fertilizasyon için sağlıklı tek testis bile yeterli olmasına rağmen tek taraflı testis torsiyonu olgularında, %25 oranında infertilite ve %90'a varan anormal sperm analiz sonuçları, tek taraflı testis torsiyonunun diğer testiste de histolojik ve hemodinamik değişikliklere neden olduğu görüşünü desteklemiştir (Sadler, 1996; Tanyel, 2000).

Testis torsiyonu iskemik hasar, detorsiyon ise reperfüzyon hasarı oluşturarak dokuda yapısal bir takım değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur (Şener ve ark, 2014).

Testis, iskemi sonucunda hücresel fonksiyon bozukluğuna yol açan ve hücre ölümü ile bitebilen bir dizi kimyasal reaksiyon başlatır (Mogilner ve ark, 2006; Prilmann ve Turner, 1997). Doku hasarını arttıran en önemli faktör SOR olup üretimi iki evrede gerçekleşir. İlk evre hemen reperfüzyonu takiben başlayarak, hücrede geri dönülebilir hasara neden olmaktadır ve antioksidan defans sistemi aktivasyonu sayesinde hasar geçicidir. Sadece birkaç saat sürer ve tipik bir oksidatif stres görüntüsündedir. SOR üretiminin ikinci evresi ise, geri dönüşümsüz hücre hasarı ve enflamasyonla karakterizedir. 4-6 saat süren deneysel testis İ/R modellerinde kalıcı doku hasarının olduğu hususunda fikir birliği vardır (Becker, 1995; Turner, 1997).

Bizim çalışmamızda da 4'er saatlik torsiyon/detorsiyonla beraber ortaya çıkan İ/R modelinde çeşitli histopatolojik değişiklikler gözlenmiştir. Bu çalışma histopatolojik hasar ve apoptozis aracılığıyla İ/R'nin testis üzerinde hücresel toksik etkisini doğrulamıştır. Ayrıca UD uygulaması ile tüm bu değişikliklerin nispeten düzeltildiği de gösterilmiştir.

Memeli testisinde testiküler kan akımı ve iskemi değişikliklerini hakkında bilgi veren ilk detaylı çalışma 1949'da Harrison ve ark. tarafından yapılmıştır. Yapılan çalışmada araştırmacılar, ratlarda bir saatlik testis torsiyonu sonucunda ilk olarak Sertoli hücrelerinin normal yapılarını kaybettiği gözlemlenmiştir. 1969'da yapılan başka bir çalışmada ise Steinberger ve Tjioe, iki saatlik iskemi sonrasında bu değişimleri ancak izleyebilmişlerdir. Orhan ve ark., (2004) çalışmalarında, altı saat devam ettirilen testis torsiyonunda ortaya çıkan doku hasarını trombosit aktive edici faktör antagonisti olan "Ginkgo biloba"nın azalttığını vurgulamışlardır.

Deneysel testis torsiyonunda testiste kan akımının azaldığı bilinmektedir. Bu durumun sonucunda ise germ hücresinde apoptoz, testisin atrofisi ve spermatogenezde bozulma ortaya çıkmaktadır (Turner ve ark.1996). İskemi sonrası değişimler kontralateral testiste uzayan reperfüzyonla testiküler hasara neden olmuştur. Deneysel testis iskemi reperfüzyonunda 4- 6 saatten daha uzun süren reperfüzyon kalıcı doku hasarına neden olur (Ralitchkova ve ark.1990, Becker ve Turner, 1995, Granados ve ark. 1998). Ayrıca, sekiz saatlik torsiyon ardından kan akımının tamamen düzeldiğini bildiren yazarlar da vardır (Filho ve ark., 2004). Bizim

deneyde amacımız torsiyon oluşturulmuş testislerde herhangi bir işlem yapmadan önce kabul edilebilir bir iskemi oluşturmaktır. Aynı zamanda testiste geri dönüşümsüz hasar gelişmeden önce torsiyonun ve deneyin sonlandırılması gerekiyordu. Bu nedenle çalışmada iskemi süresi dört saat olarak uygulandı.

Spermatogenez testis torsiyonunda etkilenen en önemli parametrelerden birisidir. JTBS testisteki histopatolojik hasarı, germinal epiteyumun gelişimsel değerlendirilmesi sayesinde ölçen bir yöntemdir (Johnsen, 1970; Mogilman ve ark. 2004). Çalışmamızda JTBS değerleri İ/R grubunda daha düşük olarak tespit edildi. Mogilman ve ark.'da yaptıkları çalışmada 4 saatlik iskemi arkasından 1 saatlik reperfüzyon uygulamışlar ve sonucunda da JTBS'nin İ/R grubunda azaldığını gözlemlenmişlerdir. Ayrıca, Ergur ve ark' da ve Ghasemnezhad ve ark'da yaptıkları çalışmada İ/R sonucunda JTBS'nin ve STÇ azaldığını gözlemlenmişlerdir.

Seminifer tübüllerdeki atrofi ve spermatogenez hücrelerdeki azalma spermatogenez eksikliğinin işaretidir. Çalışmamızda STÇ değerleri, benzer şekilde oluşturulan birçok torsiyon/detorsiyon çalışmada olduğu gibi İ/R grubunda daha düşük olarak saptandı (Karagüzel ve ark, 2012; Ghasemnezhad ve ark, 2015; Mogilman ve ark 2004). Bununla birlikte hem JTBS hem de STÇ değerlerinde UD'nin uygulaması ile artma gözlemlendi. Golalipour ve ark. 'nın yapmış olduğu çalışmada da diyabetin sebep olduğu testis hasarında seminifer epitelyum yüksekliğinin UD verilen grupta diyabetik gruba göre arttırdığı gösterilmiştir. Jalili ve ark.'da (2014) yaptıkları çalışmada nikotinin testise verdiği hasarın UD'nin koruyucu yönünün değerlendirildiği çalışmada, nikotin hasarına karşı UD'nin farklı dozlarda verilmesi sonucunda STÇ'nin bu grupta nikotin verilen gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu yönüyle bakıldığında sonuçların bizim çalışmamızla uyumlu olduğu ve UD'nin testis hasarına karşı koruyucu rolü olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda testis dokusunun histopatolojik incelemesi sonucunda, interstisyel yapıda bozulma, seminifer tübül sınırlarında düzensizlik ve spermatogenez seri hücre dizisinde bozulma ve azalma gözlemlendi. Benzer bulgular daha önceki çalışmalarda da gözlemlenmiştir (Parlaktas ve ark., 2014; Minutoli ve ark., 2014). Ayrıca, UD'nin İ/R uygulamasının neden olduğu histopatolojik hasarları azalttığı da görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda da UD'nin uygulamasının testiküler disfonksiyonu ve histopatolojik değişiklikleri azalttığı bildirilmiştir (Jalili ve ark., 2014; Golalipour ve ark., 2011).

PCNA, hücre siklusunun proliferasyon fazını görüntülemek için kullanılan bir antijendir (Şen ve ark., 2002). Hücre kinetiğini ölçmede güçlü ve germ hücrelerinin proliferasyon aktivitesinin değerlendirilmesinde ucuz, basit ve doğru bir yöntemdir (Altay ve ark., 2003). PCNA germinal hücre kayıplarının saptanmasında kullanılır. Çünkü geminal kayıpta, özellikle PCNA düzeyi azalmış ve DNA sentezinde bozulma uyarılmıştır. Spermatogenezin etkinliği; spermiyositogenezi ve mayozdaki germinal hücre kaybı ve spermatogonyum proliferasyon aktivitesine bağlıdır (Altay ve ark., 2003).

Çalışmamızda kontrol grubu ratlarının spermatosit ve spermatogonyumlarında PCNA pozitif hücreler saptandı. İ/R uygulaması sonrasında ise PCNA pozitif hücre sayısı önemli derecede azaldığı görüldü. Bu durum bize testiküler germ hücrelerinde spermatogenezis ve proliferatif aktivitenin azaldığını göstermektedir. UD'nın uygulaması sonucunda ise PCNA ekspresyonunda artış olduğu görüldü. Kanter (2010), testiküler iskemi reperfüzyon hasarında düşen PCNA ekspresyonunun melatonin tedavisi ile beraber PCNA ekspresyonunu arttırdığını bildirmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise Taati ve ark. (2015), torsiyon-detorsiyon işlemi sonucunda oluşan İ/R hasarına karşı ghrelinin etkisini araştırmayı amaçlamışlar ve bu amaçlada, 1 saatlik torsiyon sonrasında 7 günlük detorsiyon işlemi yapmışlardır. Sonucunda da PCNA düzeyini torsiyon/detorsiyon oluşturulan ve ghrelinin verilen grupta torsiyon /detorsiyon oluşturulup salın verilen gruba göre hafif derecede yüksek bulmuşlardır. Ayrıca, Erboğa ve ark (2015) 'in yapmış olduğu çalışmada İ/R sebep olduğu testis hasarında İ/R grubunda PCNA indeksinin düştüğünü, timokinon tedavisinin ise PCNA ekspresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Bizde çalışmamız da PCNA indeksini değerlendirdiğimizde İ/R'nin PCNA indeksini düşürdüğü, UD'nın ise indeks değerlerini arttırdığını tespit ettik.

Torsiyon sonrası germ hücrelerinde meydana gelen apoptoza detorsiyonla beraber bu bölgeye lökositlerin göç ederek SOR'u arttırmasının da neden olduğuna dair bilgileri bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Turner, 2004). Apoptozis, birçok fizyolojik ve patolojik olaylarda meydana gelen programlanmış hücre ölümüdür. Spermatogenezisde apoptozis, germ hücre sayısının kontrolünden ve bozuk olan germ hücrelerinin ortadan kaldırılmasından sorumlu olan fizyolojik bir süreçtir (Aktan ve ark., 2005). Ayrıca, ısı şoku, iyonize radyasyon, toksik maddeler ve hormonal yetersizlik gibi olaylarda, total germ hücre kaybına yol açan testiküler apoptozisi

tetiklemektedir. Apoptozisin yaygın özelliği olarak oksidatif stres tanımlanmaktadır (Ranawat ve Bansal, 2008). Oksidatif stres durumunda, serbest radikal yapımı ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki denge bozulup, doku hasarı meydana gelmektedir (Altan ve ark., 2006; Serafini ve ark., 2004; Jedlinska ve ark., 2006). Serbest oksijen radikalleri de hücre metabolizmasındaki birçok reaksiyonu etkileyerek DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna, sitokinlerin ekspresyonuna, histolojik inflamasyona ve neticede fibrojenze ve apoptozis veya nekrozla hücre ölümüne yol açmaktadırlar (Lavine, 2000; Chatterjee ve ark., 2002).

Tsounapi ve ark (2012) ve Mogilnar ve ark (2006) İ/R uygulamasının testiste apoptosise neden olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, İ/R testislerde apoptotik hücrelerin sayısını ve apoptotik indeksi arttırmıştır. Sonuçlarımız daha önceki çalışmalarla uyumludur (Ghasemnezhad ve ark, 2015; Karagüzel ve ark., 2012; Mogilner ve ark., 2006;). Ghasemnezhad ve ark. (2015), 2 saatlik torsiyon ve 3 saatlik detorsiyon uygulamasının ardından oluşturdukları İ/R modelinde, İ/R grubunda oksitosinin koruyucu rolü sayesinde TUNEL pozitif hücre sayısında azalma olduğunu belirlemişlerdir. Aktoz ve ark.'da (2009) çalışmalarında 5'er saatlik torsiyon ve detorsiyon uygulayarak İ/R modeli oluşturmuşlar ve detorsiyondan 40 dk. önce 15 mg/kg quercetin uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda İ/R grubunda TUNEL pozitif hücrelerin sayısında anlamlı derecede artış gözlenirken, quercetin terapisinin yapıldığı İ/R grubunda TUNEL ekspresyonunda anlamlı derecede azalma gözlemlenmiştir. 2011 yılında Kanter'in yaptığı bir çalışmada İ/R uygulamasının testiste apoptosise neden olduğunu Ginkgo biloba'nın ise hasar üzerine koruyucu etkisinin olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, Ginkgo biloba'nın uygulaması ise hem apoptotik hücrelerin sayısını hem de apoptotik indeksi azaltmıştır.

Sonuç olarak; İ/R sonucunda histolojik hasar ve apoptozisle karakterize bir durum olan testiküler toksisitenin ortaya çıktığı, UD'nın ise koruyucu etkisi ile testiküler toksisiteyi önemli ölçüde azaltıldığı bulundu. Bu durum UD'nın korucu özelliği sayesinde İ/R uygulamasına bağlı testiküler toksisiteyi önleyici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Tüm bu bilgiler ışığında, İ/R hasarına neden olan mekanizmaların anlaşılması sonucunda klinik olarak fayda sağlayacak yardımcı yeni antioksidan tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi açısından önemlidir.

4. KAYNAKLAR

Aktan G, Şanlı Ö, Kadioğlu A (2005) Sperm kromatin hasarının tespit edilmesinde kullanılan yöntemler. İnfertilite. <http://www.androloji.org.tr/images/file/infertilite>.

Aktoz T, Kanter M, Aktas C (2010) Protective effects of quercetin on testicular torsion/detorsion-induced ischaemia-reperfusion injury in rats. *Andrologia* 42:376-383.

Altan N, Dincel AS, Koca C (2006) Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turk J Biochem* 31(2):51-6.

Altay B, Cetinkalp S, Doganavşargil B, Hekimgil M, Semerci B (2003) Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. *Fertil Steril* 80(2):828-31.

Anderson JB, Williams RC. Fertility after torsion of spermatic cord (1990). *Br J Urol.*; 65: 225-30.

Becker EJ Jr, Turner TT(1995) Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *J Androl.* Jul-Aug;16(4):342-51.

Casa AS, Cass BP, Veeraraghavan K. (1980). Immediate exploration of the unilateral acute scrotum in young male subjects. *J Urog* 124:829- 832.

Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiemermann C (2002). Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 61:862-871.

Cuervo JL, Grillo A, Vecchiarelli C, Osio C, Prudent L (2007) Perinatal testicular torsion: a unique strategy. *J Pediatr Surg* 42: 699–703.

Delasiauve LJF: Descente tardive du testicule gauche, prise pour une hernie étranglée. *Rev Med Fr Etrang* 1840;1: 363-375.

Erboga M, Aktas C, Kurt O, Uygur R, Caglar V, Turan BC, Topcu B, Fidanol Erboga Z, Gurel A, Ozen OA (2015). Protective effects of thymoquinone on experimental testicular ischaemia-reperfusion injury: an apoptotic, proliferative and biochemical study. *Andrologia*.

Ergur BU, Kiray M, Pekcetin C, Bagriyanik HA, Erbil G (2008) Protective effect of erythropoietin pretreatment in testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg*.43(4):722-8.

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

Genc Z, Yarat A, Tunali-Akbay T, Sener G, Cetinel S, Pisiriciler R, Caliskan-Ak E, Altintas A, Demirci B (2011). The effect of stinging nettle (*Urtica dioica*) seed oil on experimental colitis in rats. *J Med Food*.14(12):1554-61.

Ghafari S, Balajadeh BK, Golalipour MJ (2011). Effect of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) on testicular tissue in STZ-induced diabetic rats. *Pak J Biol Sci*.14(16):798-804.

Ghasemnezhad R, Mohammadghasemi F, Faghani M, Bahadori MH (2015) Oxytocin can decrease germ cells apoptotic index in testis under acute ischemia reperfusion in a rat model. *Iran J Reprod Med*. 13(5):283-90.

Golalipour MJ, Kabiri Balajadeh B, Ghafari S, Azarhosh R, Khorri V. Protective Effect of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) on Morphometric and Morphologic Alterations of Seminiferous Tubules in STZ Diabetic Rats. *Iran J Basic Med Sci*.2011;14(5):472-7.

Granados EA, Caicedo P, Garat JM (1998) Testicular torsion before 6 hours. I. *Arch Esp Urol*Dec;51(10):971-4.

Güneş M, Umul M, Altok M, Akyuz M, İšoğlu C.S, Uruc F, Aras B, Akbaş A, and Baş E (2015) Predictive role of hematologic parameters in testicular torsion. *Korean J Urol*.56(4):324-329.

Guttreridge JMC (1992) Iron and oxygen radicals in brain. *Ann Neurol* 32: 516-521.

Harrison RG, Weiner JS (1949) Vascular patterns of the mammalian testis and their functional significance. *J Exp Biol* 26:304-316.

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29:577-580.

Jalili C, Salahshoor MR, Naseri A (2014) Protective effect of *Urtica dioica* L against nicotine-induced damage on sperm parameters, testosterone and testis tissue in mice. *Iran J Reprod Med* 12(6):401-8.

Jedlinska-Krakowska M, Bomba G, Jakubowski K, Rotkiewicz T, Jana B, Penkowski AJ (2006). Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *Reprod Dev* 52(2):203-9.

Johnsen SG (1970) Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1:2-25.

Kanter M (2010) Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol.* 2010 Dec;89(3):314-20.

Kanter M (2011) Protective effects of Ginkgo biloba (EGb 761) on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol.* 91(3):708-13.

Karagüzel E, Kutlu Ö, Yuluğ E, Mungan S, Kazaz İO, Tok DS, Özgür GK (2012) Comparison of the protective effect of dipyridamole and acetylsalicylic acid on long-term histologic damage in a rat model of testicular ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 47(9):1716-23.

Lavine JE (2000) Vitamine E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study: *J Pediatr* 136:734–738.

McCord J.M. (1985) Oxygen- derived free radicals in postischemic tissue injury: In *Mechanisms of disease.* (Eds Epstein F.H). The N. England, J Med; 159-163.

Meral I, Kanter M (2003) Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on selected mineral status and hematological values in CCl₄-treated rats. *Biol Trace Elem Res.* 96(1-3):263-70.

Minutoli L, Irrera N, Squadrito F, Marini H, Nicotina PA, Arena S, Romeo C, Antonuccio P, Altavilla D (2014) Effects of ischaemic post-conditioning on the early and late testicular damage after experimental testis ischaemia-reperfusion. *Andrology* 2:76-82.

Mogilner JG, Elenberg Y, Lurie M, Shiloni E, Coran AG, Sukhotnik I (2006). Effect of dexamethasone on germ cell apoptosis in the contralateral testis after testicular ischemia-reperfusion injury in the rat. *Fertil Steril.* Apr;85 Suppl1:1111-7.

Murphy JP: The acute scrotum. Ziegler MM, Azizkhan RG, Weber TR (ed):*Operative Pediatric Surgery*, McGraw-Hill Companies, New York, 2003, pp.563-568

Orhan İ, Hayit H, Duksal İ, Özercan İH, Fırdolaş F, Semerciöz A (2004) Tek taraflı testis torsiyonunda PAF antagonistinin karşı taraf testisinin iskemik hasarındaki koruyucu etkinliği. *Türk Üroloji Dergisi* 30:11-16.

Ozbal S, Ergur BU, Erbil G, Tekmen I, Bagrıyanık A, Cavdar Z (2012) The effects of α -lipoic acid against testicular ischemia-reperfusion injury in Rats. *Scientific World Journal* 2012:489248 doi:10.1100/2012/489248.

Özkol H, Musa D, Tuluçe Y, Koyuncu I (2012) Ameliorative influence of *Urtica dioica* L against cisplatin-induced toxicity in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Drug Chem Toxicol.* Jul;35(3):251-7.

Palmer JS, Cromie WJ, Lee RC (1998) Surfactant administration reduces testicular ischemia reperfusion injury. *J Urol* 159:2136-2139.

Parlaktas BS, Atilgan D, Gençten Y, Akbas A, Markoc F, Erdemir F, Ozyurt H, Uluocak N (2014) The effects of carvedilol on ischemia-reperfusion injury in the rat testis. *Int Braz J Urol* 40:109-1017.

Prillaman HM, Turner TT (1997) Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J Urol* 157:340-345.

Rabinowitz R, Hulbert WC (1995). Acute scrotal swelling. *Urol Clin North Am* 22: 101-5.

Ralitchkova L, Nanov Z, Gotchev D, Hinev A, Libald T, Wolnik R (1990). Experimental testicular torsion--early and late morphological and enzymohistochemical changes. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe* 23(3):185-8.

Ranade AV, Tripathi Y, Rajalakshmi R, Vinodini NA, Soubhagya RN, Nayanatara AK, Rekha DK, Kumari M (2011) Effect of vitamin E administration on histopathological changes in rat testes following torsion and detorsion. *Singapore Med J.* 52(10):742-6.

Ranawat P, Bansal MP (2008) Decreased glutathione levels potentiate the apoptotic efficacy of selenium: possible involvement of p38 and JNK MAPKs-in vitro studies. *Mol Cell Biochem*;309(1-2):21-32.

Saba M, Morales CR, De Lamirande E, et al (1997) Morpho-logical and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *J Urol* 157:1149-54.

Sadler TW (Çeviri: AC. Başaklar). Langman's medikal embriyoloji. 7. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 1996:274-275.

Sayhan MB, Kanter M, Oguz S, Erboğa M (2012) Protective effect of *Urtica dioica* L. on renal ischemia/reperfusion injury in rat. *J Mol Histol.* 43(6):691-8.

Serafini M, Del Rio D (2004) Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Rep* 9(3):145-52.

Steinberger E, Tjioe DY (1969) Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia. *Fertil Steril* 20:639-649.

Şen O, Kayaselçuk F, Zorludemir S, Aydın MV, Erdoğan B (2002) Meningiomlarda histopatolojik tanının flowsitometrik dna analizi, pcna ve ki-67 ile korelasyonu. *Türk Nöroş Derg* 12:48-53.

Şener TE, Yüksel M, Özyılmaz-Yay N, Ercan F, Akbal C, Şimşek F, Şener G (2015) Apocynin attenuates testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg.*50(8):1382-7.

Taati M, Moghadasi M, Dezfoulian O, Asadian P, Zندهdel M. Effects of Ghrelin on germ cell apoptosis and proinflammatory cytokines production in Ischemia-reperfusion of the rat testis (2015) *Iran J Reprod Med.*13(2):85-92.

Tanyel FC (2000) A reevaluation of the mechanism of testicular descent: reasons for failed descent or ascent. *J Pediatr Surg* 35:1147-1149.

Turner TT, Brown KJ. (1993) Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biol Reprod*; 49:401–407.

Turner TT, Caplis LA, Rhoades CP (1996) Testicular vascular permeability: effect of lesions associated with impaired testis function. *J Urol Mar*;155(3):1078-82.

Turner TT, Bang HJ, Lysiak JL (2004). The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. *J UrolDec* 172(6 Pt 2):2574-8.

Tsounapi P, Saito M, Dimitriadis F, Kitatani K, Kinoshita Y, Shomori K, Takenaka A, Satoh K (2012) The role of K ATP channels on ischemia-reperfusion injury in the rat testis. *Life Sci.* 15;90(17-18):649-56.

Uz E, Söğüt S, Şahin Ş, Var A, Özyurt H, Gülaç M et al. (2002) The protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *World J Urol*; 20:264-270.

Vedder NB, Fouty BW, Winn RK (1989) Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock. *Surgery*;106(3):509-516.

Williamson, R.C.N. The continuing conundrum of testicular torsion. *Br. J. Surg* 1985;72: 509-510.

Yener Z, Celik I, Ilhan F, Bal R (2009) Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. *Food Chem Toxicol.*;47(2):418-24.

Zimmerman BJ, Granger DN (1992) Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* Feb;72(1):65-83.