



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**RATLARDA TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON
HASARINA KARŞI ALLOPURİNOL VE TROLOX'UN
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Uğur ŞEKER
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

DİYARBAKIR-2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**RATLARDA TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON
HASARINA KARŞI ALLOPURİNOL VE TROLOX'UN
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Uğur ŞEKER
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer AKTAŞ

DİYARBAKIR-2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Uğur ŞEKER'in hazırladığı “**Ratlarda Testiküler Torsiyon/Detorsiyon Hasarına Karşı Allopurinol ve Trolox’un Koruyucu Etkinliğinin İncelenmesi**” 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: 20/06/2019

Danışman Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

Üye Prof. Dr. Murat AKKUŞ

Üye Prof. Dr. Özlen KARABULUT

Üye Prof. Dr. İbrahim Enver OZAN

Üye Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../20.. tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BEYAN

Bu 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.

24/06/2019

Uğur ŞEKER

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince iyi bir bilim insanı olabilmem için emeklerini esirgemeyen başta danışmanım Prof. Dr. Yusuf NERGİZ ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Ayfer AKTAŞ hocalarım olmak üzere, anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Murat AKKUŞ hocama, ayrıca bölümümüz öğretim üyeleri Prof. Dr. Engin DEVECİ, Prof. Dr. Sevda SÖKER, Doç Dr. Selçuk TUNİK ve Doç. Dr. Cenap EKİNCİ hocalarıma,

Tez izleme komisyonunda yer alarak katkılarını esirgemeyen Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi, Prof. Dr. Özlen KARABULUT hocama,

Doktora eğitimim süresince desteklerini hiç esirgemeyen Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Ümüt CİRİT hocama ve Dr. Öğr. Üyesi M. Ferit ÖZMEN'e,

Beni bugünlere getiren sevgili babam Osman ŞEKER, annem Gülhan ŞEKER, abim Doç. Dr. Ali ŞEKER'e ,

Tez yazım dönemimde dünyaya gelen ve şahsıma mutlulukların en güzelini sağlayan biricik kızım Duru ŞEKER'e ve bu mutluluğu bana yaşatan sevgili eşim Zeynep ÇOLAK ŞEKER'e,

Doktora tezim süresince yardımlarını sürekli hissettiğim çocukluk arkadaşım Dr. Emre UYAR'a,

Anabilim Dalımız personelleri, Vahdettin ERGÜN, Fırat AŞIR, Süreyya ÖZDEMİR BAŞARAN ile lisansüstü öğrencileri Seval KAYA, Fırat ŞAHİN ve Gamze ERDOĞAN'a, teşekkürü borç bilirim.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (DÜBAP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: TIP.18.013)

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ONAY	
BEYAN	I
TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	III
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
RESİMLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
1. ÖZET	1
1.1. TÜRKÇE ÖZET	1
1.2. ABSTRACT	2
2. GİRİŞ ve AMAÇ	3
3. GENEL BİLGİLER	5
3.1. Testis	5
3.1.1. Testis Anatomisi	5
3.1.2. Testis Embriyolojisi	8
3.1.3. Testis Histolojisi	10
3.1.4. Testis Damarlanması ve Lenfatik Drenaj	15
3.1.5. Testis İnnervasyonu	16
3.1.6. Spermatogenez	17
3.2. Testiküler Torsiyon/Detorsiyonuna Bağlı İskemi ve Reperfüzyon Hasarı ...	20
3.3. Malondialdehit	21
3.4. Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü)	21
3.5. PCNA (Proliferasyon Hücre Nükleer Antijeni)	34
3.6. Allopurinol [4-hydroxypyrazolo(3,4-d) pyrimidine]	35
3.7. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil kroman-2-karboksilik asit)	36
4. GEREÇ ve YÖNTEM	37
4.1. Deney Hayvanları'nın Temini, Deneyin Düzenlenmesi ve Sonlandırılması ..	37
4.2. Kan Serum Malondialdehit (MDA) Değerlerinin Ölçülmesi	39
4.3. Rutin Histolojik Takip	40
4.4. Histokimyasal Metodlar	40

4.4.1. Hematoksilen – Eozin Boyama Protokolü.....	40
4.4.2. PAS Boyama Protokolü.....	41
4.5. İmmunohistokimyasal Metodlar ve TUNEL Assay	41
4.5.1. PCNA İmmunohistokimya	42
4.5.2. Procaspase-3 İmmunohistokimya.....	42
4.5.3. Cleaved Caspase-3 İmmunohistokimya	43
4.5.4. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL Assay)	45
4.6. Morfolojik ve İstatistiksel Analiz	47
5. BULGULAR	52
5.1. Malondialdehit Bulguları.....	52
5.2. Histopatolojik Bulgular	52
5.3. TUNEL Assay Bulguları	59
5.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	62
5.5. İstatistiksel Bulgular	73
6. TARTIŞMA.....	79
7. SONUÇ.....	87
8. KAYNAKLAR.....	88
9. ÖZGEÇMİŞ.....	114
10. EKLER	115
10.1. Etik Kurul İzin Belgesi	115
11. ORJİNALLİK RAPORU.....	116

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

PCNA	:	Proliferasyon hücre nükleer antijeni
TUNEL Assay	:	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
PAS	:	Periyodik asit-Schiff
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
RNS	:	Reaktif Nitrojen Türleri
DNA	:	Deoksiribo Nükleik asit
PGCs	:	Primordiyal Germ Hücreleri
SDF/ GPCR	:	Stromal Derived Faktör 1
CXCR-4	:	Kemokin Reseptör-4
TDF	:	Testis Belirleyici Faktör
INSL3	:	İnsulin-Benzeri Protein 3
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
FAS	:	FS-7-ilişkili Yüzey Antijeni
TNF	:	Tümör Nekroz Faktör
FADD	:	Ölüm alanı içeren Fas-ilişkili protein
TRADD	:	Tümör nekroz faktör reseptörü tip 1-ilişkili ölüm alanı
RIP	:	Reseptör etkileşimli protein
c-FLIP	:	FELICE -inhibitör proteini
FasL	:	Fas Ligant
FasR	:	Fas Reseptörü
CTL	:	Sitotoksik T Lenfosit
ICAD	:	İnaktif kaspaz Aktive Edici DNaz
CAD	:	Kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz
BID	:	BH3 interacting-domain death agonist
Bad	:	Bcl2 Associated Agonist Of Cell Death
Bcl-XL	:	B-hücre lenfoma ekstra large
Bcl-2	:	B hücre lenfoma-2
ICAD	:	Kaspaz tarafından aktive edilen DNAaz inhibitörü
DAB	:	Diaminobenzidin tetraklorür
TT	:	Testiküler torsiyon
MDA	:	Malondialdehit
AIF	:	Apoptozis İndükleyici Faktör
Bax	:	Bcl2 ilişkili X protein
DISC	:	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
rER	:	Kaba Endoplazmik Retikulum
sER	:	Düz Endoplazmik Retikulum

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil-1: Testis anatomisinin şematik görünümü.....	6
Şekil-2: Total insan testis kesiti ve anatomik yapıların mikroskopik görüntüsü.....	7
Şekil-3: Spermatik kord ve testis'in gross görüntüsü	8
Şekil-4: 10 günlük fare embriyosunda PGCs	9
Şekil-5: Testis'in mediastinum bölgesi'nin görüntüsü	11
Şekil-6: Seminifer tubüllerin şematik illüstrasyonu	12
Şekil-7: Seminifer tubüllerin şematik yapısı	13
Şekil-8: Leydig hücresinin transmission elektron mikroskobu görüntüsü	14
Şekil-9: İnsan seminifer tubülünün yapısının şematik görünümü	17
Şekil-10: İnsan gametogenezinin proliferatif kinetiğinin şematik görüntüsü.....	20
Şekil-11: Dış ve İç apoptozis yolları (Green 2011).	25
Şekil-12: İskemi uygulanan ve suture edilen skrotum'un görüntüsü.	38
Şekil-13: Reperfüzyon sonrası testis'in görüntüsü	39
Şekil-14: Jurkat hücre hattında Cleaved Caspase-3 antikor pozitif kontrolü	44
Şekil-15: Grupların TUNEL Assay floresan mikroskop görüntüsü	46
Şekil-16: TUNEL Assay uygulanan kesitlerde apoptotik indeks analizi	48
Şekil-17: Testis kesitlerinde PCNA ekspresyon analizi	49
Şekil-18: Procaspase-3 ve Cleaved Caspase-3 boyanan kesitlerde Image J analizi ..	50
Şekil-19: Procaspase-3 ve Cleaved Caspase-3 boyanan kesitlerde alanların Image J analizi için işaretlenmesi	50
Şekil-20: Procaspase-3 ve Cleaved Caspase-3 immunohistokimya Image J örnek analiz sonucu	51
Şekil-21: Kan serum malondialdehit değerlerinin istatistik sonuç grafiği	74
Şekil-22: Johnsen skor analizinin istatistiksel sonuç grafiği	75
Şekil-23: TUNEL Assay değerlerinin istatistik sonuç grafiği	76
Şekil-24: Immunohistokimya verilerinin istatistiksel sonuç grafiği	77

RESİMLER LİSTESİ

Resim-1: Kontrol grubu rat testis kesiti	52
Resim-2: Kontrol grubu rat testis kesiti	53
Resim-3: T/D grubu rat testis kesitleri	54
Resim-4: T/D grubu rat testis kesitleri	55
Resim-5: T/D grubu rat testis kesitleri	55
Resim-6: T/D+A grubu rat testis kesitleri	56
Resim-7: T/D + A grubu rat testis kesitleri	57
Resim-8: T/D+T grubu rat testis kesitleri.....	58
Resim-9: T/D+T grubu rat testis kesitleri.....	59
Resim-10: Kontrol grubu rat testis kesitinde TUNEL Assay	59
Resim-11: T/D grubu rat testis kesitlerinde TUNEL Assay.....	60
Resim-12: T/D+A grubu rat testis kesitlerinde TUNEL Assay	61
Resim-13: T/D+T grubu rat testis kesitlerinde TUNEL Assay	62
Resim-14: Kontrol grubu rat testis kesitlerinde PCNA immunohistokimya.....	63
Resim-15: T/D grubu rat testis kesitlerinde PCNA immunohistokimya.....	64
Resim-16: T/D+A grubu rat testis kesitlerinde PCNA immunohistokimya.....	65
Resim-17: T/D+T grubu rat testis kesitlerinde PCNA immunohistokimya	66
Resim-18: Kontrol grubu rat testis kesitlerinde Procaspase-3 immunohistokimya ..	67
Resim-19: T/D grubu rat testis kesitlerinde Procaspase-3 immunohistokimya	68
Resim-20: T/D+A grubu rat testis kesitlerinde Procaspase-3 immunohistokimya ...	68
Resim-21: T/D+T grubu rat testis kesitlerinde Procaspase-3 immunohistokimya....	69
Resim-22: Kontrol grubu rat testis kesitlerinde Cleaved Caspase-3 immuno- histokimya.....	70
Resim-23: T/D grubu rat testis kesitlerinde Cleaved Caspase-3 immunohistokimya	71
Resim-24: T/D+A grubu rat testis kesitlerinde Cleaved Caspase-3 immuno- histokimya.....	72
Resim-25: T/D+T grubu rat testis kesitlerinde Cleaved Caspase-3 immuno- histokimya.....	73

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo-1: Kullanılan antikorların katalog, üretim ve dilüsyon oranları	41
Tablo-2: Johansen testiküler biyopsi skorlaması kriterleri	47
Tablo-3: İstatistiksel analiz yapılan verilerin, ortalama, minimum, maksimum ve standart hata değerleri	78



1. ÖZET

Ratlarda Testiküler Torsiyon/Detorsiyon Hasarına Karşı Allopurinol ve Trolox'un Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Uğur ŞEKER

Danışmanı: Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

1.1. TÜRKÇE ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, ratlarda testis torsiyon/detorsiyon modeli uygulayıp iskemi/reperfüzyon ile testiste şekillenen testis hasarına karşı allopurinol ve trolox'un koruyucu etkinliğinin araştırılması hedeflendi.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 28 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar 4 eşit gruba ayrıldı. 1) Kontrol grubu, 2) Torsiyon/Detorsiyon grubu. Bu gruptaki hayvanlara 5 saat süreyle sol testis torsiyonu 2 saat süreyle reperfüzyon uygulandı. 3) Torsiyon/Detorsiyon+Allopurinol grubu. Bu gruptaki hayvanlara grup 2'de uygulanan cerrahi işlemler gerçekleştirildi ve allopurinol enjeksiyonu yapıldı. 4) Torsiyon/Detorsiyon+Trolox grubu. Bu gruptaki hayvanlara 2. gruptaki hayvanlara uygulanan işlemler gerçekleştirilip trolox enjeksiyonu yapıldı. Sakrifiye sonrası kanda MDA düzeyine bakıldı. Testis dokularında ise histopatolojik değerlendirme, Johnsen skorlaması, Procaspase-3, Cleaved Caspase-3, PCNA immunohistokimya ve Apoptotik indeks (AI) için TUNEL-Assay uygulandı.

Bulgular: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında T/D grubunda MDA düzeyinin, cleaved caspase-3 ekspresyonu'nun, AI'in arttığı, PCNA ekspresyonu ve Johnsen skorlamasının düşüş gösterdiği, procaspase-3 ekspresyonu'nun ise benzer olduğu tespit edildi. T/D+A grubunda histopatolojik hasarın kısmen ortadan kalktığı görüldü. MDA düzeyinin, cleaved caspase-3 ve PCNA ekspresyonunun, AI'in ve Johnsen skoru'nun Kontrol ve T/D grupları arasında bir değer aldığı, procaspase-3 ekspresyonu'nun ise kontrol grubuna benzer olduğu tespit edildi. T/D+T grubunda ise histopatolojik harabiyetin büyük oranda ortadan kalktığı, MDA düzeyinin, procaspase-3, cleaved caspase-3, PCNA ekspresyonunun, AI ve Johnsen skorunun kontrol grubuyla benzer olduğu tespit edildi.

Sonuç: Trolox'un T/D'un neden olduğu testis hasarını azalttığı kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Sıçan, Testis, Torsiyon/Detorsiyon, Apoptoz, Kaspaz-3

Investigation of the Protective Effects of Allopurinol and Trolox Against Testicular Torsion/Detorsion Damage in Rats

Student's Surname and Name: ŞEKER, Uğur

Adviser of Thesis: Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

Department: Histology and Embryology

1.2. ABSTRACT

Aim: In this study, we aimed to investigate the protective effects of allopurinol and trolox on the testicular damage in a testicular torsion/detorsion model in rats.

Materials and Methods: 28 Male Sprague – Dawley rats used in this experiment were separated into 4 equal groups. 1) Control group. 2) Torsion/Detorsion (T/D) group. In this group, rats were exposed to left testicular torsion for 5 hours and reperfusion for 2 hours. 3) Torsion/Detorsion + Allopurinol (T/D+A) group. This group had the same surgical procedures in the second group and i.p. allopurinol (200 mg/kg) was administered. 4) Torsion/Detorsion + Trolox (T/D+T) group. This group had the same procedures in the second group and i.p. Trolox (50 mg/kg) was administered. After the surgical procedures, the rats were sacrificed and blood samples were obtained to measure malondialdehyde (MDA) levels. The testicles were taken to make histopathologic examinations, Johnsen score, to assess procaspase-3, cleaved caspase-3 expressions. PCNA immunohistochemistry and TUNEL-Assay were executed to evaluate the apoptotic index (AI).

Results: In the T/D group, MDA levels, cleaved caspase-3 expressions, and AI were higher while PCNA expressions and Johnsen scores were lower and procaspase-3 expressions were similar compared to the control group. In the T/D+A group, the histopathologic damage was partially disappeared. The MDA levels, cleaved caspase-3, and PCNA expressions, AI and Johnsen scores were between the values of the control and T/D group while the procaspase-3 expressions were similar to those of the control group. The histopathologic damage was almost reversed in the T/D+T group and the MDA levels, procaspase-3, cleaved caspase-3, PCNA expressions, AI and Johnsen scores were found similar to the control group.

Conclusion: Trolox was found efficient in reducing testicular T/D damage.

Keywords: Rat, Testis, Torsion/Detorsion, Apoptosis, Caspase-3

2. GİRİŞ ve AMAÇ

Spermatik kord'un kendi etrafında dönmesi sonucu testis'te iskemi şekillenmesine testis torsiyon'u denilmektedir. İskemi şekillenen testis'in normal haline getirilmesine ve kanın reperfüzyonuna ise detorsiyon denilmektedir. Testis torsiyonu, erkek genital sistemi açısından acil müdahale edilmesi gereken bir durumdur. Testiküler torsiyon'un yirmibeş yaşın altındaki erkeklerde görülme sıklığı 1/4000'dir. Bu vakaların yarısı detorsiyon uygulanmasına rağmen daha sonraki dönemlerde testis atrofisi ve testis fonksiyon bozuklukları ile yüzleşmektedir. Hatta kalıcı sterilite (kısırlık) gözlenebilmektedir (1). Testis torsiyonu kasık bölgesinde ağrı, bulantı, baş dönmesi gibi bulgularla kendisini göstermektedir. Çoğunlukla idiyopatik olup %20 oranında travmaya bağlı olarak şekillenebilmektedir. Testis'in torsiyonuna bağlı olarak oluşan iskemi toksik metabolitlerin testis dokusunda birikmesine neden olur. Detorsiyon gerçekleştirildiğinde ise testiküler reperfüzyonla beraber reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türevleri'nin (RNS) oluşumunda artış gözlenmektedir (2,3). Yani detorsiyon zamanında şekillendirilse ve testisten toksik metabolitler uzaklaştırılsa dahi reaktif oksijen ve nitrojen türlerine bağlı olarak testiküler hasar varlığını sürdürmektedir. Testis torsiyonu her yaşta görülebilmektedir. Vakaların büyük çoğunluğu 10 ve 20 yaşları arasındadır ve görülme oranının en yüksek olduğu yaş 14'tür . Testis torsiyonu'nun en sık görüldüğü ikinci yaş grubu yeni doğanlardır. Otuz yaşın üstünde Testis torsiyon'u oranı azalmaktadır ancak yetişkin ve ileri yaşlarda detorsiyonla etkilenen testisin kurtarılma şansı çocukluk dönemine kıyasla daha azdır (4). Bunun sebebinin ise teşhis koyma konusundaki gecikme ile alakalı olabileceği düşünülmektedir (5). Testis torsiyonunda tedavi planı skrotum'un acilen açılması ve torsiyon şekillenen yumurtalığın detorsiyon edilmesidir. Testis torsiyonu tedavisinde başarı ağrının ne kadar süredir var olduğu ve teşhisin ne kadar erken konulduğu ile orantılıdır. Testis torsiyonu şekillenip bulgular oluşmaya başladıktan 6-12 saat içerisinde cerrahi müdahalenin yapılması testis'in canlı tutulabilmesi için önemlidir. Uzun süren torsiyonlarda testis'in alınması gerekebilmektedir. Detorsiyon sonrası testise perfüze olan ROS ve RNS'ler hücre ve mitokondrial membran bütünlüğünü ortadan kaldırmakta, protein ve DNA'yı yıkabilmektedir. Bu kimyasal bileşenler testis'in spermatogenezis yapamayacak duruma gelmesine hatta erkek infertilitesine neden

olacak ciddi hasarları oluşturma potansiyeline sahiptir. ROS ve RNS bileşenlerinin ortamdaki varlığıyla beraber hücre DNA hasarı şekillenmekte ve hücrelerde apoptoz (programlanmış hücre ölümü) oluşmaktadır. Bu sebeple detorsiyon sonrası serbest radikalleri ortadan kaldırmak ve testis fonksiyon bozukluklarını önlemek amacıyla çeşitli antioksidanlar pre-klinik yönden denenmektedir (6). Allopurinol ve trolox son dönemlerde çok yoğun çalışılan hücredeki serbest radikalleri ortadan kaldırma kapasitesine sahip antioksidanlardır (7,8). Yaptığımız literatür taramasında antioksidanlar ile testis torsiyon/detorsiyonuna bağlı oluşan iskemi/reperfüzyon hasarına karşı kabul gören bir ilaçla tedavi metodunun henüz geliştirilemediğini tespit ettik. Ayrıca trolox ve allopurinol'un testiküler iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkinliğine yönelik çalışmaların kısıtlı olduğunu gözlemledik.

Bu sebeple çalışmamızda ratlarda testis torsiyon/detorsiyon modeli uygulayıp iskemi/reperfüzyon ile testiste şekillenen serbest radikallerin sebep olduğu testis hasarına karşı allopurinol ve trolox'un koruyucu etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

3. GENEL BİLGİLER

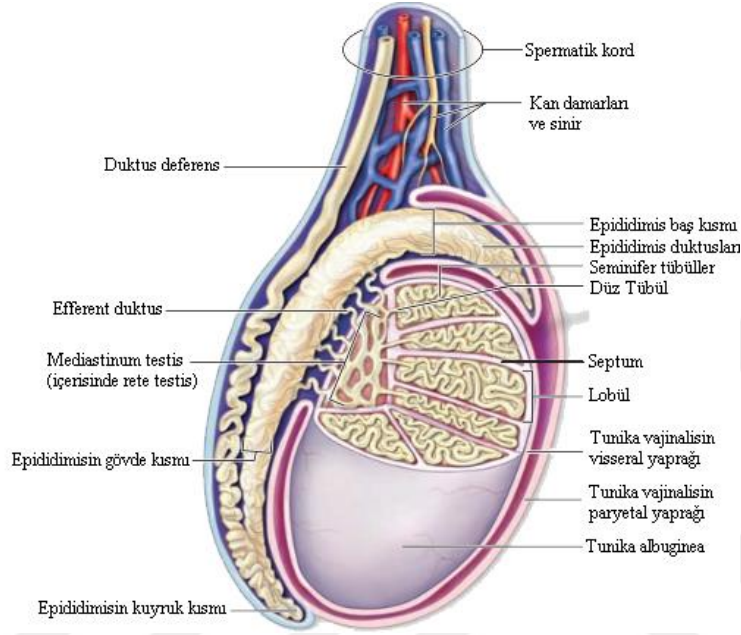
3.1. Testis

Erkek üreme sisteminin bir parçası olan testisler vücut kavitesinin dışında yer alan ve skrotum kesesi içerisinde yer alan bir çift organ yapısıdır. Ergenlikle beraber spermatogenez'in başladığı testisler erkek üreme özelliği kazanır. Üreme hücreleri yetişkin testislerde büyük bir alan kaplar ve testiküler hacim sperm üretimi ve sperm konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Testiküler hacim erken çocukluk döneminden pubertaya kadar iki katına çıkar ve pubertayla beraber testis olgunlaşması pik yaparak erişkin testis organı şekillenmiş olur (9-14). Her bir testis anterior abdominal duvarın uzantısı olan ve skrotuma uzanan müskülofasiyal kese aracılığıyla skrotum içerisinde askılı durmaktadır. Testisler abdominal duvara spermatik kordlar aracılığıyla bağlıdır ayrıca gubernakulum'un kalıntısı olan skrotal ligamentler vasıtasıyla skrotuma tutunur (15).

3.1.1. Testis Anatomisi

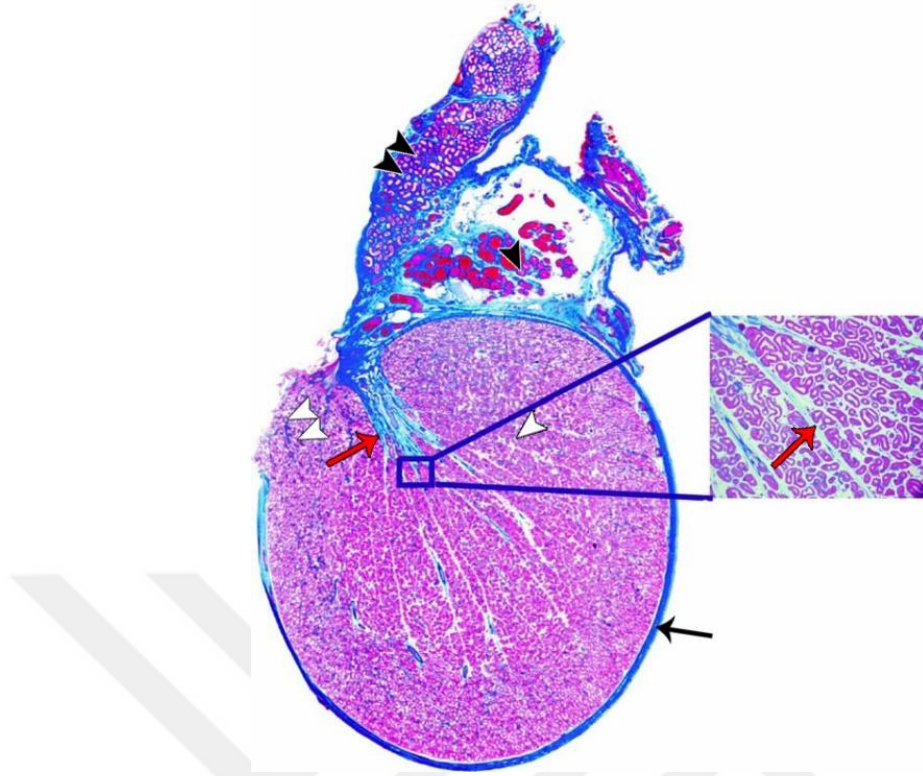
Testisler interstisyel Leydig hücrelerinin cinsiyet hormonlarını ürettiği steroidogenez bakımından endokrin, spermatogenezde üretilen sperm ve spermatozoa bakımından ekzokrin bir organdır. Testisler skrotum içerisinde spermatik kordlar tarafından askıda tutulan bir çift organdır. Testisler abdominal kavitenin dışında lokalize olup, sol testis sağ testisten anatomik olarak bir miktar daha aşağıda durmaktadır. Genel olarak erişkin testisi uzun ekseninde çapı 4,6 cm (3,6 ile 5,5 arasında) ve kısa ekseninde 2,6 cm (2,1 ile 3,2 arasında) olan bir organdır (16,17). Hacmi 15 ile 25 ml arasında değişmektedir (18). Testisler oval şekilli olup skrotum içerisinde lateral yönden desteklenerek eğimli bir şekilde yer alırlar. Testis'in üst kısmı ileri ve lateral yöndedir, altı kısmı ise geriye ve mediale doğru eğimlidir. Testis'in anterior konveks alanı ileri ve aşağı bakan kısımlarıdır, posterior alanı ise yukarı ve arka yöne bakmakta olup bu alan düz ve spermatikkordların tutunduğu kısımdır. Posterior sınırın dışındaki bütün testis yüzeyi konveks ve düz olup tunika vaginalis'in visseral yaprağı ile örtülüdür. Epididimis testis'in posterior alanı boyunca yerleşim gösterir. Testisin tamamı mavi-beyaz renkli ve testiküler damarların kolaylıkla görüldüğü yoğun fibröz bir kapsül olan tunika albuginea ile çevrelenmiştir. Tunika albuginea ile testis'in yumuşak parenkiması arasında testiküler büyük çaplı damarların yer aldığı

tunika vasküloza yer alır. Radyal şekilde uzanan testis septumları testis dokusuna ilerler ve kesintili vertikal mediastinum testis olarak adlandırılan septumları oluşturur (Şekil-1). Bu septumlar üst kısımlarında daha geniş bir alan oluştururken testis içerisine ilerledikçe dar bir şekil almaktadır (19).



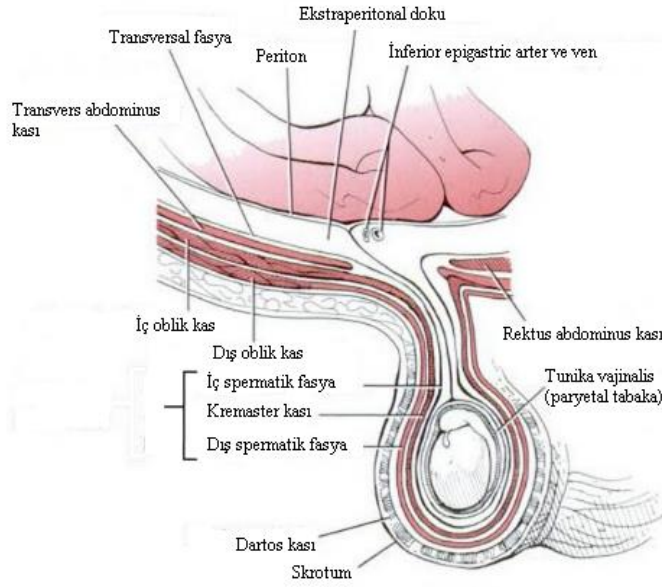
Şekil-1: Testis anatomisinin şematik görünümü (19).

Testis dokusu kesintili septumlar ve mediastinumtestis'in kesiştiği yerden çok sayıda lopçuğa ayrılır (20). Her lopçukta seminifer tubül olarak adlandırılan, çapı 180-280 µm olan, sıkı şekilde kıvrımlı ve spermatogenezis'in gerçekleştiği tubüller bulunur. Kıvrımlı seminifer tubüller düz bir şekilde ilerleyen ve tubuli seminiferus rekti olarak adlandırılan tubüllere ulaşır ve oradan da mediastinum testiste yer alan rete testise uzanır. Mezonefrik tüpten köken alan ve sayıları 12 den 40'a kadar ulaşan efferent duktuslar aracılığıyla rete testis, epididimis'in baş ve kısmen gövde kısmında yer alan epididimal kanallara ulaşır (Şekil-2) (21).



Şekil-2: Total insan testis kesiti ve anatomik yapıların mikroskopik görüntüsü. Testis'in etrafını çevreleyen tunika albuginea (siyah ok) ve testiküler doku içerisine uzanan septalar (kırmızı ok). Yüksek büyütme resimde detaylıca görüldüğü gibi testis parenkimasının lobüler yapısı (beyaz ok başı). Efferent duktuslar (beyaz çift ok başı), epididimis (çift siyah ok başı) ve testis'in panpiniform venöz pleksus'u (siyah ok başı) görülmektedir (22).

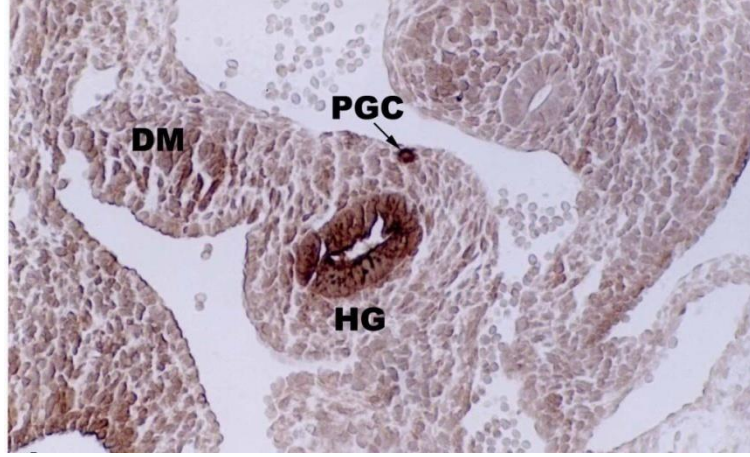
Fötal gelişimle abdominal kavitede olgunlaşıp skrotuma inen testisler peritondan köken alan tunika vajinalis olarak adlandırılan seröz bir kese ile sarılır. Bu seröz tabakanın skrotuma temas eden bir dış tabakası (pariyetal) ve tunika albuginea'yı örten bir iç tabakası (visseral) bulunur. Testiste spermin üretilmesinde çeşitli moleküler mekanizmalar şekillenmektedir. Sıcak kanlı hayvanlarda spermatogenezis vücut sıcaklığı olan 37 °C de şekillenmemektedir. Skrotumda yer alan ter bezlerinin yanı sıra dartos kasının ayrıca iç ve dış spermatik fasya'ların arasında yer alan kremaster kasının kontraksiyonu veya serbestleşmesi testis'in vücut boşluğuna yaklaşması ve uzaklaşmasını sağlayarak testis sıcaklığının sabit tutulmasına yardımcı olur (Şekil-3). Bu şekilde spermatogenezis'in şekillenmesi için testis sıcaklığı vücut sıcaklığının 2.2 °C altında tutulabilmektedir (23,24).



Şekil-3: Spermantik kord ve testis'in gross görüntüsü (25).

3.1.2. Testis Embriolojisi

Testis'in gelişiminde birden fazla embriyonal alan etkili olmaktadır. Embriyonal gelişimin 2.haftasında epiblast'tan köken alan primordiyal germ hücrelerinin (PGCs) vitellus kesesinin allantoise yakın endoderminde oluşur ve buradan genital kabartıya göçüyle testis'in üreme hücreleri oluşmaya başlar (26,27). Üreme hücrelerini üretecek olan gonadlar (testis ve over) embriyonal gelişimin ilk dönemlerinde mezonefrozun medialinde mezotelyal bir kalınlaşmanın primitif böbrek gelişimi ile birlikte 5.haftada ortaya çıkar. Bu epitelin ve altındaki mezenkimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık yani genital kabartı oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar alttaki mezenkim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklılanmamış gonad dışta bir korteks ve içte bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo genetik yönden XY cinsiyet kromozom kompleksine sahipse medulla testise farklıdır. Korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenere olur. Primordiyal germ hücreleri (PGCs) epiblasttan köken alır, primitif çizgi boyunca göç ederler ve 3. haftayla beraber vitellus kesesi duvarının allantoise yakın kısmında yer alan endoderm hücreleri arasına ulaşırlar (28). Dördüncü hafta boyunca son bağırsak dorsal mezenteri boyunca ameboid hareketler yaparak göçlerine devam ederler (Şekil-4).



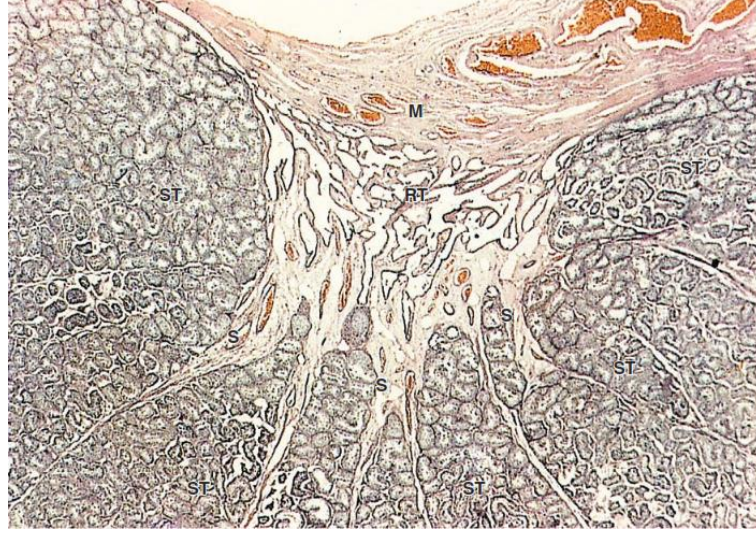
Şekil-4: 10 günlük fare embriyosunda PGCs. Son bağırsağın transvers kesitinde alkale fosfat pozitif PGC izlenmektedir. DM: Dorsal mezenter, HG:Son bağırsak, PGC: Primordiyal Germ Hücresi (29).

Beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşmaya başlarlar ve genital kabartının içine kümeleşmeleri 6. haftada şekillenir. Bu sebeple embriyonal gelişimin 6. haftasına kadar PGCs'ler genital kabartının içerisinde görünmezler. Eğer genital kabartıya ulaşmaları kesintiye uğrarsa gonadlar gelişemez. Bu sebeple primordial germ hücreleri gonadların testis'e gelişiminde indükleyici bir etkiye sahiptir. Ayrıca migrasyon öncesinde kültüre edilen PGCs aktif hareket özelliği kazanmamaktadır (30). Bunun sebebi PGCs'in aktif hareket özelliği için primitif çizgiden gelen bir sinyal yolağına ihtiyacıdır (31). Migrasyonun başlamasıyla beraber genital kabartı ve mezenşim tarafından stromal derived faktör 1 (SDF) üretilir ve bu molekül PGCs'in gonadı oluşturacak bölgeye göçünü sağlar bu genin eksikliğinde gonadlara göç gerçekleşemez. Migrasyon süresi boyunca PGCs tarafından SDF reseptörü veya diğer adıyla GPCR kemokin reseptör-4 (CXCR-4) olarak bilinen protein eksprese edilir. CXCR4 ekspresyonunda bir aksaklık olması durumunda PGCs hem migrasyon gerçekleştiremez hem de hayatta kalamaz (32,33). Primordial germ hücrelerinin göçlerini tamamlamasının hemen öncesinde ve esnasında genital kabartının epiteli proliferer olur ve epitel altında yer alan mezenşime nüfuz etmeye başlar. Burada primitive seks kordonu olarak adlandırılan düzensiz şekilli kordonlar oluşur. Hem erkek hem de dişi embriyosunda bu kordonlar yüzey epiteliyle temas halindedir ve dişi veya erkek gonad olduğu yönünde tahminde bulunmak bu dönem için zordur. Bu sebeple oluşmaya başlayan bu organ farklanmamış gonad olarak tanımlanır ve

gonadlara ulaşan PGCs gonosit olarak adlandırılmaya başlar (34). Embriyo eğer genetik olarak erkek ise, primordial germ hücreleri XY cinsiyet kromozom kompleksi ihtiva etmektedir. Y kromozomunda yer alan SRY geni tarafından kodlanan testis belirleyici faktör'ün (TDF) etkisiyle primitif seks kordonları prolifer olmaya devam eder ve iç kısımlara nüfuz ederek testis veya medüller kordonları oluşturur. Bu yapının hilumu boyunca daha sonra rete testis tubüllerini oluşturacak dallanma ve anostomozlar oluştururlar. Gelişimin sonraki aşamalarında sıkı fibröz bir bağ dokusu olan tunika albuginea testis kordonlarını yüzey epitelinden ayırır. Dördüncü ayda testis kordonları at nalı şekli alır ve uzantıları rete testis ile devam eder. Bu şekilde testis kordonları primitif germ hücreleri ve yüzey epitelinden göç eden sertoli hücrelerinden oluşur. Bu kordonların farklılanmaya başlamasının hemen ardından genital kabartıdaki mezenşim hücreleri testis kordonları arasına yerleşerek interstisyel Leydig hücrelerini oluşturur. Leydig hücreleri gestasyon'un 8.haftasından itibaren testesteron salgılamaya başlar ve bu sayede testis salgıladığı bu hormondan ötürü genital kanalların eşeyssel farklılaşması ve dış genitalerin şekillenmesinde rol oynayan bir organ haline gelir. Puberteye kadar işlevsiz olarak bekleyen testis kordonları puberta ile beraber bir lumen oluşturur ve seminifer tubüllere şekillenir. Seminifer tubül kanalları oluşurken aynı zamanda bu kanallar daha sonra duktuli efferentese ulaşan rete testise tutunurlar. Bu efferent duktuslar mezonefrik sistemin boşaltıcı tubüllerinin kalıntısıdır. Ayrıca rete testis ile mezonefrik kanal veya wolffian kanalını birleştirirler ve duktus deferens'i oluştururlar (35).

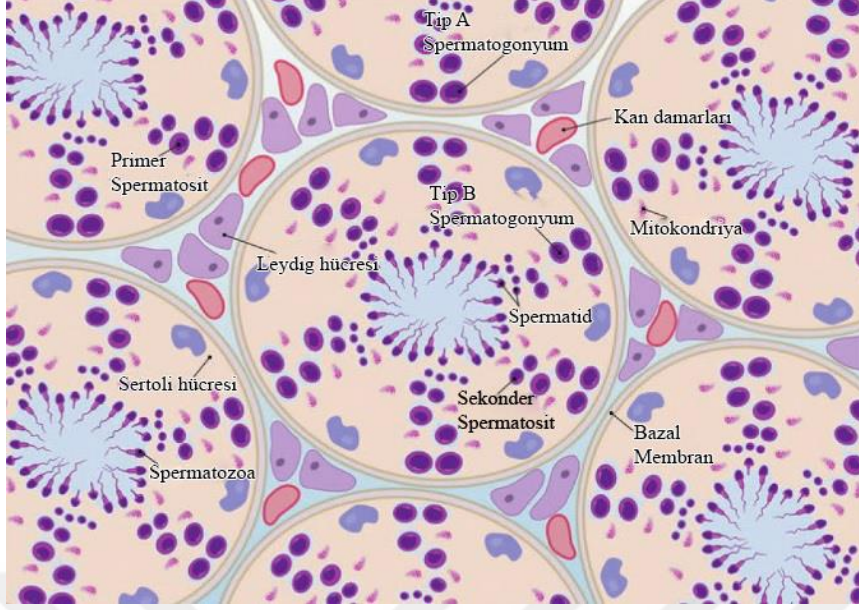
3.1.3. Testis Histolojisi

Testislerin etrafı yoğun sıkı bağ dokusu olan tunika albuginea ile örtülüdür. Bu kapsula'nın iç kısmı tunika vasküloza olup gevşek bağ dokusundan oluşur ve kan damarlarını içerir. Her testis kapsula dan köken alan kesintili bağ doku septaları tarafından 250 – 290 arasında lobçuğa ayrılır (36). Testis'in posteriyor yüzeyinde tunika albuginea kalınlaşır ve mediastinum testis olarak adlandırılır (Şekil-5).



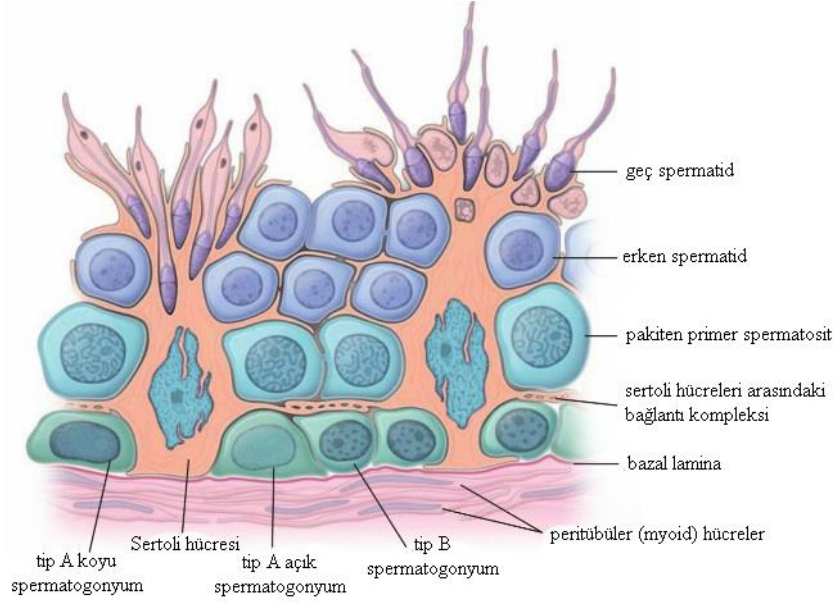
Şekil-5: Testis'in mediastinum bölgesi'nin görüntüsü. Mediastinum testis (M), Septumlar (S), Seminifer tubüller (ST), Rete testis (RT) (19).

Kan, lenf ve genital taşıyıcı kanallar bu bölgeden geçerek testise giriş ve çıkış yapar. Testisteki her lopçukta sayıları 1 ile 4 arasında değişen, ve sperm'in üretildiği seminifer tubül içerir (37). Ayrıca interstisyel alanda testesteron üretimini sağlayan Leydig hücreleri bulunur. Lopçuklardaki her tubül oldukça uzundur ve kıvrımlı bir yapı oluşturarak lopçuk içerisine paketlenir. Her tubülün uç kısmı testis mediastinumu yakınında yer alır ve kıvrımlı tubüller kısa düz bir şekil alır. Tubüllerin bu kısmı düz tubül olarak adlandırılır ve bu yapı mediastinumda yer alan anastamoz yapan bir sistem olan rete testis ile devam eder. Seminifer tubüller'in uzunlukları 30 ile 80 cm arasında değişmekte olup çapları 150 ile 200 µm arasında değişir. Seminifer tubüller 2 temel hücre popülasyonundan oluşan sıradışı ve kompleks bir epitel örtüsüne sahiptir. Bunlar Sertoli hücreleri (destek hücreleri, sustentaküler hücreler) olarak tanımlanan hücreler ve spermatogenik hücrelerdir (Şekil-6).



Şekil-6: Seminifer tubüllerin şematik illüstrasyonu (38).

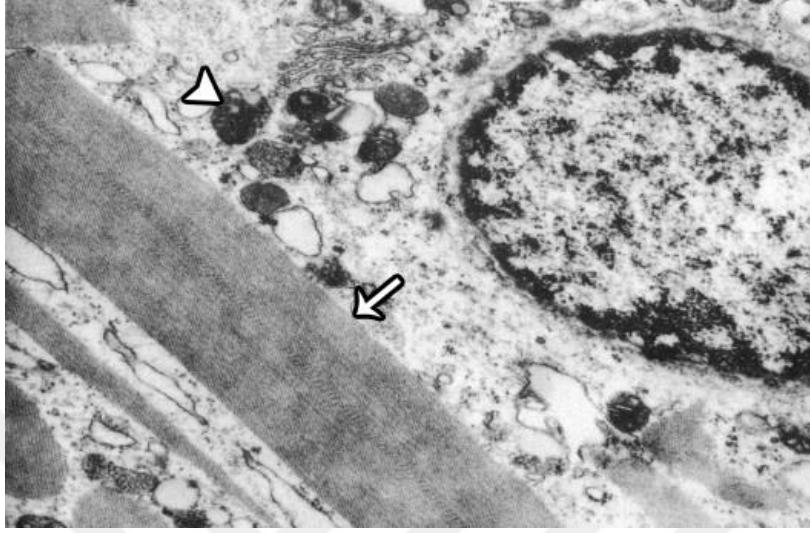
Sertoli hücreleri puberteye kadar sayılarını arttıran, geniş bir apikal yüzeyi olan ve lateral yüzey uzantılarıyla kendisine tutunan spermatogenik hücrelerin etrafını ve spermatogenik hücrelerin arasındaki boşlukları dolduran ve spermatogenezis sonucu oluşan hücresel artıkları fagosit etme kapasitesine sahip hücrelerdir (39). Sertoli hücrelerinin bu özellikleri rutin histolojik preparasyonlarda belirgin bir şekilde tespit edilememektedir. Sertoli hücreleri bütün tubül boyunca devam eden ve seminifer tubüle ve spermatogenez'e yapısal destek sunan hücrelerdir. Seminifer tubül boyunca dizilen ve hücre yan bağlantılarıyla birbirine tutunan sertoli hücreleri kan-testis bariyerinin oluşumuna katkı sunarlar (40). Seminifer tubül yapısını oluşturan ikinci hücre grubu ise spermatogenik hücreleridir. Bu hücreler replike olarak ve farklılaşarak olgun sperm hücrelerine dönüşürler. Sertoli hücreleri arasında tutunan spermatogenik hücrelerin peşin sıra gelişim aşamaları sebebiyle spermatogenik aşama ayrımı güçlükle yapılabilmektedir. Olgunlaşmamış spermatogonia, seminifer tubülde yer alan bazal lamina üzerinde yer alırlar. Seminifer tubüldeki en olgun spermatogenik hücreler ise spermatidler olup sertoli hücrelerinin apikal yüzeylerine tutunurlar ve tubül lümeni boyunca gözlenirler (Şekil-7).



Şekil-7: Seminifer tubüllerin şematik yapısı (15).

Tunika propria (peritübüler doku) tipik fibroblastları bulundurmeyen çok tabakalı bir bağ dokusudur. Yetişkinlerde bazal membranın dış kısmına komşu üç ile beş arasında değişen miyoid hücre (peritübüler kontraktıl hücreler) tabakasından ve kollajen liflerinden oluşur. Ultrasüruktürel düzeyde incelendiğinde bazal lamina'nın varlığı ve çok sayıda aktif filamentinin mevcudiyeti miyoid hücrelerin düz kas hücreleriyle benzer özelliklerine işaret etmektedir. Ayrıca önemli bir miktarda kaba endoplazmik retikulum (rER) varlığı bu hücrelerin fibroblast bulunmayan bu tabakadaki kollajen sentezine işaret etmektedir. Miyoid hücrelerin ritmik kontraksiyonları peristaltik hareketler oluşturarak spermatozoa'nın ve testiküler sıvının seminifer tubül boyunca akması ve tubülün uç kısımlarına ulaşmasını sağlar. Testis lobcuklarında kanlanmayı sağlayan damarlar, lenf damarları ve Leydig hücreleri miyoid hücreler tabakasının dış kısmında yer alırlar. Yaşlanmayla beraber tunika propria kalınlaşır. Bu kalınlaşmaya sperm üretiminde azalma ve hatta seminifer tubüllerin hacmindeki küçülme eşlik eder. Tunika propria'nın erken yaşlardaki aşırı kalınlaşması infertilite ile ilişkilendirilmektedir. Leydig hücreleri geniş, poligon ve eozinofilik karakterde hücreler olup bol miktarda lipid damlacıkları içerirler. Ayrıca bu hücrelerde lipofuksin pigmenti ve reinke kristalleri olarak adlandırılan koni şekilli sitoplazmik kristaller sıklıkla görülebilmektedir. Rutin histolojik boyamalarda 3x20 µm boyunda olan bu kristaller refraktıl bir

görüntü verirler. Tam olarak fonksiyon ve yapıları bilinmemekle beraber hücresel boyutta protein üretimine işaret ettiği düşünülmektedir (Şekil-8).



Şekil-8: Leydig hücresinin transmission elektron mikroskobu görüntüsü. Reinke kristalleri (ok) ve mitokondriya (ok başı) (41).

Steroid salgılayan diğer hücreler gibi, Leydig hücreleri de yoğun miktarda düz endoplazmik retikulum (sER) içermektedir. Kolesterolde testesteron üreten enzimler sER ile ilişki halindedir. Steroid salgılayan hücrelerde karşılaşılan bir diğer özellik olan tubüloveziküler kristallara sahip mitokondriler yine bu hücrelerde bol miktarda görünmektedir. Leydig hücreleri erken fütal dönemde dahi testosteron salgısı yapmaktadır. Testosteron üretimi ve salgılanması, embriyonik gelişimde, eşeyssel olgunlaşmada ve üreme fonksiyonlarında önem arz etmektedir. Embriyonal dönemde testosteron ve diğer androjenlerin üretimi gonadların erkek fetüste normal gelişimini sağlamaktadır. Testosteron'un haricinde Leydig hücreleri testis'in skrotuma inmesine yardımcı olan insulin-benzeri protein 3 (INSL3) salgılamaktadır. Pubertada testosteron salgılanması sperm üretimi, aksesuar eşey bezleri ve sekonder cinsiyet karakterinin gelişmesi için önemlidir. INSL3'ün üretimi aynı zamanda seminifer tubüllerde mayotik bölünmesi düzenler. Yetişkinlikte ise testesteron salgılanması spermatogenezis'in devamlılığı için gereklidir. Yetişkin testislerindeki Leydig hücreleri, dolaşımdaki INSL3'ün esas kaynağıdır. Dolaşımdaki INSL3 ölçümü ile Leydig hücresinin steroidogenik kapasite indeksi'nin değerlendirilmesi klinik

kullanılan testlerden biridir. Erken dönemde Leydig hücrelerindeki INSL3 ekspresyonundaki yetersizlik kriptorşidizme ve gubernakulum'un gelişiminde aksaklıklara sebep olmaktadır (42,43). INSL3 üretiminin yanısıra Leydig hücreleri oksitosin üretebilmekte ve salgılamaktadır. Üretilen bu testiküler oksitosin miyoid hücre kontraksiyonunu stimule etmekte ve spermatozoa'nın efferent duktuslara ulaşmasını desteklemektedir. Erkek fötüs'ün erken dönemlerinde aktif olan Leydig hücreleri gelişimin 5. ayından itibaren inaktif periyoda geçer. İnaktif hale geçen Leydig hücrelerini morfolojik olarak fibroblastlardan ayırt etmek güçtür. Pubertayla beraber gonadotropik stimulasyona uğrayan Leydig hücreleri, tekrar androjen üreten hücreler haline döner ve hayat boyunca aktif kalırlar (15).

3.1.4. Testis Damarlanması ve Lenfatik Drenaj

Testis ve epididimisi besleyen arteriyel dolaşım üç kaynaktan köken alır. Azalan arteriyel akış sırasına göre bunlar; testiküler arter (yaklaşık arteriyel kan akışının üçte ikisini sağlar), vazal arter ve kremasterik arter (birlikte testiküler kan akışının üçte birini sağlar) (44,45). Testiküler arter (internal spermatik arter) renal arterin başlangıç yerinin inferiorunda bulunan abdominal aortadan çıkar ve paryetal periton'un altında inferolateral yönde uzanarak psöas majoris boyunca ilerler ve pelvise uzanır. Sağ tarafta inferior vena kavanın anterioru ve orta kolik arter, ileokolik arterler terminal ileum'un posterioru boyunca uzanır. Sol tarafta ise inferiyor mezenterik ven, sol kolik arter ve inen kolon'un posterioru boyunca uzanır. Sağ ve sol testiküler arterler pelvise ulaşırken genito femoral sinirler ve dış ilyak arterlerin anterioru boyunca uzanır. Her iki arter de iç internal inguinal halkaya girer ve skrotuma doğru inguinal kanal boyunca ipsilateral spermatik kord boyunca ilerler. Testise yönelimi esnasında testiküler arter, inferiyor testiküler arter ve kaput korpus ve kaude epididimisi besleyen bir veya daha fazla iç spermatik arter oluşturur (46). Testis seviyesinde testiküler arterin dalları tunika albugineaya mediastinum testisen giriş yapar ve tunika vasküloza seviyesinde testis içerisine yayılmadan önce dallanır. Testiküler arterin dallanması testis'in alt kutubunda anterior, mediyal ve lateral kısımlarında, üst kutbun ise anteriorda şekillenir (47). Vazal arter internal ilyak arterden köken alan vizekal arterin superior (bazen hem superior hem inferior) dalı olarak testisi kanlandırır. Kremaster arteri (eksternal spermatik arter) inferiyor

epigastrik arter'in bir dalıdır. Spermatik korda eşlik ederek, kremaster ve kordu örten diğer yapıları kanlandırır. Hem vazal hemde kremaster arteri inguinal kanala iç inguinal halka düzeyinde giriş yapar ve testiküler arterin yanısıra spermatik kord boyunca ilerler. Testiküler arter ve iç spermatik venler, iç spermatik fasya içerisinde uzanır. Buna karşın vaz deferens ve damarları ve aynı şekilde kremaster kası ve damarları eksternal spermatik fasyanın içinde ancak iç spermatik fasyanın dışında uzanır. Epididimisin baş kısmında testiküler ve epididimal arterler arasında ayrıca epididimis'in kuyruk kısmında testiküler arter ile epididimal, kremasterik ve vazal arterler arasında yoğun anastomoz şekillenir. Testiküler ven, testisin posteriorundan doğar, epididimisi drene eder daha sonra spermatik kordun major yapılarından olan ve pampiniform pleksus olarak bilinen yoğun anastomoz kanallarını oluşturmak üzere biraraya gelir. Bu vasküler düzenlenme arter ve venlerin akışlarının sadece vasküler duvar tarafından ayrıldığını göstermektedir. Bu organizasyon vasküler yapılar arasında ısı ve küçük molekül değişimine olanak sağlar ve düşük testiküler sıcaklığına yardımcı olur (44). Pampiniform pleksus vaz deferensin anterioruna doğru ilerler ve inguinal kanalda 3-4 vene drene olur. Venler abdomene iç inguinal halkadan girer sağda inferior vena kavaya solda ise renal vene drene olan tek bir testiküler vene dönüşür. Sağ testiküler ven inferior vena kavaya renal ven düzeyinde inferior yönde dar bir açı ile kaynaşır. Buna karşın sol testiküler ven sol renal vene dik bir açı ile kaynaşır. Her iki testiküler venin yapısında da venöz valfler bulunur. Testiküler lenfatik akış yoğun ve süreklidir. Vertikal drenaj'ın genel retroperitoneal şemasını sağdan sola doğru lateral akış yönünde sürdürür. Sağ testislerden gelen lenfatik damarlar ilk olarak inter-aortokaval nodlara, parakaval nodlara ve bazı sol para-aortik nodlara drene olur. Sol testisten gelen lenf damarları ise sol para-aortik ve inter-aortokaval nodlara drene olur (48).

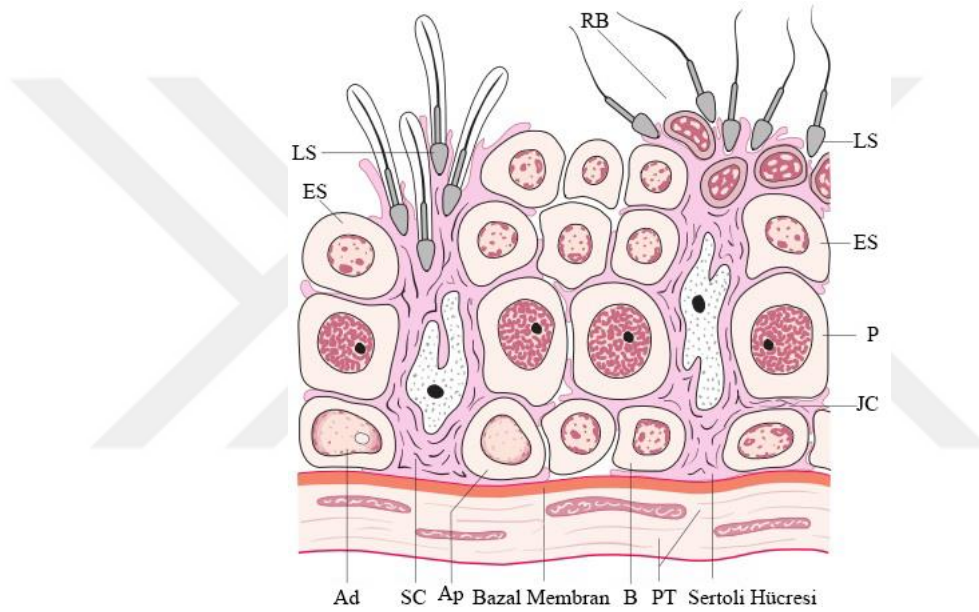
3.1.5. Testis İnnervasyonu

Testisler 10 veya 11. torasik spinal segmentten gelerek, renal ve aortik pleksuslara ulaşan ve buradan testiküler damarlar eşliğinde gelen liflerle ya da pelvik pleksustan çıkan ve vaz deferens eşliğinde gelen lifler tarafından innerve edilir (49,50). Ayrıca bazı afferent ve efferent sinirler kontralateral pelvik pleksus düzeyinde temas halinde

olabilmektedir (51). Bir testiste şekillenen patolojinin bir diğeri etkilemesinin nedenlerinden birinin bu sinir teması olabileceği düşünülmektedir (48)

3.1.6. Spermatogenezis

Spermatogenezis rezervuar hücrelerin bölünmesiyle başlar ve olgun sperm hücresinin oluşmasıyla tamamlanır. Farklı özellikler gösteren seminifer epitel hücreleri spermatogenezis aşamaları olarak bilinen ve seminifer tubüller içinde tipik hücreler halinde organize olmuş germ hücreleridir (Şekil-9).



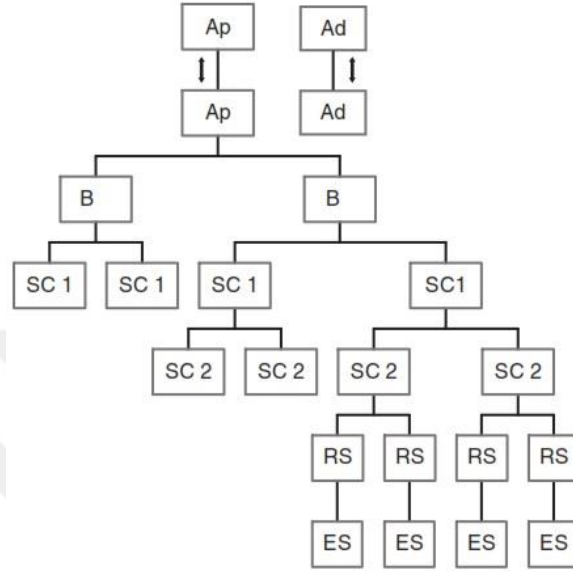
Şekil-9: İnsan seminifer tubülünün yapısının şematik görünümü. Tubül yapısını oluşturan Peritubüler hücreler (PT) ve Bazal Lamina (BL). Erken/yuvarlak Spermatozoid (ES), Spermatozoid (P), Tip A koyu Spermatozoid (Ad), Tip A açık renkli spermatozoid (Ap), Tip B spermatozoid, Sertoli Hücreleri (SC), Geç spermatozoid (LS), rezidüel cisim (RB) ayrıca kan-testis bariyerinin üyesi sertoli hücreleri arası tight junction tipi sıkı bağlantılar (JC) şematik olarak gösterilmiştir (22).

Bütün bir spermatogenezis süreci 4 faza ayrılabilir: 1. Mitotik proliferasyon ve diploid germ hücrelerinin (spermatogonia) farklılaşması (spermatogoniogenezis) 2. Tetraploid germ hücrelerinin (spermatozoidler) mayotik bölünmesi ve haploid germ hücrelerini (spermatozoidler) oluşturması 3. Spermatozoidlerin testiküler sperme dönüşmesi

(spermiogenezis) 4. Sperm hücresinin germinal epitelden seminifer tubül lümenine iletilmesi (spermiasyon). Spermatogonia seminifer epitelinin alt kısmında dizilidir ve Tip A ve Tip B spermatogonia olarak sınıflandırılır. Tip A spermatogonia'nın sitolojik ve fizyolojik özelliklerine göre iki tipi tanımlanmıştır; koyu spermatogonia ve açık spermatogonia. Koyu spermatogonia normal koşullar altında proliferasyon aktivitesi göstermemekte olup nadiren bölündüğü düşünülmektedir (Şekil-10) (52). Bu spermatogonialar kök hücreler olarak değerlendirilmektedir (53). Ancak bu germ hücreleri radyasyon gibi spermatogonia hücre sayısında ciddi bir azalmaya neden olan durumlarda mitoz geçirebilmektedir (54). Öte yandan açık Tip A spermatogonia bölünerek kendisini yeniden adlandırır ve 2 Tip B spermatogoniaya farklılaşır. Primatlarda yapılan detaylı çalışmalar spermatogonial çoğalma hakkında farklı bilgiler sunmuştur. Bu çalışmalarla sadece açık Tip A spermatogonia'nın bölünerek açık Tip A spermatogoniaların oluşumunu sağladığı ve bu sayede hücre popülasyon havuzunu sabitlediği ayrıca Tip B spermatogonia'ya bölünerek te daha sonraki gelişimsel aşamaları başlattığı tezini öne sürmüştür (52). Clermont'un daha önceki modeline karşın normal spermatogenik siklusa açık Tip A spermatogonia'nın kaynağı'nın koyu Tip A spermatogonia olmadığı öne sürülmüştür. Mayotik bölünmenin hemen başında Tip B spermatogoniardan preleptoten spermatositler şekillenir. Sonraki germ hücre basamakları DNA sentezler ayrıca anne ve yavru hücreler hücreler arası köprülerle birbirleriyle temas halinde olur (55). Primatlarda da gözlenmiş olan germ hücrelerindeki bu gelişimsel kolonizasyon gametlerin seminifer epiteldeki koordineli olgunlaşması için zorunludur (56). Spermatosit olarak bilinen tetraploid germ hücreleri mayoz bölünmenin farklı evrelerinden geçer. Pakiten fazı yoğun RNA senteziyle karakterizedir. Haploid germ hücreleri olan spermatidler bu mayotik bölünme aşamalarının sonucunda oluşur. Gametogenez esnasında gerçekleşen genetik materyalin rekombinasyonu, kromozom sayısının indirgenmesi ve spermatidlerin olgunlaşması aşamaları mayoz sırasında kusursuz gerçekleşmesi gereken kritik süreçlerdir. Sekonder spermatositler ilk mayotik bölünmeden oluşur. Bu germ hücreleri bir çift halinde haploid kromozom içerir. Sekonder mayotik bölünme esnasında spermatositler haploid spermatidlere bölünür. İlk mayozun profazı 1-3 hafta sürer, buna karşın ilk mayozun diğer basamakları ve sekonder mayoz 1-2 gün içerisinde tamamlanır. Spermatidler ikinci mayozdan oluşan,

yuvarlak ve mitotik yönden inaktif hücreler olup son ürün olarak uzamış spermatid ve sperm'in oluştuğu önemli transformasyon aşamaları geçirir. Bu aşamalar, hücre çekirdeğinin yoğunlaşması ve yapısal şekil değişikliklerine uğraması, flagellum'un oluşması ve sitoplazmanın büyük bir kısmının hücreden ayrılması şeklindedir. Bu aşamalara genel olarak spermiogenezis denir ve bütün memeli türlerinde aynı şekilde gerçekleşmektedir. Prensipte olarak Spermiogenezis 4 fazdan oluşur bunlar; Golgi, kap, akrozomal ve olgunlaşma fazlarıdır. Golgi fazında akrozom baloncukları ve kraniokaudan simetrioluşur. Kap fazında spermatidler uzamış bir hal alır ve spermatid'in baş kısmının yaklaşık 3 te 2'sini kaplayan akrozom şekillenir. Fertilizasyon esnasında akrozomda oluşturulan enzimler sperm'in yumurtaya tutunmasını sağlar.akrozomal fazda hücre çekirdeği daha yoğun bir hal alır ve hücre uzamaya devam eder. Yoğunlaşma esnasında histon proteinlerinin çoğu ortadan kalkar ve gen transkripsiyonu durdurulur. Çekirden kromatini bu sayede oldukça sıkı paketlenir. Spermiyogenezis için gereken proteinlerin bu aşamadan önce sentezlenmiş olması ve uzun yarı ömürlü RNA ve RNA bağlayıcı proteinlerin varlığı bu aşamaya gelen ve sıkı bir şekilde paketlenen çekirdek kromatinine işaret eder. Bu süreçte mRNA translasyon kontrol mekanizmasının rolü henüz çözülememiş olsa da RNA-bağlayıcı proteinlerin rol aldığı düşünülmektedir. Bu aşamanın sonunda flagellum olgunlaşmıştır. Spermatidlerin olgunlaşma fazındaki temel olay sitoplazmanın kalan kısmı'nın (rezidual cisim) hücreden uzaklaştırılmasıdır. Rezidual cisimcikler olgunlaşmada düzenleyici bir rol alırlar ve kalıntıları sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Uzamış spermatidler ve residual cisimcikleri tubül sıvı üretimini, inhibin, androjen bağlayıcı preotein ve interlökin 1 ile 6 üretimini etkileyerek Sertoli hücrelerinin sekretuar fonksiyonuna etki eder. Rezidual cisimcikler indirgenirken eş zamanlı olarak yeni bir spermatogenik siklus başlar. Sperm'in tubül lümenine aktarılması spermiasyon olarak tanımlanır. Bu aşama plazminojen aktivatörleri ve muhtemelen timet oligo peptidazların etkisinde gerçekleşmektedir. Bu aşama kısmen hormonal modifikasyonlar, sıcaklık ve toksinlerden de etkilenebilmektedir. Bu duyarlılığın nedeni henüz anlaşılammıştır. Rezidual cisimciklerin yanısıra lümene ulaşmayan sperm de Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Yuvarlak ve uzamış spermatidler fertilizasyon yapabilme özelliğine sahip olmasa dahi fertilizasyon için gerekli hücre içi özellikleri

taşımaktadır. Bu sebeple IVF’te intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu ile uzamış spermatid hatta yuvarlak spermatidler kullanılarak gebeliğin elde edilmesi mümkündür (22).



Şekil-10: İnsan gametogenezinin proliferatif kinetiğinin şematik görüntüsü. Aşamaların daha net anlaşılabilmesi için tek bir spermatogonyum’un bütün gelişimsel aşamaları gösterilmiştir. İnsan testisi yaklaşık olarak 1 milyar sperm hücresi içerir ve günde ortalama 25,000 yeni hücre oluşturulur (57). Bir Ap spermatogonyum 16 adet uzamış spermatide köken olabilir. İnsan seminifer tubülü tek bir Tip B spermatogonyaya içerdiği için son germ hücresi sayısı (uzamış spermatid) çoklu spermatogonyal bölünme gösteren canlı türlerinden daha azdır. Ad: Tip A koyu renkli spermatogonyum (testiküler kök hücreler, nadiren bölünür), Ap: Tip A açık renkli spermatogonyum (spermatogenez için kendini yenileyen progenitör hücreler), B: Tip B spermatogonyum, SC1: Primer spermatosit, SC2: Sekonder spermatosit, RS: Yuvarlak spermatosit, ES: Uzamış spermatosit (22).

3.2. Testiküler Torsiyon/Detorsiyonuna Bağlı İskemi ve Reperfüzyon Hasarı

Testiküler torsiyon (TT) sonucu oluşan iskemide, her yaşta karşılaşılabilen bir durum olmasına rağmen perinatal ve pubertal dönemdeki erkeklerde daha sık karşılaşılan urolojik bir sorundur (58-60). TT testislerde hasara, infertiliteye ve subfertiliteye neden olabilir. Bu sebeple teşhis çok kritik bir önem taşır (61,62). Spermatik kord’un

kendi etrafında dönmesiyle şekillenen torsiyon'un ne kadar süredir var olduğu ve spermatik kord'un kaç derecelik açı ile dönüş gerçekleştirdiği bu klinik durumun ortaya çıkartacağı sonuçları etkilemektedir (63). Her ne kadar testiküler torsiyona bağlı şekillenen patolojinin sebebi tam olarak aydınlatılamamış olsa da, iskemi/reperfüzyon sürecinde aşırı derecede oluşan ve sistemik dolaşımda bulunan serbest radikal türeri'nin (ROS) hücrel ve dokusal bazda şekillenen hasarda en önemli faktör olduğu düşünülmektedir (64). Spermatik kord'un torsiyonuyla şekillenen psilateral testiküler hasarı açık bir şekilde bilinmektedir ancak spermatik kord torsiyonunu takiben kontralateral testis hasarı konusunda çelişkili sonuçlar veren çalışmalar mevcuttur. Bazı çalışmalar kontralateral testiküler hasar belirtmişken bazıları bunun aksini göstermiştir (3,65,66).

3.3. Malondialdehit

Serbest radikaller, organizmada lipid peroksidasyon sürecini gerçekleştirir. Malondialdehit (MDA), hücrelerde çoklu doymamış yağ asit peroksidasyonu (lipid peroksidasyonu) sonucu oluşan son ürünlerden biridir. En bilinen lipid peroksidasyon markerleri, ioprostan (IsoPs) ve malondialdehit'tir (MDA). Diğer bilinen lipid peroksidasyon ürün markerleri ise, lipid hidroksiperoksitler, lipid peroksidasyonun floresan ürünleri, oksidasyon direnci testleri ve oksiterollerdir (67). Serbest radikallerde artış şekillenmesi, MDA'nın artışına neden olmaktadır. Malondialdehit düzeyi, kanserli hastalarda oksidatif stres ve antioksidan durumun değerlendirilmesi açısından bir belirteç olarak göz önünde bulundurulur (68).

3.4. Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü)

Apoptozis terimi literatürde ilk defa 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Curie tarafından kullanılmış olmasına rağmen, hücrenin kendisini ortadan kaldıracağı bir mekanizmanın olabileceği fikri çok daha eskilere dayanmaktadır (69-71). Apoptosiz hücre popülasyonu'nun sürdürülmesi için normal gelişim ve yaşam boyunca devam eden homeostatik bir mekanizmadır. Ayrıca apoptozis immün reaksiyon veya hücrelerin hastalık veya noxious ajanlardan etkilendiği durumlarda da savunma mekanizması olarak ortaya çıkar (72). Apoptozisi tetikleyen fizyolojik ve patolojik birçok neden bulunmaktadır, İyonize radyasyon ve kanser tedavisinde kullanılan

kemoterapötik ajanlar hücrede DNA hasarı oluşturarak p53-bağımlı yolak üzerinden apoptozu indüklemektedir. Ayrıca stimulatörün çeşidine bağlı olarak hücrelerin apoptozise uğrayıp uğramayacağı değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin kortikosteroid tarzı hormonlar timosit gibi bazı hücrelerde apoptozu gerçekleştirmekte olmasına rağmen timosit dışındaki hücreler bu süreçten etkilenmemektedir. Ayrıca bazı hücreler ligand bağlanarak apoptoz oluşturan FAS veya TNF reseptörleri eksprese etmektedir. Bazı hücreler ise hormon veya büyüme faktörü eksikliği durumunda sürekli apoptotik süreç içerisinde bulunabilmektedir. Hücrede apoptozis ve nekrozun birbirinden bağımsız şekilde gerçekleşmesi, sırayla veya simultane şekilde oluşması gibi durumlarda söz konusu olabilmektedir (73,74). Genel olarak stimülasyonun türü ve miktarı hücrenin ve/veya dokunun apoptoz'a mı yoksa nekroza mı gideceği konusunda karar vermektedir. Isı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik anti kanser ilaçları gibi etmenler düşük dozlarda apoptozis şekillendirirken bu etmenlere yüksek miktarlarda maruziyet, nekroza sebebiyet verebilmektedir (75). Apoptoz kaspazların yoğun etkisinin bulunduğu spesifik bir süreçle gerçekleşir. Bu sürecin sonunda kaspaz-3 veya kaspaz-7 gibi çeşitli kaskad sinyalleri oluşur ve hücre ölümü gerçekleşir. Apoptozu uğrayan atık durumdaki hücreler makrofajlar tarafından eferositozis olarak adlandırılan bir sürecin sonunda ortadan kaldırılır (76). Apoptozis enerji gerektiren ve kaskad oluşumu ile şekillenen kompleks bir süreçtir. Yapılan araştırmalar apoptotik iki yolağın varlığını ortaya koymuştur. Bunlar ölüm reseptörü yolağı veya diğer adıyla ekstrinsik (dış) yolak ve mitokondriyal yolak veya diğer adıyla intrinsik (iç) yolak (Şekil-11). Ancak iki yolağın birbiriyle bağlantılı olduğu ve bir yolaktaki moleküllerin diğer yolağı etkileyebildiği yönünde bulgular mevcuttur (77). İç ve dış yolağın dışında T-hücre sitotoksitesinin etkisinde gerçekleşen, granzim ve perforin bağımlı 3. bir yolak daha mevcuttur. Granzim / perforin yolağı Granzim A veya B aracılığıyla apoptozisi gerçekleştirebilmektedir. İç, dış ve granzim B yolakları aynı sonuca ulaşarak hücreyi ekseküsyon (idam) fazına getirir. Bu süreç kaspaz-3'ün yarıklanması ve DNA fragmentasyonlarının oluşmasını takiben, sitoskelet ve nükleer proteinlerin yıkımı, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimsiklerin oluşması, fagositik hücre reseptörleri için ligandların üretimi ve fagositik hücreler tarafından ortadan kaldırılma ile sonuçlanır. Granzim A ise

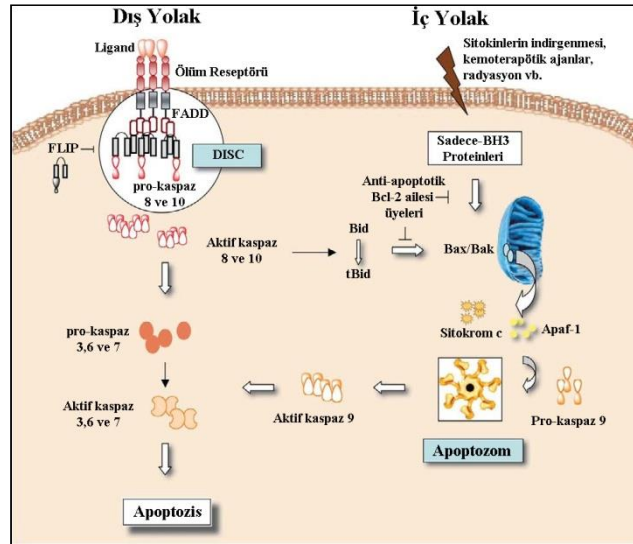
kaspaz bağımsız olarak doğrudan tek zincir DNA hasarı oluşturmak koşuluyla paralel bir yolak şekillendirir (78).

Apoptotik hücreler protein yarıklanması, protein çapraz bağlarının oluşması, DNA yıkımı ve fagositik aktivasyon gibi çeşitli biyokimyasal modifikasyonlar gerçekleştirir ve apoptozise özgü yapısal bir patoloji şekillendirir (79). Apoptoziste rol alan kaspazlar hücrelerde genellikle inaktif olarak sentezlenen proenzimlerdir ve aktifleştiklerinde diğer kaspazları aktifleştirir ve proteaz kaskadını tetiklerler. Bazı prokaspazlar agregasyon yapar ve oto aktivasyon gerçekleştirir. Bir kaspazın bir diğerini aktifleştirdiği bu proteolitik kaskad süreci, hızlı bir hücre ölümü şekillenmesini sağlar. Proteolitik özelliği olan kaspazlar birbirine komşu aminoasitlerin tanınmasını sağlayan spesifik ve birbirinden farklı tanıyıcı alanlar içeriyor olsa da, çoğunlukla proteinleri aspartik asit bölgelerinden yıkıma uğrattırır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirmeye başladığında geri dönüşü olmayan hücre ölümüne giden bir süreç başlamış olur. Bugüne kadar 10 major kaspaz tanımlanmıştır ve fonksiyonlarına göre kategorize edilmiştir. Bunlar başlatıcı kaspazlar (Kaspaz-2,-8,-9,-10), uygulayıcı kaspazlar (kaspaz-3,-6,-7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1,-4,5) (80-82). Bu tanımlanan 10 kaspazın dışında, septik şok'ta apoptoz düzenlenmesinde etkisi olan ve sitokin maturasyonunda etkili olan kaspaz-11, endoplazmik retikulum bağımlı apoptozda ve amyloid- β sitotoksitesinde etkinliği tanımlanmış kaspaz-12, büyükbaş hayvanların genlerinde tanımlanan kaspaz-13 ve embriyonik dokuda şekillenen apoptozda görev alıp yoğun şekilde eksprese edilen ancak olgun organlarda üretilmeyen kaspaz-14 tanımlanmıştır (83-86).

Ekstremsel apoptotik sinyal yolağı tümör nekroz faktör (TNF) reseptör gen ailesinin üyesi olan ve transmembran olan reseptörlerin etkileşimiyle başlar (87). TNF reseptör ailesinin üyeleri benzer şekilde sisteinden zengin ekstraselüler bir alan ve 80 kadar amino asit içeren “death domain” olarak adlandırılan bir sitoplazmik alan bulundurur. Bu death domain ölüm sinyalinin ekstraselüler yüzeyden intraselüler sinyal yolağına aktarılmasında kritik bir rol oynar. Bugüne kadar tanımlanmış olan en önemli ligand ve bu ligandlara uyumlu ölüm reseptörleri (death receptor), FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5'dir (88-92).

Ekstresek apoptozis için tanımlanmış en iyi iki model FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 yolaklarıdır. Bu yolaklarda reseptörlerin kümeleşmesi ve homolog trimer ligandlar ile tutunma şekillenir. Ligandların tutunmasıyla, reseptörlerle bağlanan ilgili ölüm alanlarını tanımlayan sitoplazmik uygulayıcı proteinleri ortaya çıkar. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması FADD uygulayıcı proteinin reseptöre tutunmasını, TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması ise Tümör nekroz faktör reseptörü tip 1-ilişkili ÖLÜM alanı (TRADD), Ölüm alanı içeren Fas-ilişkili protein (FADD) ve Reseptör etkileşimli protein (RIP) uygulayıcı proteinlerinin reseptöre tutunmasını sağlar (93-95). FADD daha sonraki aşamada ölüm efektör domain'in dimerizasyonu aracılığıyla prokaspaz-8 ile etkileşimde bulunur. Bu aşamada prokaspaz-8'in oto aktivasyonunu'nu sağlayan ölüm-indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşturulur (96). Bu DISC yapısı kaspaz-3'ü aktifleştirerek apoptotik sinyali devam ettirir. Bu mekanizmanın şekillendiği hücreler Tip 1 olarak sınıflandırılır. Bazı hücrelerde ise Fas stimülasyonu'nu takiben hücrede DISC kompleks yapısı şekillenmez ve prokaspaz-8 doğrudan oto aktivasyon sağlayarak mitokondri üzerinden apoptotik sinyalleri yönlendirir. Bu tip Fas uyarımlı sinyal yolağı Tip 2 olarak adlandırılır (97). Kaspaz-8'in aktifleşmesiyle apoptoz'un uygulama fazı başlamış olur. Ölüm reseptör yolaklı apoptoz, c-FLIP proteini'nin FADD ve kaspaz-8 e tutunmasıyla inhibe edilebilmektedir (98,99). T-hücrelerinde, reseptör bağımlı apoptozis'in düzenlenmesinde, Toso proteini kaspaz-8'in inhibisyonunu sağlayarak apoptozis'in durdurulmasını sağlar (100). T-hücre bağımlı sitotoksiste, CD8⁺ hücrelerin antijen taşıyan hücreleri öldürdüğü tip IV hipersensitive varyantıdır. Bu sitotoksik T lenfositler (CTLs) hedefteki hücreleri dış yolak ve FasL/FasR etkileşimi ile apoptozise yönlendirebilmektedir. Bu apoptotik aktivasyon en yoğun CTL bağımlı apoptotik aktivasyon türüdür (101). Ayrıca, tümör hücreleri ve virüs enfekte hücrelerde, hedefteki hücrede transmembran poruslar oluşturan bir molekül olan perforin'in sekresyonunu gerçekleştirir ve sitoplazmik granüllerin eksofitik bir şekilde porlara yönelmesini sağlarlar (102). Bu granüllerden en önemlileri serin proteazları olan Granzim A ve Granzim B'dir (103). Granzim B parçalayacağı proteinleri aspartik asid bölgelerinden yıkıma uğratar. Ayrıca prokaspaz-10'u aktifleştirir ve ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase / İnaktif kaspaz Aktive Edici DNAaz) gibi apoptozis inhibitör faktörleri ortadan kaldırır (104). Çalışmalar

ayrıca granzim B'nin Bid ve sitokrom c salınımı yoluyla mitokondriyal yolağı tetiklediğini ve granzim B'nin doğrudan kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozis'i gerçekleştirebildiğini göstermiştir (105,106). Doğrudan kaspaz-3'ün aktive edilmesi sinyal yollarına uğramadan hücrenin doğrudan apoptozis ekseküsyonuna uğramasını sağlamaktadır. Hem mitokondriyal yolak hem de kaspaz-3'ün direkt aktivasyonu granzim-B bağımlı apoptozun şekillenmesinde kritik önem taşımaktadır (107). Son dönemlerde yapılan çalışmalar, granzim B sitotoksitesinin tip 2 helper hücreleri'nin (Th2) etkinliğinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir (108). Son dönemlerde yapılan çalışmalara göre aktive edilmiş Th2 hücrelerinde ölüm reseptörleri ve kaspazlar apoptozis'in düzenlendiği süreçte rol almamaktadır. Buna karşın Sitotoksik Tip 1 Helper (Th1) hücrelerde ise apoptozis'in düzenlenmesinde Fas-Fas ligand etkileşimi, adaptör proteinlerin ölüm alanlarına tutunması ve kaspazlar görev almakta olup, granzim B'nin bir fonksiyonu bulunmamaktadır. Granzim A sitotoksik T hücre indüklü apoptoziste de önemli olup kaspaz bağımsız apoptozisi tetiklemektedir. Hücrede granzim A aktifleştğinde bir tümör süpresör (baskılayıcı) gen ürünü olan DNAaz (NM23-H1) tarafından DNA kırıkları oluşturulur (109).



Şekil-11: Dış ve İç apoptozis yolları (110).

Bu DNAaz, tümör potansiyeli bulunan hücre apoptozisi sayesinde immünojenik gözetim yaparak kanserleşmeyi önler. Nükleozom grubu proteini olan SET protein

kompleksi, normal şartlarda NM23-H1 geni'ni inhibe eder. Granzim A proteazı bu SET kompleks proteinini yarıklar dolayısıyla NM23-H1 inhibisyonu ortadan kalkar ve hücre DNA yıkımı ile apoptozise gider. SET kompleks proteini'nin NM23-H1'in inhibisyonu dışında kromatin organizasyonu ve DNA onarımı üzerinde de kritik bir rolü bulunur. Bu kompleks protein yapısında yer alan proteinler (SET, Ape1, pp32 ve HMG2) kromatin ve DNA yapısını işbirliği yaparak korurlar (111). Dolayısıyla bu kompleks yapının granzim A tarafından inaktif edilmesi DNA ve kromatin yapı bütünlüğünü ortadan kaldırmakta ve apoptozise katkı sunmaktadır.

İntrinsik sinyal yolağı, reseptör bağımsız ancak mitokondri'nin etkisinin bulunduğu bir dizi iç sinyal mekanizmasıyla şekillenir. İntrinsik yolağı tetikleyen uyarıcılar pozitif veya negatif şekilde hücre içi sinyal mekanizmaları oluşturmaktadır. Negatif sinyaller, çeşitli büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinler'in ortadan kalkmasını sağlar dolayısıyla ölüm programını süprese eden mekanizma ortadan kalkarak hücre apoptozise gider. Bir diğer deyişle negatif şekilli mekanizma, faktörlerin ortadan kalkması, apoptotik süpresyonun yok oluşu ve daha sonraki aşamada apoptozisin aktivasyonu şeklinde açıklanabilir. Bir diğer uyarıcı olan pozitif şekilli uyarıcılar radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller olarak açıklanabilir.

Her iki stimulyonda mitokondriyal membranda değişikliklere neden olur ve bu da mitokondri permabilisyon geçiş proteinlerinin (MPT) mitokondri membranında poruslar oluşturmaya, dolayısıyla mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybına ve pro-apoptotik olarak sınıflandırılan ve normal şartlarda inter membran lokalize olan iki ana protein grubunun sitosole geçmesini neden olur (112). Mitokondriyal inter membran alandan sitosole geçen ilk grup içerisinde yer alan proteinler, sitokrom-c, Smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi'dir (113-116). Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive ederler. Sitokrom-c, Apaf-1 ve prokaspaz-9'a tutunur ve bu 3 protein apoptozom kompleksini oluşturmak suretiyle aktif hale gelerek kaspaz-3 ü aktifleştirir (117,118). Buna karşın bazı canlılarda ise apoptozom oluşumu için sitokrom c varlığına ihtiyaç duyulmamaktadır (119). Bu apoptozom kümeleşmesi kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar. Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi proteinlerinin ise IAP (Apoptozis inhibitör proteini) proteinini inhibe ederek apoptozisi tetiklemektedir (115,120). IAP ile etkileşimde

bulunan ve aktivitesini süprese eden başka mitokondriyal proteinler de tanımlanmıştır ancak gen baskılanmış deneysel çalışmalarla bu proteinlerin IAP'a tutunmasının pro-apoptotik özelliklerini göstermede yeterli olmadığı belirtilmiştir (121). İkinci grup pro-apoptotik proteinler Apoptozis İndükleyici Faktör (AIF), endonükleaz G ve Kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) mitokondride apoptozis esnasında oluşturulur ancak bu proteinlerin aktif fonksiyonları hücre'nin ölüme gittiği süreçteki geç bir aşamadır. AIF nükleusa transloke olduktan sonra DNA'da ~50– 300 kb parçaları şeklinde fragmentasyonlar oluşturur ve periferal nükleer kromatinin kondanse bir hale gelmesini sağlar (122). Nükleer kondansasyon'un bu erken formu "1. aşama" kondensasyon (yoğunlaşma) olarak tanımlanır (123). Endonükleaz G de, nükleusa transloke olur ve nükleer kromatini oligonükleozomal DNA fragmentasyonları oluşturmak üzere parçalar (124). Dolayısıyla AIF ve endonükleaz G kaspaz-bağımsız şekilde hareket eder ve DNA yıkımını gerçekleştirir. CAD ise mitokondride üretilip nükleusa transloke olduktan sonra kaspaz-3 tarafından yarıklanarak aktif hale gelir ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonları ve daha belirgin şekliyle kromatin yoğunlaşması gerçekleştirir (125). Bu geç ve daha sıklıkla tanımlanan kromatin kondensasyonu "aşama 2" kondensasyon olarak tanımlanır (123). Bu mitokondriyal apoptotik süreçlerin kontrol ve düzenlenmesi Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından yapılır (126). Her ne kadar bütün mekanizma tam olarak anlaşılammış olsa da, Bcl-2 ailesi proteinlerinin organizasyonunda, tümör baskılayıcı bir protein olan p53 kritik bir rol oynamaktadır (127). Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriyal membran permabilitesini yönetir ve bu fonksiyonundan ötürü pro-apoptotik veya anti-apoptotik olarak görev alır. Bcl-2 ailesi 3 alt gruptan oluşur. Bunlar Pro-apoptotik ve sadece BH3 içeren grupta yer alan üyeleri (Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf, and Bad), pro-apoptotik efektör grupta yer alan moleküller (Bax ve Bak) ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, A1, and Bcl-B) şeklindedir (128). Bu proteinler hücrenin apoptozise ilerleyişini veya sürecin iptaline etki edecek spesifik özelliklere ve öneme sahiptir. Bcl-2 ailesi proteinlerinin esas görevinin, mitokondride üretilen sitokrom-c'nin sitosole geçişinde kullandığı mitokondri membran permabilizasyonu sonucu oluşan poruslar üzerindeki etkisi olduğu söylenebilir. Birkaç muhtemel mekanizma belirtilmiş olmasına rağmen mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır.

Fas sinyal yolağıyla gerçekleşen bazı apoptotik süreçlerde mitokondriyal hasar BH3 interacting-domain death agonist (Bid) protein'in kaspaz-8 tarafından yarıklanması ile düzenlenir (129,130). Bu durum ölüm reseptörü (ekstrensek) ve mitokondriyal (intrensek) yolakların apoptozis'e giden süreçte kesiştiği basamaklardan bir tanesidir (77). Pro-apoptotik Bad'in (BCL2 associated agonist of cell death) serin fosforilasyonu, multifonksiyonel fosfoserin bağlayıcı molekül ailesinin yesi olan 14-3-3 proteini aracılığıyla gerçekleştirilir. Fosforile edilmiş olan Bad, 14-3-3 proteini tarafından uzak bir bölgede tutulur ancak Bad fosforilasyonu ortadan kalktığında mitokondriye doğru yönelir ve sitokrom c'nin sitosole salınımını tetikler (131). Bad aynı zamanda Bcl-XL veya Bcl-2 ile de heterodimer yapı oluşturup bu anti apoptotik proteinlerin koruyucu özelliklerini ortadan kaldırmak suretiyle hücre ölümünde görev alır (132). Her ne kadar mekanizması tam olarak aydınlatılmış olmasa dahi, Bad tarafından indirgenmeyen Bcl-2 ve Bcl-XL mitokondriden sitokrom-c salınmasını inhibe etmektedir. alışmalar Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerinin, apoptotik hücre ölümünü öncelikli olarak kaspaz proteazların aktivasyonunu kontrol ederek inhibe ettiğini göstermiştir (133). Ayrıca Aven proteini de hem Bcl-XL hem de Apaf-1 proteinlerine tutunarak prokaspaz-9'un aktive olmasını engellemektedir (134). Hem Bcl-2 hem de Bcl-XL'in aşırı eksprese olması bu proteinlerin üretimini indirgemektedir. Bu durum da iki protein arasındaki doğrudan ilişkiyi görmemizi sağlamaktadır. Puma ve Noxa proteinleri Bcl-2 ailesinin yesi olan pro-apoptotik proteinlerdir. Puma, p-53 aracılı apoptozis'te önemli bir rol alır. Puma'nın aşırı eksprese olmasının BAX ekspresyonunu tetiklediği ve oluşan BAX konformasyonel değişimlerinin bu proteinin mitokondriye transloke olmasını, mitokondride sitokrom c üretiminin artmasını ve mitokondriyal membran potansiyelini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (135). Noxa, p-53 indüklü apoptozis'te görev alan bir proteindir. alışmalar, bu protein'in mitokondriye transloke olarak anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üyeleriyle etkileşime geçerek kaspaz-9'un aktivasyonuna katkı sağladığını açıklamıştır (136). Hem Puma hem de Noxa'nın p-53 tarafından indkleniyor olması, bu proteinlerin geno-toksik ve onkogen aktivasyonu ile ortaya çıkan apoptozis'te düzenleyici olarak görev alabildiklerini göstermektedir. Myc onkoproteininin'de hem p-53 bağımlı hem de p-53 bağımsız sinyal yolaklarında apoptozisi etkileyen bir

protein olduğu belirlenmiştir (137). Apoptozdaki bu kompleks yolların anlaşılması tümörögenез ve terapisi konusunda önemli bilgiler vermektedir. Hem dış hem de iç apoptotik yollar ekseküsyon (sonlanma) fazı olarak adlandırılan bir süreçle tamamlanır. Sonlandırıcı kaspazların aktivasyonu ile apoptozis'in bu süreci başlar. Sonlandırıcı kaspazlar sitoplazmik endonükleazları aktive eder. Bu sayede nükleer materyal ve proteazlar üzerinde yapısal değişiklikler oluşturularak çekirdek ve sitoskelet proteinleri yıkıma uğrattır. Kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 efektör veya sonlandırıcı kaspazlar olarak görev alırlar. Bu kaspazlar sitokeratinler, PARP, plazma membran sitoskelet proteini olan alfa fodrin, nükleer bir protein olan NuMA ve diğer bazı proteinleri yıkıma uğratarak apoptotik hücrelerde gözlenen, morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olur (138). Sonlandırıcı kaspazlar arasında en iyi tanımlanmış ve önemli olanı kaspaz-3'tür ve aktivasyonu başlatıcı (initiator) kaspazlar (kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10) tarafından gerçekleştirilir. Kaspaz-3 spesifik olarak endonükleaz CAD proteinini aktifleştirir. Proliferasyon yapmakta olan hücrelerde CAD inaktif ve kompleks formu olan ICAD halinde bulunur. Apoptotik hücrelerde kaspaz-3 aktifleşerek ICAD'ı yıkıyarak CAD'ın ortaya çıkmasını sağlar (104). CAD daha sonra kromozomal DNA'yı nükleusta parçalayarak kromatin yoğunlaşmasına neden olur. Kaspazlar ayrıca sitoskelet yapısında bozukluklar oluşturularak apoptotik cisimcikleri şekillendirir. Kaspaz-3 tarafından aktive edildiği tanımlanan bir diğer önemli protein de, sitoskeletin temel elemanı Aktin'e tutunan Gelsolin'dir. Kaspaz-3 sırasıyla gelsolin ve gelsolinin fragmentlerini yıkıyarak aktin filamentlerinin kalsiyum bağımsız bir süreçte yıkımını sağlar. Ortaya çıkan bu durum, sitoskelet, intraselüler transport, hücre bölünmesi ve sinyal transdüksiyonu gibi hücre içi fonksiyonların ortadan kalkmasına neden olur (139). Apoptozis'in sonunda gerçekleşen süreç apoptotik hücrenin fagosite edilmesidir. Membran fosfolipid asimetrisi ve normal şartlarda hücre iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin'in membran dışına dönmesi fagositik sürecin başlamasını sağlar. Her ne kadar fosfatidilserin'in dış yüzeye transloke olmasını sağlayan mekanizma tam olarak anlaşılammış olsa da, bunun aminofosfolipid translokaz aktivitesinin ortadan kalkması ve fosfolipidlerin nonspesifik flip-flop hareketiyle gerçekleşebileceği düşünülmektedir (140). Bazı çalışmalar oksidatif stres şekillenen eritrositlerde Fas, kaspaz-8 ve kaspaz-3'ün fosfatidilserin'in hücre dışına

dönmesinde etkili olduğunu göstermiş olmasına rağmen, primer T-lenfositlerde şekillenen apoptozis'te bu kaspazların fonksiyonel olmadığı gösterilmiştir (141,142). Fosfotidilserin'in apoptotik hücrelerin dış yüzeyine lokalize olması enflamatuvar olmayan fagositik tanınma sürecini gerçekleştirerek apoptozis şekillenen hücrelerin hızlı bir şekilde ortadan kaldırılmalarını sağlar (143).

Normal fizyolojik şartlarda şekillenen apoptozis karşıt durumu olan mitoz kadar önemli ve gereklidir. Hücre popülasyonlarının düzenlenmesinde mitoz ve hücre proliferasyonunda tamamlayıcı fakat zıt bir rolü bulunmaktadır. Yetişkin vücudunda apoptozis ile ortadan kalkan hücrelerin oluşturduğu boşluğu doldurmak ve homeostaz'ın sağlanması için her gün yaklaşık 10 milyar hücrenin üretildiği tahmin edilmektedir (144). Normal gelişim, yaşlılık ve hastalıklarda bu sayının önemli derecede arttığı düşünülmektedir. Çeşitli gelişimsel süreçlerde apoptozis kritik bir öneme sahiptir. Örneğin, sinir ve immün sistem gelişiminde aşırı hücre üretimi şekillenir. Bu aşırı hücre popülasyonu sistemin fonksiyonel özelliklerini sürdüreceği yapı dışındaki hücrelerin apoptozise uğraması ve ortadan kalkması ile sabitlenir. Yani aşırı sayıda olan sinir sistemi hücreleri sayılarını azaltarak sinaptik yapılar oluşturmaya başlar veya immün sistem hücrelerinin antijen spesivitesi aşırı hücre popülasyonu indirgenmişinde şekillenmeye başlar (145,146). Apoptozis aynı şekilde patojen işgali altındaki hücrelerde, yara iyileşmesinde, inflamatuvar hücrelerin ortadan kaldırılmasında, granülasyon dokusunun skar dokusuna dönüştürülmesinde görev alır (147). Yara iyileşmesinde apoptozis'in disregülasyonu aşırı skar dokusu ve fibrozis gibi yara iyileşmesinin patolojik formlarına neden olabilmektedir. Apoptozis aynı şekilde, aktive edilmiş veya oto-agresif immün hücrelerinin lenfoid organlardaki olgunlaşma safhasında (kemik iliği ve timus) veya periferel dokuda elimine edilmesi sürecinde gereklidir (148). Apoptozis ayrıca postovulatuvar foliküllerde, foliküler atrezi ve post-laktasyon sürecinde meme bezlerinin düzenlenmesi için de gereklidir (149,150). Dahası, organizma yaşlandıkça bazı hücreler daha hızlı bozulmaya başlar ve apoptozis ile elimine edilir. Teoride, yaşlanma ile ilişkili apoptoziste oksidatif stres'in primer görev aldığı ve apoptozis'in kümeleşen serbest radikallerin mitokondriyal DNA üzerinde hasar oluşturma suretiyle katkıda bulunduğu düşünülmektedir (151,152). Açık olan şudur ki, apoptozis dengeli bir şekilde gerçekleşmelidir. Çünkü gereksiz veya yetersiz apoptozis gelişimsel defektler,

otoimmün rahatsızlıkları, nörodejenerasyon ve kanser gibi patolojilere neden olabilmektedir. Kanser, otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS), edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS), iskemi gibi hastalıklar ayrıca parkinson, alzheimer, huntington ve amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların şekillenmesinde hücre ölümünün düzenlenmesindeki anormallikler büyük yer tutmaktadır. Bu hastalıkların bir kısmı yetersiz apoptozis'ten bazıları da aşırı apoptozis'ten kaynaklanmaktadır. Hücre normal siklik fonksiyonunun yok olduğu ayrıca hücrelerin hem aşırı proliferasyon olduğu hem de bu hücrelerin ortadan kaldırılamadığı patolojik süreçlere, kanser örnek verilebilir (153). Genel olarak bazı kanser türlerinin şekillenmesinde karsinogenez sürecinde apoptozis'in süprese oluşunun kanserin şekillenmesinde önmlü bir rol oynadığı düşünülmektedir (154). Bu tümör hücrelerinin apoptozis'i süprese etmesinde çeşitli moleküler mekanizmalar mevcuttur. Tümör hücreleri Bcl-2 gibi anti apoptotik proteinleri ekspresyon ederek veya Bax gibi pro-apoptotik molekülleri indirgeyerek veya mutasyona uğratarak apoptozise karşı direnç gösterirler. Hem Bcl-2 hem de Bax ekspresyonu p53 tümör süpresör geni tarafından düzenlenmektedir (155). p53'ün orta ve düşük düzeyde ekspresyonu hücre yaşamsal fonksiyonları için çok kritik olan PCNA'nın ekspresyonunu destekler ancak yüksek derecede p53 varlığı PCNA üretimini baskılamaktadır (Yamaguchi et al. 1994, Shivakumar et al. 1995, Morris et al. 1996). İnsan B hücre lenfomalarının bazı türlerinde Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu ile ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu keşif hücre ölümü başarısızlığının kansere katkıda bulunduğuna dair ilk ve en güçlü kanıtlardan biridir (156). Kanserde apoptozis'in süprese edilmesindeki bir diğer yöntem de tümör hücrelerinin immün sisteme karşı hayatta kalabilmesidir (157). Bazı immün hücreleri (T hücreleri ve NK hücreleri) normal şartlarda tümör hücrelerini perforin/granzim B yolağıyla veya ölüm-reseptör yolağıyla ortadan kaldırırlar. Bazı tümör hücreleri, ölüm reseptör yolağında T hücreleri tarafından üretilen FasL'a yanıtı azaltarak immün yanıtı kaçınabilir. Bu mekanizmanın, tümör hücrelerinde Fas reseptörünün down regüle edilmesiyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Ayrıca fonksiyonel olmayan Fas reseptörü ekspresyonu, Fas ligandı bölgeden uzaklaştırabilen, Fas reseptörünün çözünebilir formunun aşırı derecede üretilmesi ve Fas ligand'ın doğrudan tümör hücre yüzeyinde üretilmesi de tümör hücrelerinin immün yanıtı kaçabilmesine olanak sağlamaktadır

(158-160). Hatta tümör hücreleri immün yanıtı karşı Fas ligand aracılı bir karşı atak oluşturarak tümör infiltrate durumdaki aktif lenfositleri ortadan kaldırmaktadır (161). Hücre içi sinyal mekanizmalarının yıkımı apoptozis'in disregülasyonu ve kansere neden olabilmektedir. Hücre siklusunu düzenleyici bir transkripsiyon faktörü olan tümör süpresör geni p53, olup, insan tumörögenezinde en çok mutasyona maruz kalan genidir (162). İnsan kanserlerinin %50'sinde p53 mutasyon mevcudiyeti, p53'ün kanserdeki kritik önemini göstermektedir. p53 DNA'da hasar oluştuğunda onarıcı proteinleri aktifleştirebilir, hücre siklusunu G/S fazında tutarak DNA hasarının belirlenmesini sağlayabilir. Şayet DNA hasarı geri dönüşü olmayan bir boyuttaysa apoptozis'i tetikleyebilir (163). Eğer bu sistemde sıkıntı oluşursa tumörögenez şekillenebilir. p53 geni bir şekilde hasar görürse hücrenin tümör baskılama kapasitesi bu durumdan ciddi şekilde etkilenebilir. Radyasyon, çeşitli kimyasallar ve İnsan Papillomavirüsü (HPV) gibi etmenler p53 geninde tahribat oluşturabilir. Bu genin sadece bir kopyasını taşıyan insanlarda büyük olasılıkla erken yetişkinlik döneminde tümör gelişmesi ile karakterize Li-Fraumeni sendromu şekillenecektir (164,165). Mutasyonlu Ataksi Telenjiektazinin'de (ATM) tumörögenezde ATM/p53 sinyal yolağı üzerinden etkili olduğu görülmüştür (166). ATM geni tümör süpresör özelliği bulunan bir protein kinaz kodlar. DNA üzerinde iyonize radyasyon kaynaklı hasar, ATM aktivasyonunu indükler ve hücre siklusu bloke edilerek DNA onarımı tetiklenir. p53'ün ATM bağımlı fosforilasyonu, bu mekanizmada etkilidir (167). Daha önceden belirtildiği gibi, p53 hücre büyüme sinyallerini dondurarak DNA üzerinde hasarın onarımı için olanak gerçekleştirir veya hasar düzeltilmeyecek boyuttaysa hücreyi apoptozise zorlar. Bu sistem, somatik genetik/epigenetik değişiklikler ve HPV gibi onkogen viral proteinlerin ekspresyonu yüzünden inaktif hale gelebilir ve tumörögenez şekillenebilir (168). Tümör gelişimine başka hücre sinyal yollarında neden olabilmektedir. Örneğin, tümör hücrelerinde fosfotidilinositol 3-kinaz/AKT yolağının up regüle olması yaşamsal sinyallerden bağımsız hale gelmelerini sağlamaktadır. Bu upregülasyon, apoptozis'in düzenlenmesinin yanı sıra proliferasyon, büyüme ve sitoskelet düzenlenmesi gibi hücresel süreçlere de etki etmektedir (169). Kanserin yanı sıra düşük miktarlardaki apoptozis de otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS) gibi hastalıklara neden olabilmektedir (170). Çoklu otoimmün rahatsızlıklarıyla sonuçlanan bu durum oto-

agresif T hücrelerindeki yetersiz apoptozis'ten kaynaklanmaktadır. B hücrelerinin aşırı proliferasyonu ise aşırı immunoglobulin üretimine neden olmakta ve otoimmüniteye neden olmaktadır. Hemolitik anemi, immün-aracılı trombositopeni ve otoimmün nötropeni gibi durumlar ALPS'nin yaygın olan hastalıkları olarak tanımlanabilir. Bu birbirinden farklı hastalıklar farklı mutasyonlardan köken almaktadır. Tip 1A, death domain (ölüm bölgesi), Tip 1B, Fas ligand ve Tip 2 ise kaspaz-10 mutasyonundan kaynaklanmakta ve ilgili proteinin aktivasyon eksikliği söz konusudur. Otoimmün rahatsızlıkları, nörodejeneratif hastalıklar ve iskemi-reperfüzyon hasarı gibi durumlar da aşırı apoptozis ile ilişkilendirilebilmektedir. Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu (AIDS) ile sonuçlanan insan immünodefens virüs (HIV) enfeksiyonu, otoimmün hastalıklara örnek olarak verilebilir (171). Bu virüs CD4⁺ T hücrelerin CD4 reseptörlerine tutunarak enfekte olmasını sağlar. Enfekte olan T hücresinin içerisine geçen viral HIV Tat proteini, Fas reseptör ekspresyonunun artmasına ve apoptotik T hücrelerin oluşmasına neden olur. Aşırı apoptozis oluşmasının çeşitli iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarlarında da önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (172-174). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) bu apoptotik hücre ölümünde etkili olduğu düşünülmektedir (175). T/D hasarı durumunda hücrel ROS miktarı artmakta ve bu serbest radikaller mitokondriyal fonksiyonu ortadan kaldırarak apoptozis'i tetiklemektedir (176,177). Yetersiz kan akışı sonucu şekillenen iskemi durumunda oksijen taşınımında azalma ve hücrelerde ölüm gerçekleşmektedir. Her ne kadar nekroz şekilleniyor olsa da doku iskemisinde yoğun BAX ekspresyonu gerçekleştiği ve çeşitli tedavi yöntemleriyle bu doku hasarının ortadan kaldırıldığı tanımlanmıştır (178). Genel olarak düşünce, iskemi şekillenen organda apoptozis'in indüklenebileceği ancak iskeminin kalıcı olması durumunda nekroz'un daha yoğun olacağı yönündedir. Bunun yanı sıra reperfüzyonla hücreye kan akışı tekrar sağlansa dahi apoptotik kaskadlar apoptotik süreci devam ettirebilmektedir (179). Reperfüzyonla kan akışına rağmen apoptotik sinyallerin devamlılığının iskemi sürecinde dokuda oluşan serbest radikallerden kaynaklandığı düşünülmektedir (180). Testis iskemi/reperfüzyonuna bağlı şekillenen apoptozis'in ise hem mitokondriyal (intrensek) hem de Fas-FasL (ekstrensek) yollarının etkisi altında şekillendiği düşünülmektedir (181).

3.5. PCNA (Proliferasyon Hücre Nükleer Antijeni)

Proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA) DNA replikasyonu ve kromatin düzenleyici süreçlerde ve DNA onarımında kritik öneme sahip bir proteindir. PCNA başlangıçta DNA polimeraz δ ve ϵ yardımcı proteini olarak tanımlanmış olsa da, DNA sentez ve onarımında kritik bir protein olduğu anlaşılmıştır (182,183). PCNA'nın ilk tanımlanması lupus eritematozus'lu hastalarda proliferen hücrelerde keşfiyle gerçekleşmiştir (184). Aynı dönemlerde hücrenin S fazında sentezlenen ve siklin olarak tanımlanan bir protein tanımlanmıştır (185). Daha sonraki dönemlerde aslında bu iki protein'in aynı olduğu ve 29 kDa boyutundaki PCNA olduğu anlaşılmıştır (186). Günümüzde siklin ise hücre siklus düzenlenmesinde görev yapan moleküllerin bulunduğu bir protein ailesini tanımlamak için kullanılmaktadır. PCNA ekspresyonu, hücre siklusunun G1 fazının son % 5 ve S fazının ilk %35'lik kısmında sentezlenmektedir (187). PCNA hücrelerin yaşam ve ölümünde üçlü bir fonksiyona sahiptir. DNA replikasyonu şekillenmediği durumlarda, çoğunlukla p53 gen kontrolü altında bulunan PCNA hücreyi hücrelik siklus arrest'te bekletir. Bu süreç içerisinde DNA'da hasar varsa onarılması için zaman kazandırır. Şayet nükleer hasar düzeltilemeyecek boyutta ise ortamda fonksiyonel PCNA'nın azalması veya tamamen ortadan kalkması hücreyi apoptozis'e yönlendirir (188). Ayrıca çoğunlukla proliferasyon marker'ı olarak kullanılan PCNA kanser gibi ölüm mekanizma hasarı barındıran hücrelerde normal düzeyin üstünde eksprese edilmektedir (189). PCNA'nın kanser hücrelerinde doğal sitotoksik reseptörü NKp44'ü inhibe ederek immün kaçınımaya yardımcı olduğu düşünülmektedir (190). Her ne kadar nükleer bir protein olsa da PCNA'nın bazı hücrelerde sitosolde de fonksiyon gösterdiği bilinmektedir. PCNA'nın proliferen olma kapasitesine sahip olmayan hücrelerde de eksprese olması ve bunun hücrenin survival durumunu tanımladığı düşünülmektedir. In vitro çalışmalarda PCNA aşırı eksprese eden hücrelerde indüklenen hem iç hem de dış yolaklı apoptozis'in gecikmeye uğradığı, PCNA over eksprese eden immatür hücrelerin olgunlaşmış hücreler gibi hareket ettiği ve nötrofil gibi kısa ömürlü hücrelerin yaşam sürelerinin uzadığı gözlenmiştir. PCNA mutasyonu'nun ise anti-apoptotik proteinlerin fonksiyonları üzerinde yıkıcı bir etkisi olduğu düşünülmektedir (191). Fonksiyonel PCNA

oksidatif stres kaynaklı apoptoziste Bax/Bcl-2 proteinleri üzerinden apoptotik süreci ortadan kaldırma kapasitesine sahiptir (192). Proliferatif retinal hastalıklarda proliferasyon/apoptozis dengesinin etkili olduğu ve bu patolojik durumun kaspaz-3 ve PCNA ekspresyon düzeyleriyle doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir (193).

3.6. Allopurinol [4-hydroxypyrazolo(3,4-d) pyrimidine]

Allopurinol, 1950'lerin başlarında Gertrude Elion ve arkadaşları tarafından anti-lösemi ilacı (tiyoguanin, merkaptopurin ve azatiyopürin) üretmeye çalıştıkları bir dönemde geliştirildi (194). Lösemi kürü olabilecek bir araştırmanın yanı sıra, araştırmacılar oksidatif stres ve ürik aside neden olan ksantin oksidaz enzimini indirgeyen bir bileşik üretmeyi de hedeflediler. Oluşturulan birçok bileşiğin sonunda ksantin oksidaz inhibitörü ve substratı olan allopurinol'un (4-hydroxypyrazolo(3,4-d)pyrimidine) üretilmesi gerçekleşti. Uzun süreli çalışmalarla birlikte, hiperürisemik ve inflamatuvar bowel hastalığı gibi durumlar üzerinde allopurinol'un etkinliği ve güvenilirliği görüldü (195). Bir pürin analogu ve antioksidan olan allopurinol, birçoğu hastalığın tedavi planlamasına dahil edildi ve günümüzde de tıbbi amaçları araştırılmaktadır (196). Elli yıldan uzun bir süredir, allopurinol böbrek taşı ve tümör lizis sendromu ilişkili hiperürisemik durumlar ve gut hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (197). Ayrıca, allopurinole Leishmania ve Tripanozoma cruzi gibi partiküler protozoa kaynaklı enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde de başvuruldu (198,199). Son yıllarda, amilotory bağırsak hastalığı ve otoimmün hepatitli hastaların tedavisinde ayrıca tiyopurinlerle immünomodülasyon tedavisini optimize etmek amacıyla da allopurinol kullanılmaktadır (200,201). Allopurinol'ün düşük dozlu azatiyoprin veya merkaptopurin ile kombine edilerek kullanımı, tiyopurinlerin metabolizmasını olumlu şekilde etkileyerek etkinliğini arttırmakta ve tiyopurin son ürünlerinin toksisitesini ortadan kaldırmaktadır (202). Ayrıca allopurinol kardiyovasküler ve reproduktif tıpta da kullanılabilirliği potansiyelini göstermiştir. Yüksek dozlarda kullanılan allopurinol, reperfüzyon hasarıyla ortamda yükselen serbest radikalleri indirgeme kapasitesine sahiptir (203). Allopurinol'ün iskemik kalp rahatsızlığı olanlarda endotel disfonksiyonu'nu ortadan kaldırdığı ve egzersiz kapasitesine katkı sunmaktadır. Ayrıca doğum asfiksinden sonra şekillenen sinir hasarlarına karşı nöroprotektif bir etkisi olduğu bilinmektedir (204,205).

3.7. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil kroman-2-karboksilik asit)

Trolox bir α -tokoferol (Vitamin-E) analogudur. Tokoferollerdeki hidrofobik ptil grubunun hidrofilik karboksil grubuyla yer değiştirmesiyle elde edilmiştir. Troloxtaki bu modifikasyon tokoferol analogu bu bileşiğe suda çözünebilme özelliği kazandırmıştır (206). Trolox gıda ve kozmetik endüstrisinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (207,208). Trolox bir vitamin-E analogu olmasıyla beraber güçlü bir antioksidan özelliğine sahiptir. Ayrıca suda çözünebilen bu sentetik vitamin peroksil radikallerini vitamin E'ye göre daha güçlü bir şekilde ortadan kaldıracılabilmektedir (209). Trolox'un oksidatif hasarı ortadan kaldırdığına yönelik kanıtlar sunan hem in vitro hem de in vivo çok sayıda çalışma mevcuttur (210-212). Klinik ve pre-klinik çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılıyor olmasının nedeni vitamin-E'nin (α -tokoferol) suda çözünebilir bir analogu olmasına rağmen bazı özellikleriyle bu vitaminden tamamen ayrı bir molekül olarak değerlendirilmektedir. α -tokoferol aktive olan insan monositlerinde proinflammatuvar sitokin olan IL-1 β üretimini 5-lipooksijenaz yolağı üzerinden azaltmaktadır (213). Ancak trolox bu 5-lipooksijenaz yolağı üzerinde veya IL-1 β üretiminde bir etki göstermemektedir (214,215). Ayrıca α -tokoferol'un antiproliferatif ve kinaz inhibitörleri üzerindeki inhibe edici etkisi olmasına karşın trolox'un kinaz inhibitörlerinin üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamaktadır (216). Bu fonksiyonel farklılıklar birbirinin analogu olan bu iki molekülün farklı tedavi ve çalışmalarda kullanılmasına neden olmuştur.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Deneysel Hayvanların Temini, Deneysel Düzenlenmesi ve Sonlandırılması

Deneysel çalışmamız Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi Hayvan Deneysel Yönel Etik Kurulu'ndan alınan 26.04.2018 tarih ve 2018/05'nolu izin çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Tüm deneysel süre boyunca bilim uğruna kurban edilen hayvanların refahına özen gösterilmiştir. Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (DÜSAM) temin edilen 15-16 haftalık ağırlıkları 300-350 gr aralığında değişen 28 adet Sprague – Dawley cinsi erkek rat kullanılmıştır. Ratlar rastgele 4 eşit gruba (n=7) bölünmüştür. Deneysel hayvanlar için 1 hafta adaptasyon süresi sağlanarak standart pellet yem ve suya ad libitum ulaşım sağlanmıştır. Deneysel aşama başladığında hayvanlar 50/10 mg/kg Ketamin/Ksilazin i.m. enjekte edilerek genel anesteziye alınmış ve ilgili işlemler gerçekleştirilmiştir. Tüm cerrahi işlem uygulanan hayvanlara post operatif 1 mg/kg Dolorex (Butorfanol) s.c. olarak enjekte edilmiştir. Genel anesteziye alınan hayvanlarda sedasyon kontrolü düzenli aralıklarla sağlanmıştır. 1. gruptaki (kontrol) hayvanlar herhangi bir cerrahi operasyona tabi tutulmadı ve deney sonunda sakrifiye edildi. 2. gruptaki hayvanlar (Torsiyon/Detorsiyon) genel anesteziye alınarak skrotum orta hattından insuzyon yapıldı. Sol testisler saat yönünde 720° döndürülerek tunika dartosa sabitlendi. 5 saatlik iskeminin son 30 dakikasında bu gruptaki hayvanlara i.p. serum fizyolojik enjekte edildi. Beşinci saatin sonunda skrotum dikişleri açılarak sol testisler manüel olarak eski haline getirildi. Skrotum tekrar kapatıldı ve testisler 2 saat süreyle reperfüze edildi. Reperfüzyon süresi sonunda hayvanlar sakrifiye edildi. 3. gruptaki hayvanlar (Torsiyon / Detorsiyon + Allopurinol) genel anesteziye alındıktan sonra skrotum orta hattından insuzyon yapıldı. Sol testisler saat yönünde 720° döndürülerek tunika dartosa sabitlendi. 5 saatlik iskeminin son 30 dakikasında bu gruptaki hayvanlara i.p. 200 mg/kg allopurinol enjeksiyonu yapıldı. 5. saatin sonunda skrotum dikişleri açılarak sol testisler manüel olarak eski haline getirildi. Tekrar kapatılan skrotumda yer alan testisler 2 saat süreyle reperfüze edildi. Reperfüzyon süresi sonunda hayvanlar sakrifiye edildi. 4. gruptaki hayvanlar (Torsiyon / Detorsiyon + Trolox) i.m. genel anesteziye alındı. Genel anestezi altında skrotum orta hattından insuzyon yapıldı. Sol testisler saat yönünde 720° döndürülerek tunika

dartosa sabitlendi. Beş saatlik iskeminin son 30 dakikasında bu gruptaki hayvanlara i.p. 50 mg/kg trolox enjeksiyonu yapıldı. 5. saatin sonunda skrotum dikişleri açılarak sol testisler manüel olarak eski haline getirildi. Tekrar kapatılan skrotumda yer alan testisler 2 saat süreyle reperfüze edildi. Reperfüzyon süresi sonunda hayvanlar sakrifiye edildi. Tüm hayvanlar kalpten kan alma suretiyle sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen hayvanların kan örnekleri MDA analizi için kullanıldı. Sol testisler'de Zinc formalinde (Sigma #Z2902) fiksasyona alındı. Oluşan atık, toplama poşetlerine alınarak imha edilmek üzere DÜSAM personeline teslim edildi.



Şekil-12: İskemi uygulanan ve suture edilen skrotum'un görüntüsü.



Şekil-13: Reperfüzyon sonrası testis'in görüntüsü. İskemi oluşturulan sol (kalın ok) ve kontralateral sağ testisin (ince ok) görünümü.

4.2. Kan Serum Malondialdehit (MDA) Değerlerinin Ölçülmesi

Sakrifiye edilen hayvanlardan intrakardiyak alınan 8 ml kan örnekleri tüplere aktarıldıktan sonra 3000 rpm'de, 15 dk santrifüj edildi. Elde edilen plazma ayrı bir tüpe aktarılarak -80°C de MDA analizi gerçekleştirilene kadar muhafaza edildi. MDA analizi gerçekleştirilirken 0.5 ml plazma, 2.5 ml %20'lik trikoloroasetik asit (TCA) eklenerek vortex ile karıştırıldı. Müteakiben, karışıma 1 ml % 0.6'lık tiyobarbitürik asit (TBA) eklenip 10 dk vorteks ile karıştırıldıktan sonra, kaynar su içersinde 30 dk süre ile bekletildi. Soğuyan karışımın absorbans değerleri,

spektrofotometre ile 532 nm’de okundu. Sonuçlar, ekstinksiyon katsayısı (1.56x105) ve seyreltme faktörleri hesaba katılarak ($\mu\text{mol/l}$) olarak gösterildi. Elde edilen MDA değerleri SPSS 24.0 (IBM, ABD) ile normallik testine tabi tutuldu. Normalite uygunluğu gözlenen veriler daha sonra ONE Way Anova, Post-Hoc Tukey testlerine göre analiz edildi. İstatistiksel veriler bakımından $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

4.3. Rutin Histolojik Takip

Sakrifiye edilen hayvanlardan alınan testis örnekleri tamponlanmış Zinc formalin (Sigma #Z2902) içerisinde ön fiksasyona tabi tutuldu 6 saat ön fiksasyon sonrası küçültülen dokular toplamda 18 saat süreyle fikse edildi. Fiksasyon sonrası 12 saat çeşme suyunda yıkanan doku örnekleri dehidrasyon için artan alkol serilerinden geçirildi. %50 ve %70’lik alkolde 1’er gece bekletilen örnekler daha sonra %80-%90-%96-%100’lük alkolserilerinde 2’şer saat dehidrate edildi. Dehidrate edilen dokular 2 kez 5’er dakika Xylol’de şeffaflandırıldı. Şeffaflandırılan doku örnekleri %50 Xylol içeren erimiş parafin içerisinde 55 °C inkübatörde 1,5 saat bekletildi daha sonra temiz erimiş parafin içerisinde 55 °C inkübatörde 2,5 saat daha doku içerisine parafin nüfuzu sağlandı. Daha sonra doku örnekleri blokların içerisine dökülen sıvı parafine gömüldü ve bloklar katılaşıncaya kadar oda ısısında muhafaza edildi. Elde edilen bloklardan 5 μm kalınlığında kesitler polilizin kaplı lamlara alındı.

4.4. Histokimyasal Metodlar

Parafin bloklara gömülen doku örneklerinden rotary mikrotom (Leica) ile alınan 5 μm kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı ve uygulanacak boyamalar için 55 °C’ye ayarlı inkübatörde 1 saat parafin depolimerizasyonu sağlandı. İnkübatörden alınan seri kesitlerde Hematoksilen & Eozin (H&E) ve Periyodik asit–Schiff (PAS), boyamaları uygulandı.

4.4.1. Hematoksilen – Eozin Boyama Protokolü

Daha önce polilizin kaplı lamlara alınan kesitler 2 seri Xylol de 15’er dk deparafinize edildi. Xylolden alınan kesitler azalan alkol serilerinde (%100, %100, %96, %90, %80, %70) 5’er dakika rehidre edildi. Distile suya getirilen kesitler 5 dk oda ısısında

muhafaza edildi. Hematoksilende 8 dakika boyunca çekirdek boyamasına bırakılan kesitler 5 dakika çeşme suyunda yıkandı distile suya aktarıldı. Distile suda 1 dakika bekletilen kesitler %1'lik asit alkole daldırılıp çıkartılmak suretiyle fazla hematoksilenden arındırıldı. Daha sonra kesitler distile suda 5 dakika yıkandı. Distile suda asit alkolden arındırılan örnekler Eozin de 3 dakika süreyle boyandı. Sürenin sonunda artan alkol serilerinden %70 ve %80'lik alkollere daldırılıp çıkartılan kesitler %96'lık alkoklede 1 dakika bekletildi. 2 seri Xylolde 15'er dakika şeffaflandırılan örnekler entellan ile kapatıldı.

4.4.2. PAS Boyama Protokolü

Daha önce polilizin kaplı lamlara alınan kesitler 2 seri Xylol de 15'er dk deparafinize edildi. Xylolden alınan kesitler azalan alkol serilerinde (%100, %100, %96, %90, %80, %70) 5'er dakika rehidre edildi. Distile suya getirilen kesitler 5" oda ısısında muhafaza edildi. %0,5'lik Periyodik asit içerisinde 5 dakika bekletilen kesitler çeşme suyunda 5 dakika süreyle periyodik asitten arındırıldı. Distile suya aktarılan kesitler daha sonra 15 dakika süreyle Schiff reaktifinde boyandı. Çeşme suyunda yıkanan kesitlerde gözle pembelik değerlendirildi. Hematoksilen ile zıt boyama yapılan kesitler çeşme suyunun altında 5 dakika yıkandı ve artan alkol serilerinde (%70, %80, %90, %96, %100) 5'er dakika süreyle dehidre edildi. Xylol'e alınan kesitler 2 seri 15 'er dakika şeffaflandırıldı ve entellan ile kapatıldı.

4.5. İmmunohistokimyasal Metodlar ve TUNEL Assay

Rutin histolojik takip sonrası bloklanan testis örneklerinden alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlerde antikor boyaması olarak Proliferasyon Nükleer Antijen (PCNA), Procaspase-3 ve Cleaved Caspase-3 antikor boyamaları gerçekleştirildi. Ayrıca kesitlerde Apoptotik Index değerlendirmesi amacıyla TUNEL Assay uygulanarak testiküler DNA fragmentasyonu incelendi. İmmunohistokimya uygulanan kesitlere yönelik antikor bilgileri ve dilüsyon oranları Tablo-1'de listelenmiştir.

Tablo-1: Kullanılan antikorların katalog, üretim ve dilüsyon oranları.

Antikor'un Adı	Üretici Firma	Cat. No.	Host	Clonality	Dilüsyon
PCNA	Santa Cruz	Sc-25280	Mouse IgG _{2a}	Monoclonal	1/250
Procaspase-3	Novus Biologicals	NBP1-90125	Rabbit IgG	Polyclonal	1/500
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Cell Signaling	#9664	Rabbit IgG	Monoclonal	1/100

4.5.1. PCNA İmmunohistokimya

Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığında kesitler 2 seri Xylol'de 15'er dakika bekletilerek parafinden arındırıldı. Daha sonra azalan alkol serilerinde (%100, %100, %96, %90, %80, %70) 5'er dakika bekletildi. xylolden temizleme işlemi ve rehidrasyon gerçekleştirildi. Distile suya getirilen kesitler immunohistokimya amacıyla 2x5 dk PBS te yıkandı. Metanol içerisinde hazırlanan %3'lük H2O2 de 30 dakika süreyle endojen peroksit blokajı gerçekleştirildi. 2x5 dakika PBS te yıkanan örnekler 7 dakika süreyle Ultra V Block solusyonunda (Thermo, cat no: TA-125-UB) inkübe edildi. Blocking solusyon 7. dakikanın sonunda kesitlerden uzaklaştırıldı ve örnekler yıkamaya alınmadan antibody diluent (Thermo, cat no: TA-125-UD) ile 1/200 oranında dilüe edilen PCNA primer antikor (Novus Biologicals, cat no: NBP1-90125) ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Gece boyu inkübasyon sonrasında tekrar eden çalışmada alınan kesitler 1 saat süreyle oda ısısında (28 °C) ek inkübasyona tabi tutuldu. ek inkübasyonun kesitlerde spesifik bağlanmayı arttırdığı tespit edildi. Antikor inübasyonundan alınan kesitler 2x5 dakika PBS te yıkanan kesitler anti-rabbit sekonder antikor ile (Thermo, cat no: TP-125-BN) 30 dakika süreyle inkübe edildi. Sekonder antikordan alınan kesitler 2x5 dakika süreyle PBS'te yıkandı. PBS'ten alınan kesitler 30 dakika süreyle oda ısısında Streptavidin peroksidaz (Thermo, cat no: TS-125-HR) ile enzim bağlanması için inkübe edildi. Streptavidin peroksidaz inkübasyonu sonrası 2x5 dakika PBS'te yıkanan kesitler DAB kromojen (Thermo, cat no: TA-125-HD) ile reaksiyona tabi tutuldu. Mikroskop altında reaksiyon izlendi ve spesifik tutunum gözleendiğinde PBS'ile reaksiyon sonlandırıldı. Çeşme suyunda yıkanan kesitler 1 dakika süreyle hematoksilin ile zıt boyamaya tabi tutuldu. Artan alkol serilerinde 5'er dakika bekletilen kesitler 2 seri Xylol'de 15'er dakika süreyle şeffaflandırıldı. Şeffaflanan kesitler entellan ile kapatıldı ve oda ısısında kurumaya bırakılan kesitler daha sonra analiz edilmek üzere kapalı lam kutularında muhafaza edildi.

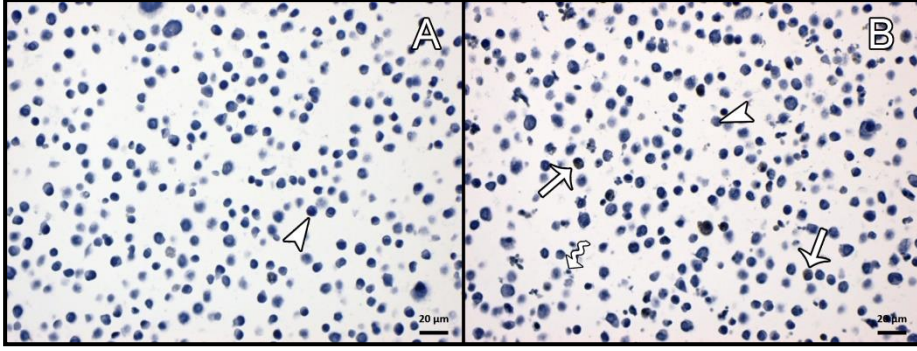
4.5.2. Procaspase-3 İmmunohistokimya

Xylol'de 2 seri 15'er dakika deparafinize edilen kesitler azalan alkol serilerinde (%100, %100, %96, %90, %80, %70) 5'er dakika bekletildi. Daha sonra distile suda bekletilen kesitler PBS'te 2x5 dakika süreyle yıkandı. Zinc formalin fiksasyonu

kullanılan örneklerimizde antijen retrieval aşaması atlandı. Metanol içerisinde hazırlanan %3'lük H₂O₂ de 30 dakika süreyle endojen peroksit blokajı gerçekleştirildi. 2x5 dakika PBS te yıkanan örnekler 7 dakika süreyle Ultra V Block solusyonunda (Thermo, cat no: TA-125-UB) inkübe edildi. Blocking solusyon 7. dakikanın sonunda kesitlerden uzaklaştırıldı ve örnekler yıkamaya alınmadan Antibody diluent (Thermo, cat no: TA-125-UD) ile 1/200 oranında dilüe edilen Procaspase-3 primer antikor (Novus Biologicals, cat no: NBP1-90125) ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Gece boyu inkübasyon sonrasında tekrar eden çalışmada alınan kesitler 1 saat süreyle oda ısısında (28 °C) ek inkübasyona tabi tutuldu. ek inkübasyonun kesitlerde spesifik bağlanmayı arttırdığı tespit edildi. Antikor inübasyonundan alınan kesitler 2x5 dakika PBS te yıkanan kesitler anti-rabbit sekonder antikor ile (Thermo, cat no: TP-125-BN) 30 dakika süreyle inkübe edildi. Sekonder antikordan alınan kesitler 2x5 dakika süreyle PBS'te yıkandı. PBS'ten alınan kesitler 30 dakika süreyle oda ısısında Streptavidin peroksidaz (Thermo, cat no: TS-125-HR) ile enzim bağlanması için inkübe edildi. Streptavidin peroksidaz inkübasyonu sonrası 2x5 dakika PBS'te yıkanan kesitler DAB kromojen (Thermo, cat no: TA-125-HD) ile reaksiyona tabi tutuldu. Mikroskop altında reaksiyon izlendi ve spesifik tutunum gözlemlendiğinde PBS'ile reaksiyon sonlandırıldı. Çeşme suyunda yıkanan kesitler 1 dakika süreyle hematoksilin ile zıt boyamaya tabi tutuldu. Artan alkol serilerinde 5'er dakika bekletilen kesitler 2 seri Xylo'l'de 15'er dakika süreyle şeffaflandırıldı. Şeffaflanan kesitler entellan ile kapatıldı ve oda ısısında kurumaya bırakılan kesitler daha sonra analiz edilmek üzere kapalı lam kutularında muhafaza edildi.

4.5.3. Cleaved Caspase-3 İmmunohistokimya

Rat testis kesitleri cleaved caspase-3 boyaması gerçekleştirilmeden önce pozitif kontrol için etopozid maruziyetine bırakılan ve etopozid ile inkübe edilmeyen Jurkat hücreleri (IHC Control Slides - SignalSlide® Cleaved Caspase-3 (Asp175) IHC Controls, UniProt ID P42574, Entrez ID 836 #8104) antikor boyaması yapılarak antikorun reaksiyon kapasitesi kontrol edildi (Şekil-14). Etopozid uygulanmış hücrelerde pozitif sinyaller gözlemlendikten sonra deneysel çalışmanın testiküler dokuları aynı protokol ile boyandı.



Şekil-14: Jurkat hücre hattında Cleaved Caspase-3 antikor pozitif kontrolü. Jurkat hücre hattında etopozid maruziyetine maruz bırakılmayan (A) ve bırakılan hücrelerde (B) cleaved caspase-3 ekspresyonları. (IHC Control Slides - SignalSlide® Cleaved Caspase-3 (Asp175) IHC Controls, UniProt ID P42574, Entrez ID 836 #8104, Bar:20 μm, Boyama: Cleaved Caspase-3, Zıt boyama: Hematoksilen).

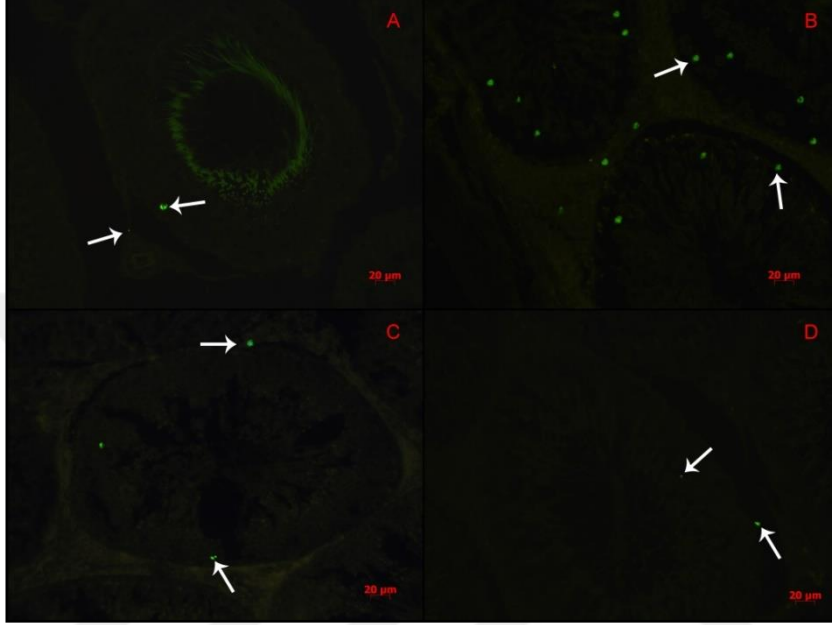
Polilizin kaplı lamlara alınan kesitler 55°C'de parafin depolimerizasyonuna tabi tutulduktan sonra 3 seri Xylol'de 5'er dakika parafinden arındırıldı. Xylol'den alınan kesitler 10'ar dakika %100 ve %96'luk alkollerde dehidre edildi. Daha sonra kesitler 2 seri dH2O'da 5'er dakika bekletildi. Dehidre edilen kesitler antijen maskesinin kaldırılması ve antikor affinitesinin artırılması için ısıtılmalı tabla üzerinde 10 mM Tris/1 mM EDTA (pH 9.0) içeren şale içerisinde kaynama sıcaklığına gelene kadar ısıtıldı. Kaynamaya başlayan solüsyon içerisindeki kesitler kaynama altı sıcaklıkta 18 dakika kadar daha antijen maskeleyişinden arındırıldı. Daha sonra benç üzerine alınan örnekler 30 dakika süreyle soğumaya bırakıldı. Antijen maskeleyişini kaldırılan kesitler 3 seri 5'er dakika süreyle dH2O'da yıkandı. Kesitler endojen peroksidaz blokajı için metil alkol içerisinde hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit çözeltisinde 10 dakika süreyle bekletildi. Endojen peroksidaz blokajı sonrası kesitler 2 seri 5'er dakika süreyle dH2O da durulandı. Yıkanan kesitler yıkama solüsyonu (1X TBS/0.1% Tween-20) içerisinde 5 dakika süreyle bekletildi. Etrafı sınırlayıcı hidrofobik kalemle çizilen kesitler blocking aşamasına alındı ve antijen affinitesi 5 dakika süreyle Ultra V Block solüsyonu (Thermo, cat no: TA-125-UB) uygulanarak gerçekleştirildi. Kesitlerden uzaklaştırılan blocking solüsyonundan sonra dokular antibody diluent (SignalStain® Antibody Diluent #8112) içerisinde 1/100 oranında dilüsyon edilen cleaved caspase-3 (Cell Signaling (ASP175) #9664) primer antikor

uygulamasına tabi tutuldu. Antikor damlatılan kesitler nemli kutu içerisinde +4 °C'de gece boyu inkübasyona tabi tutuldu. Primer antikor uzaklaştırılan kesitler 3 seri 5'er dakika süreyle yıkama solusyonunda yıkandı. Daha sonra kesitler diğer antikor boyamalarında kullanılan anti-polivalent/HRP metodundan farklı olarak tek basamaklı polimer bazlı immunohistokimya metoduna göre boyandı. Bu sebeple primer antikordan alınan kesitler yıkama işleminden sonra oda ısısında HRP/Anti Rabbit, SignalStain® Boost IHC Detection Reagent (Cell Signaling #8114P) ile 30 dakika nemli ortamda inkübe edildi. Polimer bazlı sekonder inkübasyon antikor aşamasından sonra kesitler 3 kez 5'er dakika süreyle yıkama solusyonunda bekletildi. Daha sonra kesitlere DAB kromojen (Thermo, cat no: TA-125-HD) damlatıldı ve reaksiyon mikroskop altında değerlendirildi. Reaksiyon başladığı anda kesitler yıkama solusyonuna alındı. Daha sonra kesitler 1 dakika süreyle hematoksilin zıt boyamaya tabi tutuldu. %95 ve %100 alkollerde 2'şer seri 1'er dakika bekletilen kesitler Xylol'de 2 seri 10'ar dakika şeffaflandırıldı. Daha sonra entellan ile kapatılan kesitler ışık mikroskobu altında incelendi ve immunohistokimyasal analizler gerçekleştirildi.

4.5.4. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL Assay)

Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığında kesitler paraffin depolimerizasyonunu takiben 2 seri Xylol'de 15'er dakika bekletildi. Azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70) 5'er dakika bekletilen kesitler distile suya getirilerek 5 dakika yıkandı. Kesitler daha sonra PBS'e alınarak TUNEL Assay aşamasına geçildi. 2 seri 5'er dakika PBS'te yıkanan kesitler permeabilizasyon amacıyla %0,1'lik sodium sitrat-Triton x100 solusyonuna alındı ve +4 °C 'de 3 dakika süreyle nükleer porus permeabilizasyonu sağlandı. Daha sonra 2 x 5 dk PBS'te yıkanan kesitler karanlık ortamda 1:1 dilüsyon oranında hazırlanan TUNEL reaktifiyle 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona alındı. İnkübasyon nemli ortamda ve karanlıkta gerçekleştirildi. Tunel reaktifi hazırlanırken In Situ Cell Death Detection Kit-AP (Roche Cat no: 11684809910 / Sigma) kullanıldı. Kit içeriğinde yer alan enzim solusyonu labe solusyonu ile 1/10 oranında karıştırıldı ve elde edilen reaktif 1:1 oranında TUNEL dilüsyon buffer (Roche Cat. no: 11966006001 / Sigma) ile dilüe edildi. Elde edilen

reaksiyon solusyonu kenarları hidrofobik sınırlandırıcı kalem ile çizilen kesitlerin üzerine aktarıldı. Reaktif solusyon inkubasyonu sonrası alınan kesitler 2x5 dk süreyle PBS'te yıkandı. Elde edilen TUNEL reaksiyonları Zeiss Axio Scope Floresan mikroskop (Carl Zeiss Ltd, Herts, UK) altında incelendi (Şekil-15).



Şekil-15: Grupların TUNEL Assay floresan mikroskop görüntüsü. A: Kontrol, B: Torsiyon / Detorsiyon, C: Torsiyon / Detorsiyon + Allopurinol, D: Torsiyon / Detorsiyon + Trolox. (Boyama: TUNEL Assay, Bar: 20µm)

Işık mikroskopik dönüşüm için kesitler Converter-AP (Roche Cat. no:11966006001 / Sigma) ile 37 °C'de 30 dakika süreyle inkübe edildi. Daha sonra PBS'te 2x5 dk süreyle yıkanan örnekler Fast Red substrat solusyonu ile kromojen reaksiyonuna tabi tutuldu. Fast Red solusyonu hazırlanırken 2 ml 0,1 M Tris HCL içerisinde 1 adet Fast Red Tablet (Roche Cat no: 11 496 549 001 / Sigma) çözünerek elde edildi. Elde edilen kromojen örneklerin üzerine damlatıldı ve oda ısısında kromojen reaksiyonu mikroskop altında incelendi. Pozitif sinyal gözlenen örnekler PBS'e alınarak reaksiyon durduruldu. PBS'te 2x5 dk yıkanan örnekler Harris Hematoksilende 1 dakika zıt boyamaya tabi tutuldu. Zıt boyamadan alınan kesitler 5 dk çeşme suyunda yıkandı ve kesitler Kaiser's glycerol gelatin (Merck Cat no: 1092420100) eklenmek suretiyle lamel ile kapatıldı. Hazırlanan örneklerin mikroskopta incelenmesi ve değerlendirmeleri yapılarak mikrografları çekildi.

4.6. Morfolojik ve İstatistiksel Analiz

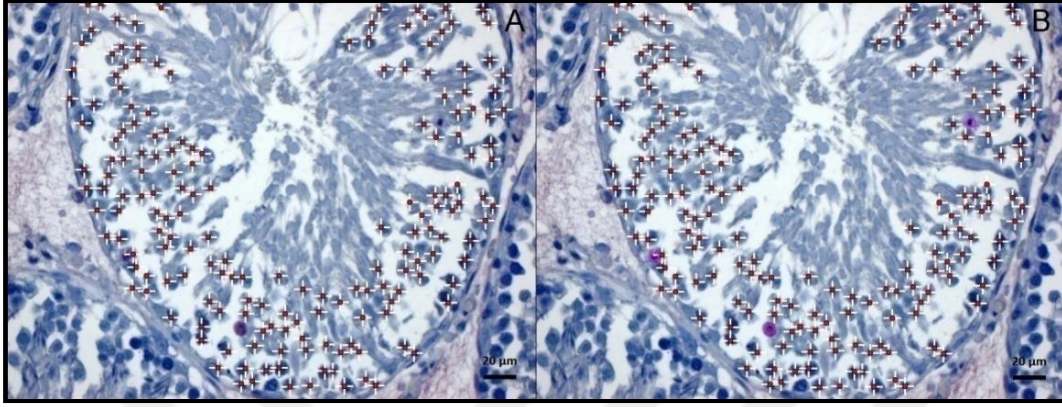
Histopatolojik değerlendirmede Hematoksilen & Eosin (H&E) boyanan kesitlerde gözlemsel patoloji değerlendirmesinin yanı sıra, her gruptaki kesitlerden rastgele seçilen 70 seminifer tubül Johnsen testiküler biyopsi skorlamasına tabi tutuldu (217). Johnsen skorlama yapılırken Tablo-2’de yer alan kriterler göz önünde bulunduruldu. İstatistiksel analiz öncesi normallik testi gerçekleştirildi. Normal dağılım testinde çarpıklık (skewness) ve basıklık (kurtosis) değerlerinin -1,5 ve +1,5 arasında olması kriter alındı. Ayrıca Komgorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk normal dağılım testlerinin $>0,05$ olması kriter kabul edildi. Normal dağılım göstermeyen skorlama değerleri Non-parametrik Kruskal Wallis testine tabi tutuldu. Gruplar arasındaki çoklu karşılaştırma ise Tamhane’s T2 testi ile gerçekleştirildi. İstatistiksel olarak $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

Tablo-2: Johnsen testiküler biyopsi skorlaması kriterleri (217).

Johnsen Biyopsi Skorlama Tablosu	Skor
Düzenli, yoğun spermatogenesis ve tubül yapısı	10
Lümende yoğun spermatozoa ancak spermatogenik hatta düzensizlik	9
Lümende az miktarda spermatozoa mevcut	8
Lümende spermatozoa yok ancak spermatidler mevcut	7
Düşük sayıda spermatid	6
Spermatozoa ve spermatid yok ancak yoğun spermatosit	5
Düşük miktarda spermatosit	4
Yalnızca Spermatogonia mevcut	3
Germ hücresi bulunmuyor	2
Germ hücresi veya Sertoli hücresi bulunmuyor	1

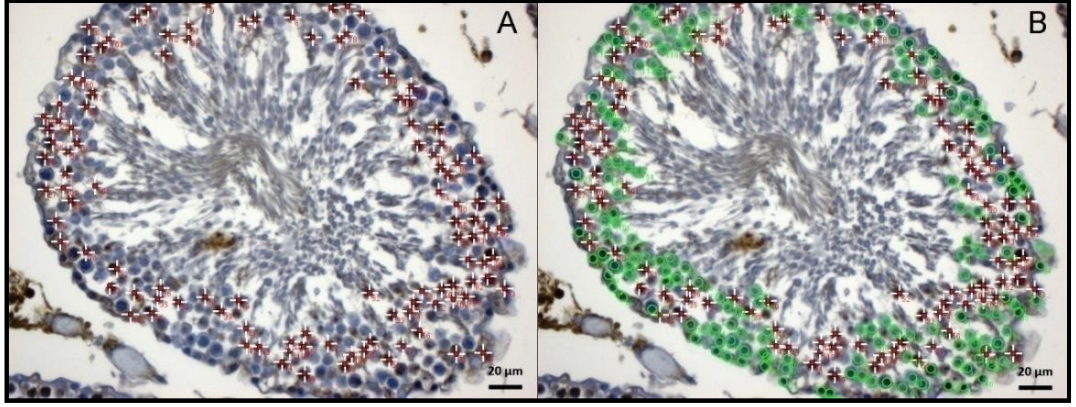
TUNEL Assay uygulanan kesitlerde apoptotik indeks (AI) analizi gerçekleştirildi. DNA fragmentasyonu değerlendirmesi yapılan mikroskopik örneklerinden her kesitten 40’lık objektifte 10 adet tubül analiz edildi. Pozitif sinyal yüzdesi hesaplanırken rastgele seçilen tubüllerde pozitif sinyal sayısının seminifer tubülde yer alan toplam hücre sayısına oranı hesaplandı ve pozitif sinyal yüzdeleri elde edildi (Şekil-16). Elde edilen pozitif sinyal yüzdeleri SPSS 24.0 (IBM) programında istatistiksel analize alındı. İstatistiksel analiz öncesi normallik testi gerçekleştirildi. Normal dağılım testinde çarpıklık (skewness) ve basıklık (kurtosis) değerlerinin -1,5 ve +1,5 arasında olması kriter alındı. Ayrıca normallik testinde Komgorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk Normal dağılım testlerinin $>0,05$ olması kriter

kabul edildi. Normal dağılım gösteren ölçümler One Way Anova istatistiksel analizine tabi tutuldu. Gruplar arasındaki karşılaştırma ise Post-Hoc Turkey testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.



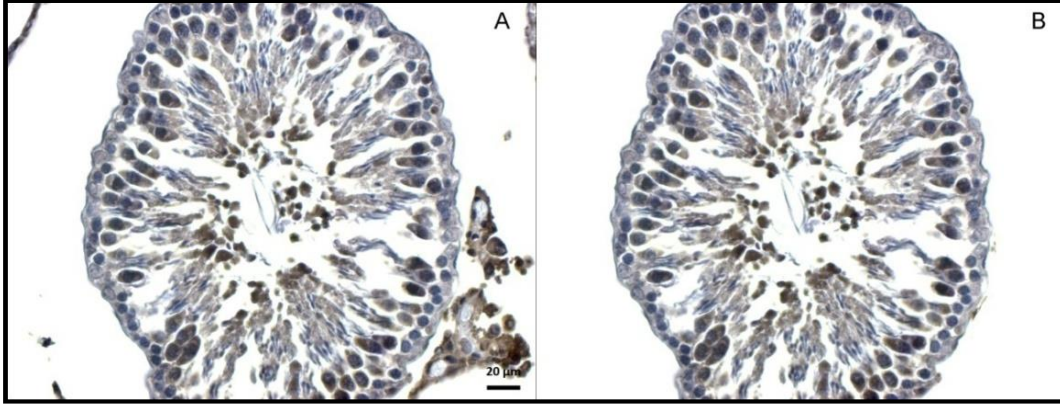
Şekil-16: TUNEL Assay uygulanan kesitlerde apoptotik indeks analizi. Negatif sinyal veren çekirdekler (+) ve pozitif sinyal veren çekirdekler'in (O) image j yazılımındaki işaretlenmiş görüntüsü.

Nükleer bir protein olan PCNA analizi için DAB pozitif ve Hematoksilen pozitif (DAB negatif) germinal hücre hattı çekirdekleri göz önünde bulunduruldu. Her kesitte rastgele seçilen 10'ar adet tubülde toplam DAB reaksiyonu veren hücre sayısının seminifer tubülde yer alan toplam hücre sayısına oranı hesaplandı ve elde edilen oranlar yüzdelik değerlere dönüştürüldü. DAB pozitif ve negatif çekirdek sayımları Image J programında gerçekleştirildi (Şekil17). Elde edilen DAB pozitif hücre yüzdeleri SPSS 24.0 (IBM) programında istatistiksel analize alındı. İstatistiksel analiz öncesi normallik testi gerçekleştirildi. Normal dağılım testinde çarpıklık (skewness) ve basıklık (kurtosis) değerlerinin -1,5 ve +1,5 arasında olması kriter alındı. Ayrıca normallik testinde Komgorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk Normal dağılım testlerinin $>0,05$ olması kriter kabul edildi. Normal dağılım gösteren ölçümler One Way Anova istatistiksel analizine tabi tutuldu. Gruplar arasındaki karşılaştırma ise Post-Hoc Turkey testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

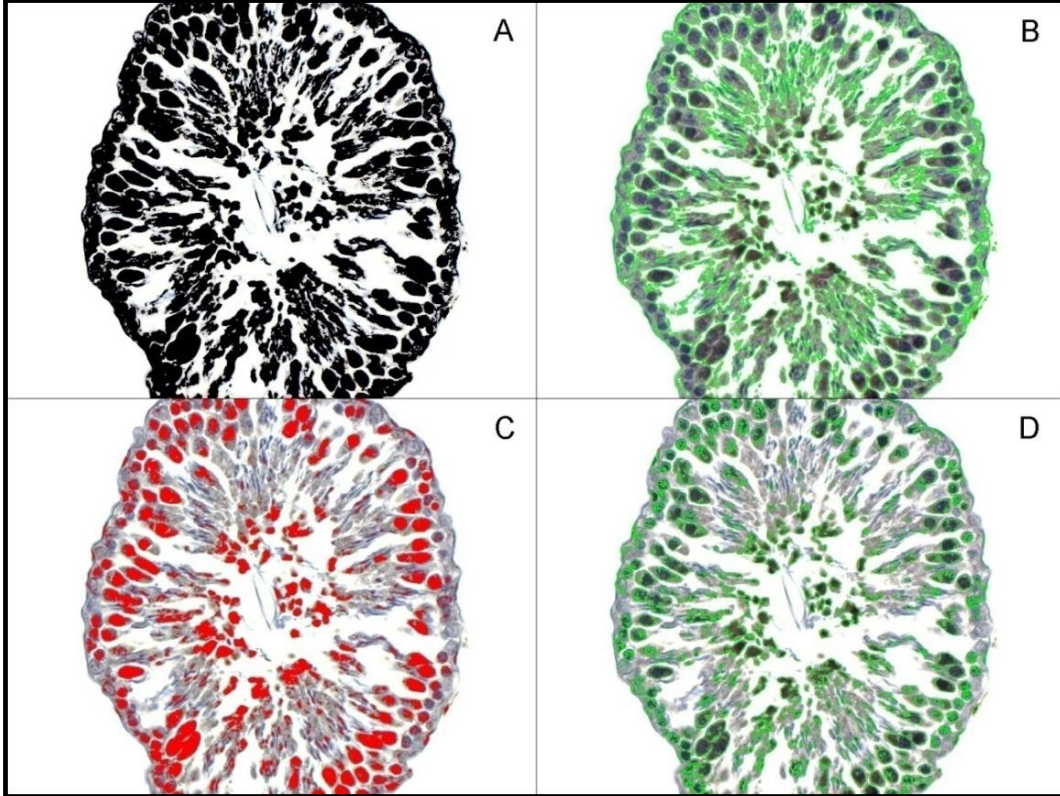


Şekil-17: Testis kesitlerinde PCNA ekspresyon analizi. Pozitif (+) ve negatif (O) çekirdekler'in Image J yazılımındaki işaretlenmiş görüntüsü.

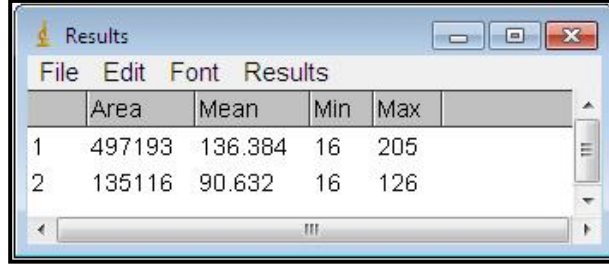
Prokaspaz-3 analizi için procaspase-3 immunohistokimya boyanan kesitlerde her örnekten 10'ar adet tubül analize tabi tutuldu. Analiz gerçekleştirilirken DAB (kahverengi/siyah) boyama alanları ve Hematoksilen (mavi/lacivert) boyama alanları arasındaki oran göz önünde bulunduruldu. Alanlar arasındaki oran hesaplanırken Image J programı kullanıldı. Toplam alan ölçüsü içerisinde yer alan DAB sinyal alanları hesaplandı ve elde edilen alanların yüzdesel değerleri elde edildi (Şekil 18-20). Elde edilen yüzde değerleri SPSS 24.0 (IBM) programında istatistiksel analize alındı. İstatistiksel analiz öncesi normallik testi gerçekleştirildi. Normal dağılım testinde çarpıklık (skewness) ve basıklık (kurtosis) değerlerinin -1,5 ve +1,5 arasında olması kriter alındı. Ayrıca normallik testinde Komgorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk Normal dağılım testlerinin $>0,05$ olması kriter kabul edildi. Normal dağılım gösteren ölçümler One Way Anova istatistiksel analizine tabi tutuldu. Gruplar arasındaki karşılaştırma ise Post-Hoc Turkey testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.



Şekil-18: Procaspase-3 ve Cleaved Caspase-3 boyanan kesitlerde Image J analizi. Örnek tubül mikrogramının (A) analize alınmadan önceki interstisyel alan ve artefaktlardan temizlenmiş görüntüsü (B).



Şekil-19: Procaspase-3 ve Cleaved Caspase-3 boyanan kesitlerde alanların Image J analizi için işaretlenmesi. Artefakt ve interstisyel alanı temizlenen seminifer tubüller Image J yazılımı ile işaretlendi (A). İşaretlenen bölgenin alanı netleştirildikten sonra seçim gerçekleştirilerek seminifer tubül alanı hesaplandı (B). Toplan doku alanı belirlenen örnekte toplam kromojen içeren bölge işaretlendi (C). İşaretlenen bölgenin toplam alanı seçildi (D).



	Area	Mean	Min	Max
1	497193	136.384	16	205
2	135116	90.632	16	126

Şekil-20: Procaspase-3 ve Cleaved Caspase-3 immunohistokimya Image J örnek analiz sonucu. Toplam seminifer tubül alanı (1) ve DAB kromojen içeren alan (2) görülmektedir.

Testiküler dokudaki Aktif kaspaz-3 analizi için Cleaved caspase-3 immunohistokimya boyanan kesitlerde her örnekten 10'ar adet tubül analize alındı. Analiz gerçekleştirilirken DAB (kahverengi) boyama alanları ve Hematoksilen (mavi) boyama alanları arasındaki oran göz önünde bulunduruldu. Alanlar arasındaki oran hesaplanırken Image J programı kullanıldı. Toplam alan ölçüsü içerisinde yer alan DAB sinyal alanları hesaplandı ve elde edilen alanların yüzdesel değerleri elde edildi (Şekil 18-20). Elde edilen yüzde değerleri SPSS 24.0 (IBM) programında istatistiksel analize alındı. İstatistiksel analiz öncesi normallik testi gerçekleştirildi. Normal dağılım testinde çarpıklık (skewness) ve basıklık (kurtosis) değerlerinin -1,5 ve +1,5 arasında olması kriter alındı. Ayrıca Komgorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk Normal dağılım testlerinin $p > 0,05$ olması kriter kabul edildi. Normal dağılım gösteren ölçümler One Way Anova istatistiksel analizine tabi tutuldu. Gruplar arasındaki karşılaştırma ise Post-Hoc Turkey testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

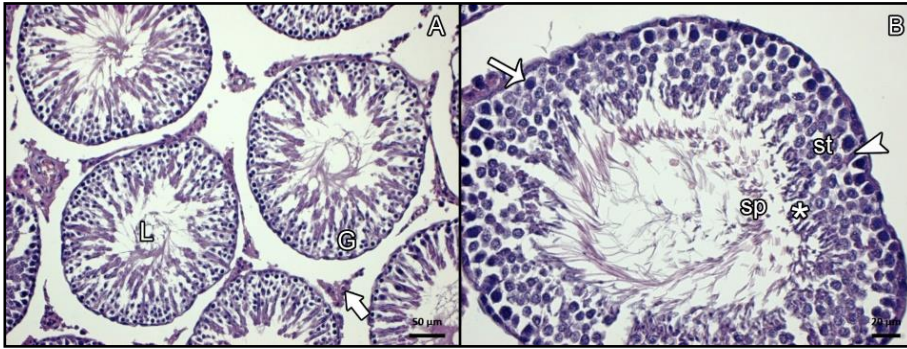
5. BULGULAR

5.1. Malondialdehit Bulguları

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Torsiyon/Detorsiyon grubunda kan MDA düzeyinde artış olduğu gözlemlendi. Torsiyon/Detorsiyon + Allopurinol grubunda ise kan serum MDA miktarının kontrol grubuna göre artmakla beraber Torsiyon/Detorsiyon grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeyinin düştüğü tespit edildi. Torsiyon/Detorsiyon + Trolox grubu kan MDA miktarının ise kontrol grubuyla yakın olduğu ve kan serum MDA düzeyi yönünden Trolox'un Allopurinol'den daha protektif bir profile sahip olduğu görüldü.

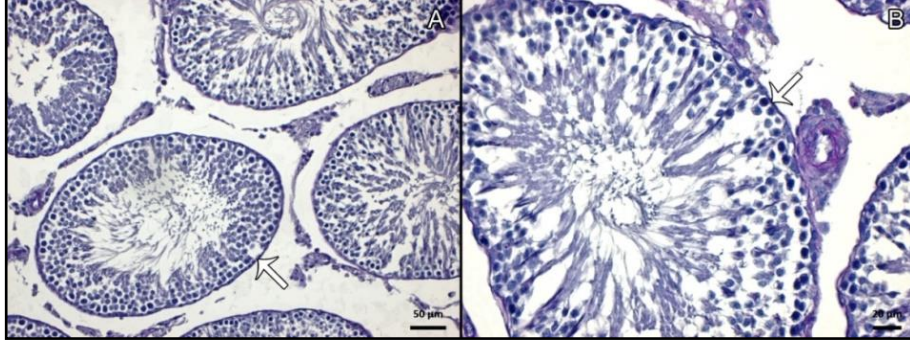
5.2. Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubu kesitlerinde yaptığımız incelemelerde düzenli seminifer tubüller izlendi. Bazal lamina üzerinde spermatogenezis'in farklı aşamalarında bulunan 5-6 sıralı germinal epitel yer almaktaydı. Germinal epitel, spermatogonya, spermatozoid ve spermatid'den oluşmaktaydı. İntertstisyel alanda düzenli kapillerler ve Leydig hücreleri izlendi (Resim-1).



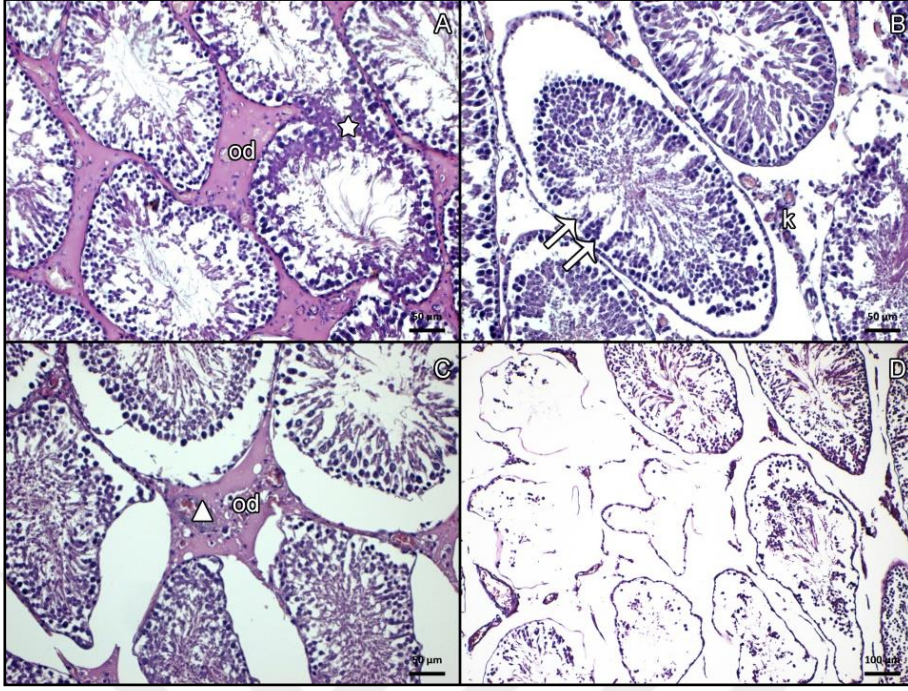
Resim-1: Kontrol grubu rat testis kesiti. A) Normal yapıda seminifer tubüller görülüyor. L: Lumen, Kalın ok: Leydig hücreleri, G: Germinal epitel (Boyama: H&E, Bar: 50 µm). B) Seminifer tubül epitelinde spermatogoniya (ince ok), spermatozoid (st), spermatid (*), spermatozoa (sp) ve Sertoli hücreleri (ok başı) izlenmektedir (Boyama: H&E, Bar: 20 µm).

PAS ile boyanan kesitlerde ise bazal membran düzenlenmesi ve kalınlığının normal olduğu izlendi (Resim-2).

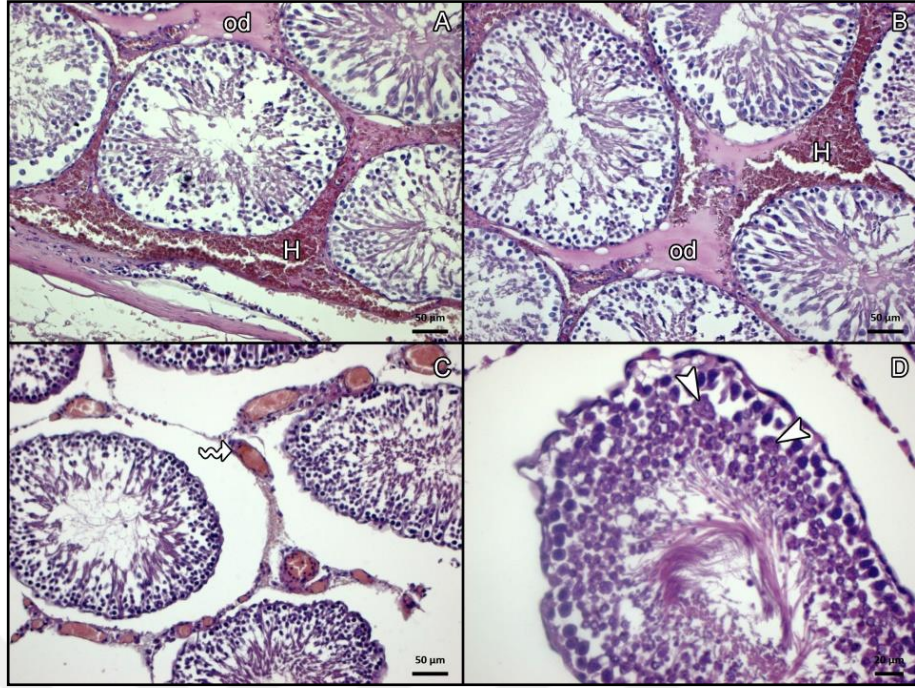


Resim-2: Kontrol grubu rat testis kesiti. A) Normal histolojik yapıda seminifer tubüller ve bazal membran (ok) görülüyor (Boyama: PAS, Bar: 50µm). B) Büyük büyütmede bazal membran (ok) görünümü (Boyama: PAS, Bar: 20µm).

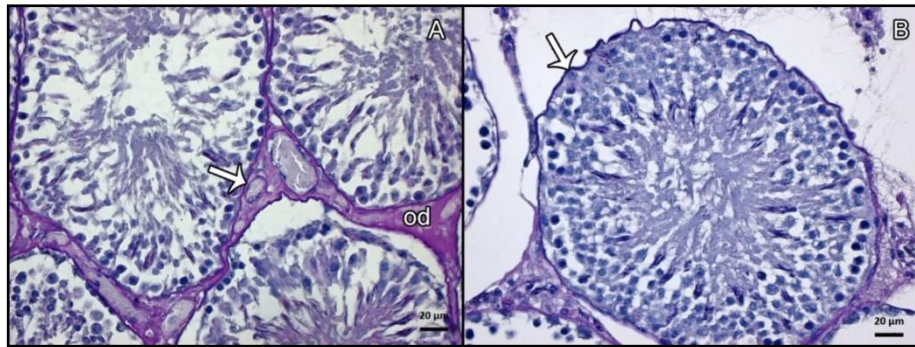
Torsiyon/Detorsiyon (T/D) grubu rat testis kesitlerinde şiddetli histolojik lezyonlar izlendi. Kesitlerde incelenen alanların büyük bir kısmında, özellikle seminifer tubüllerde harabiyet, germinal epitel hücrelerinde koagulatif nekrotik oluşumlar izlendi. Bazı testis kesitlerinde seminifer tubül epitelinde deskvamasyon ve epitel'in yer yer tamamen ortadan kalktığı tespit edildi (Resim 3). Ayrıca T/D kesitlerinde, bazı alanlarda seminifer tubül germinal epitel hücreleri arasında multinükleer dev hücrelere rastlandı. İnterstisyel alanda yaygın hemoraji, ödem ve damar konjesyonu izlendi. Ayrıca bazı alanlarda kapiller proliferasyon benzeri oluşumlar ve leydig hücre çekirdeklerinde piknotik durum izlendi (Resim-4). PAS ile boyanan T/D grubu kesitlerinde seminifer tubül bazal laminasında ondülasyon ve belirgin kalınlaşma izlendi (Resim-4).



Resim-3: T/D grubu rat testis kesitleri. A) Diffüz interstisyel ödem (od) ve koagulatif nekroz (★) (Boyama: H&E, Bar: 50 µm). B) Germinal epitelde deskuamasyon (çift ok) ve kapiller proliferasyon (k) (Boyama: H&E, Bar: 50 µm). C) Spermatogenezde düzensizlik, interstisyel ödem (od) ve damarda konjesyon (▲) görülüyor (Boyama: H&E, Bar: 50µm). D) Koagulatif nekroz ve seminifer tubül epitelinde silinme (Boyama: H&E, Bar: 100µm).

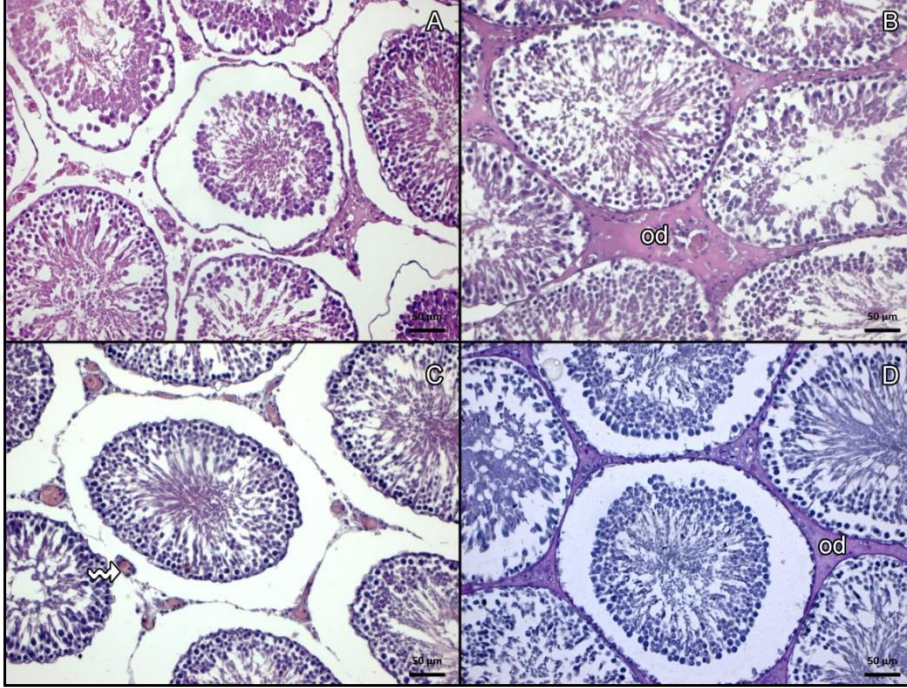


Resim-4: T/D grubu rat testis kesitleri. A) Subkapsüller hemoraji (H), interstisyel ödem (od) ve spermatogeneziste düzensizlik (Boyama: H&E, Bar: 50µm). B) Diffüz interstisyel ödem (od) ve hemorajik alanlar (H) (Boyama: H&E, Bar: 50µm). C) Kapiller proliferasyonu ve konjesyonu (kıvrık ok) izlenmektedir (Boyama: H&E, Bar: 50 µm). D) Germinal epitel hücreleri arasında multinükleer dev hücreler (ok başı) görülüyor (Boyama: H&E, Bar: 20 µm).

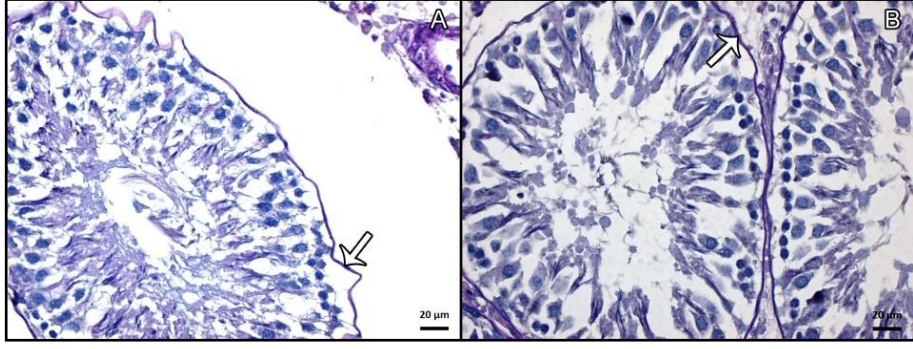


Resim-5: T/D grubu rat testis kesitleri. A) İnterstisyel ödem (od) ve seminifer tubül bazal membranında belirgin kalınlaşma (ok), B) Seminifer tubül bazal membranında kalınlaşma (ok) izlenmektedir, (Boyama: PAS, Bar: 20µm).

Torsiyon/Detorsiyon + Allopurinol (T/D+A) grubu rat testis kesitlerinde, germinal epitelde ayrışma ve deskuamasyonun yer yer devam ettiği izlendi. Ayrıca interstisyel ödem, kapiller proliferasyon (Resim 6) ve seminifer tubül bazal laminalarında ondülasyon ve kalınlaşmanın yer yer devam ettiği gözlemlendi (Resim 7).

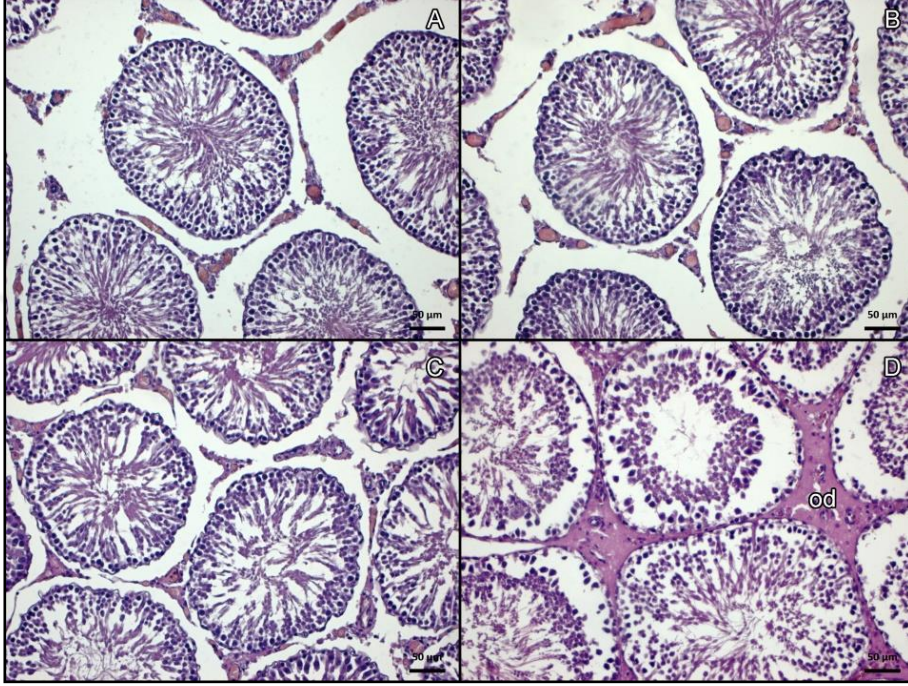


Resim-6: T/D+A grubu rat testis kesitleri. A) Tubüler lümeninde germinal epitel deskuamasyonu (Boyama: H&E, Bar: 50µm). B) Diffüz interstisyel ödem (od) görülüyor (Boyama: H&E, Bar: 50µm). C) Kapiller proliferasyonu (kırık ok) ve konjesyon tablosu (Boyama: H&E, Bar: 50 µm). D) Germinal epitelde deskuamasyon, diffüz interstisyel ödem (od) ve seminifer tubül bazal laminaları izlenmektedir (Boyama: PAS, Bar: 50 µm).

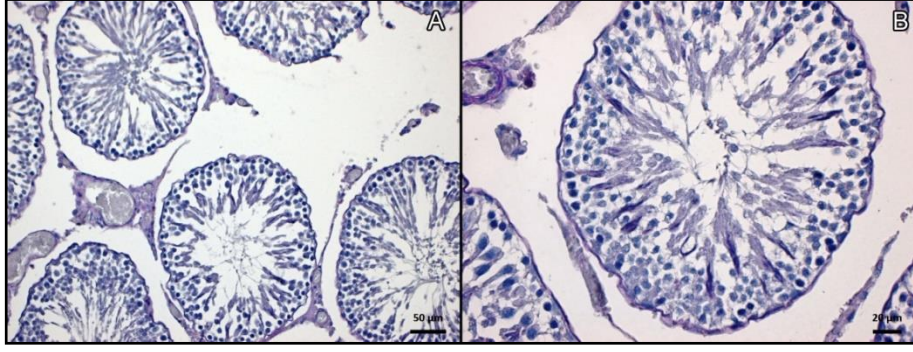


Resim-7: T/D + A grubu rat testis kesitleri. A) Bazal membranda kalınlaşma ve ondülasyon görünümü, B) Bazal membranlarda bariz kalınlaşma (ok) izlenmektedir (Boyama: PAS, Bar: 20 µm).

Torsiyon/Detorsiyon + Trolox (T/D+T) grubu rat testis kesitlerinde histolojik lezyonların T/D ve T/D+A grupların göre oldukça azalmış olduğu gözlemlendi (Resim-8). Testis kesitlerinin çoğunda kapiller proliferasyonu ve damar konjesyonu hariç kontrol grubuna yakın morfolojiye sahip olduğu izlendi (Resim-9).



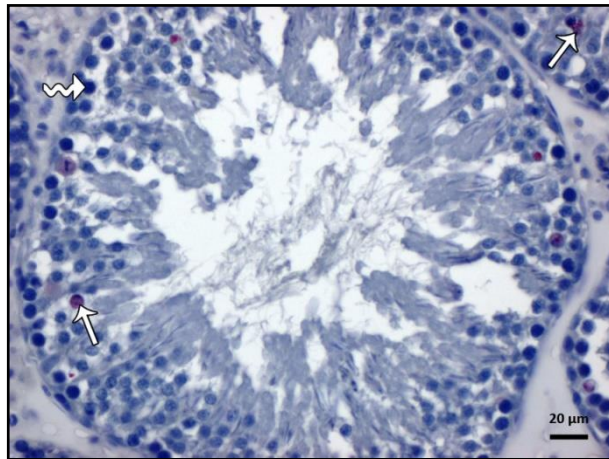
Resim-8: T/D+T grubu rat testis kesitleri. A) Seminifer tubül lümeninde çok sayıda olgun sperm hücreleri görülüyor. B) Kontrole yakın seminifer tubüller ve kapillerkonjesyon görülüyor. C) Spermatogenezis'in değişik aşamalarını yansıtan kontrol grubu kesitlerine benzer seminifer tubül yapısı. D) Bazal membrandan ayrışma ve interstisyel ödem (od) izlenmektedir. (Boyama: H&E, Bar: 50 µm).



Resim-9: T/D+T grubu rat testis kesitleri. A) Damar konjesyonu'nun dışında kontrole benzer seminifer tubül bazal laminaları görülmektedir (Boyama: PAS, Bar: 50 µm). B) Kontrole benzer bazal membran yapısı ve organizasyonu (Boyama: PAS, Bar: 20µm).

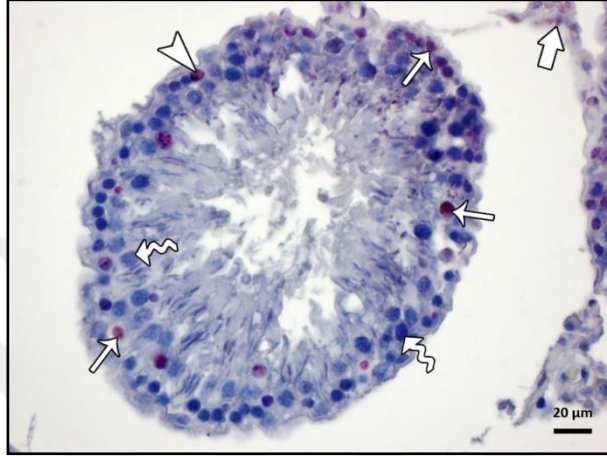
5.3. TUNEL Assay Bulguları

TUNEL Assay uygulanan kesitlerde DNA fragmentasyonu ve Apoptotik Index (AI) değerlendirmesi gerçekleştirildi. Testis kesitlerinde kontrol grubu kesitlerinde seminifer tubüllerde yer alan spermatogenik hücrelerde yer yer DNA fragmentasyonu'nun olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu kesitlerinde yer yer spermatogonyumlarda, spermatozoidlerde ve spermatidlerde TUNEL pozitif hücreler izlendi (Resim-10).



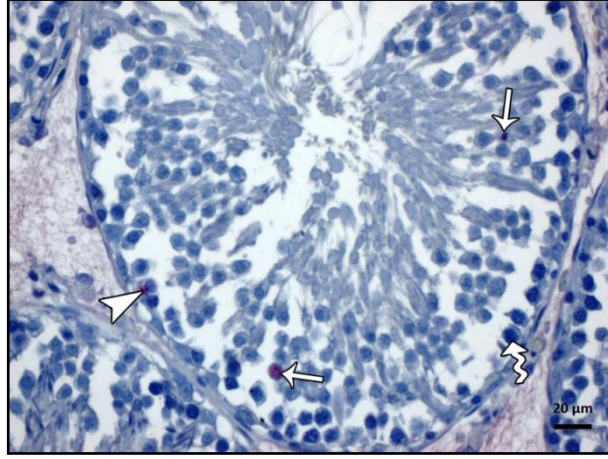
Resim-10: Kontrol grubu rat testis kesitinde TUNEL Assay. Spermatozoidler düzeyinde düşük miktarda DNA fragmentasyon sinyalleri (ok) ve negatif sinyal veren hücreler (kırıkk ok). (Bar: 20 µm, TUNEL Assay).

Torsiyon/Detorsiyon (T/D) uygulanan hayvanların testislerinden alınan kesitlerde TUNEL pozitif hücrelerin spermatogenezis'in tüm basamağında yer alan hücrelerde yoğun bir şekilde olduğu tespit edildi. Ayrıca seminifer tubüllerin yanı sıra bu gruptaki kesitlerde interstisyel alanda yer alan Leydig hücrelerinde ve kısmen kapiller endotelinde de TUNEL pozitif hücreler rastlandı. (Resim-11).



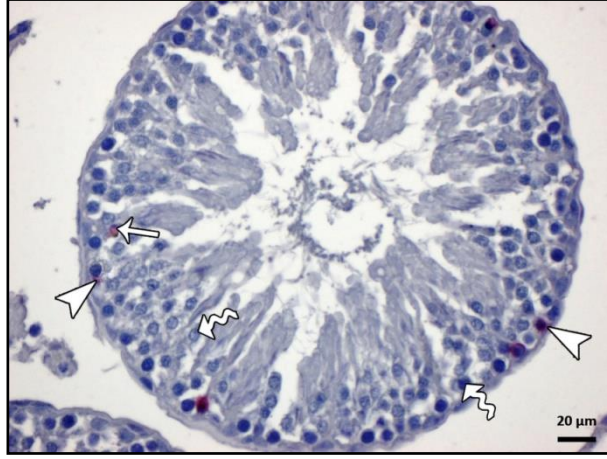
Resim-11: T/D grubu rat testis kesitlerinde TUNEL Assay. Spermatogonyum (ok başı) ve spermatosit (ok) düzeyinde yoğun TUNEL pozitif hücreler ayrıca germinal epitel'in çeşitli aşamalarında TUNEL negatif hücreler (kivrık ok) ve interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde pozitif sinyaller (kalın ok). (Bar: 20 μm, TUNEL Assay).

Torsiyon/Detorsiyon+Allopurinol (T/D+A) grubu rat testis kesitlerinde kontrol grubu ve T/D grubundaki rat testis kesitlerinde olduğu gibi pozitif sinyal veren hücrelerin varlığı izlendi. Bu gruptaki kesitlerin seminifer tubüllerinde pozitif reaksiyon izlenen hücrelerin çoğunlukla spermatogonyum ve spermatidlerde olduğu görüldü (Resim-12).



Resim-12: T/D+A grubu rat testis kesitlerinde TUNEL Assay. Spermatogonyum (ok başı) ve spermatosit (ok) düzeyinde kontrol grubuna benzer TUNEL pozitif sinyal veren hücreler ayrıca TUNEL negatif hücreler (kıvrık ok). (Bar: 20 μ m, TUNEL Assay).

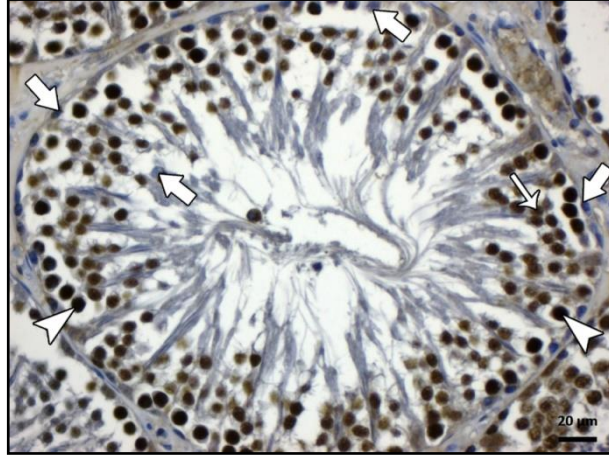
Torsiyon/Detorsiyon+Trolox (T/D+T) grubundaki rat testis kesitlerinde diğer üç grupta yer alan hayvanların testiküler dokularında olduğu gibi seminifer tubül germ hücrelerinde ve interstisyel alanda yer alan Leydig hücreleri ve kısmen kapiller endotellerinde TUNEL pozitif hücrelerin olduğu görüldü. T/D + T grubundaki kesitlerde T/D + A grubundaki ve kontrol grubundaki örneklerde olduğu gibi pozitif sinyal izlenen hücrelerin çoğunlukla spermatogonyum ve spermatosit hücreleri olduğu gözlemlendi (Resim-13).



Resim-13: T/D+T grubu rat testis kesitlerinde TUNEL Assay. Spermatogonyum (ok başı) ve spermatozoid (ok) düzeyinde kontrol grubuna benzer şekilde az sayıda TUNEL pozitif sinyal veren hücreler ayrıca spermatogenezis'in farklı aşamalarında TUNEL negatif hücreler (kivrık ok). (Bar: 20 µm, TUNEL Assay).

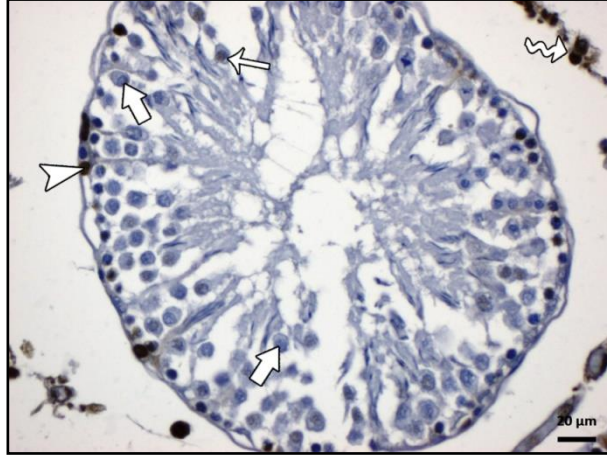
5.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

PCNA antikor boyaması yapılan kesitlerde kontrol grubu örneklerinde spermatogenezis'in her aşamasında ekspresyonun olduğu görüldü. İnterstisyel alandaki Leydig hücreleri ve kapiller endotelileri de PCNA yönünden yer yer pozitif olarak izlendi (Resim-14).



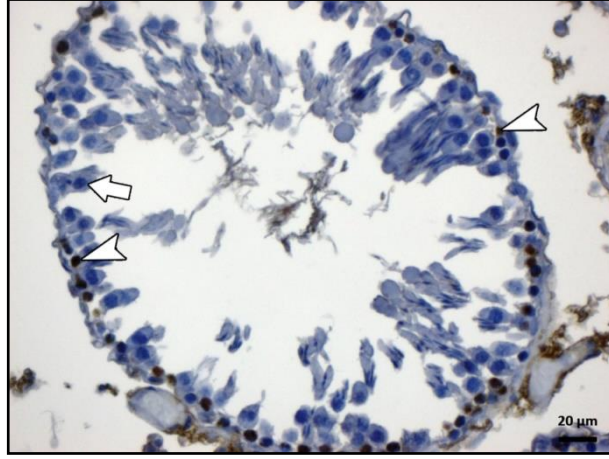
Resim-14: Kontrol grubu rat testis kesitlerinde PCNA immunohistokimya. Spermatogonyum (ok başı) ve spermatogenezis'in çeşitli aşamalarında yoğun PCNA pozitif hücreler (ok) ve seminifer tubül bazal hücrelerinde ve germinal epitel hücrelerinde PCNA negatif hücreler (kalın ok). (Bar: 20 μ m, PCNA İmmunohistokimya, H&E zıt boyama).

Torsiyon/Detorsiyon (T/D) grubundaki rat testis kesitlerinde kontrol grubuna benzer şekilde spermatogenezis'in her aşamasındaki hücrelerde PCNA pozitivitesi ve PCNA negatif hücrelerin varlığı izlendi. Ancak bu gruptaki hayvanların kesitlerinde PCNA pozitif hücrelerin çoğunlukla spermatogonyumlar ve ileri aşamadaki spermatozoidler olduğu gözlemlendi. Ayrıca yer yer interstisyel alanda Leydig hücrelerinde de pozitif sinyaller olduğu tespit edildi. Kapiller endotelinin genellikle PCNA yönünden negatif olduğu gözlemlendi (Resim-15).



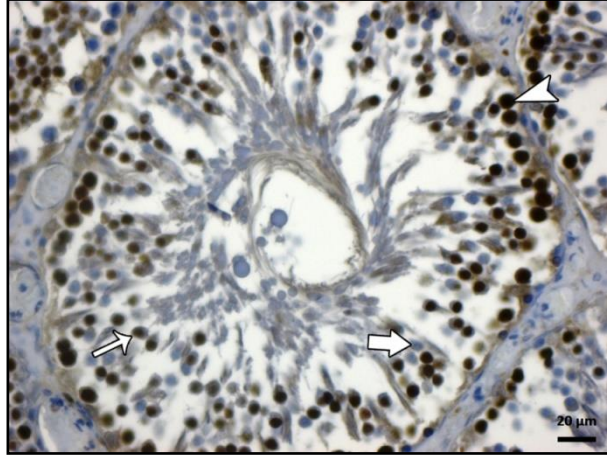
Resim-15: T/D grubu rat testis kesitlerinde PCNA immunohistokimya. Seminifer tubül'de bazı spermatogonyum hücrelerinde (ok başı) ve spermatozoid hücrelerinde (ok) düşük düzeyde PCNA pozitifitesi. Ayrıca tubül içerisinde PCNA ekspresyonu negatif hücreler ve interstisyel alanda Leydig hücrelerinde pozitiflik (kıvrık ok). (Bar: 20 μ m, PCNA İmmunohistokimya, H&E zıt boyama).

Torsiyon/Detorsiyon+Allopurinol (T/D+A) grubunda yer alan ratların testis kesitlerinde PCNA pozitif hücre çekirdeklerinin çoğunluğunun spermatogonyumlar olduğu izlendi. Spermatozoidlerde ise negatif hücrelerin yoğun bir şekilde var olduğunu gözlemledik (Resim-16). Ayrıca bu gruptaki hayvanların örneklerinde DAB pozitifliğine bağlı oluşan kromojen yoğunluğunun T/D grubuna benzer bir görüntüye sahip olduğu izlendi. Gruplar arasındaki pozitif sinyal yüzdeleri istatistiksel olarak ayrıca değerlendirildi.



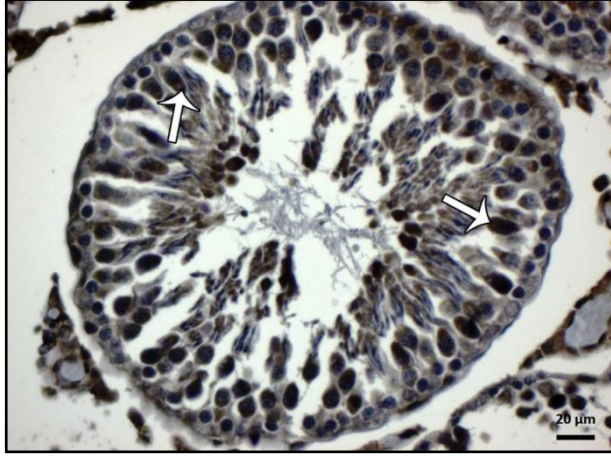
Resim-16: T/D+A grubu rat testis kesitlerinde PCNA immunohistokimya. Spermatogonyumlarda PCNA ekspresyonu gösteren (ok başı) ve ekspresyon negatif olan hücre çekirdekleri (kalın ok). (Bar: 20 μ m, PCNA İmmunohistokimya, H&E zıt boyama).

Torsiyon/Detorsiyon+Trolox (T/D+T) grubundaki ratların testis kesitlerinde spermatogenezis'in farklı aşamalarındaki hücrelerde pozitif sinyallerin olduğunu izledik. Ayrıca negatif hücreler de seminifer tubüller içerisinde yoğun yer kaplamaktaydı (Resim-17). DAB kromojenitesi bu grupta gözlemsel olarak yaptığımız değerlendirmede kontrol grubuna daha yakın görünmekteydi. Pozitif ve negatif sinyallerin seminifer tubülde kapladığı sayısal miktarların yüzdesel değerleri ve diğer gruplarla olan benzerlikleri istatistiksel yönden ayrıca değerlendirildi.



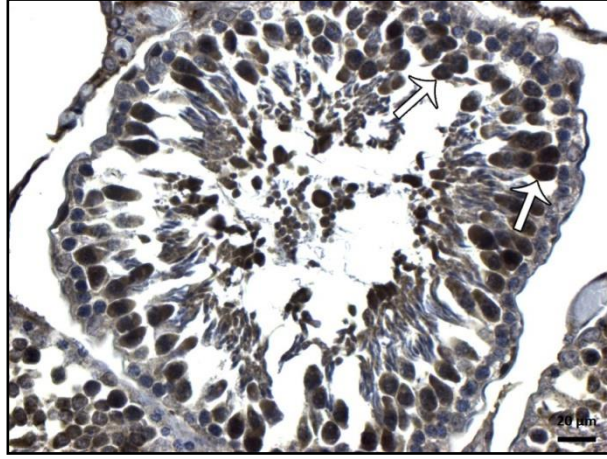
Resim-17: T/D+T grubu rat testis kesitlerinde PCNA immunohistokimya. Spermatogonyum (ok başı) ve spermatogenezis'in farklı aşamalarında (ok) yoğun PCNA ekspresyonu veren spermatogenik hücreler. Seminifer tubülde PCNA ekspresyon negatif hücreler (kalın ok). (Bar: 20 μ m, PCNA İmmunohistokimya, H&E zıt boyama).

Procaspase-3 immunohistokimya boyaması yapılan kontrol grubu kesitlerinde testiküler dokunun genelinde yoğun procaspase-3 ekspresyonu izlendi. Spermatogenezis'in farklı aşamalarında ve interstisyel alanda yer alan hücrelerde procaspase-3 varlığı görüldü. Lumene dökülmüş hücrelerde ve spermatidlere ait protoplazmik veziküllerde de procaspase-3 ekspresyonunun var olduğu gözlemlendi (Resim 18). Kontrol grubunda ekspresyon alanı'nın hematoxilen boyanmış bölgelere olan total doku oranları yüzdesel olarak hesaplanarak istatistiksel yönden değerlendirildi.



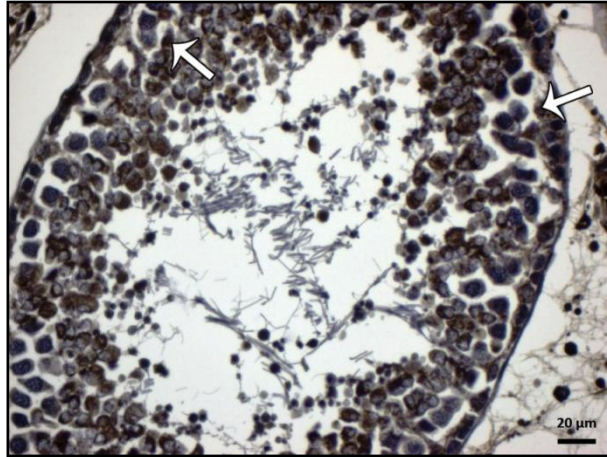
Resim-18: Kontrol grubu rat testis kesitlerinde Procaspase-3 immunohistokimya. Spermatogenezis'in farklı aşamalarındaki hücrelerde görülen yoğun procaspase-3 ekspresyonu (ok). (Bar: 20 μ m, Procaspase-3 İmmunohistokimya, H&E zıt boyama).

Torsiyon/Detorsiyon (T/D) grubu rat testis kesitlerinde procaspase-3 boyanan örneklerde germ hücrelerinde procaspase-3 ekspresyonu yoğun şekilde izlendi (Resim 19). Spermatogonyum, spermatosit ve spermatidlerde ve interstisyel Leydig hücrelerinde yoğun procaspase-3 varlığı görüldü. Protein'in tübüler alanda kapladığı yüzdesel değer istatistiksel yönden ayrıca değerlendirilerek diğer gruplar ile karşılaştırıldı.



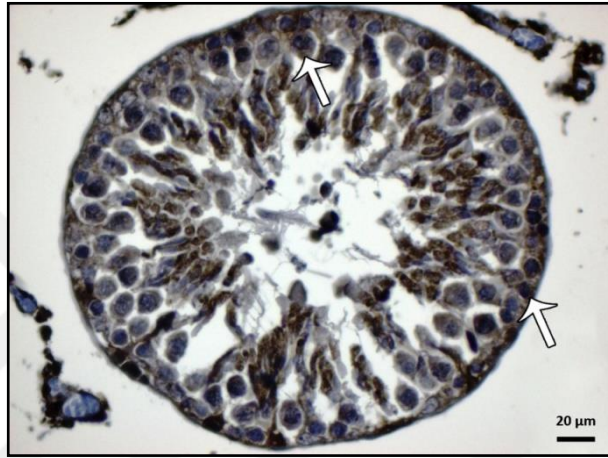
Resim-19: T/D grubu rat testis kesitlerinde Procaspase-3 immunohistokimya. Spermatogenezis'in farklı aşamalarındaki hücrelerde görülen yoğun procaspase-3 ekspresyonu (ok). (Bar: 20 µm, Procaspase-3 İmmunohistokimya, H&E zıt boyama).

Torsiyon / Detorsiyon + Allopurinol grubu rat testis kesitlerinde procaspase-3 ekspresyonu'nun diğer gruplar gibi yoğun ve diffüz bir şekilde tubüler alanda ve interstisyel alanda olduğu tespit edildi (Resim 20). Germ hücrelerindeki ekspresyon görüntüsü diğer gruplara benzer şekildedir. Ayrıca DAB pozitif sinyallerinin toplam doku alanına oranı yüzdesel olarak hesaplandı ve istatistiksel yönden ayrıca değerlendirildi.



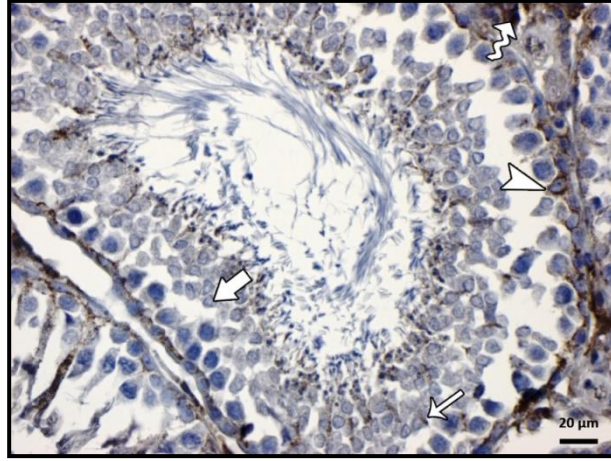
Resim-20: T/D+A grubu rat testis kesitlerinde Procaspase-3 immunohistokimya. Spermatogenezis'in farklı aşamalarındaki hücrelerde görülen yoğun procaspase-3 ekspresyonu (ok). (Bar: 20 µm, Procaspase-3 İmmunohistokimya, H&E zıt boyama).

Torsiyon/Detorsiyon+Trolox (T/D+T) grubundaki ratların testis kesitlerinde procaspase-3 pozitif sinyallerinin germ hücre sitoplazmik alanlarında var olduğu tespit edildi. Diğer gruplardaki procaspase-3 boyamalarına benzer görüntünün olduğu görüldü. Germ hücrelerinin farklı aşamalarındaki spermatogenezis ve Leydig hücrelerinde yoğun protein ekspresyonu incelendi (Resim 21). Pozitif sinyallerin toplam doku alanında kapladığı yüzdesel veriler istatistiksel yönden hesaplanarak değerlendirildi.



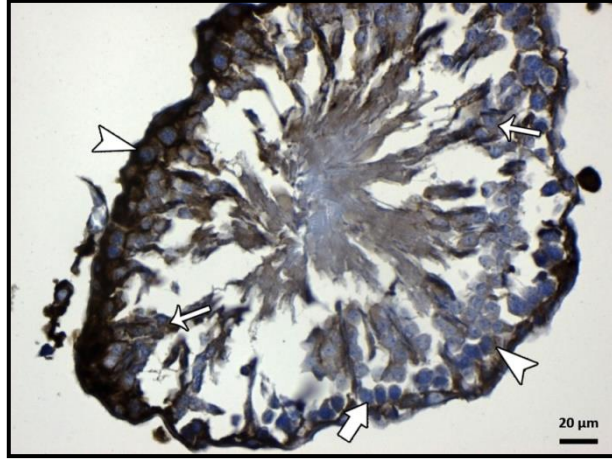
Resim-21: T/D+T grubu rat testis kesitlerinde Procaspase-3 immunohistokimya. Spermatogenezis'in farklı aşamalarındaki hücrelerde görülen yoğun procaspase-3 ekspresyonu (ok). (Bar: 20 µm, Procaspase-3 İmmunohistokimya, H&E zıt boyama).

Cleaved Caspase-3 immunohistokimya boyaması yapılan kontrol grubu kesitlerinde ekspresyon düzeyinin zayıf olduğu incelendi. Spermatogoniya ve spermatozoid düzeyinde Cleaved caspase-3 sinyallerinin zayıf olduğu gözlemlendi (Resim 22). Kontrol grubundaki testis dokularından alınan kesitlerde cleaved caspase-3 ekspresyon alanlarının toplam dokuya oranı yüzdesel olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.



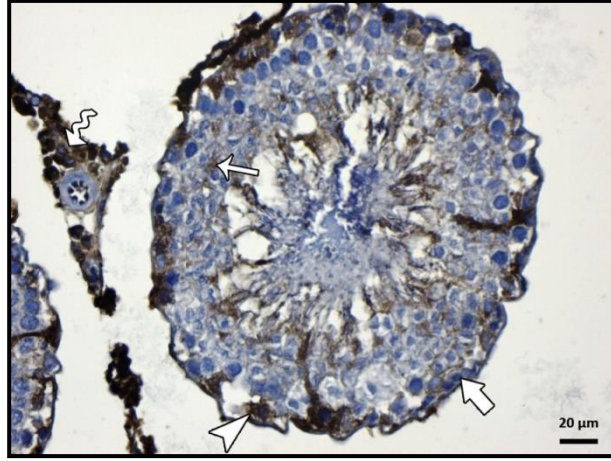
Resim-22: Kontrol grubu rat testis kesitlerinde Cleaved Caspase-3 immunohistokimya. Spermatogonyumlarda düşük düzeyde pozitif sinyal alanları (ok başı) ve seminifer tubülün genelinde negatif sinyal izlenen farklı aşamalarda germ hücreleri (kalın ok). Ayrıca interstisyel stromal alanda yer yer (kıvrımlı ok) ancak spermatid aşamasına gelemeyen hücrelerde ise düşük düzeyde diffüz pozitif sinyaller (ince ok) izlenmektedir. (Bar: 20 μ m, Cleaved Caspase-3 İmmunohistokimya, H&E zıt boyama).

Torsiyon / Detorsiyon grubu rat testis kesitlerinde Cleaved Caspase-3 ekspresyonu'nun yer yer düşük düzeyde veya negatif sinyaller gösteriyor olmasına karşın kontrol grubunun aksine hücrelerin büyük bir kısmında pozitif sinyal gösterdiği izlendi. DAB kromojen yoğunluğu da kontrol grubuyla gözlemsel olarak karşılaştırıldığında diffüz ve çok yoğun bir görüntüye sahip olduğu gözlemlendi (Resim 23). Pozitif sinyal alanlarının, seminifer tubülde kapladığı alanın yüzdesel değerleri hesaplanarak istatistiksel yönden değerlendirildi.



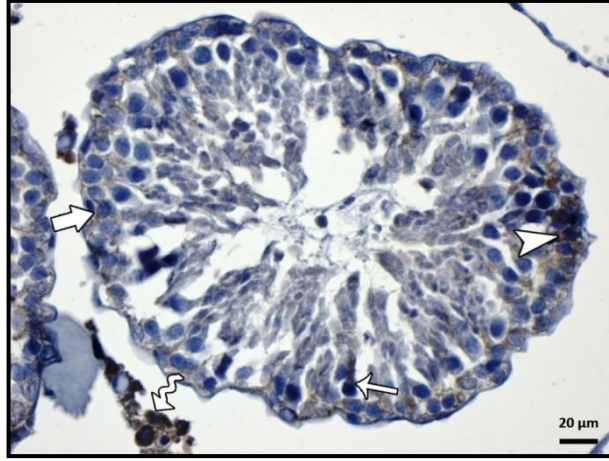
Resim-23: T/D grubu rat testis kesitlerinde Cleaved Caspase-3 immunohistokimya. Seminifer tubülde yer alan spermatogonyumlarda (ok başı) ve spermatogenezis'in farklı aşamalarındaki hücrelerde (ince ok) pozitif sinyaller. Yer yer negatif veya düşük düzeyde pozitif sinyaller veren germ hücreleri (kalın ok) izlenmektedir. (Bar: 20 μ m, Cleaved Caspase-3 İmmunohistokimya, H&E zıt boyama).

Torsiyon / Detorsiyon + Allopurinol grubu rat testis kesitlerinde Cleaved Caspase-3 ekspresyonu'nun I/R grubuna nazaran daha kısıtlı alanlarda pozitif sinyal gösterdiği izlendi. Bu gruptaki seminifer tubüllerde pozitif sinyallerin çoğunlukla spermatogonyumlarda ve kısmen spermatidlerde olduğu gözlemlendi (Resim 24). Seminifer tubül parankimasındaki DAB kromojen alanlarının toplam dokuda kapladığı yüzdesel bölgeler hesaplanarak gruplar arasındaki ilişki istatistiksel yönden değerlendirildi.



Resim-24: T/D+A grubu rat testis kesitlerinde Cleaved Caspase-3 immunohistokimya. Erken dönem spermatogenik hücrelerde (ok başı) ve spermatogenezis'in ileri aşamalarındaki hücrelerde (ince ok) yer yer yoğun pozitif sinyaller ayrıca tubül genelinde görülen negatif sinyaller (kalın ok) ve interstisyel alandaki leydig hücrelerinde Cleaved Caspase-3 pozitif alanlar (kıvrımlı ok) izlenmektedir. (Bar: 20 μ m, Cleaved Caspase-3 İmmunohistokimya, H&E zıt boyama).

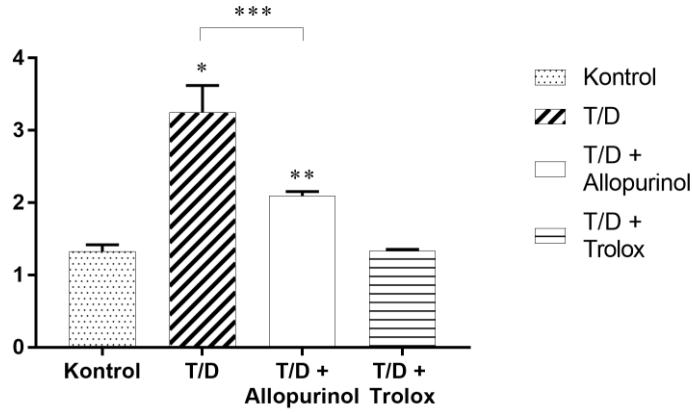
Torsiyon / Detorsiyon + Trolox grubu rat testis kesitlerinde Cleaved Caspase-3'ün pozitif sinyallerinin gözlemsel değerlendirmesinde çok kısıtlı bir alanda yer aldığı ve spermatogenezis'in çeşitli aşamalarında pozitif sinyallerin görünmesine rağmen dokunun bütünü ele alındığında negatif sinyallerin daha yoğun bir alanda var olduğu izlendi (Resim 25). Pozitif sinyallerin tubülün toplam alanında kapladığı bölgenin yüzdesel oranları hesaplanarak istatistiksel yönden analize tabi tutuldu ve Cleaved Caspase-3 pozitif yüzdesel alanları diğer gruplarla karşılaştırıldı.



Resim-25: T/D+T grubu rat testis kesitlerinde Cleaved Caspase-3 immunohistokimya. Spermatogonyumlarda (ok başı) spermatositlerde (ince ok) ve interstisyel alanda (kıvrımlı ok) yer yer görülen pozitif sinyallerin yanı sıra dokunun genelinde negatif veya düşük düzeyde sinyaller (kalın ok) izlenmektedir. (Bar: 20 μ m, Cleaved Caspase-3 İmmunohistokimya, H&E zıt boyama).

5.5. İstatistiksel Bulgular

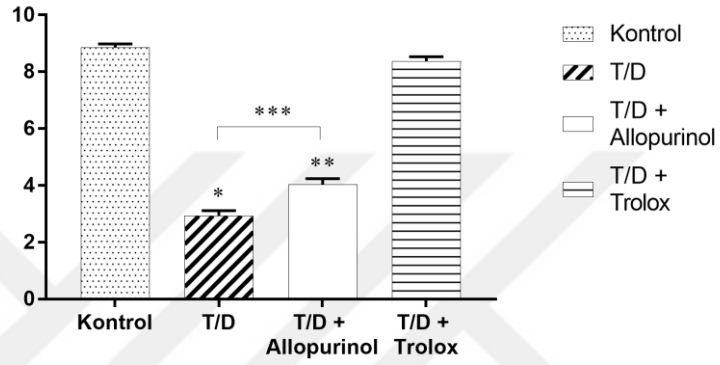
Deneysel çalışmamıza ilişkin parametrelerden kan serum MDA düzeyi, Johnsen skoru, TUNEL Assay, PCNA, procaspase-3 ve cleaved caspase-3'e ait veriler Tablo-3'te gösterilmiştir. Kan serum malondialdehit değerleri ölçülen örneklerden kontrol grubundaki MDA miktarının $1,33 \pm 0,09$ nmol/ml olduğu tespit edildi. T/D grubunda kan serum MDA değerinin $3,25 \pm 0,37$ nmol/ml olduğu ve kontrol grubundan anlamlı derecedefarklı olduğu tespit edildi ($p < 0,01$). T/D+A grubundaki hayvanların kan serum MDA düzeylerinin $2,09 \pm 0,06$ nmol/ml olduğu ve hem kontrol hem de T/D gruplarından kan serum MDA düzeylerinin anlamlı derecede farklı olduğu tespit edildi. T/D+T grubu kan serum MDA miktarı ise $1,34 \pm 0,02$ nmol/ml olarak bulundu. Bu grubun MDA değeri kontrol grubu ile benzer ($p > 0,05$) olmasına karşın T/D ve T/D+A gruplarından anlamlı derecede ($p < 0,01$) farklıydı (Şekil 21).



Şekil-21: Kan serum malondialdehit değerlerinin istatistik sonuç grafiği. Farklı üst simgeler grupların kontrol ve T/D+Trolox grupları ile anlamlı derecede farklılığını göstermektedir (*: $p<0,01$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,01$)

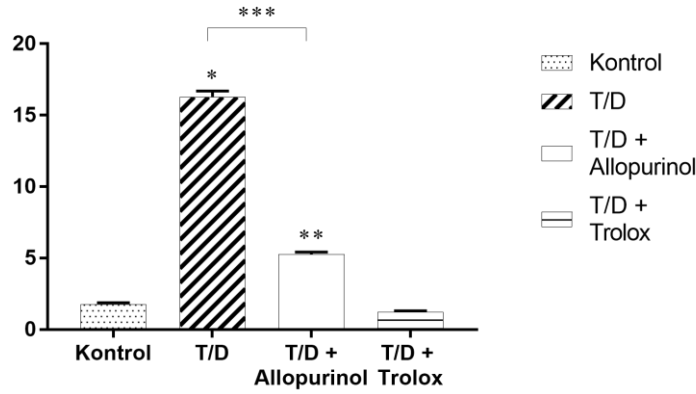
Her gruptan alınan kesitlerde rastgele seçilen 70 adet seminifer tubül Johnsen skorlamaya göre değerlendirildi. Kontrol grubu Johnson skorlaması $8,86\pm 0,12$ olarak tespit edildi. Kontrol grubundaki 5 hayvanda Spermatogenezis'in bütün aşamaları normal yapıda olmasına karşın, 2 hayvandan alınan testis kesitlerinde belirli bir miktarda seminifer tubüllerde yoğun spermatozoa mevcudiyetine rağmen kısmen germinal epitelyum disorganizasyonu izlendi. T/D grubunda spermatogenezisin ağır hasar gördüğü ve Johnsen skorlamasının $2,94\pm 0,17$ olduğu tespit edildi. Bu gruptaki hayvan testis kesitlerinden 4 tanesinde yoğun harabiyet izlendi. 2 hayvan testis kesitinde düşük sayıda spermatozoid olduğu, 1 hayvanda ise germ hücrelerinin ve sertoli hücrelerinin büyük çoğunlukla ortadan kalktığı gözlemlendi. Çoklu karşılaştırmada T/D grubunun Johnsen biyopsi skorlaması yönünden tüm gruplardan farklı olduğu ($p<0,01$) tespit edildi. T/D+A grubu rat testis kesitlerinde Johnson skorlamasının $4,04\pm 0,20$ olduğu tespit edildi. Bu gruptaki hayvanların 4 tanesinin kesitlerinde düşük sayıda spermatozoa izlendi. Kesitleri alınan ratların 2 tanesinde germinal epitelyum disorganizasyonu ile birlikte çok sayıda spermatozoa mevcudiyeti izlendi. Testis kesitlerinden 1 tanesinde ise çok sayıda spermatozoid varlığına rağmen seminifer tubül lümeninde spermatozoa'ya rastlanmadı. Ayrıca istatistiksel değerlendirmede bu grubun bütün gruplardan anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0,01$) tespit edildi. T/D+T grubu spermatogenezis değerlendirmesinde Johnson skorlamasının $8,37\pm 0,16$ olduğu kaydedildi. Bu gruptaki ratların 4

tanenin testis kesitlerinde germinal epitel disorganizasyonu'nun yanı sıra çok sayıda spermatozoa izlendi. T/D+T grubundaki 3 rat'ın testis kesitlerinde ise spermatozoa sayısında düşüş olduğu gözlemlendi. Bu grubun kontrol grubuyla benzer olduğu ($p>0,05$) ayrıca T/D ve T/D+A grupları ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel bakımdan anlamlıydı ($p<0,01$) (Şekil 22).



Şekil-22: Johnsen skor analizinin istatistiksel sonuç grafiği. Farklı üst simgeler grupların kontrol ve T/D+Trolox grupları ile anlamlı derecede farklılığını göstermektedir (*: $p<0,01$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,01$).

TUNEL Assay ile DNA fragmentasyon ve Apoptotik İndeks (AI) analizi sonucunda Kontrol grubundaki AI'in $\% 1,77\pm 0,11$ olduğu tespit edildi. T/D grubundaki AI'in ise $\% 16,29\pm 0,40$ olduğu ve bu gruptaki AI artışının kontrol grubundan anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0,01$) tespit edildi. T/D+A grubunun TUNEL Assay ile değerlendirilen AI'inin $\% 5,28\pm 0,14$ olduğu ve hem kontrol grubundan ($p<0,01$) hem de T/D grubundan ($p<0,01$) anlamlı derecede farklı olduğu sonucuna ulaşıldı. T/D+T grubunun AI değerinin $\% 1,22\pm 0,09$ olduğu ve kontrol grubu ile benzer ($p>0,05$) ancak T/D ve T/D+A gruplarından kuvvetli derecede farklı olduğu ($p=0,00$) tespit edildi (Şekil 23).

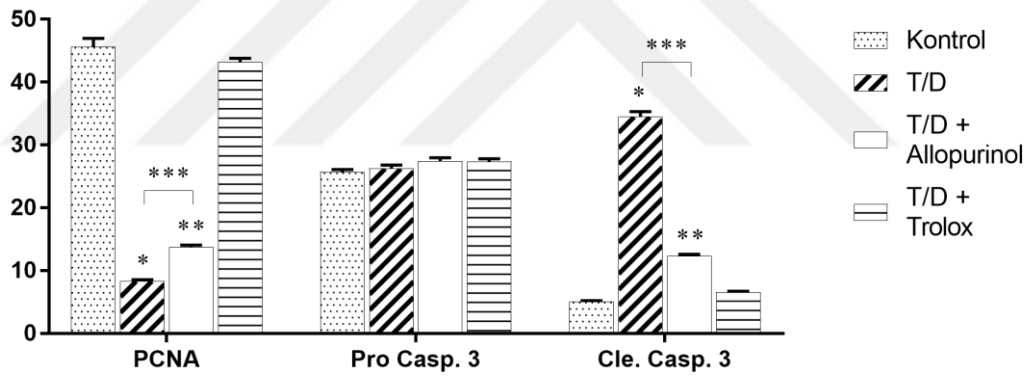


Şekil-23: TUNEL Assay değerlerinin istatistik sonuç grafiği. Farklı üst simgeler grupların kontrol ve T/D+Trolox grupları ile anlamlı derecede farklılığını göstermektedir (*: $p<0,01$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,01$)

İmmunohistokimyasal analiz yapılan parametrelerden PCNA analizinde kontrol grubunda pozitif sinyal veren hücre çekirdeklerinin toplam çekirdeklere oranı'nın $\%45,63\pm1,35$ olduğu tespit edildi. T/D grubunda ise bu oranın $\%8,37\pm0,21$ olduğu ve PCNA pozitif çekirdek yüzdesinin diğer tüm gruplardan anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0,01$) tespit edildi. T/D+A grubunun PCNA pozitif germ hücre çekirdek sayısının tubüllerde yer alan toplam çekirdek sayısına oranı $\%13,77\pm0,29$ olarak bulundu. Bu gruptaki PCNA çekirdek pozitif sinyal oranı'nın kontrol grubuna göre azalması anlamlıydı ($p<0,01$) ayrıca T/D grubu ile karşılaştırıldığında ise pozitif sinyal oranındaki artışın anlamlı olduğu ($p<0,01$) bulundu. T/D+T grubu PCNA analizinde pozitif sinyal gösteren çekirdeklerin toplam seminifer tubül germ hücre çekirdeklerine oranı'nın $\%43,20\pm0,62$ olduğu tespit edildi. Bu gruptaki pozitiflik yüzdesinin kontrol grubu ile benzer olduğu ($p>0,05$), T/D ve T/D+A grupları ile karşılaştırıldığında ise farkın anlamlı olduğu ($p<0,01$) tespit edildi (Şekil 24).

Procaspase-3 analizi yapılan örneklerde kontrol grubundaki ekspresyon alanlarının toplam doku alanına oranı $\%25,69\pm0,40$ olarak tespit edildi. T/D grubunda bu oranın $\%26,27\pm0,53$, T/D+A grubunda $\%27,46\pm0,50$ ayrıca T/D+T grubunda ise $\%27,34\pm0,50$ olduğu ve bu gruplar arasında anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edildi ($p>0,05$) (Şekil-24).

Cleaved Caspase-3 analizi yapılan örneklerden kontrol grubuna ait testis kesitlerindeki seminifer tubüllerde Cleaved Caspase-3'ün pozitif sinyallerinin toplam doku alanına oranı $5,05 \pm 0,19$ olarak tespit edildi. T/D grubundaki bu oranın $34,54 \pm 0,79$ olduğu ve kontrol grubundan kuvvetli derecede farklı olduğu ($p < 0,01$) görüldü. Yapılan analizde T/D+A grubunda Cleaved Caspase-3 pozitif sinyal oranı'nın toplam doku alanına oranı $12,31 \pm 0,31$ olarak bulundu. Bu gruptaki yüzdesel değerin kontrol grubuna kıyasla azalması anlamlıydı ($p < 0,01$) ayrıca I/R grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyon alanlarının yüzdesel değerindeki artış ta anlamlı bulundu ($p < 0,01$). T/D+T grubunun Cleaved Caspase-3 pozitif sinyal alanının toplam doku alanına oranı $6,57 \pm 0,16$ olarak tespit edildi. Bu grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$). Ancak hem T/D hem de T/D+A grubu ile karşılaştırıldığında, T/D+T grubundaki yüzdesel azalma istatistiksel yönden kuvvetli şekilde anlamlı ($p < 0,01$) bulundu (Şekil-24).



Şekil-24: İmmunohistokimya verilerinin istatistiksel sonuç grafiği. Farklı üst simgeler grupların kontrol ve T/D+Trolox grupları ile anlamlı derecede farklılığını göstermektedir (*: $p < 0,01$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,01$)

Tablo-3: İstatistiksel analiz yapılan verilerin, ortalama, minimum, maksimum ve standart hata değerleri.

MDA					
<i>Grup</i>	<i>n</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Min.</i>	<i>Maks.</i>	<i>Standart Hata</i>
Kontrol	7	1,33	1,04	1,76	0,09
T/D	7	3,25	1,87	4,26	0,37
T/D + Allopurinol	7	2,09	1,92	2,40	0,06
T/D + Trolox	7	1,34	1,24	1,41	0,02
Johnsen Score					
<i>Grup</i>	<i>n</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Min.</i>	<i>Maks.</i>	<i>Standart Hata</i>
Kontrol	70	8,86	6	10	0,12
T/D	70	2,94	1	8	0,17
T/D + Allopurinol	70	4,04	1	8	0,20
T/D + Trolox	70	8,37	6	10	0,16
TUNEL Assay					
<i>Grup</i>	<i>n</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Min.</i>	<i>Maks.</i>	<i>Standart Hata</i>
Kontrol	7	1,77	0,00	4,08	0,11
T/D	7	16,29	10,49	24,19	0,40
T/D + Allopurinol	7	5,28	3,21	7,93	0,14
T/D + Trolox	7	1,22	0,00	3,43	0,09
PCNA					
<i>Grup</i>	<i>n</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Min.</i>	<i>Maks.</i>	<i>Standart Hata</i>
Kontrol	70	45,63	23,83	72,54	1,35
T/D	70	8,37	4,38	12,50	0,21
T/D + Allopurinol	70	13,77	8,47	22,08	0,29
T/D + Trolox	70	43,20	31,01	57,32	0,62
Procaspase-3					
<i>Grup</i>	<i>n</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Min.</i>	<i>Maks.</i>	<i>Standart Hata</i>
Kontrol	70	25,69	20,14	34,53	0,40
T/D	70	26,27	19,04	36,49	0,53
T/D + Allopurinol	70	27,46	20,63	36,86	0,50
T/D + Trolox	70	27,34	19,44	35,94	0,50
Cleaved Caspase-3					
<i>Grup</i>	<i>n</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Min.</i>	<i>Maks.</i>	<i>Standart Hata</i>
Kontrol	70	5,05	2,20	9,34	0,19
T/D	70	34,54	21,47	51,90	0,79
T/D + Allopurinol	70	12,31	6,46	19,35	0,31
T/D + Trolox	70	6,57	3,51	9,57	0,16

6. TARTIŞMA

Testis torsiyonu hayati olmasa da vaktinde teşhis ve tedavi uygulanmazsa organ kaybına neden olabilir. Bu yüzden erken teşhis ve müdahale hem organ kaybı hem de infertilite yönünden önemlidir (66,218,219). Bu çalışmada ratların sol testisi 720° saat yönünde kendi etrafında döndürülerek testiküler torsiyon yapılarak iskemi modeli oluşturuldu. Beş saatlik iskemi süresi sonunda detorsiyon yapılarak reperfüzyon gerçekleştirildi ve 2 saat süreyle testise kan akışı sağlandı. İskemi/Reperfüzyon (I/R) sonucunda testiküler dokuda ağır hasar oluştuğunu gözlemledik. Bu hasarın patogenezisinde oksidan moleküllerin önemli bir rol oynadığını düşünmekteyiz. Deneysel çalışmalarda kafeik asit, fenil ester, melatonin, selenyum, resveratrol ve N-asetilsistein gibi antioksidan ajanlar sıklıkla kullanılmaktadır (61,63,220-223). Bu ajanlar iskemi reperfüzyon hasarını azaltmaktadır. Biz de bu çalışmada antioksidan özelliği iyi bilinen allopurinol ve bir vitamin E analogu olan trolox'un doku hasarını önlemedeki rolünü araştırdık.

Antioksidan kapasitesi bilinen allopurinol ve vitamin-E ile çalışan bazı araştırmacılar bu ajanların testis I/R hasarını azaltmada yetersiz olduğu yönünde veriler sunan araştırmalar gerçekleştirmişlerdir (63). Oysa bizim yaptığımız deneysel çalışmada allopurinol'un düşük seviyede koruyucu olduğu, ancak bir vitamin-E analogu olan trolox'un I/R şekillenen testiste hasarı önlemede oldukça etkin olduğu kanaatine varılmıştır. Silva ve ark. (224) yaptıkları araştırmada spermatik kord'a bir saatlik torsiyon uygulamasından 45 dakika sonra intraperitoneal yolla allopurinol enjekte etmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda allopurinol'un testis hasarını önlemede etkin olmadığını vurgulamışlardır. Bu çalışmanın sonuçları bizim deneysel çalışmamızın sonuçlarıyla uyum göstermektedir.

Harrison ve ark. (225) ratlarda bir ve iki saat süreyle oluşturdukları iskemi ve daha sonra şekillenen reperfüzyon sonucunda şekillenen doku hasarını araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmanın sonucunda testislerde şekillenen fonksiyon kaybının ve doku hasarının reperfüzyon'un 60. gününde dahi giderilmediği tespit edilmişlerdir.

Yurtçu ve ark. (226) 6 saat süreyle 720°'lik testis rotasyonu ile oluşturdukları iskemi modelinde, reperfüzyon öncesi melatonin uygulamasının oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Şimdiye kadar hayvan modellerinde koruma amacıyla propofol ve erdosteine gibi pek çok ilaç ve kimyasallarla testiküler I/R hasarı üzerine çalışmalar yapılmıştır (61,227-231). Bu ajanların esas mekanizması hasar sonrası kan akışının düzenlenmesi, germ hücrelerinde apoptozis ve serbest radikallerin azaltılmasıdır. Bununla birlikte bütün bu ajanlar deneysel torsiyon modelleri oluşturulduktan sonra kullanılmıştır. Ünsal ve ark. (232) testiküler torsiyondan 5 gün önce sarımsak takviyesi yaptıkları bir deney hayvan modeli araştırmasında, sarımsak ekstraktının I/R hasarının önemli düzeyde azalttığını gözlemlemiştir. Akgül ve ark. (233) buna benzer bir başka çalışmada ginkgo biloba'nın I/R hasarının azaltılmasında etkinliğini araştırmışlardır. Bir başka araştırmada Kostakis ve ark. (234) erişkin erkek ratlarda testiküler torsiyon/detorsiyon (T/D) esnasında oluşan I/R hasarına karşı eritropoietin ve sildenafil'in koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada detorsiyondan 30 dk önce i.p. yolla uygulanan eritropoietin ve sildenafil'in I/R hasarının yan etkilerini azalttığı belirtilmiştir. Hasar değerlendirmesinde Costantino's skorlama yapılan bu çalışmada histolojik hasarı azaltan bu iki ajanın tedavi uygulanmayan deney grubuyla karşılaştırıldığında seminifer tubül sınırlarının daha düzenli olduğu ve apoptotik germ hücre sayısının azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca bu iki ajanın koruyucu etkilerinin incelendiği bu çalışmada tedavi edilmeyen I/R grup ile tedavi uygulanan grupların Johnsen skorlama açısından karşılaştırması gerçekleştirilmiş ve tedavi uygulanan grupların spermatogenezis yönünden de anlamlı şekilde farklı olduğu belirtilmiştir. Histolojik değerlendirmede yüksek doz sildenafil ve eritropoietin'in benzer sonuçlar verdiği ancak düşük doz eritropoietin'in tedavi sonucunun daha sınırlı bir seviyede olduğu belirtilmiştir. Buradan I/R hasarının azaltılması bakımından kullanılan ajanların yanı sıra uygulanan dozun da etkili olduğu sonucuna varılmaktadır. Kostakis ve ark. (234) ayrıca detorsiyon sonrasında kaspaz-3 ekspresyon düzeyindeki artış ile apoptozisi göstermiştir.

Testiküler torsiyon vakalarının %30-80'inde testis atrofişi şekillenir (235). Bu hasarın en önemli nedeni, oluşan serbest radikal türevlerinden kaynaklanmaktadır (236). Ayrıca erkek infertilitesinin en büyük nedenlerinden birinin oksidatif stres olduğu ve infertil bireylerde seminal ROS miktarının yüksek olduğu belirtilmiştir (237-239). İskemi sonrası testiste germinal epitel, Sertoli hücreleri, tunica propria, interstisyel doku ve Leydig hücrelerinde hasar olduğu bilinmektedir (240).

Ratlarda testiküler torsiyon sonrası oluşan histopatolojik değişikliklerin önlenmesinde pek çok enzim ve ilaç kombine halinde kullanılarak araştırılmıştır (241,242). Ayrıca birçok doku, serbest radikallere karşı korunmayı sağlayan SOD, CAT, Glutasyon peroksidaz, askorbik asit, α -tokoferol gibi güçlü endojen temizleyicilere sahip olduğu bilinmektedir (243). Yapılan bir çalışmada Ranade ve ark. (244), 3 saatlik iskemiye takiben 1 saatlik reperfüzyon sonunda seminifer tubül çapında, ayrıca seminifer tubül epitel yüksekliğinde, spermatozoa maturasyonunda ve germinal epitel tutunumunda azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. Bazı çalışmalarda antioksidanların infertilite ve sperm fonksiyon bozukluğunda kritik bir role sahip olduğu gösterilmiştir (245). Ranade ve ark. (244) T/D öncesi 30 gün boyunca vitamin-E uyguladıkları ratlarda reperfüzyon'un neden olduğu testiküler hasarın azaldığını ve seminifer tubül epitel yüksekliği'nin anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir. Kolski ve ark.'nın (246) ratlarda gerçekleştirdiği bir başka çalışmada detorsiyonu takiben hiperbarik oksijen tedavisinin germinal epitel yapısının korunmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Bir başka çalışmada Bozlu ve ark. (247) benzer bir durumu kaydetmiştir. Bu çalışmada torsiyon öncesi adenzin trifosfat riboz (poly polimeraz) ön tedavisi uyguladıkları grupta seminifer epitel çapı ve germinal hücre kalınlığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydetmişlerdir. Multinükleer dev hücreler, tamoksafil uygulanan hayvanlarda yaygın görülen ve germ hücre son aşamasında gerçekleşen hücre dejenerasyonu ile ilişkilidir. Çok çekirdekli dev hücreler karyokinez sonrası sitokinez şekillenmeyen hücrelerdir. Buna karşın tubül lümeninde gözlemlenen tek çekirdekli dev hücreler ise çoğunlukla dejenere hücrelerdir. Bu sebeple dejenerasyon aşamasında çok çekirdekli dev hücreler erken safha, tek çekirdekli hücreler ise geç safhada gözlemlenir (248). Ranade ve ark. çalışmalarında I/R öncesi uygulanan vitamin-E'nin I/R'un neden olduğu germinal epitel deskuamasyonu'nu azaltmasıyla birlikte spermatogenezisi arttırdığı sonucuna ulaşmıştır. Çalışmalar normal spermatogenezis'in şekillenmesi için C ve E vitaminleri'nin gerekli olduğunu ve bu vitaminlerin eksikliğinde deney hayvan germinal hücre tabakalarında disfonksiyon olduğu bildirilmiştir (249,250). Ayrıca vitamin C ve E, klinik ve deneysel çalışmalarda birlikte kullanılarak sinerjik bir etkinlik gerçekleştirerek aşırı oksidasyon durumunu ortadan kaldırmaktadırlar (251).

Çalışmamızda deney hayvanlarından alınan kan serumlarından elde edilen MDA değerleri bakımından Torsiyon/Detorsiyon (T/D) grubunda kontrolle karşılaştırıldığında önemli bir artış gözlemledik. Bunun nedeninin testis dokusunda şekillenen iskemiye bağlı olarak lipid peroksidasyonu'nun reperfüzyonla beraber sistemik dolaşıma aktarılmasından kaynaklandığı bilinmektedir. Yıldırım Y. ve ark. (252) testiküler iskemi ve reperfüzyonu takiben intra peritoneal antioksidan uygulamasının testis dokusu hasarı ve kan serum oksidatif stres markerları üzerinde araştırma yaptıkları bir çalışmada, T/D'na bağlı şekillenen İskemi/Reperfüzyon'un (I/R) kan serumunda ve testiküler dokuda MDA düzeyinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda da 5 saat süreyle torsiyon ve 2 saat süreyle reperfüzyon uygulanan deney grubundaki (T/D) hayvanlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kan serum MDA düzeyinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Aynı çalışmada antioksidan potansiyeli bilinen ilaçların bu kan serum MDA düzeyini istatistiksel yönden anlamlı derecede azalttığı belirtilmiştir. Bir başka çalışmada Abasıyanık A. ve ark. (221), ratlarda 6 saatlik iskemi ve 6 saatlik reperfüzyon'un testis dokusunda neden olduğu hasara karşı melatonin ve allopurinol'ün koruyucu etkilerini karşılaştırmıştır. Bu çalışmada 200 mg/kg allopurinol kullanılmış ve doku MDA düzeyleri incelenmiştir. Allopurinol uygulanan deney hayvan dokularında MDA düzeyinin kontrol grubundan istatistiksel yönden anlamlı derecede farklı olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmada allopurinol tedavisi uygulanan gruptaki hayvanların doku MDA düzeyleri, torsiyon ve detorsiyon uygulanan gruptaki hayvanların doku MDA düzeylerinden de anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Yani allopurinol uygulanan grup, kontrol ve torsiyon/detorsiyon uygulanan grubun arasında bir doku MDA değerine sahip olmuştur. Bizim çalışmamızda da reperfüzyon öncesi allopurinol uyguladığımız hayvanların kan serum MDA düzeyleri T/D grubuyla karşılaştırdığımızda anlamlı derecede farklıydı ($p<0,01$). Ancak bu grubu kontrol ve Torsiyon/Detorsiyon+Trolox (T/D+T) gruplarıyla karşılaştırdığımızda da MDA düzeylerinin yine anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0,01$). Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuç doğrultusunda allopurinol'un T/D kaynaklı kan serum MDA düzeyinde bir azalma sağlamakla beraber antioksidan özelliğinin düşük düzeyde olabileceği veya deneysel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen 200 mg/kg Allopurinol uygulamalarının ortamdaki

lipid peroksidasyonunu indirgemede yeterli olamayabileceği fikrine ulaştık. Abasıyanık ve ark. ayrıca bu çalışmada, testiküler doku histopatolojisini skorlamak suretiyle melatonin ve allopurinol'ün koruyucu etkilerini incelemiştir. Değerlendirme sonuçları allopurinol'ün iskemi reperfüzyon'un neden olduğu histolojik hasarı ortadan kaldırmada yeterli olmadığı yönündedir. Bizim yaptığımız çalışmada Johnsen skorlaması ile gerçekleştirdiğimiz değerlendirmede allopurinol ön tedavisi uygulanan gruptaki (T/D+A) hayvanların Johnsen skorları kontrol'den anlamlı derecede farklıydı ($p<0,01$). Ancak bu gruptaki hayvanların Johnsen skorlamaları aynı şekilde T/D ve trolox uygulanan gruptan (T/D+T) da anlamlı derecede farklı bulundu. Yani allopurinol morfolojik yapıyı protektif özelliği bakımından da kan serum MDA düzeyi gibi kontrol ve T/D grupları arasında istatistiksel bir değer aldı. Yapılan değerlendirme T/D hasarına karşı allopurinol'ün testiküler morfolojiyi koruma açısından yeterli olmadığı yönündeydi. Çalışmamızda T/D+T grubundaki hayvanların kan MDA düzeyleri ve Johnsen biyopsi skorlamaları ise istatistiksel değerlendirme sonucunda kontrol grubuna benzer bulundu ($p>0,05$).

Kehinde E.O. ve ark. (253) yaptığı bir deneysel çalışmada, tavşanlarda sol testis üzerinde spermatik kord'u klampe etmek suretiyle 1 saat süreyle iskemi oluşturulmuş ve reperfüzyondan 30 dakika önce 200 mg/kg allopurinol enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada deney hayvanları 24 saat ve 3 ay sonra sakrifiye edilerek testiküler doku MDA miktarı ve Johnsen skorlaması değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda doku MDA düzeyinin 24 saatlik ve 3 aylık reperfüzyon sonunda kontrol grubuna benzer olduğu ayrıca Johnsen skorlamasının allopurinol uygulanan grupta, kontrole yakın olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları allopurinol'ün iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu özelliği açısından başarılı bulunmuştur. Ancak bu çalışmayı bizim deneysel prosedürümüzden ayrı kılan bazı detaylar mevcuttur. Kehinde E.O ve ark. tavşanlarda spermatik kord'u klampe etmek suretiyle iskemi oluşturmuştur. Ancak bizim çalışmamızda spermatik kord saat yönünde 720° döndürerek torsiyon gerçekleştirmek suretiyle iskemi şekillendirilmiştir. Çalışmalarımız arasındaki bir diğer farklılık ise Kehinde E. O ve ark. iskemi süresini 1 saat ile sınırlandırmıştır ancak bizim çalışmamızda 5 saat süreyle testiküler kan akışı durdurulmuştur. Her iki çalışmada da kullanılan allopurinol dozu 200 mg/kg'dır. Yaptığımız literatür

taramasında ratlarda oluşturulacak deneysel iskemi reperfüzyon modeli için en az 1 saat süreyle kan akışının durdurulması gerektiği bilgisine ulaştık (254). Ayrıca bazı çalışmalarda tam iskemi oluşturulabilmesi için 720° 'lik testis rotasyonun yeterli olduğu belirtilmiştir (255,256). Ancak Kehinde E. O ve ark. larının oluşturduğu şekilde klampe etmek suretiyle iskemi oluşturulmasına yönelik bir deney hayvanı modeli bilgisine ulaşamadık.

Romeo C ve ark. (257) ratlar üzerinde yapmış oldukları deneysel bir çalışmada, hidrofilik bir vitamin-E analogu olan raxofelast'ın deneysel torsiyon detorsiyon modeli oluşturulmuş ratlarda testiküler doku üzerindeki etkisini araştırmıştır. Bu çalışmada sol testis 720° saat yönünde torsiyon uygulanmak suretiyle 3 saat süreyle iskemi oluşturulmuş. Detorsiyondan 15 dakika önce ve sonrasında 2 doz şeklinde 20 mg/kg raxofelast i.p. yolla uygulanmıştır. Romeo ve ark. yaptıkları bu deneysel çalışma sonucunda hidrofilik vitamin-E analogu olan raxofelast'ın testis üzerindeki koruyucu etkisini göstermiştir. Bizim çalışmamızda da hidrofilik vitamin-E analogu olan trolox reperfüzyondan 30 dk önce i.p. yolla uygulanmış ve histopatolojik yapı Johnsen skorlama ve genel histopatoloji bakımından kontrol grubuna benzer bulunmuştur. Bu bulgularımız Romeo ve ark. bulgularıyla uyum göstermektedir.

Erol B. ve ark. (258) bir çalışmada testiküler T/D kaynaklı I/R hasarını ve kombine antioksidanların bu hasar üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Erol B. ve ark. çalışmalarında, vitamin-E'nin de içerisinde bulunduğu kombine antioksidanların I/R hasarı üzerindeki etkisini doku MDA düzeyi ve testiküler apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) ekspresyonu yönünden immunohistokimyasal olarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında doku MDA seviyesinin ve APAF-1 ekspresyonu'nun I/R uygulanan hayvanların testis dokusunda anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada vitamin-E'nin de içinde bulunduğu kombine antioksidanların APAF-1 ekspresyonu'nu ve doku MDA seviyesini azalttığı belirtilmiştir.

Bir başka çalışmada ise Özbal ve ark. (259), iki saat süreyle saat yönünde testiküler torsiyon uyguladıkları ratlarda, detorsiyondan 30 dakika önce i.p. yolla antioksidan özelliği bilinen α -lipoik asit uygulaması gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada T/D uygulanan hayvanlarda testiküler MDA düzeyinin, cleaved caspase-3 ekspresyonunun, Johnsen skorlamasının ayrıca TUNEL Assay yöntemi ile elde

edilen AI'in kontrol grubundan anlamlı derecede farklı olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Özbal ve ark. ayrıca antioksidan uyguladıkları hayvanlarda cleaved caspase-3 ekspresyonu'nun, AI'in ve doku MDA düzeyinin anlamlı derecede azaldığını Johnsen skorlama'nın ise kontrol grubuna benzer olduğunu belirtmiştir.

Hirai ve ark. (260) yaptıkları bir çalışmada ise ratlarda arteriyel iskemi'nin testiküler doku üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmada 6 saat süreyle arteriyel iskemi oluşturulan testis kesitlerinde proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA) pozitif hücrelerin yüzdesel değeri ve Johnsen skorlaması kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azalmıştır. Bu çalışmanın bir diğer verisi ise iskemi uygulanan örneklerde TUNEL Assay ile elde edilen AI'in anlamlı derecede artış gösterdiği'dir.

Hem Erol B. ve ark.'nın (258), hem Özbal ve ark.'nın (259) hem de Hirai ve ark.'nın (260) gerçekleştirdiği deneysel I/R çalışması, bizim çalışmamızla uyumlu sonuçlar ortaya koymaktadır. Bizim çalışmamızda vitamin-E analogu olan trolox uygulanan T/D+T grubunda, kan serum MDA miktarı ve testis dokusundaki TUNEL Assay ile elde ettiğimiz, Apoptotik İndeks (AI) istatistiksel yönden kontrol grubuna benzerdi ($p>0,05$). Ancak, T/D ve T/D+A grupları hem kontrol hem de T/D+T gruplarından kan serum MDA ve AI yönünden anlamlı derecede farklıydı ($p<0,01$). Ayrıca T/D ve T/D+A grupları arasında da istatistiksel yönden anlamlı bir fark mevcuttu ($p<0,01$). Erol B. ve ark. bu çalışma ile testiküler dokuda APAF-1 ekspresyonu değerlendirmesi yaparak testiküler T/D hasarında apoptotik sürecin dışı olarak üzerinden gerçekleştiğini belirtmiştir. Özbal ve ark. ise antioksidan uygulamalarının T/D kaynaklı kaspaz-3 yarıklanma aşamasını bloke ettiği ve bu şekilde cleaved caspase-3 üretiminin baskılandığını, AI'in düşüş gösterdiğini ayrıca doku MDA'sının azaldığını göstermiştir.

Elde ettiğimiz veriler, testiküler T/D sonrası kan serum MDA miktarının arttığını, germinal epitel düzeyinde ise PCNA ekspresyonu'nun ve Johnsen biyopsi skorlamasının anlamlı derecede azaldığını, procaspase-3 ekspresyonu'nun değişmediğini ancak caspase-3 yarıklanması ve AI'in anlamlı derecede artmakta olduğunu göstermektedir. Allopurinol uygulanan hayvanlarda ise bu patolojik durumun kısmen normaleştiği ancak vitamin E analogu trolox'un T/D hasarına karşı testiküler dokuyu korumada allopurinolden daha başarılı olabileceği yönündedir.

Allopurinol enzimler tarafından oluşturulan reaktif oksijen bileşiklerini (ROS) inhibe etmektedir. Bu mekanizmayı süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri üreten ksantin oksidaz'ın inhibisyonu üzerinden gerçekleştirmektedir (261). Benzer antioksidan kapasitesi ve moleküler yapıya sahip olan trolox ve α -tokoferol ise antioksidan özelliklerini, özellikle yapısında bulunan hidroksil grubundaki bir hidrojeni peroksil radikallerine (ROO•) bağlamak suretiyle zincir reaksiyonu oluşturarak serbest radikal aktivitesini bloke ederek göstermektedir (262-265). Yaptığımız çalışmada testiküler T/D hasarında oluşan oksidatif stresin ve neden olduğu histopatolojik hasarın ayrıca protein yapım/yıkımındaki bozukluğun ortadan kaldırılmasında trolox'un, allopurinol'den daha başarılı olmasının nedenini; trolox'un taşıdığı ve serbest radikallere bağladığı hidrojen molekülünden ötürü daha aktif bir bileşen olması ve ksantin oksidaz üzerinde blokaj yapan allopurinol'ün aksine doğrudan son ürünler üzerinden aktivite göstererek oksidatif stresi ve neden olduğu histopatolojik hasarı ortadan kaldırmasından ötürü daha başarılı olmuş olabileceğini düşünmekteyiz.

7. SONUÇ

Yaptığımız çalışma sonucunda ratlarda spermatik kord'un Torsiyon / Detorsiyonu sonucunda kanda MDA seviyesinin yükseldiği ve bu iskemi reperfüzyon sonucunda testiküler dokuda yoğun histolojik hasarın şekillendiğini tespit ettik. Ayrıca spermatogenezis'de görev alan erkek üreme hücrelerinde yoğun apoptosis izledik. Reperfüzyon öncesi Allopurinol uyguladığımız hayvanlarda bu hasarın ve kan MDA düzeylerinin kısmen azaldığını tespit ettik. Ancak vitamin E analogu Trolox uygulanan hayvanlarda genel organ bütünlüğü ve kan MDA düzeyi kontrole benzer bulundu.

Edindiğimiz veriler sonucunda ve yaptığımız literatur taraması doğrultusunda klinikte sıklıkla karşılaşılan testiküler torsiyon'un sebep olduğu organ kaybının önüne geçmek için reperfüzyon öncesi Trolox uygulamasının bir tedavi yöntemi olabileceğini düşünmekteyiz.

Organ fonksiyonu'nun tam olabilmesi için fonksiyonel bütünlüğün ele alınması gerektiği kanaatindeyiz. Bu sebeple, apoptotik markerlar ve morfolojik yönden başarılı olmasına rağmen allopurinol ve trolox'un testiküler iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı diğer hücresel ve organ mekanizmasını nasıl etkilediğine dair daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Sharp, V.J., K. Kieran, and A.M. Arlen, Testicular torsion: diagnosis, evaluation, and management. *Am Fam Physician*, 2013. 88(12): p. 835-40.
2. Altunoluk, B., H. Soylemez, V. Bakan, H. Ciralik, and F.I. Tolun, Protective effects of zofenopril on testicular torsion and detorsion injury in rats. *Urol J*, 2011. 8(4): p. 313-9.
3. Filho, D.W., M.A. Torres, A.L. Bordin, T.B. Crezcynski-Pasa, and A. Boveris, Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med*, 2004. 25(1-2): p. 199-210.
4. Altaffer, L.F., 3rd, Testicular torsion in men. *J Urol*, 1980. 123(1): p. 37-8.
5. Türk, H., O. Çelik, C.S. İsoğlu, H. Tarhan, and Y.Ö. İlbey, Erişkinde Testis Torsiyonu. *İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi*. 24(1): p. 73-76.
6. Altavilla, D., C. Romeo, F. Squadrito, H. Marini, G. Morgia, P. Antonuccio, and L. Minutoli, Molecular pathways involved in the early and late damage induced by testis ischemia: evidence for a rational pharmacological modulation. *Curr Med Chem*, 2012. 19(8): p. 1219-24.
7. Augustin, A.J., T. Boker, S.H. Blumenroder, J. Lutz, and M. Spitznas, Free radical scavenging and antioxidant activity of allopurinol and oxypurinol in experimental lens-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994. 35(11): p. 3897-904.
8. Giulivi, C. and E. Cadenas, Inhibition of protein radical reactions of ferrylmyoglobin by the water-soluble analog of vitamin E, Trolox C. *Arch Biochem Biophys*, 1993. 303(1): p. 152-8.
9. Cortes, D., J. Muller, and N.E. Skakkebaek, Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl*, 1987. 10(4): p. 589-96.
10. Hart, R.J., D.A. Doherty, R.I. McLachlan, M.L. Walls, J.A. Keelan, J.E. Dickinson, N.E. Skakkebaek, R.J. Norman, and D.J. Handelsman, Testicular function in a birth cohort of young men. *Hum Reprod*, 2015. 30(12): p. 2713-24.

11. Joustra, S.D., E.M. Van Der Plas, J. Goede, W. Oostdijk, H.A. Delemarre-van de Waal, W.W. Hack, S. van Buuren, and J.M. Wit, New reference charts for testicular volume in Dutch children and adolescents allow the calculation of standard deviation scores. *Acta Paediatrica*, 2015. 104(6): p. e271-e278.
12. Müller, J. and N.E. Skakkebaek, Quantification of germ cells and seminiferous tubules by stereological examination of testicles from 50 boys who suffered from sudden death. *International journal of andrology*, 1983. 6(2): p. 143-156.
13. Sadov, S., J.J. Koskenniemi, H.E. Virtanen, A. Perheentupa, J.H. Petersen, N.E. Skakkebaek, K.M. Main, and J. Toppari, Testicular Growth During Puberty in Boys With and Without a History of Congenital Cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016. 101(6): p. 2570-7.
14. Zachmann, M., A. Prader, H.P. Kind, H. Hafliger, and H. Budliger, Testicular volume during adolescence. Cross-sectional and longitudinal studies. *Helv Paediatr Acta*, 1974. 29(1): p. 61-72.
15. Pawlina, W. and M.H. Ross, *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 2018: Lippincott Williams & Wilkins.
16. Behre, H., D. NASHAN, and E. Nieschlag, Objective measurement of testicular volume by ultrasonography: evaluation of the technique and comparison with orchidometer estimates. *International journal of andrology*, 1989. 12(6): p. 395-403.
17. Prader, A., Testicular size: assessment and clinical importance. *Triangle; the Sandoz journal of medical science*, 1966. 7(6): p. 240.
18. Handelsman, D.J. and S. Staraj, Testicular size: the effects of aging, malnutrition, and illness. *J Androl*, 1985. 6(3): p. 144-51.
19. Mescher, A.L., *Junqueira's basic histology: text and atlas*. 2013: Mcgraw-hill.
20. Cook, J.L. and K. Dewbury, The changes seen on high-resolution ultrasound in orchitis. *Clin Radiol*, 2000. 55(1): p. 13-8.
21. Simoni, M. and I.T. Huhtaniemi, *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction. Functional Anatomy and Histology of the Testis*, ed. F.M. Bergmann. 2017: Springer. 313-338.

22. Weinbauer, G.F., C.M. Luetjens, M. Simoni, and E. Nieschlag, Physiology of testicular function, in *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction*. 2010, Springer. p. 11-59.
23. Harrison, R., Functional importance of the vascularization of the testis and epididymis for the maintenance of normal spermatogenesis. *Fertility and sterility*, 1952. 3(5): p. 366-375.
24. Bingöl-Koloğlu, M., Y. Sara, F.C. Tanyel, R. Onur, N. Büyükpamukçu, and A. Hiçsönmez, Contractility and electrophysiological parameters of cremaster muscles of boys with a hernia or undescended testis. *Journal of pediatric surgery*, 1998. 33(10): p. 1490-1494.
25. Chung, K.W. and H.M. Chung, *Gross anatomy*. 2008: Lippincott Williams & Wilkins.
26. De Felici, M., Regulation of primordial germ cell development in the mouse. *International journal of developmental biology*, 2004. 44(6): p. 575-580.
27. Cooke, P.S. and M.K. Nanjappa, How to make a human germ cell. *Asian journal of andrology*, 2015. 17(3): p. 441.
28. Fujimoto, T., Y. Miyayama, and M. Fuyuta, The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat Rec*, 1977. 188(3): p. 315-30.
29. Soto-Suazo, M. and T. Zorn, Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. *Anim Reprod*, 2005. 2(3): p. 147-60.
30. Godin, I., C. Wylie, and J. Heasman, Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development*, 1990. 108(2): p. 357-63.
31. Godin, I. and C.C. Wylie, TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development*, 1991. 113(4): p. 1451-7.
32. Ara, T., Y. Nakamura, T. Egawa, T. Sugiyama, K. Abe, T. Kishimoto, Y. Matsui, and T. Nagasawa, Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(9): p. 5319-23.

33. Molyneaux, K.A., H. Zinszner, P.S. Kunwar, K. Schaible, J. Stebler, M.J. Sunshine, W. O'Brien, E. Raz, D. Littman, C. Wylie, and R. Lehmann, The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development*, 2003. 130(18): p. 4279-86.
34. Ye, Y.-H., L.-J. Li, Y.-Z. Chen, H.-F. Huang, and Z.-Y. Liang, Physiology of Gametogenesis, in *Gamete and Embryo-fetal Origins of Adult Diseases*. 2014, Springer. p. 1-38.
35. Sadler, T.W., *Langman's medical embryology*. 2011: Lippincott Williams & Wilkins.
36. Countouris, N. and A.F. Holstein, [How many testicular lobules does a human testicle contain? Reexamination of an old problem]. *Andrologia*, 1985. 17(6): p. 525-31.
37. Waugh, A. and A. Grant, *Ross & Wilson Anatomy and physiology in health and illness E-book*. 2014: Elsevier Health Sciences.
38. Oliveira, P.F. and M.G. Alves, *Sertoli cell metabolism and spermatogenesis*. 2015: Springer.
39. Nakanishi, Y. and A. Shiratsuchi, Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol Pharm Bull*, 2004. 27(1): p. 13-6.
40. Jegou, B., The Sertoli cell in vivo and in vitro. *Cell Biol Toxicol*, 1992. 8(3): p. 49-54.
41. Paniagua, R., P. Amat, M. Nistal, and A. Martin, Ultrastructure of Leydig cells in human ageing testes. *Journal of anatomy*, 1986. 146: p. 173.
42. Nef, S. and L.F. Parada, Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nat Genet*, 1999. 22(3): p. 295-9.
43. Zimmermann, S., G. Steding, J.M. Emmen, A.O. Brinkmann, K. Nayernia, A.F. Holstein, W. Engel, and I.M. Adham, Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol*, 1999. 13(5): p. 681-91.
44. Harrison, R. and A. Barclay, The distribution of the testicular artery (internal spermatic artery) to the human testis. *British journal of urology*, 1948. 20(2): p. 57-66.

45. Raman, J.D. and M. Goldstein, Intraoperative characterization of arterial vasculature in spermatic cord. *Urology*, 2004. 64(3): p. 561-564.
46. Macmillan, E., The blood supply of the epididymis in man. *British journal of urology*, 1954. 26(1): p. 60-71.
47. Jarow, J.P., Intratesticular arterial anatomy. *J Androl*, 1990. 11(3): p. 255-9.
48. Standring, S., *Gray's anatomy e-book: the anatomical basis of clinical practice. Male reproductive system*, ed. M. Goldstein and A. Mehta. 2015: Elsevier Health Sciences. 1272 - 1287.
49. Gerendai, I. and B. Halasz, Neuroendocrine asymmetry. *Front Neuroendocrinol*, 1997. 18(3): p. 354-81.
50. Rauchenwald, M., W.D. Steers, and C. Desjardins, Efferent innervation of the rat testis. *Biol Reprod*, 1995. 52(5): p. 1136-43.
51. Taguchi, K., T. Tsukamoto, and G. Murakami, Anatomical studies of the autonomic nervous system in the human pelvis by the whole-mount staining method: left-right communicating nerves between bilateral pelvic plexuses. *J Urol*, 1999. 161(1): p. 320-5.
52. Ehmcke, J. and S. Schlatt, A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction*, 2006. 132(5): p. 673-680.
53. Ehmcke, J., J. Wistuba, and S. Schlatt, Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Human reproduction update*, 2006. 12(3): p. 275-282.
54. De Rooij, D.G., Stem cells in the testis. *International journal of experimental pathology*, 1998. 79(2): p. 67-80.
55. Alastalo, T.-P., M. Lönnström, S. Leppä, K. Kaarniranta, M. Peltö-Huikko, L. Sistonen, and M. Parvinen, Stage-specific expression and cellular localization of the heat shock factor 2 isoforms in the rat seminiferous epithelium. *Experimental cell research*, 1998. 240(1): p. 16-27.

56. Ehmcke, J., C.M. Luetjens, and S. Schlatt, Clonal organization of proliferating spermatogonial stem cells in adult males of two species of non-human primates, *Macaca mulatta* and *Callithrix jacchus*. *Biology of reproduction*, 2005. 72(2): p. 293-300.
57. Amann, R.P., The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *Journal of andrology*, 2008. 29(5): p. 469-487.
58. Bowlin, P.R., J.M. Gatti, and J.P. Murphy, Pediatric testicular torsion. *Surgical Clinics*, 2017. 97(1): p. 161-172.
59. Drlík, M. and R. Kočvara, Torsion of spermatic cord in children: a review. *Journal of pediatric urology*, 2013. 9(3): p. 259-266.
60. Skondras, I., M. Lambropoulou, A. Tsaroucha, S. Gardikis, G. Tripsianis, C. Simopoulos, and G. Vaos, The role of Apigenin in testicular damage in experimental ischemia-reperfusion injury in rats. *Hippokratia*, 2015. 19(3): p. 225.
61. Çay, A., A. Alver, M. Küçük, O. Işık, M.S. Eminağaoğlu, S.C. Karahan, and O. Değer, The effects of N-acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *Journal of Surgical Research*, 2006. 131(2): p. 199-203.
62. Ünsal, A., E. Devrim, C. Guven, M. Eroglu, I. Durak, A. Bozoklu, and M.D. Balbay, Propofol attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion. *World journal of urology*, 2004. 22(6): p. 461-465.
63. Prillaman, H. and T. Turner, Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *The Journal of urology*, 1997. 157(1): p. 340-345.
64. Dokmeci, D., M. Inan, U.N. Basaran, O. Yalcin, N. Aydogdu, F.N. Turan, and Y.H. Uz, Protective effect of L-carnitine on testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 2007. 25(6): p. 611-618.
65. Jeong, S.J., W.S. Choi, J.-S. Chung, M. Baek, S.K. Hong, and H. Choi, Preventive effects of cyclosporine a combined with prednisolone and melatonin on contralateral testicular damage after ipsilateral torsion-detorsion in pubertal and adult rats. *The Journal of urology*, 2010. 184(2): p. 790-796.

66. Yıldız, H., A.S. Durmus, H. Şimşek, and M. Yaman, Protective effect of sildenafil citrate on contralateral testis injury after unilateral testicular torsion/detorsion. *Clinics*, 2011. 66(1): p. 137-142.
67. Gaweł, S., M. Wardas, E. Niedworok, and P. Wardas, Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 2004. 57(9-10): p. 453-455.
68. Ho, E., K. Karimi Galougahi, C.C. Liu, R. Bhindi, and G.A. Figtree, Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol*, 2013. 1: p. 483-91.
69. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972. 26(4): p. 239-57.
70. Paweletz, N., Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(1): p. 72-5.
71. Kerr, J.F., History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 2002. 181-182: p. 471-4.
72. Horvitz, H.R., Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*, 1999. 59(7 Suppl): p. 1701s-1706s.
73. Hirsch, T., P. Marchetti, S.A. Susin, B. Dallaporta, N. Zamzami, I. Marzo, M. Geuskens, and G. Kroemer, The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 1997. 15(13): p. 1573-81.
74. Zeiss, C.J., The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*, 2003. 40(5): p. 481-95.
75. Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007. 35(4): p. 495-516.
76. deCathelineau, A.M. and P.M. Henson, The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays Biochem*, 2003. 39: p. 105-17.
77. Igney, F.H. and P.H. Krammer, Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(4): p. 277-88.

78. Martinvalet, D., P. Zhu, and J. Lieberman, Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, 2005. 22(3): p. 355-70.
79. Hengartner, M.O., The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000. 407(6805): p. 770-6.
80. Fuentes-Prior, P. and G.S. Salvesen, The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*, 2004. 384(Pt 2): p. 201-32.
81. Cohen, G.M., Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 1997. 326 (Pt 1): p. 1-16.
82. Rai, N.K., K. Tripathi, D. Sharma, and V.K. Shukla, Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*, 2005. 4(3): p. 138-44.
83. Hu, S., S.J. Snipas, C. Vincenz, G. Salvesen, and V.M. Dixit, Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem*, 1998. 273(45): p. 29648-53.
84. Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B.A. Yankner, and J. Yuan, Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 2000. 403(6765): p. 98-103.
85. Koenig, U., L. Eckhart, and E. Tschachler, Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 285(5): p. 1150-4.
86. Kang, S.J., S. Wang, K. Kuida, and J. Yuan, Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ*, 2002. 9(10): p. 1115-25.
87. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 2001. 104(4): p. 487-501.
88. Chicheportiche, Y., P.R. Bourdon, H. Xu, Y.M. Hsu, H. Scott, C. Hession, I. Garcia, and J.L. Browning, TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*, 1997. 272(51): p. 32401-10.

89. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998. 281(5381): p. 1305-8.
90. Peter, M.E. and P.H. Krammer, Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*, 1998. 10(5): p. 545-51.
91. Suliman, A., A. Lam, R. Datta, and R.K. Srivastava, Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*, 2001. 20(17): p. 2122-33.
92. Rubio-Moscardo, F., D. Blesa, C. Mestre, R. Siebert, T. Balasas, A. Benito, A. Rosenwald, J. Climent, J.I. Martinez, and M. Schilhabel, Characterization of 8p21. 3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*, 2005. 106(9): p. 3214-3222.
93. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, 1995. 81(4): p. 495-504.
94. Kelliher, M.A., S. Grimm, Y. Ishida, F. Kuo, B.Z. Stanger, and P. Leder, The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*, 1998. 8(3): p. 297-303.
95. Wajant, H., The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 2002. 296(5573): p. 1635-6.
96. Kischkel, F., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. Krammer, and M. Peter, Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal*, 1995. 14(22): p. 5579-5588.
97. Barnhart, B.C., E.C. Alappat, and M.E. Peter, The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol*, 2003. 15(3): p. 185-93.
98. Kataoka, T., M. Schröter, M. Hahne, P. Schneider, M. Irmeler, M. Thome, C.J. Froelich, and J. Tschopp, FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *The Journal of Immunology*, 1998. 161(8): p. 3936-3942.

99. Scaffidi, C., I. Schmitz, P.H. Kramer, and M.E. Peter, The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 1999. 274(3): p. 1541-8.
100. Hitoshi, Y., J. Lorens, S.-I. Kitada, J. Fisher, M. LaBarge, H.Z. Ring, U. Francke, J.C. Reed, S. Kinoshita, and G.P. Nolan, Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity*, 1998. 8(4): p. 461-471.
101. Brunner, T., C. Wasem, R. Torgler, I. Cima, S. Jakob, and N. Corazza. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. in *Seminars in immunology*. 2003. Elsevier.
102. Trapani, J.A. and M.J. Smyth, Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(10): p. 735-47.
103. Pardo, J., A. Bosque, R. Brehm, R. Wallich, J. Naval, A. Müllbacher, A. Anel, and M.M. Simon, Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol*, 2004. 167(3): p. 457-468.
104. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata, Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 1998. 391(6662): p. 96.
105. Barry, M. and R.C. Bleackley, Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology*, 2002. 2(6): p. 401.
106. Russell, J.H. and T.J. Ley, Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology*, 2002. 20(1): p. 323-370.
107. Goping, S., M. Barry, P. Liston, T. Sawchuk, G. Constantinescu, K.M. Michalak, I. Shostak, D.L. Roberts, A.M. Hunter, and R. Korneluk, Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity*, 2003. 18(3): p. 355-365.
108. Devadas, S., J. Das, C. Liu, L. Zhang, A.I. Roberts, Z. Pan, P.A. Moore, G. Das, and Y. Shi, Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. *Immunity*, 2006. 25(2): p. 237-247.

109. Fan, Z., P.J. Beresford, D.Y. Oh, D. Zhang, and J. Lieberman, Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*, 2003. 112(5): p. 659-672.
110. Green, D.R., *Apoptosis: physiology and pathology*. 2011: Cambridge University Press.
111. Lieberman, J. and Z. Fan, Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Current opinion in immunology*, 2003. 15(5): p. 553-559.
112. Saelens, X., N. Festjens, L. Vande Walle, M. van Gorp, G. van Loo, and P. Vandenabeele, Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 2004. 23(16): p. 2861-74.
113. Cai, J., J. Yang, and D. Jones, Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1998. 1366(1-2): p. 139-149.
114. Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang, Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000. 102(1): p. 33-42.
115. van Loo, G., M. Van Gorp, B. Depuydt, S. Srinivasula, I. Rodriguez, E. Alnemri, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, W. Declercq, and P. Vandenabeele, The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell death and differentiation*, 2002. 9(1): p. 20.
116. Garrido, C., L. Galluzzi, M. Brunet, P.E. Puig, C. Didelot, and G. Kroemer, Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 2006. 13(9): p. 1423-33.
117. Chinnaiyan, A.M., The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1999. 1(1): p. 5-15.
118. Hill, M.M., C. Adrain, P.J. Duriez, E.M. Creagh, and S.J. Martin, Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo j*, 2004. 23(10): p. 2134-45.
119. Yuan, S. and C.W. Akey, Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*, 2013. 21(4): p. 501-515.

120. Schimmer, A.D., Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*, 2004. 64(20): p. 7183-90.
121. Ekert, P.G. and D.L. Vaux, The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol*, 2005. 17(6): p. 626-30.
122. Joza, N., S.A. Susin, E. Daugas, W.L. Stanford, S.K. Cho, C.Y. Li, T. Sasaki, A.J. Elia, H.Y. Cheng, L. Ravagnan, K.F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y.Y. Kong, T.W. Mak, J.C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer, and J.M. Penninger, Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 2001. 410(6828): p. 549-54.
123. Susin, S.A., E. Daugas, L. Ravagnan, K. Samejima, N. Zamzami, M. Loeffler, P. Costantini, K.F. Ferri, T. Irinopoulou, M.C. Prevost, G. Brothers, T.W. Mak, J. Penninger, W.C. Earnshaw, and G. Kroemer, Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*, 2000. 192(4): p. 571-80.
124. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 2001. 412(6842): p. 95-9.
125. Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata, A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998. 391(6662): p. 43-50.
126. Cory, S. and J.M. Adams, The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(9): p. 647-56.
127. Schuler, M. and D.R. Green, Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*, 2001. 29(Pt 6): p. 684-8.
128. Czabotar, P.E., G. Lessene, A. Strasser, and J.M. Adams, Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. 15(1): p. 49-63.
129. Li, H., H. Zhu, C.J. Xu, and J. Yuan, Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998. 94(4): p. 491-501.
130. Esposti, M.D., The roles of Bid. *Apoptosis*, 2002. 7(5): p. 433-40.

131. Zha, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel, and S.J. Korsmeyer, Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 1996. 87(4): p. 619-28.
132. Yang, E., J. Zha, J. Jockel, L.H. Boise, C.B. Thompson, and S.J. Korsmeyer, Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 1995. 80(2): p. 285-91.
133. Newmeyer, D.D., E. Bossy-Wetzel, R.M. Kluck, B.B. Wolf, H.M. Beere, and D.R. Green, Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ*, 2000. 7(4): p. 402-7.
134. Chau, B.N., E.H. Cheng, D.A. Kerr, and J.M. Hardwick, Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell*, 2000. 6(1): p. 31-40.
135. Liu, F.T., A.C. Newland, and L. Jia, Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 310(3): p. 956-62.
136. Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, and N. Tanaka, Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 2000. 288(5468): p. 1053-8.
137. Meyer, N., S.S. Kim, and L.Z. Penn, The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol*, 2006. 16(4): p. 275-87.
138. Slee, E.A., C. Adrain, and S.J. Martin, Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 2001. 276(10): p. 7320-6.
139. Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T.J. McGarry, M.W. Kirschner, K. Kohts, D.J. Kwiatkowski, and L.T. Williams, Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 1997. 278(5336): p. 294-8.
140. Bratton, D.L., V.A. Fadok, D.A. Richter, J.M. Kailey, L.A. Guthrie, and P.M. Henson, Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem*, 1997. 272(42): p. 26159-65.

141. Ferraro-Peyret, C., L. Quemeneur, M. Flacher, J.P. Revillard, and L. Genestier, Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J Immunol*, 2002. 169(9): p. 4805-10.
142. Mandal, D., A. Mazumder, P. Das, M. Kundu, and J. Basu, Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem*, 2005. 280(47): p. 39460-7.
143. Fadok, V.A., A. de Cathelineau, D.L. Daleke, P.M. Henson, and D.L. Bratton, Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*, 2001. 276(2): p. 1071-7.
144. Renehan, A.G., C. Booth, and C.S. Potten, What is apoptosis, and why is it important? *Bmj*, 2001. 322(7301): p. 1536-8.
145. Nijhawan, D., N. Honarpour, and X. Wang, Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci*, 2000. 23: p. 73-87.
146. Opferman, J.T. and S.J. Korsmeyer, Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol*, 2003. 4(5): p. 410-5.
147. Greenhalgh, D.G., The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998. 30(9): p. 1019-30.
148. Osborne, B.A., Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr Opin Immunol*, 1996. 8(2): p. 245-54.
149. Tilly, J.L., K.I. Kowalski, A.L. Johnson, and A.J. Hsueh, Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 1991. 129(5): p. 2799-801.
150. Lund, L.R., J. Romer, N. Thomasset, H. Solberg, C. Pyke, M.J. Bissell, K. Dano, and Z. Werb, Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development*, 1996. 122(1): p. 181-93.
151. Harman, D., Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1992. 673: p. 126-41.

152. Ozawa, T., Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1995. 1271(1): p. 177-89.
153. King, K.L. and J.A. Cidlowski, Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 1998. 60: p. 601-17.
154. Kerr, J.F., C.M. Winterford, and B.V. Harmon, Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 1994. 73(8): p. 2013-26.
155. Miyashita, T., S. Krajewski, M. Krajewska, H.G. Wang, H.K. Lin, D.A. Liebermann, B. Hoffman, and J.C. Reed, Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 1994. 9(6): p. 1799-805.
156. Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams, Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 1988. 335(6189): p. 440-2.
157. Smyth, M.J., D.I. Godfrey, and J.A. Trapani, A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2001. 2(4): p. 293-9.
158. Cheng, J., T. Zhou, C. Liu, J.P. Shapiro, M.J. Brauer, M.C. Kiefer, P.J. Barr, and J.D. Mountz, Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*, 1994. 263(5154): p. 1759-62.
159. Cefai, D., R. Schwaninger, M. Balli, T. Brunner, and C.D. Gimmi, Functional characterization of Fas ligand on tumor cells escaping active specific immunotherapy. *Cell Death Differ*, 2001. 8(7): p. 687-95.
160. Elnemr, A., T. Ohta, A. Yachie, M. Kayahara, H. Kitagawa, I. Ninomiya, S. Fushida, T. Fujimura, G. Nishimura, K. Shimizu, and K. Miwa, Human pancreatic cancer cells express non-functional Fas receptors and counterattack lymphocytes by expressing Fas ligand; a potential mechanism for immune escape. *Int J Oncol*, 2001. 18(1): p. 33-9.
161. Koyama, S., N. Koike, and S. Adachi, Fas receptor counterattack against tumor-infiltrating lymphocytes in vivo as a mechanism of immune escape in gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001. 127(1): p. 20-6.
162. Wang, X.W. and C.C. Harris, p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J Cell Physiol*, 1997. 173(2): p. 247-55.

163. Pietenpol, J.A. and Z.A. Stewart, Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, 2002. 181-182: p. 475-81.
164. Varley, J.M., D.G. Evans, and J.M. Birch, Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *Br J Cancer*, 1997. 76(1): p. 1-14.
165. Gu, J., H. Kawai, D. Wiederschain, and Z.M. Yuan, Mechanism of functional inactivation of a Li-Fraumeni syndrome p53 that has a mutation outside of the DNA-binding domain. *Cancer Res*, 2001. 61(4): p. 1741-6.
166. Kitagawa, R. and M.B. Kastan, The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005. 70: p. 99-109.
167. Kurz, E.U. and S.P. Lees-Miller, DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)*, 2004. 3(8-9): p. 889-900.
168. Bolt, J., Q.N. Vo, W.J. Kim, A.J. McWhorter, J. Thomson, M.E. Hagensee, P. Friedlander, K.D. Brown, and J. Gilbert, The ATM/p53 pathway is commonly targeted for inactivation in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) by multiple molecular mechanisms. *Oral Oncol*, 2005. 41(10): p. 1013-20.
169. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(7): p. 489-501.
170. Worth, A., A.J. Thrasher, and H.B. Gaspar, Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol*, 2006. 133(2): p. 124-40.
171. Li, C.J., D.J. Friedman, C. Wang, V. Metelev, and A.B. Pardee, Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science*, 1995. 268(5209): p. 429-31.
172. Huang, J., L.J. Kim, R. Mealey, H.C. Marsh, Jr., Y. Zhang, A.J. Tenner, E.S. Connolly, Jr., and D.J. Pinsky, Neuronal protection in stroke by an sLex-glycosylated complement inhibitory protein. *Science*, 1999. 285(5427): p. 595-9.

173. Takada, M., K.C. Nadeau, G.D. Shaw, K.A. Marquette, and N.L. Tilney, The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest*, 1997. 99(11): p. 2682-90.
174. Narula, J., P. Pandey, E. Arbustini, N. Haider, N. Narula, F.D. Kolodgie, B. Dal Bello, M.J. Semigran, A. Bielsa-Masdeu, G.W. Dec, S. Israels, M. Ballester, R. Virmani, S. Saxena, and S. Kharbanda, Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(14): p. 8144-9.
175. Saikumar, P., Z. Dong, J.M. Weinberg, and M.A. Venkatachalam, Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene*, 1998. 17(25): p. 3341-9.
176. Dumont, A., S.P. Hehner, T.G. Hofmann, M. Ueffing, W. Droge, and M.L. Schmitz, Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene*, 1999. 18(3): p. 747-57.
177. Hildeman, D.A., T. Mitchell, T.K. Teague, P. Henson, B.J. Day, J. Kappler, and P.C. Marrack, Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity*, 1999. 10(6): p. 735-44.
178. Hochhauser, E., S. Kivity, D. Offen, N. Maulik, H. Otani, Y. Barhum, H. Pannet, V. Shneyvays, A. Shainberg, V. Goldshtaub, A. Tobar, and B.A. Vidne, Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 284(6): p. H2351-9.
179. Freude, B., T.N. Masters, F. Robicsek, A. Fokin, S. Kostin, R. Zimmermann, C. Ullmann, S. Lorenz-Meyer, and J. Schaper, Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. 32(2): p. 197-208.
180. Zweier, J.L. and M.A. Talukder, The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2006. 70(2): p. 181-90.
181. Lysiak, J.J., S.D. Turner, and T.T. Turner, Molecular pathway of germ cell apoptosis following ischemia/reperfusion of the rat testis. *Biology of reproduction*, 2000. 63(5): p. 1465-1472.

182. Moldovan, G.L., B. Pfander, and S. Jentsch, PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, 2007. 129(4): p. 665-79.
183. Mailand, N., I. Gibbs-Seymour, and S. Bekker-Jensen, Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. 14(5): p. 269-82.
184. Miyachi, K., M.J. Fritzler, and E.M. Tan, Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol*, 1978. 121(6): p. 2228-34.
185. Bravo, R. and J.E. Celis, A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol*, 1980. 84(3): p. 795-802.
186. Mathews, M.B., R.M. Bernstein, B.R. Franza, Jr., and J.I. Garrels, Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, 1984. 309(5966): p. 374-6.
187. Takahashi, T. and V.S. Caviness, Jr., PCNA-binding to DNA at the G1/S transition in proliferating cells of the developing cerebral wall. *J Neurocytol*, 1993. 22(12): p. 1096-102.
188. Paunesku, T., S. Mittal, M. Protic, J. Oryhon, S.V. Korolev, A. Joachimiak, and G.E. Woloschak, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol*, 2001. 77(10): p. 1007-21.
189. Stoimenov, I. and T. Helleday, PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem Soc Trans*, 2009. 37(Pt 3): p. 605-13.
190. Rosental, B., M. Brusilovsky, U. Hadad, D. Oz, M.Y. Appel, F. Afergan, R. Yossef, L.A. Rosenberg, A. Aharoni, A. Cerwenka, K.S. Campbell, A. Braiman, and A. Porgador, Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J Immunol*, 2011. 187(11): p. 5693-702.
191. Witko-Sarsat, V., J. Mocek, D. Bouayad, N. Tamassia, J.A. Ribeil, C. Candalh, N. Davezac, N. Reuter, L. Mouthon, O. Hermine, M. Pederzoli-Ribeil, and M.A. Cassatella, Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J Exp Med*, 2010. 207(12): p. 2631-45.

192. Zhao, L., Q. Gu, L. Xiang, X. Dong, H. Li, J. Ni, L. Wan, G. Cai, and G. Chen, Curcumin inhibits apoptosis by modulating Bax/Bcl-2 expression and alleviates oxidative stress in testes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Ther Clin Risk Manag*, 2017. 13: p. 1099-1105.
193. Zhang, X., G. Barile, S. Chang, A. Hays, S. Pachydaki, W. Schiff, and J. Sparrow, Apoptosis and cell proliferation in proliferative retinal disorders: PCNA, Ki-67, caspase-3, and PARP expression. *Curr Eye Res*, 2005. 30(5): p. 395-403.
194. Elion, G.B., The purine path to chemotherapy. *Science*, 1989. 244(4900): p. 41-7.
195. Rundles, R.W., The development of allopurinol. *Arch Intern Med*, 1985. 145(8): p. 1492-503.
196. Elion, G.B., A. Kovensky, and G.H. Hitchings, Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol*, 1966. 15(7): p. 863-80.
197. Seth, R., A.S. Kydd, R. Buchbinder, C. Bombardier, and C.J. Edwards, Allopurinol for chronic gout. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014(10): p. Cd006077.
198. Travi, B.L., A. Cordeiro-da-Silva, F. Dantas-Torres, and G. Miro, Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018. 12(1): p. e0006082.
199. Raviolo, M.A., M.E. Solana, M.M. Novoa, M.S. Gualdesi, C.D. Alba-Soto, and M.C. Brinon, Synthesis, physicochemical properties of allopurinol derivatives and their biological activity against *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem*, 2013. 69: p. 455-64.
200. Hoentjen, F., M.L. Seinen, S.B. Hanauer, N.K. de Boer, D.T. Rubin, G. Bouma, L.E. Harrell, and A.A. van Bodegraven, Safety and effectiveness of long-term allopurinol-thiopurine maintenance treatment in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2013. 19(2): p. 363-9.
201. Deswal, S. and A. Srivastava, Role of Allopurinol in Optimizing Thiopurine Therapy in Patients with Autoimmune Hepatitis: A Review. *J Clin Exp Hepatol*, 2017. 7(1): p. 55-62.

202. Wall, G.C., H. Muktar, C. Effken, and P.B. Mahajan, Addition of Allopurinol for Altering Thiopurine Metabolism to Optimize Therapy in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Pharmacotherapy*, 2018. 38(2): p. 259-270.
203. Moorhouse, P.C., M. Grootveld, B. Halliwell, J.G. Quinlan, and J.M. Gutteridge, Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett*, 1987. 213(1): p. 23-8.
204. Okafor, O.N., K. Farrington, and D.A. Gorog, Allopurinol as a therapeutic option in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*, 2017. 172: p. 139-150.
205. Annink, K.V., A.R. Franz, J.B. Derks, M. Rudiger, F.V. Bel, and M. Benders, Allopurinol: Old Drug, New Indication in Neonates? *Curr Pharm Des*, 2017. 23(38): p. 5935-5942.
206. Priyadarsini, K.I., S. Kapoor, and D.B. Naik, One- and two-electron oxidation reactions of trolox by peroxyxynitrite. *Chem Res Toxicol*, 2001. 14(5): p. 567-71.
207. Carlotti, M.E., S. Sapino, D. Vione, E. Pelizzetti, and M. Trotta, Photostability of Trolox in Water/Ethanol, Water, and Oramix CG 110 in the Absence and in the Presence of TiO₂. *Journal of dispersion science and technology*, 2004. 25(2): p. 193-207.
208. Delicado, E.N., A.S. Ferrer, and F.G.a. Carmona, A kinetic study of the one-electron oxidation of Trolox C by the hydroperoxidase activity of lipoxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1997. 1335(1-2): p. 127-134.
209. Barclay, L.R.C., S. Locke, J. MacNeil, J. VanKessel, G. Burton, and K. Ingold, Autoxidation of micelles and model membranes. Quantitative kinetic measurements can be made by using either water-soluble or lipid-soluble initiators with water-soluble or lipid-soluble chain-breaking antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 1984. 106(8): p. 2479-2481.
210. Casini, A., A. Pompella, and M. Comporti, Liver glutathione depletion induced by bromobenzene, iodobenzene, and diethylmaleate poisoning and its relation to lipid peroxidation and necrosis. *The American journal of pathology*, 1985. 118(2): p. 225.

211. Mickle, D.A., R.-K. Li, R.D. Weisel, P.L. Birnbaum, T.-W. Wu, G. Jackowski, M.M. Madonik, G.W. Burton, and K.U. Ingold, Myocardial salvage with trolox and ascorbic acid for an acute evolving infarction. *The Annals of thoracic surgery*, 1989. 47(4): p. 553-557.
212. Wu, T.W., N. Hashimoto, J. Wu, D. Carey, R.K. Li, D.A. Mickle, and R.D. Weisel, The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. *Biochem Cell Biol*, 1990. 68(10): p. 1189-94.
213. Devaraj, S. and I. Jialal, α -Tocopherol decreases interleukin-1 β release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 1999. 19(4): p. 1125-1133.
214. Martin-Nizard, F., A. Boullier, J.-C. Fruchart, and P. Duriez, Alpha-tocopherol but not beta-tocopherol inhibits thrombin-induced PKC activation and endothelin secretion in endothelial cells. *Journal of cardiovascular risk*, 1998. 5(5-6): p. 339-345.
215. Cachia, O., J. El Benna, E. Pedruzzi, B. Descomps, M.-A. Gougerot-Pocidallo, and C.-L. Leger, α -tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes attenuation of p47 phox membrane translocation and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. 273(49): p. 32801-32805.
216. Pédeboscq, S., C. Rey, M. Petit, C. Harpey, F. De Giorgi, F. Ichas, and L. Lartigue, Non-antioxidant properties of α -tocopherol reduce the anticancer activity of several protein kinase inhibitors in vitro. *PloS one*, 2012. 7(5): p. e36811.
217. Johnsen, S.G., Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1970. 1(1): p. 2-25.
218. Visser, A. and C. Heyns, Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU international*, 2003. 92(3): p. 200-203.
219. Cankorkmaz, L., G. Köylüoğlu, H. Ozer, E. Yildiz, Z. Sümer, and O. Ozdemir, The role of apoptosis and protective effect of carnitine in contralateral testicular injury in experimental unilateral testicular torsion. *Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi= Turkish journal of trauma & emergency surgery: TJTES*, 2009. 15(6): p. 529-534.

220. Koltuksuz, U., M.K. Irmak, A. Karaman, E. Uz, A. Var, H. Özyurt, and Ö. Akyol, Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urological research*, 2000. 28(6): p. 360-363.
221. Abasiyanik, A. and L. Dağdönderen, Beneficial effects of melatonin compared with allopurinol in experimental testicular torsion. *Journal of pediatric surgery*, 2004. 39(8): p. 1238-1241.
222. Uguralp, S., B. Mizrak, and A.B. Karabulut, Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. *European journal of pediatric surgery*, 2005. 15(02): p. 114-119.
223. Avlan, D., K. Erdouğan, B. Cimen, D.D. Apa, I. Cinel, and S. Aksöyek, The protective effect of selenium on ipsilateral and contralateral testes in testicular reperfusion injury. *Pediatric surgery international*, 2005. 21(4): p. 274-278.
224. Silva, A.C.M.B.A., V. Ortiz, R.A.d. Silva, and J.R. Tognini, Efeito do alopurinol sobre a morfologia do testículo do rato submetido a isquemia, pela torção do cordão espermático seguida de reperfusão. 2005.
225. Harrison, R., M.M. De Marval, D. Lewis-Jones, and R. Connolly, Mechanism of damage to the contralateral testis in rats with an ischaemic testis. *The Lancet*, 1981. 318(8249): p. 723-725.
226. Yurtçu, M., A. Abasiyanik, M.C. Avunduk, and S. Muhtaroglu, Effects of melatonin on spermatogenesis and testicular ischemia-reperfusion injury after unilateral testicular torsion-detorsion. *Journal of pediatric surgery*, 2008. 43(10): p. 1873-1878.
227. Salmasi, A.H., A. Beheshtian, S. Payabvash, S. Demehri, M.R. Ebrahimkhani, M. Karimzadegan, M. Bahadori, P. Pasalar, and A.R. Dehpour, Effect of morphine on ischemia-reperfusion injury: experimental study in testicular torsion rat model. *Urology*, 2005. 66(6): p. 1338-1342.
228. Mogilner, J.G., M. Lurie, A.G. Coran, O. Nativ, E. Shiloni, and I. Sukhotnik, Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. *Pediatric surgery international*, 2006. 22(1): p. 99-105.

229. Ozkurkcugil, C., M. Yardimoglu, H. Dalcik, S. Erdogan, and A. Gokalp, Effect of insulin-like growth factor-1 on apoptosis of rat testicular germ cells induced by testicular torsion. *BJU Int*, 2004. 93(7): p. 1094-7.
230. Yagmurdur, H., A. Ayyildiz, E. Karaguzel, E. Ogus, H. Surer, M. Caydere, B. Nuhoglu, and C. Germiyanoglu, The preventive effects of thiopental and propofol on testicular ischemia-reperfusion injury. *Acta anaesthesiologica scandinavica*, 2006. 50(10): p. 1238-1243.
231. Koc, A., A. Narci, M. Duru, H.S. Gergerlioglu, Y. Akaydin, and S. Sogut, The protective role of erdosteine on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *Mol Cell Biochem*, 2005. 280(1-2): p. 193-9.
232. Unsal, A., M. Eroglu, A. Avci, E. Cimentepe, C. Guven, M. Derya Balbay, and I. Durak, Protective role of natural antioxidant supplementation on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *Scand J Urol Nephrol*, 2006. 40(1): p. 17-22.
233. Akgül, T., A. Ayyıldız, B. Nuhoglu, E. Karagüzel, E. Ögüş, H. Yağmurdur, H. Üstün, and C. Germiyanoglu, Ginkgo biloba (EGb 761) usage attenuates testicular injury induced by testicular ischemia/reperfusion in rats. *International urology and nephrology*, 2008. 40(3): p. 685-690.
234. Kostakis, I.D., N. Zavras, C. Damaskos, S. Sakellariou, P. Korkolopoulou, E.P. Misiakos, P. Tsaparas, G. Vaos, and T. Karatzas, Erythropoietin and sildenafil protect against ischemia/reperfusion injury following testicular torsion in adult rats. *Experimental and therapeutic medicine*, 2017. 13(6): p. 3341-3347.
235. Akgür, F.M., K. Kiliç, T. Aktuğ, and M. Olguner, The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *The Journal of urology*, 1994. 151(6): p. 1715-1717.
236. Southorn, P.A. and G. Powis. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. in *Mayo Clinic Proceedings*. 1988. Elsevier.
237. Agarwal, A. and T.M. Said, Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU international*, 2005. 95(4): p. 503-507.

238. Allamaneni, S.S., A. Agarwal, K.P. Nallella, R.K. Sharma, A.J. Thomas Jr, and S.C. Sikka, Characterization of oxidative stress status by evaluation of reactive oxygen species levels in whole semen and isolated spermatozoa. *Fertility and sterility*, 2005. 83(3): p. 800-803.
239. Aitken, R.J. and M.A. Baker, Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and cellular endocrinology*, 2006. 250(1-2): p. 66-69.
240. Steinberger, E. and D. Tjioe, Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia. *Fertility and sterility*, 1969. 20(4): p. 639-649.
241. Akhter, S., Immune response to testicular ischaemia and reperfusion. *J. Urol.*, 1990. 143(2): p. 262A.
242. Greenstein, A., L.I. Smith-Harrison, P.E. Wakely, S. Kololgi, A.D. Salzberg, and W.W. Koontz, Jr., The effect of polyethylene glycol-superoxide dismutase administration on histological damage following spermatic cord torsion. *J Urol*, 1992. 148(2 Pt 2): p. 639-41; discussion 642-4.
243. Demopoulos, H., E. Flamm, D. Pietronigro, and M. Seligman, The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1980. 110(Suppl. 492): p. 91-119.
244. Ranade, A.V., Y. Tripathi, R. Rajalakshmi, N. Vinodini, R. Soubhagya, A. Nayanatara, D. Rekha, and M. Kumari, Effect of vitamin E administration on histopathological changes in rat testes following torsion and detorsion. *Singapore medical journal*, 2011. 52(10): p. 742-746.
245. Alvarez, J.G., J.C. Touchstone, L. Blasco, and B.T. Storey, Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of andrology*, 1987. 8(5): p. 338-348.
246. Kolski, J.M., P.J. Mazolewski, L.L. Stephenson, J. Texter, V.E. Grigoriev, and W.A. Zamboni, Effect of hyperbaric oxygen therapy on testicular ischemia-reperfusion injury. *The Journal of urology*, 1998. 160(2): p. 601-604.

247. Bozlu, M., G. Eskandari, S. Cayan, B. Canpolat, E. Akbay, and U. Atik, The effect of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibitors on biochemical changes in testicular ischemia-reperfusion injury. *The Journal of urology*, 2003. 169(5): p. 1870-1873.
248. Chapin, R.E., K.T. Morgan, and J.S. Bus, The morphogenesis of testicular degeneration induced in rats by orally administered 2, 5-hexanedione. *Experimental and molecular pathology*, 1983. 38(2): p. 149-169.
249. Mason, K.E. and S.I. Mauer, Reversible testis injury in the vitamin E-deficient hamster. *The Journal of nutrition*, 1975. 105(4): p. 484-490.
250. Chinoy, N., R. Mehta, L. Seethalakshmi, J. Sharma, and M. Chinoy, Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. *International journal of fertility*, 1986. 31(3): p. 232-239.
251. Leung, H.W., M.J. Vang, and R.D. Mavis, The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta*, 1981. 664(2): p. 266-72.
252. Yildirim, Y., D. Karakaya, E. Kelsaka, A. Aksoy, M. Gülbahar, and A. Bedir, The effect of dexketoprofen on ischemia reperfusion injury. *Bratislavske lekarske listy*, 2014. 115(5): p. 256-259.
253. Kehinde, E.O., J.T. Anim, O.A. Mojiminiyi, F. Al-Awadi, A. Shihab-Eldeen, A.E. Omu, T. Fatinikun, A. Prasad, and M. Abraham, Allopurinol provides long-term protection for experimentally induced testicular torsion in a rabbit model. *BJU international*, 2005. 96(1): p. 175-180.
254. Turner, T. and K. Brown, Spermatid cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biology of reproduction*, 1993. 49(2): p. 401-407.
255. Henderson IV, J.A., P. Smey, M.S. Cohen, C.P. Davis, A.F. Payer, and T.A. Parkening, The effect of unilateral testicular torsion on the contralateral testicle in prepubertal Chinese hamsters. *Journal of pediatric surgery*, 1985. 20(6): p. 592-597.
256. Akgür, F.M., K. Kiliç, and T. Aktuğ, Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urological research*, 1993. 21(6): p. 395-399.

257. Romeo, C., P. Antonuccio, M. Esposito, H. Marini, P. Impellizzeri, N. Turiaco, D. Altavilla, A. Bitto, B. Zuccarello, and F. Squadrito, Raxofelast, a hydrophilic vitamin E-like antioxidant, reduces testicular ischemia-reperfusion injury. *Urol Res*, 2004. 32(5): p. 367-71.
258. Erol, B., U. Sari, A.S. Amasyali, S. Ozkanli, S. Sogut, V. Hanci, O. Efiloglu, Y.O. Danacioglu, P. Engin, F. Yencilek, G. Atis, A. Yildirim, O.A. Alkoc, and T. Caskurlu, Comparison of combined antioxidants and thymoquinone in the prevention of testis ischemia - reperfusion injury. *Andrology*, 2017. 5(1): p. 119-124.
259. Ozbal, S., B.U. Ergur, G. Erbil, I. Tekmen, A. Bagriyanik, and Z. Cavdar, The effects of alpha-lipoic acid against testicular ischemia-reperfusion injury in Rats. *ScientificWorldJournal*, 2012. 2012: p. 489248.
260. Hirai, S., N. Hatayama, M. Naito, K. Nagahori, S. Kawata, and S. Hayashi, Pathological effect of arterial ischaemia and venous congestion on rat testes. 2017. 7(1): p. 5422.
261. Guan, W., T. Osanai, T. Kamada, H. Hanada, H. Ishizaka, H. Onodera, A. Iwasa, N. Fujita, S. Kudo, T. Ohkubo, and K. Okumura, Effect of allopurinol pretreatment on free radical generation after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003. 41(5): p. 699-705.
262. Ross, L., C. Barclay, J.D. Artz, and J.J. Mowat, Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: ¹⁴C tracer and product studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1995. 1237(1): p. 77-85.
263. Naguib, Y.M., A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. *Analytical biochemistry*, 1998. 265(2): p. 290-298.
264. Rezk, B.M., G.R. Haenen, W.J. Van Der Vijgh, and A. Bast, The extraordinary antioxidant activity of vitamin E phosphate. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1683(1-3): p. 16-21.
265. Wiseman, H., Dietary influences on membrane function: importance in protection against oxidative damage and disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1996. 7(1): p. 2-15.

9. ÖZGEÇMİŞ



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Adı	Uğur	Soyadı	ŞEKER
Doğum Yeri	Diyarbakır	Doğum Tarihi	17/06/1984
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	Tel	0533 315 53 35
E-posta	seker.ugur.tr@gmail.com		

EĞİTİM DÜZEYİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora / Uzmanlık	D.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü – Tıp Histoloji ve Embriyoloji AD	
Tezli Yüksek Lisans	D.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü – Tıp Histoloji ve Embriyoloji AD	2013
Lisans	D.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Diyarbakır Anadolu Lisesi	2002

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Biyolog	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi	9

Yabancı Dil Sınav Notu								
ÜDS/YDS	KPDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	68							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70,56	67,23	59,12
(Diğer) Puanı			

10. EKLER

10.1. 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 KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	KARAR NO	TOPLANTI SAYISI
26.04.2018	2	4

KARAR

1-Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Abd. Öğrt. Üyesi Prof.Dr.Yusuf NERGİZ'in yürüttüğü, Biy.Uğur ŞEKER'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı "Ratlarda Testiküler Torsiyon/De torsiyon Hasarına Karşı Allopurinol ve Trolox'un Koruyucu etkinliğinin araştırılması" başlıklı 2018/05 protokol numaralı çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan	Erkek	32	15-16 Hafta-300-350

Etik Kurulumuzca görüşülmüş olup araştırmanın oy birliği ile desteklenmesine karar verilmiştir.

Prof. Dr. Feray YOKUŞ
(BAŞKAN)

Doç. Dr. Selim TUNİK
(ÜYE)

Prof. Dr. Filiz ACUN KAYA
(ÜYE)

Doç. Dr. Hasan AKKOÇ
(ÜYE)

Doç. Dr. Ayşe MEŞE
(ÜYE)

Yrd. Doç. Dr. Ulaş M. BALIK
(ÜYE)

Doç. Dr. Ramazan DEMİREL
(ÜYE)

Yrd. Doç. Dr. Feray ALTAN
(ÜYE)

Yrd. Doç. Dr. Ersin UYSAL
(ÜYE)

Yrd. Doç. Dr. Elif VARHAN ORAL
(ÜYE)

Doç. Dr. Mehmet Erdem AKBALIK
(ÜYE)

Yrd. Doç. Dr. Akın KOÇHAN
(ÜYE)

Doç. Dr. Mehmet Hüseyin ALKAN
(ÜYE)

Av. Abdullah YAVUZ
(ÜYE)

Öğr. Mehmet Yavuz KAHRAMAN
(ÜYE)

Veteriner Hekim Yas ALAK
(ÜYE)

11. ORJİNALLİK RAPORU

24.06.2019

Turnitin

Turnitin Originality Report

Processed on: 24-Jun-2019 11:48 +03
ID: 1146617760
Word Count: 17888
Submitted: 1

bitirme tezi By Uğur Şeker

Similarity Index	6%
Similarity by Source	Internet Sources: 3% Publications: 2% Student Papers: 5%

< 1% match (student papers from 30-Mar-2018) Submitted to Gaziantep Üniversitesi on 2018-03-30
< 1% match (Internet from 13-Dec-2018) http://www.sporbillm.com/dosyalar/Poster_Sunumlar-B.pdf
< 1% match (Internet from 20-May-2019) https://dergipark.org.tr/download/article-file/206054
< 1% match (Internet from 30-Oct-2018) http://www.csssudies.com/Makaleler/1687296889_01-19-Ahmet%20ALKAL.pdf
< 1% match (student papers from 17-May-2016) Submitted to Gaziantep Üniversitesi on 2016-05-17
< 1% match (student papers from 16-May-2019) Submitted to İzmir Katip Çelebi Üniversitesi on 2019-05-16
< 1% match (student papers from 06-Feb-2018) Submitted to Gaziantep Üniversitesi on 2018-02-06
< 1% match (Internet from 07-May-2019) http://aduldspace.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11607/445/yayinc4%20mur%20B.BAT.pdf?sequence=1
< 1% match (publications) GÜL, Ahmet Bora, ALTUNOLUK, Bülent, BENLİOĞLU, Can, KURUTAS, Ergül Belge, ÇIRALIK, Harun and BEŞİM, Sefa. "Testis torsiyonunda İskemi-reperfüzyon hasarını önlemede okserutin tedavisinin etkinliği". Türk Uroloji Dergisi, 2009.
< 1% match (student papers from 04-Apr-2017) Submitted to Istanbul University on 2017-04-04
< 1% match (student papers from 05-May-2016) Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi on 2016-05-05
< 1% match (Internet from 11-Jul-2016) http://paperzz.com/doc/5055161/sunumunda---thed2014
< 1% match (publications) Rıfhan Kağan Aktas, Safak Bulut, Süleyman Bulut, Mehmet Murat Baykam et al. "The effects of N-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury". Pediatric Surgery International, 2009
< 1% match (Internet from 01-Jan-2013) http://www.duzce.edu.tr/tjoderol/dosya/20122/20.pdf
< 1% match (publications) FRÖZ, Becca, KABATAŞ, Ahmet, ALKOÇ, Ozan Alper, BALTACI, Davut, OKTAY, Murat and ÇOLAKOĞLU, Serdar. "Apoptozis Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması)". Düzce Üniversitesi, 2012.

https://www.turnitin.com/newreport_printview.asp?eq=0&eb=0&em=0&old=1146617760&sid=0&n=0&m=2&svr=331&r=71.676702296799&lang... 1/30