

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL TESTİS TORSİYONUNDA APOPİTOZİSTEKİ  
POLİ-ADP RİBOZ POLİMERAZ (PARP) YOLAĞININ  
ETKİNLİĞİ**

**Dr. Hamdi TUNCER**

**UZMANLIK TEZİ  
ÜROLOJİ ANABİLİMDALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Alim KOŞAR  
Yrd. Doç. Dr. Pınar Aslan KOŞAR**

**ISPARTA - 2011**

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL TESTİS TORSİYONUNDA APOPTOZİSTEKİ  
POLİ-ADP RİBOZ POLİMERAZ (PARP) YOLAĞININ  
ETKİNLİĞİ**

**Dr. Hamdi TUNCER**

**UZMANLIK TEZİ  
ÜROLOJİ ANABİLİMDALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Alim KOŞAR  
Yrd. Doç. Dr. Pınar Aslan KOŞAR**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon  
Birimi tarafından 2174-TU-10 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ISPARTA - 2011**

## ÖNSÖZ

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2174-TU-10).

Tez çalışmamın planlanması, projelendirilmesi ve değerlendirilmesinde önemli katkılarından dolayı danışman hocalarım sayın Prof Dr. Alim KOŞAR ve Yrd. Doç. Dr. Pınar Aslan KOŞAR'a,

Tez çalışmamın histopatolojik incelenmesinde yaptığı katkıdan dolayı S.D.Ü. Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji AD. Arş. Gör. Hakan DARICI'ya,

Tez çalışmamın biyokimyasal incelenmesinde yaptığı katkıdan dolayı Uludağ Üniv. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji AD. Arş. Gör. Mehmet SARIMAHMUT'a,

Tez çalışmamın istatistiksel değerlendirilmesinde ve yorumlanmasında, literatürlerin İngilizceden çevrilmesinde ve tezin hazırlanmasında baştan sona kadar sonsuz katkısı ve desteğinden dolayı sevgili eşim S.D.Ü. Tıp Fak. Aile Hekimliği AD. Arş. Gör. Dr. Özge TUNCER'e

Deney modelinin oluşturulmasında yaptığı katkıdan dolayı S.D.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD. Öğr. Gör. İbrahim ONARAN'a,

Tez yazımındaki önerilerinden dolayı S.D.Ü. Tıp Fak. Anestezi ve Reanimasyon AD. Öğr. Gör. Doç. Dr. Pakize KIRDEMİR'e,

Tezin hazırlanma dönemindeki desteklerinden ve uzmanlık eğitimim sırasındaki çok değerli katkılarından dolayı S.D.Ü. Tıp Fak. Üroloji AD.nın tüm değerli hocaları ve asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>5</b>
2.1. Testis .....	5
2.1.1. Testisin Anatomisi .....	5
2.1.2. Testisin Vasküler Yapısı .....	6
2.1.3. Testisin Embriyolojisi.....	7
2.1.4. Testisin Histolojisi.....	8
2.1.5. Spermatogenezis .....	8
2.2. Testis Torsiyonu .....	9
2.2.1. Klinik Bulgular .....	11
2.2.2. Tanı .....	11
2.2.3. Tedavi.....	12
2.2.4. Prognoz.....	14
2.2.5. Karşı Taraf Testisin Durumu .....	14
2.3. Apoptoz .....	15
2.3.1. Apoptoziste Morfolojik Değişiklikler .....	16
2.3.2. Apoptoziste Biyokimyasal Değişiklikler .....	16
2.3.3. Apoptozis Mekanizmaları.....	17
2.3.3.1. Ekstrensek / Reseptör Aracılı Yol.....	17
2.3.3.2. İntrensek / Mitokondrial Yol.....	17
2.3.4. Apoptozis Regülatörleri.....	18
2.3.4.1. P53.....	18
2.3.4.2. BCL-2 Ailesi Proteinleri .....	19
2.3.4.3. IAF Ailesi Proteinleri.....	19
2.3.4.4. Kaspazlar .....	19
2.4. Testiste Oksidatif Stres.....	21

2.5. Poli ADP-Ribozilasyon .....	22
2.5.1. Poli ADP Ribozilasyon Mekanizması .....	23
2.5.2. PARP Süper Ailesi .....	25
2.5.2.1. PARP-1 Proteini .....	26
2.5.2.2. PARP Ailesinin Diğer Üyeleri .....	27
2.5.2.3. Poli ADP Riboz Glikohidrolaz (PARG).....	28
2.5.3. Poli ADP-Ribozilasyonun Biyolojik Fonksiyonları .....	29
2.5.3.1. DNA Tamiri ve Genomik Stabilitenin Korunması .....	29
2.5.3.2. Transkripsiyonun Düzenlenmesi .....	30
2.5.3.3. Sentromer Fonksiyonunun Düzenlenmesi .....	31
2.5.3.4. Telomer Uzunluğunun Düzenlenmesi .....	31
2.5.3.5. Protein Degredasyonunun Düzenlenmesi.....	31
2.5.3.6. Sentrozomal Fonksiyon.....	31
2.5.3.7. Endozomal Vezikül Alışverişinin Düzenlenmesi .....	31
2.5.3.8. Apoptozdaki Rolü .....	32
2.5.3.9. Hücre İçi Aşırı NAD <sup>+</sup> Tüketimi Sonucunda Nekrotik Hücre Ölümü ve Patolojik Durumlardaki Rolü .....	34
2.5.4. PARP-1 ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişki .....	34
2.5.5. PARP-1 ve Spermatogenez Arasındaki İlişki .....	34
<b>3. MATERYAL ve METOD .....</b>	<b>38</b>
3.1. Deneysel Testis Torsiyonu İskemi-Reperfüzyon Modelinin Oluşturulması.....	38
3.2. Deney Grupları .....	39
3.3. Johnson Tubüler Biyopsi Skoru (JTBS) .....	40
3.4. Histopatolojik Değerlendirme.....	40
3.4.1. Fiksasyon ve Doku Takip Aşamaları .....	40
3.4.2. İmmünohistokimya Protokolü.....	41
3.4.3. Western Blot Analizi .....	43
3.5. Verilerin Değerlendirilmesi .....	48
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>49</b>
4.1. Makroskopik Bulgular .....	49
4.2. Johnson Tubuler Biopsi Skorları .....	51
4.3. Grupların Apoptozis Ortalamaları .....	61
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>75</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>86</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>87</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>88</b>

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ABP</b>	: Androjen Bağlayıcı Protein
<b>3-ABA</b>	: 3-Aminobenzamid
<b>AİF</b>	: Apoptoz İndükleyen Faktör
<b>BER</b>	: Base Excision Repair (Baz Eksizyon Tamiri)
<b>BRCA1</b>	: Breast Cancer 1
<b>Cyt-C</b>	: Sitokrom c
<b>DD</b>	: Death Domain (Ölüm Bölgesi)
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>FADD</b>	: Fas Associated Death Domain (Fas'a Bağlı Ölüm Bölgesi)
<b>FSH</b>	: Foliküler Stimülan Hormon
<b>HÜDAL</b>	: S.D.Ü. Deneysel Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı
<b>İAP</b>	: Inhibitor of Apoptosis Protein (Apoptozis Baskılayıcı Faktör)
<b>JTBS</b>	: Johnson Tubüler Biyopsi Skoru
<b>K</b>	: Kontrol Grubu
<b>LH</b>	: Lüteinizan Hormon
<b>MAPK</b>	: Mitojen Aktive edici Protein Kinaz
<b>MMR</b>	: Yanlış Eşleşme Tamiri
<b>MNU</b>	: N-metil N-nitrozüre
<b>MVP</b>	: Majör Vault Protein
<b>NAD</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
<b>NER</b>	: Nükleer Excision Repair (Nükleer Eksizyon Tamiri)
<b>NF-KB</b>	: Nükleer Faktör-KB
<b>NLS</b>	: Nükleer Lokalizasyon Sinyalleri
<b>PAR</b>	: Poli ADP-riboz
<b>PARG</b>	: Poli ADP Riboz Glikohidrolaz
<b>PARP</b>	: Poli ADP-Riboz Polimeraz
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffer Saline (Fosfat Tamponlu Salin)
<b>PHÖ</b>	: Programlanmış Hücre Ölümü
<b>ROS</b>	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)

<b>S</b>	: Sham Grubu
<b>SSBR</b>	: Single Strand Base Repair (Tek zincir baz tamiri)
<b>TBF</b>	: Testis Belirleyici Faktörün
<b>TEP-1</b>	: Telomerase-Associated Proteins (Telomeraz İlişkili Protein)
<b>TNF</b>	: Tümör Nekroz Faktör
<b>TNFR</b>	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
<b>TRADD</b>	: Tnfr Associted Death Domain (TNFR'e Bağlı Ölüm Bölgesi)
<b>TRAIL</b>	: Tnf-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TNF ile İlişkili Apoptozis Uyarıcı Ligantlar)
<b>TRF-2</b>	: Telomerik protein-2
<b>TT</b>	: Testis Torsiyonu
<b>1T-4R</b>	: 1 saat torsiyon + 4 saat reperfüzyon grubu
<b>2T-4R</b>	: 2 saat torsiyon + 4 saat reperfüzyon grubu
<b>4T-4R</b>	: 4 saat torsiyon + 4 saat reperfüzyon grubu
<b>YD</b>	: Yenidoğan

**TABLÖLAR DİZİNİ**

<b>Tablo 1.</b> Apoptozun moleküler düzenlenmesi.....	21
<b>Tablo 2.</b> Johnson tübüler biyopsi skoru .....	40
<b>Tablo 3.</b> Grupların johnson tübuler biopsi skor ortalamaları. ....	51
<b>Tablo 4.</b> Grupların apoptozis ortalamaları. ....	61



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<b>Şekil 1.</b> Testis epididim ve duktus deferens .....	6
<b>Şekil 2.</b> Spermatogenez .....	9
<b>Şekil 3.</b> Ekstresek ve intrinsek yol kaspaz bağımlı hücre ölümü .....	18
<b>Şekil 4.</b> Poli ADP riboz sentezi .....	24
<b>Şekil 5.</b> PARP'ın yapısal bölgeleri ve ayrılmış olan parçaları .....	25
<b>Şekil 6.</b> PARP protein ailesi üyelerinin yapısal organizasyonu .....	26
<b>Şekil 7.</b> Poli (ADP-riboz) polimeraz aracılıklı hücre ölümünde kaspas bağımsız hücre ölümü. ....	33
<b>Şekil 8.</b> Tüm grupların JTBS ortalamaları.....	56
<b>Şekil 9.</b> Kontrol, sham ve sol testislerin JTBS ortalamaları. ....	57
<b>Şekil 10.</b> Kontrol, sham ve sağ testislerin JTBS ortalamaları.....	57
<b>Şekil 11.</b> Tüm grupların apopitozis ortalamaları. ....	65
<b>Şekil 12.</b> Kontrol, sham ve sol testislerin apopitozis ortalamaları. ....	66
<b>Şekil 13.</b> Kontrol, sham ve sağ testislerin apopitozis ortalamaları. ....	66

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Kontrol grubu testis görüntüsü.....	49
<b>Resim 2.</b> 1saat torsiyon + 4 saat reperfüzyon grubu sağ ve sol testislerin görüntüsü. ....	50
<b>Resim 3.</b> 2 saat torsiyon + 4 saat reperfüzyon grubu sağ ve sol testislerin görüntüsü .....	50
<b>Resim 4.</b> 4 saat torsiyon + 4 saat reperfüzyon grubu sağ ve sol testislerin görüntüsü .....	51
<b>Resim 5.</b> Kontrol grubuna ait sol testis kesiti.....	58
<b>Resim 6.</b> SHAM grubuna ait sol testis kesiti. Seminifer tübüller normale yakın görünümde (H-E, 200X).....	58
<b>Resim 7.</b> 1T-4R grubuna ait sol testis kesiti.....	59
<b>Resim 8.</b> 2T-4R grubuna ait sol testis kesiti.....	59
<b>Resim 9.</b> 4T-4R grubuna ait sol testis kesiti.....	60
<b>Resim 10.</b> 4T-4R grubuna ait sağ testis kesiti. ....	60
<b>Resim 11.</b> Kontrol grubuna ait antikor eklenmemiş (negatif kontrol) sol testis kesiti (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X). ....	67
<b>Resim 12.</b> SHAM grubuna ait antikor eklenmemiş (negatif kontrol) sol testis kesiti (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X). ....	67
<b>Resim 13.</b> SHAM grubuna ait sol testis kesiti.....	68
<b>Resim 14.</b> T1 grubuna ait antikor eklenmemiş (negatif kontrol) sol testis kesiti....	68
<b>Resim 15.</b> T1 grubuna ait sol testis kesiti.....	69
<b>Resim 16.</b> T1 grubuna ait sol testis kesiti.....	69
<b>Resim 17.</b> T1 grubuna ait antikor eklenmemiş (negatif kontrol) sol testis kesiti (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 400X).....	70
<b>Resim 18.</b> T2 grubuna ait sol testis kesiti.....	70
<b>Resim 19.</b> T2 grubuna ait sol testis kesiti.....	71
<b>Resim 20.</b> T4 grubuna ait sağ testis kesiti.....	71
<b>Resim 21.</b> T4 grubuna ait antikor eklenmemiş (negatif kontrol) sol testis kesiti (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X).....	72
<b>Resim 22.</b> T4 grubuna ait sol testis kesiti.....	72
<b>Resim 23.</b> T4 grubuna ait sol testis kesiti.....	73
<b>Resim 24.</b> T4 grubuna ait sol testis kesiti.....	73
<b>Resim 25.</b> Western Blot analizi ile Kontrol, Sham, 1T-4R ve 4T-4R Gruplarında DR5 ekspresyonunun gösterilmesi.....	74
<b>Resim 26.</b> Western Blot analizi ile 2T-4R Grubunda DR5 ekspresyonunun gösterilmesi .....	74

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

### 1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Testis torsiyonu sıklıkla genç erkeklerde görülen ve müdahale edilmediği zaman gonad kaybına kadar gidebilen ürolojik acil durumlardan biridir. Testis ve eklerinde 25 yaşına kadar torsiyon görülme sıklığı 1/160 iken sadece testis için bu oran 1/4000'dir. Her yaş grubunda görülebilmesine rağmen, özellikle pubertal dönem ve ilk 1 yaşta pik yapar. Pediatrik yaş grubunda ise akut skrotumun % 25-35'ini oluşturmaktadır. Spermatik kord torsiyonu, sonraki dönemde de fertilitiyi etkilemesinden dolayı önemini korumaktadır (1). Testiste hasar, torsiyonun olduğu andan itibaren başlamakta olup semptomların başlangıcı ile cerrahi girişime gitme arasındaki zaman ne kadar kısa ise testisin korunma oranı o derece artmaktadır. Tedavide gecikme testiküler atrofiyle sonuçlanmakta, geç takiplerde subfertilite veya infertiliteye kadar uzanabilen klinik tabloların gelişebildiği bilinmektedir.

Spermatik kord torsiyonunda, spermatik kord ve yapılarının kendi etrafında dönmesi sonucu öncelikle venöz tıkanıklık oluşmakta, venöz tıkanıklığın ilerlemesi ile arteriyel dolaşım bozulmaktadır. Buna bağlı olarak oluşan iskemi, bir takım kimyasal reaksiyonların başlamasına yol açmakta, bu da sonuçta hücresel disfonksiyona ve nekroza yol açmaktadır. İskemi sonucu oluşan bu durumun nedeni tek bir reaksiyon ve olay ile açıklanamamakla beraber, enerji depolarının tükenmesi ve toksik metabolitlerin birikmesinin hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir (2). Bununla birlikte iskemik dokuların tekrar kanlanması, reaktif oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bu radikaller, DNA iplik kırıklarının oluşmasına yol açıp çeşitli mekanizmalarla hücre canlılığının kaybına yol açmaktadır. Reaktif oksijen radikallerinin DNA'da yaptığı iplik kırıklarının, DNA tamir mekanizmalarında görevli olan ve bol miktarda enerji tüketen, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) enzimini aktive ettiği gösterilmiştir. PARP'ın DNA tamiri için çok önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. PARP'ın yoğun aktivasyonunun, dokularda iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı olduğu bilinmektedir. PARP'ın ikili etkisi bulunmaktadır. PARP aktivitesinin eşik düzeyine göre bir taraftan DNA kırıklarını onararak hücre ömrünü uzatırken, diğer taraftan yüksek DNA hasarı nedeniyle aşırı aktive olarak apoptoz ve hücre ölümüne neden olmaktadır.

Poli ADP-ribozilasyon; nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) bağımlı bir enzim olan poli ADP-riboz polimerazlar (PARP) tarafından katalizlenen ve DNA zincir kırıkları ile aktive olan hızlı bir hücrel cevaptır. PARP proteinleri, DNA'ya bağlanan proteinlerin poli ADP-ribozilasyonunu katalizleyen ve ökaryotlarda bulunan bir enzim ailesidir (3). DNA'ya bağlanabilen proteinlere poli ADP-riboz (PAR) grupları ekleyerek bu proteinlerin fonksiyonlarını düzenler. PARP ailesinin birçok üyesi olsa da, hücrel poli ADP-ribozilasyonun % 90'ı PARP-1 tarafından gerçekleştirilmektedir. PARP-1, nükleusta bol miktarda bulunan, DNA zincir kırıkları tarafından aktive olan ve fonksiyonel olarak DNA tamiriyle ilişkili olan bir enzimdir (4).

2006 yılında yapılan bir çalışmada insan testis dokusunda PARP-1 enziminin ve PAR polimerinin spermatogenik hücrelerdeki dağılımı gösterilmiştir ve germ hücresi farklılaşmasındaki poli ADP-ribozilasyonun anahtar rolü kanıtlanmıştır (5). Spermatogenik hücrelerde mevcut olan PARP varlığı, muhtemelen bu hücrelerin DNA'sının genomik bütünlüğünü korumaya yöneliktir.

Oksidatif stres veya inflamasyon gibi çeşitli patolojik durumlarda PARP aktivasyonunda artış meydana gelmektedir (6). PARP aktive olduğunda, spesifik proteinlere örneğin, DNA'ya bağlanan proteinlere PAR grupları ekleyebilmek için hücre içinde NAD'ı tüketmektedir. PARP-1'in aşırı aktivasyonu, hücre içinde NAD ve ATP'nin fazla tüketimine neden olur ve mitokondriyal membran potansiyeli azalır. Bunların sonucunda hücre disfonksiyonu gerçekleşir ve hücre ölüme gider (7). PARP aktivasyonunun hangi mekanizmalar aracılığıyla hücre ölümüne sebep olduğu literatürde hala tartışma konusudur. Bu sebeple birkaç mekanizma önerilmiştir. Bunlar, hücrenin aşırı enerji tüketimi ile tetiklenen nekroz ve apoptoz indükleyen faktör (AIF) bağımlı apoptozdur (8).

Bazı karşı görüşlere rağmen, tek taraflı spermatik kord torsiyonun karşı testiste de hemodinamik ve histolojik değişikliklere yol açtığı artık kabul edilmektedir (9). Klinik çalışmalarda tek taraflı spermatik kord torsiyonlu olgularının uzun süre izlemlerinde, % 25 oranında infertilite, % 40'tan % 90'a varan oranlarda anormal semen analizi sonuçlarıyla karşılaşılmıştır. Bu durum hasarın yalnızca torsiyon olan tarafta olmadığını, karşı taraf testisin de olaydan etkilendiğini

düşündürmektedir. Özellikle germ hücrelerinde belirgin hasarlanma karşı testisin önemli bulgularındandır. Karşı testis hasarını önlemeye yönelik olarak E vitamini, pentoksifilin, verapamil, hiperbarik oksijen, steroidler, immun baskılayıcılar kullanılmıştır (10). Fakat bu ve benzeri çalışmalarda elde edilen sonuçlar tam tatmin edici olmamış ve klinik pratiğe aktarılamamıştır.

1996 yılında yapılan bir klinik çalışmada, tek taraflı spermatik kord torsiyonu sonrası karşı testiste programlanmış hücre ölümü (PHÖ) indeksinde artış saptanmıştır. PHÖ indeksindeki artıştan, kan-testis bariyerindeki bozulmayı takiben dolaşıma geçen sitokinlerin PHÖ'yü indüklemelerinin sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (11).

PARP inhibitörlerinin, iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası kullanımının pek çok organda hasarı azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (12). PARP inhibitörlerinin uygulanması, tavşanlarda kalp ve iskelet kasında iskemi-reperfüzyon hasarında azalmaya, fokal serebral iskemi modelinde beyin infark hacminde azalmaya, retinada iskemi-reperfüzyon hasarında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (13). Testis torsiyonundaki reperfüzyon hasarını azaltmada da PARP inhibitörleri kullanımı araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda testiste iskemi-reperfüzyon hasarında PARP inhibitörü verilmesi ile erken ve geç dönemlerdeki sonuçlar olumlu bulunmuştur. Bozlu ve arkadaşları detorsiyon öncesi verilen PARP inhibitörünün erken ve geç dönem iskemi-reperfüzyon hasarındaki biyokimyasal değişiklikleri azalttığını göstermişlerdir (14). Benzer olarak Kar ve arkadaşları PARP inhibitörünün torsiyon sonrasındaki iskemi-reperfüzyon hasarında biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri azalttığını göstermişlerdir.

Kar ve arkadaşları antioksidan ya da PARP inhibitörü verilerek yapılan benzer bir çok çalışmada iskemi-reperfüzyon hasarında biyokimyasal parametreleri değerlendirmiş, apoptozisteki artışı değerlendirmemişlerdir. Ayrıca testiküler torsiyon süreleri ortalama 4 saat tutulmuş daha kısa süreli torsiyon durumunda apoptozis durumu PARP yolağının etkinliği değerlendirilmemiştir. Oksidatif strese bağlı DNA hasarı seviyesine göre PARP'ın hem DNA onarımı hem de tam tersi olarak apoptoziste görev aldığı düşünüldüğünde, kullanılan PARP inhibitörlerinin normal ya da hafif hasarlı hücrelerde DNA onarımını da bozabileceği ortaya

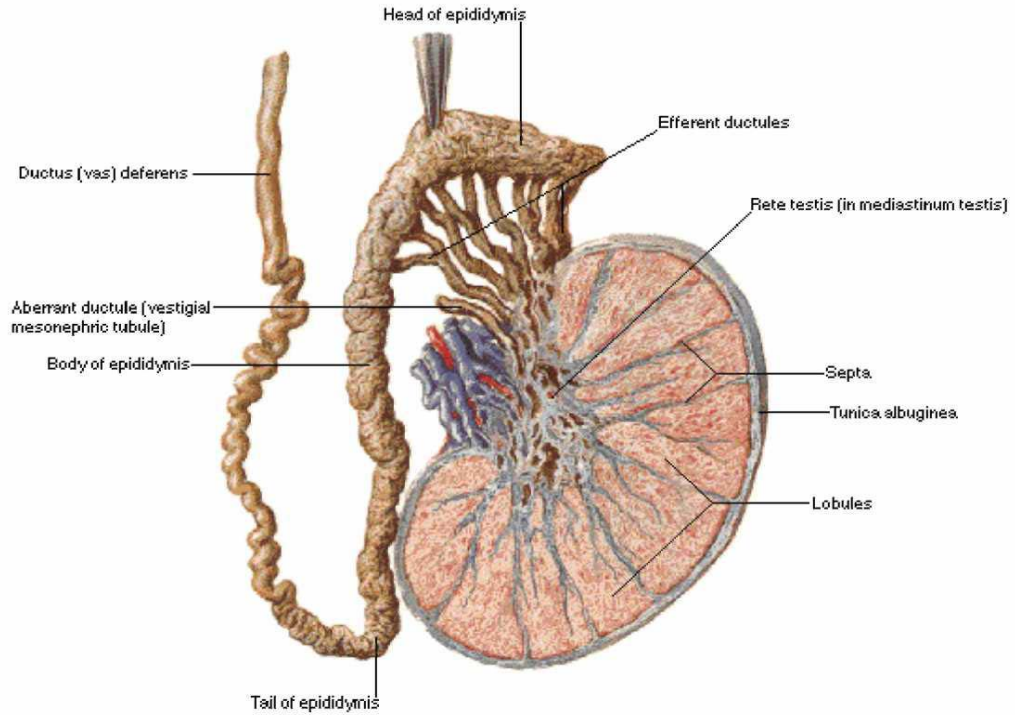
çıkılmaktadır. İkili etkisi olan PARP'ın iskeminin hangi aşamasında DNA onarımı yaptığı ya da apoptozis yönünde etki gösterdiği açıklığa kavuşmamıştır. Bizim çalışmamızda, farklı olarak, deneysel testis torsiyonu sonrası farklı iskemi sürelerinde hücrelerin apoptozise gitme durumları ve bu süreçlerde PARP yolağının etkin olup olmadığı, etkinlik varsa hangi yönde olduğunun gösterilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda karşı taraf testiste de farklı iskemi sürelerinde apoptozis gelişip gelişmediği ve PARP yolağının etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Testis

#### 2.1.1. Testisin Anatomisi

Testisler 4-5 cm uzunluğunda, 3 cm genişliğinde ve 2.5 cm derinliğinde olup 30 ml hacminindedir. Testisler sert bir kapsülle çevrili olup bu kapsül; 1) Tunika vajinalis 2) Tunika albuginea 3) Tunika vaskulozadan oluşur. Testisin posterolateral yüzeyine epididimis yapışır. Onun altında tunika albuginea, damarların ve duktusların testiküler kapsülü geçtiği noktada mediastinum testisi oluşturmak için içeri doğru uzanır. Mediastinum testis, testise ait damar ve sinirlerin organa girdiği yerdir. Tunika albuginea mediastenden sayıları 200-300 arasında değişen koni şekilli lobülleri oluşturmak için trabeküler yapıda septa radiataları verir. Tübülleri çevreleyen gevşek doku içerisinde testosteron üreten interstisyel (Leydig) hücreleri vardır. Lobüllerin tepelerine doğru, seminifer tübüller kıvrımlarını kaybedip düzelirler ve mediastende rete testisi oluştururlar. Bu rete testisten, 12-20 adet duktuli efferentes çıkar ve epididim başına girerler. Her bir lobülden gelen duktus tek bir epididim duktusuna drene olur. 6 metre boyunda olan bu kanalın kuyruğa doğru ilerledikçe çapı ve kalınlığı artarak duktus defferens meydana gelir (Şekil-1). Vas deferens epididim kuyruk kısmından ayrılarak iç inguinal halkadan karına girer, ureteri önden çaprazladıktan sonra mesane ve median umbilikal ligamentin arkasına geçer. Prostat bezine dökülmeden önce genişleyerek vas ampullayı yapar, sonra ince bir yapı halinde prostat içine dökülür (15).



**Şekil 1.** Testis epididim ve duktus deferens

(Interactive Atlas of Human Anatomy, illustrated by Frank H. Netter, M.D.)

### 2.1.2. Testisin Vasküler Yapısı

Testis ve epididimin arteriyel kanlanması internal spermatik arter, deferensiyel arter ve eksternal spermatik ya da kremasterik arterlerle sağlanır. Spermatik arter, renal arterin hemen altında abdominal aortadan çıkar, iç inguinal halka üzerinde spermatik kordun bir parçası olur ve sonuçta pleksus pampiniformisi oluşturan venlerin anastomoz ağıyla yakın ilişki içinde bulunur. Özellikle internal spermatik arter ile deferensiyel arter arasındaki yoğun bağlantılar internal spermatik arterin kesilmesinden sonra bile testisin canlılığını devam ettirmesine izin verir.

Testis venlerinin, uygun intratestiküler arterler ile birlikte seyretmemesi sıklıkla görülür. Parankimdeki küçük venler testisin yüzeyel venlerine ya da rete bölgesine doğru ilerleyen mediastinuma yakın bir grup ven içine dökülür. Bu iki grup ven pampiniform pleksusu oluşturmak üzere deferensiyel venler ile birleşir. Sağ testiküler ven inferior vena kavaya, sol testiküler ven ise sol renal vene dökülür (15).



### 2.1.3. Testisin Embriyolojisi

Ürogenital sistem, çöлом boşluğunun arka duvarında dorsal mezenterin her iki yanında embriyonun dorsal duvarı boyunca uzanan mezodermal kabarıklıktan (intermediate mezoderm) gelişir. Intermediate mezoderm, çöлом boşluğunun arka duvarında, primitif aortanın her iki tarafında longitudinal mezodermal şişlikler olarak belirir. Bu şişliklere ürogenital kabarıklık adı verilir. Ürogenital kabarıklığın medialinde ise genital kabarıklık bulunur.

Gelişimin altıncı haftasına kadar genital kabarıklık içinde germ hücreleri mevcut değildir. Primordial germ hücreleri altıncı haftada genital kabarıklığa gelirler. Bu evrede erkek ve dişi gonadların birbirinden farkları yoktur. Genital kabarıklıklar primordial germ hücrelerinin indükleyici etkileri ile over veya testise farklılaşırlar.

Eğer embriyo erkek ise primordial germ hücreleri XY kromozomunu taşırlar. Y kromozomu üzerindeki testis belirleyici faktörün (TBF) etkisiyle primitif cinsiyet kordonları çoğalmaya devam eder ve bir ağ oluşturur. Bu ağdan testis tubülleri meydana gelir.

Dördüncü ayda ise testis kordonların uçları rete testis olarak devam eder. Bu dönemde testis kordonları germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden köken alan Sertoli hücrelerinden meydana gelmiştir.

Testis kordonları arasında bulunan interstisyel Leydig hücreleri gestasyonun sekizinci haftasında testosteron üretmeye başlar ve böylece testisler dış genital organların farklılaşmasında rol oynar. Puberteye kadar testis kordonları solid halde kalır ancak puberteden sonra lümenleri açılarak seminifer tubülleri oluştururlar

Testisin kaudal kutbundan uzanan ekstrasellüler matriksten zengin yoğun mezenşimal yapıya gubernakülüm adı verilir. Testis inguinal kanaldan geçerken gubernakülümün ekstraabdominal parçası skrotum tabanına tutunur. Testis karın içine doğru gelişerek, hamileliğin 28. haftasında skrotuma inmektedir (16).

#### 2.1.4. Testisin Histolojisi

Testis, tunika albuginea adı verilen beyaz, sert ve fibröz bir bağ doku ile sarılıdır. Seminifer tubüller elastik liflerden zengin bağ dokusundan yapılmış bazal membran ile bunun iç yüzünü döşeyen germinatif epitel ve sertoli hücreleri bazal membrana oturmuş ve birbirine sıkı bağlarla tutunmuştur. Bu hücrelerin sayısı yaşam boyunca sabit olup çoğalma yeteneği olmayan hücrelerdir. Bazal membran, peritübüler kontraktıl hücreler (myoid hücreler) ve birbirine sıkıca bağlanmış Sertoli hücreleri bir arada kan-testis bariyerini oluştururlar. Bu bariyer spermatogenetik hücrelerin immun sistem hücreleri ile karşılaşmasını engelleyerek immunolojik infertiliteyi önler. İnsanlarda peritübüler myoid hücrelerin primer olarak kontraktıl fonksiyonu olduğu düşünülmektedir.

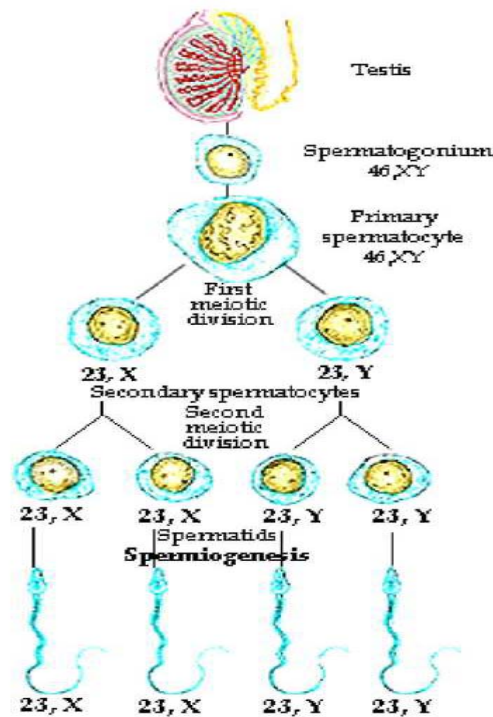
Sertoli hücreleri tubül lümenine doğru filamentöz sitoplazmik dallanmalar gösterirler, germ hücreleri bu filamentöz dallanmalar arasında bulunur. Birbirini izleyen daha ileri evre spermatosit ve spermatidler bu epitelin daha üst seviyelerinde yerleşmişken, diferansiye olmamış spermatogonia bazal membranın yakınında yer alır. Sertoli hücreleri germ hücrelerinin enerji ihtiyacını karşıladıkları gibi, gelişimin çeşitli evrelerinde oluşan germ hücrelerin atıklarını fagosite ederler ve foliküler uyarıcı hormon (FSH) reseptörleri taşırlar. Ayrıca androjen bağlayıcı protein (ABP), inhibin üretir. Androjen ve östrojen katabolizmasını sağlar. Salgıladıkları ürünlerle lümen içinde spermatogenezi kolaylaştırıcı kimyasal ortam oluştururlar.

Seminifer tubül içinde yer alan ikinci önemli yapı ise germ hücreleridir. Bunlar bazaldan lümeneye kadar değişik olgunlaşma aşamalarında bulunurlar. İnterstisyum ise kan damarları, lenfatik kanallar, fibroblastik destek hücreleri, makrofajlar, mast hücreleri ve leydig hücrelerinden meydana gelmiştir. Leydig hücreleri lüteinizan hormon (LH) etkisi ile kolesterolden testosteron sentezlerler (17,18).

#### 2.1.5. Spermatogenezis

Spermatogenez, testis seminifer tübüllerindeki germ hücrelerinden mitotik ve mayotik bölünmelerle matür spermlerin üretildiği karmaşık bir süreci kapsar ve 3 aşamada incelenebilir. Proliferasyon fazında; germ hücreleri mitoz bölünme ile

çoğalarak kendilerinin aynısı olan hücreler oluştururlar. Redüksiyon-bölünme fazında; mayoz bölünme ile germ hücreleri kromozom sayılarını 23'e indirirler. Farklılaşma fazında ise; sperm öncülü hücreler (spermatogonya, spermatosit, spermatid) sperm hücrelerine dönüşürler. Seminifer tübül içinde, spermatogenezin tüm aşamalarındaki sperm öncülü hücreler bulunur. Farklılaşma fazını tamamlayan hücreler seminifer tübül lümenine salınırlar. Bu nedenle testisin farklı bölümlerindeki farklı alanlarda, gelişimin değişik evrelerindeki sperm hücrelerinin üretimi devam eder (Şekil-2) (19,20).



Şekil 2. Spermatogenezis

(Neas J. F: The cell, embryology atlas, bölüm 2)

## 2.2. Testis Torsiyonu

Testis torsiyonu (TT) ilk defa 1840 yılında Delasiauve tarafından tanımlanmıştır. İntrauterin dönemde, yenidoğan (YD) döneminde, puberte döneminde ve inmemiş testisli olgularda TT daha sık olarak görülür. YD döneminde TT'nun fazla görülmesi, YD'lardaki testosteron düzeylerinin daha yüksek olmasından, puberte döneminde daha sık görülmesinin nedeni ise; artan testosteron düzeyine bağlı olarak oluşan testis elevasyonuna ve rotasyonuna bağlıdır (21). TT

yüksek oranda testis dokusunda nekroza neden olmasıyla acil cerrahi girişim gerektiren bir hastalıktır. Akut skrotum nedeniyle acil servise başvuran 0-17 yaşlar arasındaki hastalarda spermatik kord torsiyonu görülme insidansı % 35-38 olarak belirtilmiştir (22,23).

Testisler YD'larda ve inmemiş testisli olgularda skrotuma fikse değildir. Bunlarda daha çok ekstravajinal torsiyon denilen ve tüm kordu içeren torsiyon oluşur. Diğer etyolojik faktörler ise seksüel aktivite ve skrotal veya inguinal bölgeye yönelik akut ya da kronik travmalardır (23). Spermatik kord torsiyonunun oluşması ile beraber testisin venöz dönüşü engellenir ve venöz konjesyon oluşur. Venöz konjesyon sonunda testiste hemorajik infark alanları meydana gelir. Testis ödem nedeniyle şişer ve bu durum testiste ağrıya yol açar. Venöz konjesyonunun oluşması ve testisin şişmesi testiste basınç artışına sebep olur. Sonuçta arteriyal dolaşım da bozularak testiste iskemik nekroz meydana gelir (24).

Klinik çalışmalarda 4-6 saatlik TT'nun testiste nekrotik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise 1 saatlik iskeminin de spermatogenetik hücrelerde hasar meydana getirdiği bildirilmiştir. Atrofiye yol açan TT süresi tartışmalı olmakla beraber, Ashcraft'a göre 8 saatlik torsiyondan sonra testis atrofisi gelişmektedir. Sol spermatik kord daha uzun olduğu için, testis torsiyonu sol testiste daha sık görülür (25,26).

TT ekstravajinal ya da intravajinal olabilir.

Ekstravajinal torsiyon: Spermatik kord torsiyonu da denilir. Daha seyrek olarak oluşur. Genellikle intrauterin ve YD döneminde görülür. Ekstravajinal torsiyonda testisin skrotuma bağlantısı zayıf olduğundan, testis skrotum içinde dönebilir. Karşı tarafta anatomik bir defekt olmadığı için kontralateral eksplorasyon gerekmez (27).

İntravajinal torsiyon: Çan tokmağı (Bell-clapper) deformitesi de denir. YD döneminden sonraki torsiyonların çoğunluğunu oluşturur. Normalde tunika vajinalisin testisi kısmen sarması, epididimin posteriorda skrotuma tutunması ve epididimin testise yapışık olması testise hem hareketlilik, hem de kısmi bir stabilizasyon sağlamaktadır. Tunika vajinalisin testisi tamamen sardığı durumlarda

testis stabil olamamakta ve tunika vajinalis içinde dönebilmektedir. Bilateral olma olasılığı yüksek olduğu için kontralateral eksplorasyon yapılmalıdır (24,27).

### **2.2.1. Klinik Bulgular**

Yenidoğanda spermatik kord torsiyonu doğum öncesi veya doğumdan hemen sonra görülür. Fizik muayenede hemiskrotum ödemli ve hiperemik, mavi-siyah bir renk almış olabilir. Genelde YD döneminde görülen testis torsiyonunda belirgin bir hassasiyet izlenmediğinden tanı genellikle gecikir (28).

TT genellikle testiste, karnın alt kadrantlarında, ya da kasıkta ani ağrı ile birlikte, bulantı ve kusma ile başlar. TT görülen adolesanların yaklaşık 1/3'ünde intermittan ağrı hikayesi vardır. Genelde normalden yukarı yerleşimli, aksı değişmiş, ödemli bir testisin varlığı torsiyonu düşündürür. Fizik muayenede karşı testisin de mutlaka değerlendirilmesi gerekir. Kremasterik refleksin yokluğu spermatik kord torsiyonu açısından değerli bir bulgudur. Fizik muayenede o taraf skrotumda kızarıklık, ödem ve ileri derecede hassasiyet tespit edilir. Testisin yukarı doğru kaldırılması vasküler oklüzyonu ve ağrıyı artırır. Buna Prehn bulgusu denir. Tunikadaki ödem sıvısının effüzyonundan kaynaklanan reaktif bir hidrosel, fizik muayene bulgularını maskeleyebilir (28,29,30).

### **2.2.2. Tanı**

Spermatik kord torsiyonu tanısında halen en önemli yöntemler ayrıntılı öykü ve uygun fizik muayene olarak görülmektedir. Tanıda en önemli kriter zamanlamanın uygun yapılması ve hasta için geçerli tedavi planının çizilmesidir (31).

Tüm hastalarda rutin hemogram ve idrar analizi yapılmalıdır. Renkli doppler ultrasonografisi ile % 90'nın üzerinde doğru tanı konulabilir. Diğer bir tanı yöntemi ise Tc99m sintigrafisidir. Ancak sintigrafi ile de % 95 oranında doğru tanı konulabilmektedir. Buna karşılık küçük çocuklarda testis boyutlarının küçük olması hem doppler hem de sintigrafinin güvenilirliğini azaltmaktadır (31,32).

TT ile en çok karışan epididimoorşitte; testis yukarı doğru kaldırılınca ağrı azalır (Prehn bulgusu negatifliği). Strangüle inguinal herni, akut hidrosel, skrotal herni kesesinin torsiyonu, idiyomatik skrotal ödem, travmatik hematoma, Henoch-

Schönlein purpurası, skrotal yağ dokusu nekrozu, pyosel, testis tümörleri ve testisin lösemik infiltrasyonu ayırıcı tanıda yer alan diğer hastalıklardır. Bununla birlikte tüm çocuklar TT elimine edilinceye kadar, TT varmış gibi tedavi edilmelidir (24,31).

### 2.2.3. Tedavi

Mümkün olan en kısa zamanda detorsiyon yapılması gerekmektedir. Gerek hasta ve yakınlarının ihmali gerekse yanlış tanı nedeniyle sıklıkla tedavide gecikmeye neden olmaktadır. Ağrının başlamasından sonraki ilk birkaç saatte başvurmuş olgularda manuel detorsiyon denenebilir. 1893'de tanımlanan manuel detorsiyonda işlem sağ ve sol testis için, daha önceden belirtilen torsiyon yönünün aksine lokal anestezi ile ya da anestezi olmaksızın elle çevrilerek yapılır. Manuel detorsiyonu takiben bilateral testis fiksasyonu yapılmalıdır.

Cerrahi olarak uygulanan detorsiyonda genellikle skrotal girişim tercih edilse de kimi olguların etiolojisinde testis tümörü olabildiği için bazı ürologlar inguinal yolu önermektedir. Detorsiyone edilen testis daha sonra septum veya skrotum yan duvarına 3 noktadan abzorbe olmayan sütürle fikse edilmelidir. Tespitin yetersiz olduğunu düşünen bazı araştırmacılar tunika vajinalis eversiyonunu tekrar torsiyon oluşmasını önlemek amacıyla önermişlerdir.

Yenidoğan döneminde testis torsiyonunda tedavi şekli hakkında görüş birliği yoktur. Bu yaş grubunda tedavi seçimini değerlendirmek için olguyu postnatal ve prenatal olarak tanımlamak önemlidir. Testis canlılığının olmadığına dayanarak cerrahi müdahale gerekmediğini düşünenlerin aksine hasarlı testisin diğer testise etkilerinin engellenmesi adına eksplorasyon önerenler de vardır. Doğum sonrası akut olarak ortaya çıkan torsiyon acil cerrahi eksplorasyonu gerektirir. Ölü testise orşiektomi yapılması gerekirken yaşam belirtisi varsa orşiopeksi ile detorsiyonu gerekir. Perinatal dönemdeki en yaygın senaryo bebekte kronik değişiklikler ve ölü bir testisin bulunduğu prenatal torsiyon durumudur. Bu yenidoğanlar anestezi riski değerlendirilmesi yapıldığında kontralateral testis fiksasyonu yapılarak elektif orşiektomiye gitmelidirler. Testiküler hacmi ve pubertal gelişimi değerlendirmek için düzenli takip gerekmektedir ve hormonal disfonksiyon olması beklendiğinde endokrinoloji servisine de danışılmalıdır (örneğin, bilateral torsiyon). Testis torsiyonunda cerrahi girişim sırasında en önemli

nokta testisin canlılığını koruyup korumadığıdır. Operasyon sırasında detorsiyonun ardından 10 dakikaya kadar beklenir, testis renginin açılması olumludur. İntraoperatif olarak intravenöz Nafluorosein enjeksiyonu ardından Wood's ultraviyole ışığı altında incelenerek testis canlılığı hakkında yorum yapılabilir. Testisin canlı olmadığına karar verilir ise orşiektomi yapılır. Aynı seansta protez yerleştirilebilir. Canlı olduğuna karar verilen testisler ise fikse edilir. Testis canlılığından şüphe ediliyorsa karşı testis üzerine zararlı etkileri olabileceği göz önüne alınarak orşiektomi yapılması gerektiği öne sürülmektedir. Bazıları ise spermatik aktivitenin yok olmasına karşın endokrin aktivitenin devamı açısından testisin korunması gerektiğini savunmaktadır. Karşı testiste oluşan zararlı etkilerin immunolojik mekanizmalar ile gerçekleştiği ve korunmak için kortizon uygulanması gerektiğini bildiren çalışmalar da vardır. Torsiyone testisi olan hastalarda karşı testiste torsiyon riski bulunduğundan detorsiyonu takiben karşı testise de fiksasyon proflaktik olarak önerilmektedir. Manuel detorsiyonun başarı oranını değerlendiren çalışmalar çelişkili sonuçlar içermektedir. Bu yöntemi uygulayan klinisyenler manuel detorsiyonun cerrahi yerine geçemeyeceğini veya cerrahiye geciktiremeyeceğini bilmelidirler. Çoğu zaman testis içe doğru burkulduğundan elle detorsiyon karşıt yönde yapılmalıdır. Spermatik korda yapılan sinir bloğu bu manevrayı kolaylaştırabilir ama detorsiyona bağlı rahatlamayı veya yanlış yönde yapılan manipülasyona bağlı ağrı artışını gizleyebilir. Başarılı bir manuel detorsiyonu acil cerrahi eksplorasyonu izlemelidir. İnsizyon seçimi dışında, yenidoğan ve çocuk/yetişkin (intravaginal) dönemde görülen testis torsiyonu için yapılan cerrahi tedavi esas olarak aynıdır. Yenidoğan torsiyonu için etkilenen tarafa inguinal insizyon yapılmalıdır.

Cerrahi tedavi ile birlikte medikal yardımcı yöntemler de kullanılabilir. Bir methylxanthine türevi olan pentoksifilin kanın vizkozitesini ve platelet agregasyonunu azaltıp unilateral torsiyon sonrasında her iki testise olan kan akımını artırır. Nitrik oksidin olasılıkla kan akımının regülasyonu yolu ile kontralateral testisteki histopatolojik değişimlere karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (31,33).

#### 2.2.4. Prognoz

Dört saatlik iskemiden sonra ağır Sertoli hücre hasarı görülürken, Leydig hücre hasarı 10-12 saatlik iskemiden sonra ortaya çıkar. Torsiyonun süresi 6 saatten daha kısa ise testislerin % 85 ile 97'si, 6-12 saat arasında ise % 55 ile 85'i, 12-24 saat arasında ise % 20 ile 80'i kurtulur. TT 24 saatten uzun sürerse, kurtulma şansı % 10'nun altındadır (33).

#### 2.2.5. Karşı Taraf Testisin Durumu

Testis torsiyonunda karşı taraf testisin fonksiyonlarında bozulma tespit edilmesi birçok araştırmanın ana konusu haline gelmiştir. Bu durum ile ilgili birçok mekanizma öne sürüldüyse de en çok immünolojik mekanizma, gizli intermittan torsiyonların varlığı, konjenital displazi ve refleks vazokonstriksiyon mekanizmaları kabul görmüştür.

İskemik hasar kan testis bariyerini bozarak testisten antijenik materyalin immün sistemi uyarmasına yol açar. Bu şekilde oluşan oto-antikorlar ise sağlam olan karşı taraf testise saldırarak testisin fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilmektedir. Ratlarda yapılan bir çalışmada, testis torsiyonu sonrası orşiektomi ile birlikte anti-lenfosit globulinlerin verilip splenektominin yapılması karşı taraf testiste hasar oluşumunu önlediği gösterilmiştir. Bu durum immünolojik mekanizmaları akla getirebilir. Başka bir deneysel çalışmada ise; steroidler, azathioprine veya siklosporin gibi immünosupresanlar kullanılarak karşı taraf testisin korunduğu gösterilmiştir (34). Rodriguez ve ark. ise deneysel çalışmalarında karşı taraf testiste germ hücrelerinde apoptozis ile birlikte seminifer tübüllerde fokal hasar tespit etmişler ve bunun hücrel ve/veya humoral immünite ile oluştuğunu belirtmişlerdir (35). James ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, tek taraflı spermatik kord torsiyonu sonrasında antisperm antikorların oluşmamasına rağmen, germinal epitelyuma ve testise karşı hem humoral hem de hücrel bir reaksiyon geliştiği gösterilmiştir. Testis torsiyonu olan hastalarda, başvuru anında veya takip edilen dönemde % 0-11'inde sperm antikorları tespit edilmiştir (36).

Kan testis bariyerinde olan bozulmaların sitokinleri açığa çıkararak karşı taraf testiste apoptozise yol açtığı da düşünülmektedir. Cesarano, spermatik damarları



bağlanan hayvanlarda bir ay sonra karşı testiste hasar oluşmadığını bildirmiştir (37). Bu durum, karşı tarafta hasar oluşması için torsiyone testisten, minimalde olsa sirkülasyona katılan bir kan akımının olması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Testis torsiyonu olan hastaların % 57-88'inde başvuru anında karşı taraf testis biyopsisinde de patoloji saptanmıştır. Melikoğlu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, torsiyon sırasında karşı testiste de kan akımında azalma, detorsiyon sonrasında ise karşı testis kan akımında da yeniden artma meydana geldiğini saptamışlardır (38).

İpsilateral torsiyon sempatik bir afferent stimulus ile refleks olarak karşı testisin kanlanmasını bozabileceği düşünülmüştür. Tavşanlarda yapılan bir çalışmada deneysel olarak oluşturulan torsiyon sonrası karşı taraf testisin kan akımında ani ve giderek kötüleşen bir azalma tespit edilmiş ve bu durumun detorsiyon sonrası düzeldiği gözlenmiştir. Ratlarda yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilerek 2 saat torsiyon sonrası karşı taraf testis kan akımında % 43'e kadar bir azalma olduğu saptanmıştır. Azalmış kan akımına bağlı gelişen hipoksinin karşı testis kan akımını azaltabileceği öne sürülmüştür (19).

### **2.3. Apopitoz**

Apopitozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilen bir hücre ölümüdür. Çok hücreli organizmalarda da gelişimsel olarak istenmeyen hücrelerin eliminasyonu programlanmış hücre ölümü ile gerçekleşir. Apopitozis ve mitoz dokuda sürekli bir denge halindedir. Belirli bir dokuda hücre proliferasyonu mitozla, o dokuda olması gereken hücre sayısı da apopitozis ile belirlenir (39,40).

Apopitozis, hücrede yarattığı değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılansa da nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma zarı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apopitozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apopitozisin gerçekleşmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apopitozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apopitozisin erken

fazında gösterir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (39,40,41).

### 2.3.1. Apoptoziste Morfolojik Değişiklikler

*Hücre Büzülmesi:* Sitoplazması daha yoğundur ve bu yüzden organeller kalabalık görünür. Komşu hücreye göre daha küçüktür. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur. Hücre zarı sağlamdır.

*Kromatin Yoğunlaşması:* Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır ve genellikle büzülür. Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır.

*Apoptotik Cisimlerin Oluşması:* Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (39,42).

### 2.3.2. Apoptoziste Biyokimyasal Değişiklikler

*DNA Fragmentasyonu:* Hedef proteinlerden biri olan DNA, endonükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren  $Ca^{+2}$   $Mg^{+2}$  bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur (43).

*Hücre İskeletinin Yıkılması:* Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan proteindir. Aktin filamanlarının yıkımı ile hücre normal şeklini kaybeder (44).

*Hücre Membranı Değişiklikleri:* Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle ilişkisi kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillusler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır. Kaspazların etkisiyle hücre zarının asimetrisi bozulur.

Bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilip fagositozlarını sağlar. Apoptotik cisimler çevredeki parenkim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokulardan temizlenirler (43,44).

### 2.3.3. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozis, ekstrinsek ve intrinsek olmak üzere iki mekanizma ile gerçekleşir.

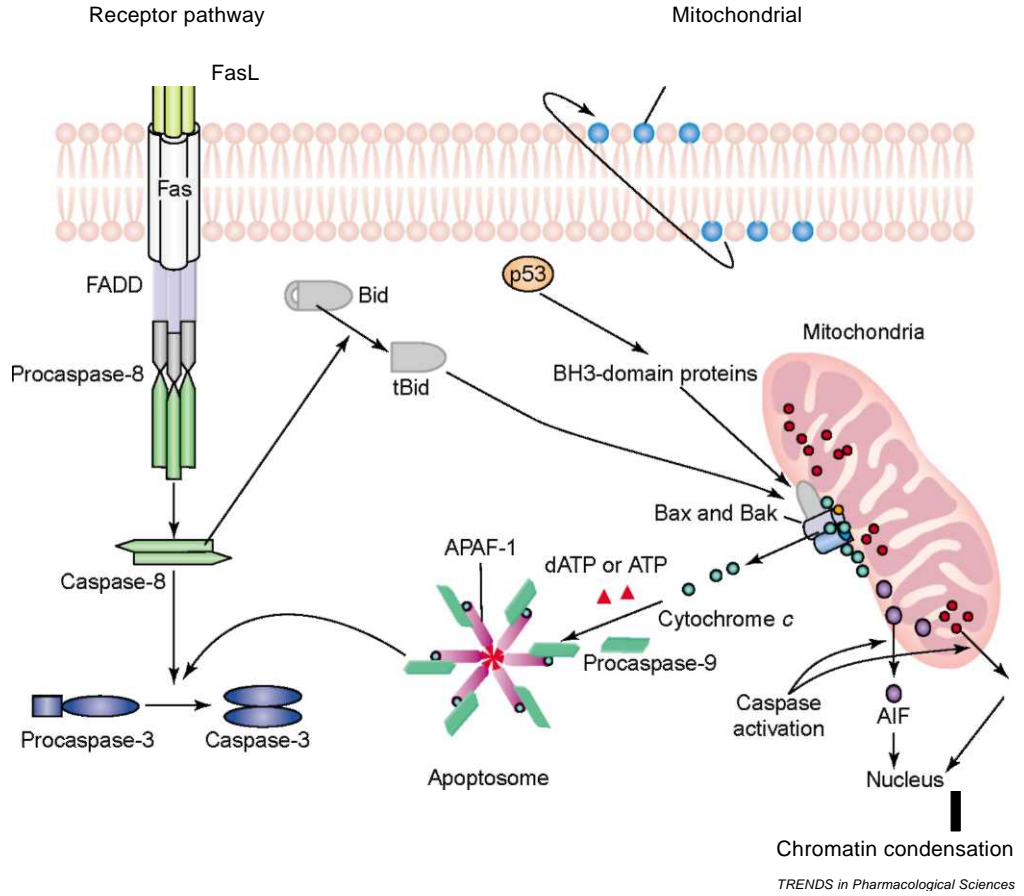
#### 2.3.3.1. Ekstrinsek / Reseptör Aracılı Yol

Apoptozisin dış yolu Tümör Nekroz Faktör (TNF) ailesi hücre yüzey reseptörlerinin ligantlar yolu ile aktive edilmesi ile uyarılır (Şekil 3). Hücre ölümünü düzenleyen mekanizmaların belki de en iyi anlaşılmış örneği sitokine bağlı dış apoptozis yoludur. TNF- $\alpha$ , TNF ile ilişkili apoptozis uyarıcı ligantlar (TRAIL) ve Fas ligantları, bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar (42).

Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligant bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarında kısmen korunmuş olan bir ölüm bölgesi (DD) bulunur. Bu bölgeler sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlanarak apoptozisin başladığı yerlerdir. Ligandlar bağlandığında Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNFR) ya da Fas molekülü kompleks oluşturur. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar ölümü başlatan sinyalleme kompleksini (DISC) oluştururlar. Reseptörün uyarılmasıyla aktive olan bu trimer proteinler prokaspas-8 in aktivasyonu ile apoptozu uyarırlar. Aktive kaspas-8 diğer kaspasları uyararak apoptozu başlatır (şekil 3) (45).

#### 2.3.3.2. İntrensek / Mitokondrial Yol

Mitokondri apoptoziste ölüm programını aktive eden birkaç faktör salar. Bu faktörlerden en önemlisi Sitokrom c (Cyt-c) ve AIF (Apoptozis indükleyici faktör) dir. DNA da hasar oluşması p53'ü aktive eder. P53 hücre durumuna göre hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamiri ve apoptozda görev alır. Bcl-2 ailesi denetimindeki mitokondriden salınan sitokrom c sitozoldeki Apaf-1 ve prokaspas-9 ile birleşerek apoptozomu oluşturur. Kaspas-9 aktifleşerek kaspas kaskadını etkinleştirir. Kaspas-3 ün aktive olmasıyla apoptozis başlar (Şekil 3) (42,46).



Şekil 3. Ekstresek ve intrensek yol kaspaz bağımlı hücre ölümü (47).

### 2.3.4. Apoptozis Regülatörleri

Apoptozisi düzenleyen genler cmyc, p53 ve bcl-2 olarak bilinir ve ürettikleri proteinler aynı adı alır. Apoptozisi baskılayan (anti-apoptotik) ya da indükleyen (pro-apoptotik) proteinler vardır. P53, Bcl-2 ailesi, apoptozis baskılayıcı faktör (IAP), Kaspazlar gibi protein aileleri apoptozis regülatörleridir (44).

#### 2.3.4.1. P53

Anti-apoptotik özellikte, 393 aminoasitli bir proteindir ve çevresel şartlara, hücresel duruma göre hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamiri ve sentezi, hücre farklılaşması, genomik şekillenme ve programlı hücre ölümünde görev alır. Genom hasarı büyük boyutlarda ise hücre programlı hücre ölümüne girer (42).

### 2.3.4.2. BCL-2 Ailesi Proteinleri

Bcl-2 ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur. Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondridir ve Bcl-2 güçlü bir ölüm inhibitörüdür. Bcl-2 ile ilgili proteinler yapısal ve fonksiyonlarına göre 3 grupta toplanır (46):

- Bax alt grubu; Hepsi proapoptotiktir. Bax ve Bak'dan oluşur
- Bik alt grubu; Proapoptotik Bik, Bid ve Bim'den oluşur.
- Bcl-2 alt grubu; Hepsinin antiapoptotik aktivitesi vardır. Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-w'den oluşur, mitokondri membranında bulunur (43).

### 2.3.4.3. IAF Ailesi Proteinleri

Anti-apoptotik protein ailesindedir ve bunlar programlanmış hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir. Bunların çoğu hücre ölümünü Kaspaz-3, Kaspaz-7 ve Kaspaz-9'a direkt olarak bağlanıp onları inhibe ederek gerçekleştirirler (42).

### 2.3.4.4. Kaspazlar

Kaspaz, sistein aspartatik asit proteazlar olarak bilinir ve birbirleriyle homolog büyük protein ailesidir. Kaspazlar, proteolitik yarıklanmasıyla aktifleşen inaktif granüller olarak üretilir. Kaspaz kaskadını başlatan kaspaz-3, -6 ve -7'dir. Apoptozis mekanizmasında üç temel grup rol alır. Bunlar: Ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimlerdir (kaspazlar). Ölüm reseptörleri; TNF (Tumour Necrosis Factor) reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri, ölüm alanı (Death Domain) adı verilen bir aminoasit dizisini içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar. TNF süperfamilyası eş zamanlı olarak birbirinden bağımsız iki etkiye sebep olabilmektedir. Kaspaz 2 ve 8 aracılığı ile ya da NF $\kappa$ B ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek apoptozisin başlamasını sağlarlar. Bilinen altı tane ölüm reseptörü (CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNFRelated Apoptosis-Inducing Ligand)-R1, TRAILR2, TNF-R1, DR3, DR5 ve DR6) vardır. Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95), karaciğerde bol miktarda bulunur. İmmünohistokimyasal

analizler ile üreme hücrelerinin spermatozoid alt gruplarında FAS ve DR5 lokalizasyonu gösterilmiştir (48). Fas'ın etkisiyle kaspaz dizisi aktive olur ve kaspazla aktive olan DNaz (caspaseactivated DNase; CAD) aracılığı ile DNA yıkımına neden olur. Memeli hücrelerinde sistein proteaz ailesinden olan kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplazmada inaktif prokaspazlar olarak bulunur. Diğer adı ile ICE proteazlardır ve bir proteaz aktivasyon dizisi (şelalesi) başlatarak sitoplazmik proteinlerin yıkımında rol almaktadırlar. Bu sırada nükleazların da aktivasyonu ile DNA parçalanması ve RNA degradasyonu gerçekleşmektedir. Sitokrom c'nin sitoplazma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olur. İnflamasyonu uyaran ve ilk kez bir proteaz olarak tanımlanan ICE, prokaspaz-1 olarak adlandırılmaktadır. Kaspazlar bir seri olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive ederler. Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunanlar (kaspaz 1,4,5,13), proteolizisin başlatıcıları (kaspaz 2, 8-10) ya da uygulayıcıları (kaspaz 3,6,7) olarak sınıflandırılırlar. Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve ölüme yönlendirirler ama ölümleri gerçekleştirmezler bunu yapacak olanları aktifleştirirler. Ölümleri gerçekleştiren uygulayıcı kaspazlardır. Uygulayıcı kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler. Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin (IAP) uygulayıcı kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir. Ayrıca IAP (Inhibitors of Apoptosis) ailesinin kaspazlardan ayrı olarak, transkripsiyon faktörlerin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgelerden keser, bu nedenle c-aspartases adını almışlardır. Böylece kaspazların kısıtlı proteolizisi nedeniyle, hücrede lizis oluşmaz, bunun yerine apoptotik cisimcikler oluşur (49).

**Tablo 1.** Apoptozun moleküler düzenlenmesi

Bcl-2 ailesi				
Antiapoptotik proteinler	Proapoptotik proteinler	Kaspaz ailesi	Apoptoz inhibitör proteinler (AIP)	Tümör Süresör Ailesi
Bcl-2	Bax	Apoptoz "başlatıcılar" : kaspaz -2, -8, -9, -10	NAIP SMN	p53 p63 p73
Bcl-xj	Bak	Apoptoz "cellâtlar" : kaspaz-3, -6, -7 Sitokin işlemciler: kaspaz - 1, -4, -5, -11, -12, -14	AIP1	
Boo	Bcl-xs Bad Bid Bik		AIP2 XAIP	

#### 2.4. Testiste Oksidatif Stres

Oksidatif stresin kaynağını oluşturan oksijen, hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılan en önemli moleküldür. Serbest oksijen radikalleri ise enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup, yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir. Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipidlere saldırarak zarar vermektedir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunmuş olur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirlerse, hücrede serbest radikallerin miktarı artar (19,50).

Spermatogenez saniyede 1000 adet sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir. Bu süreçte meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyel oksijen tüketimi olduğunu göstermektedir. Ayrıca; testisteki zayıf vaskülarizasyon, dokuda oksijen durumunun düşük ve bu düşük oksijen miktarı için olan rekabetin oldukça şiddetli olmasına neden olmaktadır. Testiküler mikroçevredeki düşük oksijen miktarına ek olarak, fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle testis oksidatif strese karşı hassas hale

gelmektedir. Dolayısıyla, hem spermatogenez hem de Leydig hücresi steroidogenezi oksidatif stresle hasar görmektedir. Testis bu tehlikeyi önlemek için; hem enzimatik hem de non-enzimatik öğelerden oluşan antioksidan sistemleri devreye sokmaktadır (51,52).

Testis; steroidogenez ve sperm üretimini desteklemek amacı ile antioksidan açıdan korunmasına rağmen, bazı endojen ve ekzojen faktörler bu savunmayı alt üst edilebilmekte ve oksidan-antioksidan denge bozularak oksidatif stres meydana gelmektedir (53,54).

## 2.5. Poli ADP-Ribozilasyon

Ökaryotlardaki poli ADP riboz polimeraz (PARP) aktivitesine ilgi, Sidney Shall ve ekibi tarafından bir salyangoz (*Physarum polycephalum*) türünde polimerize edici aktivitenin karakterize edilmesiyle başlamıştır. Riboz-riboz bağlarını ayıran enzim olan poli ADP riboz glikohidrolaz (PARG), 1971'de Masanao Miwa ve Takashi Sugimura tarafından keşfedilmiştir, ancak poli ADP-riboz'un dallanmış yapısını tanımlamak çok daha fazla zaman almıştır (55).

Poli ADP ribozilasyonun DNA tamirinde rol aldığı ilk kanıtı 80'li yılların başında, PARP'in en etkili inhibitörü olan 3-aminobenzamid (3-ABA) ile muamele edilen hücrelerin DNA hasarı ajanlarına karşı hassas hale geldiği gösterilerek ortaya çıkmıştır (56).

PARP, reaktif oksijen molekülleri gibi genotoksik ajanların oluşturduğu DNA iplik kırıklarının tespit edilmesinde önemli bir nükleer enzimdir. Testiküler germ hücrelerinde PARP'ın baz eksizyon tamirindeki rolü özellikle iyi araştırılmıştır. Hafif genotoksik zarar PARP aktivasyonunu indükleyerek, DNA tamirini ve hücrenin canlı kalmasını kolaylaştırmaktadır. Orta derecede hücre hasarında, tamir edilemez derecede DNA hasarı bulunan hücreler apoptoz yolağı aktive edilerek elimine edilmektedir. Şiddetli DNA hasarının olduğu durumda ise, PARP aşırı aktive olmakta ve hücre içi enerji metabolizmasını çökerterek hücreyi nekroza sürüklemektedir (57).

Erkek germ hücreleri çeşitli ekzojen ve endojen genotoksik ajanlara maruz kalmaktadır. Endojen ajanlar hücrelerin metabolik aktiviteleri sırasında orataya çıkan

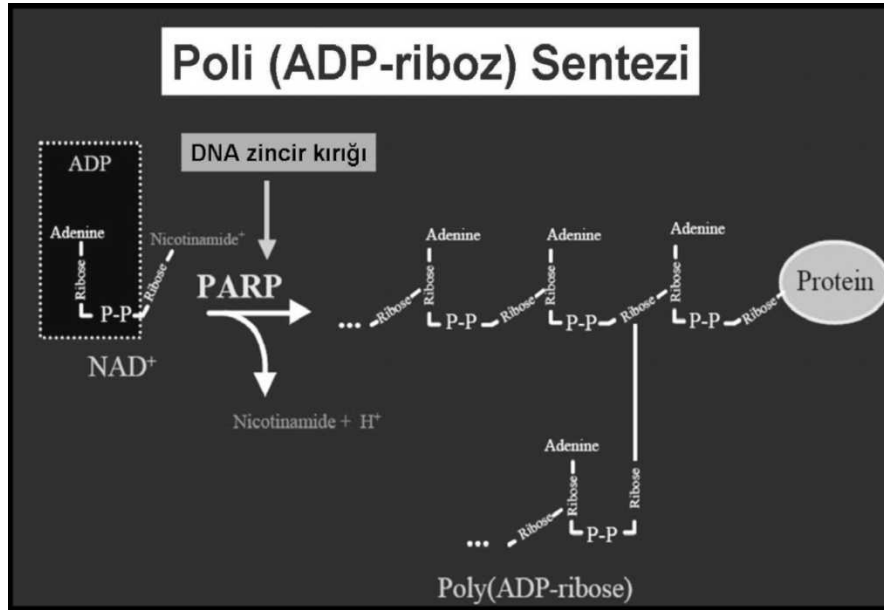


reaktif oksijen ve nitrojen türleridir. Çeşitli çevresel faktörlerin dahil olduğu eksojen ajanlar genomik DNA hasarı oluşturabilirler. Bu genotoksik ajanlar; DNA–protein çapraz bağlarında, çapraz bağların arasında ve içinde hasarlar, baz hasarı, DNA tek iplik kırıkları, çift iplik kırıkları gibi farklı DNA lezyonları yapabilirler. Bunca çeşitli DNA defektine karşılık ökaryotik hücrelerin etkili DNA tamir yolları vardır. PARP gibi bazı proteinler birden fazla DNA tamir yollarına katılırlar (57).

PARP'ın DNA tamirinde iyi tanımlanan rolü olduğu gibi aynı zamanda kaspas bağımlı ve kaspaz bağımsız AİF aracılıklı apoptoziste de görev almaktadır. Apoptozis esnasında çok sayıdaki DNA kırıkları PARP aktivasyonuna öncülük eder. PARP oksidatif DNA hasarına cevaben aktive olur ve hücresel enerji havuzunu tüketir. PARP'ın fazla aktive olması PARP'ın substratı olan NAD'ı tüketir. Glikolizis, elektron transportu ve ATP oluşumu yavaşlar. Sonuç olarak farklı proinflatuar yolların upregülasyonunda olduğu gibi fonksiyonel bozulma veya hücre ölümü olur (57).

### **2.5.1. Poli ADP Ribozilasyon Mekanizması**

Poli ADP ribozilasyon, poli ADP riboz polimerazlar (PARP) olarak bilinen bir enzim ailesi tarafından katalizlenen ve ökaryotik hücrelerde bulunan proteinlerin en etkili post-translasyonel modifikasyonudur. İnsan genomunda PARP ailesi üyelerini oluşturan 18 farklı gen tanımlanmıştır (58). Poli ADP Ribozilasyon metabolizması, DNA tamiri ve genomik stabilitenin korunması, transkripsiyonal regülasyon, sentromer fonksiyonu ve mitotik iğ oluşumu, sentrozomal fonksiyon, telomer dinamikleri, apoptoz ve nekroz gibi biyolojik olaylarda ve süreçte rol oynamaktadır (19,58). Poli ADP ribozilasyon, NAD bağımlı bir enzim olan PARP'lar tarafından katalizlenen ve DNA zincir kırıkları ile aktive olan hızlı bir hücresel cevaptır (59). PARP enzim ailesi, substrat olarak kullandığı nikotinamid dinükleotitten (NAD<sup>+</sup>) "nikotinamid" kısmını koparır, kalan ADP riboz moleküllerini birleştirerek poli ADP riboz (PAR) polimerlerini sentezlemektedir (Şekil 4). Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarının büyük çoğunluğunda koenzim olarak görev yaptığı bilinen NAD<sup>+</sup>/NADH biyomolekülleri çok yönlü kullanılmakta ve çeşitli ADP-ribozil transfer reaksiyonlarında substrat olarak görev yapmaktadır.



Şekil 4. Poli ADP riboz sentezi (19).

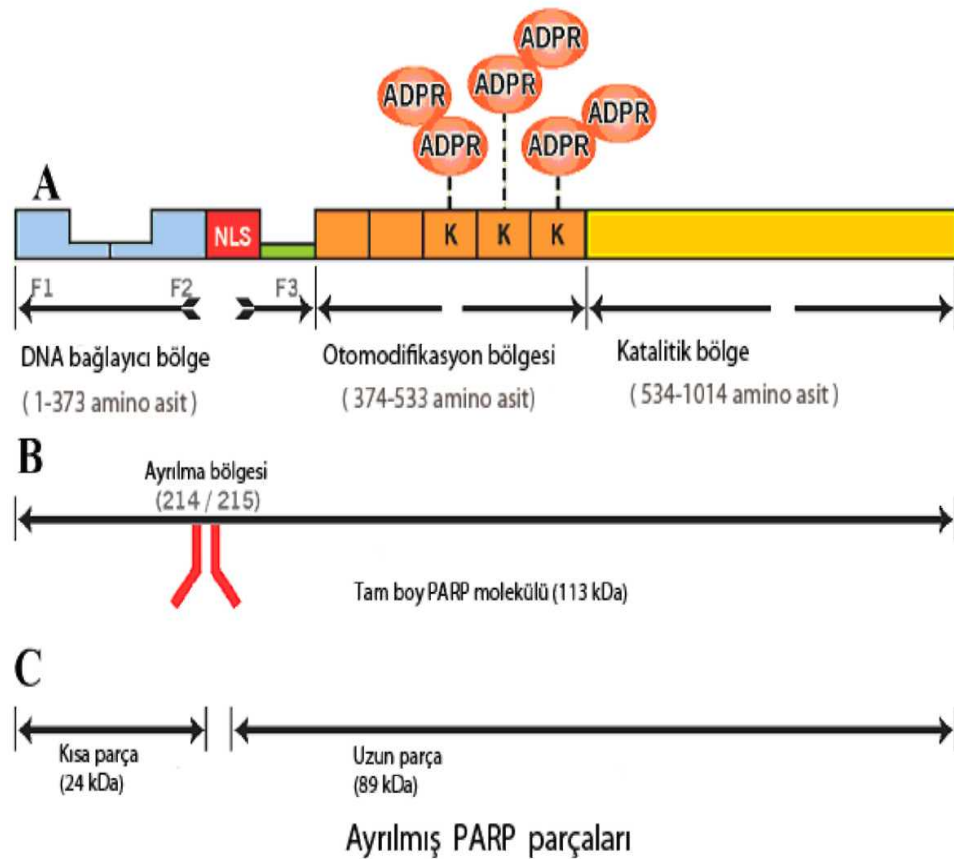
Poli ADP ribozilasyon mekanizması, iyonize radyasyon, alkile ajanlar ve oksidanlar tarafından indüklenen DNA hasarına en hızlı hücrel yanıtı vermektedir. DNA tek ve çift zincir kırıklarının varlığında poli ADP ribozilasyon çok nadir gerçekleşen bir olaydır. Ancak; DNA hasarı 100 kat artarsa bu mekanizmanın aktivitesi de artmaktadır. Bu koşullar altında poli ADP riboz'un yaklaşık % 90'ı PARP-1 tarafından sentezlenmektedir. PARP-1 normalde hücrelerde ekspre edilmektedir, ancak DNA zincir kırıklarıyla aktive olarak ekspresyonu artmaktadır.

DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bu hücrel yanıtta, PARP'lar NAD<sup>+</sup>'in nikotinamid ve riboz arasındaki glikozidik bağlarını parçalayarak, "hedef proteinlerin" glutamik asit, aspartik asit ve lizin rezidülerine ADP-riboz ünitelerinin kovalent olarak eklenmesini (modifikasyonu) gerçekleştirmektedir (19,60).

Böylece, oluşan DNA hasarı tamir edilmektedir. Bu mekanizma fizyolojik durumda normal bir şekilde çalışırken, aşırı DNA hasarının meydana geldiği durumlarda, PARP'ın da aşırı aktivasyonu normalden fazla NAD tüketilmektedir. Dolayısıyla, hücrenin enerji metabolizmasında çöküşe neden olan bu durum aynı zamanda hücreyi apoptoz ve nekroz gibi çeşitli ölüm yollarına sürüklemektedir (19).

### 2.5.2. PARP Süper Ailesi

PARP ailesi, PARP imzası olarak rol oynayan 50 aminoasit rezidüsünden yapılmış olan korunmuş katalitik bölgesi ile 18 homologdan (PARP 1-18) meydana gelmektedir. Bu bölgede PAR zincirleri başlatılır, uzatılır ve zincirlerin dallanması oluşabilir. PARP, DNA baz ekzisyon tamiri, DNA replikasyonu ve transkripsiyonu gibi bir çok genomik işlemlere dahil olan, aynı zamanda DNA dizi kırıklarına cevap vermek için substrat olarak kullandığı NAD molekülünden poli (ADP-riboz)'u sentezler (61). PARP ailesinin bütün üyelerinin yapı ve fonksiyonlarını anlamak için yapılan çalışmalar olsa da, en çok PARP-1 enzimi üzerinde çalışılmaktadır. PARP-2, PARP-3, PARP-4 (vPARP), PARP-5a (tankiraz-1) ve PARP-5b (tankiraz-2) gibi diğer PARP enzimleriyle ilgili çalışmalara kıyasla en çok çalışılan protein olan PARP-1 enziminin birçok dokudaki varlığı kanıtlanarak, poli ADP ribozilasyon mekanizmasının % 90'ını yürüttüğü bilinmektedir (19,60).



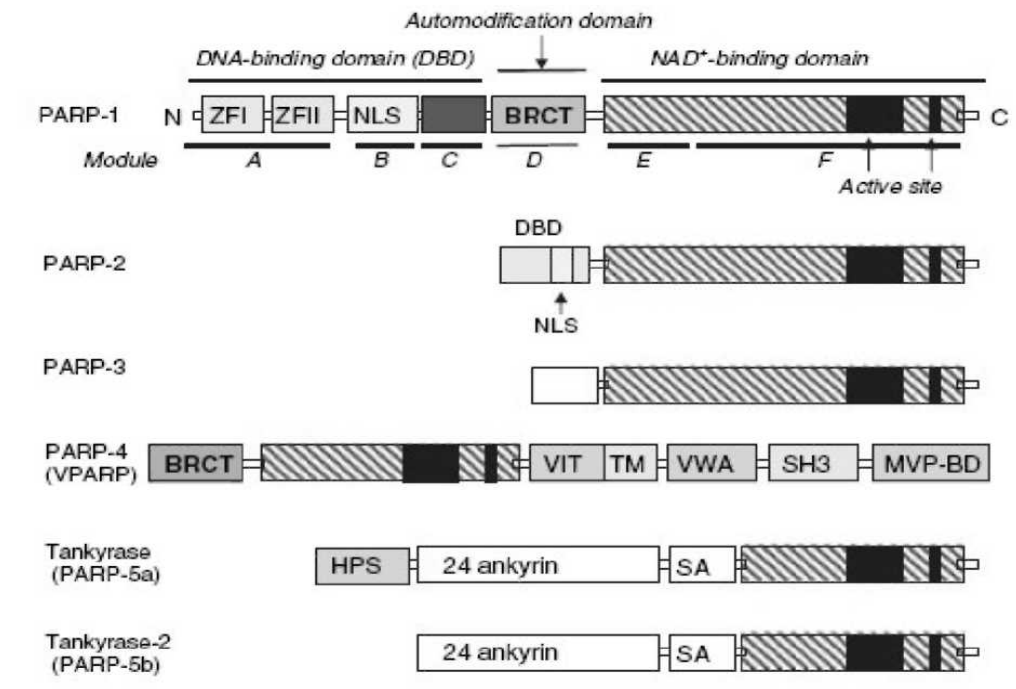
Şekil 5. PARP'in yapısal bölgeleri ve ayrılmış olan parçaları (57).

A) DNA bağlayıcı bölgesi, nukleozom bağlanması ve nuklear lokalizasyon segmenti (NLS) için çinko parmaklar (F1-F3) içerir; otomodifikasyon bölgesi Lizin amino asidi ile bağlanması aracılığıyla ADP riboz (ADPR) polimerlerinin eklenmesinden sorumludur ve katalitik bölge PARP imzası ve PARP enzimatik aktivitesine sahiptir.

B) Üzerinde ayrılma bölgesi ile tam boy PARP molekülü.

C) Kaspaz tarafından PARP'ın parçalara ayrılması (61).

### 2.5.2.1. PARP-1 Proteini



Şekil 6. PARP protein ailesi üyelerinin yapısal organizasyonu.

BRCT, BRCA1 C-Terminal; DBD, DNA-bağlanma domeyni; HPS, His-Pro-Ser'den zengin domeyn; MVP-BD, majör Vault bağlanma domeyni; VIT, vault protein interalfatripsin domeyni; VWA, von Willebrand faktör tip A domeyni; ZF, çinko parmak; TM, transmembran domeyni; SAM, steril a-modülü; SH3, src homolojibölgesi (19).

PARP-1 yüksek oranda korunmuş nukleer bir proteindir. Yapısında A'dan F'ye modül olarak ayrılabilen karakteristik 3 domeyn taşımaktadır (Şekil 6). Bu bölgeler; N terminal ucunda yer alan 42 kDa'luk "DNA bağlayıcı domeyni", merkezde bulunan 16 kDa'luk "Otomodifikasyon domeyni" ve C terminal ucunda yer alan 55 kDa'luk "Katalitik domeyni"dir (60).

PARP-1'in DNA bağlayıcı domeyni, yapısında bulunan 2 çinko parmak yapısı sayesinde tekli yada çiftli DNA zincir kırıklarına yüksek afinite göstererek bağlanmaktadır. PARP-1'in otomodifikasyon domeyni "glutamik asit rezidüleri"nce zengindir. Bu rezidüler poli ADP ribozilasyonun gerçekleştiği esas yerlerdir. 55 kDa'luk C-terminal katalitik domeyn, NAD<sup>+</sup> bağlanma, ADP-ribozil transferi ve dallanma reaksiyonları için gerekli rezidüleri içermektedir (19,60).

PARP-1 normalde ekspre olduğunda, iyonize radyasyon, alkile ajanlar ve oksidanlar tarafından indüklenen DNA hasarına karşı en uygun ve etkili hücresel yanıt olan poli ADP ribozilasyonu gerçekleştirmektedir. PARP-1'in etkileşimde bulunduğu bazı ortakları arasında, PARP-2 ve PARP-3 gibi PARP ailesinin diğer üyeleri de bulunabilmektedir (62).

#### **2.5.2.2. PARP Ailesinin Diğer Üyeleri**

Farklı hücre hatlarıyla yapılan araştırmalar sonucunda 4 yeni PARP daha tanımlanmıştır. Bunlar; PARP-2, PARP-3, PARP-4 (vPARP) ve PARP-5 (Tankiraz)'dir. Şaşırtıcı olarak, bu proteinler arasındaki homoloji PARP-1'in C-terminal bölgesinin yarısıyla sınırlıdır ve bu bölgeye aynı zamanda "PARP homoloji domeyni" de denmektedir (63).

**PARP-2'nin** katalitik domeyni PARP-1 ile %69 benzerlik göstermektedir. PARP-2, PARP-1 ile etkileşim halindedir. SSBR (single strand base repair) ve BER (base excision repair) gibi DNA kırık tamiri ilişkili yolaklarda rolleri vardır. PARP-1 ve PARP-2, kinetokor yapısı ve mitotik iğ kontrol noktalarından sorumlu proteinlerle de etkileşmektedirler (64).

DNA hasarına karşı oluşturulan hücresel yanıtta PARP-2'nin rolü, PARP-2 geni susturulmuş fare modellerinin oluşturulması sayesinde araştırılmıştır. Bu modele, alkile edici ajan olarak N-metil N-nitrozüre (MNU) verilmiş ve PARP-2 bulunmayan hücrelerde DNA zincir kırıklarının ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bu sonuç PARP-1 bulunmayan farelerde gözlenen sonuçla aynıdır. Böylece PARP-2, ADP riboz polimerleri sentezlemek için az kapasiteye sahip olmasına rağmen, SSBR yolaklarında aktif bir oyuncudur (19,59).

**PARP-3**, hücre siklusu boyunca kardeş sentriollerde yerleşen sentrozomun öz (core) bileşeni olarak tanımlanmıştır. Bütün PARP'lar içinde, sadece 54 rezidüsü bulunan, en küçük N-terminal domeyni içeren ve sentrozomal lokalizasyondan sorumlu tek protein PARP-3'tür. PARP inhibitörü 3-ABA ile kesinlikle inhibe edilememektedir (19,65).

**PARP-4 (vPARP)**, bu enzim PARP süper ailesinin 192,6 kDa'luk en büyük üyesidir ve "vault" partiküllerle ilişkili olduğu keşfedilmiştir. PARP-4, majör vault protein (MVP) ve telomeraz ilişkili protein (TEP-1) olarak bilinen ve evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş olan iki proteinle ve transle edilmemiş vRNA (vault RNA) ile ilişkili, sitoplazmik bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksidir. Bu alışılmamış partiküllerin fonksiyonu bilinmemektedir. Ancak, hücresel taşımada rolleri olabileceği düşünülmektedir. PARP-4 aynı zamanda nükleer porlarda lokalizedir ve mitoz sırasında mitotik iğ ile ilişkilidir (66).

**Tankiraz-1** (TRF1-etkileşimli, ankyrin-ilişkili ADP-riboz polimeraz), (**PARP-5a**), insan telomerik proteini TRF-1'in ortağı olarak tanımlanmıştır. PARP enzimatik aktivitesine sahip olan ve PARP-1 ile homoloji gösteren en küçük domeyni içermektedir (67).

Diğer bir Tankiraz (**PARP-5b** veya **Tankiraz-2**) daha önceden keşfedilen ayrı bir gen ile kodlanmaktadır. Bu proteinin sekansı, Tankiraz-1 ile % 85 benzerlik göstermektedir ancak HPS motifi bulunmamaktadır. Tankiraz-1 ve -2; telomer homeostazı ve artan vezikül alışverişini düzenlemektedir. (59,62).

### 2.5.2.3. Poli ADP Riboz Glikohidrolaz (PARG)

ADP riboz polimerlerinin sentezini katalizleyen farklı enzimleri kodlayan bazı genler bilinse de, ADP riboz polimerlerinin serbest ADP riboz'a hidrolizini katalizleyen enzimi kodlayan tek bir gen vardır: PARG geni. PARG, hem glikozidik hem de ekzoglikozidik aktiviteye sahip olan bir enzimdir ve ADP riboz polimerlerinin serbest ADP riboz'a hidrolizini katalize ettiği bilinen tek proteindir. PARG, apoptoz sırasında önemi olan kullanılan kaspaz-3 yarıklanma bölgesini de içermektedir. Sonuç olarak; ADP riboz molekülleri PARP ve PARG'nin birlikte etkisi ile canlı hücrelerdeki dinamik döngüsüne devam etmektedir (59,60).

### 2.5.3. Poli ADP-Ribozilasyonun Biyolojik Fonksiyonları

Poli ADP ribozilasyonun biyolojik fonksiyonları dokuz ana başlık altında özetlenebilir:

1. DNA tamiri ve genomik stabilitenin korunması,
2. Transkripsiyonun düzenlenmesi,
3. Apoptozdaki rolü,
4. Hücre içi aşırı NAD<sup>+</sup> tüketimi sonucunda nekrotik hücre ölümü ve patolojik durumlardaki rolü,
5. Sentromer fonksiyonlarının düzenlenmesi,
6. Telomer uzunluğunun düzenlenmesi,
7. Protein degradasyonunun düzenlenmesi,
8. Sentrozomal fonksiyon,
9. Endozomal vezikül alışverişinin düzenlenmesi (60).

#### 2.5.3.1. DNA Tamiri ve Genomik Stabilitenin Korunması

PARP enzimlerin katalitik birincil işlevi ADP-riboz gruplarını aspartat ve karboksi-terminal lizin protein rezidülerine transfer etmektir. PARP 200 kadar ADP riboz gruplarının eklenmesi ile doğrusal veya dallanmış şekilde alıcı proteinlerin a.a dizilerini uzatabilirler (68).

PARP'ın en önemli rolü, özellikle tek dizi kırıklarının çözümünde olduğu gibi DNA tamir kapasitesidir. PARP 1 ve 2'nin baz ekzisyon tamirinde fonksiyonel olduğu gösterilmiştir. PARP-1/PARP-2 DNA kırıkları ile aktive olur ve diğer ana DNA tamir proteinleri ve DNA bağlayıcı proteinler ile birlikte hasarlı DNA dizisini tamir etmek için etkileşim içindedir. DNA hasarının erken evresinde sıcaklık şok proteini, PAR oluşumu için ek etkinleştirme sağlayabilir (69,70).

PARP sadece DNA hasar onarımında sinyal yolağının bir parçası olarak görev yapmaz, onarım sürecine de dahil olur. Özellikle PARP-1'in DNA kırık uçlarına bağlanması, nukleazlar tarafından yıkılmasını engelleyebilir (71).

Son zamanlarda ortaya konulan bir model, DNA hasar onarımına PARP'ın katılımının feedback mekanizmaları tarafından düzenlendiğini ileri sürmektedir (72). PARP-1 ilk olarak DNA kırık bölgesi için gereklidir ve DNA bağlayıcı etki alanı aracılığıyla bu bölgeye bağlanır. PARP moleküllerinin birikimi daha sonra diğer tamir faktörlerini biraraya toplayan bir sinyal yaratır ve PARP'ın pozitif feedback mekanizmasını biçimlendirir. PARP faaliyeti, hücre ölümünü ve aşırı PAR birikimini engelleyen negatif feedback mekanizmasına neden olur (73).

Yapılan son çalışmalar bazı yeni ve ilgi çekici görüşler de ortaya çıkarmıştır. PARP-1, DNA tamiri ve genomik stabilitenin korunması ve prematür yaşlanmadan sorumlu protein olan Werner Sendromu proteininin etkileşim ortağı olarak bilinmektedir. Son zamanlarda, PARP-1'in Werner Sendromu proteininin hem ekzonükleaz hem de helikaz aktivitesini düzenlediği gösterilmiş ve PARP-1 etkisindeki olası mekanizma ortaya konmuştur (74,75).

Öne sürülen bir diğer senaryo ise, poli ADP riboz'un pirofosforolitik yarıklanmasından elde edilen ATP'nin, BER sürecinde DNA ligasyon basamakları için kullanılmasıdır. Bu nedenle canlı hücrelerde meydana gelen BER'in kısa-parçalı ve uzun-parçalı yolaklar arasında verdiği kararın, ATP'nin varlığına bağlı olduğu ortaya çıkmaktadır. Enerji açlığının olduğu durumlarda uzun-parçalı yolak tercih edilmesinin sebebi, bu yolağın poli ADP riboz'dan ATP oluşumunun artmasını sağlamasıdır. Dolayısıyla, DNA hasarı indüklü poli ADP ribozilasyon, BER'in klasik rolünün ötesinde bir durum sergilemektedir. PARP-1 ayrıca, p53'ten bağımsız olarak çift zincir kırıklarının tamirini de düzenlemektedir (76).

### **2.5.3.2. Transkripsiyonun Düzenlenmesi**

Poli ADP ribozilasyonun, kromatin yeniden modellenmesi ile gen ekspresyonunu düzenlenmesini etkilediği uzun zamandır bilinmektedir. Ayrıca, PARP-1'in transkripsiyon faktörleri ile birçok fiziksel ve fonksiyonel etkileşimde bulunduğu da belirtilmiştir (77).



### **2.5.3.3. Sentromer Fonksiyonunun Düzenlenmesi**

Esas ve geçiş sentromer proteinlerinin her ikisi de PARP-1 ve PARP-2 ile etkileşmekte ve poli ADP ribozilasyonu devam ettirmektedir. Dolayısıyla, poli ADP ribozilasyonun temel kinetokor proteinler için düzenleyici olarak görev yaptığı düşünülmektedir. PARP-2 lokalizasyonu sentromerde göze çarparken, PARP-1 geniş sentromerik ve perisentromerik dağılım göstermektedir (78).

### **2.5.3.4. Telomer Uzunluğunun Düzenlenmesi**

Poli ADP ribozilasyon telomer uzunluğunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan araştırmalarda, PARP ailesinden Tankiraz'ların aşırı nükleer ekspresyonu ile telomerlerin uzamasını indüklediği ortaya çıkmıştır (79).

### **2.5.3.5. Protein Degredasyonunun Düzenlenmesi**

Proteozom, hücre içi proteolizin önemli bir kısmından sorumlu olan ve bütün ökaryotik hücrelerde bulunan büyük, multikatalitik bir proteazdır. Bu yapı, strese karşı oluşturulan yanıtlarda olduğu gibi, çeşitli kısa ömürlü proteinlerin fizyolojik olarak geri dönüşümünü sağlamaktadır. Otomodifiye PARP-1, oksidatif olarak hasarlı histonların seçici olarak degredasyonunu kolaylaştıran proteozomu aktive etmektedir (79).

### **2.5.3.6. Sentrozomal Fonksiyon**

Mitotik bölünmeler sırasında sentrozom fonksiyonunun doğru bir şekilde gerçekleşmesi, kardeş hücrelere kromozomların tam ve doğru şekilde aktarılmasında oldukça önemlidir. Hem PARP-1 hem de PARP-3'ün sentrozomlarda stabil bir yapı oluşturdukları belirlenmiştir (65).

### **2.5.3.7. Endozomal Vezikül Alışverişinin Düzenlenmesi**

Miyosit ve adipositlerdeki endositotik veziküller, Glut4 ve IRAP gibi glukoz taşıyıcıları içermektedir. Golgi ve plazma membranındaki Glut4 vezikülleri arasında gerçekleşen geri dönüşümlü Glut4 translokasyonu, insülinin glukoz kullanımını düzenlemesine yardım etmektedir. Tankiraz burada önemli bir insülin sinyal hedefi

olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, Tankiraz Golgi'deki Glut4 depo veziküllerine yerleşmiş IRAP ile etkileşmektedir (80).

### 2.5.3.8. Apoptozdaki Rolü

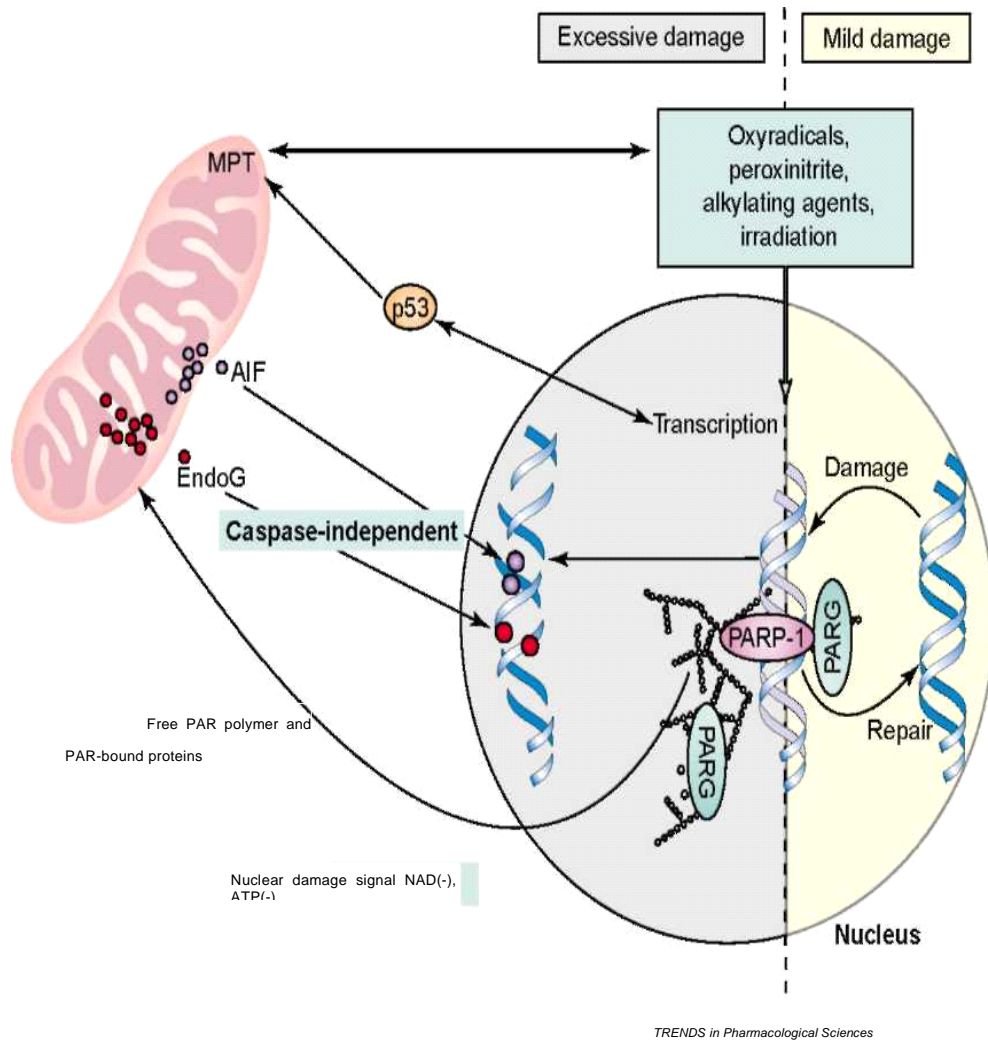
PARP-1'in hızlı aktivasyonu nedeniyle PARP-1 aktivasyon yoğunluğu DNA hasarı sonrasında hücrenin öleceğinin ya da yaşayacağını düzenlenmesinde önemli rol oynayabilir. PARP-1'in bir nick sensor olarak aktivasyonu hücresel tamiri, transkripsiyonu, DNA replikasyonunu ve diğer hücresel aktiviteleri düzenler. Ancak aşırı DNA hasarı büyük dallı PAR polimerleri üretir ve hücre ölüm programlarının aktivasyonuna yol açar (47).

PARP-1'in nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) içeren domeyninden, kaspaz-3 ve -7 tarafından yarıklanması sonucunda 24 ve 89 kDa'luk iki adet fragment oluşturmaktadır ve bu nedenle yarıklanmış PARP (cPARP) apoptozun biyokimyasal bir belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır. DNA zincir kırıkları varlığında kaspaz ilişkili PARP-1 yarıklanmasının, PARP-1'in katalitik aktivitesinin kaybına neden olduğu düşünülmektedir. Apoptozun erken evrelerinde gözlenen aşırı PAR oluşumu, PARP ailesi proteinlerinin bu süreçte görevli olduğunu göstermektedir. Ayrıca PARP-1 aktivasyonu, apoptoz indükleyici faktörün (AIF) mitokondriden nükleusa translokasyonundan sorumludur ve AIF, PARP-1 bağımlı hücre ölümünde gereklidir. Bilindiği gibi, AIF tarafından indüklenen apoptotik yolak kaspaz bağımsızdır. Dolayısıyla PARP-1 aktivasyonu; hem kaspaz bağımlı hem de AIF-indüklü apoptotik yollarda rol oynayabilir (47).

PARP-1 DNA hasarı sonrası çoğunlukla uzun dallı zincirli PAR polimerleri üretir. Overaktivasyon PARP-1 nükleer sinyali başlatır, mitokondride yayılan bu sinyal AIF'in serbest bırakılmasını tetikler. Sonra AIF mitokondriden nükleusa gelir, periferal kromatin yoğunlaşmasını indükler, DNA'nın büyük ölçekli fragmentasyonu ve nihayet sitotoksiste gerçekleşir (47).

PARP-1 aracılıklı hücre ölümünün en yaygın hipotezi; PARP-1'in aşırı aktivasyonunun gözlemlenmesini kapsar ve ADP ribozilasyonu masif NAD tüketimine ve hızlı hücresel NAD ve ATP kaybına yol açar. Bu durumda suicid hipotezi oluşur.

AİF translokasyonu PARP-1 aktivasyonu, sitokrom-c salınımı ve caspase aktivasyonu sonrasında hızlı bir şekilde gerçekleşir. Geniş spektrumlu caspase inhibitörleri PARP-1 aracılıklı hücre ölümünü engellemez. Buna karşılık AİF için nötralize antikor yapmak PARP-1 bağımlı hücre ölümünü engeller. Birlikte ele alındığında bu sonuçlar göstermektedir ki, PARP-1 tarafından başlatılan hücre ölüm programında essansiyel efektör AİF dir (Şekil 7) (47).



TRENDS in Pharmacological Sciences

### Şekil 7. Poli (ADP-riboz) polimeraz aracılıklı hücre ölümünde kaspas bağımsız hücre ölümü.

Hücre ölümü kaspas bağımsız oluşabilir. Örneğin, kaspas kaskadı inhibe edildiğinde nekroza bağlı hücre ölümünü death-domain reseptörler indükler. APAF-1 yoksunu farelerde hücre ölümünü p53 indükler. PARP-1 bağımlı hücre ölümünde toksik etkilerle PARP-1 in aşırı aktivasyonu, NAD ve ATP nin azalmasıyla çekirdek hücre ölüm sinyallerini başlatır ve AİF in mitokondriden nükleusa taşınmasına neden olur. PARP-1 aktivasyonuna bağlı AİF translokasyonu, PARP sinyallerinin AİF in mitokondriden salınmasıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Reaktif oksijen radikalleri ve diğer DNA hasar ajanları mitokondrial geçirgenliği(MPT) aktive edebilir. Bu durum AİF in salınmasına neden olur. Feed-forward mekanizmasıyla MPT mitokondriden aşırı ROS üretir. PARP-1 aracılıklı hücre ölümünde ne zaman endonükleaz-G(endo-G) nin translokasyonu bilinmemektedir. Fakat AİF ve endoG nin kaspas bağımsız hücre ölümünde birlikte rol alacağı olasıdır. PARG, PAR polimerlerini parçalayarak serbest PAR polimerleri ve ADP-ribozları üretir. Orta düzeyde DNA hasarı DNA tamir mekanizmasını aktive eder. Bununla birlikte masif DNA hasarına neden olan ağır toksik etkiler PARP-1 aşırı aktivasyonu ve hücre ölümüne neden olur (47).

### **2.5.3.9. Hücre İçi Aşırı NAD<sup>+</sup> Tüketimi Sonucunda Nekrotik Hücre Ölümü ve Patolojik Durumlardaki Rolü**

Bu mekanizmanın, iskemi reperfüzyon hasarı ve inflamatuvar süreçlerle ilişkili patofizyolojik durumların büyük çoğunluğunda önemli bir rol oynadığı son yıllarda gösterilmiştir. PARP-1'in aşırı aktivasyonu ile aşırı tüketilen NAD<sup>+</sup> dolayısıyla tetiklenen mitokondriyal disfonksiyon ve ardından meydana gelen hücre ölümü, PARP'ın aşırı aktivitesinde ortaya çıkan önemli bir olaydır. Bu mekanizmaya dayanarak günümüzde bazı hastalıkların tedavisinde, PARP inhibitörlerinin sunacağı terapötik yaklaşımlar geliştirilmektedir (60).

### **2.5.4. PARP-1 ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişki**

PARP'ın farklı koşullar altındaki rolü, DNA hasarına maruz bırakılan hücreler ile en iyi şekilde açıklanmaktadır. Hafif genotoksik zarar PARP aktivasyonunu indükleyerek, DNA tamirini ve hücrenin canlı kalmasını kolaylaştırmaktadır. Orta derecede hücre hasarında, tamir edilemez derecede DNA hasarı bulunan hücreler apoptoz yolağı aktive edilerek elimine edilmektedir. Şiddetli DNA hasarının olduğu durumda ise, PARP aşırı aktive olmakta ve hücre içi enerji metabolizmasını çökerterek hücreyi nekroza sürüklemektedir. Genellikle ağır oksidatif ve nitrosatif stresle tetiklenen büyük DNA kırıkları PARP'ın aşırı aktivasyonuna neden olurken, ardından PARP'ın substratı olan NAD<sup>+</sup>'in ve dolayısıyla ATP'nin de tükenişi gerçekleşmektedir. Bu enerji çöküşü hücre disfonksiyonuna neden olmakta ve nekrozla sona ermektedir (Şekil 8). PARP'ın apoptoz ve nekroz arasında moleküler anahtar olarak rol oynadığı yapılan çeşitli deneylerle kanıtlanmıştır (19,60).

### **2.5.5. PARP-1 ve Spermatogenez Arasındaki İlişki**

Germ hücreleri biyolojik veya kimyasal gerilim ile karşı karşıya kaldıkları zaman oksidatif stres gibi koşullar ortaya çıkar. Oksidatif stres gelişmekte olan sperm ile ilgili proteinlerin modifikasyonuna ve seminifer tübüllerden spermin premature halde salınmasına neden olabilir. Oksidatif stresin en önemli etkisi DNA hasarına neden olmaktır. PARP, oksidatif stresin sonucu olarak hücrede oluşabilen değişikliklerin tümüne yanıt verir (81).

Apoptoz, memeli sperminin normal süreçlerinden biridir. Spermatogenezin tüm aşamalarında olgun sperm üretmek ve anormal spermi ortadan kaldırmak için kendiliğinden düzenlenir. Spermatogenez sırasında çok sayıda sperm ölür ve ortadan kalkar. Bu Sertoli hücrelerinin sınırlı sayıda germ hücrelerinin korunmasına ve aşırı sayıdaki germ hücrelerinin ortadan kaldırılmasına neden olan yeteneğine bağlı olabilir. Ayrıca apoptozun, geçmişte bazı hücrel kontrol noktalarını devreye sokmayan hücreleri yok etme işlevi olabilir. Daha da önemlisi genetik anormalliklerin döllere geçmiş olmasını engellemek için apoptoz gerekli olabilir (82).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, PARP-1, 2 ve 9'un dahil olduğu çeşitli PARP izoformları ejakulat spermde tespit edilmiştir. Olgunlaşmamış sperm ile karşılaştırıldığında olgun spermde PARP-1, 2 ve 9'un arttığı görüldü. Fertil erkeklerden alınan ejakulat spermde daha yüksek düzeyde PARP-1, 2 ve 9'un görülmüş olması, infertil erkeklerle karşılaştırıldığı zaman, PARP ve erkek infertilitesi arasında olası bir ilişkiyi gösterir. PARP'ın inhibitörü olan 3-aminobenzamid (3-ABA) varlığında kimyasal ve oksidatif stresin indüklediği apoptozun yaklaşık olarak 2 kat arttığı rapor edilmiştir. Bundan anlaşılıyor ki PARP, oksidatif ve kimyasal hasara maruz kalan spermin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. (82).

İnsanda testis belirleyici faktörün (TDF), diğer memelilerde ise testis belirleyici Y lokusunun (Tdy) en önemli anahtar düzenleyicisi olan SRY/Sry (Sex-determining region Y), embriyolojik gelişim sürecinde testis oluşumu ve farklılaşmasından sorumludur (19).

In vivo ve in vitro koşullarda, PARP-1'in SRY/Sry ile ilişkili bir protein olduğu gösterilmiştir. PARP-1'in ve SRY'nin, cinsiyet belirlenmesi sırasında fetal gonadlarda gelişen Sertoli hücrelerinin nükleusunda birlikte lokalize olduğu ortaya konmuştur. Gonadogenez sırasında, PARP-1, SRY'nin hedef genlerini düzenler. PARP-1 knock-out farelerle yapılan çalışmaların sonucunda, PARP-1 proteinin SRY'nin alt yollarında görevli genlerinin ekspresyonlarını değiştirdiği ve dolayısıyla PARP-1'in cinsiyet belirlenmesinde Sry düzenleyici fonksiyonları olduğu ortaya çıkmıştır (83).

Son zamanlarda, testiste PARP ailesi proteinleri üzerine yapılan çalışmaların sayısı oldukça artmaktadır. Özellikle PARP-1 ve PARP-2'nin insan ve sıçan testisindeki varlığı, hangi hücre tiplerinde ekspre olduğu ve patolojik durumlardaki ekspresyon şiddeti en çok tartışılan konular arasındadır.

Yapılan çalışmalarda PARP'ın spermatogonya ve pakiten spermatosit nükleusunda yoğun olarak lokalize olduğu gösterilmiştir. İnsan testis örnekleriyle yapılan çalışmalarda ise, PARP-1 ve PAR aktivitesi esasen testiküler germ hücrelerinde lokalize iken, somatik testiküler hücrelerde PARP aktivitesi mevcut değildir (84).

DNA tamirinden sorumlu proteinler olan PARP'ların germinal hücrelerdeki varlığı oldukça dikkat çekicidir. Germinal hücrelerin mayoz bölünmelerdeki olaylar tarafından şekillendiği bilinmektedir: (1) DNA replikasyonu spermatogonyada ve mayozdan önce primer spermatositlerde meydana gelir, (2) Spermatogonya, spermatositler ve erken spoermatidlerin DNA transkripsiyonu aktiftir, ancak geç spermatidler ve spermatozoanın tamamı inaktiftir, (3) DNA kırıklarının oluşması ve tamiri arasında geçen sürenin düzenlenmesi primer spermatositlerde meydana gelir, (4) Geç spermatidler nükleer kondenzasyonunun son aşamasından önce kendi DNA hasarlarını tamir edebilirler. Bu aşamalarda meydana gelen hasarların fark edilmesi ve tamirinde PARP'ların, özellikle PARP-1 ve PARP-2'nin, önemli rolleri olduğu ortaya çıkmıştır. PARP-1 ve PARP-2'nin sıçan primer spermatositlerinde yüksek oranda ekspre olduğu bilinmektedir. Ayrıca spermatogenezin özgün evrelerinde PARP'ların rolü olduğuna dair kanıtlar vardır (85).

Spermatogenezde, birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasında DNA çift zincir kırıkları meydana gelmektedir. Oluşan bu kırıklar, genetik farklılığı ve kromozom ayrışmasını doğru gerçekleştirmek üzere tamir edilmektedir. Diğer bir yandan, farklılaşan spermatidlerde kromatinin sıkı paketlenmesi sırasında (kondenzasyon) DNA kırıkları ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, PARP-1'in ve PAR polimerinin; kalıcı ve devamlı ekspresyonu ve erkek germ hücrelerindeki subsellüler lokalizasyonu, insan germ hücre farklılaşmasında poli-ADP-ribozilasyon için anahtar rolü oynamaktadır. PARP-1 ve PARP-2 enzimleri post-mayotik hücrelerde ekspresyonlarını kaybeder, dolayısıyla PARP-1 geni spermde kapalıdır (84,85).

Bu bulgular, genomik bütünlüğün gardiyanı olarak görev yapan bu proteinleri germinal hücre farklılaşmasının mayotik bölünme gibi önemli basamaklarına yerleştirdiğini göstermektedir. Mayoz bölünme sürecinde, DNA tamir enzimlerinin memeli spermatogenezinde belirgin bir önemi vardır. Poli ADP ribozilasyonun, hem DNA tamir mekanizmalarında hem de epigenetik bilgiye katkı sağladığı dikkat çekmektedir (86).

### 3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun 23 Şubat 2010 tarih ve 09 sayılı etik kurul onayı alındıktan sonra S.D.Ü. Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda (HÜDAL) yapılmıştır. Deneysel çalışmalar için, T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'nın (Proje no: 2174- TU-10) maddi desteği alınmıştır. Histolojik incelemeler Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında, Western Blot analizi T.C. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında değerlendirilmiştir.

Çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarları'nda yetiştirilen ağırlıkları 190-220 gr arasında değişen 44 adet Wistar albino erkek rat kullanılmıştır. Ratlara çalışma boyunca standart beslenme rejimi uygulanmıştır. Denekler değişik sayılarda 5 gruba ayrılmıştır. Deneklerde anestezi, 10 mg/kg Xylazine hidroklorür ve 100 mg/kg ketamin intraperitoneal enjeksiyonu kombinasyonu ile sağlanmıştır.

#### 3.1. Deneysel Testis Torsiyonu İskemi-Reperfüzyon Modelinin Oluşturulması

Skrotal bölge povidon-iyot solüsyonu ile dezenfekte edilerek skrotal orta hat insizyonla girilerek tunika vajinalise ulaşılmıştır. Tunika vajinalis iki pens yardımıyla tutulup kaldırılarak bir makas yardımıyla keskin diseksiyonla geçilerek testise ulaşılmıştır. Testis skrotumdan doğurtularak gubernakulum makasla kesilerek testis serbestleştirilmiştir. Testis spermatik kordun longitudinal aksı boyunca saat yönünde 720 derece döndürülerek torsiyon oluşturulmuştur. Testisin tekrar detorsiyone olmaması için 4/0 ipek sütür ile dartos ve testis tunika albugineadan geçilerek testis skrotal cep içine sabitlenmiş, takiben skrotum cildi sütüre edilerek kapatılmıştır.

Gruplara göre 1, 2 ve 4 saatlik torsiyon süresi sonunda skrotal cilt sütürleri kesilerek testisi dartosa sabitleme sütürü kesilerek testis manuel olarak saat yönünün ters yönünde detorsiyone edilmiştir. Testis skrotuma yerleştirilerek skrotum cildi 4/0 ipek sütür ile kapatılmıştır. 4 saatlik reperfüzyon süresi sonunda skrotum eski



insizyon yerinden açılarak spermatik kord kesilerek her iki testise orşiektomi uygulanmıştır. Deney sonunda ratlar sakrifiye edilmiştir.

Testisler uzun eksene dik kesilerek parçalardan biri histolojik inceleme için bouin solüsyonu içine koyulmuş, diğeri western blot analizi için sıvı nitrojende dondurularak -80 °C de saklanmıştır.

### **3.2. Deney Grupları**

#### **1. Kontrol Grubu (K)**

Bu grup 7 adet rattan oluşmaktadır. Normal histolojik ve apoptozis değerlerinin incelenmesi amacıyla iki taraflı orşiektomi yapılmıştır.

#### **2. Sham Grubu (S)**

Bu grup 7 adet rattan oluşmaktadır. Sol testis explore edildikten sonra kapatılmış ve sham operasyonundan 4 saat sonra iki taraflı orşiektomi yapılmıştır.

#### **3. 1 saat torsiyon + 4 saat reperfüzyon grubu ( 1T-4R)**

Bu grup 10 adet rattan oluşmaktadır. Sol testis 1 saat süreyle 720 derece torsiyone edildikten sonra tekrar detorsiyone edilerek 4 saat reperfüzyonda bırakılmış ve sonrasında iki taraflı orşiektomi uygulanmıştır.

#### **4. 2 saat torsiyon + 4 saat reperfüzyon grubu ( 2T-4R)**

Bu grup 10 adet rattan oluşmaktadır. Sol testis 2 saat süreyle 720 derece torsiyone edildikten sonra tekrar detorsiyone edilerek 4 saat reperfüzyonda bırakılmış ve sonrasında iki taraflı orşiektomi uygulanmıştır.

#### **5. 4 saat torsiyon + 4 saat reperfüzyon grubu ( 4T-4R)**

Bu grup 10 adet rattan oluşmaktadır. Sol testis 4 saat süreyle 720 derece torsiyone edildikten sonra tekrar detorsiyone edilerek 4 saat reperfüzyonda bırakılmış ve sonrasında iki taraflı orşiektomi uygulanmıştır.

### 3.3. Johnson Tubüler Biyopsi Skoru (JTBS)

İlk kez 1970 yılında Johnsen tarafından insan seminifer tübüllerinin matürasyonunu değerlendiren bu skorlama sistemi, testisteki histolojik bulgulara odaklanmaktadır ve özellikle seminifer tübülde bulunan germ hücrelerinin matüritesini temel almaktadır. Spermatogenezin kantitatif şekilde değerlendirilmesi amacıyla JTBS kullanıldı. Bu skorlamaya göre, hasarlanmaya neden olan herhangi bir olay sonrasında, tübülün içinde hücrelerin dağılımı belli bir sıra takip ederek progresif olarak kaybolmaktadır. Öncelikle en olgun hücre tipi olan spermatozoa, sonrasında da spermatidler, spermatositler, spermatogoniumlar ve en son da sertoli hücrelerinin kaybı gerçekleşmektedir (87). Biyopsi materyalinin her kesitinde 10 adet tübül aşağıda belirtilen kriterlere göre derecelendirildi ve bulunan değerlerin ortalaması hesaplanarak Modifiye JTBS elde edildi.

**Tablo 2.** Johnson tubüler biyopsi skoru

Skor 10	Pek çok spermatozoa ile birlikte tam spermatogenez
Skor 9	Pek çok spermatozoa olmakla birlikte - disorganize spermatogenesis
Skor 8	Sadece birkaç spermatozoa (< 5-10/ tübül)
Skor 7	Spermatozoa yok, pek çok spermatid mevcut.
Skor 6	Sadece birkaç spermatid (< 5-10/ tübül)
Skor 5	Spermatid yok, pek çok spermatosit mevcut.
Skor 4	Sadece birkaç spermatosit (< 5/ tübül)
Skor 3	Sadece spermatogonia mevcut.
Skor 2	Sadece Sertoli hücresi mevcut.
Skor 1	Tübüler kesitte hiç hücre yok.

### 3.4. Histopatolojik Değerlendirme

#### 3.4.1. Fiksasyon ve Doku Takip Aşamaları

Dokular tamponlanmış Bouin fiksatifine içine alındı. Fikse olmaları için 24 saat beklendikten sonra doku takip işlemine başlandı. Pikrik asitin dokudan uzaklaşması için 4-5 kez 2'şer saat süreyle % 70'lik alkolde yıkanan dokular sonrasında yükselen derecelerdeki alkollerden (Merck) geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra şeffaflaşmaları için ksilol (Merck) içerisinde bekletildi. Gömme işlemi

için 65 °C'lik etüvde, 1:1 oranında ksilol-parafin ve parafin içerisinde bekletildikten sonra parafin bloklara gömüldü.

Takip sırasında kullanılan kimyasallar ve süreleri şu şekildedir:

<b><u>Kullanılan kimyasal</u></b>	<b><u>Süre</u></b>
%70'lik etil alkol	2 saat (4-5 tekrar)
%80'lik etil alkol	1 saat
%90'lık etil alkol	1 saat
%96'lık etil alkol	1 saat
%100'lük etil alkol	1 saat
%100'lük etil alkol	1 saat
Ksilol	2-5 dk
Ksilol-Parafin	5-10 dk
Parafin	3 saat

Elde edilen parafin bloklardan Leica marka kızaklı mikrotomda 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler rutin histolojik incelemeler için normal lamlara, immünohistokimyasal incelemeler için Poly-L-lysine kaplı lamlara (Thermo Scientific) alındı. Rutin histolojik incelemeler için dokular Hematoksilen-Eosin boya ile boyandı. Elde edilen dokular ışık mikroskobu ile incelenerek, oküler mikrometre ile her biyopsi spesmeninde rastgele on adet yuvarlak semifer tubül değerlendirilip Modifiye Johnson Tubüler Biyopsi Skoru ortalaması hesaplandı.

İmmünohistokimya için aşağıdaki protokol uygulandı.

### **3.4.2. İmmünohistokimya Protokolü**

İmmünohistokimya için lizinli lamlara alınan dokular deparafinizasyon için etüvde 15-60 dk ısıtıldıktan sonra ksilol ve dereceli alkollerden geçirilerek hidrate edildi. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde çözünmüş % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) solüsyonunda bekletilen dokular PBS'te (Fosfat tamponlu salin) (Sigma) yıkandı. Ardından Sitrat tamponuna (Thermo Scientific) alınan dokular ısı aracılı epitop açığa çıkarma işlemi için mikrodalga fırında iki kez ısıtılıp soğutuldu ve yine PBS'de yıkandı. Kullanılacak kimyasalların birbirine karışması ve fazla

kimyasal kullanılmasının engellenmesi için bu aşamadan itibaren lamların üzerindeki doku örneklerinin çevresi hidrofobik PAP pen kalem ile çizildi ve boyama süresinde bu işlem gerektiğçe tekrarlandı. Nonspesifik antikor bağlanmasını engellemek için Ultra V Block (Thermo Scientific) solüsyonu damlatılan dokular PBS-Tween 20 (Thermo Scientific) solüsyonunda yıkandı. Bloklamanın ardından inkübasyon kabına alınan lamlar üzerine Antikor Rabbit Aktif Kaspaz-3 (Santa Cruz, sc-13847) damlatılarak +4 °C’de bir gece bekletildi.

Buraya kadarki aşamalar aşağıda özetlenmiştir:

<b><u>Kullanılan kimyasal</u></b>	<b><u>Süre</u></b>
1. Ksilol-1	→ 10 dk
2. Ksilol-2	→ 10 dk
3. % 100’lük Etil Alkol	→ 5dk
4. % 100’lük Etil Alkol	→ 5dk
5. % 90’lık Etil Alkol	→ 5dk
6. % 80’lik Etil Alkol	→ 5dk
7. % 70’lik Etil Alkol	→ 5dk
8. Distile Su	→ 5dk
9. % 3’lük H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	→ 5 - 10 dk
10. PBS’te yıkama	→ 5 dk x 3 kez
11. Sitrat tamponunda mikrodalga fırında	→ 1,5 - 2 dk
12. Oda ısısında soğutma	→ 20 dk
13. Sitrat tamponunda mikrodalga fırında	→ 1 dk
14. Oda ısısında soğutma	→ 20 dk
15. PBS’te yıkama	→ 5 dk x 3 kez
16. Ultra V Block	→ 5 - 10 dk
17. PBS-Tween 20	→ 5 dk x 3 kez
18. Primer antikor (+4 °C’de)	→ 1 gece

Boyama işleminin geri kalanına rabbit ABC Staining Kit (Santa Cruz, sc-2018) kullanılarak devam edildi. Firmanın talimatlarına göre hazırlanan solüsyonlar aşağıdaki sırayla kesitlere uygulandı:

<b><u>Kullanılan kimyasal</u></b>	<b><u>Süre</u></b>
1. PBS'de yıkama	→ 5 dk x 3 kez
2. Biotinli sekonder antikor	→ 30 dk
3. PBS'de yıkama	→ 5 dk x 3 kez
4. AB enzyme reagent	→ 30 dk
5. PBS'de yıkama	→ 5 dk x 3 kez
6. Peroksidaz substrat	→ 2 - 8 dk
7. Distile suda yıkama	→ 5 dk x 3 kez
8. Hematoksilen (Mayer)	→ 20 sn - 1 dk
9. Distile suda yıkama	→ 5 dk x 3 kez
10. % 70'lik Etil Alkol	→ 5dk
11. % 80'lik Etil Alkol	→ 5dk
12. % 90'lık Etil Alkol	→ 5dk
13. % 100'lük Etil Alkol	→ 5dk
14. Ksilol-1	→ 10 dk
15. Ksilol-2	→ 10 dk
16. Kapatma	

Entellan kullanılarak lamel ile kapatılan dokular kuruduktan sonra ışık mikroskopunda her biyopsi spesmeninde rastgele on adet yuvarlak seminfer tübül değerlendirilip tübül başına düşen apoptotik hücreler sayılarak apoptotik hücre oranı hesaplandı.

### **3.4.3. Western Blot Analizi**

Western Blot; dokudaki spesifik bir proteini analiz etmemizi sağlayan moleküler biyoloji tekniğidir. Bu teknik sayesinde dokuda bulunan bir proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu, konsantrasyon değişimleri, farklı gruplar arasındaki konsantrasyonlarının karşılaştırılması gibi durumlar araştırılabilir.

## Western Blot DR5 Deneyi

### Doku Homojenizasyonu ve Sitolik Fraksiyonun Hazırlanması

Dondurulmuş testis dokuları soğuk RIPA tamponunda çözünerek yıkandı. Yıkanan dokular kurutma kağıdı yardımıyla suyu uzaklaştırıldıktan sonra tüpe alınarak üzerlerine 1,5/1 (v/w) RIPA tamponu (%1 Igepal, CA-630, %0,05 sodyum deoksikolat, %1 SDS ve 1x proteaz inhibitörleri karışımı; 1/25 dilüsyon; Complete Protease Inhibitor Coctail; Roche) ilave edilerek 11000 rpm de 5 dakika homojenize (ultra-turrax T25) edildi. Homojenizasyonun ardından homojenatlar 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Homojenatlar daha sonra 4 °C 'de 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek pellet kısmı atıldı. Süpernatant kısmı temiz bir tüpe alınarak tekrar 13000 rpm'de 4 °C'de 30 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı alınarak western blot analizine kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Stozolik fraksiyonların protein miktarları Lowry metoduna göre belirlendi.

### Örnek yükleme

Aşağıdaki çözeltiler eppendorf tüplere eklenir:

- 1-10. örneklerin stok çözeltilerinden 2 ul alınır
- HEPES running buffer'dan 28 ul alınır
- 5X sample buffer'dan 10 ul alınır.

Aşağıda belirtilen hacimlerde yükleme yapılır:

Örnek no	Yüklenen (ul)
1	5.14
2	4.47
3	3.96
4	5.28
5	4.95
6	5.2
7	5.13
8	4.79
9	5.21
10	4.81

**Elektroforez**

**Jel:** Pierce Precise Protein Gels, %12, 12 kuyucuklu jel kullanılır.

**Marker:** Amersham High Range Rainbow MW Markers (RPN 756)

**Running buffer:**

HEPES running buffer (1X):

12.1 g Tris base

23.8 g HEPES

1 g SDS

Ultrapure su (QH<sub>2</sub>O) ile hacim 1L'ye tamamlanır. pH ~8.0 olmalıdır. pH ayarlanmaz.

**Güç kaynağı:** Labnet Power Station 200

**Sample buffer (5X):**

4 ml 1.5 M Tris-Cl pH 6.8

10 ml glycerol

5 ml  $\beta$ -mercaptoethanol

2 g SDS (sodium dodecyl sulfate / sodium lauryl sulfate)

1 ml 1% bromophenol blue

Elektroforez süresi 35 dakika ve voltaj 150 V'tur.

Elektroforez sonrasında jelin sol üst köşesi kesilerek transfer öncesinde QH<sub>2</sub>O bulunan kapta kısa bir süre bekletilir.

**Transfer**

İnvitrogen iBlot Dry Blotting System kullanılır.

3. programda (20 Volt) 13 dakika boyunca transfer gerçekleştirilir.

Burada, alttan üste doğru sandviç şeklinde bileşenler üst üste getirilir. Sırasıyla (alttan üste):

- bakır anot

- nitroselüloz membran
- jel
- filtre kağıdı (QH<sub>2</sub>O ile ıslatılır)
- bakır katot
- sünger bulunur.

Transferin ardından membranın sol üst köşesi kesilerek işaretlenir.

**Deteksiyon:**

**Blocking agent:** Santa Cruz - Blotto, Non-Fat Dry Milk (sc-2325)

**Primer antikor:** Santa Cruz - DR5 (B-D37) sc-65314

**Deteksiyon kiti:** Amersham ECL Western Blotting detection reagents and analysis system (RPN2108)

- Detection Reagent 1
- Detection Reagent 2
- Anti-Mouse IgG HRP linked whole antibody

**PBS-T:** 10X PBS, Santa Cruz (sc-24946) 100 ml

Tween 20, DAKO 0.5 ml (%0.05)

Hacim QH<sub>2</sub>O ile 1L'ye tamamlanır.

**Shaker:** Mini Rocker MR-1

**Film:** Thermo Scientific - CL-XPosure Film (#34090)

**Bloklama:** %5 Non-Fat Dry Milk (1 g tartılır) in 20 ml PBS-T

Bu çözelti membran üzerine eklenir. Shakerla 30 dk inkübe edilir.

**Yıkama:** 3x2 dk el ile çalkalama

15 dk shakerda bekletme

3x2 dk el ile çalkalama

15 dk shakerda bekletme

3x2 dk el ile çalkalama



Primer antikor: 4°C'de overnight inkubasyon, seyreltme oranı 1:200, %5 yağsız kuru süt içeren 20 ml PBS-T. Ardından yukarıdaki yıkama işlemi tekrarlanır.

Sekonder antikor: Deteksiyon kitinden Anti-Mouse IgG HRP linked whole antibody kullanılır. Membran 1 saat süreyle shakerda inkübe edilir. Seyreltme oranı 1:5000, %5 yağsız kuru süt içeren 20 ml PBS-T. Ardından yukarıdaki yıkama işlemi tekrarlanır.

Deteksiyon: Substrat çözeltisi hazırlanır: 3 ml Detection Reagent 1 + 3 ml Detection Reagent 2 = 6 ml substrat çözeltisi. Çözelti oda sıcaklığına getirilir. Membran üzerine dökülür. Kap alüminyum folyo ile kapatılır. 2 dk beklenir. Membran önce bir şeffaf dosya içine, sonra da bu şeffaf dosya exposure kaseti içerisine yerleştirilir. Karanlık odada üzerine film konur ve overnight exposure yapılır. Ertesi gün film baskı cihazında film basılarak sonuç alınır.

### **Western Blot B-actin Deneyi**

#### **Stripping**

- Membran 45 dk stripping bufferla shaker üzerinde inkübe edilir. Membranın bulunduğu kap alüminyum folyoyla sarılmış olmalıdır.

- 3x10 dk shakerda yıkama yapılır.

#### **Deteksiyon**

Deteksiyon işlemi DR5 deneyinde olduğu gibidir. Değişiklikler:

Bloklama: Önceki deneyle aynı

Primer antikor: Santa Cruz,  $\beta$ -actin (C4) (sc-47778)

4°C'de overnight inkubasyon, seyreltme oranı 1:1000, %1 yağsız kuru süt içeren 20 ml PBS-T.

Sekonder antikor: Anti-Mouse IgG HRP linked whole antibody, seyreltme oranı 1:5000, %1 yağsız kuru süt içeren 20 ml PBS-T

Deteksiyon: Exposure süresi: 45 dakika

### 3.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Tez çalışmasının verileri SPSS (ver.15.0) programına yüklendi. Niceliksel veriler ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edildi. Grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Gruplar arası fark tesbit edilen parametrelerde iki bağımsız grubun karşılaştırılmasında Mann Whitney U Testi, iki bağımlı grubun (aynı ratın sağ ve sol testisi) karşılaştırılmasında Wilcoxon Testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Makroskopik Bulgular

Bu çalışmada, sol spermatik kordlarına; 1, 2 ve 4 saatlik iskemi-reperfüzyon modeli uygulanan ratların testisleri, orşiektomi öncesinde her grup kendi arasında değerlendirilerek incelendiğinde; sol testislerin hafif ödemli, morumsu, iskemik görünümde olduğu tespit edilmiştir. 4 saatlik torsiyonlu testislerde bu bulguların daha belirgin olduğu saptanmıştır. Ancak testis torsiyon modeli aynı kişi ve yöntemle yapılmış olmasına rağmen ratlar arasında makroskopik farklı iskemik testis görünümleri saptanmıştır. Karşı testislere yapılan orşiektomi işlemi sırasında yapılan incelemede bütün grupların testislerinde makroskobik olarak herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır.



**Resim 1.** Kontrol grubu testis görüntüsü.



**Resim 2.** 1 saat torsiyon + 4 saat reperfüzyon grubu sağ ve sol testislerin görüntüsü.



**Resim 3.** 2 saat torsiyon + 4 saat reperfüzyon grubu sağ ve sol testislerin görüntüsü



**Resim 4.** 4 saat torsiyon + 4 saat reperfüzyon grubu sağ ve sol testislerin görüntüsü

#### 4.2. Johnson Tubuler Biopsi Skorları

Kruskall-Wallis Varyans Analizi kullanılarak gruplar karşılaştırıldığında JTBS açısından gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p=0,000$ ). Bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için ikili bağımsız gruplarda Mann-Whitney U testi yapılmıştır. Aynı ratın sağ ve sol testisini oluşturan gruplar bağımlı ikili grup olarak değerlendirilerek Wilcoxon testi kullanılmıştır. Saptanan bulgular şu şekildedir:

**Tablo 3.** Grupların johnson tubuler biopsi skor ortalamaları.

GRUPLAR	SOL TESTİS ORT. JTBS SKORU	SAĞ TESTİS ORT. JTBS SKORU
KONTROL	9.81±0,18	--
SHAM	9.74±0,15	--
1T-4R	9.18±0,42	9.62±0,15
2T-4R	8.66±0,85	9.46±0,16
4T-4R	7.82±0,96	9.36±0,17

*Kontrol* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

- Kontrol grubuyla sham grubu arasındaki fark anlamsız ( $p=0,391$ ),
- Kontrol grubuyla SOL 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,004$ ),
- Kontrol grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,043$ ),
- Kontrol grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),
- Kontrol grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,004$ ),
- Kontrol grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),
- Kontrol grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ )

bulunmuştur.

*Sham* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

- Sham grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamsız ( $p=0,391$ ),
- Sham grubuyla SOL 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,009$ ),
- Sham grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,276$ ),
- Sham grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),
- Sham grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,05$ ),
- Sham grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),
- Sham grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

*SOL 1T-4R* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

- SOL 1T-4R grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,004$ ),
- SOL 1T-4R grubuyla sham grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,009$ ),
- SOL 1T-4R grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,017$ ),
- SOL 1T-4R grubuyla SOL 2T-4R grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,211$ ),
- SOL 1T-4R grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasında fark var ancak

istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,149$ ),

SOL 1T-4R grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,002$ ),

SOL 1T-4R grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,340$ ) bulunmuştur.

*SAĞ 1T-4R* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

SAĞ 1T-4R grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,043$ ),

SAĞ 1T-4R grubuyla sham grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,276$ ),

SAĞ 1T-4R grubuyla SOL 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,017$ ),

SAĞ 1T-4R grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SAĞ 1T-4R grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,027$ ),

SAĞ 1T-4R grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SAĞ 1T-4R grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,004$ )

bulunmuştur.

*SOL 2T-4R* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

SOL 2T-4R grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SOL 2T-4R grubuyla sham grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SOL 2T-4R grubuyla SOL 1T-4R grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,211$ ),

SOL 2T-4R grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SOL 2T-4R grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,012$ ),

SOL 2T-4R grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,049$ ),

SOL 2T-4R grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,036$ )

bulunmuştur.

*SAĞ 2T-4R* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

SAĞ 2T-4R grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,004$ ),

SAĞ 2T-4R grubuyla sham grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0.05$ ),

SAĞ 2T-4R grubuyla SOL 1T-4R grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,149$ ),

SAĞ 2T-4R grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,027$ ),

SAĞ 2T-4R grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,012$ ),

SAĞ 2T-4R grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SAĞ 2T-4R grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,219$ ) bulunmuştur.

*SOL 4T-4R* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

SOL 4T-4R grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SOL 4T-4R grubuyla sham grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SOL 4T-4R grubuyla SOL 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,002$ ),

SOL 4T-4R grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),



SOL 4T-4R grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,049$ ),

SOL 4T-4R grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SOL 4T-4R grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,005$ )

bulunmuştur.

*SAĞ 4T-4R* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

*SAĞ 4T-4R* grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

*SAĞ 4T-4R* grubuyla sham grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

*SAĞ 4T-4R* grubuyla SOL 1T-4R grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,340$ ),

*SAĞ 4T-4R* grubuyla *SAĞ 1T-4R* grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,004$ ),

*SAĞ 4T-4R* grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,036$ ),

*SAĞ 4T-4R* grubuyla *SAĞ 2T-4R* grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,219$ ),

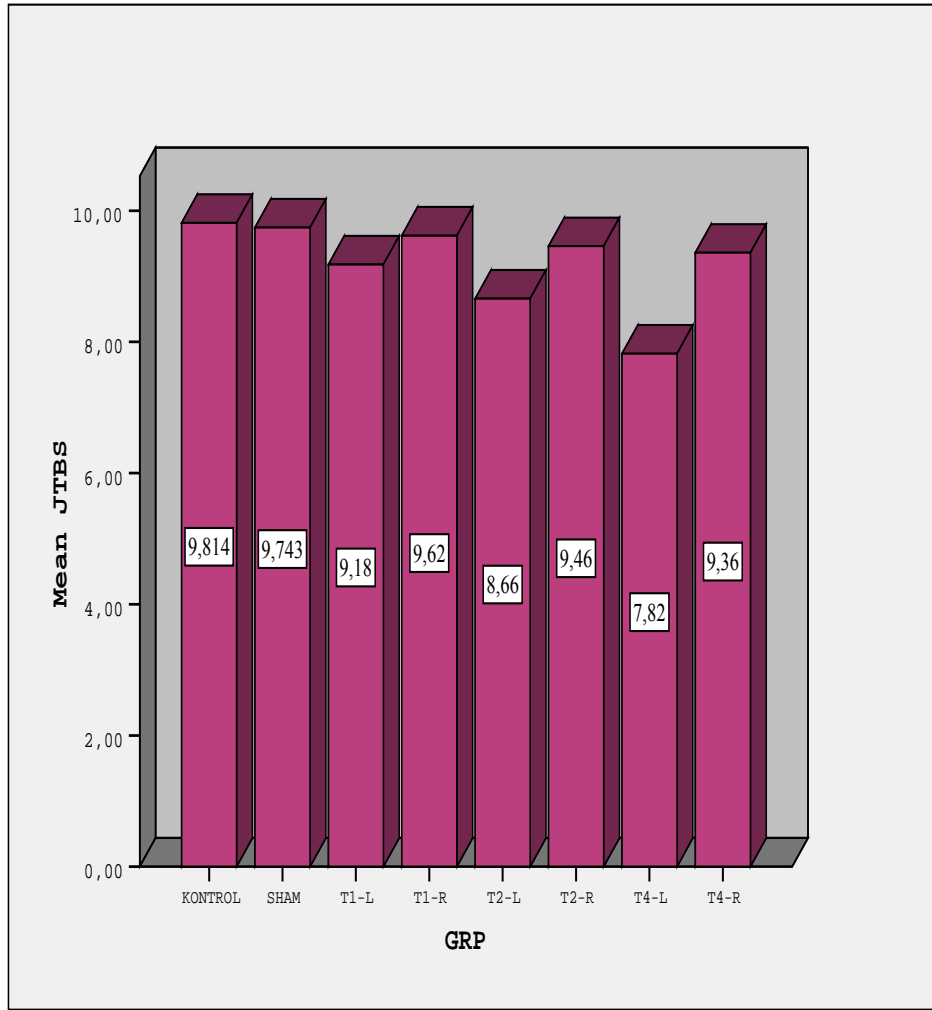
*SAĞ 4T-4R* grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,005$ ) bulunmuştur.

*SAĞ 1T-4R* ve *SAĞ 2T-4R* gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da JTBS ortalamaları sham grubundan daha düşük saptanmıştır.

SOL 2T-4R grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da JTBS ortalaması SOL 1T-4R grubundan daha düşük saptanmıştır.

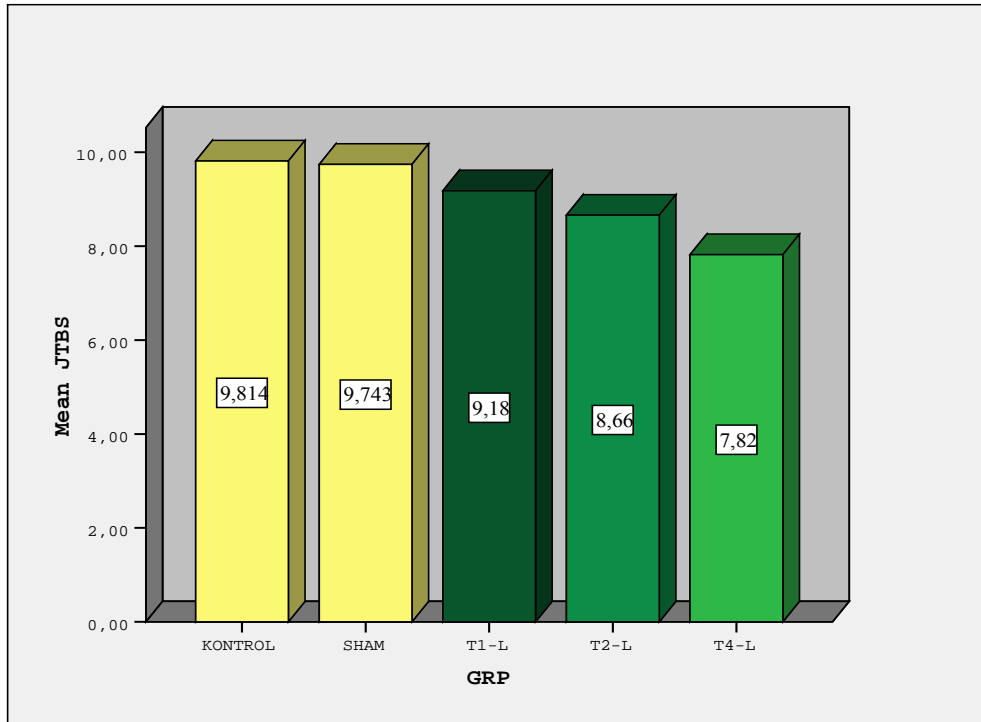
SOL 1T-4R grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da JTBS ortalamaları *SAĞ 2T-4R* ve *SAĞ 4T-4R* gruplarından daha düşük saptanmıştır.

*SAĞ 4T-4R* grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da JTBS ortalamaları *SAĞ 2T-4R* grubundan daha düşük saptanmıştır.

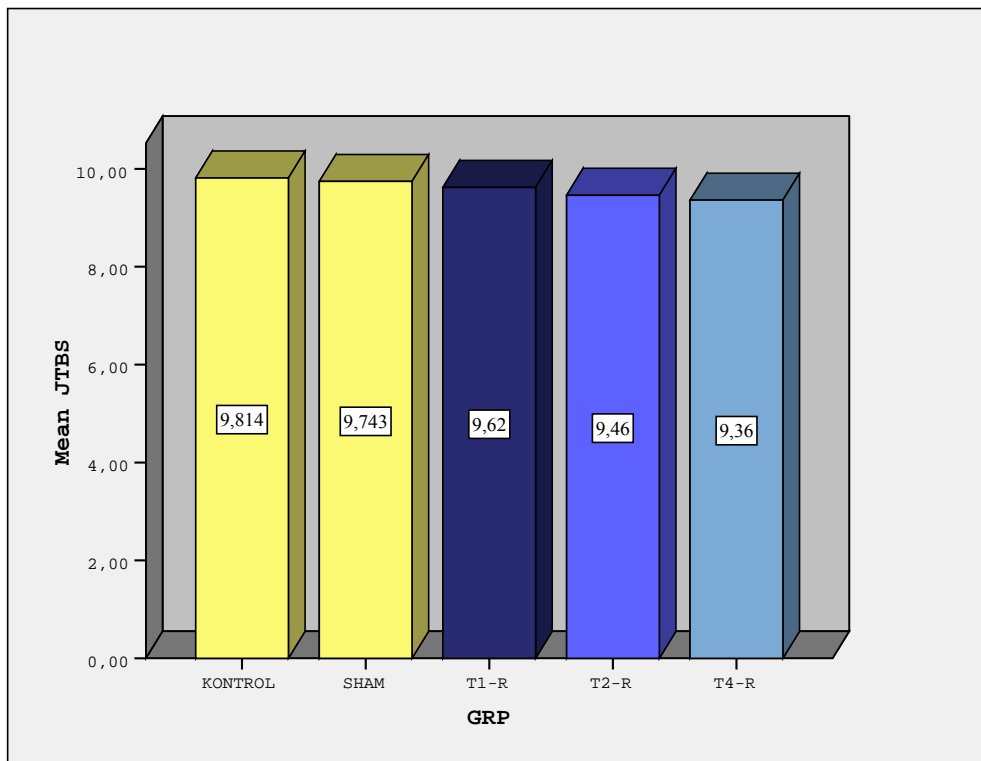


**Şekil 8.** Tüm grupların JTBS ortalamaları.

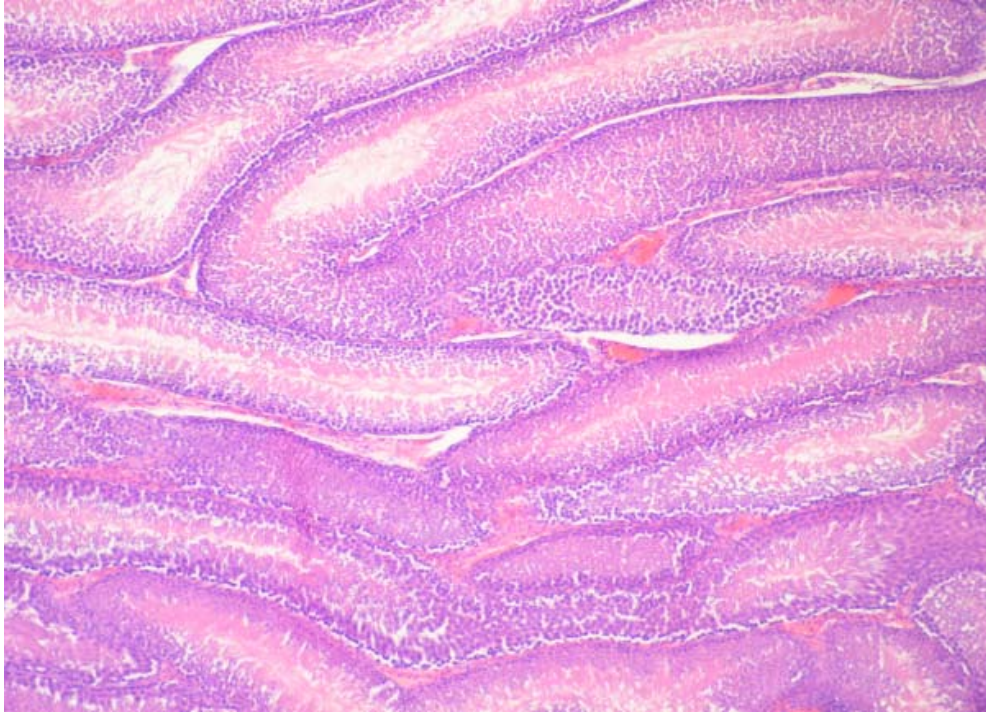
T1-L: Sol 1T-4R grubu, T1-R: Sağ 1T-4R grubu,  
 T2-L: Sol 2T-4R grubu, T2-R: Sağ 2T-4R grubu,  
 T4-L: Sol 4T-4R grubu, T4-R: Sağ 4T-4R grubu.



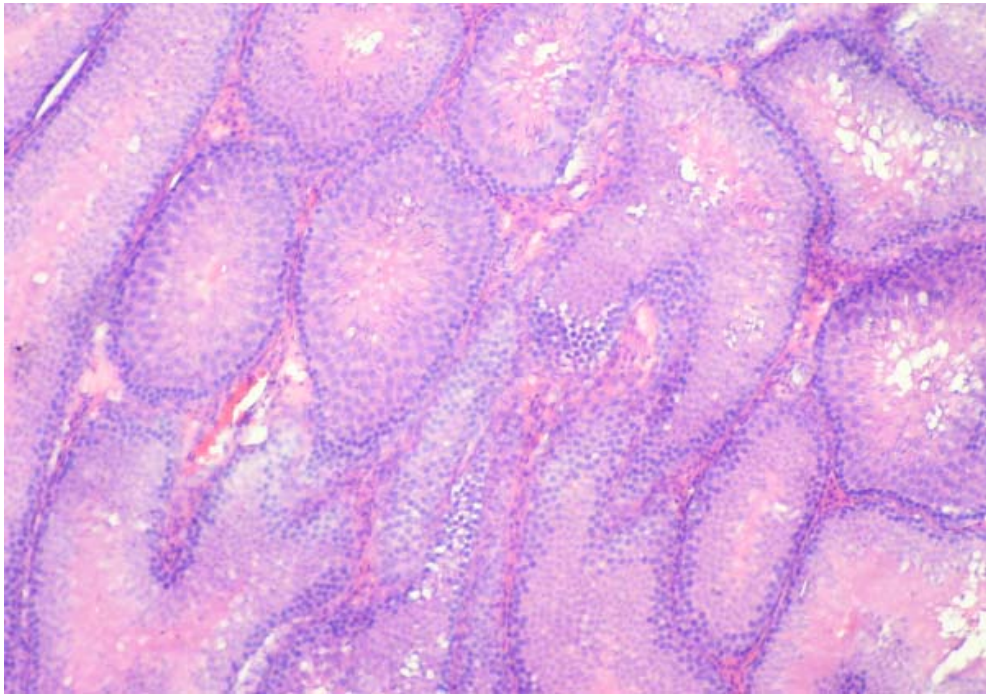
Şekil 9. Kontrol, sham ve sol testislerin JTBS ortalamaları.



Şekil 10. Kontrol, sham ve sağ testislerin JTBS ortalamaları.

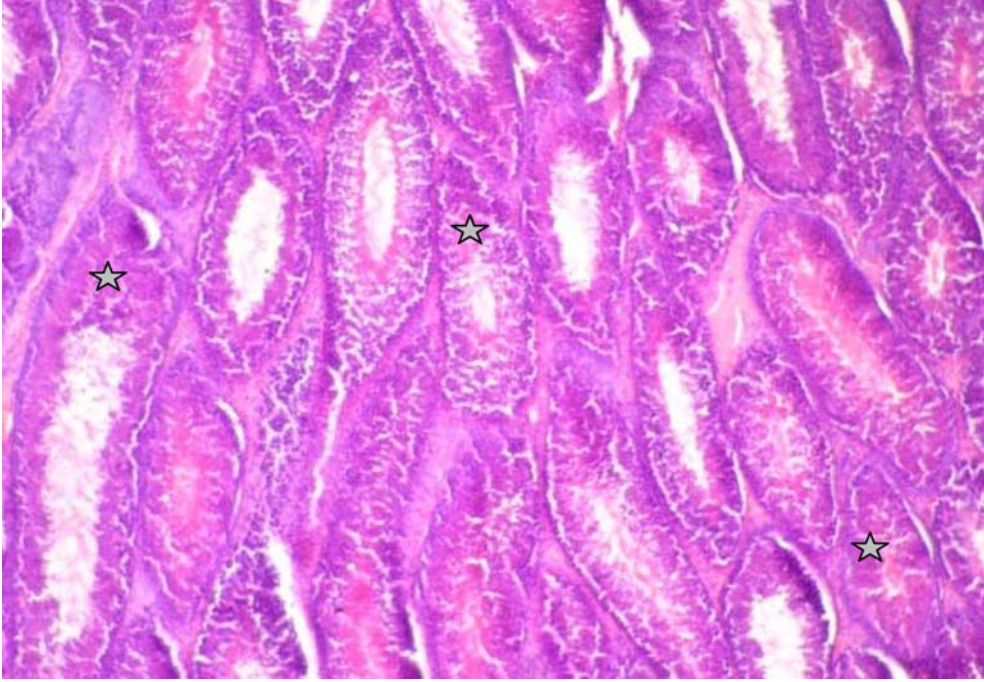


**Resim 5.** Kontrol grubuna ait sol testis kesiti. Seminifer tübüller normal görünümde. Boyama Hematoksilen-Eosin (H-E), Büyütme 200X.

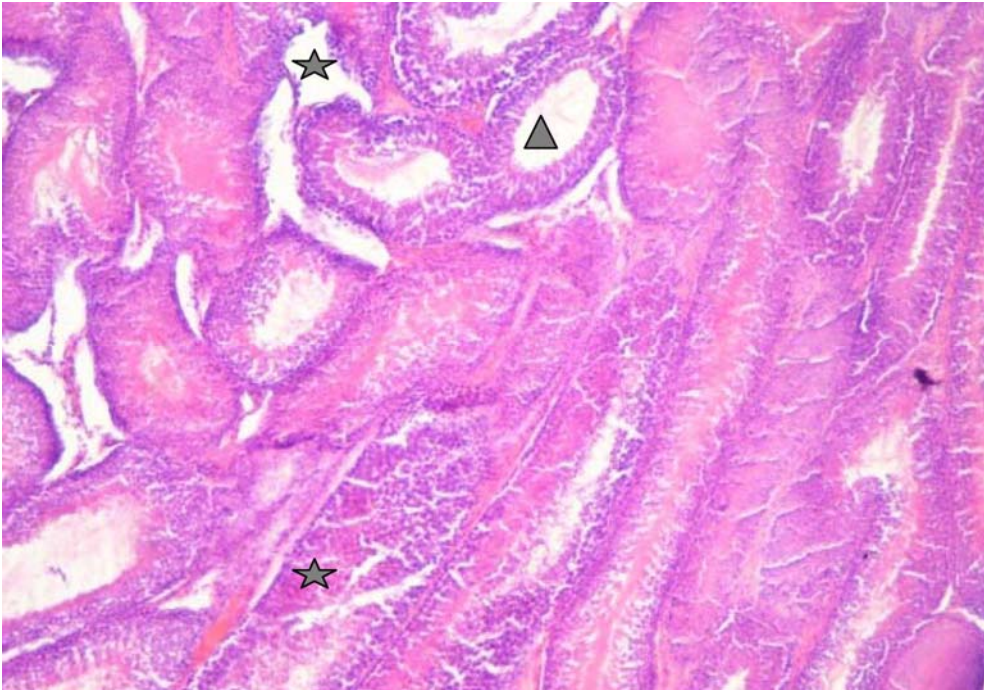


**Resim 6.** SHAM grubuna ait sol testis kesiti. Seminifer tübüller normale yakın görünümde (H-E, 200X).



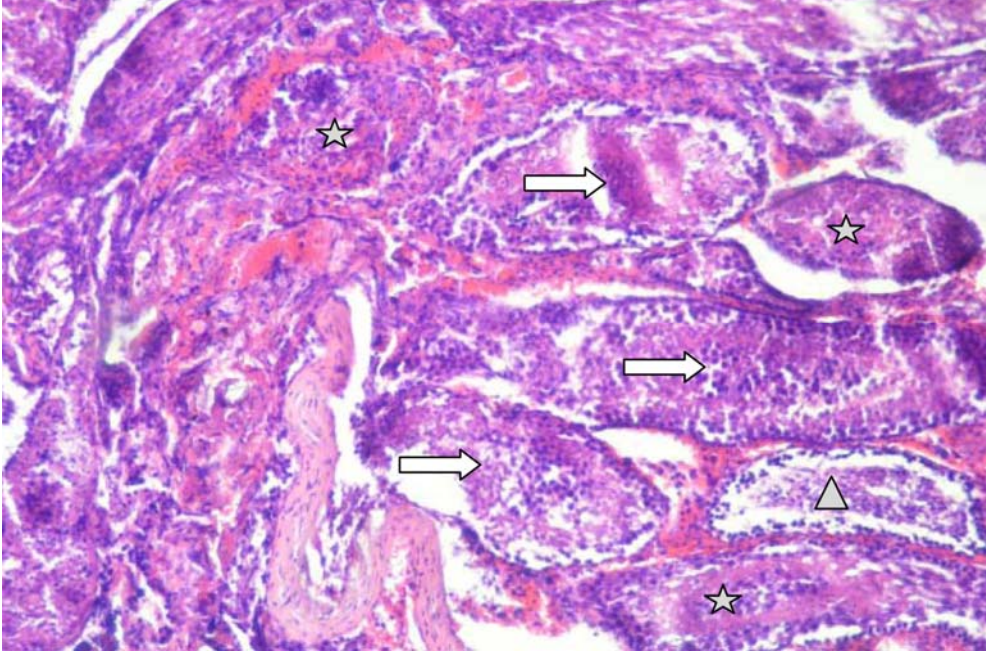


**Resim 7.** 1T-4R grubuna ait sol testis kesiti. Seminifer tübüllerde minimal hasar görünmekte. Tübül organizasyonunda yer yer düzensizlik (yıldız) mevcut (H-E, 200X).

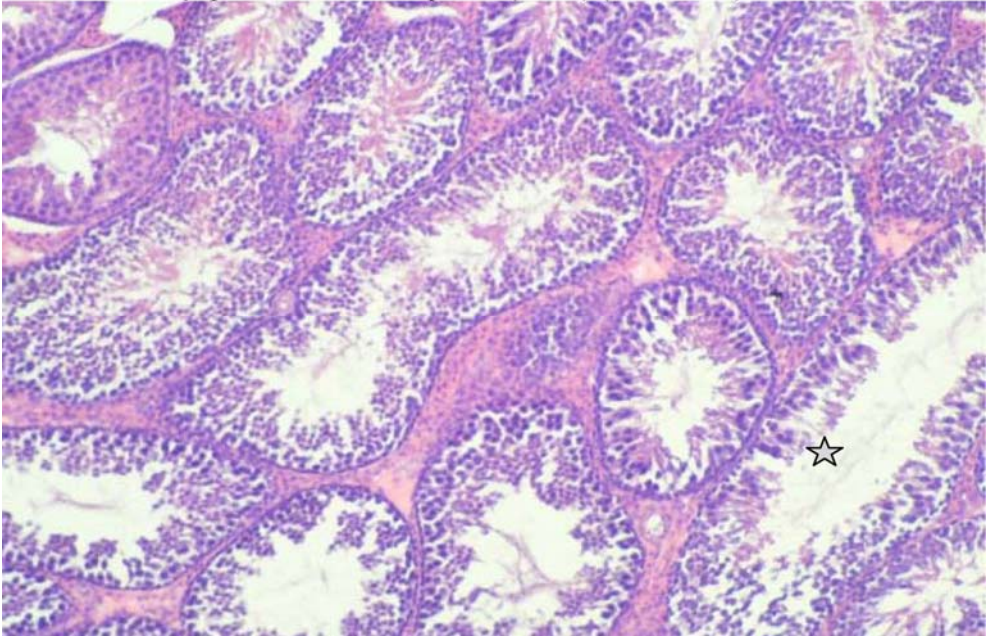


**Resim 8.** 2T-4R grubuna ait sol testis kesiti. Bazı seminifer tübüllerde orta seviyede hasar görünmekte. Tübül organizasyonunda düzensizlik (yıldız) ve spermatozoa bulunmayan tübüller (üçgen) görülüyor (H-E, 200X).





**Resim 9.** 4T-4R grubuna ait sol testis kesiti. Seminifer tübül yapısı belirgin şekilde hasar görmüş durumda. Tübüllerin çoğunda organizasyon bozukluğu, bazı tübüllerde de spermatid (üçgen) ve spermatozoa (yıldız) bulunmadığı gözlemlendi. Ayrıca tübül lümenine atılmış spermatozoa da saptandı (Oklar) (H-E, 200X).



**Resim 10.** 4T-4R grubuna ait sağ testis kesiti. Tübüllerde minimal hasar ve tübül organizasyonunda hafif değişimler (yıldız) olmakla birlikte kontrol grubundan belirgin bir farklılık gözlenmedi (H-E, 200X).

### 4.3. Grupların Apoptozis Ortalamaları

Kruskall-Wallis Varyans Analizi kullanılarak gruplar karşılaştırıldığında apoptozis açısından gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p=0,000$ ). Bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için ikili bağımsız gruplarda Mann-Whitney U testi yapılmıştır. Aynı ratın sağ ve sol testisini oluşturan gruplar bağımlı ikili grup olarak değerlendirilerek Wilcoxon testi kullanılmıştır. Saptanan bulgular şu şekildedir:

**Tablo 4.** Grupların apoptozis ortalamaları.

GRUPLAR	SOL TESTİS APOPTOZİS ORTALAMALARI	SAĞ TESTİS APOPTOZİS ORTALAMALARI
KONTROL	1.09±0,42	--
SHAM	0.79±0,17	--
1T-4R	3.18±1,31	1.50±0,11
2T-4R	5.13±0,51	2.11±0,22
4T-4R	6.50±0,86	2.59±0,17

*Kontrol* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

Kontrol grubuyla sham grubu arasındaki fark anlamsız ( $p=0,198$ ),

Kontrol grubuyla SOL 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,002$ ),

Kontrol grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,021$ ),

Kontrol grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

Kontrol grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

Kontrol grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

Kontrol grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

bulunmuştur.

*Sham* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

Sham grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamsız ( $p=0,198$ ),

Sham grubuyla SOL 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

Sham grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

Sham grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),  
 Sham grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),  
 Sham grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),  
 Sham grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

bulunmuştur.

*SOL 1T-4R* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

SOL 1T-4R grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,002$ ),  
 SOL 1T-4R grubuyla sham grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),  
 SOL 1T-4R grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı  
 ( $p=0,012$ ),  
 SOL 1T-4R grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı  
 ( $p=0,002$ ),  
 SOL 1T-4R grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasında fark var ancak  
 istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,100$ ),  
 SOL 1T-4R grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı  
 ( $p=0,000$ ),  
 SOL 1T-4R grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasında fark var ancak  
 istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,128$ ) bulunmuştur.

*SAĞ 1T-4R* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

SAĞ 1T-4R grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,021$ ),  
 SAĞ 1T-4R grubuyla sham grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),  
 SAĞ 1T-4R grubuyla SOL 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı  
 ( $p=0,012$ ),  
 SAĞ 1T-4R grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı  
 ( $p=0,000$ ),  
 SAĞ 1T-4R grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı  
 ( $p=0,000$ ),



SAĞ 1T-4R grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SAĞ 1T-4R grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

bulunmuştur.

*SOL 2T-4R* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

SOL 2T-4R grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SOL 2T-4R grubuyla sham grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SOL 2T-4R grubuyla SOL 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,002$ ),

SOL 2T-4R grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SOL 2T-4R grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,005$ ),

SOL 2T-4R grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,005$ ),

SOL 2T-4R grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

bulunmuştur.

*SAĞ 2T-4R* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

SAĞ 2T-4R grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SAĞ 2T-4R grubuyla sham grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SAĞ 2T-4R grubuyla SOL 1T-4R grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,100$ ),

SAĞ 2T-4R grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SAĞ 2T-4R grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,005$ ),

SAĞ 2T-4R grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SAĞ 2T-4R grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

bulunmuştur.

*SOL 4T-4R* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

SOL 4T-4R grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SOL 4T-4R grubuyla sham grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SOL 4T-4R grubuyla SOL 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SOL 4T-4R grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SOL 4T-4R grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,005$ ),

SOL 4T-4R grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SOL 4T-4R grubuyla SAĞ 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,005$ )

bulunmuştur.

*SAĞ 4T-4R* grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında;

SAĞ 4T-4R grubuyla kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SAĞ 4T-4R grubuyla sham grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,001$ ),

SAĞ 4T-4R grubuyla SOL 1T-4R grubu arasında fark var ancak istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,128$ ),

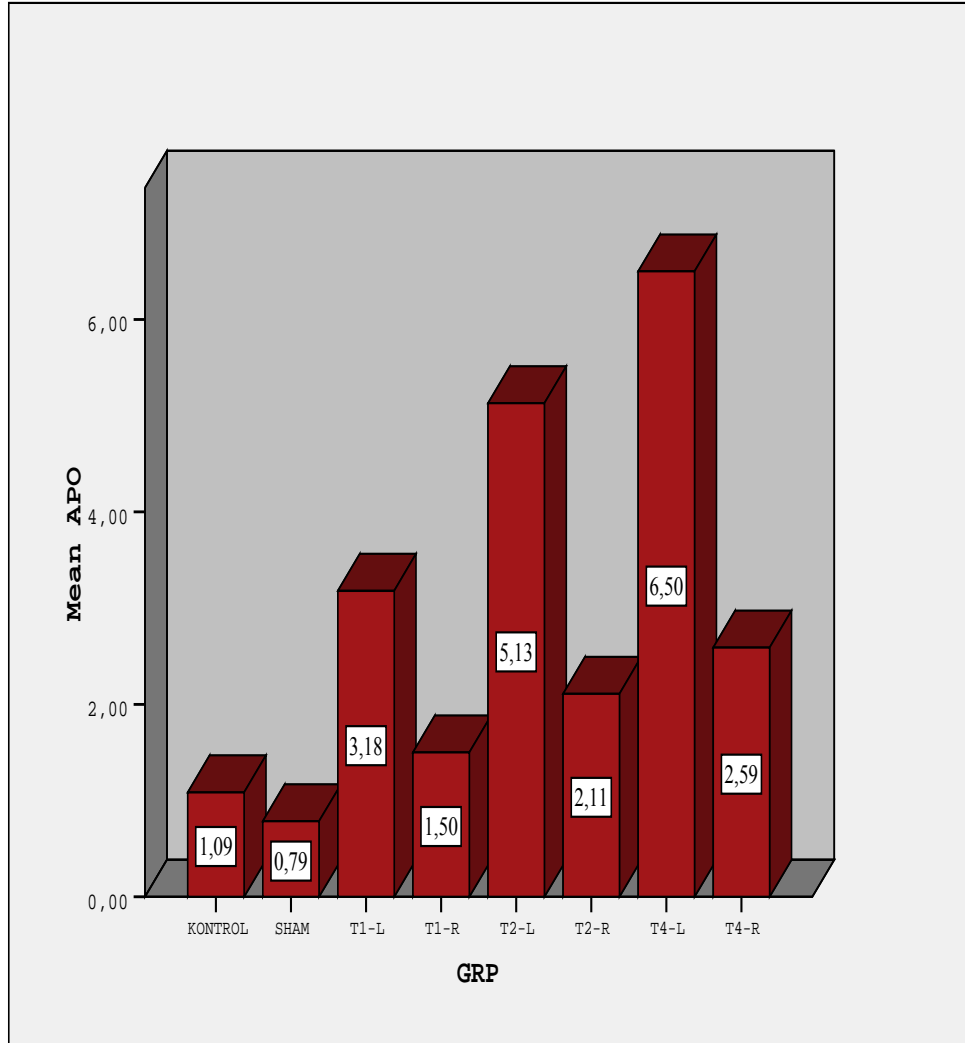
SAĞ 4T-4R grubuyla SAĞ 1T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SAĞ 4T-4R grubuyla SOL 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SAĞ 4T-4R grubuyla SAĞ 2T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,000$ ),

SAĞ 4T-4R grubuyla SOL 4T-4R grubu arasındaki fark anlamlı ( $p=0,005$ )

bulunmuştur.

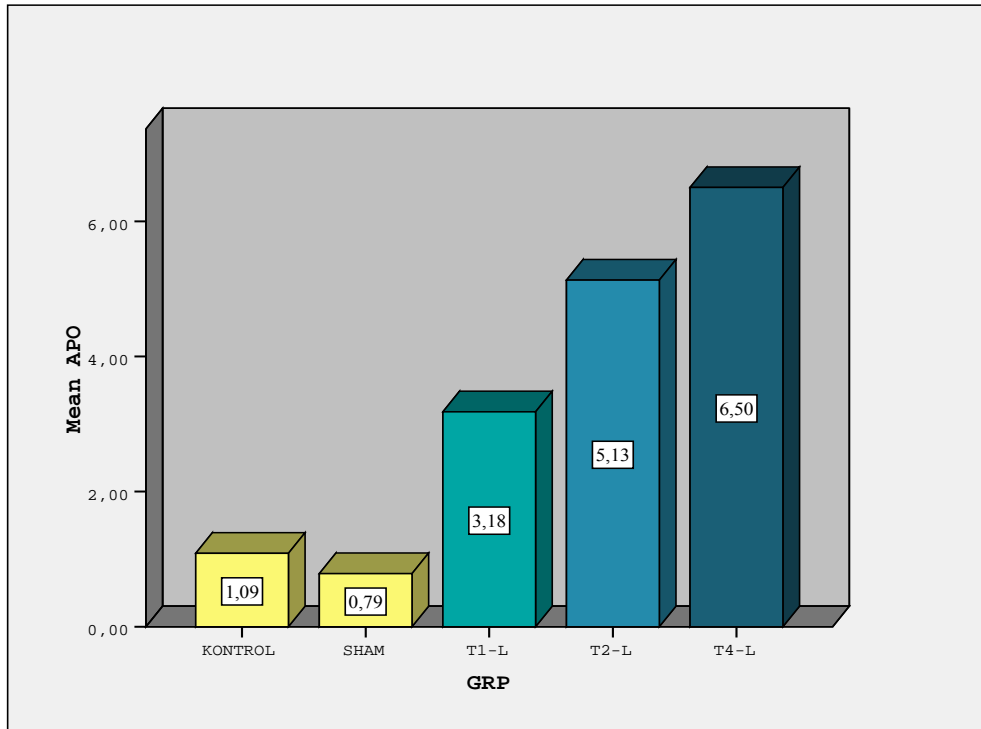


**Şekil 11.** Tüm grupların apopitozis ortalamaları.

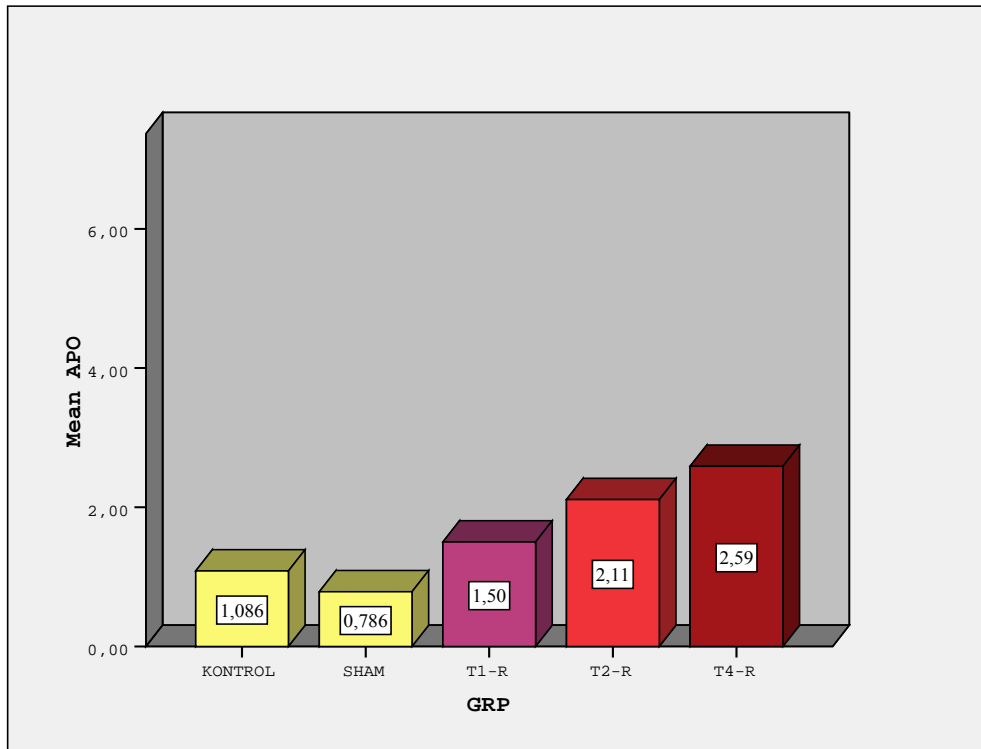
T1-L: Sol 1T-4R grubu, T1-R: Sağ 1T-4R grubu,

T2-L: Sol 2T-4R grubu, T2-R: Sağ 2T-4R grubu,

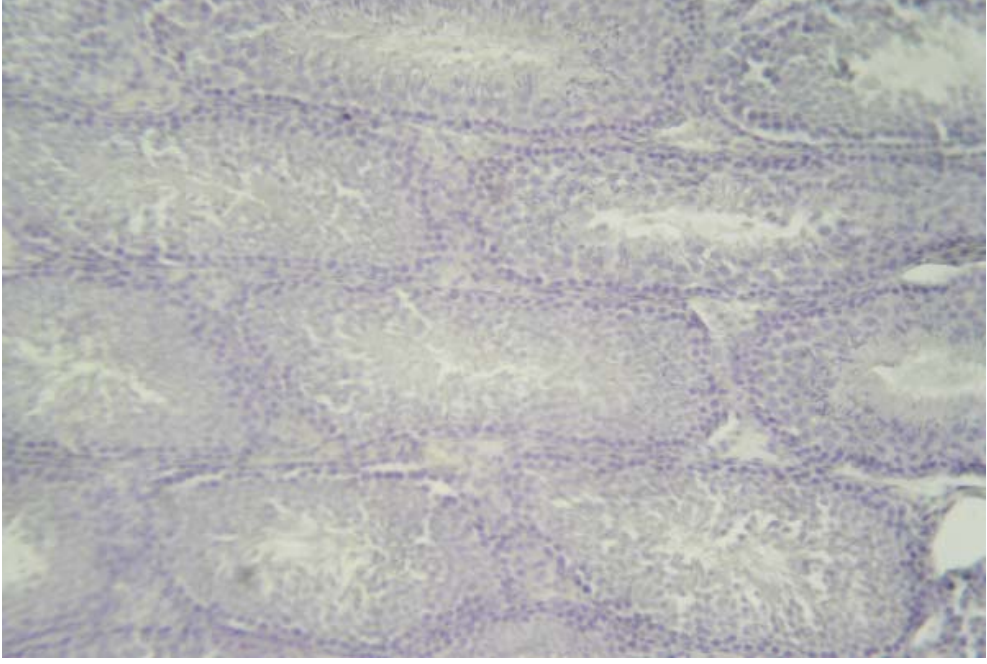
T4-L: Sol 4T-4R grubu, T4-R: Sağ 4T-4R grubu.



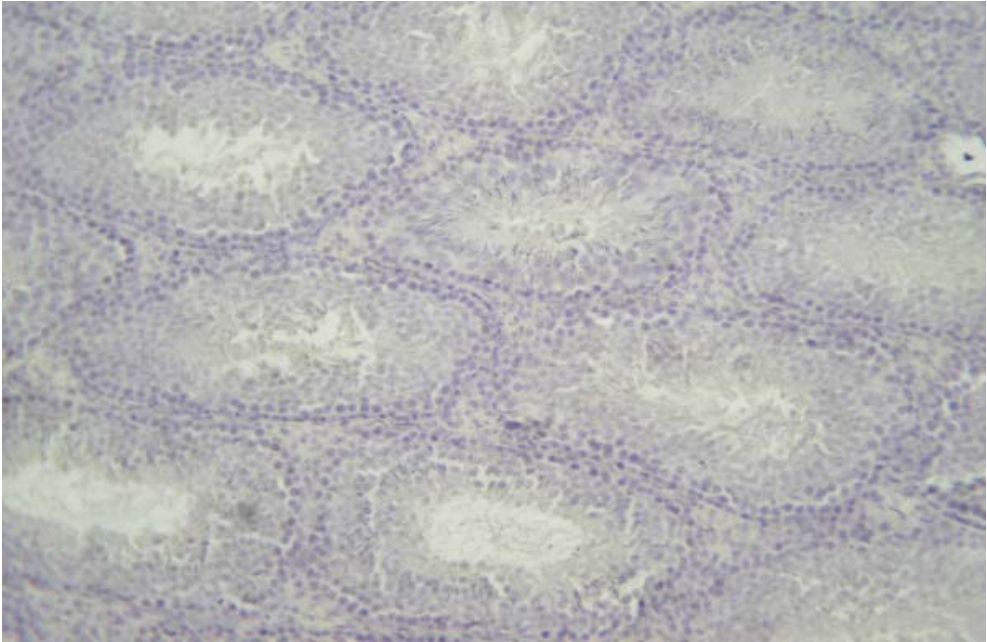
Şekil 12. Kontrol, sham ve sol testislerin apoptozis ortalamaları.



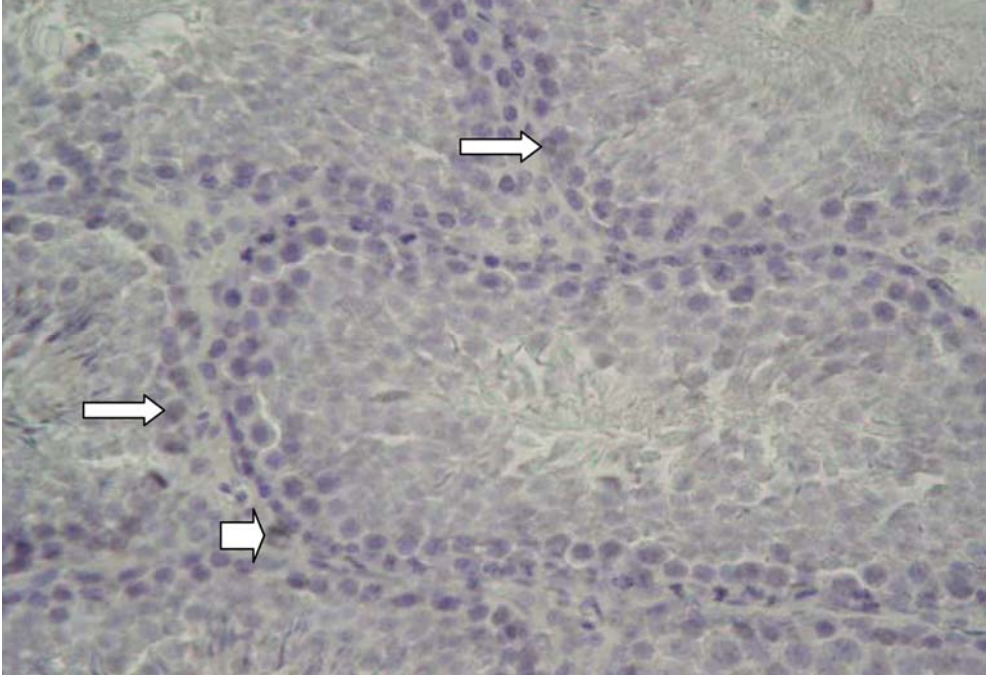
Şekil 13. Kontrol, sham ve sağ testislerin apoptozis ortalamaları.



**Resim 11.** Kontrol grubuna ait antikor eklenmemiş (negatif kontrol) sol testis kesiti (Zit boyama Hematoksilen, Büyütme 200X).



**Resim 12.** SHAM grubuna ait antikor eklenmemiş (negatif kontrol) sol testis kesiti (Zit boyama Hematoksilen, Büyütme 200X).

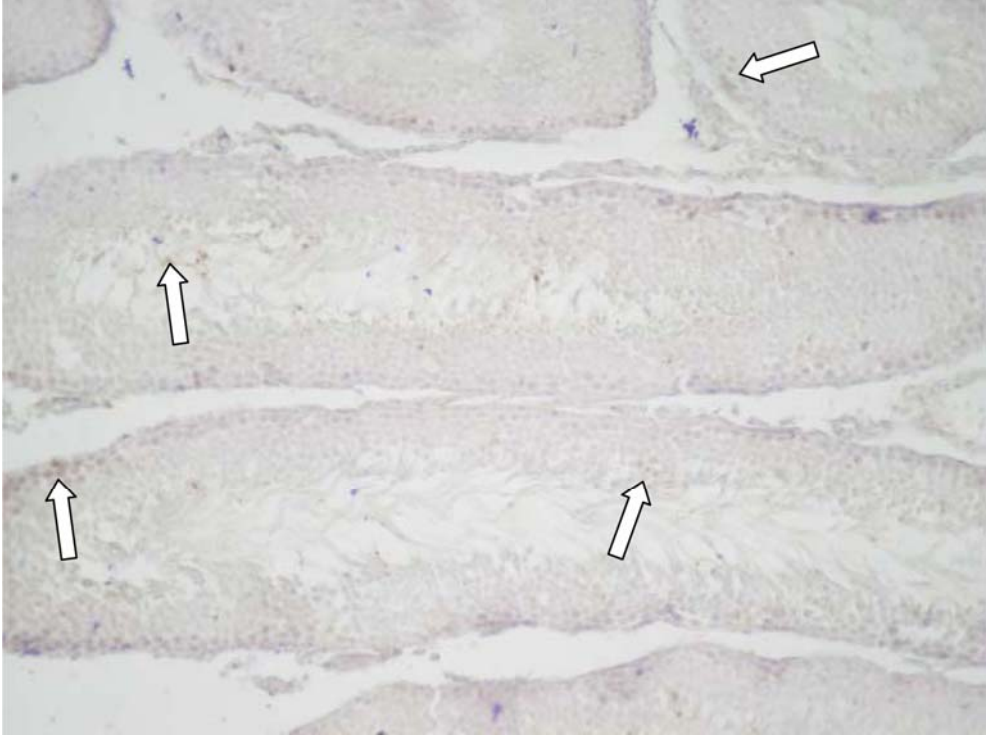


**Resim 13.** SHAM grubuna ait sol testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikoruna bazı spermatositlerde (oklar) ve leydig hücrelerinde (kalın ok) çok zayıf boyama göstermiş (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 400X).

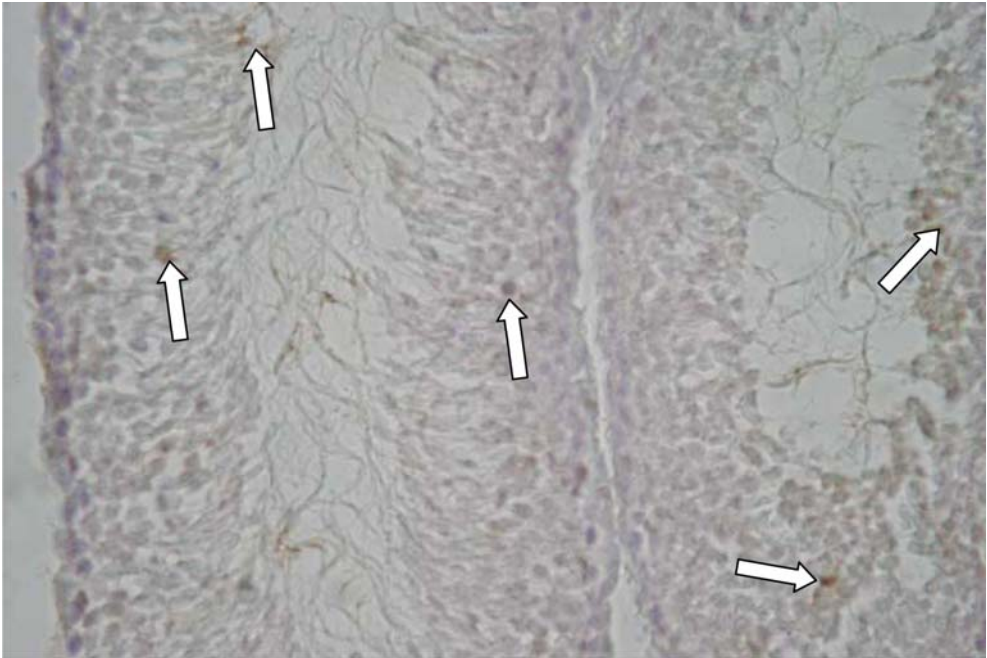


**Resim 14.** T1 grubuna ait antikor eklenmemiş (negatif kontrol) sol testis kesiti. Eritrositlerde (ok) endojen katalaz aktivitesinden dolayı hafif yalancı pozitif boyama görülmekte. (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X).

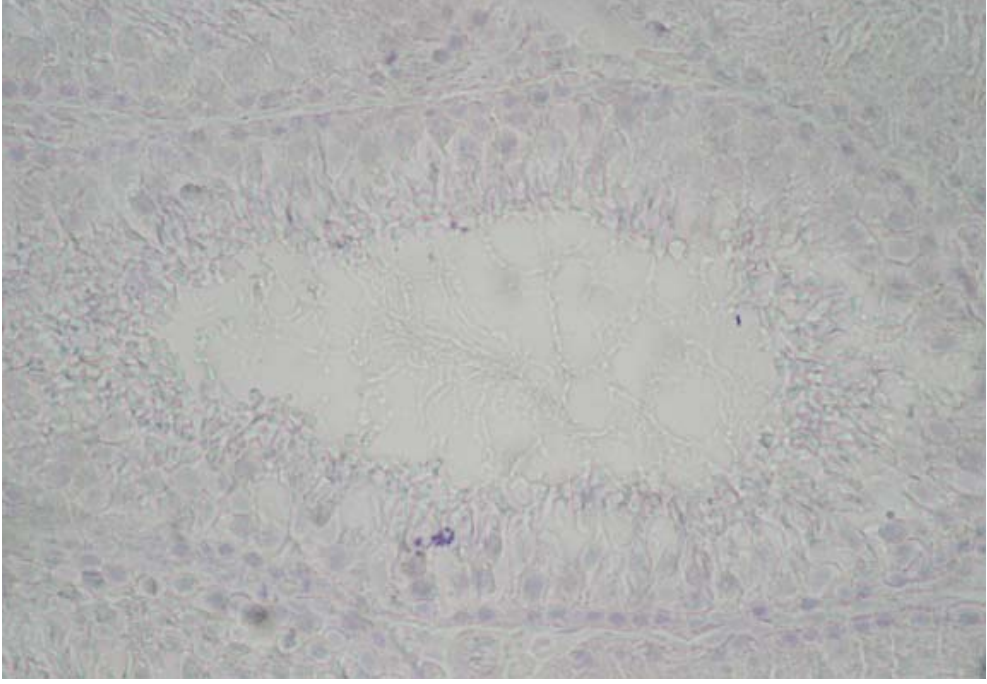




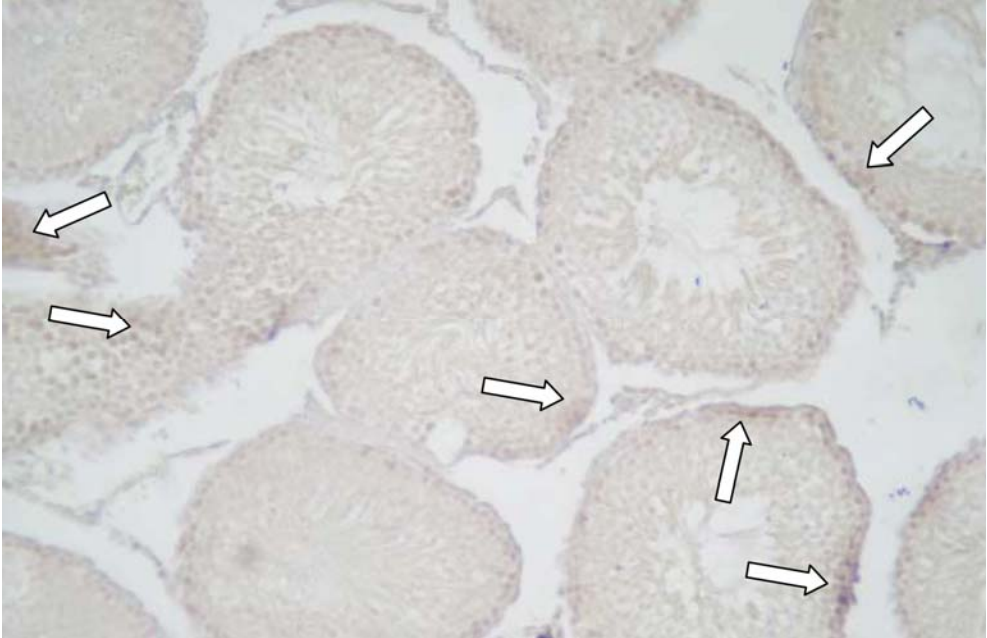
**Resim 15.** T1 grubuna ait sol testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikoruna bazı spermatozoidlerde (oklar) boyama göstermiş (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X).



**Resim 16.** T1 grubuna ait sol testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikoruna bazı spermatozoidlerde (oklar) boyama göstermiş (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 400X).

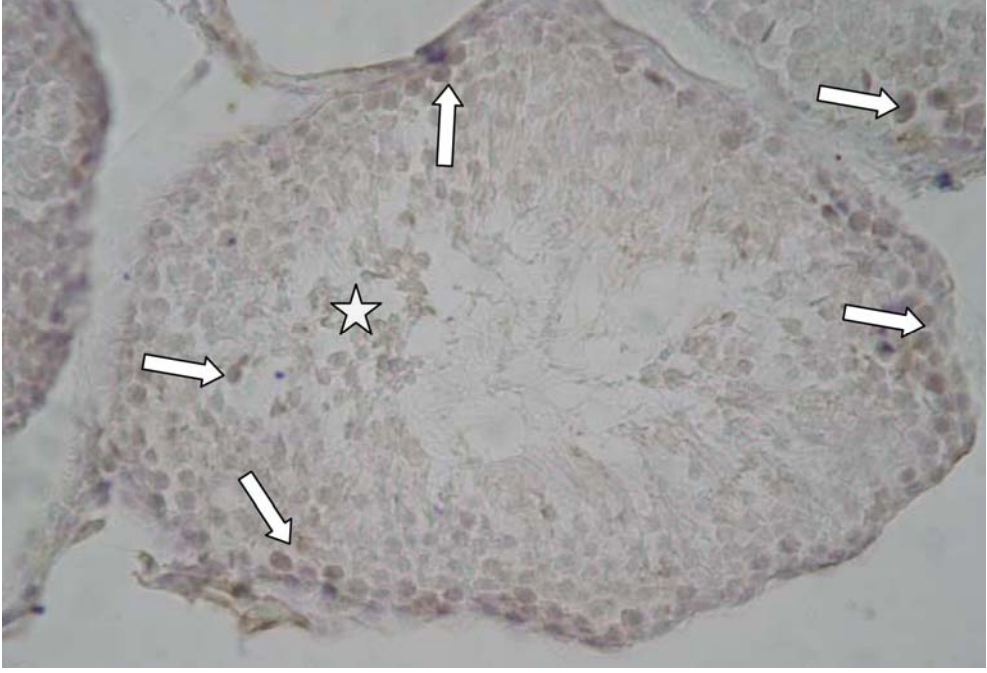


**Resim 17.** T1 grubuna ait antikor eklenmemiş (negatif kontrol) sol testis kesiti (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 400X).

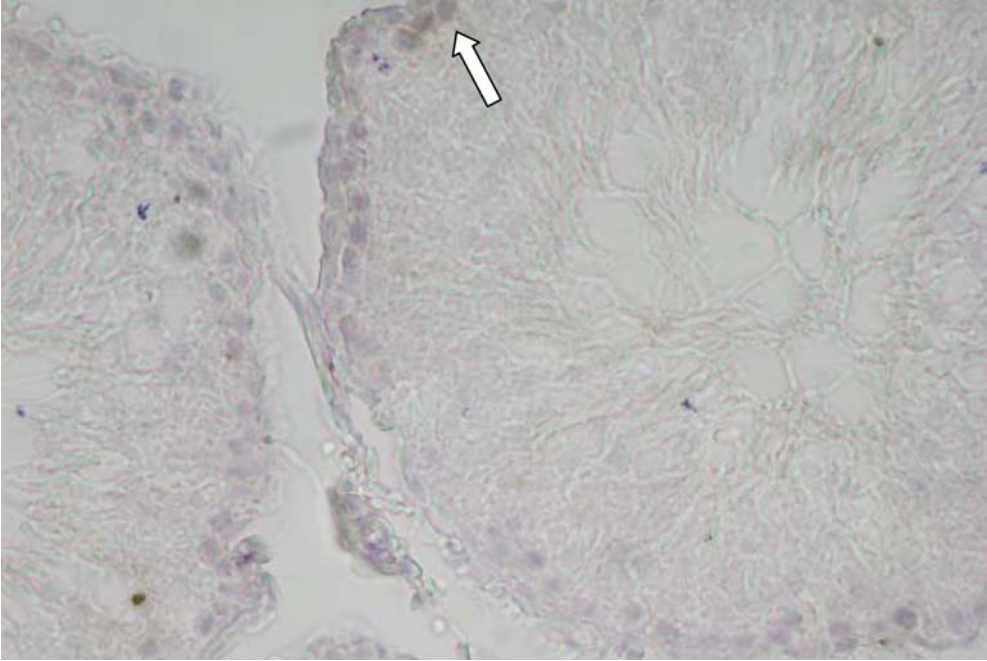


**Resim 18.** T2 grubuna ait sol testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikorunun pozitif boyandığı spermatozidler (oklar) gruplar halinde görülüyor (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X).

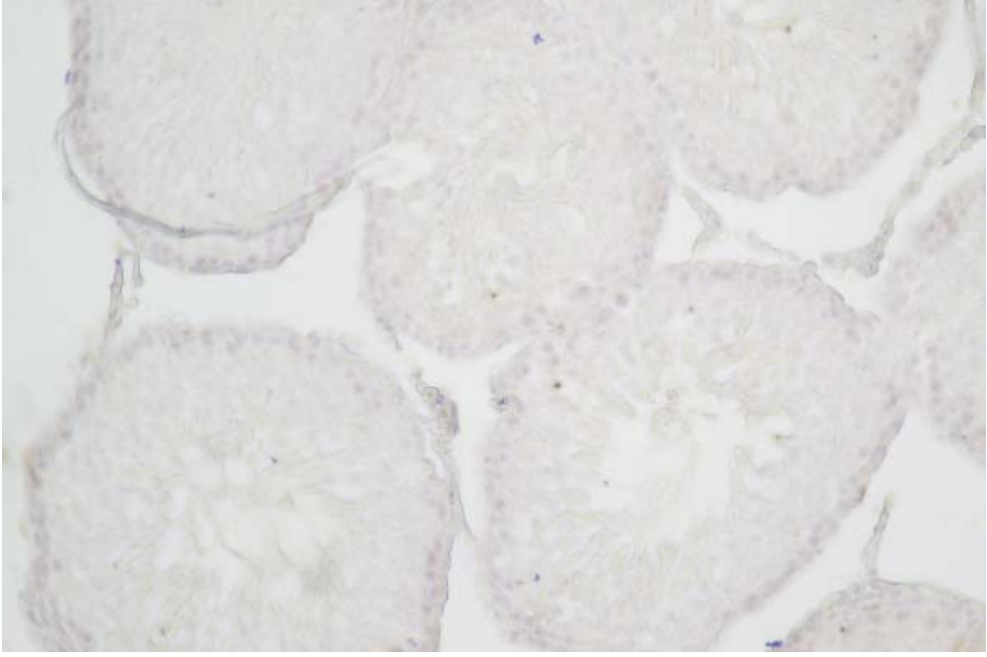




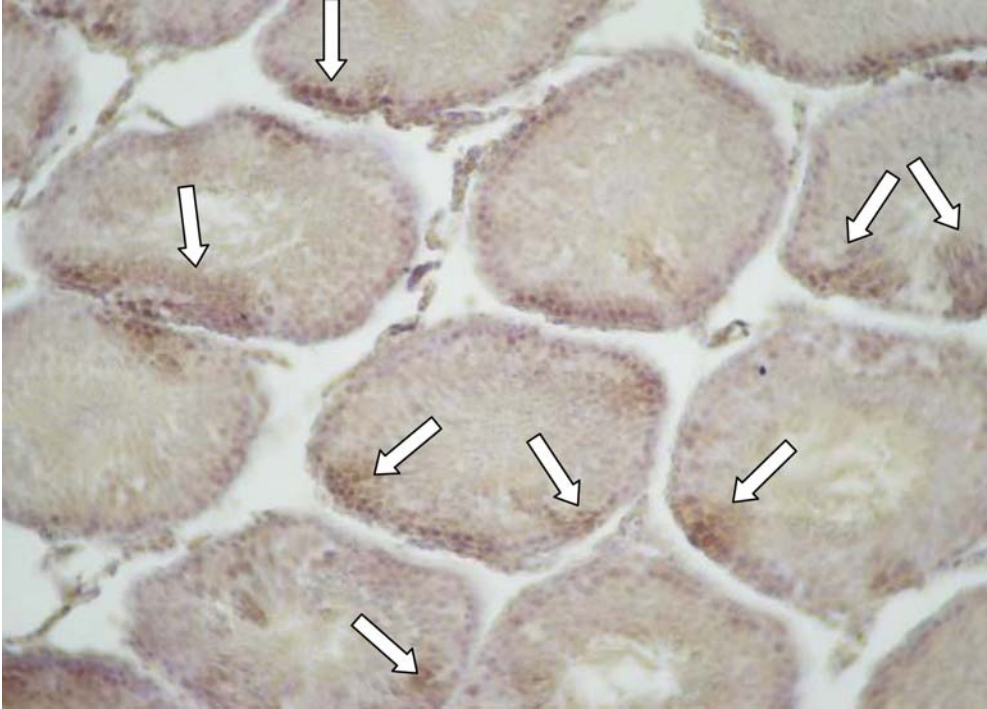
**Resim 19.** T2 grubuna ait sol testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikorunun pozitif boyandığı spermatozitler (oklar) görüntülenmiş (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 400X).



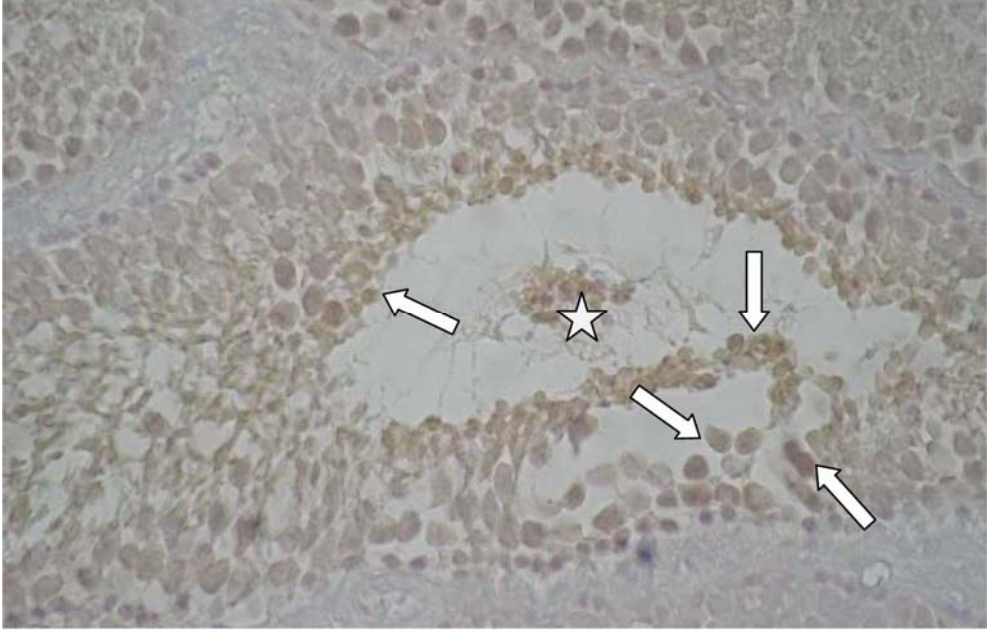
**Resim 20.** T4 grubuna ait sağ testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikoru bazı spermatozitlerde (oklar) hafif boyama göstermiş (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 400X).



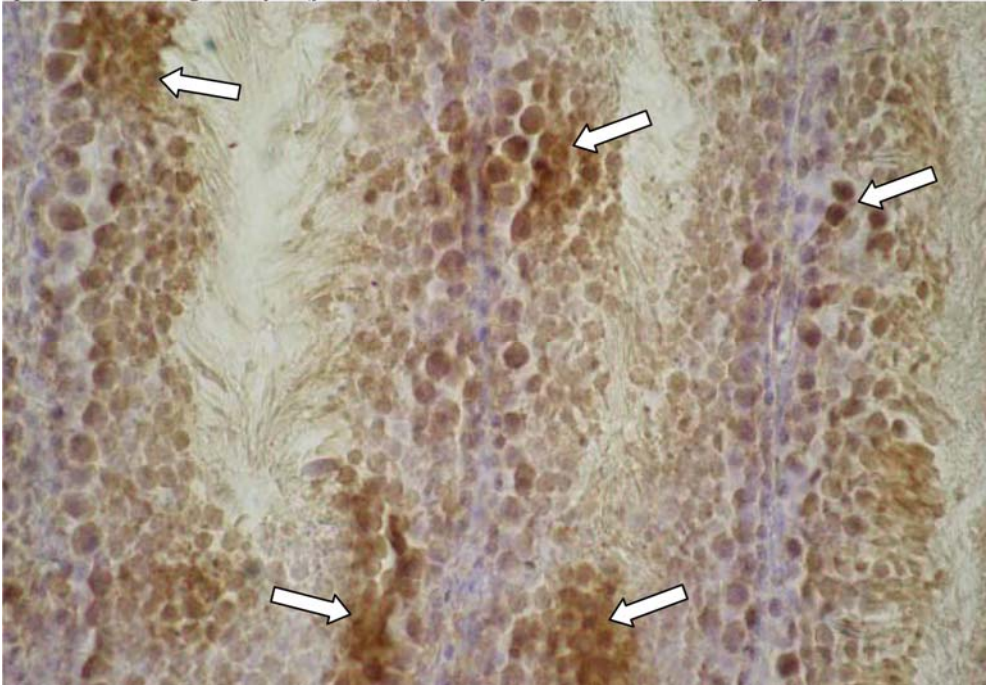
**Resim 21.** T4 grubuna ait antikor eklenmemiş (negatif kontrol) sol testis kesiti (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X).



**Resim 22.** T4 grubuna ait sol testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikorunun pozitif boyandığı spermatozoidler (oklar) görüntülenmiş (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X).

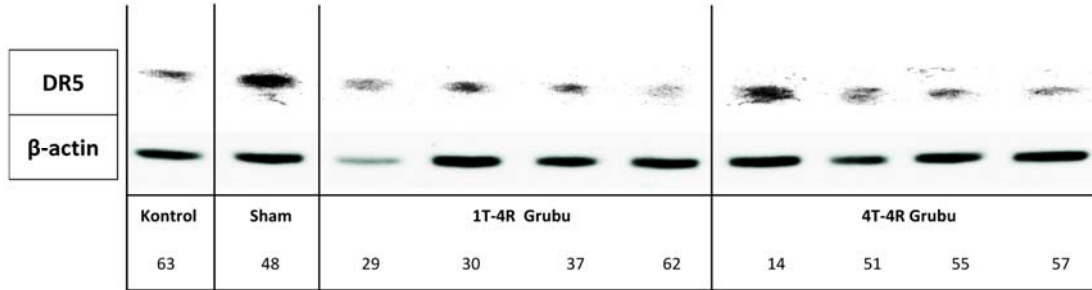


**Resim 23.** T4 grubuna ait sol testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikorunun pozitif boyandığı spermatozitler (oklar) görüntülenmiş. Ayrıca lümeneye atılmış apoptotik spermetidler de görülüyor(yıldız). (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 400X).



**Resim 24.** T4 grubuna ait sol testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikorunun pozitif boyandığı spermatozitler (oklar) gruplar halinde görüntülenmiş (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 400X).





**Resim 25.** Western Blot analizi ile Kontrol, Sham, 1T-4R ve 4T-4R Gruplarında DR5 ekspresyonunun gösterilmesi



**Resim 26.** Western Blot analizi ile 2T-4R Grubunda DR5 ekspresyonunun gösterilmesi

Western Blot Analiziyle DR5 Reseptörü Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi:

Testis torsiyonu ile ilgili olarak yapılan literatür araştırmalarında apoptozisin PARP sinyal yolağı ile açıklandığı görüldü. Bu nedenle çalışmada western blot analizi ile PARP aktivasyonunun incelenmesi planlanmıştır. Ancak metod ile ilgili yapılan manipülasyonların sınırlı süre ve bütçenin yeterli olmaması nedeni ile apoptozis mevcut imkanlar ölçüsünde DR5 ölüm resptörü ekspresyon düzeyi ile gösterildi.

Western blot analizi için Kontrol, Sham, 1T-4R, 2T-4R, 4T-4R gruplarında çalışma yapıldı. Çalışma için kontrol ve sham grubundan bir örnekte, diğer gruplardan ise 4 örnekte ekspresyon düzeyi incelendi. Sham, 2T-4R ve 4T-4R gruplarında DR5 ekspresyonu gözlemlendi (Resim 25,26).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Testis torsiyonu çocukluk döneminde akut skrotuma neden olan en ciddi patolojidir. Aynı zamanda yüksek oranda testis dokusunda nekroza neden olmasıyla acil cerrahi girişim gerektiren bir hastalıktır. Testis torsiyonu en sık peripubertal dönemde, yani 10-16 yaşlar arasında, daha az sıklıkta da perinatal dönemde görülür (24). Spermatic kordda torsiyonun oluşması ile beraber testisin venöz dönüşü engellenir ve venöz konjesyon oluşur. Venöz konjesyon sonunda testiste hemorajik infark alanları meydana gelir. Venöz konjesyonun oluşması ve testisin şişmesi testiste basınç artışına sebep olur. Sonuçta arteriyal dolaşım da bozularak testiste iskemik nekroz meydana gelir (25). Hipoksik kalan testiste oksidatif metabolizma yerine yavaş yavaş hipoksik metabolizma gelişmektedir. Azalan ATP depoları sonucunda hücrelerde enerji açığı meydana gelmekte ve asidoz oluşmaktadır. Bu sırada ATP hipoksantine kadar katabolize olmakta ve normoksik durumda olması gerektiği gibi ürik aside metabolize olamayıp iskemik dokuda birikmektedir. Bu olaylar iskemiye uğrayan oksidatif her dokuda gelişmektedir. Asıl araştırılan ve tartışma konusu olay ise torsiyonu takiben tedavi amacıyla yapılan detorsiyon işlemi sonucunda oluşan reperfüzyon hasarıdır.

Testisin detorsiyone edilerek kanlanmanın tekrar başlaması sonucu ortamın oksijenlenmesi ile hücrede fazla miktarda birikmiş olan hipoksantin, ksantin oksidaz enzimi ile ürik aside dönüşür ve aşırı miktarda SOR ortaya çıkar. SOR hücrede toksik etki gösterir. Hücre proteinini ve DNA'yı oksidize edip DNA hasarına yol açarak genetik kodda mutasyonlara neden olabilir.

Hücre hasarının bir mekanizması olarak gösterilen PARP yolağı, pek çok iskemi reperfüzyon hasarı patogenezinde yer almaktadır. Hafif genotoksik zarar PARP aktivasyonunu indükleyerek, DNA tamirini ve hücrenin canlı kalmasını kolaylaştırmaktadır. Orta derecede hücre hasarında, tamir edilemez derecede DNA hasarı bulunan hücreler apoptoz yolağı aktive edilerek elimine edilmektedir. Şiddetli DNA hasarının olduğu durumda ise, PARP aşırı aktive olmakta ve hücre içi enerji metabolizmasını çökerterek hücreyi nekroza sürüklemektedir (57).

TT'nun prepubertal dönemde fazla görülmesi nedeni ile çalışmamızda ağırlıklı olarak genç grup ratlar kullanılmıştır. Ancak rat temin ettiğimiz HÜDAL

laboratuvarına yoğun talep nedeniyle kısıtlı sayıda da olsa olgun yaş dönemindeki ratlar da çalışmamızda kullanılmıştır. Torsiyon genellikle sol testiste görüldüğü için torsiyon modeli sol testiste oluşturulmuştur. Torsiyon sonucu testiste oluşan hasar torsiyonun derecesine ve süresine bağlıdır. İncelenen literatürlerde rat testislerinde hasar oluşturmak için minimum sürenin 1 saat olduğu, 2 saat süre ile oluşturulan 360° torsiyonun rat testisinde orta derecede akut vasküler cevap oluşturduğu, tam iskemi oluşturmak için torsiyonun derecesinin 720° olmasının daha uygun olduğu saptanmıştır. 4 saatten daha uzun süre ile 720° torsiyone edilen testislerde kan akımı bloke edilerek fokal infarktüsler oluşmaktadır (88). Bu nedenle çalışmamızda en az torsiyon süresi 1 saat tutulmuştur.

PARP enzimi ilk aşamada genotoksik hasar sonucu oluşan DNA kırıklarının tamir etmek üzere aktive olan bir enzimdir. Deneysel testis torsiyonunda hasarın PARP inhibitörü verilerek önlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda PARP yolağının hücreyi apoptoz ve nekroza yönlendirmesi üzerinde yoğunlaşmış ve PARP inhibitörü verilerek iskemik bulguların azalıp azalmadığı bulunmaya çalışılmıştır. PARP'ın hafif hasar durumundaki DNA kırıklarının onarıcı etkisi göz ardı edilmiştir. Bu nedenle biz çalışmamızda farklı olarak hafif ve orta iskemik hasarlı testis torsiyonunda germ hücrelerindeki iskemik değişiklikleri, apoptoz durmunu ve PARP yolağının etkinliğini tespit edebilmek için 1, 2 ve 4 saatlik torsiyon sürelerini uyguladık.

1, 2 ve 4 saatlik iskemi-reperfüzyon modeli uygulanan ratların sol testisleri hafif ödemli, morumsu iskemik görünümde olduğu tespit edilmiştir. 4 saatlik torsiyonlu testislerde bu bulguların daha belirgin olduğu saptanmıştır. Ancak testis torsiyon modeli aynı kişi ve yöntemle yapılmış olmasına rağmen ratlar arasında makroskopik farklı iskemik testis görünümleri saptanmıştır. Genç rat testislerinin yaşlı rat testislerine göre iskemiye daha dirençli olduklarından dolayı çalışmamızda aynı iskemi sürelerindeki farklı etkilenme derecelerini değişik yaşlardaki ratların iskemiye gösterdikleri farklı dirençle açıklayabiliriz.

İskemi ve reperfüzyona bağlı organ hasarının azaltılmasında PARP inhibitörlerinin etkinliğini gösteren çalışmalar mevcuttur. PARP inhibitörlerinin uygulanması, tavşanlarda kalp ve iskelet kasında iskemi-reperfüzyon hasarında

azalmaya, fokal serebral iskemi modelinde beyin infark hacminde azalmaya, retina da iskemi-reperfüzyon hasarında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (13). Farelerde böbreklerin oksidatif stresten korunmasında da etkili olduğu gösterilmiştir (89). Testis torsiyonundaki iskemi-reperfüzyon hasarında PARP inhibitörlerinin etkinliğini araştıran çalışmalar da yapılmıştır.

Bozlu ve arkadaşları rat testisinde tek taraflı 2 saatlik torsiyon, 4 saatlik detorsiyon sonrası testiste oluşan hasarda PARP inhibitörünün etkilerini histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında PARP inhibitörüyle erken ve geç dönem histolojik ve biyokimyasal parametrelerde düzelme bildirmişlerdir (14). Yurtçu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada testis torsiyonunda antioksidan olarak tek doz steroid ve melatoninin MDA gibi biyokimyasal parametrelerde olumlu etkisi olmasına rağmen JTBS gibi histolojik parametrelerde değişiklik yapmadığını belirtmişlerdir (24). Benzer şekilde Greenstein ve ark. 3 saatlik ve Diduk ve ark. ise 6 saatlik torsiyondan sonra PEG-SOD ve diltiazemin, histopatolojik inceleme sonucunda yararlı bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir (90). Bu sonuçlara göre; 1 saatten daha fazla süren testis torsiyonlarında tek doz antioksidan maddelerin biyokimyasal olarak reperfüzyon hasarına etkisi varmış gibi gözükmesine rağmen, histopatolojik olarak etkili olmadığı görülmüştür. Bu nedenle testis torsiyonlarından sonra iskemi-reperfüzyon hasarını değerlendirmek için histopatolojik incelemenin daha doğru olacağını düşünerek çalışmamızda farklı olarak biyokimyasal değil histopatolojik değerlendirme yapılmıştır.

Johnson ve arkadaşları tek taraflı spermatik kord torsiyonunda testislerdeki iskemi reperfüzyon hasarına bağlı spermatogenezdeki değişiklikleri belli kriterlere göre derecelendirmişler, hasar arttıkça spermatogenik seri hücrelerin sayılarının azaldığı tubüler biyopsi skorunu elde etmişlerdir. Çalışmamızda tek taraflı spermatik kord torsiyonun neden olduğu iskemi reperfüzyon hasarı Hematoksilen Eozin ile boyayarak Modifiye Johnson Tubüler Biyopsi Skorlama sistemine göre değerlendirildi.

1 saat torsiyon oluşturulan testiste; seminifer tübüllerinde sayılan spermatogenik seri hücrelerin dolayısıyla JTBS skorlarının karşı testis, kontrol ve shama göre daha düşük olduğu tespit edildi. Ayrıca 1 saat torsiyon oluşturulan

testisteki JTBS skorlarının, 2 saat ve 4 saat torsiyon grupların karşı testisleriyle istatistiksel olarak farklı olmadığı tespit edildi. Dolayısıyla testiste saptanabilir en az hasar oluşturulabilmesi için 1 saatlik bir sürenin gerekli olduğu, daha kısa süreli torsiyonlarda iskemik değişikliklerin saptanmasında yanlış negatif ya da pozitif sonuçların ortaya çıkabileceği gösterilmiş oldu. Çalışmamızın sonuçları Turner ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir.

2 saat torsiyon oluşturulan testiste; spermatogenik seri hücrelerin dolayısıyla JTBS skorlarının karşı testis, kontrol, sham ve 1 saat torsiyon grubuna göre daha düşük olduğu tespit edildi. Ayrıca 4 saat torsiyonlu sol testise göre de daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu bize 2 saatlik torsiyonla orta derecede bir hasar oluşturulabileceğini göstermektedir. 4 saat torsiyon oluşturulan testiste; JTBS skorlarının karşı testis, kontrol, sham, 1 saat ve 2 saat torsiyon gruplarına göre daha düşük olduğu tespit edildi. Bu sonuçla klinikle uyumlu oldukça belirgin iskemi bulguları için 4 saatlik torsiyonun yeterli olduğu kabul edilebilir.

Apopitoz, memeli sperminin normal süreçlerinden biridir. Spermatogenezin tüm aşamalarında olgun sperm üretmek ve anormal spermi ortadan kaldırmak için kendiliğinden düzenlenir. Spermatogenez sırasında çok sayıda sperm ölür ve ortadan kalkar. Bu sertoli hücrelerinin sınırlı sayıda germ hücrelerinin korunmasına ve aşırı sayıdaki germ hücrelerinin ortadan kaldırılmasına neden olan yeteneğine bağlı olabilir. Önemli bir DNA tamir enzimi olarak PARP'ın rolü sperm genomik bütünlüğünün korunması ile ilgilidir. Benzer şekilde hücre ölüm yolundaki PARP'ın rolü, spermatogenez süreci sırasında anormal spermin eliminasyon işlemi içinde önemlidir.

Bozlu ve arkadaşları oluşturdukları testis iskemi reperfüzyon modelinde tek taraflı 2 saatlik torsiyon, 4 saatlik detorsiyon sonrası oluşan testis hasarına PARP inhibitörünün etkilerini histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirmişler fakat apopitozisi ve PARP'ı göstermemişlerdir. Çalışmalarında PARP inhibitörüyle erken ve geç dönem histolojik ve biyokimyasal parametrelerde düzelme bildirmişlerdir (14). Biz çalışmamızda farklı olarak yapılan çalışmalar ışığında biyokimyasal parametreler yerine doğrudan histopatolojik olarak apopitozisi ve PARP'ı göstermeye çalıştık. Kar ve arkadaşları 4 saat torsiyon+ 4saat detorsiyon ve



4 saat torsiyon ve 2 ay detorsiyon oluşturarak PARP inhibitörünün erken ve geç dönem etkilerini incelemişler ve histopatolojik parametrelerde, apoptoziste PARP inhibitörüyle anlamlı azalma saptamışlar, MDA ve glutasyon seviyelerinde değişiklik saptamamışlardır. Ancak bu çalışmada 4 saatlik torsiyonun etkileri incelenmiş, daha kısa süreli hafif iskemi durumundaki PARP inhibitörünün etkileri incelenmemiştir. PARP enziminin öncelikle hafif hasar durumunda DNA kırıklarını onarıcı etkisi olduğu düşünüldüğünde hafif hasar durumunda kullanılan PARP inhibitörlerinin hücre yaşamına ve genetik kod aktarımına olumsuz etkileri olacağı göz ardı edilmiştir. Bu nedenle biz çalışmamızda hafif ve orta derece iskemi durumunda germ hücrelerindeki apoptozis derecesi ve PARP yolağının etkinliğini göstermeyi amaçladık.

Hafif genotoksik zararlar PARP enzim yolağı aktive olarak DNA tamirini sağlarken, orta derecede hücre hasarında, tamir edilemez derecede DNA hasarı bulunan hücreler apoptozis yolağı aktive edilerek elimine edilmektedir. PARP'ın bu iki zıt etkisinden yola çıkılarak PARP inhibitörlerinin farklı dokularda iskemi-reperfüzyon hasarını azaltıcı etkilerini gösteren çalışmalar olduğu gibi PARP inhibitörlerinin apoptozis arttırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Jha R. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PARP inhibitörü olan 3-aminobenzamid (3-ABA) varlığında kimyasal ve oksidatif stresin indüklediği apoptozis yaklaşık olarak 2 kat arttığı rapor edilmiştir. Bu sonuç PARP'ın, oksidatif ve kimyasal hasara maruz kalan spermin korunmasında önemli bir rol oynadığının bir göstergesidir (91). Yine Atorino L. ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada sıçan spermatid ve spermatositlerinde yoğun DNA hasarına in vivo reaktif oksijen türleri ve radyasyonun yol açtığı ve PARP inhibitörlerinin ise DNA hasar onarımında gecikmeye neden olduğu gösterilmiştir (92).

Bu bilgiler ışığında sağlıklı bireylerin oluşması ve nesillerin devamı açısından DNA onarımı ve apoptozis belki de en önem arz ettiği yer germ hücreleridir. PARP inhibitörlerinin apoptozis azalttığını gösteren çalışmalar baz alınarak testis torsiyonunda PARP inhibitörü kullanıldığında tamir edilebilecek DNA'ların da onarımı söz konusu olmayacağından genetik hasarlı spermeler ortaya çıkabilecektir. Bu durum infertiliteye veya sağlıklı birey ve nesiller ortaya çıkmasına neden olabilecektir. Bu nedenle çalışmamızda hafif hasar durumunda

germ hücrelerinde hasar oluşup oluşmadığı, farklı iskemi durumlarında ne derece hasar ve apopitoz oluştuğu, bu iskemi seviyelerinde PARP'ın aktive olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda seminifer tübüllerdeki apopitozis değerlendirilirken spermatid, primer ve sekonder spermatosit ve spermatogonialarda ki apopitoz değerlendirilmiş, olgun spermatozoalar değerlendirme dışı bırakılmıştır. Kontrol ve sham gruplarının testislerinin seminifer tübülleri bu şekilde değerlendirildiğinde histolojik olarak tamamen normal olmalarına rağmen bu gruplarda çok düşük düzeyde de olsa apopitoza gitmiş hücre saptanmıştır. Bu bulgular bize normal spermatogenez sırasında ortaya çıkan aşırı sayıdaki ya da anormal spermatogonial hücrelerin apopitozla ortadan kaldırıldığını kanıtlamaktadır.

1 saat torsiyon oluşturulan testisin seminifer tübülleri değerlendirildiğinde apopitozis ortalamalarının kontrol, sham ve karşı testisine göre anlamlı derecede yüksek; 2 ve 4 saat torsiyon oluşturulan testislere göre de anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi. Ancak aynı testislerin (T1sol) apopitozis ortalamalarının 2ve 4 saat torsiyon oluşturulan grupların karşı testislerine göre daha yüksek ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. Buna göre Bozlu ve arkadaşlarının ve de Kar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan farklı olarak 1 saatlik torsiyonla oluşturulan hafif iskemi düzeylerinde de apopitozun anlamlı derecede arttığı saptanmış oldu.

2 saat torsiyon oluşturulan testisin apopitozis ortalamalarının aynı grup karşı testis, kontrol, sham, 1T-4R grubu ve 4 saatlik torsiyonun karşı testisine göre anlamlı derecede yüksek; 4 saatlik torsiyon oluşturulan testise göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi. Böylece hafif iskemide olduğu gibi orta derece iskemide de apopitozun gerçekleştiğini ve iskemi düzeyi arttıkça beklendiği gibi apopitoz ortalamasının arttığı gösterilmiş oldu. Kar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla uyumlu olarak 4 saat torsiyon oluşturulan testisin apopitozis ortalamasının da diğer tüm gruplardan yüksek olduğu tespit edildi.

Yurtçu ve arkadaşlarıyla benzer olarak Greenstein'le ark. ve Diduk'la arkadaşları, testis torsiyonlarında tek doz antioksidan maddelerin biyokimyasal parametreleri etkiliyor gibi görünmesine rağmen, histopatolojik olarak etkili

olmadığını belirtmişlerdir. Bu nedenle testis torsiyonlarından sonra iskemi-reperfüzyon hasarını değerlendirmek için histopatolojik incelemenin daha doğru olacağını düşünerek çalışmamızda da histopatolojik değerlendirme yapıldı. Histopatolojik inceleme sonunda sham grubuyla 1 saat torsiyonlu grubun sağ testisleri (T1R) kıyaslandığında, 1 saat torsiyonlu grubun sol testisleriyle (T1L) 2 saat torsiyonlu grubun sol testisleri (T2L) kıyaslandığında, 2 saat torsiyonlu grubun sağ testisleriyle (T2R) 4 saat torsiyonlu grubun sağ testisleri (T4R) kıyaslandığında JTBS açısından bu ikili gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamasına karşın apoptozis ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. Hafif iskemiye bağlı testis hasarının tespitinde ve karşı testis hasarının tespitinde JTBS'ye göre apoptotik incelemenin daha sensitif olduğunu saptamamız dikkat çekicidir. Yine çalışmamızda tüm grupların ikişerli değerlendirilmesinde apoptoz ortalamasının JTBS'ye göre istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu saptanmıştır. Çalışmamızın bu bulguları ışığında hafif testiküler torsiyonda iskemi bulgularını göstermede apoptotik incelemenin JTBS'ye göre daha sensitif olduğu söylenebilir.

Karşı taraf testiste hasar oluşumuyla ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Bu hasar mekanizmasında daha çok otoimmünizasyon, sempatik orşiopati ve kan akımında azalma olabileceği düşünülmüş ve buna yönelik çalışmalara ağırlık verilmiştir. Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada karşı testiste seminifer tubül çaplarının ve spermatogenetik aktivitenin azaldığı gösterilmiştir. Bu azalmada otoimmunitenin yeri olduğu gösterilememiştir. Testislerin normal spermatogenetik fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri için düzenli bir kan akımının sağlanması gerekmektedir. Tek taraflı testis torsiyonunda karşı testisteki kan akımının azaldığını gösteren bazı çalışmalar mevcuttur. Tanyel ve arkadaşları tavşanlarda tek taraflı spermatik kord torsiyonu uygulayarak yaptıkları çalışmada karşı testisteki kan akımında azalma olduğunu saptayarak bunun karşı testiste de hasara yol açtığını savunmuşlardır (19).

Dominquez C. ve arkadaşları tek taraflı testis torsiyonu ile ilgili klinik çalışmalarında karşı testiste oluşan hasarın subfertiliteye hatta infertiliteye yol açabileceğini rapor etmişlerdir (64). Nagler ve arkadaşları tek taraflı spermatik kord torsiyonunda, splenektomi veya immunosüpresif tedavi vererek diğer testis

hasarlanmasında otoimmün mekanizmaları araştırdıkları çalışmalarında seminifer tubül çapı ve seminifer tubüldeki spermatozoaları değerlendirerek immün süpresif tedavi ile karşı testisteki hasarın azaldığını göstermişlerdir (63). Bunun sonucunda karşı testisteki etkilenme mekanizmasının immunolojik nedenler olduğunu ileri sürmüşlerdir. Benzer olarak Sade ve arkadaşları uyguladıkları tek taraflı testis torsiyonu sonucunda karşı testisteki hasarın, immünsüpresif etkisi olan kortizonla azaldığını bildirmişlerdir. Hadziselimovich ve arkadaşları testis torsiyonu tanısı alan 17 hastada diğer testisten aldıkları biyopside germ hücrelerinde apoptosis değerlendirmişler ve tüm hastalarda karşı testislerde artmış nekrotik değişiklikler ve apoptozis tespit etmişlerdir (19).

Karşı testisteki hasarı gösteren bir çok klinik ve deneysel çalışmaya karşılık tek taraflı testis torsiyonunda karşı testiste herhangi bir değişiklik olmadığını gösteren çok sayıda deneysel ve klinik çalışmalar da mevcuttur. Ryan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ratlarda tek taraflı testis torsiyonu modelinde diğer testiste immunolojik ya da başka bir mekanizmaya bağlı olarak gelişen hasar saptamamışlardır. Ayrıca Turner ve arkadaşları da yaptıkları deneysel tek taraflı spermatik kord torsiyonunda karşı tarafta hasar tespit edememişlerdir (67). Bir başka hipotez de her iki testisin doğumsal olarak anormal olduğu görüşüdür. Gerçekten de testis torsiyonlu olguların yaklaşık yarısında karşı testiste de anomali vardır. Testis torsiyonlu olgulardaki azalmış fertilitate potansiyeli bu doğumsal anomaliye bağlı olabilir.

Çalışmamızda karşı testisler incelendiğinde testis torsiyonunda karşı testiste de hasar oluştuğunu belirten çalışmalarla uyumlu olarak JTBS ve tunel boyama ile gösterilen apoptozis ortalamaları açısından kontrol ve shama göre anlamlı derecede farklı olduğu tespit edilmiştir. JTBS açısından 2 ve 4 saat torsiyonlu grupların karşı testisleri 1 saat torsiyonlu sol testisle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. Bu bulgu bize 2 ve 4 saatlik torsiyonda karşı testisin 1 saat torsiyonda kalan testis kadar etkilendiğini göstermektedir. 1 ve 2 saat torsiyonlu sağ testislerin sham ile JTBS açısından kıyaslandığında fark olmamasına karşın apoptoz ortalamaları açısından farkın anlamlı olması hafif iskemili sağ testislerin değerlendirilmesinde apoptotik incelemenin daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Yine 1, 2 ve 4 saat torsiyonlu

grupların sağ testisleri kendi aralarında kıyaslandığında torsiyon süresi arttıkça sağ testislerin JTBS'nin düştüğü ve apoptoz ortalamalarının arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgu torsiyon süresi arttıkça karşı testislerin etkilenme derecelerinin arttığını göstermektedir.

Klinik çalışmalarda 4-6 saatlik ve üzeri TT'nun testiste nekrotik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (25, 26). Çalışmada, 2 ve 4 saatlik torsiyon + reperfüzyonlu sol testislerde kontrole göre Johnson Tübül Biyopsi Skorlarının anlamlı derecede düştüğü ve apoptoz ortalamalarının tunel boyama ile anlamlı derecede arttığı benzer şekilde western blot analiziyle DR5 ekspresyonunun da arttığı gözlenmiştir (Şekil 25,26). Bazı karşı görüşlere rağmen, tek taraflı spermatik kord torsiyonunun karşı testiste de hemodinamik ve histolojik değişikliklere yol açtığı artık kabul edilmektedir (9). Özellikle germ hücrelerinde belirgin hasarlanma karşı testisin önemli bulgularındandır. Western blot analiziyle 2T-4R grubunda hiçbir işlem uygulanmayan sağ testis dokularında (şekil 26; 2, 6 ve 9 nolu örnekler) apoptozis gözlenmezken, Sol testis eksplere edildikten sonra kapatılan Sham grubunda ise strese bağlı olarak apoptozun arttığı tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, 1 saatlik iskeminin de spermatogenetik hücrelerde hasar meydana getirdiği bildirilmiştir (25,26). 1 saat torsiyon oluşturulan testisin seminifer tübülleri değerlendirildiğinde tunel boyama ile apoptozis ortalamalarının kontrol, sham ve karşı testisine göre anlamlı derecede yüksek; 2 ve 4 saat torsiyon oluşturulan testislere göre de anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi. Western blot analizinde on örnekten oluşan her grup için ancak dört örnek çalışılmıştır. DR5 reseptörünün ekspresyonunun 1T-4R grubunda gözlenmemesinin seçilen dört örnekle sınırlı olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Testis torsiyonunda, apoptozisin gösterildiği mevcut çalışmalarda (82, 83, 84, 85) DR5 ölüm reseptörü ile yapılan bir çalışmaya rastlanılmadığından bu anlamda çalışmanın literatürde önemli bir boşluğu dolduracağına inanmaktayız.

Tez çalışmamızda özet olarak şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. Testis torsiyonu iskemi-reperfüzyon modeli aynı kişi ve yöntemle yapılmış olsa bile testislerdeki makroskopik ve mikroskopik iskemi bulgularının ratların yaşıyla bağlantılı olarak bireysel farklılık gösterebildiği,

2. Testiste saptanabilir en az hasar oluşturulabilmesi için 1 saatlik bir sürenin gerekli olduğu,
3. 2 saat torsiyon + reperfüzyonla orta derecede, 4 saat torsiyon + reperfüzyonla klinikle uyumlu belirgin derecede iskemi oluşturulabildiği,
4. 1, 2 ve 4 saatlik torsiyon + reperfüzyonlu sol testislerde kontrol ve shama göre Johnson Tübüler Biyopsi Skorlarının anlamlı derecede düştüğü ve apoptoz ortalamalarının anlamlı derecede arttığı,
5. Testiküler iskemi süresi arttıkça orantılı olarak Johnson Tübüler Biyopsi Skorlarının gittikçe düştüğü ve apoptoz ortalamalarının gittikçe arttığı,
6. Tamamen normal olan kontrol ve sham gruplarında da apoptozis gerçekleştiği ve fizyolojik spermatogenezis sırasındaki anormal spermatogonial hücrelerin apoptozisle yok edildiği,
7. Hafif iskemiye bağlı testis hasarının tespitinde ve karşı testis hasarının tespitinde JTBS'ye göre apoptotik incelemenin daha sensitif olduğu,
8. Testis torsiyonunda karşı testiste de JTBS ve apoptozis ortalamaları açısından kontrol ve shama göre anlamlı derecede farklılık olduğu, yani karşı testiste de hasar olduğu,
9. 2 ve 4 saatlik torsiyonda karşı testisin 1 saat torsiyonda kalan testis kadar etkilendiği,
10. Torsiyon süresi arttıkça karşı testislerin etkilenme derecelerinin de arttığı saptanmıştır.
11. 2 ve 4 saatlik torsiyonda western blot analizi ile DR5 reseptörünün ekspresyonunun arttığı ve ölüm reseptörü aracılığı ile apoptozisin gerçekleştiği görülmüştür.
12. Sham grubunda, DR5 reseptörünün ekspresyonunun artması ve ölüm reseptörü aracılığı ile apoptozisin gerçekleşmesi sol testise yapılan işlemde dolayı hayvanın girdiği strese kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

13.1 saatlik torsiyonda DR5 ekspresyonunun saptanamaması, 10 numunelik gruptan ancak rastgele seçilmiş 4 numude western blot analizinin yapılmış olmasına bağlandı.

14.2 saatlik torsiyon grubunda karşı testisin western blot analizi ile durumu değerlendirildiğinde çalışılan örneklerde DR5 ekspresyonu görülmemiştir.

## ÖZET

### **Deneysel Testis Torsiyonunda Apoptozisteki Poli-ADP Riboz Polimeraz (PARP) Yolağının Etkinliği**

Hücre hasarının bir mekanizması olarak gösterilen poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) yolağı, pek çok iskemi reperfüzyon hasarı patogeneğinde yer almaktadır. DNA'da oluşan iplik kırıklıkları, DNA tamir mekanizmalarında görevli olan PARP enzimini aktive etmektedir. Hafif genotoksik zarar PARP aktivasyonunu indükleyerek DNA tamirini sağlamaktadır. Orta derecede hücre hasarında, tamir edilemez derecede DNA hasarı bulunan hücreler apoptoza yönlendirilmektedir. Şiddetli DNA hasarında ise, PARP aşırı aktive olmakta ve hücre içi enerji metabolizmasını çökerterek hücreyi nekroza sürüklemektedir. PARP'ın hafif ve yüksek DNA hasarı durumunda iki farklı yöndeki etkisi dikkat çekicidir. Bu nedenle çalışmamızda testis torsiyonunda hafif iskemi-reperfüzyon hasarında germ hücrelerindeki apoptozis durumu ve PARP etkinliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 44 adet wistar albino rat kullanılmış ve ratlar kontrol, sham, 1, 2 ve 4 saat torsiyon gruplarına ayrılmıştır. Sol testislere 720° torsiyon yapıp detorsiyon sonrası 4 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Deney sonunda sol ve sağ testislere orşiektomi yapılarak testislerdeki iskemi-reperfüzyon hasarı ve apoptoz derecesi histopatolojik olarak, PARP aktivitesi western blot analizi ile gösterilmeye çalışılmıştır.

Çalışmamızda kontrol ve sham gruplarında Johnson Tübüler Biyopsi Skoru (JTBS) normal olmasına rağmen çok düşük düzeyde apoptoz saptanmıştır. 1 saat torsiyon grubunda kontrol ve sham grubuna göre JTBS'nin düştüğü ve apoptoz ortalamasının arttığı tespit edilmiştir. Ancak bu değerlerin yüksek olmadığı 2 ve 4 saat torsiyonlu grupların sağ testis değerlerine yakın olduğu görülmüştür. 2 ve 4 saat torsiyon gruplarında da kontrol, sham ve 1 saat torsiyon gruplarına göre JTBS'nin düştüğü ve apoptozun arttığı tespit edilmiştir. 1 ve 2 saat torsiyonlu sağ testislerde shama göre JTBS açısından fark olmamasına karşın apoptoz ortalamaları yüksek saptanmıştır. JTBS açısından 2 ve 4 saat torsiyonlu grupların karşı testisleri 1 saat torsiyonlu sol testisle kıyaslandığında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmemiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda testiste saptanabilir en az hasar oluşturulabilmesi için 1 saatlik bir sürenin gerekli olduğu, testiküler iskemi süresi arttıkça orantılı olarak JTBS'nin gittikçe düştüğü ve apoptoz ortalamalarının gittikçe arttığı, 2 ve 4 saatlik torsiyonda karşı testisin 1 saat torsiyonda kalan testis kadar etkilendiği, hafif iskemiye bağlı testis hasarının tespitinde ve karşı testis hasarının tespitinde JTBS'ye göre apoptotik incelemenin daha sensitif olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, İskemi-Reperfüzyon, PARP, Testis, Torsiyon



## SUMMARY

### **The Efficiency of PARP (Poli-ADP Riboz Polimeraz) Pathway at Apoptosis in the Experimental Model of Testes Torsion.**

The ADP-ribose polymerase (PARP) pathway, indicated as a damage mechanism for cells, is implicated in many ischemic reperfusion damage pathogenesis. DNA strand breaks activate the PARP enzyme as part of the DNA repair mechanism. Mild genotoxic damage induces the PARP activation for DNA repair. In moderate cell damage, the cells with excessive DNA damage beyond a repairable level undergo apoptosis. In severe DNA damage, PARP is over activated and steers the cell towards necrosis by crushing the intracellular energy metabolism. Two distinct effects of PARP in mild and severe DNA damage are noteworthy. As a result, in our study, apoptosis response and PARP activity was shown in mild ischemic reperfusion damage in germ cells due to testicular torsion.

In our study, a total of 44 Wistar Albino rats were included, and divided into control, sham, as well as 1, 2 and 4 hour torsion groups. Left testes were subjected to 720° of torsion followed by 4 hours of reperfusion. Finally, the ischemic reperfusion damage and the apoptosis level in left and right testes were evaluated histopathologically and the PARP activity was assessed using western blot analysis.

In our study, the JTBS was normal in the controls and the sham group, accompanied by very low levels of apoptosis. In the 1 hour torsion group, the JTBS was lower compared to the controls and the sham group and the average apoptosis level was higher. On the other hand, these levels were not drastically high and comparable to the right testis levels of the 2 and 4 hour torsion groups. In the 2 and 4 hour torsion groups, the JTBS was also lower and the apoptosis levels higher in comparison to the controls as well as the sham and 1 hour torsion groups. While there was no difference in the JTBS between the 1 and 2 hour torsion groups and the sham group, the average apoptosis levels of the former were higher. No statistically significant differences were found between the opposite testes of the 2 and 4 hour torsion groups and the left testis of the 1 hour torsion group in terms of the JTBS.

In conclusion, the minimum torsion duration for discernible testis damage was determined to be 1 hour, the JTBS was lower and the average apoptosis levels were higher in proportion to the duration of the testicular ischemia, the opposing testis was affected at a level corresponding to a 1 hour torsion when the actual testes underwent 2 and 4 hours of torsion, and the apoptotic examination was more sensitive to determine the testicular damage in mild ischemia and the opposing testicular damage compared to the JTBS.

**Keywords:** Apoptosis, Ischemia- reperfusion, PARP, Testes, Torsion,

## KAYNAKLAR

1. Kolski MJ, Mazelewski PJ: Effects of hyperbaric oxygen therapy on testicular ischemia reperfusion injury. *J Urol* (1998) 160: 601-602.
2. Conran RS, Kumar V, Collins T, Robins Pathologic Basis of Disease. 6.th Edition, 1-88, 1999
3. Davidovic L, Vodenicharov M, Affar EB, Poirier GG. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res*. 2001 1;268(1):7-13.
4. Malanga M, Althaus FR. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. *Biochem Cell Biol* 2005;83(3):354-64.
5. Quénet D, El Ramy R, Schreiber V, Dantzer F. The role of poly(ADP-ribosylation) in epigenetic events. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jan;41(1):60-5. Epub 2008 Aug 14.
6. Kauppinen TM, Suh SW, Genain CP, Swanson RA. Poly (ADP-Ribose) polymerase-1 activation in a primate model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 2005;81(2):190-8.
7. Yu SW, Wang H, Dawson TM, Dawson VL. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol Dis*. 2003 Dec;14(3):303-17.
8. Kim MY, Zhang T, Kraus WL. Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PARlaying' NAD<sup>+</sup> into a nuclear signal. *Genes Dev* 2005;19(17):1951-67.
9. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histopathology of prepubertal rat testis subjected to various duration of spermatic cord torsion. *J Androl* 7 (1986), 23-31.
10. Savaş Ç, Dindar H, Aras T, Yücesan S. Pentoxifylline improves blood flow to both testis in testicular torsion. *Int Urology and Nephrology* (2002) 33, 81-85.
11. Colettis PN, Stowe NT, Inman SR. Acute spermatic cord torsion alters the microcirculation of the contralateral testicular blood flow. *J. Urol* (1996) 155, 350-354.
12. S. Cuzzocrea, D.P. Riley, A.P. Caputi et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation and ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53 (2001) 135-159.
13. K. Takahashi, J.H. Greenberg, P. Jackson et al. Neuroprotective effects of inhibiting Poly(ADP-ribose) synthetase on focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb Blood Flow Metab* 17 (1997), 1137-1142
14. Bozlu M, Eskandari G, Çayan Selahittin The effect of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibitors on biochemical changes in testicular ischemia-reperfusion injury. *The Journal Of Urology* (2003) 169, 1870-1873
15. Linder HH. The male genital sistem: Clinical Anatomy. Linder HH Appleton and Lange, California 1989; 182, 495-511.
16. Johnson EK. Male Reproductive System: Histology and Embryology. Johnson EK A Wiley Medical Publication, New York 1984; 246 (5 pt 2), 698-704.
17. Ross M. Kaye G. Pawlina W. Histology a text and atlas with cell and molecular biology.2003;683-714

18. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N. Temel Üroloji: ürogenital organların anatomik ve histolojik yapısı.2007;16
19. TEKCAN M. "Varikosel ile indüklenen testiküler hasarın oluşumunda poli ADP-riboz polimeraz (PARP) yolağının rolü". 2009;8
20. DELİKTAŞ H. "Testis torsiyonuyla testiste oluşan hasarın onarımında L-karnitinin etkinliği". 2007;12
21. Shukla RB. Association of cold weather with testicular torsion. Br Med J 1982; 285:1459-62
22. Moslemi MK, Abedinzadeh M, Al-Mousawi S. Torsion of Testis in an Infant with Unilateral UDT. Case Report Med. 2010;2010:438530.
23. JONES P. Torsion of the testis and its appendages during childhood. Arch Dis Child. 1962 Apr;37:214-26.
24. Yurtçu M."Testis torsiyonundaki iskemi reperfüzyon hasarını önlemede tek doz ve yedi günlük melatonin ve steroid tedavisinin etkilerinin araştırılması" 2003;3
25. Kerr JF, Whiyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 1972; 26 (4), 239-257.
26. Jhunjhunwala JS, Sinha Hikim AS, Budd CA, Chakraborty J. Germ Cell Degeneration in the Contralateral testis of the Guinea Pig with Unilateral Torsion of the Spermatic Cord. Quantitative and Ultrastructural Studies. J Androl 1986; 7: 16-22.
27. Al-Salem AH. Intrauterine testicular torsion: a surgical emergency. J Pediatr Surg. 2007 Nov;42(11):1887-91.
28. Turner TT. Acute experimental testicular torsion. No effect on the contralateral testis. J Androl. 1985 Jan-Feb;6(1):65-72.
29. Somani BK, Watson G, Townell N. Testicular torsion. BMJ. 2010 Jul 27;341:c3213.
30. Sells H, Moretti KL, Burfield GD. Recurrent torsion after previous testicular fixation. ANZ J Surg. 2002 Jan;72(1):46-8.
31. Kar A. "Deneysel tek taraflı spermatik kord torsiyonunda aynı ve karşı taraf testislerdeki histopatolojik ve biyokimyasal değişikliklere polimeraz enzim inhibitörünün erken ve geç dönem etkileri". 2008; 3-4.
32. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. Mol Aspects Med. 2004 Feb-Apr;25(1-2):199-210.
33. Corbett HJ, Simpson ET. Management of the acute scrotum in children. ANZ J Surg. 2002 Mar;72(3):226-8.
34. Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M, Cosentino MJ. Spermatic cord torsion: effects of cyclosporine and prednisone on fertility and the contralateral testis in the rat. J Androl. 1990 Sep-Oct;11(5):401-8.
35. Rodriguez MG, Rival C, Theas MS, Lustig L. Immunohistopathology of the contralateral testis of rats undergoing experimental torsion of the spermatic cord. Asian J Androl. 2006 Sep;8(5):576-83

36. M. James C, Msao N, Ronald R, Abraham T.K. Histological changes occurring in the collateral testis of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *J Urol* 1985; 133, 906-911.
37. Cesarano TS, Nachtsheim DA, Otero F, Parsons CL. The effect of testicular torsion on contralateral testis and a production of antisperm antibodies in rabbits. *J Urol* 1984; 132, 577-579.
38. Melikoğlu M, Güntekin E, Erkılıç M and Karaveli S. Contralateral testicular blood flow in unilateral testicular torsion measured by the <sup>133</sup>Xe clearance technique. *Br. J Urol* 1992; 69, 633-635
39. Kerr J.F.R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. 2002;181-182: 471-74.
40. Doğan Ş. "Seminal plazma reaktif oksijen türlerinin(ROS) sperm DNA fragmentasyonu ve apoptozu sürecinde infertiliteye olan etkisinin değerlendirilmesi."2008;14
41. Lachaud C, Tesarik J., Cañadas, M.L. and Mendoza, C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod*. 2004; 19(3):607-10.
42. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4): 495-516.
43. Marchetti C, Marchetti P. [Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2005 Sep;33(9):669-77.
44. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 2001;15:2922-33.
45. Doğan Ş. Kovalı M. Programlı Hücre Ölümü ve Spermatozoon. 2010;201-205
46. Weng S.H., Taylor S.L., Morshedi M., Schuffner A. ve ark. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod*. 2002.8(10):984-91.
47. Suk Jin Hong, Ted M. Dawson " Nuclear and mitochondrial conversation cell death: PARP-1 and AIF signaling." *Trends in pharmacological sciences* vol.25 no.5 may 2004
48. C. John Giammona, Pragati Sawhney, Yamini Chandrasekaran, and John H. Richburg. Death Receptor Response in Rodent Testis after Mono-(2-ethylhexyl) Phthalate Exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* 185, 119–127 (2002)
49. Donepudi M., Grutter M.G. Structure and zymogen activation of caspases. *Biophysical Chemistry* 2002;101 -102:145-53
50. Chen H, Liu J, Luo L, Baig MU, Kim JM, Zirkin BR. Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol* 2005;40(8-9):728-36.
51. Zini A, Schlegel PN. Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *J Androl* 1996;17(5):473-80.
52. Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J Androl* 1992;13(5):450-5.
53. Banfi B, Molnar G, Maturana A, et al. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 2001;276(40):37594-601.

54. Kumagai A, Kodama H, Kumagai J, et al. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* 2002;8(2):118-23.
55. Brightwell M, Shall S. Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase in *Physarum polycephalum* nuclei. *Biochem J* 1971;125(3):67P.
56. Purnell MR, Whish WJ. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem J* 1980;185(3):775-7.
57. Agarwal A, Mahfouz RZ, Sharma RK, Sarkar O, Mangrola D, Mathur PP. Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009 Dec 5;7:143.
58. Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Perez JM. Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications. *Prog Biophys Mol Biol* 2005;88(1):143-72.
59. Menissier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, et al. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *Embo J* 2003;22(9):2255-63.
60. Burkle A. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD<sup>+</sup>. *Febs J* 2005;272(18):4576-89.
61. Germain M, Affar El B, D'Amours D, Dixit V. M., Salvesen G. S, and. Poirier G: Cleavage of Automodified Poly(ADP-ribose) Polymerase during Apoptosis. *J Biol Chem* 1999, 274(40): 28379-28384.
62. Ame JC, Spelnhauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays* 2004;26(8):882-93.
63. Wang ZQ, Auer B, Stingl L, et al. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev* 1995;9(5):509-20.
64. Dantzer F, Giraud-Panis MJ, Jaco I, et al. Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol Cell Biol* 2004;24(4):1595-607.
65. Augustin A, Spelnhauer C, Dumond H, et al. PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 8):1551-62.
66. Van Zon A, Mossink MH, Schoester M, et al. The formation of vault-tubes: a dynamic interaction between vaults and vault PARP. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 21):4391-400
67. Kaminker PG, Kim SH, Taylor RD, et al. TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem* 2001;276(38):35891-9.
68. Sinha Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS: Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003, 85(2-5):175-182.
69. Kotoglou P, Kalaitzakis A, Vezyraki P, Tzavaras T, Michalis LK, Dantzer F, Jung JU, Angelidis C: Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. *Cell Stress Chaperones* 2009, 14(4):391-406.

70. Dantzer F, de La Rubia G, Menissier-De Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G, Schreiber V: Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Biochemistry* 2000, 39(25):7559-7569.
71. Parsons JL, Dianova II, Allinson SL, Dianov GL: Poly(ADP-ribose)polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts. *FEBS J* 2005, 272(8):2012-2021.
72. Quenet D, El Ramy R, Schreiber V, Dantzer F: The role of poly(ADP-ribosyl)ation in epigenetic events. *Int J Biochem Cell Biol* 2009, 41(1):60-65.
73. Ullrich O, Reinheckel T, Sitte N, Hass R, Grune T, Davies KJ: Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96(11):6223-6228.
74. Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem* 2000;275(52):40974-80.
75. von Kobbe C, Harrigan JA, Schreiber V, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 regulates both the exonuclease and helicase activities of the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res* 2004;32(13):4003-14.
76. Oei SL, Ziegler M. ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose). *J Biol Chem* 2000;275(30):23234-9.
77. Rouleau M, Aubin RA, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 6):815-25.
78. Saxena A, Wong LH, Kalitsis P, Earle E, Shaffer LG, Choo KH. Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc. *Hum Mol Genet* 2002;11(19):2319-29.
79. Cook BD, Dynek JN, Chang W, Shostak G, Smith S. Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol* 2002;22(1):332-42.
80. Sbodio JI, Lodish HF, Chi NW. Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). *Biochem J* 2002;361(Pt 3):451-9.
81. Agarwal A, Said TM: Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU international* 2005, 95(4):503-507.
82. Baum JS, St George JP, McCall K: Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol* 2005, 16(2):245-259.
83. Li Y, Oh HJ, Lau YF. The poly (ADP-ribose) polymerase 1 interacts with Sry and modulates its biological functions. *Mol Cell Endocrinol* 2006;257-258:35-46.
84. Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Jacobson EL, Jacobson MK. Poly (ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(5):920-6.
85. Atorino L, Alvarez-Gonzalez R, Cardone A, Lepore I, Farina B, Quesada P. Metabolic changes in the poly(ADP-ribosyl)ation pathway of differentiating rat germinal cells. *Arch Biochem Biophys* 2000;381(1):111-8.

86. Maleki S, Keeney S. Modifying histones and initiating meiotic recombination; new answers to an old question. *Cell* 2004;118(4):404-6.
87. Johnsen SG. Testicular biopsy score count-- a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970;1(1):2-25.
88. Turner TT. Acute experimental testicular torsion. *Journal of Andrology* 1985: 65-73
89. Chatterjee P.K, Cuzzocrea S. and Thiernemann C. Inhibitors of Poly (ADP-ribose) synthetase protect rat proximal tubular cells against oxidant stress. *Kidney Int* 56 (1999),973-984.
90. Greenstein A, Smith-Harrison LI, Wakely PE, Kololgi S, Salzberg AD, Koontz WW, The effect of polyethylene glycol-superoxide dismutase administration on histological damage following spermatic cord torsion. *J Urol* 1992; 148: 639-41.
91. Jha R, Agarwal A, Mahfouz RZ, Paasch U, Grunewald S, Sabanegh E, et al. Determination of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) homologues in human ejaculated sperm and its correlation with sperm maturation and sperm cell stability. *Fertil Steril* 2008;91:782-790.
92. Atorino L, Di Meglio S, Farina B, Jones R, Quesada P. Rat germinal cells require PARP for repair of DNA damage induced by gamma-irradiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. *Eur J Cell Biol* 2001;80:222-9.