



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TESTİSTE OLUŞTURULAN İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE
MONTELUKAST' IN KORUYUCU ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba CAN ŞAHİN

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ

2016



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TESTİSTE OLUŞTURULAN İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE
MONTELUKAST' IN KORUYUCU ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba CAN ŞAHİN

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ

KABUL VE ONAY SAYFASI

TUĞBA CAN ŞAHİN' in Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Testiste Oluşturulan İskemi/Reperfüzyon Hasarı Üzerine Montelukast' in Koruyucu Etkisi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih:20.01.2016

Üye : PROF. DR. CENGİZ BAYÇU,

Üye : PROF. DR. VAROL ŞAHİNTÜRK

Üye : DOÇ. DR. HAKAN ŞENTÜRK

Üye : YRD. DOÇ. DR. DİLEK BURUKOĞLU DÖNMEZ

Üye : YRD. DOÇ. DR. HAKAN AY

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/01/2016 tarih ve 1075/2016 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

Enstitü Müdürü

Özet

Testiste Oluşturulan İskemi Reperfüzyon Modelinde Montelukast' ın Koruyucu Etkisi

Testis torsiyon ve detorsiyonu organda iskemi-reperfüzyon (İR) hasarına yol açar. Spermatik kord torsiyonu, çoğunlukla bebeklik ve adolesan çağlarında görülen ürolojik bir acildir. Montelukast ise astım tedavisinde kullanılan bir sisteinil lökotrien antagonistidir. Biz çalışmamızda testiküler İR hasarına karşı Montelukast' ın koruyucu etkisini araştırmayı amaçladık.

Deneyimizde 21 adet, 200 - 250 gr ağırlığında erişkin erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 7 adet olmak üzere randomize edilerek kontrol + serum fizyolojik (SF), İ/R + montelukast (ML), İ/R + SF grupları olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Cerrahi girişim öncesi, deney hayvanlarına i.m. yolla 70 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin uygulanarak anestezi sağlandı. Kontrol grubuna hiçbir cerrahi işlem uygulanmadı ve histolojik değişkenleri belirlemek için kullanıldı. Torsiyon, sol testisin spermatik kordonun 720° saat yönünün tersine çevrilmesiyle oluşturuldu. Detorsiyon ise 6 saat torsiyondan sonra testisin eski pozisyonuna getirilmesiyle sağlandı. İ/R gruplarında SF veya montelukast (10mg/kg ip.), detorsiyondan 30 dakika önce uygulandı ve 1 saat detorsiyone edildi. Deney sonunda meydana gelen değişiklikler ışık mikroskopunda ve konfokal mikroskopta değerlendirildi.

İ/R grubundaki incelemelerimizde çok çekirdekli dev hücre, tübüler atrofi, vakuolizasyon, damar konjesyonu, bazal membran ayrılması, germ hücre hasarı gözlemlendi. İR + ML grubunda ise tübüler atrofi, dev hücre, damar

konjesyonu, seminifer túbüllerde germ hücre hasarı ve bazal membran ayrılması parametrelerinin azaldığı gözlemlendi.

Sonuç olarak tek taraflı testiste torsiyon-detorsiyon uygulanarak oluşturulan İ/R modelinde montelukast tedavisinin etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmada, histopatolojik parametrelerdeki bozulmanın, montelukast uygulanmasıyla azaldığı gözlemlendi. Bu deneysel çalışmanın verileri, montelukast tedavisinin testis torsiyonunda kullanılabilirliğinin araştırılması gerektiğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Montelukast, İskemi, Reperfüzyon, Torsiyon, Testis

Summary

Protective Effect of Montelukast on Torsion and Detorsion Injury in Rats

Testicular torsion and detorsion causes ischemia/reperfusion (I/R) injury. Torsion of the spermatic cord is a urological emergency that can mostly occur at adolescent males. Montelukast is a leukotriene receptor antagonist (LTRA) used for the maintenance treatment of asthma. In this study, we aimed to investigate that the protective effect of montelukast on ischemia/reperfusion induced injury.

In our study, 21 adult male Wistar Albino rats, weighing 200-250 g, were used. Experimental animals randomly divided into 3 groups containing 7 rats per each group as control+ serum physiologic, I/R + montelukast (ML), I/R + serum physiologic. Rats were anesthetized intramuscularly with 70 mg / kg ketamine and 10 mg / kg xlazyme before the surgical process. The control group was used as control for histological parameters. Torsion, was created by rotating the left testis 720° in a counter clockwise direction for 6h. Detorsion was created by repositioning testis after 6-h-torsion. I/R group was applied to left testis for 6-hour torsion then 1-hour detorsion and testis were collected after dissecting the rats. In ML group, was treated with montelukast 30 minute before the detorsion with i. p (10mg/kg) injection. The animals were killed under the anesthesia and testis tissues were removed.

As a result, in I/R group, tubuler atrophy, vacualization, basal membran seperation, degenerations, loss of germ cell and widening of interstitial space were observed.

Consequently, results indicated that treated with I/R + ML group was injured less than the I/R group. This experimental data have shown that more research were needed for montelukast to use testicular ischemia treatment.

Key Words: Montelukast, Ischemia, Reperfusion, Torsion, Testis

Tablo Dizini

Tablo 1: Bouin fiksatif takip süreleri.....	61
Tablo 2: H&E boyama prosedürü.....	62
Tablo 3: PAS boyama prosedürü.....	64
Tablo 4: Kontrol, İ/R ve İ/R + ML grubunu oluşturan sıçanların testis seminifer tübül çapı ölçümleri (μ).	77
Tablo 5: Kontrol, İskemi/Reperfüzyon ve İ/R + Montelukast grubunu oluşturan sıçanların germinal hücre sayımı sonuçları.....	79
Tablo 6: Kontrol, İskemi/Reperfüzyon ve Montelukast \pm İ/R grubunu oluşturan sıçanların Leydig hücre sayımı sonuçları.....	81
Tablo 7: Sıçanların gruplarına göre ortalama sol testis ağırlıkları (g).....	82
Tablo 8: : Deney gruplarına göre ortalama sağ testis ağırlıkları (g).....	83
Tablo 9: Sıçanların gruplarına göre toplam testis ağırlıkları (g).....	84
Tablo 10: Sıçanların gruplarına göre testis ağırlıkları indeksi (%).....	85

Şekil Dizini

Şekil 1: A- İnvajinal testis torsiyonu B- Ekstravajinal testis torsiyonu
C- Testis ve eklerinde testis torsiyonu.....21

Şekil 2: Serbest Oksijen Radikallerinin oluşumu37

Şekil 3: Hücre apoptozisi ve nekrozisi41

Şekil 4: Montelukastın moleküler yapısı53

Şekil 5: Cerrahi işlemler. (A): Skrotum açılarak serbest hale getirilen ve skrotumun dışına çıkarılan testis. (B): Serbest hale getirilen testis ve spermatik kordun torsiyone edilmesi. (C): Torsiyon işleminden sonra skrotuma geçici suture uygulanması. (D): 6 saatlik torsiyon sonrasında spermatik kordun ve testisin görünümü. (E): 6saatlik torsiyon + 1 saatlik reperfüzyon sonrası spermatik kordun ve testisin görünümü. (F): Deney sonrası testisin alınması.....58

Şekil 6:(a) Deney sonrasında alınan torsiyon uygulanmamış testis. (b) Torsiyon ve detorsiyon uygulanmış iskemi/reperfüzyon hasarı olan testis.....59

Şekil 7: Kontrol grubu: Kontrol grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü.....68

Şekil 8: Kontrol grubu: Kontrol grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü.....69

- Şekil 9:** İskemi/reperfüzyon (İ/R) grubu: İskemi/reperfüzyon grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü.....70
- Şekil 10:** İskemi/reperfüzyon (İ/R) grubu: İskemi/reperfüzyon grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü.....71
- Şekil 11:** İskemi/reperfüzyon (İ/R) grubu: İskemi/reperfüzyon grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü.....72
- Şekil 12:** İskemi/reperfüzyon (İ/R) + Montelukast (ML) grubu: İskemi/reperfüzyon (İ/R) + Montelukast (ML) grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü.....73
- Şekil 13:** İskemi/reperfüzyon (İ/R)+Montelukast (ML) grubu: İskemi/reperfüzyon (İ/R)+Montelukast (ML) grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü.....74
- Şekil 14:** (a,b): Kontrol grubu, (c,d): İskemi/reperfüzyon (İ/R) grubu (e,f): İskemi/reperfüzyon (İ/R)+Montelukast (ML) grubunu oluşturan sıçan testislerinin konfokal mikroskop görüntüsü.....75
- Şekil 15:** Tübül çapı ölçümü görüntüsü.....76
- Şekil 16:** Testis tübül çapı ölçümü sonuçları.....77

Şekil 17: Germ hücre sayımı görüntüsü.....	78
Şekil 18: Germ hücre sayımı sonuçları.....	79
Şekil 19: Leydig hücre sayımı görüntüsü.....	80
Şekil 20 : Leydig hücre sayımı yönünden karşılaştırma sonuçları.....	81
Şekil 21: Sol testis ağırlıkları (g).....	82
Şekil 22: Sağ testis ağırlıkları (g).....	83
Şekil 23: Toplam testis ağırlıkları (g).....	84
Şekil 24: Testis ağırlıkları indeksi (%).....	85

Simge ve Kısaltmalar Dizini

ABP	Androjen bağlayıcı protein
AMH	Antimüllerian hormon
Apaf-1	Apopitoz aktive edici faktör
ATP	Adenozin trifosfat
cAMP	Döngüsel adenozin monofosfat
CysLT	Sisteinil Lökotrienler
DNA	Deoksiribonükleik asit
FSH	Folikül stimülan (uyarıcı) hormon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
hCG	İnsan koryonik gonadotropin hormonu
H-E	Hematoksilin-Eozin
İ/R	İskemi / Reperfüzyon
i.p.	İntraperitoneal (periton içi)

İNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KAT	Katalaz
LH	Luteinizan hormon
LTD4	Lökotrien D4
MDA	Malondialdehit
ML	Montelukast
NADPH oksidaz	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
OH	Hidroksil
PAS	Periyodik Asit Schiff
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri

SRY	Y kromozomunun cinsiyeti belirleyen bölgesi
TAİ	Testis ağırlık indeksi
TICAM	Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
T/D	Torsiyon / Detorsiyon
TBF	Testis belirleyici faktör
TNF	Tümör nekrozis faktör
5-HETE	5- Hidroksieikozatetraenoik asit

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince büyük bir emek ve hoşgörüyle akademik hayatımı şekillendiren, bana yol gösteren değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ' e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında eğitimim boyunca benden bilgi ve birikimlerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Cengiz BAYÇU' ya ve Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK' e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Lisans öğrenimimde bilgi ve birikimlerinden yararlanmaya başladığım, yüksek lisansta da beni yalnız bırakmayan, benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mehtap KUTLU' ya teşekkür ederim.

Araştırmamda kullandığım Montelukast' ı temin etmemde yardımcı olan Abdi İbrahim İlaç Sanayi A.Ş' ye teşekkür ederim.

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde TUBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Tez Bursuyla maddi destek sağlayan TUBİTAK BİDEB' e teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren araştırma görevlisi arkadaşlarım Erhan Şahin, Ezgi Bektur ve Duygu Kayıkcıoğlu' ya, Huri Çınar ve Fatma Yaz' a çok teşekkür ederim.

Benimle beraber uykusuz kalan, benden desteğini ve gülümsemesini eksik etmeyen canım eşim Engin Şahin' e sonsuz teşekkür ederim.

Tuğba CAN ŞAHİN

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	1
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Testis Anatomisi	6
2.2. Testisin Embriyolojisi.....	9
2.3. Testisin Histolojisi	12
2.3.1. Seminifer Tübüller	13
2.3.2. Spermatogenez.....	14
2.3.3 Spermiyogenez	15
2.3.3.1. Golgi Fazı	15
2.3.3.2. Akrozomal Evre:	16
2.3.3.3. Olgunlaşma Evresi:.....	17
2.3.4. Miyoid Hücreler	17
2.3.5. Sertoli Hücreleri	18
2.4. Testis Torsiyonu	20
2.4.1.Torsiyonun Fertilite ve Karşı Testis Üzerine Etkileri	22
2.4.2. İskemi ve Reperfüzyon.....	24
2.4.2.1. Akut Hücre Zedelenmesinin Nedenleri	25
2.4.2.2. Geri Dönüşümlü Zedelenme	25
2.4.2.3. Geri Dönüşümsüz Zedelenme	26
2.4.2.4. Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi	27
2.5. Serbest Radikaller.....	29
2.5.1. Serbest Radikal Kaynakları	30

2.5.2. Lipid Peroksidasyonu	31
2.6. Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü)	38
2.6.1. Testiste Apoptozisin Rolü	46
2.7. Eikozanoidler	47
2.7.1. Siklooksijenaz Ürünleri	48
2.7.2. Lökotrienler ve Diğer Lipoksijenaz Ürünleri	49
2.7.3. Montelukast	52
2.7.3.1. Montelukastın Yan Etkileri	54
3. GEREÇ VE YÖNTEM	55
3.1. Deney Hayvanları	55
3.2. Kimyasallar ve Cerrahi Gereçler	55
3.3. Cerrahi İşlemler	55
3.4. Testis Ağırlıklarının Ölçümü	59
3.5. Histolojik Yöntem	60
3.5.1. Mikroskopik İncelemeler İçin Dokuların Hazırlanması	60
3.6. İstatistiksel Analiz	65
4. BULGULAR	66
4.1. Mikroskopik Bulgular	66
4.2. İstatistiksel Bulgular	76
4.2.1. Seminifer Tübül Çapı Ölçümü	76
4.2.2. Germ Hücre Sayımı Sonuçları	78
4.2.3. Leydig Hücre Sayımı Sonuçları	80
4.2.4. Testis Ağırlık Ölçümü	82
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
KAYNAKLAR	93

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Spermatik kord torsiyonu, çoğunlukla bebeklik ve adolesan çağlarında görülen ürolojik bir acildir (Ozturk, Ozturk, Gideroglu, Terzi, & Bugdayci, 2010). Testiküler torsiyonda oluşan iskemi reperfüzyon (İR), spermatogenezisin sürdürülebilmesi açısından, akut olarak tedavi edilmesi gereken önemli bir hasardır. Testiküler torsiyonun 4-6 saat içinde tedavi edilememesi durumunda germ hücre kaybı meydana gelmektedir (Isikdemir et al., 2014). Cerrahi girişime rağmen testis torsiyonu olan hastaların % 40-60'ında testiküler atrofi ve infertilite ortaya çıkmaktadır. Bu açıdan testiküler İR'nin tedavisinde etkili olabilecek etken maddeler üzerinde araştırmalar yapmak infertilitenin önlenmesi açısından önemlidir.

İskemik dokularda canlılığı korumak için temel prensip, reperfüzyonun sağlanmasıdır. Bu nedenle testis torsiyonlu olgulara zaman geçirmeden müdahale edilmelidir (Altunoluk, Bakan, Ciralik, & Tolun, 2011). Ancak, testis torsiyonunun düzeltilmesinden sonra bu kez reperfüzyon ile oluşan hasarlanma ortaya çıkmaktadır (Beytur, Ciftci, Oguz, Oguzturk, & Yilmaz, 2012).

Reperfüzyon hasarı nötrofil infiltrasyonu ve serbest oksijen radikallerinin (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikal) artışıyla yakından ilişkili bulunmuştur (Cuzzocrea, Riley, Caputi, & Salvemini, 2001). Oluşan serbest oksijen radikallerinin mitokondri ve hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonu yoluyla membran geçirgenliğinde artışa veya membran bütünlüğünde bozulmaya, protein denatürasyonuna ve DNA hasarına yol açtığı (Cuzzocrea et al., 2001), sonuçta iskemi nedeniyle oluşan germ hücre hasarının daha da arttığı belirlenmiştir. Çeşitli antioksidan ve terapötik ajanların kullanılmasıyla bu hasarların azaltılabildiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Lysiak, 2002).

Sisteinil lökotrienler (CysLT) araşidonik asitin 5-lipooksijenaz yolağı üzerinden ortaya çıkardığı inflamasyonda önemli rol oynayan proinflamatuvar mediatörlerdir (Vollmar et al., 1989). Etkilerini hücre membranında yerleşmiş kendilerine özgü reseptörleri aktive etmek suretiyle yaparlar. Daha çok mast hücresi, bazofil ve endotel hücresinden saliverilirler. Damar geçirgenliğinde artış, dokuda inflamatuvar hücre birikimi ve ödeme sebep olurlar. Montelukast (ML), sisteinil lökotrien reseptör antagonisti olup, klinikte bronşiyal astım ve alerjik rinit gibi hastalıklarda uzunca süredir başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Montelukast, pranlukast, zafirlukast gibi lökotrien antagonisti ajanlar, proinflamatuvar biyoaktif mediatörler olan CysLT'lerin sentezini ya da etkilerini bloke ederler. Montelukast ve zafirlukast lipooksijenaz ürünü eikozanoid yapılı otakoid olan sisteinil lökotrien D4 (LTD4) ve LTE4'ün bronş düz kasları ve kapiller endotelinde bulunan reseptörlerini bu maddelerle yarışmaya girerek bloke ederler ve lökotrienlerin inflamasyondaki etkilerini engellerler.

Lökotrienlerin, astım, peptik ülser ve iskemi/reperfüzyon gibi bir çok hastalık/oluşumda daha fazla salınımı olduğu gözlenmektedir. Bu bilgi dahilinde, ML çocuklarda ve yetişkinlerde astım ilacı olarak olarak kullanılmaktadır.

Akut inflamasyonda, kemotaktik mediatör olan nötrofiller ilk olarak iskemik alana göç ederler ve reaktif oksijen türlerinin, proteazların, elastazların ve myeloperoksidazların salınımlarını yaparlar. Böylece, farmakolojik stratejilerle, nötrofil güçlendirmesi ve ayrıca reperfüzyon kaynaklı hasar oluşması sınırlandırılabilir (Ozkan et al., 2010). Bir diğer taraftan da, LTD4 reseptörüne bağlanmasıyla ortaya çıkan antiinflamatuvar özelliği, ML' nin oksidatif hasara karşı koruyuculuğunda belirgin pozitif etki sağlamaktadır (Isikdemir et al., 2014). Bu araştırmada testiküler

torsiyonda ML'nin koruyucu ve iyileştirici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Anatomisi

Testisler, sperm üreten ve sentezleyen, androjenleri salgılayan, karın boşluğunun dışında skrotum içerisinde yer alan, bir çift ovoid şekilli organdır. Büyüklükleri kişiden kişiye değişmekle beraber, ortalama 4-5cm uzunluğunda, 2-3cm genişliğinde, 2-3cm kalınlığında ve 20-30gr ağırlığındadır. Testisler yaklaşık aynı büyüklükte olmalarına karşın sol testis sağ testise göre biraz daha aşağıda yer almaktadır. Normal spermatogenez için 34°C-35°C gereklidir ve bu yerleşimleri testislerin vücut ısısından 2°C- 3°C daha düşük bir ısıda olmalarını sağlar (Kierszenbaum, 2006). Her bir testis anterior abdominal duvarın tabakalarıyla devamlılık gösteren ve skrotumun içerisine uzanan uzun bir muskulofasiyal kesenin ucunda asılıdır. Testisler, vas deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordonlar tarafından abdominal duvara bağlıdır ve gubernakulumun kalıntıları olan skrotal ligamentler ile skrotuma bağlanmışlardır (Ross & Pawlina, 2006).

Testisler karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Testislerin temel görevlerini yapabilmeleri için karın boşluğuna inmeleri gerekmektedir. Testisler, bu iniş sırasında karın ön duvarı tabakalarını da sürüklerler. Bu nedenle şu tabakalara sahiptirler:

- a) Deri
 - b) Tunika dartos
 - c) Fasia spermatika eksterna
 - d) Fasia kremasterika
 - e) Fasia spermatika interna
 - f) Tunika vaginalis testis
 - g) Tunika albuginea
 - h) Tunika vaskuloza
- } Skrotum

Testisin fascia medialis (iç yan yüz) ve fascia lateralis (dış yan yüz) olmak üzere iki yüzü, margo anterior (ön kenar) ve margo posterior (arka kenar) olmak üzere iki kenarı ekstremities süperior (üst uç) ve ekstremities inferior (alt uç) olmak üzere de iki ucu vardır (Drews, 2000).

Testislerin çevresinde fibromusküler yapıda bağ dokusu bulunur. Tunika albuginea adı verilen bu doku, mediastinum testis bölümünde kalınlaşır ve buradan çıkan fibröz septumlar testisi 250- 300 kadar lobuli testise böler. Her lobülde yaklaşık dört adet, kıvrımlı yapıda, ana işlevi sperm üretimi olan seminifer tübül bulunur (Gartner & Hiatt, 2012). Her bir seminifer tübül yaklaşık 150µm çapta ve 80cm uzunluğundadır (Kierszenbaum, 2006). Seminifer tübüllerin duvarı birkaç hücre tabakası kalınlığında epitelle döşelidir. Bu epitelin bazal hücreleri sertoli hücreleri ve spermatogonyumlardan oluşmaktadır. Spermatogonyumlar kendilerini çoğaltmak ve primer spermatozoidleri oluşturmak üzere mitoz aktivitesiyle bölünürler (Gartner & Hiatt, 2012).

Seminifer tübüller, iki ucu U şeklinde ve rete testise açılan tüplerdir. Rete testis, seminifer epitelyumun ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır (Kierszenbaum, 2006).

Üst uç epididim başı ile örtülü olup burasını saran lamina visseralis (epiorchium), doğrudan doğruya epididim üzerine atlar ve burada bir oluk meydana getirir. Bu şekilde oluşan kaput epididimisin hemen altında küçük oval bir cisimcik vardır. Appendiks testis denilen bu çıkıntı müller kanalı üst ucunun bir kalıntısıdır. Kaput epididimisin üstünde genellikle appendiks epididimis denilen bir çıkıntı vardır. Bu ayrılmış bir duktuli efferentestir. Alt uçta ligamentum skrotale denilen elastik ve düz kas liflerinden meydana gelmiş bir skrotal bağ ile skrotuma tutunmuştur.

Testisler arterlerini aorta abdominalisten alırlar. Arteria testikularis testise varıncaya kadar karın boşlugunun büyük bir kısmını ve inguinal kanalı geçmek zorundadır. Arteria testikularis testisin arka kenarından bezin içine sokulur ve mediastinum testiste bir çok dallar verir. Bu dallar septula testisleri izleyerek bezin her tarafına dağılırlar ve zengin kapiller ağı yaparak testis kanalcıklarını sararlar. Arteria testikularis ile arteria vesikalis süperiör'ün bir dalı olan arteria defferentialis ve arteria femoralisten gelen ve skrotumda dağılan arteria pudendae eksterna arasında anastomozlar var ise de arteria testikularis'in bağlanması veya kesilmesi, kansızlığa karşı fazla hassas olmalarına karşı testiste hasara neden olur (Drews, 2000).

Venler duktus deferensin etrafında pleksus pampiniformis denilen bir ven ağı meydana getirirler. Bu ağdan önce iki, sonra birer tane vena testikularis meydana gelir. Vena testikularis dekstra, vena kava inferiör'e, vena testikularis sinistra, vena renalis'e dökülür.

Sinirler, sempatik ve parasempatik lifler pleksus coeliakustan arteria testikularis çevresinde bulunan pleksus testikularis ile gelirler. Bu sinirler bezlerin çalışmasını idare ederler. Testislerin lenf damarları funikulus spermatikus'u izler ve nodus lenfatikus ile birleşirler.

2.2. Testisin Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti, ovumu dölleyen sperm çeşidi ile dölleme sırasında belirlenmiş olsa da, morfolojik özellikleri, embriyo döneminin 7. haftasına kadar gelişime başlayamazlar. Genital sistem erken dönemde her iki cinste de birbirine benzer, bu nedenle genital sistemin bu aşaması "seksüel gelişimin farklanmamış safhası" olarak adlandırılır ve gonadlara da "farklanmamış gonadlar" adı verilir .

Gonadlar (testisler ve overler) üç kaynaktan köken alırlar :

- ❖ Karın arka duvarını döşeyen mezotel (mezodermal epitel)
- ❖ Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- ❖ Primordial germ hücreleri

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar, mezonefrozun medyalinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin altındaki mezenşimin çoğalması ile mezonefrozun medyalinde bir kabarıklık (gonadal kabartı) oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar (gonadal kordonlar) altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklanmamış gonad, dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi ovaryuma farklılaşır, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise farklılaşır, korteks bir takım kalıntıları bırakarak geriler, dejenere olur.

Primordial germ hücreleri 4. hafta başında vitellüs kesesi duvarında, allantoyisin başlangıç yerine yakın, endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanması sırasında, vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olması ile, primordial germ hücreleri de arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler. 6. hafta sırasında primordial germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerler ve gonadal kordonlara dahil olurlar (Moore, Persaud, & Torchia, 2015).

Eğer embriyo genetik olarak erkekse, primordial germ hücrelerinin cinsiyet kromozomları XY'dir. Testis belirleyici faktörü kodlayan Y kromozomu üzerindeki SRY geninin etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları testis veya medüller kordonları oluşturmak üzere, çoğalmaya devam edip medullanın derinliklerine doğru ilerler. Bu kordonlar bezin hilusuna doğru, daha sonra rete testis tübüllerini oluşturacak ince hücre sıralarından ibaret bir ağ şeklinde dağılırlar. Gelişimin daha ileri evrelerinde testis kordonlarının yüzey epiteli ile olan ilişkileri tunika albuginea adlı yoğun fibröz bir bağ dokusunun araya girmesiyle sona erer.

Gonadal sırtın orjinal mezenşiminden köken alan interstisyel Leydig hücreleri testis kordonlarının arasında bulunur ve bu kordonların farklanmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlarlar. Embriyo gelişiminin 8. haftasında, Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlarlar. İnsan koryon gonadotropin hormonu (hCG) testosteron üretimini uyarır. Testisler artık genital kanal ve dış genital organların cinsiyetini etkileyecek hale gelmiştir.

Testosterona ek olarak, fetal testisler, glikoprotein yapıda bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya mülleryan inhibitör madde (MİM) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. AMH, Sertoli hücreleri (destek hücreleri) tarafından salgılanır ve hormonun salınması ergenliğe kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, uterus ve tuba uterinalara farklılaşan, paramezonefroz kanallarının (Müller) gelişimini baskılar.

Dördüncü ayda, testis kordonları at nalı şeklini alır ve bu at nalının uçları rete testis ile devam eder. Bu durumda testis kordonları artık primitif germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden köken almış Sertoli destek hücrelerinden meydana gelmiştir.

Puberteye kadar solid halde kalan testis kordonları pubertede lümenleri açılarak seminifer tübüller haline gelirler. Seminifer tübüller kanalize olur olmaz rete testis tübüleriyle birleşir ve duktuli eferenslere girerler. Bu eferent duktuslar mezonefrik sistemin geride kalmış boşaltım tübülleridir. Duktus deferens olarak bilinen bu kanallar, rete testis ile mezonefrik veya Wolffian kanallarını birbirine bağlarlar.

Testisler, genellikle 26. haftada başlayan ve 2-3 gün devam eden, inguinal kanallardan geçerek skrotuma iniş süreci yaşamaktadırlar. Testisler, periton ve processus vaginalis dışından geçerler, skrotuma girdikten sonra, inguinal kanal, spermatik kord etrafında kasılır. Terminde doğmuş yeni doğanların %97'sinden fazlasında, her iki testis de skrotum içerisinde. Doğumdan sonraki ilk üç ay içerisinde, inmemiş testislerin çoğu skrotuma iner. Testislerin skrotuma inişinde, fetal testislerce üretilen androjenler sayesinde kontrol edilmesinin yanında; fetal pelvisin genişlemesi, embriyonun boyutlarının uzaması, karın içi organların büyümesi ve karın içi basıncın artmasının rol oynadığı düşünülmektedir.

2.3. Testisin Histolojisi

Spermatogenez üzerinde en önemli uyarıcı etkiyi hormonlar yapar.

Bunlar :

1. Testosteron : Testisin interstisyel dokusunda yer alan Leydig hücreleri tarafından salgılanır ve spermatojenik hücrelerin büyümesi ve bölünmesi için gereklidir. Ayrıca ikincil cinsiyet karakterlerinin devam ettirilmesinden de sorumludur.
2. Luteinizan hormon (LH): Ön hipofizden salgılanır, Leydig hücrelerini uyararak testosteron salgılatır. Hipofizden LH salgılanması negatif geri besleme ile düzenlenir. Testosteron sentezinin artmasıyla LH salınımı baskılanır ve tersine testosteron düşük ise LH salınımı artar.
3. Folikül stimülan hormon (FSH) : Ön hipofizden salgılanır, Sertoli hücrelerini uyarır. Adenil siklaz yapımını, döngüsel adenozin monofosfat (cAMP) artışını uyarır. Ayrıca ABP' nin sentez ve salgılanmasını harekete geçirir. Daha sonra ABP testosterona bağlanarak bu hormonu seminifer tübül lümenine taşır. Böylece spermatogenez uyarılmış olur. Bu uyarı olmazsa spermatidlerin sperme dönüşmesi gerçekleşmez.
4. Östrojenler : FSH sonucunda uyarılan Sertoli hücrelerinde testosterondan yapılmaktadır.
5. Büyüme hormonu (GH) : Diğer hormonlar gibi testisin metabolik fonksiyonlarının kontrolü için gereklidir. GH özgül olarak spermatogonyumun erken bölünmesini destekler, yokluğunda ise spermatogenez durur ya da sekteye uğrar.

2.3.1. Seminifer Tübüller

Spermatozoidler seminifer túbüllerde üretilir ve erişkindeki yapım hızı günde yaklaşık 2×10^8 ' dir. Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer túbül bulunur. Her seminifer túbül karmaşık yapıda çok katlı bir epitel ile döşeli olup, çapları yaklaşık 150-250 μm ve boyları 30-70 cm' dir. Bir testisteki túbüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Túbüller kıvrımlıdır ve uçlarına doğru lümeni daralarak düz túbüller ya da tubuli rekti olarak anılan kısa segmentler halinde devam eden kangallar şeklinde uzanır. Bu düz túbüller, seminifer túbülleri rete testis denilen, epitel ile döşeli kanlların oluşturduğu bir labirente bağlar. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 adet duktuli efferentes ile epididimin baş kısmına bağlanmaktadır.

Seminifer túbüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer túbülü saran fibröz tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içerir. Seminifer túbüllerin arasındaki boşluğun büyük bölümünü interstisyel (leydig) hücreleri doldurur.

Seminifer epitelde iki tip hücre vardır: Sertoli ya da destek hücreleri ile spermatogenez serisini oluşturan oluşturan hücreler. Spermatogenez serisinin hücreleri 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir. İşlevleri spermatozoonları üretmektir. Spermatozoon üretimi spermatogenez olarak adlandırılır. Bu süreç, mitoz ve mayoz hücre bölünmeleri içerir ve hücreler sonunda spermatozoidlere farklılaşır. Bu aşama spermiyogenez olarak adlandırılır.

2.3.2. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatozoon üretim sürecidir. Süreç ilkel bir üreme hücresi olan spermatogonyum ile başlar. Spermatogonyum, yaklaşık 12 µm çapında, bazal laminanın hemen üstünde yer alan nispeten küçük bir hücredir. Cinsel olgunluk çağında spermatogonyum hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşur.

Yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izleyebilir:

A tipi spermatogonyumlar olarak da adlandırılan kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da sürmekte olan mitoz döngüleri boyunca farklılaşarak **B tipi spermatogonyumları** oluşturur. B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan öncül (progenitör) hücrelerdir. Primer spermatositler 46 kromozom (44+XY) ve 4n DNA içerir (n haploid kromozom sayısını [insanlarda 23 kromozom] ya da bu kromozom takımındaki DNA miktarını gösterir). Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu bölünmenin profaz aşaması yaklaşık 22 gün sürdüğünden, kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu bu aşamada izlenecektir. Primer spermatositler spermatojen serinin en büyük hücreleridir ve çekirdeklerinde, sarmalanma sürecinin değişik aşamalarındaki kromozomların bulunması ile tanınırlar.

Birinci mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatositler olarak adlandırılan ve yalnızca 23 kromozom (22+X veya 22+XY) içeren daha küçük hücreler oluşur. Kromozomların sayısındaki bu azalmaya (46'dan 23'e) her hücredeki DNA miktarının eksilmesi (4N'den 2N'ye) eşlik eder. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur. Çünkü bunlar interfazda çok kısa süre kalan ve çabucak ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi 23 kromozom içeren iki hücrenin, spermatidlerin oluşmasıyla sonuçlanır. Spermatositlerde birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında S fazı (DNA

sentezi) görülmediği için, ikinci bölünmeden sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (1N) hücreler meydana gelir. Böylece, mayoz bölünme sürecinin sonunda haploid sayıda kromozom içeren hücreler oluşur. Döllenmeyle bunlar normal diploid sayıya dönerler.

2.3.3 Spermiyogenez

Spermiyogenez spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoona dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez.

Spermatidler, küçük boyuları (7-8 µm çapta), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleusları ile ayırt edilebilirler. Seminifer tübüllerde lümen yakınında yerleşmişlerdir. Spermiyogenez, akrozom oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, kamçı gelişmesini ve sitoplazmanın büyük bir bölümünün kaybolmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Sonuçta, daha sonra seminifer tübül lümenine bırakılan olgun spermatozoon oluşur. Spermiyogenez üç evreye ayrılabilir (Kierszenbaum, 2006).

2.3.3.1. Golgi Fazı:

Spermatidin sitoplazması, çekirdeğin yakınında yer alan belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriyumlar, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulumu tübüllerini içerir. Proakrozomal granüller olarak adlandırılan PAS-pozitif küçük granüller Golgi kompleksinde birikir ve daha sonra birleşerek zarla sınırlı bir akrozom vezikülünün içinde yer alan tek bir akrozom granülü oluştururlar. Sentriyoller göç ederek, oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine

yakın bir konuma yerleşirler. Kamçı aksonemi oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden çekirdeğe doğru göç ederken hareket ettikçe aksonem bileşenleri çevresine sarılır.

2.3.3.2. Akrozomal Evre:

Akrozom vezikülü ve granülü, yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom, hiyalüronidaz, nörominidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden özelleşmiş bir lizozom gibi işlev görür. Bu enzimlerin, oositleri çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Spermatozoonlar bir oositle karşılaştığında, akrozomun dış zarı birçok bölgede spermatozoonun plazma zarı ile kaynaşarak akrozom enzimlerinin hücre dışına boşalmasını sağlar. Bu işlem akrozom reaksiyonu olarak bilinir ve döllenmenin ilk basamaklarından biridir.

Spermioyogenezin bu evresinde, spermatid seminifer tübülün tabanına doğru yönelir ve aksonem lümene doğru uzanır. Ayrıca, çekirdek uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden biri gelişerek kamçıyı oluşturur. Mitokondriyumlar da kamçının proksimal kısmı etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge, spermatozoon hareketlerinin enerji kaynağını oluşturur (Moore et al., 2015).

Mitokondriyumların bu şekilde yerleşmesi, bu organellerin hücre hareketi ile ilgili ve enerji tüketimi yüksek olan bölgelerde yoğunlaşmasının başka bir örneğini oluşturur. Kamçı hareketi, mikrotübüller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur.

2.3.3.3. Olgunlaşma Evresi:

Geriyeye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoonlar tübülün lümenine bırakılır.

2.3.4. Miyoid Hücreler

Miyoid hücreler hareketsiz spermleri rete testise ilerleten ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludurlar. Spermler epididimal kanaldan geçtikten sonra ileri motilite özelliklerini kazanırlar. Peritübüler doku olarak da adlandırılan tunika propria, esas olarak fibroblast içeren çok katlı bir bağ dokusudur. Seminifer tübül etrafını çevreleyen 3-5 kat miyoid hücre ve kollajen fibril katmanından oluşmaktadır.

Bazı hayvanlarda miyoid hücreler ultrastrüktüel olarak incelendiği zaman, sitoplazmasında çok sayıda aktin filamentleri içermesi ve bazal membrana sahip olması ile düz kas hücrelerine benzediği ortaya konmuştur. Fibroblastlarında bulunan düz endoplazmik retikulum içermeleri sayesinde kollajen sentezinde görev almaktadır (Moore et al., 2015).

Spermatozoon ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden duktus epididimise ulaşması miyoid hücrelerin ritmik kasılma hareketi ile peristaltik hareketin sağlanması ile gerçekleşir.

2.3.5. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri; spermatogenez serisindeki hücreleri saran, bazal membrandan seminifer tübül lümenine doğru uzanan uzun, piramidal hücreler olup, tübüller arası boşluk ve seminifer tübül lümeni arasında köprü hücreler olarak görev yaparlar .

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelin dominant hücre tipidir. Puberteden sonra postmitotiktir, seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Daha ileri yaştaki erkeklerde spermatojenik hücre popülasyonu düştüğü zaman, Sertoli hücreleri tekrar epitelin ana elemanı haline gelir. Erişkin testisinde mitotik hücre bölünmesi gözlenmez.

Işık mikroskopunda, gelişmekte olan spermatojenik hücelere kriptalar sağlayarak ev sahipliği yapmak için çok sayıda yan uzantı bulundurması nedeniyle, Sertoli hücrelerinin sınırları iyi belirlenemez. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin genişlemiş düz endoplazmik retikulum ve dar granüllü endoplazmik retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, mitokondri, lizozomlar ve lipid damlacıkları ve zengin bir hücre iskeleti (vimentin, aktinimikrotübüller) içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzanmış çekirdeğinde çok sayıda girinti, belirgin çekirdekçik ve az miktarda heterokromatin bulunur .

Bazolateral bölgelerinde, Sertoli hücreleri komşu Sertoli hücreleri ile okludens bağlantıları oluştururlar. Bu bağlantılar; seminifer epiteli bir bazal ve adluminal kompartımana böler ve gelişmekte olan spermatojenik hücreleri otoimmün reaksiyonlardan koruyan kan-testis bariyeri olarak da adlandırılan elemanları belirlerler.

Sertoli hücrelerinin şu fonksiyonları vardır;

- Gelişmekte olan spermatojenik hücrelerin desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesi,
- Spermiyogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan rezidüel (artık) cisimcikler olarak adlandırılan fazla hücre kısımlarını fagositoz ile elimine edilmesi,
- Olgun spermatidlerin aktin-araçlı kasılmalarla, seminifer tübül lümenine salınımının kolaylaştırılması,
- Gelişmekte olan spermatositler ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlardan koruyan kan-testis bariyeri olarak da adlandırılan bazolateral (alt yan yüz) bağlantılar ile kandaki zararlı maddelere karşı korunması,
- Seminifer tübül lümenine genital kanallar yönünde akan ve sperm taşınması için kullanılan bir sıvı salgılanması,
- Anti-Müllerian hormon üretimi sayesinde erkek fetüste Müller kanallarının gerilemesinin sağlanması,
- Seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronunun yoğunlaşmasını sağlayan androjen-bağlayıcı proteinin (ABP) salgılanması,
- İnhibin ve aktivin alt ünitelerini (α ve β alt üniteleri) salgılayarak hipotalamus ve ön hipofizden salınan gonadotropin salgılatıcı faktör ve FSH salınımı üzerine negatif ve pozitif feedback (geri etkili) bir etki gösterilmesi,
- Üreme hücrelerine demir taşıdığına inanılan testiküler transferinin sentezlenmesi ve salgılanmasında görev alır.

2.4. Testis Torsiyonu

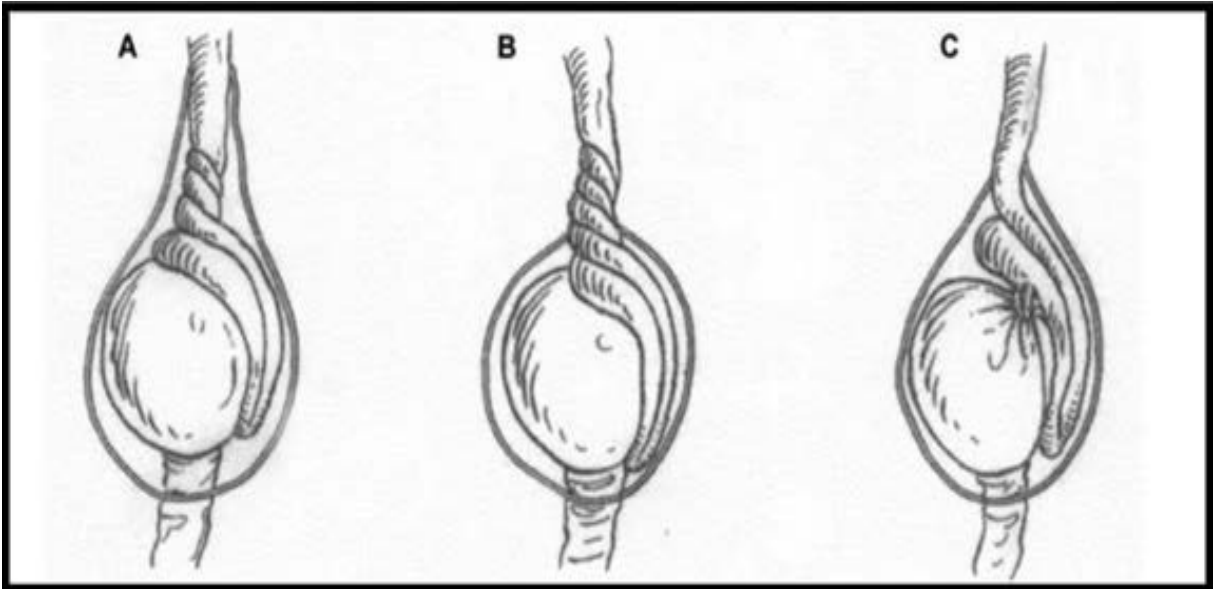
Testis torsiyonu veya spermatik kordun torsiyonu, yenidoğan, çocuk ve adölesanları etkileyen cerrahi bir acildir. 25 yaşına kadar insidansı 1/4000 olarak bildirilmiştir. Cerrahi olarak detorsiyon yapılan testislerin kurtarılma oranı % 42-88 arasında değişmektedir. Ancak, bu testislerin ne kadarında spermatojenik fonksiyonun korunduğu bilinmemektedir. Erken müdahale edilip patolojik düzeltilmediği takdirde torsiyon olan tarafa orşiektomi gerekebileceği gibi, kontralateral testiste fonksiyon kaybına ve infertiliteye yol açabileceği bildirilmiştir. Torsiyone testiste geri-dönüşümsüz değişikliklerin kaç saat sonra başladığı net olarak bilinmese de 4-6 saat içerisinde müdahale edilmesi önerilmektedir. 3 tip torsiyon bildirilmektedir;

- I. Ekstravajinal torsiyon
- II. İnvajinal torsiyon
- III. Testis eklerinin torsiyonu

Ekstravajinal torsiyon; tunika vajinalislerin spermatik korda bağlantı noktalarının proksimalinden, kordun kendi etrafında torsiyone olmasıdır (Şekil 1 A). Bu durum doğum öncesi veya doğum sonrası ilk 30 günlük dönem içerisinde gelişir. Tanı ancak doğum sonrası konabildiğinden intrauterin torsiyonlarda testisin kurtarılması mümkün olamaz. Yine de yaşamın ilk günlerinde cerrahi tedavi önerilmektedir. Erken müdahalede amaç, karşı taraftaki testisin torsiyon riskine karşı sabitlenerek korunması gerekliliğidir. Skrotumda şişlik en önemli belirtidir.

İnvajinal torsiyon; tunica vajinalislerin korda bağlantı noktalarının distalinden, kordun kendi etrafında torsiyone olmasıdır (Şekil 1 B). En sık 10-14 yaşları arasında görülse de, 20 yaş üzerinde de nadir olarak görülebildiği bildirilmektedir. Hiperaktif kremaster refleksi, inmemiş testis, gevşek epididimal birleşme, testisin horizontal

uzanımı, çan tokmağı deformitesi, geçirilmiş skrotal cerrahi ve travma gibi durumlar torsiyon için predispozan faktörlerdir. Bunun dışında; cinsel aktivite, yüzmeye, kayak sporu, kalçaların ani fleksiyonu ve soğuk hava da torsiyon oluşma riskini artıran durumlardandır. Tipik olarak akut başlayan hemiskrotal ağrıya bulantı, kusma, karın ağrısı, skrotal şişlik eşlik edebilir. Torsiyonun derecesi genellikle 180- 720 arasında değişmektedir.



Şekil 1. A- İntravajinal testis torsiyonu B- Ekstravajinal testis torsiyonu C- Testis ve eklerinde testis torsiyonu

Torsiyon varlığında yapılan renkli Doppler ultrasonografide arteriyel kan akımının kaybolduğu gözlenir. Hipervaskülerite ise enflamasyonun göstergesidir. Ayırıcı tanıda orşit, epididimit, travma, akut hidrosel, testis tümörleri ve inguinal herni düşünülmelidir. Torsiyone testisin elevasyonu ile ağrı artarken, orşitte elevasyonla hasta rahatlar. Bu bilgi (Prehn bulgusu olarak adlandırılır) ayırıcı tanıda önemlidir. Tedavi, acil cerrahi detorsiyon ve her iki testisin fiksasyonudur. Operasyona kadar

skrotum buzla sarılabılır. Detorsiyon gecikilmiş ise nekrotik testis çıkarılmalıdır.

Testis eklerinin torsiyonu (Şekil 1 C); apendiks testis ve epididim üzerinde bulunan embriyolojik kalıntıların torsiyone olması durumudur ve genellikle 16 yaş üzerinde izlenmektedir. Klinik tablo testiste veya testis üzerinde palpe edilebilen ağrılı kitle şeklindedir. Apendiks torsiyonunda skrotum cildi üzerinde mavi nokta bulgusu (blue-dot sign) gözlenebilir. Tedavi analjezik ve elevasyonla konservatif yaklaşım şeklinde olsa da testis torsiyonu ayırt edilemiyorsa yapılması uygun olacaktır.

2.4.1. Torsiyonun Fertilite ve Karşı Testis Üzerine Etkileri

Testisler serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı oldukça duyarlı organlardır. Germinal hücreler oksidatif stres varlığında ciddi şekilde hasar görür ve ölürlür. Torsiyon varlığında gelişen oksidatif stres, bu hücrelerde nekroza yol açmakta ve ileri dönemlerde infertilite gelişimine sebep olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda torsiyon öyküsü olan erkeklerin %36'sında sperm sayısının 20 milyon/ml'nin altında olduğu tespit edilmiştir (Akcora, Altug, Kontas, & Atik, 2007). Başka bir klinik çalışmada erken dönemde (13 saat) detorsiyon uygulanan erkeklerde fertilitenin korunduğu bilinmekte iken, geç dönemlerde (ortalama 70 saat) orşiektomi uygulanan erkeklerde fertilitenin olumsuz yönde etkilendiği ortaya konulmuştur. Yapılan deneysel çalışmalara bakıldığında ise birçok araştırmacı ipsilateral testiste oluşan spermatojenik hasarın kontralateral testisi de etkileyebileceğini göstermişlerdir (Savas C., 2002).

Testis torsiyonunda karşı testiste hasar oluşabileceğinin bildirilmesi üzerine bu durum birçok araştırmaya konu olmuştur. İmmünolojik mekanizma, gizli intermittan torsiyonların varlığı, konjenital displazi ve

refleks vazokonstriksiyon mekanizmalarıyla karşı testisin kanlanması birbirinden bağımsız olmasına rağmen torsiyon sonrası karşı testiste hasar oluşumu ilginç bir durumdur. Testis immünolojik olarak ayrıcalıklı organdır ve kan-testis bariyeri olası bir duruma karşı koruma sağlamaktadır. İskemik hasar bu bariyeri bozarak testisten çıkan antijenik materyalin immün sistemi uyarmasına yol açmaktadır. Oluşan antikörlerin ise karşı testiste fonksiyonların bozulmasına yol açabileceği görülmektedir. Otoimmün mekanizmayı savunan Barkley ve arkadaşları, iskemi ile yıkılan kan-testis bariyerini aşan sperm, spermlerin ürünü olan bazı maddelerin ve tübüler bazal membranın antijen gibi davrandığını, bunlara karşı antikörlerin oluştuğunu ve bu yolla kontralateral hasarlanmanın olduğunu ileri sürmüşlerdir (Barkley et al., 1993).

Unilateral testis iskemisi sonucu kontralateral testiste oluşan hasarlanmanın nedenleri arasında otoimmün mekanizma (simpatik orkidopati), torsiyon öncesi bilateral testiküler fizyomorfolojik defekt varlığı, sinirsel refleks sonucu artan simpatik tonus ile kontralateral testiküler kan akımında azalma ve serbest kalan akrozomal enzimler sayılabilir (Barut, 2008).

Torsiyonda önce ani ve progresif mikrovasküler durgunluk ile kan akımında azalma olmakta ve detorsiyonda yavaş yavaş kan akımı artmaktadır. Detorsiyon için geçen süre uzadıkça karşı testis kan akımı azalması kritik sürenin üzerine çıkmakta ve hasarlanmaya neden olmaktadır.

2.4.2. İskemi ve Reperfüzyon

İskemi, herhangi bir nedenle, dokudaki arteriyel ve venöz kan akımının, hücresele fonksiyonları karşılamak için gerekli olan düzeyin altına düşmesi durumudur. İskemi hücresele oksidatif fosforilasyonu azaltır ve adenzintrifosfat (ATP), fosfokreatin gibi enerjiden zengin fosfatların depolarında azalma ve toksik metabolitlerin birikimine bağılı germ hücre ölümüne neden olur. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar. Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişı ile hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır (Yaman et al., 1990).

İskemi sonrasında dokuda dolaşımın yeniden başlaması, reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. İskemi sonucunda artan SOR kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon zedelenmesine yol açar. Reperfüzyon oluşmazsa, öldürücü iskemik zedelenme gelişir fakat toksik SOR oluşmaz. Reperfüzyon sırasında iskemik alanda toplanan nötrofil ve trombositlerin aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} birikimi ile mikrovasküler hasarın dokudaki zedelenmenin nedeni olduğu bilinmektedir.

Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde iskemik alanda toplanan polimorf nüveli lökositler tarafından yapıldığı düşünülmektedir (Mitchell RN, 2000). İskemi sonrasında endotel ve hücre zarı fonksiyonlarının bozulmasıyla hem hücre içinde, hem de hücre dışında ödem görülür. Endotel hücrelerinde şişme ile damar dışı boşluğa sızan sıvının nedeni olduğu bası sonucu kapiler damar lümeni daralır ve sonuçta reperfüzyon olsa da mikrosirkülasyonda ciddi yetersizlikler ortaya çıkar. Reperfüzyon ile iskemide bozulmuş mikrosirkülasyonun tam olarak düzeltilememesine

“no-reflow olayı” denir. Dokuda ortaya çıkan ödemin yanısıra aktive olan nötrofil ve trombositlerin kapiller dolaşımında kalmaları bu tabloya katkıda bulunmaktadır (Anafarta, Bedük, & Arıkan, 2007).

2.4.2.1. Akut Hücre Zedelenmesinin Nedenleri

Akut hücre zedelenmesi, uyarana karşı oluşur ve hücre morfolojisinde değişimler meydana getirir. İskemide aktive olan SOR lipid peroksidasyonuna ve hücre hasarlanmasına neden olur (Wei, Yan, & Zhou, 2013).

2.4.2.2. Geri Dönüşümlü Zedelenme

- a) Hipoksi, hücre hasarı ve ölümünün en sık nedenlerinden biridir. Hipoksidede, hücre içi oksijen azlığı nedeniyle aerobik solunum aksar ve mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenir. Adenozin trifosfat (ATP) üretimi azalır ya da tamamen sona erer. ATP kaybı sonucu ATPaz aktivitesi de azalır. Bu, hücre zarında bulunan aktif sodyum pompası yetersizliği ve beraberinde hücre içinde sodyum birikimi sonucunu doğurur. Hücre içi potasyum dışarı atılır. Ardından su hücre içine girer ve hücre sel şişme meydana gelir. Hücre sel şişmenin bir diğer nedeni ise katabolitlerin birikimidir (Pekcetin et al., 2007; Wei et al., 2013).
- b) Hücrenin enerji metabolizması bu süreç içerisinde glikoza bağımlı hale gelir. Glikojen depoları hızla azalır. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine, bu ise hücre içi pH'yı düşürerek asidoza neden olur.
- c) Sonrasında granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır ve polizomlar monozomlara parçalanarak protein sentezi azalır. Hipoksi devam ederse membran geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları yavaşlar. Bu sırada mitokondriler normal, hafif

yoğunlaşmış ya da şişmiş, endoplazmik retikulum ise genişlemiş olarak görülür. Sonuçta hücre belirgin biçimde şişer. Buraya kadar olan olaylar geri dönebilir değişikliklerdir. İskemi bu andan sonra da devam ederse, geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi başlar. Hücre hasarının yapısal değişiklikleri, bazı kritik biyokimyasal sistemlerin bozulmasından sonra görünür hale gelir. Hücre şişmesi geri dönüşümlü bir hasardır ve dakikalar içinde görülebilir.

2.4.2.3. Geri Dönüşümsüz Zedelenme

Geri dönüşümsüz hücre zedelenmesinde mitokondri ve kristalarda aşırı vakuolizasyon ile plazma zarında aşırı zedelenme vardır. Hasarlanmış ve ileri derecede geçirgenleşmiş zarlardan hücre için gerekli yaşamsal elemanların kaybolduğu görülür.

Hücre içi pH'nın düşmesi, lizozom zarlarının zedelenmesi ve beraberinde enzimlerin sitoplazmaya geçerek asit hidrolazları aktiflemesi sonucu, çekirdek ve sitoplazma yapıları sindirilir. Hücre zedelenmesinde en önemli basamak kuşkusuz membran zedelenmesidir (Yagmurdur et al., 2008). Geri dönüşümsüz hasar bugünkü bilgilerimize göre ilk 20-60 dakika içinde oluşur (Kim, Kim, Shin, Kim, & Lim, 2010; Wei, Yan, & Zhou, 2011).

Hücre membran zedelenmesinde altı neden suçlanmaktadır.

1. Mitokondri fonksiyon bozukluğu,
2. Membran fosfolipidlerinin giderek artan kaybı,
3. Hücre iskeletindeki değişimler,
4. SOR,
5. Lipid yıkım ürünleri,

6. Hücre içi aminoasitlerin kaybı.

Membran zedelenmesi, hücreler arası mesafeden hücre içine doğru kalsiyum (Ca^{+2}) tutulumuna neden olur. Reoksijenasyondan sonra mitokondri tarafından tutulan Ca^{+2} hücresel enzimleri inhibe ve proteinleri denature eder. Sonuçta koagülasyon nekrozuna özgü hücresel değişimler meydana gelir.

İskemi sonrasında dokuda dolaşımın yeniden başlaması, reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. İskemi sonucunda artan SOR kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon zedelenmesine yol açar. Reperfüzyon oluşmazsa, öldürücü iskemik zedelenme gelişir fakat toksik SOR oluşmaz. Reperfüzyon sırasında iskemik alanda toplanan nötrofil ve trombositlerin aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} birikimi ile mikrovasküler hasarın dokudaki zedelenmenin nedeni olduğu bilinmektedir. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde iskemik alanda toplanan polimorf nüveli lökositler tarafından yapıldığı düşünülmektedir (Dokucu, Ozturk, Ozturk, Tuncer, & Yilmaz, 2009; Erboga et al., 2015).

2.4.2.4. Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi

1. Serbest oksijen radikalleri.
2. Nötrofiller: İskemi sonrasında damar endotelinin hasar görmesi ile nötrofil ve trombosit aktivasyonu meydana gelmektedir. Bunun yanısıra, iskemik alanda ortaya çıkan kemotaktik faktörlerden kompleman 3a ve kompleman 5a nötrofillerin bölgeye göç etmesine neden olur. İskemi/reperfüzyon alanına gelen nötrofiller, bu bölgede SOR üretir. Ortaya çıkan SOR antiproteazları inaktive eder. Sonuçta, lizozomlardan proteolitik enzimler salınarak hasar oluşur. Ayrıca nötrofillerde yarılmaları sonucunda esnek yapılarını kaybederek

mikrosirkülasyonda kalır ve embolizasyona neden olurlar (Silay et al., 2014; Yagmurdur et al., 2008).

3. Kalsiyum: Reperfüzyon sırasında hücre ve organellerin içinde aşırı Ca^{+2} birikimi ciddi doku hasarı gelişiminin en önemli nedenidir. İskemide ortaya çıkan hücre membran hasarı ve gradient farkı nedeniyle Ca^{+2} , hücre içine girer. Aynı zamanda iskemi-reperfüzyon sırasında, özellikle SOR tarafından sodyum-potasyum pompasının bozulmasıyla artan hücre içi sodyum Ca^{+2} 'yi daha da artırır. Dışarıdan Ca^{+2} girişinin yanısıra, endoplazmik retikulum da iskemi/reperfüzyon hasarına bağlı membran zedelenmesi sonucu içerdiği Ca^{+2} 'yi sitoplazmaya bırakır. Normal koşullarda hücre için yararlı olan Ca^{+2} 'nin reperfüzyon sonrasında hücre içinde aşırı miktarda birikmesi sonucu ortaya çıkan hasara kalsiyum paradoksu denilmektedir. Artan hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu ATPaz enziminin inaktivasyonuna neden olur. Böylelikle iskemide zaten azalmış olan ATP depoları daha da boşalır. Hücrede litik ödevi olan birçok enzimin Ca^{+2} tarafından aktive edilmesiyle hücre yıkımı başlar. Membran fosfolipidlerinin, aktive olan fosfolipaz tarafından parçalanması sonucu ise hücre bütünlüğü bozulur.

İskemi sonrasında endotel ve hücre zarı fonksiyonlarının bozulmasıyla hem hücre içinde, hem de hücre dışında ödem görülür. Endotel hücrelerinde şişme ile damar dışı boşluğa sızan sıvının neden olduğu bası sonucu kapiller damar lümeni daralır ve sonuçta reperfüzyon olsa da mikrosirkülasyonda ciddi yetersizlikler ortaya çıkar. Reperfüzyon ile iskemide bozulmuş mikrosirkülasyonun tam olarak düzeltilememesine “no-reflow olayı” denir. Dokuda ortaya çıkan ödemin yanısıra aktive olan nötrofil ve trombositlerin kapiller dolaşımında kalmaları bu tabloya katkıda bulunmaktadır (Ergun et al., 2010; Ishikawa, Kondo, Goda, & Fujisawa, 2005).

2.5. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngesinde tek, paylaşılmamış elektron taşıyan kimyasal ürünlerdir. Bu dengesiz durumun yarattığı enerji, organizmanın temel yapı taşları olan proteinler, karbonhidratlar, lipidler ile inorganik kimyasallar gibi komşu moleküllerle olan tepkimeler sonucu açığa çıkar. Serbest radikaller, hücre membranları ve nükleik asitlerin yapısında yer alan anahtar moleküllerdir.

İskemik dönemde hücrede metabolik ve yapısal değişiklikler meydana gelir. Dokuya gelen kan akımının kesilmesi ile hücresel oksidatif fosforilasyon azalır ve adenozin 5'-trifosfat ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır (Barada, Weingarten, & Cromie, 1989). Hücrede enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan Na^+, K^+ -ATP az pompası inhibe olur. Sonuçta hücre içinde Na^+ ve Ca^{++} iyon konsantrasyonları artar. Hücre içinde Ca^{+2} iyon konsantrasyonunun artışı hücre için sitotoksiktir (Mogilner et al., 2006). Nitekim yine bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflamatuvar sitokinlerin ve lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış, buna karşılık antioksidan enzimlerin oluşumunda azalma olur. Bu durum hücreyi reperfüzyon dönemindeki hasara karşı dayanıksız kılar.

İskemi döneminde ATP üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için ATP'den AMP ve adenozin oluşur. Adenozin, hızla hücre dışına diffüze olarak inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin (ATP) yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı NAD^+ (nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu) dir. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle $KDH \rightarrow KO$ 'a dönüştüğünden hipoksantin ürik

asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır (Lysiak, 2002).

2.5.1. Serbest Radikal Kaynakları

1. Biyolojik kaynaklar: Aktive olmuş fagositler, antineoplastikler (nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin, adriamisin) ve ekzojen kimyasalların enzimatik yıkımı, radyant enerjinin emilimi (ultraviyole, X ışını), alkol ve uyuşturucular, çevresel etkenler (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, pestisid, sigara dumanı, solventler, aromatik hidrokarbonlar), ruhsal stres (streste katekolaminler artar. Artan katekolaminlerin oksidasyonu sonucu serbest radikaller meydana gelir) (Mahood et al., 2005; Tripathi & Jena, 2010).
2. Hücresel kaynaklar: Normal metabolik olaylarda görülen oksidasyon redüksiyon (redoks) reaksiyonları sırasında (askorbat, tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavin, tetrahidropterin ve antibiotikler), enzim ve proteinler (ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz ve hemoglobin gibi), mitokondrial elektron transport zinciri, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron taşıma sistemleri (sitokrom p450, sitokrom b5 redüktaz), peroksizomlar (oksidazlar ve flavoproteinler), plazma membranı (lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde dihidronikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz ve lipid peroksidasyonu), oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma ve intoksikasyon).

2.5.2. Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan kimyasal olaya denir. Böylelikle membran lipid yapısı değişir, hücre yapı ve fonksiyonları bozulur. Lipid peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşir: Başlangıç, zincir gelişimi ve sonlanma. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalın, zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asiti zincirindeki metilen gruplarından hidrojen atomunu uzaklaştırmasıyla başlar. Burada asıl etkili radikalın hidroksil radikali olduğu düşünülmektedir. Bu şekilde oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Lipid radikalının moleküler oksijenle reaksiyona girmesiyle lipid peroksid radikalleri meydana gelmektedir. Lipid peroksid radikalleri de zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşmektedir .

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehid ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malondialdehid (MDA) miktar tiyobarbitürik asit testiyle ölçülmekte ve yöntem lipid peroksid düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidlere veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir.

2.5.3. Oksidatif Stres

Nitrik oksit'in keşfedilmesinde Furchgott ve Zawadski tarafından ilk kez 1980'de endotel kökenli vazodilatasyon etkili bir madde (Endothelial

Derived Relaxing Faktor, EDRF) tanımlanmıştır (Ishikawa et al., 2005). NO üzerine yapılan çalışmalar daha sonraki yıllarda artmış ve organizmada birçok önemli rolü olduğu saptanmıştır. Bu nedenle 1992'de NO yılın molekülü olarak tanımlanmıştır. Bugün artık endotel kaynaklı nitrik oksidin hem deneysel çalışmalarda hem insanlarda sürekli vasküler tonusun fizyolojik düzenleyici olduğu ortaya konmuştur. Yine bugün birçok hücrede NO sentezlendiğini ve vasküler tonusun düzenlenmesinin yanı sıra bir medyatör olarak nörotransmisyon, immün direnç ve hücrel adezyonun düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik olayda birincil görevi olduğu bilinmektedir (Hikim et al., 2003).

Nitrik oksit renksiz bir gaz şeklinde bulunan inorganik serbest bir radikaldir. Yarı ömrü 2–10 saniyedir. Sentezlendikten kısa bir süre sonunda hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötralize edilerek nitrat ve nitrite dönüşür. NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır (Moncada & Erusalimsky, 2002). Yarı esansiyel bir aminoasit olan L-arjinin'in terminal guanidin grubunun NOS enziminin katalize ettiği bir reaksiyon sonucu nitrik oksite çevrilmesi sonucu sentezlenmektedir.

NOS başlıca yapısal (konstitütif) ve uyarılabilir (indüklenebilir) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır. Yapısal NOS (cNOS, NOS1, NOS3) hücre içinde sürekli var olan ve vasküler tonus ayarlanmasında ve nörotransmisyonda rolü olan, intermittan küçük miktarlarda nitrik oksit üretimini sağlayan enzimlerdir. Esas olarak nöronlarda (nNOS), vasküler endotel hücrelerinde (eNOS), endokard, myokard ve trombositlerde bulunur. Ca^{+2} /kalmodülin bağımlı bir enzim olan cNOS çeşitli uyanlarla geçici olarak intrasellüler iyonize Ca^{+2} konsantrasyonunun (10^{-7} mol/L) fizyolojik sınırlar içinde yükselmesi sonucu aktive olur ve esansiyel miktarda NO sentezlenmesine yol açar.

Endotel kaynaklı eNOS (NOS⁻³) arteriyel ve venöz endotel hücrelerinde bulunan membrana bağlı bir enzimdir ve eNOS aktivitesi asetilkolin, bradikinin, adenozin trifosfat (ATP), elektriksel uyarı ve sıvı akımıyla uyarılabilir. Dolaşımın düzenlenmesinde, trombositlerin ve polimorf çekirdekli lökositlerin damar lümeniyle olan etkileşiminde görev alır. nNOS; beyin, cerebellum, nöroblastlarda bulunur ve nörotransmitter olarak görev yapar (Erkan & Müslümanoğlu). Uyarılabilen NOS (iNOS, NOS⁻²) fonksiyonel olarak Ca⁺² bağımsız olması nedeniyle cNOS'dan farklıdır. Endotel hücrelerinden başka, özellikle düz kas hücreleri ve makrofajlarda bulunmaktadır.

Makrofajların, nötrofillerin, mast hücrelerinin ve vasküler düz kas hücrelerinin sitokinlerle uyarılmasından sonra NOS'un gen tanımlaması başlayarak belirli bir sürede NOS sentez edilir ve hücrede nanomol gibi büyük miktarda NO sentezi yapabilir. Makrofajların aktivasyonu ile sentezlenen NO'nun başlıca makrofajlarda bulunmasına rağmen, vasküler düz kas hücreleri, renal tübül hücreleri, kupffer hücreleri, endotel hücreleri, monosit ve polimorf nüveli lökositlerde tespit edilmiştir. Makrofajlar dışındaki hücrelerde iNOS aktivitesinin rolü yeterince bilinmemektedir. Ancak endotelde bulunan iNOS konjestif kalp yetmezliği gibi artmış sitokinlerin bulunduğu durumlarda önemli olabilir. Sitotoksik rol oynarak immün cevapta, antimikrobiyal ve antineoplastik aktivitesinde önemlidir.

NOS protein aktivitesi insan ve ratların testis, epididim, prostat ve seminal veziküllerinde tespit edilmiştir. NOS antikorlarıyla yapılan deneysel çalışmalarda farelerin spermatozoa ve kuyruklarında NOS'un varlığı gösterilmesine rağmen spermatozoada bir mi yoksa daha fazla mı NOS izoformuna sahip olduğu bilinmemektedir (Ishikawa et al., 2005; Mahood et al., 2005). Enfeksiyon ve inflamasyona yanıt olarak NO biyosentezi sperm motilitesi ve fonksiyonunda bozulmaya neden olabilmektedir. NO ile tetiklenen sperm hasarının primer mekanizmasının

solunum ve DNA biyosentezi inhibisyonu olduğunu düşünülmektedir. Nitrik oksitin seminal plazmadaki etkileri konsantrasyonuna göre değişir. Düşük konsantrasyonda sodyum nitropurid gibi NO salıcı bileşimin sperm motilite ve canlılığının korunmasında yardımcı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca NO fare sperminin hiperaktivasyonunda situmilatör rol oynadığı bildirilmiştir. Buna karşın NO salan bileşenin çok yüksek konsantrasyonlarında sperm respirasyonunun inhibisyonu ile sperm motilitesinin bozulduğu gösterilmiştir (Mentese et al., 2012; Tsounapi et al., 2012).

Düşük konsantrasyonlardaki NO sinyal transdüksiyon molekülü gibi davranıp sperm motilitesini artırırken yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik olmaktadır. Nitrik oksit sperm kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu üzerine önemli rol oynar. NO salan bileşenlerin düşük konsantrasyonları ile inkübasyon sonucu sperm kapasitasyonunun artış gösterdiği ölçülmüştür (Tu, Chen, Liu, Chen, & Hour, 2013).

eNOS ve nNOS testiste temel olarak bulunur ve damar tonusunun fizyolojik düzenlenmesine katkıda bulunmak için intrasellüler kalsiyum artışı için aktive edilir. eNOS Leydig hücreleri, sertoli hücreleri, spermatogonya ve spermatozoidlerde ekspresyon edilir. eNOS ve nNOS testis, iskemik testis ve 12 saatten daha az reperfüzyona uğramış testiste az miktarda NO üretimini düşündürür. 24 saat ve daha fazla süreli reperfüzyonlarda NO'nin iNOS tarafından üretildiği düşünülmektedir. 48 ve 96 saatlik reperfüzyonlarda ise NO üretimi en üst seviyeye ulaşmıştır. Mononükleer ve polinükleer inflamatuvar hücrelerde de iNOS tanımlaması gözlenmiştir.

İnflamatuvar hücreler tarafından üretilen birkaç sitokin NO'ü düşündürür ve germ hücreleri üzerine etki gösterir. Reperfüzyonun erken fazında eNOS ya da nNOS nonspesifik bir şekilde gösterilir. Böylece artmış hipoksi ve NO²'nin vazodilatör etkisi gösterilmiş olur. 24 saatten daha fazla

süren iskemiyi izleyen reperfüzyon germ hücre bazal membranlarının α -fodrin proteolizini tetikler. Calpain inhibisyonu iskemik reperfüzyonun erken fazında α -fodrin proteolizisine neden olur. NO'in üretimi ve reperfüzyon fazında bozunmada sitokinlerin yüksek seviyesi germ hücre ölümü belki de nekrozis sadece calpain aktivasyonu ile değil aynı zamanda NO ve çeşitli sitokinler aracılığıyla gerçekleşir. Görünmeyen daha küçük DNA parçaları 96- 192 saat reperfüzyon sonrası TUNEL boyanmasına katkıda bulunur. NO çok sayıda inflamatuvar medyatörlerinden sadece biridir. Örneğin testiküler mikrovasküler endoteliumuna inflamatuvar hücrelerin tutunmasına adezyon molekülleri katkıda bulunur. Sonuç olarak; testisin germ hücre hasarını başlatan iskemik reperfüzyonu iNOS'u reperfüzyonun geç fazında sitokinler ve NO tarafından tetiklenen nekrotik hücre aracılığıyla tetiklemesi mümkündür. Calpainin ve iNOS'un birlikte inhibisyonu spermatogenezin bozulmasına katkıda bulunur (Üstün et al., 2008).

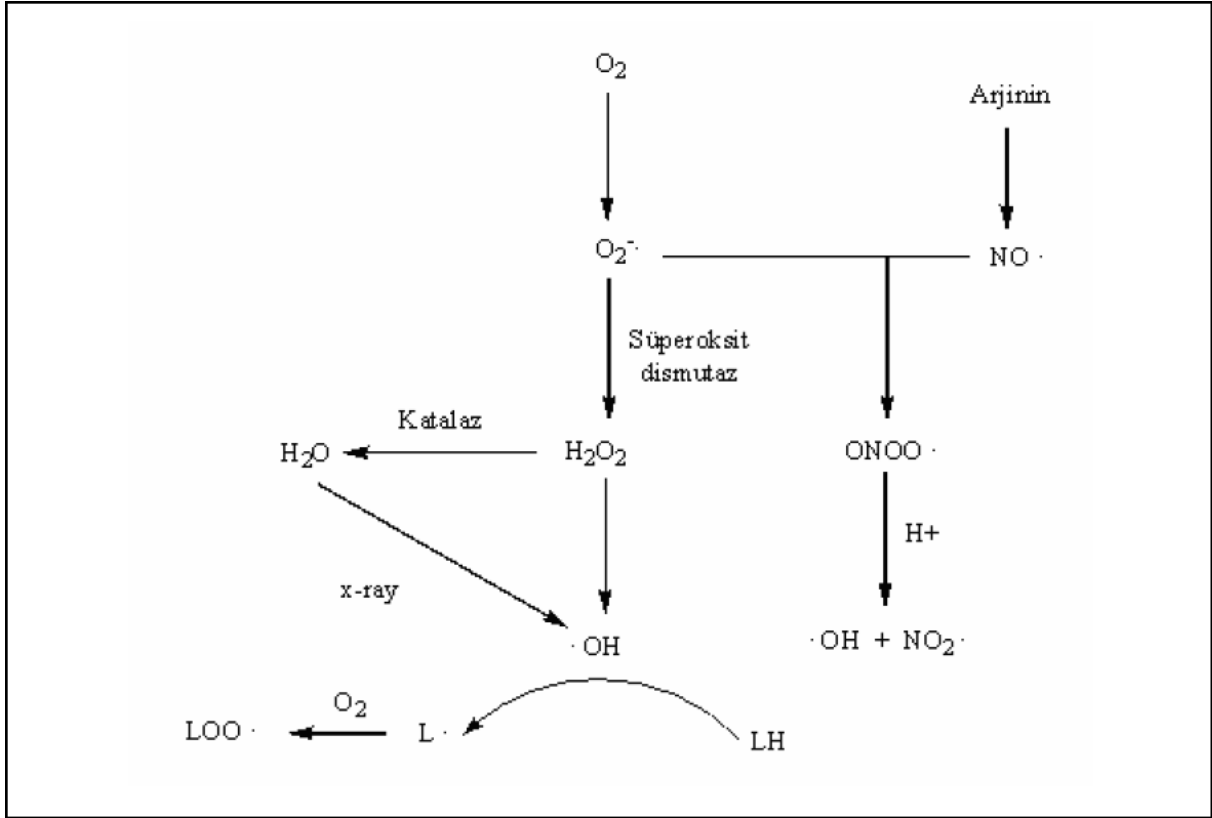
Nitrik oksitle fertilizasyon yeteneği arasında bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. NO sperm ile ovum arasındaki ilişkide de rol oynar. Kapasitasyon ortamında insan spermatozoasının NO bileşenlerinin sodyum nitropurid ile düşük dozlarda uygulanması zona pellucidaya bağlanan spermatozoa sayısını artırmıştır. NO'in artışının ATP sentezini inhibe ederek semen konsantrasyonunu azalttığı gösterilmiştir. NO hücrelerdeki ATP sentetazı inhibe ederek ATP seviyesini azaltır. ATP üretiminin azalması ile enerji eksikliği meydana gelir ve enerjinin % 90'ı ATP'den sağlandığı için sperm motilitesi bozulur. Mast hücrelerinin NO üretimini arttırdığı bilinmektedir (Yagmurdur et al., 2008; Zini et al., 1998).

Mast hücre sayısının artışının testiküler dokuda ciddi patolojik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarla mast hücrelerinin NOS ve endojen NO ekspresyonuna katkısı olduğu gösterilmiştir (Silay et al., 2014; Üstün et al., 2008). Önceki çalışmalarda

testiküler dokuda yüksek iNOS varlığında testiste ciddi patolojik değişiklikler (sertoli hücrelerinde görülebilecek) saptamışlar ve leydig hücrelerdeki mast hücre artışı ile iNOS artışı arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermişlerdir.

Bunların yanı sıra NO düzeyindeki artış ve diğer oksidan ajanlar testiküler distrese bağlı değişimlerin histopatolojik dejenerasyona neden olduğu ileri sürülmüştür. İnsan spermatozoasındaki NO üzerindeki çalışmalar çelişkili ve yetersiz bulgular vermektedir. NO' in seminal plazmadaki etkileri konsantrasyonuna göre değişmektedir. Düşük NO konsantrasyonu kapasitasyon ve zona pellucidaya bağlanmada anlamlı bir artışa sebep olur. Yüksek konsantrasyonlardaki NO ATP sentezini inhibe ederek sperm konsantrasyonunu ve motilitesini bozduğu tahmin edilmektedir. Fakat yapılan çalışmalarda NO'ın sperm motilite ve canlılığın korunmasına olan etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır (Koltuksuz et al., 2000).

eNOS ve nNOS testiste temel olarak bulunur ve damar tonusunun fizyolojik düzenlenmesine katkıda bulunmak için intraselüler Ca artışı için aktive edilir. eNOS leydig hücreleri, sertoli hücreleri, spermatogonya ve spermatozoidlerde ekspresyon edilir. eNOS ve nNOS testis, iskemik testis ve 12 saatten daha az reperfüzyona uğramış testiste az miktarda NO üretiminin kaynağıdır. 24 saat ve daha fazla süreli reperfüzyonlarda NO'ın iNOS tarafından üretildiği düşünülmektedir. 48 ve 96 saatlik reperfüzyonlarda ise NO üretimi en üst seviyeye ulaşır. Mononükleer ve polinükleer inflamatuvar hücrelerde de iNOS gözlenmiştir.



Şekil 2 : Serbest Oksijen Radikallerinin oluşumu (Büyüksü & Yiğitbaşı)

Reperfüzyonun erken fazında eNOS ya da nNOS nonspesifik bir şekilde gösterilir. Böylece artmış hipoksi ve NO_2^{\cdot} 'nin vazodilatör etkisi gösterilmiş olur 720° 1 saatlik torsiyon periyodunun sonlarına doğru olan kan akımı 3.gün reperfüzyonu ile karşılaştırıldığında sham grubunda 5 kat fazla iken opere olan grupta ise 3 kat daha fazla bulunmuştur. 30 günlük detorsiyone olan kontrol grubunda kan akım debisi ise 40 kat artarken kontrol grubu 3.gün sonunda kan akımı torsiyon sonuna göre 20 kat artış göstermiştir. Geçmiş çalışmalarda iskemik reperfüzyon hasarında leydig hücrelerinin apoptozisi için bir kanıt görülmemesine rağmen leydig hücrelerinin fonksiyonunun bozulması mümkündür. Oksidatif stresin artması durumunda leydig hücre fonksiyonu bozulur. Çünkü sertoli hücreleri ve diğer hücre tipleri leydig hücreleri ile parakrin ilişki içindedirler. Oksidatif stres direk ya da indirek olarak etki gösterir (Turner & Brown, 1993).

Spermatik torsiyon sonrasında gelişen oksidatif stresin rolü testisi de içeren farklı organlarda iskemik reperfüzyon hasarı reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İskemi reperfüzyon hasarı akciğer, kalp, böbrek ve karaciğer gibi organlarda gösterilmiştir. İskemi süresince; ne mitokondrial solunum zincirinde son elektron yakalayıcısı olarak ne de enzimatik olmayan ve serbest radikal reaksiyonlarında O^2 kullanılamaz. O^2 yeniden sağlandığında mitokondri yeniden normal fonksiyona döner fakat ROS üretimini artışı meydana gelir. Erken reperfüzyon süresince ROS üretiminin artışı reoksijenasyonda olduğu gibi non enzimatik reaksiyonlara dayanır. 1 saat torsiyonu izleyen 24 saatlik reperfüzyondan sonra ipsilateral ve kontralateral testiste oksidize glutatyon ve total glutatyon indirgenir.

Preapoptotik durumlarda ve oksidatif streste hücrelerden açığa çıkan oksidatif glutatyon sadece 24 saatlik reperfüzyonda önemli oranda azalmıştır. Bu göstergeler oksidatif stresin torsiyona dayalı reperfüzyon gelişiminde rol aynadığının bir göstergesidir. İki klasik antioksidant enzim olan süperoksit dismutaz ve katalaz testis reoksijenasyonunda farklı bir karakter gösterir (Şekil 2). Reperfüzyon gelişiminde katalaz aktivitesi önemli derecede artar. Uzun süreli iskemi izleyen 6 saat ve 2 saati geçmeyen torsiyonlardan sonra azalmış süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesi ipsilateral testiste reperfüzyondan sonra rapor edilirken kontralateral testiste görülmemiştir (Koltuksuz et al., 2000; Turner & Brown, 1993).

2.6. Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü)

Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin

çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Köken olarak "apo-TOE-sis" 'den gelmektedir ve eski Yunanca' da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir (Barut, 2008). Hücrelerin doğru yer, zaman ve sayıda olmasını sağlayan apoptozis mitozis ile dokuda sürekli bir denge halindedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir.

Apoptozisde ana morfolojik olay, nukleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılırken, apoptoziste yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (Taati, Moghadasi, Dezfoulian, Asadian, & Zendehtel, 2015).

Apoptozis, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur (Payabvash, Kiumehr, Tavangar, & Dehpour, 2008).

Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplâzması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (Kanter, Topcu-Tarlacalisir, & Parlar, 2010; Ozbal et al., 2012). Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur ki bu yapı 'zeiozis' olarak tanımlanır. Sitoplâzma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez. Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde

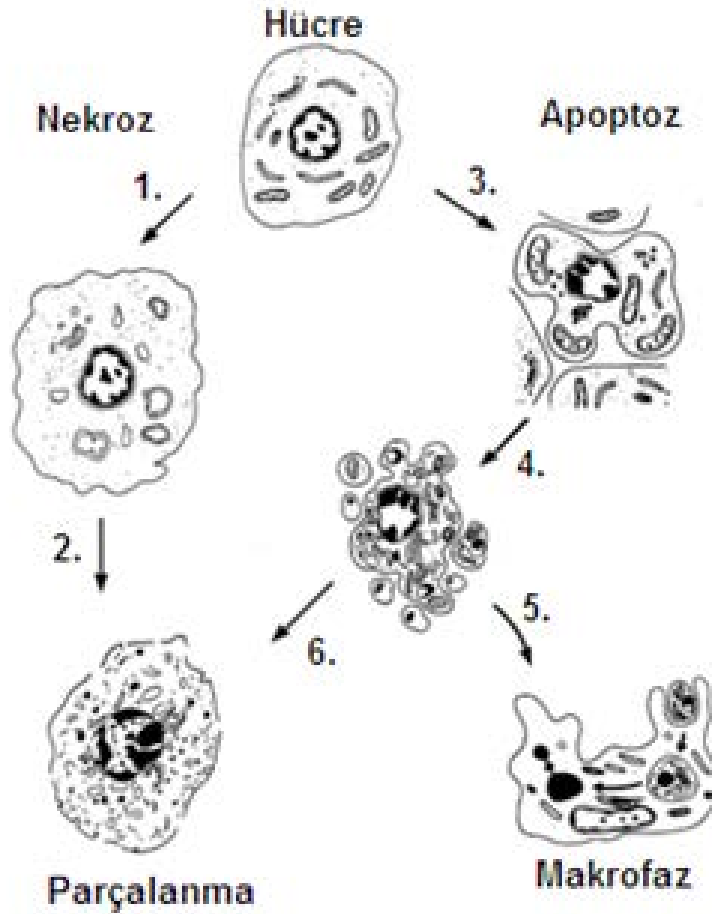
bulunan fosfotidilserin açığa çıkar (Ishikawa et al., 2005; Tsounapi et al., 2012).

Fosfotidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır (Tomatir, 2003). Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır. Sitoplâzma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler (Sinha Hikim et al., 2003; Tomatir, 2003; Zini et al., 1998).

Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilirken nekrozis fizyolojik bir ölüm şeklidir (Şekil 3). Apoptotik hücrede kromatin nukleus membranı agregasyon gösterir ve kondanse olur ancak nekroziste kromatin paterni normal hücredekine benzerdir. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepcikler "membrane blebs" oluşur. Apoptozis ile ölen bir hücrede hücre membranı intaktır ve enflamasyon gözlenmez; nekrozda ise, enflamasyon, hücresel şişme ve hücre zarının bozulması gözlenir (Sılay, 2009).

Apoptozis bir hücre hasarına yanıt olarak meydana gelir oysa nekroz genelde hasar sonucu gelişir. Apoptozis önceden belirlenen bir yol ile koordineli olarak meydana gelirken, nekroz birçok biyokimyasal olaydan bağımsız olarak gerçekleşir ve hücrede enerji stoklarının

tükenmesi ile aktive olur (Feng, Sandlow, Sparks, Sandra, & Zheng, 1999).



Şekil 3. Hücre apoptozis ve nekrozis (Üstün et al., 2008)

Programlı hücre ölümü olgun dokularda intrinsek intihar programının aktivasyonu ile hasarlı, infekte ya da değişime uğramış hücreleri ortadan kaldırmak için hem gelişimde hem de homeostazide

önemli bir mekanizmadır. Apoptozisin başlamasına neden olan ve soy hakkında bilgi içeren sinyaller viral yangı sinyali ya da ekstrasellüler sinyallerdir. Ekstrinsik sinyaller apoptozisi başlatır, ya da baskılar, intihar edecek olan hücrelere yardımcı olabilir ve aynı sinyaller bir hücre tipinde kurtulmayı başlatabilir. İntihar programının aktivasyonu spesifik mRNA molekülerinin sentezini translasyonunu gerektirir. Programlı hücre ölümü bazen hücre ölümünü intrensek mekanizmalar yoluyla transkripsiyon ya da translasyonu, kısıtlama ile de baskılayabilir. Bir hücrede apoptozis mekanizması iki yolla düzenlenir: Hücre dışından kaynaklanan, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ile (tümör nekrozis faktör süper ailesi üyeleri ve bunların reseptörleri) düzenlenen apoptozis, hücre içinden kaynaklanan, mitokondriyal yolla düzenlenen apoptozis (Feng et al., 1999; Hikim et al., 2003).

Hücre yüzeyi ölüm reseptörleri Tümör Nekrozis Faktör Reseptör (TNFR) süper ailesine ait transmembran proteinlerinin bir ailesidir. Bu reseptörler hücre dışındaki bölgelerde tekrar eden sistein zengin bölgelerde yer alırlar. Ölüm reseptörleri sitoplâzmanın iç kısmında 'ölüm bölgesi' (death domain) denen protein zincirleri taşırlar. Ölüm bölgeleri, ölüm reseptörlerine ligand bağlandığı zaman apoptotik mekanizmayı uyarırlar ve hücre dışından gelen uyarıyı hücre içine iletirler.

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu ile sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi sonucu apoptotik süreçte geri dönülemez noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör Bcl-2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin sitoplâzmaya saliverilmesi gerçekleşir veya sitokrom c'nin sitoplazmaya saliverilmesi baskılanır. Apoptozis indükleyici faktörün mitokondriden çekirdeğe geçmesi apoptozis başladığında ve AIF'nin salınımındaki artışı, mitokondrial transmembran potansiyelinin kaybolması,

periferal kromatin kondenzasyonu ve plazma membranında fosfotidilserinlerin ortaya çıkmasına neden olur (Tomatir, 2003). Bunun sonucunda yüksek moleküler ağırlıklı (50 kbp) DNA fragmentasyonu gerçekleşir. Bu etkiler kaspazlardan ve AIF'nin oksidoredüktaz aktivitesinden bağımsızdır.

Kaspaz aktivasyonundan bağımsız olan EndoG aktivasyonu, nükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olabilir. EndoG'nin salınımı, kaspaz aktivasyonuna paralel olarak apoptotik programı başlatabilir. Bax ve Bak, BH3-only proteinlerin mitokondriye hareket etmeleri ve sitokrom c salınımının düzenlenmesi için gereklidir. Hücrenin yaşayabilirlik durumu pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax oranınının bazı hematolojik malignensilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir. Bid proteini yaşayan hücrelerde sadece sitoplâzma da bulunur. Aktivasyonları sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımını sağlar (Tomatir, 2003; Wei et al., 2013). Bad proteini: Bad, birçok normal hücrede bulunmaktadır. Bad'ın apoptotik veya yaşam sinyal yolağındaki etkisi proteinin fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile düzenlenir. Bim ve Bmf proteinleri; Bim, normalde mikrotübüllerle ilişki içinde olan dynein motor kompleksi ile birlikte bulunur. Apoptozis indüksiyonu esnasında mitokondriye göç eder. Pro-apoptotik aktiviteye sahiptir ve Bmf, apoptozisin tetiklenmesi sırasında mitokondriye göç eder ve Bcl-2 ailesi ile etkileşime girerler (Taati et al., 2015).

Sitokrom c, apoptozis sırasında mitokondriden salındığında kaspaz aktivasyonunu başlatan, mitokondrial elektron zincirinin bir bileşenidir. Mitokondriyal yolla tetiklenen apoptotik yolun erken fazında mitokondrial membran potansiyelinin bozulması ve ardından sitokrom c'nin salınması genel olarak önemli rol oynar. Sitokrom c normalde iç mitokondri zarına

anyonik fosfolipid 'kardiolipin' ile birlikte bağlıdır. Kardiolipin mitokondriye özeldir, iç mitokondri zarında predominant olarak bulunur. Kardiolipin ile sitokrom c'nin ayrılması ve sitozole salınması apoptozisin başlaması için ilk adımdır. Mitokondrial elektron transport zinciri ile reaktif oksijen radikallerinin ortaya çıkması; sitokrom c'nin harekete geçmesi ve kardiolipinden ayrılması ile sonuçlanır.

Apoptozis başlatıcı faktör (AIF) mitokondrinin iç membranında bulunur. AIF 57 kD ağırlığında bir flavoprotein olup apoptozis başlangıcında mitokondriden çekirdeğe geçerek kromatin kondensasyonu yoluyla DNA fragmentasyonunu sağlar. AIF oksidoredüktaz aktivitesi gösterir. Bu etkiler kaspazlardan ve AIF'nin oksidoredüktaz aktivitesinden bağımsızdır AIF'nin çok fazla salınımı sonucunda, periferal kromatin kondenzasyonu, mitokondrial transmembran potansiyelinin kaybolması ve plazma zarında fosfotidilserinlerin ortaya çıkması ile yüksek moleküler ağırlıklı (50 kbp) DNA fragmentasyonu meydana gelir .

Apoptozun düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon regülatör geni olan p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptozise yönlendirir. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir (Oldereid, De Angelis, Wiger, & Clausen, 2001).

Kaspazlar apoptozis mekanizmasında yer alan önemli protein grubudur. Hücre sitoplâzmasında inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler. Aktif merkezlerindeki sisteinden dolayı sistein proteaz olarak

adlandırılan enzim grubudur. Apoptozisde hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler "effectors" olarak bilinirler. Bu güne kadar tanımlanan 14 kaspaz bulunmaktadır. Bunun haricinde kaspaz ailesi fonksiyonlarına göre iki alt kategoriye ayrılır:

1. Başlatıcı kaspazlar

2. İlerletici kaspazlar.

Başlatıcı kaspazlar, 90 aminoasitten fazla aminoasit içeren Kaspaz-gerektiren domain (CARD) bölümü ile ölüm domaini (DD) ve ölüm efektör domaini (DED) içeren N-terminal domain öncülü ile karakterizedir. Apoptotik sinyal yolunun erken safhasında etki gösterirler ve apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini ilerletici kaspazlara iletirler.

Kaspaz inhibitörlerinden bazılarının önemli olduğu durumlar nöro-dejeneratif hastalıklar, iskemi-reperfüzyon zedelenmesi ve otoimmün hastalıklardır. Kaspazlar potansiyel hedefleri oluşturarak bu hastalıkların tedavisinde inhibitör tedavide kullanılabilirler. Reseptörler aracılığıyla kaspaz aktivasyonuna ve apoptozise yol açarlar. Diğer yol mitokondriden Sitokrom-c sitozol içerisine bırakılır ve kaspaz aktivasyon proteinine (Apaf 1) bağlanır. Ardından Apoptozom olarak adlandırılan multiprotein yapısındaki kaspaz aktive eden kompleksin toplanmasına neden olur.

Apoptozis tanı yöntemleri içerisinde apoptotik hücre morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan ışık, floresan, lazerli konfokal, elektron ve faz- kontrast mikroskobu ile inceleme yer alır. DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde agaroz jel elektroforezi, enzimatik yolla DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi ISEL, TUNEL, İn situ hibridizasyon tekniği ve Anneksin-V yöntemi ile apoptozise özgü proteinlerin saptanması ve flow sitometri yöntemi kullanılır (Kanter et al., 2010; Tu et al., 2013).

2.6.1. Testiste Apoptozisin Rolü

Testisteki germ hücre dejenerasyonu hem gelişimde hem de erişkinde oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. Ve sıçanlarda doğurma zamanına kadar testisteki hücrelerin yarısının öldüğü bilinmektedir. Bu dejenerasyon sırasında apoptozis yoluyla ölüm en sık kullanılan mekanizmadır. Bu mekanizmanın içerisinde Bcl- 2 ailesi, kaspazlar, ölüm reseptörleri ve p53 gibi faktörler yer alır. Doku canlılığında ve devamında, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptozis, testiküler dokuda da sık saptanan bir fenomendir.

Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır. Normal spermatogenez içinde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar (Sinha Hikim et al., 2003). Apoptozis, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar. Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir. Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptozis gerçekleştiği bildirilmiştir (Kerr, 1992).

Testiste, defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin % 75'i apoptozise maruz kalır ve apoptozisin doğal bir mekanizma olarak normal spermatogenez sırasında sperm üretimini %25 ile %75 arasında değişen oranda azalttığı bilinmektedir (Kerr, 1992). Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır. Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik

hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artış görülebilir (Hikim et al., 2003; Sinha Hikim et al., 2003). Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozisinin hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir.

Hipofizektomize immatür ratlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde masif apoptozis ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da HCG tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir. Ayrıca, gonadotropin ya da testosteron eksikliği dışında matürasyon arresti ve hipospermatogeneze yol açan tüm klinik durumlarda da apoptozis görülebilir. Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere olan sensitivitesi de germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini artıran diğer bir faktördür. Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimülanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptozis gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (Sılay, 2009).

2.7. Eikozanoidler

Eikozanoidler yirmi karbon atomlu yağ asitlerinden türeyen ve güçlü biyolojik etkinlik gösteren endojen maddelerdir. Eikozanoidler, prekürsör yağ asitlerinden oluşmalarında rol oynayan enzim türüne göre:

- I. siklooksijenaz ürünleri,
- II. lipoksijenaz ürünleri
- III. 450 monoksüenaz

ürünleri şeklinde üç ana gruba ayrılırlar. Bu grupların fizyolojik ve patolojik olaylara katkıları ve çeşitli sistem ve organlara etkileri bakımından aralarında belirgin farklar vardır (Cingi, Oğhan, Ünlü, Tekat, & Okuyucu, 2011).

2.7.1. Siklooksijenaz Ürünleri

Prostanoidler diye de adlandırılan siklooksijenaz ürünü eikozanoidler, prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlardır. Siklooksijenaz enzimleri (COX-1 ve COX-2) araşidonik asidin, adı geçen prostanoidlerin prekürsörleri olan prostaglandin G ve H'ye dönüşümünü katalize eder. Bu enzimlerin diğer adı prostaglandin G/H sentazdır. Prostaglandinler (PG'ler), karbon zincirinin ortasında bir siklopentan halkası bulunan eikozanoidlerdir. Siklopentan halkasındaki substituentlerin durumuna göre E, F, D, A, B ve C diye gruplara ayrılırlar. Primer prostaglandinlerin çeşitli hücre tiplerinde yaygın şekilde dağılmış ve biyolojik yönden önemli olanları, E ve F grubu prostaglandinlerdir. Her bir grup içindeki üyeler, alifatik yan zincirler içindeki doymamış bağ sayısını gösteren ve grubu belirleyen harfin alt kısmına konulan 1,2 veya 3 sayıları ile simgelenirler. Halka üzerinde iki hidroksil grubu içeren PGF'lerin α ve β stereoisomerleri vardır. Vücutta sadece α izomerler oluşur, β izomerler oluşmaz (Silay et al., 2014).

Prostasiklinler, yapıcı prostaglandinlere çok benzerler ve bazı kaynaklarda prostaglandin olarak kabul edilirler. Prostaglandinlerden kimyaca farkı, sikiopentan halkasına ilave olarak, C-6 ve C-9 arasında yerleşen oksijen köprüsü nedeniyle ikinci bir halka daha içermeleri yani monosiklik değil bisiklik olmalarıdır. Diğer prostaglandinlerin aksine bütün hücrelerde değil, esas olarak damar çeperindeki hücrelerde (endotelde ve az miktarda olmak üzere damar düz kas hücrelerinde) yapılmaları ile de prostaglandinlerden ayrılırlar. Vücuttaki ana prostasiklin olan PGI_2 (prostaglandin I_2)'nin büyük kısmı damar endotel hücrelerinde yapılır. Yukarıda belirtilen E ve F grubu prostaglandinlerden farklı olarak. PGI_2 kanın akciğerlerden geçişi sırasında fazla yıkılmaz, hatta, önemli ölçüde akciğer damar yatağından kana salıverilir. Prostasiklinler. damar içinde

trombus oluşmasını engelleyen en önemli etkenlerdir. Stabil olmayan çok kısa etkili birleşiklerdir. Tromboksanların yapıcı prostaglandinlerden farkı, beşli siklopentan halkası yerine, biri oksijen değerleri karbon olan alü üyeli bir halka içermeleridir. Esas olarak trombositler tarafından sentez edilmeleri ile de prostaglandinlerden ayrılırlar. Tromboksanlar belirli hücrelerde oluşmaları ve stabil olmamaları bakımından prostasiklinlere benzerler. Tromboksanlar ve prostasiklinler, trombositleri zıt yönde etkileyen ve onların agregasyon ve adezyonunu düzenleyen bir sistem oluştururlar (Sılay, 2009).

Dokularda PG'ler, prostasiklinler ve tromboksanlardan başka onların prekürsörleri olan ve prekürsör yağ asitlerinden oluşan siklik endoperoksidler bulunur. Bunlar PGG₂ ve PGH₂ dir, yarılanma ömürleri çok kısa olan maddelerdir. Prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlar tek doymamış bağlı (monoenoik), iki doymamış bağlı (dienoik) veya üç doymamış bağlı (trienoik) olurlar. Monoenoik, dienoik ve trienoik prostanoidlere sırasıyla 1 serisi, 2 serisi ve 3 serisi adı da verilir. Prostasiklinlerin sadece 2 ve 3 serileri vardır: 1 serisi bulunmaz. Vurgulanması gereken bir nokta, hücrelerde siklooksijenaz ürünlerinin prekürsörü olarak en fazla bulunan esansiyel yağ asidinin, araşidonik asit ve onun prekürsörü olan linoleik asit olmasıdır. Araşidonik asitten dienoik prostanoidler oluşur (örneğin PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ ve TxA₂).

2.7.2. Lökotrienler ve Diğer Lipoksijenaz Ürünleri

Araşidonik asidin ve benzeri poli-doymamış yağ asitlerinin lipoksijenaz enzimleri (5-, 12- ve 15- lipoksijenazlar) tarafından metabolize edilmesi sonucu meydana gelen ürünlerdir. Lipoksijenazlar tarafından bu ürünlerin meydana getirilmesi esas olarak trombositlerde ve lökositlerde incelenmiştir. Trombositlerde sadece 12-LOaz bulunur. Lökositlerde 5-Lipoksijenaz (5-LOaz) araşidonik asidi 5-HPETE'ye çevirir.

5-Lipoksijenaz mast hücrelerinde de bulunur. Trombosit lipoksijenazı (12-lipoksijenaz), araşidonik asidi 12-hidroperoksieikozatetraenoik asit'e (12-HPETE'ye) dönüştürür. Arteriyel endotel hücreleri 15-lipoksijenaz enzimi içerirler. Bu enzim etkisi ile endotel hücrelerinde linoleik asitten 13-hidroksioktedekadienoik asit (13-HODE) oluşur. Bu önemli metabolit, endotel yüzeyinde trombosit ve lökositlerin agregasyonunu engeller. 5-LOaz, sitosolik bir enzimdir. Aktif duruma gelebilmesi için sitoplazmadan perinükleer membrana translokasyon yapılması gerekir. Aktivasyonda Ca^{2+} iyonu rol oynar ve bu iyonun etkisi altında, 5-LOaz, perinükleer membranda bulunan bir integral protein olan 5-lipoksijenaz aktive edici protein (FLAP, five LAP) ile birleşerek etkinlik kazanır. Lipoksijenazların prekürsör yağ asitlerinden birinci aşamada oluşturdukları hidroperoksi türevi ara ürünleri (HPETE'ler)'den hidroksi türevi ara ürünler (HETE'ler) ve onlardan da lökotrienler meydana gelir. Araşidonik asitten oluşan lökotrienler, tetraenoik (4 Çift-bağlı) halkasız yağ asitleridir. 5-LOaz ürünleri arasında LTA_4 primer lökotiendir; diğer beş lökotrien ondan oluşurlar(Kent, 2009; Sılay, 2009).

Monohidroksilli lipoksijenaz ürünleri olan 5-HETE ve 12 HETE ile dihidroksilli ürün olan LTB_4 (kimyasal adıyla 5, 12di-HETE) güçlü kemotaktik etkinlik gösteren güçlü proinflamatuvar maddelerdir.Çeşitli lökosit türlerinde, (polimorfonükleer ve eozinofil lökositler gibi) ve bazı T hücresi alt-tiplerinde LTB_4 'e yüksek afinite gösteren BLT reseptörleri bulunur. LTB_4 tarafından bu reseptörlerin aktivasyonu lökosit ve monosit fonksiyonlarının ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin stimülasyonuna ve kemotaksi, kemokinezis (migrasyon) ve agregasyona neden olur. Diğer lökotrienlerde bu özellik yoktur. Adı geçen LOaz ürünleri PGI_2 sentazı güçlü bir şekilde inhibe ederler (Saeed Arayne, Sultana, & Hussain, 2009).

Kükürtlü lökotrienler (sulfidolökotrienler veya diğer adıyla sisteinillökotreinler) olan LTC_4 , LTD_4 ve LTE_4 , SRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis)'in üç ögesini oluştururlar. Bu madde derhal oluşan aşırı duyarlık (tip I alerji) reaksiyonları sırasında mast hücreleri ve

bazofil lökositlerden saliverilen bir lökotrien karışımıdır ve bu adı, lökotrienlerin bulunmasından önce verilmiştir (Ercan, 2012).

LTC₄ ve LTD₄ hem damar ve hem de damar dışı düz kasları büzer. LTD₄ en güçlü bronkokonstriktör ve kapiler permeabilitesini artırıcı etkinlik gösteren bileşiktir. Postka-piler venüllerden plazma sıvısının dokuya sızmasına ve ödeme neden olur. LTC₄ daha az etkilidir. LTD₄ . ortak etkiler yönünden in vitro ve in vivo koşullarda histaminden 100-10.000 kez daha güçlüdür(Cingi et al., 2011).

Lökotrienler yukarıda belirtilen çeşitli etkilerini hücre membranında yerleşmiş kendilerine özgü reseptörleri aktive etmek suretiyle yaparlar. Şimdiye kadar yapılan incelemeler, aşağıdaki hastalıklarda bu hastalıklarla ilgili organ ve yapılardaki patolojik bozuklukların oluşmasında lökotrienlerin özellikle rol oynadığını ortaya koymuştur: bronşiyal astma (akciğerler), psöriyazis (cilt), ülseratif ve diğer inflamatuvar kolon hastalıkları (kalın barsak), romatoid artrit ve gut artrit (eklemler)(Cingi et al., 2011).

Lökotrien reseptörleri ve blokörleri: Lökotrienler için hedef hücrelerde üç tür reseptör belirlenmiştir ve endojen agonistlerinin adlarına göre adlandırılmışlardır. Bunlar BLT, sisLT₁ ve sisLT₂ reseptörleridir (eski adlarına göre. sırasıyla LTB₄, LTD₄ ve LTC₄ reseptörleri). sisLT₁ reseptörüne, LTD₄'den başka LTE₄ tarafından da aktive edilen ortak reseptör olduğu için LTD₄/LTE₄ reseptörü adı da verilmiştir.SisLT₁ reseptörlerinin çok sayıda kompetitif antagonisti vardır; bunlardan montelukast, zafirlukast, pobilukast, pranlukast ve ibudilast halen bronşiyal astım tedavisinde denenmektedir.

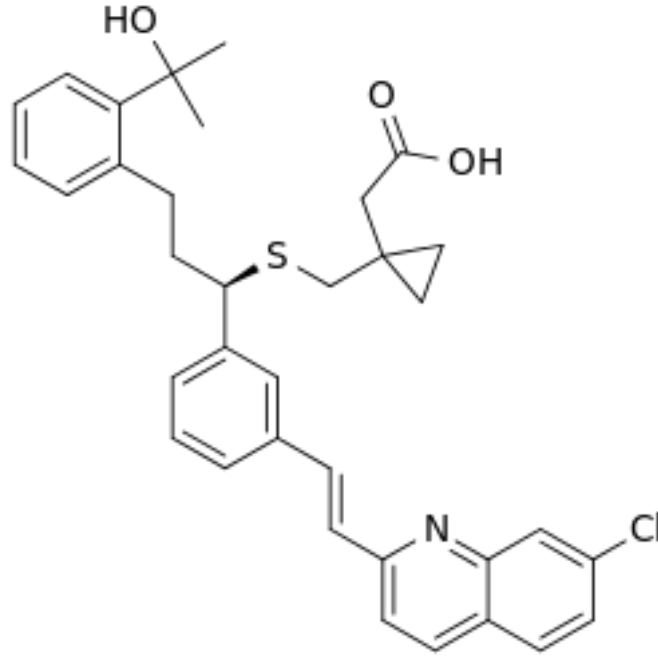
2.7.3. Montelukast

Montelukast 1990'ların başlarında geliştirilen ve piyasaya sürülen bir lökotrien reseptör antagonistidir. Montelukast, oral uygulamadan sonra hızla ve hemen hemen tümüyle emilir. Erişkinlere aç karnına 10 mg alındığında ortalama doruk plazma konsantrasyonuna (Cmaks) 3 saatte ulaşılır ve yarılanma ömrü 2.7-5.5 saat arasındadır (Köse et al., 2011). Oral olarak alındıktan sonra bağırsaklardan %64'ü hızla emilen montelukastın (oral biyoyararlanım) metabolize edilmesini takiben %86'sı feçesle, az bir kısmı da idrar yoluyla atılmaktadır. Oral biyoyararlanım ve Cmaks standart yemekten etkilenmemektedir. 5 mg tabletini aç karnına alan erişkinlerde ortalama Cmaks değerine 2-5 saatte ulaşılır. Oral biyoyararlanım montelukast aç karnına alındığında %73 iken, tok karnına alındığında %63'e düşer. Karaciğer ve biliyer yolla bağırsaklardan atılırken oksidatif eliminasyonunda sitokrom P450 izoenzimleri (CYP3A4 ve CYP2C9) rol oynamaktadır (Cingi et al., 2011).

Montelukast (Şekil 4) kuvvetli bir selektif LTD4 reseptör antagonisti (Sis-LT1) olarak kabul edilmektedir. Montelukastın 6 ay ve üzeri gruplarda günde tek doz formunda kullanımı onaylanmıştır. Diğer antilökotrienlerle karşılaştırıldığında daha geniş bir kullanım alanına ve kullanım kolaylığına sahip görünmektedir. Montelukast çok iyi metabolize olmaktadır. Terapötik dozlarda yapılan çalışmalarda erişkin ve çocuk hastalarda montelukast metabolitlerinin plazma konsantrasyonları saptanamaz düzeydedir. İnsan karaciğer mikrozomlarının kullanıldığı in vitro çalışmalar, sitokrom P450 3A4 ve 2C9'un montelukast metabolizmasında rol oynadığını göstermektedir (Köse et al., 2011). Bilinen sitokrom P450 3A4 inhibitörleri (örneğin; ketokonazol, eritromisin) ve 2C9 inhibitörlerinin (örneğin; flukonazol) montelukast farmakokinetiği üzerine etkileri henüz araştırılmamıştır. İn vitro çalışmalarda terapötik plazma konsantrasyonlarındaki montelukast sitokrom P450 3A4, 2C9,

1A2, 2A6, 2C19 veya 2D6'yi inhibe etmemiştir. Sitokrom P450 sisteminde metabolize edilmesine rağmen başta kumadin, teofilin ve oral kontraseptifler olmak üzere henüz doz ayarlaması gerektirebilecek herhangi bir ciddi ilaç etkileşimi olduğu yönünde bildirim yapılmamıştır (Cingi et al., 2011).

Sağlıklı erişkinlerde montelukastın plazma klirensi ortalama 45 mL/dakika'dır. Radyoaktif işaretli montelukastın oral dozunu takiben radyoaktivitenin %86'sı 5 günlük fekal birikimde %0.2'den azı idrarda elde edilmiştir. Montelukastın oral biyoyararlanım hesapları da buna eklendiğinde montelukast ve metabolitlerinin hemen hemen tümüyle safrayla atıldığı ortaya çıkmaktadır.



Şekil 4. Montelukastın moleküler yapısı (Sılay, 2009)

2.7.3.1. Montelukastın Yan Etkileri

Montelukastın kayda değer bir yan etkisi bulunmamaktadır. En sık görülen yan etkisi başağrısı olarak bildirilmiş olup, bu yan etkinin oranı plaseboya yakındır. Genel antilökotrien grubu ilaçların piyasaya sürüldüğü ilk yıllarda bu gruptaki ilaçların Churg-Strauss sendromunu tetiklediği yönünde bir şüphe olmakla birlikte son yıllarda yapılan gözlemsel çalışmaların bulguları bu düşünceyi destekler nitelikte değildir (Fleck et al., 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM)' dan sağlanan Wistar Albino cinsi, 24 adet, 200-250 gr ağırlığında erişkin erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar deney süresince 12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısısı $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve nemi $\% 55\pm 5$ olarak ayarlanmış ortamda yaşatıldı. Standart yiyecek ve suyla beslendi. Hayvanlar deneye başlamadan 1 hafta önce polikarbon kafeslere konularak ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 19.08.2015 tarihli ve 424-1 sayılı kararıyla çalışmamızdaki tüm işlemler onaylanmıştır.

3.2. Kimyasallar ve Cerrahi Gereçler

Montelukast, Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş (İstanbul) firmasından, Ketalar Eczacıbaşı firmasından (Küçükkarıştıran, Lüleburgaz), Alfazyne Alfasan firmasından (Woerden, Hollanda), İpek iplik, Yü-ce tıbbi gereçler (İstanbul) firmasından sağlandı.

3.3. Cerrahi İşlemler

Cerrahi girişim öncesi anestezi, intramusküler yolla 70 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin uygulanarak sağlandı, gerektiğinde sıçanların hareketsizliğini sürdürmek için anestezi ajanlarının aynı dozları tekrarlandı. Skrotum derisine $\%10$ luk povidon iyot çözeltisi ile temizlik

yapıldı. Deneklere skrotum orta hat üzerinde, 2 cm uzunluğunda vertikal cilt ve cilt altı kesisi uygulandı. Skrotal boşlukta sol testis tunika vaginalis ve spermatik kord ile birlikte gubernakulumdan künt diseksiyonla ayrılarak dışarıya alındı. Her işlem sonrasında testis dokusu skrotuma yerleştirilerek ve 5.0 ipek suture kullanılarak skrotum kapatıldı (şekil 5).

Torsiyon, spermatik kordun 720° saat yönünde çevrilmesiyle oluşturuldu ve spermatik kord 2 yerden ipele bağlandı. 6 saat torsiyon süresinin ardından, 1 saat boyunca detorsiyon uygulandı. Detorsiyon, torsiyonun aksi yönünde eş derecede çevrilmesiyle sağlandı. 7 saatlik deney periyodunun sonunda hayvanlar ketamin/ksilazin ile anestezi altında sakrifiye edildi ve skrotumdaki dikişler alınıp testisler çıkarıldı.

Deney süresince hayvanlar 3 gruba ayrıldı:

Grup 1: Kontrol + Serum Fizyolojik grubu

Bu gruptaki hayvanlara cerrahi prosedür uygulandı. Testisler dışarı çıkarıldıktan sonra torsiyon uygulanmadan tekrar skrotuma yerleştirildi. Suture atılmadan testisler çıkarıldı. Bu grup cerrahi stresin testis üzerine olan etkilerini belirlemek için kullanıldı. Bu gruptaki hayvanlara i.p. yolla SF uygulandı.

Grup-2: İskemi / Reperfüzyon grubu

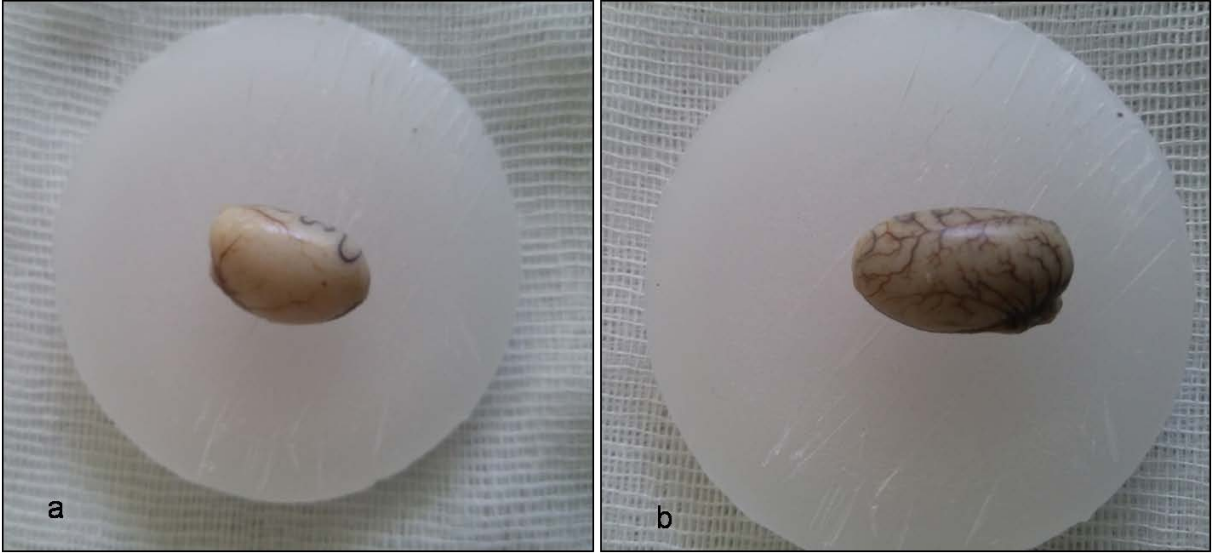
Torsiyon, sol testisin spermatik kordunun saat yönünde 720° döndürülerek ve 2 yerden mikro klemp ile sabitlenerek sağlandı ve normal anatomik bölgesine yerleştirildi. Cilt 5/0 ipek suture ile yaklaştırılarak geçici olarak kapatıldı. 6 saat sonra cilt sutureleri açılarak testis eski pozisyonuna getirildi ve 1 saat detorsiyone edildi (şekil 5). Detorsiyondan 30 dakika önce SF (10 mg/kg ip.) uygulandı. 7 saatlik deney süresinin sonunda testis çıkartılıp alındı (Beytur et al., 2012; Ozturk et al., 2010).

Grup-3: İskemi / Reperfüzyon + Montelukast grubu

Torsiyon, sol testisin spermatik kordunun saat yönünde 720° döndürülerek ve 2 yerden mikro klemp ile sabitlenerek sağlandı ve normal anatomik bölgesine yerleştirildi. Cilt 5/0 ipek suture ile yaklaştırılarak geçici olarak kapatıldı. 6 saat sonra cilt sutureleri açılarak testis eski pozisyonuna getirildi ve 1 saat detorsiyone edildi (şekil 5). Detorsiyondan 30 dakika önce montelukast (10mg/kg, ip.) uygulandı. 7 saatlik deney süresinin sonunda testis çıkartılıp alındı (Beytur et al., 2012; Ozturk et al., 2010).



Şekil 5: Cerrahi işlemler. (A): Skrotum açılarak serbest hale getirilen ve skrotumun dışına çıkarılan testis. (B): Serbest hale getirilen testis ve spermatik kordun torsiyone edilmesi. (C): Torsiyon işleminden sonra skrotuma geçici suture uygulanması. (D): 6 saatlik torsiyon sonrasında spermatik kordun ve testisin görünümü. (E): 6saatlik torsiyon + 1 saatlik reperfüzyon sonrası spermatik kordun ve testisin görünümü. (F): Deney sonrası testistisin alınması.



Şekil 6: (a) Deney sonrasında alınan torsiyon uygulanmamış testis. (b) Torsiyon ve detorsiyon uygulanmış iskemi/reperfüzyon hasarı olan testis.

3.4. Testis Ağırlıklarının Ölçümü

Çevre dokularından iyice temizlenen (şekil 6) testislerin her biri Ohaus (Adventurer Pro AV264C) marka hassas terazi ile tartıldı. Testis ağırlıkları her sıçan için ayrı ayrı sağ ve sol olmak üzere tartılarak kaydedildikten sonra, testisler Bouin çözeltilisine alındı.

3.4.1. Testis Ağırlık İndeksinin Hesaplanması

Deneye başladığımızda ölçülen vücut ağırlığı ile aynı hayvana ait sağ ve sol testis ağırlığı toplamı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak her bir hayvan için TAI değerleri belirlendi;

$$\text{TAİ: } [(\text{sağ} + \text{sol testis ağırlıkları toplamı}) / \text{vücut ağırlığı}] \times 100$$

3.5. Histolojik Yöntem

Çalışmamızda testis dokusu örnekleri ışık mikroskopik inceleme için bouin fiksatifine konuldu (tablo 1) ve uygun takip yöntemi uygulandı (şekil 6). Daha sonra dokular gömülerek bloklandı. Parafine gömülen bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alındı ve preparat haline getirilen örnekler histolojik incelemeler için Hematoksilen Eosin (HE) (tablo 2) boyası ile boyandı. Bazal laminanın incelenmesi için de Periyodik Asit Schiff (PAS) (tablo 3) ve Hemotoksilen kombinasyonu ile boyama yapıldı. Konfokal mikroskop kullanılarak yapılan histolojik inceleme için alınan dokular Akridin oranj ve Phalloidin boyaları ile ikili boyama yapıldı. Işık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapılan preparatların Olympus DP-70 ile fotoğrafları çekildi. Konfokal mikroskop ile yapılan incelemelerde Leica TCS-SP5 Konfokal Mikroskobu kullanıldı ve destek yazılım (Leica Confocal Software Version 2.0) ile görüntüleme yapıldı.

3.5.1. Mikroskopik İncelemeler İçin Dokuların Hazırlanması

Bouin fiksatifinin hazırlanışı

Pikrik asit	75 ml
%37' lik formaldehit	25 ml
Glasiyal asetik asit	5 ml

Pikrik asitin hazırlanışı

Distile su	1 lt
Pikrik asit	12 gr

Pikrik asitin iyice erimesi sağlandı ve balon joje içerisinde ağzı kapatılarak gece dinlenmeye bırakıldı. Kullanmadan önce szld.

Bouin Fiksatifinde Takip	
Bouin fiksatif	2 gün
%50'lik alkol	3 defa alkala
%70'lik alkol	1 gece
%80'lik alkol	1 saat
%90'lık alkol	1 saat
%96-I alkol	1 saat
%96-II alkol	1 saat
%100'lk alkol	30 dakika
Ksilol-I	10 dakika
Ksilol-II	10 dakika
Parafin-I	45 dakika
Parafin-II	1 saat
Parafin-III	1 saat

Tablo 1: Bouin fiksatif takip süreleri

H-E Boyama Yöntemi	
Ksilol-I	10 dakika
Ksilol-II	10 dakika
%96-I'lik alkol	5 dakika
%96-II'lik alkol	5 dakika
%90'lık alkol	5 dakika
%80'lik alkol	5 dakika
%70'lik alkol	5 dakika
Distile su	5 dakika
Hematoksilen	1 dakika
Çeşme suyu	Akarsu altında 5 dakika yıkama
Eosin	5 dakika
%70'lik alkol	3 dakika
%80'lik alkol	3 dakika
%90'lık alkol	3 dakika
%96-I'lik alkol	3 dakika
%96-II'lik alkol	3 dakika
Ksilol-I	10 dakika
Ksilol-II	10 dakika

Tablo 2 : H&E boyama prosedürü

PAS+H boyasının hazırlanışı:

A-Periyodik Asit solüyonu

Periyodik asit	1 g
Distile su	200 ml

B-Schiff solüsyonu

Bazik fuksin	1 g
Distile su	200 ml
Potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$)	2 g
Hidroklorik asit (HCl)	2 ml
Aktif kömür	2 g

Periyodik asit distile suda çözdürüldü ve kaynatıldı. Kaynatılan solüsyona bazik fuksin ilave edilerek karıştırıldı ve 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 2 g $K_2S_2O_5$ eklenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığına geldiğinde 2 ml HCl eklenip karıştırıldı. 2 g aktif kömür eklenip yeniden karıştırıldıktan sonra karanlık ortamda oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Solüsyon süzülerek kullanıldı.

PAS Boyama Yöntemi	
Ksilol-I	10 dakika
Ksilol-II	10 dakika
%96-I'lik alkol	5 dakika
%96-II'lik alkol	5 dakika
%90'lık alkol	5 dakika
%80'lik alkol	5 dakika
%70'lik alkol	5 dakika
Distile su	5 dakika
Periyodik asit	5 dakika
Distile su	Hafifçe çalkalanıp 2 dakika bekletilir.
Schiff solüsyonu	15 dakika
Çeşme suyu	Yıkama
Hematoksilen	1,5 dakika
Çeşme suyu	Yıkama
%70'lik alkol	3 dakika
%80'lik alkol	3 dakika
%90'lık alkol	3 dakika
%96-I'lik alkol	3 dakika
%96-II'lik alkol	3 dakika
Ksilol-I	10 dakika
Ksilol-II	10 dakika

Tablo 3 : PAS boyama prosedürü

Akridin Oranj – Falloidin İkili Boyama

Parafin bloklardan alınan kesitler flüoresan fallotoksin ile boyanırken, falloidin, 25 µl metanolik stok solüsyon + 1000 µl PBS ile dilüe edildi. Falloidin ile muamele edilen preparatlar 45-60 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildi. PBS ile yıkayıp akridin oranj boyasıyla 15 dakika muamele edildi ve PBS ile yıkandı. Boyanan lamalar su bazlı yapıştırıcı ile kapatıldı ve Konfokal Mikroskop ile incelendi.

3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi IBM Statistics 21 ve SigmaStat 3,5 paket programında yapıldı. Başlangıç vücut ağırlığı, deney sonu vücut ağırlığı, sağ testis ağırlığı, sol testis ağırlığı, toplam testis ağırlığı ve testis ağırlık indeksi değerleri ortalama \pm standart sapma olarak hesaplandı. Deneklere ait verilerin öncelikle normal dağılıp dağılmadıkları ve varyanslarının homojenliği test edildi. Grupların karşılaştırılmasında veriler normal dağılıyor ise tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen çoklu grupların testinde ise Kruskal- Wallis H testi kullanılmıştır. Verilerin normal dağılım varsayımına uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile test edilmiştir. Başlangıç vücut ağırlıkları ile normal dağılıma uygunluk olan verilerde Paired t Test, normal dağılıma uygunluk göstermeyen verilerde Wilcoxon Rank Test ile test edilmiştir. İstatistik anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

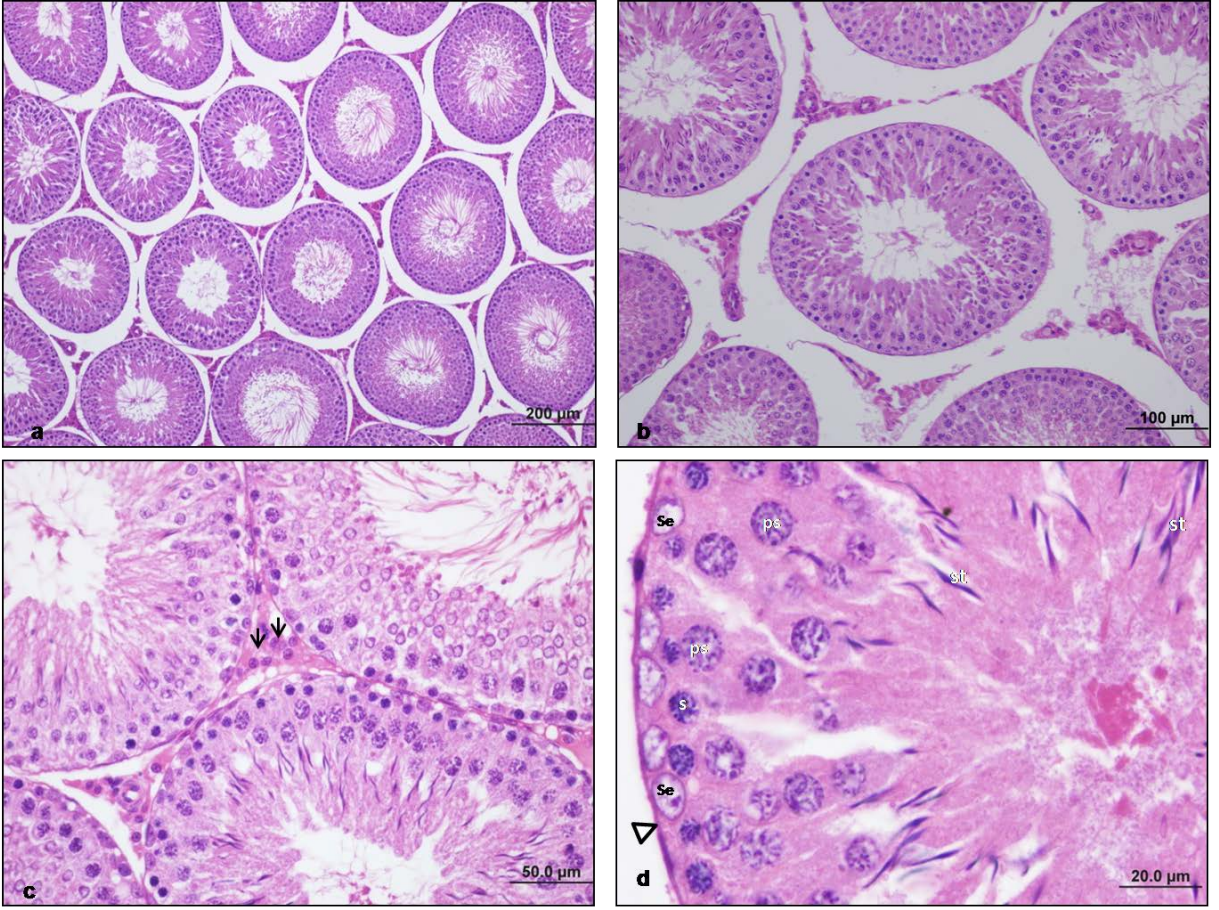
Işık mikroskopik olarak kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçan testislerinde genel görünümünü saptamak için preparatlara Hemotoksilen-Eozin (H-E) boyası ve Periyodik Asit-Schiff (PAS + H) boyası yapıldı. Ayrıca Konfokal mikroskop kullanılarak yapılan histolojik inceleme için alınan dokular akridin oranj ve falloidin boya ile ikili boyama yapılarak incelendi.

4.1. Mikroskopik Bulgular

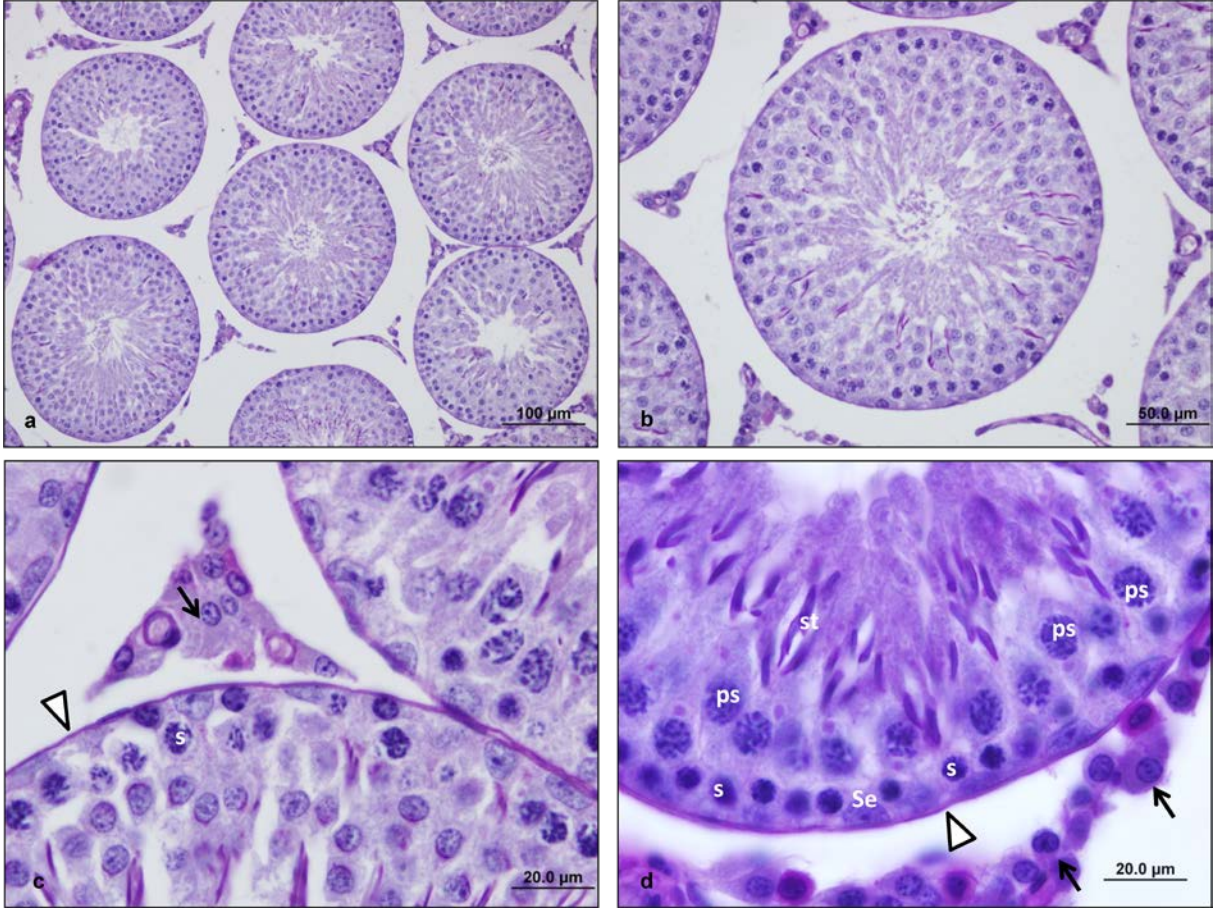
Kontrol grubu: İncelenen preparatlardan elde edilen bulgulara göre; kontrol grubunun yapılan mikroskopik incelemelerinde testiste, seminifer tübül yapıları, bazal lamina yapısı ve interstisyel alan normal yapıda gözlemlendi (Şekil 7). Normal görünümlü ve düzgün bir spermatogenezin olduğu seminifer tübüller, Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücrelerini içeriyordu. İnterstisyel alanda yer alan Leydig hücreleri eozinofilik sitoplazmaları, eksentrik yerleşimli nükleusları ve tipik yerleşim yerleriyle oldukça düzgün görüldü. PAS + H ile boyadığımız kontrol grubu testis örneklerinde PAS pozitif boyanmış bazal membran yapısı normal yapıda gözlemlendi (Şekil 8).

İskemi / Reperfüzyon grubu: İskemi / Reperfüzyon grubunu oluşturan sıçan testislerinin ışık mikroskopu ve konfokal mikroskop incelemelerinde yoğun hasar gözlemlendi. Bu hasarlardan seminifer tübül epitelinde hücresel kayıplar ile tübül duvarında incelme (Şekil 14), hücresel nekroz , vakuolizasyon ve tübüller atrofi ve multinükleer dev hücreler dikkat çekmekteydi (Şekil 9-10). İnterstisyel alanda ise damar duvarında kalınlaşma ve ödem gözlemlendi. Ayrıca İ/R uygulanan grupta tübül duvarından bazal membran ayrılması gözlemlendi (Şekil 11).

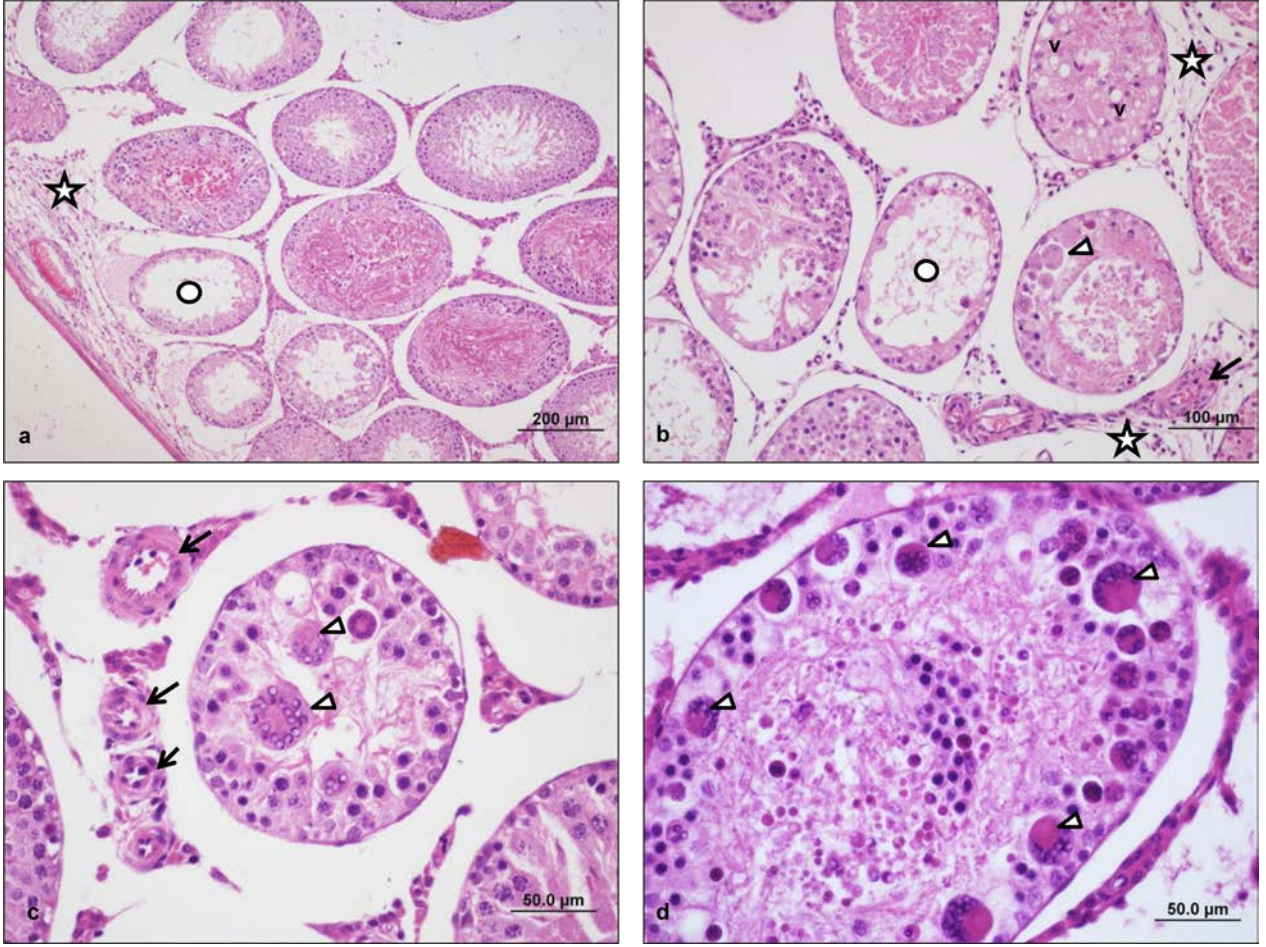
İskemi/Reperfüzyon + Montelukast grubu: İ/R uygulandıktan sonra detorsiyon öncesi ML verilen grubu oluşturan sıçan testis örneklerinin konfokal ve ışık mikroskopundaki incelemeleri sonucunda, birkaç tübülde hasar gözlense de tedavi uygulanmayan İ/R grubuna oranla genellikle azalmış hasar ve normale yakın yapıdaki seminifer tübüller ve korunmuş spermatogenik hücreler ile spermatogenezin devam ettiği gözlemlendi (Şekil 12). İskemi / Reperfüzyon grubunda vasküler konjesyon ve intersitijel alanda ödem gözlenmekteydi ancak ML verilen grupta konjesyon ve ödemin dikkate değer şekilde azaldığı gözlemlendi. Ayrıca bütünlüğünü koruyan normale yakın yapıdaki PAS pozitif bazal membran yapısı gözlemlendi (Şekil 13).



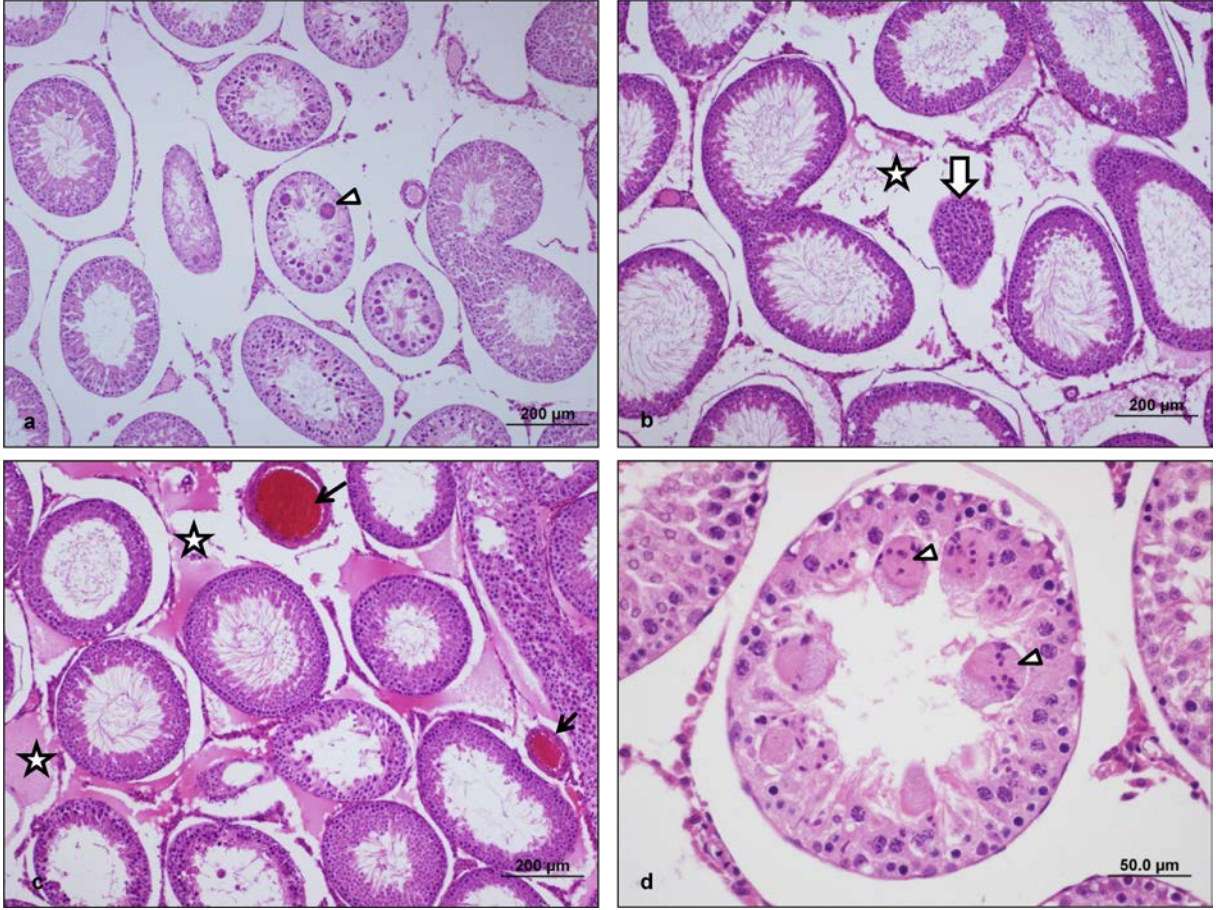
Şekil 7: Kontrol grubu: Kontrol grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü. Normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogonik hücre serileri; Sertoli hücresi (Se), spermatogonyum (s), primer spermatosit (ps) ve spermatid (st) ve tübüllerde devam eden spermatogenez görülmekte. Normal görünümlü interstisyel alan ve Leydig hücreleri (→) ile bazal membran yapısı (▶) izlenmekte (bar: 200µm, bar: 100 µm, bar: 50.0µm, bar: 20.0µm, HE, (a-d)).



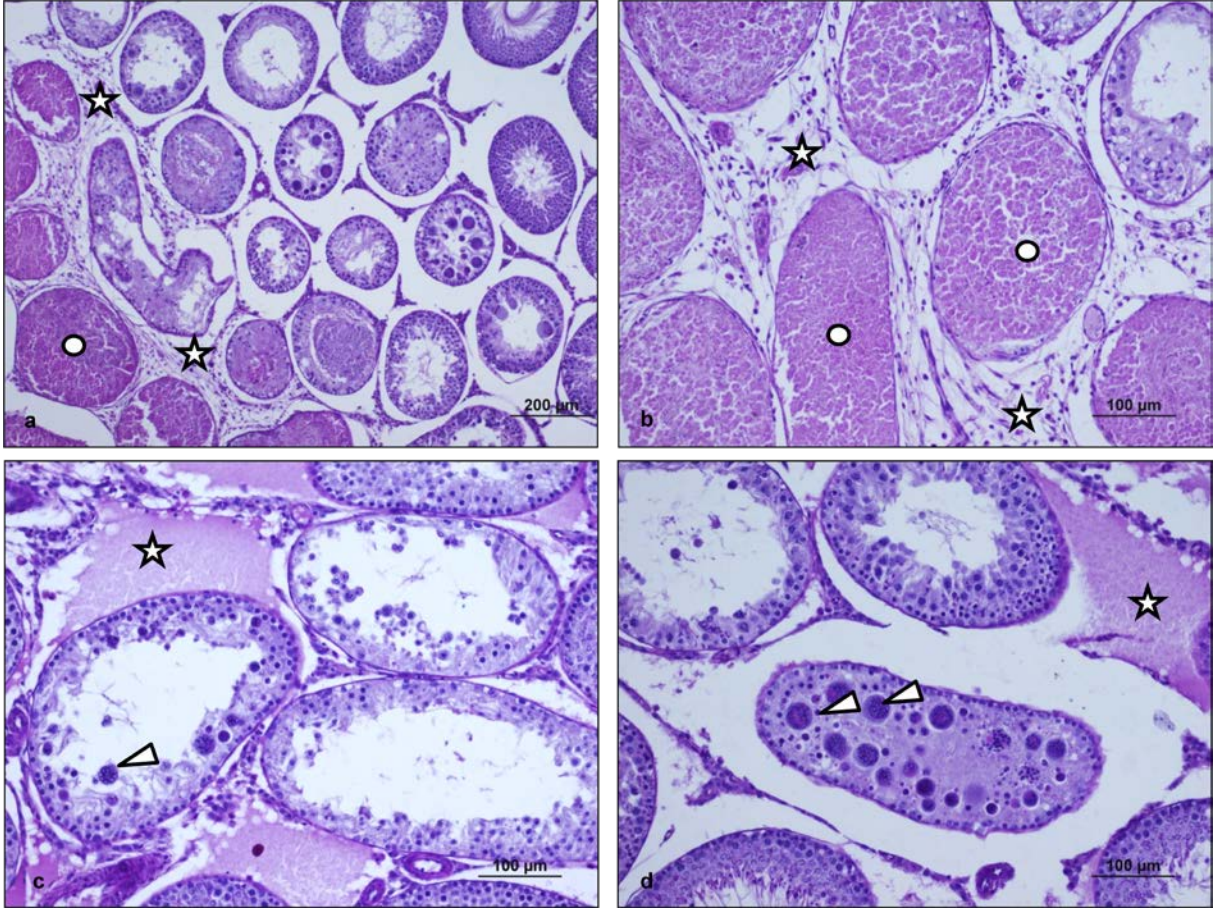
Şekil 8: Kontrol grubu: Kontrol grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü. Normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogonik hücre serileri; Sertoli hücresi (Se), spermatogonyum (s), primer spermatosit (ps) ve spermatid (st) ve tübüllerde devam eden spermatogenez görülmekte. Normal görünümlü interstisyel alan ve Leydig hücreleri (→) izlenmekte. Ayrıca normal yapıdaki PAS pozitif bazal membran yapısı (▶) izlenmekte (bar: 100µm, bar: 50.0µm, bar: 20.0µm, PAS+HE, (a-d)).



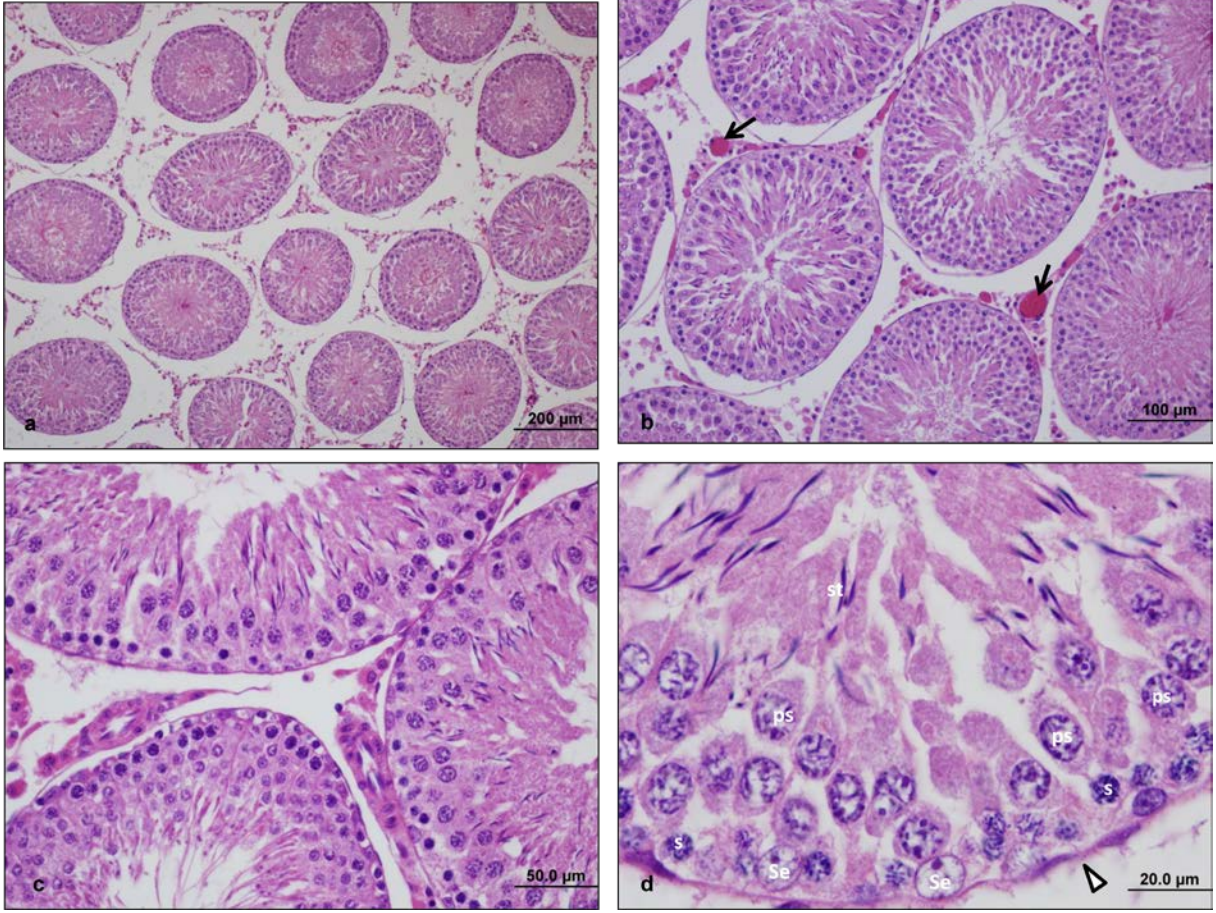
Şekil 9: İskemi/reperfüzyon (İ/R) grubu: İskemi/reperfüzyon grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü. Yoğun tübüler hasar, tübül duvarında hüresel kayıplar ile birlikte incelmış tübül duvarı (●), multinükleer hücre yapısı (▶), vakuolizasyon (v) ve interstisyel alanda damar duvarlarında kalınlaşma (→) ve ödem (*) dikkat çekmekte (bar: 200µm, bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE)(a-d).



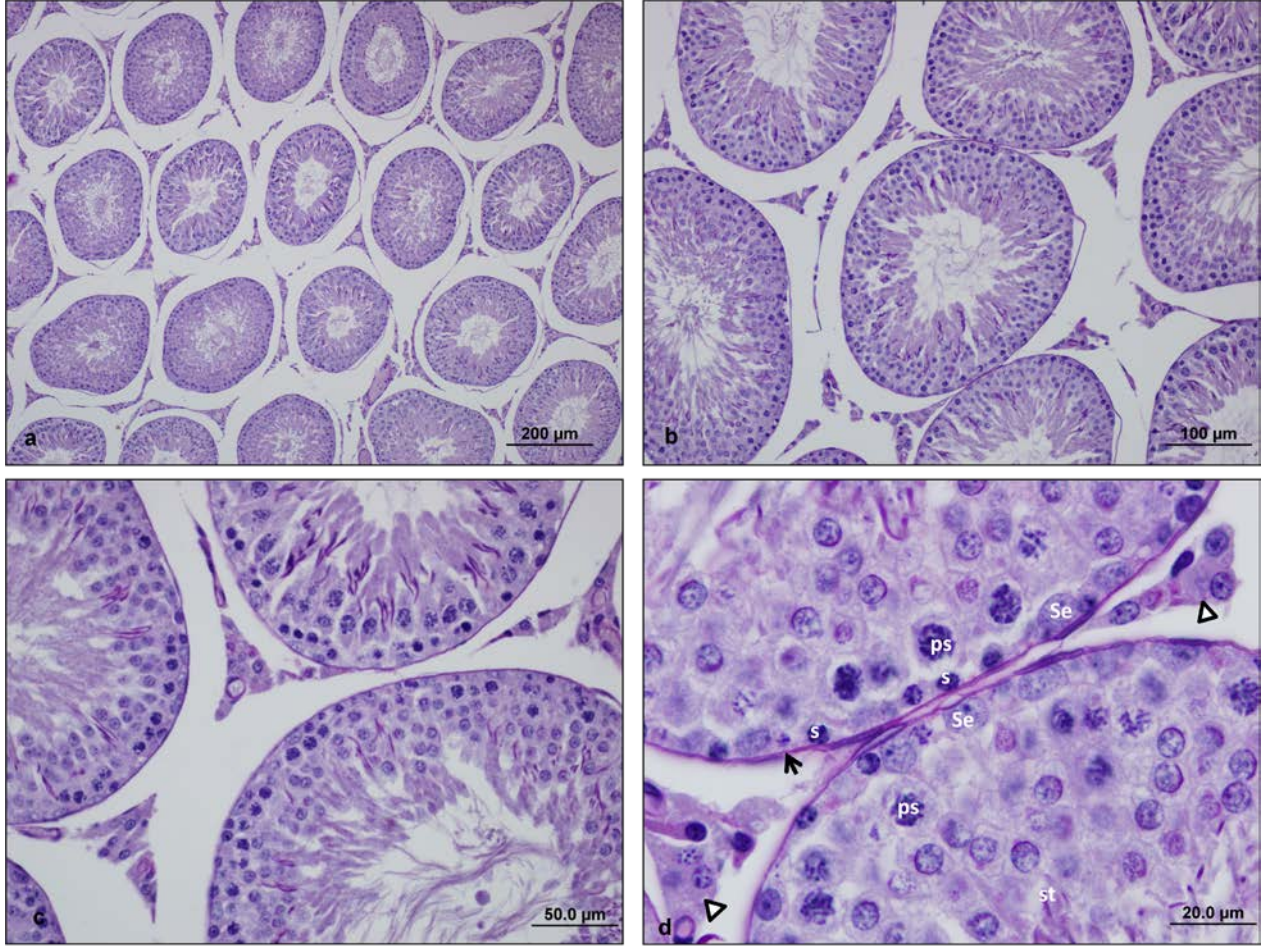
Şekil 10: İskemi/reperfüzyon (İ/R) grubu: İskemi/reperfüzyon grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü. Yoğun tübüler hasar, atrofik tübül yapısı (kalın ok), tübül duvarında multinükleer hücre yapısı (►) ve interstisyel alanda vasküler kongesyon (→) ve ödem (*) dikkat çekmekte (bar: 200µm, bar: 50.0µm, HE)(a-d).



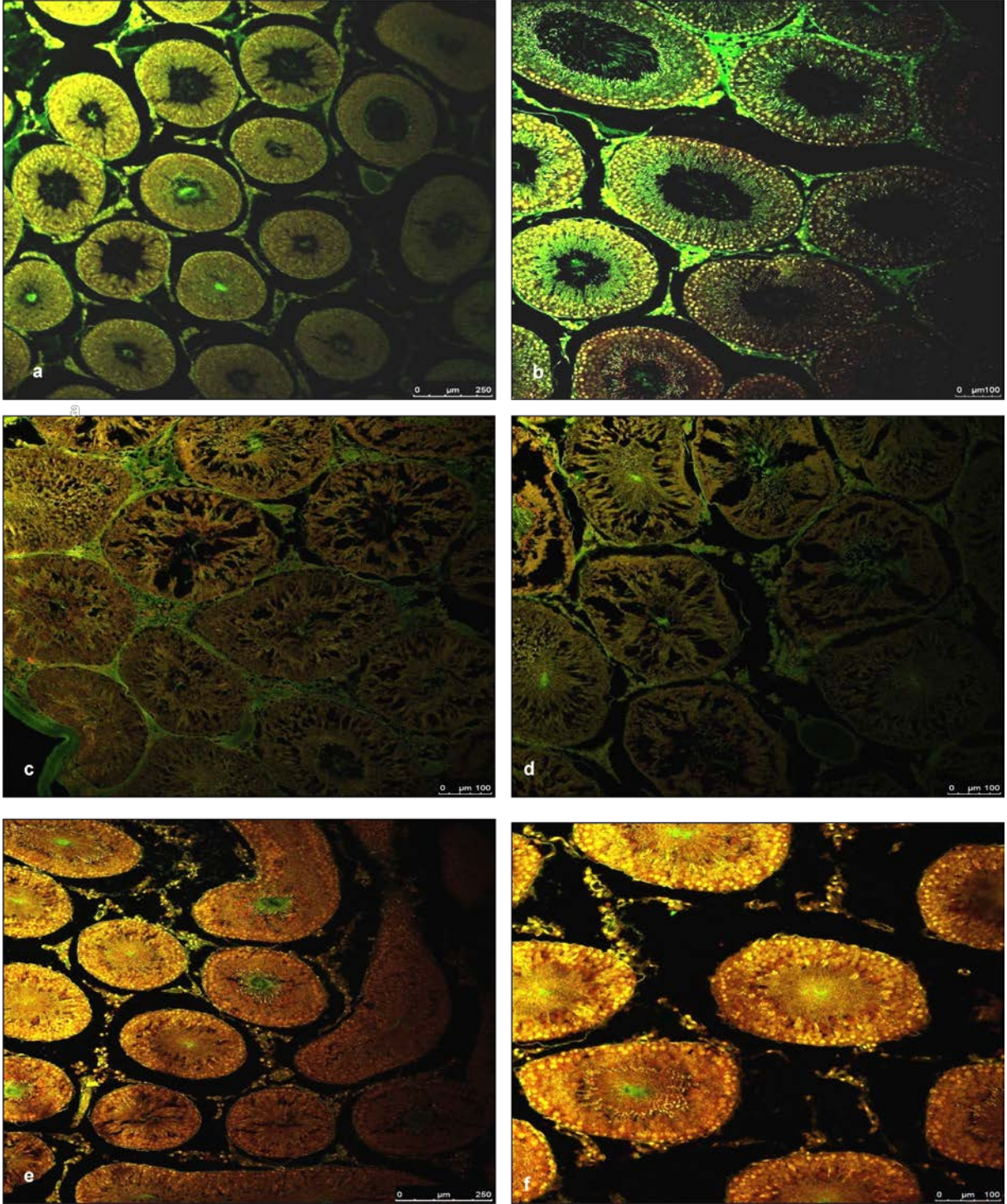
Şekil 11: İskemi/reperfüzyon (İ/R) grubu: İskemi/reperfüzyon grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü. Tübüllerde yoğun hasar (●), tübül duvarında multinükleer hücre yapısı (▴) ve interstisyel alanda ödem (*) dikkat çekmekte (bar: 200µm, bar: 100µm, PAS+HE)(a-d).



Şekil 12: İskemi/reperfüzyon (İ/R)+Montelukast (ML) grubu: İskemi/reperfüzyon (İ/R)+Montelukast (ML) grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü. Azalmış tübüler hasar ve normale yakın yapıdaki seminifer tübüller ile devam eden spermatogenez izlenmekte. İnterstisyel alanda ise azalmış ödem ve normale yakın görünümlü hücreler izlenmekte. İnterstisyel alanda vasküler kongesyonun (→) ise devam ettiği görülmekte Ayrıca bütünlüğünü koruyan normale yakın yapıdaki bazal membran yapısı (►) görülmekte (Sertoli hücresi (Se), spermatogonyum (s), primer spermatosit (ps) ve spermatid (st) (bar: 200µm, bar: 100µm, bar: 50.0µm, bar: 20.0µm, HE, a-d).



Şekil 13: İskemi/reperfüzyon (İ/R)+Montelukast (ML) grubu: İskemi/reperfüzyon (İ/R)+Montelukast (ML) grubunu oluşturan sıçan testislerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüsü. Normale yakın yapıdaki seminifer tübüller ile devam eden spermatogenez izlenmekte. İnterstisyel alanda ise normal görünümlü Leydig hücreleri (►) gözlenmekte. Ayrıca bütünlüğünü koruyan normale yakın yapıdaki PAS pozitif bazal membran yapısı (►) görülmekte (Sertoli hücresi (Se), spermatogonyum (s), primer spermatozit (ps) ve spermatid (st) (bar: 200µm, bar: 100µm, bar: 50.0µm, bar: 20.0µm, PAS+HE, a-d).

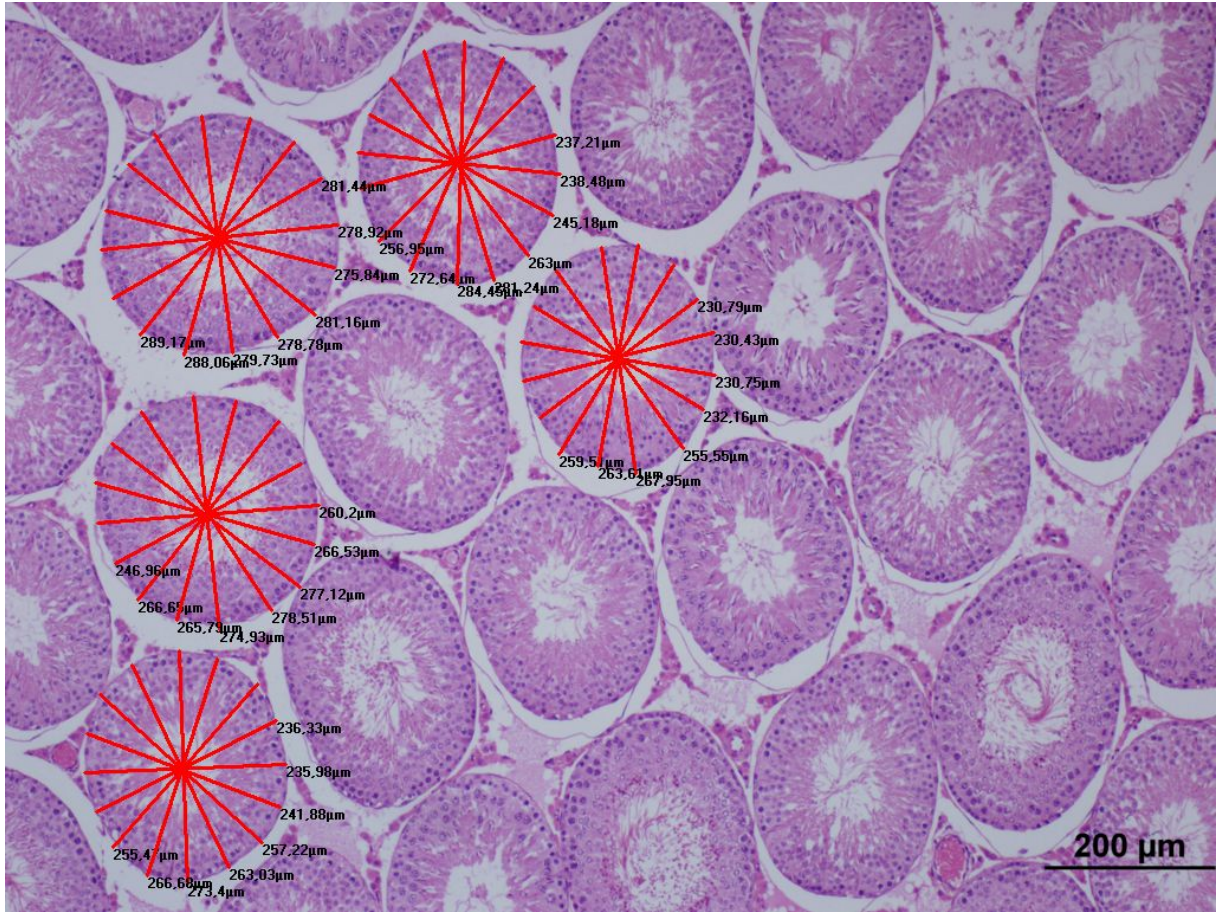


Şekil 14: (a,b):Kontrol grubu, (c,d): İskemi/reperfüzyon (İ/R) grubu (e,f): İskemi/reperfüzyon (İ/R)+Montelukast (ML) grubunu oluşturan sıçan testislerinin konfokal mikroskop görüntüsü (Akridin orange ve falloidin boyama).

4.2. İstatistiksel Bulgular

4.2.1. Seminifer Tübül Çapı Ölçümü

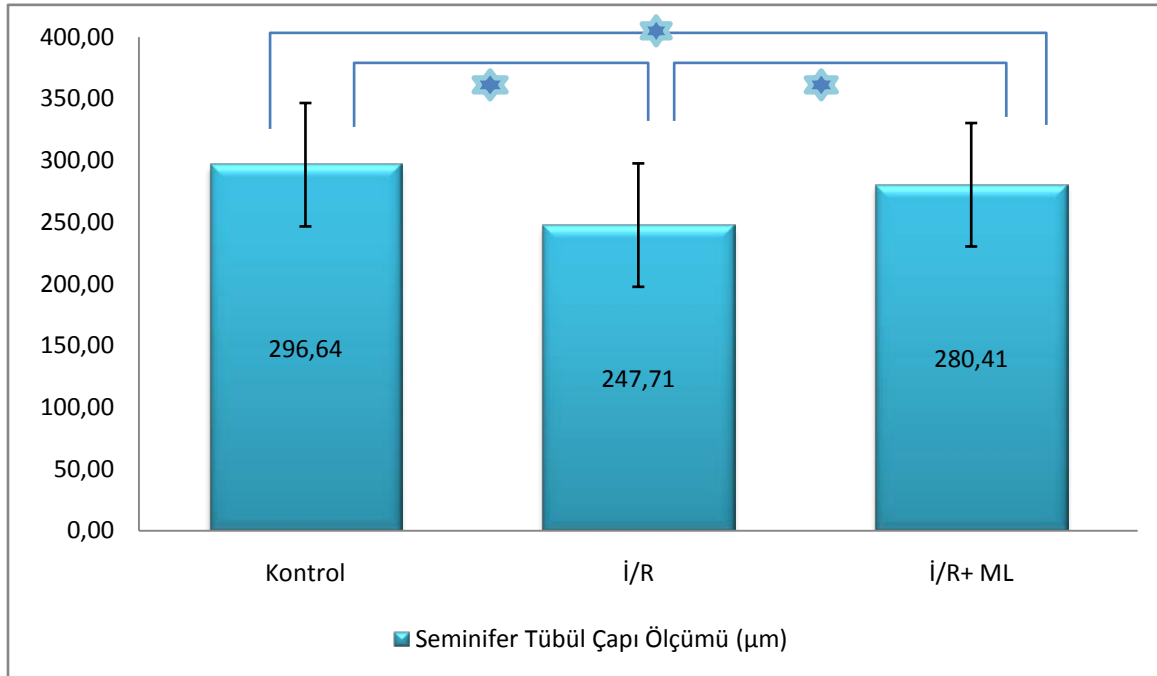
Tüm deney gruplarındaki seminifer tübül çapı ölçümü 10X objektifiyle, her bir hayvandan rastgele, 50 tübül, her bir gruptan toplam 350 adet tübül çapı, 8 noktadan birbirine dik ve aynı noktadan geçecek şekilde çizilmek suretiyle Bab Görüntü İşleme ve Analiz (Bab Bs200Pro) programı kullanılarak ölçülmüştür.



Şekil 15: Seminifer tübül çapı ölçümü görüntüsü.

Gruplar	n	Ortalama değer ± Standart sapma
Kontrol	7	296,64 ± 20,34
İskemi/Reperfüzyon	7	247,71 ± 26,58
Montelukast + İ/R	7	280,41 ± 22,59

Tablo 4: Kontrol, İ/R ve İ/R + ML grubunu oluşturan sıçanların testis seminifer tübül çapı ölçümleri (μ).

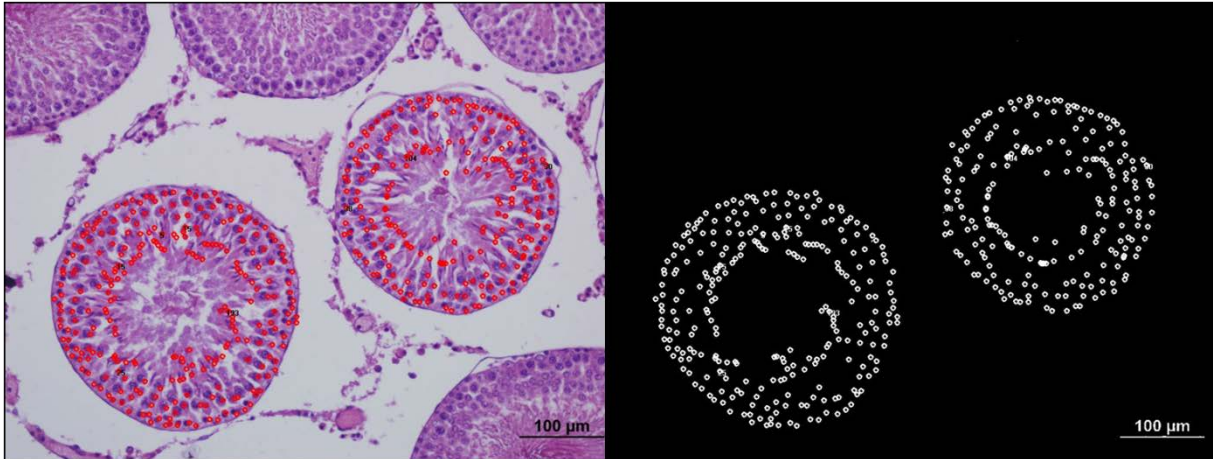


Şekil 16: Testis tübül çapı ölçümü ortalama değerleri ($p < 0,001$ * = anlamlı fark).

Testis tübül çapı ölçümü yönünden ikili karşılaştırma sonuçlarına göre kontrol grubunda tübül çapı ortalama değeri 296,64 iken, İ/R grubunda 247,71' e dmtr ve istatistiksel analize göre anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,001^{***}$). Montelukast uygulanan grupta 280,41'e yükselmiştir ve istatistiksel analize göre anlamlı fark bulunmuştur ($P < 0,001^{***}$).

4.2.2. Germ Hücre Sayımı Sonuçları

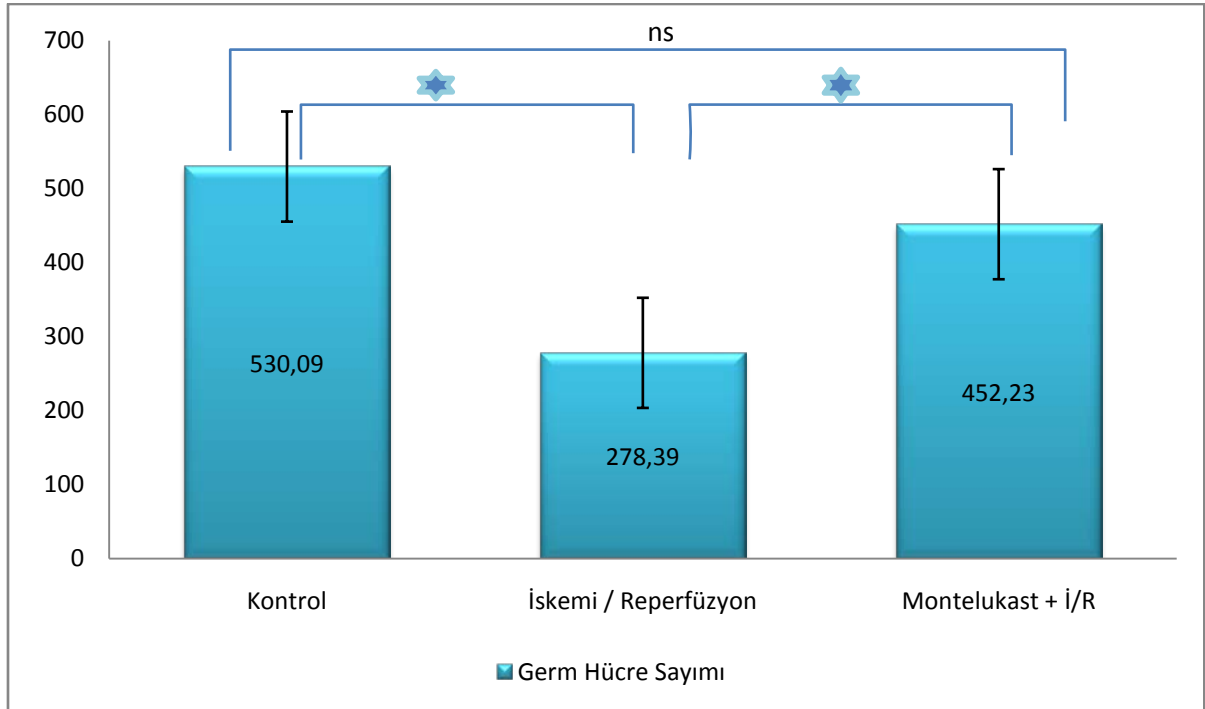
Tüm deney gruplarındaki germ hücreleri 20X büyültmede her bir hayvandan rastgele, 10 tübüler alan toplamda her bir grup için 70 tübüler alan, bilgisayarlı görüntü işleme ve analiz programında (Bab Bs200Pro) manuel olarak sayıldı.



Şekil 17: Germ hücre sayımı görüntüsü.

Gruplar	n	Ortalama değer ± Standart sapma
Kontrol	7	530,09 ± 33,67
İskemi / Reperfüzyon	7	278,39 ± 36,03
İ/R + Montelukast	7	452,23 ± 21,22

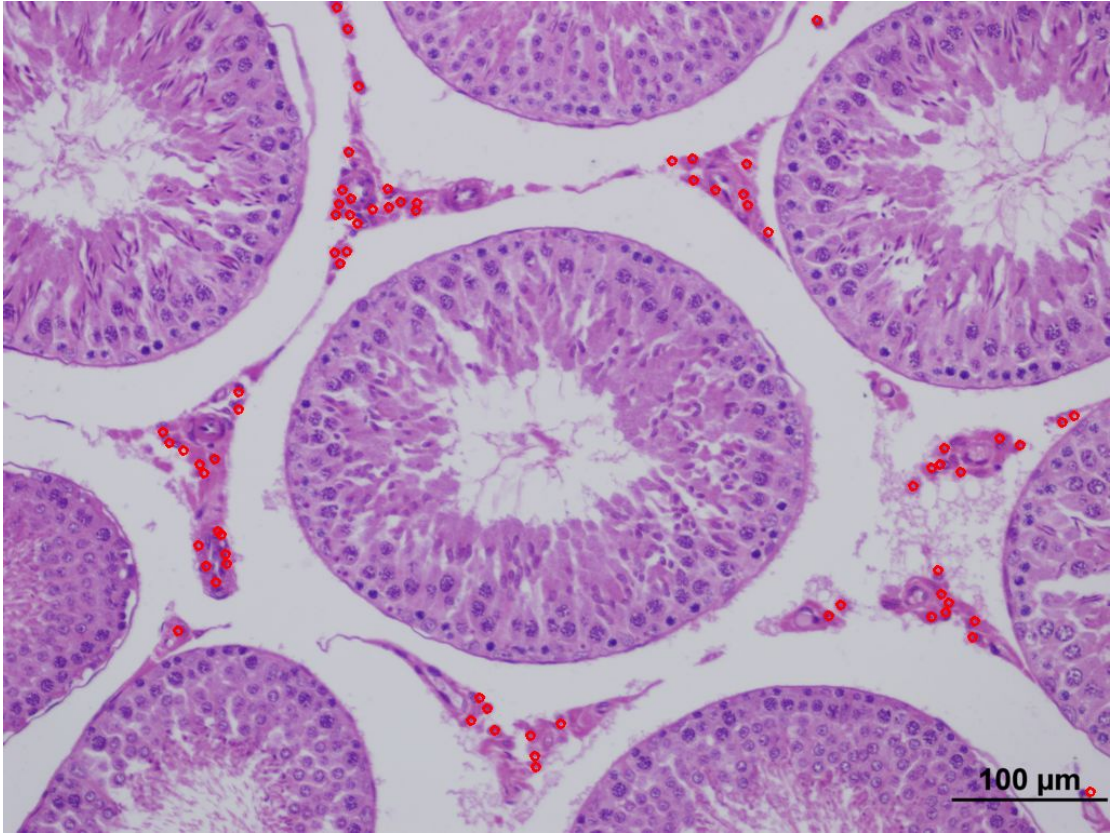
Tablo 5: Kontrol, İskemi/Reperfüzyon ve İ/R + Montelukast grubunu oluşturan sıçanların germinal hücre sayımı sonuçları.



Şekil 18: Germ hücre sayımı sonuçları ($P < 0,001^*$, $p = P = 0,927^{ns}$).

4.2.3. Leydig Hücre Sayımı Sonuçları

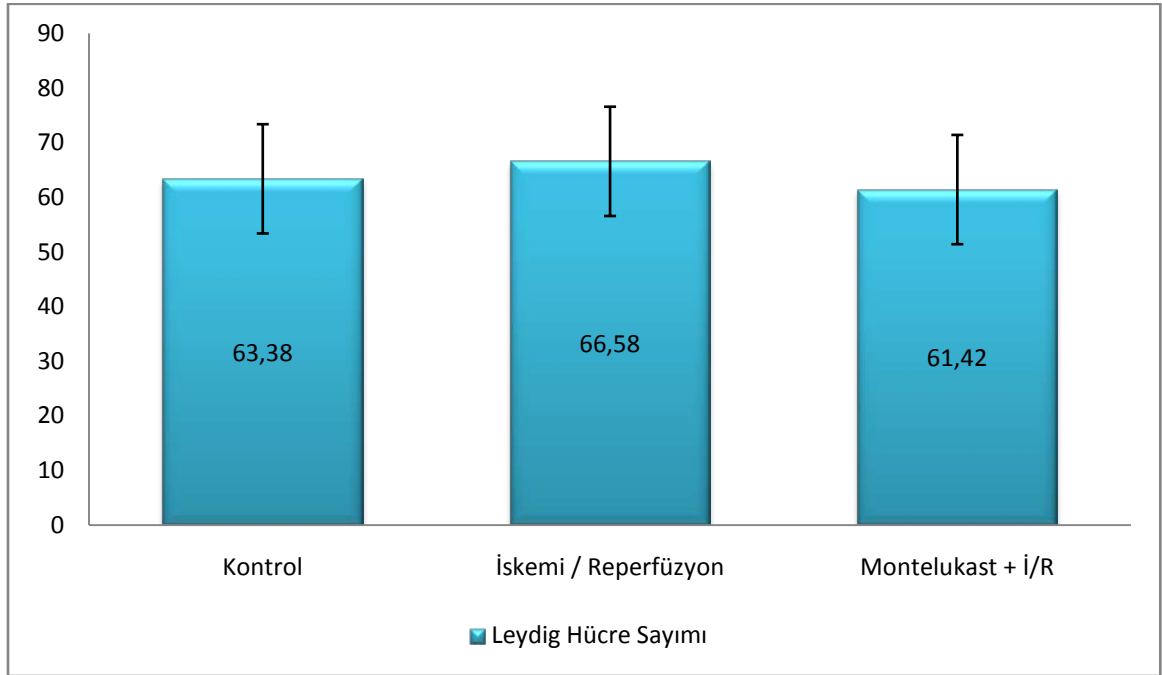
Tüm deney gruplarındaki Leydig hücreleri 20X büyültmede 10 tübüler alan toplamda her bir grup için 70 tübüler alan bilgisayarlı görüntü işleme ve analiz programı (Bab Bs200Pro) kullanılarak manuel olarak sayıldı.



Şekil 19: Leydig hücre sayımı görüntüsü (kırmızı noktalar; sayılan Leydig hücreleri).

Gruplar	n	Ortalama değer \pm Standart sapma
Kontrol	7	63,38 \pm 13,40
İskemi / Reperfüzyon	7	66,58 \pm 12,35
Montelukast + İ/R	7	61,42 \pm 7,64

Tablo 6: Kontrol, İskemi/Reperfüzyon ve Montelukast \pm İ/R grubunu oluşturan sıčanların Leydig hücre sayımı sonuçları. (n: Deney hayvanı sayısı).



Şekil 20 : Leydig hücre sayımı yönünden karşılaştırma sonuçları.

Leydig hücre sayımı yönünden ikili karşılaştırma sonuçlarına göre tüm grupların arasında anlamlı fark gözlenmemiştir .

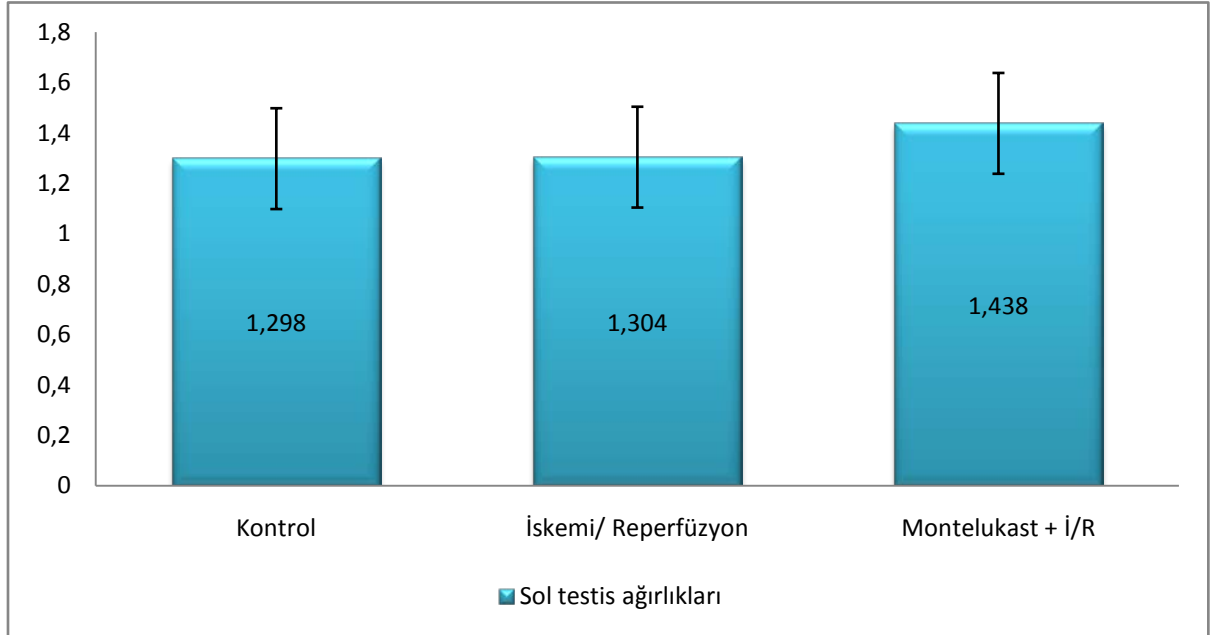
4.2.4. Testis Ağırlık Ölçümü

4.2.4.1. Sol Testis Ağırlığı

Gruplar arasında sol testis ağırlıkları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p=0,918^{ns}$).

Gruplar	n	Ortalama değer± Standart Sapma	$p=0,918^{ns}$
Kontrol	7	1,298±0,08	
İskemi/Reperfüzyon	7	1,304±0,07	
Montelukast + İ/R	7	1,438±0,18	

Tablo 7: Sıçanların gruplarına göre ortalama sol testis ağırlıkları (g).



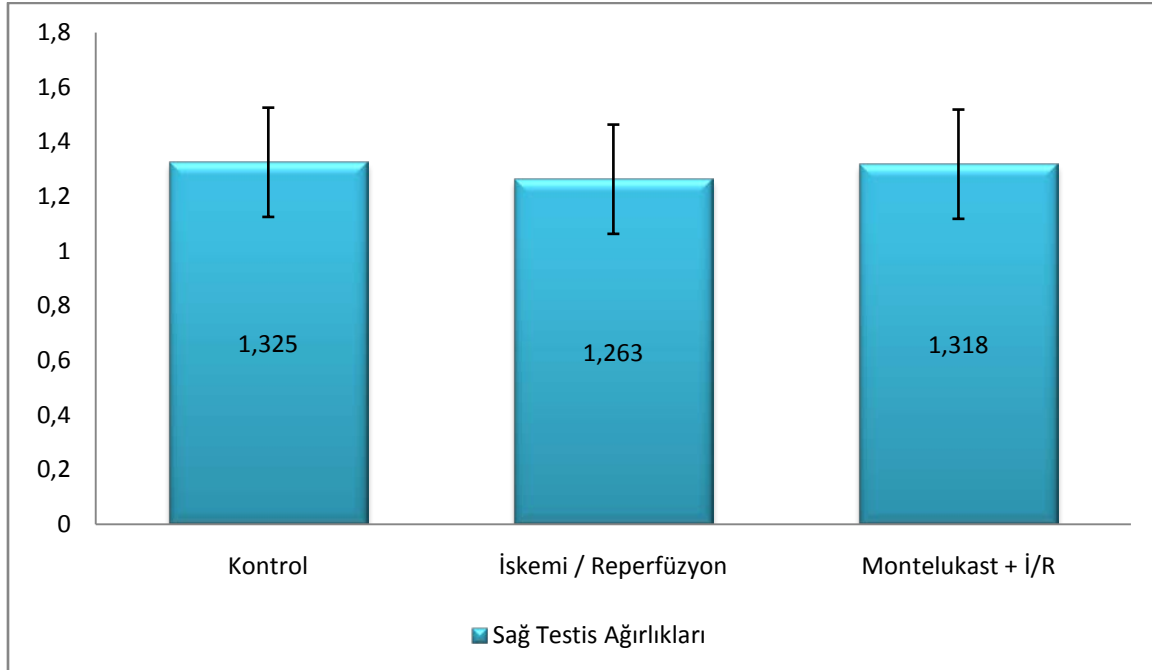
Şekil 21: Ortalama sol testis ağırlıkları (g).

4.2.4.2. Sağ Testis Ağırlıkları

Gruplar arasında sağ testis ağırlıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p=0,912^{ns}$).

Gruplar	n	Ortalama değer± Standart Sapma	$p=0,912^{ns}$
Kontrol	7	1,325±0,05	
İskemi/Reperfüzyon	7	1,263±0,09	
Montelukast + İ/R	7	1,318±0,12	

Tablo 8: Deney gruplarına göre ortalama sağ testis ağırlıkları (g).



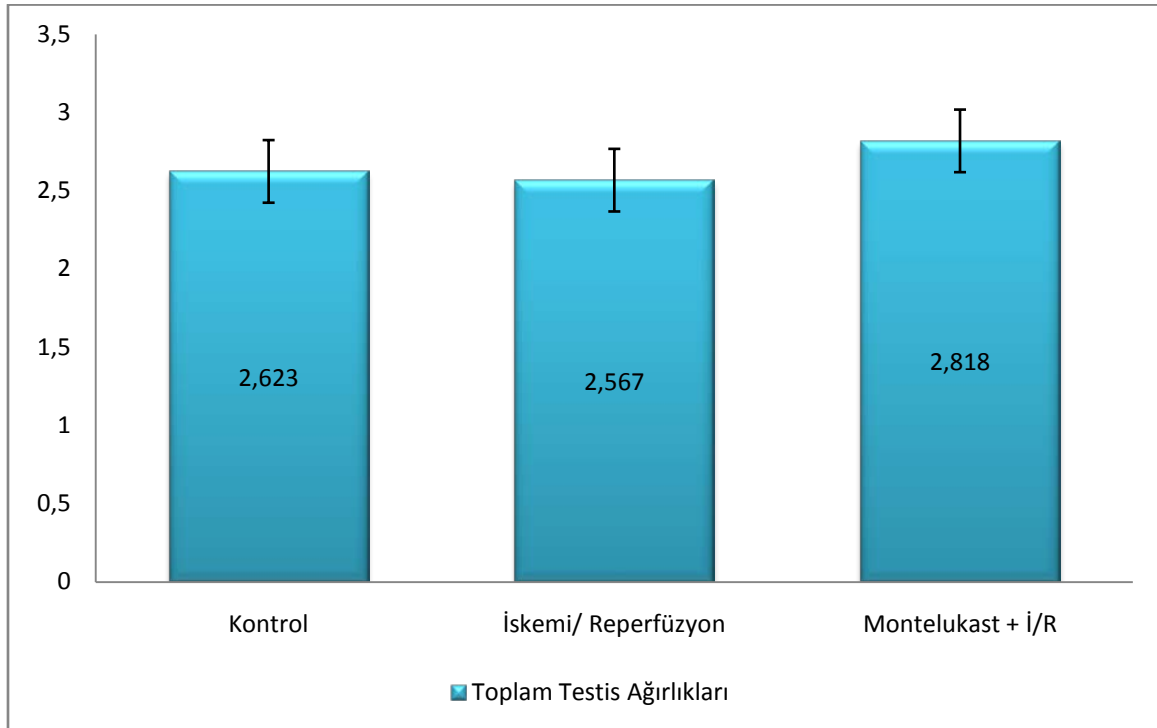
Şekil 22: Sağ testis ağırlıkları (g)

4.2.4.3. Toplam Testis Ağırlığı

Gruplar arasında toplam testis ağırlıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p=0,932^{ns}$).

Gruplar	n	Ortalama değer± Standart Sapma	$p=0,932^{ns}$
Kontrol	7	2,623±0,13	
İskemi/Reperfüzyon	7	2,567±0,8	
Montelukast + İ/R	7	2,818±0,12	

Tablo 9: Sıçanların gruplarına göre toplam testis ağırlıkları (g).



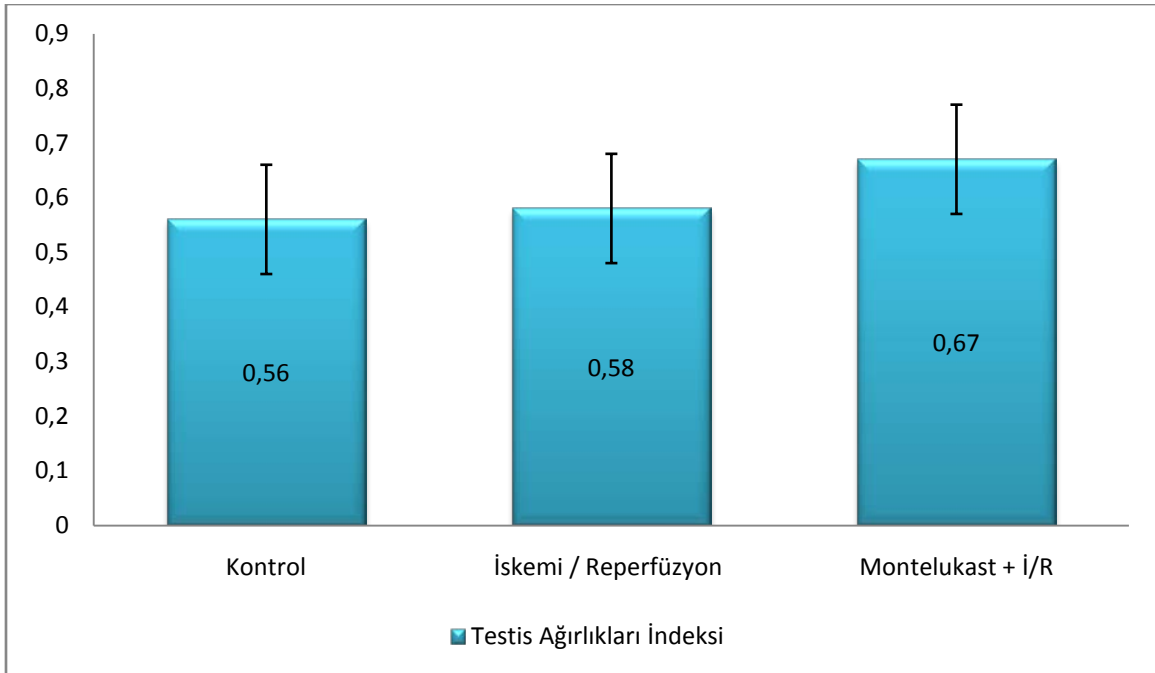
Şekil 23: Toplam testis ağırlıkları (g).

4.2.4.4. Testis Ağırlıkları İndeksi

Gruplar arasında yapılan istatistiksel analiz ile belirlenen TAİ değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$).

Gruplar	n	Ortalama değer± Standart Sapma	p<0,001
Kontrol	7	0,56±0,05	
İskemi / Reperfüzyon	7	0,58±0,03	
Montelukast + İ/R	7	0,67±0,1	

Tablo 10: Sıçanların gruplarına göre testis ağırlıkları indeksi (%).



Şekil 24: Testis ağırlıkları indeksi (%).

5. TARTIŞMA

Testis torsiyonu, adölesan ve genç erkekleri etkileyen, 24 yaşına kadar insidansı 1/158 olarak bildirilmiş ürolojik bir acildir. Torsiyone olmuş testiste hasar oluşumunu engellemek için derhal detorsiyon işleminin yapılması gerekir. Cerrahi bir işlem uygulandığı zaman bile zaman içerisinde testiste atrofi gelişebilir ve bu durum infertiliteye neden olabilir. Bu nedenle, testisi İ/R hasarından kurtaracak ve oksidatif stres hasarını önleyecek tedavilerin belirlenmesi yararlı olacaktır.

Bu çalışmanın bulguları, montelukast tedavisinin iskemi/reperfüzyon hasarına bağlı olarak gelişen histopatolojik parametrelerdeki bozulmayı azaltabileceğini ortaya çıkarmıştır. Tedavi edilmeyen İ/R grubunda, dokudaki oksidatif stres belirteçlerinde anlamlı bir bozulmayla beraber germ hücre apoptozunda da kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış saptanmıştır. Montelukast tedavisi iskemi/reperfüzyona bağlı değişen bu parametreleri tersine çevirerek testiste oluşan hasarı azaltmayı başarmıştır.

Testisler SOR hasarına karşı oldukça duyarlı organlardır. Bu hasarı önleyebilmek amacıyla antioksidan etkiyi arttırmaya yönelik literatürde birçok tedavi stratejisi öne sürülmektedir. Trimetazidin, curcumin, astaksantin gibi antioksidanlarla yapılan İ/R çalışmalarında, reperfüzyon öncesinde antioksidan tedavi verilmesinin iskemik testiste serbest radikallerin miktarını azaltarak hücre hasarı ve apoptozu anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir (Pekcetin et al., 2007). Ancak bu tedaviler halen deneysel aşamada olup yan etkilerinden ötürü klinikte kullanımları mümkün olmamıştır. Bu anlamda antioksidan maddeler ve apoptozu azaltıcı tedavilerin kullanımı gibi çalışmaların etkinliğinin araştırılması gerektiği açıktır.

Sugiyama ve arkadaşları yapmış oldukları araştırmada, sıçan testisine 4 saat torsiyon ve 4 saat reperfüzyon uyguladıklarında oluşan İ/R

hasarının yeşil çaydan izole edilen Epigallocatechin Gallate ile düzeldiğini belirtmişlerdir (Sugiyama et al., 2012).

Reperfüze edilen testislerde SOR aktivasyonu, parankim hücrelerinde ksantin oksidaz sistemi ya da lökositler tarafından sağlanmaktadır. Makrofajların da SOR salınımında bulunduğu bilinmektedir (Tripathi & Jena, 2010).

Toksik SOR sadece hücre ölümünü değil aynı zamanda apoptozisi de tetikler. Yüksek miktarda SOR nekrozla hücre ölümünü tetikler oysa düşük konsantrasyonları apoptozisin tetiklenmesine neden olur. SOR'un düşük ya da yüksek güvenilir konsantrasyonlarını belirlemek güçtür. Erken aşamada SOD ve lipid peroksidasyonunun artışı ve katalaz enzim aktivitesi bunlara örnek verilebilir. Kendiliğinden artış gösteren H₂O₂ seviyeleri de etkilenmiş testiste önemli ölçüde gözlenmiştir (Barut, 2008).

Montelukast, CysLT1 reseptörünü spesifik ve geri dönüşümlü olarak inhibe eden, selektif bir lökotrien D-4 reseptör antagonistidir. Akciğerlerde eozinofilik inflamasyonu azalttığından dolayı günümüzde astım tedavisinde kullanılmaktadır. Montelukastın nötrofil göçünü inhibe edici özelliği ve oksidatif sistem üzerindeki olumlu etkisinden dolayı mevcut endikasyonu haricinde başka organlarda da kullanımı deneysel çalışmalarla sorgulanmıştır (Houry & Abbott, 2001). Cilt fleplerinin canlılığının araştırıldığı bir çalışmada, Montelukast verilen grupta, verilmeyen gruba oranla cilt fleplerinin daha uzun süre canlılığını korumayı başardı gösterilmiştir (Sılay, 2009). Karaciğerde oluşturulan deneysel İ/R modellerinde de montelukast tedavisiyle hem hepatik enzimlerin seviyeleri düşürülmüş hem de histolojik olarak karaciğerin doku bütünlüğünün korunduğu izlenmiştir (Ozkan et al., 2010).

Böbrek ve mesanede oluşturulan İ/R modellerinde ise Montelukast verilen gruplarda doku hasarının istatistiksel olarak anlamlı

bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Montelukast bu etkisini nötrofil infiltrasyonu inhibisyonu, oksidan-antioksidan dengesinin kurulması ve inflamatuvar medyatörlerin regülasyonunu sağlayarak yaptığı düşünülmektedir (Şener et al., 2006).

Kimihiro ve Kohtaro ML'nin alerjik rinit tedavisinde kullanılmasıyla ilgili yaptıkları çalışmada, MI'nin enflamasyonda salgılanan Lökotrienlere karşı etki göstererek, damar kongesyonu gibi etkilerini azalttığını öne sürmüşlerdir. Bizde çalışmamızda iskemik hasarda oluşan enflamasyonda salınan lökotrienleri inhibe edici bir mekanizmayla tedavi edebileceğimizi savunduk (Okubo & Baba, 2008).

Öztürk ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada 3 deney grubu oluşturulmuş ve histolojik incelemeler haricinde MDA ve Glutasyon düzeylerine bakılmıştır. Oluşturulan İ/R hasarına karşı ML'nin belirgin düzeyde iyileştirici etkisinin olduğunu, İ/R'nin oksidatif etkisini tersine çevirerek hasarı azalttığını belirtmişlerdir (Ozturk et al., 2010).

Sılay ve arkadaşları Wistar Albino sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, 6 farklı deney grubu ile İ/R deney modeli oluşturulan sıçanlara ML uygulamışlardır. Çalışmanın amacı uzun ve kısa süreli iskemik hasarda oluşan nötrofil infiltrasyonun incelenmesi ve bu patolojiye ML' nin etkisinin gözlenmesidir. Deney sonunda araştırmacılar özellikle immunohistokimyasal incelemelerde torsiyon oluşturulan ve tedavi verilmeyen gruplarda oldukça fazla nötrofil infiltrasyonu artışı gözlemlemiştir. Uzun süreli iskemik hasarlarda ise nötrofil infiltrasyonun kısa süreli hasarlanmaya göre istatistiksel olarak daha az olduğunu belirtmişlerdir. Bu nötrofil infiltrasyon artışına ML' nin tedavi edici etkisinin belirgin düzeyde olduğu gözlemlenmiştir (Silay et al., 2014).

Testiküler arter ligasyon yoluyla iskemi oluşturulması klinikte karşılaşılan testis torsiyonu ile uyumlu değildir. Torsiyonda önce venöz

daha sonra arteriyal dolaşım engellenir. Bu yüzden iskeminin erken döneminde parsiyal iskemi olur. Testis torsiyonu histopatolojik düzeyde doku hasarına neden olur. Torsiyon öncelikle venöz dolaşıma engel olarak ödeme neden olur. Ödemin artmasıyla arteriyal dolaşım bozukluğu ve buna bağlı iskemi ve nekroz gelişir. Kısa süreli iskemide ortaya çıkan doku hasarının derecesi iskeminin süresine bağlıdır. 10 ile 60 dakikalık iskeminin bile testis dejenerasyonu yaptığına ilişkin yayınlar bulunmaktadır (Cosentino, Nishida, Rabinowitz, & Cocket, 1986).

İskemik süre olarak seğilen 6 saat özellikle torsiyon deneylerinde bulguların net olarak ortaya konduğu süre olup önceki çalışmalarda en az 5 saatte ciddi hasar olduğu gösterilmiştir. Ligasyon sonrası arterde posttravmatik vasküler spazma bağlı olarak da daralmanın olduğu ve bazı testislerde reperfüzyon kısmına geilememesinin nedeni olduğu görülmüştür (Bergh, Collin, & Lissbrant, 2001).

6 saatlik torsiyonu takiben 24 saatlik detorsiyon uygulanan çalışmada doku hasarı tesbit edilmiştir. 540° üzerindeki ekstravajinal torsiyonda venöz tıkanmayla sonuçlanır. Deneysel sıçan modelinde 720° testiküler iskemi başarıyla sonuçlanmıştır. Reperfüzyon hasarında toplam hasarın devamı iskemik reperfüzyon komponentlerinin bir kombinasyonudur (Barlas & Hatiboğlu, 2002).

Testisteki iskemi reperfüzyon hasarında germ hücrelerinin daha çok etkilenmiş olması oldukça toksik olan lipid peroksidasyon ürünlerinin peritübüler leydig ve sertoli hücrelerinden çok germ hücrelerinde olduğunu düşündürmektedir (Saba, Morales, De Lamirande, & Gagnon, 1997).

İskemik çalışmalarda kontralateral testislerde oluşan hasar birçok çalışmayla gösterilmiş olmasına rağmen hala tartışmaya açık bir konu olarak net değildir. Karşı testis hasarında deneysel çalışmada

kullanılan hayvan türü, yaş, torsiyon derecesi ve süresi, torsiyon oluşturmada kullanılan metod, gözlem süresi ve bakılan parametredeki farklılıklara göre değişik sonuçlar rapor edilmiştir. Karşı testisin hasarı tam olarak bilinmese de otoimmünizasyon (York & Drago, 1985), ve kan akımındaki bozukluk (Tanyel, Büyükpamukçu, & Hiçsönmez, 1989) gibi farklı nedenler ileri sürülmektedir.

Kontralateral testiste apoptozis iskemiden 1 saat sonra kan akımının azalmasına bağlı olarak germ hücre apoptozisinde bir artış olur. Ancak istatistiksel öneme 2 ya da 3 saatlik bir iskemi ardından ulaşılır. Hem apoptotik hücrelerin sayısı hem de tübüllerin içerdiği apoptotik hücreler başlangıçta 1 saati izleyen iskemide artarken 2 ve 3 saatlik iskemide istatistiksel öneme sahip olmuştur. Bu etkinin mekanizması net değildir. Bu da reperfüzyon yapılmayan gruplarda daha belirgindir (Mogilner et al., 2006; Sukhotnik et al., 2005).

Güncel veriler infertilitede testiküler iskeminin sonuçlarını, spermatogenezisin arestini ve germ hücrelerin kontralateral testiste apoptotik yolakla ölümünün açıklanmasını içermektedir ve kontralateral testiste testiküler iskemi apoptozisi tetikler. İskeminin artan süreleri germ hücrelerinin programlı hücre ölümünün artışına yol açar. Buna ek olarak iskemik testiste iskeminin tetiklediği hücre ölümü kontralateral testiste artmış germ hücre apoptozisi önemli bir oranda germ hücre ve fertilitte kaybına neden olur (Sukhotnik et al., 2005).

Çalışmamızda tübül çapı yönünden yapılan değerlendirmelerde gözlenen bulguların istatistiksel analizlerinde İ/R grubunda, ML ve kontrol grubuna göre daha düşük sonuçlar alınmıştır. Ayrıca histolojik görüntülerde tübüllerin normal oval yapılarının bozulduğu, bazal membran ayrılması olduğu gözlemlenmiştir. Bu da tübül çapı ölçümlerini zorlaştırmaktadır. ML grubunda ise kontrol grubuna yakın sonuçlar alınmış, histolojik değerlendirmelerde de olumlu olarak izlenmiştir.

Gruplar germ hücre sayımları bakımından kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. İ/R grubunda, kontrol ve ML grubuna kıyasla germ hücre kaybının daha fazla olduğu, ML grubunda ise normal düzeyler olduğu gözlemlenmiştir. İskemi modelinin olması gerektiği gibi oluşturulduğu ve değerlerin geçerliliği literatür tarafından desteklenmektedir (Mahood et al., 2005; Silay et al., 2014).

Yapmış olduğumuz araştırmada testislerin konfokal ve ışık mikroskobu görüntülerine bakıldığında İ/R grubunda germ hücre sayılarında belirgin bir azalma olduğu görülmektedir. Apoptotik hücrelere rastlanmış ve bir çok tübülde spermatogenetik aktivite durmuştur. ML grubunda spermatogenetik aktivite büyük çoğunlukta devam etmektedir. Bizim çalışmamıza benzer bulgular taşıyan ve ML' nin spermatogenetik aktiviteyi olumlu yönde etkilediği Öztürk ve arkadaşlarının yaptığı deneysel testiküler iskemi çalışmasında, ayrıca Şener ve arkadaşlarının yaptığı renal iskemi reperfüzyon çalışmasında da belirtilmiştir (Ozturk et al., 2010; Şener et al., 2006; Wu et al., 2015).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, testiste oluşturulan iskemi/reperfüzyon hasarına karşı montelukastın koruyucu etkisi araştırılmıştır. Deneyimizde 21 adet erkek Wistar Albino sıçan kullanılmış ve deney hayvanları kontrol+SF, İ/R ve İ/R+Montelukast olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır.

Deney sonucunda, kontrol + SF grubunda deneyde kullanılan hayvanların sağlıklı olduğu, normal seminifer tübüllere sahip olduğu değerlendirilmiş ve diğer gruplarla kıyaslanması için kullanılmıştır.

İ/R grubunda, incelenen örneklerde bazal membran ayrılması, tübüllerde vakuolizasyon, germinal hücrelerde sayıca azalma ve bazı tübüllerde spermatogenezin durduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca bu grupta bulunan seminifer tübüllerde multinükleer dev hücrelerin sayısı oldukça fazladır. Konfokal mikroskop ile yapılan incelemelerde ise germinal hücrelerde apoptoz meydana geldiği gözlemlenmiştir.

İ/R ile birlikte uygulanan ML grubunu oluşturan sıçan testislerinin tübüllerinde ise ışık ve konfokal mikroskopik değerlendirmelerde az sayıda tübül duvarında vakuolizasyon ve kongesyon gözlenmiştir. Genel olarak seminifer tübüllerin normale yakın olduğu belirlenmiştir. Montelukast, germ hücre apoptozunu engelmekte ve sonuç olarak testiste meydana gelen hasarı önemli ölçüde önlemektedir.

Bu deneysel veriler sonucunda montelukast tedavisinin testis torsiyonunda kullanılabilirliğinin biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalarla daha detaylı araştırılması gerektiği ortaya çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

- Akcora, B., Altug, M. E., Kontas, T., & Atik, E. (2007). The protective effect of darbepoetin alfa on experimental testicular torsion and detorsion injury. *Int J Urol*, 14(9), 846-850. doi:10.1111/j.1442-2042.2007.01844.x
- Altunoluk, B., Bakan, V., Ciralik, H., & Tolun, F. I. (2011). Protective effects of zofenopril on testicular torsion and detorsion injury in rats. *Urology journal*, 8(4), 313-319.
- Anafarta, K., Bedük, Y., & Arıkan, N. (2007). *Temel üroloji: Güneş Kitabevi*.
- Barada, J. H., Weingarten, J., & Cromie, W. (1989). Testicular salvage and age-related delay in the presentation of testicular torsion. *The Journal of urology*, 142(3), 746-748.
- Barkley, C., York, J. E., Badalament, R. A., Nesbitt, J. A., Smith, J. J., & Drago, J. R. (1993). Testicular torsion and its effects on contralateral testicle. *Urology*, 41(2), 192-194.
- Barlas, M., & Hatiboğlu, C. (2002). The effect of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *International urology and nephrology*, 34(1), 81-86.
- Barut, T. (2008). *Farklı Deneysel Testis İskemilerinin Apoptozis ile Histolojik İlişkisi*. (Uzmanlık Tezi), Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Bergh, A., Collin, O., & Lissbrant, E. (2001). Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. *Biology of reproduction*, 64(1), 13-20.
- Beytur, A., Ciftci, O., Oguz, F., Oguzturk, H., & Yilmaz, F. (2012). Montelukast attenuates side effects of cisplatin including testicular, spermatological, and hormonal damage in male rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, 69(1), 207-213. doi:10.1007/s00280-011-1692-y
- Büyükcü, N., & Yiğitbaşı, T. Reaktif Oksijen Türleri ve Obezitede Oksidatif Stres.
- Cingi, C., Oğhan, F., Ünlü, H., Tekat, A., & Okuyucu, Ş. (2011). Alerjik rinitte montelukast ve desloratadin kombinasyonunun etkinliği. *Journal of Medical Updates*, 1(1).
- Cosentino, M. J., Nishida, M., Rabinowitz, R., & Cockett, A. T. (1986). Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. *Journal of andrology*, 7(1), 23-31.
- Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Caputi, A. P., & Salvemini, D. (2001). Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological reviews*, 53(1), 135-159.
- Dokucu, A. I., Ozturk, H., Ozturk, H., Tuncer, M. C., & Yilmaz, F. (2009). The effects of molsidomine on hypoxia inducible factor alpha and

- Sonic hedgehog in testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Int Urol Nephrol*, 41(1), 101-108. doi:10.1007/s11255-008-9460-6
- Drews, U. (2000). *Renkli embriyoloji atlası: Nobel Tıp Kitabevleri*.
- Erboga, M., Aktas, C., Kurt, O., Uygur, R., Caglar, V., Turan, B., . . . Ozen, O. (2015). Protective effects of thymoquinone on experimental testicular ischaemia–reperfusion injury: an apoptotic, proliferative and biochemical study. *Andrologia*.
- Ercan, F. (2012). Mast Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri. In O. Yücel (Ed.), *Journal of Clinical and Analytical Medicine* (pp. 74-79). Ankara.
- Ergun, Y., Koc, A., Dolapcioglu, K., Akaydin, Y., Dogruer, G., Kontas, T., . . . Aslan, E. (2010). The protective effect of erythropoietin and dimethylsulfoxide on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 152(2), 186-190. doi:10.1016/j.ejogrb.2010.05.025
- Erkan, O. D. E., & Müslümanoğlu, A. Y. Nitrik oksid sentaz ve genetik polimorfizmleri. *ANDROLOJİ*, 277.
- Feng, H. L., Sandlow, J. I., Sparks, A. E., Sandra, A., & Zheng, L. J. (1999). Decreased expression of the c-kit receptor is associated with increased apoptosis in subfertile human testes. *Fertility and sterility*, 71(1), 85-89.
- Fleck, J., Marafiga, J. R., Jesse, A. C., Ribeiro, L. R., Rambo, L. M., & Mello, C. F. (2015). Montelukast potentiates the anticonvulsant effect of phenobarbital in mice: an isobolographic analysis. *Pharmacol Res*, 94, 34-41. doi:10.1016/j.phrs.2015.02.001
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2012). *Color atlas and text of histology: Lippincott Williams & Wilkins*.
- Hikim, A. P., Lue, Y., Yamamoto, C. M., Vera, Y., Rodriguez, S., Yen, P. H., . . . Swerdloff, R. S. (2003). Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. *Endocrinology*, 144(7), 3167-3175. doi:10.1210/en.2003-0175
- Houry, D., & Abbott, J. T. (2001). Ovarian torsion: a fifteen-year review. *Ann Emerg Med*, 38(2), 156-159. doi:10.1067/mem.2001.114303
- Ishikawa, T., Kondo, Y., Goda, K., & Fujisawa, M. (2005). Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in transgenic mice accelerates testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Journal of andrology*, 26(2), 281-288.
- Isikdemir, F., Kurcer, Z., Dengiz, G. O., Sipahi, E. Y., Banoglu, Z. N., Baba, F., . . . Kelek, S. (2014). Effects of montelukast and zileuton on testicular torsion/detorsion injury in rats. *Andrologia*, 46(1), 59-64. doi:10.1111/and.12042
- Kanter, M., Topcu-Tarlacalisir, Y., & Parlar, S. (2010). Antiapoptotic effect of L-carnitine on testicular irradiation in rats. *J Mol Histol*, 41(2-3), 121-128. doi:10.1007/s10735-010-9267-5
- Kent, L. (2009). *Çoklu Doymamış Yağ Asitleri Eldesi: Tepki Yüzey Metodolojisi İle Optimizasyonu*. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kerr, J. (1992). Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the

- spermatogenic cycle. *Journal of reproduction and fertility*, 95(3), 825-830.
- Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi* (P. D. R. Demir, Trans.).
- Kim, Y. H., Kim, G. H., Shin, J. H., Kim, K. S., & Lim, J. S. (2010). Effect of korean red ginseng on testicular tissue injury after torsion and detorsion. *Korean J Urol*, 51(11), 794-799. doi:10.4111/kju.2010.51.11.794
- Koltuksuz, U., Irmak, M. K., Karaman, A., Uz, E., Var, A., Özyurt, H., & Akyol, Ö. (2000). Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urological research*, 28(6), 360-363.
- Köse, E., Beytur, A., Vardı, N., Türköz, Y., Ekinci, N., & Ekincioğlu, Z. (2011). Metotreksat'ın neden olduğu akut böbrek hasarına karşı montelukast'ın etkileri. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 18(2).
- Lysiak, J. J. N., Quoc An T Turner, Terry T. (2002). Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *Journal of andrology*, 23(3), 400-409.
- Mahood, I. K., Hallmark, N., McKinnell, C., Walker, M., Fisher, J. S., & Sharpe, R. M. (2005). Abnormal Leydig Cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. *Endocrinology*, 146(2), 613-623. doi:10.1210/en.2004-0671
- Mentese, A., Turkmen, S., Karaguzel, E., Karaca, Y., Tatli, O., Sumer, A. U., . . . Turedi, S. (2012). The predictive value of ischemia-modified albumin in long-term results of ischemia-reperfusion injury in an experimental testicular torsion model. *Urology*, 80(3), 689-694. doi:10.1016/j.urology.2012.05.031
- Mitchell RN, C. R., Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (Eds.). (2000). *Hücre zedelenmesi, ölümü ve adaptasyonu*. (Ç. U. Çevikbaş, Trans. 6th ed.).
- Mogilner, J. G., Elenberg, Y., Lurie, M., Shiloni, E., Coran, A. G., & Sukhotnik, I. (2006). Effect of dexamethasone on germ cell apoptosis in the contralateral testis after testicular ischemia-reperfusion injury in the rat. *Fertility and sterility*, 85, 1111-1117.
- Moncada, S., & Erusalimsky, J. D. (2002). Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature reviews molecular cell biology*, 3(3), 214-220.
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2015). *The developing human: clinically oriented embryology*: Elsevier Health Sciences.
- Okubo, K., & Baba, K. (2008). A double-blind non-inferiority clinical study of montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist, compared with pranlukast in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergology International*, 57(4), 383-390.
- Oldereid, N., De Angelis, P., Wiger, R., & Clausen, O. (2001). Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis. *Molecular human reproduction*, 7(5), 403-408.

- Ozbal, S., Ergur, B. U., Erbil, G., Tekmen, I., Bagriyanik, A., & Cavdar, Z. (2012). The effects of alpha-lipoic acid against testicular ischemia-reperfusion injury in Rats. *ScientificWorldJournal*, 2012, 489248. doi:10.1100/2012/489248
- Ozkan, E., Yardimci, S., Dulundu, E., Topaloglu, U., Sehirli, O., Ercan, F., . . . Sener, G. (2010). Protective potential of montelukast against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Surg Res*, 159(1), 588-594. doi:10.1016/j.jss.2008.08.006
- Ozturk, H., Ozturk, H., Gideroglu, K., Terzi, H., & Bugdayci, G. (2010). Montelukast protects against testes ischemia/reperfusion injury in rats. *Can Urol Assoc J*, 4(3), 174-179. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20514280>
- Payabvash, S., Kiumehr, S., Tavangar, S. M., & Dehpour, A. R. (2008). Ethyl pyruvate reduces germ cell-specific apoptosis and oxidative stress in rat model of testicular torsion/detorsion. *J Pediatr Surg*, 43(4), 705-712. doi:10.1016/j.jpedsurg.2007.12.063
- Pekcetin, C., Ergur, B. U., Kiray, M., Bagriyanik, A., Tugyan, K., Erbil, G., & Ozogul, C. (2007). The protective effects of trimetazidine on testicular ischemia and reperfusion injury in rats. *Pediatr Surg Int*, 23(11), 1113-1118. doi:10.1007/s00383-007-2002-y
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *Histology*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Saba, M., Morales, C., De Lamirande, E., & Gagnon, C. (1997). Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *The Journal of urology*, 157(3), 1149-1154.
- Saeed Arayne, M., Sultana, N., & Hussain, F. (2009). Spectrophotometric method for quantitative determination of montelukast in bulk, pharmaceutical formulations and human serum. *Journal of Analytical Chemistry*, 64(7), 690-695. doi:10.1134/s1061934809070065
- Savas C., O. C., Karaoz E., Bezir M. (2002). Ischemia, whether from Ligation or Torsion, Causes Ultrastructural Changes on the Contralateral Testis. *Scand J Urol*, 302-306. doi:10.1080/003655902320248281
- Silay, M. (2009). *Tek Taraflı Testikuler İskemi-Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Lökotrien D-4 Reseptör Antagonisti Montelukast' in Etkisinin Değerlendirilmesi*. (Uzmanlık Tezi), Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği.
- Silay, M. S., Toklu, H., Ozagari, A., Aydın, M., Tetik, S., Sener, G., . . . Kendirci, M. (2014). Montelukast prevents testes against ischemia-reperfusion injury through suppression of iNOS expression. *Turk J Urol*, 40(4), 221-227. doi:10.5152/tud.2014.61587
- Sinha Hikim, A. P., Lue, Y., Diaz-Romero, M., Yen, P. H., Wang, C., & Swerdloff, R. S. (2003). Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 85(2-5), 175-182. doi:10.1016/s0960-0760(03)00193-6

- Sugiyama, A., Chiba, M., Nakagami, T., Kawano, S., Sanada, Y., Tajiri, T., & Toki, A. (2012). Beneficial effects of (-)-epigallocatechin gallate on ischemia-reperfusion testicular injury in rats. *J Pediatr Surg*, *47*(7), 1427-1432. doi:10.1016/j.jpedsurg.2012.01.069
- Sukhotnik, I., Helou, H., Mogilner, J., Lurie, M., Bernsteyn, A., Coran, A. G., & Shiloni, E. (2005). Oral arginine improves intestinal recovery following ischemia-reperfusion injury in rat. *Pediatric surgery international*, *21*(3), 191-196.
- Şener, G., Şehirli, Ö., Veliöğlü-Öğünç, A., Çetinel, Ş., Gedik, N., Caner, M., . . . Yeğen, B. Ç. (2006). Montelukast protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pharmacological research*, *54*(1), 65-71.
- Taati, M., Moghadasi, M., Dezfoulian, O., Asadian, P., & Zendehtdel, M. (2015). Effects of Ghrelin on germ cell apoptosis and proinflammatory cytokines production in Ischemia-reperfusion of the rat testis. *Iranian journal of reproductive medicine*, *13*(2), 85.
- Tanyel, F., Büyükpamukçu, N., & Hiçsönmez, A. (1989). Contralateral testicular blood flow during unilateral testicular torsion. *British journal of urology*, *63*(5), 522-524.
- Tomatir, A. G. (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, *23*(6), 499-508.
- Tripathi, D. N., & Jena, G. B. (2010). Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutat Res*, *696*(1), 69-80. doi:10.1016/j.mrgentox.2009.12.014
- Tsounapi, P., Saito, M., Dimitriadis, F., Kitatani, K., Kinoshita, Y., Shomori, K., . . . Satoh, K. (2012). The role of K ATP channels on ischemia-reperfusion injury in the rat testis. *Life Sci*, *90*(17-18), 649-656. doi:10.1016/j.lfs.2012.03.006
- Tu, Y. P., Chen, S. C., Liu, Y. H., Chen, C. F., & Hour, T. C. (2013). Postconditioning with far-infrared irradiation increases heme oxygenase-1 expression and protects against ischemia/reperfusion injury in rat testis. *Life Sci*, *92*(1), 35-41. doi:10.1016/j.lfs.2012.10.019
- Turner, T., & Brown, K. (1993). Spermatogenic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biology of reproduction*, *49*(2), 401-407.
- Üstün, H., Akgül, K. T., Ayyıldız, A., Yağmurdur, H., Nuhoğlu, B., Karagüzel, E., . . . Germiyanoğlu, C. (2008). Effect of phosphodiesterase 5 inhibitors on apoptosis and nitric oxide synthases in testis torsion: an experimental study. *Pediatric surgery international*, *24*(2), 205-211.
- Vollmar, B., Waldner, H., Schmand, J., Conzen, P., Goetz, A., Habazettl, H., . . . Brendel, W. (1989). Release of arachidonic acid metabolites during acute pancreatitis in pigs. *Scandinavian journal of gastroenterology*, *24*(10), 1253-1264.

- Wei, S. M., Yan, Z. Z., & Zhou, J. (2011). Psoralea corylifolia protects against testicular torsion/detorsion-induced ischemia/reperfusion injury. *J Ethnopharmacol*, 137(1), 568-574. doi:10.1016/j.jep.2011.06.010
- Wei, S. M., Yan, Z. Z., & Zhou, J. (2013). Involvement of reactive oxygen species and TATA box-binding protein-related factor 2 in testicular torsion/detorsion-induced injury. *Urology*, 81(2), 466 e469-414. doi:10.1016/j.urology.2012.09.021
- Wu, S., Zhu, X., Jin, Z., Tong, X., Zhu, L., Hong, X., . . . Shen, W. (2015). The protective role of montelukast against intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Scientific reports*, 5.
- Yagmurdur, H., Ayyildiz, A., Karaguzel, E., Akgul, T., Ustun, H., & Germiyanoglu, C. (2008). Propofol reduces nitric oxide-induced apoptosis in testicular ischemia-reperfusion injury by downregulating the expression of inducible nitric oxide synthase. *Acta Anaesthesiol Scand*, 52(3), 350-357. doi:10.1111/j.1399-6576.2007.01545.x
- Yaman, L. S., Göğüş, O., Müftüoğlu, Y. Z., Küpeli, S., Anafarta, K., Şafak, S. M., . . . Yurdakul, T. (1990). *Üroloji: Güneş Kitabevi*.
- York, J., & Drago, J. (1985). Torsion and the contralateral testicle. *The Journal of urology*, 133(2), 294-297.
- Zini, A., Abitbol, J., Girardi, S., Schulsinger, D., Goldstein, M., & Schlegel, P. (1998). Germ cell apoptosis and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression following ischemia-reperfusion injury to testis. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 41(1), 57-65.

TUĞBA CAN ŞAHİN

KİŞİSEL BİLGİLER:

Doğum Tarihi : 27.04.1989

Cinsiyet: Bayan

Medeni Hali : Evli

Ehliyet : B Sınıfı (2011)

Hobiler : Jazz ve klasik müzik

Kulüp üyelikleri : A.Ü Sivil Havacılık Kulübü, A.Ü Türk Sanat Müziği
Korusu

EĞİTİM:

Lise: Konya Selcuklu Cumhuriyet Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi 2003-2007

Lisans Öğrenimi: Anadolu Üniversitesi

Fen Fakültesi

Biyoloji Bölümü, 2008-2013

Yüksek Lisans:ESOGÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve
Embriyoloji AD Yüksek Lisans (2013-)

Staj ve Sertifikalar :

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi GENTAM

Sitogenetik Laboratuvarı -2011: Postnatal and prenatal sitogenetik analizler, harvest, mikroskopik değerlendirme,

Moleküler Sitogenetik Laboratuvarı -2011: Primer Dizaynı, Floresan mikroskopu incelemesi ,FISH

DNA Laboratuvarı -2011: DNA ekstraksiyonu, PCR ve DNA saflaştırma ,Agarose Jel Elektroforez ,DNA dizi analizi

Mikrobiyoloji Laboratuvarı-2011:ELISA,Viroloji testleri, Antibiyogram testi, Kültür

University of York, Mammalian Genetic Research, 25 Haziran- 25 Eylül 2012

Osmangazi Üniversitesi, Üreme Sağlığı Merkezi 1 Ocak- 1 Nisan 2013

Esogu , HADYEK Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (2014)

TÜBA Kök Hücre Çalıştayı

Adli Tıp Çalıştayı Fatih Üniversitesi Bionanoteknoloji Bölümü

Akademik Yayın: (SCI- EXPANDED) Can, T., Faas, L., Ashford, D. A., Dowle, A., Thomas, J., O'Toole, P., & Blanco, G. (2014). Proteomic analysis of laser capture microscopy purified myotendinous junction regions from muscle sections. *Proteome science*, 12(1), 25.

Yabancı Diller:

Advanced English, German

Bilgisayar :

Ms Office Programları (Word,Excel,Powerpoint), Autocad, EndNote, Serial Cloner, PSPP.

Konferans ve Sempozyum:

BINOTEK Bionanotechnology Forensic Biology Symposium
9/10 Nisan 2010

TUBA Kök Hücre Çalıştayı (TTB-STE 11 Credit)

TUBA Kök Hücre Sempozyumu -25/26 Haziran 2010

Academy of Engineering and Management Yönetim Akademisi
25/26 Aralık 2010

Izgoren akın International Academy Training and Consultancy
25 Aralık 2010

University of York, Biyoloji Bölümü Genetik Araştırmalar Birimi
25 Haziran -2 Ekim 2012

Anadolu Üniversitesi Türk Klasik Müziği Konseri -26 May 2013

Anadolu Üniversitesi, Poster Sunumu 4-6 Haziran 2013