

**T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**İNMEMİŞ TESTİSLİ ÇOCUKLARDA OKSİDATİF STRES, SİTOKİN CEVABI  
VE OTOİMMÜNİTENİN SUBFERTİLİTE/İNFERTİLİTE  
ÜZERİNE OLASI ETKİLERİ**

**Uzmanlık Tezi**

**Dr. Serap SAMUT BÜLBÜL**

**TRABZON - 2011**

**T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**İNMEMİŞ TESTİSLİ ÇOCUKLARDA OKSİDATİF STRES, SİTOKİN CEVABI  
VE OTOİMMÜNİTENİN SUBFERTİLİTE/İNFERTİLİTE  
ÜZERİNE OLASI ETKİLERİ**

**Uzmanlık Tezi**

**Dr. Serap SAMUT BÜLBÜL**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Mustafa İMAMOĞLU**

**TRABZON - 2011**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
KISALTMALAR	I
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. İNMEMİŞ TESTİS	3
2.2. TESTİS VE OKSİDATİF STRES	8
2.3. TESTİS VE SİTOKİN CEVABI	13
2.4. TESTİS VE OTOİMMUNİTE	15
3. MATERYAL VE METOD	18
4. BULGULAR	23
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	37
7. ÖZET	39
8. SUMMARY	41
9. KAYNAKLAR	43

## KISALTMALAR

**ASA:** Antisperm antikor

**ATP:** Adenozin trifosfat

**IVF:** İn-vitro Fertilizasyon

**İMA:** İskemik Modifiye Albumin

**MDA:** Malondialdehid

**MIF:** Mülleriyan İnhibe Edici Faktör

**mtDNA:** Mitokondrial DNA

**ROS:** Reaktif Oksijen Türleri

**SOD :** Süperoksid Dismutaz

**TNF:** Tümör Nekrozis Faktör

# 1. GİRİŞ

Erkek çocuklarında oldukça sık görülen bir sorun olan inmemiş testis, miadında doğanlarda %3-5, prematürlerde ise %20-30'a varan oranlarda görülmektedir (1). Normal bir spermatogenez için testisin vücut içine nazaran 1,5-2°C daha düşük bir ısıya sahip olan skrotumda yer alması gereklidir (2). Testisin abdomen içindeki gelişim noktasından inişin gerçekleşmesinde mekanik, hormonal, otoimmün, nöral ve testisin kendisinden kaynaklanan birden çok etkenin rolü olduğu düşünülmesine rağmen, skrotumdaki normal yerine inişini tamamlayamamasının nedeni tam olarak bilinmemektedir.

İnmemiş testisin tedavi edilmediği takdirde çeşitli komplikasyonlara neden olabileceği çok iyi bilinmektedir. Bu komplikasyonlardan en önemlisi düşük sperm sayısı, kalitesi ve bozulmuş spermatogenezis sonucunda hem tek taraflı hem de iki taraflı vakalarda subfertilite/infertilite riskinin artmış olmasıdır (3). Bununla beraber malignite gelişimi, testis torsiyonu, travmaya açık olması ve boş skrotumun yarattığı psikolojik sorunlar sıralanabilir (1). Bu sorunların gelişimini önleyebilmek için inmemiş testisin standart tedavisi olan orşiopeksi geliştirilmiştir. Ancak günümüzde özellikle inmemiş testisin uzun dönem sekelleri olan subfertilite/ infertilite ve malignite gelişimi halen önemli bir tıbbi sorun olmaya devam etmektedir. Hatta son yıllarda testislerin başarılı olarak skrotuma indirilmesinin bile bu süreci durdurmadığı tartışılmaktadır. Bu durum, araştırmacıları, fertiliteyi koruyabilmek için yeni deneysel ve klinik araştırmalar yapmaya yöneltmiştir.

İnmemiş testislerde, hem aynı taraftaki testis hem de karşı taraftaki testiste hasar oluşumu ve bunun subfertilite/infertilite ile sonuçlanması ile ilgili başlıca 3 mekanizma suçlanmaktadır. Bunlar oksidatif stres, sitokin cevabı ve otoimmünitedir (4). Bu hasarlanma mekanizmalarından hangisinin etkili olduğu önemli bir konu olarak gündemde bulunmaktadır. Bu klinik çalışma, testisin hasarlanması sonucu gelişen fertilite bozukluğuna neden olan mekanizmaları açıklayabilmek amacıyla planlanmıştır.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, fertilitte bozukluğunun önlenebilirliği açısından, etiyolojide etkili faktörlerin ortadan kaldırılmasına yönelik tedavilerin geliştirilmesi için de zemin hazırlayacaktır. Çünkü, düşüncemize göre, inmemiş testislerde doğumdan sonra oluştuğu düşünülen ilave hasarlanma veya orşiopeksi sonrası devam edebildiği iddia edilen hasarlanmalar önlenebilir olabilir. Böylece inmemiş testisli çocuklardaki artmış subfertilite/infertilite oranları azaltılabilir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İNMEMİŞ TESTİS

#### 2.1.1. Tanım

İnmemiş testis veya kriptoorşidizm, erkek çocuklarında yaygın olarak görülen bir endokrin bez hastalığıdır. İnmemiş testis, testisin normal göç yolu üzerinde takılıp kalmış olmasını ifade eder. Normal bir spermatogenez için testisin daha serin bir ortam olan skrotumda yer alması gereklidir. Bu nedenle, abdomen boşluğunda oluşan testis skrotuma göç etmek zorundadır. Miadında doğan erkek çocuklarda inmemiş testis insidansı %3-5, prematürlerde ise bu oran %20-30 olarak rapor edilmiştir (1,5). Miadında doğan infantlarda bu oran 1 yaş civarında %0,8-1' e düşmektedir. İnmemiş testis olgularının %70' i tek taraflıdır ve daha çok sağ tarafta (%60) ve %30 sol tarafta görülmektedir. İnmemiş testiste, familial kalıtım kardeşlerde %6-10 insidansa sahiptir. İki taraflı görülme sıklığı ise %10-25 arasındadır ve bunların da %6' sından daha azında endokrin bir hastalık olduğu tahmin edilmektedir. İnmemiş testisin iki doruklu bir prezentasyonu olup, 1.pik 2 yaş civarında, 2.pik ise 8-10 yaşlarında çıkan testis şeklinde görülmektedir (5). Son yıllardaki çalışmalarda çıkan testis insidansı 6 yaş altında %1,2, 6-9 yaşında %2,2 ve 9-13 yaşında ise %1,1 olarak rapor edilmektedir (6).

#### 2.1.2. Klasifikasyon

Testis skrotumda palpe edilmediği zaman, inmemiş testis, retraktıl testis, ektopik testis, çıkan testis ve vanishing testis akla gelmektedir. Lokalizasyona göre inmemiş testis, abdominal yerleşimli, kanaliküler ya da ektopik olarak sınıflandırılabilir (Tablo-1) (5). Tanımlamada abdominal yerleşimli testis palpe edilemez ve sıklıkla internal inguinal ringe lokalizedir. Kanaliküler testis iniş yolu boyunca uzanabilir, kanal içi ya da yüksek skrotal

olabilir. Testis, normal göç yolundan hareket ederek ektopik pozisyona da göç edebilir. 5 tane major testiküler ektopi vardır; perine, femoral kanal, superfisyal inguinal poş, suprapubik alan ve karşı skrotumdur. Testiküler ektopi en sık superfisyal inguinal poş içine olur (2).

İnmemiş testisle sıklıkla karışan durum ise retraktil testistir. Retraktil testis, normal iniş yolu üzerinde testisin palpe edilebilmesi ve elle skrotuma indirilebilmesi ve bırakıldığında skrotumda kalması durumu olarak tanımlanabilir. Retraktil testis normalde inişini tamamlamıştır, fakat kasıkta bulunabilmektedir. Bunun nedeni aşırı aktif kremasterik reflekstir. Retraktil testislerin bir kısmı bazen takiplerinde yukarıda kalır ve çıkan testis tanısı alır (5).

İnmemiş testislerde, son yıllarda hepsinin konjenital olmadığından ve kazanılmış inmemiş testis durumu olan çıkan testisten bahsedilmektedir. Hatta çıkan testis tanısının gittikçe arttığı ve bu vakaların konjenital inmemiş testisten daha yaygın olabileceği yönünde görüşler de mevcuttur (6). Çıkan testis, yaşamın ilk aylarında veya yıllarında skrotumda olduğu bilinen testisin daha sonra yukarı çıkarak inmemiş hale gelmesi olarak tanımlanabilir (7).

Testisin palpe edilemediği durumlarda ya %45 abdominal yerleşimli ya da %25 inguinal kanal içinde veya alternatif olarak yokluğundan bahsedilir. Bu son durum vanishing testis olarak ifade edilir ve bunun muhtemelen gubernakülümün skrotuma göçü sırasında spermatik kordun torsiyonu sonucu oluştuğu öne sürülmektedir (8).

**Tablo.1**→ İnmemiş Testisin Klasifikasyonu ve İnsidansları (5)

<b>İnmemiş Testisin Klasifikasyonu</b>	<b>İnsidansları</b>
Ektopik testis	%77
İntrakanaliküler veya aniden ortaya çıkan	%10-12
Abdominal yerleşimli testis	%4-6
Vanishing testis	%3
Testis yokluğu	%1



### 2.1.3. Testiküler İniş

Başlangıçta lomber bölgede bulunan testisler, 3.fetal aydan itibaren skrotuma doğru iniş başlarlar. Hutson' a göre, testiküler iniş 2 ardışık evreden oluşmaktadır; transabdominal ve transinguinal evre (5). Bunun başlangıç evresi olan transabdominal inişte etkin olduğu düşünülen üç hormon; MIF, insülin-3 ve testesterondur. Testis internal inguinal ring düzeyine gestasyonun 12.haftasında ulaşmaktadır. Yaşamın 3. ve 7. ayları arasında pozisyon değiştirmemektedir. Bu peryod süresince gubernakulum, inguinal kanal ve skrotumu testisin geçebilmesi ve yerleşebilmesi için yeterli büyüklüğe erdirmektir. Transinguinal evre boyunca, gubernakulum skrotuma doğru göç etmektedir. Androjenler ve genitofemoral sinir tarafından bu evre indirekt olarak kontrol edilmektedir. Transinguinal iniş, gestasyonun 24. ve 28.haftalarında meydana gelir ve genellikle 3.trimestirda tamamlanır. Yaklaşık olarak inmemiş testisle doğan yeni doğanların 2/3' ünde testiküler iniş doğum sonrası ilk 4-6 ay içinde spontan olarak gerçekleşir. Bu spontan inişin doğum sonrası testesteron akımı aracılığı ile olduğu sanılmaktadır (5).

### 2.1.4. Komplikasyonları

Komplikasyonlar subfertilite/infertilite, malignite, testiküler torsiyon, travma ve boş skrotumun yarattığı psikolojik sorunlar olarak sıralanabilir. İnmemiş testislerin neden olduğu bu ciddi komplikasyonları önleyebilmek için standart tedavisi olan orşiopeksi geliştirilmiştir (1). Ancak son yıllarda testisin başarılı bir şekilde skrotuma indirilmesinin, özellikle uzun dönem sekelleri olan subfertilite/ infertilite ve malignite gelişimini tamamen engelleyemediğine yönelik görüşler mevcuttur (1). Bu nedenle artan sayıda çalışmalar fertilite sorununun oluşumunda etkili olan faktörleri ortaya koymaya ve sonuçta bu ciddi sorunu önlemeye yöneliktir.

### 2.1.5. İnmemiş Testiste Subfertilite/İnfertilite

İnfertilite nedenleri arasında erkek faktörleri, Dünya Sağlık Örgütü' nün 1982-1985 yıllarındaki çalışmalarına göre %20 oranında önemli bir yer kapsamaktadır. Erkek faktörleri arasında ise varikosel ve inmemiş testis başta olmak üzere testiküler hastalıklar

%30-40 gibi yüksek bir oranda görülmektedir (3). Çocuklarda sık görülen inmemiş testislerde, testis lokalizasyonunun ve orşiopeksinin erkek fertilitesi üzerindeki etkileri hala bir netliğe ulaşamamıştır. Yapılan çalışmalara göre yüksek testis her zaman kötü, erken cerrahi daha iyi ve iki taraflı inmemiş testis tek taraflıya göre daha kötü olarak değerlendirilmektedir. Ancak özellikle tek taraflı inmemiş testislerde karşı testisin hangi yolla ve nasıl etkilendiği ve subfertilite/infertiliteye nasıl neden olduğu henüz tam olarak açıklanamamıştır (5). İki taraflı inmemiş testisli erkeklerde, fertilitate oranı tek taraflı inmemiş testisli erkekler ve genel erkek popülasyonuna göre oldukça azalmıştır (1). Lee ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada, iki taraflı inmemiş testislerde infertilite oranını %38, kontrol grubunda ise %6 olarak belirlemişler ve riskin bu olgularda 6 kat arttığını tespit etmişlerdir. Buna karşılık tek taraflı vakalarda bu oranı %10,5 tespit etmişler ve riskin ise normal popülasyona göre 2 kat arttığını belirlemişlerdir (9).

Histolojik olarak dejeneratif değişikliklerin var olduğu inmemiş testislerde klinik açıdan da fertilitenin azaldığı bilinen bir durumdur (10). Yapılan çalışmalar sonucunda inmemiş testisin histolojisinin 1 yaşından sonra giderek bozulmaya başladığı, germ ve Leydig hücrelerinin sayısının azaldığı, Leydig hücrelerinin anormal bir yapı kazanmaya başladığı, peritübüler ve perivasküler alanlarda fibrozis olduğu görülmüştür. Sertoli ve germ hücreleri normal görünseler bile Leydig hücrelerinin 2.-6. aylar arasında bozulmaya başladıkları elektron mikroskopisi çalışmaları ile gösterilmiştir (11,12,13). İnmemiş testis olgularında Leydig hücreleri yeterince proliferasyon olamamakta ve puberteye kadar sürecek olan uykuya yatmadan önce gerçekleşmesi gereken transformasyon-gonositlerin yetişkin kuyu spermatogoniyalar (Adult spermatogonia) haline dönüşmeleri- gecikmektedir (14,15). Ayrıca Sertoli hücrelerinde de atrofi, mitokondride dejenerasyon, ribozomal sitoplazma kaybı, endoplazmik retikulumda düzleşme, Sertoli ve spermatogonia hücrelerinde kollajen lif artışı gibi ultrastrüktürel değişiklikler gözlenmektedir (2). Bu değişiklikler yaşamın ikinci yılında görülmeye başlar, birinci yılında görülmez (2,5). Bu çalışmaların sonuçlarına göre çocuk 2 yaşına geldiğinde inmemiş testislerin %40' unda hiç germ hücresi kalmamakta buna karşın 1 yaş altındaki inmemiş testislerin %70' inde germ hücre sayısı ve yapısı normal bulunmaktadır (13,14). Bu bulgular göz önünde bulundurularak inmemiş testis ameliyatı için uygun zamanın 6-12 ay olduğu öne sürülmektedir (6).

Prem Puri ve arkadaşları yaptıkları araştırmada, yaş ortalaması 24,7 olan 7-14 yaş arasında orşiopeksi geçirmiş (119 tek taraflı ve 23 iki taraflı) 142 erkekte semen analizlerini değerlendirmişler. Tek taraflı inmemiş testisli erkeklerde %78, tek taraflı palpe edilemeyen testislerde %68 ve iki taraflı inmemiş testislerde ise sadece %30 oranında normal semen analizi göstermişler ve iki taraflı palpe edilemeyen testislere sahip erkeklerde ise azospermi saptamışlardır. Prem puri ve arkadaşları inmemiş testis nedeni ile orşiopeksi geçirenlerde, germinal epitelin hasarlandığına ve bunun sperm sayısını ve kalitesini azalttığına inanmaktadırlar (16).

Garcia ve arkadaşları, abdominal ve superfisyal poş yerleşimli testislerde sperm dansitesi arasında önemli farklılıklar saptamışlardır. 140 hastada (çocukluk çağında inmemiş testis nedeni ile ameliyat edilen) sperm analizi yapmışlar ve biyopsilerde belirgin germ hücre kaybı görmüşlerdir. İki taraflı inmemiş testislerin, %78-100 oranında infertilite riski ile bağlantılı olduğunu tespit etmişlerdir (17). Negri ve arkadaşları benzer bir çalışmada iki taraflı inmemiş testis hikayesine sahip ve fertilite tedavisine katılan 30 erkekte (yaş ortalaması  $34,7 \pm 4,4$  yaş) biopsi yapmışlar ve bu erkeklerin testiküler histolojilerinde, 10 hastada belirgin orta derecede hipospermatogenezis, 8 hastada şiddetli hipospermatogenezis saptamışlardır (18).

Okayama ve arkadaşlarının 274 hastada yaptığı retrospektif bir çalışmada, tek taraflı ve iki taraflı orşiopeksi (ameliyat yaşı 2-9 yaş ve ya 9-12 yaş) geçiren hastalarda sperm değerlerini araştırmışlar. Bu çalışmada, iki taraflı inmemiş testislerde orşiopeksinin fertilite potansiyelini düzeltmediğini görmüşlerdir. Tek taraflı inmemiş testislerde ise tedavi edilmeyen gruba göre sperm değerlerinde iyileşme sağladığını saptamışlardır. Araştırmacılar, orşiopeksinin puberte öncesi dönemde yapılması gerektiğini öne sürmüşler, fakat erken yaşta yapılan orşiopeksinin de sonraki dönemde fertilite üzerine faydası olmadığını görmüşlerdir. Ek olarak araştırmacılar, hasarlanmış tek taraflı inmemiş testislerde karşı taraftaki normal yerleşimli testisin fonksiyonunun azalmasının bilinmeyen bazı faktörlere bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir (19).

İnkarsere inguinal herni, inmemiş testis, testis tümörü, vas deferens obstrüksiyonu ve testiküler torsiyon gibi cerrahi patolojilerde aynı taraftaki testisin etkilenmesinin karşı testiste de hasarlanmaya neden olabildiği gösterilmiştir (4). Yani tek taraflı testiküler patolojilerin hepsi karşı testiste hasarlanmaya neden olabilmektedir. İki yaşından büyük

çocuklarda tek taraflı inmemiş testislerde orşiopeksi sırasında her iki testisten yapılan biyopsilerde normal yerleşimli karşı testiste de histolojik değişikliklerin olduğu gösterilmiştir (20). İnmemiş testiste, testisin skrotum dışı lokalizasyonda kaldığı süre ne kadar uzun olursa bu değişikliklerde o kadar şiddetli ve kalıcıdır. Skrotuma inmiş karşı testisteki germ hücrelerinin hem foksiyonu hasarlanmıştır hem de kompensatuar hipertrofiye olmuşlardır (2). Başka bir çalışmada da karşı normal testiste spermatogonia sayısının inmemiş testise göre yüksek fakat normal testise göre ise düşük olduğu görülmüştür (21).

İnmemiş testislerde, aynı taraftaki ve karşı taraftaki testiste hasar oluşumuyla ilgili başlıca 3 mekanizma suçlanmaktadır. Bunlar oksidatif stres, sitokin cevabı ve otoimmünitedir (4). Ancak bu mekanizmaların etkinliği ile ilgili yapılan çalışmalara rağmen, hangisinin daha etkin olduğu henüz net olarak açıklanamamıştır.

## **2.2. TESTİS VE OKSİDATİF STRES**

### **2.2.1. Oksidatif Stres ve Malondialdehid**

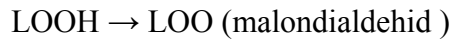
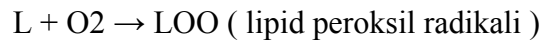
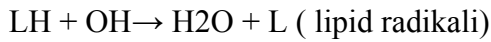
Organizmada metabolizma sonucu normal olarak serbest radikaller ve oksidan maddeler açığa çıkar. Serbest oksijen radikalleri, enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir. Yapılarında, çiftlenmemiş elektron bulunduran ve başka moleküllerle kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere “oksidan moleküller” veya “reaktif oksijen türleri” (ROS) denir. Serbest radikaller hücrelerimizde DNA’ya, proteinlere ve lipidlere zarar verirler (22).

Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize edip ortadan kaldıran antioksidanlar üretmektedir. Antioksidan savunma sistemi içinde bulunan hücre içi, hücre dışı ve membrana ait savunma sistemleri serbest radikallere karşı organizmayı korur (22). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest radikaller hidroksil, süperoksid, nitrik oksit ve lipit peroksid gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksid grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksid dismutaz (SOD) aracılığında hidrojen

peroksid ( $H_2O_2$ ) ve  $O_2$ ' ye çevrilir.  $H_2O_2$  ise dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır.

Normalde organizmada oksidan ve antioksidan sistem arasında denge vardır. Oksidan ve antioksidan sistem arasındaki denge bozukluğu birçok patolojik olayın başlamasına zemin hazırlar (23,24). Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse hücre membran proteinlerini yıkarak, membran lipidlerinin peroksidasyonuna, hücre membranını serbestleştirip hücre fonksiyonunu engelleyerek, nükleer membranı geçip nükleustaki genetik materyale etki edip DNA' yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirerek vücutta ciddi doku hasarlarına neden olabilirler (22,25).

Serbest radikallerin hücre membran ve lipoproteinlerinin yapısında yer alan yağ asitlerine etkisi ile lipid peroksidasyonu meydana gelir (26).



Lipid peroksidasyonu MDA ve 4-hidroksinonenal (HNE) gibi oldukça toksik ürünler oluşmasına neden olur. Bu ürünlerin en önemlisi olan MDA, oldukça reaktif bir aldehit türevidir ve proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipidler veya nükleik asitlerle reaksiyona girerek biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlara neden olur. Membranların yapıları bozular, geçirgenlikleri değişir, iyon transportu ve enzimatik aktiviteler gibi fonksiyonlar etkilenir (27).

### 2.2.2. Testis ve Oksidatif Stres

Spermatogenez, saniyede 1000 sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir. Bu süreçte doğal olarak meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitelyum tarafından yüksek oranda mitokondriyal oksijen tüketimini

göstermektedir. Ayrıca: testisteki zayıf vaskülarizasyon, bu dokuda oksijen durumunun düşük ve oksijen miktarı için olan rekabetin oldukça şiddetli olmasıdır.

Hem spermatogenez hem de Leydig hücresi steroidogenezisi, oksidatif stresle hasar görebildiği için testis dokusundaki düşük oksijen miktarı, testisin kendini serbest radikallerin hasarından koruyabileceği mekanizmaların önemli bir parçası olabilmektedir. Testis bu korunmayı sağlamak için, çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyiciler içermektedir. Testiküler mikroçevredeki düşük oksijen miktarına rağmen testis; fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle, oksidatif strese karşı hassas hale gelmektedir. Bu risklerin üstesinde gelebilmek için, testis hem enzimatik hem de non-enzimatik öğelerden oluşan antioksidan sistemleri içermektedir (22).

Testis; steroidogenez ve sperm üretimini desteklemek amacı ile antioksidan açıdan korunmasına rağmen, bazı endojen ve ekzojen faktörlerin bu savunmayı alt üst ettiği ve oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir. Bu faktörler; inmemiş testis, testiküler torsiyon, varikosel, hipertroidizm, diyabet, enfeksiyon, reproduktif hormon dengesizliği ve zenobiyotiklerin etkisi. Bunların sonucunda; erkek germ hücre hattında DNA hasarı, spermatazoada DNA hasarı, testiküler antioksidan enzim aktivitesinde bozukluk, oksidatif stresin ve lipid peroksidasyonunun indüklenmesi, ROS temizleyicilerin kaybı, testiküler SOD ve katalazın baskılanması görülmektedir (22).

Testis, bilindiği gibi fiziksel strese oldukça duyarlıdır. Daha önce yapılmış araştırmalarda, oksidatif stres testiküler hasarlanmada önemli bir mediatör olarak kullanılmıştır. ROS, testisin oksidatif stresle yönetimini sınırlayabilir. Normal fizyolojik durumlarda, seminal plazmada ve normal motil spermatazoada ROS üretilmez. Morfolojik anormal spermatazoa ROS üretebilir (28). Fazla miktarda ROS üretiminin, spermin nükleer DNA' sında hasara ve yüksek derecede sperm mitokondrisi mutasyonuna neden olduğu bilinmektedir (29). Aşırı ROS formasyonu, anormal sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile pozitif olarak bağlantılıdır (28). Bu nedenlerden dolayı aşırı ROS üretimi, erkek infertilitesinin etiyolojisinde rol oynayabilir.

Sperm motilitesi ve sperm-oosit birleşme kapasitesi kaybı, membran akışkanlığının azalması, lipid peroksidasyonu artışı ve membran-bağlı enzimlerde ATP kaybı ile ilişkilendirilmiştir (30). Lipid peroksidasyonu, defektif sperm fonksiyonun etiyolojisinde önemli rol oynar. Lipid peroksidler, insan spermatazoasına aşırı derecede sitotoksiktir.

MDA konsantrasyonu, sperm morfolojisi ile direkt ilişkili, sperm-oosit füzyonu ile de ters ilişkilidir (28).

Ville Peltola ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada adult ratlarda inmemiş testis oluşturmuşlar ve inmemiş testisin maruz kaldığı yüksek ısının ROS' nin artmasını indüklediğini, testiste oksidatif strese bağlı olarak lipid peroksidasyonun arttığını ve antioksidan enzimlerin (SOD ve katalaz) inaktive olduğunu görmüşlerdir. Aynı zamanda inmemiş testisteki artmış lipid peroksidasyonu seviyelerini karşı skrotal testiste de tespit etmişlerdir. Sonuç olarak testisteki oksidatif strese bağlı olarak ROS' nin aşırı üretiminin inmemiş testisteki hasarlanma mekanizmalarında önemli bir role sahip olabileceğini belirtmişlerdir (31).

Zini ve arkadaşları ise ratlarda yaptığı bir çalışmada tek taraflı inmemiş testis oluşturup, 40 gün sonra aynı taraf, karşı taraf ve kontrol grubunda antioksidan enzim mRNA seviyelerini değerlendirmişler. Kontrol testise göre inmemiş taraftaki testis ve karşı testiste germ hücre spesifik SOD ve GPx mRNA seviyelerinde önemli derecede azalma tespit etmişlerdir. Yaptıkları araştırmadaki bulgular, inmemiş testis germ hücrelerindeki spesifik gen ekspresyonundaki bozulmanın iki taraflı olabileceğini desteklemektedir. İnmemiş testiste histolojik olarak şiddetli derecede hipospermatogenezis ve Sertoli ve Leydig hücre fonksiyonlarında bozulma görmüşler. İnmemiş testisin ağırlığının, karşı testis ve kontrol testise göre azaldığı tespit etmişlerdir. Ayrıca oksidatif güç ve antioksidanlar arasındaki dengenin testisin normal steroidogenezisi ve spermatogenezisi için oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda oksidatif stresin inmemiş testiste, anormal spermatogenezis ve tümörüogeneze neden olabilecek bir role sahip olduğunu öne sürmektedirler (32).

Kumar ve arkadaşları, 33 idiopatik infertil erkekte (ortalama yaş 30) ve 30 fertil erkekte (ortalama yaş 31) yaptıkları çalışmada, infertil erkeklerin varikozel, inmemiş testis ve endokrin hastalıklar gibi faktörler taşıdıklarını belirlemişler ve bunlarda semen analizlerinde sperm MDA, ROS ve seminal antioksidan enzimlerin (SOD, katalaz ve GPx) düzeylerini değerlendirmişlerdir. Araştırmada kontrol grubuna göre infertil grupta düşük sperm sayısı, motilite azlığı saptamışlardır. MDA ve ROS seviyelerini ise kontrol grubuna göre infertil grupta önemli derecede yüksek tespit etmişlerdir. Seminal plazmadaki katalaz ve GPx aktiviteleri kontrol grubuna göre infertil grupta önemli derecede düşük ve SOD aktivitesinde ise farklılık olmadığını tespit etmişlerdir. İnfertil erkeklerdeki spermelerde

şiddetli derecede mikrotübüler bozulma ve mtDNA sekans analizlerinde önemli nükleotidlerde mutasyon tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda aşırı ROS artışının membran akışkanlığını bozarak MDA düzeyini yükselttiğini ve bu durumun da sperm motilitesini bozduğunu öne sürmektedirler. Ayrıca oksidatif stres ve mtDNA mutasyonlarının, infertil erkeklerdeki bozulmuş fertilitenin etiyolojisinde önemli rol oynadığını iddia etmektedirler (29).

### 2.2.3. İskemik Modifiye Albumin

Plazma proteinlerinin %60' ını oluşturan albumin kanda en fazla bulunan proteindir ve karaciğerde sentezlenir. Albuminin başlıca görevleri, plazma onkotik basıncının ayarlanması, kan pH' sının tamponlanması ve karaciğerde aminoasit sentezi için depo görevi görmesidir. Ayrıca kanda bazı ilaçlar, hormonlar ve serbest yağ asitleri gibi birçok organik ya da inorganik molekülün taşınması da albumin sayesinde olur (33). Kanda ana taşıyıcı molekül olan albumin, iskemi sonucunda değişikliğe uğrar; iskemi-reperfüzyon esnasında oluşan serbest radikaller ve asidozun sodyum-potasyum pompasını bozması gibi hücrel değişimler, albuminin N-terminal bölgesinin taşıma kapasitesini olumsuz etkiler ve bakır, nikel ve kobalt gibi geçiş metallerini bağlama kapasitesi azalır. Bunun sonucunda albuminin bir varyantı olan İMA olarak adlandırılan protein oluşur (34). Oluşan ve ortamdaki indirgeyici ajanlarla okside olan metal atomları bu zincir reaksiyonunun oluşmasını sürekli tetiklerken albumin tarafından bağlanmaya çalışılır ve bağlı albumin de bir taraftan İMA oluşturmaya devam eder (35).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda İMA, oksidatif stres ve iskeminin yeni ve sensitif markırı olarak gösterilmektedir. İMA' nın çeşitli patolojik durumlarda yükseldiği ve bu durumlarda akut iskemi döneminde tanı koydurucu bir biomarkır olabileceği öne sürülmektedir. Bu durumlar pulmoner emboli, mezenterik iskemi, periferel arteryel oklüzyon, derin ven trombozu ve inmedir (36).

Literatürde İMA' nın, testiküler dokulardaki iskemik olaylar sonucu nasıl etkilendiğini gösteren çalışmalar çok azdır. Bunlar arasında en önemlisi Kutlu ve arkadaşlarının deneysel olarak testis torsiyonu oluşturarak yaptıkları çalışmadır. Araştırmacılar ratlarda testis torsiyonu oluşturmuşlar ve torsiyondan 4 saat sonra bakılan



grubun kan örneklerinde, diğer gruplara göre İMA seviyelerinde önemli derecede yükselme tespit etmişlerdir. Ayrıca 4 saat sonra bakılan torsiyon grubunda diğer gruplara göre histopatolojik hasarın da önemli derecede yüksek olduğunu ve aynı zamanda bu grubun karşı taraftaki testisinde de belirgin histopatolojik hasar olduğunu görmüşlerdir. Bu gruptaki torsiyone testis ve karşı taraftaki testisin histopatolojik hasarı ile İMA seviyesi arasındaki pozitif korelasyondan dolayı İMA' in testisin durumu için önemli bir prognostik faktör olabileceğini öne sürmektedirler (36).

### 2.3. TESTİS VE SİTOKİN CEVABI

Sitokinler, hücre içi iletişimde önemli rol oynayan lökositler ve diğer hücreler tarafından üretilen ve sekrete edilen regülatuar peptidlerdir. Çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreç içerirler, özellikle inflamatuvar cevaba aracılık ederler, erkek ve kadın üreme fizyolojisinde önemli fonksiyonlara sahiptirler. İnflamatuvar sitokinler, özellikle makrofajlar olmak üzere beyaz kan hücreleri tarafından, yabancı antijenlere, patojenlere ve özellikle kronik inflamasyona cevap olarak üretilirler. Sitokinlerin etkilerinin kontrolü kompleks bir mekanizmadır (37).

Erkek genital traktında normal olarak seminal plazmada önemli seviyelerde sitokinler (IL-1, IL-6, TNF gibi) bulunmaktadır. Bunların germ hücreleri, Leydig hücreleri, Sertoli hücreleri, spermatazoa, epididim ve prostattan salınmaktadır. Bu sitokinlerin sekresyonlarının seminifer epitelyum siklusu boyunca denetlendiği ileri sürülmektedir (38). Aynı zamanda testisten steroid salınımında potent düzenleyicidirler. İmmun modülasyon dışında direkt olarak testiküler fonksiyon regülasyonunu etkiledikleri gösterilmektedir (37).

Testiküler intestisyum immunolojik olarak ayrıcalıklı bir sitedir. Spermatozitlerin kan-testis bariyerinden geçişlerinde testesteron ve sitokinlerin etkili olduğu belirtilmektedir (39). İntakt kan-testis bariyeri, Sertoli hücreleri ve fonksiyonel germ hücreleri etkileşimi ve normal testiküler steroidogenezis ve spermiogenezisdeki sitokinlerin içeriğiyle ilgili çok az bilgi bilinmektedir. Rat testislerinden izole edilen intestisyel sıvıdaki immunosupresif faktörlerin, testisin immun dokunulmazlığında önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (40).

Spermatogenezis, kompleks bir süreçtir, endokrin ve testiküler parakrin/otokrin faktörler tarafından regüle edilir. Sitokinler aynı zamanda, spermlerin fonksiyonunu ve fertilitiyi etkileme kapasitesine de sahiptirler (41). Patolojik durumlarda proinflamatuvar sitokinlerin seviyesi artar ve germ hücre proliferasyonunu, Sertoli ve Leydig hücrelerinin fonksiyon ve sekresyonunu ve spermatogenezisi negatif etkiler (40). Yapılan son çalışmalarda, IL-6 ve TNF başta olmak üzere bazı sitokinlerin direkt olarak spermatazoayı etkileyerek lipid peroksidasyonu seviyesinin yükselmesine ve spermatazoada direkt ROS üretimine neden olabileceği gösterilmektedir (41). Bu sitokinlerin sekresyon seviyelerinin ve testiküler parakrin ve otokrin faktörlerin regülasyon mekanizmasının gelecekteki keşfi erkek subfertilite/infertilitesi için terapötik bir durum sağlayacaktır.

Yapılan çalışmalarda, sitokinlerin oksidatif stres mediatörü olabileceği ve oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında denge değiştirici güce sahip oldukları rapor edilmektedir. Bir çalışmada genital trakt infeksiyonlu erkeklerde, sitokinlerin erkek genital traktında prooksidan ve antioksidan aktiviteleri modüle edebileceği rapor edilmiştir (42).

### 2.3.1. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, daha çok inflamatuvar olaylarda ve otoimmün hastalıklarda görülen proinflamatuvar sitokinlerden en etkili olanlardan birisidir. IL-6, 184 aminoasitten oluşan 26 kD ağırlığında bir glikoproteindir. Monositler/makrofajlar, fibroblastlar, T-lenfositler, astrositler, mikroglialar ve mast hücreleri tarafından üretilir. IL-6, karaciğerde akut faz proteinlerinin sentezinin indüksiyonu ve kronik otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda görülen hipergammaglobülinemiden sorumludur. Bazı malign hastalıklar, otoantikor ve romatoid faktör oluşumu bulunan otoimmün hastalıklarda sentezi artar (43).

IL-6, seminal sıvıda da bulunan çok fonksiyonel bir sitokindir (42). Ancak IL-6'nın testisteki lokal etkileri henüz net olarak açıklanamamıştır. Nallela ve arkadaşları, varikoselli infertil erkeklerde yaptıkları çalışmada IL-6 ve ROS düzeylerini değerlendirmişler, IL-6 ve ROS düzeylerinin bu hastalarda kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek tespit etmişlerdir. Ayrıca total antioksidan kapasitenin de azaldığını görmüşlerdir. Proinflamatuvar sitokin IL-6 ve oksidatif stresin, bu hastalarda infertilitenin patofizyolojisinde rol oynayabileceğini iddia etmektedirler (42). Yapılan çalışmalarda

seminal plazmada bulunan proinflamatuvar sitokin IL-6 ile ROS üretimi arasında pozitif bir bağlantı olduğunu destekleyen gözlemler de mevcuttur (44).

IL-6, Sertoli hücreleri tarafından da üretilir. Lenfosit ve diğer testiküler hücreler üzerinde fizyolojik parakrin faktör olarak etki gösterir (40). Ayrıca bu sitokine dokunun immunolojik korunması için lokal lenfosit fonksiyonlarının regülasyonunda ihtiyaç olabilir (45). IL-6'nın, Sertoli hücrelerinde transferrin sekresyonunda etkilediği gösterilmiştir (40). Ayrıca spermatogonal proliferasyon, germ hücre diferansiyasyonu, Sertoli hücreleri steroidogenezi ve protein sekresyonunu da etkiler (38). Spermatozoidlerde ve spermatogonialardaki DNA sentezini inhibe eder (46). Seminal plazmada artmış IL-6 seviyelerine karşılık sperm konsantrasyon, motilite ve normal sperm formu yüzdesi azalmış olarak bulunur (47).

Seshadri ve arkadaşları, yaş ortalaması 34,5 (22-49yaş) olan 73 infertil erkeklerde semen analizi sınıflaması yaptıktan sonra IL-6 seviyelerini oligospermik, astenospermik, oligoastenospermik, azospermik obstrüktif ve germ hücre defektli grupta normospermik gruba göre önemli derecede yüksek tespit etmişlerdir (47).

## 2.4. TESTİS VE OTOİMMUNİTE

İnfertilite, günümüzde çocuksuz evliliklerde yaşanan psikolojik ve sosyolojik baskılar göz önüne alındığında halen çözüm bekleyen bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Nedeni bilinmeyen subfertilite/infertilite olgularında immunojenik faktörlerin ön plana çıktığı belirtilmektedir. İmmunojenik faktörler içerisinde en iyi bilinen ve infertilitede başlıca rol oynayan sperm hücrelerine karşı gelişen ASA'dır. Bu nedenle ASA değerlendirilmesi yapılamayan infertilite araştırmalarının eksik kaldığı bildirilmektedir. ASA'lar: serum, semen, foliküler sıvı, vajinal ve servikal sekresyonlarda saptanabilir ve Ig A, Ig G ve Ig M yapısında da olabilirler (48).

Testisler, vücutta çok iyi korunmuş organlardır. Spermatozoal antijenlerin dışarı çıkmasına ya da dolaşımdaki immunglobulinlerin veya immünolojik aktif hücrelerin içeri girmelerini önleyebilecek bir yapıya sahiptirler. Bu yapı, testiste bazal membrana oturmuş olan Sertoli hücrelerinin hem kendi aralarında hem de komşu germ hücreleriyle yapmış olduğu kan-testis bariyeridir. Yapılan çalışmalar, spermin vücuda girmesiyle erkekte

şiddetli bir immun yanıtın ortaya çıktığını, bu yanıtında da üreme fonksiyonlarını olumsuz etkilediğini göstermiştir. Bu nedenle erkeğin üreme fonksiyonlarının düzenli işleyebilmesi, bu zararlı immun cevabın önlenmesine bağlıdır. Kan-testis bariyerini bozulmasına neden olan bir olay (vazektomi, genital sistemde obstrüktif olaylar, inmemiş testis, varikosel, testis biyopsisi, travma, torsiyon, kanser, eşcinsellik, genetik yatkınlık) ASA oluşumuna neden olabilir. ASA' lar, sperm transportunun inhibisyonunda ve fertilizasyon yeteneğinin azalmasında rol oynarlar. Antikor ile kaplı spermin servikal mukusta penetrasyon yapamadığı düşünülmektedir. ASA' lar, erkekte spermatogonia evresinden itibaren spermatogenezise etki edebilir ve aspermatogenezis veya oligospermatogenezise yol açabilirler (48).

Kan-testis bariyeri, sperm otoimmunizasyonunu önlemek için lokal immun regulatuar mekanizmaya bir destektir. Normalde sperm yüzey antijenleri kan-testis bariyerinin arkasında bulunur. İnmemiş testiste, gonadların anormal lokalizasyonu ile beraber daha sonraki yüksek ısı, kan-testis bariyerindeki değişimi indükler ve lokal immunoregülasyonu bozar. İnmemiş testiste, tek başına veya orşiopeksinin travmatik etkisiyle immun sistemdeki antijenler ASA' ları bağlar (49). Her bir antikor bir antijene bağlanır ve ayrıca sperm fonksiyonunu etkiler. Erkeklerde ASA gelişimi, kan-testis bariyeri varlığında, germ hücrelerindeki antijen sekestrasyonlarına bağlıdır. Spermatogenezis maturasyonu esnasında, spermatozoid ve spermatidlerin gelişiminde yeni antijenler salınır. Antijenler immunokomponent hücreleri ile kontakt kurduğunda ASA oluşur. Kan-testis bariyeri formasyonunu bozan anormalliklerin gelişimi ASA oluşumuna neden olur (50).

Literatürde, prepubertal erkek çocuklarda ASA varlığının tartışmalı bir sorun olduğu dökümente edilmektedir. Bununla beraber ASA varlığını puberte öncesi gösteren raporlar da mevcuttur. ASA, matür sperm hücrelerinin yüzeyindeki antijenik determinantları tanıyarak puberte öncesi inmemiş testis ve başka bir gonadal hastalığı olan bireylerde ortaya çıkabilir. ASA' ların gelişimi, otoimmun reaksiyonlara predispozisyon için kanıt olabilir (51).

Domagala ve arkadaşları, 59 prepubertal (0,5-9 yaş, Tanner evre 1) ve 17 prepubertal erkek çocuklar (10-13 yaş, Tanner evre 2,3,4), bunların 49 tanesi tek taraflı inmemiş testis, 25 tanesi iki taraflı inmemiş testis ve 10 tane de sağlıklı prepubertal (2-14 yaş) erkek çocuklarından oluşan yaptıkları çalışmada, 76 prepubertal erkekte (testiküler

yetmezliği olan) ASA varlığını %3,95 olarak rapor etmişlerdir (51). Domagala ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada ise tek ve iki taraflı inmemiş testisi olan 69 prepubertal erkek ocuklarında ASA' yı %7 olarak tespit etmişler ve aynı seansda sağlıklı bireylerde de ASA pozitifliğine rastlamışlardır (51). Mininberg ve arkadaşları, yaşları 8 hafta-7 yaş olan orşiopeksi ya da başka bir inguinal cerrahi geçirmiş prepubertal erkek ocuklarda ASA' yı %28 olarak rapor etmişlerdir (52).

İnmemiş testiste, infantlarda, çocukluk çağında ve 10-12 yaşındaki erkeklerde germ hücre gelişiminde anormallikler rapor edilmektedir (49). Çocukluk ağındaki inmemiş testislerden alınan sonuçlarda semen parametrelerindeki azalma ve/veya lokal ya da sirkülatuar ASA varlığı infertilite ile ilişkili olabilir (51). Azalmış ilerleyici sperm motilitesi ve artmış sperm aglünitasyonu, ASA pozitif infertil ve inmemiş testis hikayesi olan erkeklerde önemli oranlarda rapor edilmektedir (53).

ASA' nın, inguinokrotal anomali ve inmemiş testis nedeni ile ameliyat olacak olan çocuklarda ameliyat öncesi motil spermatazoa ile reaksiyona girdiği rapor edilmektedir (54). Yapılan klinik araştırmalarda, inmemiş testisten ameliyat öyküsü bulunan infertil erkeklerde serum ASA yüksekliğinin testisin abdominal pozisyonu veya orşiopeksi ile ilişkili olmadığı rapor edilmektedir (53,54). Sinisi ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada 209 inmemiş testisli erkek ocuklarda ASA (+)' liğini %13,8 bulmuşlardır. 188 prepubertal erkeğin 21 tanesinde ASA (+)' liğini %11,1, 21 pubertal erkeğin ise 8 tanesinde ASA (+)' liğini %38 olarak rapor etmişlerdir. ASA sonuçlarında, tek taraflı, iki taraflı ya da testis lokalizasyonu ile ilgili bir istatistiksel farklılık tespit etmemişlerdir. Sinisi ve arkadaşları, inmemiş testiste sperm antijenlerine karşı oluşan otoimmün yanıtın testis lokalizasyonundan ve orşiopeksiden bağımsız olduğunu iddia etmişlerdir. Ayrıca pubertal yaştaki çocukların daha fazla risk taşıdığını göstermişlerdir (53).

### 3. MATERYAL VE METHOD

Bu klinik çalışma KTÜ Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından planlanıp, 2009/107 dosya 13 karar nolu etik kurul izni alındıktan sonra, Biyokimya Anabilim Dalı ve Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı' nın katkılarıyla ortaklaşa olarak yapıldı.

Çalışma iki grup oluşturularak yapıldı.

**Grup 1 (Çalışma grubu)** ; Çocuk Cerrahisi polikliniğine inmemiş testis nedeni ile başvuran 1-16 yaş arası, hiç ameliyat geçirmemiş ve ek bir hastalığı olmayan 88 hastadan oluşturuldu.

**Grup 2 (Kontrol grubu)** ; Çocuk Cerrahisi polikliniğe başvuran 1-16 yaş arası her iki testisi skrotumda bulunan, herhangi bir ameliyat geçirmemiş ve ek bir hastalığı olmayan 44 çocuktan oluşturuldu.

Her bir hasta ve çocuk olmaları nedeni ile ebeveynleri çalışma öncesi bilgilendirilerek aydınlatılmış onam formu ile onay alındı. 1.grupta yer alan hastalardan ameliyattan 1 gün önce, 2.grupta yer alan çocuklarda ise poliklinik kontrolü sırasında, Çocuk Cerrahisi polikliniğinde biyokimya tüpüne 3cc, hemogram tüpüne ise 2cc (toplam 5cc) kan örneği alındı. Kan örnekleri, +4 derecede 10 dakika 3000 devirde santrifüj edilerek plazma ve serum kısımları -80 derecede gerekli analizler yapılana kadar saklandı. Yaptığımız araştırmada oksidatif stresi değerlendirmek için MDA ve İMA düzeyleri, sitokin cevabını değerlendirmek amacıyla IL-6 ve otoimmunitiyi değerlendirmek için de ASA düzeyi ölçülerek aşağıda belirtildi.

#### 3.1. OKSİDATİF STRESİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmada oksidatif stresin etkisini değerlendirmek amacı ile hasta plazma örneklerinde MDA, serum örneklerinde ise İMA ölçüm tayini yapıldı.

### 3.1.1. MDA Düzeyinin Ölçümü

MDA düzeyinin belirlenmesi için plazma örneklerinde MDA miktarı 1984 yılında Yagi tarafından geliştirilen TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) methodu kullanılarak tayin edildi (55). Lipid peroksidasyon ürünü MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için serum lipidleri proteinle birlikte fosfotungistik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürüldü. Bir deney tüpüne 150 µL plazma, 1.2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 150 µL fosfotungistik asit eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika bekletildi. Karışım 1500 g' de 10 dk. santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Geriye kalan çökelek üzerine 2 mL saf su eklendi ve yeniden çözüninceye kadar vortekslendi. Tüpe 500 µL TBA eklendi ve 1 saat 100<sup>0</sup>C' de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüpler 1000 g' de 10 dk. santrifüjlendi. Üstteki berrak kısım alınarak 532 nm dalga boyunda absorbanlar okundu. 1 mmol 1,1,3,3-tetrametoksipropan 100 mL 0.01 M HCl içinde 50 °C' de 1 saat inkübe edildi ve bu bileşiğin hidrolizi sonucu oluşan MDA çözeltisinden 10, 5, 3,2,1, 0.5 nmol/mL çalışma standartları hazırlandı. Elde edilen sonuçlarla standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak plazma MDA miktarı nmol MDA/mL olarak belirlendi.

### 3.1.2. İMA Düzeyinin Ölçümü

İMA seviyelerini belirlemek için albümin kobalt bağlama testinden faydalanıldı, albümine kobaltın azalan bağlanma kapasitesi Bar ve arkadaşları tarafından geliştirilen hızlı ve kolometrik tayin metoduyla değerlendirildi (56). 200 µL hasta serumları cam tüplere eklendi ve üzerlerine %0.1 'lik 50 µL CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O ( Sigma ) yavaşça karıştırıldıktan sonra yeterli kobalt albumin bağlanması sağlanması amacıyla 10 dakika beklendi. Renklendirici ajan olarak 50 µL 1.5 mg/mL' lik Dithiothreitol (DTT) ( Sigma ) eklendi. 2 dakika beklendikten sonra % 0.9' luk NaCl' den 1 mL kobalt ve albumin arasında meydana gelen bağlanmayı durdurmak amacıyla eklenerek reaksiyon durduruldu. Her bir numune için numune körü yapıldı. DTT eklenen aşamada 50 µL 1.5 mg/mL' lik

DTT yerine 50 µL distile su konarak DTT' siz serum kobalt körü hazırlandı. Numune absorbanları spektrofotometrede ( Shimadzu, UV1601) 470 nm ölçüldü. DTT' li örneklerdeki renk oluşumu kör tüplerindeki renk oluşumuyla karşılaştırılarak sonuçlar ABSU absorban üitesi cinsinden rapor edildi.

### **3.2. SİTOKİN CEVABININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Çalışmada sitokin cevabının etkisini belirlemek amacı ile serum örneklerinde IL-6 düzeyi değerlendirildi.

#### **3.2.1. IL-6 Düzeyinin Ölçümü**

IL-6 seviyesinin belirlenmesi için serum örneklerinde AssayMax Human IL-6 ELISA kiti kullanılarak ölçüm yapıldı. Bu analiz kantitatif sandviç enzim immunassay tekniği ile IL-6 düzeylerini 5 saatten daha az bir sürede ölçer. İnsan IL-6' sı için spesifik bir fareye ait monoklonal antikor, bir mikropate üzerine kaplanmıştır. İmmobil antikor ve insan IL-6' sı için spesifik biotinli poliklonal antikor tarafından sıkıştırılmış örneklerdeki ve standartlardaki IL-6, streptavidin-preoksidaz konjugatı tarafından tanınmıştır. Serbest materyallerin hepsi yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra peroksidaz enzim substratı eklendi. Renk gelişimi durdu ve renk yoğunluğu ölçüldü.

### **3.3. OTOİMMUNİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yaptığımız çalışmada otoimmunitenin etkisini değerlendirmek için hasta serum örneklerinde ASA markırı ölçümü yapıldı.

#### **3.3.1. ASA Düzeyinin Ölçümü**

İnsan spermelerine karşı IgG türü antikorların varlığının değerlendirildiği test, indirekt immunofloresan yöntemi kullanılarak çalışıldı. Bu amaçla Euroimmun Spermatozoa (human) (Euroimmun, Lubeck, Almanya) kitleri kullanıldı.



**Test prosedürü:**

1. Çalışmaya başlamadan önce tüm kit içeriği ve örneklerin oda ısısına gelmesi sağlandı.
2. PBS tuzu 1 L distile su içerisinde çözüldü. İçerisine 2 ml Tween 20 eklenerek yavaşça karıştırıldı. Hazırlanan bu solüsyon (PBS/Tween 20 solüsyonu) yıkama aşamalarında ve serum dilüsyonlarında kullanıldı.
3. Hasta ve kontrol grubundan elde edilen serum örnekleri, hazırlanan PBS/Tween 20 solüsyonu kullanılarak, dilüsyon oranı 1:10 olacak şekilde dilüe edildi.
4. İnsan spermleri ile kaplanmış preparatlar 25 µl dilüe edilmiş örnek ile muamele edildi. Her çalışmada bir adet pozitif kontrol örneği, bir adet negatif kontrol örneği de çalışmaya dahil edildi.
5. Oda ısısında (18-25°C'de) 30 dakika inkübe edildi.
6. PBS/Tween 20 solüsyonu kullanılarak en az 5 dakika olacak şekilde yıkandı.
7. Her bir örnek 20 µl konjugat ile muamele edildi.
8. Oda ısısında (18-25°C'de) 30 dakika inkübe edildi.
9. PBS/Tween 20 solüsyonu kullanılarak en az 5 dakika olacak şekilde yıkandı.
10. Örneklerin üzerine kapatma medyumunu damlatılarak preparatlar lamel ile kapatıldı.
11. Floresan mikroskop kullanılarak x20 ve x40 büyütme ile incelendi.

**Sonuçların değerlendirilmesi:**

Öncelikle pozitif kontrol ve negatif kontrol değerlendirilerek testin geçerli sonuç verip vermediği kontrol edildi. Geçerli sonuç verenler için 1:10 dilüsyondaki sonuçlar değerlendirildi. Spermlerin kuyruk kısmı ile birlikte baş ya da gövde kısımlarına karşı antikor varlığı durumunda test pozitif olarak değerlendirildi.

Pozitif örnekler daha ileri dilüsyonlarda çalışılarak antikor titreleri belirlendi. Gösterilen pozitiflikler; + 1/10, ++ 1/32, +++ 1/320, +++++ 1/1000 dilüsyonlarda belirlendi.

### 3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Ölçümle elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. İki grubun ölçümsel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılıma uyanlarda Student-t testi, normal dağılıma uymayanlarda Mann Whitney U testi kullanıldı.

Veriler, ortalama  $\pm$  standart sapma (Ort  $\pm$  SD) şeklinde ifade edildi. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. OKSİDATİF STRESİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İnmemiş testisli çocuklarda, oksidatif stresin değerlendirilmesi için yaptığımız çalışmada MDA ve İMA sonuçları toplam 132 çocukta (88 inmemiş testis, 44 kontrol) değerlendirildi.

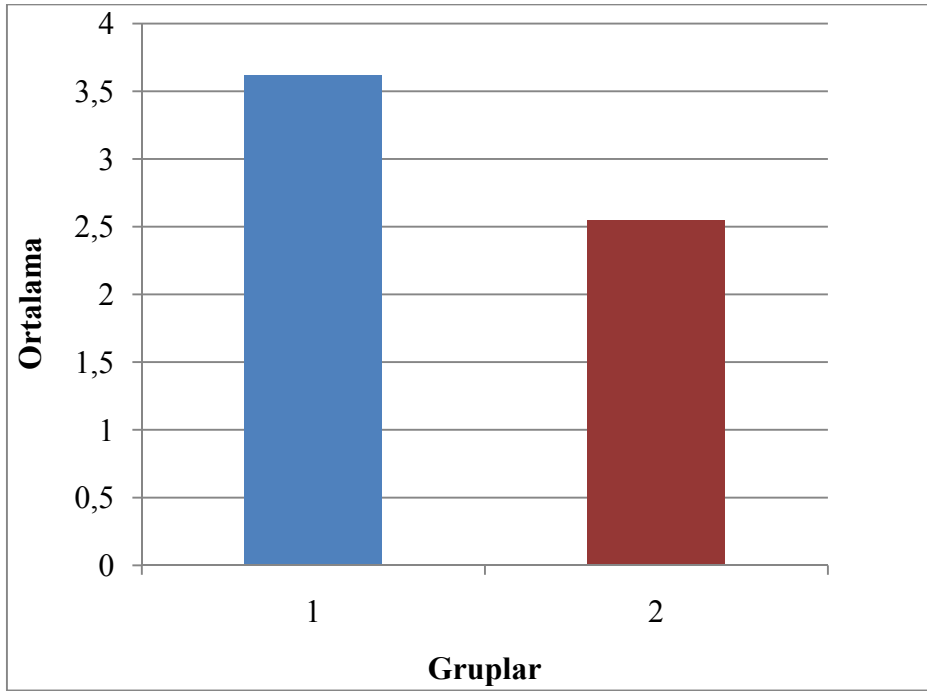
#### 4.1.1. MDA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışma ve kontrol grubuna ait toplam 132 çocukta MDA sonuçlarının istatistiksel olarak ortalama değerleri ve standart sapmaları hesaplandı ve sonuçları Tablo 2’de sunuldu.

**Tablo 2: MDA sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi**

Grup	Ortalama	Standart sapma
1 (Çalışma)	3,62	± 4,88
2 (Kontrol)	2,55	± 4,05

Her iki grubun MDA sonuçlarının ortalama değerlerinin karşılaştırılması ise Grafik 1’ de gösterildi.

**Grafik 1: MDA sonuçlarının ortalama değerleri**

Her iki grubun MDA sonuçlarına göre istatistiksel olarak karşılaştırılmasında gruplar arasında anlamlı fark bulundu ( $p=0,003$ ).

#### 4.1.2. İMA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

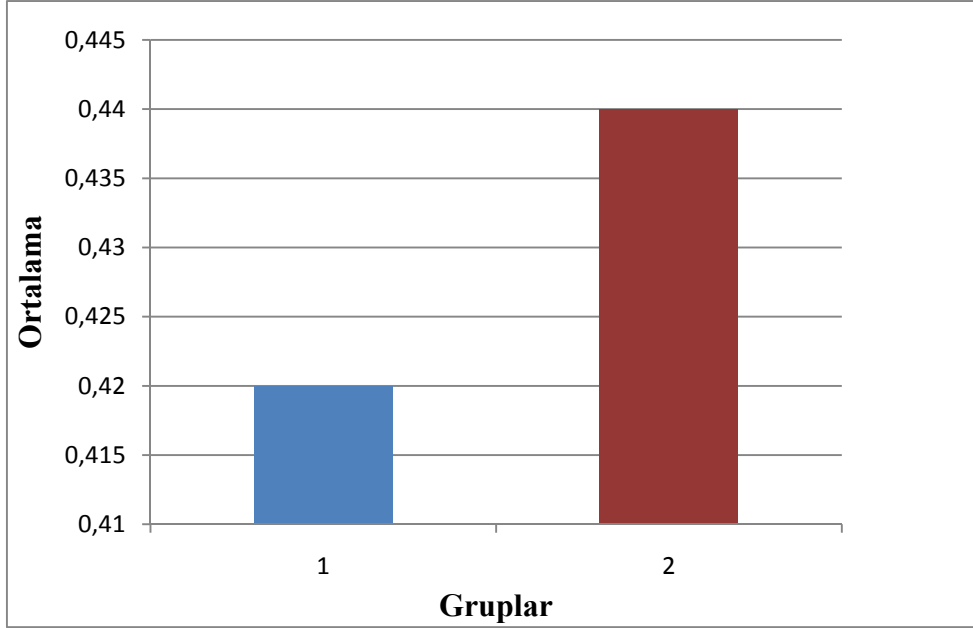
Çalışma ve kontrol grubunda oksidatif stresi değerlendirmek için İMA sonuçlarının istatistiksel olarak ortalama değerleri ve standart sapmaları hesaplandı ve istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 3' te sunuldu.

**Tablo 3: İMA sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi**

Grup	Ortalama	Standart sapma
1 (Çalışma)	0,42	$\pm 0,082$
2 (Kontrol)	0,44	$\pm 0,055$

Her iki grubun İMA sonuçlarının ortalama değerleri karşılaştırılmak için Grafik 2’de gösterildi.

**Grafik 2: İMA sonuçlarının ortalama değerleri**



Her iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılması ile gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,179$ ).

## 4.2. SİTOKİN CEVABININ DEğERLENDİRİLMESİ

İnmemiş testisli çocuklarda, sitokin cevabının değerlendirilmesi için çalışma ve kontrol gruplarının IL-6 sonuçları değerlendirildi.

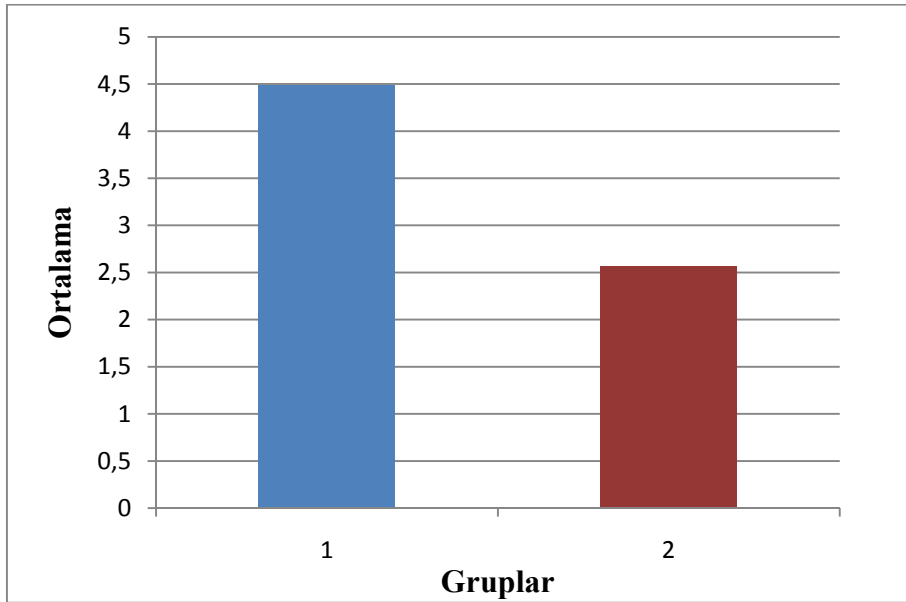
### 4.2.1. IL-6 Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Her iki gruba ait toplam 132 çocukta IL-6 sonuçlarının istatistiksel olarak ortalama değerleri ve standart sapmaları hesaplandı. IL-6 için istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 4’de sunuldu.

**Tablo 4: IL-6 sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi**

Grup	Ortalama	Standart sapma
1 (Çalışma)	4,49	± 6,80
2 (Kontrol)	2,57	± 2,80

Her iki grubun IL-6 sonuçlarının ortalama değerleri karşılaştırılmak için Grafik 3’te gösterildi.

**Grafik 3: IL-6 sonuçlarının ortalama değerleri**

Her iki grubun IL-6 sonuçlarının değerlendirilmesinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0,019$ ).

#### 4.3. OTOİMMÜNİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İnmemiş testisli çocuklarda, otoimmün durumun değerlendirilmesi için yaptığımız çalışmada 88 inmemiş testisli, 44 kontrol olmak üzere toplam 132 çocukta ASA sonuçlarının değerlendirilmesinde ki-kare testinin kullanılması planlandı.

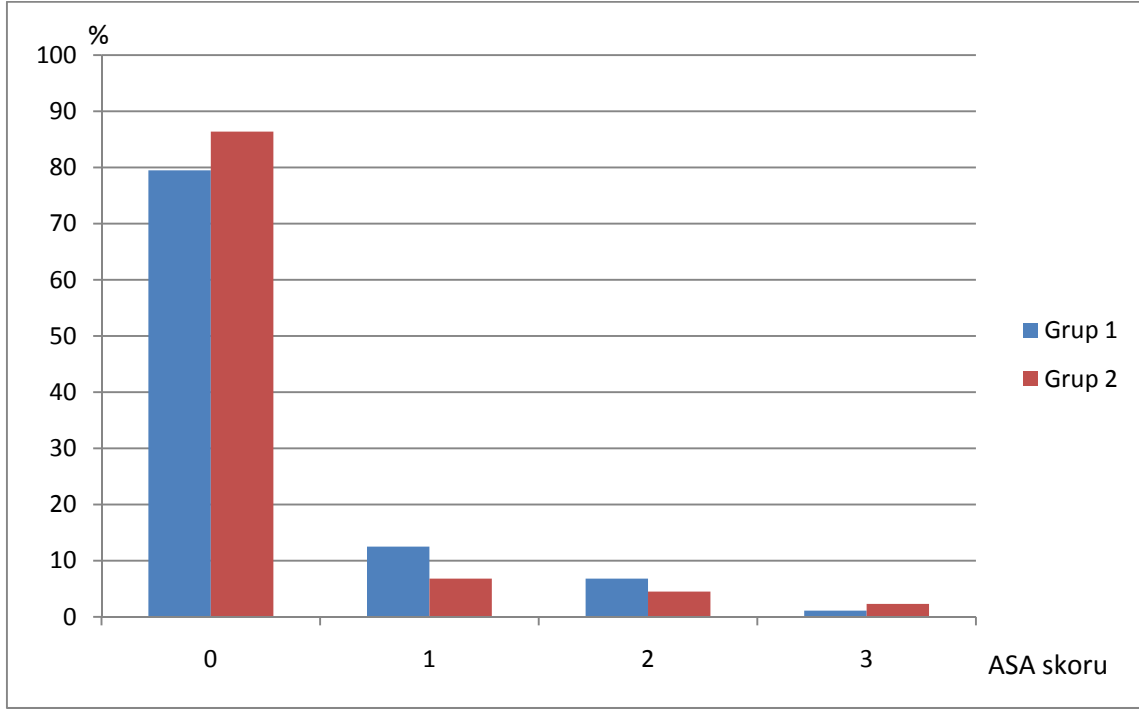
#### 4.2.1. ASA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Her iki gruptaki toplam 132 çocukta ASA' nın değerlendirilmesi için ASA pozitifliklerinin gruplar içinde istatistiksel olarak yüzde (%) dağılımları hesaplandı. ASA sonuçları için ASA skoru oluşturuldu. Çalışma grubunda 70 tane negatif, 11'inde 1 (+), 6' sında 2 (+) ve 1' inde tane (+++) sonuç tespit edilirken, kontrol grubunda ise 33 tane negatif, 3' ünde 1 (+), 2' sinde 2 (++) ve 1' inde 3 (+++) sonuç tespit edildi (Resim 1 ve 2). ASA' nın istatistiksel değerlendirilme sonuçları ise Tablo 5' de sunuldu.

**Tablo 5: ASA sonuçlarının skorlanması ve yüzde (%) dağılımı**

ASA sonuçları	ASA skoru	Grup 1 (Çalışma)		Grup 2 (Kontrol)	
		Sayı (n)	%	Sayı (n)	%
negatif	0	70	79,5	38	86,4
+ pozitif	1	11	12,5	3	6,8
++ pozitif	2	6	6,8	2	4,5
+++ pozitif	3	1	1,1	1	2,3

ASA sonuçlarının veri dağılımı ki-kare testi için uygun olmadığından karşılaştırma yapılamadı. Grupların ASA skorunun görsel olarak karşılaştırılması için grafik oluşturuldu (Grafik 4).

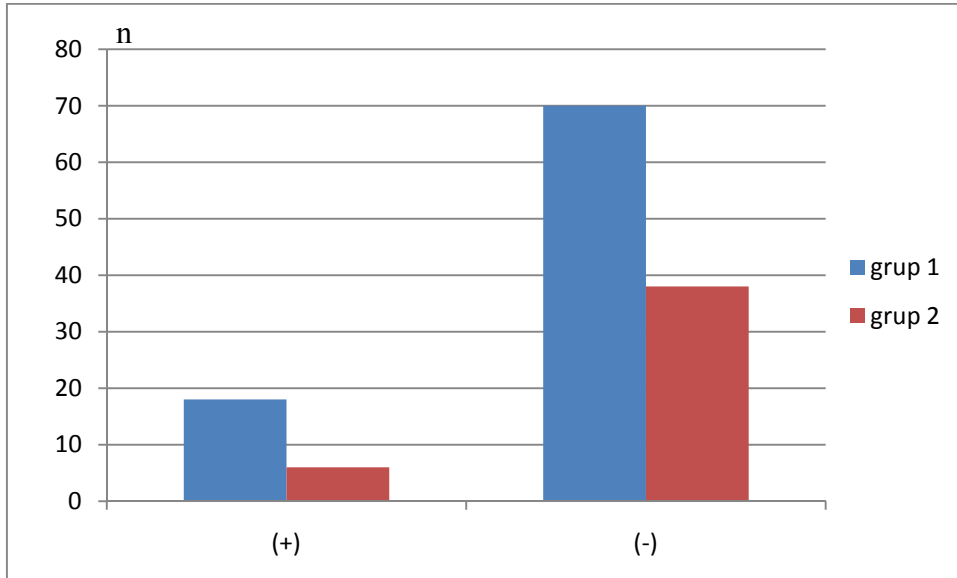
**Grafik 4: ASA sonuçlarının yüzde (%) dağılımı**

ASA sonuçlarının pozitiflikleri kendi aralarında toplanarak yapılan istatistiksel değerlendirme Tablo 6' da gösterildi. Her iki grubun değerleri görsel olarak karşılaştırılmak için Grafik 5' de sunuldu.

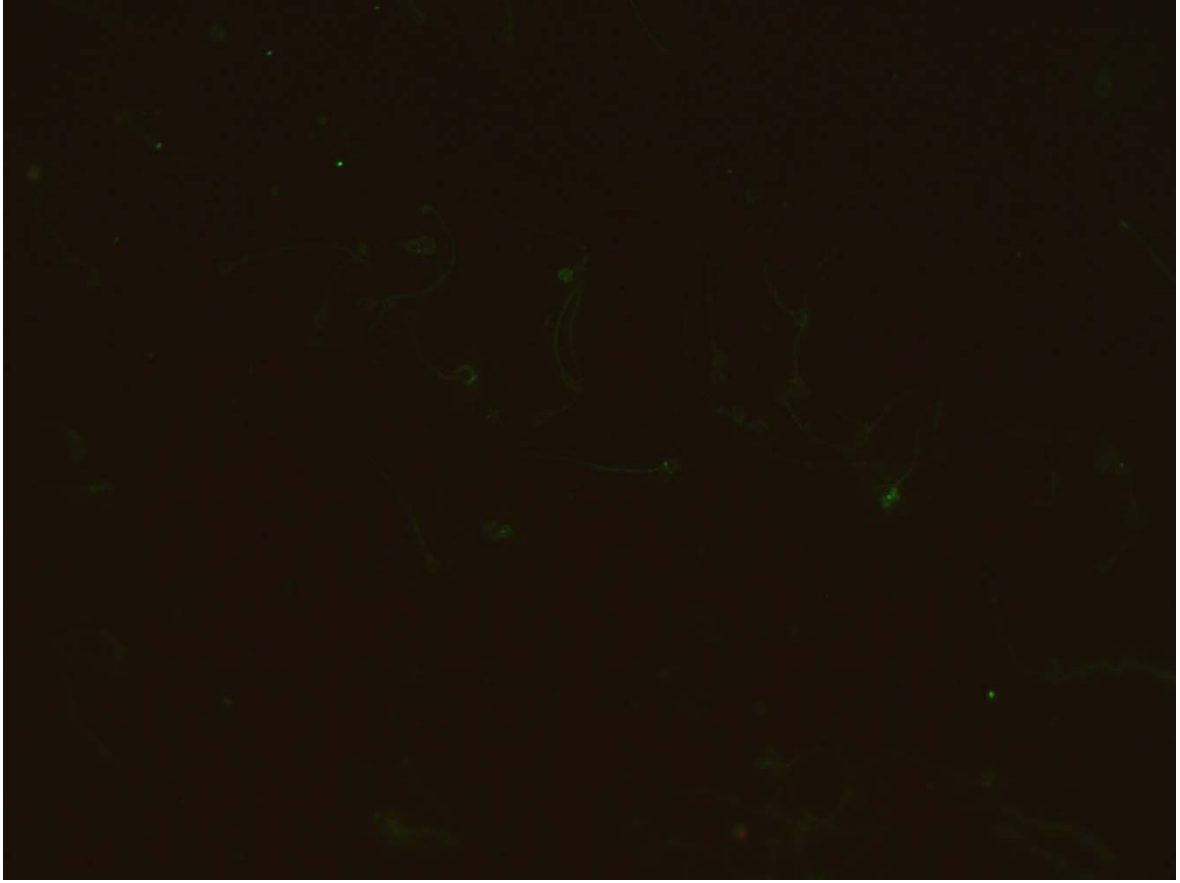
**Tablo 6: ASA sonuçlarının yüzde (%) dağılımı**

Gruplar	(+) Sonuçlar		(-) Sonuçlar	
	(n)	(%)	(n)	(%)
1 (Çalışma)	18	20,5	70	79,5
2 (Kontrol)	6	13,6	38	86,4

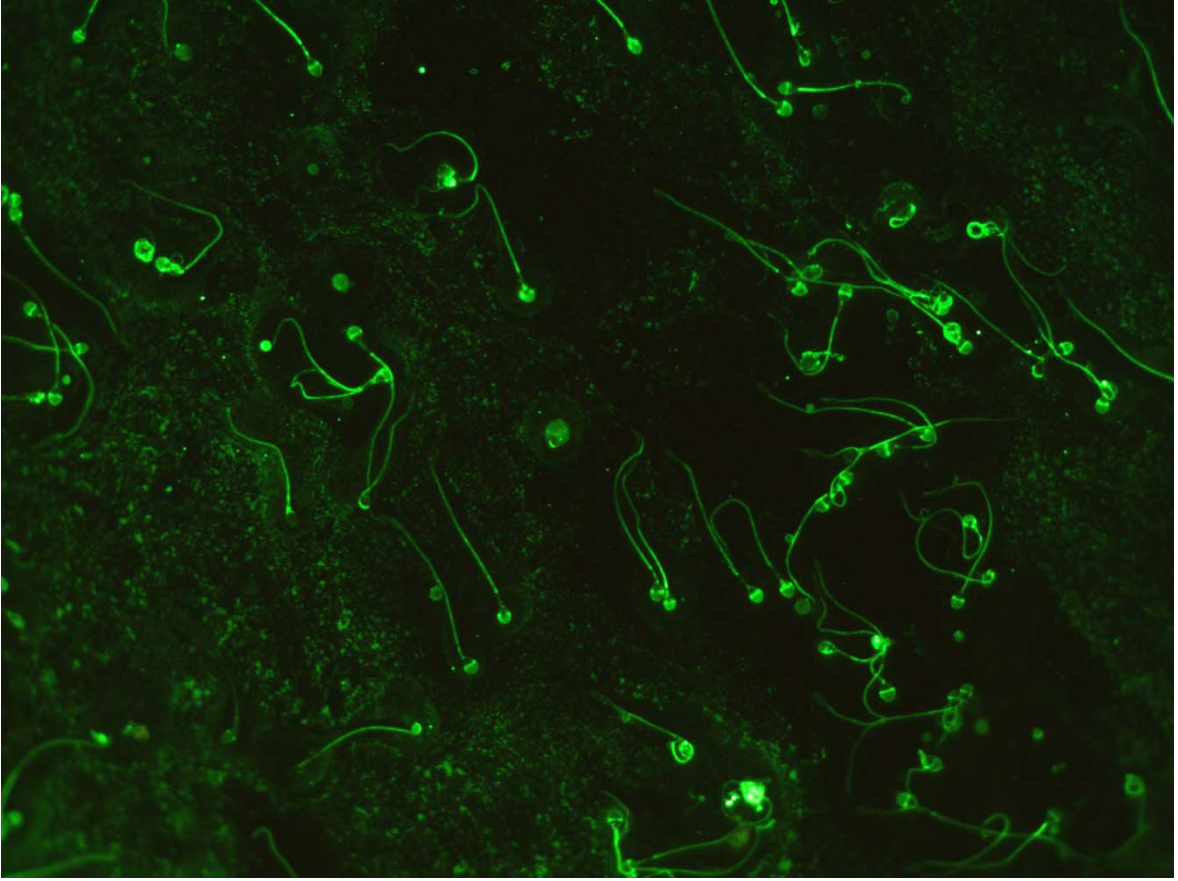


**Grafik 5: ASA sonuçlarının değerlendirme grafiği**

Her iki grubun istatistiksel olarak değerlendirilmesinde anlamlı fark bulunmadı (p=0,473).



**Resim 1** : ASA sonucu negatif olan hastaya ait floresan mikroskopisi görüntüsü (X 40)



**Resim 2:** ASA sonucu (+++) pozitif olan bir hastaya ait floresan mikroskopisi görüntüsü (X40). Spermilerin kuyruk kısmı ile birlikte baş ya da gövde kısımlarına karşı antikor varlığı mevcut.

## 5. TARTIŞMA

Testisin, normal bir spermatogenez ile matüre ve yaşayabilen spermatazoa üretebilmesi için lokal çevre ısı, vücut ısısının 1,5-2 °C altında olan skrotumda bulunması gereklidir (2). Bu nedenle inmemiş testisli hastalarda fertilitite potansiyelini koruyabilmek için inmemiş testisin standart tedavisi olan orşiopeksi geliştirilmiştir. Ancak günümüzde inmemiş testisli vakalarda testisin başarılı bir şekilde skrotuma indirilmesine rağmen bu sürecin durmadığı da tartışılmaktadır. İnmemiş testis hikayesi olan erkeklerde semen analizi göz önüne alınmadan çocuk sahibi olan hastalar değerlendirildiğinde, fertilitite oranı tek taraflı olgularda %65-85, iki taraflı olgularda ise %36-50 olduğu rapor edilmektedir (10). Tek taraflı inmemiş testislerde görülen histolojik dejeneratif değişikliklerin normal yerleşimli karşı testiste de hasar oluşumuna neden olarak germ hücre sayısının azalmasına ve fonksiyonunun bozulmasına yol açtığı da bilinmektedir (19,20). Sonuç olarak inmemiş testisli çocuklarda, subfertilitite/infertilitite halen çözüm bekleyen önemli tıbbi bir sorundur ve bu durum araştırmacıların yoğun çalışma alanı olmaya devam etmektedir.

İnmemiş testislerde düşük sperm sayısı, sperm kalitesi ve bozulmuş spermatogenez sonucu subfertilitite/infertilitite gelişiminin nedeni olarak, hem aynı taraftaki testis hem de karşı testisin hasarlanması ile ilgili başlıca 3 mekanizma suçlanmaktadır; oksidatif stres, sitokin cevabı ve otoimmünite (2,3). Bu mekanizmaların etkinliği ile ilgili yapılan ciddi çalışmalara rağmen bu mekanizmalardan hangisinin daha etkin olduğu henüz net olarak açıklanamamıştır.

Testis, fiziksel strese oldukça duyarlı bir dokudur. Antioksidan açıdan korunmasına rağmen inmemiş testis ve varikosel başta olmak üzere bazı faktörlerin bu mekanizmayı bozduğu ve oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda, bu oksidatif stresinde testiküler hasarlanmada önemli bir mediatör olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stres sonucu aşırı ROS üretimi, özellikle anormal sperm konsantrasyonuna, motilitesine ve morfolojisine neden olarak erkek subfertilitite/infertilitesinin etiyolojisinde rol oynayabilmektedir (28).

Aşırı ROS üretimi, membran lipidlerine saldırarak lipid peroksidasyonunun artışına neden olur. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler arasında en önemlisi ve en iyi bilineni MDA' dır. MDA, sperm fonksiyonlarını bozacak kadar spermatazoaya karşı sitotoksiktir. MDA oluşumunun artışı, sperm-oosit füzyonu ile ters, sperm morfolojisi ile direkt ilişkilendirilmiştir (28). Ville Peltola ve arkadaşları ratlarda yaptıkları çalışmada inmemiş testislerde, ROS' lerin yüksek ısının etkisiyle arttığını, bunun sonucunda lipid peroksidasyonunun arttığını tespit etmişler ve aşırı ROS üretiminin testiküler hasarlanmada rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (31). Zini ve arkadaşları ise ratlarda tek taraflı inmemiş testis oluşturup yaptıkları çalışmada, hem inmemiş tarafta hem de karşı taraftaki testisteki etkilenme sonucunda oksidatif stresin inmemiş testiste anormal spermatogenezis ve tümöriogenezise neden olabileceğini iddia etmişlerdir (32). Kumar ve arkadaşları ise, infertil erkeklerde yaptıkları semen analizleri sonucunda, kontrol grubuna göre ROS ve MDA düzeylerini yüksek tespit etmişler ve ROS artışının membran akışkanlığını bozarak MDA düzeyini yükselttiğini ve bu durumda sperm motilitesini bozduğunu öne sürmüşlerdir. Sonuç olarak, tüm bu çalışmalar oksidatif stresin, erkek subfertilite/infertilitesinin etiyojisinde önemli rol oynadığını açıkça göstermektedir (29).

Literatürde inmemiş testislerdeki subfertilite/infertilitenin etiyojisine suçlanan üç mekanizmadan özellikle oksidatif stresin ön plana çıktığı görülmektedir. Bu sonuç çalışmamızdaki bulgularla desteklenmektedir. Çalışmamızda inmemiş testisli çocuklarda kontrol grubuna göre MDA sonuçlarının yüksek olduğunu, istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde artışın ( $p=0,003$ ) anlamlı olduğunu tespit ettik. Düşüncemize göre MDA' nın yüksek bulunması, inmemiş testisli çocuklardaki subfertilite/infertilite sorununun etiyojisinde oksidatif stresin önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Literatürde etiyojide suçlanan bu üç mekanizmanın etkinliklerinin hepsinin tek bir klinik çalışmada araştırıldığı bir klinik araştırma bulunmamaktadır. Bu noktada bizim çalışmamızı farklı kılan aynı klinik çalışma grubunda her üç mekanizmanın da çalışılması ve karşılaştırılmasının yapılmasıdır.

İMA ise oksidatif stres ve iskeminin yeni ve sensitif markırı olarak gösterilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda testis torsiyonu, pulmoner emboli, mezenter iskemi gibi durumlarda akut iskemi döneminde tanı koydurucu bir markır olabileceği öne sürülmektedir (36). Kutlu ve arkadaşları ratlarda oluşturdukları testis

torsiyonunda 4 saat sonraki grupta İMA düzeylerini yüksek tespit etmişler ve bu grupta belirgin histopatolojik hasar olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca bu grupta karşı normal lokalizasyondaki testiste de histopatolojik hasar olduğunu görmüşler, histopatolojik hasar ile İMA seviyeleri arasındaki pozitif korelasyondan dolayı İMA' nın testisin akut iskemi sorunlarında durumu açısından önemli bir prognostik faktör olabileceğini iddia etmişlerdir (36). Biz çalışmamızın sonucunda inmemiş testisli grupta kontrol grubuna göre İMA düzeylerinin artmadığını ve istatistiksel olarak değerlendirildiğinde de anlamlı bir fark ( $p=0,179$ ) olmadığını tespit ettik. Bu sonuçlar çalışma grubunda akut iskemik bir durumun olmadığını desteklemektedir.

Son yıllarda erkek subfertilite/infertilitesinin etiyolojik faktörleri arasında sitokin cevabı çalışmalarının popülerite kazanması araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Çünkü normal olarak seminal sıvıda bulunabilen IL-6 ve TNF gibi bazı sitokinlerin spermatazoayı etkileyerek ROS artışına neden olarak lipid peroksidasyonunun artmasına neden olabileceği gösterilmiştir. Sitokinler, bu yol ile spermlerin fonksiyonunu ve fertilitiyi etkileyebilirler (41). Daha çok kronik inflamatuvar ve otoimmün olaylara neden olan proinflamatuvar sitokinler arasında en etkili olanlardan birisi IL-6' dır. Literatürde seminal sıvıdaki IL-6 ile ROS arasında bağlantı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (44). Nallella ve arkadaşları, varikoselli infertil erkeklerde kontrol grubuna göre IL-6 düzeylerinin önemli oranda yüksek olduğunu, antioksidan kapasitenin de azaldığını tespit etmişler ve proinflamatuvar IL-6 ve oksidatif stresin bu hastalarda subfertilite/infertilitenin etiyolojisinde rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir (42). Seminal plazmada IL-6 artışı, sperm konsantrasyonunun, normal sperm formu yüzdesinin ve motilitesinin azalmasına neden olur (47). Seshadri ve arkadaşları, infertil erkeklerde semen analizi yaparak IL-6 seviyelerini değerlendirmişler ve oligospermik, astenospermik, oligoastenospermik, azospermik obstrüktif ve germ hücre defektli grupta yüksek tespit etmişlerdir (47).

Yapılan çalışmalar ışığında bizde çalışmamızda inmemiş testisli çocuklarda sitokin cevabının testiküler hasarlanmadaki etkinliğini araştırmak için IL-6 düzeylerini değerlendirdik. Çalışmamızın sonucunda kontrol grubuna göre inmemiş testisli grupta IL-6 sonuçlarının önemli derecede yüksek olduğunu ve bu yüksekliğin istatistiksel olarak da anlamlı olduğunu ( $p=0,019$ ) tespit ettik. Hem MDA hem de IL-6 düzeylerinin yüksek bulunması ise inmemiş testislerde subfertilite/infertilitenin etiyolojisinde oksidatif stres ve

proinflamatuar sitokinlerin birlikte rol oynayabileceğini veya birbirlerinin etkilerini tetiklediklerini düşündürmektedir. Bu bulgu Nallella ve arkadaşlarının varikoselli hastalarda oksidatif stres ve proinflamatuar IL-6' nın subfertilite/infertilite de birlikte rol oynayabileceği tespitiyle de örtüşmektedir.

İnmemiş testislerde, gonadların anormal lokalizasyonu ve beraberinde yüksek ısı, kan-testis bariyerinin değişimini indükleyerek lokal immunregülasyonu bozar ve germ hücrelerindeki antijenlere karşı ASA oluşumuna neden olur. Bu antijenlerin ASA' ları bağlaması ya inmemiş testisin kendisine bağlı nedenlerden ya da orşiopeksinin yarattığı travma etkisiyle olur (49). Böylece oluşan immun reaksiyonda sperm fonksiyonunu kötü yönde etkiler (50). ASA' lar, spermatogenezise etki edebilir, oligospermatogenezis veya aspermatogenezise neden olabilirler. Ayrıca bu reaksiyonun spermin servikal mukusta penetrasyon yapmasını engellediği düşünülmektedir (48).

Literatürde, ASA' nın prepubertal çocuklarda bulunması tartışmalı olmakla beraber varlığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Domagala ve arkadaşları yaptıkları araştırmada, 76 inmemiş testisi olan prepubertal erkekte %3,95 oranında ASA (+)' liği saptamışlardır. Domagala ve arkadaşları bundan önceki gözlemlerinde ise 69 tek ya da iki taraflı inmemiş testisli prepubertal erkekte ASA varlığını %7 olarak tespit etmişler ve ayrıca sağlıklı bireylerde de ASA varlığı görmüşlerdir (51). Mininberg ve arkadaşları ise bu oranı orşiopeksi veya başka bir inguinal ameliyat geçirmiş prepubertal erkek çocuklarda %28 olarak rapor etmişlerdir (52). Literatürde ayrıca ASA pozitif ve inmemiş testis hikayesi bulunan infertil erkeklerde, azalmış sperm motilitesi ve artmış sperm aglütinasyonundan bahsedilmektedir (53).

Çalışmamızda ASA varlığını inmemiş testisli grupta %20,5 sağlıklı bireylerde ise %13,6 olarak tespit ettik. ASA sonuçlarının inmemiş testisli grupta yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak bu yükseklik anlamsızdı. Sonuçlarımıza göre ASA varlığı inmemiş testise bağlı subfertilite/infertilitenin etiolojisindeki etkin mekanizmalarda otoimmunitenin ön planda olabileceğini açıklama da yetersiz kalmaktadır. Literatürdeki inmemiş testisli pubertal ve prepubertal erkek çocuklarındaki subfertilite/infertilitenin etiolojisinde otoimmunitenin rolünü açıklamak için yapılan araştırmalara bakıldığında ASA' nın iyi bir markır olmayacağını ve bu çalışmaların otoimmunitenin etkisini açıklayabilecek başka markırlarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Özet olarak bu klinik çalışmada, kronik iskemi ve/veya kronik inflamatuvar yanıt markırlarının çalışma grubunda anlamlı olarak yüksek bulunması, inmemiş testisli erkek çocuklarda, oksidatif stres ve sitokin cevabının uzun dönemde gelişen komplikasyonların en önemlisi olan subfertilite/infertilitenin etiyolojisinde önemli bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Bu mekanizmaların etkisini önleyebilecek yaklaşımların geliştirilmesi, subfertilite/infertilitenin önlenabilirliği açısından önemli bir adım olabilir. Otoimmün yanıt markırı, çalışma grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunmasına rağmen, bu farklılık istatistiksel olarak anlamsız olduğu için, otoimmunitenin etiyolojideki rolü tartışmalı görünmektedir. Bu temel çalışma daha geniş çalışma ve kontrol gruplarından oluşan yeni çalışmalarla desteklenirse inmemiş testislerdeki subfertilite/infertilitenin etiyolojisinin açıklanabilmesi açısından önemli bir adım olabilir.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada inmemiş testisli çocuklarda, hem tek taraflı hem de iki taraflı testisin hasarlanma mekanizmaları olan oksidatif stres, sitokin cevabı ve otoimmunitenin hangisinin etkin olduğu araştırıldı. 88 tane inmemiş testisli ve 44 tane sağlıklı çocuktan oluşan gruplarda, oksidatif stresi değerlendirmek için MDA ve İMA düzeyleri, sitokin cevabını değerlendirmek için IL-6 düzeyi ve otoimmunitiyi değerlendirmek için ASA düzeyi incelenerek karşılaştırıldı.

Oksidatif stresin etkisi açısından, inmemiş testisli grupta sağlıklı gruba göre MDA sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı arttığı gözlemlendi. İMA sonuçları ise inmemiş testisli grupta sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi. Bu sonuçlar akut bir iskemik durumdan ziyade kronik iskeminin sonucu olarak oksidatif stresin subfertilite/infertilitede etkili olabileceğini gösterdi.

Sitokin cevabının etkisi değerlendirildiğinde, inmemiş testisli grupta kontrol grubuna göre IL-6 sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı arttığı gözlemlendi. Bu sonuç kronik inflamatuvar durumda artan sitokin cevabının inmemiş testisli çocuklarda yüksek olduğunu gösterdi.

Otoimmünite açısından ise ASA sonuçları değerlendirildiğinde, inmemiş testisli grupta kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmedi. Sağlıklı çocuklarda da ASA pozitifliğine rastlandı. Bu sonuç otoimmunitenin inmemiş testisli çocuklarda anlamlı bir artış göstermediğini işaret etmektedir.

Elde ettiğimiz bulgulara göre inmemiş testisli çocuklarda oksidatif stres ve sitokin cevabının etkili olduğunu gözlemledik. Otoimmünite için anlamlı bir sonuç tespit edilmedi.

Çalışmamızın sonuçlarına göre inmemiş testisli çocuklarda oksidatif stres ve sitokin cevabının, gelecekteki fertilite durumu üzerinde etkili olarak subfertilite/infertiliteye neden olabileceği için bu mekanizmaların kötü etkilerinden korunmak için önleyici etkin tedavilerin geliştirilmesi önerilir. Bu klinik çalışmamız, sonuçların güvenilirliği ve güçlü bir destek

olması açısından daha geniş yeni çalışmalarla desteklenmeli ve en önemlisi inmemiş testis grubu daha uzun dönemde takip edilmeli ve sonuçları tespit edilmelidir.

## 7. ÖZET

Çocukluk çağında sık görülen inmemiş testislerde, tedavi edilmediği takdirde özellikle subfertilite/infertilite, malignite gelişimi gibi önemli komplikasyonlara neden olabileceği çok iyi bilinmektedir. Hatta inmemiş testisin standart tedavisi olan orşiopeksi yöntemi ile testisin skrotuma indirilmesi durumunda bile bu komplikasyonların gelişiminin engellenemediği tartışılmaktadır. Ayrıca inmemiş testislerde, bir taraftaki testisteki hasarlanma aynı zamanda karşı taraftaki testisi de halen açılmadığımız nedenler ile hasarlanma ve yapısal değişikliklere uğratarak, hem tek taraflı hem de iki taraflı inmemiş testislerde subfertilite/infertilite riski artmaktadır. İnmemiş testislerde, hem tek taraflı hem de iki taraflı testisin hasarlanmasında suçlanan mekanizmalar olan oksidatif stres, sitokin cevabı ve otoimmuniteden hangisinin etkili olduğunu aydınlatmak amacıyla bu çalışmayı planladık.

Çalışmada 88 tane inmemiş testisli hastalardan oluşan çalışma grubu ve 44 tane sağlıklı çocuklarda oluşan kontrol grubu oluşturuldu. Oksidatif stresi değerlendirmek için MDA ve İMA düzeyleri her iki grupta incelendi. MDA düzeyleri, grupların plazma örneklerinde TBARS methodu kullanılarak tayin edildi. İMA düzeylerini belirlemek için her iki grubun serum örneklerinde albumin kobalt bağlama testinden faydalanıldı, albumine kobaltın azalan bağlanma kapasitesi kolometrik tayin methodu ile değerlendirildi. Sitokin cevabını değerlendirmek için IL-6 düzeyleri, her iki grupta serum örneklerinde AssayMax Human IL-6 ELISA kiti kullanılarak ölçüm yapıldı. Otoimmunitenin etkisini değerlendirmek için her iki gruba ait serum örneklerinde indirekt immun flöresan yöntemi kullanılarak Euroimmun Spermatozoa (human) (Euroimmun, Lubeck, Almanya) kitleri ile değerlendirme yapıldı.

Çalışmadan elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi. Oksidatif stresin etkisi açısından çalışma grubunda kontrol grubuna göre MDA sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı arttığı ( $p=0,003$ ) gözlemlendi. İMA sonuçları ise çalışma grubunda kontrol

grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark ( $p=0,179$ ) gözlenmedi. Sitokin cevabının değerlendirilmesinde, çalışma grubunda kontrol grubuna göre IL-6 sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı arttığı ( $p=0,019$ ) gözlendi. Otoimmünite değerlendirildiğinde ise ASA sonuçlarının veri dağılımı istatistiksel olarak ki-kare testi için uygun olmadığından karşılaştırılma yapılamadı. ASA pozitiflikleri kendi aralarında toplanarak değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark ( $p=0,473$ ) gözlenmedi.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, inmemiş testisli çocuklarda oksidatif stres ve sitokin cevabının uzun dönemde gelişen subfertilite/infertilitenin etiyojisinde önemli bir rol oynayabileceğini fakat otoimmünitenin artırıcı bir etkisi olmadığını gözlemledik.

## 8. SUMMARY

It is well-known fact that undescended testicles, common case in childhood, may cause significant complications like sub-fertility/infertility, malignancy development when they are not treated. Even, it is still controversial that the mentioned complications are not fully avoided when testicles are pulled down into scrotum with Orchiopexy method, which is the standard treatment for undescended testicles. Moreover, sub-fertility/infertility risk is higher for both one-sided and two-sided undescended testicles since the deterioration on one testicle causes deterioration and structural changes on the other testicle for reasons that could not be clearly explained yet. We designed this study to figure out which of the three accused mechanisms; oxidative stress, cytokine response and autoimmune causes one-sided and two-sided deterioration of the testicles in the undescended testicle cases.

For the study, an experimental group with 88 children with undescended testicles and a control group with 44 healthy children were formed. MDA and IMA levels were monitored in both groups to assess oxidative stress. MDA levels were determined with TBARS Assay on serum samples of the both groups. Albumin Cobalt Binding Test was used to determine the IMA levels on serum samples of the both groups. The reducing binding capacity of albumin cobalt was evaluated with coulometric determination method. In order to assess cytokine response in both groups, IL-6 levels in serum were measured with AssayMax Human IL-6 ELISA kit. Autoimmunity effect in both groups were evaluated with Indirect Immuno-fluorescent method, by using Euroimmun Spermatozoa (human) (Euroimmun, Lubeck, Germany) kits.

The statistical interpretation of the available data showed that the increase in MDA results of the experimental group is greater than the control group at statistically significant level ( $p=0,003$ ). However, when IMA scores of the experimental and control groups were compared, no significant difference was observed ( $p=0,179$ ). In the evaluation of cytokine response, it was observed that IL-6 results of the experimental group increased

significantly higher than the control ( $p=0,019$ ). When autoimmune is considered, although ASA results of the experimental group were higher, the groups could not be compared because the variance of the data was not suitable for chi-square test. Furthermore, there was no statistically significant difference when ASA positives were cumulatively evaluated ( $p=0,473$ ).

The results of the present study tell that oxidative stress and cytokine response may have substantial effects on etiology of sub-fertility/infertility developing in the long term on children with undescended testicles. On the other hand, no additive effect of autoimmune was observed.

## 9. KAYNAKLAR

1. Kolon Thomas F, Patel RP, Huff SD : Cryptorchidism: diagnosis, treatment, and long-term prognosis. *Urologic Clinics of North America*, 31: 469-480, 2004.
2. Leissner j, Filipas D, Wolf HK, Fisch M: The undescended testis: considerations and impact on fertility. *BJU International*, 83: 885-892, 1999.
3. World Health Organization: Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int J Androl*, 7 : 1, 1987.
4. Çiftçi AO, Müftüoğlu S, Çakar N, Tanyel FC: Histological evidence of decreased contralateral testicular blood flow during ipsilateral testicular torsion. *British Journal of Urology*, 80: 783-786, 1997.
5. Murphy Feilim, Paran TS, Puri Prem: Orchidopexy and its impact on fertility. *Pediatr Surg Int*, 23: 625-632, 2007.
6. Steinbrecher HA, Malone PS: Testicular problems in children. *Pedia and Child Health*, 18 (6), 264-267, 2008.
7. Atwel JD: Ascent of the testis: fact or fiction. *Br J Urol*, 57: 474, 1985.
8. Turek PJ, Ewalt DH, Snyder HM 3rd et al: The absent cryptorchid testis: Surgical findings and their implications for diagnosis and etiolog. *J Urol*, 151: 718, 1994.
9. Lee PA, O'Leary LA, Songer NJ, et al: Paternity after unilateral cryptorchidism. A controlled study. *Pediatrics*, 98: 676, 1996.
10. Kogan SJ: Fertility in crytorchidism. *Eur J Pediatr*, 146 (1): 21, 1987.
11. Gaudio E, Paggiarino D, Carpino F: Structural and ultrastructural modifications of cryptorchid human testes. *J Urol*, 131:292-296, 1984.
12. Hadziselimovic F, Herzog B, Seguchi H: Surgical correction of cryptorchidism at 2 years: Electron microscopic and morphologic investigations. *J pediatr Surg*, 10: 19-26, 1975.
13. Hadziselimovic F: Cryptorchidism-histology, fertility and treatment. *Prog Reprod Biol Med*, 10: 1,1984.

14. Hadziselimovic F: Fertility and cryptorchidism. *Am J Dis Child*, 139: 963, 1985.
15. Huff DS, Hadziselimovic F:, Snyder H, et al: Postnatal testicular maldevelopment in unilateral cryptorchidism. *J Urol*, 142: 546, 1989.
16. Puri P, O' Donnell B: Semen anallysis of patients who had orchidopexy at or after seven years of age. *Lancet*, 2: 1051-1052, 1988.
17. Garcia J, Zalabardo S, Garcia JS et al: Clinical, physical, sperm and hormonal data in 251 adults operated on for cryptorchidism in childhood. *BJU Int*, 85: 1100-1103, 2000.
18. Negri L, Ablani E, DiRocco M et al: Testicular sperm extraction in azoospermic men submitted to bilateral orchidopexy. *Hum Reprod*, 18: 2534-2539, 2003.
19. Okayama A, Nonomura N, Nakamura M et al: Surgical management of undescended testis: retrospective study of potential fertility in 274 cases. *J Urol*, 142: 749-751, 1989.
20. Hadziselimovic F, Herzog P, Buser M: Development of cryptorchid testes. *Eur J Pediatr*, 146 (2): 8, 1987.
21. McAleer IM, Packer MG, Kaplan GW, Schwez HC, Krous HF, Billman GF: Fertility index analysis in cryptorchidism. *J Urol*, 153: 1255-1258, 1995.
22. Janos Z, Krishnamurti D: *Oxidative Stres and Disease 10: Nutrients and cell signaling*. Taylor Et Francis, Önsöz, 2005.
23. Gale L, Paul JB, Teur GN et al: Oxidative stres, induced in pathologres: the role of anti-oxidants. *Biol Pharm*, 53 (4): 169-180, 1999.
24. Knight JA: *Free radicals, antioxidants aging and disease*. AACCC Press, Washington DC, 1999, pp.1-61.
25. Çavdar C, Sifil A, Çamsar T: Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/ Office Journal of the Turkish Nephrology*, 3-4: 92-95, 1997.
26. Sevanian A, Ursini F: Lipid peroxidation in membrane and low density lipoproteins: similarities and differences. *Free Radical Biology and Medicine*, 29: 306-311, 2000.
27. Aviran M: Malondialdehit affects the physico-chemical and biological charesteristics of oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 34: 141-143, 1990.
28. Sharma RK, Agarwal A: Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48 (6): 835-850, 1996.



29. Kumar R, Venkatesh S, Kumar M et al: Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation in idiopathic oligoasthenozoospermic men. *Indian J Biochem & Biophys*, 46: 172-177, 2009.
30. Makker K, Agarwal A, Sharma R: Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res*, 129: 357-367, 2009.
31. Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa T: Abdominal Position of the Rat Testis is Associated with High Level of Lipid peroxidation. *Biol Reprod*, 53: 1146-1150, 1995.
32. Zini, Armand; Schlegel, Peter N: Cu/Zn Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione peroxidase mRNA Expression in the Rat Testis After Surgical Cryptorchidism and Efferent Duct. *J Urol*, 158 (2): 659-663, 1997.
33. Carter DC, Ho JX: Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem*, 45: 153-203, 1994.
34. Levine RL: Ischemia: From acidosis to oxidation. *FASEB J*, 7: 1242-1246, 1993.
35. Marx G, Chevion M: Site-specific modification of albumin by free radicals. *Biochem J*, 236: 397-400, 1985.
36. Kutlu O, Mentese A, Turkmen S et al: Investigation of the possibility of using ischemia-modified albumin in testicular torsion: an experimental study. *Fertil Steril*, 2010.
37. Kruse WE, Boit R, Rohr G et al: Relationship of seminal plasma interleukin (IL) -8 and IL-6 with semen quality. *Human Reprod*, 16 (3): 517-528, 2001.
38. Martinez P, Proverbio F, Camejo MI: Sperm lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines. *Asian J Androl*, 9 (1): 102-107, 2007.
39. Yan Helen HN, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY: Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB*, 22: 1945-1959, 2008.
40. Huleihel M, Lunenfeld E: Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl*, 6: 259-268, 2004.
41. Matalliotakis I, Kiriakou D, Fragouli I et al: Interleukin-6 in seminal plasma of fertile and infertile men. *Arch Androl*, 41: 43-50, 1998.
42. Nallella KP, Allamneni SSR, Pasqualotto FF et al: Relationship of Interleukin-6 with Semen Characteristics and Oxidative Stress in Patients with Varicocele. *Urology*, 64:1010-1013, 2004.

43. Arend WP, Dayer JM: Cytokines and growth factors. Textbook of Rheumatology, 3rd Ed WB Saunders Company Philadelphia, 1993, pp. 227-247.
44. Camejo MI, Segnini A, Proverbio F: Interleukin-6 (IL-6) in seminal plasma of infertile men, and lipid peroxidation of their sperm. Arch Androl, 47: 97-101, 2001.
45. Skinner MK: Cell-cell interactions in the testis. Endocrin Rev, 12: 45-77, 1991.
46. Hakovirta H, Syed VJ, Jégou B, Parvinen M: Function of interleukin-6 as an inhibitor of meiotic DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium. Mol Cell Endocrinol, 108:193-198,1995.
47. Seshadri S, Bates M, Vince G, Jones DIL: The role of cytokine Expression in different subgroups of subfertile men. Am J Reprod Immunol, 62: 275-282, 2009.
48. Güngör S, Sağlam M, Gümrükçü E et al: İnfertitede nedeni açıklanamayan erkek ve kadınlarda antisperm antikor sıklığı. GATA Bülteni, 1983, s. 1201-1210.
49. Mirilas P, Mamoulakis C, de Almeida M: Puberty does not induce serum antisperm surface antibodies in patients with previously operated cryptorchidism. J Urol, 170:2432-2435, 2003.
50. Bohring C, Krause W: Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)- immunity. Human Reprod, 18: 915-924, 2003.
51. Domagala A, Havryluk A, Nakonechnyj A et al: Antisperm antibodies in prepubertal boys with cryptorchidism. Syst Biol Reprod Med, 52 (6): 411-416, 2006.
52. Mininberg DT, Chen ME, Witkin SS: Antisperm antibodies in cryptorchid boys. Eur J Pediatr, 152: 23-24, 1993.
53. Sinisi AA, Pasquali D, Papparella A et al: Antisperm antibodies in cryptorchidism before and after surgery. J Urol, 160: 1834-1837, 1998.
54. Mirilas P, de Almeida M: Absence of the antisperm surface antibodies in prepubertal boys with cryptorchidism and other anomalies of the inguinoscrotal region before and after surgery. J Urol, 162: 177-181, 1999.
55. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV: A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. J Emerg Med, 19: 311-315, 2000
56. Yagi K: Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In: Armstrong D, editor. Free Radicals in Diagnostic Medicine. New York: Plenum Press; 1994. p. 1-15.