

**RATLARDA TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON
MODELİNE BAĞLI OLUŞAN DOKU HASARINDA
AMLODİPİNİN ETKİSİ**

Çiğdem DOĞAN

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Zekai HALICI**

Yüksek Lisans Tezi-2014

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON
MODELİNE BAĞLI OLUŞAN DOKU HASARINDA
AMLODİPİNİN ETKİSİ**

Çiğdem DOĞAN

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Zekai HALICI**

**ERZURUM
2014**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON MODELİNE
BAĞLI OLUŞAN DOKU HASARINDA AMLODİPİNİN
ETKİSİ

Çiğdem DOĞAN

Tez Savunma Tarihi : 14.11.2014
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zekai HALICI (Atatürk Üniversitesi) 
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Elif ÇADIRCI (Atatürk Üniversitesi) 
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Yasin BAYIR (Atatürk Üniversitesi) 

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2014

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Testisin Embriyolojisi.....	4
2.2. Testisin Anatomisi	5
2.2.1. Testis Vaskülizasyonu	6
2.3. Testisin Histolojisi ve Spermatogenez.....	8
2.3.1. İnterstisyel Doku.....	10
2.3.2. Seminifer Tübüller.....	11
2.4. Testis Torsiyonu	11
2.4.1. İntravaginal Testis Torsiyonu	12
2.4.2. Ekstravaginal Testis Torsiyonu	13
2.4.3. Torsiyonun Fertilite Üzerine Etkileri.....	14
2.5. İskemi ve Reperfüzyon Hasarı.....	14
2.5.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Akut Hücre Zedelenmesinin Nedenleri.....	15
2.5.1.1. Geri Dönüşümlü Zedelenme	15
2.5.1.2. Geri Dönüşümsüz Zedelenme.....	16
2.5.2. İskemi Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisindeki Rol Oynayan Sistemler.....	17
2.5.3. Serbest Radikaller	19

2.5.3.1. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Etkileri	19
2.5.4. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)	20
2.5.5. Proteinlere Etkileri	21
2.5.6. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	22
2.5.7. Karbonhidratlara Etkileri	22
2.5.8. Oksidatif Stres, Nitrik Oksit (NO) ve Nötrofiller	22
2.6. Antioksidanlar	24
2.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	25
2.6.2. Glutatyon (GSH)	25
2.7. Malondialdehit (MDA)	26
2.8. İskemi Reperfüzyon Hasarında Sitokinler	26
2.8.1. Sitokinlerin Genel Özellikleri	26
2.8.1.1. Tümör Nekrotizan Faktör (TNF)	28
2.8.1.2. Testiste TNF- α ve TNF- α Reseptörlerinin Lokalizasyonu	29
2.8.1.3. Seminifer Epitelde TNF- α 'nin Rolü	30
2.8.1.4. Testis İnterstisyel Hücrelerinde TNF- α 'nın Rolü	31
2.9. TGF- β (Transforming Growth Factor- β)	31
2.9.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında TGF- β	32
2.10. Kalsiyum Kanal Blokerler	32
2.10.1. Amlodipin	34
2.10.1.1. Farmakodinamik Özellikleri	36
2.10.1.2. Farmakokinetik Özellikleri	36
3. MATERYAL VE METOT	37
3.1. Materyal	37
3.1.1. Deney Hayvanları	37

Bu çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama.....	37
3.1.2. Kullanılan İlaçlar	37
3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar	38
3.2. Metot.....	38
3.2.1. Deney Planı.....	38
3.2.1.1. Gruplar	40
3.2.2. Histopatolojik Çalışmalar	42
3.2.2.1. Işık Mikroskopik İşlemler.....	42
3.2.2.2. Dokuların Hematoksilen ve Eosin (H&E) Boyanma İşlemi.....	43
3.2.2.3. Kesitlerden Görüntü Elde Edilmesi	43
3.2.3. Biyokimyasal Çalışmalar	44
3.2.3.1. Testis Dokusunda Yapılan Analizler	44
3.2.4. Moleküler çalışmalar	48
3.2.4.1. Gerçek Zamanlı PCR Analizi	48
3.2.4.2. RNA İzolasyonu	48
3.2.4.3. cDNA (complementer DNA) Sentezi	49
3.2.4.4. Gerçek Zamanlı PCR Primerleri ve Çalışma Prensipleri.....	50
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	51
4. BULGULAR.....	53
4.1. Histopatolojik Bulgular.....	53
4.1.1. Işık Mikroskopik Bulgular	53
4.1.1.1. Hematoksilen-Eosin (H-E) Boyama	53
4.2. Biyokimyasal Bulgular	59
4.2.1. SOD, GSH, MDA Analizleri	59
4.3. Moleküler Çalışmalar	63

4.3.1. TNF- α mRNA Ekspresyonu Analizi	63
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
KAYNAKLAR	75
EKLER	96
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	96
EK-2. Etik Kurul Onay Formu	97

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve özellikle tezimin her aşamasında hiçbir fedakarlık ve özveriden kaçınmayan, sonsuz bir emek, hoşgörü ve sabırla bana yol gösteren, fikir ve önerilerinden her zaman yararlandığım ve yüksek enerjisi ile bana her zaman destek olan tez danışmanım ve hocam Sayın Prof.Dr. Zekai HALICI'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmalarım boyunca, bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim ve bilgilerinden yararlandığım çok değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Abdulmecit Albayrak, Doç. Dr. Elif Çadircı, Doç. Dr. Emre Karakuş, Doç.Dr. Yasin Bayır, Yrd. Doç.Dr. Erol Akpınar, Yrd. Doç.Dr. Beyzagül Polat ve tez çalışmalarım esnasında her an ve her zaman yardımlarını esirgemeyerek bana karşı göstermiş oldukları sabırlarından ve emeklerinden dolayı tüm asistan arkadaşlarıma ayrıca hayatım boyunca bana maddi manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama, kardeşlerime ve bana her zaman her konuda yardımcı olan eşime ve oğluma göstermiş oldukları sabır ve destekten dolayı teşekkür ederim.

Çiğdem DOĞAN

ÖZET

Ratlarda Testiküler Torsiyon/Detorsiyon Modeline Bağlı Oluşan Doku Hasarında Amlodipinin Etkisi

Amaç: Testis torsiyonu ürolojik vakalar içerisinde en önemli acillerden biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda testis torsiyonuna bağlı olarak gelişen iskemik hasarda serbest radikallerin ve enflamatuar sitokinlerin rol aldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada amacımız bir kalsiyum kanal blokörü olan amlodipinin farklı dozlarda; ratlarda oluşturulan testis torsiyon/detorsiyon hasarındaki etkisini oksidan/antioksidan, moleküler ve histopatolojik olarak incelemektir.

Materyal ve Metot: Çalışmamız 7 deney grubu ve 1 kontrol grubu olmak üzere toplam 8 grup olarak dizayn edildi. Gruplar: Sham, İskemi, İskemi+Reperfüzyon, İskemi+Amlodipin (5mg/kg), İskemi+Amlodipin (10 mg/kg), İskemi-Reperfüzyon (IR)+Amlodipin (5 mg/kg), IR+Amlodipin (10 mg/kg) ve son olarak Sham+Amlodipin (10 mg/kg) olarak ayrıldı.

Bulgular: Çalışma sonucunda, iskemi ve iskemi/reperfüzyon gruplarında sağlıklı grubuna göre SOD ve GSH gibi antioksidan seviyelerinin düşüşleri belirgin bir şekilde görülmüştür. Ayrıca amlodipin uygulanan tedavi gruplarında SOD ve GSH seviyelerin arttığı, MDA seviyelerinin ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü tespit edilmiştir. İskemi ve reperfüzyon gruplarında TNF- α ve TGF- β seviyelerinde artış görülürken tedavi gruplarında TNF- α ve TGF- β seviyelerinde önemli derecede düşüş gözlenmiştir. Ayrıca yapılan histopatolojik çalışmada amlodipin tedavi gruplarında iskemi ve reperfüzyon gruplarına göre hasar seviyesinin önemli derecede azaldığı görülmüştür.

Sonuç: Tüm bu sonuçlar amlodipinin torsiyon/detorsiyon modeline bağlı oluşan testis doku hasarında anlamlı olarak koruyucu etkisinin olduğu biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler olarak gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Amlodipin, Rat, Testis, Torsiyon/Detorsiyon

ABSTRACT

In Rats Testicular Torsion / Detorsion In Tissue Damage Depends On The Model The Effect Of Amlodipine

Aim: Testicular torsion is one of the most common medical emergencies in urological cases. In recent years, in the studies have been shown that free radicals and inflammatory cytokines play role in ischemic damage depending on testicular torsion. The aim of this study, the effects of amlodipine at different doses which is a calcium channel blocker, in rats testicular torsion / detorsion damage is to examine the oxidant / antioxidant, molecular and histopathologically.

Material and Method: In this study, seven experimental groups and one control group was designed as a total of eight groups. Groups were sham, Testicular Ischemia, Testicular ischemia + reperfusion, Ischemia + amlodipine (5 mg / kg), Ischemia + amlodipine (10 mg / kg), ischemia-reperfusion (IR) + amlodipine (5 mg / kg), IR + Amlodipine (10 mg / kg), and finally Sham + amlodipine (10 mg / kg), respectively.

Results: As a result of this study, significant decreases levels of antioxidant like SOD and GSH were markedly observed in ischemia and reperfusion groups when compared with healthy control group. These levels increased in the treatment group with amlodipine also MDA levels statistically decrease has been found in the treatment groups While increases the levels of TNF- α and TGF- β has been found in torsion and detorsion groups, significantly decreases the levels of these inflammatory cytokines and the agent was observed in treatment groups. Also in the histopathological study, significant decrease of the ischemia and reperfusion injury were observed in treatment groups when compared with torsion and detorsion groups.

Conclusion: These results demonstrated that amlodipine significantly protective effects on testis tissue damage occurs depends on torsion / detorsion model via the biochemically, histopathologically and molecularly.

Key Words: Amlodipine, Rat, Testis, Torsione/detorsione

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AML	: Amlodipin
AMP	: Adenozin monofosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
Ca	: Kalsiyum
DHP	: Dihidropiridin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTNB	: Ditiyobis Nitrobenzoik Asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GSH	: Glutatyon
H-E	: Hematoksilen-Eozin boyama
IL	: İnterlökin
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
I/R	: İskemi/Reperfüzyon
LOOH	: Lipid Hidroperoksit
LH	: Lüteinizan hormon
LPO	: Lipit peroksidasyonu
LPS	: Lipopolisakkarit
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MDA	: Malondialdehid
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NK	: Naturel Killer
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O₂	: Oksijen
PBS	: Fosfat tamponlu salin
ROS	: Reaktif Oksijen Ürünü

PMNL	: Polimorfonükleer lökositler
RNA	: Ribonükleik asit
RNS	: Reaktif nitrojen türevi
Sg	: Spermatogonyum
St	: Spermatozoid
Sp	: Spermatozoid
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TBA	: Tiyobarbitürik asit
T/D	: Torsiyon-detorsiyon
TAF	: Trombosit aktive edici faktör
TGF	: Transforming growth faktör
TNF-β	: Lenfotoksin
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör- α
TNF	: Tümör nekrotizan faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Testis epididim ve duktus deferens	8
Şekil 2.2. Spermatogenezis.....	10
Şekil 2.3. Akut hücre zedelenmesi nedenleri	15
Şekil 2.4. Hücre hasarlanmasında sitoplazmik kalsiyum artışının nedenleri ve sonuçları	19
Şekil 2.5. Lipid peroksidasyonu	20
Şekil 3.1. Thermal cycler koşulları.....	50
Şekil 3.2. Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyon ısı ve süreleri	51
Şekil 4.1. Sham grubunun kesit görüntüleri.	53
Şekil 4.2. İskemi yapılan grubun kesit görüntüleri.....	54
Şekil 4.3. İskemi-reperfüzyon yapılan grubun kesit görüntüleri	55
Şekil 4.4. İskemi yapılan + Amlodipin 5 mg/kg verilen grubun kesit görüntüleri.....	55
Şekil 4.5. İskemi yapılan + Amlodipin 10 mg/kg verilen grubun kesit görüntüleri.....	56
Şekil 4.6. İskemi /reperfüzyon yapılan + Amlodipin 5 mg/kg verilen grubun kesit görüntüleri.....	57
Şekil 4.7. İskemi /reperfüzyon yapılan + Amlodipin 10 mg/kg verilen grubun kesit görüntüleri.....	58
Şekil 4.8. Sağlıklı olup + Amlodipin 10 mg/kg verilen grubun kesit görüntüleri.....	58
Şekil 4.9. Rat testisinde ölçülen SOD aktivitesinin grafikte gösterilmesi.....	60
Şekil 4.10. Rat testisinde ölçülen GSH seviyesinin grafikte gösterilmesi.....	61
Şekil 4.11. Rat testisinde ölçülen MDA seviyesinin grafikte gösterilmesi	63
Şekil 4.12. Rat testisinde ölçülen TNF- α seviyesinin grafikte gösterilmesi	64
Şekil 4.13. Rat testisinde ölçülen TGF- β seviyesinin grafikte gösterilmesi.....	65

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Deney Planı.....	40
Tablo 3.2. Histopatolojik değerlendirme	44
Tablo 3.3. cDNA sentezi için kullanılan mix içeriği	50
Tablo 3.4. Rölatif Gene Ekspresyonu analizi.....	50
Tablo 4.1. Rat testis dokusunda ölçülen SOD, GSH ve MDA sonuçları.....	59

1. GİRİŞ

Testis torsiyonu çocukluk ve gençlik çağlarındaki erkeklerde akut seyirli, derhal teşhis ve tedavi edilmesi gereken cerrahi bir durumdur. 25 yaşından genç erkeklerdeki insidansı 1/4000'dir.¹ Başarılı bir cerrahi girişime karşın bu hastaların % 40-60'ında testiküler atrofi ve infertilite gelişmektedir.² Yapılan çalışmalarda, testiküler torsiyonun inmemiş testisi olanlarda 10 kat fazla görüldüğü ve oluşan vakaların % 6,8'inin inmemiş testisli hastalarda oluştuğu saptanmıştır.³ Testis torsiyonu olan hastaların %61'inin 21 yaşından küçük olduğu belirtilmiştir.⁴ Testis torsiyonu biri neonatal dönem, diğeri de 13 yaş civarı olmak üzere 2 defa pik yapmaktadır.⁵ Testis torsiyonunun görüldüğü en yüksek yaş 69 olarak görülse de yaşlılarda torsiyon oranı düşüktür.⁶ İlginç olarak testis torsiyonuna soğuk aylarda özellikle aralık ayında daha sık (%14 oranında) rastlanmaktadır.⁷

Testiküler torsiyon-detorsiyon (T/D) nedeniyle oluşan iskemi ve reperfüzyon (I/R) testiküler hasara neden olmaktadır. İskemi sırasında oksijen miktarının metabolik ihtiyaçlara oranla düşük seviyede olması, hücresel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolitlerin birikimine bağlı olarak germ hücre ölümü gerçekleşir.⁸ Reperfüzyon safhasında hem reaktif oksijen radikallerinde (ROS)'ta (başlıca hidroksil radikalleri ve süperksit anyonları olmak üzere) hem de reaktif nitrojen türevlerinde (RNS) (başlıca nitrik oksit (NO) olmak üzere) ciddi artış olur.⁹ Bu serbest radikaller mitokondri ve hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonu yoluyla membran geçirgenliğinde artışa veya membran bütünlüğünde bozulmaya neden olur iken ayrıca proteinlerin, enzimlerin ve buna bağlı olarak da DNA'nın hasar görmesine neden olurlar.¹⁰ Sonuçta iskemi nedeniyle oluşan germ hücre hasarı daha da artar.

İ/R hasarına bağı gelişen organ hasarlarında birçok terapötik ajanların koruyucu rolleri gösterilmiştir. Aynı zamanda barsak, kalp, karaciğer, böbrek, akciğer, testis ve beyin gibi organlarda antioksidan sisteminin iyileştirilmesi, İ/R hasarını önleme amacıyla kullanılmıştır.¹¹ Ancak yapılan önceki çalışmalar sonucunda torsiyona bağı hasarın tedavisinin tam olarak önlenemediğı ve günümüzde klinikte uygulanan çalışmalarda mevcut olarak kullanılan bir terapötik ajan bulunmadığı bilinmektedir. Ayrıca vücutta en kolay torsiyone olan organın testis olmasına rağmen, literatürde bu konu hakkında da yeterince tatmin edici çalışmalar bulunmamaktadır. Bu yüzden testis torsiyonun tedavisi ile ilgili halen deneysel ve klinik çalışmalar devam etmektedir.

Kalsiyum kanal blokerlerinin kimyasal yapılarına göre dihidropridin (DHP) grubu içerisinde bulunan amlodipin çabuk etki gösteren ve “etkin” olan antihipertansif bir ilaç olduğu ve ayrıca güçlü antioksidan özelliğinde olduğundan dolayı vasküler iskemilere bağı gelişen organ hasarlarının azalmasında etkili olduğu bilinmektedir.¹²

Antioksidanlar iskemi ve reperfüzyon sırasında artan radikallerin vücudumuz tarafından süpürülmesini sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda özellikle iskemi reperfüzyon hasarına bağı olarak azalan antioksidanlar ile doku hasarı arasında direkt ilişki gösterilmiştir.¹³

Üçüncü nesil dihidropridin türevi olan amlodipinin antioksidan aktivitesi dışında antihipertansif etkisi, lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, nitrik oksit üretiminin artırılması, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunun azaltılması ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyesinin korunması gibi özelliklerinin de olduğu bildirilmiştir.¹²

Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalarda I/R modeli oluşturulmuş olan beyin¹⁴, kalp¹⁵ ve karaciğerde¹⁶ de amlodipinin koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Tüm bu verilerden elde edilen sonuçlar ışığında testiste I/R ile oluşan testiküler hasarda amlodipin'in sistemik uygulamasının oksidan ve antioksidan denge üzerine olan etkisi incelenmiştir.

I/R hasarında bozulmuş oksidan/antioksidan denge haricinde ayrıca artan bir sitokin salınımında bulunmaktadır. Bu artan sitokinler içerisinde en önemli sitokinlerden biri de TNF- α 'dır. TNF, damar düz kaslarını gevşeterek kan basıncını ve doku perfüzyonunu azaltır. TNF bu etkileri, düz kas hücrelerine direkt etki ederek ve damar endotel hücreleri tarafından salgılanan prostasiklin ve NO gibi damar genişleticileri uyararak indirekt yoldan yapar.¹⁷

TGF- β ise organizmanın tüm dokularının gelişimini çok yönlü kontrol etmesinin dışında ayrıca homeostazi ve onarımda da çok önemli rol oynamaktadırlar¹⁸.

TGF- β aktivitesindeki bozukluğun yumurtalık kanseri,¹⁹ pankreas kanseri²⁰ gibi durumlarda rol oynadığı yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir. TGF- β 'nın iyileştirici özellikleri özellikle iskemi reperfüzyon hasarında görülmektedir. Rat ve tavşan modellerinde oluşturulan inmede TGF uygulanması infarkt alanlarını azaltmıştır.²¹

Yaptığınız literatür incelemelerinde Amlodipinin enflamatuar sitokinlere ve oksidan/antioksidan seviyeleri arasındaki dengeye olumlu yönde etkide bulunduğu ve bunlar sonucunda ise klinik olarak önemli bir yere sahip olduğu ayrıca kısırılık gibi toplumda ciddi problemlere yol açan testis torsiyonunda da Amlodipin'in koruyucu etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmadaki amacımız bir kalsiyum kanal blokörü olan amlodipinin farklı dozlarda; ratlarda oluşturulan testis torsiyon/detorsiyon hasarındaki etkisini oksidan/antioksidan, moleküler ve histopatolojik olarak incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testisin Embriyolojisi

Sekonder oositi dölleyen sperm türüne bağlı olarak embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti fertilizasyonda belirlenir.²²

Primordiyal gonadın mezenkimal kısmı insan embriyosununun 10-12. dorsal segmentleri arasından gelişmekte iken bununla birlikte gelişimin üçüncü haftasındaki primordiyal germ hücreleri ise allantoisinin başlangıç yerine yakın bir yerde yolk kesesi duvarında ve endoderm hücreleri arasında ortaya çıkarlar.²³

Bu primordiyal (ilkel) germ hücreleri beşinci haftanın başında amibik hareketlerle son barsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyip primitif gonadlara ulaşır ve altıncı haftada tamamen genital kıvrımlara yerleşerek henüz farklılaşmamış olan fetal gonad, gebeliğin bu haftasında ortaya çıkmış olur.²⁴

Farklılaşmamış gonadlar olarak adlandırılan her iki cinsin gonadları gebeliğin yedinci haftasına kadar benzerdir.²⁴

Gebeliğin yedinci haftasında ise gonadların erkek ya da dişiliğe farklılaşmaları XX, XY kromozom kompleksine bağlı olarak belli olur.²² Gebeliğin yedinci haftasının başında genetik olarak XY olan embriyoda primitif germ kordonları Y kromozomu üzerindeki testis belirleyici faktör etkisiyle hızla çoğalır.²³ Gonadın medulla bölgesini dolduran bu kordonlar testis veya meduller kordonları oluştururlar. Bu kordonlar gonadın hilusunda ince ve daha küçük kordonlara parçalanıp ağ şekline dönüşerek “*rete testis*”i oluştururlar.²³ Gelişim ilerledikçe testis kordonları yüzey epiteliyle olan ilişkilerini testisin üzerinde yer alan fibröz yapıdaki tunika albuginea sayesinde kaybederler.²⁴ Kordonlar puberteye kadar kapalıdır. İşte bu dönemde lümen oluşarak seminifer tübüller belirir. Seminifer tübüller rete testis lümenine bağlandıktan sonra

duktuli efferentes ile devam ederek Wolf kanalına dökülüp duktus deferensi oluştururlar.²⁵

8-18. haftalar arasında interstisyel dokudaki mezenkimal hücrelerin hızlı değişimi sonucunda ortaya çıkan ve testisin %50'sini oluşturan Leydig hücreleri gebeliğin ortasına gelindiğinde ve doğuma yaklaştığında sayıları azalır.²⁵

Başlangıçta lomber bölgede bulunan testisler, üçüncü fütal aydan itibaren skrotuma doğru inişe başlarlar. Yapılan hipotezlere^{26, 27} göre testisin inişinin iki evresi vardır:

İlki transabdominal evredir. Bu evre androjenden bağımsız olan ve inişin anti mülleryan hormon etkisiyle olduğu evredir. Testis bu evrede karın arka duvarı boyunca inişe geçer; gebeliğin 17. haftasında iç inguinal halka hizasına gelir ve gebeliğin 28. haftasına kadar burada kalır.²⁵

İkincisi inguinokrotal evredir. Testis bu evrede inguinal kanal yoluyla karın ön duvarını geçerek skrotuma iner. Testis gebeliğin yedinci ayından sonra inguinal kanalı geçmiş ve doğumdan hemen önce de gelişimini tamamlamış halde skrotumdaki yerini alır.²⁷

2.2. Testisin Anatomisi

Erişkin bir erkeğin testisi ovoid şekilli olup 4x3.5x3 cm boyutlarında ve her bir testisin hacmi 30 ml kadardır. Testisin 2/3 olan anterolateral bölümü serbest iken, posterolateral yüzü epididim, bağ dokusu ve damarlarla örtülüdür. "*Mediastinum testis*" olarak isimlendirilen kranioposterior kısmından ise seminal taşıyıcılar çıkar.²⁸ Testis parankimi dıştan içe doğru, en dışta tunika vaginalis, ortada tunika albuginea ve en içte tunika vaskulosa olmak üzere 3 tabakadan oluşan bir kapsül ile sarılıdır.

Visseral ve parietal olmak üzere 2 tabakadan oluşan Tunika vaginalisin visseral tabakası testisin her iki yanında ve ön yüzünde bulunur.²⁹ Parietal tabaka ise testisin alt

kısından üst kısmına doğru uzanır.³⁰ Bu iki tabaka arasında potansiyel bir boşluk vardır. Bu boşlukta az miktarda seröz sıvı bulunur.³¹ Bu yapı ekstravaginal torsiyonun olduğu kompartmanı oluşturur.

Tunika albuginea kalın, sert fibröz bir tabaka olup testis içeriğini sarar. Tunika albugineanın yapısında, esas olarak kollajen doku içine dağılmış çok sayıda, dallanmış, düz kas hücreleri vardır ve bu lifler otonomik innervasyon sonrasında kasılarak efferent duktuslara doğru sperm hücrelerinin hareket etmesinde yardımcı olur. Tunika albugineadan kaynaklanan septalar, seminifer tübülüsleri lobüllere böler.³²

Tunika vaskulosa, tunica albugineanın hemen altında yer alır. Testisin septumlarının iç yüzünü örttüğünden dolayı kapsül aracılığıyla septalarla 250 kadar kompartmana bölünen testis kompartmanları etrafında uzanmaktadır.³²

Her bir septum interstisyel doku ve gelişmekte olan germ hücreleri içeren seminifer tübül ve en az bir sentrifugal arter içerir. Seminifer tübüller her iki ucu da sıklıkla rete testiste sonlanan "V" şeklinde tübüller olarak uzanırlar. İnsan testisinde yaklaşık olarak 600- 1200 seminifer tübül bulunmaktadır.³²

2.2.1. Testis Vaskülizasyonu

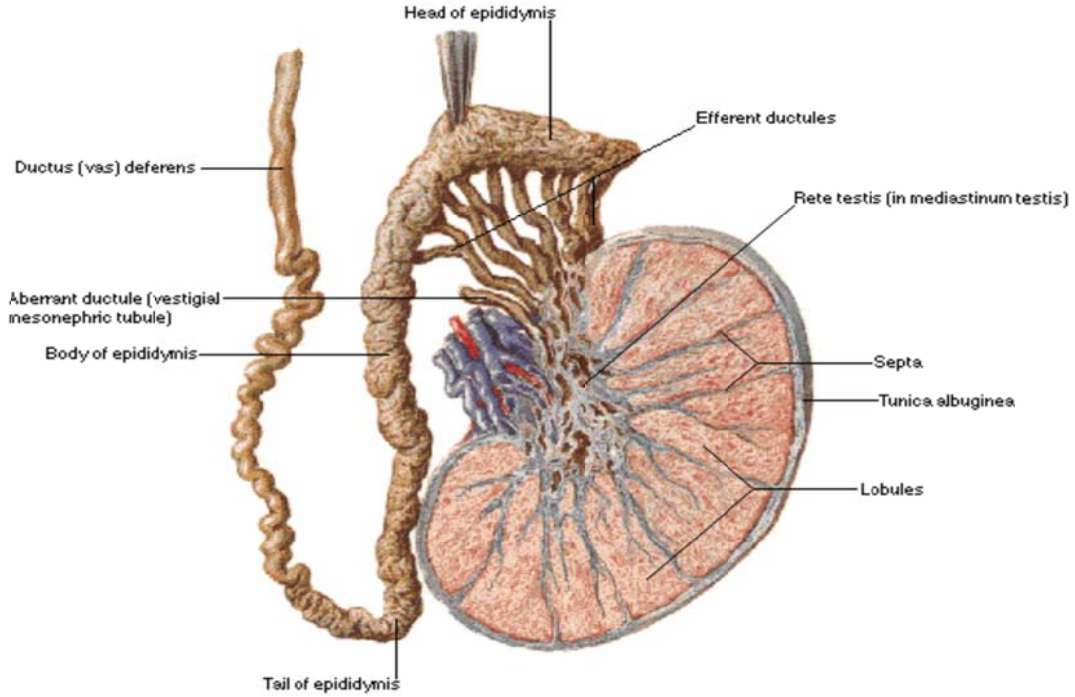
İnsan testis parankimi dakikada 100 mg doku için yaklaşık 9 ml kan ile beslenir.³³ Testiküler arterler aortadan çıkarak retroperitoneal bölge boyunca iç inguinal halkaya ulaşmak için yol alırlar. İç halka seviyesinde bulunan damarlar, genitofemoral sinirin genital dalı, ilioinguinal sinir, kremasterik arter ve vas deferens ile buluşurlar.³⁴ Testiküler arter, testise girdiğinde internal arter, inferior testiküler arter ve epididimis başına giden kapital arter olmak üzere üç dala ayrılır. Bu dallanmanın seviyesi oldukça değişkenlik gösterip olguların %31-%88'inde inguinal kanal içinde olduğu bildirilmiştir.³⁵

Testiküler arter, testisin ana damarı olan aortanın ön yüzünden ve böbrek arterinin yaklaşık iki-üç cm altından çıkıp retroperitoneumda ilerleyip iç kasık halkasına kadar spermatik kord yapıları arasına katılır. Tek veya dallara ayrılan testiküler arter, testis arka yüzüne ulaşır burada oblik biçimdeki tunika albugineayı geçerek ana dallara bölünerek ilerler ve seminifer tübüller arasında yer alan interlobüler arteriollerini oluşturur. Ana damar testiküler arter olmasına karşın, kremasterik, vazal ve epididimal arterlerle testiküler arter arasında birçok anastomoz görülebilmektedir.³⁶

Testisin venöz drenajı kapiler ile başlar ve testis dışında “*plexus pampiniformis*”i meydana getirirler. Çoğunlukla iç kasık halkası seviyesinde bu venler birleşerek testiküler veni oluştururlar.³⁶

Sağ testiküler ven, sağ böbrek veninin dört-beş cm kadar altından vena kava inferiora açılırken, sol testiküler ven ise sol böbrek venine açılır. Sinirler genelde damarları takip ederek testise ulaşırlar. Tunika albuginea dışında dallara ayrılan sinirler interstisyuma kan damarları ile birlikte ulaşırlar.³⁶ Testisin innervasyonu asıl olarak sempatik postganglionik ve viseral afferent sinirlerle olmaktadır.²⁸

Testis lenfatikleri, seminifer tübüller etrafında görülmeyen lenfatik kapilerlerle interlobüler septadan başlar. Daha sonra spermatik kordu takip ederek paraaortik, interaortokaval ve perikaval lenf düğümlerine açılırlar.³⁶



Şekil 2.1. Testis epididim ve duktus deferens³⁷

2.3. Testisin Histolojisi ve Spermatogenez

Testisler; embriyonik gelişimi, seksüel olgunlaşmayı ve üreme fonksiyonlarını etkileyen ekzokrin ve endokrin fonksiyonu olan bir çift organdır. Testislerde üretilen androjenler embriyoda erkek fetüsün normal gelişimi için gereklidir.³⁸ Pubertede ise testislerden salgılanan testesteron sperm üretiminin başlamasını ve sekonder seks karakterlerinin gelişimini sağlar.³⁹ Erişkinlerde de sperm üretiminin devam etmesi, sekonder seks karakterlerinin korunması ve yardımcı bezlerin fonksiyonları testise bağlıdır.³⁸

Skrotum içinde yer alan ve dıştan içe doğru üç tabakalı kalın bir kapsülle kuşatılmış olan testisin orta tabakası olan tunika albuginea, kapsülden testisin içine doğru ince bağ dokusu uzantıları ile testisi sayıları 250'ye ulaşan lobüllere ayırır. Her

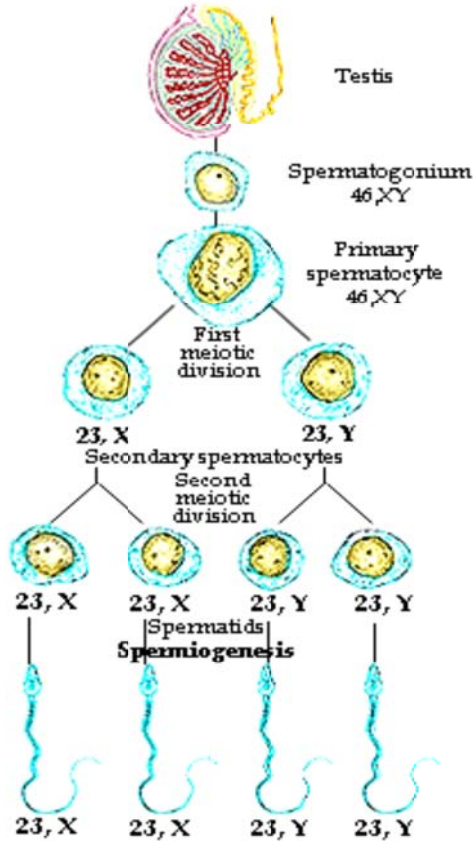
testis lobülü kan damarlarını, sinirleri ve interstisyel hücreleri içeren gevşek bağ dokusu ile sınırlı seminifer tübüllerden oluşur.⁴⁰

Seminifer tübüller iki farklı hücre grubu içeren seminifer epitel ile döşeli kanallardır. Seminifer hücre gruplarından birinci grup hücreler germ hücrelerine destek olup onları besleyen sertoli hücreleridir. Sertoli hücreleri bazal membrandan tübül lümenine kadar uzanan prizmatik hücrelerdir. İkinci grup hücreler de germ hücreleri olan spermatogenetik hücrelerdir. Spermatogenetik hücreler ise sertoli hücrelerinin lateral uzantıları ile oluşan bölmelerde yerleşmişlerdir. Bu iki hücre grubu arasındaki sıkı bağlantı kompleksleri kan-testis bariyerini oluşturur.³⁸

Spermatogenetik hücreler birbiri üzerine sıralanmış farklı gelişim aşamaları gösterir. Bunlardan bazal membrana en yakın olanı spermatogonyumlardır. Lümene en yakın bulunan, daha olgun hücreler ise spermatidlerdir. Lümeninde ise spermiyumlar bulunur.³⁸

Germ hücreleri insanda olgunlaşmasını 64 günde tamamlayan ve çoğalabilen hücrelerdir. Bazal membrana oturan spermatogoniumların bir kısmı (spermatogonium A) kök hücreleri oluştururken, bir kısmı da (spermatogonium B) mitoz ile bölünerek lümenine doğru göç ederler ve primer spermatositlere dönüşürler.²⁴

Primer spermatositlerin birinci mayoz bölünmesi ile sekonder spermatositler oluşur. Bu mayoz bölünme ile diploid kromozumlu olan primer spermatosit haploid kromozoma inmiş olur. Sekonder spermatositlerin ikinci mayoz bölünmesi sonucunda ise spermatidler oluşur. Bu hücreler haploid kromozom ve (Deoksiribo nükleik asit) DNA içeriğine sahiptirler. Spermatidlerin farklılaşarak hareketli spermatozoonlara (sperm) dönüşmesine **spermiyogenez** denir.⁴¹



Şekil 2.2. Spermatogenezis⁴¹

2.3.1. İnterstisyel Doku

Testis dokusunun % 25-30'unu oluşturur ve bu dokunun intertübüler bölgesinde Leydig hücreleri, kan damarları, lenfatikler, sinirler, makrofajlar ve mast hücreleri bulunmaktadır. Görevi testosteron üretimi olan Leydig hücreleri ergenlikte ortaya çıkan santral konumlu, tek ve yuvarlak bir çekirdeğe sahip hücrelerdir.³⁸ Testosteron ise kolesterolden sentezlenen, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonudur. Lüteinizan hormon (LH) testosteron salgılanmasını kontrol eder. Plazmada testosteronun %65'i androjen bağlayıcı protein olarak adlandırılan bir beta globuline, %33'ü ise albumine bağlı olarak bulunur.³³ Spermatogenez; hipofizden salgılanan FSH ile LH'nin testis üzerindeki etkileriyle ilişkilidir.⁴² LH, normal spermatogenez hücrelerinin gelişimi için Leydig hücrelerinin etkisiyle

testosteron yapımını uyarır. FSH ise Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklazı ve sonuçta siklik adenozin monofosfat artışını uyarır. Böylece androjen bağlayıcı protein sentezi ve salgısı artar. Androjen bağlayıcı protein testosteronu bağlayarak seminifer tübül lümenine taşır.³³ Spermatogenez testosteron ile uyarılır, östrojen ya da progesteronla inhibe edilir.^{41, 42}

2.3.2. Seminifer Tübüller

Testisin herbir lobülü birbirleri arasında ilişkileri olan bir-dört kadar seminifer tübül içerir. Bunlar, dışta miyoid hücreleri de içeren bağ dokunun çevrelediği, belirgin bir bazal membran ile interstisyumdan ayrılırlar.⁴²

Seminifer tübüller, Sertoli hücreleri ile germ hücrelerini içerirler. Erişkin testisindeki Sertoli hücreleri, seminifer tübülün bazal kısmından lümene doğru uzanan ve bölünme yeteneği olmayan destek hücreleridir. Seminifer tübüllerin hücresel yapısının % 10-15'ini oluşturan sertoli hücrelerinin çekirdekleri düzensiz şekilli ve oldukça büklümlü olup belirgin nükleolusları ile germ hücre elemanlarından ayrılırlar. Puberte çağında ise Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantı kompleksleri oluşur.³³ Kandan gelen maddelerin lümen içerisine geçişini önleyen en önemli kompleks kan testis bariyerini oluşturan komplekstir.³⁸ Sertoli hücreleri fagositoz kapasiteleri dışında; spermatogenezin düzenlenmesinde rol alan androjen bağlayıcı protein, transferrin, büyüme hormonu, seruloplazmin ve inhibin gibi pek çok maddenin sentezini de yaparlar.³³

2.4. Testis Torsiyonu

Testis torsiyonu, spermatik kord yapılarının kendi ekseni etrafında dönmesi sonucu testis kan akımının bozulmasıdır. Klinikte testis torsiyonları 360 ile 720 derece arasında görülmektedir. Tedavi edilmezse testis dokusunda nekroz gelişir.^{43, 44} Testis ve eklerinde 25 yaşına kadar torsiyon görülme sıklığı 1/160 iken ⁴⁵ sadece testis için bu

oran 1/4000 dir.¹ Her yaş grubunda görülebilmemesine rağmen, özellikle pubertal dönem ve ilk 1 yaşta pik yapar.⁴⁶ Olguların % 65'i pubertal dönemde ve 13 yaş grubundadır.⁴⁷

Travmanın ya da aşırı egzersizin, torsiyonu başlatan bir etken olabileceği düşünüldüğü gibi kremaster veya dartos kaslarının kasılması da torsiyonu başlatan bir etken olabilir. Çevre ısısının 2°C'nin altına düştüğü ortamlarda torsiyonun daha sık görüldüğü bildirilmiştir.⁴⁸ Torsiyonun ana sebebi testiste ödeme ve ağrıya yol açan venöz tıkanıklıktır. Bu venöz tıkanıklık ise testisin tunikası elastik olmadığından arteriyel dolaşımı bozarak tıpkı diğer dokularda olduğu gibi testiste de hipoksiye neden olur. Deneysel çalışmalarda testiküler iskemiye en duyarlı olan hücrelerin başta spermatogonia ve spermatozoidler olmak üzere germ hücreleri olduğu gösterilmiştir.⁴⁹

Ani başlangıçlı ve ciddi bir skrotal ağrı torsiyon için özgün bir bulgudur. Skrotal ağrı kasığa ve aynı taraf karın alt kadranına yayılır. Olguların dörtte birinde ağrıya bulantı, kusma gibi diğer sindirim sistemi şikayetleri de eşlik edebilir.^{26, 50} Torsiyonun nedeni olarak, testisin skrotuma inişinin ve gubernakulumun skrotum duvarına fiksasyonunun tam olmaması sorumlu tutulmaktadır.^{51, 52}

Sol testis daha uzun bir spermatik korda sahip olduğundan sağ testise oranla iki defa daha sık torsiyone olur. İnmemiş ve retraktıl testislerde torsiyon olasılığı artmıştır.⁵²

Testis torsiyonu iki tiptir ;

2.4.1. İnvaginasyon Testis Torsiyonu

Testis torsiyonu genellikle sağ testise göre sol testiste daha fazla görülür. Bunun sebebi sol testisin daha uzun bir spermatik kordonunun olmasıdır.⁵³ Testisi ve epididimin anteriorunu sadece tunika vaginalis kaplar. Tunika vaginalis, testisi ve epididimi tümüyle sardığında ise epididim posteriorundan skrotum duvarına tutunacak yer bulamayıp böylece testis tunika vaginalis içinde sadece damarlar ve duktus

deferens ucunda sallanır bir durumda kalıp kolay bir şekilde torsiyone olur. Bu duruma intravaginal torsiyon ve bu durumun anatomik bozukluğuna da "Bell Clapper deformitesi (zil tokmağı)" denir.⁵⁴ Bir tarafta intravaginal testis torsiyonu olduğunda karşı tarafta da aynı anatomik kusur ve torsiyon potansiyeli olduğu kabul edilmektedir.⁵⁵ Yenidoğan döneminden sonraki torsiyonların hemen hepsi intravaginal torsiyondur.⁵¹

2.4.2. Ekstravaginal Testis Torsiyonu

Spermatik kord seviyesinde olan ve daha çok yenidoğanlarda görülen torsiyona da spermatik kord torsiyonu veya ekstravaginal torsiyon denilmektedir.⁵⁵ Pubertal dönemde testis hacmindeki artış, mezenterik yapıya oranla daha hızlı olup torsiyon olasılığı artmaktadır.⁵⁴

Ekstravaginal testis torsiyonları genellikle testiküler atrofi ile sonuçlanır. Bu olgularda da erken cerrahi girişim ve kontralateral testisin fiksasyonu önerilmektedir.²⁶

Gonad torsiyonunda testisin canlılığı, torsiyonun derecesi ve torsiyonun süresi gibi iki parametreyle yakından ilgilidir.⁵⁶ Testis torsiyonunda ilk altı saatlik zaman dilimi kritik zaman olup bu çok kritik zamanda testisin kurtarılma oranı % 85-97'dir. 6-12 saatte bu oran % 55-85 ve 12-24 saat arasında % 20-80 iken 24 saatten sonra bu oran % 10'un altına inmektedir.⁵⁷

İskemik dokularda canlılığın korunması için öncelikli ve temel prensip reperfüzyonun sağlanmasıdır. Bundan dolayı testis torsiyonlu olgulara zaman geçirmeden müdahale edilmesi gerekmektedir.⁵⁸ Detorsiyon sonrasında gelişebilecek olan reperfüzyon hasarı; nötrofil infiltrasyonu ve serbest oksijen radikallerinin (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri) artışıyla yakın ilişkilidir.⁵⁹

Serbest oksijen radikallerinin artışı ise hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonuna, protein denaturasyonuna ve son olarak da DNA hasarına yol açar.

Yapılan deneysel çalışmalarda, detorsiyon sonrası ortaya çıkabilecek bu hasarı önlemek için değişik maddeler kullanılmıştır.^{9, 60-62}

2.4.3. Torsiyonun Fertilite Üzerine Etkileri

Testisler, serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı çok duyarlı organlardır. Oksidatif stres varlığında ciddi şekilde hasar gören germinal hücreler daha sonra ölürlür.⁶³ Torsiyon varlığında gelişen oksidatif stres, germinal hücrelerde nekroza yol açıp daha sonraki dönemlerde infertilite oluşumuna sebep olabilmektedir.⁴⁷

Yapılan çalışmalarda torsiyon öyküsü olan erkeklerin %36'sında sperm sayısının <20 milyon/ml'nin altında olduğu tespit edilmiştir.⁶⁴

Başka bir klinik çalışmada, erken dönemde (<13 saat)detorsiyon uygulanan erkeklerde fertilitenin korunduğu bildirilmekte iken, geç dönemde (ortalama 70 saat) orşiektomi uygulanan erkeklerde fertilitenin olumsuz yönde etkilendiği ortaya konulmuştur.⁶⁵

2.5. İskemi ve Reperfüzyon Hasarı

İskemi; dokunun oksijen (O₂) ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin dolaşım tarafından sağlanamaması ve yine bu süreçte oluşan atık ürünlerin dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak tanımlanmaktadır.⁶⁶ İskemik hasarın derecesi hipoksinin derinliğine ve şiddetine bağlıdır. Bunun sonucunda ise iskemiye bağlı doku hasarında hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne yol açmaktadır.⁶⁷

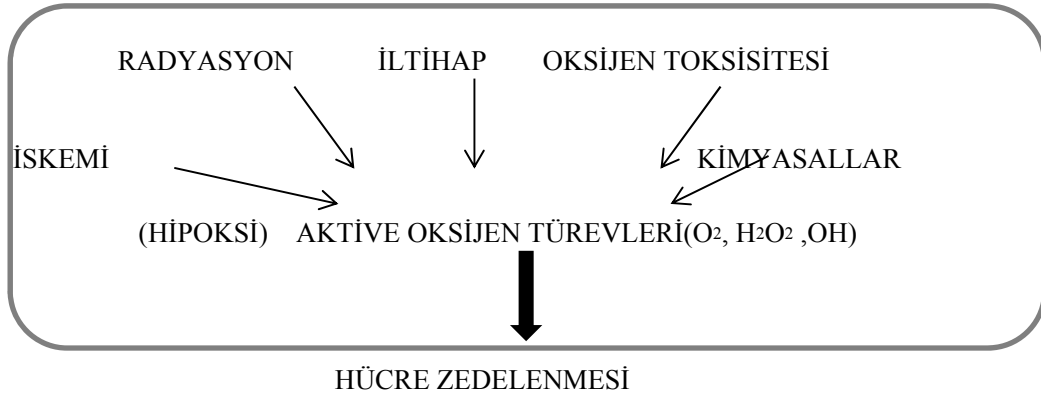
IR hasarı karakteristik olarak;

- PMNL (polimorfonükleer lökositler)'nin aktivasyonuna⁶⁷
- Serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına⁶⁸
- Sitokinlerinin salınımında artışa⁶⁹
- Eikasonoidlerin üretiminde artışa⁷⁰

- Kompleman sistemin aktivasyonuna neden olur.⁷¹

2.5.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Akut Hücre Zedelenmesinin Nedenleri

Akut hücre zedelenmesi, uyarana karşı oluşur ve hücre morfolojisinde değişimler meydana getirir. İskemideki akut hücre zedelenmesi ise aktive olan (Serbest Oksijen Radikali) SOR'un lipid peroksidasyonuna ve hücre hasarlanmasına neden olması ile oluşmaktadır. Akut iskemiyi izleyen olaylar şu şekilde gelişir.⁷²



Şekil 2.3. Akut hücre zedelenmesi nedenleri⁷²

2.5.1.1. Geri Dönüşümlü Zedelenme

Hücre hasarı ölümünün en sık nedenlerinden birisi hipoksidir. Hipoksi de, hücre içi oksijen azlığı nedeniyle aerobik solunum aksayarak mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenmiş olur.⁷³

Bunun sonucunda Adenozin trifosfat (ATP) üretimi azalır ya da tamamen sona erer, ATPaz aktivitesi de azalır. ATPaz aktivitesindeki azalma, hücre zarında bulunan aktif sodyum pompası yetersizliğini ve beraberinde hücre içinde sodyum birikimini fazlalaştırır. 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.⁷²

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.⁷²

Sonrasında granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır ve polizomlar monozomlara parçalanarak protein sentezi azalır. Hipoksi devam ederse membran geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları yavaşlar.⁷³ 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. Hücre ölümünün, örneğin miyokard bulguları tam iskemiden 10-12 saat sonrasına kadar ışık mikroskobu ile görülmez.⁷³

2.5.1.2. Geri Dönüşümsüz Zedelenme

Geri dönüşümsüz hücre zedelenmesinde mitokondri ve kristalarda aşırı vakuolizasyon ile plazma zarında zedelenme vardır. Bu durumda hasarlanmış ve ileri derecede geçirgenleşmiş zarlardan hücre için gerekli yaşamsal elemanların kaybolduğu görülür.⁷²

Hücre içi pH'nın düşmesi, lizozom zarlarının zedelenmesi ve bunlarla beraber enzimlerin sitoplazmaya geçerek asit hidrolazları aktiflemesi sonucunda çekirdek ve sitoplazma yapıları sindirilmektedir.⁷⁴

Hücre zedelenmesindeki en önemli basamak membran zedelenmesidir. Membran zedelenmesine sebep olabilecek altı sebep şunlardır;

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

6. Hücre içi aminoasidlerin kaybıdır.^{72, 74}

Membran zedelenmesi, hücreler arası mesafeden hücre içine doğru kalsiyum (Ca^{+2}) tutulumuna neden olmaktadır. Mitokondri tarafından tutulan Ca^{+2} hücresel enzimleri inhibe ederek aynı zamanda proteinleri de denature etmektedir. Sonuçta koagülasyon nekrozuna özgü hücresel değişimler meydana gelmektedir.⁷³

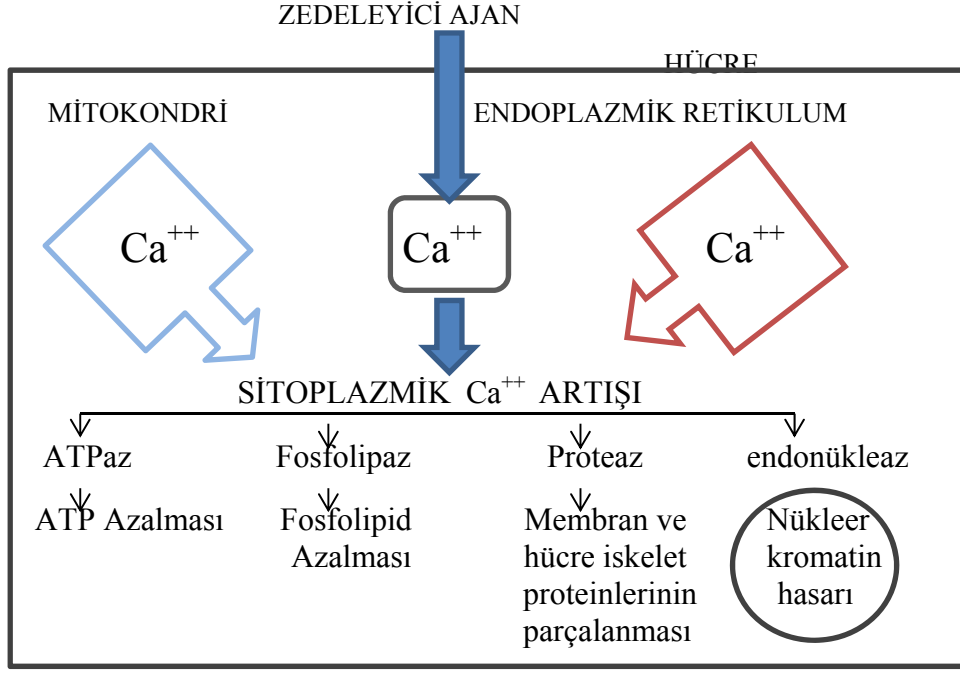
İskemi sonrasında dokuda dolaşımın yeniden başlaması reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. İskemi sonucunda artan SOR kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon zedelenmesine yol açmaktadır.⁷⁴ Reperfüzyon oluşmazsa, öldürücü iskemik zedelenme gelişir fakat toksik SOR oluşmaz. Reperfüzyon sırasında iskemik alanda toplanan nötrofil ve trombositlerin aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} birikimi ile mikrovasküler hasarın dokudaki zedelenmenin nedeni olduğu bilinmektedir.⁷² Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde iskemik alanda toplanan polimorf nüveli lökositler tarafından yapıldığı düşünülmektedir.⁷² Geri dönüşümsüz hasar bugünkü bilgilerimize göre ilk 20-60 dakika içinde oluşur.⁷³

2.5.2. İskemi Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisindeki Rol Oynayan Sistemler

Serbest oksijen radikalleri: Serbest radikaller, bir ya da daha çok sayıda çiftleşmemiş elektron içeren atom ya da atom gruplarıdır.⁷⁵ Kan akımı ve oksijen sağlanmasının restorasyonu ile büyük miktarlarda serbest oksijen radikali üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir.⁷⁶ Organizmada serbest oksijen radikalleri ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. Serbest oksijen radikalleri paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar.⁷⁷

Nötrofiller: İskemi sonrasında damar endotelinin hasar görmesi ile nötrofil ve trombosit aktivasyonu meydana gelmektedir.⁷⁸ İskemi reperfüzyon alanına gelen nötrofiller, bu bölgede SOR üretirler ve ortaya çıkan SOR antiproteazları inaktive eder. Sonuçta, lizozomlardan proteolitik enzimler salınarak hasar oluşur.⁷⁹ Ayrıca nötrofiller de uyarılmaları sonucunda esnek yapılarını kaybederek mikrosirkülasyonda kalır ve embolizasyona neden olurlar.⁷⁸

Kalsiyum: Reperfüzyon sırasında hücre ve organelleri 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. Dışarıdan Ca^{+2} girişinin yanısıra, endoplazmik retikulum da iskemide 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.⁷⁴ 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.⁷⁴ 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.⁸⁰



Şekil 2.4. Hücre hasarlanmasında sitoplazmik kalsiyum artışının nedenleri ve sonuçları ⁸¹

2.5.3.Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngesinde tek ve paylaşılmamış olan elektron taşıyan kimyasal ürünler olup bu durumdaki enerji bir takım tepkimelerle açığa çıkmaktadır. Bu tepkimeler de organizmanın temel yapı taşları olan proteinler, karbohidratlar, lipidler ile inorganik kimyasallar gibi komşu moleküllerle olan tepkimelerdir.⁷⁷

Serbest radikaller, hücre membranları ve nükleik asitlerin yapısında yer alan anahtar moleküllerdir.^{74, 75, 82}

Serbest radikaller biyolojik ve hücrenel kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. İskemi, oksidatif stres yapıcı bir durum olup hücrenel kaynaklıdır.^{75, 82}

2.5.3.1. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve bunlardan başka mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabilityyi bozup, trombosit agregasyonunu artırıp, hücrede potasyum kaybının olmasına etki ederler.⁸³

2.5.4. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan kimyasal olaya denir.⁸⁴ Bu kimyasal olay sonucunda membran lipid yapısı değişir, hücre yapı ve fonksiyonları bozulur.⁸⁴ Lipid peroksidasyonu başlangıç, zincir gelişimi ve sonlanma olmak üzere üç aşamada gerçekleşir.⁸⁵

Lipid peroksidasyonunun başlaması organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalin, zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından hidrojen atomunu uzaklaştırmasıyla olur. Bu şekilde oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğramaktadır.⁸⁶ Asıl etkili radikalin hidroksil radikali olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda demir iyonlarının da lipid peroksidasyonunda önemli rolü vardır.⁸⁷ Lipid radikalinin moleküler oksijenle reaksiyona girmesiyle zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlayıp bu durum sonunda ise lipid peroksid radikalleri meydana gelmektedir. Lipid peroksid radikalleri de kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşmektedir.⁸⁸⁻⁹⁰

Başlangıç	I. + LH	IL + L.
Zincir gelişimi	L. + O ₂ LOO. + LH	LOO. L. + LOOH
Sonlanma	LOO. + LOO LOOOOL	LOOOOL Radikal olmayan ürünler,
O ₂		
I.: Başlangıç radikali, LH: Lipid molekülü	L.: Lipid radikali,	LOO.:Peroksil radikali,

Şekil 2.5. Lipid peroksidasyonu^{83, 88}

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehid ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri malondialdehid

(MDA)'dir. Malondialdehit lipid peroksidasyonunun son ürünü olması açısından, SOR tarafından oluşan lipid peroksidasyonunun güvenilir bir göstergesidir.⁹¹ MDA hücre zarından kolay difüze olur ve hücre içinde lipofuksin şeklinde sitoplazmada birikir.⁸⁷ Malondialdehid miktarı, tiyobarbitürik asid testiyle ölçülmektedir ve bu yöntem lipid peroksid düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidlere veya nükleik asidlere bağlanarak kendi toksik etkisini gösterir.⁸⁸⁻⁹⁰

Membranda lipid peroksidasyonu sonucu:

- a- Membran transport sistemleri bozulur,
- b- Hücre içi ve hücre dışı iyon dengeleri bozulur,
- c- Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve buna bağlı olarak proteazlar aktive olur,
- d- Hücre içi organellerde oluşan lipid peroksidasyonu ve litik enzimlerin salgılanmasına bağlı hücre hasarı gelişir.⁸⁷

2.5.5. Proteinlere Etkileri

Proteinlerin oksidasyonu, reaktif oksijen/nitrojen türevleri veya diğer oksidan metabolitlerle kovalent modifikasyonu sonucu gerçekleşir.⁹²

Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları şu şekilde sıralanabilir. Enzim aktivitesindeki azalma, protein agregasyonu, proteolize artmış ya da azalmış yatkınlık, protein fonksiyonlarının ve proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artıştır.⁹³ Serbest radikallerin proteinlerdeki oksidasyonuna tiyol (-SH) gruplarının yol açtığı ve bunun da protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisi olduğu bilinmektedir.⁹⁴

2.5.6. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

Serbest radikalleri iyonize edici radyasyonla oluşurlar ve DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar.⁹⁵ Sitotoksiste, büyük oranda, nükleik asid baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır.⁹⁶

2.5.7. Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksidler ve okzoaldehidler oluşurlar. Oluşan bu Okzoaldehidler DNA, ribonükleik asit (RNA) ve proteinlere bağlanmaları ve bunlarla aralarında çapraz bağlar oluşturmaları gibi özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler.⁹⁷

2.5.8. Oksidatif Stres, Nitrik Oksit (NO) ve Nötrofiller

Organizmada serbest radikallerin oluşumu ve ortadan kaldırılmaları arasında sürekli bir denge vardır. Buna oksidatif denge denilmektedir.⁹⁸ Bu denge sürdürülebildiği zaman serbest radikallerin herhangi bir patolojik etkisi oluşmamaktadır. Fakat serbest radikallerin oluşmaları aşamasında oluşum hızlarında artış veya ortadan kaldırılma hızında bir azalma olduğunda oksidatif stres denilen süreç gözlenmekte ve bu durum doku hasarı ile sonuçlanmaktadır.⁹⁹

ROS oluşumunda nötrofiller, osidatif ve nitrozatif sistemle etkileşerek önemli rol oynarlar. ROS; hidrojen peroksit, hidroksi radikaller, süperoksit anyonları, NO ve toksik ürünleri, hücre ve mitokondriyal membranlarda lipid peroksidasyonuna yol açarak bunun sonucunda membran geçirgenliği değişir, yapısı bozulur, protein denaturasyonu ve DNA hasarını takiben hücre ölümü gerçekleşir.⁶³

İskemiye maruz kalan dokuda başlayan kimyasal reaksiyonlar sonucunda hücresel disfonksiyon ve nekroz gelişir, hücresel enerji depoları boşalır ve toksik

metabolitler birikerek hücre ölümü olur. Hücre ölümünün gerçekleşmemesi için dokuya yeniden kan akımı gereklidir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu paradoksal olarak doku hasarına yol açar. Reperfüzyon döneminde başlayan reaksiyonların sitotoksik oksidanlarla ilişkisinin daha ciddi olduğu bildirilmiştir.¹⁰⁰

İskemik dokunun reperfüzyonu, arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına sebep olurken ayrıca postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızması ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına sebep olur.¹⁰⁰ Reperfüzyonda, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinden fazla miktarda oksijen radikali (O_2^-) oluşur ve NO oluşumu azalır. Süperoksit radikaliyle NO arasındaki dengenin bozulması sonucunda endotel hücrelerinden trombosit aktive edici faktör (TAF), TNF gibi inflamatuvar medyatörlerin salınmasına ayrıca lökosit-endotel hücre adezyonuna aracılık eden adezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur.¹⁰¹

Nötrofillerin saldıkları maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, aktif nötrofillerin damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları ile damar endoteline yapıştıklarından dolayı mikrovasküler tıkanmaya neden olarak I/R hasarında rol oynayan önemli bir mediyatör olduğu kabul edilir.¹⁰²

Serbest radikallerin hücre membranındaki Ca^{+2} -ATPaz üzerindeki ve ayrıca hücre içi kalsiyum depolarındaki etkisi sonucu hücre içi kalsiyum düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Bu olaylar ise endotel hasarına ve parankimal dokuda da fonksiyon kaybına yol açmaktadır.¹⁰³

NO; kısa yarı ömürlü, su ve yağda çözünebilen, NOS ailesinin indüklenmesiyle beraber moleküler oksijen ve L-argininden oluşan, serbest bir radikaldir.¹⁰⁴ Endotelial ve nöronal NOS (eNOS ve nNOS) formlar olarak adlandırılmakta ve hücre içi kalsiyum

artışıyla sentezlenmektedir.¹⁰⁵ Testis dokusu içerisinde eNOS; Leyding, Sertoli, spermatozoid ve spermatozoid hücreleri tarafından sentezlenirken nNOS; Leyding hücrelerinde bulunmakta ve vazodilatasyonda rol oynamaktadır. eNOS, çeşitli sitokinlerin indüklenmesiyle beraber transkripsiyonel bir aktivasyon sonucu oluşmaktadır.¹⁰⁵ NO, hasarın süresine bağımlı olarak nekroz veya apoptoza yol açan önemli bir medyatördür.¹⁰²

Western blot yöntemiyle yapılan çalışmalarda eNOS, testis torsiyonundan 24 saat sonra anlamlı olarak artmakta ve 96. Saatten sonra düşme göstermektedir. Bu durum geç dönemde oluşan geri dönüşümsüz hasarda eNOS aktivitesiyle yüksek miktarda sentezlenen NO'nun önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır.¹⁰⁶

2.6. Antioksidanlar

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşın geliştirilen antioksidan savunma sistemleri vücuttaki pek çok savunma sisteminden biridir.¹⁰⁷ Bu sistemde kullanılan ve serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere ise “antioksidan” denilmektedir.¹⁰⁸

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

- 1) **Toplayıcı Etki:** Bu etkiyi ya serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma şeklinde ya da daha zayıf yeni moleküle çevirme şeklindeki bir etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.^{109, 110}
- 2) **Bastıncı (uyarıcı) Etki:** Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme şeklindeki bir etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.¹¹¹

- 3) **Zincir Kırıcı Etki:** Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.¹¹²
- 4) **Onarıcı Etki:** Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklindeki etkidir.¹¹³

2.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD hemen hemen bütün canlılarda bulunan ve aktivitesi yaş ilerledikçe artan ayrıca süperoksitin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir.¹¹⁴ SOD'un tüm çeşitleri süperoksitin dismutasyon reaksiyonunu katalizleyebilirler.¹¹⁵

SOD'un süperoksit gibi oldukça saldırgan bir radikalın etkisini ortadan kaldırdığı ve bununla birlikte canlılardaki yaşamsal etkisinin çok önemli olduğu düşünülmektedir.¹¹⁶

Serbest radikallerin oluşturduğu yıkıcı etkinin önlenmesinde, SOD enziminin katalaz enzimi ile birlikte incelenmesi gerektiği düşünülmektedir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan hidrojen peroksit, oksijenin toksik türlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir.¹¹⁷

2.6.2. Glutatyon (GSH)

Glutatyon (GSH) karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan glisin, sistein ve glutamat amino asitlerinden sentezlenebilen tripeptit yapıdaki çok önemli bir antioksidandır. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır.¹¹⁸

GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar.¹¹⁹ GSH eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir.¹¹⁹

2.7. Malondialdehit (MDA)

Serbest oksijen radikallerinin ve savunma sisteminin koruyucu etkisini aştıkları zaman metabolizmada zararlı etkiler oluşturdukları bildirilmiştir.¹²⁰ Lipidler SOR'den en yüksek oranda etkilenen bileşiklerdir.¹²¹ Bu etkilenme sonucunda membranlarda bulunan fosfolipidlerdeki doymamış bağlar ve kolesterol, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü olan malondialdehiti oluştururlar.¹²² Oluşan malondialdehit; hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek, membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açarak, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur.^{123,}

124

2.8. İskemi Reperfüzyon Hasarında Sitokinler

Sitokinler, çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen ve salgılanan ayrıca hormon benzeri olan polipeptidlerdir. Fakat sadece hormonlara benzerler hormon değildir. Bunlar enflamasyon, hücre büyümesi, iyileşmesi ve yaralanmaya karşı sistemik yanıtı da içine alan bağışıklık ve enflamatuar olayları düzenlerler.¹²⁵

2.8.1. Sitokinlerin Genel Özellikleri

Sitokinler çok geniş bir protein grubudur ve birçok özellikleri vardır.¹²⁵⁻¹²⁷

1) Sitokin salınımı kısadır ve kendini sınırlayan bir olgudur. Genel olarak sitokinler öncül moleküller olarak depolanmazlar ve sentezleri yeni gen transkripsiyonu ile başlatılır. Bu transkripsiyonel aktivasyon genellikle geçici olup, sitokinleri kodlayan mRNA'lar stabil değildir. Bu nedenle sitokin salınımı geçicidir ve bir kez sentezlendikleri zaman, sitokinler hızla salınırlar.¹²⁵

2) Sitokinler çeşitli hücreler tarafından üretilir.¹²⁸

3) Sitokinler birçok farklı hücre tiplerine etki ederler. Bu özelliğe *pleiotropizm* denir.¹²⁷

4) Sitokinlerin aynı hedef hücrede farklı birçok etkileri vardır. Bazı etkiler aynı anda meydana gelirken, bazı etkiler farklı zaman aralıklarıyla oluşabilir (dakikalar, saatler, günler).¹²⁷

5) Sitokinler genellikle diğer sitokinlerin fonksiyonlarını etkilerler. İki sitokin birbirini antagonize eder veya additif etki gösterebilir. Ya da bazı durumlarda sinerjik etki gösterebilirler.¹²⁶

6) Sitokinler, diğer polipeptid hormonlarda olduğu gibi hedef hücrenin yüzeyindeki özel membran reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatırlar. Birçok sitokin reseptörünün ekspresyonu özel sinyaller tarafından üretilir ve söz konusu hücre sitokini salgılayan hücrenin kendisi olabilir (*Otokrin etki*) veya komşu hücre olabilir (parakrin etki) veya diğer gerçek hormonlarda olduğu gibi dolaşıma salınan sitokinler tarafından uyarılan uzaktaki bir hücre olabilir (*Endokrin etki*).¹²⁸

7) Birçok hedef hücre için sitokinler hücre bölünmesini düzenlerler yani büyüme faktörü gibi etki ederler.¹²⁵

Reperfüzyon sonrası, dolaşımda IL-1, IL-6 ve Tümör Nekrozis Faktor- α (TNF- α) gibi sitokinler gözlenir. Bu ajanlara karşı antagonistler kullanılarak, hem IL-1'in hem de TNF- α 'nın vasküler yaralanmaya katkıda buldukları ve endotel adhezyon moleküllerini arttırdıkları gösterilmiştir.^{129, 130} İskemi-reperfüzyon da sitokin salınımının bilinmesine rağmen bu sitokinlerin permeabilite üzerine olan etkilerinin direkt mi yoksa hücre adhezyon molekülleri ekspresyonu ve nötrofil adhezyon aktivasyonu yoluyla mı olduğu bilinmemektedir.¹³¹

Sitokinlerin (TNF- α ve IL-1 β) testis I/R hasarındaki rolünü tespit etmek için testisin içine enjekte edildiği bir çalışmada, enjeksiyon sonrası testis endotel hücrelerindeki sinyal yollarının (JNK) aktive olduğu ve E-selectin salınımına yol açarak nötrofil göçünün olduğu, ROS miktarında artış ve sonuçta germ hücre apoptozisinin olduğu gösterilmiştir. Özellikle IL-1 β 'nin testis I/R hasarına benzer etki yarattığı saptanmıştır.¹³²

2.8.1.1. Tümör Nekrotizan Faktör (TNF)

Tümör nekrotizan faktör (TNF), doğal immünitelye aracılık eden sitokindir. TNF'nin hücrel kaynağı lipopolisakkarit (LPS) ile aktive olan mononükleer fagositlerdir.¹²⁷ T hücreleri, aktive NK (Naturel Killer) hücreleri ve aktive mast hücreleri de bu proteini salgılar.¹³³ İnsan TNF'si nonglikolize bir transmembran protein olup, molekül ağırlığı 17 kD'dır.¹³⁴ İki çeşit TNF vardır. Bunlar, genellikle aktif makrofajlardan salınan TNF- α ile aktif T hücrelerinden salınan TNF- β (Lenfotoksin)'dir.¹³⁵

İki tip TNF reseptörü vardır. Bunlar, sitotoksik aktiviteyi ve fibroblast proliferasyonunu arttıran TNFR Tip I (75-80 kDa) ile T hücre proliferasyonuna neden olan TNFR-Tip II (55-60 kDa)'dir.¹³⁵

TNF, damar düz kaslarını gevşeterek kan basıncını ve doku perfüzyonunu azaltır. TNF bu etkileri, düz kas hücrelerine direkt etki ederek ve damar endotel hücreleri tarafından salgılanan prostasiklin ve NO gibi damar genişleticileri uyarak indirekt yoldan yapar.¹¹⁹

TNF, intravasküler koagülasyona neden olarak doku perfüzyonunu azaltır.¹²⁷

2.8.1.2. Testiste TNF- α ve TNF- α Reseptörlerinin Lokalizasyonu

De ve arkadaşları tarafından¹³⁶ TNF- α , mRNA (Mesajcı Ribonükleik Asit) ve seviyelerinin spermatitidlerin etrafından salındığı gösterilmiştir. Hem spermatoisitler hem de spermatidler etrafındaki iki farklı alanda TNF- α mRNA'sı bulunmaktadır.¹³⁶

Ayrıca in situ hibridizasyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar, yuvarlak spermatidler ve patikan spermatoisitlerde TNF- α 'nın mRNA'sının varlığını da göstermiştir. Aynı zamanda testis interstisyel makrofajlarda mRNA varlığını da teyit etmiştir.¹³⁶

Hutson ve arkadaşları dağılmış sıçan testis makrofajları üzerinde yaptığı ilk çalışmalarda TNF- α aktivitesini bulmuşlardır.¹³⁷

Ancak benzer çalışmalardan elde edilen son bulgulara göre TNF- α 'nın testiküler instertiyal sıvılarda veya testiküler makrofajlarda bulunmadığı gösterilmiştir. Bu da bize TNF- α 'nın sağlıklı testislerde sürekli olarak ekspre edilmediğini göstermektedir.¹³⁸ Kollajenaz olmayan rat testislerinde makrofajların lipopolisakkarit ile tedavisi TNF- α üretimini indüklemiştir. Buda bize TNF- α 'nın testiküler makrofajlarda belli koşullar altında üretilidiğini göstermiştir.¹³⁸

TNF- α 'nın hangi tip hücrelerde olduğunu belirlemek için Northern blot analizi gerçekleştirilmektedir. De ve arkadaşları,¹³⁶ izole edilmiş hücre populasyonlarında TNFR1 için yapılan Northern blot analizleri sonucunda Sertoli ve Leydig hücrelerinin TNFR1 mRNA'sını içerdiği bulunmuştur. Mauduit ve arkadaşları domuz Sertoli hücreleri kültürlerini kullanarak¹³⁹ yaptıkları bir çalışmada sertoli hücrelerini radyo etiketli TNF- α ' lar ile bağlamışlar ve FSH ile tedavi ederek TNFR1'nin miktarının arttığını göstermişlerdir. TNFR2 burada gösterilmemiştir.¹³⁹

Yukarıdaki çalışmaların sonuçları birlikte ele alındığında normal germ hücreleri, özellikle yuvarlak spermatidler ve reseptörlerinin Sertoli ve Leydig hücreleri tarafından üretilen TNF- α olduğu gösterilmektedir.^{137, 139}

2.8.1.3. Seminifer Epitelde TNF- α 'nin Rolü

Memeli TNF- α 'sının fonksiyonel olarak çok sayıda rolünün olduğu bildirilmiştir. Germ hücrelerinde TNF- α 'nın ekspresyonundaki artış ve androjenler ve östrojenin sentezi için sitokrom P450 aromataz enziminin sorumlu olduğu bildirilmiştir.¹³⁹

TNF- α ayrıca spermatogenezi desteklemek için dolaylı bir şekilde davranır. Daha önce de belirtildiği gibi TNF- α transkripsiyon faktörü NFKB aktivasyonunu teşvik edebilir ve gerçekten de fare sertoli hücre kültürlerindeki TNF- α bağlayıcı nükleer NFKB uyarılmıştır.¹⁴⁰ Hücre içi sertoli hücreleri androjen reseptörlerini bağlar ve buna testosteron aracılık eder. Delfino ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmalarda TNF- α 'nın androjen reseptörlere NFKB'nin bağlanmasını uyardığı ve primer sertoli hücre kültürlerinde androjen reseptörlerinin arttığı bulunmuştur.¹⁴⁰

Transferin hücre içindeki önemli bir demir taşıyıcısıdır.¹⁴¹ Testis kan bariyerinin olduğu yerlerde testise pek çok elektrolit ve makromoleküllerin geçişi engellenir. Adluminal kompartmanlardan gelen demir, sertoli hücreleri tarafından üretilen transferin tarafından dolaşım sistemine taşınır.¹⁴²

Daha önce yapılan çalışmalar transferrin üretiminin germ hücreleri tarafından üretildiğini göstermiştir.¹⁴³ Daha yakın zamanda TNF- α 'nın sertoli hücrelerinde transferrin mRNA ve in vitro protein düzeylerini arttırdığı bulunmuştur.¹⁴⁴ Pentikäinen'in ve diğerleri tarafından yürütülen çalışmalarda TNF- α 'nın germ hücrelerde serum içermeyen koşullar altında kültürlenip insan seminiferous epitel

segmentlerinde gözlenen konsantrasyona bağımlı bir tarzda inhibe ettiğini bulmuşlardır.¹⁴⁵

TNF- α sertoli hücreleri üzerinde parankin etki gösterir.¹⁴⁶ TNF- α 'nın sıçan sertoli hücre kültürlerinde IL-1 α ve IL-6 üretimini arttırması mümkün olmuştur.¹⁴⁷ Bu veriler sonuçta sertoli hücrelerindeki TNF- α ve spermatogenezi etkileyebilir. Sitokin sekresyonunun sertoli hücrelerinin profilini değiştirebilir olduğunu yapılan bu çalışmalar düşündürmektedir.¹⁴⁸ Benbrahim-Tallaa ve arkadaşları testiste TNF- α 'nın seviyelerinin arttığını ve spermiyogenez sırasında genotoksik ürünlere karşı detoksifikasyon süreçlerinin değiştirilebilir olduğu hakkında öneride bulunmuşlardır.¹⁴⁹

Diğer sitokinler ve polisakkaritler ile birlikte TNF- α 'nın hem sertoli hücrelerinde hem de seminiferous pertitubular hücrelerinde uyarılabilir nitrik oksit sintaz (İnos) ve nitriti teşvik ettiği gösterilmiştir.¹⁵⁰

2.8.1.4. Testis İnterstisyel Hücrelerinde TNF- α 'nın Rolü

Testiküler makrofajlar TNF- α kaynağı olabilirler ve Leyding hücreleri membran sayısallaştırmaları ile yakından ilişkili olduğundan steroidogenezdeki Leyding hücrelerinde TNF- α 'nın bir rolü olup olmadığı araştırılmaktadır.¹⁵¹ Yapılan çalışmalarda inhibitör mekanizması TNF- α 'yı etkileyerek sterojenik akut düzenleyici protein olan mRNA ve protein düzeylerinde bir azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir.¹⁵²

2.9. TGF- β (Transforming Growth Factor- β)

TGF- β ailesi gelişimi çok yönlü kontrol eden ekstrasellüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubudur. Organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında çok önemli rol oynayan TGF- β ailesi, yapısal olarak ilişkili çok sayıda polipeptid büyüme faktörleri içerir, bunların her biri hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir¹⁸.

2.9.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında TGF- β

Hemen hemen her hücrede sentez edilen ve birçok hücre üzerinde bulunan kompleks hücre reseptör sistemi ile ilişkili olan TGF- β 'nın 3 farklı izoformu bulunmaktadır.¹⁵³ TGF- β 'nin fizyolojik homeostazisin regülasyonunda önemli görevleri bulunmaktadır. TGF- β aktivitesindeki bozukluk yumurtalık kanseri,¹⁹ pankreas kanseri²⁰ patogenesisi gibi durumlarda rol oynar. TGF- β 'nin aynı zamanda kemik defektlerinin iyileşmesinde önemli rolleri vardır.^{154, 155} Bu iyileştirici özellikleri özellikle iskemi reperfüzyon hasarında da görülmektedir. Rat ve tavşan modellerinde oluşturulan inmede TGF uygulanması infarkt alanlarını azaltmıştır.²¹

2.10. Kalsiyum Kanal Blokerler

İlk kalsiyum kanal blokeri (KKB) olan verapamilin bulunmasından neredeyse yarım asır geçmesine rağmen bu ilaçların hipertansiyondaki yerleri tartışılır olmuş ve inişli-çıkışlı bir seyir izlemiştir. Bu ilaçların, özellikle (dihidropiridinler) DHP'lerin en önemli artıları çabuk etki gösteren ve "etkin" antihipertansif ilaçlar olmalarıdır. Santral kan basıncında etkin bir şekilde düşürmektedirler. Bu yüzden özellikle 80'li yılların sonu ve 90'lı yılların başında çok sık olarak kullanılan antihipertansifler olmuşlardır. Ancak KKB' ler ile ilgili özellikle 90'lı yılların ikinci yarısından itibaren soru işaretleri oluşmaya başlamış, bu ilaçların özellikle kardiyak mortaliteyi artırdıkları ileri sürülmüştür.¹⁵⁶ Burada öne sürülen mekanizmalardan belki de en önemlisi DHP'lerin vazodilatasyonla refleks sempatik aktivite artışına ve oksijen tüketiminde artışa sebep olmalarıdır. Ancak çalışmalar, başlangıçta böyle bir etki olsa da sempatik aktivasyonun kalıcı olmadığını öne sürmektedir.¹⁵⁷ Kalsiyum kanal blokerleri uzun zamandan beri hipertansiyon, aritmi ve koroner kalp hastalıklarında kullanılmaktadır.¹⁵⁸ İlk zamanlarda variant anjinada kullanılırken, daha sonraları kararlı ve kararsız anjinayı

da içine alacak şekilde koroner kalp hastalığının hemen hemen bütün formlarında kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca miyokardın enfartüsünde de kullanılmıştır.¹⁵⁹

Kalsiyum kanal blokerlerinin pozitif etkileri şunlardır:

1. Vasodilatasyon ile periferik direnci azaltarak ard yükü düşürür.
2. Miyokardial oksijen istemini azaltır.
3. Kardiyak ve vasküler dokuda kalsiyum aşırı yükünü azaltır.¹⁵⁷

Miyoplazmadaki kalsiyum miktarı hücreye kalsiyum girişine bağlıdır. Kalsiyum yavaş kanallardan hücreye girerek daha sonra düzenleyici protein olan troponin ile bağlanarak tropomyozinin inhibitör etkisini kaldırır ve ATP varlığında myosin ve actin ilişkisi böylece başlamış olur bunun sonucunda kas hücresi kasılır. Kalsiyum kanal blokerleri plazma membranındaki voltaja bağlı kalsiyum kanallarını bloke ederek hücre içine kalsiyum girişini engeller. Böylece vasküler düz kastaki kasılma inhibe olarak vazodilatasyon oluşur.^{158, 159} Kalsiyum kanal blokörlerinin düz kas hücresindeki etkisi venöz yatağa göre arteryel duvarda çok daha fazladır.¹⁶⁰

Albrecht Fleckenstein kalsiyum kanallarının kalsiyum kanal blokerleri diye adlandırılmış olan ajanlar tarafından bloke edildiğini yaptığı çalışmalarla göstermiştir.¹⁶¹ Bu ajanlar kalsiyum kanal kanalları, kalsiyum entry kanal blokerleri veya yavaş kanal kanalları olarak da isimlendirilmektedir. L ve T tip olmak üzere 2 tip kalsiyum kanalı vardır.¹⁶² L-tipi kanallar özellikle kalp ve düz kaslarda olmak üzere dokularda genişçe yayılırlar.¹⁶³ L-tipi kanalların varlığı rat mesangial hücrelerinde de gösterilmiştir.¹⁶⁴ L-tipi kanalların DHP, fenilalkilaminlere ve benzodiazepinlere duyarlılığı yüksektir.¹⁶⁵ Klinik kullanımda olan kalsiyum kanal blokerlerinden L kanal blokerlerinin aktivitesi katekolaminler ile artar.¹⁶² T kanalları ise atriyumda bulunur. Ayrıca bunların normal ventrikül hücrelerinde bulunup bulunmadığı halen tartışılan bir konudur. T kanalları ayrıca vasküler düz adele hücrelerinde,

nörohormonal sekretuar hücrelerde de vardır. T kanallarının sinüs düğümünün ve atriyoventriküler nodal dokunun inisiyal depolarizasyonunda rol oynadığı ileri sürülmektedir.¹⁶²

Kalsiyum kanal blokerleri kimyasal yapılarına göre 3 grup içinde sınıflandırılmaktadır.

1. Fenilalkilamin grubu: prototip verapamil gallopamil, anipamil, romipamil, tiapamil.

2. Benzotiazepin grubu: prototip diltiazem

3. Dihidropridin grubu : prototip nifedipin, nitrendipine, felodipine, nicardipine, isradipine, amlodipine ve nisoldipine, niludipine, flordipine, silvadipine, darodipine, azodipine, diazodipine, iodipine, lacidipine, mesudipine, nilvadipine, oxodipine, riodipine, ryosidine ve vadipine'dir.¹⁵⁸

2.10.1. Amlodipin

Amlodipin kalsiyum antagonistlerinin en yaygın kullanılanlarındandır ve tüm dünyada hipertansiyon popülasyonlarında kullanılır. Amlodipin vasküler düz kas içine kalsiyum iyonlarının transmembran akışını önleyen bir dihidropirin kalsiyum antagonistidir.¹⁶⁶ Üçüncü nesil Dihidropridin türevi olan amlodipinin antihipertansif etkisi dışında antioksidan aktivitesi, lipid peroksidasyonunun inhibiyonu, nitrik oksit üretiminin artırılması, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunun azaltılması ve SOD aktivitesinin korunması gibi özelliklerinin de olduğu bildirilmiştir.¹² Amlodipinin üzerine yapılan deneysel çalışmalarda iskemik kalpte NO üretimi arttırdığı ve aynı zamanda endotel hücrelerinde eNOS aktivitesini arttırdığı ve köpeklerde miyokardiyal oksijen tüketiminde azalmaya neden olduğu bildirmişlerdir.^{167, 168} Oksidatif stres NO'yu inaktive eder ve amlodipin oksidatif stresi bastırır.^{169, 170}

Esas etki yeri periferik damarlardır. Periferik vazodilatasyonla, sistemik vasküler rezistansı azalttığı ve koroner kanlanmayı artırdığı için antianginal etki gösterir. Bu özellikle koroner spazm durumlarında miyokarda oksijen sağlanmasını artırır.¹⁷¹ Çeşitli çalışmalarda örneğin diğer I/R organlarından olan beyin¹⁴, kalp¹⁵ ve karaciğerde¹⁶ amlodipinin koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir.

Günümüzde pek çok ilaç hipertansiyon, kanser ve diyabet tedavisinde kullanılır. Ancak bu ilaçların yaşa bağlı ortaya çıkan problemler üzerindeki etkileri çalışılmamıştır. Örneğin: dihidropiridin türevi olan kalsiyum kanal blokerleri Amlodipin, lasitipin ve nikardipin hipertansiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Geniş çaplı klinik deneyler sonucunda bu ilaçların kan basıncını düşürerek kardiyovasküler hastalıkları önlediği ayrıca invitro denemelerle damarlar üzerindeki antioksidan etkilerinin varlığı gösterilmiştir.¹⁷²

Buna ek olarak amlodipinin hayvanlarda¹⁷³ ve insanlarda ki¹⁷⁴ anti aterosklerotik ve anti inflamatuvar etkilerinin varlığı da gösterilmiştir.

Yapılan önceki çalışmalarda ise amlodipinin overiyal I/R hasarına karşı protektif ve antiosteoprotik etkilerinin varlığı da gösterilmiştir.^{175, 176}

Amlodipinin güçlü antioksidan özelliğinde olması vasküler iskemilere bağlı gelişen organ hasarlarının azalmasına sebep olmaktadır.¹² Ve bu ilacın anti inflamatuvar etkileri şimdi çok daha iyi tanımlanmaktadır.¹⁷⁷

Hipertansiyon oluşturulmuş ratlarda oluşturulan bir felç modelinde amlodipin tedavisinin beyin hasarını azalttığı ve bu etkileri SOD'u arttırarak ortaya koyduğu gösterilmiştir.¹⁷⁸

Ayrıca amlodipin ile tedavi edilen ratlarda kronik arter tıkanıklığına bağlı gelişen arter oklüzyonunda azalma olmuştur.¹⁷⁹

2.10.1.1. Farmakodinamik Özellikleri

Amlodipin, miyokardial hücreler ve düz kas hücreleri seviyesinde kalsiyum iyonlarının transmembran akımını inhibe ederek etki gösteren bir kalsiyum antagonistidir.¹⁶⁶

Uzun süredir bilinen antianginal etkisinin temel mekanizmaları şunlardır :

- Amlodipin, total olarak periferik direnci azaltır. Birlikte refleks taşikardi olmaması nedeniyle, kardiyak yükün azalması, miyokardın oksijen gereksinimi ve tüketiminin azalması şeklinde kendini gösterir. Bu amlodipin'in kardiyak iskemideki etkinliğini açıklar¹⁸⁰

- Amlodipin, koroner genişlemeyi yavaş kalsiyum kanallarından kalsiyum girişini inhibe ederek sağlar. Esas etki yeri periferik damarlardır. Periferik vazodilatasyonla, sistemik vasküler rezistansı azalttığı ve koroner kanlanmayı artırdığı için antianginal etki gösterir. Bu özellikle koroner spazm durumlarında miyokarda oksijen sağlanmasını artırır. (Prizmetal veya variant angina)¹⁸¹

2.10.1.2. Farmakokinetik Özellikleri

Amlodipin oral uygulamadan sonra iyi absorbe olur. En yüksek plazma konsantrasyonuna 6-12 saat sonra ulaşır. % 97.5 kadar oranda plazma proteinlerine bağlanır. Terminal eliminasyon yarı ömrü 35-50 saate kadar uzar. Plazmada sabit konsantrasyona uygulamaya başladıktan 7-8 gün sonra ulaşır. Amlodipin büyük ölçüde karaciğerde metabolize olur. Metabolitleri ve alınan dozun % 10'undan az kısmı değişmeden idrar ile vücuttan atılır¹⁸²

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Moleküler Farmakoloji Araştırma Laboratuvarı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATADEM) bünyesindeki deneysel hayvan laboratuvarından temin edilen toplam 48 adet ve ağırlıkları 180-200 gram arasında değişen Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney süresince, sıçanlara yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu, Standart Sıçan Yemi) verildi. Hayvanlar deney öncesi gruplar halinde laboratuvarında normal oda sıcaklığında (22 C⁰) barındırıldı ve beslendi. Çalışmalarımızın tüm aşamaları Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 30.07.2013 tarih ve 3517 sayılı yazısı ve Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulunun 29.08.2013 tarih ve 3 sayılı oturumunun 91 numaralı kararı ile etik kurallara uygun olduğu onaylanmıştır.

3.1.2. Kullanılan İlaçlar

Amlodipin: Norvacs 10 mg Tb (Pfizer İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) Çalışmada sıçanlara belirlenen saatlerde 5 mg/kg ve 10 mg/kg (oral) olarak verildi. Amlodipin 2 ml serum fizyolojik içinde çözülerek uygulanmıştır.

Tiyopental Sodyum: Çalışmada Tiyopental (Pental Sodyum, İbrahim Ethem Ulagay İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) i.p. olarak ötenazi için 50mg/kg olarak verildi.

3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Cihazlar	Modeli ve Firması
Eliza Okuyucu	Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA
Mikroplate Yıkayıcı	Stat Fax 2600 Microplate Washer, USA
Santrifüj (Soğutmalı)	Hettich Zentrifugen 320R, Germany
pH Metre	SCHOTT Instruments Lab 850, Germany
Manyetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A, Germany
Doku Homojenizatörü	Tissue Lyser II Qiagen, Germany
Hassas Terazi	Shimadzu ATX224, USA
Etüv	Memmert WNB 7-45, Germany
Karıştırıcı	IKA- MS 3 basic, USA
Buzdolabı (-86 °C)	Nuaire NU-9483E, USA
Derin Dondurucu	Vestel BZP-XL3402W, Türkiye
Otomatik Multikanal Pipet	Eppendorf Research Pro (20-300µ)
Pipet Seti	Eppendorf Research Plus

3.2. Metot

3.2.1. Deney Planı

Çalışmada ağırlıkları 180-200 gr arasında değişen 48 adet Wistar-Albino erkek sıçan çalışmaya alındı. Sıçanlar randomize olarak 6'şarlı olmak üzere 7 deney grubu ve 1 kontrol grubu olmak üzere toplam 8 gruba ayrıldı. Bütün sıçanlara ısı ve ışık miktarları kontrol edilen odalarda su ve yemleri sağlanarak bakıldı.

Gruplar şu şekildedir:

Grup Tasarımı:

Grup I: Sham Operasyonu

Grup II: 2 Saat Testis Torsiyon

Grup III: 2 Saat Testis Torsiyon+ 2 Saat Detorsiyon

Grup IV: 2 Saat Testis Torsiyonu +Torsiyondan 30 dk önce Amlodipin 5 mg/kg (oral)

Grup V: 2 Saat Testis Torsiyonu +Torsiyondan 30 dk önce Amlodipin 10 mg/kg (oral)

Grup VI: 2 Saat Testis Torsiyonu + 2 Saat Detorsiyon+ Detorsiyondan 30 dk önce Amlodipin 5 mg/kg (oral)

Grup VII: 2 Saat Testis Torsiyonu + 2 Saat Detorsiyon+ Detorsiyondan 30 dk önce Amlodipin 10 mg/kg (oral)

Grup VIII: Sham + Amlodipin 10 mg/kg

Cerrahi girişim öncesi sıçanların sağlıklı olmaları dikkate alınarak sıçanlara 25 mg/kg dozda tiopental sodyum kas içine uygulanarak genel anestezi yapıldı. Skrotal bölge traş edilip temizlendikten sonra %10'luk povidon-iyot solüsyonu ile dezenfekte edilerek ilioinguinal kesi atıldı. Skrotal boşlukta önce sol testis tunika vaginalis ve spermatik kord ile birlikte gubernakulumdan künt disseksiyonla ayrılarak dışarıya alındı. Daha sonra sol testis kord elemanı ile birlikte saat yönünde olacak şekilde 720° döndürülerek deneysel ekstravaginal testis torsiyonu modeli oluşturularak 6/0 propilen dikişlerle skrotum iç yüzeyine yerleştirildi.

Tablo 3.1. Deney Planı

Gruplar	Hayvan Sayısı	Tedavi	Doz
I	6	Sham	
II	6	Testis İskemi	
III	6	İskemi Reperfüzyon	
IV	6	İskemi+Amlodipin	5 mg/kg
V	6	İskemi+Amlodipin	10 mg/kg
VI	6	IR+Amlodipin	5 mg/kg
VII	6	IR+Amlodipin	10 mg/kg
VIII	6	Sham+Amlodipin	10 mg/kg

3.2.1.1. Gruplar

İlk grup kontrol (K) grubuydu. Grupta altı sıçan yer alıyordu. Bu gruptaki sıçanların sadece karın bölgeleri açıldı. Testislerine torsiyon/detorsiyon modeli uygulaması yapılmayarak tekrar kapatıldı. 4 saat sonra gerekli incelemeler için sıçanlara yüksek doz tiopental sodyumla ötenazi yapılarak testisleri cerrahi olarak alındı.

İkinci grup altı sıçandan oluşan torsiyon grubuydu. Bu gruptaki sıçanların herbirinin sol testisleri kord elemanı ile birlikte saat yönünde olacak şekilde 720° döndürülerek deneysel ekstravaginal testis torsiyonu modeli oluşturularak 6/0 propilen dikişlerle skrotum iç yüzeyine yerleştirildi. 2 saatlik torsiyon süresi sonunda testisler cerrahi olarak çıkarıldı ve sıçanlara yüksek doz tiopental sodyumla ötanazi yapıldı.

Üçüncü grup altı sıçandan oluşan torsiyon/detorsiyon grubuydu. Bu gruptaki sıçanların herbirinin sol testisleri kord elemanı ile birlikte saat yönünde olacak şekilde 720° döndürülerek deneysel ekstravaginal testis torsiyonu modeli oluşturularak 6/0 propilen dikişlerle skrotum iç yüzeyine yerleştirildi. İki saatlik torsiyon süresi sonunda detorsiyon gerçekleştirildi.

Dördüncü grupta ki sıçanlara diğer gruplardan farklı olarak torsiyon modeli oluşturulmadan yarım saat önce Amlodipin 5 mg/kg oral gavaj yöntemi ile uygulandı. Ve daha sonra sıçanların herbirinin sol testisleri kord elemanı ile birlikte saat yönünde olacak şekilde 720° döndürülerek deneysel ekstravaginal testis torsiyonu modeli oluşturularak 6/0 propilen dikişlerle skrotum iç yüzeyine yerleştirildi. İki saatlik torsiyon süresi sonunda testisler cerrahi olarak çıkarıldı ve sıçanlara yüksek doz tiopental sodyumla ötanazi yapıldı.

Beşinci gruptaki altı sıçana da dördüncü gruptakinden farklı olarak torsiyon modeli oluşturmadan yarım saat önce uygulanan Amlodipin dozu 10 mg/kg sıçanlara yine oral gavaj yöntemi ile uygulandı. Ve daha sonra sıçanların herbirinin sol testisleri kord elemanı ile birlikte saat yönünde olacak şekilde 720° döndürülerek deneysel ekstravaginal testis torsiyonu modeli oluşturularak 6/0 propilen dikişlerle skrotum iç yüzeyine yerleştirildi. İki saatlik torsiyon süresi sonunda testisler cerrahi olarak çıkarıldı ve sıçanlara yüksek doz tiopental sodyumla ötanazi yapıldı.

Grup 6 ve 7'ye yukarıda anlatıldığı gibi iskemi ve sonrasında reperfüzyon oluşturuldu, iskemi bitimine yarım saat kala Amlodipin'in (5 mg/kg ve 10 mg/kg) dozları oral gavaj yoluyla verildi. Ve daha sonra sıçanların herbirinin sol testisleri kord elemanı ile birlikte saat yönünde olacak şekilde 720° döndürülerek deneysel ekstravaginal testis torsiyonu modeli oluşturularak 6/0 propilen dikişlerle skrotum iç yüzeyine yerleştirildi. İki saatlik torsiyon süresi tamamlanmadan yarım saat önce sıçan testislerinde detorsiyon modeli oluşturulmadan yarım saat önce Amlodipin 5 mg/kg ve 10 mg/kg oral gavaj yöntemi ile uygulandı. 2 saatlik detorsiyon süresi sonunda testisler cerrahi olarak çıkarıldı ve sıçanlara yüksek doz tiopental sodyumla ötanazi yapıldı.

Sekizinci ve son gruptaki altı sıçana da 10 mg/kg amlodipin verildi. Ve bu gruptaki sıçanların testislerine testis torsiyon/detorsiyon modeli uygulaması

yapılmayarak sadece gerekli incelemeler için testisler cerrahi olarak alındı ve sıçanlara yüksek doz tiopental sodyumla ötenazi yapıldı.

Tüm gruptaki sıçanlar çalışma sonrası yüksek doz tiopental ile ötanazi uygulanarak deney sonlandırıldı. Tüm gruplardaki hayvanların kan örnekleri toplandı ve testisleri alındı. Alınan testislerden uygun miktarda doku alınarak biyokimyasal analiz için ayrıldı ve -80°C’de saklandı. Kalan testis dokusu, histopatolojik çalışma için % 10’luk nötral formaldehit çözeltisine konularak tespit edildi. Toplanan kanlar santrifüj edilerek serumları elde edildi ve serumlar -80°C dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.2. Histopatolojik Çalışmalar

3.2.2.1. Işık Mikroskopik İşlemler

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında Konvansiyonel ışık mikroskobu işlemlerinin tümü gerçekleştirilmiştir.

Akarsuda yıkama: Dokular 1 saat yıkandı.

Dehidratasyon işlemi (dereceli alkol serilerinden geçirme): Bu amaçla artan alkol serilerinden (Pelco) geçirildi. Bu amaçla;

-%50’lik Alkolde 20 dk,

-%60’lik Alkolde 20 dk,

-%70’lik Alkolde 20 dk,

-%80’lik Alkolde 20 dk,

-%90’lık Alkol’de 1 saat,

-%100’lük Alkolde 1 saat,

-%100’lük Alkol de 1 saat bekletildi.

Ksilen serileri (Merc) ® ile şeffaflaştırma işlemi: Bu amaçla;

-1/1 oranında Ksilen/Etil Alkol’de 15 dk,

-Ksilende 75 dk,

İnfiltrasyon işlemi (parafin serilerinden geçirme)

-Ksilen + boncuk parafin (Merck) ® karışımında 60° C'lik etüvde 1 saat,

-Boncuk parafinde 60° C'lik etüvde 1 saat,

-Boncuk parafinde 60° C'lik etüvde 2 saat bekletildi.

Dokuların parafin bloklara gömülmesi;

Elde edilen parafin bloklara gömülü bulunan dokular, (Leica RM2125RT) mikrotomunda 5 µm kalınlığında kesilerek, boyama işlemlerine hazır hale getirildi. Daha sonra kesitler, ışık mikroskobu düzeyinde incelenmek üzere boyandı.

3.2.2.2. Dokuların Hematoksilen ve Eosin (H&E) Boyanma İşlemi

Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2125RT) ile kesilen 5 µm'lik kesitler deparafinizasyon işlemi için lama yerleştirilerek 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilerek, kimyasal deparafinizasyon işlemi için 10'ar dakika 2 değişim ksilende tutuldu. Sırayla % 95, % 80, % 70, % 60 etil alkol serilerinde 2 dakika bekletilen kesitler 5 dakika çeşme suyunda yıkandı. Kesitler 5 dakika hematoksilen boya solüsyonunda tutulduktan sonra 5 dakika çeşme suyunda yıkandı. Diferansiyasyon işlemi için asit alkol solüsyonuna 1-3 saniye batırılıp çıkarılan kesitler 5 dakika çeşme suyunda yıkandı. 2-3 dakika eosin boya solüsyonunda tutulan kesitler tekrar 1-5 dakika çeşme suyunda yıkandı. %80'lik alkolde 10 dakika, iki ayrı %96'lık alkol serisinde 10 dakika bekletilen kesitler üç ayrı ksilol serilerinde 20 dakika bekletildikten sonra, üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı ve penset yardımıyla hava kabarıkları çıkarıldı.

3.2.2.3. Kesitlerden Görüntü Elde Edilmesi

Gruplara ait kesitlerin fotoğraflar Olympus BH 40 marka kamera ataçmanlı ışık mikroskobu altında analiz edilerek çekildi.

Tablo 3.2. Histopatolojik değerlendirme

EVRE	BULGU
1	Düzenli sıralı germ hücreleri ile birlikte normal testis dokusu
2	Daha az düzenli germ hücreleri, düzensiz yakınlaşmış seminifer tübüller
3	Düzensiz germ hücreleri, küçülmüş piknotik çekirdek ve sınırları bozulmuş seminifer tübüller
4	Düzensiz, koagülasyon nekrozu oluşmuş germ hücreleri ile dolu seminifer tübüller

3.2.3. Biyokimyasal Çalışmalar

3.2.3.1. Testis Dokusunda Yapılan Analizler

Makroskopik analizlerden sonra, rat dokuları -80°C’de saklandı. Her ratın 100mg dokusu spesifik homojenat tamponunda, Tissue Lyser ile homojenize edildi. Daha sonra kitteki direktiflere göre santrifüj edildi. Biyokimyasal çalışmalar için her süpernatanttan SOD, MDA seviyeleri ve GSH seviyeleri manuel ölçüm metodlarıyla ölçüldü.¹⁸³ Ayrıca uygun tampon ile homojenize edilmiş tüm testis süpernatantlarında total protein analizi yapıldı. Bütün datalar her mg protein için ort ± standart sapma olarak gösterildi.

Protein tayini: Protein konsantrasyonları ticari protein standartları kullanılarak Lowry metodu ile tespit edildi. (Sigma Aldrich, Total protein kit-TP0300-1KT-USA).¹⁸³

Homojenat Tamponu: Fosfat Tamponu (50 mM pH 7.8, + 10 mM EDTA) veya PBS Ölçüm karışımı: Xantine (0.3 mM, 40 ml), EDTA(Etilendiamin tetraasetik asit) (0.6 mM, 20 ml), NTB (Nitro blue tetrazolium) (150 µM 0,00015 M, 20 ml), Na₂CO₃ (0.4M, 12 ml), BSA (Bovine Serum Albumine) (1.2 g /L),

XO (Xanthine oksidaz) (167 U/L),

(NH₄)₂SO₄ (Amonyum Sülfat) (2M, 2 ml),

SOD Standartları.

Deneyin prensibi: Bu metotta, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalleri Tetrazolium'u indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda meydana gelen indirgenme mavi-mor renk oluşturmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise Tetrazolium indirgenmesi tam olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmakta, buradan aktivite hesabı yapılabilmektedir.¹⁸³

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu¹⁸³;

1. Dokular kırmızı kan hücresi ve pıhtılarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkanır,
2. 0.1 gram doku 1ml homojenat tamponu ile karıştırılır,
3. 10 µl Triton x-100 ilave ederek homojenizatörde 1 dakika boyunca homojenize edilir,
4. 12000 rpm' de 15 dakika 4° C de santrifüjlenir,
5. Süpernatant (üstte kalan berrak kısım) enzim çözeltisi olarak kullanılır.

Çalışma prosedürü:

1. Çalışmada 96 kuyucuklu plate kullanılır,
2. Her kuyuya ölçüm karışımından 200'er µl eklenir,
3. Standartlar hazırlanarak 50 µl standartlar sırasına eklenir,
4. Numune çözeltilerinden uygun kuyucuklara 50'şer µl eklenir,
5. Kör kuyusuna 50 µl homojenat tamponu eklenir,
6. Oda sıcaklığında herbir kuyucuğa 5'er µl XO eklenir,
7. İlk kuyucuğa XO eklendikten 20 dakika geçtikten sonra 560nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılır.¹⁸⁴

SOD aktivitesinin hesaplanması: Oluşan mavi-mor rengindeki formazon boyasındaki azalmanın absorbans miktarları 560 nm'de 96'lık well plate kullanılarak okundu ve

seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan SOD stok çözeltisi ile oluşturulan standart grafikten yararlanarak ölçümler hesaplandı. Numunelerin SOD aktivitesi, U/mg protein olarak tarif edildi. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar yapılarak belirlendi.¹⁸³

Manuel olarak Total Glutasyon (GSH) tayini:

Homojenat Tamponu: Tris-HCl (Tris-Hidroklorik asit) (50 mM, pH 7.4) veya PBS

Ölçüm Tamponu: Tris-HCl (200 mM pH 8,2 + 0.2 mM EDTA)

DTNB (Ditiyobis Nitrobenzoik Asit) (10 mM)

GSH Standartları

GSH miktarının ölçülmesi ve prensibi: Sedlak ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi. Ölçüm ortamındaki DTNB 5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) disülfid bir kromojendir ve sülfhidril gruplu bileşikler tarafından kolayca indirgenir. Meydana gelen sarı renk 412 nm spektrofotometrik olarak ölçülebilir.¹⁸³

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu¹⁸³;

1. Dokular kırmızı kan hücresi ve pıhtılarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkanır,
2. 0.1 g doku üzerine 4.5 ml homojenat tamponu ilave edilerek homojenize edilir,
3. Homojenatlar, 12000 g 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilir ve süpernatantlar, GSH miktarının belirlenmesinde kullanılır.

Çalışma prosedürü:

1. Çalışmada 96 kuyucuklu plate kullanılır,
2. Ölçüm tamponundan her kuyuya 150'şer µl eklenir,
3. DTNB'den her kuyuya 10'ar µl eklenir,
4. Numunelerden 50'şer µl uygun kuyulara eklenir ve kısaca vortekslenir,
5. Standartlar uygun kuyulara 50'şer µl eklenir,

6. K r kuyusuna 50  l homojenat tamponu eklenir,
7. 30 dakika 37  C de inkübasyona bırakılır ve
8. 412 nm dalga boyunda absorbands okunur.¹⁸⁵

GSH miktarının hesaplanması: Oluşan sarı renk miktarları 412 nm'de 96'lık well plate kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan GSH stok  zeltisi ile oluşturulan standart grafikten yararlanarak ölümler hesaplandı. Numunelerin GSH miktarları, nmol/mg protein olarak tarif edildi. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar yapılarak belirlendi.¹⁸³

Manuel olarak Malondialdehit (MDA) tayini:

Homojenat Tamponu: % 10'luk KCl (potasyumklor r) veya PBS

Ölüm Tamponu:

% 8 SDS (Sodium dodesyl sulphate)

% 0.08 TBA (tiobarb tirikasit)

% 20 Asetik asit

Saf su

MDA Standartları 1,1,3,3-Tetraethoxypropane

MDA miktarının  l lmesi ve prensibi: Asidik ortamdaki tiyobarbitürik asit ile 90-95  C'de reaksiyona giren MDA, pembe renkli kromojen meydana getirir. 15 dakika kaynatıldıktan sonra hızla soğutulan numunelerin absorbandsları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okunur.¹⁸³

Deneyin yapılışı:

Doku homojenizasyonu ¹⁸³;

1. Dokular sıvı azot altında homojenize edilmeden önce PBS ile yıkanır,
2. Sıvı azotla parçalanmış numuneler 100mg tartılır,

3. 0.1 g doku üzerine 1 ml homojenat tamponu ilave edilerek tissue lyser'da homojenize edilir,

Çalışma prosedürü:

1. Çalışmada 96 kuyucuklu plate kullanılır,
2. Tüm kuyulara 10µl SDS, 75 µl asetik asit, 75 µl TBA ve 20 µl saf su eklenir,
3. Numune kuyularına 20'şer µl uygun numunelerden eklenir,
4. Kör kuyusuna 20 µl homojenat tamponu eklenir,
5. Standartlar uygun kuyulara 20'şer µl eklenir,
6. Pipetlemeler yapıldıktan sonra plate, 105° C de bir buçuk saat inkübe edilir,
7. İnkübasyon sonunda plate, 4000 rpm de, 4° C de, 15 dakika santrifüjlenir,
8. Süpernatant (üstte kalan berrak kısım) MDA çözeltisi olarak kullanılır,
9. 532 nm dalga boyunda absorbans okunur.¹⁸⁶

MDA miktarının hesaplanması: Oluşan pembe renk miktarları 532 nm'de 96'luk well plate kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan MDA stok çözeltisi ile oluşturulan standart grafikten yararlanarak ölçümler hesaplandı. Numunelerin MDA miktarları, nmol/mg protein olarak tarif edildi. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar yapılarak belirlendi.¹⁸³

3.2.4. Moleküler çalışmalar

3.2.4.1. Gerçek Zamanlı PCR Analizi

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında moleküler analiz işlemlerinin tümü moleküler laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.2. RNA İzolasyonu

1. Testis diseke edildi ve eppendorf tüp içerisine alındı. Tüm dokuyu kaplayacak şekilde RNA Later RNA Stabilization Reagent (Qiagen) solüsyonu ilave edildi. Doku

içerisine nüfuz etmesini sağlamak amacı ile 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra 20°C’de muhafaza edildi.

2.Dokular RNA Later içerisinden çıkartılarak 600 µl Buffer RLT + 6 µl β-mercaptoethanol (β-ME) solüsyonu ile birlikte içerisinde 1 adet steril çelik bilye bulunan plastik tüplere konuldu ve Tissue Lyser II (Qiagen) homojenizasyon cihazı ile 2,5 dk 25 Hz olacak şekilde homojenize edildi.

3.Hojenizasyon işleminden sonra yeni bir eppendorf tüp içerisine alındı ve 3 dk 13.000 rpm’de santrifüj edildi.

4.Santrifüjden sonra süpernatant yeni bir eppendorf tüpe alındı ve RNeasy Mini Kit ‘in protokolüne göre total RNA isolationu Qiagen) Qiagen yapıldı.

5.Eppendorf tüpü içerisinde elde edilen RNA -80°C de saklandı.

RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

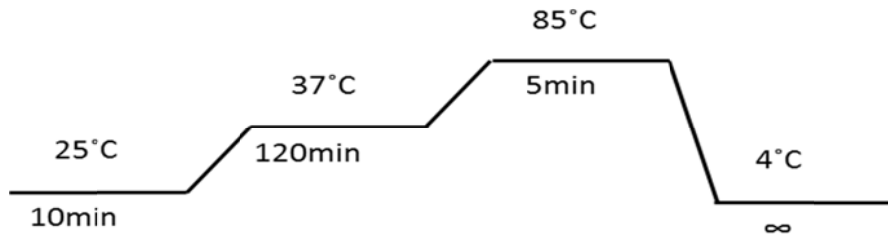
RNA’nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla 995 µl distile su + 5 µl RNA olacak şekilde vortekslenerek karıştırıldı ve spektrofotometrede (EPOCH Take3 Plate, Biotek) 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı.

3.2.4.3. cDNA (complementer DNA) Sentezi

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit enzimi kullanımı ile total RNA’dan cDNA sentezi yapıldı. Her reaksiyon Tablo 3.1’de gösterildiği gibi toplam hacim 10µl RNA olacak şekilde hazırlandı ve cDNA sentezi Şekil 3.3’deki sıcaklık değerlerine göre Veriti 96 Well Thermal Cyclers (Applied Biosystem) ile sağlandı. cDNA miktarı nano-drop spektrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek) ile ölçüm belirlendi ve -20°C’de saklandı.

Tablo 3.3. cDNA sentezi için kullanılan mix içeriği

PCR Master mix içeriği	Mix Miktar(μ l)
10X Buffer RT	2
25 X dNTPs mix	0,8
10 X RT Random Primers	2
MultiScribe Reverse Transcriptase	1
DEPC-H ₂ O	4,2
RNA	10
Toplam	20



Şekil 3.1. Thermal cycler koşulları ¹⁸

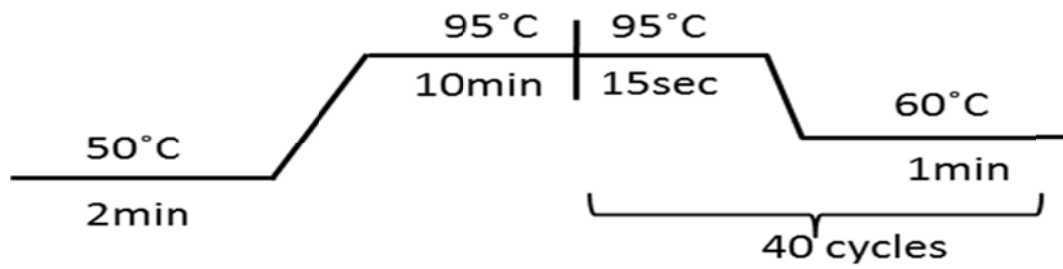
Tablo 3.4. Rölatif Gene Ekspresyonu analizi

TNF- α	İleri primer	GCTCCCTCTCATCAGTTCCA
	Geri primer	CTCCTCTGCTTGGTGGTTTG
TGF- β	İleri primer	CGCAACAACGCAATCTATGAC
	Geri primer	GGACAGCAATGGGGTTCT

3.2.4.4. Gerçek Zamanlı PCR Primerleri ve Çalışma Prensipleri

Rölatif TNF- α ve TGF- β mRNA ekspresyonları rat testis dokularında StepOne Plus Real Time PCR System technology (Applied Biosystem) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. TaqMan bazlı ilgili genlerin primer problemleri Primer Design Ltd. firmasında dizayn ettirilip temin edildi (Southampton, UK). Sonuçlar kontrol grubuna göre rölatif-kat olarak değerlendirildi. Endojen kontrol gen olarak β -actin kullanıldı ve

her bir cDNA örneği için üç tekrar uygulandı. Real Time PCR reaksiyonu 96 kuyucuklu plaklarda 9 µl cDNA (100 ng), 1 µl Primer Perfect Probe miks ve 10 µl QuantiTect Probe PCR Master miks (Qiagen, Hilden, Germany) olacak şekilde toplam reaksiyon volumü her bir kuyucukta 20 µl'ye tamamlandı. qPCR Hazırlanan reaksiyon plağı 2 dk 50°C, 10 dk 95 °C'de bir siklüs ve 15 sn 94 °C, 60 sn 60 °C'de 40 siklüs olacak şekilde yürütüldü. Tüm veriler kontrol grubuyla karşılaştırmalı şekilde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre hesaplandı.¹⁸⁷



Şekil 3.2. Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyon ısı ve süreleri¹⁹

DNA'nın çift sarmal yapısı birbirinden ayrılarak tek iplikli hale geldi. Sonra hibridizasyon basamağı ile primerler bağlandı ve amplifiye edilecek bölgeyi kesti. Ardından polimerizasyon basamağında ise sentez gerçekleştirildi. Hibridizasyon ve polimerizasyon basamağı 40 döngü devam ettirildi (Burada 95° C'de 15 saniye kalmasının sebebi sentezi yapılan kısma tekrar primer bağlanması için denatüre olmasını sağlamaktır). 40 döngü sonunda örneklerin amplifikasyon kalitelerini anlamak için (kaç ürün amplifiye olduğunu görmek için) 55° C'den 95° C'ye hızlı bir şekilde ısıtılarak melt analizi yapıldı.

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Deneylerden elde edilen sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi ve 0.05'in altındaki P değerleri, istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile ve post-hoc

testlerinden ‘‘Duncan’’ tekniği kullanılarak belirlendi. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Her bir farklı harf diğer gruptan istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir. Aynı harfler anlamsız olduğunu göstermektedir.

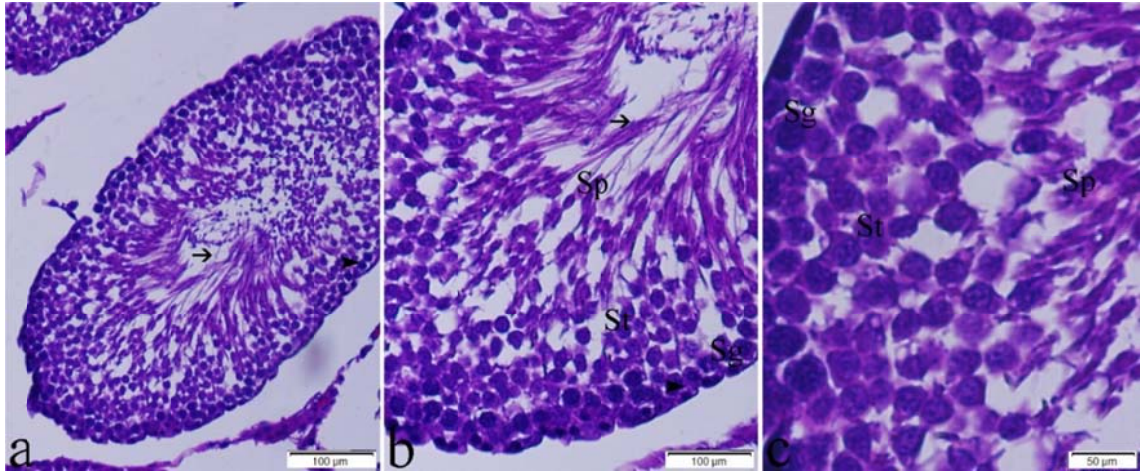
4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

4.1.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.1.1.1. Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyama

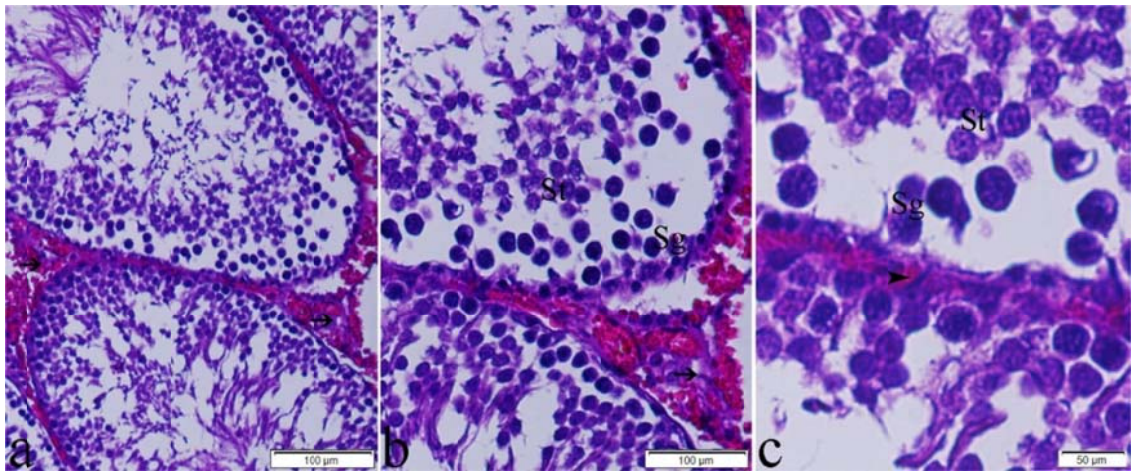
Grup 1'e (Sham Grubu) Ait Bulgular: Histopatolojik olarak sham grubuna ait testis kesitleri değerlendirildiğinde seminifer tübüllerin yapısı normal olarak görülmekteydi. Bazal membran ve onun üzerine yerleşmiş germinal epitel sağlıklı olarak izlenmekteydi. Seminifer tübüllerin lümenlerinin olgun spermatidlerin kuyrukları ile dolu olduğu görülmekteydi (Şekil 1. A, B). Daha büyük büyütmelerde tübül duvarındaki spermatogonyal seriyi oluşturan hücreler ayırt edilebilmekteydi. Bazal kompartmana yerleşmiş olan spermatogonyumlar, adlüminal kompartmandaki spermatositler ve lümene en yakın bölümlerdeki olgunlaşmakta olan spermatidler normal yapıda izlenmekteydi (Şekil 1.B, C).



Şekil 4.1. Sham grubunun kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. ok: adlüminal kompartman, ok başı: bazal kompartman, Sg: spermatogonyum, St: spermatosit, Sp: spermatid.

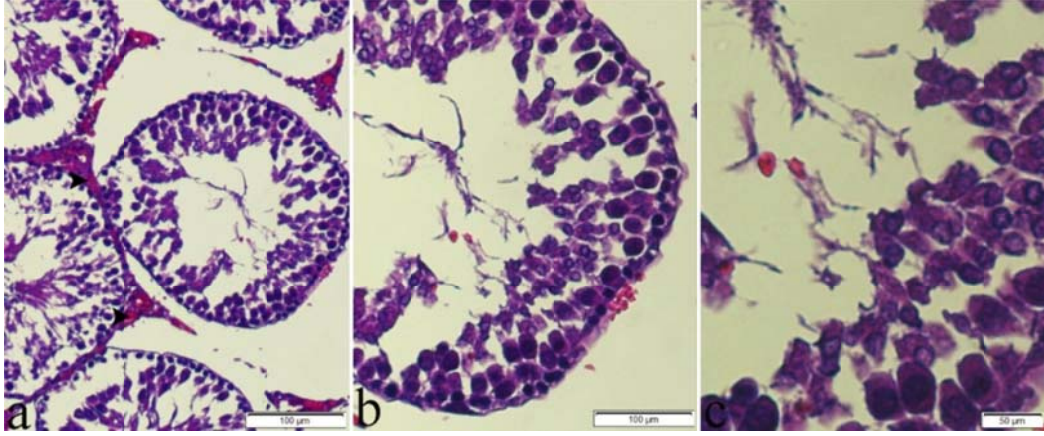
Grup 2'ye (Testis İskemi Grubu) Ait Bulgular: İskemi yapılan gruba ait testis kesitleri değerlendirildiğinde ilk izlenimde seminifer tübüllerin düzensiz sınırları dikkat çekmekteydi. Tübüllerin hemen hemen hepsinde germinal epitelin kalınlığı azalmıştı.

Bazal membranda kalınlaşma mevcuttu. Bunun yanı sıra germinal epitel-bazal membran arasında normalde gözlenmeyen kan hücreleri göze çarpmaktaydı (Şekil 2. C). Germinal epiteli oluşturan hücreler arasında fazla miktarda ödem bulguları mevcuttu (Şekil 2.A, B, C). İnterstisyumda yaygın hiyalinizasyon ve kanama dikkat çekici bulgular arasındaydı (Şekil 2. A, B). Daha büyük büyütmelerde bazal kompartmandaki spermatogonial hücreler arasında kopukluk ve düzensizlik izlenmekteydi (Şekil 2. B, C).



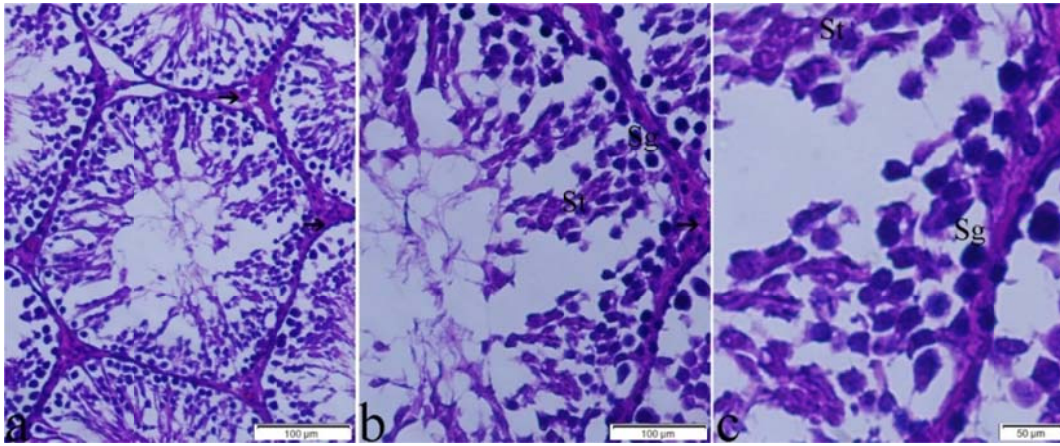
Şekil 4.2. İskemi yapılan grubun kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. ok: interstisyel bağ dokusu, ok başı: bazal membran, Sg: spermatogonyum, St: spermatozoid, Sp: spermatozoid.

Grup 3'e (I/R Grubu) Ait Bulgular: Bu gruba ait kesitlerdeki seminifer tübüller histolojik açıdan çok fazla hasarlı görülmekteydi. Aynı zamanda interstisyel dokuda fazla kanlanma bulguları dikkat çekmekteydi (Şekil 3.A, B). Kanın damar-dışına sızıışı-extravasküler kanama- tübüllerin sınırına kadar devam etmekteydi (Şekil 3.B, C). Seminifer tübüllerde germinal epitelin kalınlığı çok fazla incelmşti. Tübüllerin lümeninde ise olgun sperm hücrelerinin kuyrukları çok az sayıda izlenmekteydi.



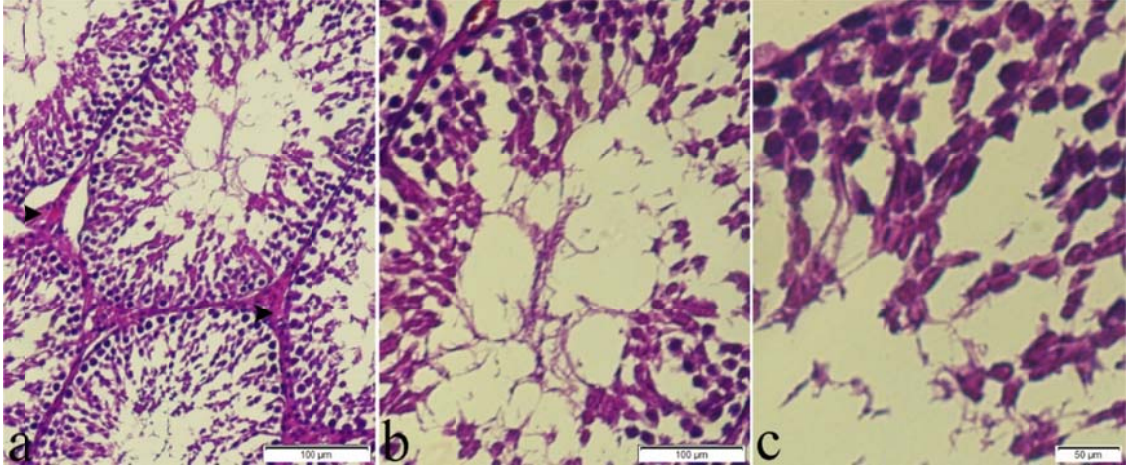
Şekil 4.3. İskemi-reperfüzyon yapılan grubun kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. ok başı: bazal kompartmanda ödem, Sg: spermatogonyum, St: spermatisit.

Grup 4'e (Testis İskemi+ Amlodipin 5mg/kg Grubu) Ait Bulgular: İskemi yapılan + Amlodipin 5 mg/kg verilen grubun testis kesitleri incelendiğinde seminifer tübüllerin düzensiz sınırları izlenmekteydi. Tübüllerin duvarını oluşturan germinal epitel kalınlığı iskemi yapılan grupla karşılaştırdığımızda çok fazla değişmemekteydi (Şekil 4.A,C). İnterstisyel dokuda hiyalinizasyon alanları hafif olarak izlenmekteydi ve iskemi grubunda izlediğimiz kanama odakları burada bulunmamaktaydı. (Şekil 4.A,B). Germinal epiteli oluşturan hücreler arasında ödeme rağmen, spermatogonyumların yapısı normal değerlendirilmekteydi (Şekil 4.A,C). Tübüllerin lümenlerinde olgun spermatid sayısı azalmaktaydı (Şekil 4.A, B).



Şekil 4.4. İskemi yapılan + Amlodipin 5 mg/kg verilen grubun kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. ok: interstisyel bağ dokusu, Sg: spermatogonyum, St: spermatisit.

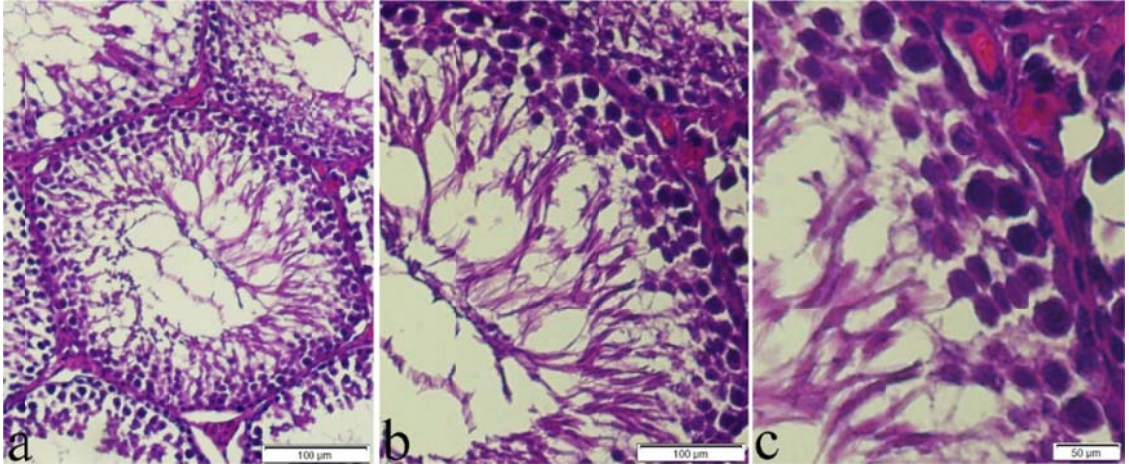
Grup 5'e (Testis İskemi+ Amlodipin 10 mg/kg Grubu) Ait Bulgular: İskemi yapılan + Amlodipin 10 mg/kg verilen grubun kesitlerinde seminifer tübüllerin sınırlarında düzensizlik mevcuttu (Şekil 5.A, B). Tübüllerin sınırlarındaki bazal lamina kalınlığı incelmışti (Şekil 5.B, C). Bazal lamina üzerine oturan germinal epitelin kalınlığı iskemi yapılan ve 5 mg/kg Amlodipin verilen gruba karşılaştırdığımızda artmışti ve epiteli oluşturan hücreler arasında ödem bulguları azalmaktaydı (Şekil 5.A, B, C). Tübüllerin lümenine baktığımızda burada olgun sperm sayısının grup 2 ve grup 4'e göre hafif arttığı görülmekteydi (Şekil 5.A, B). İnterstisyel dokuda hafif hiyalinizasyon bulguları devam etmekteydi. (Şekil 5. A).



Şekil 4.5. İskemi yapılan + Amlodipin 10 mg/kg verilen grubun kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. ok başı: hiyalinizasyon gösteren alanlar.

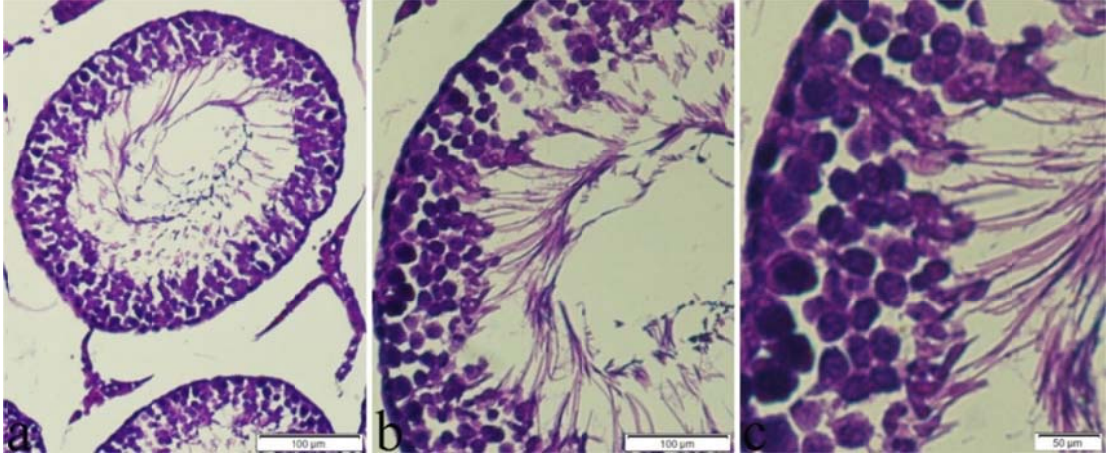
Grup 6'ya (Testis I/R+ Amlodipin 5mg/kg Grubu) Ait Bulgular: Bu grubun testis kesitlerinde seminifer tübüllerin sınırlarındaki düzensizlik düzelmekteydi, tübüllerin bazal membranının kalınlığı normale yakındı. (Şekil 6. A, B,C). Bazal membrandaki iyileşme bulguları iskemi reperfüzyon yapılan gruba kıyasladığımızda daha belirgindi. Germinal epitel oluşturan hücreler arasında hafif ödem bulguları devam etmesine rağmen, tübüllerin germinal epitelinin kalınlığı artmaktaydı. Germinal epitelin kalınlığı iskemi yapılan + 5mg/kg amlodipin verilen gruba göre daha iyi

artmıştı. Tübüllerin lümenleri olgun spermilerin kuyrukları ile dolu görülmekteydi (Şekil 6. A, B).



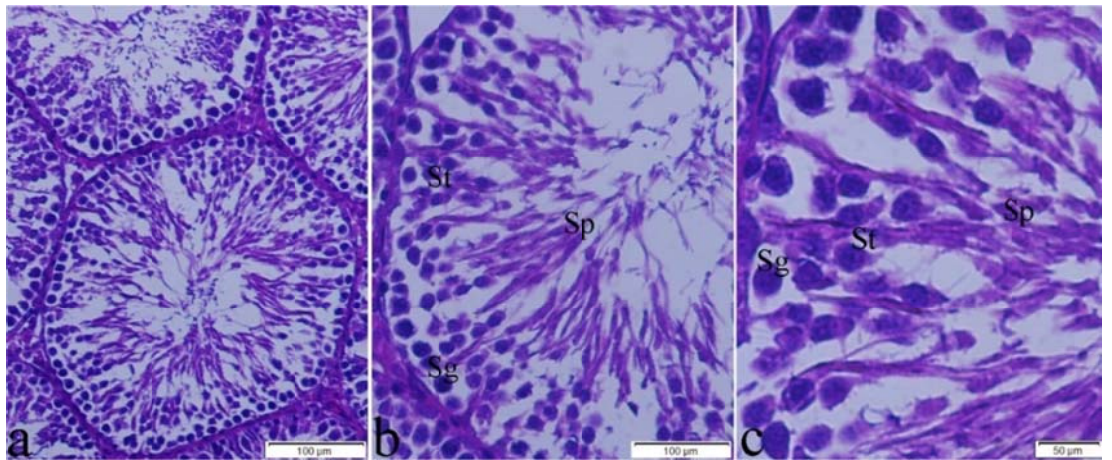
Şekil 4.6. İskemi /reperfüzyon yapılan + Amlodipin 5 mg/kg verilen grubun kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. ok: hialinizasyon gösteren alanlar, ok başı: bazal membran, Sg: spermatogonyum, St: spermatosit.

Grup 7'e (Testis I/R+ Amlodipin 10 mg/kg Grubu) Ait Bulgular: İskemi reperfüzyon yapılmış ve Amlodipin 10 mg/kg verilmiş grubun kesitlerinde seminifer tübüllerin yapısı histolojik olarak normal değerlendirilmekteydi (Şekil 7. A, B). Tübüllerin bazal membranları normal kalınlıktaydı (Şekil 7. B, C). Tübül duvarını oluşturan germinal epitelin kalınlığı da normal olarak değerlendirilmekteydi (Şekil 7. A, B). Germinal epitelde kalınlığındaki artış gr. 6'e göre daha fazlaydı. Epitelin bazal kompartmanındaki spermatogonyumlar, adlüminal kompartmandaki spermatositler normal yapıda izlenmekteydi. Epiteli oluşturan hücreler arasında ödem bulguları iskemi - reperfüzyon yapılan + Amlodipin 5 mg/kg verilen grupla karşılaştırdığımızda daha da azalmaktaydı. Aynı zamanda tübüllerin lümenleri de sperm hücrelerinin kuyrukları ile dolu olarak görülmekteydi (Şekil 7. A, B).



Şekil 4.7. İskemi /reperfüzyon yapılan + Amlodipin 10 mg/kg verilen grubun kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. Ok: dev hücre formasyonu, Sg: spermatogonyum, St: spermatoisit.

Grup 8'e (Sham+ Amlodipin 10 mg/kg Grubu) Ait Bulgular: Sağlıklı olup + 10 mg/kg Amlodipin verilen gruba ait testis kesitlerini değerlendirildiğimizde seminifer tübüller normal yapıda izlenmekteydi. Germinal epitel kalınlığı normale yakınken, tübüllerin sınırlarını oluşturan bazal membran da normal olarak görülmekteydi (Şekil 8. A, B, C). Bazal kompartmana yerleşmiş olan spermatogonyumlar normal yapıda izlenmekteydi (Şekil 8. B, C). Adlüminal kompartmandaki spermatoisitler ve lümendeki olgun spermatoitler normal olarak görülmekteydi. Seminifer tübüllerin lümenleri spermatoitlerin kuyrukları ile dolu idi (Şekil 8. A, B).



Şekil 4.8. Sağlıklı olup + Amlodipin 10 mg/kg verilen grubun kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. Sg: spermatogonyum, St: spermatoisit, Sp: spermatoit

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. SOD, GSH, MDA Analizleri

Tablo 4.1. Rat testis dokusunda ölçülen SOD, GSH ve MDA sonuçları

Gruplar	SOD (U/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
Sham	20.46 ± 5.13 d	2.15 ± 0.49 d	1.46 ± 0.55 a
Testis İ	11.49 ± 2.73 a,b	1.16 ± 0.48 a,b	2.92 ± 1.23 c,d
Testis İ/R	9.91 ± 3.33 a	1.00 ± 0.54 a	3.29 ± 0.61 d
Testis İ+AML 5 mg/kg	15.93 ± 4.10 c	1.53 ± 0.38 b,c	2.36 ± 0.94 c
Testis İ+AML 10 mg/kg	15.87 ± 3.41 c	1.73 ± 0.45 c,d	2.23 ± 0.78 b,c
Testis İ/R+AML 5 mg/kg	13.33 ± 3.39 a,b,c	1.22 ± 0.28 a,b	2.60 ± 0.45 c,d
Testis İ/R+AML 10 mg/kg	14.27 ± 2.01 b,c	1.62 ± 0.29 b,c	2.36 ± 0.41 c
Sham +AML 10 mg/kg	20.75 ± 6.11 d	2.09 ± 0.59 c,d	1.56 ± 0.41 a,b

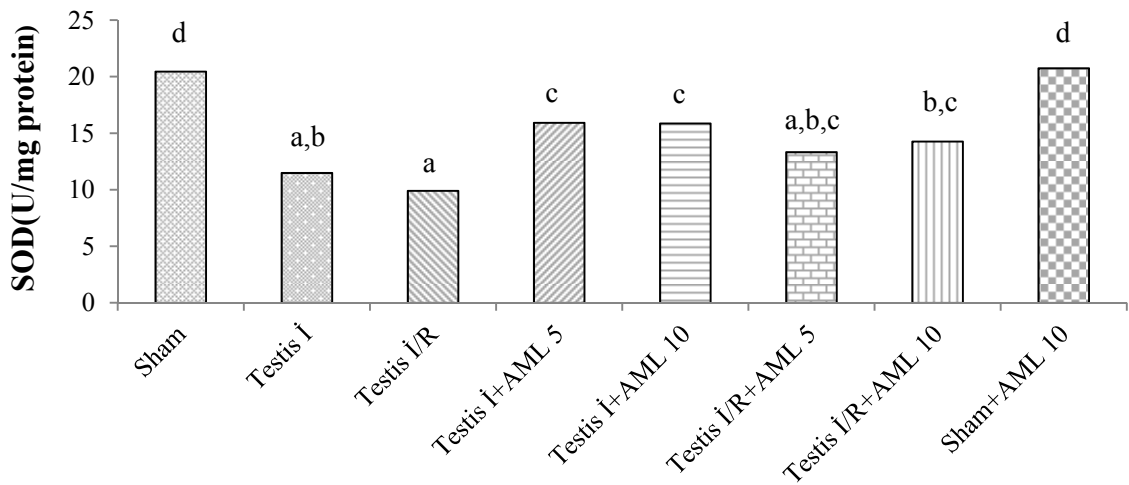
***Testis İ:Testis İskemi, Testis İ/R:Testis İskemi/Reperfüzyon, Testis İ+AML5:Testis İskemi+Amlodipin 5 mg/kg, Testis İ+AML 10:Testis İskemi+Amlodipin 10 mg/kg, Testis İ/R+AML 5:Testis İskemi Reperfüzyon+Amlodipin 5 mg/kg, Testis İ/R+Amlodipin 10:Testis İskemi Reperfüzyon+Amlodipin 10 mg/kg, Sham+AML 10:Sham+Amlodipin 10 mg/kg

Sonuçlar One-Way ANOVA testinde Post Hoc Duncan tekniği kullanılarak yapıldı. P< 0.05 anlamlı olarak kabul edildi. (Değerler: ORT ±SD)

Tablo 4.1’de görüldüğü gibi Sham, Testis İskemi, Testis İskemi/Reperfüzyon, Testis İskemi+Amlodipin 5 mg/kg, Testis İskemi+ Amlodipin 10 mg/kg,Testis İskemi/Reperfüzyon Amlodipin 5 mg/kg, Testis İskemi/Reperfüzyon+Amlodipin 10 mg/kg ve Sham+Amlodipin 10 mg/kg deney gruplarındaki SOD seviyeleri sırası ile 20.46±5.13 U/mg protein, 11.49±2.73 U/mg, 9.91±3.33 U/mg protein, 15.93±4.10 U/mg, 15.87±3.41 U/mg protein, 13.33±3.39 U/mg protein, 14.27±2.01 U/mg protein ve 20.75±6.11 U/mg protein olarak tespit edildi.

Çalışmamızın testis iskemi grubundaki SOD aktivitesinde sağlıklı gruba göre anlamlı derecede azalma gözlemlendi. İskemiye bağlı oluşan hasarı önlemek için uyguladığımız İskemi+5 mg/kg Amlodipin ve İskemi+10 mg/kg Amlodipin gruplarında

ise iskemi kontrol grubuna göre SOD aktivitesinde anlamlı derecede düzelme görüldü. Yine çalışmamızın testis iskemi ve reperfüzyon oluşturulan grubumuzda ise SOD aktivitesi ciddi şekilde azaldı. Amlodipin 5mg/kg ve 10 mg/kg uyguladığımız iskemi reperfüzyon gruplarında ise bu değerlerin oldukça düzeldiği gözlenmiş Amlodipin 10 mg/kg uyguladığımız grupta anlamlı bir düzelme görülmüştür. Çalışmamızda sadece sağlıklı Amlodipin uyguladığımız grubun SOD aktivitesinde herhangi bir değişiklik gözlenmediği kaydedildi.

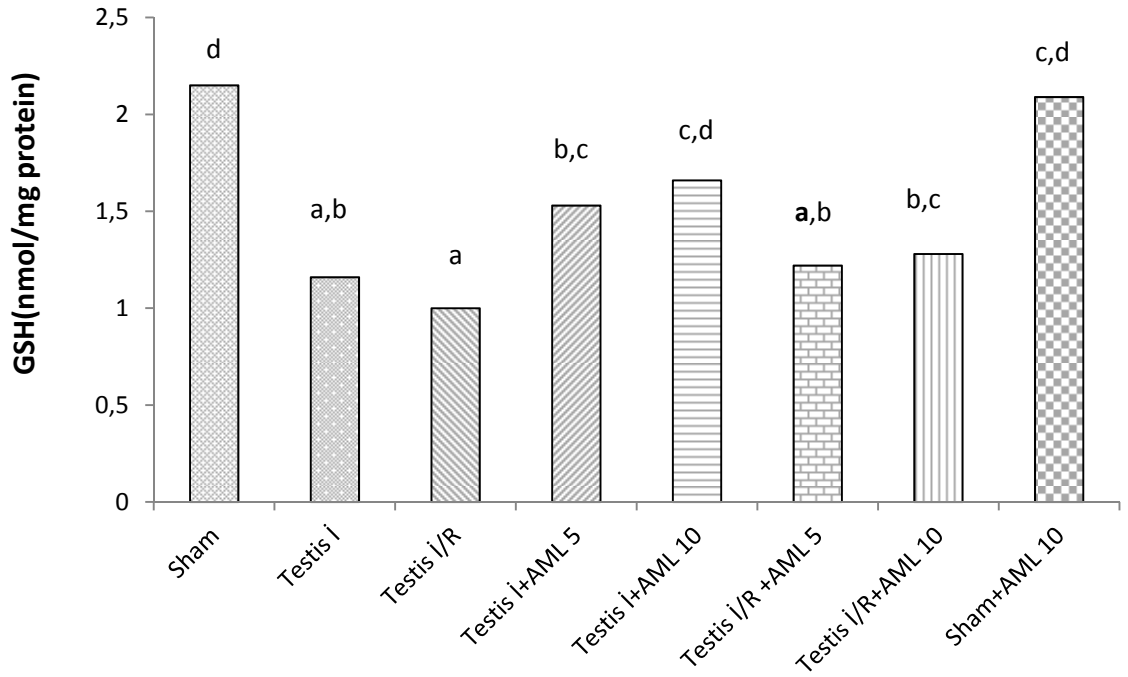


Şekil 4.9. Rat testisinde ölçülen SOD aktivitesinin grafikte gösterilmesi

*****Testis İ:**Testis İskemi, **Testis İ/R:**Testis İskemi/Reperfüzyon, **Testis İ+AML5:**Testis İskemi+Amlodipin 5 mg/kg, **Testis İ+AML 10:**Testis İskemi+Amlodipin 10 mg/kg, **Testis İ/R+AML 5:**Testis İskemi Reperfüzyon+Amlodipin 5 mg/kg, **Testis İ/R+Amlodipin 10:**Testis İskemi Reperfüzyon+Amlodipin 10 mg/kg, **Sham+AML 10:**Sham+Amlodipin 10 mg/kg
 ***IR:İskemi Reperfüzyon. Aynı sütunda aynı harf veya harflerle gösterilen değerler arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur .(p<0.05)

GSH sonuçlarına baktığımızda ise Tablo 4.1.'de görüldüğü gibi Sham, Testis İskemi, Testis İskemi/Reperfüzyon, Testis İskemi+Amlodipin 5 mg/kg, Testis İskemi+Amlodipin 10 mg/kg, Testis İskemi/Reperfüzyon Amlodipin 5 mg/kg, Testis İskemi/Reperfüzyon+Amlodipin 10 mg/kg ve Sham+Amlodipin 10 mg/kg deney gruplarındaki GSH seviyelerinin sırası ile 2.15 ± 0.49 nmol/mg protein, 1.16 ± 0.48 nmol/mg protein, 1.00 ± 0.54 nmol/mg protein, 1.53 ± 0.38 nmol/mg protein, 1.73 ± 0.45 nmol/mg protein, 1.22 ± 0.28 nmol/mg protein, 1.62 ± 0.29 nmol/mg protein ve 2.09 ± 0.59 nmol/mg protein olarak tespit edildiği gözlemlendi.

Çalışmamızda testis iskemi grubunda sağlıklı gruba göre anlamlı derece de azalma gözlemlendi. İskemi için uyguladığımız Amlodipin 5 mg/kg ve 10 mg/kg gruplarında ise iskemi kontrol grubuna göre GSH aktivitelerinde anlamlı derecede düzelme görüldü. Yine çalışmamızın testis İskemi+Reperfüzyon oluşturulan gruplarında ise sağlıklı gruba göre GSH seviyesindeki anlamlı bir şekilde azalma görülmüş olup 10 mg/kg dozda amlodipin uygulanan grupta ise bu düşüş anlamlı bir şekilde düzelmiştir. Ayrıca Sağlıklı+Amlodipin uyguladığımız grubumuzdaki GSH aktivitesinde sağlıklı gruba göre herhangi bir değişiklik gözlenmediği yani bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.



Şekil 4.10. Rat testisinde ölçülen GSH seviyesinin grafikte gösterilmesi

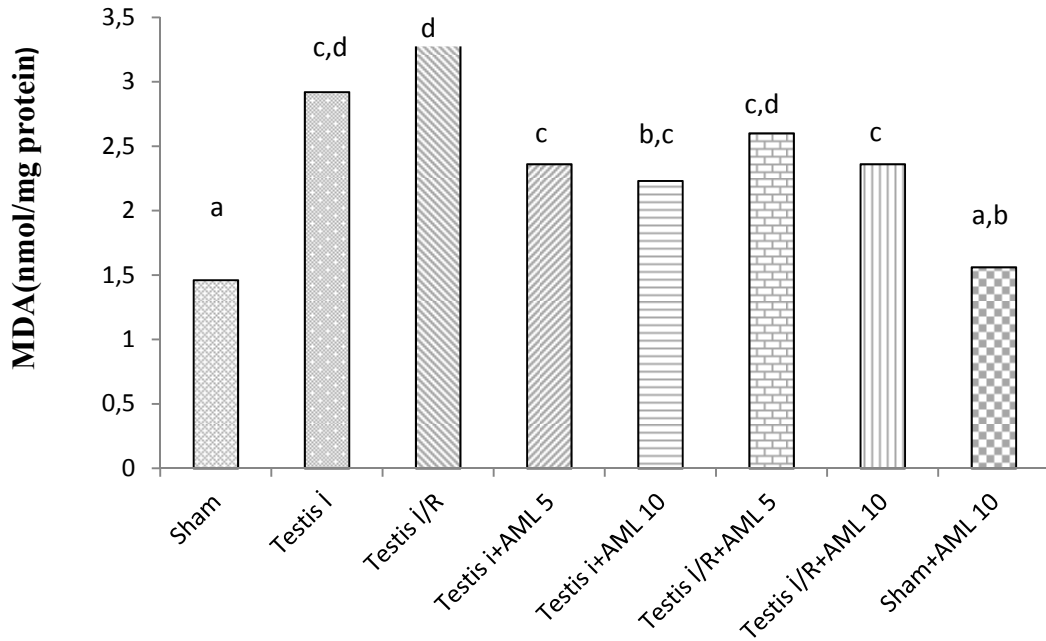
*****Testis İ**:Testis İskemi, **Testis İ/R**:Testis İskemi/Reperfüzyon, **Testis İ+AML5**:Testis İskemi+Amlodipin 5 mg/kg, **Testis İ+AML 10**:Testis İskemi+Amlodipin 10 mg/kg, **Testis İ/R+AML 5**:Testis İskemi Reperfüzyon+Amlodipin 5 mg/kg, **Testis İ/R+Amlodipin 10**:Testis İskemi Reperfüzyon+Amlodipin 10 mg/kg, **Sham+AML 10**:Sham+Amlodipin 10 mg/kg

***IR:İskemi Reperfüzyon.Aynı sütunda aynı harf veya harflerle gösterilen değerler arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur .(p<0.05)

Son olarak MDA seviyelerine baktığımızda Tablo 4.1’de görüldüğü gibi Sham, Testis İskemi, Testis İskemi/Reperfüzyon, Testis İskemi+Amlodipin 5 mg/kg, Testis

İskemi+Amlodipin 10 mg/kg, Testis İskemi/Reperfüzyon+Amlodipin5 mg/kg, Testis İskemi/Reperfüzyon+Amlodipin 10 mg/kg ve Sham+Amlodipin 10 mg/kg deney gruplarındaki MDA seviyelerinin sırası ile 1.46 ± 0.55 nmol/mg protein, 2.92 ± 1.23 nmol/mg protein, 3.29 ± 0.61 nmol/mg protein, 2.36 ± 0.94 nmol/mg protein, 2.23 ± 0.78 nmol/mg protein, 2.60 ± 0.45 nmol/mg protein, 2.36 ± 0.41 nmol/mg protein ve 1.56 ± 0.41 nmol/mg protein olarak tespit edildiği gözlemlendi.

Çalışmamızda testis iskemi ve testis iskemi+reperfüzyon gruplarında MDA seviyelerinin önemli derecede arttığı gözlemlendi. Amlodipin uygulanan testis iskemi gruplarında testis iskemi grubuna göre anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. I/R Tedavi grupları arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemesine rağmen MDA seviyeleri açısından en fazla düzelme Amlodipin 10 mg/kg+iskemi+reperfüzyon grubuna aittir. Amlodipin 10 mg/kg dozda uygulanan testis iskemi+reperfüzyon grubunda ise MDA seviyelerinin anlamlı olarak düşmüş olduğu gözlemlendi. MDA seviyeleri açısından en iyi iyileşme İskemi+Amlodipin 10 mg/kg ve IR+Amlodipin 10 mg/kg gruplarında olmuştur. Ve bu iki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur.



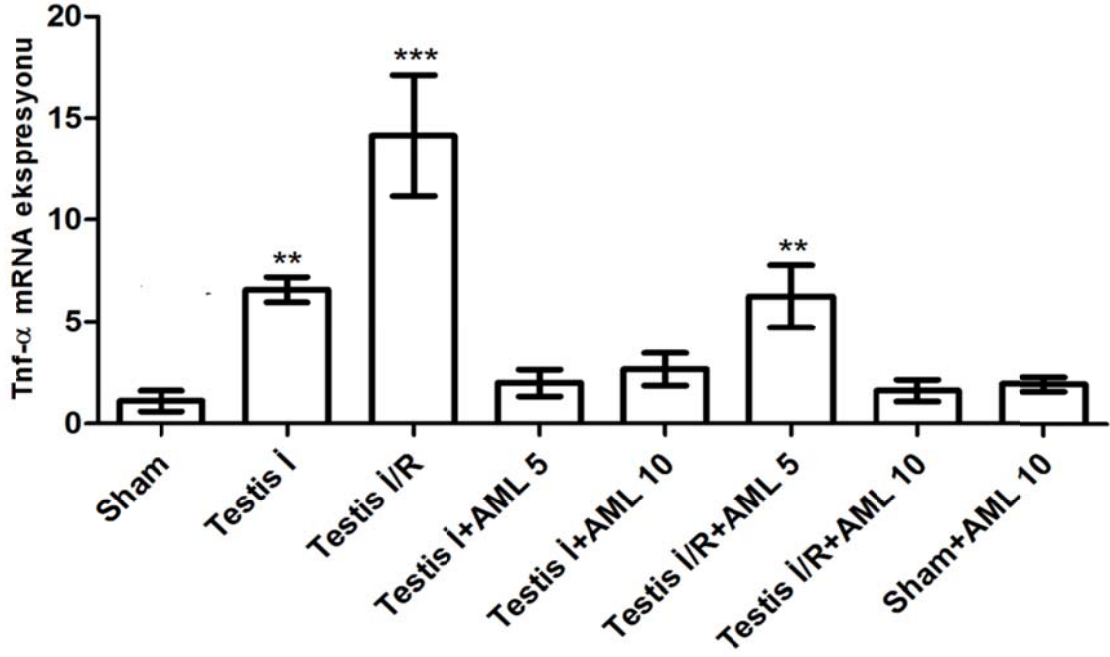
Şekil 4.11. Rat testisinde ölçülen MDA seviyesinin grafikte gösterilmesi

*****Testis İ:**Testis İskemi, **Testis İ/R:**Testis İskemi/Reperfüzyon, **Testis İ+AML5:**Testis İskemi+Amlodipin 5 mg/kg, **Testis İ+AML 10:**Testis İskemi+Amlodipin 10 mg/kg, **Testis İ/R+AML 5:**Testis İskemi Reperfüzyon+Amlodipin 5 mg/kg, **Testis İ/R+Amlodipin 10:**Testis İskemi Reperfüzyon+Amlodipin 10 mg/kg, **Sham+AML 10:**Sham+Amlodipin 10 mg/kg
 ***IR:İskemi Reperfüzyon.Aynı sütunda aynı harf veya harflerle gösterilen değerler arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur .(p<0.05)

4.3. Moleküler Çalışmalar

4.3.1. TNF- α mRNA Ekspresyonu Analizi

mRNA ekspresyonu kantitatif gerçek zamanlı PCR analizi ile tespit edilmiştir. β -aktin geni referans olarak kullanılmıştır. Göreceli kat kontrol hayvanları ile karşılaştırıldığında, sonuçlar ifade edilmektedir. Malzeme ve Metotlar kısmında tarif edildiği gibi gene özgü proplar kullanılmıştır. Göreceli ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplanmıştır. Değerler anlamına \pm S.D. temsil *** p <0.0001.



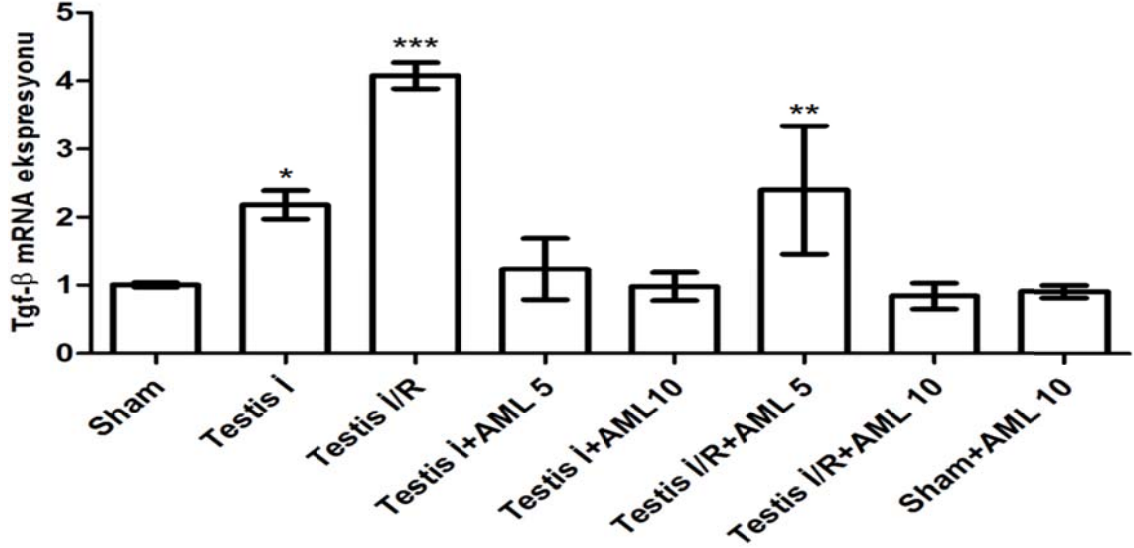
Şekil 4.12. Rat testisinde ölçülen TNF- α seviyesinin grafikte gösterilmesi

***Testis İ:Testis İskemi, Testis İ/R:Testis İskemi/Reperfüzyon, Testis İ+AML5:Testis İskemi+Amlodipin 5 mg/kg, Testis İ+AML 10:Testis İskemi+Amlodipin 10 mg/kg, Testis İ/R+AML 5:Testis İskemi Reperfüzyon+Amlodipin 5 mg/kg, Testis İ/R+Amlodipin 10:Testis İskemi Reperfüzyon+Amlodipin 10 mg/kg, Sham+AML 10:Sham+Amlodipin 10 mg/kg

Çalışmamızdaki Tnf- α değerleri sırasıyla Sham grubunda 1.10 ± 0.51 olarak, Testis İskemi grubunda 6.57 ± 0.61 olarak, Testis İskemi+Reperfüzyon grubunda 14.14 ± 2.98 olarak İskemi+Amlodipin 5 mg/kg grubunda 1.98 ± 0.65 olarak, İskemi+Amlodipin 10 mg/kg 2.65 ± 0.79 olarak, IR+Amlodipin 5 mg/kg 6.24 ± 1.53 olarak, IR+Amlodipin 10 mg/kg 1.60 ± 0.52 olarak, Sham+Amlodipin 10 mg/kg 1.94 ± 0.34 olarak ölçüldü. TNF- α mRNA Ekspresyonu değerinin Sham grubuna göre Testis İskemi grubunda 6 kat arttığı gözlemlendi. Amlodipin 5 ve 10 mg/kg iskemi ile artmış olan TNF- α değerini kontrol grubuna yakın şekilde azaltmıştır. IR grubundaki TNF- α değerinin Sham grubuna göre yaklaşık olarak 14 kat arttığı tesbit edildi. IR'ye Amlodipinin 5 ve 10 mg/kg dozlarında uygulanması ile artmış olan TNF- α değerini azalttığı belirlendi. Sham grubuna uygulanan amlodipinin 10 mg/kg dozunun TNF- α mRNA ekspresyonu hiçbir şekilde değiştirmedeği görüldü. TNF- α seviyelerini incelediğimizde hem iskemi hem de

iskemi reperfüzyonda artmış olan TNF- α seviyeleri en iyi 10 mg/kg dozunda amlodipin uygulamasının düzelttiği belirlendi.

TGF- β mRNA Ekspresyonu Analizi



Şekil 4.13. Rat testisinde ölçülen TGF- β seviyesinin grafikte gösterilmesi

***Testis İ:Testis İskemi, Testis İ/R:Testis İskemi/Reperfüzyon, Testis İ+AML5:Testis İskemi+Amlodipin 5 mg/kg, Testis İ+AML 10:Testis İskemi+Amlodipin 10 mg/kg, Testis İ/R+AML 5:Testis İskemi Reperfüzyon+Amlodipin 5 mg/kg, Testis İ/R+Amlodipin 10:Testis İskemi Reperfüzyon+Amlodipin 10 mg/kg, Sham+AML 10:Sham+Amlodipin 10 mg/kg

Çalışmamızdaki TGF- β mRNA ekspresyonu değerleri sırasıyla Sham grubunda 1.00 ± 0.03 olarak, Testis İskemi grubunda 2.18 ± 0.20 olarak, Testis İskemi+Reperfüzyon grubunda ise 4.07 ± 0.19 , İskemi+Amlodipin 5 mg/kg 1.23 ± 0.45 , İskemi+Amlodipin 10 mg/kg grubunda 0.97 ± 0.20 , IR+Amlodipin 5 mg/kg grubunda 2.39 ± 0.94 , IR+Amlodipin 10 mg/kg grubunda 0.83 ± 0.19 olarak ve son grubumuz olan Sham+Amlodipin 10 mg/kg grubunda ise 0.91 ± 0.09 olarak ölçüldü. TGF- β mRNA ekspresyonu değerinin Sham grubuna göre Testis İskemi grubunda yaklaşık olarak 2,5 kat arttığı gözlemlendi. İskemi de kontrol grubuna göre artmış olan TGF- β seviyeleri iskemi üzerine uygulanan 5 mg/kg ve 10 mg/kg dozlardaki Amlodipin

ile anlamlı derecede azaltılmıştır. IR grubundaki TGF- β mRNA ekspresyonu değerinin ise Sham grubuna göre yaklaşık olarak 4 kat arttığı, Amlodipin 5 mg/kg ve 10 mg/kg ile artmış olan TGF- β değerini azalttığı belirlendi. Sham grubuna uygulanan Amlodipin 10 mg/kg dozunun TGF- β mRNA ekspresyonunu hiçbir Şekilde deęiŐtirmedięi gözlendi. Bu değerlere göre hem iskemi hem de IR grubunda TGF- β değerini Sham grubu seviyesine en fazla azaltan Amlodipin dozunun 10 mg/kg olduğu belirlendi.

5. TARTIŞMA

Testis torsiyonu, erkeklerde, özellikle genç yaştaki çocuklarda, testisin iskemik kalmasına neden olabilen ürolojik bir acildir. Testis torsiyonuna bağlı oluşan geçici iskemi, testiste kalıcı hasar yapabilir ve sonuçta testis atrofisi gelişebilir. Bu durumda bazen tek veya çift taraflı testis kaybı gerçekleşebilmektedir.¹⁸⁸ Testiküler torsiyon-detorsiyon (T/D) nedeniyle oluşan iskemi ve reperfüzyon (I/R) testiküler hasara neden olmaktadır.⁸

İskemik dokularda yapılması gereken en temel işlem canlılığı tekrar sağlamak için reperfüzyonun sağlanmasıdır. Bu nedenle testis torsiyonu teşhis edildikten hemen sonra hiç vakit kaybetmeden mutlaka müdahale edilmesi gerekli olacaktır.²⁶

Testis torsiyonu doku hipoksisine, bu ise germinal hücre nekrozu ile fertilitede azalma ya da infertiliteye neden olur.⁴⁷ Testis torsiyonu oluştuğunda venöz akışın bozulması kan akımının azalmasına ve diğer dokularda olduğu gibi bunun sonucunda da testiste hipoksiye neden olur. Deneysel çalışmalarda germ hücrelerinin testiküler iskemiye en duyarlı hücreler olduğu gösterilmiştir.⁴⁹ Germ hücre ölümü iskemi sırasında oksijen miktarının metabolik ihtiyaçlara oranla düşük seviyede olmasına bağlı olarak, hücresel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolitlerin birikimi sonucunda gerçekleşir.⁸

Sıçan testisleri ile yapılan deneysel çalışmalarda testiküler torsiyon ve detorsiyonun aynı taraf testisinde torsiyonun derecesi ve süresi ile ilişkili olarak testisin fonksiyonunun bozulmasına ve bunun sonucunda da atrofiye neden olduğu bilinmektedir.¹⁸⁸

Deneysel çalışmalarda arteriyel tıkanıkta iki saat, venöz tıkanıklıkta ise altı saat içinde testis nekrozu geliştiği gösterilmiştir.⁴⁷ Bulguların ortaya çıkması sonrasında ilk 12 saat içinde tedavi edilmeyen olgularda testisin kaybı söz konusu olabilmektedir.⁵⁰

Testisin dönme sayısı ve torsiyon süresiyle ilişkili olan ve testis torsiyonu sonucunda oluşan iskemik hasarın yapılan deneysel çalışmalardaki 720° testis torsiyonunda kan akımının geri dönüşümsüz olarak kesildiği ve tam bir iskemi oluştuğunu göstermiştir.⁴⁴ Bununla birlikte testis torsiyonlarının genellikle 360° ile 720° arasında uygulanarak deneysel çalışmalara yön verildiği tespit edilmiştir.⁴⁴ Ayrıca sol testisin sağ testise oranla daha uzun bir spermatik korda sahip olmasından dolayı sol testis torsiyonunun sağ testise göre daha sık görüldüğü bildirilmiştir.⁵²

Turner¹⁸⁹ yaptığı çalışmada ratların testisinde longitudinal aksı boyunca 180°, 360° ve 720° torsiyon uygulamıştır. Torsiyon olan testisi ise sırasıyla 1, 2 ve 4 saat sonra detorsiyone etmiştir. Sonuç olarak ise 360° ve bir saatlik torsiyonun yalnızca akut vasküler değişimlere yol açtığını, 720° ve dört saatlik torsiyonun ise tam iskeмиyle sonuçlandığını saptamıştır. Tüm bu bilgiler ışığında testis torsiyonu, oluşum süresi, ve oluştuğu tarafa göre birçok komplikasyonlara neden olmaktadır. Tek tedavinin günümüzde cerrahi olması nedeniyle cerrahiye alım süresi ve tanıda geçen zaman kaybını önlemek ve bu sürede doku hasarını önlemek için literatürde birçok klinik ve deneysel çalışma mevcuttur.^{60, 190-192} Biz de bu çalışmamızda klinikte oluşan testis torsiyonuna en çok benzeyen sol testis torsiyonu ve 2 saat iskemi ve sonrası 2 saat detorsiyone ederek amlodipinin etkilerini inceledik.

İskemi ve reperfüzyona bağlı aşırı miktarda reaktif oksijen meydana gelir. Aşırı miktarda artan bu reaktif oksijenler, hücresel DNA hasarı oluşturarak hücre membranları ile dokuları arasında lipid peroksidasyonuna neden olurlar.⁵⁹ Lipid peroksidasyonu sonrasında membran geçirgenliği değişerek, membrana bağlı enzimler azalmakta ve bunun sonucunda protein sentezi inhibe olmaktadır.¹⁹² Reperfüzyon sonrası oluşan serbest oksijen radikalleri reperfüzyon hasarından sorumlu

tutulmaktadır.^{58, 60} Literatürde bulunan birçok çalışmada reaktif oksijen türlerinin rat testislerinde torsiyon sonrası oluşan I/R'a olan etkileri gösterilmiştir.

Testis torsiyonunda iskemi kan akımının azalması ile oluşur ve bunun sonucunda da ATP azalır. Hücre, azalan bu enerji ihtiyacını, en az enerji yüklü olan AMP' yi kullanarak karşılamaya çalışır. AMP yıkım ürünleri ise; adenozin, inozin ve hipoksantindir.¹⁹³ Reperfüzyonla ATP yıkım ürünü hipoksantin oksijen sayesinde ve ksantin oksidaz varlığında ürik aside dönüşür. Bu dönüşümün meydana gelmesi sırasında ciddi miktarda serbest oksijen radikalleri oluşur. Lipid peroksidleri ise SOR'un hücre membranındaki lipidlerle reaksiyona girmesi ile oluşmaktadır. Böylece oluşan bu lipid peroksidler membran geçirgenliğinde değişim yaratmaktadır. Bundan dolayı serbest radikaller mikrosirkülasyonu durdurmalarından dolayı reperfüzyon hasarından sorumlu tutulmaktadır.¹⁹⁴

Yapılan çalışmalarda iskemi reperfüzyon hasarına bağlı gelişen patolojik durumların en önemli belirleyicileri; antioksidan enzim aktiviteleri, enflamatuar sitokinler ve ajanların seviyeleri, histopatolojik inceleme ve lipid peroksidasyonun son ürünlerinden olan malondialdehit gibi enzimatik olmayan oksidanların seviyeleri olduğu görülmektedir. Bu parametrelerle amlodipinin testiküler iskemi ve reperfüzyon hasarında nasıl etkili olabileceği hakkında bilgi vermek yararlı olacaktır. Kalsiyum kanal blokerlerinin kimyasal yapılarına göre dihidropridin (DHP) grubu içerisinde bulunan amlodipin çabuk etki gösteren ve "etkin" olan antihipertansif bir ilaç olduğu ve ayrıca güçlü antioksidan özelliğinde olduğundan dolayı vasküler iskemilere bağlı gelişen organ hasarlarının azalmasına sebep olmaktadır.¹² Antioksidanlar iskemi ve reperfüzyon sırasında artan radikallerin vücudumuz tarafından süpürülmesini sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda özellikle iskemi reperfüzyon hasarına bağlı olarak azalan antioksidanlar ile doku hasarı arasında direkt ilişki gösterilmiştir.¹³

Tüm bu bilgilerden yola çıkarak amlodipin uygulamasının testiküler iskemi reperfüzyon hasarındaki muhtemel etkilerini Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA üzerinden inceledik. MDA hücre zarından kolay difüze olur ve hücre içinde lipofuksin şeklinde sitoplazmada birikir.⁸⁷ MDA membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve capraz bağ yapmalarına yol açtıklarından dolayı iskemi ve reperfüzyonda membran yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini, iyon transportunu etkileyebilirler.⁸⁶ Bu durumun MDA' in iskemi reperfüzyon hasarı gelişen birçok çalışmada dokularda artış gösterdiği belirtilmiştir.^{63, 64} Bizim çalışmamızda da testis iskemi ve testis iskemi+reperfüzyon gruplarında MDA seviyelerinin sham grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede arttığını ve daha sonra ise tedavi edici olarak düşündüğümüz bir kalsiyum kanal blokeri olan amlodipin gruplarında ise doza bağlı olarak MDA seviyelerinde Testis İ ve Testis İ/R gruplarına göre anlamlı bir düşüş olduğunu tespit ettik. Bunlar sonuçlar ise bize Amlodipinin iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu etkilerinin olabileceğini göstermektedir.

Üçüncü nesil dihidropridin türevi olan amlodipinin antihipertansif etkisi dışında antioksidan aktivitesi, lipid peroksidasyonunun inhibiyonu, nitrik oksit üretiminin artırılması, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunun azaltılması ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyesinin korunması gibi özelliklerinin de olduğu bildirilmiştir.¹²

Hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumak SOD'un fizyolojik görevidir. SOD enzimi süperoksit radikalini hidrojen perokside indirgeyerek radikalın zararlı etkilerini azaltır.¹⁹⁵ Yapılan literatür çalışmalarında testis torsiyonu ve detorsiyonuna bağlı olarak SOD seviyesinin azaldığı gösterilmiştir.^{146, 147} Kendi çalışmamızda da testis dokusundaki SOD seviyesini inceledik. Yaptığımız bu incelemeye göre iskemi ve iskemi reperfüzyon gruplarında SOD seviyesinin sham grubuna göre anlamlı derecede düştüğünü ve buna karşılık amlodipinli tedavi

gruplarında ise doza bağı olarak SOD seviyesinin arttığını saptamış olduk. Bizim çalışmamızda olduğu gibi yapılan diğer çalışmalarda da benzer olarak yapılan fakat farklı dokulara uygulanan iskemi ve reperfüzyon modellerinde bizim çalışmamızda ki gibi Amlodipin'in iskemi ve iskemi reperfüzyon gruplarında SOD seviyesini arttırdığı gösterilmiştir.^{196, 197}

Yaptığımız çalışmada araştırdığımız diğer bir antioksidan parametresi ise GSH tır. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona giren GSH oksidatif stres hasarına karşı hücreleri korur. Ayrıca yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin membranlardan transportunu sağlar. Lökositleri ve eritrositleri oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir. Yapılan çalışmalarda testis torsiyon ve detorsiyonuna bağı olarak GSH seviyesi oldukça düşmektedir.^{148, 149}

Bizim çalışmamızda da iskemi ve reperfüzyon gruplarında GSH seviyelerinin Sham grubuna göre anlamlı derecede düştüğünü ve bununla birlikte amlodipin ile tedavi ettiğimiz doza bağı gruplarda ise bu seviyenin arttığını gösterdik. Amlodipinin etkilerinin benzer şekilde sonuçlandığı çalışmalardan biri de Coşkun ve arkadaşlarının¹⁹⁸ tavşanlardaki intestinal I/R'ında GSH seviyesinin anlamlı şekilde arttığı göstermiştir. Bu çalışmaya benzer olarak diğer deneysel çalışmalarda da birçok dokuda özellikle beyin¹⁴, kalp¹⁵ ve karaciğer¹⁶ dokularında oluşturulan I/R hasarında amlodipinin koruyucu etkisinin olduğunu gösterilmiştir.

Tüm bu verilerden elde edilen sonuçlar ışığında testiste I/R ile oluşan testiküler hasarda amlodipin'in sistemik uygulamasının oksidan ve antioksidan denge açısından düzeltici etkisinin olduğu ortaya konulmuştur.

I/R hasarında bozulmuş oksidant antioksidant denge haricinde ayrıca artan bir sitokin salınımında bulunmaktadır. Bu artan sitokinler içerisinde en önemli sitokinlerden biri de TNF- α 'dır. TNF, damar düz kaslarını gevşeterek kan basıncını ve doku

perfüzyonunu azaltır. TNF bu etkileri, düz kas hücrelerine direkt etki ederek ve damar endotel hücreleri tarafından salgılanan prostasiklin ve NO gibi damar genişleticileri uyarak indirekt yoldan yapar.¹¹⁹ NO ise doku hasarı ile sonuçlanan oksidatif stres ile inaktive edilir ve amlodipin sayesinde oksidatif stresi bastırır.^{169, 170}

TNF- α , reperfüzyon sonrası, doğal immüniteye aracılık eden bir sitokindir.¹²⁷ Antagonistler kullanılarak, TNF- α nın vasküler yaralanmaya katkıda bulunduğu ve endotel adhezyon moleküllerini arttırdığı gösterilmiştir.^{129, 130}

TNF- α ' nın testis I/R hasarındaki rolünü tespit etmek için testisin içine enjekte edildiği bir çalışmada, enjeksiyon sonrası testis endotelyal hücrelerindeki sinyal yollarının (JNK) aktive olduğu ve E-selectin salınımına yol açarak nötrofil göçünün olduğu, ROS miktarında artış ve sonuçta germ hücre apoptozisinin olduğu gösterilmiştir.¹³² Hutson ve arkadaşları dağılmış sıçan testis makrofajları üzerinde yaptığı ilk çalışmalarda TNF- α aktivitesini bulmuşlardır.⁴⁴

TGF- β ailesi, yapısal olarak ilişkili çok sayıda polipeptid büyüme faktörleri içerir, bunların her biri hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir.¹⁸ TGF- β ' nın fizyolojik homeostazisin regülasyonunda önemli görevleri bulunmaktadır. TGF- β aktivitesindeki bozukluk yumurtalık kanseri,¹⁹ pankreas kanseri²⁰ gibi durumlarda rol oynar. TGF- β ' nın aynı zamanda kemik defektlerinin iyileşmesinde önemli rolleri vardır.^{154, 155} Bu iyileştirici özellikleri özellikle iskemi reperfüzyon hasarında da görülmektedir. Rat ve tavşan modellerinde oluşturulan inmede TGF uygulanması infarkt alanlarını azaltmıştır.²¹

Bizde çalışmamızda TNF- α ve TGF- β seviyelerini moleküler düzeyde inceledik. Çalışmamızın iskemi ve reperfüzyon gruplarında bu seviyelerin aşırı derecede arttığını gösterdik. Bu da bize literatür ışığında TNF- α ve TGF- β ' in testis hasarında önemli

rolleri olduğunu göstermektedir. Amlodipin uygulanan tedavi gruplarında TNF- α ve TGF- β seviyelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığını gösterdik.

Çalışmamızda son olarak iskemi ve reperfüzyona bağlı gelişen organ hasarını histopatolojik olarak değerlendirdik. Bizim çalışmamızda iskemi ve iskemi/reperfüzyon grubunda seminifer tübüllerin sınırlarının bozulduğu, germinal epitel kalınlığının oldukça azaldığı ve bazal membranda kalınlaşma ile birlikte germinal epitel-bazal membran arasında sağlıklı grupta gözlenmeyen kan hücreleri gözlenmiştir. Yapılan tedavi gruplarında ise Amlodipin 5 mg/kg dozunda histopatolojik olarak kısmi bir iyileşme göstermektedir. Buna karşın 10mg/kg dozunda ise germinal epitelin kalınlığı sağlıklı gruba nazaran azalmış olarak gözlenmekte, fakat seminifer tübüllerin lümeninde olgun spermatid sayısı artmaktaydı. Bu artış özellikle iskemi yapılan ve Amlodipin 5 mg/kg verilen gruba göre önemli olduğu gösterilmiştir. I/R+10 mg/kg amlodipin uygulanan gruplardaki sıçan testislerinin histolojik yapıları sağlıklı gruptaki sıçan testislerine benzer idi. Çalışmamızdaki Amlodipin' in histopatolojik etkilerini destekler nitelikte pek çok çalışma mevcuttur. Özellikle rat overindeki iskemi-reperfüzyon (I/R) deneysel modelinde amlodipin'in histopatolojik olarak etkinliği gösterilmiştir.¹⁹⁷ Ayrıca Cosentino ve ark.¹⁹⁰ testislere farklı süreler şeklinde uyguladıkları amlodipinin torsiyon sonrasında etkisini histopatolojik olarak incelemişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda, amlodipin' in testis torsiyonu hasarı üzerinde koruyucu etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir. Deneysel olarak oluşturulan testis hasarında amlodipin' in uygulanması bu hasara karşı ilk olarak serbest radikallerin seviyelerinin azalmasına ve SOD ve GSH gibi antioksidanların artışına neden olarak testis hasarına bağlı gelişen oksidan/antioksidan dengeyi olumlu yönde etkilediğini gördük. Ayrıca TNF- α gibi enflamatuar sitokin ile TGF- β 'nin da expresyonlarını olumlu yönde düzelterek enflamasyona bağlı gelişen doku hasarının şiddetlenmesini önlediğini gösterdik. Son olarak da tüm bu bulguları histopatolojik olarak dokudaki hasarın düzelmesini göstererek katkı sağladığını destekledik. Bu sonuçlar, deneysel olarak ratlarda oluşturduğumuz testis torsiyonu hasarında amlodipin'in gelecekte tedavide umut verici katkısının olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Barada JH, Weingarten JL, Cromie WJ. Testicular salvage and age-related delay in the presentation of testicular torsion. *Journal of Urology*, 1989, 142: 746-748.
2. Krarup T. Testes after Torsion. *British Journal of Urology*, 1978, 50: 43-46.
3. SD. G. Glenn *Ürolojik Cerrahi*. 6. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi, 2006.
4. Cummings JM, Boullier JA, Sekhon D, Bose K. Adult testicular torsion. *Journal of Urology*, 2002, 167: 2109-2110.
5. Gunther P, Schenk JP, Wunsch R, Holland-Cunz S, Kessler U, Troger J, Waag KL. Acute testicular torsion in children: the role of sonography in the diagnostic workup. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 16: 2527-2532.
6. Davol P, Simmons J. Testicular torsion in a 68-year-old man. *Urology*, 2005, 66: 195.
7. Williams CR, Heaven KJ, Joseph DB. Testicular torsion: is there a seasonal predilection for occurrence? *Urology*, 2003, 61: 638-641; discussion 641.
8. Mogilner JG, Lurie M, Coran AG, Nativ O, Shiloni E, Sukhotnik I. Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. *Pediatric Surgery International*, 2006, 22: 99-105.
9. Lysiak JJ, Nguyen QAT, Turner TT. Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *Journal of Andrology*, 2002, 23: 400-409.
10. Akgur FM, Kilinc K, Tanyel FC, Buyukpamukcu N, Hicsonmez A. Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral testicular torsion and detorsion. *Urology*, 1994, 44: 413-418.

11. Telang VM, Stahl RE, Clark DA, Orafidiya AO, Dweck HS. Ischemic-Injury to Rabbit Ileum - Protective Role of Vitamin-E (Tocopherol-T). *Pediatric Research*, 1986, 20: A250-A250.
12. Mason RP. Mechanisms of plaque stabilization for the dihydropyridine calcium channel blocker amlodipine: review of the evidence. *Atherosclerosis*, 2002, 165: 191-199.
13. Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS, Kaplan M, Schimmel MS, Eidelman AI, Branski D, Hochman A. Amelioration of ischemia-reperfusion injury in rat intestine by pentoxifylline-mediated inhibition of xanthine oxidase. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 1999, 29: 69-74.
14. Yamagata K, Ichinose S, Tagami M. Amlodipine and carvedilol prevent cytotoxicity in cortical neurons isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 2004, 27: 271-282.
15. Lucchesi BR, Hoff PT, Tamura Y. Cardioprotective effects of amlodipine in animal models of ischemia and reperfusion. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 1991, 17 Suppl 1: S34-39.
16. Piratvisuth T, Dunne JB, Williams R, Tredger JM. Amlodipine improves hepatic hemodynamic and metabolic function in the isolated perfused rat liver after sequential cold and warm ischemia. *Transplantation*, 1995, 60: 23-28.
17. Handelsman DJ CA BL, Turtle JR. . *Testicular function in potential sperm donors*. Baskı. 1984.
18. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 1998, 67: 753-791.

19. Wang D, Kanuma T, Mizunuma H, Takama F, Ibuki Y, Wake N, Mogi A, Shitara Y, Takenoshita S. Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor-beta signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Research*, 2000, 60: 4507-4512.
20. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science(New York,N.Y.)*, 1996, 271: 350-353.
21. Flanders KC, Ren RF, Lippa CF. Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*, 1998, 54: 71-85.
22. Şeftalioğlu A. *Genel ve özel insan embriyolojisi*. 3. Baskı. Ankara, Feryal Matbaası, 1998.
23. Moore KL. *The Developing human*. 4. Baskı. Philadelphia, Saunders Co, 1988.
24. Sadler TW. (Çeviri:AC.Başaklar) *Langman's medikal embriyoloji*. 7. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 1996.
25. Petorak İ. *Medikal embriyoloji*. Baskı. İstanbul, Beta Basım Dağıtım A.Ş, 1986.
26. Hutson JM, O'Neill JA RM, Grosfeld, JL FE, Coran AG *Pediatric surgery*. 5th Baskı. St. Louis, Mosby-Year Book Inc, 1998.
27. Rozanski TA, Bloom DA. The undescended testis. Theory and management. *The Urologic clinics of North America*, 1995, 22: 107-118.
28. Snell RS. *Clinical anatomy*. 3. Baskı. Boston, Brown and Company, 1986: 168-175.
29. Brooks JD. In Walsh PC RA, Vaughan ED, Jr, Wein AJ (Eds). *Campbell's Urology*. 8. Baskı. Philadelphia:, WB saunders, 2002.

30. Kim ED LL, Howards SS. Male infertility. In Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Mitchell ME (Eds): Adult and pediatric urology. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins: 2002. p.1683-1758. . *Adult and pediatric urology*.4.Baskı.Philadelphia,Lippincott Williams&Wilkins:, 2002.
31. Schlegel PN HMIWP, Retik AB, Vaughan ED, Jr, Wein AJ *Campbell''s Urology*. 8. Baskı. Philadelphia, WB Saunders, 2002.
32. Lennox B, Ahmad KN. Total Length of Tubules in Human Testis. *Journal of Anatomy*, 1970, 107: 191-&.
33. Kayalı H. *Özel histoloji*. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Film Merkezi, 1989,218-228
34. Beck EM, Schlegel PN, Goldstein M. Intraoperative Variococele Anatomy - a Macroscopic and Microscopic Study. *Journal of Urology*, 1992, 148: 1190-1194.
35. Jarow JP. Clinical significance of intratesticular arterial anatomy. *Journal of Urology* 1991, 145: 777-779.
36. Kuran O. *Sistemik anatom* İstanbul, Filiz Kitabevi, 1983,512-514
37. Netter FH. *Interactive Atlas of Human Anatomy*. 5. Baskı. 2010: 370.
38. Junqueira LC CJ. *Temel Histoloji*. Çeviri: AYTEKİN Y SS. Nobel Tıp Kitabevi, 2006.
39. Sharpe RM, Maddocks S, Millar M, Kerr JB, Saunders PT, McKinnell C. Testosterone and spermatogenesis. Identification of stage-specific, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules. *Journal of Andrology*, 1992, 13: 172-184.
40. Dere F. *Anatomi Atlası ve Ders Kitabı*. 5. Baskı. Adana, Nobel Kitabevi, 1997.
41. Neas J.F. The cell,Embriyoloji Atlas 2010, bölüm 2.

42. Gartner PG HJ. *Color Text Book of Histology*. 3. Bask¹. Philadelphia, WB Saunders Co, 2006.
43. Rowe MI ONJ, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG. *Essentials of pediatric surgery*. St. Louis, Mosby-Year Book Inc, 1995.
44. Hutson J. *Pediatric Surgery*. St. Louis,, Mosby,, 1998: 1087-1109.
45. Williamson RC. Torsion of the testis and allied conditions. *The British Journal of surgery*, 1976, 63: 465-476.
46. Bartsch G, Frank S, Marberger H, Mikuz G. Testicular torsion: late results with special regard to fertility and endocrine function. *Journal of Urology*, 1980, 124: 375-378.
47. Melekos MD, Asbach HW, Markou SA. Etiology of acute scrotum in 100 boys with regard to age distribution. *Journal of Urology*, 1988, 139: 1023-1025.
48. Shukla RB, Kelly DG, Daly L, Guiney EJ. Association of cold weather with testicular torsion. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 1982, 285: 1459-1460.
49. Tjioe DY, Steinberger E. A quantitative study of the effect of ischaemia on the germinal epithelium of rat testes. *Journal of reproduction and fertility*, 1970, 21: 489-494.
50. Prater JM, Overdorf BS. Testicular torsion: a surgical emergency. *American family physician*, 1991, 44: 834-840.
51. Backhouse KM. Embryology of testicular descent and maldescent. *The Urology clinics of North America*, 1982, 9: 315-325.
52. Fonkalsrud EW. Testicular undescent and torsion. *Pediatric clinics of North America*, 1987, 34: 1305-1317.

53. Damjanov I. Physical,chemical,immune and iatrogenic causes of infertility. *Pathology of infertility*. 1. Baskı. st Louis Mosby Year Book, 1993.
54. Kass EJ, Lundak B. The acute scrotum. *Pediatric clinics of North America*, 1997, 44: 1251-1266.
55. Leape LL. Testikuler torsion. 1. Baskı. Philadelphia, Saunders, 1990.
56. Başaklar A.C.Yenidoğanın cerrahi hastalıkları. 48 Baskı. Ankara, Palme yayıncılık, 1994.
57. Noseworthy J.Testicular torsion.Philadelphia, W.B.Saunders Co, 2000.
58. Akgur FM, Kilinc K, Aktug T. Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urological Research*, 1993, 21: 395-359.
59. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological Reviews*, 2001, 53: 135-159.
60. Akgur FM, Kilinc K, Aktug T, Olguner M. The Effect of Allopurinol Pretreatment before Detorting Testicular Torsion. *Journal of Urology*, 1994, 151: 1715-1717.
61. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *Journal of Urology*, 1997, 157: 340-345.
62. Sarica K, Bakir K. Semiquantitative evaluation of testicular histology after testicular torsion: protective effect of external cooling. *Urologia internationalis*, 1999, 63: 110-114.
63. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury.*Moleculer Aspects of Medicine*, 2004, 25: 199-210.

64. Visser AJ, Heyns CF. Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU International*, 2003, 92: 200-203.
65. Anderson MJ, Dunn JK, Lipshultz LI, Coburn M. Semen quality and endocrine parameters after acute testicular torsion. *Journal of Urology*, 1992, 147: 1545-1550.
66. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *The Journal of surgical research*, 2002, 105: 248-258.
67. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *Journal of Pathology*, 2000, 190: 255-266.
68. Rose S, Floyd RA, Eneff K, Buhren V, Massion W. Intestinal ischemia: reperfusion-mediated increase in hydroxyl free radical formation as reported by salicylate hydroxylation. *Shock*, 1994, 1: 452-456.
69. Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock*, 2002, 17: 114-119.
70. Myers SI, Hernandez R, Turnage RH, Bartula L, Taylorkalley B. Resuscitation of Ischemia-Reperfusion with Hyperalimentation Increases Intestinal Pgi(2) Synthase (Ps) Content and Pgi(2) Release. *Shock*, 1995, 3: 422-429.
71. Riedemann NC, Ward PA. Complement in ischemia reperfusion injury. *The American Journal of pathology*, 2003, 162: 363-367.
72. Mitchell RN CR. *Temel patoloji* 6. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi 2000.
73. <http://med.ege.edu.tr/saitsen/ogrenci/hucre.html>.
74. Türkyılmaz Z. Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Zedelenmesinde Pentoksifilin, Dimetilsülfoksit ve Eksojen Melatoninin Koruyucu Etkilerinin Karşılaştırılması Edirne: TÜ Tıp Fak, 2003.

75. Taşkıran A. Koroner By-Pass Yapılan Olgularda Lipid Hidroperoksit, Antioksidan Kapasite ve Oksidan Strese Duyarlılık. Edirne: TÜ Tıp Fak, 2002.
76. Lin E LS, Calvano SE. The systemic response to injury. 7. Baskı. Mc Graw, hill, 1999.
77. Ertan T SA, Kılıc M, Aşlar AK, Koc M, Cengiz O. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin(TAS) onemi. *Cerrahi Tıp Bulteni*, 2001, 2: 154-167.
78. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical biology&medicine*, 1995, 18: 125-126.
79. Carden DL SJ, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circulation research*, 1990.
80. Bagge U AB, Lauritzen C. White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. 1980.
81. Kumar V CR, Robbins SL. *Basic Pathology*. Baskı. 2000.
82. M. A. Alkolün Oluşturduğu Serbest Radikaller Üzerine İbuprofen ve Erusik Asidin Etkileri Edirne:TÜ Sağlık Bilimleri Enst, 2000.
83. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in biomedical sciences*, 1990, 15: 129-135.
84. İnjury GPI-r. *British J of Surgery* 1994, 81: 637-647.
85. Porter NA, T. Richardson and J.W. Finley (Eds). Mechanism of fatty acid and phospholipid autoxidation. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1985.
86. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. 2000.
87. Draper HH HM. *Methods Enzymol*. 1990.

88. Söyük S. Anjiografik Olarak Saptanan Arter Darlığının Derecesi ile Lipid-Lipoprotein, Lp(A), Apo A-I, Apo B ve MDA Düzeyleri Arasındaki İlişki. Edirne: TÜ Tıp Fak, 2001.
89. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proceeding*, 1988, 63: 381-389.
90. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal-Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979, 95: 351-358.
91. Buege JA AS. *Methods Enzymology*. 1978.
92. Shacter E. Protein oxidative damage. 2000.
93. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev*, 2000, 32: 307-326.
94. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal*, 1997, 324 (Pt 1): 1-18.
95. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya , Mimoza yayınları, 1995.
96. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. 8. Baskı. 1994.
97. Halliwell B. How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radical Research Communications*, 1990, 9: 1-32.
98. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? *Redox Report: communications in free radical research*, 2004, 9: 145-152.
99. Yan SL, Wu ST, Yin MC, Chen HT, Chen HC. Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. *Journal of Food Science*, 2009, 74: H259-265.

100. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *The surgical clinics of North America*, 1992, 72: 65-83.
101. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The journal of investigative dermatology*, 1982, 78: 206-209.
102. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovascular Research*, 2000, 45: 651-660.
103. Gower JD, Healing G, Fuller BJ, Simpkin S, Green CJ. Protection against oxidative damage in cold-stored rabbit kidneys by desferrioxamine and indomethacin. *Cryobiology*, 1989, 26: 309-317.
104. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine*, 1994, 120: 227-237.
105. Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biology of Reproduction*, 2001, 65: 514-521.
106. Okusa MD, Linden J, Macdonald T, Huang L. Selective A2A adenosine receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *The American journal of physiology*, 1999, 277: F404-412.
107. Diplock A. Healthy lifestyles nutrition and physical activity. Belgium, ILSI Europe concise monograph series, 1998: 59 p.
108. Elliot JG. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech*, 1999, 53: 46-48.

109. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB Journal:official publication of the Federation of American societiesfor Experimental Biology*, 1995, 9: 526-533.
110. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS:acta pathologica,microbiologica,et immunologica Scandinavica*, 2007, 115: 81-103.
111. Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'aquila G, Zuliani G, Di Iorio A, Andres-Lacueva C. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15: 1236-1248.
112. Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *The Canadian Journal of cardiology*, 1993, 9: 89-93.
113. Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacological Reviews*, 2002, 54: 375-429.
114. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 2004, 36: 1-9.
115. Buettner GR, Ng CF, Wang M, Rodgers VGJ, Schafer FQ. A new paradigm: Manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 41: 1338-1350.
116. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *The journal of biological chemistry*, 1970, 245: 1374-1377.

117. Mao GD, Thomas PD, Lopaschuk GD, Poznansky MJ. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity. *The journal of biological chemistry*, 1993, 268: 416-420.
118. Murray RK GD MP, Rodwell VM. Harper's Biochemistry. USA, McGraw-Hill Press, 2000.
119. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of pineal research*, 1995, 18: 1-11.
120. Carecani P. RER, Van Thiel D. H. Reoxygenation Injury in Isolated Rat Hepatocytes. 1994.
121. Ernster L. Biochemistry of Reoxygenation Injury. *Critical Care Medicine*, 1988, 16: 947-953.
122. Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M, Benevento A, Trabucchi E. Effects of ischaemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *The European Journal of surgery=acta chirurgica*, 1993, 159: 393-398.
123. Niki E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and physics of lipids*, 1987, 44: 227-253.
124. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 1984, 105: 273-282.
125. Noronha IL, Niemir Z, Stein H, Waldherr R. Cytokines and Growth-Factors in Renal-Disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1995, 10: 775-786.
126. Oppenheim JJ RF, Faltynek C. Cytokines. Stites, DP TA, ed. 1994:105-, 123. *Basic and Clinical Immunology*. 1994.
127. Abbas AK LA, Poper JS. Cytokines. Cellular and Molecular Immunology, Philadelphia, WB Saunders Company, 1994.

128. Kılıçturgay K. İmmunoloji. Bursa Nobel Tıp Kitapevi, 1997.
129. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *The British Journal of surgery*, 1994, 81: 637-647.
130. Lin E LS, Calvano SE. The systemic response to injury. 7. Baskı. Hill, Mc Graw, 1999.
131. Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scandinavian Journal of gastroenterology*, 2001, 36: 55-65.
132. Read MA, Whitley MZ, Gupta S, Pierce JW, Best J, Davis RJ, Collins T. Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of biological chemistry*, 1997, 272: 2753-2761.
133. Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *European Journal of biochemistry*, 1991, 202: 3-14.
134. Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin/tumour necrosis factor. *Lancet*, 1989, 1: 1122-1126.
135. M. J. Biologic activities and mechanism of action of tumor necrosis factor - a/cachectin. 1991.
136. De SK CH, Pace JL, Hunt JS, Terranova PF, Enders GC. Fare spermatojenik hücrelerinde tümör nekroz faktörü-alfa sentezlenmesi. 1993, 133: 389-396.
137. JC. H. Testis makrofajlar tarafından tümör nekroz faktörü alfa salgılanması. 1993, 23: 63-72.
138. Moore C HJ. Makrofaj-Leydig hücre etkileşimleri arabaluculuk tümör nekroz faktörü fizyolojik alaka. 1994, 134: 63-69.

139. Mauduit C BV, Caussanel V, reseptör p55 α Benahmed M. Tümör nekroz faktör hormonal (folikül uyarıcı hormon) testis Sertoli hücrelerinin kontrol altındadır. 1996, 224: 631-637.
140. Delfino F WW. Memeli testis NF-KB aşamalı özgü nükleer ekspresyon. 1998, 12: 1696-1707.
141. Aisén P LI. Demir taşıma ve depolama proteinleri. 1980, 49: 357-393.
142. Sylvester SR GM. Sertoli hücrelerinin bir hemşire fonksiyonu. 1994.
143. Stallard BJ GM. Mol Endocrinol. 1990.
144. Sigillo F GFFb, Benahmed M, Tümör nekroz faktörü α ve retinoik asit sıçan Sertoli hücre transferin ifadesinin vitro yönetmelikte. 1999, 148: 163-170.
145. Pentikäinen'in V EK, Suomalainen L, M Ojala, Pentikäinen'in MO, Parvinen M, Dunkel'e L. J Clin Metabol. TNFa Fas ligand aşağı düzenler ve insan testiste germ hücre apoptozu inhibe eder. 2001, 86: 4480-4488.
146. Besset V LM-BB, Collette J, M. Benahmed Endocrinology , 1996 137 :296-303. doi: tümör nekrozu faktörü alfa kültürlenmiş domuz Sertoli hücrelerinde protein ifadesini 3 bağlayıcı insülin-benzeri büyüme faktörü uyarır . 1996, 137: 296-303.
147. Stephan JP SV. Sertoli hücre IL-1 ve in vitro olarak IL-6 üretiminin Jegou B. düzenlenmesi. 1997, 134: 109-118.
148. De Cesaris P SD, Riccioli A, Padula F, Filippini A, Ziparo E.. Chem. . Tümör nekroz faktör- α farklı iletim yollarının tarafından interlökin-6 üretimini ve integrin ligandı ifadesini indükler. 1998, 273: 7566-7571.
149. Benbrahim-Tallaa L BF, Rey C, Benahmed M. *Journal of Endocrinology* . 2002.
150. Bauche F SJ, Touzalin AM, Jegou B.. Biol Reprod. Sıçan seminifer tübül hücrelerinde bir uyarılabilir-tipi NO sentez in vitro yönetmelikte Baskı. 1998.

151. Xiong Y HD. Fare Leydig hücre steroidogenez düzenlenmesinde tümör nekroz faktörü- α rolü 1993, 132: 2438-2444.
152. Mauduit C GF, Rey C, Chauvin MA, Stocco DM, Louisot P, Benahmed M. . Tümör nekroz faktör- α steroidojenik akut düzenleyici protein ekspresyonunda bir azalma ile Leydig hücre steroidogenezi engeller. 1998, 139: 2863-2868.
153. Massague J, Blain SW, Lo RS. TGF beta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, 2000, 103: 295-309.
154. Ruskin JD, Hardwick R, Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Alveolar ridge repair in a canine model using rhTGF-beta 1 with barrier membranes. *Clinical Oral Implants Research*, 2000, 11: 107-115.
155. Sumner DR, Turner TM, Urban RM, Leven RM, Hawkins M, Nichols EH, McPherson JM, Galante JO. Locally delivered rhTGF-beta2 enhances bone ingrowth and bone regeneration at local and remote sites of skeletal injury. *Journal of orthopaedic research:official publication of the orthopaedic research society*, 2001, 19: 85-94.
156. Furberg CD, Psaty BM, Meyer JV. Nifedipine. Dose-related increase in mortality in patients with coronary heart disease. *Circulation*, 1995, 92: 1326-1331.
157. Binggeli C, Corti R, Sudano I, Luscher TF, Noll G. Effects of chronic calcium channel blockade on sympathetic nerve activity in hypertension. *Hypertension*, 2002, 39: 892-896.
158. Opie LH. Clinical use of calcium channel antagonist drugs. 2. Baskı. Boston, Kluwer Academic 1990.
159. Braunvald E. Mechanism of action of calcium channel-blocking agents. 1982: 1618.

160. Kushiro T, Watanabe N, Takahashi A, Koike M, Saito F, Otsuka Y, Kanmatsuse K. Different effects of L-type and L+N-type calcium channel blockers on hamster cheek pouch venules. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2004, 44: 672-675.
161. Fleckenstein A. Kammermeier H DJ, Freund HJ, Grün G KA. Zum Wirkungsmechanismus neuartiger Coronardilatoren mit gleichzeitigen sauerstoffeinsparenden Myocardeffekten, Prenylamin und Iproveratil. *Z Kreislaufforsch* 1967.
162. Fleckenstein A. Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers and vascular smooth muscle. 1977: 149.
163. Gielow ML, Gu GG, Singh S. Resolution and pharmacological analysis of the voltage-dependent calcium channels of *Drosophila* larval muscles. *The Journal of neuroscience: the official journal of the society for Neuroscience*, 1995, 15: 6085-6093.
164. Nishio M, Tsukahara H, Hiraoka M, Sudo M, Kigoshi S, Muramatsu I. Calcium channel current in cultured rat mesangial cells. *Molecular Pharmacology*, 1993, 43: 96-99.
165. Fleckenstein A. History of calcium antagonists. *Circulation Research*, 1983, 52: 13-16.
166. Sahney S. A review of calcium channel antagonists in the treatment of pediatric hypertension. *Paediatr Drugs*, 2006, 8: 357-373.
167. Zhang XP, Hintze TH. Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels - An unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation*, 1998, 97: 576-580.

168. Lenasi H, Kohlstedt K, Fichtlscherer B, Mulsch A, Busse R, Fleming I. Amlodipine activates the endothelial nitric oxide synthase by altering phosphorylation on Ser(1177) and Thr(495). *Cardiovascular Research*, 2003, 59: 844-853.
169. Mason RP, Mak IT, Trumbore MW, Mason PE. Antioxidant properties of calcium antagonists related to membrane biophysical interactions. *American Journal of Cardiology*, 1999, 84: 161-221.
170. Mason RP, Walter MF, Trumbore MW, Olmstead EG, Jr., Mason PE. Membrane antioxidant effects of the charged dihydropyridine calcium antagonist amlodipine. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 1999, 31: 275-281.
171. Burges R, Moisey D. Unique pharmacologic properties of amlodipine. *American Journal of Cardiology*, 1994, 73: 2A-9A.
172. Civantos B, Alexandre A. Blood pressure and alpha-vascular reactivity in hypertensive rats treated with amlodipine and dietary Ca. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 489: 101-110.
173. Kataoka C, Egashira K, Ishibashi M, Inoue S, Ni WH, Hiasa K, Kitamoto S, Usui M, Takeshita A. Novel anti-inflammatory actions of amlodipine in a rat model of arteriosclerosis induced by long-term inhibition of nitric oxide synthesis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2004, 286: H768-H774.
174. Pitt B, Byington RP, Furberg CD, Hunninghake DB, Mancini GBJ, Miller ME, Riley W, Investigators P. Effect of amlodipine on the progression of atherosclerosis and the occurrence of clinical events. *Circulation*, 2000, 102: 1503-1510.

175. Halici Z, Suleyman H, Cadirci E. Effects of calcium channel blockers on hyaluronidase-induced capillary vascular permeability. *Archives of Pharmacal Research*, 2008, 31: 891-899.
176. Halici Z, Karaca M, Keles ON, Borekci B, Odabasoglu F, Suleyman H, Cadirci E, Bayir Y, Unal B. Protective effects of amlodipine on ischemia-reperfusion injury of rat ovary: biochemical and histopathologic evaluation. *Fertility and Sterility*, 2008, 90: 2408-2415.
177. Suleyman H, Halici Z, Hacimuftuoglu A, Gocer F. Role of adrenal gland hormones in antiinflammatory effect of calcium channel blockers. *Pharmacological Reports*, 2006, 58: 692-699.
178. Umemoto S, Tanaka M, Kawahara S, Kubo M, Umeji K, Hashimoto R, Matsuzaki M. Calcium antagonist reduces oxidative stress by upregulating Cu/Zn superoxide dismutase in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, 2004, 27: 877-885.
179. Kyselovic J, Krenek P, Wibo M, Godfraind T. Effects of amlodipine and lacidipine on cardiac remodelling and renin production in salt-loaded stroke-prone hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 2001, 134: 1516-1522.
180. Tulenko TN, Brown J, Laury-Kleintop L, Khan M, Walter MF, Mason RP. Atheroprotection with amlodipine: cells to lesions and the PREVENT trial. Prospective Randomized Evaluation of the Vascular Effects of Norvasc Trial. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1999, 33 Suppl 2: S17-22.
181. Carter AJ, Gardiner DG, Burges RA. Natriuretic Activity of Amlodipine, Diltiazem, and Nitrendipine in Saline-Loaded Anesthetized Dogs. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1988, 12: S34-S38.

182. Packer M, O'Connor CM, Ghali JK, Pressler ML, Carson PE, Belkin RN, Miller AB, Neuberg GW, Frid D, Wertheimer JH, Cropp AB, DeMets DL. Effect of amlodipine on morbidity and mortality in severe chronic heart failure. Prospective Randomized Amlodipine Survival Evaluation Study Group. *The New England journal of medicine*, 1996, 335: 1107-1114.
183. Ün H. Siçan Testisinde Oluşturulmuş İskemi/Reperfüzyon Hasarında BİR Renin İnhibitörü Olan Aliskiren'in Etkisinin Araştırılması. Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans, Atatürk Üniversitesi, 2014.
184. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 1988, 34: 497-500.
185. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 1968, 25: 192-205.
186. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979, 95: 351-358.
187. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
188. Baker LA, Turner TT. Leydig cell function after experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. *Journal of Andrology*, 1995, 16: 12-17.
189. Turner TT. Acute Experimental Testicular Torsion - No Effect on the Contralateral Testis. *Journal of Andrology*, 1985, 6: 65-72.
190. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett ATK. Histological-Changes Occurring in the Contralateral Testes of Prepubertal Rats Subjected to Various

- Durations of Unilateral Spermatic Cord Torsion. *Journal of Urology*, 1985, 133: 906-911.
191. Heindel RM, Pakyz RE, Reinking LN, Cosentino MJ. The Effect of Various Degrees of Unilateral Spermatic Cord Torsion on Fertility in the Rat. *Journal of Urology*, 1990, 144: 366-369.
192. Saba M, Morales CR, De Lamirande E, Gagnon C. Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *Journal of Urology*, 1997, 157: 1149-1154.
193. Yagmurdur H, Ayyildiz A, Karaguzel E, Ogus E, Surer H, Caydere M, Nuhoglu B, Germiyanoglu C. The preventive effects of thiopental and propofol on testicular ischemia-reperfusion injury. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2006, 50: 1238-1243.
194. Savas C, Dindar H, Bilgehan A, Ataoglu O, Yucesan S. Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in testicular torsion. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 2002, 36: 65-70.
195. McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother*, 2005, 59: 139-142.
196. Li J, Li QX, Xie XF, Ao Y, Tie CR, Song RJ. Differential roles of dihydropyridine calcium antagonist nifedipine, nitrendipine and amlodipine on gentamicin-induced renal tubular toxicity in rats. *European Journal of Pharmacology*, 2009, 620: 97-104.
197. Halici Z, Karaca M, Keles ON, Borekci B, Odabasoglu F, Suleyman H, Cadirci E, Bayir Y, Unal B. Protective effects of amlodipine on ischemia-reperfusion injury of rat ovary: biochemical and histopathologic evaluation. *Fertility and Sterility*, 2008, 90: 2408-2415.

198. A. Kagan Coskun AG, Zekai Halici, Akgun Oral, Melik Seyrek, Yasin Bayir, Cenk Kilic, Taner Yigit, Tahir Ozer, A. Ihsan Uzar. The Effects of Amlodipine on the Biochemical and Histopathological Changes in the Rabbit Ileum Subjected to Ischemia-Reperfusion. 2011, 43: 33-38.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	: Çiğdem DOĞAN
Doğum Tarihi	: 28.02.1981
Doğum Yeri	: İskenderun
Medeni Hali	: Evli,1 çocuk
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 25240, Erzurum
Tel	: 0505 758 19 33
Fax	: -
E-mail	: yildirim.cigdem@hotmail.com
Eğitim	
Lise	: Gaziantep Süper Lisesi (1999)
Lisans	: Mersin Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2001-2005)
Tezsiz Yüksek Lisans	: Çukurova Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği(2005-2006)
Yabancı Dil Bilgisi	
Orta Derecede	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Yok	
İlgi Alanları ve Hobiler	
Kitap okumak	
Spor yapmak	

EK-2. Etik Kurul Onay Formu

07-107

Eğilim

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-109
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

29.08.2013
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA
25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 30.07.2013 tarih ve 42190979-01-02/3517 sayılı yazı.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Zekai HALICI'nın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yürütülecek olan "~~Ratlarda Testiküler~~ Torsiyon/Detorsiyon Modeline Bağlı Oluşan Doku Hasarında Amlodipinin Etkisi" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 29.08.2013 tarih ve 3 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 91 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan Vekili

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Sayı No : 4275
Tarih : 29.08.2013

Doktora Kurulu
Bilgi BİS
29.08.2013

Prof. Dr. Özkan POLAT
Başkan

Toplantı Tarihi : 29.08.2013
Toplantı Sayısı : 3
KARAR NO : 91- Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Zekai HALICI'nın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yürütülecek olan "~~Ratlarda Testiküler~~ Torsiyon/Detorsiyon Modeline Bağlı Oluşan Doku Hasarında Amlodipinin Etkisi" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 30.07.2013 tarih ve 42190979-01-02/3517 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-236 08 80 Fax : 0-442-236 08 81 e-mail: hadyek@atauni.edu.tr