

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN TESTİS TORSİYON-DETORSİYON
MODELİNDE ETİL PİRÜVAT ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

ASLI ÇELİK

LABORATUVAR HAYVANLARININ SAĞLIK
BİLİMLERİNDE KULLANIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2011

TEZ KODU: DEU.HSI.Msc-2009970109

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN TESTİS TORSİYON-DETORSİYON
MODELİNDE ETİL PİRÜVAT ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

LABORATUVAR HAYVANLARININ SAĞLIK
BİLİMLERİNDE KULLANIMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASLI ÇELİK

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Mehmet Ensari GÜNELİ

TEZ KODU: DEU.HSI.Msc-2009970109

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, Laboratuvar Hayvanlarının Sağlık Bilimlerinde Kullanımı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Aslı ÇELİK “**SIÇAN TESTİS TORSİYON-DETORSİYON MODELİNDE ETİL PİRÜVAT ETKİSİNİN İNCELENMESİ**” konulu Yüksek Lisans tezini 03/08/2011 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



BAŞKAN

Doç. Dr. Mehmet Ensari Güneli
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Laboratuvar Hayvanları Bilimi AD



ÜYE

Doç. Dr. Çetin Pekçetin
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Laboratuvar Hayvanları Bilimi AD



ÜYE

Prof. Dr. Halil Resmi
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya AD

ÜYE (Yedek)

Prof. Dr. Osman Yılmaz
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Laboratuvar Hayvanları Bilimi AD

ÜYE (Yedek)

Doç. Dr. Alper Bağrıyanık
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji AD

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Testis	5
2.2. Testis Torsiyonu ve Detorsiyonu (T/TD).....	7
2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı (İ/R Hasarı).....	8
2.3.1. Reperfüzyon Hasarının Oluşum Mekanizmaları ve Mediyatörleri.....	9
2.3.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR).....	9
2.3.1.2. Endotel Hücreleri.....	13
2.3.1.3. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL).....	13
2.3.1.4. Kalsiyum.....	14
2.3.1.5. Eikozanoidler.....	15
2.3.1.6. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA).....	17
2.3.1.7. Sitokinler.....	17
2.4. Antioksidanlar.....	18
2.4.1. Endojen Antioksidanlar.....	19
2.4.2. Eksojen Antioksidanlar.....	19
2.5. Etil Pirüvat.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Araştırmanın Tipi.....	22
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	22
3.3. Çalışma Grupları.....	23
3.3.1. Deney Gruplarının Oluşturulma Gerekçeleri.....	23
3.4. Çalışma Materyali.....	24
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	24

3.6. Veri Toplama Araçları.....	24
3.6.1. Anestezi.....	24
3.6.2. Deneysel Testis İskemi/Reperfüzyon (Torsiyonu / Detorsiyon) Modeli.....	24
3.6.3. Deney Prosedürü.....	25
3.6.4. Deneyin Sonlandırılması ve Doku Örneklerinin Toplanması.....	26
3.6.5. Biyokimyasal İnceleme.....	27
3.6.5.1. MDA Analizi.....	27
3.6.6. Histolojik İnceleme.....	28
3.6.6.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü.....	28
3.6.6.2. Hematoksilen-Eozin Boyaması	29
3.6.6.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru.....	30
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	31
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	31
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	32
3.10. Etik Kurul Onayı.....	32
4. BULGULAR.....	32
4.1. Testis Dokusu Malondialdehit (MDA) Düzeyleri.....	32
4.2. Testis Dokunun Histolojik Analizleri.....	33
4.2.1. Jonhsen Skorlama.....	33
4.2.2. Işık Mikroskobu Görünümleri.....	35
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
7. KAYNAKLAR.....	47
8.EKLER.....	57
EK-1 Etik Kurul Onayı.....	57
EK-2 ARBİS Özgeçmiş.....	58

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1: Rutin doku takibi.....	29
Tablo 2: Hematoksilen-eozin boyama protokolü.....	30
Tablo 3: Jonhsen testiküler biyopsi skorlaması.....	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Testis yapısı.....	6
Şekil 2: Testiküler Torsiyon.....	7
Şekil 3: İ/R hasar mekanizması.....	11
Şekil 4: İ/R ve inflamasyon arasındaki döngü.....	12
Şekil 5: Lökotrien, prostoglandin ve tromboksan gibi eikozanoidlerin oluşumunu gösteren araşidonik asit kaskad sistemi.....	16
Şekil 6: Glikolitik yol basamakları.....	21
Şekil 7: Gruplara yapılan girişimlerin şematik görünümü.....	23
Şekil 8: Deney modeli oluşturma sırasında yapılan işlemler.....	25
Şekil 9a: Sol testis (ipsilateral) MDA düzeyi.....	32
Şekil 9b: Sağ testiste (kontralateral) MDA düzeyi.....	33
Şekil 10a: Sol testis (ipsilateral) Johnsen skoru.....	34
Şekil 10b: Sağ testis (kontralateral) Johnsen skoru.....	34
Şekil 11: Grup 1(Sham)'de genel görünüm, H-E.....	36
Şekil 12: Grup 1 (Sham)'de genel görünüm, H-E.....	36
Şekil 13: Grup 1 (Sham)'de seminifer tübül genel görünüm, H-E.....	37
Şekil 14: Grup 2 (İ/R+SF)'de genel görünüm, H-E.....	37
Şekil 15: Grup 2 (İ/R+SF)'de seminifer tübül görünümü, H-E.....	38
Şekil 16: Grup 2 (İ/R+SF)'de hücrelerin genel görünümü, H-E.....	38
Şekil 17: Grup 2 (İ/R+SF)'de hücrelerin görünümü, H-E.....	39
Şekil 18: Grup 2 (İ/R+SF)'de seminifer tübül ve hücrelerin görünümü, H-E.....	39
Şekil 19: Grup 2 (İ/R+SF)'de hücrelerin görünümü, H-E.....	40
Şekil 20: Grup 2 (İ/R+SF)'de hücrelerin görünümü, H-E.....	40
Şekil 21: Grup 2 (İ/R+SF)'de seminifer tübül görünümü, H-E.....	41
Şekil 22: Grup 3 (İ/R+EP)'de genel görünüm, H-E.....	41
Şekil 23: Grup 3 (İ/R+EP)'de genel görünüm, H-E.....	42
Şekil 24: Grup 4 (EP+İ/R)'de seminifer tübül ve hücrelerin görünümü, H-E.....	42
Şekil 25: Grup 4 (EP+İ/R)'de seminifer tübül ve hücrelerin görünümü, H-E.....	43
Şekil 26: Grup 4 (EP+İ/R)'de seminifer tübül ve hücrelerin görünümü, H-E.....	43

KISALTMALAR

- AMP: Adenozin monofosfat
ATP: Adenozin trifosfat
ATPaz: Adenozin trifosfataz
Ca⁺²: Kalsiyum
CH₃COCOO⁻: Pirüvat
CH₃COCOOH: Pirüvik asit
COOH: Karboksilat
e⁻: Elektron
ELAM-1: Endoteliyal lökosit adezyon molekülü-1
EP: Etil pirüvat
GAPDH: Gliseraldehid-3- fosfat dehidrogenaz
GMP-140: Granül membran protein-140
GP: Glukojenfosforilaz
H-E: Hematoksilen-eozin
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HK: Hekzokinaz
HMGB-1: High mobility group box -1
HOCl: Hipoklorik asit
ICAM-1: İnterselüler adezyon molekülü-1
IFN- γ : İnterferon-gama
İL-1: İnterlökin-1
İL-6: İnterlökin-6
İL-8: İnterlökin-8
İ/R: İskemi-reperfüzyon
KAT: Katalaz
KD: Ksantin dehidrogenaz
KO: Ksantin oksidaz
LTB₄: Lökotrien B₄
MDA: Malondialdehit

MHC: Major histokompatibilite
MPO: Myeloperoksidaz
NAD: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit
NF-κB: Nükleer faktör kappa B
NO: Nitrik oksit
O₂⁻: Süperoksit anyonu
ONOO⁻: Peroksinitrit
PAF: Platelet(trombosit) aktive edici faktör
PFK: Fosfofruktokinaz
SF: Serum fizyolojik
SOD: Süperoksit dismutaz
SOR: Serbest oksijen radikalleri
T/DT: Torsiyon/detorsiyon
TBA: Tiyobarbitürik asit
TNF-α: Tümör nekrozis faktör-alfa
TxA₂: Tromboksan A₂
TxB₂: Tromboksan B₂
VCAM-1: Vasküler hücre adezyon molekülü-1

Sıçan Testis Torsiyon-Detorsiyon Modelinde Etil Pirüvat Etkisinin İncelenmesi

Aslı Çelik, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları
Bilimi Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Bu çalışmada, sıçanlarda testiküler iskemi/reperfüzyon (İ/R) (torsiyon-detorsiyon) hasarında etil pirüvat (EP)'in etkisi araştırıldı. Erişkin Wistar erkek sıçanlar 4 gruba ayrıldı: Sham (n=7), İ/R+Serum fizyolojik (SF) (n=7), İ/R+EP (n=7), EP+İ/R (n=7). Sıçanlarda testiküler İ/R hasarı, sol testisleri (ipsilateral) 720° torsiyone edilerek 1 saat süreyle iskemisi, sonrasında 720° detorsiyone edilerek 4 saat boyunca reperfüzyonu ile oluşturuldu. EP (50 mg/kg), EP+İ/R ve İ/R+EP grubundaki sıçanlara, sırasıyla iskemiden 30 dakika önce ve reperfüzyonun 30. dakikasında intraperitoneal olarak injekte edildi. Reperfüzyon sonunda tüm sıçanların, sağ ve sol testisleri eksize edilerek, biyokimyasal ve histolojik olarak incelendi. Malondialdehit (MDA) düzeyleri açısından incelendiğinde; sol testiste (ipsilateral) gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$), sağ testiste (kontralateral) fark gözlemlendi ($p<0.05$). Sol testis İ/R (ipsilateral) hasarı, sağ testiste (kontralateral) MDA düzeyini yükseltti ($p<0.05$). EP uygulaması MDA düzeylerini etkilemedi ($p>0.05$). Histolojik skorlamaya göre (Johnsen skorlaması) ise; sol testis İ/R uygulaması, hem sol (ipsilateral) hem de sağ (kontralateral) testiküler dokularda hasar oluşturdu ($p<0.001$). EP, iskemiden önce uygulanan grupta sol testis dokusunda hasarı azalttığı gözlenirken ($p<0.001$), sağ testiste herhangi bir değişiklik oluşturmadığı saptandı ($p>0.05$). Sonuç olarak, EP sıçanlarda İ/R'ye bağlı testiküler doku hasarını koruyucu etkisi ile azaltır.

Anahtar Sözcükler: etil pirüvat, iskemi-reperfüzyon hasarı, testis, sıçan

Investigation of the Effects of Ethyl Pyruvate in Rat Model of Testicular Torsion-Detorsion

Aslı Çelik, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Laboratory Animal Science, 35340, İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

In this study, the effect of ethyl pyruvate (EP) in rat model of testicular ischemia/reperfusion (I/R) (torsion-detorsion) injury was investigated. Adult male Wistar rats were divided into 4 groups: Sham (n=7), I/R+Saline (n=7), I/R+EP (n=7) and EP+I/R (n=7). In rats that underwent I/R, left testes (ipsilateral) were rotated 720° for 1 hour (ischemia), and then rotated back (detorsion) for 4 hours (reperfusion). To rats in EP+I/R and I/R+EP groups, EP (50 mg/kg) was intraperitoneally injected 30 minute before ischemia or 30 minute after reperfusion, respectively. At the end of reperfusion, right and left testes of all rats were excised and evaluated by biochemical and histological analyses. In terms of malonedialdehyde (MDA) levels, there was not any significant difference among left (ipsilateral) testes ($p>0.05$), whereas there was significant difference among right (contralateral) testes ($p<0.05$). Left testes I/R injury elevated MDA levels in right testes ($p<0.05$). However, administration of EP did not affect MDA levels in both right and left testes ($p>0.05$). Histological scoring (Johnsen's scoring) showed that left testes exposed to I/R caused damage in both left (ipsilateral) and right (contralateral) testicular tissues ($p<0.001$). Administration of EP before ischemia caused significant decrease in damage in left testes ($p<0.001$); however, no significant change in right testes was observed ($p>0.05$). In conclusion, EP decreases testicular tissue injury against I/R thanks to its protective effect in rats.

Keywords: ethyl pyruvate, ischemia-reperfusion injury, testis, rat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi, bir pıhtı veya mekanik etkenle kan akımının azalması veya kesilmesine bağlı olarak dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu dokunun oksijenden ve diğer besin öğelerinden yoksun olmasıdır. İskemik dokuda toksik metabolitlerin temizlenmesi ve hücrelerin yenilenmesi için dokuya tekrar kan akımının sağlanması gerekir. Doku kanlanmasının ilaçlarla veya mekanik müdahalelerle yeniden sağlanmasına ise *reperfüzyon* denmektedir. Dokularda iskemiye bağlı oluşan hasarın, paradoksal olarak, reperfüzyon ile artarak devam ettiği bilinen bir fenomendir (*reperfüzyon hasarı*). Reperfüzyon hasar mekanizmasında, serbest oksijen radikalleri (SOR), polimorf nüveli lökositler, kompleman sistemi ve endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör önemli rol oynamaktadır.

Testis torsiyonu, her yaşta gözlenebilen, özellikle puberte döneminde yaygın görülen, torsiyonun derecesi ve süresi arttıkça testiküler fonksiyonlarda bozulmaya sebep olan acil ürolojik problemdir. Testis torsiyonuna hemen müdahale edilmediği takdirde subfertiliteye ve testiküler atrofiye neden olabilmektedir. Testiste torsiyon gerçekleşmesi durumunda iskemik hasar, torsiyon giderilmesi (detorsiyon), yani reperfüzyon ile de iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı oluşmaktadır. Testiküler İ/R hasarında, SOR'un oldukça önemli rol oynadığı gösterilmiştir. SOR vasıtasıyla olan lipid peroksidasyonu, hücre membran geçirgenliğinde artışa neden olur ve hücre hasarı gerçekleşir. Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunda son üründür ve oksidatif hasarın düzeyini göstermede kullanılır. Birçok araştırmada testis İ/R hasarına bağlı olarak dokuda MDA artışı olduğu saptanmıştır. Testiste ve diğer organlarda (kalp, akciğer, böbrek, barsak, ekstremiteler vs.) gerçekleşen İ/R hasarının antioksidan ilaçlarla düzeltilebildiği birçok araştırmada rapor edilmiştir. Özellikle güçlü SOR azaltıcı ilaçların İ/R hasarında oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla İ/R hasarının önlenmesi ve tedavisinde daha güçlü ilaçlara gereksinim vardır. Bu tür ilaçların insanlarda kullanımından önce *in vivo* deneylerle, etkileri doğrulanması gereklidir.

Pirüvat, pirüvat kinaz enzim katalizi ile oluşan glikolitik yolun son ürünüdür. Pirüvat, ortamın oksijenizasyon derecesine, dokunun mitokondrisi olup olmaması gibi faktörlere bağlı, farklı reaksiyonlarda görev almaktadır. Pirüvatın alfa-keto karboksilat yapısı, moleküle

antioksidan özelliği kazandırır; peroksidaz ve peroksinitriti (ONOO^-) nötrale eder. Özellikle SOR süpürücüsü (*scavenger*) olarak işlev yapmaktadır.

Pirüvatın deneysel olarak oluşturulmuş birçok hasar mekanizmasında tedavi edici özelliğinin olduğu bulunmuştur. Ayrıca kalp, karaciğer, barsak gibi organlarda oluşturulan İ/R hasarında da etkili olduğu gözlenmiştir. Bu bulgulara rağmen, pirüvat'ın sulu çözeltilerdeki zayıf stabilitesi terapötik ajan olarak kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle, deneysel çalışmalarda onun etil esteri olan etil pirüvat (EP) kullanılmaktadır. EP'nin birçok deneysel araştırmada antioksidan ve antiinflamatuvar etkililiği gösterilmiştir. EP aktif bir SOR temizleyicisidir. EP, proinflamatuvar medyatörlerin (*High Mobility Group Box -1* (HMGB-1), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), siklooksijenaz-2, interlökin-6 (IL-6) gibi) oluşumunu azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiği tespit edilmiştir. EP'nin kalp, bağırsak, akciğer, karaciğer gibi birçok organda İ/R'ye bağlı olarak gerçekteşen hasarda etkili olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda sıçanlarda testiküler İ/R (torsiyon-detorsiyon) hasarında EP'nin koruyucu ve tedavi edici etkisinin olup olmadığını biyokimyasal ve histolojik olarak araştırmayı amaçladık.

H1: Etil pirüvat testis torsiyonunda oluşun iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu veya tedavi edicidir.

2. GENEL BİLGİLER

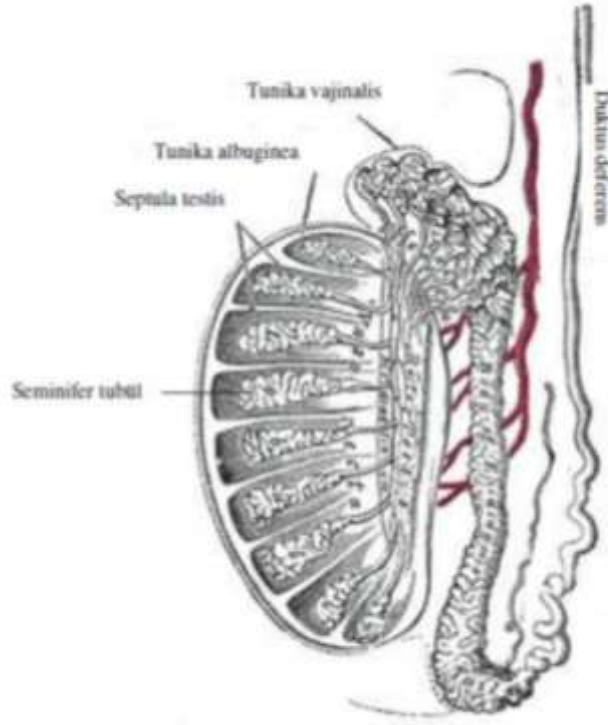
2.1. Testis

Testis, erkek üreme hücrelerini taşıyan organdır. Testis, funikulus spermaticus'a asılı olarak inguinal bölgeye yerleşik, skrotum içinde bulunan bir çift organdır. Erişkinde yaklaşık 4x3x2.5 cm. boyutlarındadır (1).

Skrotum, testis ve funikulus spermaticus'un içinde bulunduğu torbadır. Skrotum, testisleri muhafaza etmekle beraber, musculus cremaster kasının kasılıp gevşemesiyle de testislerin belirli bir ısıda kalmasını da sağlarlar. Skrotum, bir septumla ikiye ayrılmıştır. Skrotumun yapısında katmanlar bulunmaktadır. Bu katmanlar dıştan içe doğru; Kutis, tunika dartos, fascia spermatica eksterna, fascia cremasterica, fascia spermatica interna, lamina parietalis.

Testis, lamina viseralis, tunika albuginea ve tunika vaskuloza olmak üzere üç tabaka ile sarılıdır. Fascia spermatica interna'ya yapışan lamina parietalis ve testisi saran lamina viseralis yapraklarına tunika vaginalis testis denir. Tunika vaginalis testis'in lamina viseralis'ini saran katman ise tunika albuginea'dır. Tunika albuginea, testisi saran fibröz yapıda mavimsi-beyaz renkli tabakadır. Tunika albuginea, testis içerisine doğru kıvrım yapar ve mediastinum testisi oluşmaktadır. Mediastinum testis yarım bölme şeklinde bir yapı olup, damar ve kanalların girip çıktığı alandır. Ayrıca bu bölümde septula testis denilen bölmeler mevcuttur. Fibröz yapıdaki septalar testisi yaklaşık 250 adet, piramit biçimli lobüllere ayırır. Bu lobüllerde bir ile dört arasında değişen sayıda kıvrımlı seminifer tübüller bulunmaktadır (Şekil 1) (2-7).

Seminifer tübüller yaklaşık 60 cm uzunluğunda borucuklar olup, duvarını döşeyen germ hücreleri lümeneye dökülerek ilerlerler. Seminifer tübüllerin bağ ve elastik dokudan oluşan bir bazal membranı bulunur. Bazal membranda sertoli hücreleri ve spermatogonik hücreler bulunmaktadır. Seminifer tübüller arasındaki stroma bağ dokuda interstisyel leydig hücreleri yer almaktadır. Seminifer tübüller mediastinumda birleşerek rete testisi oluştururlar. Burada birleşen seminifer tübüller, efferent duktus halinde testisten epididime gelirler (8,9).



Şekil 1: Testis yapısı. Tunika vajinalis, tunika albuginea, septula testis, seminifer tübül, duktus deferens (*Gray's Anatomi Atlası*) (7).

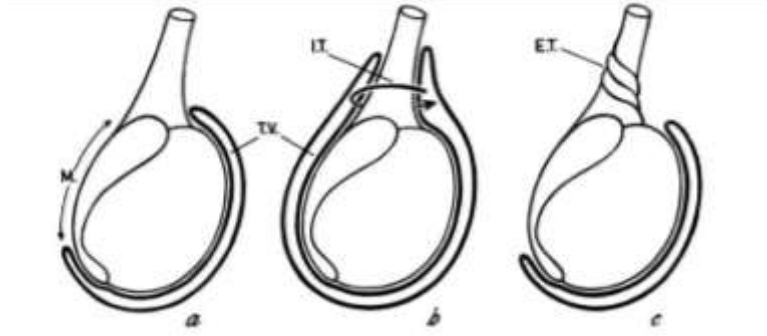
İnsanlarda testis dokusunda (100 mg) yaklaşık 9 mL/dk kan geçişi olur. Testis ve epididimin arter beslenmesi 3 kaynaktan gelir: internal spermatik arter, deferensiyal arter ve eksternal spermatik (kremasterik) arter. İnternal spermatik arter, renal arterlerin hemen altında abdominal aortadan çıkar. Spermatik korddan geçerek testise ulaşır. Spermatik korddan çıktıktan sonra arterler pleksus pampiniformis ile çok yakın temas halinde ilerlerler. Pleksus pampiniformis, testisten çıktıktan sonra venlerin birbirleriyle yaptıkları yoğun anastomoz ve kıvrılmalar neticesi oluşan bir ven kümesidir.

Testis içerisinde kan akımı, metabolik ihtiyaca bağlı olarak bölgesel farklılıklar gösterir. Testisin fonksiyonlarında mikrosirkülasyonunun çok önemli rolü vardır (4-6,10).

Testisin lenf damarları intertübüler bölgelerden kaynaklanır ve spermatik kord içinde ilerlerler. Seminifer tübüllerin lenfatik drenajının olmadığı kabul edilmektedir. Bu nedenle lenfatik obstrüksiyon durumunda interstisyumda dilatasyon gözlenirken, seminifer tübüller etkilenmezler (11).

2.2. Testis Torsiyonu ve Detorsiyonu (T/TD)

Testis torsiyonu (spermatik kord torsiyonu), testis ve spermatik kordun tunika vajinalisin distalinde (intravajinal) (Şekil 2b) veya tunika vajinalisin proksimalinde (ekstravajinal) (Şekil 2c) dönmesidir (12). Testisin ön yüzünü tunika vajinalis örter ve epididimis ile spermatik kordun bazı bölümlerine değişik mesafelerde uzanır. Tunika vajinalis tümüyle epididimis ve spermatik kordu sarması durumunda, testis serbestçe kendi etrafında döner, torsiyon gerçekleşir. Bu deformiteye “bell clapper” denir. Bu deformite sıklıkla bilateral olup, çocukluk ve adölesan yaşlarda gözlenmektedir. Daha çok ergenlik (puberte) döneminde gerçekleşen bu torsiyon, intravajinal torsiyon olarak adlandırılır. Neonatal dönemde ise inen testis dokusu skrotum içerisinde son derece hareketlidir. Bu yaş grubunda karşılaşılan torsiyonlar genellikle ekstravajinal torsiyondur (13).



Şekil 2: Testiküler Torsiyon. a) Normal testis – Tunika vajinalis (T.V.), Mesorchium (M), b) Intratunikal torsiyon (I.T.), c) Ekstratunikal torsiyon (E.T.) (13).

Testis torsiyonu klinikte oldukça sık rastlanan bir vakadır. Her yıl, 25 yaş altında 4000 erkekte birinde gözlenmektedir. Testis torsiyonunda genellikle hasta şikayetleri skrotal ağrı ile başlar (14). Adölesan çağındaki hastaların % 50-60'nda akut skrotal ağrı şikayeti olsa bile bu hastaların ancak %25- 35'inde rotasyonel testis vakası ile karşılaşılır (13).

Genel olarak bu dönemdeki erkeklerde akut skrotal ağrı ile karşılaşıldığında aksi kanıtlanana kadar vaka testis torsiyonu olarak kabul edilmektedir. Olgularda çoğunlukla torsiyonun gerçekleştiği taraftaki testise bağlı kremaster kasında refleks yanıt değerlendirilerek tanı konmaktadır (14).

Detorsiyon işleminde amaç testis kan akımının en kısa sürede tekrar sağlanmasıdır. Aksi takdirde testis dokusunda iskemik hasar oluşmaktadır. Bu durum kontralateral testisi de etkileyerek infertilizasyona yol açabilir (15-17). Torsiyonun derecesi ve süresi oluşacak olan hasarın en önemli belirleyicileridir. Süreç sonunda torsiyonun (iskemi) düzeltilmesiyle beraber SOR oluşumu, intrasellüler Ca^{+2} artışı, nötrofillerin ve adezyon moleküllerinin eşlik ettiği bir dizi kompleks reaksiyonlar sonucunda reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir (18-20). Reperfüzyon ile oluşan inflamatuvar yanıt, testis hasarından önemli ölçüde sorumludur. Bu akut inflamatuvar yanıt, proinflamatuvar sitokinlerin ortamda çoğalması, vasküler adezyon moleküllerinin aşırı ekspresyonu ve nötrofillerin olaya katılması şeklindedir. Bu lokal inflamatuvar yanıtla başlayan süre, SOR'ların aşırı üretimi oksidatif strese yol açar. Bu radikallerin fazla üretimi apoptotik hücre ölümüne aracılık eder. Testiküler İ/R sonrasında inflamatuvar yanıtla bağlı oluşan serbest radikaller; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu bozar, hücre içi ATP düzeyinin azalmasına, kalsiyumun (Ca^{+2}) konsantrasyonunun artmasına ve degradatif enzimlerin aktivasyonuna yol açar. Bu da hücrenin fonksiyonlarını ve bütünlüğünü bozar ve germ hücrelerinde apoptoz gerçekleşir (21-23).

Testis torsiyonunda, erken ve doğru tanısal yaklaşımla kalıcı testiküler hasarın önüne geçilebilmektedir. Tedavisinde acil detorsiyon işlemi uygulanmaktadır. Özellikle ekstravaginal torsiyonlarda tedavi sonuçlarının tatmin edici olduğu ifade edilmektedir. Ancak, mutlaka detorsiyone edilen tarafta kan akımının sağlandığını, reperfüze olduğunu göstermek gerekmektedir. Acil invazif olmayan/manuel detorsiyon işlemi başarılı olmadığı takdirde, cerrahi işlem uygulanmaktadır (14).

Testiküler T/DT'da, İ/R hasarının mekanizması ve tedavisine ilişkin birçok deneysel araştırmalar yapılmakta olup, soruna olumlu katkı yapacak tedavi seçenekleri araştırılmaktadır (24-32).

2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı (İ/R Hasarı)

İskemi, doku ve organların canlılığını sağlayan arter veya venlerin kan akımının kesilmesi sonucu dokulardaki yetersiz perfüzyon nedeniyle, dokunun oksijenden yoksun kalmasıdır. İskemi, hücre enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikimine yol açarak, hücre disfonksiyonu ve sonrasında hücre ölümüne kadar gidebilen bir

dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır. Reperfüzyon ise iskemik dokunun perfüzyonun yeniden sağlanmasıdır. İ/R'ye bağlı dokuda reperfüzyon hasarı oluşmaktadır. Bu hasara İ/R hasarı denilmektedir (33).

Böylelikle, doku hasarının esas olarak iskemi sonrası reperfüzyon ile sekonder geliştiğini göstermektedir. İ/R hasarında nötrofillerin önemli rol oynadığı gösterilmiştir (34-38). İ/R hasarında, doku ödemi ve plazma proteinlerine mikrovasküler permeabilite artışı, mikrovasküler yatakta iskemi sonrası endotel hücrelerinden ya da makrofajlardan salgılanan interlökinlerin ve sitokinlerin neden olduğu nötrofil birikimi ve adezyon moleküllerinin bu hücrelerde ekspresyonunun artması ile nötrofil ve trombosit agregasyonu, parenkim ya da dokuda revaskülarizasyonun engellenmesi söz konusudur (34,39).

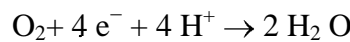
Bu mekanizmaya klinikte ekstremitte iskemisi, solid organ transplantasyonu, myokard enfarktüsü, inme, hipovolemik şok gibi doku hipoperfüzyonu ve/veya tam iskemisi durumları örnek gösterilebilir (34,39-42).

İ/R hasarında nötrofillerin rolünü açıklamaya yönelik yapılan çalışmalarda, koroner arterin geçici olarak klemplenmesiyle oluşturulan deneysel myokard enfarktüsü modelinde, reperfüzyon ile oluşan enfarkt alanının büyüklüğü, önceden kan nötrofil sayıları azaltılmış hayvanlarda, kan nötrofil düzeyleri normal olanlara göre belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (40,43).

2.3.1. Reperfüzyon Hasarının Oluşum Mekanizmaları ve Mediyatörleri

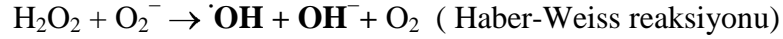
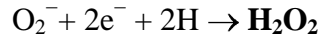
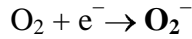
2.3.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

Normal memeli hücreleri, oksidatif fosforilasyon yolu ile enerji üretebilmek için moleküler oksijene gereksinim duyar. Oksijenin yetersizliğinde (iskemi gibi) hücre enerji depoları tükenmeye başlar, toksik metabolitler ortaya çıkar ve sonrasında hızla hücre ölümü meydana gelir. Normal koşullar altında, moleküler oksijenin büyük bir kısmı hücre içi sitokrom oksidaz sistemi ile dört değerli indirgenmeye uğrayarak suya dönüşür (44).

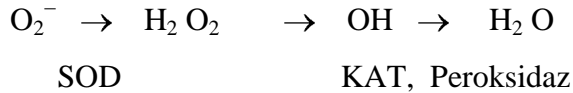


Ancak İ/R durumunda sadece bir elektron (e^-) transferi ile tek-değerli indirgenme olur ve oldukça reaktif serbest radikaller meydana gelir. Serbest radikal, herhangi bir atom veya

molekülün dış yörüngesinde çift oluşturmamış bir elektron (e^-) içermesi durumu olarak tanımlanır. İskemi sırasında oluşan bir dizi biyokimyasal olaylar sonucunda, reperfüzyon ile birlikte, İ/R hasarı gelişiminde önemli rol oynayan süperoksit anyonu (O_2^-), hipoklorik asit (HOCl) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi SOR'lar oluşur. Moleküler oksijen her aşamada indirgenmeye uğrayarak, yukarıda belirtilen reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuna yol açar. O_2^- , tek başına hücre yıkımına yol açan reaksiyonları başlatabildiği gibi, esas olarak daha reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna yol açarak hücre toksisitesinde rol oynamaktadır (45).



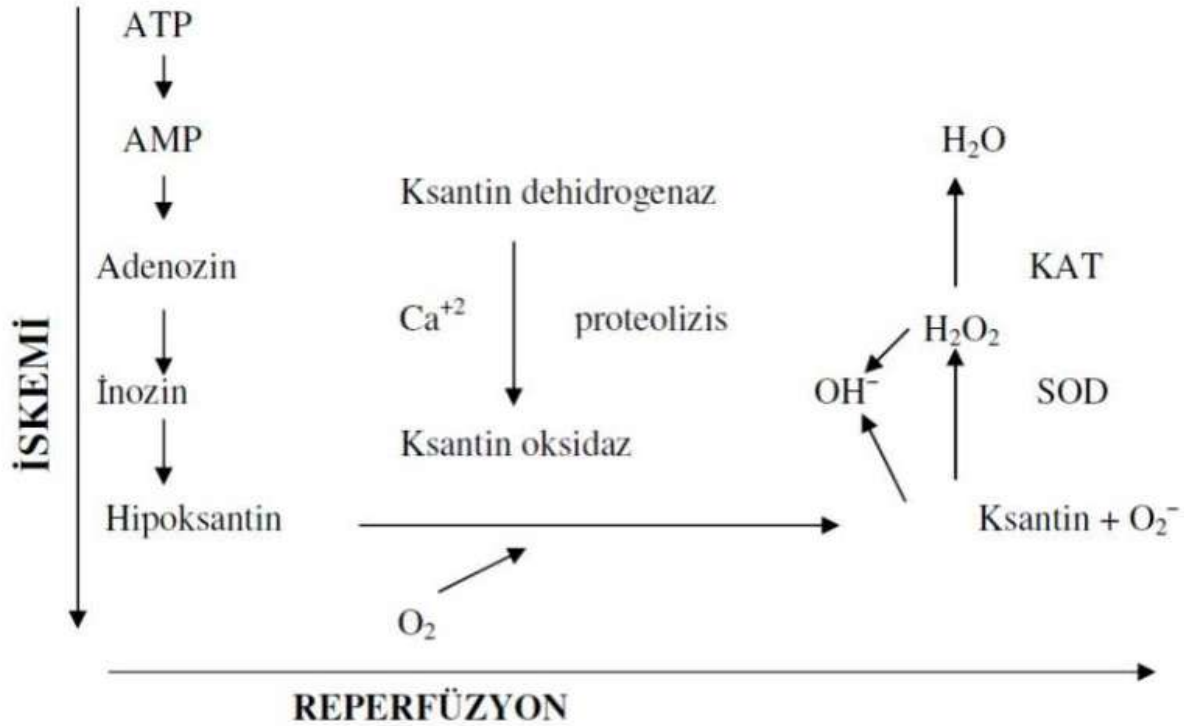
Oluşan bu oksijen radikallerinin, dokularda bulunan bütün biyomoleküllerde (nükleik asitler, membran lipidleri, enzimler, reseptörler vs) hasara yol açar. Kendine yönelik yıkıma ve *letal* potansiyele karşı, organizmanın, doğal antioksidan/savunma mekanizmasını harekete geçirmesi olağandır. Bu savunma, glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) gibi endojen antioksidan enzimler ile gerçekleşir. Bu enzimler, SOR ile reaksiyona girerek onları toksik olmayan bileşiklere çevirirler.



İ/R hasarında adenosin trifosfat (ATP), sırasıyla adenosin monofosfat (AMP), adenosin, inozin ve hipoksantine dönüşür (Şekil 3). Oksidatif ortamda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz (KD) enzimi tarafından, okside nikotinamid adenin dinükleotitin (NAD^+) indirgenmesi eşliğinde, ksantine çevrilir. Bu reaksiyon sonucunda SOR açığa çıkmaz. Ancak, iskemi durumunda KD, ksantin oksidaza (KO) dönüşür. Bu enzimatik 'D'-nin 'O' ya dönüşümü, SOR sonucu oluşan İ/R hasarının başlıca sorumlusudur. İskemi sürecinde bir diğer önemli nokta, hücre düzeyinde aşırı miktarda hipoksantin birikimidir. Şöyle ki; KD iskemik süreç sonunda KO'ya dönüşmüştür ve oluşan KO, substrat olarak NAD^+ yerine, oksijeni kullanmaktadır; dolayısıyla iskemik ortamda kullanılabilir oksijen olmadığı için, hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize edememektedir. Reperfüzyona kadar hipoksantin ve KO'nun artmış düzeylerinin zararı yoktur. Doku tekrar oksijen ile karşılaştığında

(reperfüzyon), KO, hipoksantini çok miktarda O_2^- ortaya çıktığı bir reaksiyonla ksantine çevirir. Bu süperoksit üretim artması, bir zincirleme reaksiyon dizisi başlatarak, H_2O_2 'nin ve diğer SOR'ların, endotel hücrelerinden salınımına yol açar. H_2O_2 'nin bir kısmı KAT varlığında su ve oksijene çevrilerek ortamdaki temizlenebildiği gibi, önemli bir bölümü (iskemik sürecin uzunluğuna paralel olarak) metal şelatların katalizörlüğünde O_2^- ile etkileşerek, yüksek reaktivite gösteren (nötrofil çekici özelliği olan) hidroksil radikallerinin (OH) oluşumuna yol açar (Haber-Weiss reaksiyonu) (46-49).

SOR'nin sentez ve metabolizmasını değiştirip, bozulan Ca^{+2} homeostazını düzelterek, İ/R hasarından sorumlu olduğu düşünülen patofizyolojik mekanizmaları bloke eden çok sayıda ajan (SOR süpürücüsü ajan: etil pirüvat, pentoksifilin, diklofenak, süperoksit dismutaz, siklosporin) tanımlanmıştır. Bu ajanların İ/R hasarı üzerine olumlu etkileri, deneysel olarak testis iskemisi, ekstremitte iskemisi, myokard enfarktüsü, inme, hipovolemik şok gibi doku hipoperfüzyonu ve/veya tam iskemisi durumlarında gösterilmiştir (24,25,49-56).

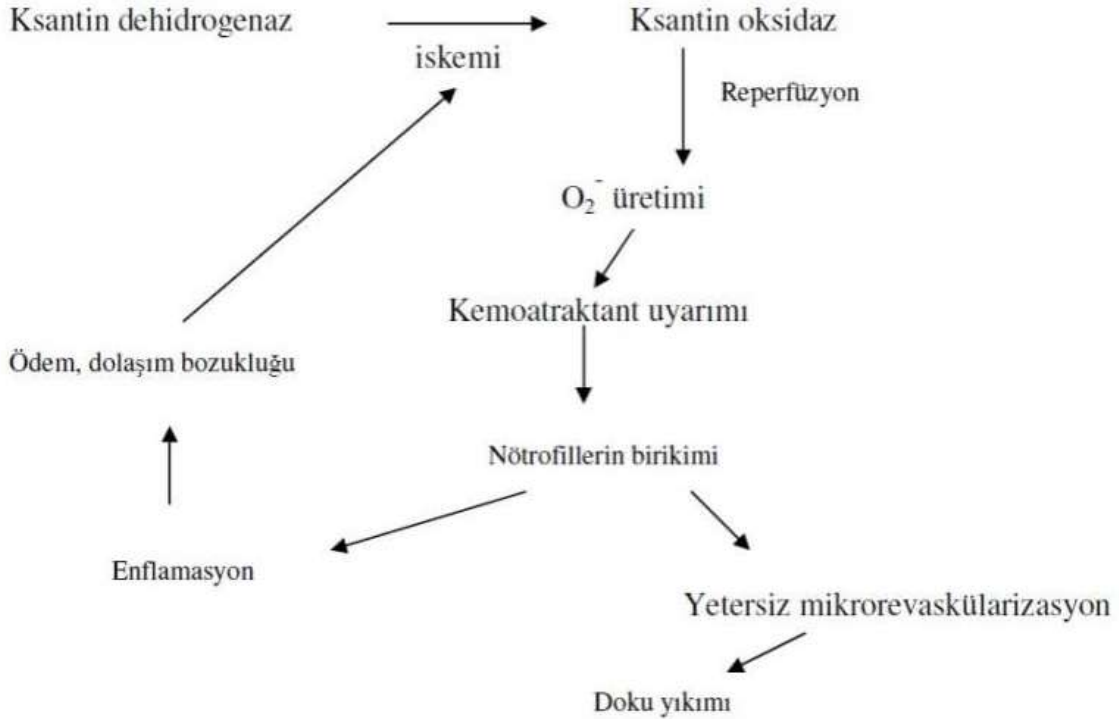


Şekil 3: İ/R hasar mekanizması. Hipoksantin, reperfüzyon ile oksijenin tekrar dolaşıma katılımıyla KO ile etkileşir ve endotel hücrelerinde O_2^- ve diğer reaktif oksijen metabolitleri ortaya çıkar. OH^- ise, demir (Fe^{+2}) veya bakır (Cu^{+2}) katalizörlüğünde Haber-Weiss

reaksiyonu ile veya sadece Fe^{+2} katalizörlüğünde, H_2O_2 ile etkileşerek (Fenton reaksiyonu) ortaya çıkar.

SOR tek başına doku hasarından sorumlu değildir. Nötrofillerin sayı veya endotele yapışma yeteneklerinin azaltıldığı deneysel modellerde, İ/R hasarının büyük ölçüde önlenemediğinin gösterilmesi bu hipotezi desteklemektedir. Bu hipotezi savunan başka bir olay da, reperfüzyon öncesi oksijen radikal inhibitörleri veya antioksidan enzimlerle yapılan tedavi sonucunda, reperfüze dokudaki nötrofil sayısının oldukça azalmasıdır. Sonuç olarak, SOR'un (kendileri hücre yıkımına yol açabildikleri gibi) ana patolojik etkisi, reperfüze dokuyu hedef alan nötrofil göçü için kemotaktik aktivitenin başlaması ve bunun sonucu mikrovasküler yatağın revaskülarizasyonunu engellemektir (Şekil 4) (39,40).

Nötrofil kemotaksisi sonrası oluşan inflamasyon ve ödem, dolaşım bozukluğu ve iskemiyi daha da arttırarak, kısır döngü oluşturduğu, daha çok sitotoksik oksijen türleri oluşturduğu böylelikle artan doku hasarına yol açtığı ifade edilmektedir (34).



Şekil 4: İ/R ve inflamasyon arasındaki döngü.

2.3.1.2. Endotel Hücreleri

İ/R hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli rol oynamaktadır. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve fonksiyonların bozulmasına yol açar. Endotel hücreleri SOR'ların hedefi ve üretim kaynaklarıdır. Örneğin, İ/R hasarında endotel hücrelerinden endotelin üretimi nitrik oksit üretiminden daha fazla gerçekleştiği için mikrovasküler homeostaz bozulmaktadır (57).

2.3.1.3. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilededeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğu gösterilmiştir (58).

Deneysel çalışmalarda, nötrofil sayısının azaltılması veya çeşitli farmakolojik ajanlarla nötrofil kemotaksisinin önlenmesinin, kalp, akciğer, ince barsak, karaciğer, testis gibi organlarda İ/R hasarını önemli oranda azalttığı gösterilmiştir (34,35,40-43). İ/R sonrasında, KO kaynaklı oksidanlar oluşmakta ve bunlar mikrovasküler endotel hücrelerine lökositlerin kemotaksisini ve adezyonunu sağlayan çeşitli mediyatörlerin salınımına neden olmaktadır. SOR'lar aynı zamanda çeşitli adezyon moleküllerinin ekspresyonunu da artırarak lökosit adezyonunu stimule etmektedir (34).

Reperfüzyon sırasında nötrofillerin ortamda bulunmasından ziyade, endotele adezyonları, mikrovasküler hasarın oluşmasında en önemli nedeni oluşturmaktadır (34,59). Reperfüzyona bağlı doku hasarında adezyon olayının rolünü araştırmaya yönelik yapılan çalışmalarda, deney hayvanlarının, CD18 kompleksi adı verilen nötrofil adeziv glikoproteinine karşı oluşturulan monoklonal antikolar ile tedavisinin, intestinal İ/R'de mukozal hasarı önlediği gösterilmiştir (60). Bu antikor, nötrofillerin endotele yapışmasını büyük ölçüde engelleyerek, reperfüze olan intestinal mukozada nötrofillerin etkisini azaltmıştır (61-63). Benzer çalışmalar, kalp ve akciğerlerde de gözlenmiştir (64,65). Buna ek olarak, CD18 endotelial ligantından başka, interselüler adezyon molekül-1'in (ICAM-1) de reperfüzyon hasarında rol oynadığı ve bu proteine karşı gelişmiş antikor ile tedavinin, infarkt alanını sınırladığı ve CD18'e benzer etki gösterdiği bulunmuştur (66-70). Bu adezyon moleküllerinin yanısıra, vasküler hücre adezyon molekül-1 (VCAM-1), endotelial lökosit adezyon molekül-1 (ELAM-1) ve granül membran protein-140 (GMP 140) endotel lökosit adezyonunda kritik rol oynayan diğer ligandlardır. Ayrıca, İ/R ile birlikte hücre içi Ca^{+2} düzeyinin yükselmesiyle, TNF- α , İL-1 ve interferon- γ (IFN- γ) bu ligantları aktive eder ve lökosit endotel adezyonu daha da artar (60-70).

Nötrofil-endotel adezyonunun, güçlü hasarlayıcı ajanların yüksek konsantrasyonda birarada bulunduğu bir mikroçevre oluşturduğu düşünülmektedir (42). Nötrofil, CD18 ve ICAM-1 proteinlerinin endotele adezyonu, ekstraselüler mikroçevreye H_2O_2 ve proteazların salınımı için güçlü bir sinyal oluşturmaktadır.

Nötrofiller, endotel üzerinde iki alana yapışarak hasara yol açmaktadırlar: 1- prekapiller sfinkter, 2- postkapiller venül. Aktive olan nötrofiller daha visköz bir yapı kazandıkları için bazen prekapiller sfinkterden geçememektedirler (42). Sonuçta, kapillerler öncesinde ve içerisinde bir nötrofil tıkaçı oluşmakta ve iskemik hasarı daha arttıran, reperfüzyon sonrası 'tekrar akımın gerçekleşmemesi' fenomeni (*no reflow phenomenon*) meydana gelmektedir. Ancak nötrofiller genellikle endotel içerisinde post kapiller venüllere yapışmaktadırlar (34,43). Nötrofillerin, reperfüzyon sonrası hasara yol açmaları, esas olarak elastaz gibi proteolitik enzimlerin salınımını artırmalarının yanısıra, HOCl ve H_2O_2 gibi toksik oksijen metabolitlerinin, sitokinlerin ve platelet aktive edici faktörün (PAF) oluşumunu

indüklemeleriyle gerçekleşir. Sonuçta, elastin gibi temel yapısal matriks proteinleri lizise uğramakta ve mikrovasküler geçirgenlik bozulmaktadır (34,71).

2.3.1.4. Kalsiyum

SOR'lar hücrel Ca^{+2} homeostazını bozarak doku hasarına yol açtığı bilinmektedir. Hücre içi Ca^{+2} 'un belli bir kısmı endoplazmik retikulum ve mitokondride depolanmış halde bulunmaktadır. Sitozol, ekstrasellüler boşluk ve endoplazmik retikulum arasındaki Ca^{+2} gradienti, Ca^{+2} pompalayan ATP az ile dengelenir.

Oksidatif stres sonucu açığa çıkan SOR, glutasyon redüktaz düzeyini düşürerek, intrasellüler Ca^{+2} dağılımını bozar. Daha sonra Ca^{+2} ATPaz inaktivasyonuna bağlı olarak, endoplazmik retikulum ve mitokondrilerden Ca^{+2} salınır ve sitozolik Ca^{+2} düzeyi yükselir. Plazma membran, Ca^{+2} ATPaz sisteminin de inaktivasyonu ile, ekstrasellüler Ca^{+2} un hücre içine akımı izlenir. Sonuçta sitozolik ve mitokondrial Ca^{+2} içeriği daha da artar. Bu da mitokondrial disfonksiyona yol açar ve hücreyi ölüme götüren yolları tetikler. Bu durum, temel olarak hücrel ATP'nin ve dolayısıyla hücre enerji düzeyinin azalmasına sekonder gelişmektedir.

Artan sitozolik Ca^{+2} 'un iki temel etkisi söz konusudur:

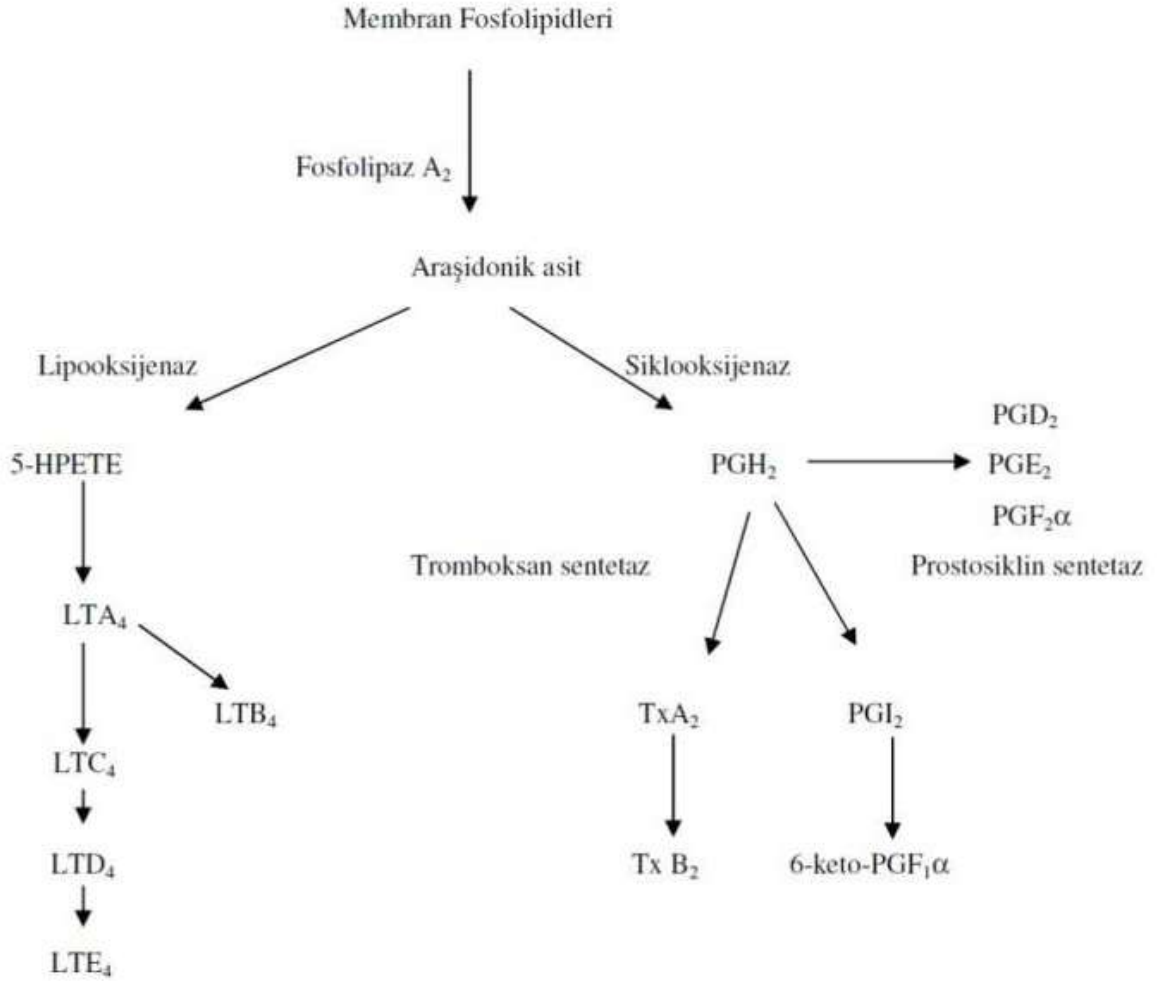
- *Sitozolik Ca^{+2} -bağımlı proteazların aktivasyonu:* Aktive olan proteazlar biri hücre iskeletinin çökmesine neden olur. Ca^{+2} ile aktive edilen ve 'kalpain' olarak tanımlanan ikinci sitozolik proteaz ise, ksantin dehidrogenazdan ksantin oksidaz oluşumunu indükler ('D'nin 'O'ya dönüşümü).

- *Fosfolipaz A2'nin aktif hale gelmesi:* Fosfolipaz A2'nin aktive olması, fosfolipidlerden araşidonik asit salınımı ile sonuçlanır. Araşidonik asit metabolizma kaskad sisteminin başlamasıyla lökotrienB₄ (LTB₄), tromboksan A₂, B₂ (TxA₂-TxB₂) gibi güçlü kemoatraktant ve vazokonstrüktör maddeler açığa çıkar. Bu maddeler, nötrofillerin endotele adezyonunu arttırarak, İ/R hasarının oluşmasında önemli rol oynarlar. İ/R sonrasında artan hücre içi Ca^{+2} ayrıca, karaciğerde Kupffer hücrelerini aktive ederek, bu hücrelerden TNF- α , İL-1, İL-6 salınımını da arttırır. Bunun sonucu, adezyon moleküllerinin endoteldeki ekspresyonları, mikrovasküler yatakta nötrofil ve trombosit agregasyonu da artar. Deneysel

araştırmalarda, prezervasyon solüsyonuna konulan Ca^{+2} kanal blokörlerinin, lökosit adezyonunu önleyerek greft sağ kalımını arttırdığı gösterilmiştir (72-75).

2.3.1.5. Eikozanoidler

Eikozanoidler yirmi karbon atomlu yağ asitlerinden türeyen ve güçlü biyolojik etkinlik gösteren endojen maddelerdir. Yapılan çalışmalarda, İ/R sonrasında, araşidonik asit metabolizması ile oluşan son ürünlerinin (eikozanoidler) plazma konsantrasyonunun arttığı saptanmıştır. Eikozanoidler, esas olarak Kupffer hücrelerinden salınırlar. SOR'nin salınımı sonucunda hücre içi artan Ca^{+2} miktarı, plazma membran fosfolipaz A_2 aktivasyonuna neden olur. Fosfolipaz A_2 hücre membran fosfolipidlerini araşidonik asite çevirerek, eikozanoidlerin oluşumunu başlatır (Şekil 5) (34,76-78).



Şekil 5: Lökotrien, prostoglandin ve tromboksan gibi eikozanoidlerin oluşumunu gösteren araşidonik asit kaskad sistemi.

Araşidonik asit ürünlerinin, İ/R hasarında, nötrofilleri temel olarak üç mekanizma ile etkiledikleri bildirilmektedir:

1. Güçlü birer kemoatraktan rolü oynayarak nötrofil akümülyasyonunu sağlarlar ve endotele nötrofillerin adezyonunu arttırlar. LTB₄ ve TxA₂ gibi eikozanoidler oldukça güçlü kemoatraktanlar olduğu günümüzde bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, LTB₄ ve TxA₂ inhibisyonunun, İ/R'ye bağlı nötrofil diapedezini önemli oranda engellediği gösterilmiştir.

2. Araşidonik asit ürünleri, nötrofilleri aktive ederek, daha fazla oranda SOR ve proteolitik enzim üretmelerine neden olurlar. LTB₄'ün, nötrofillerden H₂O₂ ve elastaz salınımında ve nötrofillerin, in vitro ve in vivo olarak, endotelial geçirgenliğini arttırmasında

güçlü bir uyarana olduğu gösterilmiştir. TxA₂ ise, İ/R sonrasında nötrofilleri aktive ederek H₂O₂ üretimlerini stimüle eder.

3. Reperfüzyon sonrasında lökotrienler ve tromboksanlar, mikrovasküler yatağa doğrudan vazokonstriktör etki yaparak yetersiz kapiller akıma yol açarlar (76-78).

2.3.1.6. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyon, hücre membranındaki fosfolipidlerdeki poliansatüre yağ asitlerinin SOR tarafından oksidatif olarak bozulmasıdır. Böylelikle membran lipid yapısını bozarak, hücrenin yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır. Lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikal, hidroksil radikalidir.

İ/R ile oluşan H₂O₂, iki değerlikli iyonlarla reaksiyona girerek OH⁻ oluşumunu gerçekleştirir (Haber-Weiss reaksiyonu). Hidroksil radikallerin karakteristik özelliği, membranda yer alan doymamış yağ asitlerinden, metilen hidrojen atomlarını çıkartarak, lipid peroksidasyonunu başlatmalarıdır. Bu süreç sonunda konjuge dienler, lipid hidroperoksit radikalleri, lipid hidroperoksitler gibi lipid kökenli SOR'lar oluşur. Kendileri aktif birer okside edici ajan olan bu lipid parçalanma ürünleri, hücre membranına ağır hasar verirler. Bunun sonucunda, hücre esnekliğini kaybeder ve transmembranöz iyon gradientinin bozulmasıyla hücrenin salgısal fonksiyonu ve bütünlüğü bozulur.

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünlerinden olan MDA, peroksidize poliansatüre yağ asitlerinin beta-ayrışması sonucu oluşur. Tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu ile plazma ve doku konsantrasyonları ölçülür (18,21,79-81).

2.3.1.7. Sitokinler

Sitokinler, monositler, makrofajlar ve lenfositler tarafından salgılanan ve immün sistem hücrelerinin proliferasyonunda ve farklılaşmasında rol oynayan, hücrelerarası iletişimi sağlayan maddelerdir. Sitokinler temel olarak Kupffer hücreleri ve endotele tutunmuş lökositler tarafından salınırlar. İ/R hasarında en önemli olanları TNF- α , İL-1, İL-6, İL-8 ve IFN- γ 'dır. Sitokinler, İ/R hasarının oluşmasında önemli rol oynayan mediyatörlerdir.

Etkilerini, tek başlarına ya da belirli bir etkileşim zinciri çerçevesine etkileşip, birbirlerinin etkisini artırarak gösterirler.

TNF- α : Endotel hücrelerini birçok yolla aktive eder. Ortamda pro-koagulan aktivitenin ve adezyon moleküllerinin aktivitesi artırır. İL-1, İL-8 ve LTB₄'ün salınımını hızlandırır. Nötrofillerden serbest oksijen radikallerinin salınımını provoke eder, nötrofil agregasyonunu, endotele yapışma yeteneğini ve fagositozu artırır. Endotelden nitrik oksit (NO) salınımına yol açar. NO superoksit ile reaksiyona girerek toksik ONOO⁻ radikallerinin oluşumuna yol açar.

İL-1: En çok Kupffer hücreleri tarafından salınır. Diğer sitokinlerin salınımını başlatır. Sinüsoid endotelinde protrombotik ve proinflamatuvar bir ortam hazırlar.

İL-6: Kupffer hücreleri ve sinüsoid endotelial hücrelerden salınır. Endotoksine hassastır. Hepatositlerden akut faz reaktantlarının (C-reaktif protein, α -1 antitripsin, fibrinojen) salınımını indükler.

IFN- γ : Büyük granüler lenfositler ve bazı T-hücreleri tarafından salınır. TNF- α , İL-1 salınımını ve endotel hücrelerinde major histokompatibilite (MHC) antijen sınıf II ekspresyonunu artırır. Endotele lenfosit adezyonunu ve antijen prezentasyonunu provoke eder. TNF- α ve İL 1 ile birlikte proteaz/antiproteaz dengesini bozarak, endotel hücreleri tarafından bazal membran protein degradasyonunun oluşumunu indükler.

İL-8: Nötrofil hareketlerini stimüle eden güçlü bir kemokindir (18,82,83).

2.4. Antioksidanlar

“Organizmanın pro-oksidan/antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için çok önemlidir. SOR’ların oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan “antioksidan savunma sistemi” dört yolla etki göstermektedir:

1. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme, “süpürücü etki”. Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu yolla etki gösterirler.

2. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya “inaktif şekle dönüştürücü etki”. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobun, seruloplazmin ve mineraller “zincir kırıcı etki” gösterirler.

4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde “onarıcı etki” gösterirler.

Endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olan antioksidanların tanımlanmasında ve etkinliklerinin ortaya konmasında İ/R hasarı modelleri önemli katkı sağlamıştır. Antioksidan özelliği öne sürülmüş pek çok madde çeşitli İ/R modellerinde test edilerek değerlendirilmiştir.

2.4.1. Endojen Antioksidanlar

Enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

1. *Enzim olan endojen antioksidanlar:* Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSHPx), Glutasyon S-Transferaz (GST), Katalaz, Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz.

2. *Enzim olmayan endojen antioksidanlar:* Melatonin, Seruloplazmin, Transferin, Miyoglobun, Hemoglobun, Ferritin, Bilirubin, Glutasyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümin.

2.4.2. Eksojen Antioksidanlar

1. *Vitamin eksojen antioksidanlar:* α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, Askorbik asit (vitamin C), Folik asit (folat).

2. *İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar:*

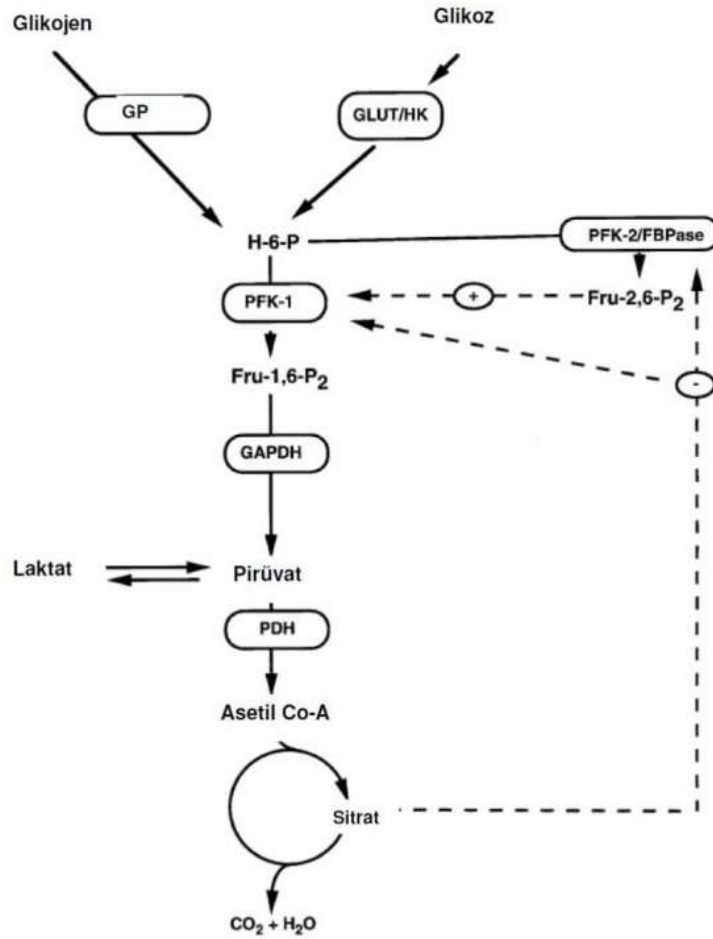
- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)

- NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar)
- Rekombinant süperoksit dismutaz
- Trolox-C (vitamin E analogu),
- Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
- Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
- Nötrofil adezyon inhibitörleri
- Demir şelatörleri.” (Klinik Gelişim, 5-13, 2009)

2.5. Etil Pirüvat

Glikoliz: Glukozy, ($C_6H_{12}O_6$), pirüvata kadar yıkan metabolik yoldur. Bu işlem sırasında oluşan serbest enerji, ATP ve NADH (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit) gibi yüksek enerjili bileşikler oluşturmak üzere kullanılır.

Glikoliz, oksijenli ve oksijensiz solunum yapan hücrelerin sitoplazmasında, oksijen kullanılmadan gerçekleşen ortak bir enerji elde etme yoludur. Glikoliz sonucunda ATP sentezlenir. Bu da glukoz molekülünün bütün enerjisinin ancak % 2 kadardır. Gerek oksijenli ve gerekse oksijensiz solunum yapan bütün organizmalarda glikoliz gerçekleşir ve hepsinde reaksiyon aşamaları aynıdır. Ancak glikolizden sonraki (pirüvattan sonraki) basamaklarda bazı farklılıklar görülür. Örneğin, oksijenli ortamda yaşayan hücreler, glikolizin son ürünü olan pirüvati, Asetil Co-A'ya dönüştürerek, ardından da Krebs çemberine sokarak olayı oksijen varlığında mitokondrilerde devam ettirirler. Glukoz molekülü Krebs sonunda karbondioksit ve su moleküllerine kadar parçalanır ve oksijenli solunum sonucunda 38 ATP sentezlenmiş olur. Oksijensiz şartlarda ise pirüvat; etil alkol, asetik asit, laktik asit gibi ürünlere dönüşür. Glikoliz, bazı ökaryotik hücrelerin yeterli oksijen bulamadığı zamanlarda, acil ATP üretimi için, hayat kurtarıcı bir rol oynar (Şekil 6) (84,85).



Şekil 6: Glikolitik yol basamakları: Tüm basamakalar kutular içinde belirtilmiştir. Glukojen fosforilaz (GP), heksokinaz (HK), gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH). Noktalı çizgiler fosfofruktokinaz-1 (PFK-1) ve fosfofruktokinaz-2 (PFK-2) allosterik kontrol aktivitesini göstermektedir (84).

Pirüvik asit organik bir asittir. Aynı zamanda bir ketondur ve en basit keto asit olarak bilinir. Pirüvat, pirüvik asidin anyon veya ester olarak adlandırılan tuzudur. Çoğunlukla pirüvik aside eşdeğer anlamda kullanılır. Renksiz bir sıvıdır ve kokusu asetik aside benzer. Etil pirüvat (EP), pirüvik asidin basit alifatik esteridir. Kimyasal adı etil 2-oksopropionatdır. Formülü $C_5H_8O_3$ 'dür (85-87).

EP, Nükleer Faktör- κ B (NF- κ B) iletim sistemini bloke ederek antiinflamatuvar ve antioksidan etki gösterir. NF- κ B, çeşitli uyarılarla (iskemi, sitokinler, growth faktör vb) uyarılan hücrede, sitoplazmadan hücre çekirdeğine göç eder ve burada çeşitli genlerdeki nükleotidlere bağlanır. Bu faktör, doğuşsal ve edinsel bağışıklık, inflamasyon, kemik

şekillenmesi (*remodelling*) ve kanser patogeneğinde önemlidir. NF- κ B kompleksi, hücrede immun ve inflamatuvar olaylarla ilgili hızlı cevap transkripsiyonunda rol oynar. NF- κ B immunglobulini aktive eden bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır. Daha sonra NF- κ B' nin 200 kadar genin transkripsiyonunda rolü olduğu bulunmuştur. EP'nin NF- κ B kompleksindeki kritik önemi olan sülfhidril gruplarını bozarak etki ettiği düşünülmektedir. Bu etkiyi özellikle p65 alt birimine bağlanarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir (88).

Günümüzde deneysel testis torsiyonu modelinde çeşitli antioksidan ajanların İ/R hasarını iyileştirdiğine yönelik oldukça fazla çalışma vardır (27-29,87-89). Diğer yandan pirüvatın ester türevi olan EP, biyokimyasal olarak endojen metabolitine olan benzerliği ve hayvan çalışmalarında gösterilen geniş güvenlik indeksi ve yiyecek katkı maddesi olarak dahi kullanılabilmesi güvenli bir ajan olduğunu göstermektedir (23).

Kullanımının güvenli olması ve potansiyel sitoprotektif etkileri nedeniyle EP'nin günümüzde çeşitli organ ve sistemlerin İ/R hasarında etkileri araştırılmıştır (87). Tsung ve ark. (92) EP'nin hepatik İ/R hasarı modelinde apoptozu, nötrofil infiltrasyonunu, hepatik lipid peroksidasyonunu ve inflamatuvar sitokinleri azaltarak önemli yararlı etkilerinin olduğunu göstermişlerdir. Payabvash ve ark. (28) testis İ/R hasarı modelinde, hem iskemi öncesinde hem de reperfüzyon sonrasında EP'nin testis doku hasarını azalttığı, azalan epididimal sperm konsantrasyonunu ve motilite fonksiyonlarını düzelttiğini/iyileştirdiğini tespit etmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Deneysel bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Tıp Fakültesi Multidisipliner Laboratuvarları Deney Hayvanları Birimi, Araştırma Laboratuvarları (ARLAB) ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, Şubat-Haziran 2011 zaman diliminde yürütülmüştür.

3.3. Çalışma Grupları

Araştırma grupları şu şekilde oluşturuldu (Şekil 7):

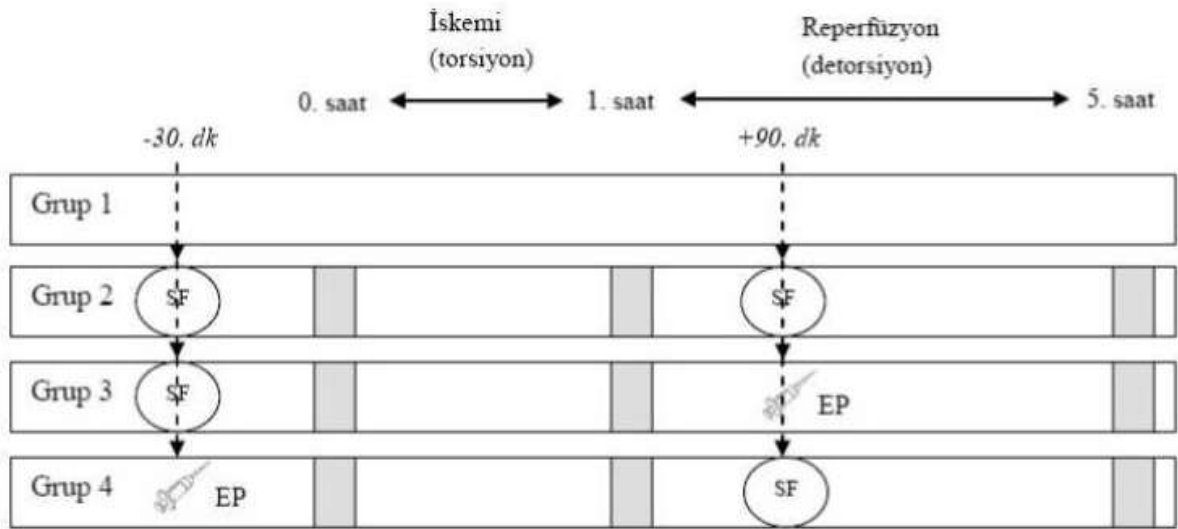
Deney Grupları:

Grup 1 (Sham): Sham (n=7),

Grup 2 (İ/R+SF): Torsiyon/detorsiyon + Serum fizyolojik (SF) (n=7),

Grup 3 (İ/R+EP): Torsiyon/detorsiyon + Etil pirüvat (EP) (n=7).

Grup 4 (EP+İ/R): Etil pirüvat (EP) +Torsiyon/detorsiyon (n=7).



Şekil 7: Gruplara yapılan girişimlerin şematik görünümü.

3.3.1. Deney Gruplarının Oluşturulma Gerekçeleri

1. Grup: (Sham grubu) İ/R (T/DT) hasarı yapılan 2. grubun kontrolü olarak kullanıldı. Bu grupta T/DT gerçekleştirilmedi. Sadece hayvanların her iki testisi, tunika vajinalis düzeyinde açılıp testisler serbest hale getirildi. Toplam 5 saat genel anestezi uygulandı.

2. Grup: Bu gruptaki hayvanların sol testislerine İ/R (T/DT) uygulandı. İskemiden 30 dakika önce ve reperfüzyonun 30. dakikasında vücut sıcaklığına eş değer sıcaklıkta 1 mL SF (%0,9 NaCl) intraperitoneal (İP) olarak injekte edildi.

3. Grup: Bu gruptaki hayvanların sol testislerine İ/R (T/DT) uygulandı. İskemiden 30 dakika önce 1 mL SF, reperfüzyonun 30. dakikasında ise 1 mL EP (50 mg/kg) (Sigma Aldrich, Almanya) İP olarak uygulandı.

4. Grup: Bu gruptaki hayvanların sol testislerine İ/R (T/DT) uygulandı. İskemiden 30 dakika önce 1 mL EP (50 mg/kg), reperfüzyonun 30. dakikasında ise 1 mL SF İP olarak uygulandı.

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen, 28 adet Wistar-Albino suşu erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, DEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nden 24 Şubat 2011 tarihinde tedarik edildi. Rastgele olarak seçilen sıçanlar, her kafeste 3-4 adet olacak şekilde yerleştirildi ve kafesleri etiketlendi. Kafes etiketlerinde proje ismi, grupların isimleri bulunmaktaydı. Tüm hayvanlar sıcaklığı 22 °C, %50-60 nisbi nem ve 12 saat gündüz/ 12 saat gece aydınlatma periyotlarında bulunan standart hayvan oda ve kafeslerinde barındırıldı. *Ad-libitum* pelet yem ve su verildi. Hayvanlara uygulanan deneysel uygulamalar ve sakrifikasyon, DEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken: Madde uygulamaları (SF, EP).

Bağımlı değişken: Ölçülen ürünler (MDA, doku histolojisi).

3.6. Veri Toplama Araçları

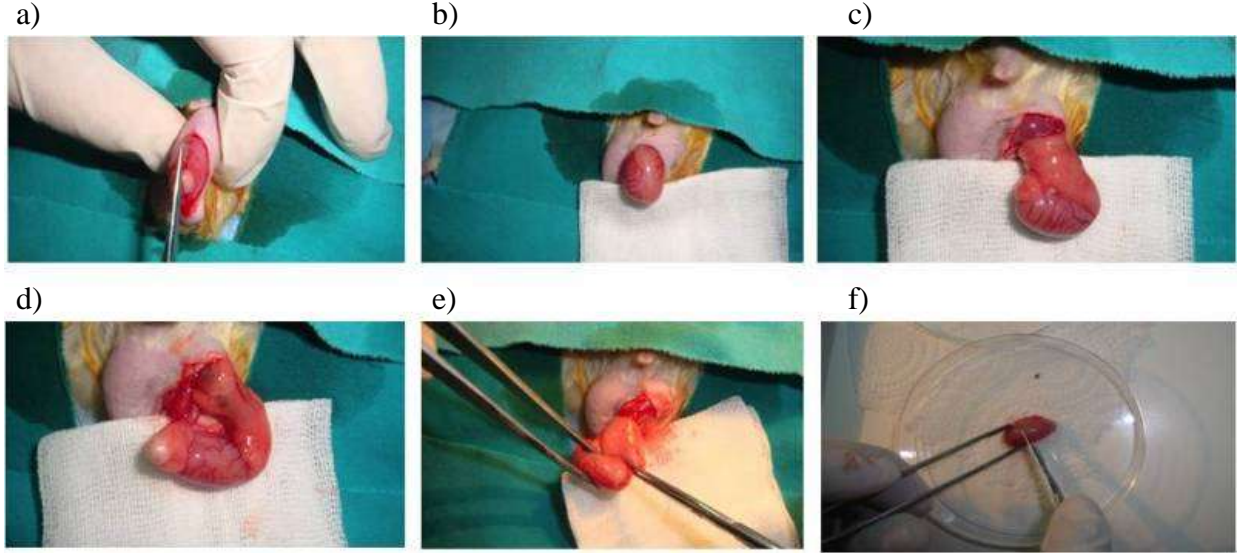
3.6.1. Anestezi

Deneysel İ/R süresince sıçanlara genel anestezi uygulandı. Bunun için 50 mg/kg dozunda ketamin (Ketalar, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 5 mg/kg dozunda ksilazin (Basilazin, Ba-vet, İstanbul, Türkiye) kombinasyonu İP olarak injekte edildi. Anestezinin idamesi ketaminin başlangıç dozunun yarısı (25 mg/kg) ile sağlandı. Anestezi derinliği hayvanların refleksleri (pedal, korneal, palpebral refleksler) ve solunumu izlenerek takip edildi.

3.6.2. Deneysel Testis İskemi/Reperfüzyon (Torsiyonu / Detorsiyon) Modeli

İ/R (T/DT) modeli Hancı ve ark. (32) uyguladıkları yöntemle göre gerçekleştirildi. Anestezi altındaki sıçanların testis dokusunda tunika vajinalis açılıp testisler serbest hale getirildikten sonra, sol testisler saat yönünde 720° torsiyone edilerek, testis dokusunun 1 saat süreyle iskemisi gerçekleştirildi. İskemi sonunda, 720° detorsiyon ile testis dokusunun 4 saat

boyunca reperfüzyonu sağlandı. İ/R (T/DT) süresi boyunca SF emdirilmiş steril tamponlar, tunika albuginea'ya sarılarak testis dokusunun nemli kalması sağlandı. Sağ testise torsiyon ve detorsiyon işlemi uygulanmadı. 5 saatlik İ/R süresi sonunda orşiyektomi işlemi ile her iki testis dokusu biyokimyasal ve histolojik incelemeler için testisler eksize edildi (Şekil 8).



Şekil 8: Deney modeli oluşturma sırasında yapılan işlemler. a) tunika vajinalis'in kesilmesi, b) testis dokusunun serbest hale getirilmesi, c) testiküler iskemi (testis torsiyonu), d) reperfüzyon (testis detorsiyonu), e) orşiyektomi, f) testisin horizontal olarak kesilerek iki eş parçaya ayrılması.

3.6.3. Deney Prosedürü

Ağırlıkları ölçülen sıçanlar ketamin-ksilazin kombinasyonu ile anestezi edildi. Genel anesteziye alınan sıçanların operasyon alanı asepsi ve antisepsi kuralları da dikkate alınarak, inguinal bölgesi tıraş edildi. Tıraş edilen bölge antiseptik solüsyon ile dezenfeksiyonu sağlandıktan sonra, bisturi (15 numara) ile sol skrotal duvara insizyon yapıldı. Tunika vajinalis tabakası geçildikten sonra sol testis dokusu serbest hale getirildi. Bu süre zarfında testis dokusunda oluşabilecek kurumalara ve yapışmalara engel olmak için steril enjektörle 0,5 mL vücut sıcaklığında steril SF solüsyonu çekilerek, steril tamponlara SF emdirildi. Sol testisin tunika albuginea tabakasını kapsayacak şekilde sarılan nemli tamponlar 5 saat süreyle tespit edildi.

Gruplara göre işlemler şu şekilde yapıldı:

Grup 1 de sham operasyonu yapılan sıçanlarda testis dokusuna İ/R yapılmadı. Ancak diğer grupların İ/R süreleri dikkate alınarak (1 saat iskemi ve 4 saat reperfüzyon süresi toplam 5 saat) genel anestezi altında kalması sağlandı. Sağ testis dokusuna ise hiçbir işlem uygulanmadı.

Grup 2, 3 ve 4'teki sıçanların testis dokusu 1 saat süreyle iskemi için tespit edildi. İskemi süresi biten sıçanların 720° detorsiyon ile testis dokusunun reperfüzyonu sağlandı. Sağ testis dokusuna hiçbir işlem uygulanmadı. 4 saat reperfüzyon süresi sonunda bilateral orşiyektomi yapılarak testis dokuları biyokimyasal ve histolojik olarak incelendi.

Grup 2'de iskemiden 30 dakikadan önce ve reperfüzyonun 30. dakikasında İP yolla 1 mL SF verildi.

Grup 3'de iskemiden 30 dakika önce 1 mL SF ve reperfüzyonun 30. dakikasında İP yolla 1 mL seyreltik EP (50 mg/kg) verildi.

Grup 4'de iskemiden 30 dakika önce 1mL seyreltik EP (50 mg/kg) ve reperfüzyonun 30. dakikasında 1mL SF İP yolla injekte edildi.

3.6.4. Deneyin Sonlandırılması ve Doku Örneklerinin Toplanması

Reperfüzyon sonunda hayvanların göğüs boşluğu açılarak kardiyak perfüzyon sağlandı. Bu amaçla göğüs boşluğu açılan sıçanların sağ atriumlarına makas ile kesi yapıldı. Daha sonra sol ventrikülden 50 mL SF verilerek dokulardaki kanın uzaklaşması sağlandı. Yine sol ventrikülden 50 mL %10'luk formaldehit solüsyonu injektör aracılığıyla tatbik edildi. Bu uygulama ile testis dokusunun fiksasyonu sağlandı. Daha sonra sağ ve sol testislere bilateral orşiyektomi yapıldı. Sakrifiye edilen hayvanların sol ve sağ testisleri bisturi ile horizontal kesildi ve simetrik olarak iki eş parçaya bölündü. Distal parçası (yarım) serbest oksijen radikallerinin yarattığı hasarın göstergesi olan MDA düzeyinin belirlenmesi için ependorf tüplere konuldu. Ependorf tüplerin nakli için sıvı nitrojen nakil kutusu kullanıldı. Testis dokusunun yarısı biyokimya değerlendirmeler için DEÜ Tıp Fakültesi ARLAB'a gönderildi. Dokular, derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edildi. Dokunun proksimal yarımı ise % 10

luk formaldehit solüsyon dolu kaplar içerisine konarak, DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına histolojik incelemeler için gönderildi.

3.6.5. Biyokimyasal İnceleme

Lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA doku örneklerinde ölçüldü (93,94).

3.6.5.1. MDA Analizi

Analiz Koşulları:

Kolon özellikleri: 250 x 4,6 mm, 5 µM tanecik çapında C18 kolon

Mobil faz bileşimi: KH₂PO₄ (0,01M) %30 metanol içerecek şekilde hazırlandı. K₂HPO₄ (0,01M) %30 metanol içerecek şekilde hazırlandı, ikisi karıştırılarak pH 7'ye ayarlandı. Mobil faz 0.2 µM çapında filtreden geçirildi.

Mobil faz akış hızı: 0,8 mL/dakika

Gradient program: İzokratik

Fırın sıcaklığı: 30 °C

Dedektör: Floresans (eksitasyon 515 nm, emisyon 553 nm)

Enjeksiyon hacmi: 10 µL

Standart/ standart için çözgen: Standartlar saf su ile çözüldü ve dilue edildi.

Uygulama basamakları:

40 µL örnek (veya standart) kapaklı cam tüplere kondu.

100 µL saf su ilave edildi.

20 µL 2.8 mmol/L BHT (etanolde) ilave edildi.

40 µL %8.1 SDS,

600 µL 8 g/L TBA çözeltisi ilave edildi. (TBA, 200 mL/L asetik asid ile 1:1 dilue edildi, 2 M NaOH pH NaOH ile 3.5'a ayarlandı.)

95 °C'de su banyosunda 1 saat bekletildi.

Su banyosundan çıkarıldıktan sonra buz üzerinde soğutuldu.

200 µL saf su, 1000 µL, butanol:piridin (15:1) ilave edildi ve tam 1 dakika vortekslenerek karıştırıldı. 2-3 dakika tüpler bekletildi.

Renkli üst (organik) fazın kendiliğinden ayrıldığı gözlemlendi.

Üst fazlar eppendorf tüplerine alındı.

10,000 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edildi.
HPLC cihazına 10 mikrolitre enjeksiyon yapıldı.

3.6.6. Histolojik İnceleme

Histolojik incelemeler için doku örnekleri % 10'luk tamponlu formaldehitte doku tespiti için bekletildi. Formaldehitte tespit edilen testis dokusu parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında Leica RM 2125 (Almanya) mikrotomu ile ince kesitler yapıldı. Kesitler hematoksilin-eozin (H-E) ile boyandı. Tüm grupların doku örnekleri aynı histolog tarafından bilgisayarlı görüntüleme analiz sistemi bulunan ışık mikroskopunda (Olympus BH-2 Tokyo, Japonya) histolojik olarak değerlendirildi. Histolojik yıkımı sınıflandırmada her grup için ayrı ayrı tübüller değerlendirilerek, ortalama "Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru" hesaplandı (95).

3.6.6.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Testis dokuları %10' luk tamponlanmış nötral formalin içerisinde 3 gün süreyle tespit edilerek rutin doku takip işlemi başlatıldı. Tespit maddesinin uzaklaştırılmaları için 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, 60°C de etüvde 20' şer dakika sırasıyla %70, %80, %96' ya artan etil alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra 60°C de etüvde 20' şer dakika dört değişim asetonda dehidrate edildi. Ardından şeffaflandırma amacıyla 60°C de etüvde 30' ar dakika iki değişim ksilolde bekletildi. 60°C'lik etüvde iki değişim halinde 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlanarak ince doku dilimleri parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 1). Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5 µ' luk kesitler alındı.

Tablo 1: Rutin doku takibi

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%10'luk Formaldehit	3 gün
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 Gece
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	20 Dakika
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	20 Dakika
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 2	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 3	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 4	20 Dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 1	30 Dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 2	30 Dakika
	Parafin 1	60 Dakika
	Parafin 2	60 Dakika
Bloklama	Parafin	

3.6.6.2. Hematoksilen-Eozin Boyaması

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dakika 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 5 değişim absolü alkol-%70'e azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absolü alkolden geçirilen

kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 2).

Tablo 2: Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (Oda Isısında)	10 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (Oda Isısında)	10 Dakika
Rehidratasyon	%100'luk alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'luk alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 Dakika
Yıkama	Akarsu	10 Dakika
Boyama	Eozin	2 Dakika
	% 70'lik alkol	Çalkalama
	%80'lik alkol	Çalkalama
	%96'lık alkol	Çalkalama
	%100'lük alkol	Çalkalama
	%100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.6.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

Deney gruplarındaki her bir hayvan için ayrı ayrı 20 adet seminifer tübül değerlendirilerek, her bir tübüle Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması yapıldı (Tablo 3).

Tablo 3: Jonhsen testiküler biyopsi skorlaması.

Skor 1	Germ hücresi ve sertoli hücresi hiç yok.
Skor 2	Germ hücresi hiç yok. Yalnızca Sertoli hücresi mevcut.
Skor 3	Sadece spermatogonia şeklinde mevcut.
Skor 4	Çok az sayıda spermatozoid mevcut.
Skor 5	Spermatozoa ya da spermatid hiç yok. Ancak çok sayıda spermatozoid mevcut.
Skor 6	Sadece birkaç tane spermatid mevcut.
Skor 7	Spermatozoa hiç yok. Fakat çok sayıda spermatid mevcut.
Skor 8	Çok az sayıda spermatozoa mevcut.
Skor 9	Çok sayıda spermatozoa mevcut ve düzensiz spermatogenezis mevcut.
Skor 10	Tamamlanmış spermatogenezis mevcut ve düzgün açık tübül mevcut.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Haziran – Temmuz 2010: Tez için konu seçimi ve hipotezin belirlenmesi.

Ağustos – Eylül 2010: Kaynak tarama.

Ekim – Kasım 2010: Tez önerisi yazımı.

Aralık 2010: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul başvurusu.

Ocak 2011: DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü başvurusu.

Şubat 2011: Hazırlık (ön çalışma.)

Mart 2011: *In vivo* deneylerin gerçekleştirilmesi.

Nisan – Haziran 2011: Biyokimyasal ve histolojik analizler

Haziran 2011: Verilerin toplanması ve değerlendirilmesi. Tez yazımı.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Veri analizleri Windows için SPSS'in 15.0 versiyonu ile yapıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal Wallis testi kullanılarak yapıldı. Kruskal Wallis testinden elde edilen p değerleri istatistiksel olarak anlamlı çıktığında Mann Withney U karşılaştırma testi kullanılarak analiz edildi. p değeri 0.05 ten küçükse anlamlı olarak ifade edildi ($p < 0.05$).

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Deneyisel testis İ/R(T/DT) modeli sonunda uygulanan “kardiyak perfüzyon” işlemi biyokimyasal inceleme (MDA) sonuçlarını olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir.

3.10. Etik Kurul Onayı

DEÜ Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 24 Aralık 2010 tarihinde araştırmanın uygulanmasında sakınca olmadığına karar vermiştir (protokol no: 76/2010) (EK-1).

4. BULGULAR

4.1. Testis Dokusu Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

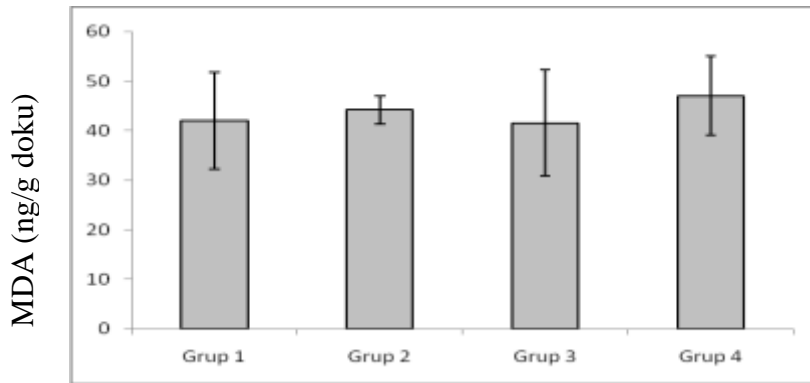
Tüm grupların sol (ipsilateral) ve sağ (kontralateral) testis dokusundaki MDA düzeyleri, sırasıyla Şekil 9a ve Şekil 9b’de gösterilmiştir. MDA düzeyleri istatistiksel olarak analiz edildiğinde:

Sol testiste (ipsilateral): (Şekil 9a)

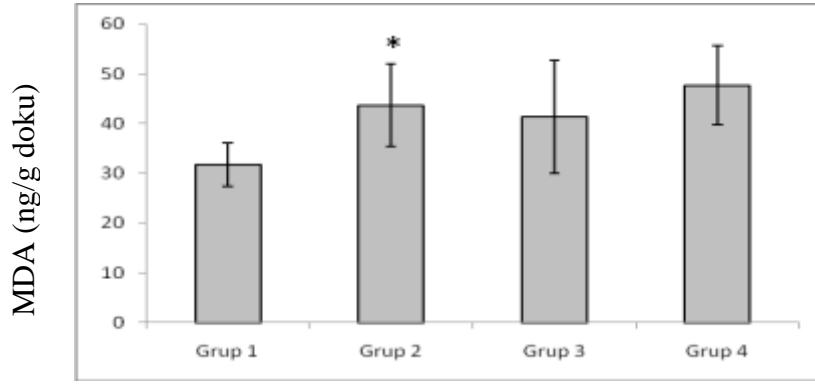
–Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Sağ testiste (kontralateral): (Şekil 9b)

–Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında anlamlı bir fark bulundu ($p<0.05$).



Şekil 9a: Sol testis (ipsilateral) MDA düzeyi.



Şekil 9b: Sağ testiste (kontralateral) MDA düzeyi.

Grup 1 (Sham) ve Grup 2 (İ/R+SF) arasında anlamlı fark olduğu ($p<0.05$), sol testis İ/R hasarının sağ testiste MDA düzeyini yükselttiği bulundu. EP uygulaması MDA düzeylerini etkilemedi ($p>0.05$).

Açıklamalar:

Grup 1: Sham,

Grup 2: İ/R + SF (sol testise T/DT yapıldı),

Grup 3: İ/R + EP (sol testise T/DT yapıldı ve reperfüzyonun 30. dakikasında EP injekte edildi),

Grup 4: EP+İ/R (İskemiden 30 dk önce EP uygulandı ve sol testise T/DT yapıldı).

* Grup 1 (Sham)'e göre ($p<0.05$).

4.2. Testis Dokunun Histolojik Analizleri

4.2.1. Jonhsen Skorlama

Testis dokusunun histolojik analizleri, “Johnsen testiküler biyopsi skorlaması”na göre yapıldı (Tablo 3). Tüm grupların sol (ipsilateral) ve sağ (kontralateral) testis skor düzeyleri, sırasıyla; Şekil 10a ve Şekil 10b’de gösterilmiştir. Histolojik skorlama istatistiksel olarak analiz edildiğinde:

Sol testiste (ipsilateral): (Şekil 10a)

–Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında anlamlı bir fark bulundu ($p<0.001$).

–Grup 1 (Sham) ve Grup 2 (İ/R+SF) arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Sol testis İ/R uygulaması, sol testiste skor düzeyini düşürdü.

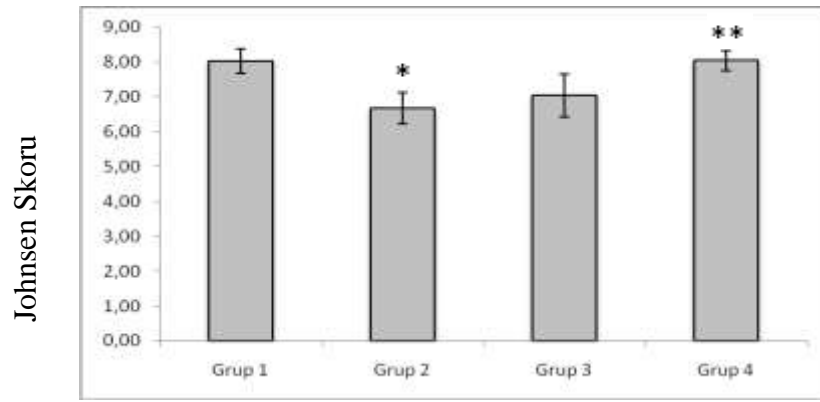
–Grup 2 (İ/R+SF) ve Grup 4 (EP+İ/R) arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). İskemiden önce uygulanan EP, İ/R'ye bağlı azalan skorlamayı artırdı.

Sağ testiste (kontralateral): (Şekil 10b):

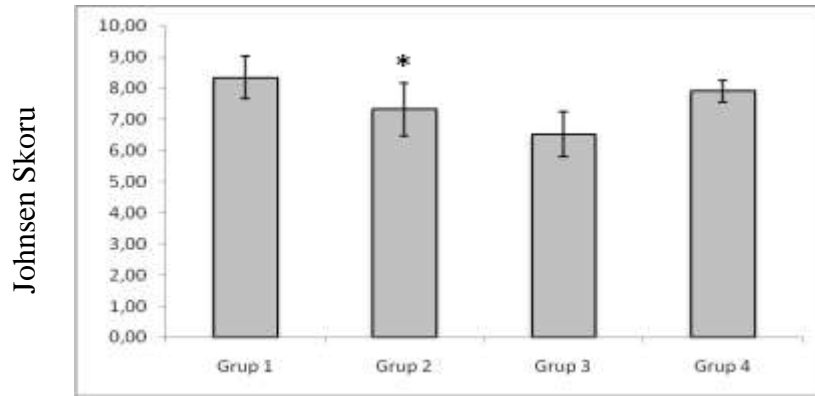
–Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

–Grup 1 (Sham) ve Grup 2 (İ/R) arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Sol testis İ/R uygulaması, sağ testiste skor düzeyini azalttı.

–EP'nin sağ testiste herhangi bir değişiklik oluşturmadığı saptandı ($p>0.05$).



Şekil 10a: Sol testis (ipsilateral) Johnsen skoru.



Şekil 10b: Sağ testis (kontralateral) Johnsen skoru.

Açıklamalar:

Grup 1: Sham,

Grup 2: İ/R + SF (sol testise T/DT yapıldı),

Grup 3: İ/R + EP (sol testise T/DT yapıldı ve reperfüzyonun 30. dakikasında EP injekte edildi),

Grup 4: EP+İ/R (İskemiden 30 dk önce EP uygulandı ve sol testise T/DT yapıldı).

* Grup 1 (Sham)' e göre ($p<0.001$).

** Grup2 (İ/R+SF)'ye göre ($p<0.001$).

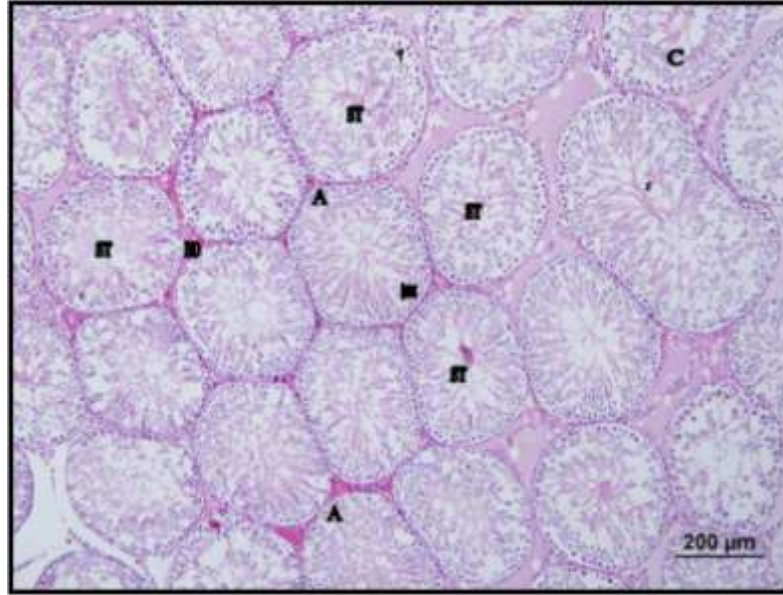
4.2.2. Işık Mikroskobu Görünümleri

Grup 1 (Sham)'e ait testis kesitleri incelendiğinde testis dokusu olağan histolojik görünümdeydi. Seminifer tübüller, intersitisyel alan ve intersitisyel bağ dokusundan oluşmaktaydı. Seminifer tübüller geniş intersitisyel doku içinde heterojen bir yapı göstermekteydi. Seminifer tübüllerin duvarında bazal membran üzerine oturmuş spermatogonyumlar, spermatozoidler ve merkezde spermatidler izlendi (Şekil 11-13).

Grup 2 (İ/R+SF) incelendiğinde seminifer tübüllerde yoğun dejenerasyonlar ve atrofi gözlemlendi. Tübülün karakteristik yuvarlak yapısında bozulmalar, seminifer tübül duvarındaki epitelde bozulma ve tübül lümeninde düzensizlik görüldü. Spermatogenik seriye ait hücrelerde morfolojik bozukluklar, spermatogonium ve sertoli hücrelerinde azalma izlendi (Şekil 14-21).

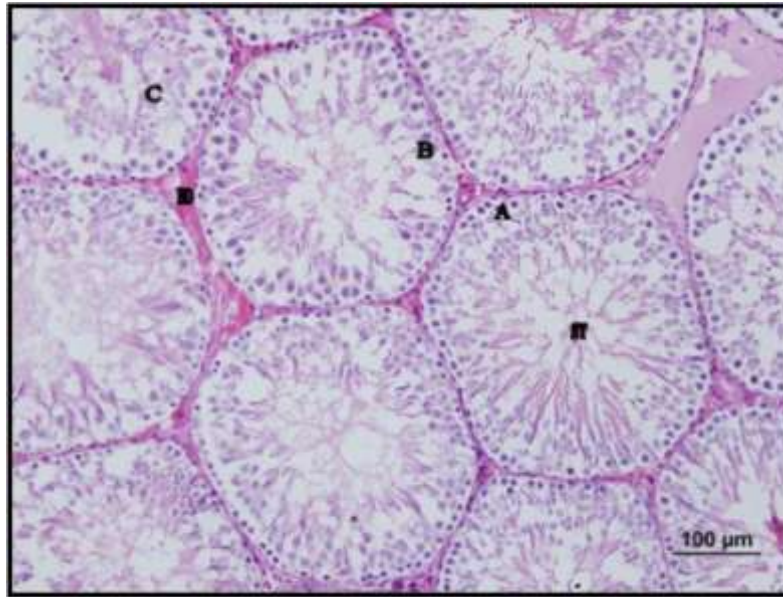
Grup 3 (İ/R+EP)'de, Grup 2 (İ/R+SF)'de gözlenen çoğu patolojik bulguda bir miktar azalma saptandı. Seminifer tübüllerde dejenerasyon, spermatogenik seriye ait hücre diziliminde bozukluk ve hücre sayısında azalmanın yer yer devam ettiği gözlemlendi (Şekil 22-23).

Grup 4 (EP+İ/R)'de, Grup 2 (İ/R+SF)'de gözlenen bulguların tümünde azalma saptandı. Tübül lümenindeki düzensizliklerin düzeldiği, spermatogenik seriye ait hücrelerde morfolojik bozuklukların oldukça azaldığı, sham grubuna benzer şekilde spermatogenik dizilim gösterdiği tespit edildi (Şekil 24-26).

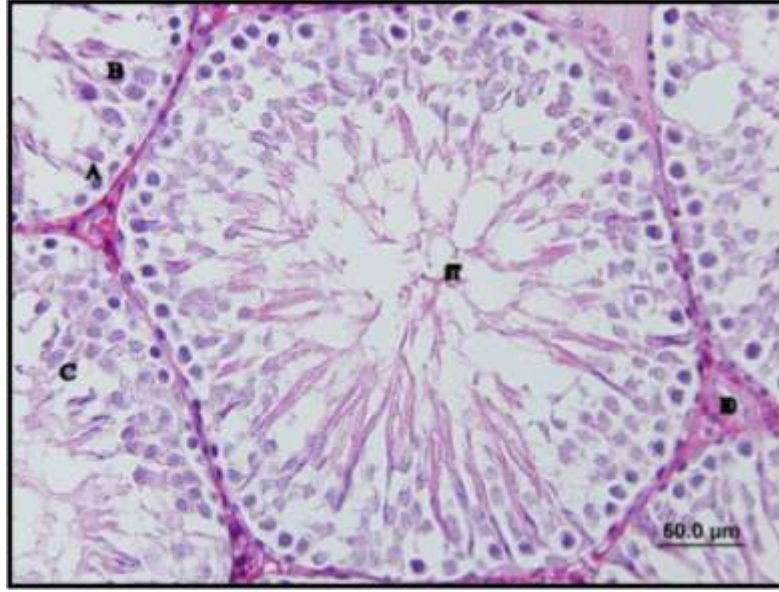


Şekil 11: Grup 1 (Sham)'de genel görünüm, H-E.

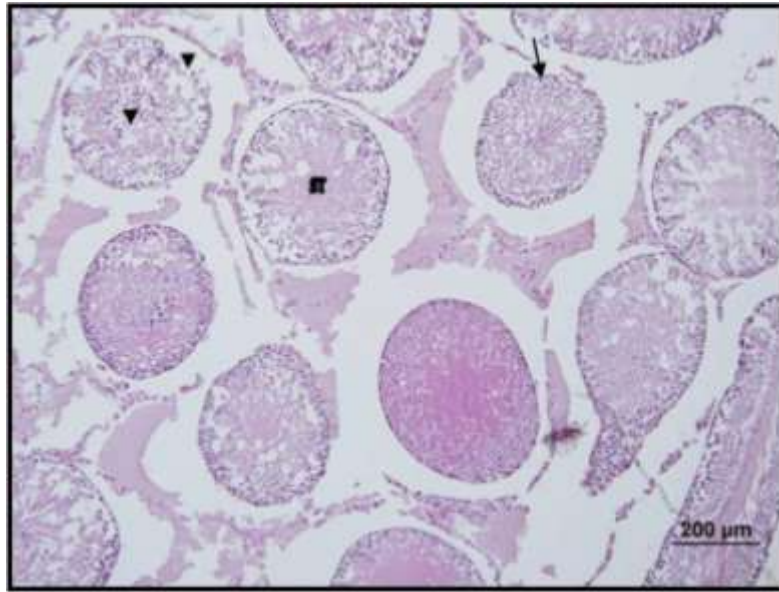
Seminifer tübüller normal görünümünde olup geniş intersitisyel doku içinde heterojen dağılım göstermekteydi. BD: İntersitisyel bağ doku, ST: Seminifer tübül, A: Spermatogonyum, B: Spermatozoid, C: Spermatozoid.



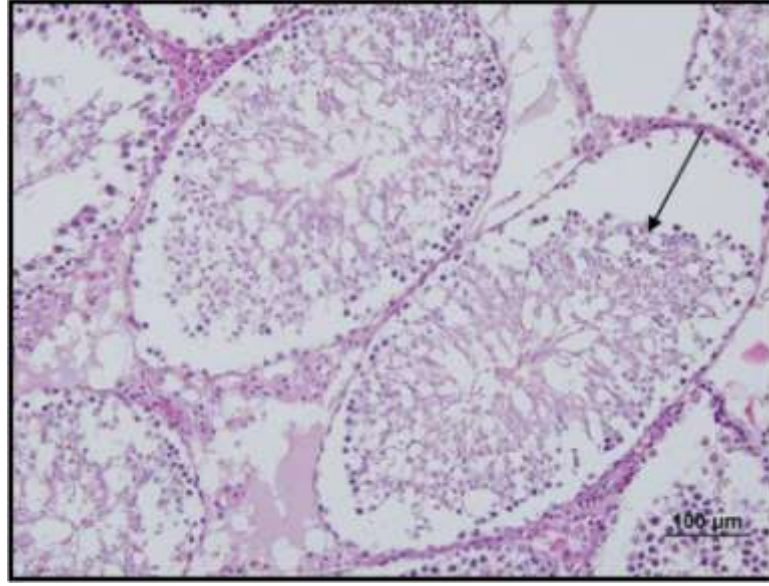
Şekil 12: Grup 1 (Sham)'de genel görünüm, H-E. BD: İntersitisyel bağ doku, ST: Seminifer tübül, A: Spermatogonyum, B: Spermatozoid, C: Spermatozoid.



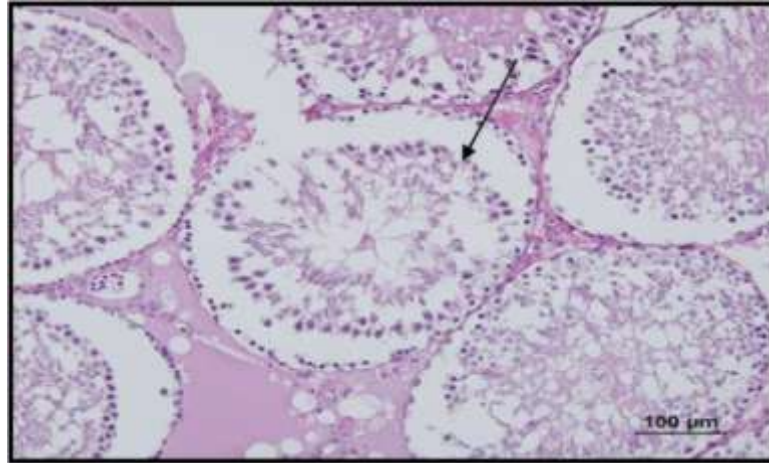
Şekil 13: Grup 1 (Sham)'de seminifer tübül genel görünüm, H-E. BD: İntersitisyel bağ doku, ST: Seminifer tübül A: Spermatogonyum, B: Spermatozit, C: Spermatisid.



Şekil 14: Grup 2 (I/R+SF)'de genel görünüm, H-E. Seminifer tübüllerde, dejenerasyon ve atrofi vardır (→). Seminifer tübül duvarındaki epitelde bozulma ve tübül lümeninde düzensizlik gözlemlendi (▼). ST: Seminifer tübül.



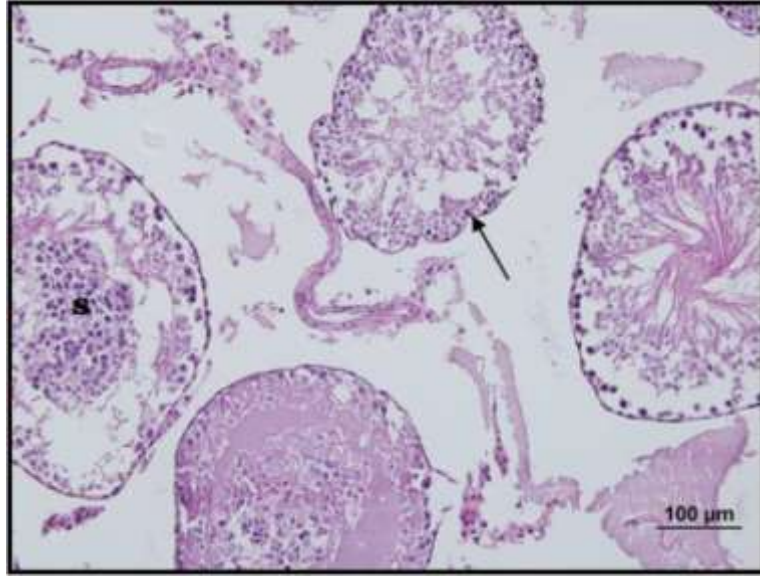
Şekil 15: Grup 2 (İ/R+SF)'de seminifer tübül görünümü, H-E. Seminifer tübüllerde düzensizlik, spermatogenik seri hücrelerin diziliminde bozulma (ok).



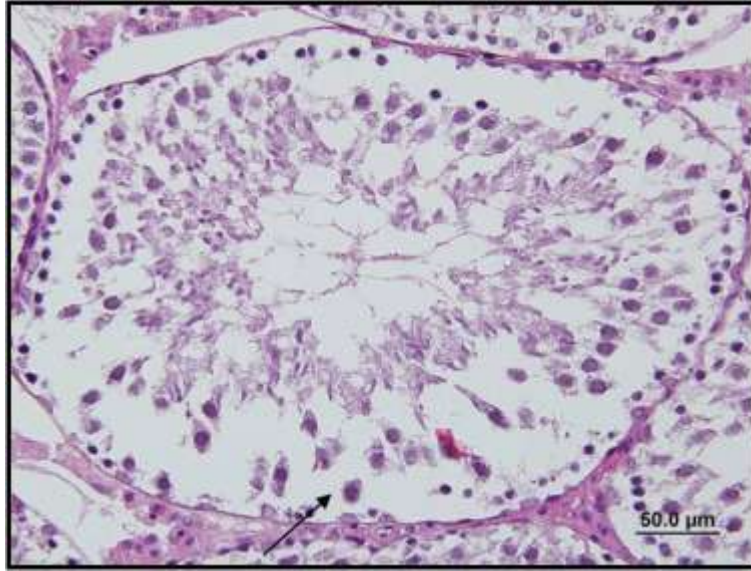
Şekil 16: Grup 2 (İ/R+SF)'de hücrelerin genel görünümü, H-E. Spermatogenik seri hücrelerin dizilimde bozulma (ok).



Şekil 17: Grup 2 (İ/R+SF)'de hücrelerin görünümü, H-E. Spermatogenik seri hücrelerin diziliminde bozulma (ok).



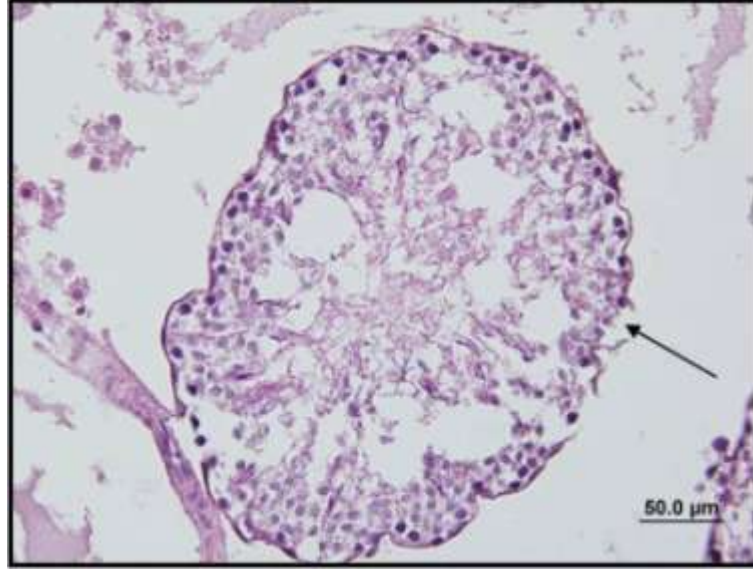
Şekil 18: Grup 2 (İ/R+SF)'de seminifer tübül ve hücrelerin görünümü, H-E. Seminifer tübül konturlarında düzensizlik (ok), spermatogenik seri hücrelerin diziliminde bozulma, lümen içinde spermarosit birikimi (S).



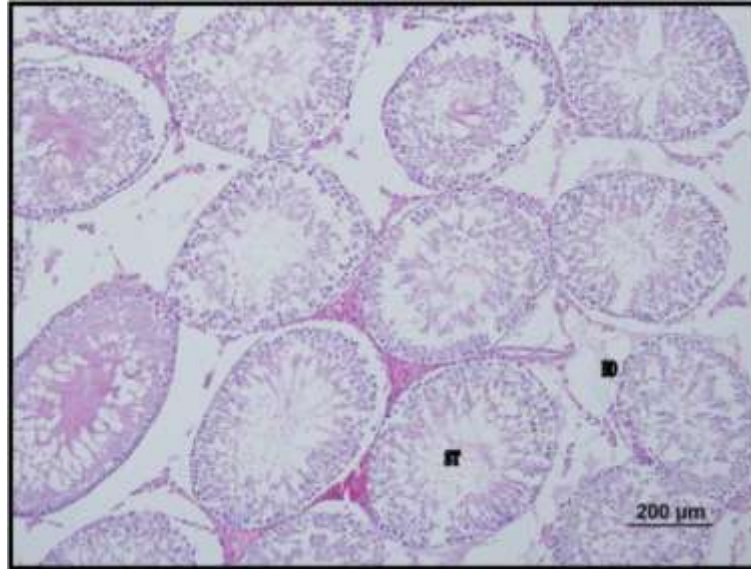
Şekil 19: Grup 2 (İ/R+SF)'de hücrelerin görünümü, H-E. Spermatogenik seri hücrelerin diziliminde bozulma (ok), spermatogonium ve sertoli hücrelerinde azalma.



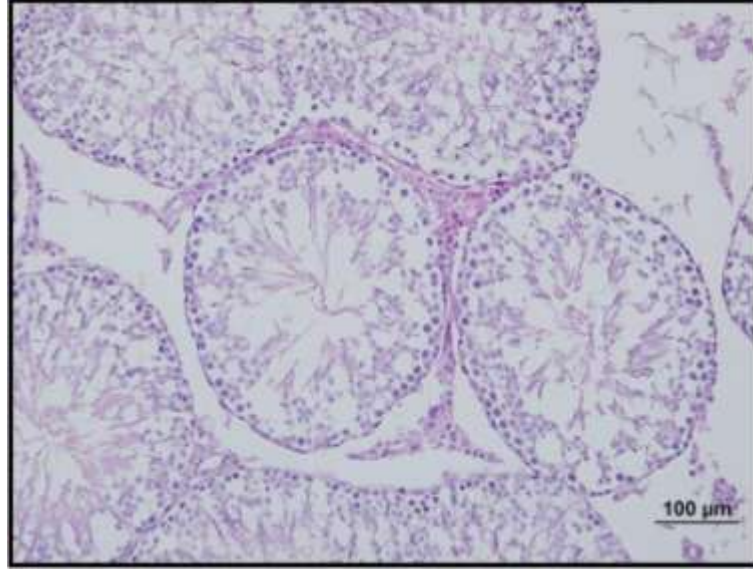
Şekil 20: Grup 2 (İ/R+SF)'de hücrelerin görünümü, H-E. Spermatogenik seri hücrelerin diziliminde bozulma, spermatogonium ve sertoli hücrelerinde azalma.



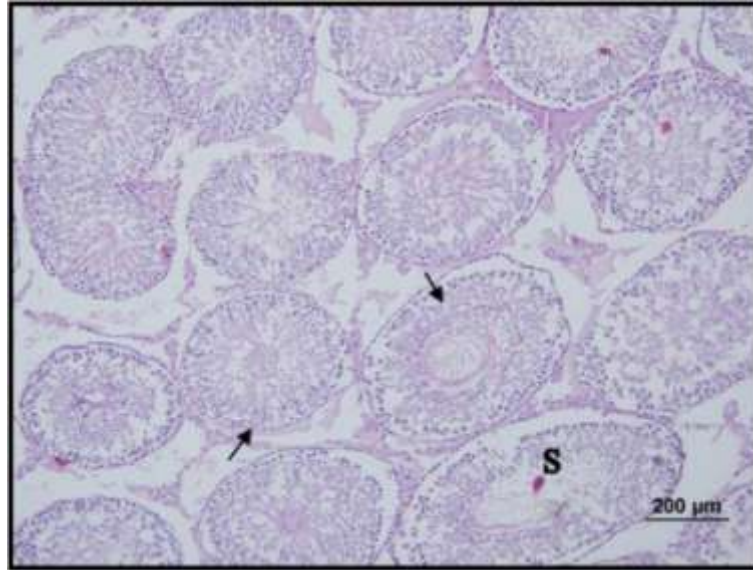
Şekil 21: Grup 2 (İ/R+SF)'de seminifer tübül görünümü, H-E. Seminifer tübül konturlarında düzensizlik (ok), spermatogenik seri hücrelerin diziliminde bozulma.



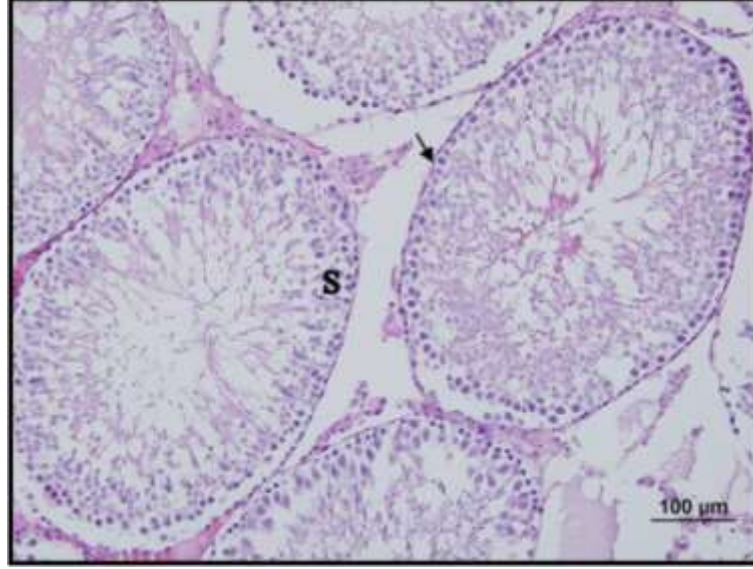
Şekil 22: Grup 3 (İ/R+EP)'de genel görünüm, H-E. BD: İntersitisyel bağ doku, ST: Seminifer tübül.



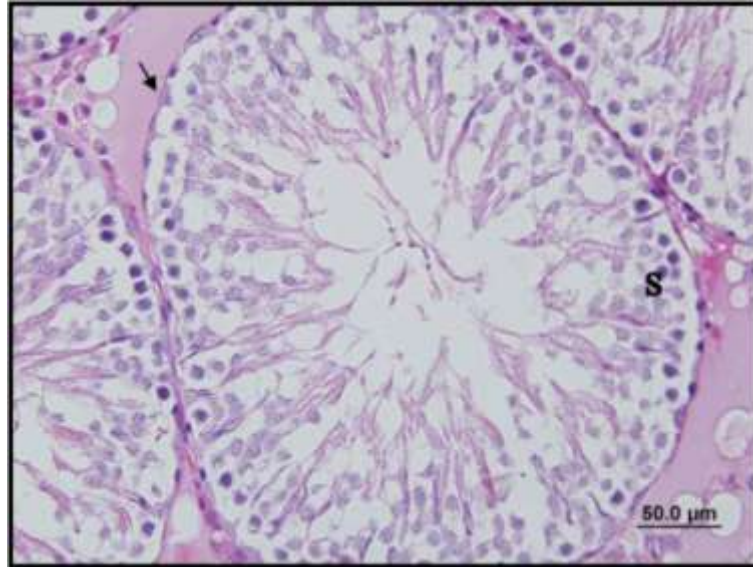
Şekil 23: Grup 3 (İ/R+EP)'de genel görünüm, H-E. Seminifer tübüllerde düzensizliklerde azalma, spermatogenik seri hücrelerin diziliminde bozukluk.



Şekil 24: Grup 4 (EP+İ/R)'de seminifer tübül ve hücrelerin görünümü, H-E. Seminifer tübül kontur düzensizliklerinde azalma (oklar), spermatogenik seri hücrelerin diziliminde bozulma (S).



Şekil 25: Grup 4 (EP+I/R)'de seminifer tübül ve hücrelerin görünümü, H-E. Seminifer tübül konturlarında düzensizliklerinde azalma (ok), spermatogenik seri hücrelerin diziliminde düzelme (S).



Şekil 26: Grup 4 (EP+I/R)'de seminifer tübül ve hücrelerin görünümü, H-E. Seminifer tübül konturlarında düzensizliklerinde azalma (ok), spermatogenik seri hücrelerin diziliminde düzelme (S).

5. TARTIŞMA

Testis torsiyonu (iskemi); yenidoğan, çocukluk ve adölesan dönemdeki erkekleri etkileyen ve sık karşılaşılan acil ürolojik bir hastalıktır. Acilen tedavi edilmediği takdirde, hücrel enerji depolarının azalması ve toksik metabolitlerin birikimine bağlı bir dizi hasarlanma mekanizmaları başlar (67,70,72,73). Testis torsiyonun tedavisi cerrahi olarak en kısa sürede detorsiyon (reperfüzyon) yapılması şeklindedir. Eğer torsiyon 6 saat içinde cerrahi olarak tedavi edilmezse testiste disfonksiyonel değişiklikler oluşmaktadır (97). Bizim çalışmamızda 1 saat iskemi uygulandığından bu tür değişiklikler oluşmamıştır. Deneysel olarak yapılan araştırmalarda, testis dokusunda İ/R ile ciddi fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler olduğu gözlenmiştir (39,49). Bizim çalışmamızda da 4 saat detorsiyonun sonunda, reperfüzyona bağlı olarak seminifer tübüllerde dejenerasyon ve atrofi saptanmıştır. Ayrıca spermatogeneziste yer alan hücrelerde hasar oluşmuştur. Pekçetin Ç ve ark.'nın (29) yaptıkları çalışmada 2 saatlik iskemi sonrası 4 saat reperfüzyonun seminifer tübül çapları ve sayısının kontrole göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca atrofik görünüm ve bazal membran bozukluklarının da mevcut olduğu saptanmıştır.

İskemi, dokuda anaerobik metabolizma son ürünlerinin ve toksik ürünlerin birikimine yol açarak; reperfüzyon ise, SOR oluşturarak, hücrel antioksidan sistemleri etkileyerek hasar oluşturmaktadır. İnsanlarda testis T/DT ile testiküler dokuda atrofi ve testis nekrozu gibi patolojik değişiklikler ile spermatogeneziste gerileme, azospermi ve kısırlık gibi bulgular ortaya çıkmıştır (12,13). Sıçanlarda testiste İ/R ile ciddi doku hasarına yol açtığı gösterilmiştir (23-25,28-32,76,80,90). Deneysel olarak yapılan sıçan testis İ/R modellerinde, İ/R'ye maruz kalma süresi değişmektedir (28-32,76,80,96,97). Torsiyonun derecesi ve süresi ile ilişkili olarak, reperfüze olan testiste bilateral testiküler İ/R hasarı meydana gelmektedir (19,98,99). Ancak tek taraflı testis torsiyonunun karşı testise etkisi tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda karşı testiste hasar olduğu rapor edilmesine karşın, bazı çalışmalarda bu birliktelik saptanmamıştır (14,19,28). Çalışmamızda tek taraflı testis T/DT sonrası karşı testiste bir oksidatif stres ve doku hasarı olduğu saptanmıştır. Ancak hasar torsiyon yapılan testiste daha şiddetli olmuştur. Karşı testiste refleks olarak azalmış kan akımı, testisten salınan SOR ve bozulmuş kan-testis bariyeri nedeniyle kendi sperm hücresine karşı oluşan otoimmünizasyon bu hasarı açıklamak için öne sürülen mekanizmalardan bazılarıdır (100-102). Karihtala P ve ark. (102)

detorsiyondan 3 ay sonra dahi her iki testisteki SOR miktarının normalden fazla olduğunu ve bu durumun karşı testiste oluşan hasarın nedenlerinden birisi olduğunu belirtmiştir.

Oksidatif stres testis hasarında önemli rol oynamakta olup, toksisite, kemoterapi, varikosel, testiküler torsiyon gibi infertiletiye yol açacak birçok patolojik sürece eşlik etmektedir (79,103,104). Memeli testisleri SOR hasarına oldukça duyarlıdır. Testis T/DT'ü yani İ/R hasar mekanizması tamamen açıklığa kavuşturulmamış olmasına rağmen, SOR'nin oluşturduğu oksidatif stresin oldukça önemli rol oynadığı gösterilmiştir (18). İ/R'ye maruz kalan testis dokusunda, ksantin oksidaz ve aktive olan nötrofillerdeki NADPH oksidaz; O_2^- , H_2O_2 , $ONOO^-$ ve OH^- radikalleri gibi toksik SOR'ları oluşturmaktadır (18,79). SOR üretiminin ya da SOR'un temizlenmesi, İ/R'ye bağlı testiküler hasarı önlemektedir (18,79,101,103).

Deneysel olarak *in vivo* koşullarda oluşturulmuş İ/R hasarında, oksidatif hasarlanmanın göstergesi olarak dokuda lipid peroksidasyona bakılmaktadır (26,62,100). MDA lipid peroksidasyonunda bir son üründür ve oksidatif hasarın düzeyini göstermek için kullanılmaktadır. Erol B ve ark.'ın (105) yaptıkları çalışmalarda, sıçanlarda 1 saatlik iskemiye takiben 4 saatlik reperfüzyona bağlı olarak testis dokusunda MDA düzeyinin artmış olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda İ/R ile kontralateral testis dokusunda MDA düzeyinde artışın olduğunu tespit ettik. EP uygulamasının ise MDA düzeyinde bir fark yaratmadığını gözledik. Ancak birçok deneysel hayvan modellerinde EP'nin direkt olarak SOR'leri temizleyerek etkili olduğu bulunmuştur (28,106,107). Dolayısıyla bizim çalışmada da EP'nin, İ/R'ye bağlı testis hasarını azaltmadaki koruyucu etkisi SOR'leri engeleyerek yapmış olabilir.

Normal fizyolojik koşullarda, mitokondri SOR'un en önemli kaynağıdır. SOR hücre içi antioksidan enzimlerle (SOD, KAT ve Glutatyon peroksidaz) ve diğer antioksidan moleküllerle (glutatyon, vitamin E gibi) azaltılmaya çalışılır. Ancak patolojik koşullarda artan SOR'lara, bu antioksidanlar yetecek etkinliğe sahip olamazlar ve artan SOR savunma sistemi elemanlarının niceliğini ve niteliğini bozabilir. Antioksidanların bu yetersizliği mitokondrilerde daha ciddi olayların oluşmasına neden olur. Bundan dolayı mitokondrilerde aşırı miktarlarda H_2O_2 oluşur. H_2O_2 zayıf bir reaktiftir, ancak Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonları ile toksik OH^- radikallerine dönüşür. Bundan dolayı aşırı miktarda artan H_2O_2

lipid, protein ve mDNA'da hasara ve apoptotik olaylara yol açabilir (45-49,98-102). Testiküler İ/R hasarında, testis dokusunda antioksidan enzim aktivitesinde azalmanın olduğu tespit edilmiştir (32,89,90,105). Bu da İ/R'nin oksidatif hasarlanmayla ilişkisini göstermekte olup, direkt oksidan etkisi dışında, antioksidan aktiviteyi de azaltarak, indirekt olarak da etkilediğini göstermektedir. Hu X ve ark.'nın (108) yaptıkları deneysel myokardiyal İ/R modelinde azalan SOD'un EP ile arttığını bulmuşlardır. Payabvash S ve ark.'nın (28) yaptıkları deneysel testis İ/R modelinde azalan antioksidan enzim düzeylerini, EP'nin artırdığını (artan SOD, KAT ve glutatyon peroksidaz) bulmuşlardır. Dolayısıyla çalışmamızda EP'nin İ/R'ye bağlı testis hasarını azaltmadaki etkisi antioksidan aktiviteyi indirekt olarak artırarak yapmış olabilir.

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozis, hücrel homeostazisin sürdürülmesinde önemli bir fizyolojik olaydır (92,104). Enerji bağımlı ve doğal olarak oluşan apoptozis nekrozdan farklıdır. Normal testis dokusunda hücre ölümü ve hücre proliferasyonu arasında bir denge vardır. Ancak İ/R'nin de dahil olduğu birçok testis hastalığının patogenezsinde artan apoptozisin önemli rol oynadığı gösterilmiştir (21,28,76,109). Oksidatif stres, apoptozis mekanizmasında güçlü bir mediyatör olarak tanımlanmaktadır (110). Testiküler dokuda İ/R ile oluşan oksidatif stresin apoptozun oluşmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (28,29). Bu çalışmada da İ/R ile testiküler dokuda artan oksidatif stres apoptoza yol açmış olabilir. EP'nin koruyucu etkisi, İ/R'ye bağlı oksidatif stresi azaltarak apoptozu önleyici etkisine (antiapoptotik) aracılık etmiş olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Testiküler doku hasarını değerlendirmede, histolojik olarak ışık mikroskopisi kullanılarak yapılan "Johnsen skorlama yöntemi" kantitatif yöntemlerden biridir (111). Johnsen skorlama'ya göre bu çalışmada, sıçanların sol testise uygulanan İ/R (T/DT)'nin, hem sol hem de sağ testiküler dokuda hasar oluşturduğu, iskemi öncesi sistemik olarak verilen 50 mg/kg dozundaki EP'nin, sol testiküler hasarı azalttığı bulunmuştur.

Bu bağlamda EP, sıçanlardaki testiküler İ/R hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu ve bu etkisini antioksidan etki ile gösterdiği düşünülmektedir. Bu da İ/R'ye bağlı testis hasarında

oksidatif stresin önemli rol oynadığı, koruyucu tedavide EP'nin fayda sağlayacağını göstermektedir. Ancak bu etkisinin daha iyi aydınlatılabilmesi için moleküler düzeyde aydınlatılması, hücre içi sinyal yollarıyla ilişkisinin belirlenmesi ve sonuçlar EP'nin yararını destekliorsa klinik çalışmalarla desteklenmesine gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Simmons LW, Firman R, Rhodes G, Peters M. Human sperm competition: testis size, sperm production and rates of extrapair copulations. *Animal behaviour*, 2004; 68: 297-302.
2. Brooks JD. Alt üriner sistem ve erkek genital sistemin anatomisi. In: Anafarta K, Yaman O, editors. *Campbell üroloji, sekizinci baskı*, Ankara, Öncü basımevi, 2005; 75-78.
3. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi-1.cilt, dördüncü baskı*, Ankara, Öncü basımevi, 2006; 329-334.
4. Snell RS. *Clinical anatomy, üçüncü baskı*, Boston, Brown and Company, 1986; 168-75.
5. Kuran O. *Sistematik anatomi, ikinci baskı*, İstanbul, Filiz Kitabevi, 1983; 512-514.
6. Pettersson S, Soderholm B, Persson JE, Eriksson S ve ark. Testicular blood flow in man measured with versus occlusion plethysmography and xenon-133. *Scand J Urol Nephrol*, 1973;7:115-119.
7. Glass J, Mundy AR. Male reproductive system, In: Standring S, editors. *Gray's anatomy: The anatomical basis of clinical practice. 39. baskı*, İspanya, Elsevier churchill livingstone, 2005, 1305.
8. Chamindrani Mendis-Handagama SML, Siril Ariyaratne HB. Differentiation of the adult leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of reproduction*, 2001; 65: 660-671.
9. Lee NPY, Cheng CY. Ectoplasmic specialization, a testis-specific cell-cell actin-based adherens junction type: is this a potential target for male contraceptive development? *Human Reproduction Update*, 2004; 10(4): 349-369.
10. Gürbüz N. Testisin vasküler anatomisi. *Androloji Bülteni*, 2004; 19: 333-336.

11. Clark RV. Three-dimensional organization of testicular interstitial tissue and lymphatic space in the rat. *Anat. Rec*, 1976; 184(2): 203-225.
12. Jones P. Torsion of the testis and its appendages during childhood. *Arch Dis Child*, 1962; 37(192): 214–226.
13. Cuckow PM, Frank JD. Torsion of the testis. *BJU International*, 2000; 86: 349-353.
14. Ringdahl E, Teague L. Testicular torsion. *Am Fam Physician*, 2006; 74: 1739-1743.
15. Frank JD, O'Brien M. Fixation of the testis. *BJU International*, 2002; 89: 331-333.
16. Turner TT, Brown KJ. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biology of Reproduction*, 1993; 49: 401-407.
17. Miller DC, Peron SE, Keck RW, Kropp KA. Effects of hypothermia on testicular ischemia. *J Urol*, 1990; 143(5): 1046-8.
18. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl*, 2008; 29: 488-498.
19. Visser AJ, Heyns CF. Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU International*, 2003; 92: 200-203.
20. Matthews PN. Spermatic cord torsion. *Archives of Disease in Childhood*, 1986; 61: 426-427.
21. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y ve ark. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biology Of Reproduction*, 1999; 61: 393–399.
22. Turner TT, Bang HJ, Lysiak JL. The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. *J Urol*, 2004; 172: 2574-8.
23. Uchiyama T, Delude RL, Fink MP. Dose-dependent effects of ethyl pyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion. *Intensive Care Med*, 2003; 29(11): 2050-8.
24. Gürdal M, Tekin A, Erol A, Onmuş H ve ark. Torsiyone rat testisinde gelişen iskemi-reperfüzyon hasarında pentoksifilinin antioksidan etkisi. *Türk Üroloji Dergisi*, 2002; 28(3): 260-263.

25. Dağlar Z, Günşar C, Neşe N, Şencan A ve ark. Diklofenak'ın deneysel testis torsiyonundaki etkileri. *Çocuk Cerrahisi Dergisi*, 2009; 23(1): 4-9.
26. Özokutan BH, Küçükaydin M, Muhtarolu S, Tekin Y. The role of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *Journal of Pediatric Surgery*, 2000; 35(1): 101-103.
27. Armagan A, Uz E, Yılmaz HR, Soyupek S ve ark. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Asian J Androl*, 2006; 8(5): 595-600.
28. Payabvash S, Kiumehr S, Tavangar SM, Dehpour AR. Ethyl pyruvate reduces germ cell-specific apoptosis and oxidative stress in rat model of testicular torsion/detorsion. *Journal of Pediatric Surgery*, 2008; 43: 705-712.
29. Pekcetin C, Ergur BU, Kiray M, Bagriyanik A ve ark. The protective effects of trimetazidine on testicular ischemia and reperfusion injury in rats. *Pediatr Surg Int*, 2007; 23: 1113-1118.
30. Karakaya E, Ates O, Akgür FM, Olguner M. Rosuvastatin protects tissue perfusion in the experimental testicular torsion model. *Int Urol Nephrol*, 2010; 42: 357-360.
31. Guimarães SB, Kimura OS, Leitão de Vasconcelos PR. Dimethylsulfoxide attenuates ischemia-reperfusion injury in rat testis. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 2010; 25(4): 357-361.
32. Hanci V, Erol B, Bektas S, Mungan G ve ark. Effect of dexmedetomidine on testicular torsion/detorsion damage in rats. *Urol Int*, 2010; 84(1): 105-11.
33. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim*, 2009; 22(3): 5-13.
34. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR ve ark. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg*, 1991; 78: 651-655.
35. Thornton MA, Winn R, Alpers CE, Zager RA. An evaluation of the neutrophil as a mediator in vivo renal ischemic reperfusion injury. *Am J Pathol*, 1989; 135: 509-515.

36. Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE ve ark. Role of neutrophils in ischemia reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol*, 1987; 253: 699-703.
37. Vedder NB, Fouty BW, Winn RK, Harlan JM ve ark. Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated from resuscitation from shock. *Surgery*, 1989; 106: 509-516.
38. Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*, 1989; 257: 683-688.
39. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surgical Clinics of North America*, 1992; 72(1): 65-83.
40. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD ve ark. Reduction of the extend of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*, 1983; 67: 1016-1023.
41. Granger DN, Rutili G, Mc Cord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, 1981; 81: 22-29.
42. Klausner JM, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D ve ark. Limb ischemia-induced increased in permeability is mediated by leucocytes and leukotrienes. *Ann Surg*, 1988; 208: 755-760.
43. Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA. Role of leucocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol*, 1986; 251: 314-322.
44. Hinder RA, Stein HJ. Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg*, 1991; 126(1): 104-105.
45. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*, 1978; 201(4359): 875-880.
46. Levine SA, Reinhardt JH. Biochemical-pathology initiated by free radicals, oxidant chemicals and therapeutic drugs in the etiology of chemical hypersensitivity disease. *Orthomolecular Psychiatry*, 1983; 12(3): 166-183.
47. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med*, 1988; 16: 947-953.
48. Mc Cord JM. The superoxide free radicals: its biochemistry and pathology. *Surgery*, 1983; 94(3): 412-414.

49. Zweier JL, Talukder MAH. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 2006; 70: 181-190.
50. Savier E, Shedlofsky SI, Swim AT, Lemasters JJ ve ark. The calcium channel blocker nisoldipine minimizes the release of tumor necrosis factor and interleukin-6 following rat liver transplantation. *Transplant Int*, 1992; 5(1): 398-402.
51. Prasad K, Kalra J, Buchko G. Acute hemorrhage and oxygen free radicals. *J Vasc Dis*, 1988; 39(12): 1005-1013.
52. Cicalase L, Lee K, Schraut W, Watkins S ve ark. Pyruvate prevents ischemia-reperfusion injury of rat small intestine. *Am J Surg*, 1996; 171(1): 97-101.
53. Salvemini D, Cuzzocrea S. Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2002; 3(6): 886-895.
54. Mruk DD, Silvestrini B, Mo M, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 2002; 65(4): 305-311.
55. Hayashi T, Nagasue N, Kohno H, Chang YC ve ark. Beneficial effect of cyclosporine pretreatment in preventing ischemic damage to the liver in dogs. *Transplantation*, 1988; 46(6): 923-924.
56. Sarica K, Bakir K, Yagci F, Erbağci A. Unilateral testicular torsion: protective effect of verapamil on contralateral testicular histology. *Urol Int*, 1999; 62: 159-163.
57. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N ve ark. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol*, 2008; 48: 109-114.
58. Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of protection of verapamil by preventing neutrophil infiltration in the ischemic rat kidney. *J SurgRes*, 1996; 61: 469-472.
59. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res*, 1990; 66: 1436-1444.
60. Nathan C, Srimal S, Farber C, Sanchez E ve ark. Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD 11/ CD 18 integrins. *J Cell Biol*, 1989; 109: 1341-1349.

61. Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY ve ark. A monoclonal antibody to the adherence-promoting leucocyte glycoprotein, CD 18, reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits. *J Clin Invest*, 1988; 81: 939-944.
62. Ozturk H, Buyukbayram H, Ozdemir E, Ketani A ve ark. The effects of nitric oxide on the expression of cell adhesion molecules (ICAM-1, UEA-1, and tenascin) in rats with unilateral testicular torsion. *J Pediatr Surg*, 2003; 38(11): 1621-7.
63. Adams DH, Hubscher SG, Shaw J, Rothlein R ve ark. Intercellular adhesion molecule 1 in liver allograft during rejection. *Lancet*, 1989; 2: 1122-1127.
64. Ballantyne CM, Mainolfi EA, Young JB, Windsor NT ve ark. Relationship of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 after heart transplantation to rejection: human leukocyte antigen mismatch and survival. *J Heart Lung Transplant*, 1994; 13(4): 597-603.
65. Arnold R, Konig W. Respiratory syncytial virus infection of human lung endothelial cells enhances selectively intercellular adhesion molecule-1 expression. *The Journal of Immunology*, 2005; 174: 7359 –7367.
66. Faull RJ, Russ GR. Tubular expression of intercellular adhesion molecule 1 during renal allograft rejection. *Transplantation*, 1989; 48: 226-232.
67. Jutila MA, Berg EL, Kishimoto TK, Picker LJ ve ark. Inflammation-induced endothelial cell adhesion to lymphocytes, neutrophils and monocytes. *Transplantation*, 1989; 48: 727-732.
68. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 1990; 346: 425-429.
69. Michael L, Dustin MI, Springer TA. Lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J cell Biol*, 1988; 107: 321-327.
70. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, 1989; 243(4895):1160-5.

71. Palmer JS, Cromie WJ, Plzak LF, Leff AR. A platelet activating factor antagonist attenuates the effects of testicular ischemia. *J Urol*, 1997; 158: 1186-90.
72. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L ve ark. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation*, 1998; 97: 1848-1867.
73. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation*, 2001; 104: 2981-2989.
74. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation*, 2001; 104: 3158-3167.
75. Barry WH. Calcium and ischemic injury. *Trends Cardiovasc Med*, 1991; 1(4): 162-6.
76. Mogilner JG, Elenberg Y, Lurie M, Shiloni E ve ark. Effect of dexamethasone on germ cell apoptosis in the contralateral testis after testicular ischemia-reperfusion injury in the rat. *Fertility and Sterility*, 2006; 85(1): 1111-1117.
77. Barone FC, Schmidt DB, Hillegass LM, Price WJ ve ark. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. *Stroke*, 1992; 23(9): 1337-47.
78. <http://www.acnp.org/g4/gn401000059/ch059.html>, 25.06.11.
79. Lysiak JJ, Nguyen QT, Turner TT. Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *J Androl*, 2002; 23: 400-409.
80. Çakan M, Çakan T, Aydos T, Yılmaz D ve ark. Sıçan testisindeki iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan oksidatif stres ve histopatolojik değişiklikler üzerine ketoprofenin koruyucu etkisi. *Türk Üroloji Dergisi*, 2007; 33(1): 50-55.
81. Kasdallah-Grissal A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M ve ark. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol & Alcoholism*, 2006; 41(3): 236-239.
82. Lysiak JJ, Nguyen QAT, Kirby JL, Turner TT. Ischemia-reperfusion of the murine testis stimulates the expression of proinflammatory cytokines and

activation of c-jun n-terminal kinase in a pathway to E-selectin expression. *Biology of Reproduction*, 2003; 69: 202–210.

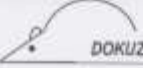
83. Lysiak JJ. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004; 2(9): 1-10.
84. Depre C, Rider Mh, Hue L. Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur J Biochem*, 1998; 258: 277- 290.
85. Utter MF, Keech DB. Pyruvate carboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1963; 238(8): 2603-2608.
86. Fink MP. Ethyl pyruvate. *Current Opinion in Anesthesiology*, 2008; 21: 160- 167.
87. Fink MP. Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. *Journal of Internal Medicine*, 2007; 261: 349- 362.
88. Han Y, Englert JA, Yang R, Delude RL ve ark. Ethyl pyruvate inhibits nuclear factor- κ B -dependent signaling by directly targeting p65. *JPET*, 2005; 312: 1097- 1105.
89. Abasiyanik A, Dagdonderen L. Beneficial effects of melatonin compared with allopurinol in experimental testicular torsion. *J Pediatr Surg*, 2004; 39: 1238– 1241.
90. Cay A, Alver A, Kucuk M, Isik O ve ark. The effects of Nacetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *J Surg Res*, 2006; 131: 199–203.
91. Kehinde EO, Anim JT, Mojiminiyi OA, Al-Awadi F ve ark. Allopurinol provides long-term protection for experimentally induced testicular torsion in a rabbit model. *BJU Int*, 2005; 96(1): 175-80.
92. Tsung A, Kaizu T, Nakao A, Shao L ve ark. Ethyl pyruvate ameliorates liver ischemia-reperfusion injury by decreasing hepatic necrosis and apoptosis. *Transplantation*, 2005; 79(2): 196-204.
93. Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem*, 2000; 33(8): 619-25.

94. Agarwal R, Shawn D. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 2002; 775(1): 121–126.
95. Johnsen SG. Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1970; 1(1): 2–25.
96. Yapanoglu T, Aksoy Y, Gursan N, Ozbey I ve ark. Antiapoptotic effects of dehydroepiandrosterone on testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia*, 2008; 40(1): 38-43.
97. Aktas A, Tuncer MC, Yıldırım A, Nergiz Y ve ark. Protective effects of melatonin on testicular torsion and detorsion damage in sprague-dawley rats. *Int J Morphol*, 2011; 29(1):7-15.
98. Filho DW, Torres MA, Bordin ALB, Crezcynski-Pasa TB ve ark. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Molecular Aspects of Medicine*, 2004; 25: 199-210.
99. Yıldız H, Durmus AS, Şimşek H, Yaman M. Protective effect of sildenafil citrate on contralateral testis injury after unilateral testicular torsion/detorsion. *Clinics*, 2011; 66(1): 137-142.
100. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*, 1995; 9(7): 526-33.
101. Kingston R. The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury. Cecconi F, D'Amelion, editors. *Apoptosome*, birinci baskı, New York, Springer Netherlands, 2010; 283-304.
102. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*, 2007; 115: 81–103.
103. Baker LA, Turner TT. Leyding cell function after experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. *J Androl*, 1995; 16: 12-17.
104. Bartke A. Apoptosis in germ cells, a generalized or celltype-specific phenomenon. *Endocrinology*, 1995; 136: 3-4.
105. Erol B, Tokgoz H, Hanci V, Bektas S ve ark. Vardenafil reduces testicular damage following ischemia/reperfusion injury in rats. *Kaohsiung J Med Sci*, 2009; 25(7): 374-80.

106. Hollenbach M, Hintersdorf A, Huse K, Sack U ve ark. Ethyl pyruvate and ethyl lactate down-regulate the production of pro-inflammatory cytokines and modulate expression of immune receptors. *Biochemical pharmacology*, 2008; 76: 631-644.
107. Chung KY, Park JJ, Kim YS. The Role of high-mobility group box-1 in renal ischemia and reperfusion injury and the effect of ethyl pyruvate. *Transplantation Proceedings*, 2008; 40: 2136-2138.
108. Hu X, Cui B, Zhou X, Xu C ve ark. Ethyl pyruvate reduces myocardial ischemia and reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein in rats. *Mol Biol Rep*, 2011; 38.
109. Ozkurkcugil C, Yardimoglu M, Dalcik H, Erdogan S ve ark. Effect of insulin-like growth factor-1 on apoptosis of rat testicular germ cells induced by testicular torsion. *BJU Int*, 2004; 93(7): 1094-7.
110. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as mediator of apoptosis. *Immunol Today*, 1994; 15: 7-10.
111. Akkuş E, Uygun N, Özkara H, Alıcı B ve ark. Testis biopsilerinin johnsen skorlaması ile değerlendirilmesinin önemi. *Türk Üroloji Dergisi*, 1997; 23: 213-217.

8. EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı

 **DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**
35340, Inciraltı, İzmir-232 412234
<http://deu.edu.tr/ideneyetik/>

Toplantı No : 07/22/2010
Toplantı Tarihi : 24 Aralık 2010

Multidisipliner Laboratuvarı Başkanlığı'na

76/2010 Protokol No'lu; Multidisipliner Laboratuvarı Anabilim Dalı Yüksek lisans programı öğrencisi Aslı ÇELİK'in yürütücüsü olduğu "Sıçan testis torsiyon-detorsiyon modelinde etil pirüvat etkisinin incelenmesi" isimli projede; etil pirüvatın kaynağının nereden temin edileceğinin belirtilmesi gerekmektedir.

Projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik
Kurul Başkanı
(Araştırmacı)

Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Alper ŞOYLU
Üye

Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye

Prof.Dr.Selman SÖKMEN
Üye (topl.katılmadı)

Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye (topl.katılmadı)

Doç.Dr.Turna İLKNUR
Üye (topl.katılmadı)

Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye (topl.katılmadı)

Prof.Dr.Abdullah KUMRAL
Üye(topl.katılmadı)

Doç.Dr.A.Hüseyin BASKIN
Üye

Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye

Vtr.Hekim Adnan SERPEN
Üye

Ayşe Nur BALIN
Üye

Doç.Dr.Şermin GENÇ
Üye

NOT: Proje başvuru formlarındaki belgelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır

ÖZGEÇMİŞ ASLI ÇELİK

TC Kimlik No / Pasaport No:	27356385964
Doğum Yılı:	1985
Yazışma Adresi :	mithatpaşa cad. no 811 k6 d12 göztepe 35310 İzmir/Türkiye
Telefon :	232-4124656
e-posta :	aslicelik85@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ankara Üniversitesi	VETERİNER FAKÜLTESİ	VETERİNER HEKİMLİĞİ TEMEL BİLİMLER	Lisans	2009

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
---------------	------	-------	-------------	------------	--------------

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Diğer
laboratuvar hayvanları, deneysel çalışma

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Sıçan Testis Torsiyon-Detorsiyon Modelinde Etil Pirüvat Etkisinin İncelenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	3000	24.12.2010-30.06.2011	Yürütücü	Ulusal
Demir sükröz ve demir dekstranın sıçanlarda periferik kanda lenfosit dağılımı ve işlevleri	Dokuz Eylül Üniversitesi	25000	30.05.2011-03.06.2011	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)

üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması.					
Sklerozan enkapsüle perifonit (SEP) modelinde stroid-sirolimus kombinasyonunun etkisinin incelenmesi.	Dokuz Eylül Üniversitesi	4600	22.11.2011-20.02.2011	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Intrauterin uygulanan hiperoksinin yenidoğan sıçanlarda bronkopulmoner displazi modeline etkisi.	Dokuz Eylül Üniversitesi	1000	30.03.2010-30.07.2010	Araştırmacı/Uzman	Ulusal
Maternal pentoksifilin tedavisinin hayvan periventriküler lökomalazi modelinde beyin hasarı üzerine etkisi.	Dokuz Eylül Üniversitesi	9500	31.05.2010-15.07.2010	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Guinea pigde deneysel oluşturulmuş kolestatoma inhibisyonunda lokal prednisolon sodyum fosfat, deksametazon ve 1,25-dihidroksivitamin D3'ün etkileri (Deneysel Hayvan Modeli).	İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi	2500	07.05.2010-07.07.2010	Araştırmacı/Uzman	Ulusal
Konvensiyonel olarak yetiştirilen laboratuvar hayvanlarında postnatal dönemde cinsiyet,yaş ve ağırlık korelasyonunun değerlendirilmesi.	Dokuz Eylül Üniversitesi	200	01.02.2010-20.08.2010	Yürütücü	Ulusal
Tavşanda geç kalça displazisi modeli kalçanın çıkık kalma sürecinin geç displaziye etkisi.	Dokuz Eylül Üniversitesi	5500	26.02.2010-30.08.2010	Araştırmacı/Uzman	Ulusal
İntragastrik Hidroklorik asit uygulanarak, deneysel asidoz oluşturulan ratlarda, Tris Hidroksymethly Aminomethane (THAM) tedavisinin mortalite üzerine etkisi.	Dokuz Eylül Üniversitesi	1200	28.05.2011-12.06.2011	Araştırmacı/Uzman	Ulusal

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
2. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu Bilimsel Etkinlik Teşvik Ödülü	Dokuz Eylül Üniversitesi	2010

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Yılmaz O, Guneli E, Karaman M, Kolatan E, Celik A. Doctoral Degree Program Of Department Of Laboratory Animal Science. 6. Orpheus Conferance, 2011.
Yılmaz O, Guneli E, Karaman M, Kolatan E, Celik A. Laboratory Animal Breeding And Research Department In Dokuz Eylul University Advanced Biomedical Research Center. Third East Mediterranean ICLAS Symposium on Laboratory Animal Science, 2011, İstanbul.
Gureş N, Karaman M, Kolatan E, Celik A, Cavdar Z, Küme T, Guneli E, Yılmaz O. Investigation Of The Effects Of Ethyl Pyruvate On The Inflammatory Response In Rat Colitis Model. Third East Mediterranean ICLAS Symposium on Laboratory Animal Science, 2011, İstanbul.
Celik A, Kolatan E, Karaman M, Guneli E, Yılmaz O. Laboratory Animal Science Education In

Turkey. Third East Mediterranean ICLAS Symposium on Laboratory Animal Science, 2011, İstanbul.

Yılmaz O, Güneli E, Karaman M, Kolatan E, Çelik A. Hayvan Laboratuvarı Tesislerinde Konum, Tasarım ve Fonksiyonel Alan Ölçülerinin Önemi. 2. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu 1-2 Ekim 2010, İzmir.

Yılmaz O, Güneli E, Karaman M, Kolatan E, Çelik A. Hayvan Laboratuvarı Tesislerinde Koridor Planı ve Tasarımı. 2. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu 1-2 Ekim 2010, İzmir.

Yılmaz O, Güneli E, Karaman M, Kolatan E, Çelik A. Hayvan Laboratuvarı Tesislerinde İş Akışı. 2. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu 1-2 Ekim 2010, İzmir.

Çelik A, Songür M, Akel İ, Salt S, Tad L, Yılmaz O. Tavşanlarda Deneysel Kalça Displazisi Modelinde Ön Ekstremitte Patolojileri. 2. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu 1-2 Ekim 2010, İzmir.

Akel İ, Çelik A, Tad L, Songür M, Atilla P, Yılmaz O, Tümer Y. Tavşanda Kalça Displazisi Modeli – Arka Ayak Alçılanması. 2. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu 1-2 Ekim 2010, İzmir.

Çelik A, Karaman M, Kolatan E, Güneli E, Yılmaz O. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Biriminde Konvensiyonel Olarak Yetiştirilen Laboratuvar Hayvanlarının Yaşa Bağlı Ağırlık Değişimlerinin İncelenmesi. 2. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu 1-2 Ekim 2010, İzmir.

Diğer yayınlar

Düzenleme Tarihi :09/09/2011