

**T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FOSFODİESTERAZ 4 ENZİM İNHİBİTÖRÜ
ROLİPRAMİN SIÇANLARDA TESTİKÜLER İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ecz. Ezgi AKDENİZ

DOKTORA TEZİ

1. TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ

2. TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Zehra YILMAZ

ZONGULDAK

2018

**T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FOSFODİESTERAZ 4 ENZİM İNHİBİTÖRÜ
ROLİPRAMİN SIÇANLARDA TESTİKÜLER İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ecz. Ezgi AKDENİZ

DOKTORA TEZİ

1. TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ

2. TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Zehra YILMAZ

ZONGULDAK

2018

KABUL ve ONAY:

**“FOSFODİESTERAZ 4 ENZİM İNHİBİTÖRÜ ROLİPRAMİN
SIÇANLARDA TESTİKÜLER İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI
ÜZERİNE ETKİLERİ”** başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından
değerlendirilerek, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı doktora tezi olarak kabul
edilmiştir.

25.04.2018

Başkan: Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ

Üye: Prof. Dr. Z. Nur BANOĞLU

Üye: Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Namık BİLİCİ

Üye: Dr. Öğr. Üyesi N. Ceñk COŞKUN

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

TARİH:

Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu tezi hazırlama sürecinde bilgileri, tecrübeleri, yapıcı görüş ve önerileri ile bana her konuda yol gösteren çok değerli danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ ve Prof. Dr. Zehra YILMAZ'a emekleri için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimime başladığım günden bugüne kadar kıymetli bilgilerini, tecrübelerini, görüşlerini ve güler yüzlerini benden esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Zekiye Nur BANOĞLU ve Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHİ'ye,

Tez çalışmalarım esnasında gerçekleştirilen histolojik incelemeler için ve çalışmalarım ilerlerken paylaştığı değerli görüşleri için Sayın Doç. Dr. Meryem AKPOLAT ve Dr. Öğretim Üyesi Kanat GÜLLE'ye, biyokimyasal incelemeler için Sayın Prof. Dr. Murat CAN ve Doç. Dr. Berrak GÜVEN'e,

Tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan arkadaşlarım Ecz. Ebru KOCAKAYA ve Ecz. Semiral ALBAYRAK SEMALAR'a, manevi desteğiyle yanımda olan arkadaşım Ecz. Özge ORHAN'a,

Eğitim sürecimde ve ötesinde, bana her zaman destek olan, varlıklarıyla güç bulduğum aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ezgi AKDENİZ
Zonguldak, 2018

ÖZET

Ezgi Akdeniz, Fosfodiesteraz 4 Enzim İnhibitörü Rolipramın Sıçanlarda Testiküler İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkileri. Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Zonguldak, 2018.

Bu çalışmada, fosfodiesteraz 4 (FDE 4) enzim inhibitörü rolipramın sıçanlarda testiküler torsiyon/detorsiyon (T/D) sonrası, testislerdeki sperm miktarı ve motilitesi ile histopatolojik hasara olan etkileri, hasara katkısı olduğu düşünülen apoptotik yollar ve proinflatuvar sitokinler üzerinden araştırıldı. Sıçanlar Sham, rolipram (ROL), T/D ve ROL+T/D olarak 4 gruba ayrıldı. Anestezi edilen sıçanların sağ testislerinin spermatik kordunun saat yönünde 720° döndürülüp batına sabitlenmesi ile 3 saatlik torsiyon oluşturuldu. Detorsiyondan 15 dakika önce, sıçanlara rolipram (tek doz 10 mg/kg) veya çözücüsü intraperitoneal (i.p.) uygulandı. Detorsiyonun 4. ve 24. saatinde testis dokularında tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve interlökin-1 beta (IL-1 β) düzeyleri ile spektrofotometrik yöntemle kaspaz-3 aktivitesi ölçüldü. Detorsiyonun 24. saatinde histopatolojik doku hasarları ve immünohistokimyasal boyama yöntemi ile kaspaz-3, 8 ve 9 aktiviteleri değerlendirildi. Detorsiyonun 65. gününde sperm sayısı ve motilitesi değerlendirildi. T/D uygulaması ipsilateral testislerde, detorsiyonun 4. ve 24. saatinde kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı artışa; detorsiyonun 24. saatinde anlamlı histopatolojik hasara ve kaspaz-3 ve kaspaz-9 ile spermatogonyumlarda kuvvetli immün boyanmaya; detorsiyonun 65. gününde sperm sayısı ve motilitesinde anlamlı azalmaya neden olmuştur. Rolipram tedavisi, T/D grubunda TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde anlamlı artışlar yapmıştır. T/D'ye bağlı kaspaz-3 doku aktivitesindeki artışı, germ hücrelerindeki kaspaz-3 ve kaspaz-9 immün boyanmayı, histolojik hasarı, sperm miktarı ve motilitesindeki azalmaları geri döndürememiştir. Sonuç olarak, rolipram tedavisi T/D hasarında proinflatuvar sitokinlerin düzeylerini artırmış, aktive olan intrinsek apoptotik yolağı inhibe edememiş ve histopatolojik hasar ile sperm sayısı ve motilitesi üzerinde koruyucu etkiler gösterememiştir.

Anahtar Kelimeler: Testiküler torsiyon/detorsiyon, Fosfodiesteraz 4, Rolipram, TNF- α , IL-1 β , Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9.

ABSTRACT

Ezgi Akdeniz, The Effects of Rolipram, a Phosphodiesterase 4 Enzyme Inhibitor, on Testicular Ischemia Reperfusion Injury in Rats. Bulent Ecevit University, Health Sciences Institute, Department of Medical Pharmacology, Doctoral Thesis, Zonguldak, 2018.

In this study, the effects of phosphodiesterase 4 (PDE 4) enzyme inhibitor rolipram on sperm count, motility and histopathological damages in rat testes after testicular torsion/detorsion (T/D) in rats were investigated through apoptotic pathways and proinflammatory cytokines which are thought to have contributions to the damage. Rats were divided into 4 groups as Sham, rolipram (ROL), T/D and ROL+T/D. Torsion was formed by rotating the spermatic cord of the right testes of anesthetized rats 720° clockwise and fixing it to abdomen for 3 hours. Fifteen minutes before detorsion, rolipram (single dose 10 mg/kg) or vehicle was administered intraperitoneally (i.p.) to the rats. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) levels and spectrophotometric caspase-3 activity in testicular tissues were measured 4 and 24 hours after detorsion. Twenty four hours after detorsion, histopathologic tissue damages and activities of caspase-3, 8 and 9 using immunohistochemical staining method were evaluated. On the 65th day of detorsion, sperm count and motility were evaluated. T/D caused significant increase in caspase-3 activity at 4th and 24th hours of detorsion, significant histopathologic damage and strong immunostaining for caspase-3 and caspase-9 in spermatogonia at 24th hours of detorsion, significant decrease in sperm count and motility at 65th day of detorsion in ipsilateral testes. Rolipram treatment significantly increased TNF- α and IL-1 β levels in the T/D group. Rolipram didn't restore increased caspase-3 tissue activity, caspase-3 and caspase-9 immunostaining in germ cells, histological damage, sperm count and motility reductions associated with T/D. In conclusion, rolipram treatment increased the levels of proinflammatory cytokines in T/D injury, didn't inhibit the active intrinsic apoptotic pathway and showed no protective effects on histopathological damages and sperm count and motility.

Keywords: Testicular torsion/detorsion, Phosphodiesterase 4, Rolipram, TNF- α , IL-1 β , Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL ve ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Torsiyon/Detorsiyonu	3
2.2. Testis Torsiyon/Detorsiyon Hasarının Fizyopatolojisi	4
2.3. Apoptoz	11
2.4. Fosfodiesteraz Enzimleri.....	14
2.5. Fosfodiesteraz Enzim İnhibitörleri.....	17
2.5.1. FDE 4 enzim inhibitörleri	18
2.5.2. Rolipram.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Hayvanlar	22
3.2. Kimyasallar	22
3.3. Gruplar	22
3.4. Testiküler Torsiyon/Detorsiyon	23
3.5. Testis ve Kauda Epididim Ağırlıklarının Ölçülmesi.....	24
3.6. Testis Dokusunda Kaspaz-3 Aktivitesinin Ölçülmesi	25
3.7. Testis Dokusunda TNF- α ve IL-1 β Düzeylerinin Ölçülmesi	25
3.8. Sperm Analizi.....	25
3.8.1. Sperm sayımı.....	25
3.8.2. Sperm motilitesi	27
3.9. Testis Dokularının Histopatolojik Değerlendirmesi	27
3.10. Testis Dokularının İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Değerlendirilmesi	28
3.11. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	29

4. BULGULAR	30
4.1. Testis ve Kauda Epididim Ağırlıkları	30
4.2. Testis Dokusunda Kaspaz-3 Aktivitesi	31
4.3. Testis Dokusunda TNF- α ve IL-1 β Düzeyi	32
4.4. Epididimal Sperm Sayımı ve Motilitesi	33
4.5. Testis Dokularının Histopatolojik Değerlendirmesi	35
4.6. Testis Dokularının İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Değerlendirilmesi	37
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇLAR	48
7. KAYNAKLAR	50
8. EKLER	65
Ek 1: Etik Kurul Onayı	65
9. ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Testis T/D fizyopatolojisinde rol oynayan etmenlerin birbiriyle ilişkisi	7
Şekil 2. Apoptozisin ekstresek ve intrinsek yollarında rol oynayan çeşitli moleküler bileşenler.....	13
Şekil 3. cAMP sinyal sistemi.	19
Şekil 4. Rolipramın kimyasal formülü	21
Şekil 5. Deney grupları ve aşamaları	23
Şekil 6. Deneysel T/D uygulaması.....	24
Şekil 7. Sperm sayımı için kauda epididimlerin hazırlanması.....	26
Şekil 8. Sperm sayımı sırasında Makler kamerada spermlerin görüntüsü.	27
Şekil 9. Detorsiyonun 24. saatinde ipsilateral ve kontralateral testislerin morfolojisi.....	36
Şekil 10. Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokularında kaspaz-3 antikoruyla yapılan immün boyama görüntüsü.....	37
Şekil 11. Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokularında kaspaz-8 antikoruyla yapılan immün boyama görüntüsü.....	38
Şekil 12. Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokularında kaspaz-9 antikoruyla yapılan immün boyama görüntüsü.....	39

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Deneysel testis İ/R hasarında kullanılan farmakolojik ajanlar	9
Tablo 2. FDE enzim ailesi.....	16
Tablo 3. Johnsen skorlama sistemine göre histopatolojik kriterler.....	28
Tablo 4. Detorsiyonun 4. ve 24. saatlerinde çıkarılan ipsilateral ve kontralateral testislerin ağırlıkları.	30
Tablo 5. Detorsiyonun 65. gününde çıkarılan testis ve kauda epididimlerin ağırlıkları.....	31
Tablo 6. Detorsiyonun 4. ve 24. saatlerinde çıkarılan ipsilateral ve kontralateral testislerde kaspaz-3 aktiviteleri.....	32
Tablo 7. Detorsiyon işleminin 4. ve 24. saatlerinde çıkarılan ipsilateral testislerde TNF- α ve IL-1 β düzeyleri.	33
Tablo 8. Detorsiyonun 65. gününde alınan ipsilateral ve kontralateral kauda epididimlerden elde edilen sperm sayımı.	34
Tablo 9. Detorsiyonun 65. gününde alınan ipsilateral kauda epididimlerden elde edilen spermlerin motilitesi.....	34
Tablo 10. Detorsiyonun 24. saatinde alınan ipsilateral testislerdeki histopatolojik hasar skorlaması.	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIF	Apoptoz indükleyici faktör
ADEİ	Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri
AKAP	A-kinaz bağlantı proteini
APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ARB	Anjiyotensin reseptör blokörleri
ATF	cAMP-bağımlı transkripsiyon faktörü
ATP	Adenozin trifosfat
Bax	B-hücre lenfoma-2 ilişkili X protein
Bcl-2	B-hücre lenfoma-2
cAMP	Siklik 3',5'-adenozin monofosfat
CBP	cAMP-bağlayıcı protein
cGMP	Siklik 3',5'-guanozin monofosfat
CNG	Siklik nükleotid-kapılı iyon kanalı
COX-2	Siklooksijenaz-2
CREB	cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein
CYP 450	Sitokrom P450
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
ERK	Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz
FDE	Fosfodiesteraz
IL-1	İnterlökin-1
IL-1α	İnterlökin-1 alfa
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-5	İnterlökin-5
IL-6	İnterlökin-6
IL-13	İnterlökin-13
ICAM-1	Hücreler arası adezyon molekülü-1
ICER	İndüklenebilir cAMP erken repressörü
INF-γ	İnterferon gama
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İ/R	İskemi/reperfüzyon
JNK	c-Jun N-terminal kinaz

K_{ATP}	ATP'ye duyarlı potasyum
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MC	Melanokortin
MMPX	8-metoksimetil-3-izobutil-1-metilksantin
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
PARP	Poli adenzin difosfat riboz polimeraz
PKA	Protein kinaz A
PLA2	Fosfolipaz A2
RAAS	Renin anjiyotensin aldosteron sistemi
ROS	Serbest oksijen radikalleri
T/D	Torsiyon/detorsiyon
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
TNFR-1	Tümör nekrozis faktör alfa reseptörü-1
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Testiküler torsiyon, testisin kendi eksenini etrafında dönmesi sonucu dokuda iskemiye neden olan ürolojik acil bir durumdur (1). İnsidansı 1-25 yaş arasındaki erkeklerde 4.5/100.000 olan (2) bu anormallite, daha çok yenidoğan ile puberte döneminde görülmektedir. Bu durum akut olarak düzeltilmezse iskemi sonucu testis kaybedilebilir (3). Torsiyone testiste kan akışının yeniden sağlanması için testis ters yönde döndürülür, bir başka ifadeyle detorsiyone edilir. Testiküler torsiyon/detorsiyon (T/D) bu açıdan bir tür iskemi/reperfüzyon (İ/R) olayıdır (4). İskemi olayı tek başına dokuya hasar verdiği gibi reperfüzyon olayı da dokudaki hasarı şiddetlendirmektedir (5). Bu durum sperm anormallileri (6) ve spermatogenezin hasarlanmasına (4) yol açtığı gibi infertiliteye de neden olabilir (7). Ayrıca, T/D'ye uğramış testiste gözlenen hasara ilave olarak karşı testiste de hasar görülme ihtimali vardır (6-8).

Testiküler İ/R hasarının pek çok fizyopatolojik süreçle ilişkisi bulunmaktadır. Proinflamatuvar sitokin ekspresyonu (9), serbest oksijen radikalleri (ROS) kaynaklı oksidatif stres, hasarlı bölgeye nötrofil toplanması (10) gibi durumlar bu süreçte ağırlıklı olarak rol alan olaylardır. İ/R hasarında gözlenen fizyopatolojik süreçle ilişkili durumların, nekroz şeklinde görülen hücre ölümüne neden olduğu düşünülmekte iken son yıllarda yapılan çalışmalarda apoptoz şeklindeki hücre ölümünün de bu hasara katkıda bulunduğu anlaşılmıştır (11-14). Bu çalışmalar, apoptozun reperfüzyon hasarına uzanan yolda ortak bir varış noktası konumunda olduğunu düşündürmektedir. Bu noktaya varış sürecinde, başta tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) olmak üzere proinflamatuvar sitokinler de hasarın oluşumunda önemli bir etmen olarak karşımıza çıkmaktadır.

Fosfodiesteraz (FDE) enzimleri, hücre için önemli sinyal molekülleri olan siklik 3',5'-adenozin monofosfat (cAMP) ile siklik 3',5'-guanozin monofosfatı (cGMP) hidroliz eden enzim ailesidir. Günümüze kadar 11 çeşit FDE enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimler birbirinden substratlarına, düzenleyici mekanizmalarına ve doku dağılımlarına göre ayrılmaktadırlar. FDE 4 enzimi spesifik olarak cAMP'yi hidroliz etmektedir, hücre içi cAMP düzeylerinin kontrolünde büyük rol oynamaktadır ve çok geniş bir doku dağılımına sahiptir (15).

Çalışmamızda kullandığımız rolipram, FDE 4 enzimini selektif olarak inhibe eden ajanların prototipi niteliğindedir ve bu enzimi çok güçlü bir şekilde inhibe

etmektedir (16). FDE 4 enziminin inhibisyonu, hücre içi cAMP düzeyinin artmasına ve TNF- α ile diğer bazı inflamatuvar sitokinlerin inhibisyonuna neden olmaktadır (17). TNF- α ekspresyonunun inhibisyonu, hem inflamasyonu önlediği hem de apoptoze neden olan hücre dışı yolağın uyarılmasını engellediği için FDE 4 inhibitörleri ile T/D hasarından sorumlu tutulan inflamatuvar ve apoptotik sürecin azaltılabileceği düşünülmektedir. FDE 4 enzimini selektif olarak inhibe eden rolipramın beyin, böbrek, mide, barsak gibi çeşitli organlarda İ/R hasarına karşı yararlı etkilerinin olduğu son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmekle birlikte testiküler İ/R hasarındaki etkileri ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır (16, 18-20).

Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda tek taraflı oluşturulan deneysel testiküler İ/R hasarında FDE 4 enzim inhibitörü rolipramın, iskemi uygulanan ipsilateral ve uygulanmayan kontralateral testislerdeki sperm miktarı, motilitesi ve histopatolojik hasara olan etkilerini, TNF- α ve interlökin-1 beta (IL-1 β) gibi proinflamatuvar sitokinler ile apoptotik yollar üzerinden araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Torsiyon/Detorsiyonu

İlk defa Hunter tarafından tanımlanan testis torsiyonu, spermatik kordun kendi eksenini etrafında dönmesi sonucu testiste kan akımının bozulmasına neden olan ürolojik bir anormalitedir (1, 21). En sık yenidoğan ve puberte dönemlerinde karşılaşılan bu anormalite geriatric dönemde ise çok nadir görülmektedir (3). Testis torsiyonu akut skrotal olguların %16-42'sini oluşturmaktadır (22).

Testis torsiyonunun intravajinal ve ekstravajinal olmak üzere başlıca iki çeşidi vardır, birbirinden anatomileri ve yaş dönemleri açısından ayrılmaktadır. Adolesanlarda yaygın olan intravajinal torsiyon, testis torsiyonunun en sık karşılaşılan çeşididir ve bu tip torsiyonda 'Bell clapper deformitesi' (çan tokmağı deformitesi) olarak adlandırılan konjenital anormalite mevcuttur. Tunika vajinalise normalden farklı biçimde tutunduğu için serbest şekilde asılı kalan testis, spermatik kord ile birlikte tunika vajinalisin içinde döner. Neonatal dönemde yaygın olan ekstravajinal torsiyon ise daha nadir görülmektedir ve bu tipteki torsiyonda herhangi bir anatomik anormalite yoktur (3, 23).

Testisin skrotum içinde aşırı hareketli olması patolojiktir ve torsiyonu kolaylaştırmaktadır. Kremaster kasının kasılması, egzersiz ve travma olayı da torsiyonu tetikleyen nedenler arasında sayılmaktadır. Öte yandan testis uykuda bile torsiyone olabilir. Torsiyon olayı için soğuk havanın uyarıcı bir etken olduğu konusunda çelişkili görüşler mevcuttur (1, 23-24).

Torsiyon nedeniyle testiste önce venlerin ardından arterlerin tıkanması, testis dokusunda iskemiye neden olur ve iskemik dokuda hipoksik metabolizma hakim olduğu için de mitokondriyal solunum zinciri bozulur. Damar geçirgenliğinin artması ödeme yol açar ve bu süreç apoptoz ya da nekroz yoluyla hücrenin ölümüne neden olmaktadır (25). Rodentlerde yapılan çalışmalar oksijensiz kalan Sertoli hücrelerinde vakuollerin oluştuğunu, germ hücrelerinin azaldığını ve testosteron seviyelerinin değiştiğini ortaya koymuştur (26).

İskemik haldeki torsiyone olmuş testis dokusu, manuel olarak veya cerrahi müdahale yardımı ile detorsiyone edilerek kurtarılmaya çalışılır (22). Torsiyone olmuş testis dokusunun detorsiyone edilerek yeniden kanlandırılması, aslında bir

çeşit İ/R olayıdır. İskeminin kendisi dokuda hasara neden olduğu gibi manuel ya da cerrahi girişim ile sağlanan reperfüzyon olayı da doku hasarını şiddetlendirmektedir.

Tek taraflı torsiyon sonrasında karşı taraftaki kontralateral testiste hasar oluşup oluşmadığı konusu henüz tartışma konusudur (27-29). Aslında iki testisin kan akışı birbirinden bağımsız olmasına rağmen, karşı testiste hasar meydana gelmesi şaşırtıcı gibi dursa da (25) pek çok araştırma hasar oluştuğunu doğrulamaktadır (6) (8, 30). Karşı testiste gelişen hasar, kan-testis bariyerinin bozulması sonucu antisperm antikorlarının oluşması (31), kontralateral testisin kan akımının afferent uyarı sonucu refleks olarak azalması (32), subklinik epizodlar, akrozomal enzim salınımı, doğuştan gelen gonodal anormalite (33) ve immünolojik nedenler (27) ile açıklanmaktadır.

2.2. Testis Torsiyon/Detorsiyon Hasarının Fizyopatolojisi

Testiküler İ/R hasarı, birden fazla olayı içinde barındırmaktadır ve bu olaylar tek başına testis dokusunda hasara neden olabildiği gibi birbirini tetikleyerek de hasar yapabilmektedirler. Hasar mekanizmaları olarak; ROS ve bunun sonucu oluşan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu (34), proinflamatuvar sitokinlerin ve diğer bazı inflamasyonu tetikleyen mediyatörlerin ekspresyonu (35), hasarlanmış dokuya nötrofillerin toplanması (36), nekrotik veya apoptotik hücre ölümü sayılabilir. Hasara giden süreçte apoptoz olayı ortak bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 1).

İ/R hasarının fizyopatolojisini anlamaya yönelik yapılan araştırmaların birçoğunda ROS'un yeri açık bir şekilde ortaya konulmuştur. Reperfüze olan bir dokuda oksijenin yüksek konsantrasyona erişmesi, ortamdaki toksik ROS düzeyinin artmasına neden olmaktadır. ROS konsantrasyonu reperfüzyon olayından sonraki 90-120 dakikalık zaman diliminde anlamlı düzeylere ulaşmaktadır; ancak dokuya verdiği zarar ise 6 ay kadar sürmektedir (4). Yapılan çalışmalarda, reperfüzyondan sonra inflamatuvar mediyatörlerin eksprese olması ile bazı inflamatuvar yolakların aktive olduğu da ortaya konulmuştur. Sonuçta, hem ROS hem de bu inflamatuvar yolaklar testisi apoptoz kaynaklı hücre ölümüne götürmektedir. Normal şartlarda, apoptoz olayı spermatogenez sırasında olağan şekilde devam etmekte ve germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasındaki dengeyi sağlamaktadır (11). Ancak, İ/R gibi olağan dışı koşullarda apoptozun artması sperm işlevini olumsuz yönde etkilemektedir. Hem hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalar (14) hem de T/D'ye

maruz kalan hastaların izlenmesi sonucu ortaya çıkan bulgular (7) bu durumun daha ileri aşamalarda infertiliteye neden olabileceğini düşündürmektedir.

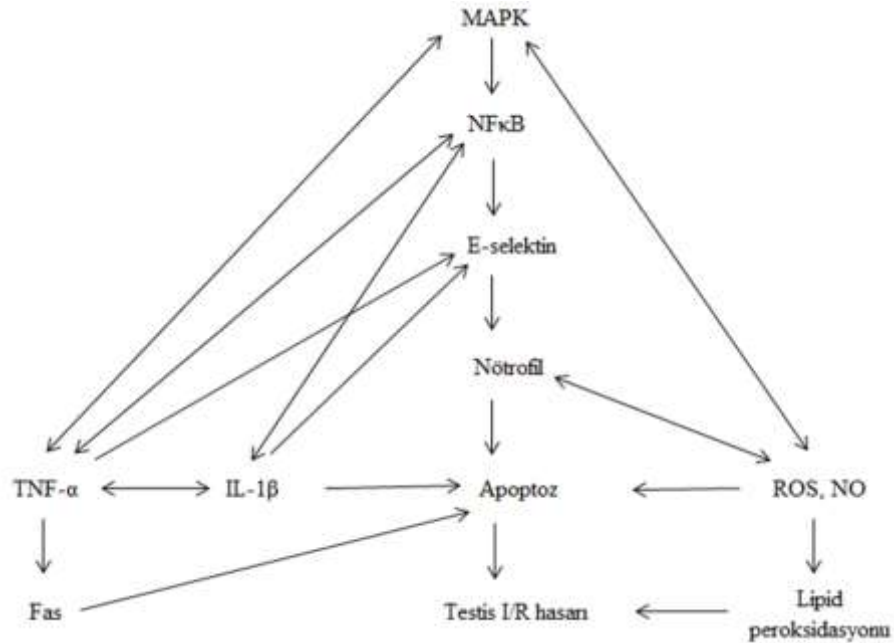
Testiküler İ/R hasarında (9) ve testisin İ/R dışındaki patolojilerinde (37) TNF- α ve/veya IL-1'in yüksek konsantrasyona eriştiği ve hasarın şiddetlenmesine neden olduğu bilinmektedir. TNF- α ve interlökin-1 (IL-1 α ile IL-1 β) hücre içi işleyişi sağlayan sitokin ailesinin proinflamatuvar üyelerindedirler, reseptörle etkileştikten sonra çeşitli genlerin transkripsiyonuna neden olurlar, inflamasyonun başlamasında ve artarak devam etmesinde önemli katkıları vardır. Bu sitokinler vücutta önemli düzenleyici görevlere sahiptirler; ancak yüksek konsantrasyonlara eriştiklerinde çeşitli patolojik olaylara sebep olabilirler (38). Bu sitokinlerden TNF- α testiste spermatidler, pakiten spermatositler ve makrofajlarda; IL-1 ise Leydig hücreleri ile interstisyumda yapılmaktadır ve her iki sitokin de normal koşullarda testis homeostazının korunmasına yardımcı olur. TNF- α spermatogenez ve germ hücrelerinin hayatta kalmasını destekler, transferrin ve CYP 450 aromataz enzimi ile diğer sitokinlerin seviyesini düzenler; IL-1 ise testosteron seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynar (39).

Vücudun iskemi ve travma gibi hasar gördüğü veya toksinler gibi bazı zararlı maddeler ile karşılaştığı durumlarda TNF- α ve IL-1'in uyarılması inflamatuvar olaylar zincirini başlatır. Bu sitokinler kendilerinin ve birbirlerinin sentezini artırır. Ayrıca, fosfolipaz A2 (PLA2), siklooksijenaz-2 (COX-2), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), kemokinler ile lökositlerin inflamasyonlu bölgeye göçünde rol oynayan hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi diğer bazı inflamasyon mediyatörlerinin ekspresyonunu uyararak da inflamasyona katkıda bulunurlar (40-41). TNF- α ve IL-1 bu mediyatörlerden başka, inflamasyonla ilişkili olan mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) ailesi üyelerinden c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 MAPK'yi de aktive ederler (42-43); ancak JNK aktivasyonu daha çok IL-1'in uyarımı ile ilişkili gibi görünmektedir (42). MAPK ailesinin bir diğer üyesi olan ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz1/ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz3'ün (ERK1/ERK3) de testis İ/R hasarının fizyopatolojisinde rolü olduğu bildirilmektedir (11). MAPK'ler kendileri gibi bir başka inflamasyon mediyatörü olan nükleer faktör kappa B'yi (NF- κ B) fosforile ederek aktive olmasına yol açarlar. Aktif hale gelen NF- κ B hücrenin çekirdeğine transloke olur ve gen transkripsiyonu yapar. Hem MAPK hem de NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu uyarırlar

(44) ve uyarılmış olan TNF- α ve IL-1 β 'nin ise JNK ve p38 MAPK ile NF- κ B sinyal yolağını harekete geçirerek, endotelden E-selektin ekspresyonuna ve inflamasyon bölgesine nötrofil göçüne sebep oldukları tespit edilmiştir (43). E-selektin aracılı nötrofil göçü olayı ise testiküler İ/R'ye bağlı apoptotik hücre ölümü meydana gelmesinde kilit rol oynamaktadır. Lysiak ve arkadaşları çalışmalarında (36) testiküler subtunikal venlere nötrofil toplanmasına paralel olarak germ hücre apoptozunda artış olduğunu ve E-selektinden yoksun farelerin testislerinde ise aynı bölgedeki nötrofil miktarında veya apoptozda herhangi bir artış olmadığını tespit etmişlerdir.

TNF- α yukarıda belirttiğimiz dolaylı yolun yanı sıra, direkt olarak da hücre ölümünü indüklemektedir. Bu apoptotik hücre ölümünden tümör nekrozis faktör alfa reseptörü-1 (TNFR-1) sorumludur, bu reseptör TNF- α 'nın ölüm reseptörü olarak bilinmektedir. TNF/TNFR-1 sisteminin germ hücrelerinde apoptozu indüklemesinin, testis İ/R hasarına yol açtığı ve İ/R sonrası apoptotik germ hücrelerinin %40'ının TNFR-1'i eksprese ettiği bildirilmiştir (27). TNF- α ayrıca, kendisi gibi ölüm reseptörü kaynaklı apoptozu aracılık eden Fas ve ligandı FasL modülasyonu ile de germ hücrelerinin sağkalım olayını etkiler (45). TNF- α , testiste spontan olarak apoptozu indüklemeyen; ancak hasarlı testiste apoptozu neden olan Fas/FasL sistemi (46) için immün kaynaklı bir uyarıdır (40). TNF- α 'nın TNFR-1 reseptörüne ve Fas'ın ligandı FasL'ye bağlanması sonucunda kaspaz-8'in aktive olmasıyla başlayan bu süreç apoptozun başlıca iki yolağından biri olan ölüm kaynaklı yolak (ekstresek yolak) olarak isimlendirilir (47). Bu yolağın aksine mitokondriyal yolak (intrensek yolak) üzerinden hücreyi ölüme götüren ve testis İ/R hasarına sebep olan bir başka etmen ise ROS'tur. İ/R sonrasında dokuda yüksek konsantrasyona erişen ROS apoptotik düzenleyiciler olan B-hücre lenfoma-2 ilişkili X protein/B-hücre lenfoma-2 (Bax/Bcl-2) oranını artırır. Bu genler sırasıyla, pro-apoptotik ve anti-apoptotik özellik taşımaktadır. Bax/Bcl-2 oranındaki artışı mitokondri membranından sitokrom-c ile apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımı ve kaspaz-9 aktivasyonu izler (4). Kaspaz-8 ve kaspaz-9'un her ikisi de bir sonraki aşama olarak majör uygulayıcı kaspaz olan kaspaz-3'ü aktive eder (47). Apoptozu uzanan bu süreçte ROS kaynağı olan nötrofillerin de katkısı olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda testis İ/R sonrasında ROS düzeyi ve apoptozdaki artışla birlikte testis subtunikal venlerine nötrofil göçü olduğu tespit edilmiştir (14, 36). İ/R durumunda, ROS'un testis ve diğer organlarda en olumsuz etkisi lipid peroksidasyonu gelişmesidir.

Reperfüzyondan sonra antioksidan savunma sistemi tarafından kontrol altına alınamayan ROS, membran yapıtaşlarına saldırarak lipid peroksidasyonuna neden olur. Testisler çoklu doymamış yağ asidi bakımından zengin bir hücre membranına sahip oldukları için oksidatif strese oldukça duyarlıdır ve bu saldırı karşısında işlevini kaybedebilirler (25, 48). ROS, membran yapıtaşlarının dışında hücrelerin DNA'sına da saldırır ve DNA zincirinde kırılmalara yol açar. DNA'sı hasar gören ve bu durumu düzeltmek isteyen hücre ise bazı tamir mekanizmalarını devreye sokar. Bunlardan birisi de poli adenzin difosfat riboz polimeraz (PARP) enziminin aktivasyonudur. Bu enzim DNA'yı onarmak için çok fazla enerjiye gereksinim duyar. Aşırı çalışması durumunda hücrenin enerjisi tükenir ve nekrotik hücre ölümü meydana gelebilir. Testis ve diğer organlarda yapılan çalışmalarda, İ/R sonrası PARP aktivasyonu olduğu ve inhibe edilmesi durumunda organ hasarının düzeldiği gösterilmiştir (49-51). Lipid peroksidasyonu olayı ayrıca proinflamatuvar sitokinler gibi MAPK aktivasyonu yaparak da reperfüzyon sonrası testis hasarına katkıda bulunmaktadır (52). Oksijenden türeyen ROS'un yanı sıra nitrik oksitten (NO) türeyen peroksinitrit radikali de reperfüze bir hücre için oldukça tehlikelidir. Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ve iNOS ekspresyonunun artmasına bağlı olarak dokuda konsantrasyonu yükselen NO ortamdaki oksijen ile hızlıca reaksiyona girerek çok reaktif yapıdaki peroksinitrit radikalini meydana getirdiği gibi apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne de sebep olabilir (53-54).



Şekil 1. Testis T/D fizyopatolojisinde rol oynayan etmenlerin birbiriyle ilişkisi.

Yukarıda anlattığımız ve Şekil 1’de özetlediğimiz, bir yolağın diğerini aktive etmesi sonucu birbirini izleyen olaylar silsilesi ile ortaya çıkan testis İ/R hasarını önleyebilmek için araştırmacılar tarafından farklı etki mekanizmasına sahip farmakolojik ajanlar denenmektedir (Tablo 1). Antioksidan (34) ve antiinflamatuvar (35) özellikli bazı maddeler ile çeşitli hormonların yanı sıra (55) adenozin reseptör agonisti (56), Rho-kinaz inhibitörü (48) ve NF-κB inhibitörü (57) gibi birtakım kimyasalların bu yıkıcı patolojiye karşı faydalı etkileri gözlenmiştir. Öte yandan farklı farmakolojik ajanlarla yapılan çalışmalar, vücuttaki başka sistemlerin de bu hasarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bunlardan bir tanesi renin anjiyotensin aldosteron sistemidir (RAAS). Bu sistemi etkileyen anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ADEİ), anjiyotensin reseptör blokörleri (ARB), renin inhibitörü aliskiren ve ayrıca endotelin reseptör blokörü bosentanın inflamasyon, oksidatif stres ve/veya apoptoz kaynaklı hasarı düzelttikleri bildirilmiştir (58-60).

Testiküler İ/R hasarında, RAAS inhibisyonundan başka faydalı olabileceği düşünülen bir başka mekanizma ise vagus etkisindeki kolinerjik sinir sisteminin uyarılmasıdır. Minutoli ve arkadaşları (61) inflamasyon ve apoptozu önleyici özelliği bilinen melanokortin (MC) reseptörlerinden MC4 agonisti ile yaptıkları çalışmalarında, vagus sinirinin uyarılmasının inflamasyon ve iskemik uyarıyla tetiklenen apoptotik süreci down-regüle ettiğini ortaya koymuşlardır. Testiküler İ/R hasarında rolü bulunan bir diğer etmen de kalpaindir. Reperfüzyon sırasında, kalpainin substratı olan, hücrenin bütünlüğünü koruyan ve bir membran proteini olan α-fodrinin proteolizinde artış görülür ve bu artış apoptoz ve nekrozla ilişkilidir (13).

Testiküler İ/R hasarına karşı, ATP’ye duyarlı potasyum (K_{ATP}) iyon kanalları diğer bazı organ İ/R hasarlarında iskemik ön ve sonradan koşullanmayı modüle ettikleri için bu kanalları açan veya bloke eden ilaçlar da araştırmacılar tarafından yeni hedef haline gelmiştir (62-63). Ayrıca, oksijen inhalasyonu (64) ve hiperbarik oksijen tedavisi de (65) bu yıkıcı patolojik duruma karşı faydalı olabilecek tedavi alternatifleri olarak düşünülmektedir.

Eretil disfonksiyon tedavisinde kullanılan FDE 5 enzim inhibitörleri testis İ/R hasarında denenilen vazoaaktif bir ilaç grubudur ve hücre içi ikincil haberci olarak görev yapan cGMP'nin yıkılmasını önleyerek etki gösterirler (66). Bu ilaçlar İ/R'den sonra özellikle kalpte miyokard hücrelerinde mitokondriyal K_{ATP} kanallarını açarak miyokardı korurlar, ayrıca NO yolağını aktive ederek apoptoz ile nekroz aracılı hücre

ölümünü önlerler (67). FDE 5 inhibitörlerinin kalp dışındaki bazı organların İ/R hasarında da faydalı etkilerinin olduğu, testisin İ/R durumunda oksidatif stresi, apoptoz ve nekrozu azalttığı tespit edilmiştir (66). cAMP vücutta hücre içi ikincil haberci olarak görev yapan bir diğer sinyal molekülüdür ve hücrenin işleyişinde çok önemli roller üstlenmektedir. FDE inhibitörü ilaçların TNF- α kaynaklı apoptozu inhibe eden cAMP'nin (68-69) konsantrasyonunu artırarak inflamatuvar sitokinleri baskıladığı ve çeşitli organ İ/R hasarlarına karşı koruyucu etkileri olduğu gözlenmiştir. Bu ilaçlar olumlu etkilerini protein kinaz A (PKA) aktivasyonu yaparak; TNF- α , IL-6, MAPK ve NF- κ B gibi inflamatuvar mediyatörleri inhibe ederek ve apoptoz olayı ile nekrozu azaltarak göstermektedirler (70-72). Ancak cAMP'yi artıran FDE enzim inhibitörlerinin testis İ/R'deki etkileri henüz bilinmemektedir.

Tablo 1. Deneysel testis İ/R hasarında kullanılan farmakolojik ajanlar.

Ajanlar	Etkileri
<i>Antioksidan Ajanlar</i>	
Alfa-lipoik asit	Oksidatif stresle ilişkili parametrelerde değişiklik, apoptozda azalma, histopatolojik hasarda iyileşme (73).
Ginkgo biloba (EGb 761)	Apoptozda azalma, histopatolojik hasarda iyileşme (74).
Likopen	Sperm motilitesinde artma, anormal sperm oranında azalma (75).
Melatonin	Lipit ve protein oksidasyonunda azalma, histopatolojik hasarda iyileşme (34).
<i>Antienflamatuvar Ajanlar</i>	
IL-10	Oksidatif stresle ilişkili parametrelerde değişiklik, histopatolojik hasarda iyileşme (76).
Lipoksin A4	Oksidatif stresle ilişkili parametrelerde değişiklik, proinflamatuvar sitokinlerde azalma, antienflamatuvar sitokinlerde artma, NF- κ B p65 ekspresyonunda azalma, apoptozda azalma, morfolojik düzelme (35).
Meloksikam	İnflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonunda azalma (77).
<i>Kalsiyum Kanal Blokörleri</i>	
Amlodipin	Oksidatif stresle ilişkili parametrelerde değişiklik, inflamatuvar sitokinlerin inhibisyonu (78).
Nifedipin	Oksidatif stresle ilişkili parametrelerde değişiklik, apoptozda azalma (79).

Tablo 1. (devamı)

<i>Ajanlar</i>	<i>Etkileri</i>
<i>RAAS Üzerine Etkili İlaçlar</i>	
Aliskiren	Oksidatif streste azalma, inflamasyonla ilişkili bazı genlerin ekspresyonunda azalma (58).
Enalapril, losartan, bosentan	Lipid peroksidasyonunda azalma (59).
Bosentan	Tübüler hasarda azalma (59).
Lisinopril, losartan	Apoptozda azalma, histopatolojik hasarda iyileşme (60).
<i>FDE 5 Enzim İnhibitörleri</i>	
Sildenafil	Oksidatif stresle ilişkili parametrelerde değişiklik; histopatolojik hasarda iyileşme (80).
	Oksidatif stresle ilişkili parametrelerde değişiklik, apoptozda azalma (81).
Vardenafil	Oksidatif streste azalma, apoptozda azalma, e(NOS) ve i(NOS) düzeylerinde azalma (66).
<i>Diğerleri</i>	
Polideoksiribonükleotid (Adenozin A2A reseptör agonisti)	Histolojik hasarda düzelme, spermatogenezde iyileşme, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunda artma (56).
Simvastatin (Hidroksimetilglutaril-KoA redüktaz inhibitörü)	Apoptozda azalma, eNOS aktivitesinde azalma, hemoksijenaz-1 ekspresyonunda artma (82).
Nikotinamid (PARP inhibitörü)	Apoptozda azalma, histopatolojik hasarda iyileşme (83).
Sivelestat (Nötrofil elastaz inhibitörü)	Oksidatif streste azalma, apoptozda azalma, histopatolojik hasarda iyileşme (84).
PD98059 (MAPK3/MAPK1 inhibitörü)	MAPK3/MAPK1'de azalma, TNF α 'da azalma, apoptozda azalma (56).
FBmAb (Monoklonal E-selektin antikoru)	Nötrofil göçü inhibisyonu (85).
Dehidroepiandrosteron (Hormon)	Apoptozda azalma (55).
Taurin (Aminoasit)	Oksidatif streste azalma, spermatogenezde düzelme (86).
<i>İskemik Koşullama</i>	
Sonradan koşullama	MAPK inhibisyonu, inflamatuvar sitokinlerin inhibisyonu, NF- κ B inhibisyonu, I κ B- α ekspresyonunda artma, histolojik hasarda iyileşme (Erken dönem) (44).
	Histopatolojik hasarda iyileşme (Uzun dönem) (87).
Ön koşullama ve Sonradan koşullama	Histolojik hasarda azalma, oksidatif stresle ilişkili parametrelerde değişiklik, apoptozda azalma, ısı şok protein 70 mRNA'sında azalma (88).

2.3. Apoptoz

Apoptoz kelimesi Yunanca'da çiçek yaprağının dökülmesi anlamına gelmektedir (89). Hücrelerin normal gelişimi sırasında meydana gelen ölüm 19. yüzyılın ortalarında Carl Vogt tarafından keşfedilmiştir. Bu şekildeki programlanmış hücre ölümünü ifade etmek üzere apoptoz terimi ilk kez 1971 yılında Wylie, Kerr ve Currie tarafından kullanılmıştır (90).

Nekroz, bir diğer hücre ölüm şeklidir ve İ/R hasarında apoptoz gibi rol oynar. Apoptoz ile nekroz olayları oluşum süreçleri, enerji gereksinimleri, morfolojik özellikleri ve sonuçları yönüyle birbirinden ayrılır:

- Apoptoz, ister hücre içi ister hücre dışı etmenler kaynaklı olsun genler tarafından kontrol edilen ve adenosin trifosfat (ATP) kullanılarak gerçekleştirilen programlı bir hücre ölümüdür. Apoptoz sırasında büzüşme ve çekirdekte kromatin yoğunlaşması görülür. Apoptoz sonucunda ilgili hücrelerde herhangi bir inflamasyon oluşmadan bu hücreler ortamdaki temizlenir.
- Nekroz ise ani toksik etki yüzünden hücre zarının geçirgenliğinin bozulması sonucu ATP kullanılmaksızın meydana gelir. Nekroz sırasında hücre şişer ve hücre zarı patlar. Nekroz sonucunda ise ilgili hücrelerde hücre içindeki maddelerin dışarı dağılmasına bağlı olarak bir inflamasyon meydana gelir (91).

Apoptoz, hücrelerin normal yaşam döngüsü ve düzgün gelişiminin önemli bileşenlerinden biridir. İstenmeyen hücrelerin eliminasyonunu sağlayarak hücre homeostazisini korur. DNA hasarı, UV radyasyonu, iyonize radyasyon, oksidatif stres, replikasyon veya rekombinasyon hataları ile çevresel ve terapötik genotoksinler apoptozu tetikleyen başlıca etmenlerdir (92).

Apoptoz ekstrensek (ölüm reseptörü) ve intrinsek (mitokondriyal) olmak üzere başlıca iki yolak üzerinden gerçekleşir (Şekil 2):

- Ekstrensek yolağa ölüm reseptörleri aracılık eder. Bu reseptörlerin hücre dışına dönük tarafı sistemden zengindir. Apoptotik sinyal için olmazsa olmaz ölüm bölgesi ise hücre içine dönük kısımlarında yerleşiktir. Ölüm reseptörleri TNF-R1 (CD120a), CD95(APO-1/Fas), DR3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), TRAIL-R1 (APO-2, DR4), TRAIL-R2 (DR5, KILLER, TRICK2) ve DR6 olarak sıralanabilir. TNF- α , Fas ve TRAIL bu apoptotik

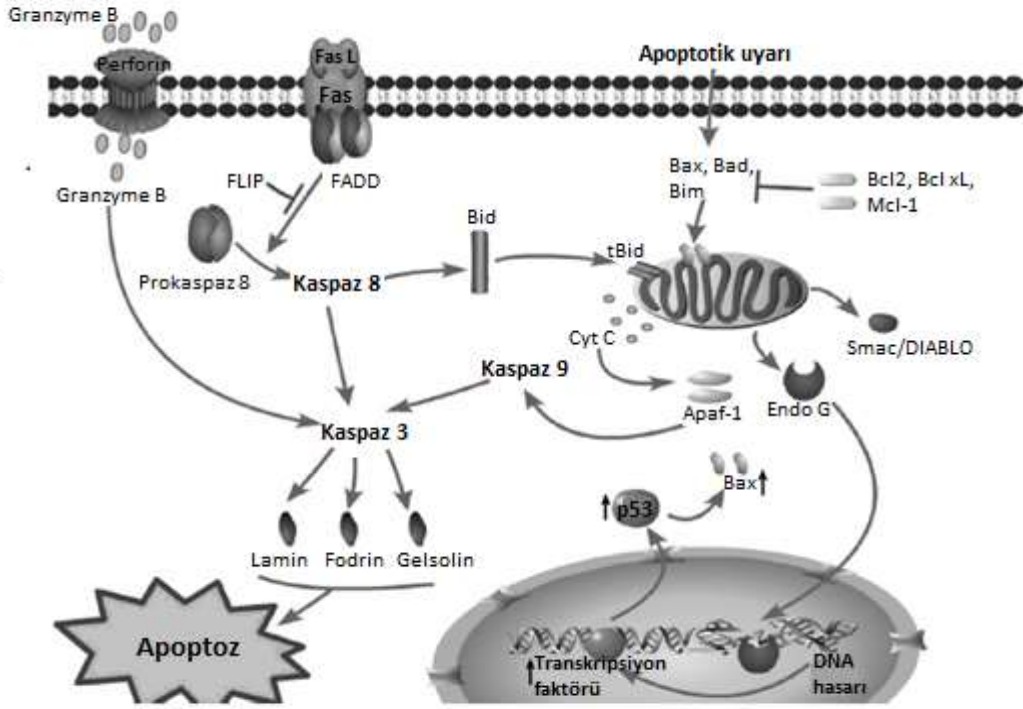
yolağı harekete geçiren başlıca ligandlardır. Bu ligandların ölüm reseptörüne bağlanması sonucu kaspaz-8 aktivasyonu görülür. Kaspaz-8'in diğer kaspazları indüklemesi ile hücreyi ölüme götüren olaylar dizisi başlamış olur (90).

- İntrensek yolak ise DNA hasarı ve sitotoksik stres gibi çeşitli hücre içi ölüm sinyalleri tarafından aktive edilir. Apoptotik uyarılar karşısında mitokondrinin dış membranı bütünlüğünü kaybederek oldukça geçirgen hale gelir. Başta sitokrom c olmak üzere normalde hücreler arası bölgede yer alan pro-apoptotik proteinler sitoplazmaya salınır ve kaspazları aktifleştirir. Sitokrom c sitoplazmada apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'e (Apaf-1) bağlanarak apoptozom adı verilen protein kompleksini meydana getirir. Bu olay, kaspaz-9 ve sonrasında diğer kaspazların aktivasyonu ile apoptozla sonuçlanır (93).

Bu temel yolların dışında perforin/granzim A veya B'yi içeren bir başka apoptoz yolağı daha tanımlanmıştır (94).

Kaspazlar apoptozu başlatan ve uygulayan temel bileşenlerdir. Sistein proteaz yapısındaki kaspazlar proteinlerin aspartik asitten sonra gelen bağımlı kırarlar. Kaspazlar hücrede genelde inaktif halde bulunur ve bu şekliyle prokaspaz olarak isimlendirilir. Prokaspazlar herhangi bir otoproteolitik mekanizmayla ya da diğer proteazlar tarafından aktif hale getirilir. Aktif hale gelen kaspazın bir başka prokaspazı aktiflemesi ile devam eden bu proteolitik olaylar zinciri apoptotik hücre ölümü ile sonuçlanır.

Memelilerde apoptozu başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, 8, 9 ve 10); apoptozu uygulayıcı kaspazlar (kaspaz-3, 6 ve 7) ve sitokin aktivasyonu ile ilişkili olan inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14) olmak üzere 3 tip ve toplamda 14 tane kaspaz tanımlanmıştır (92). Kaspaz-3 apoptozun başlıca uygulayıcı kaspazıdır (Wu, 2014), intrensek yolağın başlatıcısı olan kaspaz-9 ve ekstrinsek yolağın başlatıcısı olan kaspaz-8 tarafından aktifleştirilebilir (47).



Şekil 2. Apoptozisin ekstrinsek ve intrinsek yolaklarında rol oynayan çeşitli moleküler bileşenler. Şemada üç tane yolak sunulmuştur. İntrensek yolak mitokondriyi içermektedir. İntrensek yolak Fas/FasL ve Granzim yolağı ve bunların düzenleyicilerini içerir. Lamin, fodrin ve gelsolin kaspaz-3'ün substratlarıdır. Kaspaz-3'e yanıt olarak harekete geçmeleri hücre fragmentasyonu ile sonuçlanır. DNA hasarından sonra p53 aktivasyonu olduğu görülmektedir (94).

Apoptoz, pro-apoptotik ve anti-apoptotik genler tarafından kontrol edilir:

- Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik genler apoptozu inhibe eder.
- Bax ve BH3 ise pro-apoptotik genlerdir ve apoptozu uyarırlar.

Bcl-2 ile Bax arasındaki oran hücrenin sağkalımı açısından önemlidir. Bu oran Bcl-2 lehinde yüksek olduğunda hücre yaşamını sürdürür, Bax lehine arttığında ise hücre ölümü meydana gelmektedir. Bax ve Bcl-2 arasındaki oranın düzenlenmesinde tümör baskılayıcı bir gen olan p53'ün rolü olduğu düşünülmektedir. Bu geni taşımayan ya da mutasyona uğrayan hücreler ise yaşamını sürdürebilmektedirler (91).

Apoptotik hücre ölümünün normalden az ya da fazla olması organizmada çeşitli bozukluklara yol açabilir. Yetersiz apoptoz bazı kanser türleri ve otoimmün hastalıklar ile ilişkilidir. Aşırı apoptozun ise Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi

birtakım nörodejeneratif hastalıklar, AIDS ve İ/R hasarı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (95).

Testis dokusunda, normal fizyolojik koşullarda, spermatogenez süresince germ hücrelerinden bazıları olgunluğa erişmeden apoptoz sonucu ölürlür. Bu durum steroid hormonları tarafından kontrol edilmektedir. Ayrıca, testiküler çevrenin germ hücre gelişimini destekleme kapasitesinin sınırlı olması germ hücrelerinin ölümünü düzenleyen önemli faktörlerdendir. Özellikle germ hücrelerinin tutunduğu Sertoli hücreleri sadece sınırlı sayıda hücreye destek olabilmektedir, bu durum germ hücre sayısının Sertoli hücreleri ile dengede olmasını gerektirmektedir (96). Germ hücreleri ile Sertoli hücrelerinin birbirine oranının belli sınırlar içinde kalması spermatogenezin devamı ve gamet üretiminin zarar görmemesi açısından önemlidir (97).

Apoptoz için asıl hedef, germ hücrelerinden spermatogonia ve spermatisitlerdir (97). Gelişmekte olan bir testiste gonositlerin spermatogonialara farklılaştığı dönemde apoptoz olayında abartılı bir artış olur. Spermatogenezin ilk dalgası olarak da bilinen bu evrede apoptoz intrensek veya ekstrensek yolak aracılığıyla meydana gelebilir. Yapılan çalışmalarla sıçanlarda bu dönemdeki apoptotik süreçte kaspaz-3, 8 ve 9'un (98) rol oynayabileceği ve CD95'in (Apo-1/Fas) up-regülasyonunun olduğu (99) gösterilmiştir. Zheng ve arkadaşları da (100) farelerde bu dönemde kaspaz-2'nin rolünü ortaya koymuşlardır.

2.4. Fosfodiesteraz Enzimleri

FDE enzimleri, hücre içi ikincil haberci moleküller olan cAMP ve cGMP'yi hidrolize eden enzim ailesidir. Bu enzimler cAMP ve cGMP'deki 3',5' siklik fosfat bağının hidrolizini kataliz ederek inaktif ürünler olan 5'-AMP veya 5'-GMP üretimine neden olur. Bugüne kadar memelilerde toplamda 21 farklı gen içeren 11 tane FDE enzim ailesi (FDE1-FDE11) tanımlanmıştır. Her bir FDE enziminin A, B, C ve D olarak tanımlanan farklı izoformları bulunabilir.

FDE enzimleri birbirinden substrat spesifikliği ve afinitesi, düzenleyici mekanizmaları ve katalitik özelliklerine göre ayrılmaktadır. FDE 4, 7 ve 8 cAMP molekülünü, FDE 5, 6 ve 9 cGMP molekülünü, FDE 1, 2, 3, 10, 11 ise her iki molekülü hidroliz etmektedir (Tablo 2).

FDE enzimleri kalp, beyin, akciğer, testis ve diğer pek çok organda yerleşim göstermektedir. Bir enzim birden fazla dokuya dağılabileceği gibi bir hücre birkaç

farklı FDE eksprese edebilmektedir. FDE enzimlerinin yapısında ~270 aminoasit ile çevrilmiş katalitik kısım ile aminoasit ucuyla katalitik kısım arasında kalan düzenleyici kısım ortaktır. Katalitik kısım enzimin çekirdeğini oluşturur ve yüksek düzeyde korunmaktadır. Aminoasit sırası ise değişkenlik göstermektedir (101). Bu enzimler genetik olarak regüle edildiği gibi hücre içi birtakım hücresel olaylar (siklik nükleotid konsantrasyonu, fosforilasyon, düzenleyici proteinlerle etkileşme...) tarafından da düzenlenir (102).

Memelilerin testis dokusunda in situ hibridizasyon çalışmaları sonucu Sertoli hücreleri, pakiten spermatositler ve yuvarlak spermatidlerde FDE 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 ve 11'in varlığı belirlenmiştir. FDE 4, testiste bilinen başlıca düzenleyici FDE alt üyesidir. Bu enzimin FDE 4D geni, Sertoli hücrelerinde cAMP hidrolize edici aktivite ile birebir ilişkilidir (103). FDE 4 genlerinin dağılımları ise hücrelere göre farklılık göstermektedir. FDE 4A daha çok germ hücrelerinde, FDE 4B ise Sertoli ve Leydig hücreleri gibi somatik hücrelerde yerleşmiştir. Bazı dejeneratif olaylar FDE 4 izoenzimlerinin ekspresyonunda değişikliğe sebep olabilmektedir (104).

Tablo 2. FDE enzim ailesi (102, 105-106).

FDE Ailesi	Düzenleme	Substratı	Yerleşimi	İnhibitörleri
FDE 1	Ca ²⁺ /kalmodulin ile aktive	cAMP, cGMP	Kalp, beyin, akciğer, düz kas	Vinposetin, Nikardipin, 8-MeOM-IBMX, Nimodipine, KS-505a, IC224
FDE 2	cGMP ile aktive	cAMP, cGMP	Adrenal bez, kalp, akciğer, karaciğer, trombositler	EHNA, IC933, BAY-60-7750, PDP
FDE 3	cGMP ile kompetitif olarak inhibe	cAMP, cGMP	Kalp, akciğer, karaciğer, trombositler, adipoz doku, inflamatuvar hücreler	Silostamid, Milrinon, Silostazol
FDE 4	PKA (aktivasyon) veya ERK (inhibisyon) ile fosforile	cAMP	Sertoli hücreleri, böbrek, beyin, karaciğer, akciğer, inflamatuvar hücreler	Rolipram, Roflumilast, Silomilast, Ro 20-1724
FDE 5	PKG (aktivasyon) ile fosforile	cGMP	Akciğer, trombositler, vasküler düz kas	Zaprinast, Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil
FDE 6	Transducin ile aktive	cGMP	Fotoreseptör	Zaprinast, Sildenafil, Vardenafil, Dipiridamol
FDE 7	Roliprama duyarsız	cAMP (yüksek afinite)	İskelet kası, kalp, böbrek, beyin, pankreas, T lenfositleri	Dipiridamol, BRL 50481, IC242
FDE 8	Roliprama ve IBMX'e duyarsız	cAMP	Testis, göz, karaciğer, iskelet kası, kalp, böbrek, over, beyin, T lenfositleri	Dipiridamol
FDE 9	IBMX'e duyarsız	cGMP	Böbrek, karaciğer, akciğer, beyin	Zaprinast, BAY-73-6691
FDE 10	Bilinmiyor	cAMP, cGMP	Testis, beyin	Dipiridamol, Papaverine, TP-10, MP-10
FDE 11	Bilinmiyor	cAMP, cGMP	İskelet kası, prostat, böbrek, karaciğer, hipofiz ve tükürük bezleri, testis	Tadalafil, Zaprinast, Dipiridamol

2.5. Fosfodiesteraz Enzim İnhibitörleri

FDE enzim aktivitesi ilk olarak 1958 yılında Sutherland and Rall tarafından ortaya konmuştur (107). Eftörleri aracılığıyla bir dizi hücresele olayla ilişkili olan cAMP ve cGMP'nin sinyal amplitüdü ve süreleri, FDE enzimlerinin ekspresyonu ve aktivitesi ile yakından ilişkilidir (108). FDE aktivitesindeki bozukluklar astım, erektil disfonksiyon, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAİ), otoimmün bozukluk, hipertansiyon, intermittant klodikasyon, kalp yetmezliği, şizofreni, inme ve depresyon gibi pek çok hastalıkla ilişkilidir (109). Bu nedenle, FDE'yi inhibe eden ajanlar günümüzde terapötik hedef olarak dikkat çekmektedirler. Bu ajanları terapötik açıdan cazip kılan sebeplerden ilki temel farmakolojik bir prensibe dayanmaktadır. Bu prensibe göre herhangi bir ligand ya da ikincil habercinin parçalanmasının önlenmesiyle konsantrasyonunda meydana gelen artış, sentezlenmesiyle meydana gelen artıştan daha fazladır. Bir diğere neden memeli dokularında FDE'lerin farklı izoformlarının eksprese edilmesi, dolayısıyla bu enzimlerin farklı fizyolojik olaylar ve patolojik durumlarla ilişkili olmalarıdır. Hücrelerdeki substrat niteliğindeki cAMP ve cGMP konsantrasyonlarının çok düşük olması ve FDE inhibitörlerinin yüksek miktarda endojen substratla yarışmak zorunda kalmaması FDE enzim inhibitörlerini ilaç hedefi olarak cazip kılmaktadır (105).

Günümüzde FDE 3, FDE 4 ve FDE 5'i inhibe ederek etki gösteren bazı ilaçların çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanım endikasyonu vardır;

- Bunlardan FDE 3 inhibitörleri intermittant klodikasyon (silostazol) ve akut kalp yetmezliğinde (milrinon vd.) (110-111),
- FDE 4 inhibitörleri KOAİ (roflumilast) (112) ve psöriyatik artrit (apremilast) tedavisinde (113),
- FDE 5 inhibitörleri erektil disfonksiyon (sildenafil, tadalafil, vardenafil vd.), pulmoner hipertansiyon (sildenafil ve tadalafil) ve benign prostat hiperplazi (tadalafil) tedavisinde kullanım alanına sahiptir (114).

Bu 3 grup dışında kalan FDE inhibitörleri henüz klinik kullanım için endikasyon almamalarına rağmen bazı hastalıklarda kullanılıp kullanılmayacakları konusunda araştırmalar devam etmektedir. Bunlardan FDE 1 inhibitörü vinpocetin, bazı Avrupa ülkelerinde hafızayı güçlendirici etkisi nedeniyle diyet süplemanı olarak kullanılırken ateroskleroz tedavisi için de umut vadetmektedir (115). FDE 2 inhibitörlerinden EHNA ve BAY-60-7550'nin kognitif fonksiyonlar üzerine faydalı

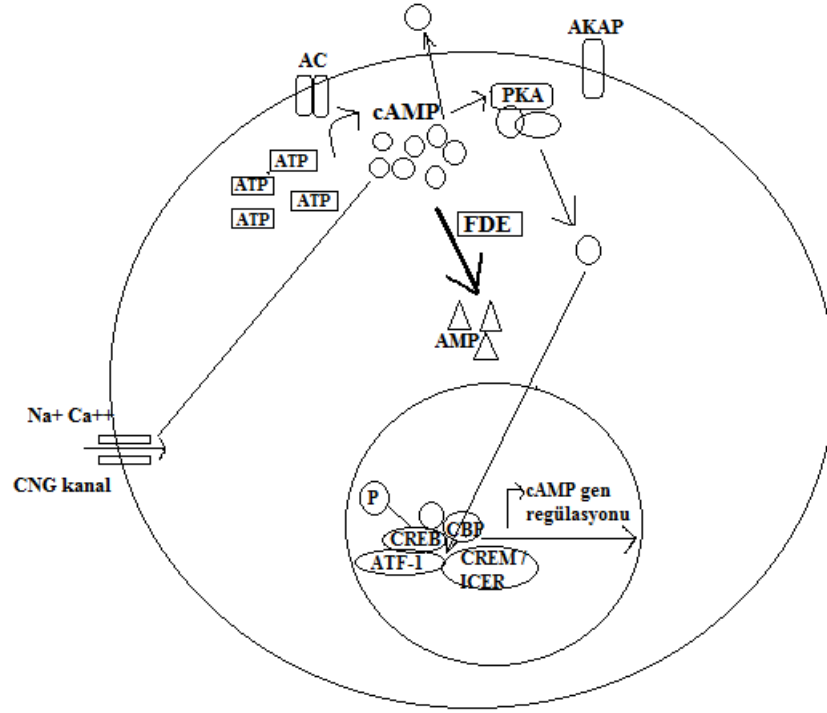
olabileceği düşünülmektedir (116). EHNA ile yapılan çalışmalar bu maddenin aynı zamanda tümör oluşumunu önleyebileceğini de ortaya koymuştur (117). Ayrıca, deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda FDE 5 inhibisyonunun, multiple skleroz hastalığında motor bozuklukları düzelttiği (118); FDE 9 inhibisyonunun diyabet (119) ve Alzheimer hastalığında faydalı olabileceği (120) ve FDE 10 inhibisyonunun antipsikotik etkilere neden olduğu (121) tespit edilmiştir.

Nonspesifik bir FDE inhibitörü olup adenozin reseptör antagonisti olarak da etki eden teofilin 1930'lu yıllardan beri astım ve KOAH gibi solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (122). Bir diğer nonspesifik FDE inhibitörü olan dipiridamol ise inme ve kalp kapakçığı replasmanını takiben antiagregan olarak tercih edilmektedir (123).

2.5.1. FDE 4 enzim inhibitörleri

FDE 4, FDE ailesi içinde spesifik olarak cAMP'yi hidroliz etme özelliği ile öne çıkan, cGMP'ye duyarsız bir enzimdir. Bu enzim A, B, C ve D olmak üzere 4 çeşit genden oluştuğu için FDE ailesinin en büyük üyesi olma özelliğini taşır (101).

Beyin ve immün sistem hücrelerinde bol miktarda bulunan FDE 4 solunum yolu, vasküler düz kas, endotel hücreler, kalp ve diğer bazı organlarda da yerleşim göstermektedir (16). FDE 4 enziminin bulunduğu bölgelerde cAMP modülasyonunda büyük rolü olması FDE 4 inhibitörlerini cAMP konsantrasyonunu artırma noktasında önemli kılmaktadır. cAMP konsantrasyonundaki artış PKA'yı aktifleştirir ve bu aktivasyon sonucu efektör molekül olan cAMP yanıt elemanı bağlayıcı proteinin (CREB) fosforile olduğu bilinmektedir (Şekil 3).



Şekil 3. cAMP sinyal sistemi. ATP'den adenilat siklaz enzimi aracılığı ile cAMP üretilir. Yüksek konsantrasyona erişen sitozolik cAMP, PKA'nın aktivasyonuna neden olur. PKA; CREB, ICER/CREM, ATF-1 ve CBP gibi transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu indükleyerek çeşitli metabolik enzimleri ve sinyal yollarını harekete geçirir. FDE enzimi hücre içi cAMP düzeyini azaltarak cAMP'in etkilerini dengeler. ATF, cAMP-bağımlı transkripsiyon faktörü; CBP, cAMP-bağlayıcı protein; CNG, siklik nükleotid-kapılı iyon kanalı; CREB, cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein; ICER, indüklenebilir cAMP erken repressörü; P, fosforilasyon; AKAP, A-kinaz bağlantı proteini (124).

cAMP/PKA sinyali beyinde öğrenme, hafıza, sinaptik plastisite ve nöronal eksitasyon gibi pek çok sürecin sağlıklı işleyebilmesine aracılık eder (125). Selektif FDE 4 inhibitörlerinin prototipi olan rolipram bu mekanizmayı harekete geçirir ve keşfedildiği yıllarda ilk olarak antidepresan etkisi (126) tespit edilmiştir. Günümüzde ise bu grup ilaçların santral sinir sistemi bozukluklarında potansiyel kullanım alanları araştırılmaktadır (127).

İmmün ve inflamatuvar hücrelerde bol miktarda bulunan FDE 4 enziminin çeşitli ilaçlarla inhibe edilmesi, cAMP artışına bağlı olarak inflamatuvar hücreler ile nötrofillerin aktivasyonunun (128) ve TNF- α , IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin sentezinin azalmasına yol açar (129). Antiinflamatuvar etkileri nedeniyle FDE 4

inhibitörleri solunum yolu hastalıklarının tedavisi için hedef olmuştur. Bu enzimin inhibisyonu, solunum yollarındaki immün hücrelerde TNF- α konsantrasyonunda ve süperoksit anyon üretiminde azalmaya, proliferasyon ve adezyon moleküllerinde inhibisyona ve apoptozda gecikmeye neden olmaktadır (122). Bu enzimi inhibe eden ajanlar ayrıca bronş düz kasının tonusunu azaltarak bronkodilatasyon sağlamakta ve bronkospazm yapan bazı maddelerin etkisini tersine çevirmektedir (16).

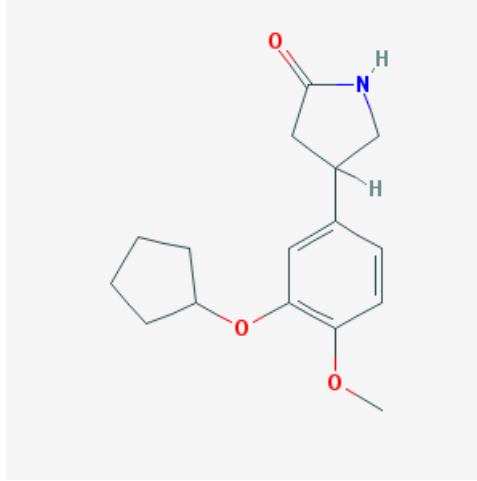
Roflumilast, 2011 yılında FDA tarafından şiddetli KOAH tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmış olup FDA onayı bulunan ilk FDE 4 enzim inhibitörüdür (130) ve ülkemizde de kullanılmaktadır. Roflumilastın ve diğer FDE 4 inhibitörlerinin sistemik kullanımları ile ortaya çıkan ortak yan etkileri bulantı ve kusmadır (18). Bu yan etkileri azaltmak için bu ilaçların inhalasyon yoluyla verilebilen lokal etkili formlarını geliştirmeye yönelik prelinik ve klinik çalışmalar devam etmektedir. Öte yandan, FDE 4 enzim inhibitörlerinin etkisini artırmak için dual etkili inhibitörler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu dual etkili inhibitörler FDE 4 enzime ilave olarak FDE 1, FDE 3, FDE 5 ve FDE 7 enzimini de inhibe edebilmektedirler. Bazıları ise FDE 4 inhibisyonu ile birlikte beta-2 reseptörlerini stimüle edici veya muskarinik tip 3 reseptörlerini antagonize edici özelliğe sahiptirler (131).

FDE 4 enzim inhibitörlerinden apremilast ise inflamatuvar bir hastalık olan psöriyatik artrit ve plak tipi psöriyaziste kullanılmak üzere FDA tarafından 2014 yılında onaylanmıştır. Oral olarak kullanılır ve en belirgin yan etkileri diyare, bulantı ve baş ağrısı olarak sayılabilir (113).

Silomilast, tetomilast, AN-2728 ve NCS 613 gibi bazı FDE 4 inhibitörlerinin henüz FDA onaylı bir kullanım endikasyonu yoktur; ancak bu ilaçların immüno-regülatör özelliklerinden dolayı pek çok otoimmün hastalıkta kullanılıp kullanılmayacakları konusunda klinik çalışmalar devam etmektedir (18).

2.5.2. Rolipram

Rolipram FDE 4 enzim inhibitörlerinin en eskisi olup bu enzimi selektif ve güçlü bir şekilde inhibe eder (132). Önceleri ZK 62711 ismiyle anılan rolipramın, ilk kez Schawabe ve arkadaşları tarafından sıçan beyninden alınan doku kesitlerinde cAMP'ye spesifik fosfodiesterazı inhibe ederek cAMP'yi artırdığı keşfedilmiştir (133). Rolipramın kimyasal yapısı Şekil 4'te sunulmuştur.



Şekil 4. Rolipramın kimyasal formülü (134).

Rolipram (50 mg/kg doza kadar) oral alımı takiben hızlı bir şekilde absorbe edilmektedir. Sıçanlardaki biyoyararlanımı %35 iken, insanlarda bu oran %75'tir. Beyindeki konsantrasyonu plazmadakinin iki katına ulaşan rolipramın başlıca eliminasyonu böbrekler ile olup yarılanma ömrü 1-3 saat arasında değişmektedir (135).

Rolipramın 1980'li yıllarda rezepinin indüklediği hipotermi ve hipokineziyi inhibe etmesi öte yandan yohimbin letalitesini artırması, potansiyel antidepresan aktivitesini ortaya çıkarmıştır (126). Yağda çözünürlüğü yüksek olduğu için kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçen rolipram (136) yapılan çalışmalarda antidepresan etkiden başka anksiyolitik (137) ve antipsikotik (138) etki de göstermiş; öğrenme ve hafıza bozukluğu ile Alzheimer hastalığında kognitif işlevlerde düzelmeye sağlamıştır. Rolipramın bu olumlu etkilerinde postsinaptik cAMP'yi artırmasının ve uzun dönemli potansiyalizasyonu indüklemesinin rolü olabileceği düşünülmektedir (139-140).

FDE 4 inhibitörleri genel olarak immün sistemi modüle ederler, bu bağlamda rolipram güçlü bir antiinflamatuvar aktiviteye sahiptir, pek çok hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynayan TNF- α 'yı hem mRNA hem de protein düzeyinde inhibe edebilmektedir. Ayrıca, rolipramın TNF- α gibi proinflamatuvar sitokin özelliği gösteren IL-1 β , IL-5, IL-13 ve INF- γ 'nın sentezini de baskıladığı bilinmektedir (141). Rolipramın hasarlı bölgeye nötrofil göçünü engellemesi (20) ve inflamasyon süreciyle ilişkili NF- κ B'yi inhibe etmesi de antiinflamatuvar özelliğine katkı sağlamaktadır (142). Deney hayvanlarında astım (143), diyabet (144) ve kolit (145) gibi çeşitli hastalıkların yanı sıra İ/R kaynaklı hasarda ortaya çıkan inflamasyon üzerinde de iyileştirici etkileri ortaya konulmuştur (146).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvanlar

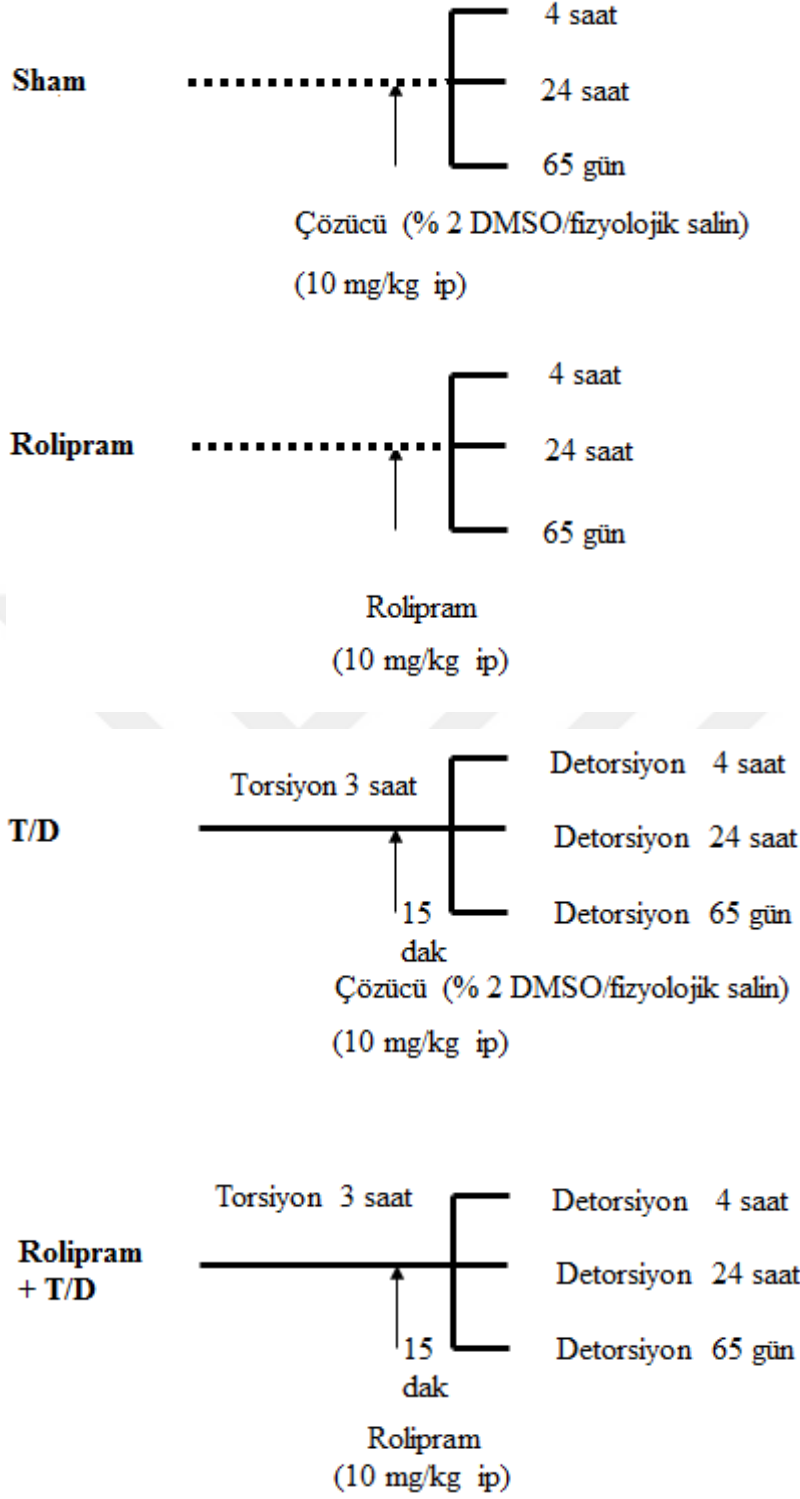
Deneyleerde, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde ve Ankara Saki Yenilli Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda üretilen Wistar cinsi 250-350 gram ağırlığında 96 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olan 21 ± 2 C° sıcaklıkta, 60 ± 5 nem oranındaki odalarda barındırıldılar. Hayvanlar pellet yem ve çeşme suyu ile beslendi. Hayvanlar üzerinde yapılan uygulamalar ve protokoller için "Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan" onay alındı (Ek 7.1.).

3.2. Kimyasallar

Deneyleerde rolipram (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA) ve anestezi için tiyopental sodyum (Pental®, İE Ulugay İlaç Sanayi A.Ş.) kullanıldı. Rolipram %2'lik (h/h) DMSO/ %0.9 NaCl solüsyonunda, tiyopental %0.9 NaCl solüsyonunda çözüldü.

3.3. Gruplar

Sıçanlar rastgele olarak Sham, ROL, T/D ve ROL+T/D olmak üzere 4 ana gruba ayrıldı. Her grup, uygulanan detorsiyon sürelerine göre kendi içinde 4 saat, 24 saat ve 65 gün olarak tekrar üçe ayrıldı (Şekil 5).



Şekil 5. Deney grupları ve aşamaları.

3.4. Testiküler Torsiyon/Detorsiyon

Sıçanlara 50 mg/kg tiyopental sodyum i.p. verilerek anestezi edildi. Sıçanlara abdominal insizyon uygulanarak sağ testisleri dışarı çıkarılıp spermatik kord saat

yönünde 720⁰ döndürölüp batına sabitlendi (Şekil 6). Üç saatlik torsiyon sonrası, spermatik korda detorsiyon uygulanarak testisler skrotuma yerleştirildi. Sham (kontrol) grubuna spermatik kordun T/D işlemi hariç diğeri cerrahi işlemler uygulandı. Tedavi edilecek gruba rolipram (10 mg/kg), detorsiyondan 15 dakika önce tek doz i.p. olarak verildi. Rolipram tedavisi olmayan gruplara çözücü tek başına uygulandı. Detorsiyon sonrası hayvanlar tekrar anestezi edilerek torsiyon uygulanan ipsilateral testisler ile uygulanmayan kontralateral testisler çıkarıldı.



Şekil 6. Deneysel T/D uygulaması.

3.5. Testis ve Kauda Epididim Ağırlıklarının Ölçülmesi

Detorsiyon işleminin 4. ve 24. saatlerinde çıkarılan testislerin ağırlıkları ile 65. gününde çıkarılan testislerin ve kauda epididimlerinin ağırlıkları hassas terazide gram (g) cinsinden ölçüldü.

3.6. Testis Dokusunda Kaspaz-3 Aktivitesinin Ölçülmesi

Kaspaz-3 aktivitesi kolorimetrik analiz kiti (Biovision, CA, USA) ile spektrofotometrik (ELX 800 G, BIO_TEC Instrument Winooski, USA) olarak ölçüldü. Testis dokusu proteinleri CHAPS ([3-[(3-Cholamidopropyl) demethylammonio]-1-propanesulfonate) içeren tampon solüsyonunda kaspaz-3 substratı (Ac-DEVD-pNA, Ac-IETD-pNA ve Ac-LEHD-pNA) ile 37 C° sıcaklıkta 2 saat boyunca inkübe edildi. Aktivite belirlenmesi, kromofor p-nitroanilin (p-NA) spektrofotometrede 405 nm'de ölçülerek yapıldı. Sonuçlar nmol/mg doku proteini olarak sunuldu.

3.7. Testis Dokusunda TNF- α ve IL-1 β Düzeylerinin Ölçülmesi

Detorsiyonun 4. saatinde alınan testislerde TNF- α ve IL-1 β düzeyleri ticari firmanın (Biosource International, Nivelles, Belgium) talimat ve kılavuzlarına göre sandviç ELISA yöntemi kullanılarak değerlendirildi. IL-1 β 'nın kalibrasyon aralığı 2000 pg/ml ve analitik duyarlılığı 4 pg/ml; çalışmalar-içi ve çalışmalar-arası değişkenlik katsayısı (CV) değerleri sırasıyla <%10 ve <%10 idi. TNF- α 'nın kalibrasyon aralığı 2500 pg/ml ve analitik duyarlılığı 11 pg/ml; çalışmalar-içi ve çalışmalar-arası değişkenlik katsayısı (CV) değerleri sırasıyla <%5 ve <%10 idi.

3.8. Sperm Analizi

Detorsiyonun 65. gününde çıkarılan kauda epididimlerde spermelerin sayısı ve motilitesi belirlendi.

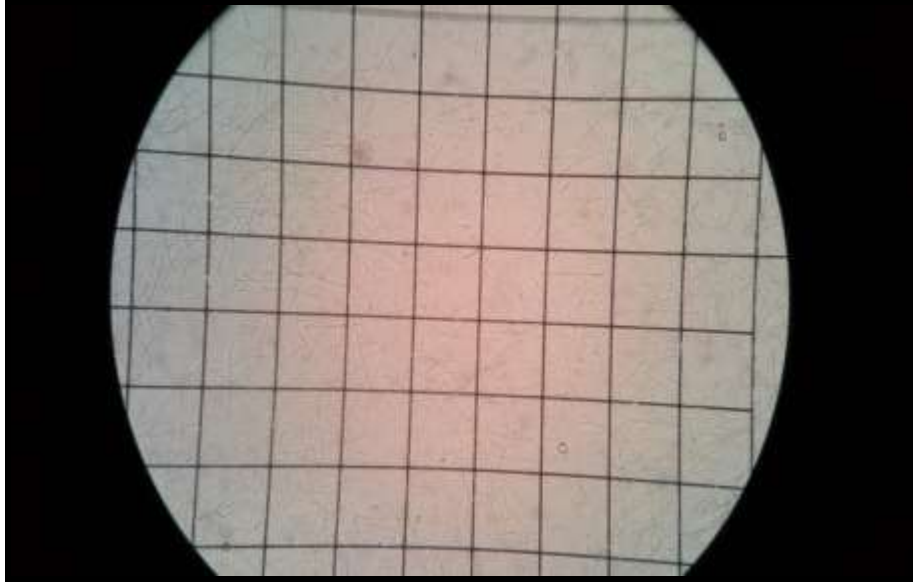
3.8.1. Sperm sayımı

Epididimal sperm sayımı Yokoi ve arkadaşlarının çalışması (147) modifiye edilerek yapıldı. Hayvanların kauda epididimleri çıkartılıp bir cetvel yardımı ile 1 cm boyunda kesilip tartıldıktan sonra (Şekil 7), bir epandorf tüpe yerleştirildi ve üzerine 1 ml serum fizyolojik eklenerek katarakt makası ile parçalanıp yarım saat süre ile 37 C° sıcaklıkta bekletildi. Bu işlem hem epididimdeki spermelerin sıvıya salınmasını

hem de motilitelerinin doğru değerlendirmesini sağlamak amacıyla uygulandı. Makler kamera yardımı ile ışık mikroskopisi altında, 20'lik objektifte sperm sayımı yapıldı. Örnekten alınan 10 µl sıvı Makler kameranın alt kısmındaki diskin üzerine yerleştirildikten sonra bu diskin üzeri ayrı bir cam disk ile kapatıldı. Yan yana 10 kare içindeki spermler sayıldı (Şekil 8). Sayılan 2-3 alan içindeki sperm sayısının ortalaması alındı. Sperm sayısı $\times 10^6$ / gram epididim olarak sunuldu.



Şekil 7. Sperm sayımı için kauda epididimlerin hazırlanması.



Şekil 8. Sperm sayımı sırasında Makler kamerada spermilerin görüntüsü.

3.8.2. Sperm motilitesi

Spermilerin motilitesi, sperm sayımı yapılırken aynı anda ışık mikroskopisinde değerlendirildi. Sperm motilitesi hareketli ve hareketsiz olarak değerlendirilerek kaydedildi.

3.9. Testis Dokularının Histopatolojik Değerlendirmesi

Detorsiyonun 24. saatinde anestezi edilerek çıkarılan ipsilateral ve kontralateral testisler %10'luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonuna alındı ve 24 saat fikse edildi. Testis dokuları transvers olarak iki eşit parçaya ayrıldı. Tüm örnekler histopatolojik inceleme için rutin doku takibi işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitlere hematoksilin-eozin (H&E) boyası uygulandı.

Histopatolojik değerlendirmeler Zeiss marka Axiolab A1 model ışık mikroskobu (Carl Zeiss, Almanya) altında, H&E boyalı preparatlar üzerinde gerçekleştirildi. Ön incelemede, hazırlanan tüm preparatlar küçük büyütmede (X40) gözden geçirildi ve testis dokusunun genel morfolojisi (kesit düzlemindeki seminifer tübül sayısı, bazal membran yapısı, interstisyel doku özelliği, Leydig hücreleri, peritübüler hyalinizasyon vb.) değerlendirildi. Seminifer tübüllerdeki histolojik bulgular Johnsen skorlama sistemine uygun olarak 1-10 arasında değişen bir skalada

skorlandı (148). Tübüllerin skorlama işlemi 400'lük büyütmede 10 ardışık alanda yapıldı ve ortalamaları alındı. Johnsen skorlaması, öncelikle en matür hücre tiplerinin kaybı ile germinal epitelin ilerleyici dejenerasyonu ve spermatozoa, spermatid, spermatozoid ve son olarak da Sertoli hücrelerinin gözlenememesi ile karakterize, testiküler hasarı temel alan bir skorlamadır. Hasar arttıkça skorlamadaki puan azalır (Tablo 3).

Tablo 3. Johnsen skorlama sistemine göre histopatolojik kriterler.

Skor	Histolojik bulgular
10	Bütünüyle matür spermatogenez izlenmektedir. Seminifer tübüllerde germinal epitel çok sıralıdır ve çok sayıda spermatozoa içerir.
9	Hafif derecede bozulmuş spermatogenez izlenir. Seminifer tübüllerin germinal epitelyumunda disorganizasyon ve lümene doğru yığılma yanı sıra çok sayıda geç spermatozoa görülür.
8	Yoğun nükleer boyama gösteren 10 taneden az spermatozoa gözlenmektedir. Bazen piknotik cisimciklere rastlanır.
7	Spermatozoa yoktur, ancak çok sayıda matür spermatidler gözlenir. Bu hücrelerin düşük yoğunluktaki nükleer boyanma özellikleri nedeniyle periferik yerleşimi gösterilebilir.
6	Az sayıda soluk kromatinli ve dar oval başlıklı orta büyüklükte spermatidler gözlenir, sıralı olarak dizilmişlerdir. Piknotik cisimcik yoktur.
5	Spermatozoa ve spermatid yoktur, ancak çok sayıda spermatozoid görülür.
4	Sadece çok az bir miktar spermatozoid (5'ten az) gözlenir. Spermatid ve spermatozoa gözlenmez.
3	Germ hücre olarak sadece spermatogonia vardır.
2	Hiç bir germ hücresi yoktur, fakat Sertoli hücreleri vardır.
1	Tübüler bölümde hücre yoktur.

3.10. Testis Dokularının İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan testis doku örneklerinde immünohistokimyasal boyamalar yapıldı. Anti-kaspaz-3, 8 ve 9 aktivitesini araştırmak

amacıyla ABC (Avidin-Biotin Kompleks) yöntemi kullanıldı. Testis dokusundan 4 µm kalınlığında alınan transvers kesitler, deparafinizasyon işlemi için 61 C°'de inkübe edilip sırasıyla ksilen ve alkol serilerinden geçirilerek suya indirildi. Dokuda formaldehit fiksasyonundan kaynaklanan reseptör maskelenmesini önlemek için sitrat tamponuna alınan kesitlere mikrodalgada yüksek ısı uygulandı. Antijenik determinant bölgelerinin açığa çıkarılmasından sonra kesitler sitrat tamponundan distile suya alınıp 20 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Kesitler fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde 3 defa çalkalandıktan sonra, endojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla 15 dakika süreyle %3'lük hidrojen peroksit ile muamele edildi. Nonspesifik bağlanmayı önlemek amacıyla 5 dakikalık Ultra V block (LabVision, TA-015-UB) uygulamasını takiben 1/100 dilüsyonlarda hazırlanan anti-cleavage caspase-3, 8 ve 9 primer antikoları kesitlere nemli bir ortamda 1 saat oda sıcaklığında uygulandı. Primer antikor aşamasından sonra kesitler PBS'ye alınıp uygun sekonder antikor (Biotinylated Link, Dako, K0609) ile 30 dakika muamele edildi. Ardından tekrar PBS'ye alınan kesitlere 10 dakika Streptavidin peroksidaz (Streptavidin HRP, Dako, K0609) kompleksi uygulandı. Tekrar PBS'ye alınan kesitlere immün reaksiyon gerçekleşinceye kadar (mikroskop altında kontrol ederek) diaminobenzidin (DAB) kromojen solüsyonu (Vector, SK-4100) uygulandı, zıt boyama Mayer's hematoksilen ile yapıldı. Kesitler alkol serilerinden geçirilip, ksilen ile muamale edildikten sonra entellan ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Zeiss marka Axiolab A1 model ışık mikroskobu (Carl Zeiss, Almanya) altında değerlendirilerek bulgular fotoğraflandı.

3.11. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Veriler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak sunuldu. Grupların normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uyan çoklu grupların karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA Testi ile LSD post hoc testi uygulandı. Normal dağılıma uymayan grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi, gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde Mann-Whitney *U* testi kullanıldı. Sağ ve sol testislerin parametrik değerlerinin karşılaştırılmasında paired-Student *t* testi, parametrik olmayan değerlerinin karşılaştırılmasında ise Wilcoxon testi uygulandı. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde, $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Testis ve Kauda Epididim Ağırlıkları

Detorsiyonun 4. ve 24. saatlerinde hayvanların testis ağırlıkları ile 65. gününde hem testis hem de kauda epididimlerinin ağırlıkları ölçüldü.

Detorsiyonun 4. saatinde gruplar karşılaştırıldığında testis ağırlıklarının ortalamalarında anlamlı fark olmadığı belirlendi.

Her grubun ipsilateral ve kontralateral testis ağırlık ortalamaları birbiri ile karşılaştırıldığında da anlamlı farklılık bulunmadı (Tablo 4).

Detorsiyonun 24. saatinde gruplar karşılaştırıldığında testis ağırlıklarının ortalamalarında anlamlı fark olmadığı belirlendi. Her grubun ipsilateral ve kontralateral testis ağırlık ortalamaları birbiri ile karşılaştırıldığında ise sadece T/D grubundaki ipsilateral testis ağırlıklarının ortalamasının kontralateral testislerinkinden düşük olduğu bulundu ($p=0.012$) (Tablo 4).

Tablo 4. Detorsiyonun 4. ve 24. saatlerinde çıkarılan ipsilateral ve kontralateral testislerin ağırlıkları.

Gruplar	Testis Ağırlıkları (g)			
	4. Saat		24. Saat	
	İpsilateral	Kontralateral	İpsilateral	Kontralateral
Sham	1.40±0.016	1.41±0.137	1.36±0.187	1.32±0.049
ROL	1.26±0.272	1.26±0.229	1.34±0.054	1.34±0.054
T/D	1.46±0.246	1.39±0.169	1.25±0.159*	1.41±0.168
ROL+T/D	1.50±0.216	1.43±0.154	1.22±0.211	1.22±0.294

Veriler ortalama değerleri ± standart sapma olarak sunuldu. *: $p<0.05$ kontralateralden farkı gösterir.

Detorsiyonun 65. gününde, testis ve kauda epididim ağırlıklarının ortalamaları gruplar arasında karşılaştırıldığında, T/D grubundaki ipsilateral testis ağırlıkları ortalaması Sham ($p=0.009$) ve ROL ($p=0.004$) gruplarının ortalamalarına göre ve kauda epididim ağırlıklarının ortalaması sadece ROL grubunun ($p=0.004$) ortalamasına göre düşük bulundu. Kontralateral taraftaki kauda epididim ağırlıklarının ortalamaları karşılaştırıldığında, ROL ($p=0.007$) ve ROL+T/D

(p=0.006) grubunun ortalamaları sadece Sham grubununkilere göre yüksek bulundu. Her grubun ipsilateral testis ve kauda epididim ağırlıklarının ortalamaları kontralateral testis ve kauda epididim ağırlıklarının ortalamaları ile karşılaştırıldığında ise T/D grubundaki ipsilateral testislerin (p=0.008) ve kauda epididimlerin (p=0.0001) ağırlık ortalamaları kontralaterale göre düşük bulundu. Sham uygulama ve rolipram verilmesinin anlamlı bir fark yaratmadığı gözlemlendi. ROL+T/D grubunun ipsilateral taraftaki testis ve kauda epididim ağırlıklarının ortalamaları kontralaterale göre düşük bulunmadı (Tablo 5).

Tablo 5. Detorsiyonun 65. gününde çıkarılan testis ve kauda epididimlerin ağırlıkları.

Gruplar	Testis Ağırlıkları (g)		Kauda Epididim Ağırlıkları (g)	
	İpsilateral	Kontralateral	İpsilateral	Kontralateral
Sham	1.28±0.355	1.27±0.368	0.208±0.332	0.202±0.058
ROL	1.39±0.385	1.54±0.130	0.257±0.090	0.271±0.051 ^a
T/D	0.69±0.182 ^{ab*}	1.37±0.139	0.140±0.027 ^{b*}	0.246±0.041
ROL+T/D	1.11±0.620	1.58±0.125	0.221±0.125	0.290±0.016 ^a

Veriler ortalama değerleri ± standart sapma olarak sunuldu. ^a: p<0.05 Sham'den, ^b: p<0.05 ROL'den, *: p<0.05 kontralateralden farkı gösterir.

4.2. Testis Dokusunda Kaspaz-3 Aktivitesi

Detorsiyonun 4. ve 24. saatlerinde çıkarılan testis dokularındaki kaspaz-3 aktiviteleri Tablo 6'da sunulmaktadır.

Detorsiyonun 4. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokularının kaspaz-3 aktivite ortalamaları birbirinden farklılık gösterirken (p=0.001) kontralateral testislerde farklılık gözlenmedi. İpsilateral testislerin kaspaz-3 aktivitesi ortalamaları, Sham ve ROL gruplarında birbirinden farklı bulunmadı. T/D ve ROL+T/D gruplarının ortalamaları Sham (sırasıyla p=0.002, p=0.003) ve ROL (sırasıyla p=0.002, p=0.003) gruplarına göre yüksek bulundu. T/D grubunun ipsilateral testislerinin kaspaz-3 aktivite ortalaması ise kontralateral testislere göre yüksek bulundu (p=0.028) (Tablo 6).

Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokularının kaspaz-3 aktivite ortalamaları birbirinden farklılık gösterirken (p=0.001) kontralateral testisler

arasında farklılık gözlenmedi. İpsilateral testislerin kaspaz-3 aktivite ortalamaları değerlendirildiğinde, T/D grubunun değeri ROL grubuna göre yüksek bulundu ($p=0.004$). ROL+T/D grubunun ortalamasının T/D ($p=0.004$) ve ROL ($p=0.004$) gruplarına göre yüksek olduğu görüldü. T/D ($p=0.028$) ve ROL+T/D ($p=0.046$) gruplarının ipsilateral testislerinin kaspaz-3 aktivite ortalamaları kontralateral testislere göre de yüksek bulundu (Tablo 6).

Tablo 6. Detorsiyonun 4. ve 24. saatlerinde çıkarılan ipsilateral ve kontralateral testislerde kaspaz-3 aktiviteleri.

Gruplar	Testislerin Kaspaz-3 Aktivitesi (nmol/mg protein)			
	4. Saat		24. Saat	
	İpsilateral n=7	Kontralateral n=7	İpsilateral n=6	Kontralateral n=6
Sham	6.29±1.180	6.85±0.644	-	-
ROL	6.40±1.327	6.77±1.100	7.28±0.655	7.82±0.662
T/D	16.50±6.866 ^{ab*}	8.77±3.333	9.98±2.377 ^{b*}	7.07±1.069
ROL+T/D	19.50±7.923 ^{ab}	8.67±3.483	25.15±14.549 ^{bc*}	7.43±0.807

Veriler ortalama değerleri ± standart sapma olarak sunuldu. ^a: $p<0.05$ Sham'den, ^b: $p<0.05$ ROL'den, ^c: $p<0.05$ T/D'den, *: $p<0.05$ kontralateralden farkı gösterir.

4.3. Testis Dokusunda TNF- α ve IL-1 β Düzeyi

Detorsiyonun 4. ve 24. saatlerinde çıkarılan ipsilateral testis dokularındaki TNF- α ve IL-1 β düzeyleri Tablo 7'de sunulmaktadır.

Detorsiyonun 4. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokularındaki TNF- α düzeyi ortalamalarının birbirinden farklı olduğu bulundu ($p=0.001$). İpsilateral testislerin TNF- α düzeyi ortalamaları Sham ve ROL grupları karşılaştırıldığında birbirinden farklı bulunmadı. T/D ve ROL+T/D gruplarının ortalamalarının Sham ve ROL gruplarına göre yüksek olduğu görülürken; sadece ROL+T/D grubunun TNF- α düzeyi ortalaması Sham ($p=0.002$) ve ROL ($p=0.006$) grubundan anlamlı farklı bulundu. Benzer şekilde ipsilateral testislerin IL-1 β düzey ortalamaları Sham ve ROL grupları karşılaştırıldığında birbirinden farklı bulunmadı. T/D ve ROL+T/D gruplarının IL-1 β düzey ortalamaları Sham grubuna göre daha yüksek olmasına

rağmen sadece ROL+T/D grubunun ortalaması Sham grubunun ortalamasına göre anlamlı farklı bulundu ($p=0.020$) (Tablo 7).

Detorsiyon işleminin 24. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokularının TNF- α ve IL-1 β düzeyleri ortalamaları gruplar karşılaştırıldığında birbirinden farklı bulunmadı (Tablo 7).

Tablo 7. Detorsiyon işleminin 4. ve 24. saatlerinde çıkarılan ipsilateral testislerde TNF- α ve IL-1 β düzeyleri.

Gruplar	TNF- α Düzeyi (pg/mg protein)		IL-1 β Düzeyi (pg/mg protein)	
	4. Saat	24. Saat	4. Saat	24. Saat
	n=7	n=6	n=7	n=6
Sham	88.71 \pm 13.000	-	62.71 \pm 9.178	-
ROL	113.29 \pm 15.074	142.83 \pm 5.913	69.86 \pm 18.151	62.67 \pm 18.107
T/D	140.43 \pm 39.887	151.67 \pm 30.369	80.86 \pm 24.293	77.83 \pm 20.094
ROL+T/D	160.29 \pm 26.998 ^{ab}	107.83 \pm 48.701	87.71 \pm 20.064 ^a	82.83 \pm 29.294

Veriler ortalama değerleri \pm standart sapma olarak sunuldu. ^a: $p<0.05$ Sham'den, ^b: $p<0.05$ ROL'den farkı gösterir.

4.4. Epididimal Sperm Sayımı ve Motilitesi

Detorsiyonun 65. gününde çıkarılan ipsilateral ve kontralateral kauda epididimlerde sperm miktarı değerlendirildi (Tablo 8). Kontralateral testislerde sperm miktarı gruplar arasında farklı bulunmadığından sadece ipsilateral testislerin sperm motilitesi değerlendirildi (Tablo 9).

İpsilateral kauda epididimlerde sperm ortalamaları gruplar arasında birbirinden farklılık gösterirken ($p=0.001$); kontralateral taraftaki ortalamalar arasında farklılık gözlenmedi ($p=0.087$). İpsilateral kauda epididimlerdeki sperm sayımı karşılaştırıldığında, Sham ve ROL grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenirken; T/D ve ROL+T/D gruplarının sperm ortalamalarının Sham (sırasıyla $p=0.002$ ve $p=0.004$) ve ROL (sırasıyla $p=0.004$ ve $p=0.010$) gruplarına göre düşük olduğu bulundu. İpsilateral kauda epididimlerdeki sperm ortalamaları kontralateral tarafla karşılaştırıldığında ise sadece T/D ($p=0.028$) ve ROL+T/D ($p=0.043$) gruplarında düşük bulundu ($p=0.028$) (Tablo 8).

Tablo 8. Detorsiyonun 65. gününde alınan ipsilateral ve kontralateral kauda epididimlerden elde edilen sperm sayımı.

Gruplar	Sperm Sayımı ($\times 10^6$ / gram epididim)	
	İpsilateral	Kontralateral
	testis n=7	testis n=6
Sham	70.8 \pm 44.09	79.8 \pm 57.18
ROL	38.3 \pm 35.27	34.8 \pm 19.75
T/D	5.6 \pm 4.98 ^{ab*}	82.0 \pm 39.95
ROL+T/D	5.3 \pm 8.21 ^{ab*}	29.3 \pm 23.34

Veriler ortalama değerleri \pm standart sapma olarak sunuldu. ^a: p<0.05 Sham'den, ^b: p<0.05 ROL'den, ^{*}:p<0.05 kontralateral kauda epididimden farkı gösterir.

Detorsiyonun 65. gününde, ipsilateral kauda epididimlerdeki sperm motilite yüzdeleri karşılaştırıldığında, Sham ve ROL grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı; T/D ve ROL+T/D gruplarının sperm motilite yüzdesinin Sham (sırasıyla p=0.004, p=0.004) ve ROL (sırasıyla p=0.004, p=0.002) gruplarına göre düşük olduğu; ancak T/D ve ROL+T/D grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (Tablo 9).

Tablo 9. Detorsiyonun 65. gününde alınan ipsilateral kauda epididimlerden elde edilen spermilerin motilitesi.

Gruplar	Sperm Motilitesi (%)
	İpsilateral
	Testis n=7
Sham	60.6 \pm 23.66
ROL	50.4 \pm 16.43
T/D	12.6 \pm 14.47 ^{ab}
ROL+T/D	11.50 \pm 12.55 ^{ab}

Veriler ortalama değerleri \pm standart sapma olarak sunuldu. ^a: p<0.05 Sham'den, ^b: p<0.05 ROL'den farkı gösterir.

4.5. Testis Dokularının Histopatolojik Değerlendirmesi

Detorsiyonun 24. saatinde alınan ipsilateral ve kontralateral testislerin morfolojik görüntüleri Şekil 9'da sunulmaktadır. Tüm grupların kontralateral testislerinde (Şekil 9 E-F-G-H) normal morfolojik yapı izlendiğinden sadece ipsilateral testislerin değerlendirilmesinde Johnsen skorlaması kullanıldı.

İpsilateral testis dokularının Johnsen skoru, grupların ortalamaları birbiri ile karşılaştırıldığında farklılık gösterdi ($p=0.0001$). Sham ve ROL grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı; T/D ve ROL+T/D gruplarının Johnsen skorlarının, Sham ($p=0.002$, $p=0.002$) ve ROL ($p=0.001$, $p=0.001$) gruplarına göre düşük olduğu; T/D ve ROL+T/D grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (Tablo 10).

Tablo 10. Detorsiyonun 24. saatinde alınan ipsilateral testislerdeki histopatolojik hasar skorlaması.

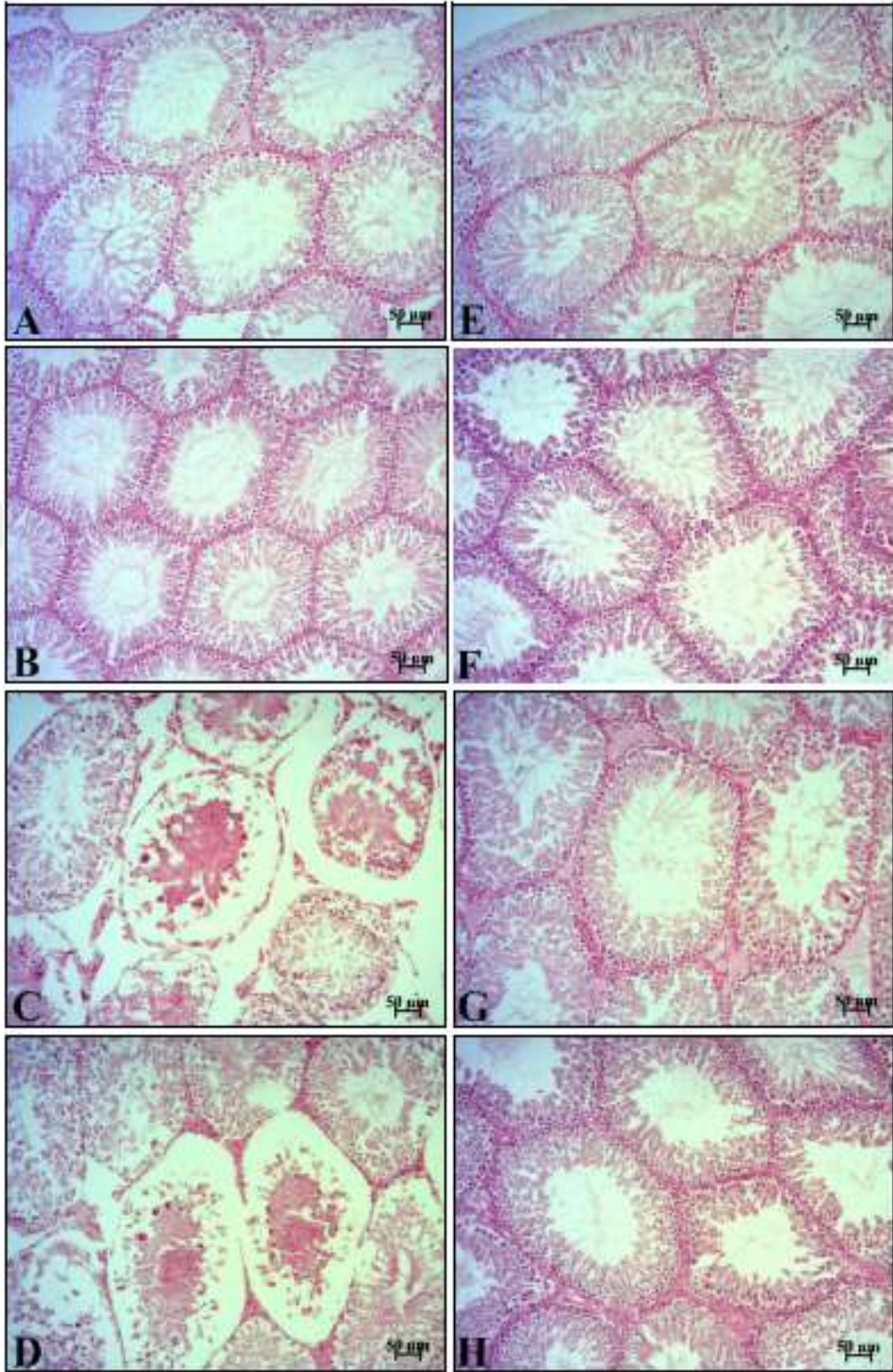
Gruplar	Johnsen Skoru
	İpsilateral Testis n=7
Sham	9.66 ± 0.127
ROL	9.09 ± 0.323
T/D	6.61 ± 1.191 ^{ab}
ROL+T/D	5.50 ± 1.113 ^{ab}

Veriler ortalama değerleri ± standart sapma olarak sunuldu.^a: $p<0.05$ Sham'den, ^b: $p<0.05$ ROL'den farkı gösterir.

İpsilateral testis dokuları histopatolojik olarak değerlendirildiğinde; Sham (Şekil 9A) ve ROL (Şekil 9B) grubunda normal morfoloji ve matür spermatogenez izlenirken; T/D grubunun testislerinde seminifer tübüllerin kontüründe bozulma, spermatogenetik seri hücrelerinin yerleşiminde düzensizlikler, hem spermatogenetik seri hücrelerinde hem de Sertoli hücrelerinde ciddi oranda kayıplar, vakuolizasyonlar, lümene atılmış olgunlaşmamış spermatogenetik seri hücreleri izlenildi (Şekil 9C). ROL+T/D grubunun testis dokularında da, T/D grubundakilere benzer dejeneratif değişiklikler gözlemlendi (Şekil 9D). Tüm grupların kontralateral testislerinde (Şekil 9E-F-G-H) normal morfolojik yapı izlendi.

İpsilateral Testis

Kontralateral Testis

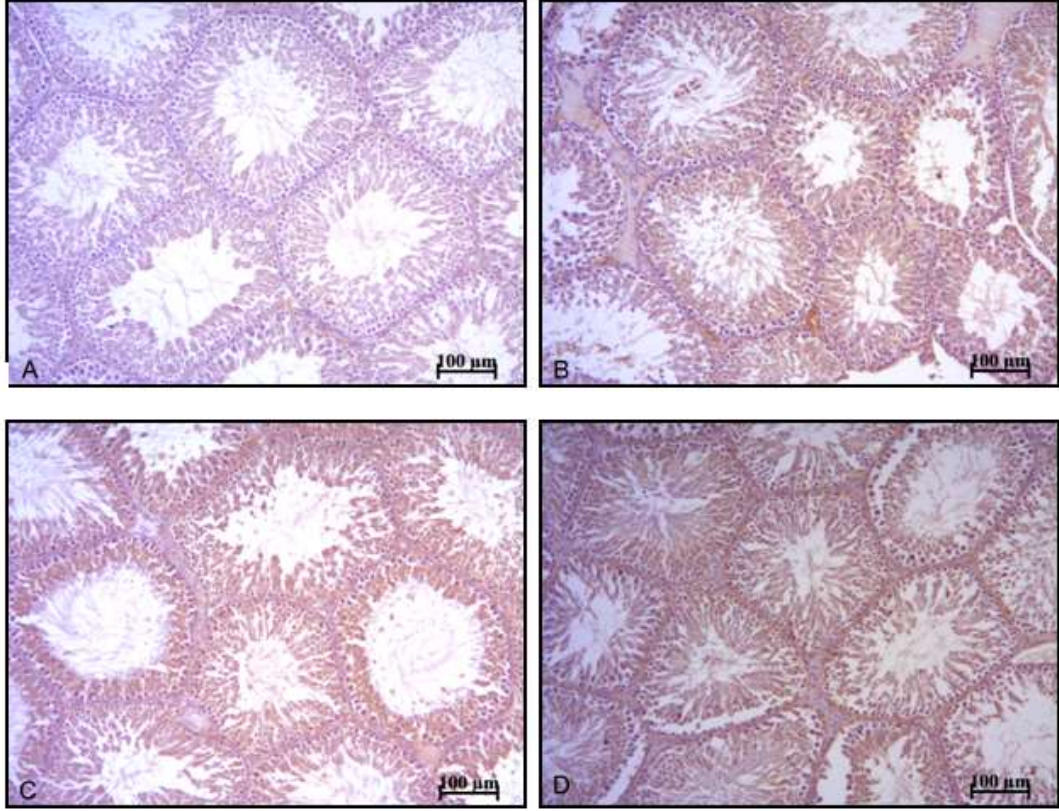


Şekil 9. Detorsiyonun 24. saatinde ipsilateral ve kontralateral testislerin morfolojisi. Sham, Rolipram (ROL), Torsiyon/Detorsiyon (T/D) ve ROL+T/D gruplarına ait ipsilateral (A-B-C-D) ve kontralateral (E-F-G-H) testisler. Hematoksilen-Eozin, Ölçek çubuğu: 50 µm.

4.6. Testis Dokularının İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Değerlendirilmesi

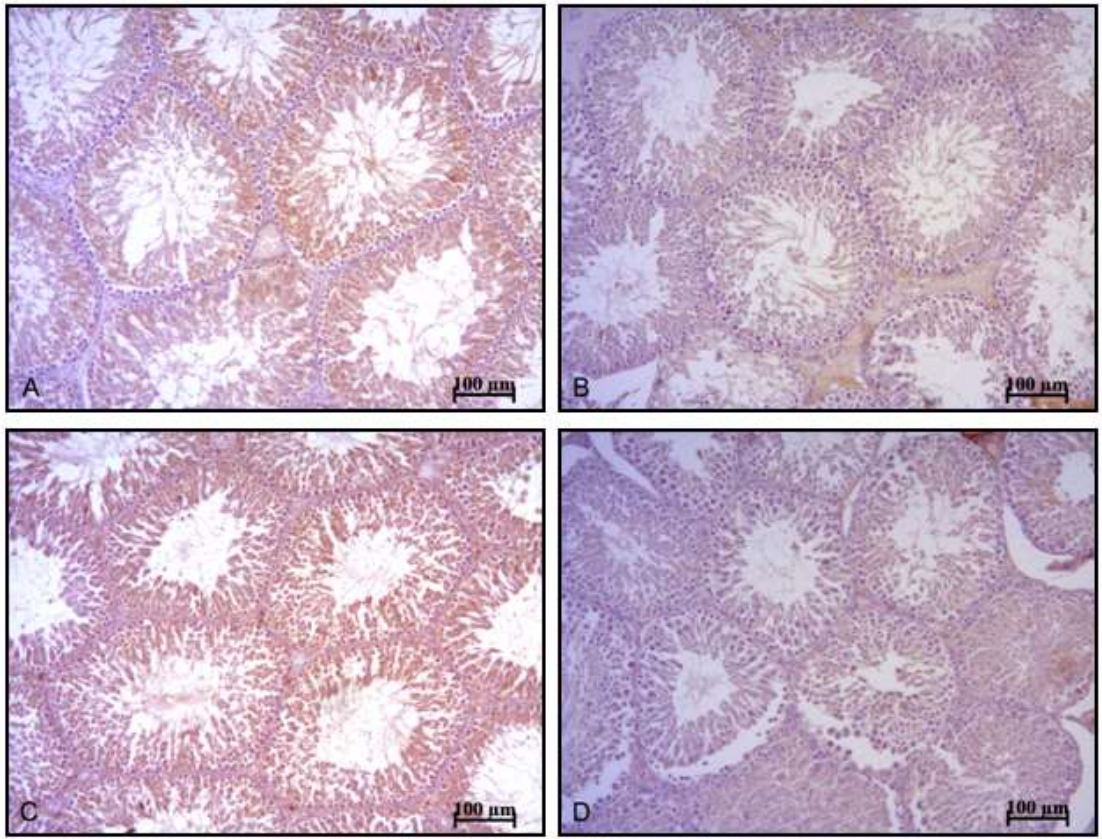
Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokularında immünohistokimyasal boyama yöntemi ile kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri değerlendirildi.

Kaspaz-3 ile Sham grubunda birkaç hücrede boyanma; ROL grubunda orta şiddette boyanma; T/D grubunda lümene dökülmüş spermatogenetik seriye ait hücrelerde ve ROL+T/D grubunda ise özellikle seminifer tübülün bazal kısımlarında ve spermatogonyum hücrelerinde kuvvetli boyanmalar izlendi (Şekil 10).



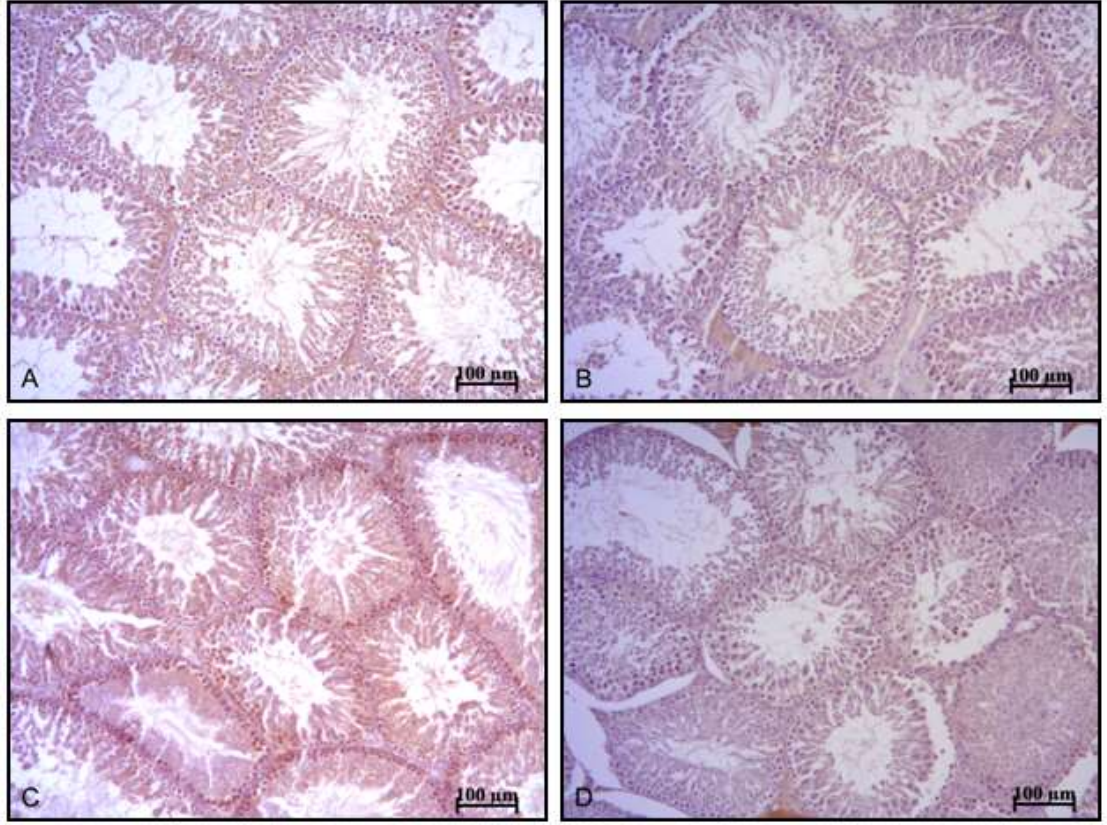
Şekil 10. Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokularında kaspaz-3 antikoruyla yapılan immün boyama görüntüsü. Sham (A) grubunda birkaç hücrede zayıf boyanma; ROL (C) grubunda orta şiddette boyanma; T/D (B) grubunda lümene dökülmüş spermatogenetik seriye ait hücrelerde kuvvetli boyanmalar; ROL+T/D (D) grubunda özellikle seminifer tübülün bazal kısımlarında ve spermatogonyum hücrelerinde kuvvetli boyanmalar izlendi.

Kaspaz-8 ile Sham ve ROL gruplarının ipsilateral testis dokularında spermatositlerde belirgin boyanma; T/D ve ROL+T/D gruplarında zayıf immün reaksiyonlar izlendi (Şekil 11).



Şekil 11. Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokularında kaspaz-8 antikoruyla yapılan immün boyama görüntüsü. Sham (A) ve ROL (C) gruplarında özellikle spermatositlerde boyanma izlendi, spermatogonyumlarda herhangi bir reaksiyon gözlenmedi. T/D (B) ve ROL+T/D (D) gruplarında zayıf immün reaksiyonlar izlendi.

Kaspaz-9 ile Sham ve ROL gruplarının ipsilateral testis dokularındaki spermatogonyumların çoğunda; T/D ve ROL+T/D gruplarında ise spermatogonyum hücrelerinin bazılarında kuvvetli boyanmalar izlendi (Şekil 12).



Şekil 12. Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokularında kaspaz-9 antikoruyla yapılan immün boyama görüntüsü. Sham (A) ve ROL (C) gruplarında özellikle spermatogonyumlarda şiddetli immün boyanma izlendi. T/D (B) ve ROL+T/D (D) gruplarında kuvvetli boyanma bazı spermatogonyum hücrelerinde izlendi, diğer spermatogenetik seriye ait hücrelerde izlenmedi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, FDE 4 enzim inhibitörü olan rolipramın, sıçanlarda tek taraflı oluşturulan deneysel testiküler T/D hasarında ipsilateral ve kontralateral testis ve kauda epididim ağırlıkları, sperm sayısı ve motilitesi ile testiküler histopatolojik hasara olan etkileri, hasarın oluşumuna katkısı olduğu bildirilen proinflamatuvar TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinler ve apoptotik yollar üzerinden araştırılmıştır.

T/D uygulamasının ipsilateral tarafta, detorsiyonun 4. saatinde kaspaz-3 aktivitesinde artışa; detorsiyonun 24. saatinde testislerin ağırlığı ve Johnsen skorlamasında azalmaya, kaspaz-3 aktivitesinde artışa, spermatogonyumlarda kaspaz-3 ve kaspaz-9 ile immünohistokimyasal kuvvetli boyanmaya; detorsiyonun 65. gününde testis ağırlıklarında, sperm sayısı ve motilitesinde azalmaya neden olduğu belirlendi. T/D uygulaması kontralateral taraftaki testislerde herhangi bir değişikliğe neden olmadı. Detorsiyon öncesi rolipram uygulanmasının, azalan testis ağırlığını Sham grubuna geri döndürdüğü; bununla birlikte kaspaz-3 aktivitesi, Johnsen skorlaması, sperm sayısı ve motilitesi üzerine etkisi olmadığı belirlendi. ROL+T/D grubunda detorsiyonun 24. saatindeki kaspaz-3 aktivitesindeki artışın T/D grubundan anlamlı olarak daha fazla olduğu; detorsiyonun 4. saatinde TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin T/D grubunda anlamlı artış göstermemesine rağmen ROL+T/D grubunda anlamlı artış gösterdiği bulundu.

Torsiyona uğrayan ve iskemik hale gelen bir testis dokusunun kalıcı hasar görmesini önlemek için torsiyonun en kısa sürede düzeltilmesi gerekmektedir. Bir saatlik iskemi sonucu spermatogenez zarar görebilmekte ve süre uzadıkça testisteki hasarın şiddeti artmaktadır. Torsiyondan sonra 10 saat boyunca iskemik kalan testiste kan dolaşımında %80 oranında tıkanıklık meydana gelirken bu süre 24 saati bulursa testis geri dönüşümsüz olarak hasarlanmaktadır (149). Ancak, kan akışının yeniden sağlandığı reperfüzyon evresinin de iskemi hasarını şiddetlendirdiği bilinmektedir. İ/R olayı, spermlerin sayısı ve niteliğinde değişikliğe neden olmakta, spermatogenezi olumsuz etkilemektedir (6). Hekimoglu ve arkadaşları çalışmalarında (75) 1 saatlik iskemi sonrası reperfüzyonun 30. gününde sperm konsantrasyonunda ve sperm motilitesinde azalma ile anormal sperm oranında artma gözlemlenmiştir. Fuse ve arkadaşları (150) İ/R'yi takiben kauda epididimlerdeki sperm sayısının 8, 16 ve 24. haftalarda; sperm motilitesinin de 8. ve 16. haftalarda azaldığını tespit etmişlerdir. Zhang ve arkadaşları (65) çalışmalarında reperfüzyonun 30. gününde sperm

üretiminde azalmanın yanı sıra testis ağırlıklarında da azalma izlenmiştir. Bizim çalışmamızda, detorsiyonun 65. gününde testis ve kauda epididimlerin ağırlığı, sperm sayıları ve motiliteleri değerlendirildiğinde, önceki çalışmalara benzer olarak testis ağırlıklarında, sperm sayılarında ve motilitelerinde azalmalar gözlemlendi.

Testislerden birinde torsiyon gerçekleşmesinin karşı testiste de hasarı indüklediği konusunda halen farklı görüşler mevcuttur. York ve Drago, sıçanlarda tek taraflı torsiyonun kontralateral testiste ortalama seminifer tübül çapında azalmaya neden olduğunu belirlemiştir (151). Bazı araştırmacılar kan akımında meydana gelen değişikliklere bağlı olarak sempatik sistemin refleks aktivasyonu (32), antisperm antikörlerinin oluşması (31), immünolojik mekanizmalar (27) gibi nedenlerle karşı testiste hasar meydana gelebileceğini savunmuşlardır. Rodriguez ve arkadaşları (27) sıçanların sol testislerini 720⁰ torsiyone etmiş ve 10, 30 ve 80 gün sonra aldıkları kontralateral testisleri histopatolojik hasar ve apoptozis açısından değerlendirmişler; torsiyondan 10 gün sonra alınan sıçanların kontralateral testis örneklerinde hasar görülmezken 30 gün sonra alınan örneklerin %44.8'inde, 80 gün sonra alınan örneklerin ise %25'inde hasar tespit edilmiştir. Bu sonuçlar detorsiyonun başlangıcında kontralateral tarafta hasar gözlenmeyebileceğini, hasar gözlendikten sonra da zaman içerisinde lezyonların geriye dönebileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda, detorsiyonun 4. ve 24. saatlerinde, ipsilateral testislerin kaspaz-3 aktivite ortalamaları kontralateral testislerinkiler ile karşılaştırılmıştır. Detorsiyonun 4. saatinde, T/D ve ROL+T/D gruplarının kaspaz-3 aktivite ortalamaları karşı testislere göre yüksek bulunmasına rağmen sadece T/D grubuna ait olan yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Detorsiyonun 24. saatinde ise hem T/D hem de ROL+T/D gruplarının aktivitelerindeki yükseklik karşı testislere göre istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir. Ayrıca, detorsiyonun 24. saatinde çıkarılmış olan kontralateral testislerin hepsinde normal histolojik yapı gözlenmiştir. Detorsiyonun 4. saatinde, ipsilateral ve kontralateral testis ağırlıkları ortalamaları gruplar arasında birbirinden farklı bulunmaz iken detorsiyonun 24. saatinde sadece T/D grubunda ipsilateral testislerin ağırlıklarının ortalamalarının karşı tarafa göre anlamlı olarak düşük olduğu bulundu. Detorsiyonun 65. gününde ise T/D grubundaki ipsilateral testislerin ve kauda epididimlerin ağırlık ortalamaları kontralateral testislere göre düşük bulunmuştur; ancak ROL+T/D grubunun ipsilateral taraftaki testis ve kauda epididim ağırlıklarının ortalamaları karşı tarafa göre düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir. İpsilateral kauda

epididimlerdeki sperm miktarı ortalamaları kontralateral tarafla karşılaştırıldığında ise sadece T/D ve ROL+T/D gruplarında düşük bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, çalışmamızda tek taraflı 3 saat süreyle uygulanan torsiyon sonrası detorsiyonun 4. ve 24. saatinde ve 65. gününde kontralateral testislerin hasardan etkilenmediğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda kullandığımız rolipram, FDE 4 enziminin spesifik inhibitörüdür ve bu enzimi inhibe ederek cAMP'nin 5'AMP'ye dönüşümünü engeller. Böylece hücre içi cAMP seviyesi yüksek kalır (16). Rolipram antidepresan olarak keşfedilmiş olmasına rağmen (125) yapılan çalışmalarda antiinflamatuvar (140), antioksidan (152) ve antikarsinojenik (153) etkilerinin de olduğu gösterilmiştir. FDE enzimleri kalp, beyin, akciğer, testis ve diğer pek çok organda yerleşim göstermektedir. Memelilerin testis dokusunda Sertoli hücreleri, pakiten spermatositler ve yuvarlak spermatidlerde FDE 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 ve 11'in varlığı belirlenmiştir. FDE 4 ise testiste bilinen başlıca düzenleyici FDE alt üyesidir. FDE enzimleri spermatozoonlarda farklı yerleşimler gösterirler, böylece farklı cAMP havuzunun regülasyonu ile sperm fonksiyonun selektif modülasyonuna imkan sağlamış olurlar (104). Fisch ve arkadaşları (154) insan sperm hücrelerinde FDE 4 ve FDE 1 inhibisyonu ile sırasıyla sperm motilitesinin arttığını ve akrozom reaksiyonunun uyarıldığını gözlemlemişlerdir. Baxendale ve arkadaşları (155) rolipram ve FDE 1 inhibitörü 8-metoksimetil-3-izobutil-1-metilksantin (MMPX) farelerin spermalarında cAMP'yi artırdığını; sadece rolipramın spermaların kapasitasyonunu ve in vitro üreme yeteneğini uyardığını tespit etmişlerdir. Bu durumun FDE 4 enziminin hem baş hem de kuyruk kısmında, FDE 1'in ise sperm sadece kuyruk kısmında yer almasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Yukarıda bahsedilen çalışmalar her ne kadar FDE 4'ün testislerde Sertoli hücreleri, spermatosit ve spermatidlerde yer aldığını, artan cAMP seviyelerinin sperm motilitesi üzerinde belirleyici olabileceğini ifade etse de bizim çalışmamızda, detorsiyon öncesi rolipram tedavisi T/D'ye bağlı azalan sperm miktarı ve motilitesi üzerinde herhangi bir düzelmeye neden olmamıştır.

Çalışmamızda kullandığımız rolipram literatürde antiinflamatuvar özelliği öne çıkmaktadır ve patogenezinde inflamasyon olan pek çok hastalıkta faydalı etkileri olduğu bildirilmektedir. Hartmann ve arkadaşları (145) dişi farelerde inflamatuvar kolit modeli oluşturmuş ve rolipramın 10 mg/kg dozunda kolonda TNF- α konsantrasyonunu baskıladığını göstermişlerdir. Çeşitli organlarda

oluşturulan İ/R hasarı modellerinde, rolipramın hasarı azaltıcı etkilerinden bahsedilmektedir. Kyo ve arkadaşları (146) sıçan midelerinde 30 dakikalık iskemi ve 60 dakikalık reperfüzyon gerçekleştirmişler ve iskemiden önce hayvanlara oral 0.1 ve 0.3 mg/kg dozlarında uygulanan rolipramın gastrik hasarı, gastrik mukozadaki TNF- α konsantrasyonunu ve hasarlı alanda nötrofil birikiminin indirekt göstergesi olan miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesini azalttığını tespit etmişlerdir. Souza ve arkadaşları çalışmalarında (17) rolipramın ve anti-TNF- α antiserumunun süperior mezenterik arter İ/R hasarında lokal ve sistemik etkilerini değerlendirmişler; rolipramın barsak ve akciğerlerde vasküler permeability ve nötrofil birikimini inhibe ettiğini, intestinal hemorajiyi azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca, reperfüzyonun sonunda serum, bağırsak ve akciğer dokularında TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 sitokin düzeylerini ölçmüşler; rolipramın akciğer ve ince bağırsak dokularındaki TNF- α 'yı tamamen, serumdaki TNF- α 'yı kısmen (%57) inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada rolipram serum, akciğer ve bağırsak dokularında artan IL-1 β , IL-6 ve IL-10 artışlarını da önlemiştir. Kraft ve arkadaşları (20) farelerde oluşturdukları inme modelinde fokal serebral iskemiden 2 saat sonra hayvanlara 10 mg/kg dozda rolipram uygulamışlar, infarkt volümünün %50 oranında azaldığını ve daha az nöronda apoptozis olduğunu gözlemişlerdir. Rolipram tedavisi iskemiden sonra beyine göç eden nötrofil sayısında azalma, nöronları iskemik hasardan koruyan tümör büyüme faktörü beta-1 (TGF β -1) düzeylerinde ise artışa neden olmuştur. Rolipramla tedavi edilen farelerde daha az IL-1 β ve TNF- α eksprese edilmiştir. Bu çalışmaların aksine, Bielokova ve arkadaşları (136) tarafından yapılan faz I/II klinik bir çalışmada, multiple skleroz hastalığında rolipramın antiinflamatuvar etkinliği araştırılmış ve rolipramın beyin dokularında inflamatuvar aktiviteyi azaltması beklenirken manyetik rezonans görüntülemelerde kontrast madde tutan lezyonların artışına neden olduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da, rolipramın proinflamatuvar sitokinleri artırarak benzer şekilde inflamatuvar aktiviteyi artırdığını belirledik. T/D grubunun ipsilateral testislerinde detorsiyonun 4. saatinde TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin yükselmekle birlikte Sham grubuna göre anlamlı farklı olmadığı fakat rolipram ön tedavisi alan T/D grubunda TNF- α ve IL-1 β düzeylerindeki artışın anlamlı olduğu bulundu. Bu çalışmada rolipramın T/D uygulanmaksızın tek başına verilmesi durumunda TNF- α ve IL-1 β düzeylerini anlamlı olarak yükseltmemesi, rolipramın testis T/D'ye bağlı İ/R hasarında proinflamatuvar sitokinlerin seviyesinde artışa neden olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda apoptotik yollar üzerinde rolipramın etkilerini değerlendirmek amacıyla, detorsiyonun 24. saatinde grupların testis dokularında kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri için immünohistokimyasal boyama işlemi yapılmıştır. Apoptotik hücre ölümü, TNF- α ve Fas ligand gibi ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile ekstrinsek yolak vasıtasıyla ve/veya mitokondriden sitokrom c salınımı ile intrinsek yolak vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Ekstrinsek yolağın başlatıcısı kaspaz-8 veya intrinsek yolağın başlatıcısı kaspaz-9'un aktivasyonu her iki yolak için ortak uygulayıcı olan kaspaz-3'ü aktive etmektedir (94). Deneysel olarak oluşturulan İ/R çalışmalarında, apoptozisin göstergesi olarak genelde ortak yolak olan aktif kaspaz-3 değerlendirilmektedir. Öte yandan, kaspaz-3'ün aktivasyonunda artış görülmesi, ekstrinsek ve intrinsek yolağın her ikisinin uyarılması aracılığıyla da meydana gelebileceği için apoptotik hücre ölümünün hangi yolla gerçekleştiği hakkında bilgi vermemektedir. Testis dokusunda apoptozis, normalde spermatogenez esnasında spontan olarak gerçekleşmekte ve sağlıklı bir testiküler olgunlaşmayı sağlamaktadır. Erken apoptozis dalgası olarak da ifade edilen bu fizyolojik apoptozis, spermatogenezin ilk fazında ve yoğun şekilde görülmektedir. Spermatogenezin bu evresinde germ hücrelerinin %80'i elimine edilmekte, Sertoli hücrelerinin sayısı ise değişmemektedir. Bu şekilde germ hücreleri ve Sertoli hücrelerinin sayısal oranında denge kurulması testis farklılaşması sürecinde kritik öneme sahiptir. Spermatogonialarla sınırlı değildir; aksine daha çok spermatositleri etkilediği bildirilmektedir (156). Toksinler, kriptorşidizm, varikosel oluşumu gibi çeşitli patolojik durumlarda da testis dokularında apoptotik hücre ölümü gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalar reperfüzyondan sonra kan akışı geri dönse bile germ hücre apoptozisi nedeniyle spermatogenezde kalıcı kayıp meydana geldiğini göstermektedir (157). Son yıllarda, İ/R hasarında apoptotik hücre ölümünün önemli rolü olduğu ortaya konulmuştur (11-14). Shiraishi ve arkadaşları (13) 6 saatlik iskemi sonrasında hücre ödemi, membran bozulması, sitozolün eozinofilik değişimi gibi nekrotik değişimlerin indüklendiğini; nükleer kondensasyon ve fragmantasyon gibi apoptotik değişikliklerin ise sadece reperfüzyon sonrasında indüklendiğini bildirmişlerdir. Germ hücre apoptozisi testiste oksidatif hasarın artması ve lökositlerin diapedezi sonucu uyarılmaktadır (36). Testiküler İ/R olayında, aşırı ROS üretimi sonucu, MAPK ve inflamatuvar yolak aktive olur ve apoptozisde artış görülür (52). Apoptozis sonucu da testiküler atrofi gelişir, spermatogenez bozulur (36). Çalışmamızda detorsiyonun 65. gününde ipsilateral testislerin

ağırlıklarında anlamlı azalma ile testislerin atrofiye uğradığı ve detorsiyonun 24. saatinde T/D grubundaki testislerde seminifer tübüllerin kontüründe bozulma, spermatogenetik seri hücrelerinin yerleşiminde düzensizlikler, hem spermatogenetik seri hem de Sertoli hücrelerinde ciddi oranda kayıplar, vakuolizasyonlar, lümene atılmış olgunlaşmamış spermatogenetik seri hücreleri tespit edilmiştir. Rolipram ile tedavi edilen T/D grubunda testiküler atrofi gözlenmezken testis dokularında dejeneratif değişiklikler görülmüştür.

Testis İ/R hasarında apoptotik yollardan hangisinin aktif olduğu ile ilgili yaptığımız literatür taramasında farklı sonuçlarla karşılaştık. Cayli ve arkadaşları (158) çalışmalarında sıçanların testislerinde 2 saatlik iskemiden sonra reperfüzyonun 12. saatinde aktif kaspaz-3, aktif kaspaz-9, BAX düzeylerinde upregülasyon olduğunu; Bcl-2 proteininde ise downregülasyon olduğunu gözlemişlerdir. Lysiak ve arkadaşları (159) farelerin testisinde 2 saatlik iskemiden sonra reperfüzyonun 4. saatinde ROS'ta artış olduğunu, 24. saatte ise mitokondriyal sitokrom c'nin sitoplazmaya salındığını tespit etmişlerdir. Buna paralel olarak, sitoplazmadan mitokondriye BAX ve kaspaz-2 translokasyonunun gerçekleştiği ve testiküler germ hücrelerindeki aktif kaspaz-3'ün arttığını da ileri sürmüşlerdir. Kaspaz-9'un inhibe edilmesi ile aktif kaspaz-3'te ve apoptozise uğrayan germ hücre miktarında azalma olduğu; kaspaz-8'in inhibisyonu ile apoptoziste anlamlı bir azalma olmadığı bildirilmiştir. Lysiak ve arkadaşları bu çalışmada testiste apoptotik hücre ölümünün mitokondriyal yolak aracılı gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir. Aydos ve arkadaşları (160) sıçan testis dokularında 2 saatlik iskemiye takiben 4 saatlik reperfüzyon ile İ/R hasarı oluşturmuşlardır. Reperfüzyon sonrası çıkarılan testis dokularında TNFR-1 aktivitesinde artış tespit etmelerine rağmen, TNF- α aktivitesinde artış gözlememişlerdir. Ayrıca, testis dokularının immünohistokimyasal boyanması sonucu kaspaz-3 ile spermatogonia ve spermatositlerde ve kaspaz-8 ile interstisyel doku, spermatogonia ve spermatositlerde pozitif boyanmalar tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, testis dokularında sitokrom c için pozitif boyanma olmaması da, araştırmacılara İ/R hasarına ekstresek yolağın aracılık ettiğini düşündürmüştür. Gültekin ve arkadaşları (161) sıçan testislerine 4 saat uygulanan torsiyon sonrası detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan testislerde, hem kaspaz-8 hem de kaspaz-9'un boyanma şiddetini artmış olarak saptadıklarından T/D olayının intresek ve ekstresek yolları aktive edebileceğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, T/D'den 24 saat sonra çıkarılan testis dokuları immünohistokimyasal olarak

değerlendirildiğinde, kaspaz-9 ile spermatogonyumların bazılarında kuvvetli boyanma izlenirken, kaspaz-8 ile zayıf boyanma ve kaspaz-3 ile lümeneye dökülen spermatogenetik seriye ait hücrelerde kuvvetli boyanmalar tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları, sıçan testiküler T/D hasarında, Lysiak ve arkadaşlarının çalışmalarına benzer şekilde, intrensek yolak aktivasyonuna bağlı apoptotik yolağın daha aktif olduğunu düşündürmektedir. Sham ve ROL grubunda kaspaz-8 ile spermatositlerde gözlenen kuvvetli boyanma normal spermatogenez sürecindeki erken apoptozis gibi düşünülebilir (98). T/D grubunda kaspaz-8 ile zayıf immün boyanmaların görülmesi ise T/D olayının normal spermatogenez sürecindeki kaspaz-8 aracılı ektrrensek yolağı inhibe ediyordüğünü düşündürmektedir.

Rolipramın germ hücrelerini apoptozisten koruduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Lee ve arkadaşları (162) irradyasyon uygulaması sonrası farelere rolipramı i.p. olarak 1.25 mg/kg dozda, günde 2 defa 5 gün boyunca uygulamışlardır. Rolipram, irradyasyona bağlı 12. saatte gelişen apoptozise karşı germ hücrelerini korumuştur. İrradyasyondan 35 gün sonra azalan testis ağırlıklarını artırmıştır. Radyasyonun neden olduğu sperm sayısı ve motilitesindeki azalmaları ve testiküler morfolojik değişiklikleri düzeltmiş, seminifer tübüllerin yenilenmesi ve kök hücrelerin yaşam süreleri üzerinde olumlu etkiler sergilemiştir. Araştırmacılar, rolipramın bu koruyucu etkilerinden CREB aktivasyonunun sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Rolipram ile yapılan başka bir çalışmada ise Ramezani ve arkadaşları bu ilacın insan glioblastoma kök-hücre benzeri hücrelerde bevacizumabın neden olduğu hücre ölümünü artırdığını bildirmişlerdir (153). Rolipramın bevacizumab ile kombine kullanılması durumunda, serbest VEGF_A düzeylerinde azalma, p53 ve bölünmüş kaspaz-3 miktarlarında artışlar yaptığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda rolipram ile tedavi ettiğimiz ROL+T/D grubunda, kaspaz-3 ile özellikle seminifer tübülün bazal kısımlarında ve spermatogonyum hücrelerinde kuvvetli; kaspaz-8 ile zayıf; kaspaz-9 ile ise spermatogonyum hücrelerinin bazılarında kuvvetli boyanmalar izlenmiştir. Rolipram tedavisi alan T/D grubunda da benzer immünohistokimyasal boyanmaların gözlenmesi, detorsiyonun 4. ve 24. saatinde spektrofotometrik yöntemle ölçülen kaspaz-3 aktivitesinin gruplar içerisinde ROL+T/D grubunda en yüksek düzeyde ölçülmesi, rolipramın testiküler T/D hasarında aktive olan apoptotik yolakları baskılamadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, T/D hasarında detorsiyon öncesi uygulanan rolipram tedavisi, histopatolojik hasar ile sperm sayısı ve motilitesi üzerine koruyucu etkiler

göstermemiştir. T/D hasarında, rolipramın TNF- α ve IL-1 β düzeylerini artırdığı ve aktive olan intrensek apoptotik yolağın başlatıcısı kaspaz-9'u inhibe edemediği anlaşılmaktadır. Bu sonuçlara göre, testis T/D hasarında rolipram ile yapılan FDE 4 enzim inhibisyonunun koruyucu etki için yeterli olmadığı görülmekle beraber bu konuda daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



6. SONUÇLAR

Çalışmamızda T/D uygulaması, sıçanlara abdominal insizyon sonrası sağ testisler dışarı çıkarılarak spermatik kord saat yönünde 720° döndürülüp batına sabitlendikten 3 saat sonra, korda detorsiyon uygulanması sonrası testisler skrotuma yerleştirilerek tamamlandı. FDE 4 enzim inhibitörü rolipramın (10 mg/kg i.p.) detorsiyondan 15 dakika önce verilmesinin, iskemi uygulanan ipsilateral ve uygulanmayan kontralateral testislerdeki histopatolojik hasar, sperm miktarı ve motilitesi üzerine etkileri, apoptotik yollar ve proinflatuar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β üzerine etkileri araştırılmıştır.

1. Detorsiyonun 4. saatinde T/D grubunun TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde artış olmakla birlikte anlamlı düzeyde olmadığı; ROL+T/D grubunda ise bu artışın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Detorsiyonun 24. saatinde ölçülen TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.
2. Detorsiyonun 4. ve 24. saatlerinde T/D ve ROL+T/D gruplarının ipsilateral testislerinde kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı artış olduğu belirlenmiştir. Detorsiyonun 24. saatinde ROL+T/D grubunun kaspaz-3 aktivitesi T/D grubuna göre de anlamlı artışa neden olmuştur.
3. Detorsiyonun 24. saatinde yapılan histolojik incelemede, T/D ve ROL+T/D gruplarının testis dokularında benzer dejeneratif değişiklikler yaptığı ve hasar skorlamasında kullanılan Johnsen skorunda her iki grupta da anlamlı azalma gözlenmiştir.
4. Detorsiyonun 24. saatinde testis dokularında immünohistokimyasal boyama yöntemi ile kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri değerlendirilmiş olup kaspaz-3 ile T/D grubunda lümen dökülmüş spermatogenetik seriye ait hücrelerde, ROL+T/D grubunda özellikle seminifer tübülün bazal kısımları ve spermatogonyum hücrelerinde kuvvetli boyanmalar; kaspaz-8 ile T/D ve ROL+T/D gruplarında zayıf boyanmalar; kaspaz-9 ile ise T/D ve ROL+T/D gruplarında bazı spermatogonyum hücrelerinde kuvvetli boyanmalar izlenmiştir.
5. Detorsiyonun 65. gününde, T/D grubunun testis ağırlıklarında, sperm sayısı ve sperm motilitesinde azalmalar olduğu; ancak rolipram

tedavisinin testis ağırlığındaki azalmayı önlemekle birlikte sperm sayısı ve motilitesinde gözlenen azalmayı önlemediği belirlenmiştir.

6. Kontralateral testisler, çalışmamızda oluşturduğumuz İ/R hasarından etkilenmemiştir.
7. Çalışmamızda testiküler T/D hasarı üzerine etkilerini araştırdığımız FDE 4 enzim inhibitörü rolipram, T/D sonrası TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde artışa neden olurken; T/D'ye bağlı kaspaz-3 aktivitesi ile kaspaz-3 ve kaspaz-9 germ hücrelerindeki immün boyanmayı, histopatolojik hasar ile sperm miktarı ve motilitesindeki azalmaları geri döndürememiştir.



7. KAYNAKLAR

1. Günther P, Rübben I. The acute scrotum in childhood and adolescence. *Dtsch Arztebl Int* 109(25): 449–458, 2012.
2. Mansbach JM, Forbes P, Peters C. Testicular torsion and risk factors for orchiectomy. *Arch Pediatr Adolesc Med* 159(12): 1167-71, 2005.
3. Kapoor S. Testicular torsion: a race against time. *Int J Clin Pract* 62(5): 821-7, 2008.
4. Al-Maghrebi M, Kehinde EO, Anim JT. Long term testicular ischemia-reperfusion injury-induced apoptosis: involvement of survivin down-regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 395(3): 342-7, 2010.
5. Visser AJ, Heyns CF. Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU Int* 92(3): 200-3, 2003.
6. Kurcer Z, Hekimoglu A, Aral F, Baba F, Sahna E. Effect of melatonin on epididymal sperm quality after testicular ischemia/reperfusion in rats. *Fertil Steril* 93(5): 1545-9, 2010.
7. Hadziselimovic F, Geneto R, Emmons LR. Increased apoptosis in the contralateral testes of patients with testicular torsion as a factor for infertility. *J Urol* 160(3 Pt 2): 1158-60, 1998.
8. Saba M, Morales CD, De Lamirdane E, Ganon C. Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *J Urol* 157(3): 1149–54, 1997.
9. Yazihan N, Ataoglu H, Koku N, Erdemli E, Sargin AK. Protective role of erythropoietin during testicular torsion of the rats. *World J Urol* 25(5): 531-6, 2007.
10. Lysiak JJ, Nguyen QAT, Turner TT. Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *J Androl* 23(3): 400-409, 2002.
11. Minutoli L, Antonuccio P, Polito F, Bitto A, Squadrito F, Di Stefano V, Nicotina PA, Fazzari C, Maisano D, Romeo C, Altavilla D. Mitogen-activated protein kinase 3/mitogen-activated protein kinase 1 activates apoptosis during testicular ischemia-reperfusion injury in a nuclear factor-kappaB-independent manner. *Eur J Pharmacol* 604(1-3): 27-35, 2009.

12. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in the cells isolated from rat skeletal muscle. *J Orthop Res* 26(3): 351-6, 2008.
13. Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Inhibition of calpain but not caspase protects the testis against injury after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod* 63(5): 1538-4, 2000.
14. Turner TT, Tung KS, Tomomasa H, Wilson LW. Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis in the rat. *Biol Reprod* 57(6): 1267-74, 1997.
15. DeNinno MP. Future directions in phosphodiesterase drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22(22): 6794-6800, 2012.
16. Dal Piaz V, Giovannoni MP. Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. *Eur J Med Chem* 35: 463-480, 2000.
17. Souza DG, Cassali GD, Poole S, Teixeira MM. Effects of inhibition of PDE4 and TNF- α on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology* 134(5): 985-994, 2001.
18. Kumar N, Goldminz AM, Kim N, Gottlieb AB. Phosphodiesterase 4-targeted treatments for autoimmune diseases. *BMC Med* 11: 96, doi: 10.1186/1741-7015-11-96, 2013.
19. Daniel PB, Walker WH, Habener JF. Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annual Reviews of Nutrition* 18: 353-83, 1998.
20. Kraft P, Schwarz T, Göb E, Heydenreich N, Brede M, Meuth SG, Kleinschnitz C. The phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram protects from ischemic stroke in mice by reducing blood-brain-barrier damage, inflammation and thrombosis. *Exp Neurol* 247: 80-90, 2013.
21. Nöske HD, Kraus SW, Altinkilic BM, Weidner W. Historical milestones regarding torsion of the scrotal organs. *J Urol* 159(1): 13-6, 1998.
22. Ringdahl E, Teague, L. Testicular torsion. *Am Fam Phys* 74(10): 1739-1743, 2006.
23. Özdemir K, Savaş Ç. Çocuklarda akut skrotal bulguların değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 7(4): 50-60, 2000.

24. DaJusta D, Granberg CF, Villanueva C, Baker LA. Contemporary review of testicular torsion: new concepts, emerging technologies and potential therapeutics. *Journal of pediatric urology* 9(6): 723-730, 2013.
25. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med* 25(1-2): 199-210, 2004.
26. Reyes JG, Farias JG, Henríquez-Olavarrieta S, Madrid E, Parraga M, Zepeda AB, Moreno RD. The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev* 2012: 929285, 15 pages, doi: 10.1155/2012/929285, 2012.
27. Rodriguez MG, Rival C, Theas MS, Lustig L. Immunohistopathology of the contralateral testis of rats undergoing experimental torsion of the spermatic cord, *Asian J Androl* 8(5): 576-583, 2006.
28. Turner TT. Acute experimental testicular torsion: no effect on the contralateral testis. *J Androl* 6(1): 65-72, 1985.
29. Cosentino MJ, Rabinowitz R, Valvo JR, Cockett AT. The effect of prepubertal spermatic cord torsion on subsequent fertility in rats. *J Androl* 5(2): 93-8, 1984.
30. Lievano G, Nguyen L, Radhakrishnan J, Fornell L, John E. New animal model to evaluate testicular blood flow during testicular torsion. *J Pediatr Surg* 34(6): 1004-6, 1999.
31. Mastrogiacomo I, Zanchetta R, Graziotti P, Betterle C, Scrufari P, Lembo A. Immunological and clinical study of patients after spermatic cord torsion. *Andrologia* 14(1): 25-30, 1982.
32. Tanyel FC, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A. Contralateral testicular blood flow during unilateral testicular torsion. *Br J Urol* 63(5): 522-4, 1989.
33. Nguyen L, Lievano G, Ghosh L, Radhakrishnan J, Fornell L, John E. Effect of unilateral testicular torsion on blood flow and histology of contralateral testes. *J Pediatr Surg* 34(5): 680-3, 1999.
34. Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, Baba F, Aksoy N, Celik N. Effect of melatonin on testicular ischemia/reperfusion injury in rats: is this effect related to the proinflammatory cytokines? *Fertil Steril* 89(5): 1468-1473, 2008.
35. Zhou XL, Yang QS, Ni SZ, Tu XP, Zhao Y, Xu B, Pan ZQ, Shen J. Protective effects of lipoxin A4 in testis injury following testicular torsion and detorsion in rats. *Mediators Inflamm* 2014: 898056, 9 pages, doi: 10.1155/2014/898056, 2014.

36. Lysiak JJ, Turner SD, Nguyen QAT, Singbartl K, Ley K, Turner TT. Essential role of neutrophils in germ cell-specific apoptosis following ischemia/reperfusion injury of the mouse testis. *Biol Reprod* 65: 718–725, 2001.
37. Theas MS, Rival C, Jarazo-Dietrich S, Jacobo P, Guazzone VA, Lustig L. Tumour necrosis factor-alpha released by testicular macrophages induces apoptosis of germ cells in autoimmune orchitis. *Hum Reprod* 23(8): 1865-72, 2008.
38. Witkamp R, Monshouwer EM. Signal transduction in inflammatory processes current and future therapeutic targets: a mini review. *Veterinary Quarterly* 22(1): 11-16, 2000.
39. 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* 2: 1-9, 2004.
40. Riccioli A, Starace D, D'Alessio A, Starace G, Padula F, De Cesaris P, Filippini A, Ziparo E. TNF-alpha and IFN-gamma regulate expression and function of the Fas system in the seminiferous epithelium *J Immunol* 165(2): 743-9, 2000.
41. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118(2): 503-8, 2000.
42. Lysiak JJ, Nguyen QA, 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. *Biol Reprod* 69(1): 202-10, 2003.
43. Read MA, Whitley MZ, Gupta S, Pierce JW, Best J, Davis RJ, Collins T. Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 272(5): 2753-61, 1997.
44. Minutoli L, Irrera N, Squadrito F, Marini H, Nicotina PA, Arena S, Romeo C, Antonuccio P, Altavilla D. Effects of ischaemic post-conditioning on the early and late testicular damage after experimental testis ischaemia-reperfusion *Andrology* 2(1): 76-82, 2014.
45. Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L, Ojala M, Pentikäinen MO, Parvinen M, Dunkel L. TNFalpha down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 86(9): 4480-8, 2001.

46. Koji T, Hishikawa Y, Ando H, Nakanishi Y, Kobayashi N. Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: involvement of the Fas system in the induction of germ cell apoptosis in the damaged mouse testis. *Biol Reprod* 64(3): 946-54, 2001.
47. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157(5): 1415-30, 2000.
48. Çayan S, Saylam B, Tiftik N, Ünal ND, Apa DD, Efesoy O, Çimen B, Bozlu M, Akbay E, Büyükaşar K. Rho-kinase levels in testicular ischemia-reperfusion injury and effects of its inhibitor, Y-27632, on oxidative stress, spermatogenesis, and apoptosis. *Urology* 83(3): 675.e13-8, 2014.
49. Hekimoglu A, Kurcer Z, Aral F, Baba F, Atessahin A, Sakin F. Effects of 3-aminobenzamide on unilateral testicular ischemia-reperfusion injury: what is the role of PARP inhibition? *Can J Physiol Pharmacol* 88(12): 1123-9, 2010.
50. Bozlu M, Coşkun B, Cayan S, Acar D, Aktaş S, Ulusoy E, Akbay E. Inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase decreases long-term histologic damage in testicular ischemia-reperfusion injury. *Urology* 63(4): 791-5, 2004.
51. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53(1): 135-59, 2001.
52. Antonuccio P, Minutoli L, Romeo C, Nicòtina PA, Bitto A, Arena S, Altavilla D, Zuccarello B, Polito F, Squadrito F. Lipid peroxidation activates mitogen-activated protein kinases in testicular ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 176(4 Pt 1): 1666-72, 2006.
53. Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod* 65(2): 514-21, 2001.
54. Zini A, Abitbol J, Girardi SK, Schulsinger D, Goldstein M, Schlegel PN. Germ cell apoptosis and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression following ischemia-reperfusion injury to testis. *Arch Androl* 41(1): 57-65, 1998.
55. Yapanoglu T, Aksoy Y, Gursan N, Ozbey I, Ziypak T, Calik M. Antiapoptotic effects of dehydroepiandrosterone on testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia* 40(1): 38-43, 2008.

56. Minutoli L, Antonuccio P, Squadrito F, Bitto A, Nicotina PA, Fazzari C, Polito F, Marini H, Bonvissuto G, Arena S, Morgia G, Romeo C, Caputi AP, Altavilla D. Effects of polydeoxyribonucleotide on the histological damage and the altered spermatogenesis induced by testicular ischaemia and reperfusion in rats. *Int J Androl* 35(2): 133-44, 2012.
57. Kabay S, Ozden H, Guven G, Burukoglu D, Ustuner MC, Topal F, Gunes HV, Ustuner D, Ozbayer C. Protective effects of the nuclear factor kappa B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate on experimental testicular torsion and detorsion injury. *Korean J Physiol Pharmacol* 18(4): 321-6, 2014.
58. Un H, Bayir Y, Halici Z, Akpınar E, Karakus E, Oral A, Ziypak T, Selli J. The effects of RAAS inhibition in rate limiting step by aliskiren on testicular torsion injury in rats. *J Urol* 194(3): 828-33, 2015.
59. Turkili B, Kurcer Z, Dengiz GO, Kandemir NO, Mungan G, Ozacmak VH, Banoglu ZN. Role of angiotensin and endothelin in testicular ischemia reperfusion injury. *Int J Urol* 19(3): 257-63, 2012.
60. Gokce G, Karboga H, Yildiz E, Ayan S, Gultekin Y. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on apoptotic changes in contralateral testis following unilateral testicular torsion. *Int Urol Nephrol* 40(4): 989-95, 2008.
61. Minutoli L, Bitto A, Squadrito F, Irrera N, Rinaldi M, Nicotina PA, Arena S, Magno C, Marini H, Spaccapelo L, Ottani A, Giuliani D, Romeo C, Guarini S, Antonuccio P, Altavilla D. Melanocortin 4 receptor activation protects against testicular ischemia-reperfusion injury by triggering the cholinergic antiinflammatory pathway. *Endocrinology* 152(10): 3852-61, 2011.
62. Shimizu S, Oikawa R, Tsounapi P, Inoue K, Shimizu T, Tanaka K, Martin DT, Honda M, Sejima T, Tomita S, Saito M. Blocking of the ATP sensitive potassium channel ameliorates the ischaemia-reperfusion injury in the rat testis. *Andrology* 2(3): 458-65, 2014.
63. Tsounapi P, Saito M, Dimitriadis F, Kitatani K, Kinoshita Y, Shomori K, Takenaka A, Satoh K. The role of K ATP channels on ischemia-reperfusion injury in the rat testis. *Life Sci* 90(17-18): 649-56, 2012.
64. Lee JW, Kim JI, Lee YA, Lee DH, Song CS, Cho YJ, Han JS. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 47(4): 736-42, 2012.

65. Zhang Y, Lv Y, Liu YJ, Yang C, Hu HJ, Meng XE, Li MX, Pan SY. Hyperbaric oxygen therapy in rats attenuates ischemia-reperfusion testicular injury through blockade of oxidative stress, suppression of inflammation and reduction of nitric oxide formation. *Urology* 82(2): 489.e9-489, 2013.
66. Erol B, Tokgoz H, Hanci V, Bektas S, Akduman B, Yencilek F, Mungan G, Mungan A. Vardenafil reduces testicular damage following ischemia/reperfusion injury in rats. *Kaohsiung J Med Sci* 25(7): 374-80, 2009.
67. Das A, Xi L, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. *J Biol Chem* 280(13): 12944-55, 2005.
68. Bhattacharjee R, Xiang W, Wang Y, Zhang X, Billiar TR. cAMP prevents TNF-induced apoptosis through inhibiting DISC complex formation in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 423(1): 85-90, 2012.
69. Koga K, Takaesu G, Yoshida R, Nakaya M, Kobayashi T, Kinjyo I, Yoshimura A. Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein. *Immunity* 30(3): 372-83, 2009.
70. Ji H, Shen XD, Zhang Y, Gao F, Huang CY, Chang WW, Lee C, Ke B, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Activation of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase signaling prevents liver ischemia/reperfusion injury in mice. *Liver Transpl* 18(6): 659-70, 2012.
71. Nishiki T, Kitada H, Okabe Y, Miura Y, Kurihara K, Kawanami S, Tanaka M. Effect of milrinone on ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Transplant Proc* 43(5): 1489-94, 2011.
72. Yamaguchi K, Kawahara T, Kumakura S, Hua J, Kugimiya T, Nagaoka I, Inada E. Effect of olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Shock* 33(4): 436-41, 2010.
73. Ozbal S, Ergur BU, Erbil G, Tekmen I, Bagrıyanık A, Cavdar Z. The effects of α -lipoic acid against testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *The Scientific World Journal* 2012: 489248, 8 pages, doi:10.1100/2012/489248, 2012.
74. Kanter M. Protective effects of Ginkgo biloba (EGb 761) on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol* 91(3): 708-13, 2011.

75. Hekimoglu A, Kurcer A, Aral F, Baba F, Sahna E, Atessahim A. Lycopene, an antioxidant carotenoid, attenuates testicular injury caused by ischemia/reperfusion in rats. *Tohoku J Exp Med* 218(2): 141-7, 2009.
76. Ozturk H, Ozturk H, Terzi EH, Bugdayci G, Duran A. Interleukin 10 reduces testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Urology* 83(2): 508.e1-6, 2014.
77. Gürocak S, Yilmaz A, Alp E, Üre I, Sözen S, Menevşe S, Menevşe A, Bozkirli I. Inflammation and oxidative stress in testicular torsion: do they deserve intensive treatment to save both guilty and innocent testes? *Urology* 78(1): 164-9, 2011.
78. Dogan C, Halici Z, Topcu A, Cadirci E, Karakus E, Bayir Y, Selli J. Effects of amlodipine on ischaemia/reperfusion injury in the rat testis. *Andrologia* 48(4): 441-52, 2016.
79. Meštrović J, Drmić-Hofman I, Pogorelić Z, Vilović K, Šupe-Domić D, Šešelja-Perišin A, Capkun V. Beneficial effect of nifedipine on testicular torsion-detorsion injury in rats. *Urology* 84(5): 1194-8, 2014.
80. Yıldız H, Durmus AS, Şimşek H, Yaman M. Dose-dependent protective effect of sildenafil citrate on testicular injury after torsion/detorsion in rats. *Andrologia* 44 Suppl 1: 300-6, 2012.
81. Beheshtian A, Salmasi AH, Payabvash S, Kiumehr S, Ghazinezami B, Rahimpour S, Tavangar SM, Dehpour AR. Protective effects of sildenafil administration on testicular torsion/detorsion damage in rats. *World J Urol* 26(2): 197-202, 2008.
82. Tu YP, Chuang SJ, Chen SC, Liu YH, Chen CF, Hour TC. Simvastatin induces the expression of hemeoxygenase-1 against ischemia-reperfusion injury on the testes in rats. *Toxicol Lett* 207(3): 242-50, 2011.
83. Kar A, Ozden E, Yakupoglu YK, Kefeli M, Sarikaya S, Yilmaz AF. Experimental unilateral spermatic cord torsion: the effect of polypolymerase enzyme inhibitor on histopathological and biochemical changes in the early and late periods in the ipsilateral and contralateral testicles. *Urology* 76(2): 507, 2010.
84. Tsounapi P, Saito M, Dimitriadis F, Shimizu S, Kinoshita Y, Shomori K, Satoh I, Satoh K. Protective effect of sivelestat, a neutrophil elastase inhibitor, on ipsilateral and contralateral testes after unilateral testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. *BJU Int* 107(2): 329-36, 2011.

85. Celebi M, Paul AG. Blocking E-selectin inhibits ischaemia-reperfusion-induced neutrophil recruitment to the murine testis. *Andrologia* 40(4): 235-9, 2008.
86. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Beneficial effect of taurine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Urology* 70(6): 1237-42, 2007.
87. Ozkisacik S, Erdem AO, Durmaz O, Culhaci N, GURSOY H, Yazici M. The long-term protective effects of short-interval postconditioning in testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 47(4): 743-6, 2012.
88. Shimizu S, Saito M, Kinoshita Y, Shomori K, Satoh I, Satoh K. Ischemic preconditioning and post-conditioning to decrease testicular torsion-detorsion injury. *J Urol* 182: 1637-43, 2009.
89. Kerr JF, Wylie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4): 239-257, 1972.
90. Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem* 2(1): 20-9, 2001.
91. Tomatır AG. Apoptoz: programlı hücre ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri* 23(6): 499-508, 2003.
92. Rastogi RP, Sinha RP. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal* 8: 155-181, 2009.
93. Wu H, Che X, Zheng Q, Wu A, Pan K, Shao A, Wu Q, Zhang J, Hong Y. Caspases: a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Int J Biol Sci* 10(9): 1072-83, 2014.
94. Tripathi R, Mishra DP, Shaha C. Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways *J Reprod Immunol* 83(1-2): 31-5, 2009.
95. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyol Dern Ars* 36(2): 120-130, 2008.
96. Pentikäinen V, Erkkilä K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol* 276(2 Pt 1): E310-6, 1999.
97. Royere D, Guérif F, Laurent-Cadoret V, Hochereau de Reviers MT. Apoptosis in testicular germ cells. *International Congress Series* 1266: 170-176, 2004.
98. Moreno RD, Lizama C, Urzua N, Vergara SP, Reyes JG. Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat. *Cell Tissue Res* 325(3): 533-540, 2006.

99. Lizama C, Alfaro I, Reyes JG, Moreno, RD. Up-regulation of CD95 (Apo-1/Fas) is associated with spermatocyte apoptosis during the first round of spermatogenesis in the rat. *Apoptosis* 12(3): 499–512, 2007.
100. Zheng S, Turner TT, Lysiak JJ. Caspase 2 activity contributes to the initial wave of germ cell apoptosis during the first round of spermatogenesis. *Biol Reprod* 74(6): 1026–1033, 2006.
101. Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109(3): 366-98, 2006.
102. Ghosh R, Sawant O, Ganpathy P, Pitre S, Kadam VJ. Phosphodiesterase inhibitors: their role and implications. *Int J PharmTech Res* 1(4): 1148-1160, 2009.
103. Levallet G, Levallet J, Bouraïma-Lelong H, Bonnamy PJ. Expression of the cAMP-phosphodiesterase PDE4D isoforms and age-related changes in follicle-stimulating hormone-stimulated PDE4 activities in immature rat sertoli cells. *Biol Reprod* 76(5): 794-803, 2007.
104. Farooqui SM, Al-Bagdadi F, Houslay MD, Bolger GB, Stout R, Specian RD, Cherry JA, Conti M, O'Donnell JM. Surgically induced cryptorchidism-related degenerative changes in spermatogonia are associated with loss of cyclic adenosine monophosphate-dependent phosphodiesterases type 4 in abdominal testes of rats. *Biol Reprod* 64(6): 1583-9, 2001.
105. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58(3): 488-520, 2006.
106. Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S252-7, 2006.
107. Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 232(2): 1077-91, 1958.
108. Fajardo AM, Piazza GA, Tinsley HN. The role of cyclic nucleotide signaling pathways in cancer: targets for prevention and treatment. *Cancers (Basel)* 6(1): 436-58, 2014.
109. Francis SH, Blount MA, Corbin JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* 91(2): 651-90, 2011.

110. Teerlink JR. A novel approach to improve cardiac performance: cardiac myosin activators. *Heart Fail Rev* 14(4): 289-98, 2009.
111. Liu Y, Fong M, Cone J, Wang S, Yoshitake M, Kambayashi J. Inhibition of adenosine uptake and augmentation of ischemia-induced increase of interstitial adenosine by cilostazol, an agent to treat intermittent claudication. *J Cardiovasc Pharmacol* 36(3): 351-60, 2000.
112. Antoniu SA. New therapeutic options in the management of COPD - focus on roflumilast. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 6: 147-55, 2011.
113. Fala L. Otezla (Apremilast), an oral PDE-4 inhibitor, receives FDA approval for the treatment of patients with active psoriatic arthritis and plaque psoriasis. *Am Health Drug Benefits* 8(Spec Feature): 105-10, 2015.
114. Elhwuegi AS. The wonders of phosphodiesterase-5 inhibitors: a majestic history. *Ann Med Health Sci Res* 6(3): 139-45, 2016.
115. Cai Y, Li JD, Yan C. Vinpocetine attenuates lipid accumulation and atherosclerosis formation. *Biochem Biophys Res Commun* 434(3): 439-43, 2013.
116. Gomez L, Breitenbucher JG. PDE2 inhibition: potential for the treatment of cognitive disorders. *Bioorg Med Chem Lett* 23(24): 6522-7, 2013.
117. Bernard JJ, Lou YR, Peng QY, Li T, Lu YP. PDE2 is a novel target for attenuating tumor formation in a mouse model of UVB-induced skin carcinogenesis. 9(10): e109862, 2014.
118. Mestre L, Redondo M, Carrillo-Salinas FJ, Morales-García JA, Alonso-Gil S, Pérez-Castillo A, Gil C, Martínez A, Guaza C. Phosphodiesterase 7 inhibitor TC3.6 ameliorates symptomatology in a model of primary progressive multiple sclerosis. *Br J Pharmacol* 172(17): 4277-90, 2015.
119. Shao YX, Huang M, Cui W, Feng LJ, Wu Y, Cai Y, Li Z, Zhu X, Liu P, Wan Y, Ke H, Luo HB. Discovery of a phosphodiesterase 9A inhibitor as a potential hypoglycemic agent. *J Med Chem* 57(24): 10304-13, 2014.
120. Van der Staay FJ, Rutten K, Bärfacker L, Devry J, Erb C, Heckroth H, Karthaus D, Tersteegen A, van Kampen M, Blokland A, Prickaerts J, Reymann KG, Schröder UH, Hendrix M. The novel selective PDE9 inhibitor BAY 73-6691 improves learning and memory in rodents. *Neuropharmacology* 55(5): 908-18, 2008.

121. Suzuki K, Harada A, Shiraishi E, Kimura H. In vivo pharmacological characterization of TAK-063, a potent and selective phosphodiesterase 10A inhibitor with antipsychotic-like activity in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 352(3): 471-9, 2015.
122. Page CP, Spina D. Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 12(3): 275-86, 2012.
123. Khan AS, Chaudhry S, Qureshi AI. Antithrombotic utilization trends after noncardioembolic ischemic stroke or TIA in the setting of large antithrombotic trials (2002-2009). *J Vasc Interv Neurol* 8(1): 20-6, 2015.
124. Raker VK, Becker C, Steinbrink K. The cAMP pathway as therapeutic target in autoimmune and inflammatory diseases. *Front Immunol* 7: 123 doi: 10.3389/fimmu.2016.00123, 2016.
125. Lee D. Global and local missions of cAMP signaling in neural plasticity, learning, and memory. *Front Pharmacol* 6: 161, doi: 10.3389/fphar.2015.00161, 2015.
126. Wachtel H. Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3,5-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. *Neuropharmacology* 22(3): 267-272, 1983.
127. Jabaris SG, Sumathy H, Kumar RS, Narayanan S, Thanikachalam S, Babu CS. Effects of rolipram and roflumilast, phosphodiesterase-4 inhibitors, on hypertension-induced defects in memory function in rats. *Eur J Pharmacol* 746: 138-47, 2015.
128. Bruno O, Brullo C, Arduino N, Schenone S, Ranise A, Bondavalli F, Ottonello L, Dapino P, Dallegri F. Synthesis and biological evaluation of neutrophilic inflammation inhibitors. *IL FARMACO* 59(3): 223-235, 2004.
129. Atkins CM, Oliva AA Jr, Alonso OF, Pearse DD, Bramlett HM, Dietrich WD. Modulation of the cAMP signaling pathway after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 208(1): 145-58, 2007.
130. Oba Y, Lone NA. Efficacy and safety of roflumilast in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Thorax* 7(1): 13-24, 2013.
131. Matera MG, Rogliani P, Calzetta L, Cazzola M. Phosphodiesterase inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease: what does the future hold? *Drugs* 74(17): 1983-92, 2014.

132. Christensen SB, Guider A, Forster CJ, Gleason JG, Bender PE, Karpinski JM, DeWolf WE Jr, Barnette MS, Underwood DC, Griswold DE, Cieslinski LB, Burman M, Bochnowicz S, Osborn RR, Manning CD, Grous M, Hillegas LM, Bartus JO, Ryan MD, Eggleston DS, Haltiwanger RC, Torphy TJ. 1,4-Cyclohexanecarboxylates: potent and selective inhibitors of phosphodiesterase 4 for the treatment of asthma. *J Med Chem* 41(6): 821-35, 1998.
133. Schwabe U, Miyake M, Ohga Y, Daly JW. 4-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidone (ZK 62711): a potent inhibitor of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterases in homogenates and tissue slices from rat brain. *Mol Pharmacol* 12(6): 900-10, 1976.
134. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/rolipram#section=Top>. Erişim tarihi: 07.12.2017.
135. Krause W, Kuhne G. Pharmacokinetics of rolipram in the rhesus and cynomolgus monkeys, the rat and the rabbit. Studies on species differences. *Xenobiotica* 18(5): 561-71, 1988.
136. Bielekova B, Richert N, Howard T, Packer AN, Blevins G, Ohayon J, McFarland HF, Stürzebecher CS, Martin R. Treatment with the phosphodiesterase type-4 inhibitor rolipram fails to inhibit blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 15(10): 1206-14, 2009.
137. Li YF, Huang Y, Amsdell SL, Xiao L, O'Donnell JM, Zhang HT. Antidepressant-and anxiolytic-like effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram on behavior depend on cyclic AMP response element binding protein-mediated neurogenesis in the hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 34(11): 2404-19, 2009.
138. Kaner SJ, Tokarczyk J, Siegel SJ, Bilker W, Abel T, Kelly MP. Rolipram: a specific phosphodiesterase 4 inhibitor with potential antipsychotic activity. *Neuroscience* 144(1): 239-46, 2007.
139. Imanishi T, Sawa A, Ichimaru Y, Miyashiro M, Kato S, Yamamoto T, Ueki S. Ameliorating effects of rolipram on experimentally induced impairments of learning and memory in rodents. *Eur J Pharmacol* 321(3): 273-8, 1997.
140. Gong B, Vitolo OV, Trinchese F, Liu S, Shelanski M, Arancio O. Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. *J Clin Invest* 114(11): 1624-34, 2004.

141. Zhu J, Mix E, Winblad B. The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system. *CNS Drug Rev* 7(4): 387-98, 2001.
142. Sánchez AJ, Puerta C, Ballester S, González P, Arriaga A. Rolipram impairs NF- κ B activity and MMP-9 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 168(1-2): 13–20, 2005.
143. Nejman-Gryz P, Grubek-Jaworska H, Glapiński J, Hoser G, Chazan R. Effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram on lung resistance and inflammatory reaction in experimental asthma. *J Physiol Pharmacol* 57(4): 229-39, 2006.
144. Liang L, Beshay E, Prud'homme GJ. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes* 47(4): 570-5, 1998.
145. Hartmann G, Bidlingmaier C, Siegmund B, Albrich S, Schulze J, Tschöep K, Eigler A, Lehr HA, Endres S. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 292(1): 22-30, 2000.
146. Kyoji T, Kitazawa S, Tajima K, Zhang X, Ukai Y. Phosphodiesterase type IV inhibitors prevent ischemia-reperfusion-induced gastric injury in rats. *J Pharmacol Sci* 95(3): 321-8, 2004.
147. Yokoi K, Uthus EO, Nielsen FH. Nickel deficiency diminishes sperm quantity and movement in rats. *Biol Trace Elem Res* 93(1-3): 141-54, 2003.
148. Johnsen SG. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1(1): 2-25, 1970.
149. Dunne PJ, O'Loughlin BS. Testicular torsion: time is the enemy. *Aust N Z J Surg* 70(6): 441-2, 2000.
150. Fuse H, Tsuritani S, Iwasaki M, Katayama T. Experimental testicular ischaemia: time course of the effect on rat spermatogenesis. *Int Urol Nephrol* 25(5): 491-8, 1993.
151. York JP, Drago JR. Torsion and the contralateral testicle. *J Urol* 133(2): 294–7, 1985.

152. Görür S, Celik S, Hakverdi S, Aslantaş O, Erdoğan S, Aydın M, Ocak S, Namik Kiper A. Preventive effect of rolipram, a phosphodiesterase 4 enzyme inhibitor, on oxidative renal injury in acute ascending pyelonephritis model in rats. *Urology* 72(4): 743-8, 2008.
153. Ramezani S, Vousooghi N, Kapourchali FR, Hadjighasem M, Hayat P, Amini N, Joghataei MT. Rolipram potentiates bevacizumab-induced cell death in human glioblastoma stem-like cells. *Life Sci* 173: 11-19, 2017.
154. Fisch JD, Behr B, Conti M. Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors. *Hum Reprod* 13(5): 1248-54, 1998.
155. Baxendale RW, Fraser LR. Mammalian sperm phosphodiesterases and their involvement in receptor-mediated cell signaling important for capacitation. *Mol Reprod Dev* 71(4): 495-508, 2005.
156. Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16(9): 2262-70, 1997.
157. Turner TT, Brown KJ. Spermatid cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biol Reprod* 49(2): 401-407, 1993.
158. Cayli S, Ocakli S, Senel U, Eyerci N, Delibasi T. Role of p97/Valosin-containing protein (VCP) and Jab1/CSN5 in testicular ischaemia-reperfusion injury. *J Mol Histol* 47(1): 91-100, 2016.
159. Lysiak JJ, Zheng S, Woodson R, Turner TT. Caspase-9-dependent pathway to murine germ cell apoptosis: mediation by oxidative stress, BAX, and caspase 2. *Cell Tissue Res* 328(2): 411-9, 2007.
160. Aydos TR, Başar MM, Kul O, Atmaca HT, Uzunalıoğlu T, Kisa Ü, Efe OE. Effects of ozone therapy and taurine on ischemia/reperfusion-induced testicular injury in a rat testicular torsion model. *Turk J Med Sci* 44(5): 749-55, 2014.
161. Gültekin Uyanık A. Deneysel testis torsiyonunda, detorsiyon sonrası tunika albuginea insizyonunun testis dokusu üzerine etkisi. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Manisa, 2014.
162. Lee W, Son Y, Jang H, Bae MJ, Kim J, Kang D, Kim JS. Protective effect of administered rolipram against radiation-induced testicular injury in mice. *World J Mens Health* 33(1): 20-9, 2015.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 08.01.2014
TOPLANTI NO : 2014/01

- 1- B.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2013-33-04/12 protokol no'lu "Fosfodiesteraz 4 Enzim İnhibitörü Rolipramın Sıçanlarda Testiküler İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkileri" konulu çalışmanın Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Rafet KOCA
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

9. ÖZGEÇMİŞ

Ezgi AKDENİZ, 1987 yılında Zonguldak'ta doğdu. İlk ve ortaokulu Gazi İlköğretim Okulu'nda, lise eğitimini Zonguldak Atatürk Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini 2005-2010 yılları arasında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde tamamladı. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında 2010 yılında doktora eğitimine başladı. Aynı yıl Zonguldak Atatürk Devlet Hastanesi'nde hastane eczacısı olarak başladığı meslek hayatına, 2016 yılından itibaren Sağlık Bilimleri Üniversitesi Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde devam etmektedir.

