

T.C.  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİMDALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI DENEYSEL TESTİS İSKEMİLERİNİN  
APOPTOZİS İLE HİSTOLOJİK İLİŞKİSİ

Arş. Gör. TURGAY BARUT

Danışman: Doç. Dr. M. İBRAHİM TUĞLU

Manisa, 2008

T.C.  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİMDALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI DENEYSEL TESTİS İSKEMİLERİNİN  
APOPTOZİS İLE HİSTOLOJİK İLİŞKİSİ

Arş. Gör. TURGAY BARUT

Danışman: Doç. Dr. M. İBRAHİM TUĞLU

Manisa, 2008

## TUTANAK

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Turgay Barut'un yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "Farklı Deneysel Tetis İskemilerinin Apoptosis ile Histolojik İlişkisi" başlıklı çalışma, jürimizce lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

30/07/2008

Ünvanı/ Adı Soyadı

İmza

Tez Danışmanı: Doç. Dr. M. İbrahim TUĞLU

.....

ÜYE:

Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN

.....

ÜYE:

Prof. Dr. Tuncay VAROL

.....

## TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tezi hazırlamamda destek olan "Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu"na teşekkür ederim.

Çalışmanın diğer bir anlamında yardımlaşmak olduğunu öğrendiğim, asistanlık eğitimim süresince desteğini hep yanımda hissettiğim ve bilimsel çalışmada sınırların olmaması gerektiğini anlamama yardımcı olan danışman hocam Doç. Dr. M. İbrahim TUĞLU'ya,

Deneyim ve önerilerini esirgemeyen Anabilimdalı Başkanımız Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN, Doç. Dr. V. Sevinç İNAN'a,

Tezimin deneysel aşamasında ve asistanlık eğitimim süresince bilgilerini paylaştan Anatomi Anabilimdalı Başkanı Prof. Dr. Tuncay VAROL'a ve Doç. Dr. Enis Cezayirli'ye

Histoloji ve Embriyoloji'ye ilgi duymamda etkili olan Prof. Dr. Meral BAKA'ya ve Doç. Dr. Kenan ÇINAR'a,

Birlikte çalıştığımız Histoloji-Embriyoloji ve diğer anabilimdalları asistan arkadaşlarıma,  
Her defasında o'dan başlamama rağmen 9 yıllık üniversite hayatım boyunca bana sabır gösteren ve güvenen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

*Bir damla deniz suyu daha ...*

## FARKLI DENEYSEL TESTİS İSKEMİLERİNİN APOPTOZİS İLE HİSTOLOJİK İLİŞKİSİ

Ligasyon ile arteriyal dolaşımın bozulmasına bağlı iskemi torsiyon ile buna venöz dolaşımın da eklenmesi 2 farklı mekanizma olarak birçok farklı klinik durumun deneysel olarak araştırılmasını sağlar. Bu çalışmada 6 saatlik iskleme sonrasında reperfüzyona bağlı hasarın zaman bağımlı histolojik incelemesi yapılarak oluşan oksidatif stres ve gelişen apoptozis ilişkisi araştırıldı.

Erişkin sıçanlarda 6 saatlik torsiyon veya ligasyon iskemisini takiben 1, 3, 7 ve 28 günlük reperfüzyon uygulandı. İskemik reperfüzyon sonrası testis dokusu histolojik, immunohistokimyasal ve morfometrik olarak incelendi. Doku örnekleri Hematoksilen Eozin ve NOS antikoları ve TUNEL immunohistokimyası teknikleri ile boyandı. Sıçanların sağ testislerine iskemi uygulaması yapıp ipsilateral grubu oluştururken sol testisleri kontralateral grubu olmak üzere değerlendirildi. Testisten alınan doku örneklerinde hasarın derecelendirilmesi, hücre ölümü, oksidatif stres ve apoptotizis körleme yöntemle germ hücrelerinin mikroskop altında histolojik ve morfometrik bakıları yapıldı.

İskemik gruba ait testislerin seminifer tübüllerindeki spermatogonium, primer spermatosit ve spermatidlerdeki bozulma, germ hücre sayısında vakuolizasyon ve sayısal azalmanın torsiyon grubu ile karşılaştırıldığında ligasyon grubunda çok daha az olduğu görüldü. Bununla uyumlu bir şekilde NOS artımının varlığı ve apoptosizle ilişkili olduğu saptandı. Apoptozis bütün hücre tiplerinde gözlemlendi. Kontralateral testislerde çok daha az olmak üzere benzer bulgulara rastlanıldı.

Bu bulgular iskemik reperfüzyona bağlı hasar oluşmasında torsiyonun venöz dönüşü de bozması nedeniyle daha etkin olduğunu ve iskemi dışında gelişen diğer faktörlerin torsiyon grubunda oluşan oksidatif stres ve apoptozisi artırdığı düşünüldü.

Anahtar kelimeler: testis, germ hücresi, torsiyon, ligasyon, iskemi, oksidatif stres, NOS, apoptozis

## **THE HISTOLOGIC RELATION OF DIFFERENT EXPERIMENTAL TESTIS ISCHEMIA WITH APOPTOSIS**

Arterial circulation's disturbance associative with ligation and torsion is depend on as two different mechanism is a lot of clinic different circumstances as experimental investigation. This study has got after depend on the time of reperfusion histological analysis and comparison oxidative stres and grow up apoptosis.

At the adult Wistar rat wich is following 6 hours torsion and ligation ischemia applied 1,3,7 and 28 days reperfusion. After the ischemic reperfusion testis tissue as histological, immunochemical and morphplogical analysed. Tissue samples is stained Hematoxilen eosin, NOS antibodies (iNOS, eNOS) and TUNEL immunochemical stain. ischemia, applied rats's right testis, set off to ipsilateral testis and left testis used to contralateral testis. Taked from the testis tissue samples, injury gradation, cell death, oxicative stres and apoptosis of the germ cell analysed as with blind technics at the microscope.

Testis, ischemia group, compared with ligation and torsion group for spermatogonium, primer spermatocyt and degeneration of the spermatids and torsion group had more injury so far as the ligation groups. Concordant of this increase of the NOS exist and associative with apoptosis determined. Apoptosis is detected all of the cell types. Contralateral testis was similar but has less injury than ipsilateral testis.

This indications depend on ischemic reperfusion injury, torsion is more effective, depend on return of the venous disruption, and other factors wich without ischemia gived rise the thought consisted at the torsion group oxidative stres and apoptosis.

Key words: testis, germ cell, torsion, ligation, ischemia, oxidative stres, NOS, apoptosis

## ÖNSÖZ

İnfertilite, sosyal ve psikolojik bir sorun olarak toplumsal yaşamı etkileyen ancak gelişen teknoloji ile tedavide büyük umutların elde edildiği bir durumdur. Bu sorunun aşılmasında önemli bir faktör, fertilizasyon için yardım isteyen çiftlerin yaklaşık üçte birini kapsayan erkekteki sperm performansının yetersizliğidir. Bu konuda torsiyona veya ligasyona bağlı olarak gelişen iskemi sırasında oluşan hücre ölümleri hem akut hem de kronik anlamda sperm sayısı, etkinliği ve kalitesi üzerinde etkilidir. Bu projenin amacı oluşturulacak olan testis iskemilerinde oluşan strese bağlı germ hücrelerinin apoptozisinin deneysel olarak araştırılması ve farklılıkların karşılaştırılmasıdır. Erkek fertilitesi spermatogenez ile başlar, taşınma, yardımcı organlarla depolanma ve uygun şekilde aktarıma ile tamamlanır. Bu aşamada spermin sayısal yetersizliği mikroinjeksiyon ve intrastoplazmik sperm injeksiyonu ile çözülebilmektedir. Ancak testisin yetersiz fonksiyonun düzeltilmesi, spermi etkileyen faktörlerin araştırılması ve geliştirilmesine bağlı olarak mümkün olabilmektedir. Bizim çalışmamızın amacı arter ligasyonu ve torsiyon sonrasında oluşturulan iskeminin ardından farklı zaman dilimlerinde yapılan reperfüzyonun ortaya çıkardığı stresin Nitrik Oksit Sintetaz (NOS) ile belirlenmesi ve germ hücrelerinin ölmesi ile ilişkisi TUNEL (Terminal deoksinukleotidil transferaz [Tdt]-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) immunohistokimya yöntemiyle belirlenmesi ve farklılıkların karşılaştırılmasıdır. Projemizin gerçekleşmesinde desteği olan Rektörlük makamına ve Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü'ne, özellikle Araştırma Fon Saymanlığı görevlilerine teşekkür ederiz.

Doç. Dr. M. İbrahim TUĞLU

Arş. Gör. Turgay BARUT

## RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1 Testisin embriyolojisi.	25
Resim 1.2 Testisin anatomisi.	26
Resim 1.3 Testisin anatomisi.	27
Resim 1.4 Testisin histolojisi	28
Resim 1.5 Testisin histolojisi	29
Resim 1.6 Spermatogenezis	30
Resim 1.7 Spermatogenezis	31
Resim 1.8 Testisin fizyolojisi	32
Resim 1.9 Testisin fizyolojisi	33
Resim 1.10 Ligasyon iskemisi	34
Resim 1.11 Torsiyon iskemisi	35
Resim 1.12 Apoptozis	36
Resim 1.13 Apoptozis –Nekrozis karşılaştırma	37
Resim 1.14 Apoptozis-Mitokondrial yolak	38
Resim 1.15 Apoptozis-Sitokrom c	39
Resim 3.1 Makroskobik testis Sham-Kontrol grupları	52
Resim 3.2 Makroskobik ligasyon ve torsiyon grupları karşılaştırma	53
Resim 3.2 Makroskobik ligasyon ve torsiyon kontralateral grupları karşılaştırma	54
Resim 3.4 HE Sham-Kontrol grupları	55
Resim 3.5 HE testislerin ligasyon grupları	56
Resim 3.6 HE testislerin torsiyon grupları	57
Resim 3.7 HE ligasyon ve torsiyon grupları karşılaştırma	58
Resim 3.8 HE kontralateral testis ligasyon ve torsiyon grupları karşılaştırma	60
Resim 3.9 IHK Sham-Kontrol grupları iNOS-eNOS karşılaştırma	61
Resim 3.10 IHK testis ligasyon ve torsiyon grupları eNOS karşılaştırma	62
Resim 3.11 IHK testis ligasyon ve torsiyon grupları iNOS karşılaştırma	63
Resim 3.12 IHK kontralateral testis ligasyon ve torsiyon grupları iNOS karşılaştırma	64
Resim 3.13 TUNEL Sham-Kontrol grupları	67
Resim 3.14 TUNEL ligasyon ve torsiyon grupları karşılaştırma	68
Resim 3.15 TUNEL kontralateral testis ligasyon ve torsiyon grupları	69



## **TABLULAR DİZİNİ**

Tablo 3.1 HE Hasarın histomorfometrisi	59
Tablo 3.2 HE Kontralateral testis karşılaştırması	59
Tablo 3.3 IHK eNOS karşılaştırması	65
Tablo 3.4 IHK iNOS karşılaştırması	65
Tablo 3.5 IHK iNOS kontralateral testis karşılaştırması	66
Tablo 3.6 TUNEL karşılaştırması	70
Tablo 3.7 TUNEL kontralateral karşılaştırması	70

## SİMGELER VE KISALTIMLAR DİZİNİ

LH	: Luteinize hormon
FSH	: Folikül stimulan hormon
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentetaz
nNOS (NOS- 1)	: Nöronal Nitrik Oksit
iNOS (NOS- 2)	: İndüklenebilir Nitrik Oksit
eNOS (NOS- 3)	: Endotelial Nitrik Oksit
cNOS	: Yapısal Nitrik Oksit
EDRF	: Endotel Kökenli Gevşeme Faktörü
ICSH	: İntersitisyel hücre uyarım hormonu
ABP	: Androjen bağlayıcı protein
ATP	: Adenozin Trifosfat
DNA	: Deoksiribonukleik asit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
OH	: Hidroksil
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNFR	: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör
AIF	: Apoptozis indükleyici faktör
PARP	:Poli ADP-ribose polimeraz- 1
EndoG	: Endonukleaz G
PTP	: Permeabilite geçirgenlik poru
IFN	: İnterferon
CARD	: Kaspaz-gerektiren domain
DD	: Ölüm domaini
DED	: Ölüm efektör domaini
DISC	: Ölümü tetikleyen sinyal kompleksi
AO	: Akridin-orange
EB	: Edityum-bromid
TUNEL	: Terminal deoksinukleotidil transferaz [Tdt]-mediated dUTP-biotin nick-end labeling
HE	: Hematoksilen eozin
IHK	: İmmunohistokimya
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
HCG	: Human coryonik gonadotropin
NAD	: Nikotinamid adenin dinukleotit
FAD	: Flavın adenin dinukleotit

## İÇİNDEKİLER

### 1. GİRİŞ

- 1.1 Testis anatomisi
- 1.2 Testis embriyolojisi
- 1.3 Testis histolojisi
- 1.4 Testis fizyolojisi
- 1.5 Ligasyon iskemisi
- 1.6 Torsiyon iskemisi
- 1.7 Kontralateral testis iskemisi
- 1.8 İskemi ve reperfüzyon
- 1.9 Oksidatif stres
- 1.10 Apoptozis
- 1.11 Testiste apoptozisin rolü

### 2. GEREÇ VE YÖNTEM

- 2.1. İskeminin oluşturulması ve reperfüzyon
- 2.2. Histokimya
- 2.3. NOS immunohistokimyası
- 2.4. TUNEL immunohistokimyası

### 3. BULGULAR

### 4. TARTIŞMA

### 5. SONUÇ, YORUM VE ÖNERİLER

### 6. KAYNAKLAR

## 1. GİRİŞ

Testis iskemisi erkek infertilitesinde önemli rol oynamakta ve klinikte çözülmesi gereken sorunlar içinde yer almaktadır. Tek taraflı testis torsiyonu yaygın bir cerrahi problem olup, irreversible değişiklikler yaparak karşı testisi de içine alan hasar oluşturur (Romeo ve ark. 2003 ve Allan ve ark. 1987). Oluşan hasar iskeminin direk etkisinin yanı sıra reperfüzyonla gelen oksidatif stres gibi sekonder etkilere bağlıdır. Bu nedenle testiküler torsiyon vakalarında tedavideki etkinliğin sağlanabilmesi için hem patolojik mekanizmaların anlaşılması hem de bunu yönlendiren moleküler araştırmaların yapılması iskemik hasarın testis dokusunda görülmesinin başlamasından sonraki aşamada neler yapabileceğimiz ile ilgili bilgiyi bize verecektir (Nguyen ve ark. 1999, Akgur ve ark. 1993Turner ve ark. 1997 ve Andiran ve ark. 2000). Bu çalışmada iskemik reperfüzyon hasarı ile oluşan oksidatif stres ve intihar yolu ile gerçekleşen hücre ölümü yani apoptosis incelenerek, torsiyon ile ligasyon arasında görülen mekanizma farklılığının literatüre kazandırılması amaçlanmaktadır.

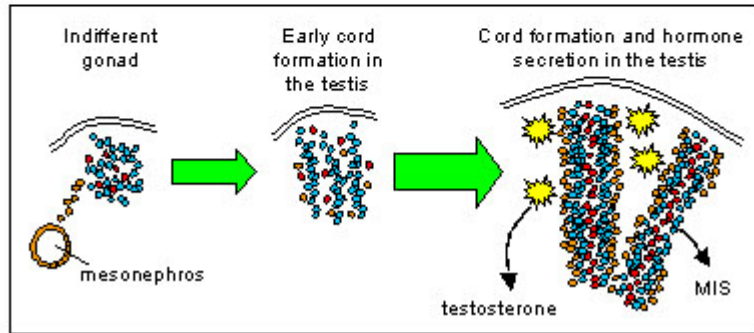
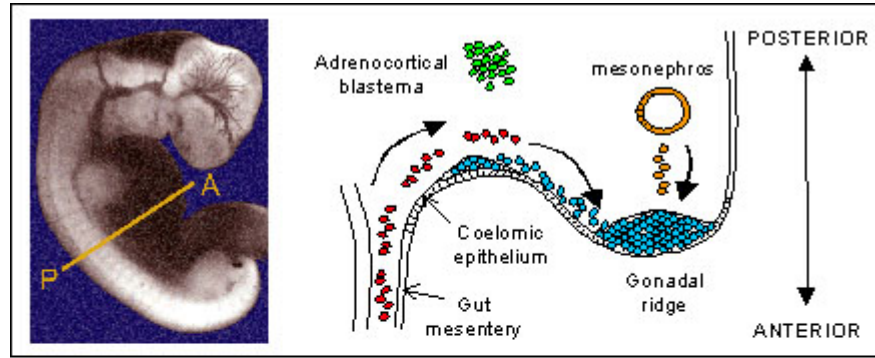
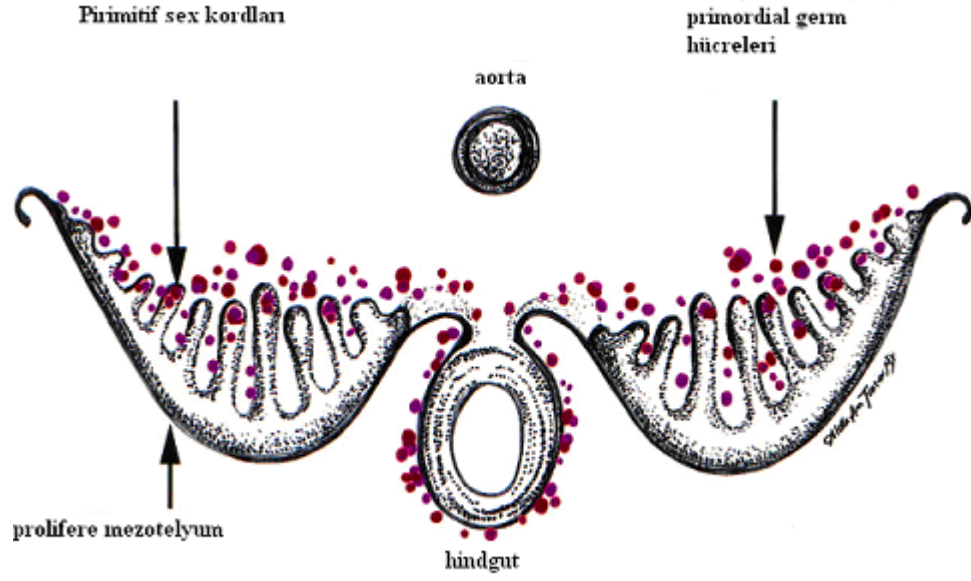
Aynı cinsiyetlerden oluşan çiftlerde, çocuk istenmesine ve normal kopulasyona karşın, bir yıl içinde gebeliğin gerçekleşmemesine "infertilite" denmektedir. Genelde evliliklerin % 10'u çocuksuzdur. Bu oranın da % 40'ından erkek sorumlu tutulmaktadır. Diğer pek çok ülkede olduğu gibi ülkemizde de erkek infertilitesi, kolay kabullenilememekte ve önemli sosyal sorunlara neden olabilmektedir. Tıptaki olağanüstü gelişmelere karşın, erkek infertilitesinin giderilmesi konusundaki uğraşlar başarısız kalmaktadır. Ancak bazı etiyojilerde erken yapılacak girişimlerle erkek infertilitesinin gelişmesini önleyebilmek olasıdır. Unilateral testis iskemileri bu konuda örnek gösterilebilir. Torsiyon-detorsiyon kuşkusu bulunan kişilerin uzun süreli izlenmelerinde; detorsiyon yapılanların da %70'in üstünde testis atrofisi geliştiği, seminal analiz sonuçlarının %85- 90 oranında anormal olduğu anlaşılmıştır. Daha ayrıntılı incelemelerde, testislerin iki taraflı işlev bozukluğu gösterdiği saptanmıştır (Lin EP ve ark. 2007). Sorun, kendi içinde çelişki getirdiği için önemlidir.

Kontralateral testislerin hasarı konusunda pek çok çalışma yapılmış en yaygın kabul gören mekanizma otoimmün bir reaksiyon olarak açıklanmıştır. İskemik testiste dejenere olan sperm hücreleri ve/veya tübüler bazal membranı antijen gibi davranmakta, bunlara karşı oluşan otoantikorlar diğer testisin hasarlanmasına neden olmaktadır (Ringdahl E ve ark. 2006).

Sonuç olarak hem ipsilateral hem de kontralateral testisler iskemik reperfüzyona bağlı oksidatif hasara uğramakta ve germ hücreleri apoptozis yoluyla ölmektedir. Bu olayları yönlendiren mekanizmaların anlaşılması için testisin anatomik, histolojik ve fonksiyonel yapısı hakkında detaylı bilgiye ihtiyaç vardır.

### **1.1. Testis Embriyolojisi:**

Testis embriyolojisi sırasında embriyonda, her iki cinsten, genital organ taslakları başlangıçta aynıdır. Gonadlar, mezenteriyumun kökü ile mezonefroz arasında dorsal çölm epitelinden yani mezodermden gelişir. Bu bölgeden kalınlaşan çölm epiteli, "epithelium germinale", altındaki mezenşim ile birlikte bir blastem oluşturur. Bu, henüz dişilik ya da erkeklik yönünde farklılaşmamış devirdeki gonad taslağıdır. Gonad taslağında, "epithelium germinale" den derine, mezenşim içine doğru üreyen hücre kordonları, birbirleriyle anastomozlaşarak mezonefroza dayanır ve onunla bağlantı yapar. Primer döl kordonlarında iki çeşit hücre vardır. Bunlar, çoğunluğu oluşturan küçük, kübik ya da prizmatik epitel hücreler ile bunların arasına serpilmiş büyük, yuvarlak primordial cins hücrelerdir. Erkekliğe farklılaşmada, yedinci haftadan itibaren testis oluşmaya başlar. Döl kordonları, ileride tunika albuginea'yı yapacak olan bir mezenşim kitlesi ile "epithelium germinale" den ayrılır. Bunları oluşturan iki çeşit hücreden primordial cins hücreler, "spermatogonyum"ları, küçük kübik hücreler ise "Sertoli hücreleri"ni yapar. Mezonefrozun yakınında, 3- 5 lumbal vertebralar hizasında bulunan testis taslakları, sonra normal anatomik yerlerini almak üzere yer değiştirilirler. İntrauterin 4. ayda inguinal kanal içine sokulurlar ve doğumdan kısa bir süre önce skrotuma inerler (Resim 1. 1).



**Resim 1. 1** Testisin embriyolojisi

## 1.2. Testis anatomisi

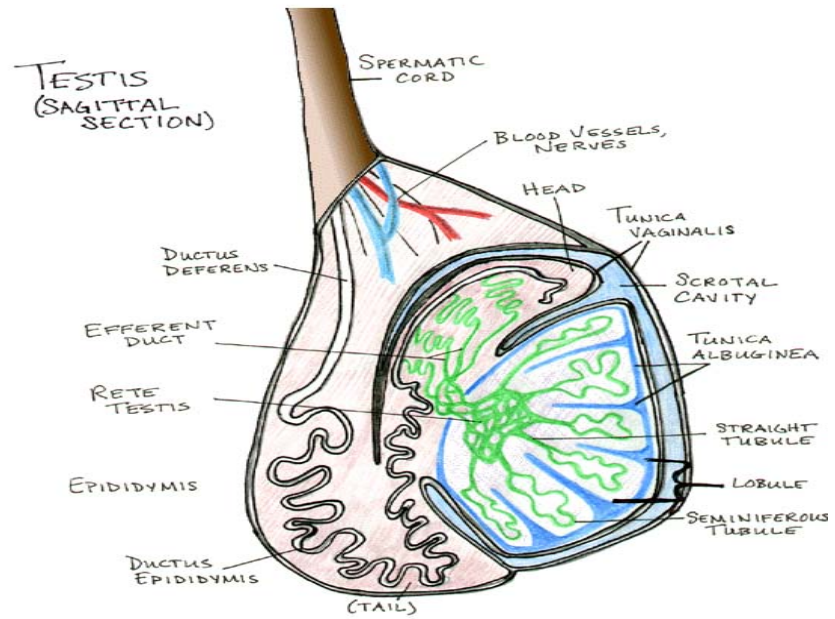
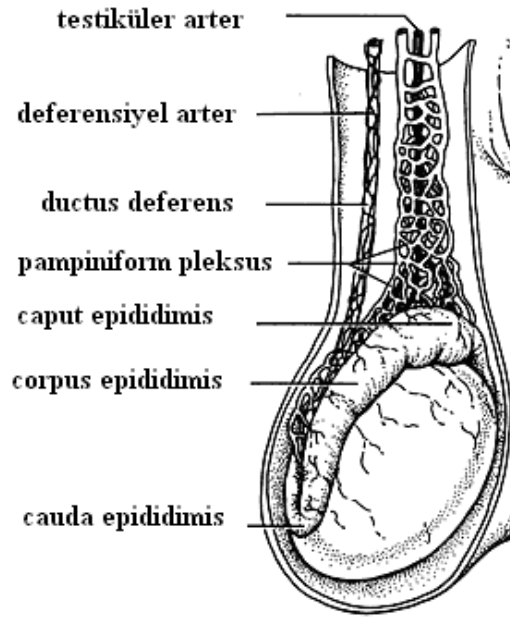
Funikulus spermatikusa asılı durumda bulunan testisler; sağı sollu bir çift olup skrotum içinde bulunurlar (Resim 1. 2). Testisin ön kenarı, her, iki yüzü ve uçları düz ve konveks olup periton ile kaplıdır. Arka kenarın sadece lateral kısmı peritonla örtülüdür. Peritonsuz medial kısma epididimis tutunur ve buradan damar, sinir ve kanallar geçer. Testise ilişkin damar ve sinirler septalar aracılığı ile interstisyuma ulaşırlar. Testiküler lobüllerin her biri, 1- 4 adet, çok kıvrımlı tübül yapısı taşır. Bu tübüller kör bir uçla başlayıp mediastinum testise ulaşırlar. Her seminifer tübül 30- 70 cm uzunluğa ve 150- 250 mm çapa sahiptir. Seminifer tübüller insan testisinin % 66 kadarını oluşturur. Eriskin bir erkekte, her testisin ağırlığı yaklaşık 12 gr ve hacmi 15- 20 ml'dir. Boyutları 2.5x3x4.5 cm kadardır (Arıncı K ve Elhan A. 1995).

Tunika albuginea testisi saran mavimsi beyaz renkli fibröz bir tabakadır. Tunika albugineanın hemen altında tunika vaskuloza denilen damar ağı tabakası vardır. Tunika albugineadan başlayan çok sayıda trabekül ve septalarla testis 200-300 adet lobüle ayrılır. Her lobülde 1- 4 adet seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller ise rete testis denilen kanal sistemine açılırlar. Rete testis mediastinum testisin üst bölümünde sayıları 10- 15 arasında değişen kanallar şekline dönüşür. Daha sonra tek bir kanal olan epididimal kanal halini alır. Testisin arteriyal kanlanması, aortanın ventral yüzünde renal arterlerin 2- 3 cm altından çıkan bir çift testiküler arter tarafından sağlanır. Spermatik kordla beraber seyreden testiküler arter daha sonra birkaç dala ayrılır. Testisin esas kanlanmasının testiküler arter tarafından sağlanmasına rağmen bu arterle kremasterik, vazal ve epididimal arterler arasında çok sayıda anastomoz vardır. Testis ve epididim venleri önce funikulus spermatikusu saran bir ağ şeklinde plexus pampiniformisi, daha sonra da birbirleriyle birleşerek testiküler veni oluştururlar. Sağ taraftaki testiküler ven vena cava inferiora dökülürken; soldaki vena renalis sinistraya açılır. Kollateral venöz drenajı eksternal pudental ven, posterior skrotal ven ve kremasterik ven sağlar.

Testisin lenfatik drenajı; yüzeysel ve derin olmak üzere iki grupta toplanıp, testiküler vene paralel olarak paraaortik lenf nodlarına dökülür. Testisin

innervasyonu esas olarak sempatik postganglionik ve visseral afferent liflerle olur. Lifler genellikle damar yapılarına paralel seyrederek Testise kadar ulaşan sinir tunika albuginea seviyesinde dallara ayrılarak interlobüler septayı innerve eder.





Resim 1. 2 Testisin anatomisi.

### 1.3. Testis Histolojisi:

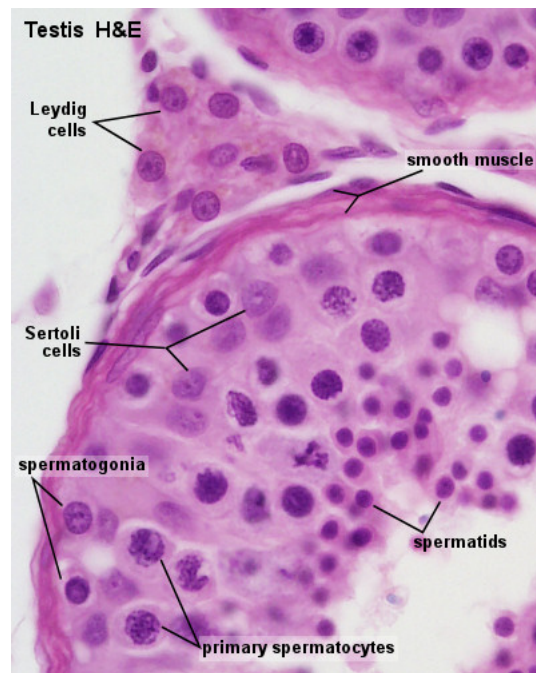
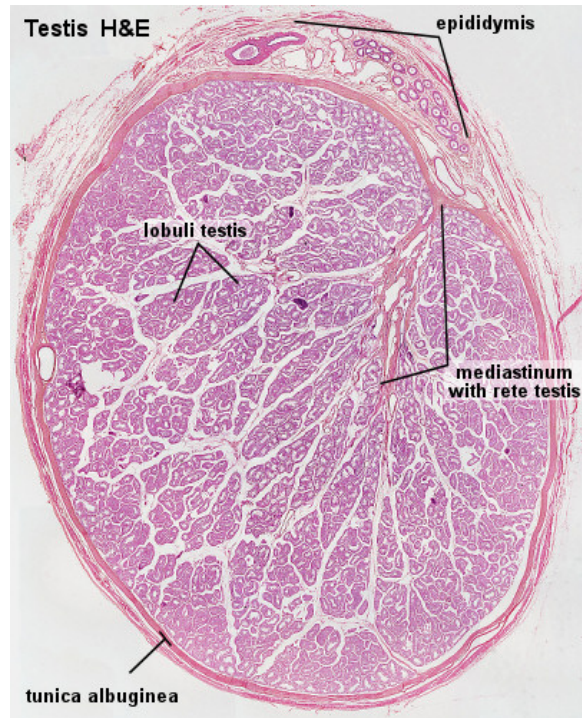
Testisler hem spermleri üretip hem de androjenleri ürettikleri için bileşik, túbüler, halokrin, iç salgı ve dış salgı bezi olarak kabul edilebilir. Bu yüzden hormonal kontrol düzeneği testislerin düzenli çalışması için gereklidir. Hormonal kontrol düzeneği, hipofiz-Leydig ve Sertoli hücreleri arasındaki düzgün ilişkilerle ayarlanır. Bu ilişkilerde endokrin ve parakrin yollar kullanılır.

Testis seminifer túbülleri yaklaşık 150 µm çapında ve 80 cm uzunluktadır, iki ucu U şeklinde olan rete testise açılan tüplerdir. Rete testis, seminifer epitelyumun ürünleri olan testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonları toplayan kanallar ağıdır. Seminifer túbül somatik sertoli hücreleri ve spermatogenetik hücreler olarak iki belirgin hücre popülasyonu içeren özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli merkezi bir lümenen oluşur. Spermatogenetik hücreler spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidlerdir (Resim 1. 3). Seminifer epitelyum bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir myoid hücrelerden oluşan bir duvarla çevrelenmiştir. Seminifer túbüller arasındaki boşluk alan kan damarları, lenfatik kanallar veya sinüzoidler, makrofajlar ve androjen üreten Leydig hücre grupları tarafından doldurulmuştur.

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelyumun dominant hücre tipidir. Puberteden sonra seminifer túbülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluştururlar. Bazal laminadan seminifer túbül lümenine doğru uzanan prizmatik hücreler olan bu hücreler kan testis bariyerini oluşturularak spermatogenetik hücreleri destekler. Spermiyogenez sonunda spermatidler tarafından atılan fazla hücre kısımlarını fagosite eder. Olgun spermatidlerin kasılmalarıyla seminifer túbül lümenine salınımı kolaylaştırır ve seminifer túbül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılar. FSH androjen-bağlayıcı protein (ABP) sentezini ve sekresyonunu düzenler, inhibin ve aktivin salgılar.

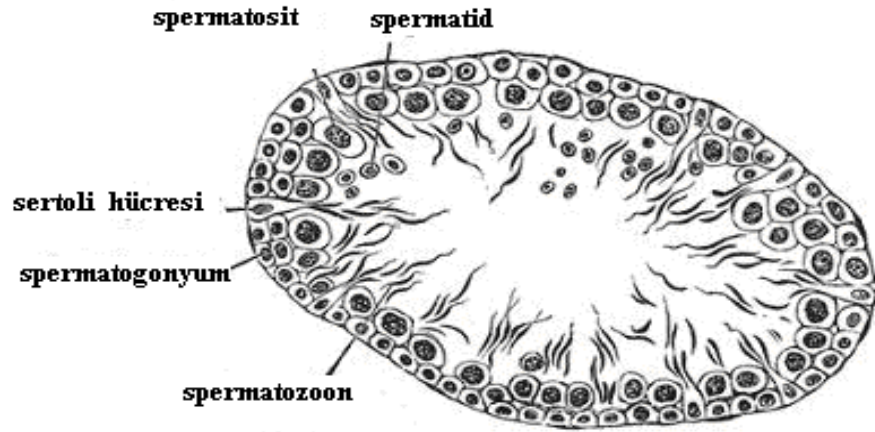
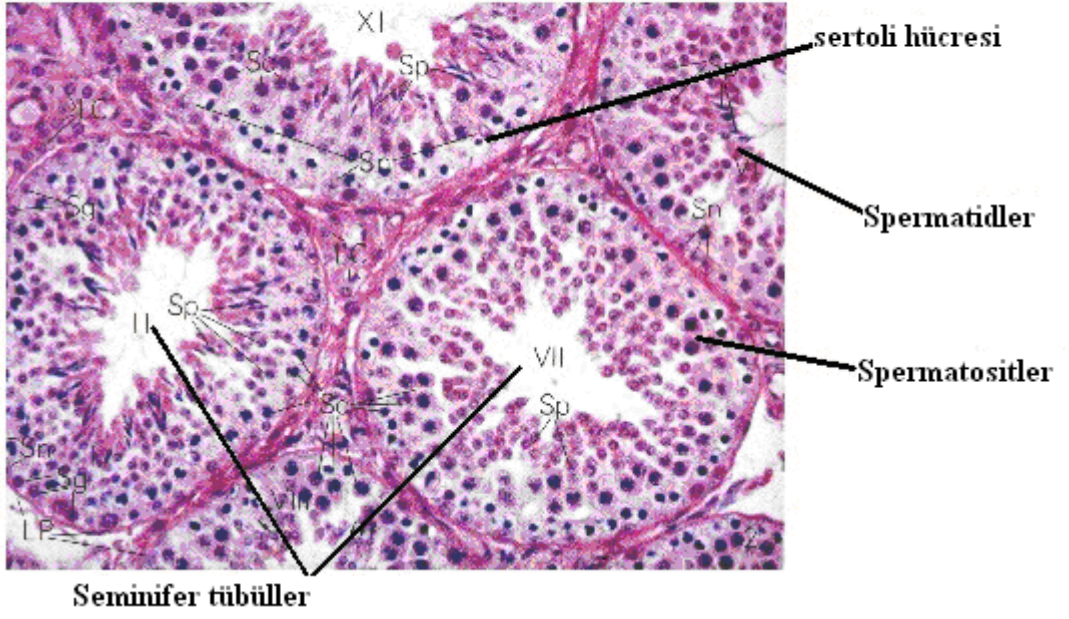
Germinal hücreler; spermatogonyum, spermatosit, spermatid ve spermatozoonlardır. Bu hücreler primordial germ hücrelerinden köken alırlar. Hem dişi de hem de erkekte ilk primordial germ hücreleri 4. haftada yolk kesesi

endodermi duvarında gelişerek gonad taslaklarına doğru yol alır. Gonadların oluşmasını işaret eden ilk belirtiler 5. haftada başlar. Seminifer tübül bazal membranı üzerinde oturan spermatogonyumlar, küçük diploid germ hücreleridir, puberteye kadar bölünmezler. Doğumdan önceki dönemde ortaya çıkan germ hücrelerinde üç tür spermatogonyum gelişir. Bunlar açık tip A, koyu tip A ve B tipi spermatogonyumlardır. B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlerle süreklilik sağlar. Yani tip B spermatogonyumların son mitoz bölünmesinden sonra primer spermatositler ortaya çıkar. Gonositlerden üreyen ilkel spermatogonyumun ileri derecede özelleşmiş spermatozoon haline gelinceye kadar geçirdiği sürece spermatogenez denir (Resim 1. 4).



**Resim 1.3** Testis histolojisi

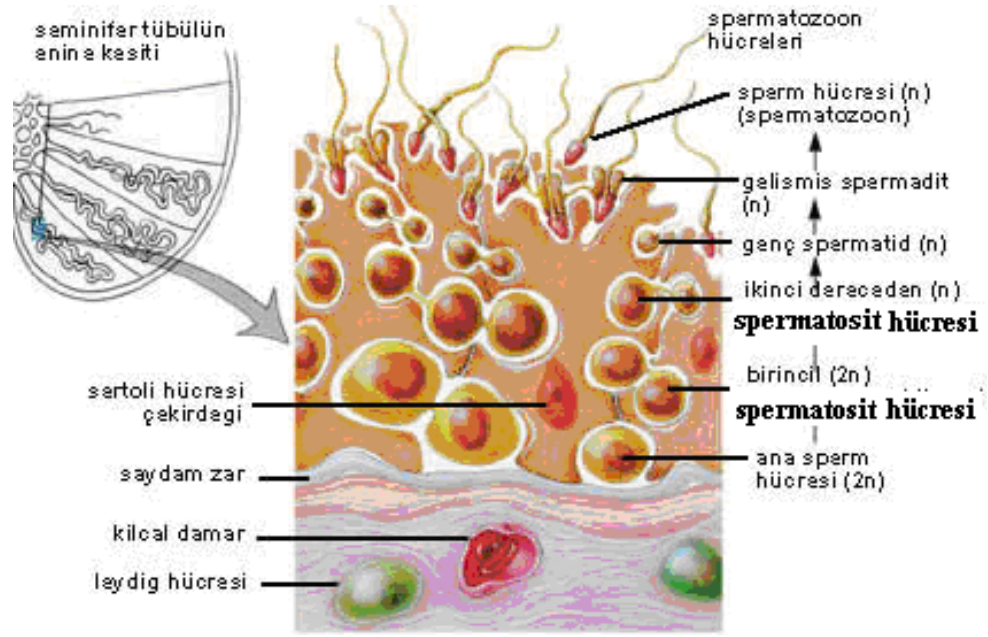
## Seminifer Tübüller



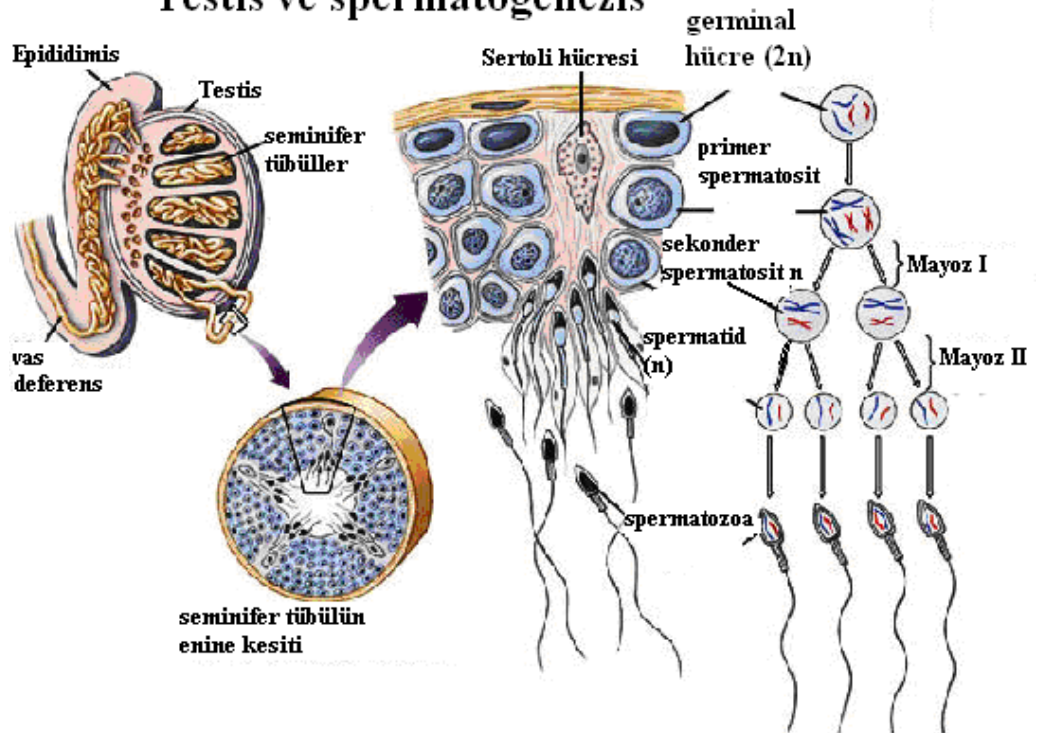
Resim 1. 4 Spermatogenetik hücreler ve seminifer tübüller

Spermatogonyumlar; Açık veya soluk A tipi spermatogonyumlar B tiplerinden daha azdır. Oval veya yuvarlak şekilli bu hücreler her zaman bazal lamina üzerine otururlar. Ancak en çok bulunan spermatogonyum tipi olan B tipi spermatogonyumların bazal lamina ile bağlantıları daha azdır. Hücrelerin çekirdeği merkezi olarak yerleşmiş ve yuvarlak şekillidir. Çekirdekte bir ya da iki koyu boyanan çekirdekçik bulunur. Sitoplazmada diğer A tiplerine göre daha fazla ribozom bulunur. Oval yerine yuvarlak olan nukleusları dışında açık tip A spermatogonyumlara benzerler. Mitozla bölünerek primer spermatositleri meydana getirirler. Soluk veya açık A tipi spermatogonyumlar kök hücrelerdir. Bunlar bölünerek hem yeni soluk A tipi spermatogonyumları yaparlar hem de koyu tip hücreleri oluştururlar. Koyu A tipi hücrelerde B tipi hücreleri oluşturmak için bölünürler. B tipi spermatogonyumların son mitotik bölünmelerinden sonra primer spermatositler ortaya çıkarlar. Bu hücreler mayoz bölünmenin preleptoten, leptoten, zigoten, pakiten ve diploten safhalarını geçirek sekonder spermatositlere dönüşürler. Bunlar da ikinci bir mayoz bölünme geçirek haploid kromozom setine sahip olan spermatidleri oluştururlar. Spermatidler herhangi bir bölünme geçirmeden, bir seri değişiklikler geçirek spermatozoonu, onlarda tipik şekilli erişkin spermleri meydana getirirler. Spermatositler de birbirleri ile sitoplâzma köprüleri aracılığı ile bağlıdırlar. Bu özellikler spermatidlerde de devam eder. B tipi spermatogonyumlar, mayoz bölünme geçirecek olan spermatositlere dönüşürler. Hücrelerin sitoplâzması spermatogonyumlarınkine benzer. Spermatidler; Spermatositlerin ikinci mayoz bölünmelerinden sonra haploid kromozoma sahip spermatidler oluşur. Erken dönemde spermatidler nispeten küçük, küresel şekilli hücrelerdir. Nukleusları ince kromatinlidir, arada yoğun kromatin yumakları vardır. Nukleus kısa sürede daha da küçülür. Sitoplâzmadaki dağınık düz endoplazmik retikulum, küçük ve perifere dizili, yuvarlak, kristası belirgin olmayan mitokondriyumlar ve iyi gelişmiş golgi kompleksi görülür. Granüllü endoplazmik retikulum azdır. Küçük ve hücre zarı altında dizilmiş mitokondriyumlar spermatid sitoplâzmasının tanınmasını kolaylaştırır. Spermatid olgunlaşması sırasındaki değişiklikler türlere göre farklılıklar gösterse de genel özellikleri ile hemen hemen aynıdır (Resim 1. 5).





## Testis ve spermatogenezis



Resim 1. 5 Testisin germ hücreleri

Spermatiddeki değişiklerle oluşan kalıtsal özellikleri taşıyan hücre spermiumdur. Spermiumda akrozom, sperm in oosite girmesini sağlamak için gereklidir. Memelilerde spermatidlerin spermium haline gelmesi belirli basamakları izler: Golgi fazında, önce spermatidin nukleusu etrafında golgi kompleks bölgesinde veziküllü yapılar çoğalır (proakrozomal veziküller). Bunlar birleşince büyük boşluklu yapılar oluşur (akrozom vezikülü). Bu bölgede nukleus yoğunluğunda artış görülür. Sitoplâzmadaki mitokondriler hücre çeperine doğru dizilirler. Kromatid cisimcik karşı uca kayarak çiftlerine yaklaşır. Buradan flagellum gelişir. Nukleus uzunluğu artar. Akrozomal granülden akrozom gelişir ve nukleusun 2/3 ön yüzü akrozom ile kaplanır. Ayrıca burada galaktoz, mannoz, fruktoz karbonhidratları ile hyalurinidaz, asit fosfataz, nukleoidaz enzimleri de yoğunlaşır. Mitokondrilerle çevrili olan bölge orta parçayı temsil eder. Olgunlaşma fazı, spermiumogenезin son evresidir. Spermatid türe has şeklini alırken spermatidin çekirdeğinden spermiumun başı, sentrioller ile mitokondrilerden de kuyruk bölümü şekillenir. Spermatidin diğer organelleri artık cisimcikler şeklinde sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Olgunlaşma fazında spermiumun son şeklinin kazanılması sağlanır. Testis içinde spermiumların metabolik ihtiyaçları hala sertoli hücreleri tarafından sağlanır. Spermiumogenез üç aşamada gerçekleşir: mitotik bölünmelerle çok sayıda spermiumogonyum oluşması, mayotik bölünmede genetik çeşitlilik elde edilmesi ve kromozom sayılarının yarıya inmesi, yaygın hücre modelleşmesi oluşması ve kromozomların aktarımı ve herhangi bir zarara karşı sıkı paketlenmesinin gerçekleşmesi.

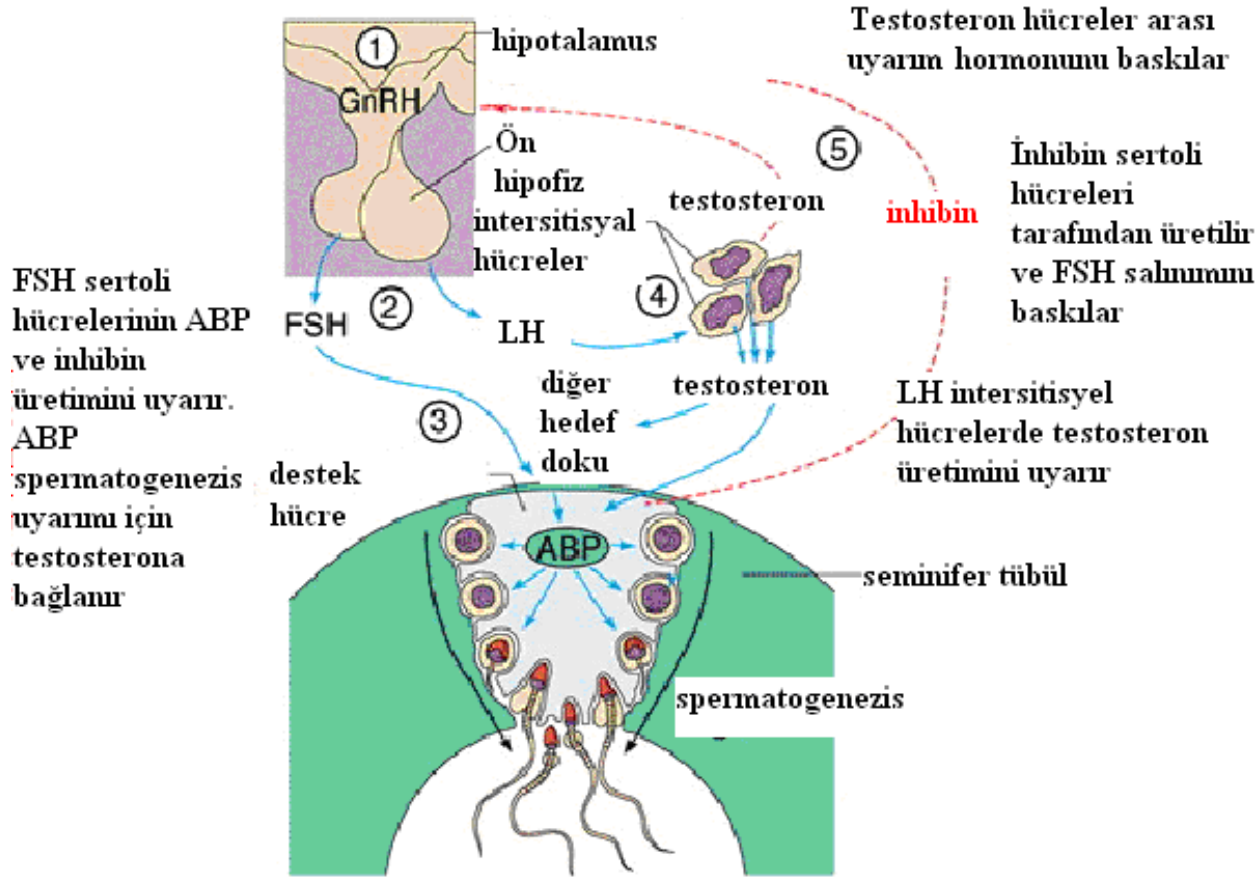
#### **1.4. Testis Fizyolojisi**

Testisin işlevleri içerisinde spermiumogenез en önemli olup, en primitif şekli spermiumogonyumdan spermium aşamasına gelen germinatif hücreler, testis, epididimis, vezikula seminalis ve prostat salgıları ile birleşip ejakulatı oluşturur. Testisin bu çok önemli işlevi, overin aynı doğrultudaki işleviyle birlikte neslin sürekliliğini sağlar. Endokrin işlevleri içerisinde testosteron yapımı interstisiyel Leydig hücreleri tarafından salgılanır. B-inhibin yapımı FSH supresyonu ile sağlanır ve sertoli hücrelerinden salgılanır. Östrojen yapımı oldukça azdır ve seminifer tübülü germinal epitelinden, testosteron yıkımı sırasında oluşarak veya interstisiyel



hücrelerden olabilmektedir. Testisin işlevleri hipotalamusun yönetiminde olmak üzere, hipofiz ön lobundan salgılanan FSH ve LH hormonlarının etkisi ve kontrolü altındadır. FSH (Folikül stimulan hormon): Hipotalamustan salgılanan "FSH-releasing faktör" ile kontrol edilir. Seminifer tübülilerde primer spermatositleri, sekonder spermatosit haline dönüştürerek spermatogenezi başlatır. Spermatogenezin sürmesi için az da olsa interstisiyel hücrelerden salgılanan testosteron gerekmektedir. Bunun içinde LH'a gerek vardır. Sonuçta, spermatogenezin oluşması için FSH ve LH'in ikisi birden gerekli olmaktadır. FSH'in salgısı, spermatogenezle orantılı olarak inhibin tarafından kontrol edilir. FSH inhibisyonunda belkide aktif seminifer tübülü ya da interstisiyel hücrelerden salgılanan östrojenler de rol oynamaktadır. LH (Luteinizan hormon, ICSH: İntersitisiyel hücre uyarım hormonu): Hipotalamustan salgılanan "LH-releasing faktör" kontrolü altındadır. Leydig hücrelerinden testosteron salgılanmasını sağlar. LH ile FSH birlikte uygulandığında, LH'in testosteron yapımını uyaran etkisi potansiyelize olur. LH'in salgılanması kan testosteron düzeyi ile ayarlanır. (Resim 1. 6).

# Beyin-Testis Ekseni



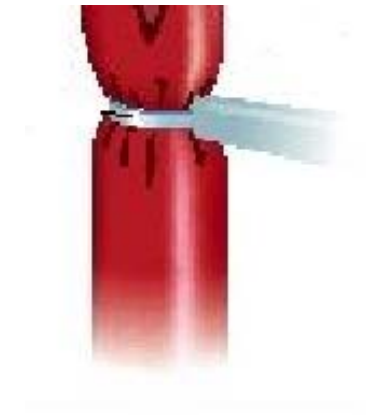
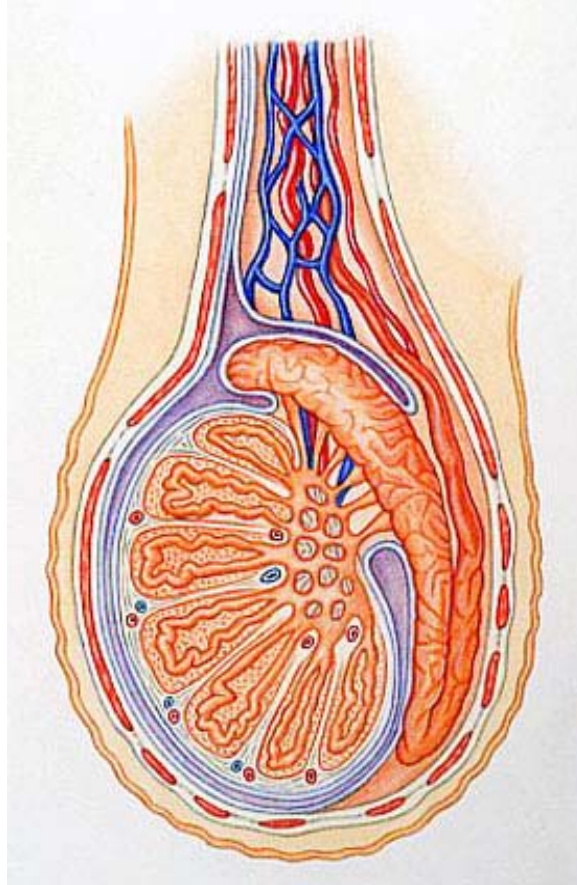
Resim 1. 6 Testisin fizyolojisi.

## 1.5 Ligasyon iskemisi

Testisin kanlanması en uzun arteri olan testiküler arterden sağlanır. Bu damardaki direnç diğer organ kapillerlerindeki basınca göre düşüktür. Seminifer tübüller normal şartlarda düşük perfüzyon basıncı ve düşük oksijene yaklaşık olarak adapte olabirler. Ancak bir hasarda kan akımının sağlanmasında testiküler işlev bozukluğuna rastlanır. Bu durum iki sorunun ortaya çıkmasına neden olur: birincisi doğal şartlarda testikuler kan akımının nasıl sağlandığı, ikincisi ise kan akımının azalmaya devam etmesinin etkisinin ne olduğudur (Damber JE ve ark. 1992). Lümen daralması (sklerozis) genç ve daha yaşlı erkeklerin testiküler arterlerinde yaygındır (Brehmer-Andersson E ve ark. 1985) ve testiküler arterde genç dönemde kendiliğinden gerçekleşir. Sistemik kan basıncındaki azalma testiküler kan akımının bozulmasıyla birliktedir (Lissbrant E ve ark. 1997). Bu durumda dolaşım şoku spermatogenetik epitelin hasarı izler ve seminifer tübül hasarını tetiklenir (Nolte T. , ve ark. 1995).

Araştırmacılar seminifer tübüllerde merkezi hasarı ve intersitisyel inflamatuvar reaksiyonu infertil erkeklerin testislerinde görüldüğü gibi gözlemlemişlerdir (Markey CM ve ark.1994). Bu çalışmalarda kan akımının erkek infertilitesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Markey CM ve ark.1994). Spermatogenezis ligasyon iskemisi durumunda semihipoksik çevreye uyum göstermiş ve serbest oksijen radikallerinden sperm DNA hasarını korunabilmesine neden olmuştur. Hücreleri proliferasyon gösteren tüm dokular oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu da perfüzyon ve etkili bir kan basıncı ile mümkündür. Kan akımındaki azalma intratestiküler kan damarlarında bir inflamatuvar yanıt oluşumuna neden olur. Kan akımındaki azalma kan damarlarında lökositin artışı, intersitisyel alana göçü (ilk inflamasyon yanıtı) meydana getirir. Fakat bu durum kan akımı sıfırın altına düştüğünde gözlenmemiştir. İskemi alanına gelen lökositlerin çoğalması doku sağaltımı için gereklidir. Lökositlerin akümüasyonu reperfüzyonun sağlanmasıyla da hasarlı dokuya serbest radikallerin hasar vermesine de yol açar. Testiküler kan akımının azalması iki farklı mekanizma aracılığıyla germ hücre ölümüne neden olabilir; doğrudan hipoksi ve artan lökositlerin etkileri. Bu patojenik mekanizmalar arasındaki ilişki; hipoksi ve oksijen radikallerinin hasarı ile ilişkilidir. Çünkü çok net olmamakla birlikte

testiküler kan akımındaki bozunma görünüşe göre endotel hücre adezyon moleküllerinde ve hasar bölgesine gelen lökositlerin artışına neden olmaktadır (Bergh A ve ark.1996). Testiste kan akımının azalması etkili bir germ hücre ölümünün tetiklenmesi ve vasküler yanıtı benzer bir inflamasyona neden olur (Resim 1. 7).



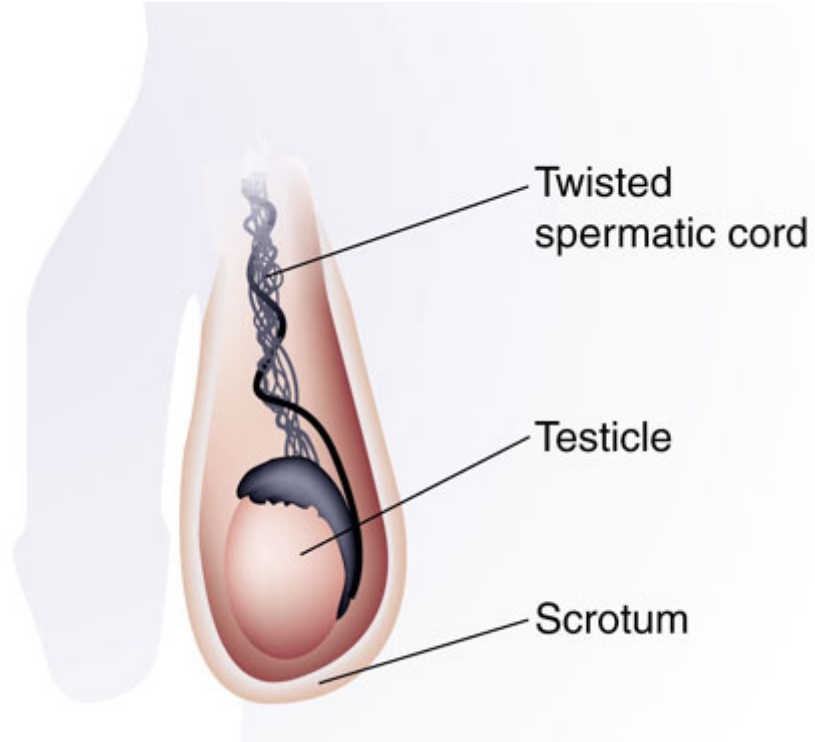
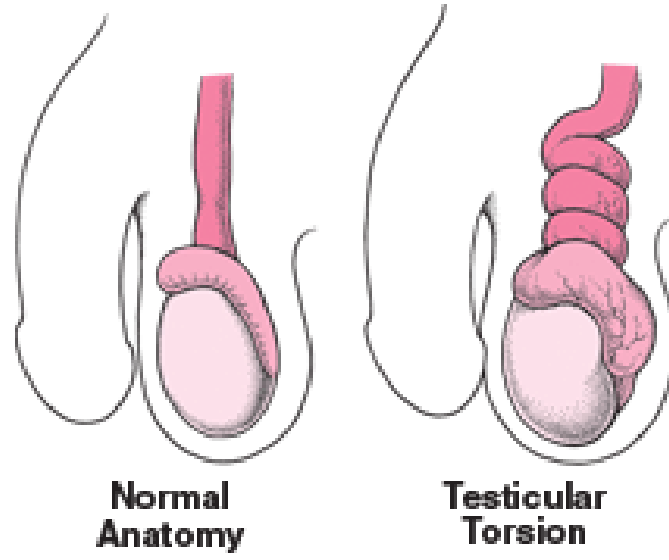
**Resim 1. 7** Ligasyon iskemisi

## 1.6. Torsiyon iskemisi:

Testiküler torsiyon-detorsiyon (T/D) nedeniyle oluşan iskemi ve reperfüzyon (I/R) testiküler hasara neden olmaktadır. İskemi sırasında oksijen miktarının metabolik ihtiyaçlara oranla düşük seviyede olması, hücresel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolitlerin birikimine bağlı olarak germ hücre ölümü gerçekleşir (Mogilner JG ve ark. 2006). Testis iskemisinin etiyolojisine bakıldığında edinsel testiküler kanlanma bozuklukları, organın ya da gonadın torsiyonu, varikoseli, skrotuma inmesini gerçekleştirememesi ya da iatronejik nedenler sonucu oluşmaktadır. Unilateral varikosel, tümör, inmemiş testis gibi patolojilerde testisin çevrel ısısı artmaktadır. Bunun sonucu ipsilateral testiste başta spermatogenik hücrelerde olmak üzere ısı artışına çok duyarlı protein yapılı birimlerde yapısal bozulmalar ve hasarlanmalar olmaktadır. Testis torsiyonunda ise, torsiyon derecesine göre testis kan akımı parsiyel ya da tam kesilerek erken ya da geç dönemde testis infarktüsüne neden olmaktadır.

Testis torsiyonu sıklıkla genç erkeklerde görülen ve müdahale edilmediği zaman gonad kaybına kadar gidebilen ürolojik acil durumlardan biridir (Sade M ve ark.1998). Testis torsiyonu için değişik predizpozan faktörler tanımlanmıştır. Normalde tunika vajinalis testisin ön yüzünü sarar ve epididim ya da spermatik kord düzeyinde sonlanır. Tunika vajinalisin spermatik kordonun üst kısmında sonlandığı durumlarda, testis tunikal kavitenin içinde normal durumundadır. Ayrıca pubertal dönemde testis hacmindeki artış, mezenterik yapıya oranla daha hızlı olup torsiyon olasılığı artmaktadır. Ekstravajinal torsiyon olarak tanımlanan bu durumda, testis, epididim ve tunika vajinalis spermatik kordonun üst düzeyinde vertikal düzlemde torsiyona maruz kalır. Testis torsiyonu oluştuğunda venöz dönüş bozulur. Buna bağlı olarak ödem, hemoraji ve arteriyel obstrüksiyon gelişir. Kan akımının azalması, tıpkı diğer dokularda gösterildiği gibi testiste de hipoksiye neden olur (Tijoe DY ve ark. 1970). İskemik dokularda canlılığı korumak için temel prensip reperfüzyonun sağlanmasıdır. Bu nedenle testis torsiyonlu olgularda zaman geçirmeden müdahale edilmelidir. Akgür ve arkadaşları testiste iskemi gelişmesi ve ardından reperfüzyonunun sağlanmasının da “reperfüzyon hasarı”na neden olduğunu göstermişlerdir (Akgür FM ve ark.1993). Reperfüzyon hasarı nötrofil infiltrasyonu ve serbest oksijen radikalleri olan süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil

radikal artışıyla yakın ilişkilidir (Cuzzocrea S ve ark.2001). Oluşan serbest oksijen radikalleri hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonu, protein denatürasyonu ve DNA hasarına yol açar (Resim 1. 11). Testis torsiyonu gibi iskeminin düzeltilebileceği durumlarda hekimlere çok az bir süre kalmaktadır (Krarup T, 1978). Bu sürenin en az 24 saate varacak kadar geniş, tutulmasına karşılık, son zamanlarda yapılan çalışmalar süreyi 2- 6 saate kadar indirmiştir (Szabo C ve ark. 1998). Bu nedenle çalışmamızda hasarın net bir şekilde görülebileceği 6 saatlik iskemi süresi seçilmiştir(Resim 1. 8).



**Resim 1. 8** Torsiyon iskemisi

## 1.7. Kontralateral testis iskemisi

Unilateral torsiyonun kontralateral testise etkisi tartışmalıdır. Testis iskemilerinde Bartsch (Bartsch G. ve ark. 1980) , Chakraborty (Chakraborty ve ark. 1980), York (York ve ark. 1985) gibi araştırcılar yaptıkları çalışmalarla bilateral hasarlanma olduğunu ileri sururken Madgar (Madgar ve ark. 1997), Turner (Turner ve ark. 1985), Puri (Puri ve ark. 1985) gibi araştırmacılar, gerek klinik gerekse deneysel çalışmalarında, unilateral testis iskemilerinde kontralateral hasar oluşmadığı yönünde sonuçlar elde etmişlerdir. Otoimmun mekanizmayı savunanlar, iskemi ile yıkılan kan-testis engelini aşan sperm, spermlerin ürünü olan bazı maddelerin ve/veya tübüler bazal membranın antijen gibi davrandığını, bunlara karşı antikörlerin oluştuğunu ve bu yolla kontralateral hasarlanmanın olduğu ileri surmşlerdir (Barkley C ve ark. 1993).

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

Bazı araştırmacılar unilateral torsiyonun kontralateral hasara neden olduğunu ve bu durumun da immunolojik mekanizmalarla gerçekleştiğini belirtilmektedir (Sade ve ark 1988, York JP. , 1985, Cosentino ve ark. 1985). Ancak testiküler torsiyon sonrası kontralateral hasar henüz anlaşılmamıştır ve bu hasar sempatik sistem tarafından aktive edilen bir refleks aracılığıyla meydana geldiği düşünülmektedir (Karagüzel G ve ark. 1994). Testiküler hasarda en az düzeydeki kan akımı sirklyonu bile kontralateral testiste olabilecek hasar için sistemik bir reaksiyonun başlamasını tetikleyici olabilir ve bu da germ hücre apoptozisine neden olabilir (Rodriguez M. ve ark. 2006). Buna karşılık testisler 4 saat torsiyonda ve 4 saat de detorsiyonda tutulmuş histolojik ve biyokimyasal analizler kontralateral testiste hasar olmadığını göstermiştir. Çalışmaya göre 8 saatlik süre immunolojik yanıt için yeterli değildir. İskemik reperfüzyonla testiste NO önemli bir rol oynar. L-arjinin ile NO inhibe edilmesine rağmen iskemi-reperfüzyon hasarı gelişir. Burada rol oynayan

serbest radikallerin kontralateral testis hasarına etki edebileceği de düşünülmüştür (Özokutan H. ve ark. 2004, Moon C ve ark. 2005, Yağmurdur H ve ark. 2008).

Krarup ( Kraup ve ark. 1978), Bartsch (Bartsch ve ark. 1980) iskemi nedeni olan torsiyondan önce her iki testiste fizyomorfolojik bir defekt olduğunu ileri sürmüşlerdir. İskemi sonucu yıkılan kan-testis engelini aşan serbest kalmış, akrozomal enzimleri (hyaluronidaz, proteinaz vb) kontralateral testis hasarından sorumlu tutan araştırmacılarda vardır (Somuncu S ve ark. 2006). Unilateral böbrek yaralanmalarında, refleks mekanizma ile artan simpatik tonus, kontralateral böbrekte kan akımında azalmaya neden olmaktadır. Aynı embriyolojik kökenli testiste de benzer olayın olduğu gösterilmiştir. Torsiyonda önce ani ve progressif mikrovasküler durgunluk ile kan akımında azalma olmakta ve detorsiyonda yavaş yavaş kan akımı artmaktadır. Detorsiyon için geçen süre uzadıkça karşı testis kan akımı azalması kritik sürenin üzerine çıkmakta ve hasarlanmaya neden olmaktadır (Tanyel ve ark. 1989). Minimal yaşam belirtisi gösteren iskemik testislerin korunması önerilmesine karşın, özellikle torsiyon düzeltme işlemi uygulanan testis torsiyonlu kişilerde %70-90 oranlarında ipsilateral atrofi saptanmıştır. Ayrıca torsiyon düzeltme işlemi sonrası %95'lere varan oranlarda anormal seminal analiz bulgularından (volüm, sayı, dejenerasyon ve hareketlilik yüzdesi) söz edilmiştir(Jagadish S ve ark. 1986). Bulgular unilateral iskemide bilateral testis işlev bozukluğu ve infertilite gelişimi gündeme getirmiştir.

### **1.8. İskemi ve reperfüzyon**

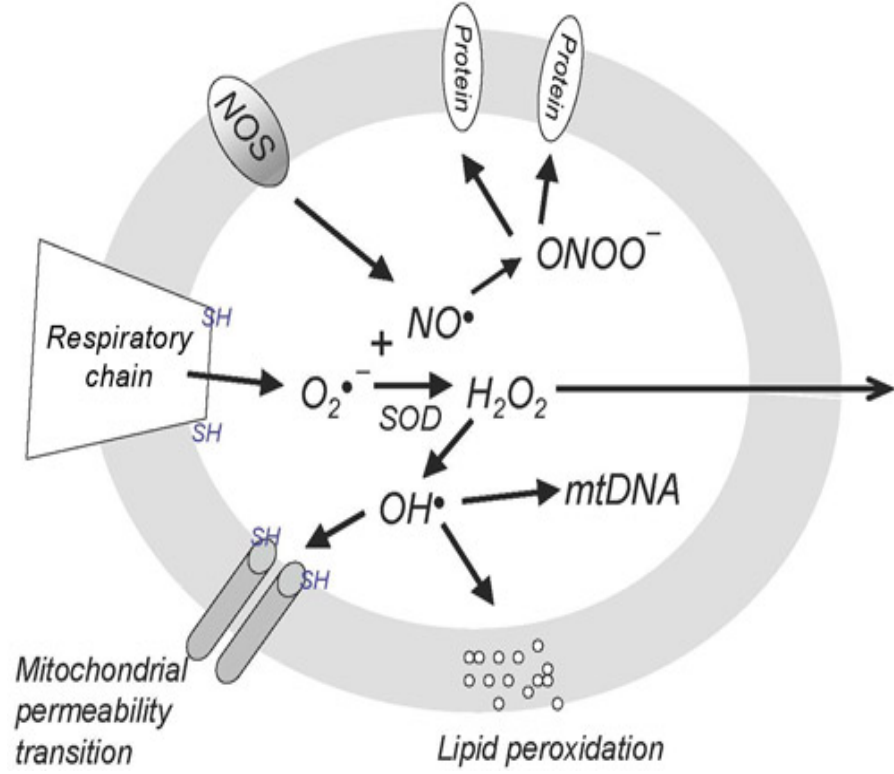
İskemi, herhangi bir nedenle, dokudaki kan akımının, hücrel fonksiyonları karşılamak için gerekli olan düzeyin altına düşmesi durumudur. Aerobik organizmalar canlılıklarını devam ettirebilmek için oksijene gereksinim duymaktadırlar. İskemi hücrel oksidatif fosforilasyonu azaltır ve adenozintrifosfat (ATP), fosfokreatin gibi enerjiden zengin fosfatların depolarında yetmezlik oluşur (Langer JC ve ark.1995). İskemide enerji eksikliğine bağlı olarak; iyon dengesinde bozulma, ATP yıkım ürünlerinin birikmesi, makromolekül sentezinin durması, asidoz gibi olaylar gelişir. İskemi proinflatuar durumu uyararak lökosit adezyon



molekülleri, endotelin, tromboksan A2, sitokinler, gibi mediatörlerin salınmasına neden olur (Langer JC ve ark.1995).

Reperfüzyon safhasında, hem reaktif oksijen türevlerinde (ROS) (başlıca hidroksil radikalleri ve süperksit anyonları olmak üzere) hem de reaktif nitrojen türevlerinde (RNS) (başlıca nitrik oksit (NO) ve onun peroksinitrit gibi toksik metabolitlerinde olmak üzere) ciddi artış olur (Lysiak JJ ve ark. 2002, Filho DW ve ark. 2004 ). Bu serbest radikaller mitokondri ve hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonu yoluyla membran geçirgenliğinde artışa veya membran bütünlüğünde bozulmaya neden olur (Akgür FM ve ark. 1994). Sonuçta iskemi nedeniyle oluşan germ hücre hasarı daha da artar.

NO, damar endoteli ve bazı başka dokularda L-arginin aminoasitlerinden üretilir. Süperoksit ile reaksiyona girerek oluşturduğu kuvvetli bir oksidan olan peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) ile dokulara direkt olarak ve ayrıca oluşturduğu hidroksil radikali ile dolaylı olarak hasar vermektedir.  $OH^-$  ise canlı hücrelerde makro moleküllerle (deoksiribonükleik asit (DNA), membran lipidleri, karbohidratlar, aminoasitler) hızlı bir şekilde reaksiyona girerek doku hasarı oluşturmaktadır (Gutteridge JMC ve ark. 1992). İskemi sırasında hücre ATP hipoksantinden indirgenmektedir. Normalde hipoksantin, ksantin dehidrogenaz ile ksantine oksitlenir. İskemi sırasında ise ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza çevrilir. Ksantin oksidaz iskemi sırasında hipoksantinden ksantine dönüşümü katalizleyemez ve dokularda aşırı hipoksantin birikir. Reperfüzyon sırasında ortama yeniden giren oksijen ve ksantin oksidaz, aşırı hipoksantin ile birlikte toksik serbest oksijen radikalleri oluşturur (Reilly PM ve ark.1991). Serbest oksijen molekülleri, hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olarak direkt hücresel membran yaralanması yapan potent okside ve redükte edici maddelerdir. Lipid peroksidasyonu sonucu membranların geçirgenliği değişmekte, membrana bağlı enzimler azalmakta ve protein sentezi inhibe olmaktadır. Lipid peroksidasyonu yeni oksijen radikallerinin oluşmasına da yol açmaktadır. Membran lipid peroksidasyonuna bağlı olarak lizozom ve mitokondri gibi organellerin içerdikleri enzimler hücre içine salınmakta ve böylece hücreler ölmektedir (Resim 1. 9) (White BC 1993).



**Resim 1. 9** Lipid peroksidasyonu

Ksantin oksidaz reaksiyonu sırasında ortaya çıkan süperoksit radikali nötrofillerin infiltrasyonuna neden olmaktadır (Menger MD ve ark.1997). Normal koşullarda mitokondrial elektron zincirinde de oksijenin parsiyel indirgenmesi sonucu %1- 5 oranında serbest oksijen molekülleri oluşmaktadır. Reperfüzyon ile gelen yüksek konsantrasyondaki moleküler oksijen, iskemi sırasında birikmiş olan NADH,  $FADH_2$  gibi indirgen moleküller ile indirgenerek serbest oksijen radikalleri oluşturur (Reilly PM ve ark.1991). Sonuçta reperfüzyonda çok çeşitli hücreler (vasküler endotel, kan hücreleri), organeller (mitokondri, lizozom) ve enzimler (nitrik oksit sentetaz) serbest oksijen radikali kaynağı olabilmektedir (Gutteridge JMC ve ark.1992).

İskemi/reperfüzyon hasarında lökositlerin rolünü gösteren bir çalışmada (Menger MD ve ark.1997) reperfüzyon ile birlikte sırasıyla kemotaksis, lökosit endotel hücre yapışması ve göçü oluşmuştur. Hücre dışı bölgeye ulaşan aktive lökositlerden salınan toksik serbest oksijen radikalleri, proteazlar ve elastazlar mikrovasküler geçirgenlikte artma, ödem, tromboz ve parankimal hücre ölümüne neden olurlar (Childs EW ve ark.2002). İskemi/reperfüzyon hasarı ve No-reflow

Fenomeni reperfüzyon sırasında ortaya çıkan serbest oksijen moleküllerinin lökositleri aktive etmesiyle, lökositlerin damar endoteline yapışıp kapiller yatakta tıkaçlar oluşarak dolaşım bozulmaktadır. Bu nedenle reperfüzyon sonrası kapillerin bir kısmı perfüze olamamaktadır. İskemi/reperfüzyon sonrası kapillerin bir kısmında perfüzyonun geri dönmemesi “no-reflow fenomeni” olarak adlandırılmaktadır (Anaya-Prado R ve ark.2002). Aktive olan nötrofiller, salgıladıkları proteaz, elastaz, jelatinaz gibi enzimler ile endotel hücrelerinin parçalanmasına, endotel devamlılığının bozulmasıyla trombositler ve nötrofillerin kapiller alana kemotaksisine yol açmaktadır. Endotelyal devamlılığın bozulması ile ortaya çıkan sitotoksik mediyatörler mikrovasküler geçirgenliği artırmakta ve böylece intersitisyel alana sıvı kaybına ve oluşan hemokonsantrasyon ve interstisyel ödem ile kapiller lümenin daralmasına neden olmaktadır (Hakgüder G ve ark. 2002). Nötrofiller lökotrien B4‘ü salgılayarak, süperoksit radikali oluşmasına ve nötrofil kemotaksisiyle pozitif feed back mekanizması ile aktive olmakta ve tıkaç oluşturmuş olan nötrofiller yeni serbest oksijen radikalleri oluşturmaya bu da nötrofil infiltrasyonuna neden olmaktadır (Akgür FM ve ark.1994, Anaya-Prado R ve ark.2002).

Spermatik torsiyon uygulamasının ardından reperfüzyon hasarı sonucu reaktif oksijen türevleri (ROS) üretiminin artışı akciğerde ya da beyinde doku hasarının görülmesinden öncedir (Gonzalez-Flecha ve ark. 1993, Gasbarrini ve ark. 1998, Cutrin ve ark. 2000, Yamato ve ark. 2003). ROS üretimi iskemik reperfüzyon olan dokularda iki faz görülür; Birinci faz reperfüzyondan hemen sonra meydana gelen fazdır. Birkaç saat içinde ortaya çıkan tipik bir oksidatif stres durumları hücrel hasarı geri dönüşümlüdür. Oksidatif fosforilasyonun kaybı ve mitokondrial disfonksiyon ile ROS’un mitokondrial üretimi artmıştır (Gonzalez-Flecha ve ark. 1993). İkinci faz oksidatif stres altında sonra ortaya çıkar. Bu faz nötrofil infiltrasyonu ve makrofajlarla geri dönüşümsüz doku hasarı ve inflamasyon ile ilişkilidir (Cutrin ve ark. 2000).

Reperfüzyonun uzun periyoduyla ilişkili olarak unilateral torsiyon normal dolaşımında kontralateral kan akımı azalır. Kan akımının devamı fertilité için gereklidir (Tanyel ve ark.1989, Melikoglu ve ark. 1992). Buna ek olarak 1 saatlik torsiyonu takiben 24 saatlik reperfüzyonda damar geçirgenliğinin arttığı bildirilmiştir

(Turner ve ark.1996). İskemi sonrası değişimler kontralateral testiste uzayan reperfüzyonla testiküler hasara neden olmuştur. Deneysel testis iskemi reperfüzyonunda 4- 6 saatten daha uzun süren reperfüzyon kalıcı doku hasarına neden olur (Rhee ve Yoon 1988, Ralitchkova ve ark.1990, Becker ve Turner, 1995, Granados ve ark. 1998).

### 1.9. Oksidatif stres

Nitrik oksit'in keşfedilmesinde Furchgott ve Zawadski tarafından ilk kez 1980'de endotel kökenli vazodilatasyon etkili bir madde (Endothelial Derived Relaxing Faktor, EDRF) tanımlanmıştır (Furchgott RF ve ark. , 1980). NO üzerine yapılan çalışmalar daha sonraki yıllarda artmış ve organizmada birçok önemli rolü olduğu saptanmıştır. Bu nedenle 1992'de NO yılın molekülü olarak tanımlanmıştır (Intengan HD ve Schiffrin EL. 2000). Bugün artık endotel kaynaklı nitrik oksidin hem deneysel çalışmalarda hem insanlarda sürekli vasküler tonusun fizyolojik düzenleyici olduğu ortaya konmuştur. Yine bugün birçok hücrede NO sentezlendiğini ve vasküler tonusun düzenlenmesinin yanı sıra bir medyatör olarak nörotransmisyon, immün direnç ve hücrel adezyonun düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik olayda birincil görevi olduğu bilinmektedir (Bruhwyler J. ve ark.1993).

Nitrik oksit renksiz bir gaz şeklinde bulunan inorganik serbest bir radikaldır. Yarı ömrü 2–10 saniyedir. Sentezlendikten kısa bir süre sonunda hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötralize edilerek nitrat ve nitrite dönüşür (Wendy K. A. ve ark. , 2001). NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır (Moncada S ve ark. 2002). Yarı esansiyel bir aminoasit olan L-arjinin'in terminal guanidin grubunun NOS enziminin katalize ettiği bir reaksiyon sonucu nitrik oksite çevrilmesi sonucu sentezlenmektedir (Ribeiro M.O. 1992). NOS başlıca yapısal (konstitütif) ve uyarılabilir (indüklenebilir) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır (Marletta MA. , 1993). Yapısal NOS (cNOS, NOS1, NOS3) hücre içinde sürekli var olan ve vasküler tonus ayarlanmasında ve nörotransmisyonda rolü olan, intermittan küçük miktarlarda nitrik oksit üretimini sağlayan enzimlerdir. Esas olarak nöronlarda (nNOS), vasküler endotel hücrelerinde (eNOS), endokard, myokard ve trombositlerde bulunur. Ca<sup>+2</sup>

/kalmodülün bağımlı bir enzim olan cNOS çeşitli uyanlarla geçici olarak intrasellüler iyonize  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun ( $10^{-7}$  mol/L) fizyolojik sınırlar içinde yükselmesi sonucu aktive olur ve esansiyel miktarda NO sentezlenmesine yol açar. Endotel kaynaklı eNOS (NOS- 3) arteriyel ve venöz endotel hücrelerinde bulunan membrana bağılı bir enzimdir ve eNOS aktivitesi asetilkolin, bradikinin, adenozin trifosfat (ATP), elektriksel uyarı ve sıvı akımıyla uyarılabilir. Dolaşımın düzenlenmesinde, trombositlerin ve polimorf çekirdekli lökositlerin damar lümeniyle olan etkileşiminde görev alır. nNOS; beyin, cerebellum, nöroblastlarda bulunur ve nörotransmitter olarak görev yapar. (Katusic ZS, Cosentino F. 1994). Uyarılabilen NOS (iNOS, NOS- 2) fonksiyonel olarak  $Ca^{+2}$  bağımsız olması nedeniyle cNOS'dan farklıdır. Endotel hücrelerinden başka, özellikle düz kas hücreleri ve makrofajlarda bulunmaktadır. Makrofajların, nötrofillerin, mast hücrelerinin ve vasküler düz kas hücrelerinin sitokinlerle uyarılmasından sonra NOS'un gen tanımlaması başlayarak belirli bir sürede NOS sentez edilir ve hücrede nanomol gibi büyük miktarda NO sentezi yapabilir. Makrofajların aktivasyonu ile sentezlenen NO'nun başlıca makrofajlarda bulunmasına rağmen, vasküler düz kas hücreleri, renal tübül hücreleri, kupffer hücreleri, endotel hücreleri, monosit ve polimorf nüveli lökositlerde tespit edilmiştir (Wendy K. A. ve ark. , 2001). Makrofajlar dışındaki hücrelerde iNOS aktivitesinin rolü yeterince bilinmemektedir. Ancak endotelde bulunan iNOS konjestif kalp yetmezliği gibi artmış sitokinlerin bulunduğu durumlarda önemli olabilir. Sitotoksik rol oynarak immün cevapta, antimikrobiyal ve antineoplastik aktivitesinde önemlidir (Marletta MA. 1993).

NOS protein aktivitesi insan ve ratların testis, epididim, prostat ve seminal veziküllerinde tesbit edilmiştir. NOS antikorlarıyla yapılan deneysel çalışmalarda farelerin spermatozoa ve kuyruklarında NOS'un varlığı gösterilmesine rağmen (Ishikawa T ve ark. 2005) spermatozoada bir mi yoksa daha fazla mi NOS izoformuna sahip olduğu bilinmemektedir. Enfeksiyon ve inflamasyona yanıt olarak NO biyosentezi sperm motilite ve fonksiyonunda bozulmaya neden olabilmektedir. NO ile tetiklenen sperm hasarının primer mekanizmasının solunum ve DNA biyosentezi inhibisyonu olduğunu düşünülmektedir. Nitrik oksitin seminal plazmadaki etkileri konsantrasyonuna göre değişir. Düşük konsantrasyonda sodyum nitropurid gibi NO salıcı bileşimin sperm motilite ve canlılığının korunmasında

yardımcı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca NO fare sperminin hipeaktivasyonunda situmilatör rol oynadığı bildirilmiştir. Buna karşın NO salan bileşenin çok yüksek konsantrasyonlarında sperm respirasyonunun inhibisyonu ile sperm motilitesinin bozulduğu gösterilmiştir (Lee NP ve ark. 2005). Düşük konsantrasyonlardaki NO sinyal transdüksiyon molekülü gibi davranıp sperm motilitesini artırırken yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik olmaktadır. Nitrik oksit sperm kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu üzerine önemli rol oynar. NO salan bileşenlerin düşük konsantrasyonları ile inkübasyon sonucu sperm kapasitasyonunun artış gösterdiği ölçülmüştür (Ishikawa T ve ark. 2005, Lee NP ve ark. 2005).

eNOS ve nNOS testiste temel olarak bulunur ve damar tonusunun fizyolojik düzenlenmesine katkıda bulunmak için intraselüler kalsiyum artışının için aktive edilir. eNOS leydig hücreleri, sertoli hücreleri, spermatogonya ve spermatozitlerde eksprese edilir. eNOS ve nNOS testis, iskemik testis ve 12 saatten daha az reperfüzyona uğramış testiste az miktarda NO üretimini düşündürür. 24 saat ve daha fazla süreli reperfüzyonlarda NO'in iNOS tarafından üretildiği düşünülmektedir. 48 ve 96 saatlik reperfüzyonlarda ise NO üretimi en üst seviyeye ulaşmıştır. Mononükleer ve polinükleer inflamatuvar hücrelerde de iNOS tanımlaması gözlenmiştir. İnflamatuvar hücreler tarafından üretilen birkaç sitokin NO'ü düşündürür ve germ hücreleri üzerine etki gösterir. Reperfüzyonun erken fazında eNOS ya da nNOS nonspesifik bir şekilde gösterilir. Böylece artmış hipoksi ve NO<sub>2</sub>'nin vazodilatör etkisi gösterilmiş olur. 24 saatten daha fazla süren iskemiye izleyen reperfüzyon germ hücre bazal membranlarının  $\alpha$ -fodrin proteolizini tetikler. Calpain inhibisyonu iskemik reperfüzyonun erken fazında  $\alpha$ -fodrin proteolizisine neden olur. NO'in üretimi ve reperfüzyon fazında bozunmada sitokinlerin yüksek seviyesi germ hücre ölümü belki de nekrozis sadece calpain aktivasyonu ile değil aynı zamanda NO ve çeşitli sitokinler aracılığıyla gerçekleşir. Görünmeyen daha küçük DNA parçaları 96- 192 saat reperfüzyon sonrası TUNEL boyanmasına katkıda bulunur. NO çok sayıda inflamatuvar medyatörlerinden sadece biridir. Örneğin testiküler mikrovasküler endoteliumuna inflamatuvar hücrelerin tutunmasına adezyon molekülleri katkıda bulunur. Sonuç olarak; testisin germ hücre hasarını başlatan iskemik reperfüzyonu iNOS'u reperfüzyonun geç fazında sitokinler ve NO tarafından tetiklenen nekrotik hücre aracılığıyla tetiklemesi mümkündür. Calpainin ve

iNOS'un birlikte inhibisyonu spermatogenezisin bozulmasına katkıda bulunur (Sun L. 2006, Üstün H. 2008).

Nitrik oksitle fertilizasyon yeteneği arasında bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. NO sperm ile ovum arasındaki ilişkide de rol oynar. Kapasitasyon ortamında insan spermatozoasının NO bileşenlerinin sodyum nitropurid ile düşük dozlarda uygulanması zona pellucidaya bağlanan spermatozoa sayısını artırmıştır. NO'nun artışının ATP sentezini inhibe ederek semen konsantrasyonunu azalttığı gösterilmiştir. NO hücrelerdeki ATP sentetazı inhibe ederek ATP seviyesini azaltır. ATP üretiminin azalması ile enerji eksikliği meydana gelir ve enerjinin % 90'ı ATP'den sağlandığı için sperm motilitesi bozulur. Mast hücrelerinin NO üretimini artırdığı bilinmektedir. (Middendorff R ve ark. 1997, Shiraishi K. 2001, Ha TY ve ark. 2004, Taneli F ve ark. 2005).

Mast hücre sayısının artışının testiküler dokuda ciddi patolojik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarla mast hücrelerinin NOS ve endojen NO ekspresyonuna katkısı olduğu gösterilmiştir (Sezer C. ve ark. , 2005) Önceki çalışmalarda testiküler dokuda yüksek iNOS varlığında testiste ciddi patolojik değişiklikler (sertoli hücrelerinde görülebilecek) saptamışlar ve leydig hücrelerdeki mast hücre artışı ile iNOS artışı arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Bunların yanı sıra NO düzeyindeki artış ve diğer oksidan ajanlar testiküler distrese bağlı değişimlerin histopatolojik dejenerasyona neden olduğu ileri sürülmüştür. İnsan spermatozoasındaki NO üzerindeki çalışmalar çelişkili ve yetersiz bulgular vermektedir. NO'nun seminal plazmadaki etkileri konsantrasyonuna göre değişmektedir. Düşük NO konsantrasyonu kapasitasyon ve zona pellucidaya bağlanmada anlamlı bir artışa sebep olur. Yüksek konsantrasyonlardaki NO ATP sentezini inhibe ederek sperm konsantrasyonunu ve motilitesini bozduğu tahmin edilmektedir. Fakat yapılan çalışmalarda NO'nun sperm motilite ve canlılığın korunmasına olan etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır (Yip KH ve ark. 2008).

eNOS ve nNOS testiste temel olarak bulunur ve damar tonusunun fizyolojik düzenlenmesine katkıda bulunmak için intraselüler Ca artışı için aktive edilir. eNOS leydig hücreleri, sertoli hücreleri, spermatogonya ve spermatisitlerde eksprese edilir. eNOS ve nNOS testis, iskemik testis ve 12 saatten daha az reperfüzyona uğramış

testiste az miktarda NO üretiminin kaynağıdır. 24 saat ve daha fazla süreli reperfüzyonlarda NO'in iNOS tarafından üretildiği düşünülmektedir. 48 ve 96 saatlik reperfüzyonlarda ise NO üretimi en üst seviyeye ulaşır. Mononükleer ve polinükleer inflamatuvar hücrelerde de iNOS gözlenmiştir. Reperfüzyonun erken fazında eNOS ya da nNOS nonspesifik bir şekilde gösterilir. Böylece artmış hipoksi ve NO<sub>2</sub>'nin vazodilatör etkisi gösterilmiş olur (Shiraishi K. ve ark. 2001). 720° 1 saatlik torsiyon periyodunun sonlarına doğru olan kan akımı 3.gün reperfüzyonu ile karşılaştırıldığında sham grubunda 5 kat fazla iken opere olan grupta ise 3 kat daha fazla bulunmuştur. 30 günlük detorsiyone olan kontrol grubunda kan akım debisi ise 40 kat artarken kontrol grubu 3.gün sonunda kan akımı torsiyon sonuna göre 20 kat artış göstermiştir. Geçmiş çalışmalarda iskemik reperfüzyon hasarında leydig hücrelerinin apoptozisi için bir kanıt görülmemesine rağmen leydig hücrelerinin fonksiyonunun bozulması mümkündür. Oksidatif stresin artması durumunda leydig hücre fonksiyonu bozulur. Çünkü sertoli hücreleri ve diğer hücre tipleri leydig hücreleri ile parakrin ilişki içindedirler. Oksidatif stres direk ya da indirek olarak etki gösterir (Turner TT ve ark. 1997)

Spermatik torsiyon sonrasında gelişen oksidatif stresin rolü testisi de içeren farklı organlarda iskemik reperfüzyon hasarı reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Akgür ve ark. 1993, 1994, Sarıca ve ark. 1997). İskemi reperfüzyon hasarı akciğer, kalp, böbrek ve karaciğer gibi organlarda gösterilmiştir. İskemi süresince; ne mitokondrial solunum zincirinde son elektron yakalayıcısı olarak ne de enzimatik olmayan ve serbest radikal reaksiyonlarında O<sub>2</sub> kullanılamaz. O<sub>2</sub> yeniden sağlandığında mitokondri yeniden normal fonksiyona döner fakat ROS üretimini artışı meydana gelir (Gonzalez-Flecha ve ark. 1993). Erken reperfüzyon süresince ROS üretiminin artışı reoksijenasyonda olduğu gibi non enzimatik reaksiyonlara dayanır. 1 saat torsiyonu izleyen 24 saatlik reperfüzyondan sonra ipsilateral ve kontralateral testiste oksidize glutatyon ve total glutatyon indirgenir. Preapoptotik durumlarda ve oksidatif streste hücrelerden açığa çıkan oksidatif glutatyon sadece 24 saatlik reperfüzyonda önemli oranda azalmıştır. Bu göstergeler oksidatif stresin torsiyona dayalı reperfüzyon gelişiminde rol aynadığının bir göstergesidir. İki klasik antioksidant enzim olan süperoksit dismutaz ve katalaz testis reoksijenasyonunda farklı bir karakter gösterir. Reperfüzyon gelişiminde



katalaz aktivitesi önemli derecede artar. Uzun süreli iskemiye izleyen 6 saat ve 2 saati geçmeyen torsiyonlardan sonra azalmış süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesi ipsilateral testiste reperfüzyondan sonra rapor edilirken kontralateral testiste görülmemiştir (Sarica ve ark. 1997 ve Saba ve ark. 1997).

## 1.10 Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü)

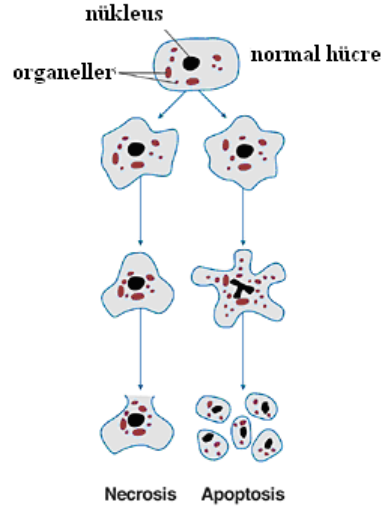
Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Akşit H. Bildik A. 2008, Tomatır A G, 2003, Öztürk F 2002). Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Köken olarak "apo-TOE-sis" 'den gelmektedir ve eski yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir (Touchette N. Fogle S. , 1991). Hücrelerin doğru yer, zaman ve sayıda olmasını sağlayan apoptozis mitozis ile dokuda sürekli bir denge halindedir (Cummings M C. ve ark. 1997). Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (Majno G. ve ark. 1995, Schwartzman R A. ve ark. ,1993 ).

Apoptozisde ana morfolojik olay, nukleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılırken, apoptoziste yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (Zhang J, Xu M 2002). Apoptozis, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur (Akşit H. Bildik A. 2008, Balakumran A. 1996).

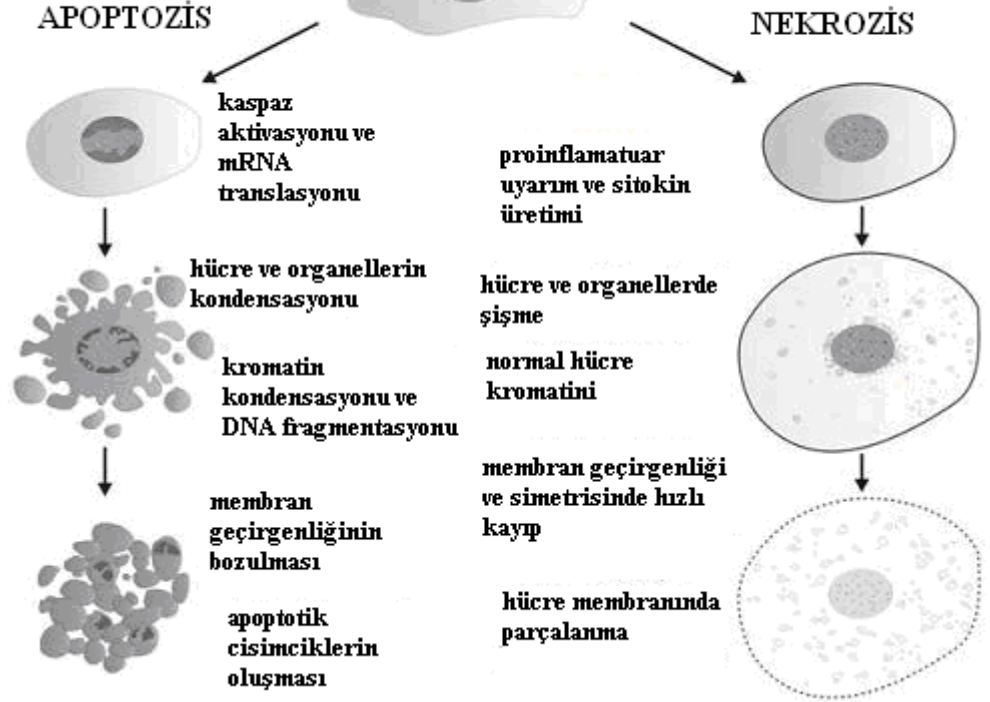
Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (Cohen J J. 1993). Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur ki bu yapı 'zeiozis' olarak tanımlanır (Tomatır A G, 2003). Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (Balakumran A. 1996). Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan

fosfotidilserin açığa çıkar (Balakumran A. ve 1996Cohen J J.1993Öztürk F 2002). Fosfotidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır (Tomatır A G, 2003). Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçi genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (Wyllie A H. 1980). Sitoplâzma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler (Öztürk F 2002, Balakumran A. 1996 ve Cohen J J.1993).

Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilirken nekrozis fizyolojik bir ölüm şeklidir. Apoptotik hücrede kromatin nukleus membranı agregasyon gösterir ve kondanse olur ancak nekroziste kromatin paterni normal hücredekine benzerdir. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepcikler “membrane blebs” oluşur. Apoptozis ile ölen bir hücrede hücre membranı intaktır ve enflamasyon gözlenmez; nekrozda ise, enflamasyon, hücresel şişme ve hücre zarının bozulması gözlenir (Orrenius S ve ark. 2004). Apoptozis bir hücre hasarına yanıt olarak meydana gelir oysa nekroz genelde hasar sonucu gelişir. Apoptozis önceden belirlenen bir yol ile koordineli olarak meydana gelirken, nekroz birçok biyokimyasal olaydan bağımsız olarak gerçekleşir ve hücrede enerji stoklarının tükenmesi ile aktive olur (Resim 1.10) (Denecker G. ve ark. , 2001, Krysko ve ark.2008).



**Programlı hücre ölümü  
yolağı**

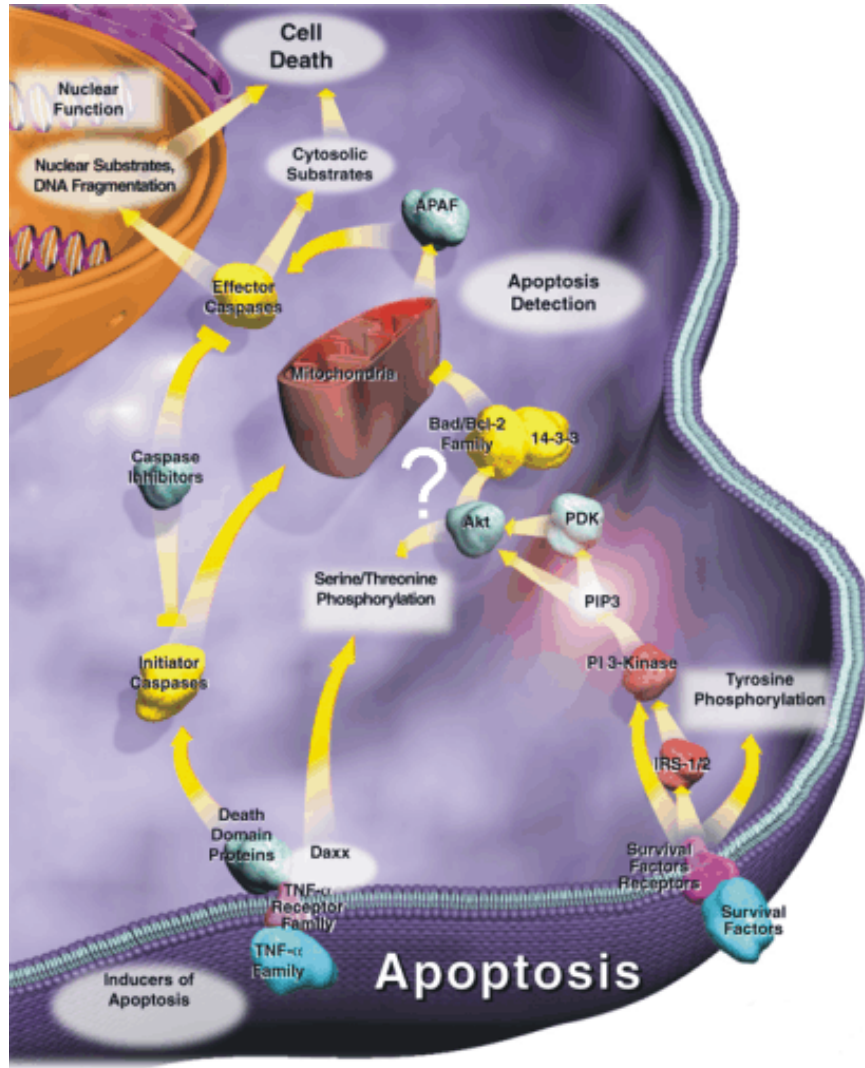


**Resim 1. 10** Apoptozis- Nekrosiz

Programlı hücre ölümü olgun dokularda intrinsek intihar programının aktivasyonu ile hasarlı, infekte ya da değişime uğramış hücreleri ortadan kaldırmak için hem gelişimde hem de homeostazisde önemli bir mekanizmadır. Apoptozisin başlamasına neden olan ve soy hakkında bilgi içeren sinyaller viral yangı sinyali ya da ekstrasellüler sinyallerdir. Ekstrinsik sinyaller apoptozisi başlatır, ya da baskılar, intihar edecek olan hücrelere yardımcı olabilir ve aynı sinyaller bir hücre tipinde kurtulmayı başlatabilir. İntihar programının aktivasyonu spesifik mRNA molekülerinin sentezini translasyonunu gerektirir. Programlı hücre ölümü bazen hücre ölümünü intrinsek mekanizmalar yoluyla transkripsiyon ya da translasyonu, kısıtlama ile de baskılayabilir (Mehmet H. , 2006). Bir hücrede apoptozis mekanizması iki yolla düzenlenir: Hücre dışından kaynaklanan, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ile (Tümör nekrozis faktör süperailisi üyeleri ve bunların reseptörleri) düzenlenen apoptozis, hücre içinden kaynaklanan, mitokondriyal yolla düzenlenen apoptozis (Scorrano L. ve ark. 2003). Hücre yüzeyi ölüm reseptörleri Tümör Nekrozis Faktör Reseptör (TNFR) süperailisine ait transmembran proteinlerinin bir ailesidir. Bu reseptörler hücre dışındaki bölgelerde tekrar eden sistein zengin bölgelerde yer alırlar. Ölüm reseptörleri sitoplâzmanın iç kısmında ‘ölüm bölgesi’ (death domain) denen protein zincirleri taşırlar. Ölüm bölgeleri, ölüm reseptörlerine ligand bağlandığı zaman apoptotik mekanizmayı uyarırlar ve hücre dışından gelen uyarıyı hücre içine iletirler (Ashkenazi A. ve ark. 1998).

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu ile sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi sonucu apoptotik süreçde geri dönülemez noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör Bcl- 2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin sitoplâzmaya saliverilmesi gerçekleşir veya sitokrom c'nin sitoplazmaya saliverilmesi baskılanır. Apoptozis indükleyici faktörün mitokondriden çekirdeğe geçmesi apoptozis başladığında ve AIF'nin salınımındaki artışı, mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybolması, periferel kromatin kondenzasyonu ve plazma membranında fosfolipidlerin ortaya çıkmasına neden olur (Verhagen A.M. ve ark. , 2002). Bunun sonucunda yüksek moleküler ağırlıklı (50 kbp) DNA fragmentasyonu gerçekleşir. Bu etkiler

kaspazlardan ve AIF'nin oksidoredüktaz aktivitesinden bağımsızdır (Miramar M. D. 2001). Kaspaz aktivasyonundan bağımsız olan EndoG aktivasyonu, nükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olabilir (Zha J. ve ark.1996). EndoG'nin salınımı, kaspaz aktivasyonuna paralel olarak apoptotik programı başlatabilir. Bax ve Bak, BH3-only proteinlerin mitokondriye hareket etmeleri (Ovalı E. 1999 ) ve sitokrom c salınımının düzenlenmesi için gereklidir. Hücrenin yaşayabilirlik durumu pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl- 2/Bax oranının bazı hematolojik malignensilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir (Resim 1. 11) .



**Resim 1. 11** Apoptozis

Bid proteini yaşayan hücrelerde sadece sitoplâzmadadır bulunur. Aktivasyonları sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımını sağlar (Luo X.ve ark.1998). Bad proteini: Bad, birçok normal hücrede bulunmaktadır. Bad'ın apoptotik veya yaşam sinyal yolağındaki etkisi proteinin fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile düzenlenir (Konishi Y. ve ark. , 2002). Bim ve Bmf proteinleri; Bim, normalde mikrotübüllerle ilişki içinde olan dynein motor kompleksi ile birlikte bulunur. Apoptozis indüksiyonu esnasında mitokondriye göç eder. Pro-apoptotik aktiviteye sahiptir ve Bmf, apoptozisin tetiklenmesi sırasında mitokondriye göç eder ve Bcl- 2 ailesi ile etkileşime girerler (Putch G. V. ve ark. , 2001).

Sitokrom c, apoptozis sırasında mitokondriden salındığında kaspaz aktivasyonunu başlatan, mitokondrial elektron zincirinin bir bileşenidir (Garrido C. 2006, Luo X. ve ark.1998). Mitokondriyal yolla tetiklenen apoptotik yolun erken fazında mitokondrial membran potansiyelinin bozulması ve ardından sitokrom c'nin salınması genel olarak önemli rol oynar (Grinberg M. 2002). Sitokrom c normalde iç mitokondri zarına anyonik fosfolipid 'kardiolipin' ile birlikte bağlıdır. Kardiolipin mitokondriye özeldir, iç mitokondri zarında predominant olarak bulunur. Kardiolipin ile sitokrom c'nin ayrılması ve sitozole salınması apoptozisin başlaması için ilk adımdır. Mitokondrial elektron transport zinciri ile reaktif oksijen radikallerinin ortaya çıkması; sitokrom c'nin harekete geçmesi ve kardiolipinden ayrılması ile sonuçlanır (Resim 1.15) (Petrosillo G ve ark. 2001).

Apoptozis Başlatıcı Faktör (AIF) mitokondrinin iç membranında bulunur. AIF 57 kD ağırlığında bir flavoprotein olup apoptozis başlangıcında mitokondriden çekirdeğe geçerek kromatin kondensasyonu yoluyla DNA fragmentasyonunu sağlar. AIF oksidoredüktaz aktivitesi gösterir (Yu S. W. ve ark. 2002). Bu etkiler kaspazlardan ve AIF'nin oksidoredüktaz aktivitesinden bağımsızdır AIF'nin çok fazla salınımı sonucunda, periferal kromatin kondensasyonu, mitokondrial transmembran potansiyelinin kaybolması ve plazma zarında fosfolipidlerin ortaya çıkması ile yüksek moleküler ağırlıklı (50 kbp) DNA fragmentasyonu meydana gelir (Miramar M.D. ve ark. 2001).

Apoptozun düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da

bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon regülatör geni olan p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptozise yönlendirir. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir (Tomatır A. 2003, Israels LG ve Israels ED. 1999).

Kaspazlar apoptozis mekanizmasında yer alan önemli protein grubudur. Hücre sitoplazmasında inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler. Aktif merkezlerindeki sisteinden dolayı sistein proteaz olarak adlandırılan enzim grubudur. Apoptozisde hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler "effectors" olarak bilinirler. Bu güne kadar tanımlanan 14 kaspaz bulunmaktadır. Bunun haricinde kaspaz ailesi fonksiyonlarına göre iki alt kategoriye ayrılır:

1- Başlatıcı kaspazlar 2- İlerletici kaspazlar. Başlatıcı kaspazlar, 90 aminoasitten fazla aminoasit içeren Kaspaz-gerektiren domain (CARD) bölümü ile ölüm domaini (DD) ve ölüm efektör domaini (DED) içeren N-terminal domain öncülü ile karakterizedir. Apoptotik sinyal yolunun erken safhasında etki gösterirler ve apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini ilerletici kaspazlara iletirler (Hofmann K. ve ark. 1997). Kaspaz İnhibitörlerinden bazılarının önemli olduğu durumlar nöro-dejeneratif hastalıklar, iskemi-reperfüzyon zedelenmesi ve otoimmün hastalıklardır. Kaspazlar potansiyel hedefleri oluşturarak bu hastalıkların tedavisinde inhibitör tedavide kullanılabilirler (Yılmaz N. ve Pençe S. 2002). Reseptörler aracılığıyla kaspaz aktivasyonuna ve apoptozise yol açarlar. Diğer yol mitokondriden Sitokrom-c sitozol içerisine bırakılır ve kaspaz aktivasyon proteinine (Apaf 1) bağlanır. Ardından Apoptozom olarak adlandırılan multiprotein yapısındaki kaspaz aktive eden kompleksin toplanmasına neden olur (Resim 1.13).

Apoptozis tanı yöntemleri içerisinde apoptotik hücre morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan ışık, floresan, lazerli konfokal, elektron ve faz-kontrast mikroskobu ile inceleme yer alır. DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde agaroz Jel elektroforezi, enzimatik yolla DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi ISEL, TUNEL, İn situ hibridizasyon tekniği ve Anneksin-V yöntemi ile



apoptozise özgü proteinlerin saptanması ve flow sitometri yöntemi kullanılır (Muppidi J ve ark. 2004, Taşdemir E, 2008, Krysko DV, 2008).

DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi: DNA'nın 180- 200 baz çifti ve bunun katları şeklinde kırılması olarak ifade edilen DNA fragmentasyonu programlı hücre ölümünün belirleyici özelliğidir (Arends M. ve ark.1991). DNA'nın bu özelliği agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Fakat bu yöntemlerle apoptozisin kesinliği değil DNA'nın fragmentasyonunun anlaşılması için tanımlayıcıdır. Enzimatik yolla DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi: TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt]-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) yöntemi 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından doku kesitlerinde ve hücrelerde ilk defa kullanılmıştır. TdT enziminin aktivitesi için DNA'nın 3' ucu biotinlenmiş dUTP ile birleşir. İn situ olarak DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde ise (ISEL), çoğunlukla Kornberg polimeraz (E. Coli'den elde edilen DNA polimeraz) DNA polimeraz I'in Klenow fragmenti ve TdT kullanılmaktadır(Hilton D.A ve ark. 1997). Bu yöntemler, tek ya da çift iplikli DNA kırıklarına işaretlenmiş nükleotidlerin bağlanması esasına dayanır. DNA fragmentasyonunda DNA iplikleri internükleozomal bölgelerde kırılma olur ve DNA'nın 3'-OH ucu ortaya çıkar. Avidin peroksidaz tekniği için 3,3'-diaminobenzidine (DAB) veya 3-amino- 9-ethylcarbazole (AEC) gibi kromojenler kullanılarak biotinlenmiş nükleotidler belirlenir. Dioksijenin- işaretli nükleotidler, alkalin fosfat, biotin ya da peroksidaz işaretli sekonder antikorlar kullanılarak belirlenebilir. Hematoksilin, metilgreen ya da DAPI ile rutin artalan boyaması kullanılarak TUNEL veya ISEL reaksiyonları belirgin hale getirilebilir. Ancak bu iki metodun zayıf tarafları vardır. Bunlardan birincisi apoptozis altındaki hücrelerde internükleozomal DNA fragmentasyonunun ölçülememesi, ikincisi ise DNA fragmentasyonunun apoptozisle mi ilişkili olduğu yoksa DNA'nın rasgele olarak nekrozis ile mi parçalandığı fark edilemeyebilir. O nedenle apoptotik DNA fragmentasyonu biyokimyasal analizler ile desteklenmelidir.

### **1.11 Testiste apoptozisin rolü**

Testisteki germ hücre dejenerasyonu hem gelişimde hem de erişkinde oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. Ve sıçanlarda doğurma zamanına kadar testisteki

hücrelerin yarısının öldüğü bilinmektedir. Bu dejenerasyon sırasında apoptozis yoluyla ölüm en sık kullanılan mekanizmadır. Bu mekanizmanın içerisinde Bcl- 2 ailesi, kaspazlar, ölüm reseptörleri ve p53 gibi faktörler yer alır. Doku canlılığında ve devamında, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptozis, testiküler dokuda da sık saptanan bir fenomendir. Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır. Normal spermatogenez içinde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar (Sinha Hikim A P. 1998, Sharpe R M.1994). Apoptozis, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar (Beumer T L. ve ark. ,2000). Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir (Jefferson K P. Ve ark. 2000). Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptozis gerçekleştiği bildirilmiştir (Kerr J B. 1992).

Testiste, defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin % 75'i apoptozise maruz kalır ve apoptozisin doğal bir mekanizma olarak normal spermatogenez sırasında sperm üretimini %25 ile %75 arasında değişen oranda azalttığı bilinmektedir (Hsueh A J W. ve ark. 1996, Kerr 1992, Allan D. J. ve ark. 1987, Huckins, 1978). Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (Ayaşhoğlu E. , 2001, Hikim S. ve ark. 2000, Rodriguez I. ve ark. 1997). Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artış görülebilir (Heiskanen P. ve ark.1996 ve Ikeda M. 1999). Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozisinin hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (Tapanainen J S. ve ark. 1993 ve Yin Y. ve ark. 1997). Hipofizektomize immatür ratlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde masif apoptozis ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da HCG tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir (Heiskanen P. ve ark.1996 ve Yin Y. ve ark. 1997). Ayrıca, gonadotropin ya da testosteron eksikliği dışında matürasyon arresti ve hipospermatogeneze yol açan tüm klinik durumlarda

da apoptozis görülebilir (Lin W. ve ark. 1999). Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere olan sensitivitesi de germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini artıran diğer bir faktördür (Blanco-Rodriguez J. 1998). Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptozis gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (Korsmeyer S J. 1995).

Bizim çalışmamızda 6 saatlik iskemi sonrasında 1, 3, 7 ve 28 günlük dönemlerde reperfüzyon sağlanmış testislerde hem oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu hem de oluşan hasara bağlı apoptozis yolu ile ölen hücre araştırıldı. Çalışmada ligasyon ve torsiyon olmak üzere iki farklı yolla iskemi oluşturulmuş, ligasyonda direk iskemi öngörülürken torsiyonda venöz dönüşün bozulmasını içeren ama sonuç olarak dolaşımın bozulmasına bağlı indirek iskemi uygulandı. Genellikle reperfüzyonun 1. , 3. ve 7. gününde histolojik olarak artmış hasara uyumlu hem artmış NOS tanımlaması hem de apoptotik ölüm gözlemlendi. 28. günde reperfüzyon hasarının azalmasına bağlı olarak NOS ve apoptozisin azaldığı görüldü.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Yapılan işlemler için C.B.Ü. etik kurulu onayı alındı. Oluşturulan 11 grupta (torsiyon, ligasyon gruplarında oluşturulan her bir reperfüzyon grubu için (1, 3, 7 ve 28 günlük) 4'er adet, , sham ligasyon grubu için 1 adet, sham torsiyon grubu için 1 adet ve kontrol grubu için 1 adet) toplam 35 adet 250±50 gram ağırlığında Wistar cinsi sağlıklı erkek sıçanlar ksilazin+ketamin anestezisi altında sağ testislerine 6 saat süre ile iskemi uygulandı. Sham yapılan deneklerde arter ligasyonu ve testis torsiyonu yapıldıktan hemen sonra açıldı. 1, 3, 7 ve 28 günlük reperfüzyonu takiben anestezi altında servikal dislokasyon sonrası hayvanlara kardiyak perfüzyon ile fiksasyon yapıldı. Çıkarılan testisler uzunlamasına ikiye bölünüp % 10'luk formaldehitte 48 saat daha fiske edildi, alkol serisinde dehidrate edilip parafine gömüldü. 5 µm'lik seri kesitler deparafinize edilip, H&E ile boyandı. Mikroskop altında histolojik ve morfometrik bakıları yapıldı. Kesitler histoloji için H-E, apoptozis değerlendirilmesi için TUNEL ile indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Hazırlanan preparatlar Olympus BX- 40 model ışık mikroskobu altında incelendi.

**2.1. İskeminin oluşturulması ve reperfüzyon:** Ligasyon oluşturabilmek için ksilazin/ketamin anestezisi altında skrotal kese açılarak sağ subkapsüler testiküler arter testis girişinin 1 cm altından 5/0 cerrahi iplik ile bağlandı. Torsiyon grupları için ise; ratların sağ testisi 360° saat yönünde çevrildi ve scrotuma 5/0 cerrahi ip ile fiske edildi. 6 saat sonunda detorsiyon işlemi yapıldı ve reperfüzyona imkân sağlandı. 6 saatin sonunda; grupların tümünde uygulama yapılan taraftaki testislerde makroskobik olarak total nekroz gözlemlendi. 6 saatlik iskemiye takiben ligasyon ve torsiyonun ortadan kaldırılması ile kan akımının yeniden sağlanmasının ardından 1 gün, 3 gün, 7 gün ve 28 gün reperfüzyon grupları oluşturulmuş ve farklı deney gruplarındaki reperfüzyonun farklı zaman dilimlerindeki etkileri incelenmiştir.

**2.2. Histokimya:** H&E boyaması ile seminifer tübüllerde hücre hasarı analizi yapıldı (Tablo 2.2). Seminifer tübüllerde germ hücrelerinde dejenerasyon, düzensizlik, kayıp, katman sayılarında azalma, tübüllerde yırtılma spermatogenik

hücrelerin lümen için eksfoliasyonu gözlemlendi. Morfolojik kriter olarak Johnson skorlaması ile histolojik hasarda 4 skala belirlenmiştir (Cosentino MJ ve ark. 1986, Sukhotnik I. ve ark. 2006). 1. derece; normal testiküler histoloji, germinal hücrelerde düzenli bir yapı, spermatogenezin tamamının varlığı ve normal tübül yapısı 2. derece; az düzenli hasar, seminifer tübüllerde ayrılmış germinal hücreler, bozulmuş spermatogenez ve çoğu spermatozoada hasar, 3. derece hasarda bozulmuş histoloji, spermatozoanın oldukça azalması, germinal hücrelerde tek tek görünüm, küçülmüş piknotik çekirdek, seminifer tübül sınırlarında belirgin azalma, 4. derecede germ hücrelerinde koagulatif nekroz yakından ilişkili ayrılmış seminifer tübül, spermatozoa ve spermin bulunmaması ve çok az miktarda spermatosit bulunması ve sertoli hücre hasarının görülmesi olarak derecelendirilmiştir (Özokutan H. ve ark. 2000).

**2.3. NOS immunohistokimyası:** Deney sonunda yüksek doz anestezi ile öldürülen hayvanlara önce nötral formalinle kardiyak perfüzyon uygulandı daha sonra dokular alınarak 48 saat 10% formalin ile fikse edildi. Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde 37° etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solüsyonu ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti hidrojen peroksidaz ikincil antikoru ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Diaminobenzidin tetrahidroklorit) ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu ile kapatıldı (Tablo 2.3).

**2.4. TUNEL immunohistokimyası:** TUNEL Yöntemi İle apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega G7130

kiti kullanılarak 5 µm kalınlığındaki parafin bloklardan alınmış kesitlere uygulandı. Kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde ısı ile deparafinize edildi. Ardından 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinize edildi. Azalan alkol serileri ile 2'şer dakika (%95, %80, %70, %60) rehidratasyon uygulandıktan sonra dokular serum fizyolojik ile oda ısısında 5 dakika (%0.85 NaCl) muamele edildi. 5 dakika PBS (fosfat buffer solusyonu) ile oda ısısında yıkandı. Doku kesitleri %4 paraformaldehit ile 15 dakika oda ısısında fiske edildi. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20-µg/ml proteinase K 20 dakika doku kesitlerine uygulandı. PBS ile yıkamayı takiben %4'lük paraformaldehit ile 5 dakika yeniden fiksasyon yapıldı. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. Kesitler 5- 10 dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutuldu. TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37 °C de 60 dakika plastik cover slipler kesitleri kapatacak şekilde konarak tutuldu. 15 dakikalık SSC yıkamasının ardından 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 3- 5 dakika hidrojen peroksit uygulanması sonrası 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı, 1/500 oranında PBS ile hazırlanan Streptavidin HRP solüsyonu ile 30 dakika oda ısısında inkübasyona tabi tutuldu. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı ve ardından DAB (Diaminobenzidin tetrahydroclorür) ile boyama yapıldı, birkaç kere distile su ile yıkama yapıldı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı. Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptanmaya çalışıldı. Negatif kontrol için primer antikor yerine PBS, pozitif kontrol olarak da apoptozis olduğu bilinen testis dokuları kullanıldı (Tablo 2.4). Ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirildi.

**2.5. Morfometrik analiz:** Parametrelere göre değerlendirilen veriler, ortalama ve standart sapmaları hesaplanarak ANOVA istatistiksel analiziyle incelenip anlamlılıkları bulundu.

### 3.BULGULAR:

**3.1 Makroskopik Bulgular:** Örneklerin çekilen makroskopik görüntülerinde kontrol ve sham grupları arasında morfolojik olarak fark gözlenmezken hem torsiyon hem de ligasyon gruplarında özellikle zamana bağlı hasar ve bazı olgularda atrofi saptandı. 1, 3 ve 7. günler için alınan makroskopik görüntülerde zamana bağlı artan hasarın yaptığı morfolojik değişiklikler (ödem, konjesyon, damarlarda vazodilatasyon, atrofi) gözlemlendi (Resim 3. 1). Kontralateral testislerin makroskopik bakışında kontrol ve her iki sham grubu için hasarın yokluğundan dolayı resimler konmadı ve ipsilateral testislerde az miktarda hasar gözlemlendi. 1, 3, 7 ve 28. günler için hasarın boyutu değişmezken ligasyon ve torsiyon arasında da önemli fark gözlemlenmedi.

**3.2 Işık mikroskopik bulgular:** Kontrol grubunda testis kesitlerinde seminifer tübül sınırların düzgün olduğu, tübül germ hücrelerinin düzenli bir organizasyon içerisinde normal görünümde buldukları spermatogonyumdan başlayarak spermiyogenezin tüm evrelerindeki germ hücrelerinin normal görünümde olduğu saptandı. İntersitisyel aralıktaki leydig hücrelerinin, daha küçük çekirdekli makrofajların ve damarların normal yapılarını korudukları tesbit edildi. Sham grubu hayvanlarda normalden çok az farklı olmak kaydıyla seminifer tübül sınırlarının düzensizleştiği bazı alanlarda damarlarda dilatasyona benzer bulguların varlığı saptandı.

Ligasyon grubu testislerin 1.gün ışık mikroskopisi HE ile değerlendirmede; tümünde seminifer tübülilerde; germ hücrelerinde dejenerasyon, düzensizlik, kayıp, katman sayılarında azalma, tübülilerde yırtılma ve çaplarında azalma, spermatogenetik hücrelerin lümen içine ekfoliasyonu ve intraepitelyal vakuolizasyon görüldü. Seminifer tübülilerde yırtılma ve nekroz oranı artmış, olarak bulundu. Ligasyon grubu testislerin 3.gün değerlendirmesinde seminifer tübülilerde spermatogenetik epitelyum katmanında azalma, seminifer tübüllerde ayrılma, intersitisyel hücrelerde belirgin bir kayıp gözlemlendi. İnterstisyumdaki değişiklikler ise ödem ve daha çok fibrozis artışı şeklinde belirlendi. Ligasyon grubu testislerin 7.gün değerlendirmesinde spermatogenetik epitelyumda dejenerasyon, primer

spermatozitlerde ve setoli hücrelerinde kayıp, intersitisyel alanda ödem, spermatogenetik epitelyum hücrelerinde ise lümen içine eksfoliasyon bulundu. İntersitisyel hücrelerde hasarın daha az olduğu gözlemlendi. Ligasyon grubu testislerin 28. gün değerlendirme: seminifer tübüllerde herhangi bir ayrılma gözlenmezken, intersitisyel alanda oldukça artmış ödeme rastlandı. Spermatogenetik epitelyum katmanlarında azalma gözlenirken, spermatogonyum hücrelerinde bir dejenerasyona rastlanmadı. Primer spermatozit ve sertoli hücreleri belirgin değildir. Yapılan morfometrik analizde 1. günde başlayan 3. ile 7. günde artan ve 28. günde azalan hasar olduğu bulundu. L1 ve L7 ( $p<0.01$ ) ile L7 ve L28 arasında anlamlı ( $p<0.05$ ) fark gözlemlendi (Tablo 3. 1).

Torsiyon grubu testislerin 1.gün ışık mikroskopisinde HE boyaması ile yapılan değerlendirmede seminifer tübülilerde düzensizlik; germ hücrelerinde dejenerasyon, düzensizlik, kayıp, katman sayılarında azalma, tübülilerde yırtılma ve çaplarında azalma, spermatogenetik hücrelerin lümen içine eksfoliasyonu ve intraepitelyal vakuolizasyon görüldü. Seminifer tübülilerde yırtılma ve nekroz oranı artmış, olarak bulundu. İntersitisyel alanda hücre kaybı ve minimal düzeyde ödem gözlemlendi. Torsiyon grubu testislerin 3.gün HE boyaması ile değerlendirmesinde bu bulgulara ek olarak; seminifer tübülilerde ayrılma, yırtılma ve dağılma, spermatogenetik epitelyum tabakasında kayıplar ve dejenerasyon, artmış ödeme birlikte germ hücre kaybı ve intersitisyel alanda hücre kaybına rastlandı. Torsiyon grubu testislerin 7.gün HE boyaması ile değerlendirmesinde: seminifer tübüllerde spermatogenetik hücrelerin bazal mambrandan ayrıldığı, dejenerasyona uğradığı ve dev hücre formasyonlarının görüldüğü belirlendi. Tübül içinde artmış ödeme rastlanmış, intersitisyel alanda da ödem gözlemlendi. Torsiyon grubu testislerin 28.gün HE boyaması ile değerlendirme: spermatogenetik epitelde spermatogonyum ve primer spermatozitlerde kayıp gözlenirken, intersitisyel hücrelerde herhangi bir hasar gözlenmedi. Yapılan morfometrik analizde 1. Günde başlayan 3. ile 7. Günde artan ve 28. Günde azalan hasar olduğu bulundu. T1 ile T28 ve T3 ile T7 dışında tümünde anlamlı ( $p<0.01$ ) fark gözlemlendi (Tablo 3. 1).

Ligasyon ve Torsiyon gruplarının karşılaştırılmasının değerlendirilmesinde 1.gün Işık mikroskopisi HE ile yapılan değerlendirmelerde; tümünde seminifer



tübülilerde; germ hücrelerinde dejenerasyon, düzensizlik, kayıp, katman sayılarında azalma, tübülilerde yırtılma ve çaplarında azalma, spermatogenetik hücrelerin lümen içine eksfoliasyonu ve intraepitelyal vakuolizasyon görüldü. Seminifer tübülilerde yırtılma ve nekroz oranı artmış, olarak bulundu. İnterstisyumdaki değişiklikler ise daha çok fibrozis artışı şeklinde belirlendi. Torsiyon grubunun örneklerinin ligasyona oranla daha iyi olduğu gözlemlendi. Torsiyon ve ligasyon gruplarının karşılaştırılmasının değerlendirilmesinde 3.gün değerlendirme: Her iki grupta da seminifer tübüllerde ayrılma, spermatogenetik hücre tabakasında azalma, intersitisyel hücrelerde kayıp ve torsiyon grubunda tübül lümenine spermatogenetik hücre eksfoliasyonu gözlemlendi. Torsiyon grubunun örneklerinin ligasyona oranla daha kötü olduğu gözlemlendi. Torsiyon ve ligasyon gruplarının karşılaştırılmasının değerlendirilmesinde 7.gün değerlendirme: torsiyon grubu seminifer tübüllerinde dev hücre formasyonu gözlenirken ligasyon grubunda bu hücrelere rastlanmadı. Ayrıca torsiyon grubu lümen içi ve intersitisyel alanda ödem artışı gözlenirken ligasyon grubunda sadece intersitisyel alanda ödeme rastlandı. Torsiyon grubunun örneklerinin ligasyona benzediği gözlemlendi ve torsiyon grubunda dev hücre formasyonu ayırıcı oldu (Resim 3. 2).

Torsiyon ve ligasyon gruplarının karşılaştırılmasının değerlendirilmesinde 28.gün değerlendirme: Torsiyon grubunda spermatogenetik epitelyum tabakasında ciddi bir kayıp gözlemlendi, lümen içinde ya da tübüller arasında herhangi bir ödeme rastlanmadı. Ligasyon grubunda ise intersitisyel alanda bir fibrozis görülürken spermatogenetik hücre tabakasında kayıp gözlemlendi. Morfometrik analiz sonuçlarında testislerin HE boyalı kesitlerinde JS kriterlerine göre hasarın reperfüzyon sonrası 1, 3 ve 7. gün arttığı ve 28. gün azaldığı saptandı. Ligasyona göre torsiyonun hez zaman diliminde daha çok hasar oluşturduğu bulundu. L1 ile T1 ( $p<0.05$ ), L3 ile T3 ( $p<0.001$ ), L7 ile T7 ( $p<0.05$ ) ve L28 ile T28 ( $p<0.05$ ) arasında anlamlı farklılıklar saptandı (Tablo 3. 1).

Kontralateral testislerin torsiyon ve ligasyon gruplarının karşılaştırılmasında; Kontralateral testislerin HE boyalı kesitlerinde JS kriterlerine göre hasarın ipsilateral testislere oranla çok daha az olduğu ve yine hasarın reperfüzyon sonrasında 1 ve 3. gün arttığı ve 7. ve 28. gün azaldığı saptandı. Ligasyona göre torsiyonun hez zaman diliminde daha çok hasar oluşturduğu bulundu. L1 ile L3 ( $p<0.05$ ) ve T1 ile T3

( $p<0.05$ ) anlamlı fark saptanırken grupların 1, 3, 7 ve 28 gün karşılaştırılmalarında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 3. 2).

### 3.3 İmmunohistokimya bulguları

Kontrol ve sham gruplarında hem ipsilateral hem de kontralateral testislerde bazal düzeyde NOS varlığı görüldü. Bazal düzeydeki iNOS boyamasının her zaman eNOS'tan daha fazla olduğu saptandı.

Ligasyon ve torsiyon grubu karşılaştırılmasında eNOS boyaması için torsiyon grubunda ligasyon grubuna göre daha fazla olan tanımlama, spermatogonyum ve primer spermatozoidlerde daha yoğun olduğu saptandı. 1.gün değerlendirmelerinde eNOS tanımlanmasının spermatogenetik epitelde ve spermatogonyumlarda olduğu gözlemlendi. 3.gün değerlendirmesinde ligasyon grubu ile torsiyon grubu benzerlik gösterirken tanımlamanın spermatogonyum ve primer spermatozoidlerde olduğu saptandı. 7.gün değerlendirmesinde eNOS tanımlanmasının arttığı torsiyon grubunda daha belirgin olduğu bulundu (Resim 3. 3). 28.gün değerlendirmesinde 7. gün bulgularına göre daha az tanımlama saptandı. Ligasyon grubunda eNOS ekspresyonunun torsiyon grubundan daha az olduğu gözlemlendi. L3 ve L7 ile L28 arasında anlamlı ( $p<0.05$ ) fark saptandı. T1 ile T7 ve T3 ile T28 arasında anlamlı ( $p<0.05$ ) ayrıca T7 ile T28 arasında anlamlı ( $p<0.01$ ) fark gözlemlendi. 3 ve 7. gün ( $p<0.05$ ) karşılaştırmaları dışında anlamlı fark bulunmadı.

iNOS boyamasının eNOS'a benzer şekilde tanımlamanın intersitisyel alan ve spermatogonyumlarda var olduğu görüldü. iNOS boyaması ile eNOS boyaması arasında 1. gün reperfüzyonu takiben iNOS tanımlaması eNOS tanımlamasına göre daha fazla bulunurken ligasyon grubunda eNOS tanımlaması daha fazla saptandı. 3, 7 ve 28 günlük reperfüzyonu takiben ise eNOS tanımlaması torsiyon grubunda daha fazla görüldü. (Resim 3. 4). L1ve T1, L3 ve T3, L7 ve T7, L28 ve T28 grupları arasında anlamlı ( $p<0.05$ ) bir farklılık gözlemlendi.

NOS boyalarının morfolometrik analizlerinde hem eNOS (Tablo 3. 3) hem de iNOS (Tablo 3. 4) hasarla uyumlu bir şekilde artış olduğu ve 28.günde azaldığı saptandı

Kontralaterallerin iNOS torsiyon ve ligasyon gruplarının karşılaştırılmasında ipsilateral testislerden daha az olmak üzere ve zamana bağımlı benzer şekilde NOS tanımlamaları görüldü.

Kontralateral testislerin morfolometrik analizde iNOS tanımlamasının hasar ile uyumlu bir şekilde boyandığı ve zamana bağılı 7.güne kadar artış gösterdiği ve 28.günde azaldığı görüldü. L1ve T1, L3 ve T3, L7 ve T7, L28 ve T28 grupları arasında anlamlı ( $p<0.05$ ) bir farklılık gözlemlendi (Tablo 3. 5).

### 3.4 TUNEL bulguları

Kontrol ve sham gruplarında az miktarda TUNEL + hücre varlığı görüldü. Kontrol ve sham grubu kontralateral testislerin yine az miktarda apoptotik hücre içerdiği saptandı.

Testislerin torsiyon ve ligasyon grubu karşılaştırılmalarında TUNEL boyamasında 1.gün yapılan incelemede nekrotik alanların yanı sıra azalmış olan spermatogenetik epitelde spermatogonyum ve primer spermatositlerde apoptotik hücelere rastlandı. 3. gün değerlendirmesinde TUNEL pozitif hücre oranında anlamlı olmayan ( $p>0,05$ ) bir artış gözlenirken, 7.gün spermatogonyum hücelerinde apoptozis anlamlı ( $p<0,05$ ) bir artış gösterdi. Primer spermatositler büyük oranda harabiyete uğramış olup az miktarda apoptozis göstermişlerdir. 28.gün değerlendirmesinde spermatogonyum hücelerinde artmış apoptozis gözlenmiş olup, primer spermatosit hücelerinde apoptotik hücelere rastlanıldı (Resim 3. 5).

TUNEL morfometrik analizi ile histolojik bulguları destekler şekilde 1, 3 ve 7. günlerde artmış ancak 28.günde anlamlı ( $p<0,05$ ) bir şekilde azalmış özellikle torsiyon grubunda her durum için daha da belirgin bir apoptozis profili görüldü. L1 ve T1, L3 ve T3, L7 ve T7 grupları arasında anlamlı ( $p<0,05$ ) bir farklılık gözlenirken L28 ve T28 grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. T3 ve T28 grupları arasında ( $p<0,05$ ) ile T7 ve T28 grupları arasında ( $p<0,01$ ) oranında anlamlı bir farklılık gözlemlendi (Tablo 3. 6).

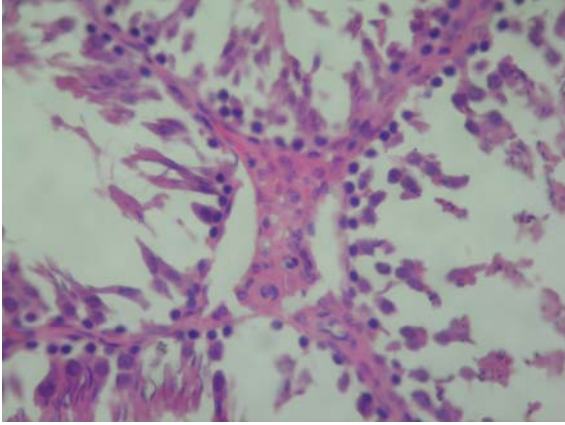
Kontralateral testislerin torsiyon ve ligasyon grubu karşılaştırılmalarında TUNEL boyamasında 1.gün değerlendirmesinde apoptotik hücre lokalizasyonunun ipsilateral testislerle benzer şekilde gerçekleştiği ve torsiyon grubunda da belirgin olduğu görüldü. 3 ve 7.günlerde artan hasarın 28.günde azaldığı bulundu (Resim 3.6).

Kontralaterallerin morfometrik analizde ipsilaterale benzer şekilde ancak her zaman dilimi ve durum için daha az olmak üzere apoptozisin gerçekleştiği ve torsiyonda belirginleştiği bulundu. L1 ve T1, L3 ve T3, L7 ve T7, L28 ve T28 grupları arasında anlamlı ( $p<0,05$ ) bir farklılık gözlemlendi (Tablo 3. 7).



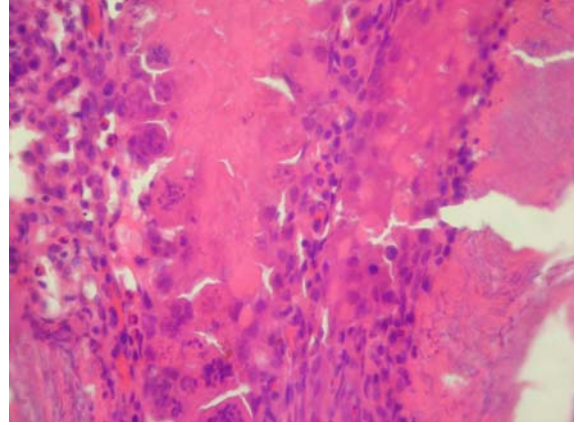
LİGASYON 3.GÜN VE TORSİYON 3.GÜN (x16)

**Resim 3. 1:** Testislerin makroskopik görüntülerinde ligasyon grubunda arteriyal dolaşımın bozulmasına bağlı soluk renk hâkimiyeti gözlemlendi. Torsiyon grubunda venöz dönüşün bozulmasına bağlı mor renklenme ve 1 ve 3. günlerde hem ligasyon hem de torsiyon için belirgin hasar görülürken, 7 ve 28. günlerde makroskopik olarak belirgin bir hasara rastlanmadı.



7.GÜN H&E LİGASYON

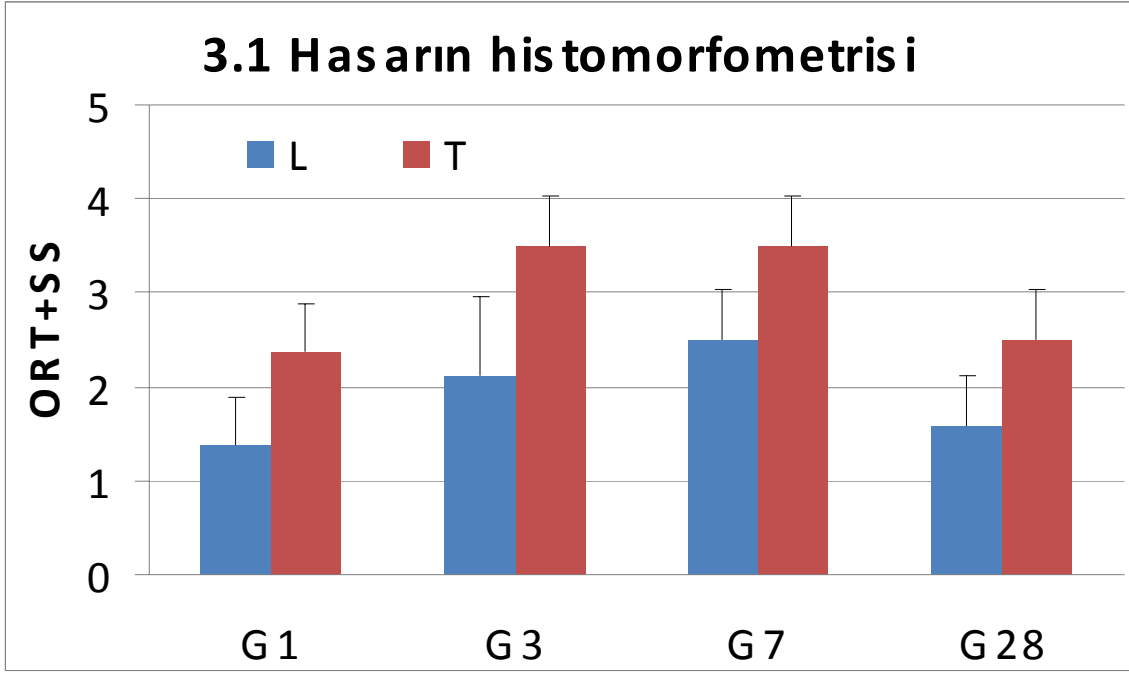
(X400)



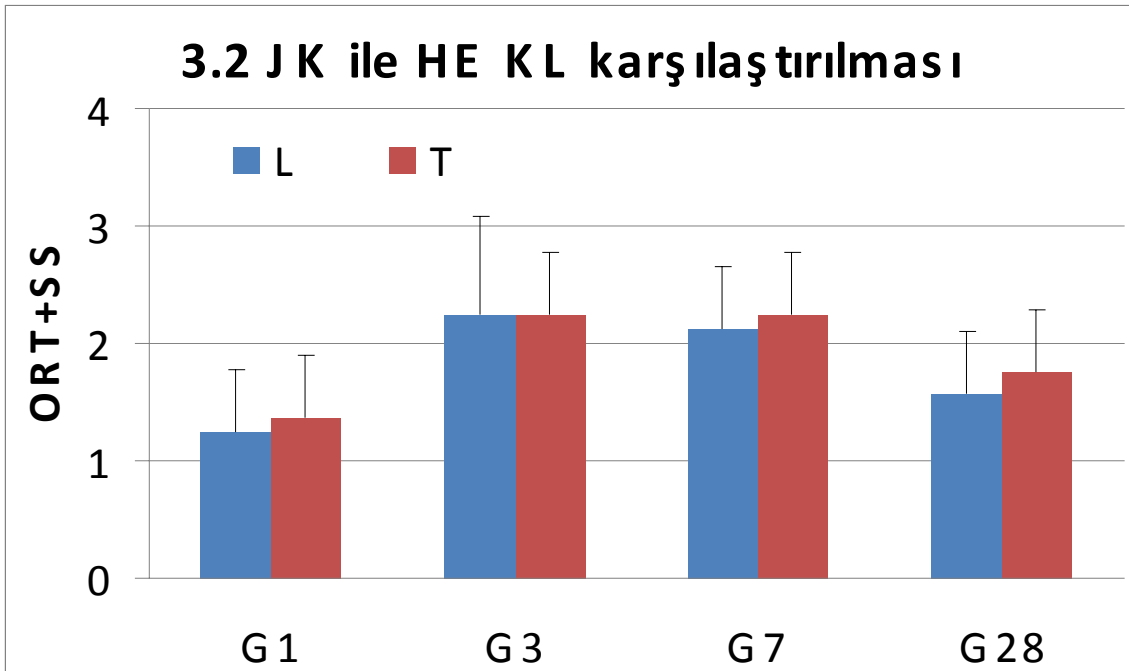
TORSİYON

(X400)

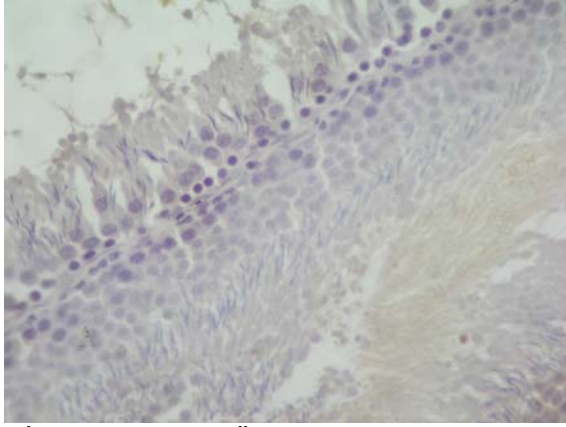
**Resim 3. 2:** Torsiyon grubuna ait 7. günde saptanan dev hücre formasyonu



**Tablo 3.1:** Testislerin JS kriterlerine göre HE karşılaştırmalarında hasarın histomorfometrisi. 7.güne kadar hasarın anlamlı arttığı ve 28.gün azaldığı ayrıca torsiyon hasarının ligasyon grubuna göre her zaman anlamlı olmayan bir Resimde daha az olduğu bulundu.

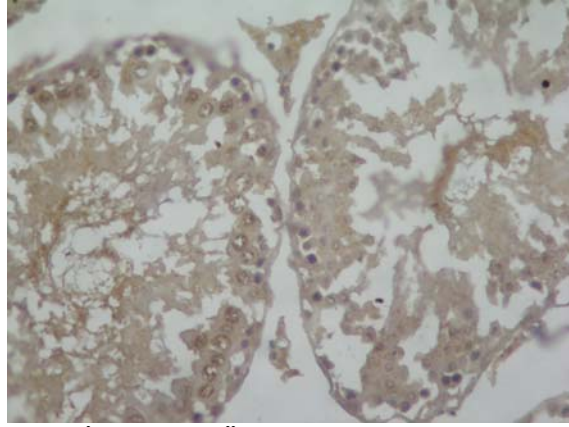


**Tablo 3.2:** Kontralateral testislerin JS kriterlerine göre HE karşılaştırmalarında 3. günde eşit, 7 ile 28.gün azaldığı ayrıca torsiyon ve ligasyon gruplarında hasarın birbirine yakın değerler gösterdiği gözlemlendi.



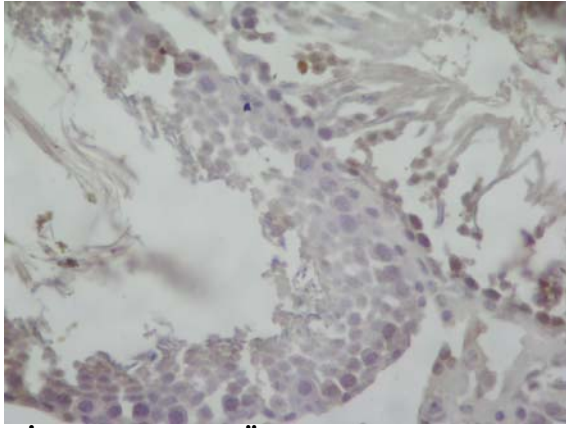
LİGASYON 1. GÜN

eNOS



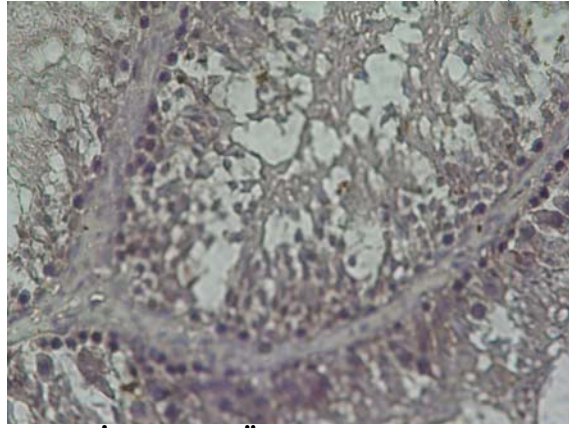
TORSİYON 1.GÜN

eNOS(X400)



LİGASYON 7. GÜN

eNOS

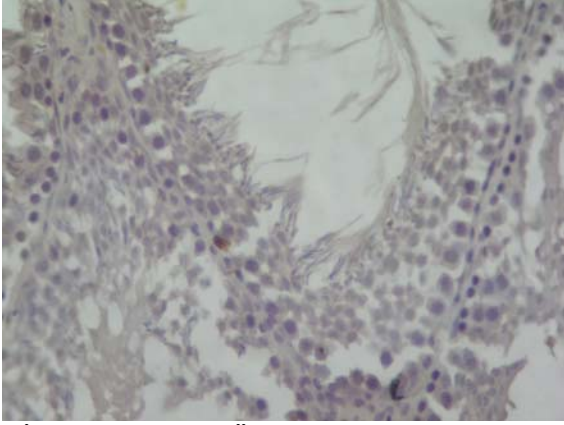


TORSİYON 7.GÜN

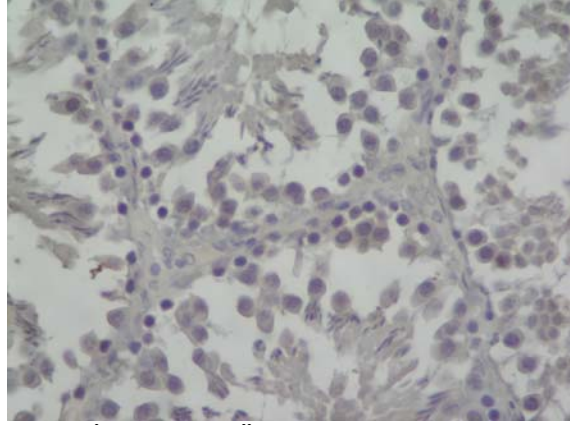
eNOS(X400)

**Resim 3. 3:** İmmunohistokimya eNOS antibody boyamalarında torsiyon grubunda boyanmanın daha fazla olduğu saptandı.

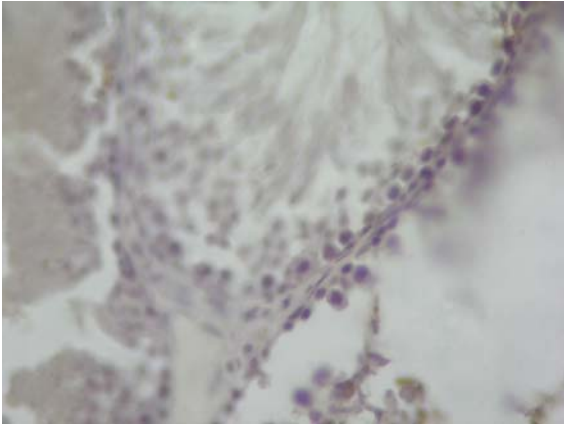




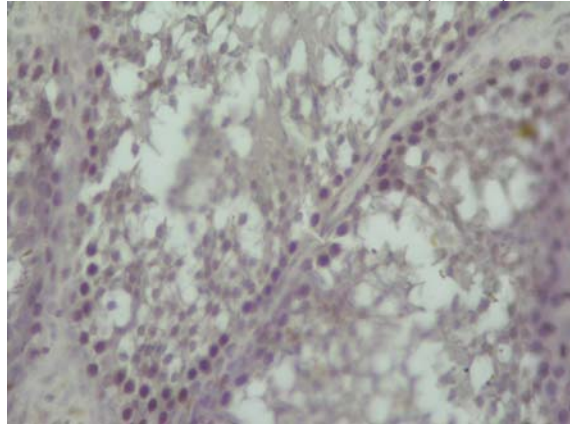
LİGASYON 1. GÜN iNOS



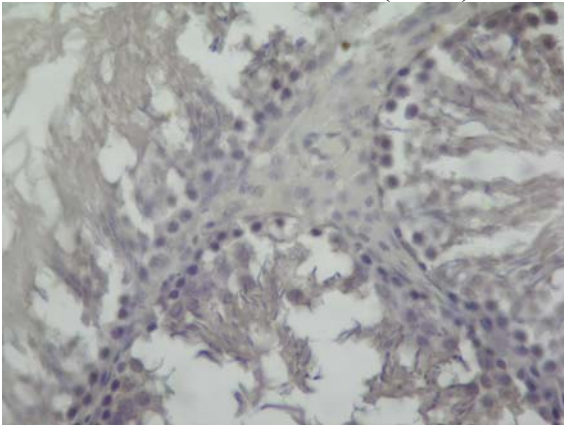
TORSİYON 1. GÜN iNOS(X400)



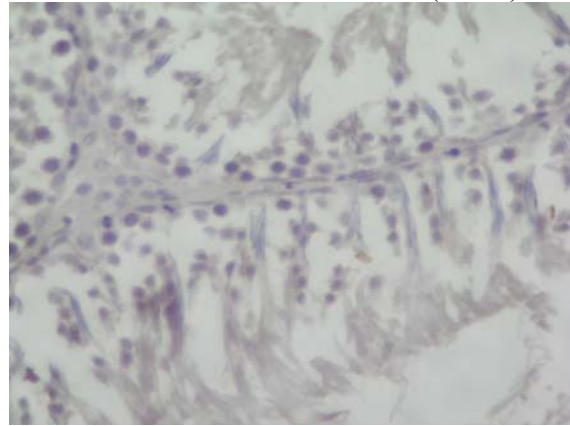
LİGASYON 7. GÜN iNOS (X400)



TORSİYON 7.GÜN iNOS(X400)

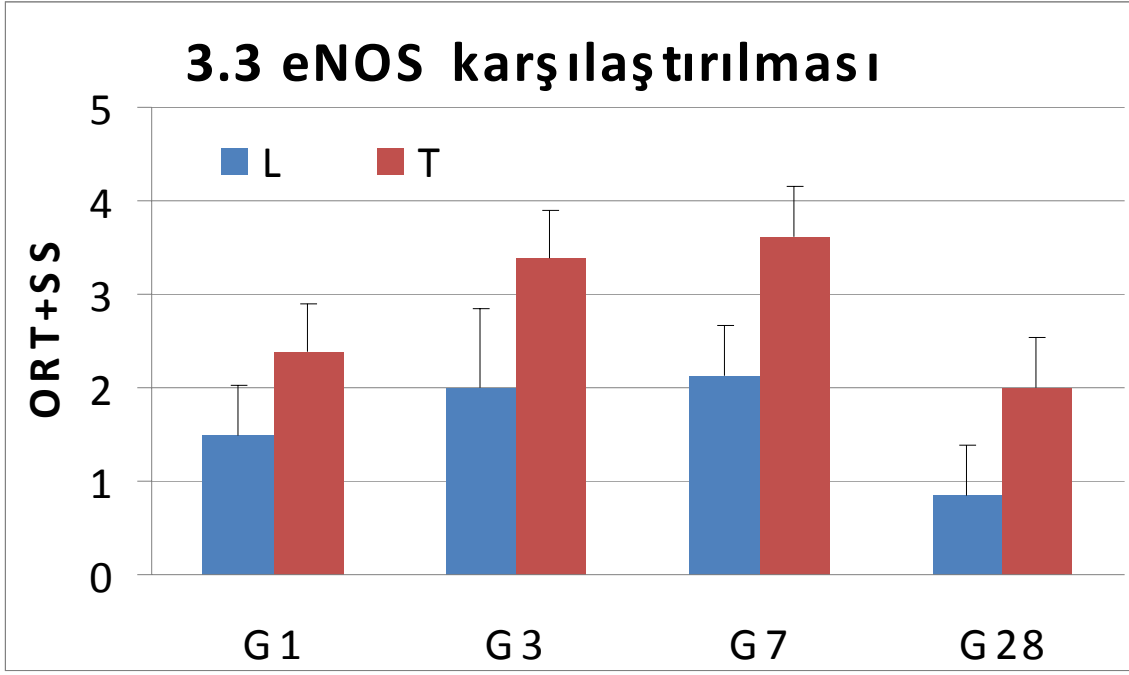


LİGASYON 28.GÜN iNOS (X400)

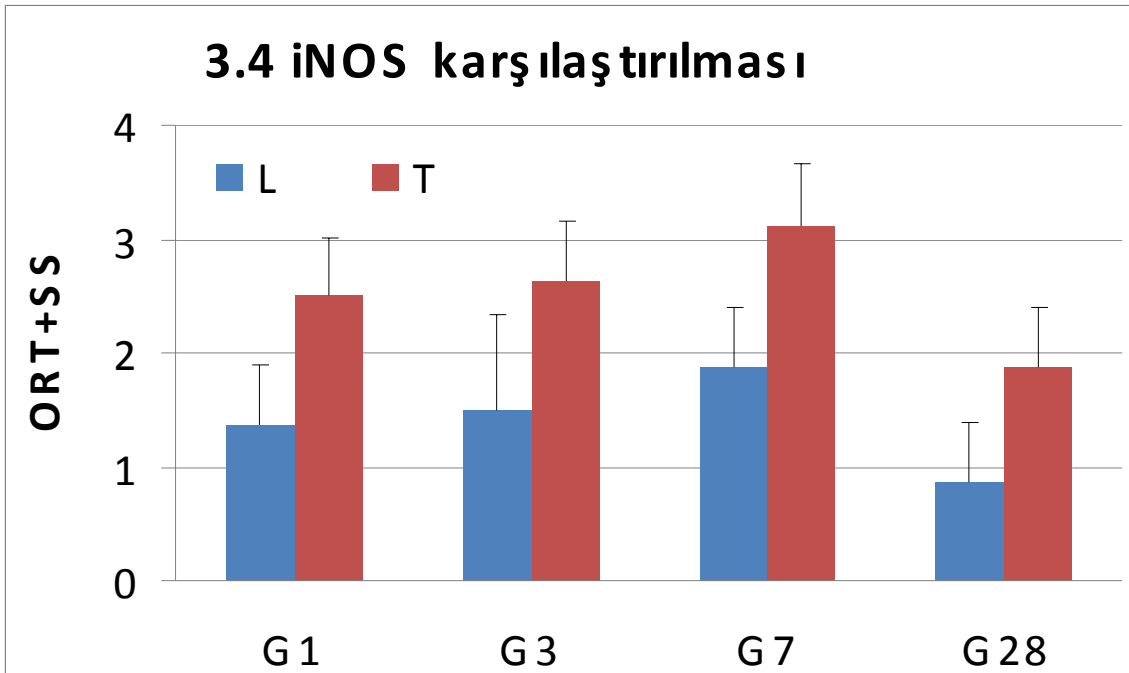


TORSİYON 28.GÜN iNOS(X400)

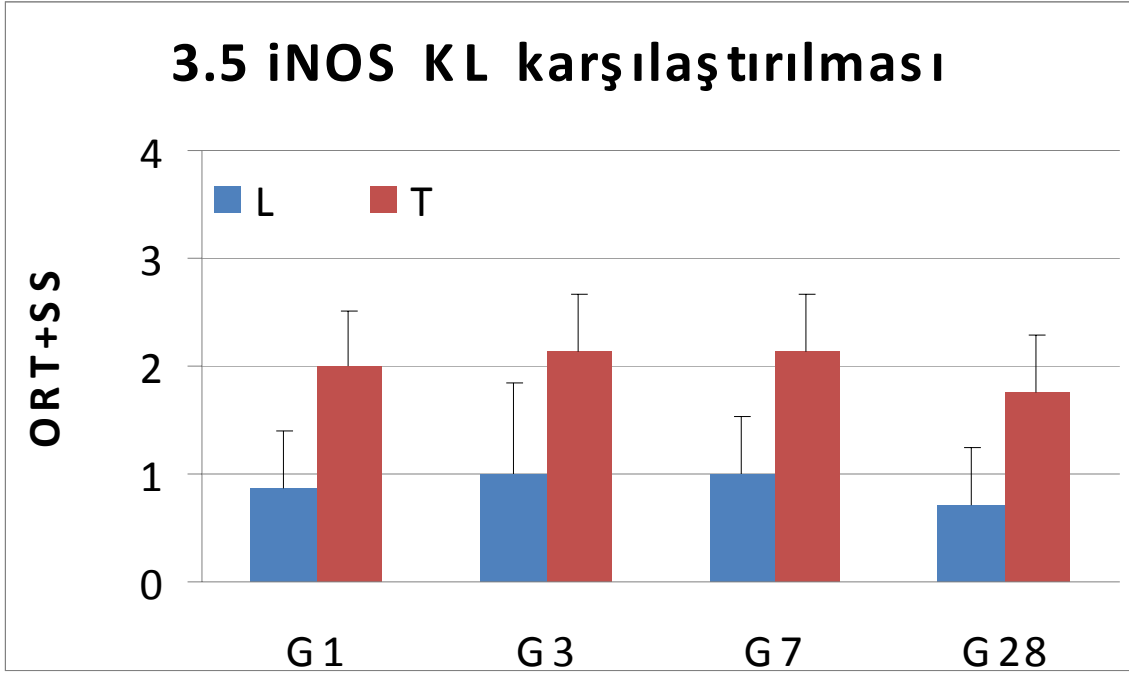
**Resim 3. 4:** Testislerin iNOS boyamalarının boyamalarının torsiyon ve ligasyon karşılaştırmasında 1, 3 ve 7. günlerde artan hasara bağlı tanımlamanın 28. günde azaldığı saptandı.



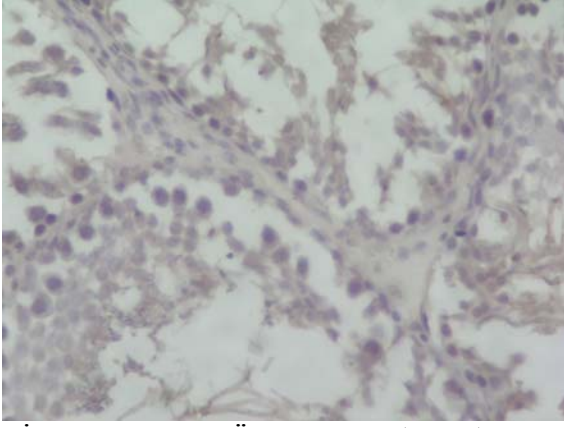
**Tablo 3.3** Testislerin eNOS durumu 1 ve 3 günlük reperfüzyonda eNOS tanımlaması torsiyon ligasyon grubuna göre daha fazla olmak üzere artış gösterdi. 7 günlük reperfüzyonda devam eden artış 28 günlük reperfüzyonda azaldı.



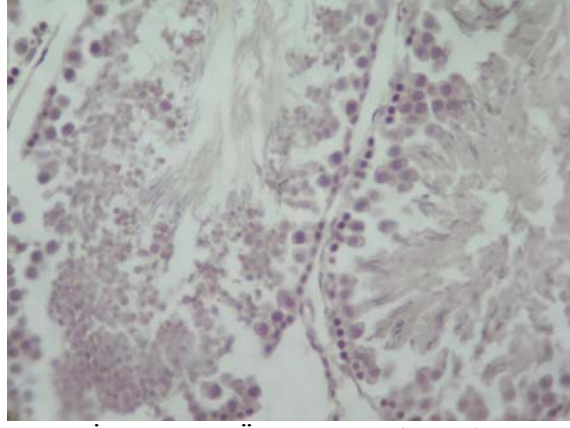
**Tablo 3.4** Testislerin iNOS durumu günlük reperfüzyonu takiben torsiyon grubu testislerde ligasyon grubuna göre daha fazla gözlemlendi. 28 günlük reperfüzyonu takiben iNOS tanımlamasında azalma gözlemlendi.



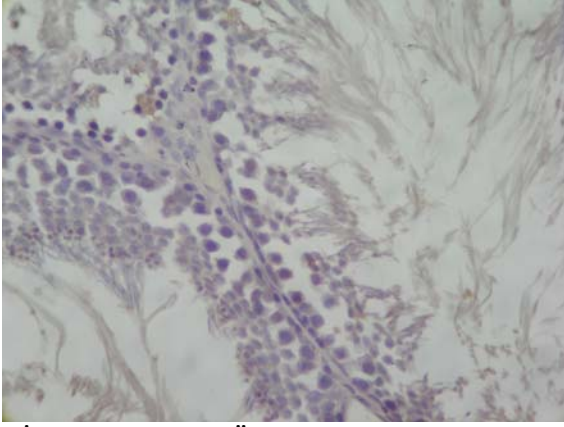
**Tablo 3.5:** Kontralateral testislerin i-NOS immunohistokimyasal boyamasında torsiyon grubu testislerde daha fazla tanımlama gözlemlendi. 1,3 ve 7. günlerde artış gösteren tanımlama 28.günde her iki grup için azalma gösterdi.



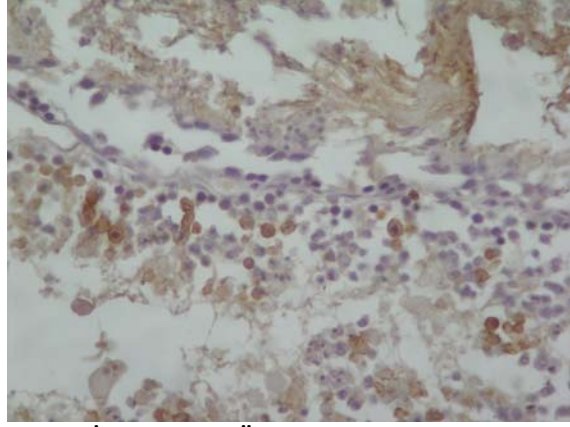
LİGASYON 1. GÜN TUNEL (X400)



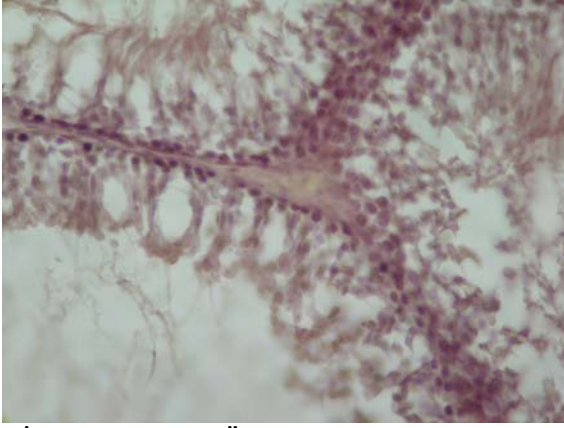
TORSİYON 1. GÜN TUNEL (X400)



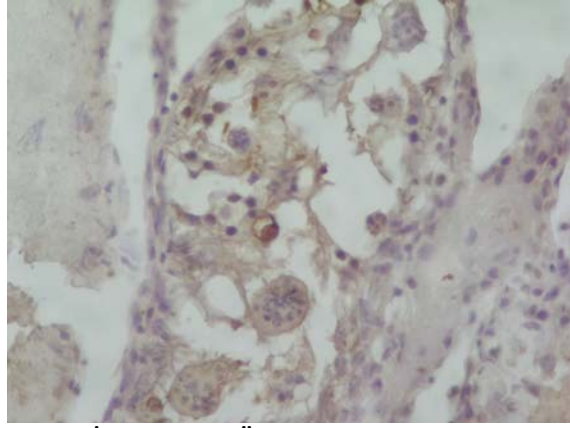
LİGASYON 3. GÜN TUNEL (X400)



TORSİYON 3. GÜN TUNEL (X400)

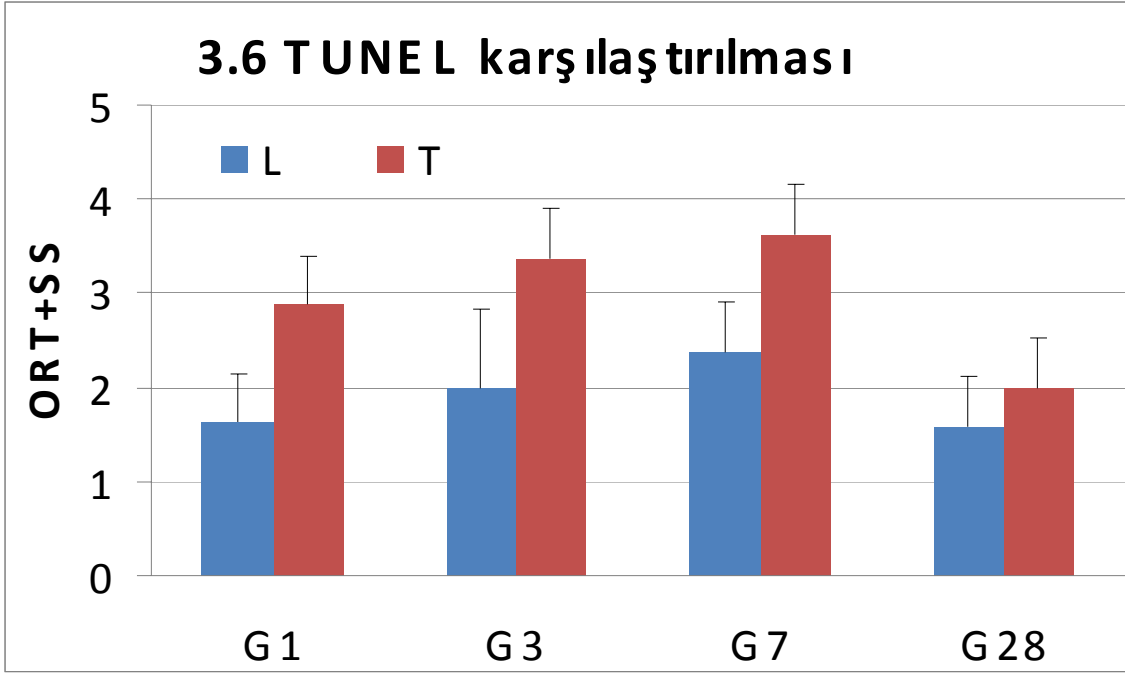


LİGASYON 7. GÜN TUNEL (X400)

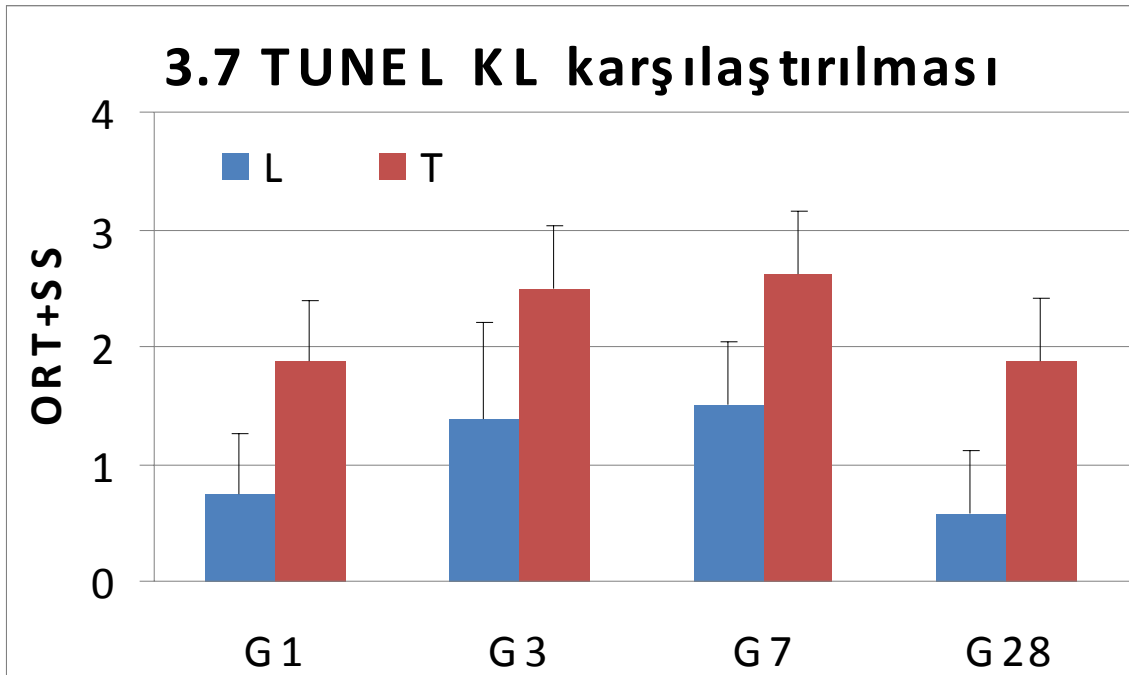


TORSİYON 7. GÜN TUNEL (X400)

**Resim 3. 5:** Testislerin TUNEL boyamalarının torsiyon ve ligasyon karşılaştırmasında histolojik olarak anlamlı farklılıklar gözlemlendi. artan hasara bağlı 1, 3 ve 7. günlerde fazlalaşan apoptotik indeks 28. günde azaldı. Torsiyon gurubunda apoptozisin her zaman daha yüksek olduğu görüldü.

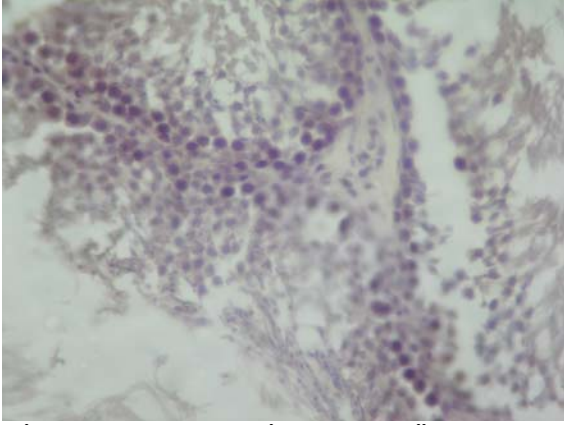


**Tablo 3.6:** Testislerin TUNEL boyamalarının torsiyon ve ligasyon grupları için karşılaştırılmasında 1,3,7 günlük reperfüzyonda apoptotik hücre indeksi torsiyon grubunda ligasyon grubuna göre belirgin bir artışı gösterirken bu farklılık 28 günlük reperfüzyonda her iki grup için azalma gösterdi.

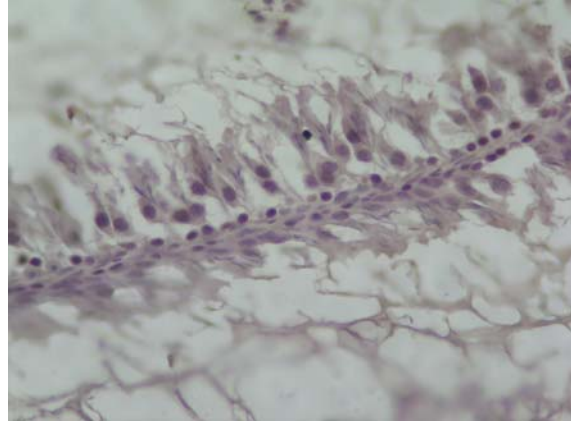


**Tablo 3.7:** Testislerin kontralateral gruplarının TUNEL boyamalarında ipsilateral testislere göre belirgin bir Resimde daha az olmak üzere torsiyon grubunda 1,3 7 günlük reperfüzyonda apoptotik hücre indeksinde artış gözlenirken 28 günlük reperfüzyonda azalma saptandı.

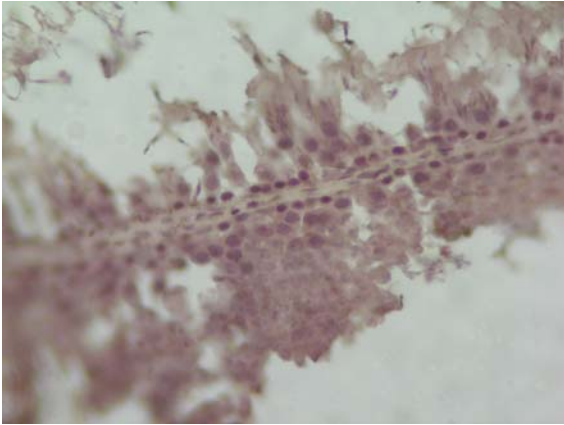




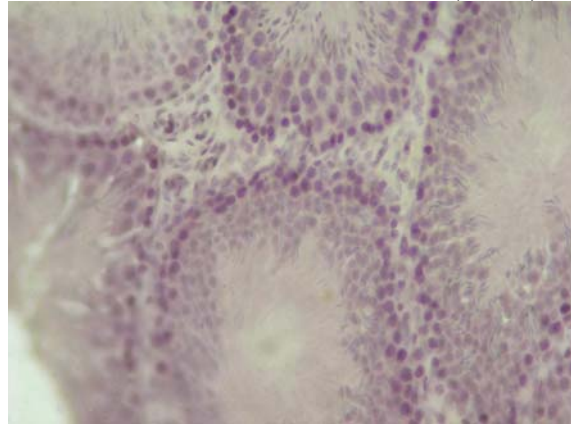
LİGASYON- TORSİYON 1. GÜN



KONTRALATERAL TUNEL (X400)

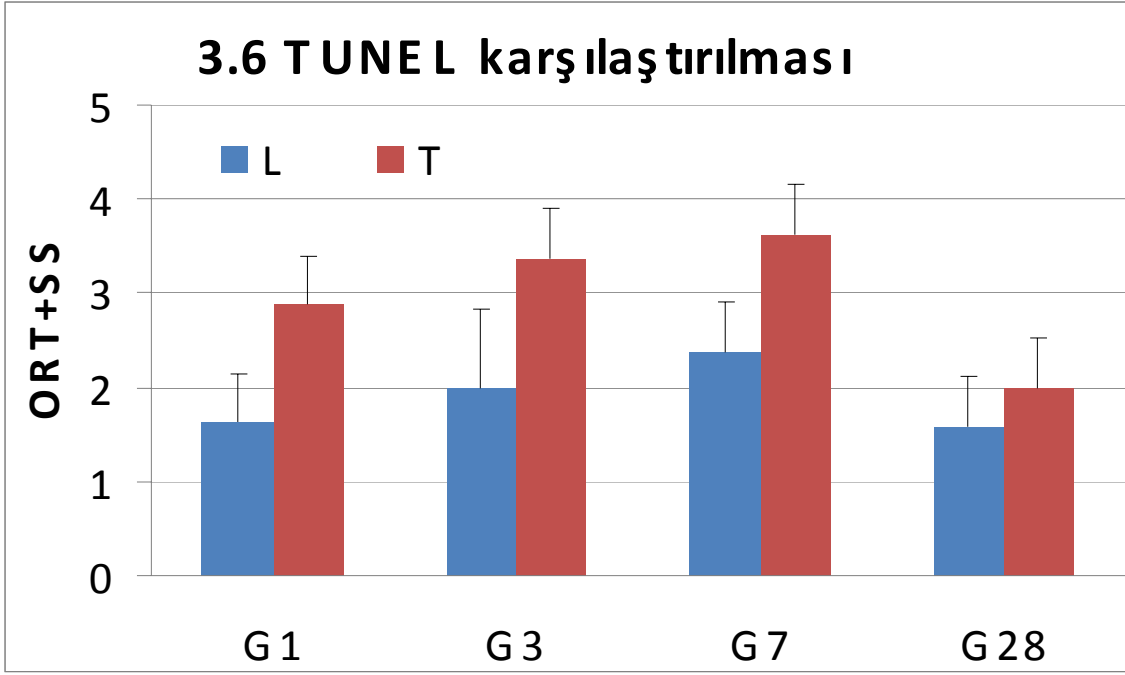


LİGASYON- TORSİYON 7. GÜN



KONTRALATERAL TUNEL (X400)

**Resim 3. 6:** Kontralateral testislerin TUNEL boyamalarının Torsiyon ve ligasyon karşılaştırmasında histolojik olarak anlamlı farklılıklar gözlemlendi. İpsilateral testise oranla çok daha az apoptotik hücresi saptandı.



#### 4. TARTIŞMA

Testis günde milyonlarca spermin üretildiği bir organ olarak canlılığının devamı ve korunması açısından kan desteğinin en önemli olduğu organdır. Testis kan desteğini alışılmadık uzun bir arter ile sağlar. Testisteki oksijen basıncı azdır. Seminifer tübüllerdeki yüksek metabolik aktivite bu düşük oksijen basıncı ve düşük vasküler perfüzyon basıncı ile uyum sağlamıştır. Ancak oluşabilecek küçük problemlerde bile testis kan akımının azalması fonksiyonunu hızlı ve direkt bir şekilde etkiler. Testiküler arterin sklerozu, kendiliğinden oluşan hipertansiyon ve benzeri hastalıklarda testise giden kan akımında azalma gerçekleşir. Dolaşım şoklarına bağlı spermatogenetik epitelde hasar olduğu bilinmektedir. Endotelin 1 ve serotonin gibi güçlü vazokonstriktör ajanların testiste fonksiyon bozukluğu yaptığı gösterilmiştir. Ligasyona bağlı olarak 60 dakikada başlayan hasarın 100 dakikaya ulaştığında özellikle spermatogonya ve spermatozoidleri etkilediği saptanmıştır. Bu süre zarfında reperfüzyona bağlı serbest radikal oluşumu ve dolayısıyla apoptotik hücre hasarı oluşmaktadır. Deneysel olarak yapılan ligasyon iskemilerinde görülen bulguların infertil ve yaşlı erkeklerdeki testis bulgularıyla aynı olduğu saptanmıştır. Hatta intersitisyel inflamasyon reaksiyonunun bile benzer olduğu düşünülmüştür (Bergh A. ve ark. 2001) .

Özetle saptanan bulguların iskeminin süresi, yöntemi ve şartlarına bağlı olarak literatürde yapılmış diğer çalışmalarla benzerlik ve farklılıklar göstermesine karşılık aynı parametrelerde karşılaştırma yapılmış bir yayına rastlanmadı. Yapılan bir çalışmada 1/2 ve 1 saatlik 720°'lik torsiyon uygulaması sırasında 1. saatte başlayan ve 30 güne kadar süren ilerleyici hasarın olduğu gösterilmiştir. Hasar için gerekli kritik sürenin 1/2 saat ile 1 saat arasında olduğu gösterilmiştir. Torsiyon sırasında testis kan akımının %3 veya %4'e kadar indiği saptanmıştır. Torsiyon sonrası reperfüzyonda 4 saat içerisinde kan akımının büyük oranda geri döndüğü bulunmuştur ancak bu dönüş testisler arasında farklılıklar göstermiştir. Kan akımının kontrol değerlerine dönmesi ancak infarkt olmamış testislerde mümkün olduğu bulunmuştur (Turner ve Brown 1993). Reperfüzyon sırasında testis kan akımındaki geri dönüşün yetersizliği 30 güne kadar sürebilmektedir. Tek taraflı testiküler iskemide testis 3 saatlik süreçte izlenmiş seminifer tübül epiteli hasarı gözlenmiştir.



Histolojik kesitlerde 12 saatlik akut iskemide bile şaşırtıcı bir şekilde bazal membranla devam eden bir ya da iki hücre tabakasına rastlanmıştır. 6 saatlik iskemide spermatidlerin çevresinde ve pakiten ve leptoten aşamasındaki spermatozoidlerde çok sayıda azalmaya rastlanmıştır. Spermatic arterin ligasyonunu izleyen süreçte germ hücreleri için en uygun sıcaklık sağlanmış ve merkezi tübüllerde periferaldekilere göre daha fazla hasar gözlenmiş, bunun nedeni de periferal alanın skrotal deriye teması olarak yorumlanmıştır (Chaki S. P. ve ark. 2003). Oluşan iskemiye bağlı hasarı tetikleyen birçok farklı etken böyle çalışmalar ile gösterilmiştir. Testiküler kan akımının azalması doğrudan hipoksi ve artan lökositlerin etkileri şeklinde iki farklı mekanizma aracılığıyla germ hücre ölümüne neden olabilir. Bu patojenik mekanizmalar arasındaki ilişki hipoksi ve oksijen radikallerinin hasarı ile testiküler hücre hasarında önemlidir. Çünkü çok net olmamakla birlikte testiküler kan akımındaki bozunma görünüşe göre endotel hücre adezyon moleküllerinde ve hasar bölgesine gelen lökositlerin artışına neden olmaktadır. Testisin bilinmeyen inflamasyon medyatörleri olduğunu savunan çalışmalar olmuştur (Bergh A. ve ark. 1996).

İskemik süre olarak seçilen 6 saat özellikle torsiyon deneylerinde bulguların net olarak ortaya konduğu süre olup önceki çalışmalarda en az 5 saatte ciddi hasar olduğu gösterilmiştir. Ligasyon sonrası arterde posttravmatik vasküler spazma bağlı olarak da daralmanın olduğu ve bazı testislerde reperfüzyon kısmına geçilememesinin nedeni olduğu görülmüştür (Bergh A. ve ark. 2001). 5 saatlik ligasyon iskemisi sonrasında tübüllerde ve germ hücrelerinde dejenerasyon görülürken Leydig hücrelerinin etkilenmediği bulunmuştur. Bir çalışmada 60 dakikalık ligasyonda spermatogenetik epitelde sınırlı hasar görmüş ya da herhangi bir hasara rastlanmamıştır. Fakat 90- 105 dakikada preleptoten aşamasındaki spermatozoidlerde yer yer spermatogonyalarda hasara rastlanmıştır (Steinberger E ve ark. 1999). Testiküler kan damarlarında artmış lökositlerden az miktarının intersitisyel alana geçtiği görülmüştür. İskemi sonrası endotelial adezyon moleküllerinin artarak hem inflamasyona hem de serbest radikal oluşumuna neden olabilecek lökosit birikimi oluşmuştur. 6 saatlik uyguladığımız iskemide benzer şekilde ağır hasar, spermatogenetik epitelde dejenerasyon ve daha az Leydig hücre

etkilenmesi görülürken kontralateral testislerde daha az hasara rastlandı. Hasar mekanizmasında apoptozisin belirlendiği TUNEL yöntemi kullanıldı.

Önceki çalışmalarda TUNEL ile karşılaştırıldığında DNA polimerazının kullanıldığı ISEL yönteminin benzer sonuçlar vermesine rağmen daha az duyarlı olduğu gözlenmiştir (Bergh A. ve ark. 2001). 5 saatlik ligasyon sonrası normale oranla yüz katına çıkmış apoptotik germ hücre sayısı bulunmuştur. Birçok tübülde tübül periferindeki çoğu germ hücresi apoptozis göstermiştir. Bazılarında leydig hücrelerinde de pozitiflik saptanmıştır. Ancak testis kan akımındaki oluşan değişikliklere bağlı olarak 5 saat ligasyon sonrasında bile görülen iskemik değişiklikler farklılıklar oluşturmaktadır. Kontralateral testislerde ise çok daha az pozitif apoptotik hücre saptanmıştır. Bazı çalışmalarda 5 saatlik iske mi sonrasında nekrotik hasarın oluştuğu da gösterilmiştir. Bir başka çalışmada 1 saatlik testiküler torsiyon sonrasında 3 katına çıkan apoptotik spermatogonia ve primer spermatosit sayısı bir ay sonrasında günlük sperm üretimini %50 azalttığı bulunmuş olup testis iskemisinin kronik sonuçları anlamında büyük önem taşımaktadır (Turner TT ve ark. 1997). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde artmış apoptozis ve kontralateralde daha az gerçekleşen apoptozis bulunmasına rağmen 5 saatlik iskemideki kadar şiddetli olmadı.

Testis torsiyonunda doku hasarı ile torsiyon süresi ve derecesi arasında ilişki vardır. Testisin atrofiden kurtulabilmesi için 4- 6 saat içinde müdahale edilmesi gerekir (Ransler CW ve Allen TD. 1982). Bununla birlikte torsiyondan bir saat sonra bile geri dönüşümsüz hasar oluştuğuna ilişkin çalışmalar mevcuttur İlk 12 saate kadar mümkün olsa da insanlarda 24 saat içinde düzeltilmediği takdirde testiste infarkt oluşması kaçınılmazdır (Kogan SJ. 1991). Sıçanlarda deneysel olarak yapılan çalışmalarda 1- 2 saat süreli 360° torsiyonda sadece orta derece akut vasküler cevaba yol açtığı, 720° torsiyonda ise testis kan akımının ise tamamen engellendiği tespit edilmiştir (Turner TT. 1985). Fertilite araştırmalarında 360°'lik torsiyon yapılan grupla kontrol grubu arasında fark saptanmazken 720° ve üstündeki torsiyonlarda fertilitenin azaldığı gözlenmiştir (Heindel RM ve ark. 1990). Reperfüzyon sonrası lipid peroksidasyon ürünleri birkaç dakika içinde ortaya çıkarak 12 saat süreyle ortamda kalmaktadır (Walsh TR. ve ark. 1990).

Testiküler arter ligasyon yoluyla iskemi oluşturulması klinikte karşılaşılan testis torsiyonu ile uyumlu değildir. Torsiyonda önce venöz daha sonra arteriyal dolaşım engellenir. Bu yüzden iskeminin erken döneminde parsiyal iskemi olur. Testis torsiyonu histopatolojik düzeyde doku hasarına neden olur. Torsiyon öncelikle venöz dolaşıma engel olarak ödeme neden olur. Ödemin artmasıyla arteriyal dolaşım bozukluğu ve buna bağlı iskemi ve nekroz gelişir. Kısa süreli iskemide ortaya çıkan doku hasarının derecesi iskeminin süresine bağlıdır. 10 ile 60 dakikalık iskeminin bile testis dejenerasyonu yaptığına ilişkin yayınlar bulunmaktadır (Cosentino ve ark. 1986). Kısa süreli iskemide özellikle spermatogonya başta olmak üzere germ hücrelerinin etkilendiği, intersitisyel hücrelerin ise iskemiye daha dirençli oldukları saptanmıştır (Bergh A. ve ark.2001). Testisteki iskemi reperfüzyon hasarında germ hücrelerinin daha çok etkilenmiş olması oldukça toksik olan lipid peroksidasyon ürünlerinin peritübüler leydig ve sertoli hücrelerinden çok germ hücrelerinde olduğunu düşündürmektedir (Saba ve ark. ,1997).

Testiküler kan akımındaki azalma ve detorsiyon sonrasındaki önemli artış testisi etkiler (Guimarães S. B. , ve ark. 2002). Klinik ve deneysel çalışmaların tartışmalı sonuçlarına rağmen; testis torsiyonunda bilinen gerçek “acil müdahale” edilmesinin gerekliliğidir. Burada amaç testis fonksiyonlarının ve fertilitenin korunmasıdır. Mutlaka 4- 6 saat içinde müdahale yapılmalı ve karşı taraf testise de fiksasyon işlemi uygulanmalıdır. Semptomların süresinin 8 saati geçtiği olgularda ciddi atrofi ve 12 saatin geçtiği olgularda testiküler nekroz gelişme riski yüksektir. Semptomları 24 saati geçen olgularda orşiektomi yapılması, karşı testisin fonksiyonlarını sürdürmesini sağlamaktadır. Tek taraflı torsiyonlarda, diğer testisin nasıl hasar gördüğüne dair kesin bilgiler olmamasına rağmen immünolojik mekanizmalar ve testislerdeki doğumsal anormallikler sorumlu tutulmaktadır.

Son çalışmalar ilk olarak hasar gören hücrelerin spermatogonya ve primer spermatositler olduğunu göstermiştir ( Markey CM ve ark.1995 ve Somuncu S ve ark, 2006). Reperfüzyon öncesi testise kan akımının %50-%75 olduğu durumda nekroz işaretine rastlanmamıştır. Böyle dokularda germ hücreleri apoptozis yoluyla ölmüştür. Ayrıca damar içi lökosit hücrelerindeki artış ise germ hücre ölümü artışı olmaksızın gerçekleşmiş böylece germ hücrelerinin sekonder ölümüne neden

olmadığını göstermiştir. Testiste reperfüzyondan kısa bir süre sonra lökosit artışı endotelial adezyon moleküllerinin artışı tetiklenmesini sağlaması mümkündür (Bergh A. ve ark.1996).

Germ hücre apoptozisi normal spermatogenezde sperm sayısının %25- 75 oranında hücre sayısının azalmasına neden olabilen spontan bir olgudur (Huckins, 1978, de Rooij & Lok,1987). Apoptozise tüm germ hücrelerinde rastlanır (Allan ve ark.1987 ve Kerr 1992). Apoptozis patolojik ya da torsiyon, hipofizektomi gibi farklı deneysel çalışmalar altında gelişebilen bir olaydır (Tapanainen ve ark.1993, Shikone ve ark. 1994, Turner ve ark. 1997 ve Lisa ve ark.2000). %25 oranında unilateral testisküler torsiyonun infertiliteye neden olabildiği belirtilmiştir (Nguyen ve ark. 1999). Bir, üç, altı, on iki, ve yirmi dört saatlik iskemi periyotlarında germ hücrelerinde koyu nükleer çekirdekli hücreler apoptozis boyanmasını göstermiştir. 1 saatlik iskemi sonrası toplamın %30 u oranda apoptotik hücreye rastlanmış ve kontralateral gruba karşılaştırılmıştır. 3 saatlik iskemi sonrasında tübüllerin yaklaşık %35'inde germ hücrelerinde kayıpla ilişkili olarak ekfoliasyon gözlenmiştir. 1 saatten 24 saate doğru artan iskemi süresince her tübülde seminifer tübüllerde aşamalı olarak piknotik hücre sayısı artmıştır. 6 saatlik iskemide ise germ hücre sayısında önemli bir azalma gözlenmiştir. 12 saatlik iskemide ise pakiten ve leptoten fazında spermatozoidler görüldüğü bildirilmiştir. Başlangıç saatlerinde germ hücrelerinin hiçbir tipinde apoptozis için spesifik referans görülmemiştir. 12- 24 saat gibi geç dönemlerde germ hücreleri piknotik çekirdekli bazal membrana yakın yerleşimli tek katlı hücre tabakasına rastlanmıştır. Seminifer tübülün çapında 24 saatlik iskemide önemli bir azalma gözlenmiştir. Germ hücreleri merkezdeki tübüllerde perifere göre daha fazla hasarlanma göstermiştir. İskemi alanına gelen lökositlerin çoğalması doku sağaltımı için gereklidir. Lökositlerin akümüasyonu sonrasında reperfüzyonun sağlanmasıyla da serbest radikallerin etkisi ile hasar artmaktadır. Reperfüzyon öncesi testise kan akımının %50-%75 olduğu durumda nekroz işaretine rastlanmamıştır. Böyle dokularda germ hücreleri apoptozis yoluyla ölmüştür (Bergh A ve ark.1996).

Torsiyonun ilk saatini takiben 4 saatlik reperfüzyonda apoptozisi tetiklediği ilk olarak Turner ve ark. tarafından gözlemlenmiştir. Apoptozis artan reperfüzyonda

diapedezis yapan lökositler tarafından reaktif oksijen türleri ile indüklenir. Germ hücre apoptozisinin değerlendirilmesinde başlangıçta mitokondrial yolakla ilişkili Bax 'ın yanı sıra Fas-FasL etkileşimi ile indüklendiği gösterilmiştir (Turner TT ve ark. 2000). Son çalışmalar göstermiştir ki germ hücre apoptozisinde nötrofillerin ve endotelial hücre adezyon moleküllerinden E-selektinin bu patolojide doğrudan önemli bir rol oynamaktadır (Lysiak JJ ve ark. 2001). İpsilateral testisteki reperfüzyondan sonra kontralateral testisteki spermatogenezis mekanizmasının düzenlenmesi anlaşılmamıştır. Kontralateral testisteki germ hücreleri reperfüzyonun 24 saat sonunda apoptozisin arttığı gösterilmiştir (Sukhotnik I ve ark. 2005). Buna ek olarak kontralateral testiste 96 saatlik iskemik reperfüzyonda germ hücre apoptozisinde önemli oranda artış görülmüştür (Mogilner J 2006). TUNEL immunohistokimyası sonuçlarına göre; kan akımının azalmasına bağlı olarak DNA fragmentasyonuna uğramış germ hücrelerinin ölümü tetiklenmiştir. Normal kanlanmaya maruz kalan testise göre yaklaşık 100 kat daha fazla TUNEL pozitif hücreye rastlanmıştır. Birkaç tübülde germ hücreleri hemen hemen sadece bölgesel olarak periferde boyandığı gözlenmiştir. Kontralateral testisinde TUNEL pozitif germ hücre sayısı ligasyon grubuna göre daha az bulunmuştur. Kontrol grubunda ise; çoğu tübülde TUNEL pozitif germ hücrelerine rastlanmamıştır. Testiste kan akımının azalması etkili bir germ hücre ölümünün tetiklenmesi ve vasküler yanıtı benzer bir inflamasyona neden olur. Normal vazomosyon genellikle görülmez. Vazomosyon etkili bir akıma ve intravasküler basınca bağlıdır. Testiste vazomosyon transvasküler kan akımı değişimi önemlidir ve testiküler bozunmaya katkıda bulunur (Bergh A ve ark.1996). Bu anlamda çalışmamızda benzer sonuçlar bulunmasına rağmen kontrol ve sham gruplarında TUNEL pozitif hücre görülmedi ve iskemik hasarda ise 6 saatlik iskemiye karşılık yaygın apoptosis saptanmadı. Bizim çalışmamız hücrelerin hasara karşı daha dirençli olduğunu düşündürdü. Ancak iskemi sonrası reperfüzyon miktarı bu hasarın etkinliğini belirlemede en önemli faktör olup görülen farklılıklar bu şekilde açıklanabilir. Doku perfüzyon miktarının ölçülmesi bu sorunun giderilmesinde büyük yarar sağlayacaktır.

Oksidatif stresin iskemik testiste oynadığı rol farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Bu deneysel çalışmalarda testiküler iskemiye en duyarlı olan hücrelerin başta spermatogonya ve spermatozoidler olmak üzere germ hücreler olduğu

gösterilmiştir (Tijoe DY ve ark. 1970). Detorsiyon sonrası reperfüzyonun sağlanmasıyla dokuya olan kan akımı artar ve ortaya fazla miktarda serbest radikaller çıkar. Serbest oksijen radikaller ilk karşılaştıkları yapı ile reaksiyona girerler. Bu yapı en sık olarak hücre veya organel membranlarının lipid komponentidir. İskemi apoptozis ve oksidatif stres ilişkisi birçok çalışmada gösterilmiş ve artan strese bağlı serbest radikallerin apoptozisi indüklediği saptanmıştır. Oksidatif stres analizinin yapıldığı 1 saatlik iskemide 24 saatliğe göre yaklaşık %40 daha fazla lipid peroksidasyonuna rastlanmıştır. Süperoksitdismutaz (SOD) ise 1 saatten 24 saate doğru şiddetli bir azalma göstermiştir. 6 saatlik iskemide ise doku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyeli bir artış göstermiştir (Bergh A ve ark. 1996). Yüksek miktarda ROS nekrozla hücre ölümünü tetikler oysa düşük konsantrasyonları apoptozisin tetiklenmesine neden olur. ROS'un düşük ya da yüksek güvenilir konsantrasyonlarını belirlemek güçtür. Peroksidatif stresin seviye formları iskemik uyarım sonrası çeşitli parametrelerin alımıyla bulunabilir. Erken aşamada SOD ve lipid peroksidasyonunun artışı ve katalaz enzim aktivitesi bunlara örnek verilebilir (Saba ve ark. 1997). Bizim çalışmamızda NOS miktarının arttığı bulundu ve literatürle uyum gösterdi.

iNOS ve eNOS germ hücre apoptozisi için gerekli olmasına rağmen nNOS'un gerekli olmadığı bulunmuştur. Germ hücre apoptozisinde apoptozis sırasında eNOS görülürken normal germ hücrelerinde bulunmamıştır ve germ hücre dejenerasyonunda rol oynar. Buna ek olarak iNOS germ hücre apoptozisinde pozitif bir düzenleyicidir. Çünkü iNOS testiste daha fazla bulunur ve germ hücre apoptozisinde çok önemlidir. Seminifer epitelde germ hücre sayısının düzenlenmesi için iNOS ve eNOS'un aynı apoptotik yolağı kullanıp kullanmadığı bilinmemektedir. Fakat iNOS ve eNOS'un germ hücre apoptozisinde pozitif bir düzenleyici olduğu bilinmektedir (Lee NP, Cheng CY. 2004). Bizim çalışmamızda da her zaman dilimi ve durumda iNOS boyamasının eNOS'tan daha yoğun olduğu saptanmış ve bu durum literatür tarafından da desteklenmiştir. Western blot analizi sonucuna göre iNOS tanımlaması 1 saatlik iskemiden sonra belirgin bir şekilde artmıştır. Reperfüzyonun 48. saatinde pik yapmıştır. İmmunohistokimya boyaması göstermiştir ki testis dokusu intersitisyel alanında makrofaj benzeri hücre infiltrasyonu ve iNOS tanımlaması gösterilmiştir. Germ hücre apoptozisi reperfüzyonun 24.saatinde maksimum bir şekilde indüklenmiştir.

6 saatlik torsiyonu takiben 24 saatlik detorsiyon uygulanan çalışmada doku hasarı tesbit edilmiştir. 540° üzerindeki ekstravajinal torsiyonda venöz tıkanmayla sonuçlanır. Deneysel sıçan modelinde 720° testiküler iskemi başarıyla sonuçlanmıştır. Reperfüzyon hasarında toplam hasarın devamı iskemik reperfüzyon komponentlerinin bir kombinasyonudur (Barlas M. ve Hatiboğlu C. 2002). Serbest radikal azaltıcılar toplam hasarın sürdürülmesinde büyük bir öneme sahiptir. İskeminin 60 dakika sonrası testisdeki reperfüzyon hasarını önlemek için yapılan bir çalışmada serbest radikal azaltıcıların testiküler hasarın artmasında etkili olmadığı bulunmuştur. Testiküler torsiyon ve detorsiyon iskemi ve reperfüzyona uğrayan dokularda morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri tetiklemektedir. Antioksidan tedavileri reperfüzyon hasarının azaltılmasında başarılı sonuçlar vermiştir. Allopurinol ve süperoksit dismutaz ve katalaz tedavisi testis detorsiyonundan sonra testis fonksiyonunun kurtarılmasına sebep olmuştur. Nitrik oksit azalması testiküler iskemi reperfüzyonunda negatif etkiye sahiptir. NO iskemide yüksek vasküler permeabilite ve aynı zamanda lökositlerin ve trombositlerin agregasyonunu gösterir (Barlas M. ve Hatiboğlu C. 2002). İskemik reperfüzyon nötrofil aktivasyonu, inflamatuvar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin büyük miktarda intraselüler  $Ca^{+2}$  salınımı ve serbest oksijen radikallerinin üretimi ile ilişkilidir. NOS temel olarak endotel hücreler ve nöronal hücrelerden intraselüler kalsiyum aktivasyonu ile aktive edilir. Testiste eNOS Leydig hücreleri, sertoli hücreleri, spermatozoid ve spermatitten ekspres edilir. iNOS tanımlaması sitokinlerin çeşitli kombinasyonları tarafından transkripsiyonel aktivasyon gerektirir. Devam eden sürelerde nitrik oksit üretimi birkaç organda oksiradikal hasara yol açar. NO apoptoziste ya da nekroziste hücre ölümü aracılığıyla önemli bir mediatördür (Lee NP, Cheng CY. 2004).

Sham grubunda 12 saatlik reperfüzyonda iNOS tanımlaması gözlenmezken 24 saatlik reperfüzyonda maksimum iNOS tanımlaması gözlenmiştir. iNOS tanımlaması özellikle reperfüze edilen testis dokusuna infiltre olan mononükleer ve polimorfonükleer hücrelerde gözlenirken; sertoli hücresi, Leydig hücresi, peritübüler hücreler ya da infiltrasyon gösteren nötrofillerde immunreaktivite gözlenmemiştir. iNOS pozitif hücrelerin çevresindeki seminifer tübül germ hücrelerinde hematoksilen-eozin boyamada artmış nekroz ve bu nekrotik hücrelerin TUNEL negatif olduğu

gözlenmiştir. Bir başka çalışmada iNOS tanımlaması 1 saatlik iskemiden sonra belirgin bir şekilde artarak reperfüzyonun 48. saatinde pik yapmıştır. İmmunohistokimya boyaması testis dokusu intersitisyel alanında makrofaj benzeri hücre infiltrasyonu ile iNOS tanımlamasının birlikteliği gösterilmiştir (Shiarishi ve ark. 2001, Kim HC ve ark. 2007, Yağmurdur H. 2008).

Reperfüze edilen testislerde ROS aktivasyonu, parankim hücrelerinde ksantin oksidaz sistemi ya da lökositlerin ürettiği ROS bilinmektedir. Makrofajların da ROS salınımında bulunduğu bilinmektedir. Kan akımının sağlanmasının ardından lökositlerin yeteri kadar ROS salınımında bulunamayabilmektedir. Toksik ROS sadece hücre ölümünü değil aynı zamanda apoptozisi de tetikler. (Johnson ve ark. , 1996). Yüksek miktarda ROS nekrozla hücre ölümünü tetikler oysa düşük konsantrasyonları apoptozisin tetiklenmesine neden olur. ROS'un düşük ya da yüksek güvenilir konsantrasyonlarını belirlemek güçtür. Peroksidatif stresin seviye formları iskemik uyarım sonrası çeşitli parametrelerin alımıyla bulunabilir. Erken aşamada SOD ve lipid peroksidasyonunun artışı ve katalaz enzim aktivitesi bunlara örnek verilebilir (Saba ve ark. 1997). Kendiliğinden artış gösteren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyeleri de etkilenmiş testiste önemli ölçüde gözlenmiştir.

İskemik çalışmalarda kontralateral testislerde oluşan hasar birçok çalışmayla gösterilmiş olmasına rağmen hala tartışmaya açık bir konu olarak net değildir. Karşı testis hasarında deneysel çalışmada kullanılan hayvan türü, yaş, torsiyon derecesi ve süresi, torsiyon oluşturmada kullanılan metod, gözlem süresi ve bakılan parametredeki farklılıklara göre değişik sonuçlar rapor edilmiştir. Karşı testisin hasarı tam olarak bilinmese de otoimmünizasyon (York J ve Drago JR. , 1985) , ve kan akımındaki bozukluk (Tanyel FC ve ark. 1989) gibi farklı nedenler ileri sürülmektedir. İmmunolojik mekanizma hipotezine göre torsiyondan sonra canlılığını kaybetmiş olan spermatidler, oldukça antijenik maddeler salgırlar. Bu maddelerin intersitisyumdaki makrofaj ve lenfositlerle teması sonunda karşı testise zarar verecek antikorlar ortaya çıkar (Kogan SJ. 1991). Bazı klinik ve deneysel çalışmalarda prepubertal dönemde detorsiyon sonrası canlılığını korumayan testisin skrotum içine konulmasından sonra karşı taraf testisin normal olarak geliştiği, erişkin döneme gelince de spermatogenez ve fertilitenin normal olduğu tespit edilmiştir.



Prepubertal dönemdeki bu immun cevabın olmayışı, matür spermatozoa antijenini yokluğuna bağlanmaktadır (Henderson JA. ve ark. , 1985).

Testis torsiyonu sonrasında karşı testiste seminifer tübül çapında azalma, spermatozoid ve spermatid dejenerasyonu ve Leydig hücrelerinde hipertrofi gibi histopatolojik değişiklikler rapor edilmiştir (Nagler HM, White RD. , 1982). Bir çalışmada spermatik damar ligasyonu kontralateral testiste hasara neden olmamıştır (Nagler ve ark. , 1984). Spermatik torsiyonda kontralateral testisteki histolojik ve yapısal değişiklikler bildirilmişken testiküler arter ligasyonu sonrasında bildirilmemiştir (Nagler and deVere White, 1982; Caesar R. ve ark.1994; Cosentino ve ark. 1984; Saba ve ark. 1997). Kontralateral testisteki germ hücrelerinde reperfüzyonun 24. saati sonunda apoptozisin arttığı gösterilmiş ve ipsilateral testisteki reperfüzyondan sonrası kontralateral testisteki spermatogenezis mekanizmasının düzenlenmesi anlaşılmamıştır (Sukhotnik I ve ark.2005). Buna ek olarak kontralateral testiste 96 saatlik iskemik reperfüzyonda germ hücre apoptozisinde önemli oranda artış görülmüştür. İskemik reperfüzyondan 96 saat sonra kontralateral testiste az miktarda histolojik değişiklik gözlenmiştir. İskemi grubu sham grubuyla karşılaştırıldığında reperfüzyon sonrası küçük ama önemli bir azalma göstermiştir. Geçmiş yayınlar kontralateral testiste iskemi ardından önemli ölçüde germ hücre apoptozisi olduğu gösterilmiştir (Sukhotnik I 2005 ve Mogilner J 2006). Buna karşılık, birkaç çalışma unilateral torsiyonda kontralateral hasarlanma olmayacağını iddia eder (Turner 1985 Becker ve Turner, 1995, Anderson ve Williamson,1990, Turner ve Brown, 1993, Akgür ve ark. 1993,1995). Bütün kontralateral testiküler biyopsi örneklerinde 2 ya da 3. derecede atrofik Leydig hücreleri, spermatidlerde malformasyon, sıklıkla binuklear spermatid, geç spermatid sayısında azalma ve sertoli hücrelerinde patolojik değişikliklere rastlanmıştır.

Kontralateral testislerde özellikle spermatozoidlerde erken ve geç spermatidlerde, sertoli hücrelerinde genişleme gözlenmiştir. Buna karşın spermatogonya, fibroblast ve myofibroblast gibi peritübüler bağ dokusu elemanları ve endotelial hücreler az miktarda apoptozise uğrarlar. Leydig hücreleri spermatozoidlerden daha az etkilenirler. Kontrol gruplarında testiste sertoli hücrelerinde spermatozoid ve spermatidlere göre apoptozis daha az görülür. Hem

kontralateral testiste apoptozisin gelişmesi hem de torsiyon sırasında nekrotik değişimlerin derecesi farklıdır. Sertoli hücreleri ve leydig hücreleri etkilenme gösterirken, kapiller endotelyum, bağ doku ve peritübüler fibroblastlar daha az etkilenirler (Hadziselimovic F. ve ark 1997). Unilateral testiküler arter ligasyonu sonrasında kontralateral testiste membrana propriada katlanma, kollajen fibriller, elektron yoğun cisimcikler ve net sitoplazmik bölgelere rastlanmıştır. Aynı zamanda sertoli ve leydig hücreleri iskeminin 3. gününde normal bulunmuştur (C. Savaş ve ark. 2002).

Fertilite kaybının derecesi testiküler torsiyona bağlı iskemi gelişmesi ve kontralateral testis hasarıyla ilişkilidir. Unilateral testis torsiyonunu izleyen kontralateral testis hasarı tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar kontralateral hasarın varlığını iddia ederken (Kraup T. 1978, Nagler H. M. ve White R.D. 1982) bazı araştırmacılar karşıdır (Cosentino M. J. ve ark. 1985, Turner T. T. 1987). Kontralateral testiste iskemi hasarı için yapılan çalışmada minimal düzeyde kontralateral hasar, germ hücrelerinde dejenerasyon, düzensizlik, tübül çaplarında azalma, spermatik hücrelerin seminifer tübül lümeni içine eksfoliasyonu, seminifer tübül yüksekliğinde azalma; intersitisiyel alanda ödem, hemoraji ve fibrozis ile Leydig hücre proliferasyonu saptanmaktadır, hafif organizasyon bozukluğu, tek hücre apoptozisi, az miktarda bazal membrandan ayrılma gözlenmiştir (C. Savaş ve ark. 2002, Sukhotnik I ve ark. 2005).

Spermatik kord torsiyonu hem ipsilateral hem de kontralateral testiste oksidatif strese ve irreversibil hasara neden olur. Reversibil ve irreversibil sonuçlar iskemi periyodunun uzunluğuyla ilişkilidir. Uzun süreli hasar kontralateral testiste fonksiyon ve bütünlük kaybına neden olur. Artan NO seviyeleri peroksinitrit üretimi yoluyla hasara iştirak ederler(Danilo Wilhelm Filho ve ark. 2004). Kontralateral hasarı açıklamak için birbirini izleyen mekanizmalar önerilmiştir; spermatogonyaya karşı otoimmünizasyon, testiküler kan akımının azalmasında etkili olan sempatik yanıt, detorsiyondan sonra serbest oksijen radikali formasyonu ve iNOS tarafından aktive edilen nitrik oksit üretimi. Son kanıtlara göre apoptozis iskemik bir testiste iskemik reperfüzyon hasarının ardından önemli bir şekilde artar. Ancak kontralateral testiste germ hücre kitlesinin azaltılmasında apoptozisin rolü bilinmemektedir.

1 saatlik iskemi yapılan grupta esas olarak testisin periferindeki yerleşen seminifer tübüllerde bozulmuş spermatogenezis gözlenmiştir. 2 saatlik iskemide çoğu tübülde spermatogenetik bozunma meydana gelmiştir. Bu testis grubunda farklı derecelerde disorganizasyon, tek hücre ve hücre kümesi şeklinde apoptotik hücrelere rastlanmıştır. Ayrıca bazal membrandan ayrılmış spermatogenetik hücreler gösterilmiştir. İskeminin 3. saatinde ise daha fazla bir hasar gözlenmiştir. Çok sayıda tübülde dev hücre ve apoptotik kümeler görülmüştür. Germ hücrelerinde bazal membrandan ayrılma, lümen içine eksfoliasyon görülmüştür. İskeminin 24 saat sonrası şiddetli germ hücre hasarı gözlenir ve seminifer tübüllerde sadece sertoli hücrelerine rastlanır. Ayrıca bazal membrandan ayrılış azalmış germ hücre tabakasında artmış sayıda apoptotik hücreler ve dev hücrelere rastlanır (Sukhotnik I ve ark. 2005).

Testis torsiyonu gelişen olgularda amaç testis fonksiyonlarının korunması ve fertilitenin devam ettirilmesidir. Tek taraflı testis torsiyonunda, her iki testiste reperfüzyon hasarı gösterilmiştir (Akgür FM ve ark. 1994). Bunun aksini gösteren deneysel çalışmalar da mevcuttur (Turner TT. ve ark. 1987, Ryan PC ve ark.1988). Karşı taraf testisin nasıl etkilendiği net olarak açıklanamamakla beraber, sıklıkla immünojenik mekanizmalar (Nagler HM ve ark. 1982,Koşar A ve ark. 1999) ve testislerdeki doğumsal anomaliler sorumlu tutulmaktadır (Dominguez C ve ark. 1994). Torsiyon sonucu gelişen testiküler hasar, torsiyonun derecesi ve süresiyle yakın ilişkilidir. Torsiyon derecesi  $360^{\circ}$  nin üzerinde ve süresi de 24 saatten fazlaysa ciddi atrofi ve testis kaybıyla sonuçlanmaktadır. İlk 4- 6 saatte müdahale edildiğinde prognoz oldukça iyidir. Müdahale için bekleme süresi 24 saati geçen olguların çoğunda testis atrofisi izlenmiştir. Müdahale için bekleme süresi 8 saati geçen olgularda testis boyutlarında ciddi azalma izlenmiştir. Tek taraflı testis torsiyonunda, karşı taraf testiste görülebilecek hasarın hastanın yaş grubuyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Prepubertal ve olgun ratların karşılaştırıldığı çalışmalarda, prepubertal ratların testislerinin kısa dönem torsiyona daha dayanıklı olduğu ve fonksiyonlarını sürdürdüğü bildirilmiştir (Becker EJ Jr ve ark. 1994).

Kontralateral testiste apoptozis iskemiden 1 saat sonra kan akımının azalmasına bağlı olarak germ hücre apoptozisinde bir artış olur. Ancak istatistiksel

öneme 2 ya da 3 saatlik bir iskemi ardından ulaşılır. Germ hücre programlı ölümündeki artış kontralateral testiste gösterilmiştir. Bu iskemi süresiyle ilişkili olarak germ hücre apoptozisi arasında ilişki vardır. Hem apoptotik hücrelerin sayısı hem de tübüllerin içerdiği apoptotik hücreler başlangıçta 1 saati izleyen iskemide artarken 2 ve 3 saatlik iskemide istatistiksel öneme sahip olmuştur. Bu etkinin mekanizması net değildir. Bu da reperfüzyon yapılmayan gruplarda daha belirgindir. Sonuç olarak iskemik testiste çok sayıda sitokin, enzim ve medyatör, serbest oksijen radikallerinden ya da diğer reperfüzyon ürünlerinin kontralateral testiste programlı hücre ölümünü tetiklemesinden daha etkilidir. Güncel veriler infertilitede testiküler iskeminin sonuçlarını, spermatogenezisin arestini ve germ hücrelerin kontralateral testiste apoptotik yolakla ölümünün açıklanmasını içermektedir ve kontralateral testiste testiküler iskemi apoptozisi tetikler. İskeminin artan süreleri germ hücrelerinin programlı hücre ölümünün artışına yol açar. Buna ek olarak iskemik testiste iskeminin tetiklediği hücre ölümü kontralateral testiste artmış germ hücre apoptozisi önemli bir oranda germ hücre ve fertilitate kaybına neden olur ( Sukhotnik I. ve ark. 2005).

Unilateral testiküler arter ligasyonu sonrasında kontralateral testiste membrana propriada katlanma, kollajen fibriller, elektron yoğun cisimcikler ve net sitoplazmik bölgelere rastlanmıştır. Aynı zamanda sertoli ve leydig hücreleri iskeminin 3. gününde normal bulunmuştur. Akrozomal enzimler ya da nörohumoral mekanizma kontralateral hasara neden olabileceği görüşleri bulunurken unilateral testiküler torsiyonun kontralateral testiste ultrastrüktürel düzeyde hasara neden olmayacağını savunan görüşler de bulunmaktadır. Tanyel ve arkadaşlarının kabul gören teorisi kan akımındaki azalma kontralateral testiste refleksiv bir azalmadır. Son çalışmalar 24 saatlik ipsilateral testiküler iskemide kontralateral tarafta da ultrastrüktürel değişiklik belirlenmiştir. Bu sonuçlar da kan akım değişiklikleri elektron mikroskobik olarak zararlı etki gösterir (C. Savaş ve ark. 2002).

Unilateral testis iskemilerinde bilateral testiküler hasarlanmayı açıklamaya yönelik olarak yapılan çalışmalarda hormon düzeyleri de ölçülmüştür. İskemi süresindeki uzamaya koşut olarak testosteron düzeyi düşük bulunmuştur (Terry T ve ark. 2005). Fraser ise aynı olay süresince, testosteron düzeyinin düşmemekte ve

prolaktinin düzeyi değişmemekte olduğunu göstermiştir (Leappe LL. ve ark. 1986). Bir başka çalışmada unilateral testis torsiyonlu sıçanlarda salt LH yükselmesi saptamışlardır. FSH düzeyi artmış olarak bulunmaktadır. Neden olarak bilateral testiküler hasarlanma sonucu seminifer tübül yanıtının azalması gösterilmektedir (Workman SJ ve ark.1988). Testis iskemilerinde sağaltım mekanizmaları için henüz hayvan deneyi aşamasında olmak üzere birçok sağaltım yöntemi önerilmektedir. Günümüzde genelde uygulanan klasik yöntem; acil eksplorasyon, detorsiyon ve bilateral testiküler fiksasyondur. Gecikmiş olgularda ise orşiektomi ve kontralateral testis fiksasyonu işlemi uygulanmaktadır (Leappe LL. ve ark. 1986, Zini ve ark. 1998). Unilateral torsiyondan sonra testiküler hasarın gelişiminde çok hassas biyokimyasal değişiklikler görülmüştür (Pedrosa ve ark. 2001). Spermatik kord torsiyonunun ardından her testis için kan akımı bağımsız olduğu için kontralateral testiste hasar şaşirtıcı anatomik ve fizyolojik değişikliklere neden olur. Unilateral testiküler torsiyon kontralateral testiste kan akımında azalmayı başlatır (Tanyel ve ark. 1989).Ancak doku oksijen konsantrasyonları ölçülmüş, kontralateral testiste oksijen parsiyel basıncı unilateral torsiyon süresince etkili olmamıştır (Klotz ve ark. 1996).

Bu çalışma; amaçlanan iskemik reperfüzyon modelinde testis dokusu hasarının iskemiye yol açan farklı deneysel yöntemler arasındaki apoptotik hücrelerin niceleyici analizlerinin karşılaştırılması ve dolayısıyla farklı çalışmalar sonucu elde edilecek apoptozis modellerinin karşılaştırılmasına olanak sağlayacaktır. Bu çalışmalar iskemiye bağlı sperm maturasyonunda ve kalitesinde oluşan değişikliklerin ortaya konmasında önemli katkılar sağlayacaktır.

## 5. SONUÇ VE YORUMLAR:

Bu çalışmada kan akımındaki azalma ile iki farklı mekanizma aracılığıyla testiste hasar ve germ hücre ölümüne neden olabileceği gösterildi. Ligasyon ve torsiyon mekanizmaları arasındaki en önemli fark torsiyon ile bozulan venöz dönüşün ikinci bir etki oluşturması ve daha fazla hasar yapması oldu. Bu nedenledir ki daha fazla oksidatif stres oluşumu gerçekleşti ve dolayısıyla daha çok apoptozis oluştu. Özellikle ilk 3 gün içerisinde nekroza varan hasar oluşumu saptandı. Bu hasarın daha fazla olmasında kan damarlarında lökositin artışı, ilk inflamasyon yanıt olarak intersitisyel alana göçü farklılığın oluşmasındaki asıl etkindir.

Çalışmada görülen önemli bir bulgu torsiyon grubuna özel 7.günde görülen dev hücre formasyonunun saptanmasıdır. Bir transformasyon mekanizmasını düşündüren hücre farklılaşmasının makrofaj yönlenmesi şeklinde geliştiği ve oksidatif stresi artıran bir etkisinin olduğu kabul edildi..

Çalışmamızda 6 saatlik iskemi ile hem ligasyon hem de torsiyon grubunda ciddi anlamda serbest radikal oluşumunun gerçekleştiği ve bunun apoptoz ile ilişkili olduğu saptandı. ROS üretiminin tartışmalı olarak yararlı ya da zararlı olduğu açık değildir. Hasarlı dokuda ortama bırakılan ve kontralateral testisi etkileyerek daha az olmak kaydıyla hasar oluşturan özellikle immunolojik mekanizmaların olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmadan çıkan sonuçlar göstermektedir ki; Çalışmamızda 6 saatlik iskemi sonrasında bile testisin tamamen fonksiyonunu yitirmedi, torsiyon uygulanan testisler ligasyon uygulanan gruba göre daha fazla hasar gördü, kontralateral testislerde de her iki grupta da hasar oluştu. Torsiyon uygulanan gruba özel olarak 7 günlük reperfüzyonda dev hücre formasyonu görüldü. 28 günlük reperfüzyonda ise her iki grupta da iyileşme gözlemlendi. iNOS tanımlanması eNOS tanımlamasına göre daha fazla saptandı. Sonuç olarak; her iki deneysel uygulama da germ hücre apoptozisinin oluşmasında etkili oldu.

## 6. KAYNAKLAR:

Allan, D. J. Harmon, B. V. & Kerr, J. F. R. Cell death in spermatogenesis. In: Perspec Mamm Cell death (ed. C. S. Potten), pp. Oxford University Press, London, 1987, 289–258

Arends M. Wyllie A.H. Apoptosis: mekanism and roles in pathology, Int. Rev. Exp. Pathol. , 1991, 32: 223- 254

Akgür FM, Kılınç K, Aktuğ T. , Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. Urol Res., 1993;21(6):395- 9

Akgür FM, Kılınç K, Aktuğ T, Olguner M. The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. J Urol. , 1994, 151: 1715

Akgür FM, Kılınç K, Tanyel FC, et al: Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral testicular torsion and detorsion. Urology, 1994, 44: 413- 418

Arıncı K, Elhan A Anatomi Güneş Kitabevi, Ankara 1995,417- 420

Ashkenazi A. Dixit V. M. Death receptors: Signaling and modulation, Science. 1998, 281:1305- 1308

Andiran F, Okur DH, Kilinc A ve ark. Do experimentally induced ipsilateral testicular torsion, vas deferens obstruction, intra-abdominal testis or venous obstruction damage the contralateral testis through a common mechanism? BJU Int, 2000, 85: 330

Ayşoğlu E. Apoptoz. T Klin Tıp Bilimleri Dergisi. , 2001, 21: 57- 62

Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury,J Surg Res. , 2002 Jun 15,105(2):248-58.

Akşit H.ve Bildik A. Derleme 55 Apoptozis, YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008 19(1): 55- 63

Brehmer-Andersson E, Andersson L, Johansson JE. Hemorrhagic infarctions of testis due to intimal fibroplasia of spermatic artery, *Urology*, 1985; 25: 379–382

Bruhwyler J, Chleide E, Liegeois JF, Carreer F: Nitric oxide: A new messenger in the brain; *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1993, Vol 17: 373- 384

Becker, E.J. Turner, T.T. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *J. Androl.* , 1995,16:342–351

Balakumran A, Champbell G A, Maslen M T. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996,139: 122- 127

Bergh A, Damber JE, Hjertkvist M. Human chorionic gonadotrophin-induced testicular inflammation may be related to increased sensitivity to interleukin- 1 *Int J Androl.*, 1996 Aug,19(4):229- 36

Barkley C, York JP, Badalament RA, Nesbitt JA, Smith JJ, Drago JR. , Testicular torsion and its effects on contralateral testicle *Urology.*, 1993 Feb,41(2):192- 4

Bartsch G, Frank H, Marberger H, Mikus G, Testicular torsion: Late results with special regard to fertility and endocrine function, *J Urol*, 1980,56: 256- 263

Bray S.E. Schorl C. Hall P.A. The challenge of p53: Linking biochemistry, biology and patient management, *Stem Cell*, 1998, 16: 248- 260

Becker EJ Jr, Turner TT. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. , *J Androl*, 1995, 16: 342

Bruhwyler J, Chleide E, Liegeois JF, Carreer F: Nitric oxide: A new messenger in the brain; *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1993,17: 373- 384



Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl.* , 1998,19:487- 497

Beumer T L, Roepers L H, Gademan S U, Lock M T W, Tycho K B, Kal H B, Rooij D G. Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl- 2 Family members. *Mol Repr Development*, 2000, 56: 353- 359

Bergh A. Ola Collin ve Erik Lissbrant Effects of Acute Graded Reductions in Testicular Blood Flow on Testicular Morphology in the Adult Rat *Biology Of Reproduction*, 2001, 64: 13–20

Barlas M. ve Hatiboğlu C. , The effect of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury *International Urology and Nephrology*, 2002, 34: 81-86

Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histological changes occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *J Urol.* , 1985, 133: 906–11.

Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion *J Androl.*, Jan-Feb1986,7(1):23- 31

Chakraborty J, Hikim APS, Jhunjhunwala J, Torsion of the spermatic cord: A long term study of the contralateral testis, *Urol Res*, 1986,14: 257- 260

Cohen J J. Apoptosis. *Immunol Today*, 1993,14: 126- 130

Cohen J J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract.* , 1993,15: 35- 43

Caesar R, Kaplan G. Incidence of the bell clapper deformity in an autopsy series, *Urology*, 1994, 44: 114

Cummings M C, Winterford C M, Walker N I. Apoptosis. Am J Surg Pathol. , 1997, 21: 88- 101

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death, Biochem. J. , 1999, 341:233- 249

Cooper G. M. Cell signaling, In: The Cell: a molecular approach, ASM press, 2th, Washington D.C. , 2000, 13, PP:523- 552

Cutrin, J.C. Boveris, A. Zingaro, B. Corvetti, G. Poli, G.. In situ determination by surface chemiluminescence of temporal relationships between evolving warm ischemia–reperfusion injury in rat liver and phagocyte activation and recruitment. Hepatology, 2000, 31: 622–632

Cuzzocrea S, Riley DP, Çaputi AP, Salvemini D. Antioxidant Therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. , Pharmacol Rev 2001, 53: 135

Childs EW, Udopi KF, Wood JG, et al: In vivo visualization of reactive oxidants and leukocyte-endothelial adherence following hemorrhagic shock, Shock, 2002, 8: 16- 25

Chaki S. P. , Ghosh M. Misro M. Simultaneous increase in germ cell apoptosis and oxidative stress under acute unilateral testicular ischaemia in rats, international journal of andrology, 2003, 26:319–328

Çakan M, Çakan T. Aydos T. Yılmaz D, Öğüş E. Kılıç A.S. Sıçan testisindeki iskemi –reperfüzyon hasarı sonucu oluşan oksidatif stres ve histopatolojik değişiklikler üzerine ketoprofenin koruyucu etkisi, Türk Üroloji Dergisi, 2007, 33 (1): 50- 55,

Dive C. Hickman J.A. drug-targets interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death?, Br. J. Cancer, 1991, 64: 192- 196

Damber JE, Bergh A. Testicular microcirculation a forgotten essential in andrology? [editorial]. *Int J Androl.* , 1992, 15: 285–292

Dominguez C, Martinez Verduch M, Estornell F, Garcia F, Hernandez M, Garcia-Ibarra F. Histological study in contralateral testis of prepubertal children following unilateral testicular torsion. , *Eur Urol.* , 1994, 26: 160

Deveraux Q.L. Roy N. Stennicke H.R. et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase- 8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases, *EMBO J.* , 1998, 17: 2215- 2223

Denecker G. Vercammen D. Declercq W. Vandenabeele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors, *Cell Mol Life Sci.* , 2001, 58: 356- 370

Furchgott RF, Zawadzki JV. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature*, 1980;288:373- 6

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: 199- 210, 2004

Filho, DW, Torres, M.A. Bordin, A.L.B. Araujo, E.J. Weber, A.L. Charao, C.C.T. Crezcynski-Pasa, T.B. Reperfusion time is mandatory for contralateral testicular oxidative damage after ipsilateral torsion. , *J. Urol.* , 2004

Guimarães S. B. Paulo Roberto Leitão de Vascôncelos In vivo acute changes in ATP and glucose concentrations in the testicles of prepubertal rats following unilateral torsion *Acta Cir. Bras.* vol.17 no.2, Mar./Apr. 2002, 30.

Krarpup T. The testis after torsion. *Br J Urol* 1978;50: 43

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* , 1992,119: 493- 501

Gutteridge JMC. Iron and oxygen radicals in brain. *Ann Neurol*, 1992, 32: 516-521

Gonzalez-Flecha, B.S. Cutrin, J. Boveris, A.. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J. Clin. Invest.* , 1993, 91: 456–464

Granados, E.A. Caicedo, P. Garat, J.M.. Testicular torsion. III. After 12 h. *Arch. Esp. Urol.* , 1998,51:978–981

Gasbarrini, A. Pasini, P. Nardo, B. De Notaris, S. Simoncini, M. Cavallari, A. Roda, E. Bernardi, M.Roda, A. Chemiluminescent real time imaging of post-ischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. *Free Radic. Biol. Med.* , 1998,24, 211–216

Grinberg M. Sarig R. Zaltsman Y. Frumkin D. Grammatitakis N. Reuveny E, Gross A. tBid Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis, *J. Biol. Chem.* , 2002, 277:12237- 12245

Gurp M.V. Festjens N. Loo G.V. Saelens X. Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death, *Science Direct.* , 2003, 304: 487- 497

Garrido C, L Galluzzi, M Brunet, PE Puig, C Didelot and G Kroemer Mechanisms of cytochrome c release from Mitochondria 2006, 13: 1423–1433  
Green, Measuring Apoptosis at the Single Cell Level *Methods.* , 2008 March, 44(3): 222–228

Huckins, C. The morphology and kinetics of spermatogonyal degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anatomical Record*, 1978, 190: 905–906

Hadziselimovic F, Synder H, Duckett J: Testikuler histology in children with unilateral testicular torsion, *J Urol* 1986, 136, 208- 210

Heindel RM, Pakyz RE, Reinking Ln, Cosentino MJ. The effect of various degrees of unilateral spermatic cord torsion on fertility in the rat. , *J. Urol* 1990;144:366- 369

Hsueh A J W, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonodal Cell Apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research.* , 1996,51: 432- 457

Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J,Dunkel L. Apoptotic Celi Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatric Research*, 1996, 40: 351- 356

Hilton D.A. Love S. Barber R. Demonstration of apoptotic cells in tissue sections by in situ hibridization using digoxigenin-labeled poly-A oligonucleotide probs to detect thymidine-rich DNA sequences, *J. Histochem. Cytochem*, 1997, 42: 13- 20

Hofmann K. Bucher P. Tschopp J. The CARD domain a new apoptotic signallling motif. *Trends Biochem.* 1997, 22: 155- 156

Huppertz B. Frang H. G. Kaufmann P. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization, *Anat. Embryol.* , 1999, 200:1- 18

Hikim S,Amiya P, Wang C, Leung A, Swerdloff R S. Involvement of Apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antogonist treatment. , 2000,57: 136- 141

Hakgüder G, Akgür FM, Ates O, et al: Short-term intestinal motility that can be preserved by xanthine oxidase inhibition, *Dig Dis and Sci* 2002, 47: 1279- 1283

Ha TY, Kim HS, Shin T.Expression of constitutive endothelial, neuronal and inducible nitric oxide synthase in the testis and epididymis of horse, *J Vet Med Sci.* , 2004 Apr;66(4):351- 6

Ikeda M, Kodama H, Fukuda J. Shimizu Y, Murata M, Kumagai J,Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Repr*, 1999, 61: 393- 399

Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist*, 1999, 4: 332- 9

Intengan HD, Schiffrin EL. Disparate effects of carvedilol versus metoprolol treatment of stroke-prone spontaneously hypertensive rats on endothelial function of resistance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* , 2000, 35: 763- 8

Ishikawa T, Kondo Y, Goda K, Fujisawa M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in transgenic mice accelerates testicular germ cell apoptosis induced by experimental Cryptorchidism, *J Androl.* , 2005 Mar-Apr, 26(2):281- 8

Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol.* 2000,86: 598- 606

Jagadish S,Hikim APS: Germ cell dejeneration in the contralateral testis of the Guinea pig with unilateral torsion of the spermatic cord *J Androl.* , 1986,7: 16- 22

Jiang J. Serinkan B.F. Tyurina Y.Y. Borisenko G.G. Mı Z. Robbins P.D. Schroit A.J. Kagan V. E. Peroxidation and externalization of phosphatidylserine associated with release of cytochrome c from mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine.* 2003, 35: 814- 825

Kerr J.F.R. Wyllie A.H. Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 1972, 26: 239-257

Kraup T. The testes after torsion. *Brit J Urol* 1978; 50: 43- 46

Kelley W.S. Stump K.H. A rapid procedure for isolation of large quantities of *Escherichia coli* DNA polymerase I utilizing a *polA* transducing phase, *J. Biol Chem.* , 1979, 254:3206- 3210

Kogan SJ Testis and scrotum: Acute and chronic scrotal swellings. In: Gillenwater JY, Grayhock JT, Howards SS, Duckett JW (eds). *Adult and Pediatric Urology*. 2.nd. ed. MosbyYearbook, 1991,pp: 2195- 2215

Kerr J B. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenetic cycle, *J Reprod Fertil*, 1992, 95: 825- 830

Katusic ZS, Cosentino F. Nitric oxide synthase: from molecular biology to cerebrovascular physiology. *News Physiol Sci.* , 1994;9: 64- 67

Karagüzel G, Tanyel FC, Kiliç K, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A. The preventive role of chemical sympathectomy on contralateral testicular hypoxic parameters encountered during unilateral testicular torsion, *Br J Urol* 1994; 74: 507–10.

Korsmeyer S J. Regulators of cell death. *Reviews*. 1995,11: 101- 105

Klotz, T. Vorreuther, R. Heindenreich, A. Zumb\_e, J. Engelman, U. . Testicular tissue oxygen pressure, *J. Urol.* , 1996,155:1488–1491

Koşar A, Küpeli B, Alçıgır G, Ataoğlu H, Sarıca K, Küpeli S. Immunologic aspect of testicular torsion: detection of antisperm antibodies in contralateral testicle, *Eur Urol* , 1999, 36: 640

Konishi Y, Lebdnen M, Donovan N, Bonni A. Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cyclic to the cell death machinery, *Mol. Cell.* , 2002, 1: 1005- 1016

Kim HC, Byun JS, Lee TK, Jeong CW, Ahn M, Shin T. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the testes of pigs. *Anat Histol Embryol.* , 2007 Apr, 36(2):135- 138

Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis (Review). *Methods*, 2008 Mar, 44(3):205- 21

Lisa, M. W. Suzarne, H. Pamela, J. F. & John, M. H. Apoptotic cell death and fertility in three unilateral cryptorchid rat models, *Urological Research*, 2000, 28: 332–337

Lu J, Ashwell K, Ken W S, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis, *Spine* 2000, 25: 1859- 1866

Langer JC, Sohal SS, Blennerhasselt P: Mucosal permeability after subclinical intestinal ischemia/reperfusion injury: An exploration of possible mechanisms. *J pediatr Surg.* , 1995, 30: 568- 572

Lissbrant E, Löfmark U, Collin O, Bergh A. Is nitric oxide involved in the regulation of the rat testicular vasculature? *Biol Reprod.* , 1997 May;56(5):1221- 7

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors, *Cell.* , 1998, 94: 481- 490

Loo D.T, Rillema J.R. Measurement of cell death, In: Mather JP, Barnes D. *Animal Cell Culture Methods*, Academic Press, 1998, 57, PP:252- 265



Lin W W, Lamb D J, Lipshultz L I, Kim E D. Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. *Int UrolNephrol.* , 1999, 31(3): 361- 370

Lysiak JJ, Nguyen QA, Turner TT: Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *J Androl.* , 2002, 23: 400- 409

Lee NP, Cheng CY. Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics (Review). *Biol Reprod.* , 2004 Feb, 70(2):267- 76.

Lee NP, Mruk DD, Wong CH, Cheng CY. Regulation of Sertoli-germ cell adherens junction dynamics in the testis via the nitric oxide synthase (NOS)/cGMP/protein kinase G (PRKG)/beta-catenin (CATNB) signaling pathway: an in vitro and in vivo study. *Biol Reprod.* , 2005 Sep, 73(3):458- 71

Lin EP, Bhatt S, Rubens DJ, Dogra VS. Testicular torsion: twists and turns. *Semin Ultrasound CT MR.*, 2007 Aug, 28(4):317- 28

Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases (Review). *Biochim Biophys Acta.* , 2008 Jan, 1784(1):106- 15

Mishell B.B. Shiiqi S.M. Henry C. et al. Selected methods in cellular immunology, 1980, 21- 22

Mikuz G Testicular torsion: simple grading for histological evaluation of tissue damage, *Appl Pathol*, 1985,3: 134

Madgar I. , Lunenfeld B, Mashiach R, Effect of testicular torsion contralateral testis and fertility in mature rats. *Arch Androl.* , 1987,19: 237- 241

Melikoglu, M. Guntekin, E. Erkilic, M. Karaveli, S. Contralateral testicular blood flow in unilateral testicular torsion measured by the Xenon- 133 clearance technique. *Br. J. Urol.* , 1992,69, 633–6

Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway; *The New England Journal of Medicine*, 1993 Dec, 30: 2002- 2012

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* , 1993;268:12231- 12234

Markey CM, Jequier AM, Meyer GT, Martin GB. Testicular morphology and androgen profiles following testicular ischaemia in rams. *J Reprod Fertil*, Aug 1994,101(3):643- 50

Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis, *Am J Pathol.* , 1995,46: 3- 15

Menger MD, Rucker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: On the mechanisms of capillary “no-reflow ”, *Shock* 1997, 8: 2- 7

Middendorff R, Müller D, Wichers S, Holstein AF, Davidoff MS. Evidence for production and functional activity of nitric oxide in seminiferous tubules and blood vessels of the human testis. *J Clin Endocrinol Metab.* , 1997 Dec, 82(12):4154- 61

Moll U.T. Erster S. Zaika A. p53, p63 and p73-solos , alliances and feuds among family members. *Biochim Biophys Acta.* , 2001, 1552: 47- 59

Miramar M.D. Constantini P. Ravagnan L. et al. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *J.Biol. Chem.* , 2001, 276:391- 398

Muppidi J, Porter M, Siegel RM. Measurement of apoptosis and other forms of cell death (Review). *Curr Protoc Immunol.* , 2004 May, Chapter 3:Unit 3.17

Moon C, Ahn M, Kim S, Yasuzumi F, Shin T. Increased expression of both constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in the delayed phase of acute experimental testicular torsion. *J Vet Med Sci.* , 2005 Apr, 67(4):453- 6

Marcelo G. Rodriguez, Claudia Rival, María S. Theas, Livia Lustig. Immunohistopathology of the contralateral testis of rats undergoing experimental torsion of the spermatic cord, *Asian J Androl*, 2006; 8 (5): 576–583

Mogilner JG, Lurie M, Coran AG, Nativ O, Shiloni E, Sukhotnik I: Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. , *Pediatr Surg Int.* , 2006, 22: 99- 105

Mehmet H. , Programmed cell death in development and homeostasis, Teaching workshop on apoptosis, 2006

Nagler HM, White DR. The effect of testicular torsion on the contralateral testis *J Urol.* , 1982, 128: 1343

Nolte T, Harleman JH, Jahn W. Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats, *Exp Toxicol Pathol.*, 1995 Sep, 47(4):267- 86

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, *Journal of Pediatric Surgery*, 1999, 34, 680–683

Puri P, Brton D, O'donnell B, prepubertal testicular torsio: Subsequent fertility, *J Pediatr Surg.* , 1985, 20:595- 602

Pedrosa, R.C. De Bem, A. Locatelli, C. Curi-Pedrosa, R. Geremias, R. Wilhelm Filho, D.. Time-dependent oxidative stress caused by benzimidazole, *Redox Rep.* , 2001, 6, 265–270

Ovalı E. Apoptozis, In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara, Güneş Kitabevi, 1999, PP:195- 203

O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events (Review), *Free Radic Biol Med.* , 2006 Aug 15,41(4):528- 40

Özokutan H, Mustafa Küçükaydın, Sebahattin Muhtaroglu, Yücel Tekin Kayseri The Role of Nitric Oxide in Testicular Ischemia-Reperfusion Injury, *J Pediatr Surg.* , 2000,35:101- 143.

Öztürk FApoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2002, 9 (2): 143- 148

Ransler CW, Allen TD. Torsion of the spermatic cord, *Urol Clin. North Am.* , 1982, 245- 249

Ryan PC, Whelan C, Gaffney EF, Fitzpatrick JM. The effect of unilateral experimental testicular torsion on spermatogenesis and fertility *Br J Urol.* , 1988, 62: 359

Rhee, H.W. Yoon, M.S. The effect of testicular torsion on the contralateral testis in rats, *J. Cathol. Med. Coll.* , 1988,41: 957–968

Ralitchkova, L. Nanov, Z. Gotchev, D. Hinev, A. Libald, T. Wolnik, R.. Experimental testicular torsion early and late morphological and enzymohistochemical changes. *Z. Exp. Chir. Transpl. Kunst. ,Org.* 1990, 23: 185–188

Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites, *Am J Surg.* , 1991, 161: 488- 503

Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension, *Hypertension*, 1992;20: 298- 303

Rodriguez I, Christiane O, Araki K, Garcia I, Vassali P. An early and massive wave of germinal celi apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis, *Embo J*, 1997,24: 2262- 2270

Reed JC. Warner-Lambert/Pekte-Davis award lecture: Mecanism of apoptosis, *Am. J. Pathol.* , 2000, 157:1415- 30

Putchu G.V. Moulder K.L. Golden J.P. et al. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL- 2 family member, is a critical for neuronal apoptosis, *Neuron*, 2001, 29: 615- 628

Petrosillo G. Ruggiero F.M. Pistolese M. Paradies G. Reactive oxygen species generated fromthe mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in apoptosis, *FEBS Lett.* , 2001, 509:435- 438

Romeo C, Ientile R, Impellizzeri P, Turiaco N, Teletta M, Antonuccio P, Basile M, Gentile C Preliminary report on nitric oxide-mediated oxidative damage in adolescent varicocele.*Hum Reprod*, 2003 Jan,18(1):26- 9

Rosenstein D, McAninch JW.Urologic emergencies *Med Clin North Am*.2004 Mar;88(2):495- 518

Ringdahl E, Teague L. Testicular torsion, *Am Fam Physician*, 2006 Nov 15, 74(10):1739- 43

Sade, M. Amato, S. Buyuksu, C. Mertan, S. Canda, M.S. Kaplanoglu, N. The effect of testicular torsion on the contralateral testis and the value of various types of treatment. *Br. J. Urol.* , 1988,62: 69–71

Schwartzman R A, Cidloski J A. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death, *Endocrine Reviews*, 1993,14:133- 144

Shikone, T. , Billing, H. & Hsueh Aaron, J. W. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rats testis, *Biology of Reproduction*, 1994, 51: 865–872

Sharpe R M: Regulation of spermatogenesis, in *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil E, Neill J D. Raven Press. New York, 1994, 1364- 1434

Saba M, Morales CR, De Lamirdane E, Gagnon C. morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats, *J Urol* 1997, 157: 1149- 1154

Srinivasan A. Roth K.A. Sayers R.O. Shindler K.S. Wong A.M. Fritz L.C. Tomaselli K. In situ immunodetection of activated caspase- 3 in apoptotic neurons in the developing nervous system, *Cell Death Differ*, 1998, 5:1004- 1016

Szabo C, Dawson VL. Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischemia-reperfusion, *Trends Pharmacol Sci*, 1998, 19: 287

Sinha Hikim A P, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang X-H, Swerdloff R S. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death, *J Clin Endoc and Metab*, 1998,83: 152

Steinberger E, Tjioe DY. Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia, *Fertil Steril*, 1999, 20: 639–649

Sheikh M.S. Fornace A.J. Role of p53 family members in apoptosis, *J. Cell Physiol*, 2000, 182:171- 181

Stadelmarin C. & Lassmarin, H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell & Tissue Research*, 2000,301: 19–31

Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod*. 2001 Aug, 65(2): 514- 21

Savas C. C. Özoğul, E. Karaöz ve M. Bezir Ischemia, whether from Ligation or Torsion, Causes Ultrastructural Changes on the Kontralateral Testis *Scand J Urol Nephrol*, 2002, 36: 302–306

Scorrano L. Korsmeyer S.J. mechanism of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2003, 304: 437- 444

Sprick M. R. Walczak H. The interplay between the Bcl- 2 and death receptor-mediated apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1964: 125- 132

Sezer C, Koksall IT, Usta MF, Gulkesen KH, Erdogru T, Ciftcioglu A, Baykara M. Relationship between mast cell and iNOS expression in testicular tissue associated with infertility. *Arch Androl*. 2005 Mar-Apr;51(2):149- 58

Sukhotnik I. Iness Miselevich Michael Lurie, Ofer Nativ Arnold G. Coran Jorge G. Mogilner, The time relationship between ipsilateral testicular ischemia and germ cell apoptosis in the contralateral testis in rat, Springer-Verlag, 2005;21(7):512- 6

Somuncu S, Cakmak M, Erdogan S, Caglayan O, Akman H, Kaya M. , Protective effects of trapidil in ischemia-reperfusion injury due to testicular torsion and detorsion: an experimental study, *Int J Urol.*, 2006 May, 13(5):601- 5

Sun L, Ren YP, Jiang W, Zhang MY, Hou QY. ,Expression and role of nitric oxide synthase in the testis and epididymis of *Macaca fascicularis*, *Zhonghua Nan Ke Xue Chinese*, 2006 Oct;12(10):876- 8

- Tjioe DY, Steinberger E. A quantitative study of the effect of ischaemia on the germinal epithelium of rat testes. *Reprod Fertil.*, 1970 Apr, 21(3):489- 94
- Turner TT. Acute experimental testicular torsion: no effect on the contralateral testis, *J Androl.* , 1985;6: 65- 72
- Turner TT. On unilateral testicular and epididymal torsion: no effect on the contralateral testis, 1987,1285
- Tanyel, F.C. Buyukpamuku, N. Hicsönmez, A. Contralateral testicular blood flow during unilateral testicular torsion, *Br. J. Urol.* , 1989,63, 522–524
- Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIH Res.* , 1991, 3: 75
- Turner TT, Brown KJ. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow, *Biol Reprod*, 1993 Aug, 49(2): 401- 7.
- Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol*, 1993 May, 7(5):643- 50
- Turner, T.T. Caplis, L.A. Rhoades, C.P.. Testicular vascular permeability: effects of lesions associated with impaired testis function, *J. Urol.* , 1996,155, 1078–1082.
- Turner TT, Tung KSK, Tomosama H, Wilson LW Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis of the rat, 1997, *Biol Reprod* 57: 1267
- Thornberry N.A. Lazebnik Y. Caspases: Enemies within, *Science*, 1998, 281:1312- 1316
- Tomatır A. G. Apoptoz; programlı hücre ölümü, *T. Klin. J. Med. Sci.* , 2003, 23: 499- 508



Taneli F, Vatansever S, Ulman C, Giray G, Genc A, Taneli C. Pre-ischemic administration of nitric oxide synthase inhibitors reduced germ cell apoptosis after spermatic vessel ligation in the rat testis, *Urol Int.* , 2005, 75(1): 70- 4

Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC, Criollo A, Vitale I, Hangen E, Modjtahedi N, Kroemer G. Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. *Methods Mol Biol.* , 2008, 445: 29- 76

Uzun H. Kalkan M. Tunç B, Aktaş Ş, Çetinkaya M. Alıcı B. Testiküler torsiyonda hiperbarik oksijen tedavisinin etkinliği hyperbaric oxygen therapy in testicular torsion, 2004, 30 (3): 273- 278

Üstün H, Akgül KT, Ayyıldız A, Yağmurdur H, Nuhoğlu B, Karagüzel E, Oğuş E, Germiyanoglu C. Effect of phosphodiesterase 5 inhibitors on apoptosis and nitric oxide synthases in testis torsion: an experimental study, *Pediatr Surg Int.* , 2008 Feb, 24(2):205- 11

York JP, Drago JR. : Torsion and the contralateral testis *Brit J. Urol* 1985;133:294- 297

Yin Y, Hawkins K L, Devvolf W C, Morgantaler A. Heat stres causes testicular germ celi apoptosis in adult mice, *J Androl.* , 1997,18: 159- 165

Yu S.W. Wang H. Poitras M.F. et al. Mediation of poly (ADP- ribose) Polymerase -1-dependent cell death by apoptosis- inducing factor, *Science*, 2002, 297:259- 63

Yamamoto, C. M. Sinha Hikip, A. P. Huynh, P. N. Shapiro, B.Lue, Y. Salameh, W. A. Wang, C. & Swerdloff, R. S. Redistribution of bax is an early step in an apoptotic pathway leading to germ cell death in rats, triggered by mild testicular hyperthermia. *Biology of Reproduction*, 2000, 63: 1683–1690.

Yılmaz N. , Pençe S. Kaspazlar derleme, *İbni-sina tıp dergisi* 2002, 7

Yamato, M. Egashira, T. Utsumi, H. Application of in vivo ESR spectroscopy to measurement of cerebrovascular ROS generation in stroke, *Free Radic. Biol. Med.* 2003,35, 1619–1631.

Yağmurdur H, Ayyıldız A, Karagüzel E, Akgül T, Üstün H, Germiyanoğlu C. Propofol reduces nitric oxide-induced apoptosis in testicular ischemia-reperfusion injury by downregulating the expression of inducible nitric oxide synthase. *Acta Anaesthesiol Scand.* , 2008 Mar, 52(3):350

Yip KH, Huang Y, Wayne MM, Lau HY. Induction of nitric oxide synthases in primary human cultured mast cells by IgE and proinflammatory cytokines. *Int Immunopharmacol*, 2008 May, 8(5):764- 8

Verhagen A.M. Ekert P.G. Pakusch M. et al. Identification of DIBLO,a Mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins, *Cell.* , 2000, 102: 43- 53

Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*, 1980,284: 555- 556

Wallace DMA, Gunter PA, Landon GW: Sympathic orchidopathia: An experimental and clinical study, *Brit J. Urol*, 1982, 54: 765- 768

Walsh TR, Rao PN, Makowka L, Lipid peroxidation of is a nonparenchymal cell event with reperfusion after prolonged liver ischemia, *J Surg Res.* , 1990,49: 18- 22

White BC, Grossman LI, Krause GS: Brain injury by global ischemia and reperfusion a theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurol.* , 1993, 43: 1656- 1665

Willingham M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis, *J.Histochem. Cytochem.* , 1999, 47: 1101- 1109

Wendy K. A. , Chris E.C.Richard G. K.Review Article: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochemical J.* , 2001, 357,593-615

Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis, *Genes& Development.* 2001, 15: 2922- 293

Zini, A. Abitbol, J. Girardi, S.K. Shulsinger, D. Goldstein, M. Schlegel, P.N.. Germ cell apoptosis and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression following ischemia–reperfusion injury to testis, *Arch. Androl.* , 1998,41, 57–65.

Zha J. Harada H. Yang E. jockel J. Korsmeyer S.J. Serine phosphorylation of death agonist bad in response to survival factor results in binding to 14- 3- 3 not Bcl-xl, *Cell*, 1996, 87: 619- 628

Zhang J, Xu M Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis, *Trends in Cell Biology*, 2002,12 (2): 84- 89).