

T.C.
ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
TESTİS İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE
NİMESULİD'İN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Eyüp Can POLAT

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Durdu ALTUNER

ERZİNCAN
2017

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Doç.Dr.Durdu ALTUNER danışmanlığında, 15780601002 nolu Yüksek Lisans öğrencisi Eyüp Can POLAT tarafından hazırlanan bu çalışma 25.07.2017 tarihinde saat 10⁰⁰ da jürimiz tarafından oy birliği ile Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir. 25.07.2017

Unvan Adı Soyadı
Juri Başkanı Prof.Dr.Halis SÜLEYMAN

İmza



Üye Doç.Dr.Durdu ALTUNER



Üye Yrd.Doç.Dr.Celalettin Semih KUNAK



ONAY:

Bu tez Erzincan Üniversitesi Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 13.07.2017 tarih ve 16/1 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.


Yrd.Doç.Dr. İlyas SAYAR

Enstitü Müdürü

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uygunluğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Ecz. Eyüp Can POLAT



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

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1700100624
Konu : HADYEK Kararı.

31.03.2017

HUKUK MÜŞAVİRLİĞİNE

İlgi : 28.02.2017 tarihli ve 77040475-000-E.1700064357 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 30.03.2017 tarih ve 3 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 34 no'lu kararı ile sözkonusu tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz ederim.

Toplantı Tarihi: 30.03.2017

Toplantı Sayısı : 3

KARAR N0 34: Erzurum Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Durdu ALTUNER'in yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Testis İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Nimesulid'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması ile ilgili 28.02.2017 tarih ve 77040475-000-E.1700064357 sayılı Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü, Hukuk Müşavirliği yazısı ekindeki Erzurum Üniversitesi Rektörlüğünün 24.02.2017 tarih ve 44495147-804.01-E.10467 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

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

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#birim=veteriner-fakultesi>
Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr



1 / 2

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
www.atauni.edu.tr adresinden doğrulama yapabilirsiniz. Doğrulama Kodu=08223FA

TEŞEKKÜR

Her an bilgi birikimi ve tecrübesinden faydalanmama izin veren, yol gösteren ve ufkumu açan Tıbbi Farmakoloji A.B.D. Başkanı Sayın Prof. Dr. Halis SÜLEYMAN hocama,

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini esirgemeyen, her konuda yardımcı olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Durdu ALTUNER'e,

Tezimin deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Bahadır SÜLEYMAN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Renad MAMMADOV'a,

Tez çalışmamın yürütülmesinde bana her türlü kolaylığı sağlayan ve tezim ile ilgili tavsiyelerde bulunarak yol gösteren Erzincan Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Bülent GÜMÜŞEL'e,

Tez çalışmamı yürütmem için benden desteğini esirgemeyen Erzincan Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekan Yardımcısı Sayın Yrd. Doç. Dr. Sümeyra TUNA YILDIRIM'a,

Bugünlere gelmemde her anımda maddi, manevi hiçbir desteğini benden esirgemeyen fedakar babama, anneme ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KISALTMALAR	VII
ÖZET	IX
ABSTRACT.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemi/Reperfüzyon (İ/R) Hasarı	3
2.2. İskeminin Hücre ve Organ Düzeyinde Etkileri	3
2.3. İ/R Hasarının Patogenezi	6
2.4. İ/R Hasarında Sitokinlerin Rolü	8
2.5. Testis İ/R Hasarı	11
2.6. Testis İ/R hasarının tedavisi	12
2.6.1. Cerrahi Girişim:	12
2.6.2. Antioksidan Terapi.....	13
2.7. Nimesulid	16
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Deney Hayvanları	19
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	20
3.2. Metot.....	22
3.2.1. Deney Grupları.....	22

3.2.2. Deney Prosedürü.....	22
3.2.3. Biyokimyasal Analizler	23
3.2.4. Histopatolojik Analizler.....	26
3.2.5. İstatistiksel Analizler	26
4. BULGULAR	27
4.1. Biyokimyasal Bulgular	27
4.1.1. MDA Analiz Sonuçları	27
4.1.2. tGSH Analiz Sonuçları	28
4.1.3. IL-1 β Analiz Sonuçları	29
4.1.4. TNF- α Analiz Sonuçları	30
4.1.5. COX-1 Analiz Sonuçları.....	31
4.1.6. COX-2 Analiz Sonuçları.....	32
4.1.7. Histopatolojik Bulgular.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
6. KAYNAKÇA.....	45
ÖZGEÇMİŞ	57

KISALTMALAR

AMP: Adenozin monofosfat

ATP: Adenozin trifosfat

COX-2: Siklooksijenaz 2

DNA: Deoksiribonükleik asit

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz

ET: Endotelin

GSH: Glutasyon

GSHPx: Glutasyon peroksidaz

H₂O₂: Hidrojen peroksit

I/R: İskemi Reperfüzyon

IL-1: İnterlökin-1

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

i.p.: intraperitoneal

KAT: Katalaz

KO: Ksantin oksidaz

MDA: Malondialdehid

MIP: Makrofaj inflamatuvar protein

MODS: Multiorgan disfonksiyon sendromu

MPO: Miyeloperoksidaz

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NF-κB: Nükleer faktör κB

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

O₂: Moleküler oksijen

OH: Hidroksit

PAF: Trombosit aktive edici faktör

PG: Prostaglandin

PGI₂: Prostaglandin

PNL: Polimorfonükleer lökositler

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SİRS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu

SOD: Süperoksit dismutaz

SSS: Santral sinir sistemi

TNF- α : Tümör nekroz faktör α

TxA₂: Tromboksan A₂

ÖZET

Testis iskemi/reperfüzyon hasarı (İ/R); özellikle çocukluk ve ergenlik dönemlerinde görülen bir genitoüriner sorundur. Testis İ/R hasarına bağlı olarak ortaya çıkabilecek üreme bozukluklarının önüne geçilmesi için kan akımının hızlıca yeniden sağlanması gerekir. Eğer testise hasar geliştikten sonra ilk 6 saat içerisinde müdahale edilirse testisin kurtarılma şansı artmaktadır. 24 saatten sonra ise testisi kurtarma şansı % 10'lara inmektedir.

Testise giden kan damarlarının torsiyone olması sonucu testiste iskemi gelişir. İskemiye bağlı olarak hücredeki ATP depoları zamanla tükenir ve hücrelerde toksik metabolitler birikmeye başlar. Reperfüzyon ile hücrelerde oluşan hasarın düzelmesi beklenirken, aksine hücrelere giren oksijen molekülleri hızla reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüşür. Oluşan ROS'lar hücre membran lipidlerine, nükleik asitlere zarar verir, dokuya inflamasyon hücrelerinin (nötrofil, makrofaj, lökosit gibi) migrasyonuna neden olur ve sonuçta inflamasyon gerçekleşir.

Nimesulid; siklooksijenaz-2 (COX-2) enziminin spesifik bir inhibitörüdür. COX-2 enzimi inflamasyonda rol alan prostaglandinlerin üretiminden sorumludur. Bu enzimin inhibisyonu ile inflamatuvar yanıtta azalma olur. Ayrıca nimesulid; antioksidan etkilere de sahiptir.

Literatür bilgilerinden ve nimesulidin yukarıda bahsedilen etkilerinden yola çıkarak nimesulidin testis İ/R hasarını önlemede faydalı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda 24 adet Albino Wistar türü erkek sıçanlar her grupta 6 sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı: İskemi/Reperfüzyon+50 mg/kg nimesulid uygulanan (NİM-50) grup, İskemi/Reperfüzyon+100 mg/kg nimesulid uygulanan (NİM-100) grup, İskemi/Reperfüzyon uygulanan grup (İRG) ve Sham Operasyonu uygulanan grup (SG). NİM-50 ve NİM-100 gruplarına 2 saatlik İ/R prosedürü uygulanmadan önce nimesulid belirtilen dozlarda verildi, İRG grubunda ise sadece 2 saatlik İ/R prosedürü uygulandı, başka hiçbir ilaç uygulanmadı. Hayvanlar yüksek doz anestetik ilaçla öldürülerek testisler çıkarıldı, biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelendi.

Elde edilen bulgulara göre total glutatyon (tGSH) ve COX-1 düzeyleri NİM-50 ve NİM-100 gruplarında İRG'ye göre yükselmiştir. COX-2, malondialdehid (MDA), interlökin-1 β (IL-1 β) ve tümör nekroz faktör α (TNF- α) düzeyleri ise NİM-50 ve NİM-100 gruplarında İRG'ye göre düşük bulunmuştur. Yapılan histopatolojik incelemelerde İRG'de görülen histopatolojik değişikliklerin NİM-50'de gerilediği, NİM-100'de ise önlendiği görülmüştür.

Elde edilen bu sonuçlara göre nimesulid inflamasyonu ve oksidatif stresi önlemede başarılı olmuştur. Sonuç olarak yaptığımız çalışma testis İ/R hasarına karşı korumada nimesulidin etkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Testis; İskemi/Reperfüzyon; Nimesulid

ABSTRACT

Testis ischemia/reperfusion damage is a genitourinary disorder especially seen in childhood and adolescence. Rapid regeneration of the blood stream is required to prevent reproductive defects due to testicular I/R injury. If intervened to testis within 6 hours after damage has developed, the chance of rescuing the testis increase. After 24 hours, the chance of rescuing the testis descend to % 10.

Testicular ischemia develops after the testis blood vessels become torsion. Depending on ischemia, ATP stores on the cells exhaust over time and accumulation of toxic metabolites start. While recovering of damage developed in the cells is expected by reperfusion, on the contrary, the oxygen molecules entering the cell rapidly turn into reactive oxygen species (ROS). The resulting ROSs damage to membrane lipids and nucleic acids, cause migration of inflammatory cells (such as neutrophils, macrophages, leukocytes) to tissue and eventually inflammation occurs.

Nimesulide is a specific inhibitor of cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme. COX-2 is responsible for the production of prostaglandins involved in inflammation. Inflammatory response decrease by inhibition of this enzyme. Additionally, nimesulide has antioxidant effects.

Based on the literature and the above mentioned effects of nimesulide, nimesulide was thought to be useful in preventing testis I/R injury.

In our study, 24 Albino Wistar male rats were divided into 4 groups as 6 rats in each group: Ischemia/Reperfusion+50mg/kg Nimesulide administrated (NIM-50) group, Ischemia/Reperfusion+100mg/kg Nimesulide administrated (NIM-100) group, Ischemia/Reperfusion applied group (IRG) and Sham operated (SG) group. Nimesulide was administrated to NIM-50 and NIM-100 groups at the indicated doses before 2 hours applied I/R procedures. I/R procedures were applied only to IRG group, no other medication was applied. Animals were sacrificed with high dose anesthetic drugs and testes were extracted. Testes were examined biochemically and histopathologically.

According to the findings, total glutathione (tGSH) and COX-1 levels were increased in the NIM-50 and NIM-100 groups compared to IRG. The levels of COX-2, malondialdehyde (MDA), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor α (TNF- α) were lower in the NIM-50 and NIM-100 groups than in the IRG group. Histopathologic studies revealed that the histopathologic changes seen in IRG were decreased in NIM-50 and prevented in NIM-100.

According to these results, nimesulide is successful in preventing inflammation and oxidative stress. The result of our study suggests that nimesulide may be effective in protecting against testicular I/R injury.

Keywords: Testis; Ischemia/Reperfusion; Nimesulide

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: İ/R hasarında rol alan olaylar dizisi.....	11
Şekil 2. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında MDA değerleri	27
Şekil 3. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında tGSH değerleri	28
Şekil 4. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında IL-1 β değerleri	29
Şekil 5. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında TNF- α değerleri.....	30
Şekil 6. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında COX-1 değerleri.....	32
Şekil 7. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında COX-2 değerleri.....	33
Şekil 8: SG grubundaki testis dokusunun histopatolojik görünümü.....	34
Şekil 9A: İRG grubundaki testis dokusunun histopatolojik görünümü	35
Şekil 9B: İRG grubundaki testis dokusunun histopatolojik görünümü	36
Şekil 9C: İRG grubundaki testis dokusunun histopatolojik görünümü	37
Şekil 10: NİM-50 grubundaki testis dokusunun histopatolojik görünümü.....	38
Şekil 11: NİM-100 grubundaki testis dokusunun histopatolojik görünümü.....	39

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi; bir dokuya giden kan akımının çeşitli nedenlerle azalması veya ortadan kalkması sonucu dokunun yeterince oksijenlenememesi olayıdır (1). İskemi nedeniyle hücrelerde fonksiyon bozukluğu ve nekroza kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşir (2). İskemide dokuya gelen oksijen miktarı azalmasından dolayı ATP gibi yüksek enerjili fosfatların üretimi de azalır (3, 4). İskemik dönemde dokuda ATP kullanımını devam ettiği için ATP'den AMP, adenzin, inozin ve hipoksantin oluşur. Sağlıklı dokularda hipoksantin ksantin dehidrojenaz (KDH) ile metabolize edilir ve bu reaksiyonda nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) kullanıldığı için toksik oksijen radikalleri oluşmaz. İskemik dokuda ise KDH, ksantin oksidaza (KO) dönüşür ve hipoksantin, KO aracılığıyla metabolize edilir (5). İskemili dokuda hipoksantin KO ile metabolizmasında moleküler oksijen (O_2) kullanıldığı için ara ürün olarak toksik oksijen radikalleri oluşur. İskemi gelişen dokuda yeterince O_2 olmadığı için hipoksantin dokuya yeniden O_2 sağlanana kadar metabolize edilemez ve toksik oksijen radikalleri oluşamaz (2, 5).

Enerji üretiminin azalması durumunda hücre membranında yer alan Na^+/K^+ -ATPaz pompası inhibe edilir ve hücre içi Na^+ ve Ca^{2+} konsantrasyonu artar (6). Hücre içinde Ca^{2+} miktarının artması hücre için toksiktir (7). İntraselüler Ca^{2+} iyonu artışı, membran fosfolipidlerinden araşidonik asitin üretimini artıran fosfolipaz A2 enzimini aktive eder (2). Araşidonik asit, siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimi tarafından inflamatuvar prostaglandinlere (PG) metabolize edilir (2). Ayrıca intraselüler Na^+ iyonu miktarının artması hücrenin su alarak şişmesine neden olur (8).

Bu nedenle, uzun süre devam eden iskemik dokuda hasar gelişimini önlemek için yapılacak ilk müdahale, dokunun yeniden reperfüze edilmesidir. Fakat iskemi sırasında oluşumu artan KO, reperfüzyonla dokuya bol miktarda sunulan O_2 'yi kullanarak hipoksantini ksantine dönüştürürken aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşur ve dokunun antioksidan kapasitesini azaltır (9, 10). Oluşan

ROS'lar hücre membran lipidlerini okside ederek lipitlerden aldehid ve malondialdehid (MDA) gibi toksik ürünlerin oluşmasına neden olur (11).

Reperfüzyon hasarının patogeneğinde polimorfonükleer lökositler (PNL) önemli bir yere sahiptir. Kendi azurofilik granüllerinde oksidan etkiye sahip NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz (MPO) enzimlerini içerirler (12). Ortamda Cl⁻ iyonlarının varlığında H₂O₂, MPO enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır, birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girer ve doku hasarına neden olabilir (2, 13).

Klinikte, karşılaştığımız testis İ/R hasarı, burkulmuş (torsiyone) testisin detorsiyonu sonucu ortaya çıkan patolojik bir olaydır. Testis torsiyonu iskemik hasara yol açarken, detorsiyon ise reperfüzyon hasarına yol açmaktadır (14). Torsiyone olmuş testisin kurtarılması için yapılan erken cerrahi girişimlere rağmen testislerin sadece % 32'si kurtarılabilir (15). Tek taraflı testis torsiyonu % 25 oranında infertiliteye yol açmaktadır (15, 16).

Literatür bilgileri İ/R hasarının, dokunun oksijensiz kalması ile başlayan, serbest oksijen radikallerinin üretimi ile devam eden ve inflamatuvar yanıtla genişleyen karmaşık patolojik bir süreç olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle İ/R hasarının önlenmesinde hem antioksidan ve hem de COX-2 enzimini selektif inhibe eden antiinflamatuvar ilaçların yararlı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda testis İ/R hasarına karşı etkilerini araştıracağımız nimesulid, COX-2 selektif inhibitörü antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkili bir ilaçtır (17). Nimesulidin diğer non selektif COX-2 inhibitörlerinden farkı, COX-1 inhibisyonuna bağlı olarak ortaya çıkan yan etkilerinin (doku hasarları, kanama, mide ülseri vb.) daha hafif olmasıdır (17). Yapılan literatür taramalarında, nimesulidin testis İ/R hasarı üzerindeki koruyucu etkisine ait herhangi bir bilgiye rastlanmadı. Bu nedenle çalışmamızın amacı, nimesulidin sıçan testisinde İ/R ile oluşturulan oksidatif hasara etkisini biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi/Reperfüzyon (İ/R) Hasarı

İskemi; bir dokuya giden kan akımının çeşitli nedenlerle azalması veya ortadan kalkması sonucu dokunun yeterince oksijenlenememesi olayıdır. İlk kez 19. yy'de dokulara arteriyel akışta meydana gelen obstrüksiyondan dolayı dokunun yeterince kanlanamaması durumunu açıklamak için kullanılan bu terim üzerinde yapılan uzun süreli araştırmaların sonucunda araştırmacılar, özellikle son 30 yılda moleküler, hücre ve dokusal düzeyde önemli bulgular elde ettiler (1).

İskemik bölgede oksijenden yoksun kalan hücrelerde enerji depolarının tükenmesi ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne neden olmaktadır. İskemik dokuda iskemiye bağlı hasarın yeniden yeterli perfüzyonun sağlanması ile düzelmesi beklenirken, aksine reperfüzyon sonucu hücre içine moleküler oksijen (O₂) girişiyle hızla oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) hücrelere iskemiden daha fazla zarar vermektedir (4). Bu durum İ/R hasarı olarak adlandırılmaktadır. Hasara bağlı olarak gelişen lokal ve sistemik etkilerin organ transplantasyonu, miyokard infarktüsü, serebrovasküler hastalıklar, majör cerrahi girişimler, trombolitik tedavi, hemorajik tedavi ve şok gibi birçok klinik durumda ortaya çıkan yüksek morbidite ve mortaliteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir (18).

Her organın iskemiye olan duyarlılığı farklıdır. (1). Özellikle mikrovasküler yapıların endotel hücreleri İ/R hasarına en duyarlı yapılardır (12). İskemik hasarın şiddeti doğrudan iskeminin süresi ile orantılıdır. Fakat organlara özgü farklılıklar da hasarın derecesini, şiddetini ve geri dönüşümünü etkiler. Bu farklılıkların biyolojik nedeni tam olarak bilinmemektedir (1).

2.2. İskeminin Hücre ve Organ Düzeyinde Etkileri

Uzun süreli iskemi, çeşitli hücrelerde metabolik ve mikroskobik düzeyde değişikliklere yol açar. İskemi nedeniyle hücresel oksidatif fosforilasyon olaylarında

meydana gelen azalma, enerji bakımından zengin adenozin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin gibi fosfatların yeniden sentez edilme mekanizmalarında bozulmaya yol açar. Bu bozulmanın sonucunda membrandaki ATP-bağımlı iyonik pompa fonksiyonu, hücre içine kalsiyum, su ve sodyum alınması yönünde değişir. Ayrıca adenin nükleotitlerinin iskemi esnasında yıkımı, hücre içinde daha sonra ROS'a dönüşecek olan hipoksantin birikmesine neden olur. İskemi, endotelde bazı proinflamatuvar gen ürünlerinin (lökosit adezyon molekülleri, sitokinler) ve biyoaktif maddelerin (ET, TxA2) ekspresyonunu arttırırken diğer "koruyucu" gen ürünlerinin (NOS, trombomodülin) ve biyoaktif maddelerin (prostasiklin (PGI₂), NO) üretimini baskılar. Sonuç olarak iskemi, reperfüzyondan sonra dokunun duyarlılığını artıran bir proinflamatuvar süreci uyarılmış olur (19).

Çeşitli organlar İ/R hasarından etkilenir. Bu organlardan biri kalptir. Aterosklerotik plak, trombüs veya inflamasyon gibi sebeplerden dolayı iskemik kalp hastalıkları gelişebilir. İskemi nedeniyle hücresel enerji depoları boşalır ve oluşan metabolitlerin uzaklaştırılma mekanizmasında ortaya çıkan bozukluklar nekrotik ve apoptotik mekanizmalar aracılığıyla hücre ölümüne neden olur. Bu durumlara hipoksinin eşlik etmesiyle birlikte ölümcül aritmiler ve miyokard infarktüsü gibi ciddi tablolar ortaya çıkar (20). Kalpte oluşan İ/R hasarına bağlı olarak ortaya çıkan tablolardan biri "miyokardiyal stunning"dir. Miyokardiyal disfonksiyon olarak da adlandırılan miyokardiyal stunning (sersemleme); geri dönüşümlü bir hasardır ve iskemiye takiben reperfüzyon ile bir süre sonra tamamen ortadan kalkar. Bu sorunun ortaya çıkmasında reperfüzyondan sonra ATP sentezinin azalması, koroner mikrovasküler spazm ya da tıkanma, ROS'a bağlı sitotoksik hasar ve anormal kalsiyum metabolizması rol oynar (19). Reperfüzyon aritmisi, trombolitik tedavi alan ve kardiyak operasyon geçiren hastalarda yaygın olarak görülen ve koroner iskeminin düzelmesinden sonra meydana gelen ani ölümlerden sorumlu olan bir sorundur. Yapılan çalışmalarda; özellikle iskemiden 10-15 dakika sonra normal koroner damar yapısına sahip olan hayvanların iskemiye maruz kalmış miyokard dokularının reperfüze edilmesiyle, sıklıkla ventriküler taşikardi, ventriküler fibrilasyon veya hızlanmış bir idioventriküler ritmin ortaya çıktığı gösterilmiştir. Oluşan reperfüzyon aritmisi, kısmen iskemik bölgenin reperfüzyonu ile o bölgedeki iyon konsantrasyonlarında meydana gelen hızlı ve ani değişimlerin sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir. Çoğu reperfüzyon aritmisi klinik

olarak önemli olmamasına rağmen akut miyokard infarktüsü geçiren hastalarda trombolitik tedavi ile yapılan çalışmalar, ventriküler fibrilasyon ve taşikardi insidansının tedavi edilmeyenlere göre daha düşük olduğunu göstermiştir (19).

Sahip olduğu yüksek enerji üretim kapasitesi ve bunu sağlamak için oksijene ve glukoza diğer organlara göre daha fazla ihtiyaç duyması nedeniyle beyin, kan akımında meydana gelen değişimlere en duyarlı organdır (1). Santral sinir sistemindeki İ/R hasarı, inme, travmatik kafa yaralanmaları, karotis endarterektomisi, anevrizma onarımı ya da derin hipotermik dolaşım şokundan sonra ortaya çıkabilir. Beyinde gelişen İ/R hasarı; beyin dokusu etrafına lökosit migrasyonu sonucu kan-beyin bariyerinin bozulması ile karakterizedir. Beyin dokusu içine salınan çeşitli proteazlar, lipid türevi medyatörler ve ROS, özellikle penumbra bölgesinde yer alan ve potansiyel olarak kurtarılabilir hücrelerde geri dönüşümsüz hasar oluşturur. Ayrıca beyin kan akımındaki dalgalanma; beyin ödeme ve kafa içi basınçta artmaya da neden olur. Bu yüzden santral sinir sistemindeki (SSS) İ/R hasarı, duyuşal, motor ve kognitif fonksiyonları önemli ölçüde kötüleştirdiği hatta ölüme bile neden olduğu için klinik belirtileri diğer organlarda görülen iskemik hasarlara göre daha da belirgin olabilir (19).

Overde meydana gelen İ/R hasarı; overin kendi ekseni etrafında tamamen ya da kısmen dönmesi sonucu overe gelen kan akımının azalması veya ortadan kalkmasıyla meydana gelir (21, 22). Genellikle üreme dönemindeki bayanlarda görülür (23). İ/R hasarının tanı ve tedavisinin erken yapılması özellikle genç hastalarda infertiliteye neden olabilir (24).

Böbrek transplantasyonu, kardiyopulmoner bypass, sepsis, kısmi nefrektomi, hidronefroz ve çeşitli ürolojik girişimler sonucu böbreklerde iskemi gelişebilir. İskemi sonrasında hücrelerde birçok metabolik ve yapısal değişiklikler (vasküler endotel hücrelerde, tübüler epitelyum hücrelerinde, böbrek immün sistem hemostazındaki değişiklikler vb.) oluşur. (25, 26). İskemik hasarın şiddeti iskemi süresine bağlıdır. Böbrek İ/R hasarının sonucunda prerenal azotemiden tübüler veya kortikal nefropatiye bağlı olarak ortaya çıkan ciddi böbrek yetmezliğine varan klinik tablolar ortaya çıkabilir (27).

Karaciğer vücutta en fazla kanlanan organlardan biri olmasına rağmen karaciğerde de iskemik hasar gelişebilmektedir. Karaciğer transplantasyonu, hepatektomi, hemorajik şok, travma veya miyokard infarktüsü sonrası İ/R hasarı ortaya çıkabilir (28, 29). Karaciğer rezeksiyonu veya naklinden sonra İ/R hasarı sonucu karaciğerde fonksiyon kaybı ya da bozukluğu görülebilir (30).

Gastrointestinal kanaldaki İ/R hasarı; çeşitli patolojik durumlar ve strangüle bağırsak, vasküler cerrahi ve hemorajik şok gibi cerrahi durumların sonucunda ortaya çıkar. Vücudu dış çevreden korumada bir bariyer görevi üstlenen bağırsağın bariyer fonksiyonunda meydana gelen bozulma, bireyin İ/R hasarından zarar görmesinde önemli rol oynar. Gastrointestinal sistemdeki İ/R hasarı sonucu bağırsak motilitesi ve absorpsiyonunun bozulmasının yanı sıra artmış olan permeabilite de portal ve sistemik dolaşıma bakteri geçişine neden olur ve sonucunda sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ortaya çıkabilir (19).

Multiorgan disfonksiyon sendromu (MODS); bağırsak, karaciğer ve iskelet kası gibi uzak organlarda meydana gelen İ/R hasarı, aort damarında tıkanıklık ve sonrasında damarın açılmasıyla oluşan reperfüzyon ve dolaşım şokunun ortadan kaldırılmasının ardından gelişebilir. Ayrıca sepsis, büyük travmalar, yanıklar, pankreatit ve immünolojik hastalıklar da bu sendromun ortaya çıkmasına neden olabilir (31). Solunum sistemi, MODS'den en sık hasar gören organdır ve bu hasar genelde iskeminin başlamasından sonraki 24-72 saat içerisinde akut solunum yetmezliği gelişmesiyle ortaya çıkar. Solunum hasarı, solunum yetmezliğine ve akut respiratuvar distres sendromuna dönüşebilir. Solunum yetmezliğini hepatik, renal, gastrointestinal, miyokardiyal ve SSS disfonksiyonu takip eder (19). Bahsi geçen durumlar özellikle neden olduğu SIRS ve MODS tablolarından dolayı yoğun bakımda tedavi edilen hastaların % 30-40'ında ölüme neden olduğu için büyük öneme sahiptir (32).

2.3. İ/R Hasarının Patogenezi

İskemiye maruz kalan dokunun onarılması ve dokuda oluşan toksik metabolitlerin uzaklaştırılması için dokunun yeniden kanlanması gerekir. Fakat dokunun reperfüzyonuyla iskeminin tek başına oluşturduğu hasardan daha şiddetli bir hasar meydana gelir (33). Reperfüzyon döneminde oluşan hasarın ana nedeni hücre içine bol

miktarda giren O_2 'nin hızla toksik oksijen radikallerine dönüşmesidir (2, 4). Reperfüzyon sonucu oluşan hasardan en çok hücre zarı lipidleri, nükleik asitler, proteinler ve deoksiribonükleik asit (DNA) olumsuz etkilenir (34). İskemik dönemde hücrede bazı metabolik ve yapısal değişiklikler meydana gelir. Dokuya gelen kan akımının azalması sonucu ATP ve fosfokreatinin gibi yüksek enerjili fosfatların üretimi azalır (35). İskemi dönemi ilerledikçe hücredeki enerji depolarının boşalması sonucu Na^+/K^+ -ATPaz pompasının işlevi durur, hücre içi Na^+ ve Ca^{2+} konsantrasyonu artar. Hücre içi iyon konsantrasyonunun değişmesi ile proinflamatuvar sitokinlerin ve lökosit adhezyon moleküllerinin üretiminde artış olurken antioksidan parametrelerde ise azalma olur. Bu durum reperfüzyon dönemindeki hasara karşı hücreyi daha da açık hale getirir (6).

İskemi döneminde ATP üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için dokularda üretilen ATP'nin yıkımıyla adenzin monofosfat (AMP), adenzin, inozin ve hipoksantin oluşur. Oluşan hipoksantin, sağlıklı dokularda ksantin dehidrojenaz (KDH) ile ksantin ve ürik aside dönüştürülür. Sağlıklı dokularda hipoksantin, KDH'la olan metabolizmasında nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) kullanıldığı için toksik oksijen radikalleri oluşmaz (3). Fakat iskemili dokuda hipoksantin; KDH ile değil, ksantin oksidaz (KO) ile metabolize edilir. Çünkü iskemi sürecinde KDH, KO'ya dönüştürülür. Hipoksantin, KO ile olan metabolizmasında O_2 kullanıldığı için ara ürün olarak toksik oksijen radikalleri üretilir (2, 9, 36). İskemi gelişen dokuda yeterince O_2 olmadığı için hipoksantin metabolize edilemez ve toksik oksijen radikalleri oluşmaz (2, 5). Fakat iskemi sırasında oluşumu artan KO, reperfüzyonla dokuya bol miktarda sunulan O_2 'yi kullanarak iskemik dönemde dokuda birikmiş olan hipoksantini ksantine dönüştürürken aşırı miktarda ROS oluşur ve dokunun antioksidan kapasitesini azaltır (9, 10). Oluşan ROS'lar hücre membranındaki lipidleri okside ederek aldehid ve malondialdehid (MDA) gibi toksik ürünlerin oluşmasına neden olur. MDA iyonik transport ve enzimatik aktiviteyi bozarak hücre membranı permeabilitesi ve akışkanlığında değişikliklere yol açar. Hücre membranının bütünlüğü bozulur ve kopmalar oluşmaya başlar. Böylece hücreler organellerine ayrılmaya başlar. Lipid peroksidasyonu nedeniyle oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (37-39). Birçok çalışmada hasarlı dokulardaki MDA düzeyleri sağlıklı dokularinkine göre yüksek bulunmuştur (38, 40, 41). Ayrıca oluşan bu radikaller,

oksidatif DNA hasarını da indükleyerek nükleik asitlerde alkali değişimlere ve DNA'da zincir kırılmalarına neden olur. Eğer DNA onarılamazsa mutasyonlar oluşur. 8-hidroksiguanin (8-OHGua), DNA'nın mutajenik bir tipi olarak kabul edilir ve DNA hasarını belirlemede kullanılan bir parametredir (42, 43).

İntraselüler Ca^{2+} miktarının artması fosfolipaz A2'nin aktivasyonuna neden olur (12). Fosfolipaz A2 bir membran fosfolipidi olan araşidonik asit miktarını artırır (44-46). Araşidonik asit; siklooksijenaz (COX) enzimleri aracılığıyla tromboksan (Tx), prostaglandin (PG) ve PGI₂ ürünlerine dönüşür. Bu enzimler COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki alt tiptedir (47). Platelet agregasyonu, doku bütünlüğünün korunması gibi olaylarda COX-1 görev alır ve bilhassa plateletlerde, endotel hücrelerinde mide, böbrek ve düz kaslarda bulunur. Patolojik durumlarda ise (inflamasyon gibi) COX-2 sentezi artar, COX-2 enzimi özellikle inflamasyon hücrelerinde (makrofajlar, monositler gibi) bulunur, vasküler homeostazın sağlanmasında da görev alır. Ayrıca COX-2 enzimi indüklenebilir bir enzimdir (48, 49). Doku İ/R hasarı sürecinde inflamatuvar uyaran tarafından önce nükleer faktör κB (NF κB) aktive edilir. Aktive olan NF κB , araşidonik asitten ROS ve proinflamatuvar sitokinlerin oluşmasına neden olan COX-2 enzimini aktive eder. İnflamasyon durumunda aktive olan COX-2 enzimi, araşidonik asitten önce PGH₂ oluşur, sonrasında PGE₂ sentetaz tarafından aktif PGE₂ oluşur. İnflamasyonda COX-2, PGE₂ oluşumunu 100 katına çıkararak inflamatuvar yanıtı şiddetlendirir (50). Diğer bir COX enzimi olan COX-1 ise sitoprotektif PG'lerin sentezinden sorumludur (51). Son çalışmalarda, İ/R hasarından sonra over dokusunda inflamasyonun histopatolojik göstergeleri ve yüksek COX-2 aktivitesi gözlenmiştir (52).

2.4. İ/R Hasarında Sitokinlerin Rolü

Tümör nekroz faktör- α (TNF- α); inflamasyon veya hasar gelişen dokuda makrofajlar tarafından kısa bir süre içerisinde salgılanan bir sitokindir. Yerel infeksiyon veya inflamasyon alanlarında immün yanıtı başlatır. Nötrofillerin ve mononükleer fagositlerin güçlü bir aktivatörüdür (53). Ayrıca interlökin-1 (IL-1), IL-6 gibi inflamatuvar yanıtta rol oynayan diğer sitokinlerin de üretimini artırır (54-56). Lökositlerin inflamasyon bölgesine TNF- α aracılığıyla toplanmasında adhezyon molekülleri, kemokinler ve hatta anjiogenez gibi çoklu olaylar rol oynar (57-59).

Lenfosit aktivasyonunda ve aktivitelerini sürdürmelerinde de TNF- α 'nın rolü vardır (60-62).

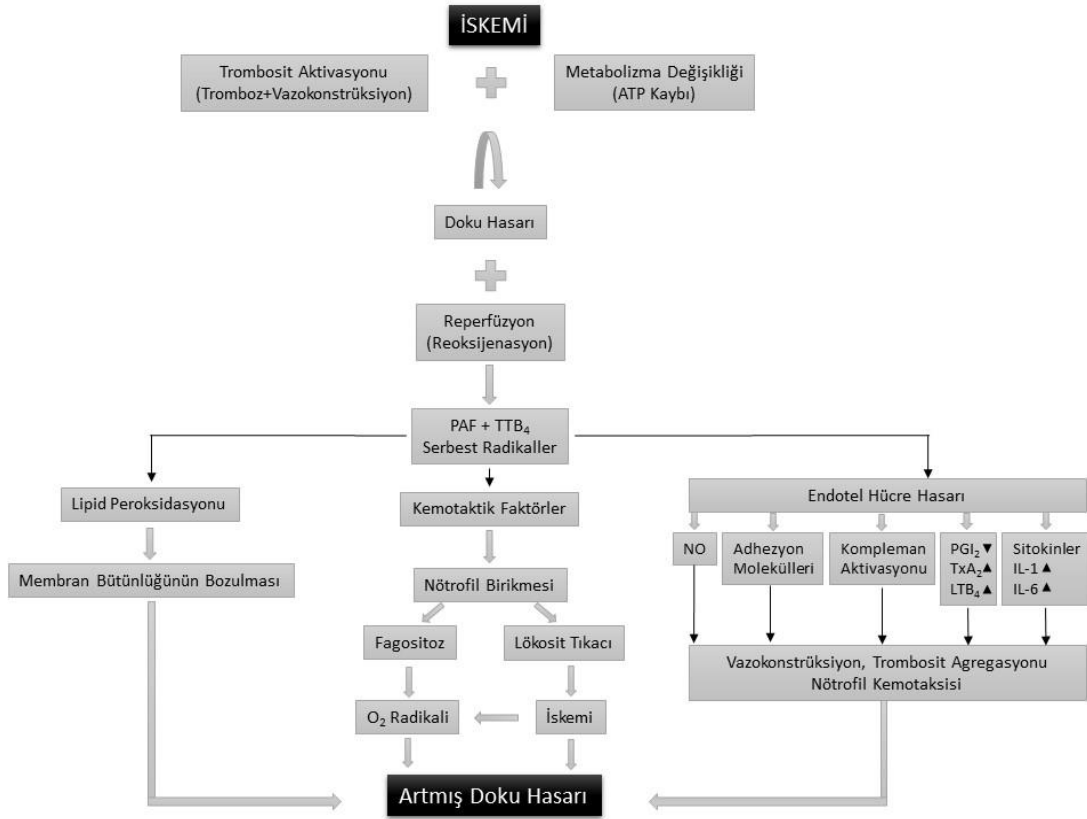
İnflamasyonda rol oynayan diğer sitokinlerden IL-1 ailesi; IL-1 β ve IL-1 α 'dan oluşur (53). Hem IL-1 β ve hem de IL-1 α PNL'den sentezlenir ve "alarm sitokinleri" olarak adlandırılırlar (53, 63). Mezenşimal orjinli hücreler (keratinosit, endotel hücreleri ve akciğer, gastrointestinal kanal ve böbrek epitel hücreleri gibi) yapısal olarak önceden oluşturulmuş IL-1 α prekürsörü taşırlar (64, 65). İskemik bir olayda hipoksi süresince ölen hücrelerinin membran bütünlüğünün kaybıyla hücre içerikleriyle birlikte IL-1 α da ortama salınır. Ardından hasarın olduğu dokudaki makrofajlar yanıt olarak IL-1 β oluşturur (66). Oluşan IL-1 β , nötrofil migrasyonuna neden olur (13).

Kompleman sisteminin İ/R hasarındaki rolü tam olarak bilinmemesine rağmen sistemin aktivasyonu sonucu proinflamatuvar komponentler oluşur (C3a, C5a, iC3b ve C5b-9). Anaflatoksin olan C3a ve C5a lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin stimülasyonunun yanı sıra C5a, makrofaj inflamatuvar protein 2 (MIP-2), MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein 1, TNF- α , IL-1 ve IL-6 üretiminin uyarılması inflamatuvar yanıtı amplifiye eder (4).

Polimorfonükleer lökositlerin (PNL) aktivasyonu ve migrasyonu endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon moleküllerinin aracılığıyla olur. Selektinler olarak bilinen adhezyon molekülleri L, P ve E selektin olmak üzere üç üyedir. Endoteldeki P-selektin ekspresyonunu İ/R hasarı artırır. Bu molekül, ilk olarak PNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit-endotel bağlantısını (lökosit rolling) oluşturur. İkinci aşamada, lökosit beta-2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile endoteldeki interselüler adhezyon molekülü 1 arasındaki etkileşim sonucunda lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşamada ise, trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1 ve endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gerçekleşir. Aktive lökositler damar dışına çıkarak hasar bölgesine doğru migrasyon yapar (67). Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gereken kemotaktik maddeler arasında C3a ve IL-1, lökotrien B4, trombosit aktive edici faktör (PAF) ve PG türleri vardır. Oksidan etkilere sahip NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz (MPO) PNL'lerin kendi azurofilik granüllerinde yer alır. Aktive PNL'ler lökositlerdeki KO miktarını artırır

(68). İskemiye takiben reperfüzyonun başlamasıyla dokuya sağlanan O₂'nin yaklaşık % 70'i KO tarafından süperoksida dönüştürülür. Süperoksid radikali normalde süperoksid dismutaz (SOD) enzimi aracılığı ile H₂O₂'ye dönüşür. Glutasyon (GSH); GSH bağımlı antioksidan savunma sisteminin enzimatik olmayan bir bileşenidir (69). Yapısındaki sülfidril grupları vasıtasıyla oksidatif hasara karşı hücreleri ve yapısal bileşenlerini korur (70, 71). Ayrıca GSH, glutasyon peroksidaz (GSHPx) için H₂O₂ ve diğer çeşitli organik peroksitlerin suya ve karşılık gelen stabil alkollere dönüştürülmesinde görev alan bir substrat olarak kullanılır (69). Katalaz (KAT) veya GSHPx tarafından H₂O₂, toksik olmayan ürünlere dönüşür (13). Sağlıklı dokuda GSHPx aracılığı ile olan reaksiyonda H₂O₂; okside glutasyon (GSSG) ve suya dönüşürken, KAT ile olan reaksiyonda ise su ve O₂'ye dönüşür (72, 73). İskemik dokuda H₂O₂ MPO ile hipoklorik asit ve klorür iyonlarına dönüştürülür. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca tepkimeye girer. Ayrıca oluşan H₂O₂ geçiş metallere varlığında toksik hidroksit (OH*) radikaline dönüşür. Bu reaksiyona "Fenton reaksiyonu" adı verilir. Oluşan OH* radikalinin de reaktivitesi yüksektir ve bir molekülle karşılaştığında 10⁻⁶ saniye gibi kısa bir süre içinde reaksiyona girer (74). Aktif lökositler nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NF-κB) aktivasyonuna ve TNF-α sentezine neden olur. (68). Lökositlerin ürettiği serbest radikallerle etkileşen bu maddeler, mast hücrelerinden selektin ve ICAM gibi adhezyon moleküllerini mobilize eden inflamatuvar mediyatörlerin salınmasını stimüle eder. Aktif nötrofiller salıverdikleri maddelerle neden oldukları hasarın yanı sıra, damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar (33).

Damar endotel hücreleri ROS için hem bir hedeftir hem de üretim kaynağıdır. Bu hücreler, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan ET ve NO üretir. Arteriyel dolaşımda NO, ET'nin vazokonstriktör etkisini antagonize etme eğilimindedir. Venüllerde ise bu durumun tersi geçerlidir. İ/R hasarında ET/NO dengesi ET lehine bozulur ve sonucunda arterlerde vazokonstriktör, venlerde ise vazodilatasyon gerçekleşir (75).



Şekil 1: İ/R hasarında rol alan olaylar dizisi (76)

2.5. Testis İ/R Hasarı

Testis İ/R hasarı, çocukluk çağında en sık, ergenlik çağında ise apandisit sonrası en çok görülen genitoüriner bir problemdir (77). Memeli testisleri, membranlarında yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi içerdiği için oksidatif strese ve özellikle lipid peroksidasyonuna oldukça hassastır. Sperm hücrelerinin sağlığı için yağ asitleri oldukça elzemdir. Testislerde meydana gelen İ/R hasarı; DNA hasarına, protein sentezinin inhibisyonuna ve spermatogenezde aksaklıklara neden olabilir (78). Yapılan çalışmalarda, İ/R olayı tek bir testiste meydana gelse de diğer testise giden kan akımının da azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Testiste iskemi nedeniyle ortaya çıkan hasar kan-testis bariyerinin de bozulmasına neden olur (79, 80). Ayrıca İ/R hasarında nötrofil aktivasyonu, inflamatuvar sitokinler ve trombojenitesi artmış adhezyon molekülleri, hücre içine çok miktarda Ca^{2+} salınmasında ve reaktif oksijen ve nitrojen türleri de hasar oluşmasında rol alır. Bu olaylar membran lipidlerinde

peroksidasyon yaparak çeşitli hücre bileşenlerine zarar verir (81). Testislerde İ/R hasarına bağlı olarak ortaya çıkan ROS'un primer kaynağının testis dokusuna infiltre olan lökositler olduğu fakat sperm hücrelerinden de üretildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (82). Erken teşhis ve tedavi testis İ/R hasarında önemlidir. Teşhis için anamnez, fiziksel muayene, skrotal doppler ultrasonografi ve testiküler sintigrafi kullanılabilir (83). Testis İ/R hasarı tedavi edilmezse yetişkinlerde fertilitede azalmaya ve spermatogenezde bozulmaya yol açabilir. Soğuk havalarda görülme insidansı artmaktadır (84). Testis hacminin artması (sıklıkla puberte ile ilgili), testiküler travma, tümör, testisin yatay konuma gelmesi, kriptorşidizm hikayesi ve spermatik kordun uzun olması da testis İ/R hasarına neden olur (85).

Testise giden damarların torsiyone olması, testis arteriyel kan akımını ve venöz drenajı bloke eder. Bu durum testiste ödem, konjesyon, şişme, hemoraji, ekimoz ve selülite neden olur. İlerleyen dönemde oluşan ödem; testis kan akımının bozulmasına, arteriyel blokajın şiddetlenmesine, hipoksiye, dejenerasyona, enfarktüse, nekroza, apoptozise ve testiste gangren gelişmesine neden olur (77, 86, 87). Testis İ/R hasarına maruz kalmış hastalara yapılan spermioqram testlerinin sonuçları, test yapılan hastaların % 35'inden daha fazlasında anormal çıkmıştır. Ayrıca bu hastaların % 25'inde kısırlık gelişmiştir.(88).

2.6. Testis İ/R hasarının tedavisi

2.6.1. Cerrahi Girişim:

Cerrahi girişimlerin amacı; semptomlar görüldükten hemen sonra hastayı opere ederek testis kan akımını yeniden sağlamaktır. Eğer semptomlar görüldükten sonra 6 saatten daha kısa bir süre içerisinde hasta opere edilirse testisi kurtarma şansı % 90, 12 saatten sonra % 50 ve 24 saatten sonra ise bu oran % 10'a kadar düşmektedir. Eğer testis cansız ve perfüzyon yok ise orşiektomi gerekebilir (85, 89-91). Bir çalışmada buz uygulanmasının ROS oluşumunu geciktirdiği ve hücre enerji kaynaklarını koruduğu gösterilmiştir (86, 92).

2.6.2. Antioksidan Terapi

Testis İ/R hasarında antioksidan terapi iki şekilde uygulanır. Birinci tedavi yöntemi; H₂O₂ ve süperoksit radikallerini; SOD, KAT ve GSHPx gibi spesifik enzimler kullanarak uzaklaştırmayı amaçlayan tedavidir. İkinci tedavi yönteminde ise radikal üretimi engellenmeye çalışılır. Fakat bu tedavi stratejileriyle her zaman başarı sağlanamayabilir. Rasyonel tedavi stratejisi; antioksidanlarla seminal sıvının oksidan süpürme kapasitesini artırarak oksidatif strese karşı koymaktır (93).

Koenzim Q10 mitokondrideki oksidatif fosforilasyon sürecinde elektron transferi için elzem bir maddedir. Ayrıca kuvvetli antioksidan, membran stabilizörü ve oksidatif fosforilasyonla ATP üretiminde bir kofaktördür. Oksidatif ve nitratif stresi önleyerek endotelial bozukluğu geri çevirir. Erol ve diğerleri (94), çalışmalarında iskemi oluşturulmuş testise reperfüzyondan önce Koenzim Q10 uygulamış ve testis MDA, indüklenbilir NOS (iNOS), endotelial NOS (eNOS) ve germ hücresi spesifik apoptozisinde azalma olduğunu göstermiştir.

Testis İ/R hasarına karşı LT üretimi ve depolanması ile doğrudan ilişkilendirilen antioksidan özelliğe sahip yeni bir ilaç olan montelukastın etkisini araştıran Öztürk ve diğerleri (95) tarafından, testis MDA, GSH ve MPO değerleri ölçülmüş ve ilaç uygulanmamış sıçanlardaki değerlerle kıyaslanınca bu değerlerin daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Yang ve diğerleri (96), antioksidan ve lipid düşürücü etkinliği olan simvastatin üzerinde yaptıkları çalışmalarında, testis İ/R hasarının doza bağımlı olarak simvastatin tarafından önlendiğini göstermiştir. Altta yatan mekanizma olarak NF-κB aktivasyonunun önlenmesi ve oksidatif stresin düşürülmesi öne sürülmüştür.

Eretil disfonksiyon tedavisinde kullanılan sildenafil, vardenafil ve tadalafil gibi fosfodiesteraz tip 5 inhibitörleriyle sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, bahsi geçen ilaçların intraperitoneal (ip) olarak uygulanması total antioksidan enzim düzeylerinde yükselme ve MDA, germ hücresi apoptozisi, iNOS ve eNOS seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Fakat oral uygulamada bu etkiler görülmemiştir (97, 98).

Yapılan bir çalışmada, NF-κB'nin güçlü bir inhibitörü olan sülfasalazinin NF-κB aktivasyonunu inhibe ederek testis İ/R hasarından sonra spermatogenik hücreleri apoptozisten koruduğu gösterilmiştir (99).

Antonuccio ve diğerleri (100) tarafından yapılan çalışmada, hidrofilik E vitamini benzeri antioksidanların testis İ/R hasarı için iyi bir seçenek olduğu gösterilmiştir. Fakat Turan ve diğerleri (101) tarafından yapılan çalışmada ise İ/R hasarından önce ya da sonra E vitamini verilmesinin yeterli düzeyde koruma sağlamadığı belirtilmiştir.

Likopen domateste bolca bulunan güçlü bir antioksidandır. Erkeklerde sebebi bilinmeyen kısırlıkta likopen verilmesi bireylerin özellikle sperm motilitesi, konsantrasyonu ve morfolojisinde önemli bir iyileşme sağlamıştır. Ayrıca dokuz ay boyunca düzenli olarak likopen alan oligospermili hastaların sperm özelliklerinde düzelme olmuştur. Sıçanlarda yapılan çalışmada likopenin antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı fakat GSH düzeylerini düşürmediği bulunmuştur (78).

Bir serbest radikal süpürücüsü olan Ginkgo biloba ile yapılan çalışmalarda Ginkgo biloba'nın tek taraflı testis İ/R hasarında MDA ve nitrit-nitrat konsantrasyonlarını düşürdüğü gösterilmiştir. Başka bir çalışmada da testisteki apoptotik hücreler ile eNOS ve iNOS aktivitelerinin Ginkgo biloba uygulamasıyla azaldığı bulunmuştur (102).

Doğal bir enzimatik antioksidan olarak görülen L-karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin kullanılarak enerji elde edilmesinde gerekli bir maddedir. Antiinflamatuvar, antiapoptotik, nöroprotektif, kardiyoprotektif, gastroprotektif özelliklerinin yanı sıra antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileri vardır. Ayrıca sperm üretiminde de kilit rol oynar (103). Bu yüzden son yıllarda erkek kısırlığının tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Fakat L-karnitinin erkeklerde görülen kısırlığı tedavi edici mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan bir çalışmada L-karnitin MDA düzeylerini düşürdüğü ve İ/R'ye maruz bırakılan testis dokusunda gözlenen histolojik hasarı düzelttiği gösterilmiştir (104). Ayrıca L-karnitin testis dokularını İ/R hasarının neden olduğu apoptozisten koruduğu rapor edilmiştir (105). L-karnitin ile bir COX-2 enzim inhibitörü olan meloksikamın kombine kullanımının İ/R hasarına etkisinin araştırıldığı çalışmada, inflamasyonda rol alan spesifik genlerin

ekspresyonunun güçlü bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu etki tek başına meloksikam ile yapılan çalışmada da görülmüştür (106).

1960'larda mukolitik bir ilaç olarak kullanılmaya başlanan N-asetilsisteinin daha sonra antioksidan ve radikal süpürücü etkilere sahip olduğu ve bir GSH prekürsörü olduğu anlaşılmıştır. Aktaş ve diğerleri (107) tarafından yapılan bir çalışmada deneysel testis İ/R hasarının erken döneminde N-asetilsistein uygulamasının koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. N-asetilsistein ile yapılan başka çalışmalarda da N-asetilsisteinin antioksidan enzim aktivitesini ve germ hücresi apoptozisini düzenleyerek İ/R hasarını azalttığı gösterilmiştir (108).

Alfa lipoik asit; İ/R hasarında hem serbest radikal süpürücü olarak hem de hücrel antioksidanların geri dönüşümünü sağlayarak etki gösterir. Guimarães ve diğerleri (109) tarafından yapılan çalışmada, alfa lipoik asitin tedavi edilmeden önce uygulanmasının, testis dokusunun GSH düzeylerini yükselttiği ve plazma total antioksidan kapasitesini artırdığı gösterilmiştir.

İbuprofen, insanlarda en çok kullanılan antiinflamatuvar ilaçlardan biridir. Etkisini COX enzimini inhibe ederek, kanal aktivitelerini düzenleyerek ve peroksizom proliferatör-aktive reseptörü aktive ederek gösterir. Böylece proinflamatuvar sitokin üretimini inhibe etmiş olur. Ayrıca antiradikal, antioksidan ve ROS süpürücüdür. İbuprofen; biyolojik membranları oksidasyondan korur, MDA gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin birikmesini engeller. Sıçanlarda oluşturulan testis İ/R deneyinden elde edilen sonuçlar, ibuprofenin tedavi öncesi dönemde koruyucu etkilerinin olabileceğine işaret etmektedir (104).

Antioksidan etkileri olan pentoksifilin, mikrovasküler kan akışını düzenlemek için kullanılır. Yapılan çalışmada artan testis MDA düzeylerini düşürmede etkili bir ajan olduğu gösterilmiştir (110).

Yazawa ve diğerleri (111), deksametazonun testis İ/R hasarından sonra görülen germ hücrelerinin apoptozisini ve vasküler nötrofil adhezyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Yapanoglu (112) ve Aksoy (113) dihidroepiandrosteronun testis İ/R hasarı üzerine etkilerini araştırmışlar ve oksidatif stresle ilgili biyokimyasal, apoptotik ve histopatolojik değişikliklerden koruyucu etkileri olduğu sonucuna varmışlardır.

Diklofenak sodyum, PG sentezini inhibe eden, antiinflamatuvar ve analjezik etkileri olan bir ilaçtır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, diklofenakın germ hücre apoptozisini azaltarak testis İ/R hasarından sonra spermatogenezin devamı için faydalı olduğu gösterilmiştir (114).

2.7. Nimesulid

Nimesulid; non-steroidal antiinflamatuvar ilaç (NSAİ) grubuna dahil olan bir COX-2 enzim inhibitörüdür. Dokularda COX enzimleri, araşidonik asitten PG'lerin sentezinde katalizör olarak işlev görür. Dokuda ağrı yapıcı etkenler, tahriş, zedelenme ve immünolojik reaksiyonlar sonucu araşidonik asitten PG, PGI₂ ve TxA₂ üretiminin artmasının yanı sıra PAF gibi maddelerin de üretimi artar (115). Nimesulid ve diğer NSAİ ilaçlar genel olarak aşağıdaki gibi etki gösterir:

- Lipooksijenaz ve COX enzimlerinin son ürünlerinin sentezinin inhibisyonu
- Toksik oksijen radikallerinin ve lizozomal enzim sekresyonunun inhibisyonu
- Nötrofillerin kemotaksisinin, adhezyonunun ve agregasyonunun inhibisyonu

Nimesulidin COX enzimlerine olan spesifikliği her bir enzim için farklıdır ve COX-2 enzimine olan spesifikliğin COX-1'e göre 5 (116, 117) veya 20 (118) kat fazla olduğunu ileri süren çalışmalar vardır. Yüksek dozlarda ise seçicilik azalmaya başlar. İnflamatuvar uyarana karşı cevap olarak oluşan PG ve TxA₂ gibi maddeler, PNL ve monosit/makrofajları aktive eder. Aktive edilmiş PNL'ler dokuya geçmek için önce postkapiller venüllerin endotel duvarına yapışırlar. Daha sonra lökosit yüzeyindeki integrin ve damar endotelinde lökosit yapışmasına aracılık eden selektin moleküllerinin sayısı artırılır (115). Nimesulid nötrofil yüzeyinde yer alan CD11b/CD18 integrininin inhibisyonu ile nötrofillerin endotel hücrelerine adhezyonunu inhibe eder (119). Damar endotel hücrelerine lökositlerin adhezyonunu düzenleyen ve inflamatuvar cevapta esansiyel rol oynayan bir adhezyon molekülü olan L-selektin akışı nimesulid tarafından indüklenebilir (120). Endotel hücre duvarına yapışmalar ile fagositoz fonksiyonlarının aktivasyonu PNL'lerin uyarılmasıyla olur. Bu olayların sonucunda dokuda lizozomal enzimler, ROS ve lipooksijenaz ürünleri gibi sitotoksik maddeler oluşur. Nimesulid tarafından bu maddelerin oluşumu önlenir (115). Ayrıca nimesulid, inflamasyonlu bölgede ödem oluşumunu ve lökosit infiltrasyonunu da inhibe eder (121). Lökosit infiltrasyonunun nimesulid tarafından

inhibisyonu, COX-1 ve COX-2 enzimlerinin birlikte inhibe edildiği dozlarda görülür (122). Nimesulidin inflamasyon sürecinde rol oynadığı bilinen sitokinleri inhibe etmesi; inflamasyona bağlı ağrıda başarı ile kullanılabileceğini göstermektedir (123). Antipiretik etkisi ise PG sentezinde yaptığı inhibisyona dayanmaktadır (124). Terapötik dozlarda nimesulid COX-2 enzimini inhibe etmediği için gastrointestinal şikayetlere neden olmaz (125).

Nimesulid; çeşitli eklem rahatsızlıkları, kas-iskelet sistemi hastalıkları, baş ağrısı, jinekolojik ve ürolojik problemler, operasyon sonrası ve kanser kemoterapisine bağlı ağrı, vasküler hastalıklar, kulak-burun-boğaz hastalıkları ve hava yolları inflamasyonunda başarıyla kullanılan bir ilaçtır. Aspirin ve diğer NSAİ ilaçlara karşı alerji yaşayan hastalar için iyi bir alternatiftir (126).

Nimesulid; özellikle eşzamanlı hastalıkları olan yaşlılarda ve çocuklarda genellikle iyi tolere edilebilen bir ilaçtır (127). Gastrik toleransının iyi olmasında COX-2 enzimine selektifliğinin yanı sıra zayıf asiditesi de rol oynar (128).

Nimesulidin radikal süpürücü etkisinin COX-2 enzimi keşfedilmeden önce yapısındaki paranitrosülfonilaminofenilinden kaynaklandığı öne sürülmüştür (129). Enzimin keşfinden sonra ise COX-2 enzim inhibisyonunun ve antiinflamatuvar etkisinin yapısındaki metansülfonamid varlığından kaynaklandığı açıklanmıştır (130).

Literatür bilgileri İ/R hasarının, dokunun oksijensiz kalması ile başlayan, serbest oksijen radikallerinin üretimi ile devam eden ve inflamatuvar yanıtla genişleyen karmaşık patolojik bir süreç olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle İ/R hasarının önlenmesinde hem antioksidan ve hem de COX-2 enzimini selektif inhibe eden ilaçların yararlı olabileceği düşünülmektedir. Bilindiği gibi, İ/R'de semptomatik olarak antiinflamatuvar, antipiretik ve analjezik tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda deneyeceğimiz nimesulid, COX-2 selektif inhibitörü antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkili bir ilaçtır (17). Nimesulidin diğer non selektif COX-2 inhibitörlerinden farklı olarak COX-1 inhibisyonuna bağlı olarak ortaya çıkan yan etkileri (doku hasarları, kanama, mide ülseri vb.) ya görülmez ya da hafif olarak ortaya çıkar. Literatürde böbrek (51), karaciğer (131) ve beyin (132) gibi organlarda oluşan oksidatif hasarı önlemede nimesulidin etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yaptığımız

literatür taramalarında, nimesulidin testis İ/R hasarı üzerindeki koruyucu etkisine ait herhangi bir bilgiye rastlanmadı. Bu nedenle çalışmamızın amacı, nimesulidin sıçan testisinde İ/R ile oluşturulan oksidatif hasara etkisini biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırmaktır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Deney hayvanları, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deneyde kullanmak için ağırlıkları 230-240 gram arasında değişen toplam 24 adet Albino Wistar türü erkek sıçanlar rastgele seçildi. Hayvanların ortama adapte olabilmeleri için deneyden önce farmakoloji laboratuvarında bir hafta oda sıcaklığında (22°C) barındırıldı ve beslendi. Bu çalışmanın tüm aşamalarının etik kurula uygun olduğu "Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından verilen 30.03.2017 tarihli ve 3/34 no'lu karar ile onaylanmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Tablo 1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler, cihazlar ve temin edildikleri firma isimleri

Kimyasal Maddeler/Cihazlar	Modeli ve Firması
Nimesulid	Nimelid 100 mg Tablet, Deva Holding A.Ş., Türkiye
Ketamin HCl	Ketalar Enjektabl Flakon 500 mg, Pfizer Türkiye, Türkiye
Sevofluran	Sevorane Likid % 100 Solüsyon 250 ml, Abbott, Türkiye
MDA Analiz Kiti	Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit, Sigma-Aldrich, ABD
IL-1 β Analiz Kiti	Rat Interleukin 1 β ELISA Kit, Shanghai LZ, Çin
TNF- α Analiz Kiti	Rat Tumor Necrosis Factor α ELISA Kit, Shanghai LZ, Çin
COX aktivite analiz kiti	Cayman, Ann Arbor, MI, ABD
TBARS Ölçüm Kiti	OxiSelect™ TBARS Assay STA-330 Kit, Cell Biolabs, ABD
COX-1 İnhibitörü	SC-560, Cayman Chemical, ABD
COX-2 İnhibitörü	DuP-697, Cayman Chemical, ABD
EDTA Çözeltisi	Ethylenediaminetetraacetic Acid Solution, Sigma-Aldrich, ABD
Sükroz Çözeltisi	Sucrose Solution, Sigma-Aldrich, ABD
Tris Tamponu	Tris Buffer, BIO-RAD, ABD
N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiaminin	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma-Aldrich, ABD

HPLC Grade su	Water (HPLC), Fisher Chemical, ThermoFisher Scientific, ABD
Araşidonik Asit	Arachidonic acid, Sigma-Aldrich, ABD
Streptavidin-HRP	HRP-Conjugated Streptavidin, ThermoFisher Scientific, ABD
Ultra-Turrax Homojenizer	Staufen, Almanya
Santrifüj (Soğutmalı)	Thermo Electron LEN GMBH Heraeus 4600, Almanya
Spektrofotometre	Beckman DU 500, Global Medical Instrumentation, ABD
Mikroplaka Okuyucu	PowerWave HT Microplate Spectrophotometer, Bio-Tek, ABD
Hassas Terazı	Sartoriusn AG, Almanya
Distile Su Cihazı	Easypure RF Compact Ultrapure Water System, ThermoFisher Scientific, ABD
Karıştırıcı	Vortex-Genie, Scientific Industries, ABD
Magnetik Karıştırıcı	Labincol 32, Breda, Hollanda
Plaka Çalkalayıcı	IRMA Shaker, Labsan, ABD
Su Banyosu	Nüve BM 101, Nüve malz. San. Lim. ve Tic. A.Ş., Türkiye
pH Metre	Jenway 3010 pH Meter, UK
Derin Dondurucu	Sanyo Ultra Low, Sanyo Electric Co Ltd., Japan
Otomatik Pipet	Finpipette Lasysystems, Finlandiya
Leica Bond-Max	LEICA Biosystems, Türkiye
Olympus BX 51	Olympus, Japonya

3.2. Metot

3.2.1. Deney Grupları

Deney hayvanları her grupta 6 adet sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı: İskemi/Reperfüzyon+50 mg/kg nimesulid uygulanan (NİM-50) grup, İskemi/Reperfüzyon+100 mg/kg nimesulid uygulanan (NİM-100) grup, İskemi/Reperfüzyon uygulanan grup (İRG) ve Sham Operasyonu uygulanan grup (SG).

3.2.2. Deney Prosedürü

Cerrahi girişimler steril şartlar altında, uygun laboratuvar ortamında 50 mg/kg i.p. ketamin (Ketalar Enjektabl Flakon 500 mg, Pfizer Türkiye, Türkiye) anestezisi ve uygun aralıklarla sevofluran (Sevorane Likid % 100 Solüsyon 250 ml, Abbott, Türkiye) koklatarak gerçekleştirildi. Deney gruplarındaki hayvanların skrotum bölgesi % 10'luk povidon iyot çözeltisi ile temizlendi. Daha sonra deneklerin skrotumuna orta hat üzerinde iki cm uzunluğunda vertikal kesi uygulanarak skrotal boşluğa ulaşıldı. Ardından İRG, NİM-50, NİM-100 ve SG gruplarındaki hayvanların skrotal boşlukta bulunan sol testisleri tunika vaginalis ve spermatik kord ile birlikte gubernakulundan künt diseksiyonla ayrılarak dışarıya alındı ve SG'deki hayvanların testislerine hiçbir işlem yapılmadan tekrar skrotuma yerleştirilirken İRG, NİM-50 ve NİM-100 grubu hayvanların testisleri ise iki saat süre ile 720° torsiyone edilip tekrar skrotal boşluğa yerleştirildi. İki saatlik bekleme süresinin sonunda testisler detorsiyone edilerek iki saat boyunca testislerin perfüzyonu sağlandı. Reperfüzyon süresinin sonunda İRG, NİM-50, NİM-100 ve SG gruplarındaki hayvanlar yüksek doz anestezik ile öldürülerek sol testisleri çıkarıldı. Çıkarılan testis dokularında biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler yapıldı. Torsiyon-detorsiyon işlemi uygulanan NİM-50, NİM-100 ve İRG gruplarından elde edilen sonuçlar SG ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.2.3. Biyokimyasal Analizler

3.2.3.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçümü

Çıkarılan her bir testis dokusundan 0.2 g tartıldı. Testisler MDA tayini için % 1.15'lik KCl çözeltisi, tGSH ölçümü için pH=7.5 olan fosfat tamponu içinde 2 ml'ye tamamlanarak buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra +4° C'de 10 000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatan kısmı analiz numunesi olarak kullanıldı.

Testis dokularındaki MDA tayin yöntemi, yüksek sıcaklıkta (95°C'de) tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın oluşturduğu pembe renkli kompleksin adsorbansının 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (133). Homojenatlar, 5 000 g'de 20 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatan, MDA miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, 100 µl % 8 sodyum dodesil sülfat, 750 µl % 20 asetik asit, 750 µl % 0.08 TBA ve 150 µl saf su pipetlenerek vortekslendi. Karışım 100°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerine 2,5 ml n-bütanol ilave edildi ve spektrofotometrik (Beckman DU 500, Global Medical Instrumentation, ABD) olarak ölçüm yapıldı. Oluşan kırmızı renk miktarları 532 nm'de 3 ml'lik küvetler kullanılarak spektrofotometrede okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan MDA stok çözeltisi (Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit, Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak oluşturulan standart grafikten yararlanarak numunelerin MDA miktarı belirlendi.

Testis dokusunda GSH tayininde spektrofotometrik yöntem kullanıldı (134). Homojenatlar, 12 000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatanlar, GSH miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 500 µl ölçüm tamponu (0.2 mM EDTA içeren 200 mM Tris-HCl, pH=8.2), 500 µl süpernatan, 100 µl 5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ve 7 900 µl metanol pipetlenerek vortekslendi. Karışım 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve sonra spektrofotometre ile ölçümler yapıldı. Bu yöntemde ortama eklenen DTNB disülfid bir kromojendir ve sülfidril gruplu bileşikler tarafından kolayca indirgenmektedir. Bu reaksiyona bağlı olarak meydana gelen sarı renk spektrofotometrede 3 ml'lik kuartz küvetler kullanılarak 412 nm dalga boyunda adsorbansı ölçüldü ve seyreltme katsayıları

dikkate alınarak önceden hazırlanan GSH stok çözeltisi (Glutathione Assay Kit, Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak oluşturulan standart grafikten yararlanılarak numunelerin GSH miktarı belirlendi. Testis dokularındaki GSH ve MDA düzeyleri nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Testis dokularında IL-1 β ve TNF- α homojenat konsantrasyonları, sıçanlara spesifik sandviç enzim-bağımlı immunosorbent analiz kitleri (sırasıyla; Rat Interleukin 1 β ELISA Kit ve Rat Tumor Necrosis Factor α ELISA Kit, Shanghai LZ, Çin) kullanılarak ölçüldü. Analizler, üreticinin talimatlarına göre yapıldı. Sıçan IL-1 β ve TNF- α için spesifik monoklonal antikorları mikropalakaların kuyucuklarına konuldu. Doku homojenatı, standartlar ve biyotinlenmiş spesifik monoklonal antikorlar ve streptavidin-HRP (HRP-Conjugated Streptavidin, ThermoFisher Scientific, ABD) bu kuyucuklara pipetlendi ve ardından 37°C’de 60 dakika inkübe edildi. Yıkamadan sonra bir renk oluşturmak için bağlı enzim üzerinden etki gösteren kromojen reaktif A ve kromojen reaktif B eklendi. Ardından reaksiyonu durdurma çözeltisi eklendi. Bu renkli ürünün yoğunluğu orjinal örnekte var olan sıçan IL-1 β ve TNF- α konsantrasyonları ile doğru orantılıdır. İşlemlerin sonunda kuyucuklu plakaların adsorbans değerleri 450 nm’de bir mikropalaka okuyucu (PowerWave HT Microplate Spectrophotometer, Bio-Tek, ABD) ile okundu. Örneklerin adsorbansı standart grafiklerin kullanıldığı formüllerle hesaplandı. Elde edilen sonuçlar pg/ml protein olarak verildi.

3.2.3.2.COX aktivitesinin ölçümü

Testis dokularında COX aktivitesinin ölçümü, COX aktivite analiz kiti (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntemin prensibi reaksiyon sonucu oluşan okside N,N,N,N’-tetrametil-p-fenilendiamin’in (TMPD) (N,N,N’,N’-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma-Aldrich, ABD) 590 nm’de kolorimetrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır.

3.2.3.2.1. COX Aktivitesi Analizi için Reaktiflerin Hazırlanması

Analiz tamponu: 3 mL analiz tamponu 27 mL HPLC-grade su (Fisher Chemical, ThermoFisher Scientific, ABD) su ile seyreltilerek hazırlandı.

Hem Reaktifi: 88 µl hem çözeltisi, önceden hazırlanmış 1.912 mL analiz tamponu ile seyreltildi.

Araşidonik asit çözeltisi: 100 µl araşidonik aside (Arachidonic acid, Sigma-Aldrich, ABD) 100 µl KOH ilave edilip karıştırıcı (Vortex-Genie, Scientific Industries, ABD) ile karıştırıldı. Bu karışım 1.8 mL HPLC-grade su ile seyreltildi. Bu reaktiflere ilaveten COX standartı, kolorimetrik substrat, DuP-697 (COX-2 inhibitörü), SC-560 (COX-1 inhibitörü) kit içerisinde kullanıma hazır olarak bulunmaktaydı.

3.2.3.2.2. COX Aktivitesi için Yöntemin Uygulanması

96 kuyucuk içeren mikrolakanın kuyucuklarına numune, numune körü, inhibitör ve standart kuyucukları işaretlendi. Numuneler dolaptan çıkarıldı ve çözündükten sonra numune körü için her bir numuneden 50 µl alındı ve mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Daha sonra mikrosantrifüjde, 8 000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant numune körü olarak kullanıldı. Kuyucuklardan COX standart kuyucuğuna, numune ve numune körü kuyucuklarına 150 µl analiz tamponu ve 10 µl hem çözeltisi konuldu. Ardından sırasıyla kuyucuklara standart, numune ve inaktif numunelerden 10 µl eklendi. İnhibitör kuyucuklarına ise 140 µl analiz tamponu, 10 µl hem çözeltisi, 10 µl numune, 10 µl SC-560 çözeltisi ilave edildi. Plate çalkalayıcıda birkaç saniye çalkalandıktan sonra 5 dakika 25°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüm kuyucuklara önce 20 µl kolorimetrik substrat sonra 20 µl araşidonik asit çözeltisi ilave edildi. Plaka birkaç saniye karıştırıcıda karıştırıldı ve 5 dakika 25°C'de inkübasyonda tutulduktan sonra 590 nm dalga boyunda adsorbanslar okundu. Aşağıda verilen formül yardımıyla total COX aktivitesi ve COX-1, COX-2 aktiviteleri hesaplandı. Her numune için total COX aktivitesi hesaplandıktan sonra, SC-560 ile muamele edilmiş numunelerin COX aktiviteleri aynı formülle hesaplandı. Bu sonuçlar numunelerin COX-2 aktiviteleriydi. Total COX aktivitelerinden COX-2 aktiviteleri çıkarılarak numunelerin COX-1 aktivite sonuçları elde edildi. Örneklerdeki enzim aktiviteleri, 25°C'de 1 dakikada 1 nmol TMPD'yi okside eden enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak alınıp mg yaş doku başına enzim ünitesi olarak verildi (Ünite/mg protein).

$$\begin{array}{l} \text{Toplam} \\ \text{COX} \\ \text{Aktivitesi} \end{array} = \frac{\Delta A_{590/5 \text{ dk}}}{0.00826 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0.21 \text{ mL}}{\frac{\text{Toplam Hacim}}{0.01 \text{ mL}}} \div 2^*$$

Numune Hacmi

*Sonuçlar, 2 mol TMPD'nin PGG2'nin PGH2'ye indirgenmesi için gerekli olduğundan 2'ye bölünür.

3.2.4. Histopatolojik Analizler

Sıçanlardan çıkarılan testis dokuları % 10 formalin çözeltisinde fikse edildi. Rutin doku takibi işlemlerinden dokular parafine gömüldü. Sonra parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alındı ve Hematoksilen&Eozin (H&E) ile boyandı. Tüm kesitler kodlandı ve alınan kesitler hangi tedavi protokolünün uygulandığını bilmeyen bir patolog tarafından ışık mikroskopunda (Olympus BX 52, Tokyo, Japan) incelendi.

3.2.5. İstatistiksel Analizler

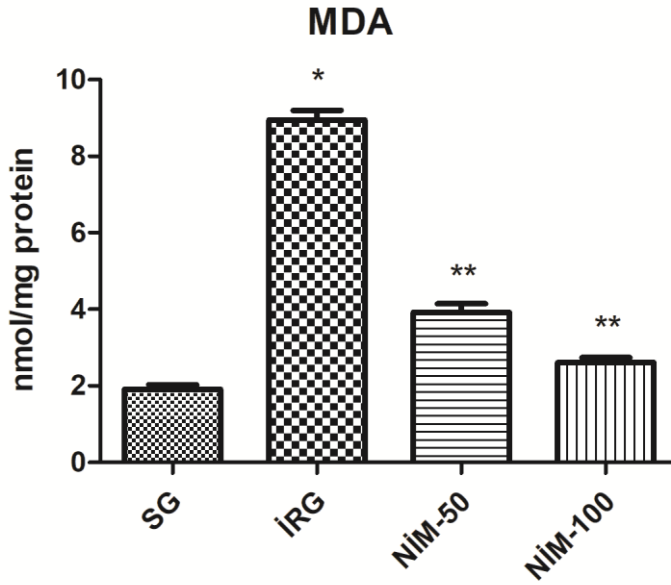
Deneylerden elde edilen sonuçlar “ortalama değer ± standart hata” ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) olarak ifade edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi one-way “ANOVA” testi kullanılarak belirlendi. Devamında “Tukey” testi yapıldı. Tüm istatistiksel işlemler “SPSS for Windows, 22.0” istatistik programında yapıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. MDA Analiz Sonuçları

Dokular üzerinde yapılan analizlerden elde edilen sonuçlara göre; MDA değerleri SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında sırasıyla; 1.92 ± 0.11 , 8.95 ± 0.2 , 3.92 ± 0.23 ve 2.62 ± 0.12 olarak bulunmuştur (Tablo 2). SG ile karşılaştırıldığında İRG'nin MDA değerleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Ayrıca İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları kıyaslandığında ise İRG'de MDA değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0.001$) (Şekil 2).



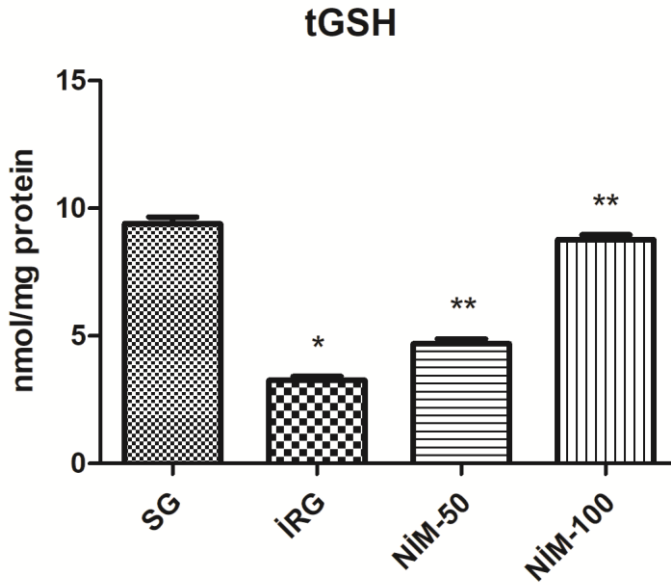
Şekil 2. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında MDA değerleri

*SG ile İRG grupları karşılaştırılmıştır.

**İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları karşılaştırılmıştır.

4.1.2. tGSH Analiz Sonuçları

Tablo 2’de görüldüğü gibi tGSH analizinden elde edilen sonuçlara göre; tGSH değerleri SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında sırasıyla; 9.4 ± 0.26 , 3.25 ± 0.15 , 4.70 ± 0.18 ve 8.77 ± 0.19 olarak bulunmuştur. SG ile İRG grupları karşılaştırıldığında tGSH değerlerinin İRG’de istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düştüğü ($p < 0.001$); İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları karşılaştırıldığında ise NİM-50 ve NİM-100 gruplarında tGSH değerlerinin İRG’den daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0.001$) (Şekil 3).



Şekil 3. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında tGSH değerleri

*SG ile İRG grupları karşılaştırılmıştır.

**İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları karşılaştırılmıştır.

Tablo 2. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarının MDA ve tGSH düzeyleri

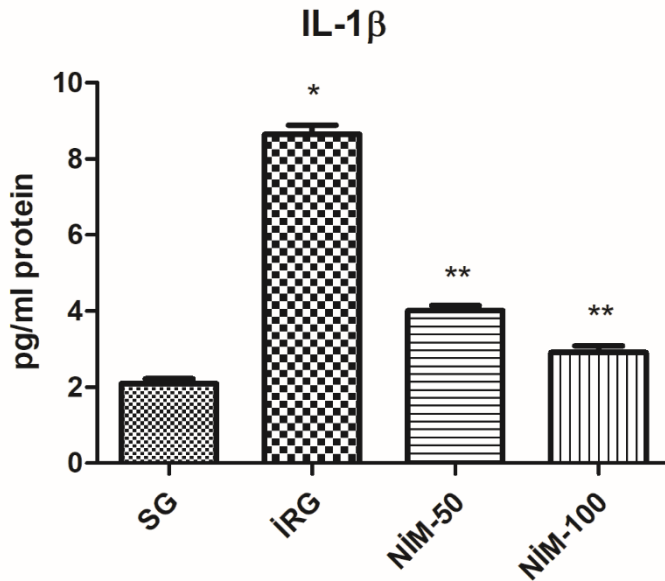
Gruplar	MDA nmol/mg protein	p	tGSH nmol/mg protein	p
SG	1.92±0.11	-	9.4±0.26	-
İRG	8.95±0.2	p<0.001*	3.25±0.15	p<0.001*
NİM-50	3.92±0.23	p<0.001**	4.70±0.18	p<0.001**
NİM-100	2.62±0.12	p<0.001**	8.77±0.19	p<0.001**

*SG ile İRG grupları karşılaştırılmıştır.

**İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları karşılaştırılmıştır.

4.1.3. IL-1 β Analiz Sonuçları

Dokular üzerinde yapılan analizlerde IL-1 β düzeyleri SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında sırasıyla; 2.1±0.12, 8.65±0.23, 4.02±0.13 ve 2.92±0.17 olarak bulundu (Tablo 3). Sonuçlar, SG ile karşılaştırıldığında İRG'de anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.001). Ayrıca İRG ile NİM-50 ve NİM-100 gruplarında da IL-1 β düzeylerinin İRG'de istatistiksel olarak anlam ifade edecek şekilde yüksek olduğu bulunmuştur (p<0.001) (Şekil 4).

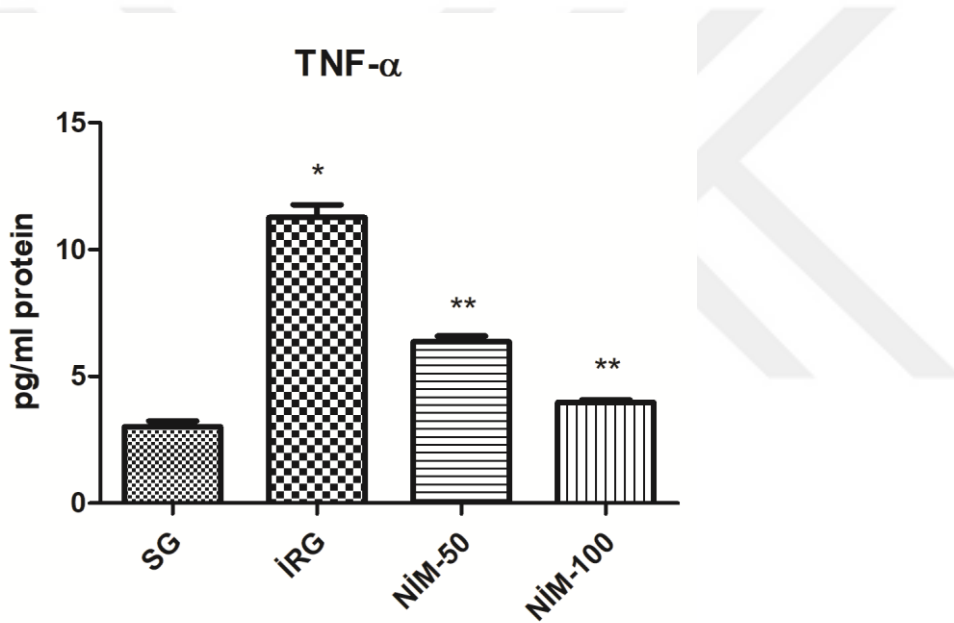
**Şekil 4.** SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında IL-1 β değerleri

*SG ile İRG grupları karşılaştırılmıştır.

**İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları karşılaştırılmıştır.

4.1.4. TNF- α Analiz Sonuçları

Yapılan analizlerden elde edilen sonuçlara göre TNF- α değerleri SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında sırasıyla; 3.02 ± 0.23 , 11.27 ± 0.51 , 6.37 ± 0.23 ve 3.98 ± 0.10 olarak bulunmuştur (Tablo 3). Ulaşılan bulgular İRG'de TNF- α düzeylerinin SG'ye göre çok yüksek ($p < 0.001$); İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları karşılaştırıldığında ise NİM-50 ve NİM-100 gruplarında TNF- α değerlerinin daha düşük olduğunu göstermektedir ($p < 0.001$) (Şekil 5).



Şekil 5. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında TNF- α değerleri

*SG ile İRG grupları karşılaştırılmıştır.

**İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları karşılaştırılmıştır.

Tablo 3. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarının IL-1 β ve TNF- α düzeyleri

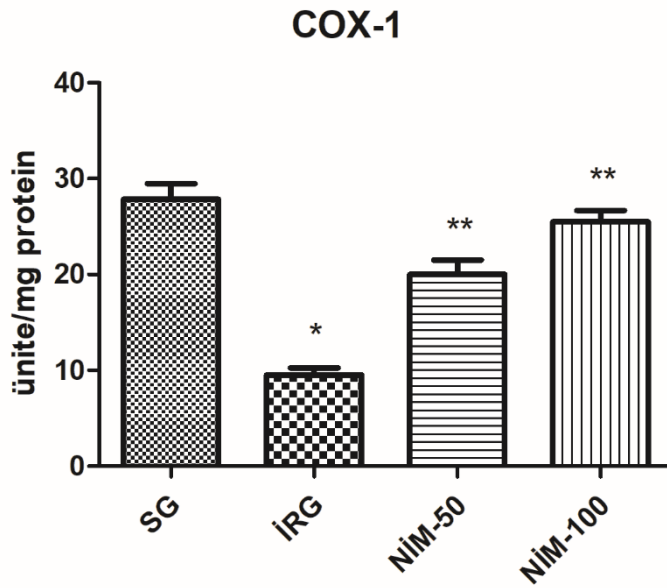
Gruplar	IL-1 β pg/ml protein	p	TNF- α pg/ml protein	p
SG	2.1 \pm 0.12	-	3.02 \pm 0.23	-
İRG	8.65 \pm 0.23	p<0.001*	11.27 \pm 0.51	p<0.001*
NİM-50	4.02 \pm 0.13	p<0.001**	6.37 \pm 0.23	p<0.001**
NİM-100	2.92 \pm 0.17	p<0.001**	3.98 \pm 0.10	p<0.001**

*SG ile İRG grupları karşılaştırılmıştır.

**İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları karşılaştırılmıştır.

4.1.5. COX-1 Analiz Sonuçları

Yapılan analizlerden elde edilen sonuçlara göre; SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 deney gruplarındaki hayvanların testis dokularının COX-1 düzeyleri sırasıyla; 27.83 \pm 1.64, 9.50 \pm 0.76, 20.00 \pm 1.53 ve 25.50 \pm 1.18 olarak bulundu (Tablo 4). Elde edilen sonuçlara dayanılarak SG grubundaki COX-1 düzeyleri İRG ile kıyaslandığında yaklaşık 3 kat daha fazla bulunmuştur (p<0.001). Ayrıca İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları karşılaştırıldığında COX-1 değerleri İRG'de istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde (p<0.001) düşük bulunmuştur (Şekil 6).



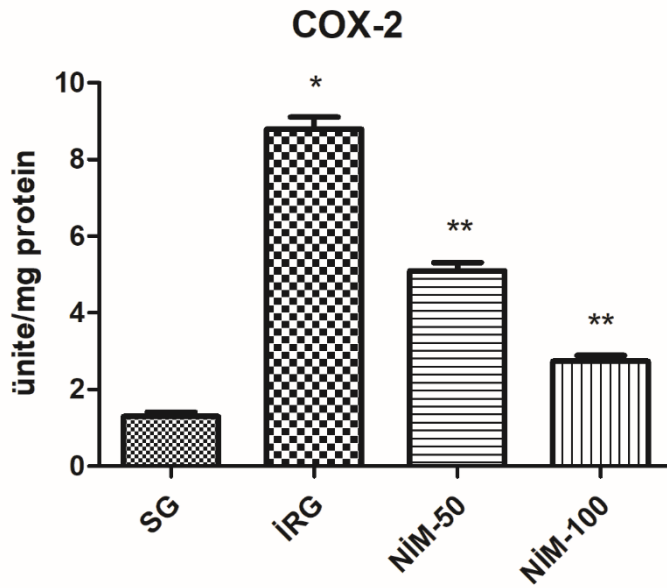
Şekil 6. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında COX-1 değerleri

* SG ile İRG grupları karşılaştırılmıştır.

**İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları karşılaştırılmıştır.

4.1.6. COX-2 Analiz Sonuçları

Yapılan analiz sonuçlarına göre; COX-2 değerleri SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında sırasıyla; 1.30 ± 0.12 , 8.78 ± 0.32 , 5.10 ± 0.21 ve 2.73 ± 0.15 olarak bulunmuştur (Tablo 4). Analiz sonuçları İRG'de SG ile karşılaştırıldığında COX-2 düzeyleri daha yüksek ($p < 0.001$); NİM-50 ve NİM-100 gruplarında ise COX-2 düzeyleri İRG grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ifade edecek şekilde düşük bulunmuştur ($p < 0.001$) (Şekil 7).



Şekil 7. SG, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarında COX-2 değerleri

*SG ile İRG grupları karşılaştırılmıştır.

**İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları karşılaştırılmıştır.

Tablo 4. Sham, İRG, NİM-50 ve NİM-100 gruplarının COX-1 ve COX-2 düzeyleri

Gruplar	COX-1		COX-2	
	Ünite/mg protein	p	Ünite/mg protein	p
SG	27.83±1.64	-	1.30±0.12	-
İRG	9.50±0.76	p<0.001*	8.78±0.32	p<0.001*
NİM-50	20.00±1.53	p<0.001**	5.10±0.21	p<0.001**
NİM-100	25.50±1.18	p<0.001**	2.73±0.15	p<0.001**

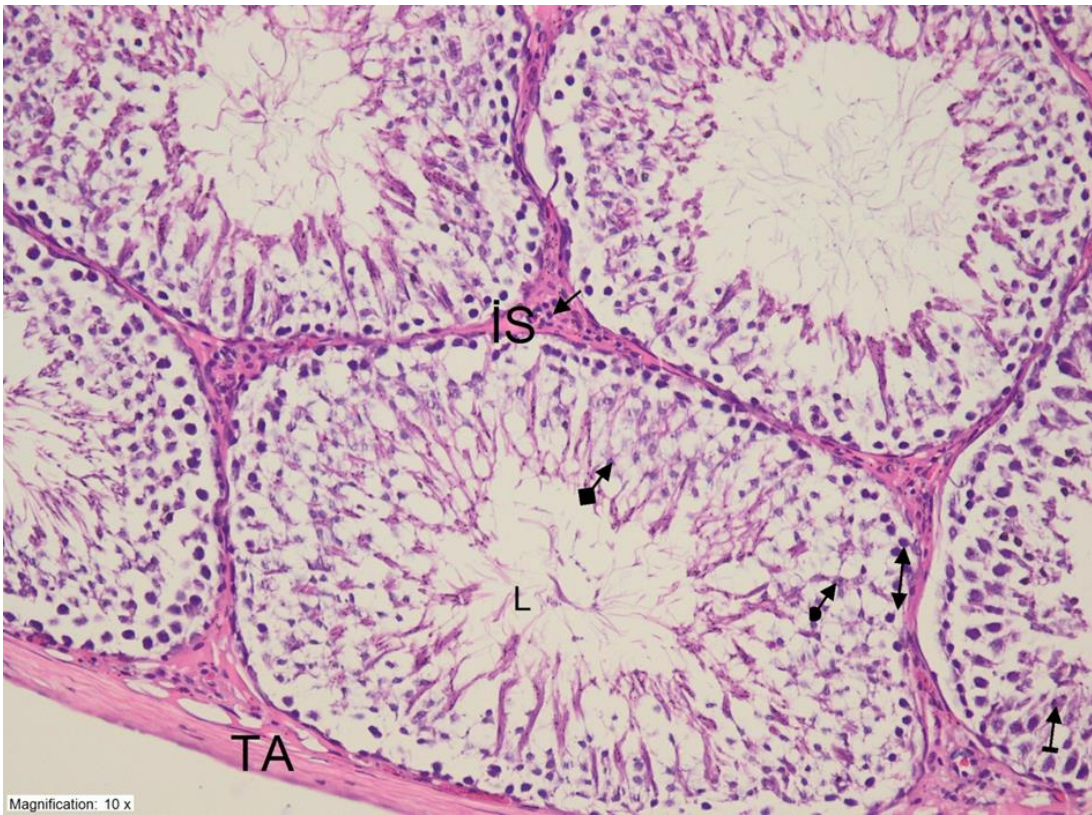
* SG ile İRG grupları karşılaştırılmıştır.

**İRG ile NİM-50 ve NİM-100 grupları karşılaştırılmıştır.

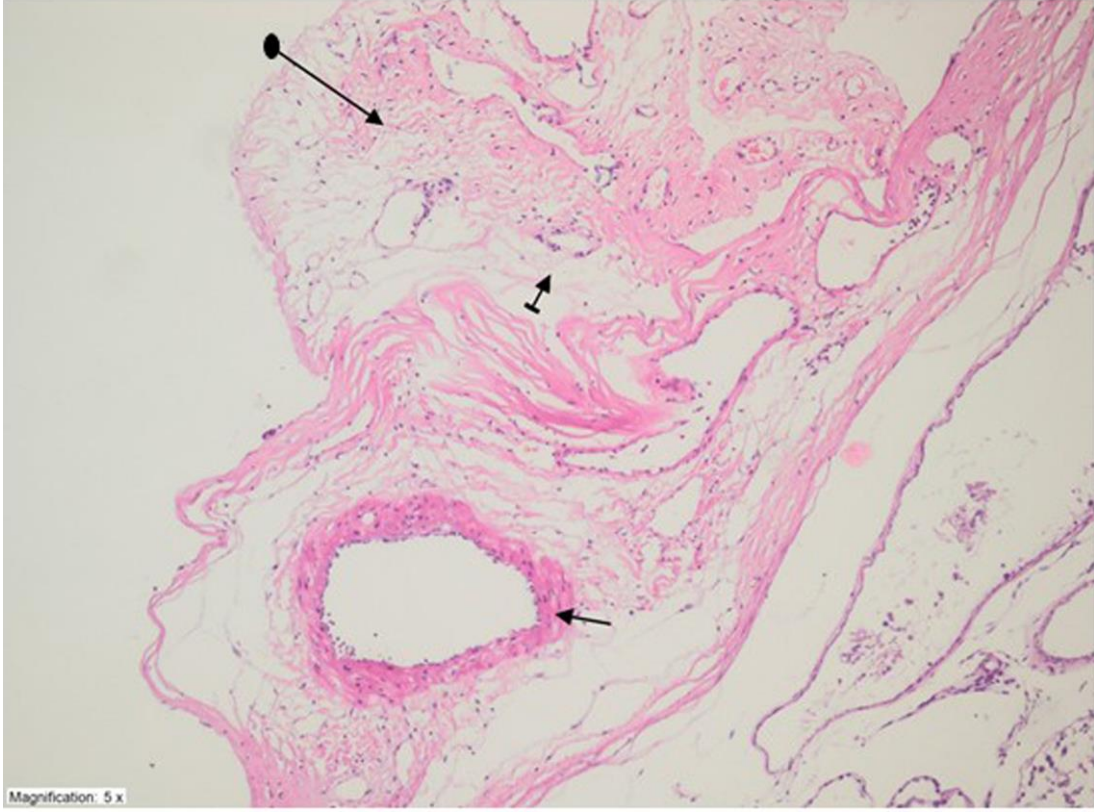
4.1.7. Histopatolojik Bulgular

Yapılan histopatolojik analizlerden elde edilen sonuçlara göre; SG grubuna ait testis dokusunda tunika albuginea, Leydig hücresi interstisyel alan, lümen, Sertoli hücresi, spermatogonium, primer spermatozoid ve spermatozoidlerin normal yapısı izlenmektedir (Şekil 8). İR uygulanan İRG grubunda tunika albugineada dejenerasyon, ödem içeren yaygın interstisyel alan hasarı ve dilate konjesyone kan damarı gözlenmektedir (Şekil

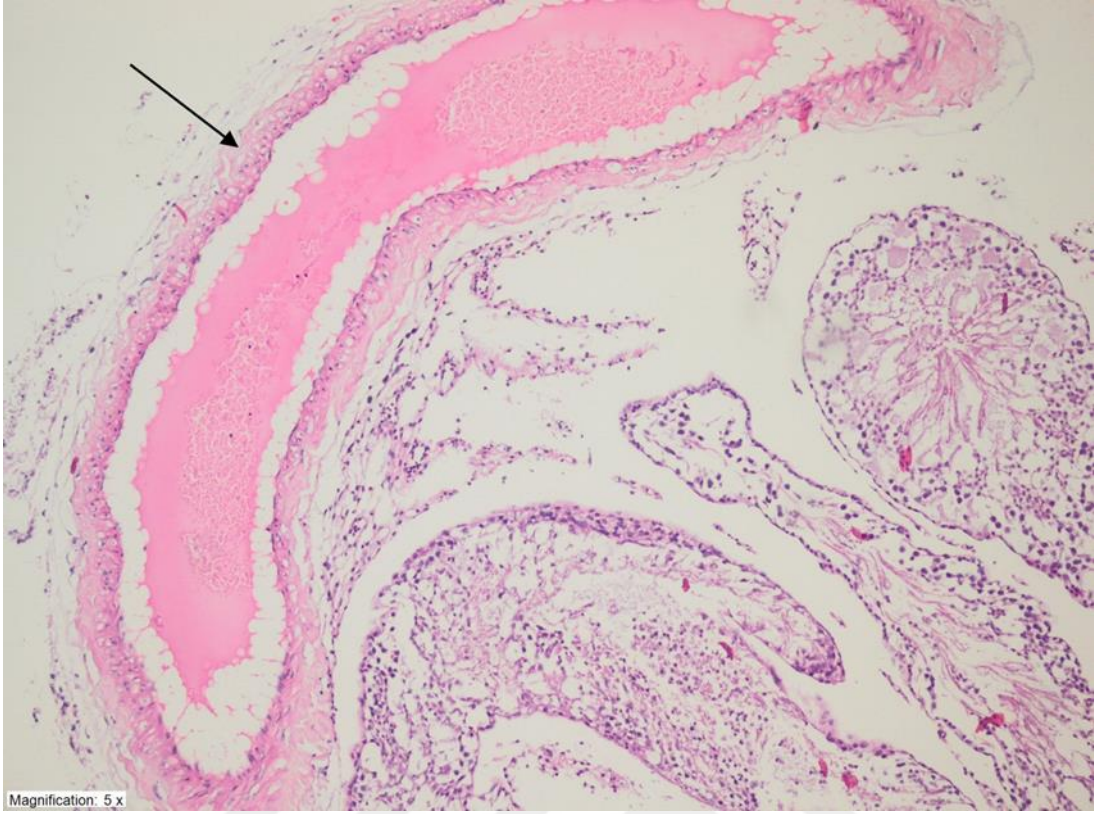
9A). Aynı zamanda stromada dilate konjesyone kan damarları da görülmüştür (Şekil 9B). Yine bu grubun testis dokusunda nekrotik seminifer tübül, parçalanmış intersitisyel doku, ödem ve atrofik seminifer tübüllere rastlanmıştır (Şekil 9C). Şekil 10'da 50 mg/kg dozda nimesulid verilen NİM-50 grubunda dilate konjesyone kan damarı, ödem ve daha organize seminifer tübül yapıları gözlenmiştir. Nimesulid, 100 mg/kg dozda testis dokusunu daha iyi korumuştur. NİM-100 grubunda, dilate konjesyone damarlar dışında normale yakın görünüm izlenmiştir (Şekil 11).



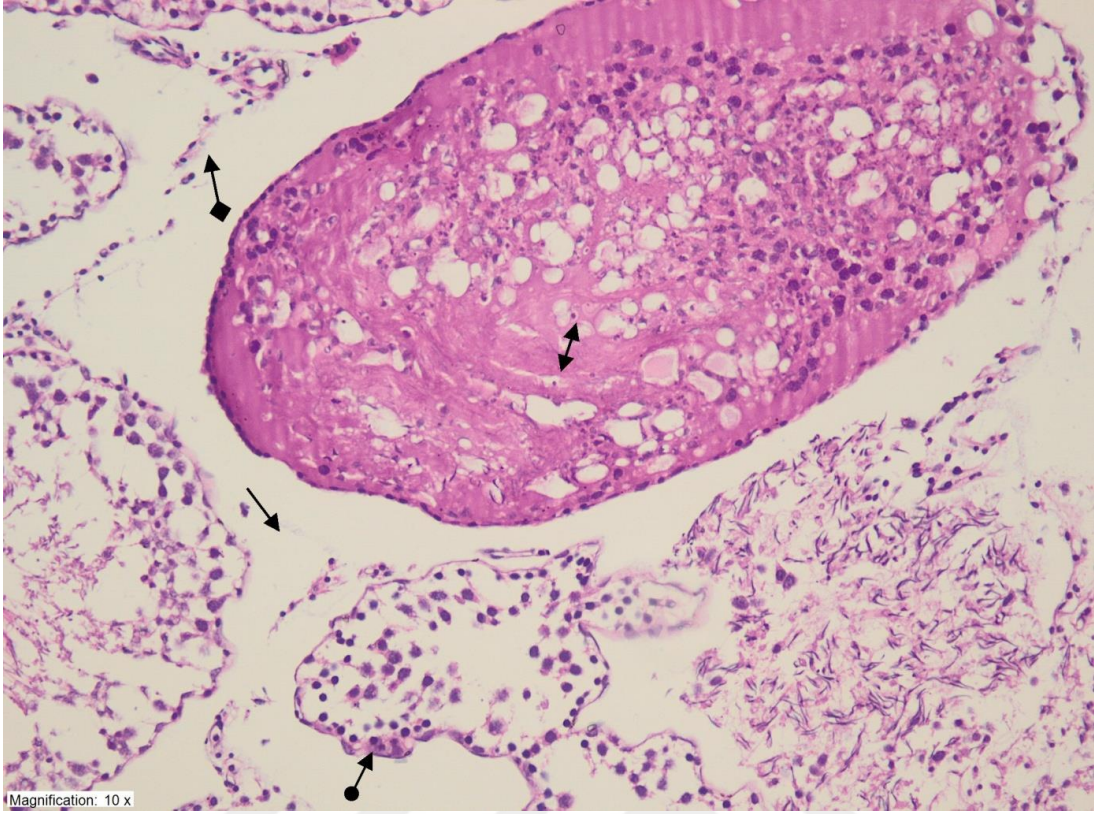
Şekil 8: SG grubundaki testis dokusunun histopatolojik görünümü: TA (tunica albuginea), Leydig hücresi (düz ok), IS (interstisyel alan), L (lümen), Sertoli hücresi (yuvarlak ok), spermatogonium (çift taraflı ok), primer spermatosit (çizgili ok) ve spermatit (kareli ok) (H&E; x200).



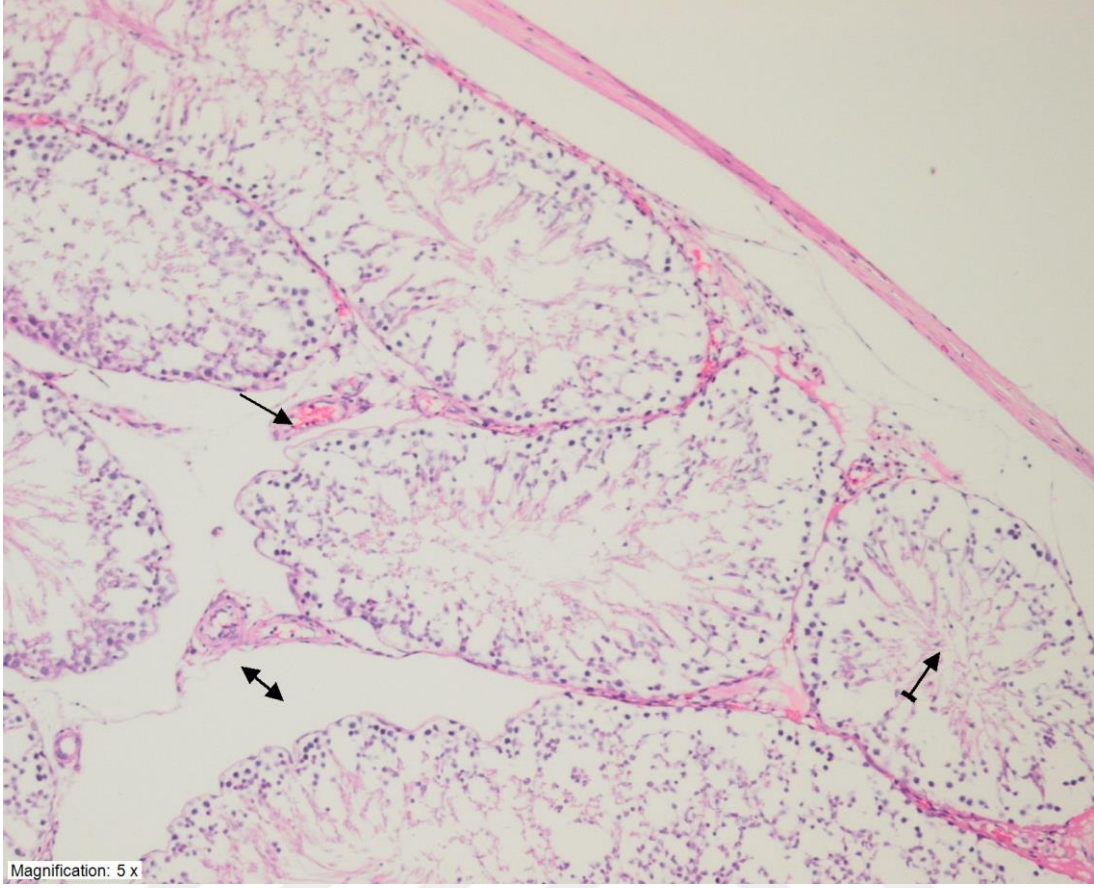
Şekil 9A: İRG grubundaki testis dokusunun histopatolojik görünümü: Dejenere tunika albuginea (Yuvarlak ok), ödem (çizgili ok) ve bir kısmı konjesyone dilate damar yapıları (düz ok) (H&E; x200).



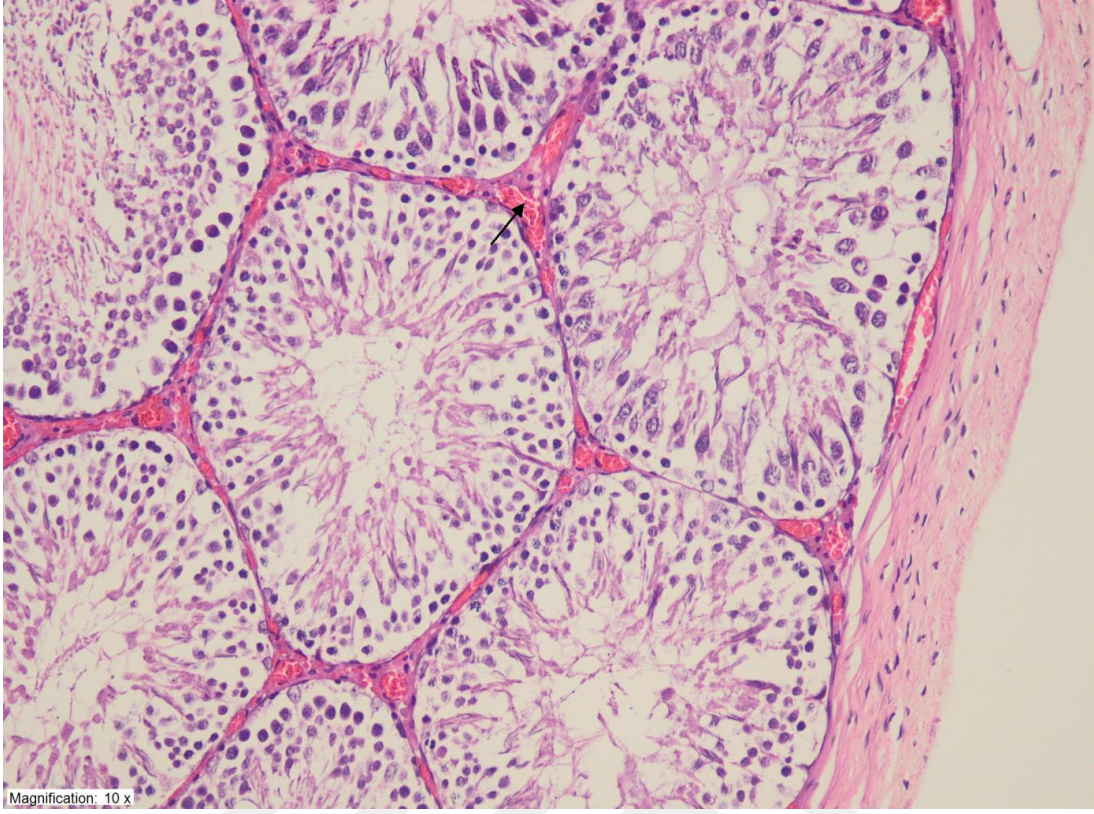
Şekil 9B: İRG grubundaki testis dokusunun histopatolojik görünümü: Stromada dilate konjesyone kan damarı (düz ok) (H&E; x200).



Şekil 9C: İRG grubundaki testis dokusunun histopatolojik görünümü: Nekrotik seminifer tübül (çift taraflı ok), parçalanmış intersitisyel doku (kareli ok), ödem (düz ok) ve atrofik seminifer tübül (yuvarlak ok) (H&E; x200).



Şekil 10: NİM-50 grubundaki testis dokusunun histopatolojik görünümü: Dilate konjesyoe kan damarı (düz ok), ödem (çift taraflı ok) ve daha organize seminifer tübül yapıları (çizgili ok) (H&E; x200).



Şekil 11: NİM-100 grubundaki testis dokusunun histopatolojik görünümü: Dilate konjesyone kan damarları (düz ok) dışında normale yakın görünüm (H&E; x200).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Testis İ/R hasarı, her yaşta görülebilmesine rağmen özellikle çocukluk ve ergenlik çağında ortaya çıkan genitoüriner bir sorundur (77). Tedavi edilmezse kısırlık da dahil olmak üzere ciddi komplikasyonlara neden olabilir (15). Testis İ/R hasarının tedavisinde temel amaç; torsiyone olmuş testisin kısa süre içerisinde detorsiyone edilerek yeniden kanlanmasının sağlanmasıdır. Fakat testisin reperfüzyonuyla dokuda aşırı miktarda ROS oluşmakta, dokunun antioksidan kapasitesi azalmakta ve hücrenin oksidan/antioksidan dengesi oksidanlar lehine bozulmaktadır (6).

Deney sonuçlarımızdan da anlaşılacağı gibi, İ/R uygulanan testis dokusunda MDA miktarında belirgin artış görülmüştür. Lipid peroksidasyonunda son ürün olarak MDA oluşmakta ve MDA oksidan bir parametre olarak bilinmektedir. Artan MDA miktarı, hücre membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin bozulmasına yol açarak hücre ölümüne neden olmaktadır (135). Bundan önce yapılan çalışmalarda da İ/R uygulanan testis dokusunda MDA düzeyleri yüksek bulunmuştur (136-138).

Yine bu çalışmamızda, MDA miktarı yüksek bulunan testis dokusunda, tGSH miktarının anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan tGSH, enzimatik olmayan endojen antioksidan bir maddedir (69). Oksidatif hasara bağlı olarak ortaya çıkan serbest radikalleri bertaraf etme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (70). Ayrıca H_2O_2 'nin O_2 ve H_2O 'ya dönüştürülmesi reaksiyonunda GSHPx için bir substrat olarak kullanılır. Dokularda GSH düzeyinin yükselmesi, dokunun antioksidan kapasitesini artırarak oksidatif hasarla mücadele etme gücünü artırmaktadır. Bu yüzden oksidatif hasarı önlemede dokulardaki GSH miktarını yeterli düzeyde tutmak gerekir. Testis İ/R hasarında tGSH miktarının azaldığını gösteren çok sayıda deneysel çalışmalar bulunmaktadır (109, 137). Deney sonuçlarımız, İ/R işlemi uygulanan testis dokusunda oksidatif stresin geliştiğine işaret etmektedir. Oksidatif doku hasarında oksidan parametreler yükselmekte, antioksidan parametreler ise azalmaktadır (139). Bilindiği gibi fizyolojik şartlarda

oksidan/antioksidan denge antioksidanların üstünlüğüyle sürdürülmektedir (140). Bu dengenin bozulması doku hasarına yol açmaktadır. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır (139). Çalışmamızda İRG grubunun testis dokusunda MDA değerleri NİM-50, NİM-100 ve SG grupları ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde yüksek çıkmıştır. Testis İ/R hasarına karşı kullanılan nimesulidin doza bağımlı olarak MDA artışını önlediği görülmüştür. Nimesulidin MDA üzerindeki inhibitör etkisi özellikle 100 mg/kg dozda daha belirgin bulunmuştur. Literetürlerde nimesulidin testis İ/R hasarı üzerindeki koruyucu etkisine ait bilgilere rastlanmadı. Ancak, nimesulidin 100 mg/kg dozda İ/R ile indüklenen oksidatif karaciğer hasarını 50 mg/kg dozuna göre daha anlamlı önlediği rapor edilmiştir (131). Ayrıca, nimesulidin MDA artışını, tGSH'nin azalmasını önleyerek böbrek dokusunu İ/R hasarından koruduğu bildirilmiştir (51). Nimesulid uygulanan grupların testis dokusunda MDA üretiminin ve tGSH tüketiminin inhibe edilmesi literetür bilgileri ile de örtüşüğünü göstermektedir.

Çalışmamızda ayrıca MDA'nın yüksek, tGSH'nin düşük bulunduğu İRG grubunun testis dokusunda proinflamatuvar bir parametre olan IL-1 β 'in artış gösterdiği kaydedilmiştir. Bilindiği gibi, IL-1 β İ/R döneminde aktive edilen polimorf nükleer lökositlerden (PNL) salgılanmaktadır (13). Yapılan çalışmalarda PNL'lerin oksidatif patlaması ve serbest radikallerin salınması gibi birçok olayda IL-1 β 'in rol oynadığı gösterilmiştir (141). Bundan önce yapılan birçok deneysel çalışmada İ/R uygulanan testis dokusunda IL-1 β düzeyinin yükseldiği ifade edilmiştir (136, 142, 143). Nimesulid uygulanan NİM-50 ve NİM-100 gruplarında IL-1 β miktarının İRG'ye göre daha düşük olduğu anlaşılmıştır. Nimesulidin testis dokusunda İ/R hasarına bağlı meydana gelen IL-1 β miktarındaki yükselmeyi önlemesi, hasar gelişen dokuya nötrofil migrasyonunu önlemiş olabileceğini düşündürmektedir. Nimesulidin, testis dokusunda İ/R hasarına bağlı IL-1 β artışını önlediğini gösteren çalışmalar bulunmamaktadır. Ancak, nimesulidin beyin hücrelerinde antioksidan ve IL-1 β gen ekspresyonunu inhibe ederek anti-nöroinflamatuvar etki oluşturduğu gösterilmiştir (144). Yine nimesulidin beyin hücrelerinde lipopolisakkarit ile indüklenen proinflamatuvar IL-1 β gen ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (145). Deney sonuçlarımız ve literatür bilgilerinden İ/R uygulanmış testis dokusunda IL-1 β ile

ilişkili inflamasyonun geliştiği ve nimesulidin bu olayı baskılamada etkili olduğu anlaşılmaktadır.

İnflamasyon gelişen bölgede PNL'ler tarafından IL-1 β dışında ayrıca proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α üretilmektedir (54). İnflamasyon durumunda PNL ve diğer proinflamatuvar kan hücrelerinin aktivasyonunda ve inflamasyon bölgesine toplanmasında TNF- α 'nın rolü bilinmektedir. Ayrıca TNF- α 'lar, IL-1 β 'lerin de üretimini artırmaktadır (54-56). Turner ve diğerleri (146), testisin reperfüzyonunu takiben dokuda TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin arttığını göstermiştir. Testis İ/R hasarı üzerine yapılan çalışmalarda TNF- α düzeylerinin yükseldiği belgelenmiştir (136, 143, 147). Çalışmamızda TNF- α düzeylerinin İRG'de SG'ye göre yüksek olması, çalışmamızın literetür bilgileri ile uyum içerisinde olduğunu ortaya koymaktadır. Nimesulidin İ/R ile indüklenen testis dokusunda TNF- α miktar artışını anlamlı derecede azalttığı görülmüştür. Hem NİM-50 hem de NİM-100 gruplarında ise TNF- α miktarının İRG'ye göre düşük olduğu anlaşılmıştır. Nimesulidin TNF- α üzerindeki antagonist etkisi 100 mg/kg dozda daha belirgin olduğu saptanmıştır. Niranjana ve diğerlerinin (145) çalışmasında da nimesulidin antiinflamatuvar aktivitesinin IL-1 β ve TNF- α üzerindeki inhibitör etkisinden ileri geldiği savunulmaktadır.

Literatür bilgileri, İ/R hasarının dokunun oksijensiz kalması ile başlayan, serbest oksijen radikallerinin üretimi ile devam eden ve inflamatuvar yanıtla genişleyen karmaşık bir patolojik süreç olduğunu göstermektedir. Deney sonuçlarımızda da görüldüğü gibi oksidan parametrelerin yüksek olduğu İRG'nin testis dokusunda COX-2 aktivitesinde belirgin bir artış yaşanmıştır. Beyin, over ve karaciğer İ/R hasarına yönelik yapılan çalışmalarda COX-2 enziminin inflamasyonlu bölgede yükseldiği gösterilmiştir (52, 131, 148). İnflamasyon mediyetörleri tarafından indüklenebilir bir enzim olan COX-2, araşidonik asitten proinflamatuvar PG'lerin sentezinde görev almaktadır (149). Bu nedenle İ/R hasarının önlenmesinde hem antioksidan ve hem de COX-2 enzimini selektif inhibe eden antiinflamatuvar ilaçlar üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak, testis İ/R hasarına karşı etkisi araştırılan nimesulidin, testis dokusunda İ/R ile artan proinflamatuvar COX-2 enzim aktivitesini anlamlı derecede inhibe ettiği anlaşılmaktadır. Deney gruplarımızda COX-2 aktivitesi İRG'de SG'ye göre oldukça yüksek, NİM-50 ve NİM-100 grubunda ise

İRG'ye göre düşük olmuştur. Özellikle de 100 mg/kg dozda nimesulid COX-2 aktivitesini belirgin bir şekilde düşürmüştür. Nimesulidin COX-2 selektif inhibitörü antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkili ilaç olduğu bilinmektedir. Bazı deneysel çalışmalarda nimesulidin, COX-2 enzimi inhibe ederek dokularda inflamasyon ve toksik radikal oluşumunu baskıladığı ifade edilmiştir (17).

Testislere uygulanan İ/R işlemi, dokularda COX-2 aktivitesinde artışa yol açarken, COX-1 aktivitesini azaltmıştır. Araşidonik asitten sitoprotektif PG'lerin sentezinde görev alan COX-1 enzimi; hücrelerde yapısal olarak yer alan bir enzimdir (117, 150). Bu enzimin inhibisyonu dokularda hasar oluşmasına zemin hazırlar (48, 150). Literatürde over, karaciğer ve böbrek gibi organlarda İ/R hasarı üzerine yapılan çalışmalarda, COX-1 değerlerinin İ/R hasarına maruz bırakılan gruplarda sağlıklı gruplara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (51, 52, 131). Bizim çalışmamızda da İ/R işlemi uygulanan İRG'de COX-1 değerleri SG'ye kıyasla daha düşük bulunmuştur. Nimesulidin 50 mg/kg dozda uygulandığı grupta COX-1 değerleri İRG'ye göre belirgin yükselmiş, 100 mg/kg nimesulid verilen grupta ise SG'deki değerlere yakın değerler elde edilmiştir.

Yapılan histopatolojik incelemelerde; İRG grubunun testis dokusunda tunika albugineada dejenerasyon, ödem içeren yaygın interstisyel alan hasarı, dilate konjesyone kan damarı, nekrotik seminifer tübül, parçalanmış interstisyel doku, ödem ve atrofik seminifer tübüllere rastlanmıştır. Tunika albugineada meydana gelen dejenerasyon testis dokusunda İ/R sonucu oluşan patolojik belirtilerden biri olduğu gösterilmiştir (151). Histopatolojik çalışmalar sonucu İ/R işlemine tabi tutulmuş testis dokularında gözlenen ödem içeren interstisyel alanlar, İ/R hasarının bir diğer patolojik göstergesidir (152). Ayrıca, Chi ve diğerleri (153) çalışmalarında İ/R'nin testis dokusunda seminifer tübüllerde nekroza yol açabildiğini rapor etmiştir. Testis İ/R hasarı üzerine yapılan başka çalışmalarda ise tüm bunlara ilaveten, testis dokusunda konjestiyone damar yapıları, seminifer tübüllerde ödem ve yapısal bozuklukların olduğu saptanmıştır (154, 155). Bizim bu çalışmamızda, İ/R işlemine bağlı olarak ortaya çıkan biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikleri 100 mg/kg dozda başarıyla önleyen nimesulidin, histopatolojik değişiklikleri de başarıyla önlediği gösterilmiştir. Ayrıca 50 mg/kg dozda nimesulid uygulanan grupta da İ/R işlemi sonucu gelişen doku

hasarının histopatolojik olarak kısmen önlendiği anlaşılmıştır. Ancak 100 mg/kg nimesulid İ/R hasarının histopatolojik göstergelerini düzeltmede 50 mg/kg doza göre daha başarılı olmuştur. Literatürden elde edilen bilgilerle ulaştığımız sonuçlar mukayese edildiğinde, çalışmamızın histopatolojik sonuçlarının literatür ile uyduğu görülmektedir.

Sonuç olarak; İ/R oluşturulan testis dokusunda, oksidan/antioksidan dengenin oksidanların lehine değiştiği anlaşılmıştır.

Testislere uygulanan İ/R işlemi, dokularda proinflammatuar IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinlerin üretiminde artışa neden olmuştur.

Testis dokusunda İ/R'ye bağlı oluşan hasarın COX-1/COX-2 aktiviteleri arasındaki dengeyi COX-2 lehine bozduğu saptanmıştır.

Testis dokularında İ/R işleminin oksidatif stresin yanı sıra inflammatuar reaksiyona da yol açtığı görülmüştür.

Çalışmamızda MDA, IL-1 β , TNF- α ve COX-2 düzeyleri yüksek, tGSH ve COX-1 düzeyleri düşük bulunan testis dokularında histopatolojik olarak hasar geliştiği gösterilmiştir.

Nimesulidin, 100 mg/kg dozda iskemi-reperfüzyon işlemine bağlı MDA, IL-1 β , TNF- α ve COX-2 artışını, tGSH ve COX-1 azalmasını 50 mg/kg dozuna göre daha iyi önlediği görülmüştür.

Nimesulidin, testis dokusunu iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruduğu histopatolojik incelemelerle de kanıtlanmıştır.

Nimesulidin, antioksidan ve selektif antiinflammatuar özelliği ile İ/R'nin indüklediği testis hasarını baskılaması onun, yan etkilerinin daha az ve klinikte testis iskemi reperfüzyon hasarının tedavisinde daha yararlı olacağını düşündürmektedir.

6. KAYNAKÇA

1. Kalogeris T., Baines C. P., Krenz M. ve Korthuis R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*, 298, 229-317.
2. Yapca O. E., Borekci B. ve Suleyman H. (2013). Ischemia-reperfusion damage. *Eurasian J Med*, 45(2), 126-127.
3. Reiter R. J. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *Faseb J*, 9(7), 526-533.
4. Şener G. ve Berrak Ç. Y. (2009). İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*, 22(3), 5-13.
5. Grace P. A. (1994). Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 81(5), 637-647.
6. Green C. J., Gower J. D., Healing G., Cotterill L. A., Fuller B. J. ve Simpkin S. (1989). The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun*, 7(3-6), 255-264.
7. Orrenius S., Burkitt M. J., Kass G. E., Dypbukt J. M. ve Nicotera P. (1992). Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol*, 32 Suppl, S33-42.
8. Siesjo B. K. (1988). Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit Care Med*, 16(10), 954-963.
9. Li C. ve Jackson R. M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(2), C227-241.
10. Lindsay T. F., Liauw S., Romaschin A. D. ve Walker P. M. (1990). The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *J Vasc Surg*, 12(1), 8-15.
11. Del Maestro R. F. (1980). An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl*, 492, 153-168.
12. Carden D. L. ve Granger D. N. (2000). Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 190(3), 255-266.
13. Korthuis R. J. ve Granger D. N. (1993). Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol*, 16(4 Suppl 1), I19-26.
14. Mogilner J. G., Elenberg Y., Lurie M., Shiloni E., Coran A. G. ve Sukhotnik I. (2006). Effect of dexamethasone on germ cell apoptosis in the contralateral

- testis after testicular ischemia-reperfusion injury in the rat. *Fertil Steril*, 85 Suppl 1, 1111-1117.
15. Krarup T. (1978). The testes after torsion. *Br J Urol*, 50(1), 43-46.
 16. Thomas W. E. ve Williamson R. C. (1983). Diagnosis and outcome of testicular torsion. *Br J Surg*, 70(4), 213-216.
 17. Suleyman H., Cadirci E., Albayrak A. ve Halici Z. (2008). Nimesulide is a selective COX-2 inhibitory, atypical non-steroidal anti-inflammatory drug. *Curr Med Chem*, 15(3), 278-283.
 18. Ozcan O., Erdal H. ve Yonden Z. (2015). İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Oksidatif Stress İlişkisine Biyokimyasal Bakış. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 6(23).
 19. Collard C. D. ve Gelman S. (2001). Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*, 94(6), 1133-1138.
 20. Lefer D. J. ve Granger D. N. (2000). Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med*, 109(4), 315-323.
 21. Hibbard L. T. (1985). Adnexal torsion. *Am J Obstet Gynecol*, 152(4), 456-461.
 22. McWilliams G. D., Hill M. J. ve Dietrich C. S., 3rd. (2008). Gynecologic emergencies. *Surg Clin North Am*, 88(2), 265-283, vi.
 23. Bouguizane S., Bibi H., Farhat Y., Dhifallah S., Darraji F., Hidar S., et al. (2003). [Adnexal torsion: a report of 135 cases]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 32(6), 535-540.
 24. Bayer A. I. ve Wiskind A. K. (1994). Adnexal torsion: can the adnexa be saved? *Am J Obstet Gynecol*, 171(6), 1506-1510; discussion 1510-1501.
 25. Salehipour M., Monabbati A., Salahi H., Nikeghbalian S., Bahador A., Marvasti V. E., et al. (2010). Protective effect of parenteral vitamin E on ischemia-reperfusion injury of rabbit kidney. *Urology*, 75(4), 858-861.
 26. Yazihan N., Ataoglu H., Kavas G. O., Akyurek N., Yener B. ve Aydm C. (2008). The effect of K-ATP channel blockage during erythropoietin treatment in renal ischemia-reperfusion injury. *J Invest Surg*, 21(6), 340-347.
 27. Woolfson R. G., Millar C. G. ve Neild G. H. (1994). Ischaemia and reperfusion injury in the kidney: current status and future direction. *Nephrol Dial Transplant*, 9(11), 1529-1531.
 28. Tsaroucha A. K., Tsiaousidou A., Ouzounidis N., Tsalkidou E., Lambropoulou M., Giakoustidis D., et al. (2016). Intraperitoneal administration of apigenin in liver ischemia/reperfusion injury protective effects. *Saudi J Gastroenterol*, 22(6), 415-422.

29. Jeon B. R., Yeom D. H. ve Lee S. M. (2001). Protective effect of allopurinol on hepatic energy metabolism in ischemic and reperfused rat liver. *Shock*, 15(2), 112-117.
30. Crenesse D., Laurens M., Heurteaux C., Cursio R., Saint-Paul M. C., Schmid-Alliana A., et al. (2003). Rat liver ischemia-reperfusion-induced apoptosis and necrosis are decreased by FK506 pretreatment. *Eur J Pharmacol*, 473(2-3), 177-184.
31. Neary P. ve Redmond H. (1999) *Ischaemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome*. (Grace PA MR, editor). London: Blackwell Science.
32. Teke Z., Kabay B. ve Özden A. (2008). İskemi/Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi. *Pamukkale Medical Journal*, 1, 65-72.
33. Zimmerman B. J. ve Granger D. N. (1992). Reperfusion injury. *Surg Clin North Am*, 72(1), 65-83.
34. Wilhelm J. (1990). Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr*, 137, 1-53.
35. Jennings R. B. ve Reimer K. A. (1991). The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*, 42, 225-246.
36. Parks D. A., Williams T. K. ve Beckman J. S. (1988). Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol*, 254(5 Pt 1), G768-774.
37. Cighetti G., Duca L., Bortone L., Sala S., Nava I., Fiorelli G., et al. (2002). Oxidative status and malondialdehyde in beta-thalassaemia patients. *Eur J Clin Invest*, 32 Suppl 1, 55-60.
38. Gutteridge J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 41(12 Pt 2), 1819-1828.
39. Södergren E. (2000). *Lipid Peroxidation in vivo: Evaluation and application of methods for measurement*. Acta Universitatis Upsaliensis.
40. Cadirci E., Oral A., Odabasoglu F., Kilic C., Coskun K., Halici Z., et al. (2010). Atorvastatin reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: biochemical and histopathologic evaluation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 381(5), 455-466.
41. Polat B., Suleyman H. ve Alp H. H. (2010). Adaptation of rat gastric tissue against indomethacin toxicity. *Chem Biol Interact*, 186(1), 82-89.
42. Marnett L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), 361-370.

43. Huang H. Y., Helzlsouer K. J. ve Appel L. J. (2000). The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9(7), 647-652.
44. Fern R. ve Moller T. (2000). Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. *J Neurosci*, 20(1), 34-42.
45. Udassin R., Vromen A. ve Haskel Y. (1994). The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. *J Surg Res*, 56(3), 221-225.
46. Vilanova J. M., Figueras-Aloy J., Rosello J., Gomez G., Gelpi E. ve Jimenez R. (1998). Arachidonic acid metabolites in CSF in hypoxic-ischaemic encephalopathy of newborn infants. *Acta Paediatr*, 87(5), 588-592.
47. Melli M., Türker R. K. ve Kayaalp S. O. (2009) Eikazonoidler (Araşidonik Asit Metabolitleri) ve Diğer Otakoidler. In: Kayaalp SO, editor. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 12th ed. Ankara, Turkey: Pelikan Publishing. p. 1281-1298.
48. Hinz B. ve Brune K. (2002). Cyclooxygenase-2--10 years later. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(2), 367-375.
49. Lizarraga M. I., Sumano L. H. ve Castillo A. F. (2002). Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 usos potenciales en perros. *Veterinaria México (México)*, 33(3), 285-307.
50. Harris R. E., Casto B. C. ve Harris Z. M. (2014). Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. *World J Clin Oncol*, 5(4), 677-692.
51. Suleyman Z., Sener E., Kurt N., Comez M. ve Yapanoglu T. (2015). The effect of nimesulide on oxidative damage inflicted by ischemia-reperfusion on the rat renal tissue. *Ren Fail*, 37(2), 323-331.
52. Isaoglu U., Yilmaz M., Sener E., Cetin N., Altuner D., Bilen H., et al. (2012). The impaired balances of oxidant/antioxidant and COX-1/COX-2 in ovarian ischemia-reperfusion injury and prevention by nimesulide. *Latin American Journal of Pharmacy*, 31(10), 1481-1488.
53. Dinarello C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117(14), 3720-3732.
54. Dinarello C. A., Cannon J. G., Wolff S. M., Bernheim H. A., Beutler B., Cerami A., et al. (1986). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med*, 163(6), 1433-1450.
55. Nawroth P. P., Bank I., Handley D., Cassimeris J., Chess L. ve Stern D. (1986). Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J Exp Med*, 163(6), 1363-1375.

56. Vassalli P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*, 10, 411-452.
57. Leibovich S. J., Polverini P. J., Shepard H. M., Wiseman D. M., Shively V. ve Nuseir N. (1987). Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*, 329(6140), 630-632.
58. Pober J. S., Gimbrone M. A., Jr., Lapierre L. A., Mendrick D. L., Fiers W., Rothlein R., et al. (1986). Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol*, 137(6), 1893-1896.
59. Strieter R. M., Kunkel S. L., Showell H. J., Remick D. G., Phan S. H., Ward P. A., et al. (1989). Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. *Science*, 243(4897), 1467-1469.
60. Kehrl J. H., Miller A. ve Fauci A. S. (1987). Effect of tumor necrosis factor alpha on mitogen-activated human B cells. *J Exp Med*, 166(3), 786-791.
61. Ranges G. E., Zlotnik A., Espevik T., Dinarello C. A., Cerami A. ve Palladino M. A., Jr. (1988). Tumor necrosis factor alpha/cachectin is a growth factor for thymocytes. Synergistic interactions with other cytokines. *J Exp Med*, 167(4), 1472-1478.
62. Sung S. S., Bjorndahl J. M., Wang C. Y., Kao H. T. ve Fu S. M. (1988). Production of tumor necrosis factor/cachectin by human T cell lines and peripheral blood T lymphocytes stimulated by phorbol myristate acetate and anti-CD3 antibody. *J Exp Med*, 167(3), 937-953.
63. Stylianou E. ve Saklatvala J. (1998). Interleukin-1. *Int J Biochem Cell Biol*, 30(10), 1075-1079.
64. Chen C. J., Kono H., Golenbock D., Reed G., Akira S. ve Rock K. L. (2007). Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med*, 13(7), 851-856.
65. Eigenbrod T., Park J. H., Harder J., Iwakura Y. ve Nunez G. (2008). Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *J Immunol*, 181(12), 8194-8198.
66. Abbate A., Salloum F. N., Vecile E., Das A., Hoke N. N., Straino S., et al. (2008). Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation*, 117(20), 2670-2683.
67. Woodfin A., Voisin M. B. ve Nourshargh S. (2007). PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(12), 2514-2523.

68. Frangogiannis N. G. (2007). Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost*, 97(5), 738-747.
69. Todorović N. ve Filipović D. (2017). Prefrontal cortical glutathione-dependent defense and proinflammatory mediators in chronically isolated rats: Modulation by fluoxetine or clozapine. *Neuroscience*, 355, 49-60.
70. Rangan U. ve Bulkley G. B. (1993). Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull*, 49(3), 700-718.
71. Urso M. L. ve Clarkson P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2), 41-54.
72. Garnier-Suillerot A., Tosi L. ve Paniago E. (1984). Kinetic and mechanism of vesicle lipoperoxide decomposition by Fe (II). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 794(2), 307-312.
73. Hardwick T. J. (1957). The rate constant of the reaction between ferrous ions and hydrogen peroxide in acid solution. *Canadian Journal of Chemistry*, 35(5), 428-436.
74. Reiter R. J., Acuna-Castroviejo D., Tan D. X. ve Burkhardt S. (2001). Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*, 939, 200-215.
75. Garcia-Villalon A. L., Amezcua Y. M., Monge L., Fernandez N., Salcedo A. ve Dieguez G. (2008). Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol*, 48(2-3), 109-114.
76. Sener G., Sakarcan A. ve Yegen B. C. (2007). Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res*, 51(11), 1345-1352.
77. Heyns C. F. ve Visser A. J. (2006) Testicular torsion. (Schill W.B. CFR, Hargreave T.B., editor). *Almanya: Springer*.
78. Hekimoglu A., Kurcer Z., Aral F., Baba F., Sahna E. ve Atessahin A. (2009). Lycopene, an antioxidant carotenoid, attenuates testicular injury caused by ischemia/reperfusion in rats. *Tohoku J Exp Med*, 218(2), 141-147.
79. Filho D. W., Torres M. A., Bordin A. L., Crezcynski-Pasa T. B. ve Boveris A. (2004). Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med*, 25(1-2), 199-210.
80. Visser A. J. ve Heyns C. F. (2003). Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU International*, 92(3), 200-203.
81. Sun J., Liu G. H., Zhao H. T. ve Shi C. R. (2006). Long-term influence of prepubertal testicular torsion on spermatogenesis. *Urol Int*, 77(3), 275-278.
82. Turner T. T. ve Lysiak J. J. (2008). Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl*, 29(5), 488-498.

83. Cosentino M. J., Nishida M., Rabinowitz R. ve Cockett A. T. (1986). Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. *J Androl*, 7(1), 23-31.
84. Molokwu C. N., Somani B. K. ve Goodman C. M. (2011). Outcomes of scrotal exploration for acute scrotal pain suspicious of testicular torsion: a consecutive case series of 173 patients. *BJU International*, 107(6), 990-993.
85. Ringdahl E. ve Teague L. (2006). Testicular torsion. *Am Fam Physician*, 74(10), 1739-1743.
86. Pentyala S., Lee J., Yalamanchili P., Vitkun S. ve Khan S. A. (2001). Testicular torsion: a review. *J Low Genit Tract Dis*, 5(1), 38-47.
87. Cimador M., DiPace M. R., Castagnetti M. ve DeGrazia E. (2007). Predictors of testicular viability in testicular torsion. *Journal of Pediatric Urology*, 3(5), 387-390.
88. Prando D. (2009). Torsion of the spermatic cord: the main gray-scale and doppler sonographic signs. *Abdom Imaging*, 34(5), 648-661.
89. Kapoor S. (2008). Testicular torsion: a race against time. *Int J Clin Pract*, 62(5), 821-827.
90. Kram H. B., Miyamoto E., Rajfer J., Appel P. L. ve Shoemaker W. C. (1989). Testicular oximetry: a new method for the assessment of tissue perfusion and viability following torsion and detorsion. *J Pediatr Surg*, 24(12), 1297-1302.
91. Bhagra A., Suravaram S. ve Schears R. M. (2008). Testicular torsion-a common surgical emergency. *International Journal of Emergency Medicine*, 1(2), 147.
92. Gao D. J., Xuan X. J., Wang Y. J., Sun B. G. ve Wang J. X. (2009). [Verapamil and hypothermia protect spermatogenesis of torsioned testes in rats]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 15(9), 796-800.
93. Sharma R. K. ve Agarwal A. (2004). Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. *Reprod Med Biol*, 3(4), 177-199.
94. Erol B., Bozlu M., Hanci V., Tokgoz H., Bektas S. ve Mungan G. (2010). Coenzyme Q10 treatment reduces lipid peroxidation, inducible and endothelial nitric oxide synthases, and germ cell-specific apoptosis in a rat model of testicular ischemia/reperfusion injury. *Fertil Steril*, 93(1), 280-282.
95. Ozturk H., Ozturk H., Gideroglu K., Terzi H. ve Bugdayci G. (2010). Montelukast protects against testes ischemia/reperfusion injury in rats. *Can Urol Assoc J*, 4(3), 174-179.
96. Yang S., Shih H. J., Chow Y. C., Wang T. Y., Tsai P. S. ve Huang C. J. (2010). Simvastatin attenuates testicular injury induced by torsion-detorsion. *J Urol*, 184(2), 750-756.

97. Beheshtian A., Salmasi A. H., Payabvash S., Kiumehr S., Ghazinezami B., Rahimpour S., et al. (2008). Protective effects of sildenafil administration on testicular torsion/detorsion damage in rats. *World J Urol*, 26(2), 197-202.
98. Ustun H., Akgul K. T., Ayyildiz A., Yagmurdu H., Nuhoglu B., Karaguzel E., et al. (2008). Effect of phosphodiesterase 5 inhibitors on apoptosis and nitric oxide synthases in testis torsion: an experimental study. *Pediatr Surg Int*, 24(2), 205-211.
99. Zhao Y. G., Zheng X. M., Zhou J., Zhang X. J., Men X. W., Chen B., et al. (2006). [Changes of nuclear factor-kappa gene binding expression in and apoptosis of spermatogenic epithelial cells in the restored testis after torsion: experiment with rats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 86(20), 1381-1385.
100. Antonuccio P., Minutoli L., Romeo C., Nicotina P. A., Bitto A., Arena S., et al. (2006). Lipid peroxidation activates mitogen-activated protein kinases in testicular ischemia-reperfusion injury. *J Urol*, 176(4 Pt 1), 1666-1672.
101. Turan C., Kucukaydin N., Bekerecioglu A., Kazez A., Dogan P. ve Kucukaydin M. (1996). The effect of vitamin E on ipsilateral and contralateral testis following unilateral testicular torsion in rats. *Res Exp Med (Berl)*, 196(4), 243-246.
102. Akgul T., Karaguzel E., Surer H., Yagmurdu H., Ayyildiz A., Ustun H., et al. (2009). Ginkgo biloba (EGB 761) affects apoptosis and nitric-oxide synthases in testicular torsion: an experimental study. *Int Urol Nephrol*, 41(3), 531-536.
103. Dokmeci D. (2005). Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia Med (Plovdiv)*, 47(1), 26-30.
104. Dokmeci D., Kanter M., Inan M., Aydogdu N., Basaran U. N., Yalcin O., et al. (2007). Protective effects of ibuprofen on testicular torsion/detorsion-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Toxicol*, 81(9), 655-663.
105. Guan Y., Zheng X. M., Yang Z. W. ve Li S. W. (2006). [Apoptosis of epididymal epithelium and the content of epididymal carnitine following testicular torsion/detorsion in rats]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 12(7), 636-638.
106. Gurocak S., Yilmaz A., Alp E., Ure I., Sozen S., Menevse S., et al. (2011). Inflammation and oxidative stress in testicular torsion: do they deserve intensive treatment to save both guilty and innocent testes? *Urology*, 78(1), 164-169.
107. Aktas B. K., Bulut S., Bulut S., Baykam M. M., Ozden C., Senes M., et al. (2010). The effects of N-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Pediatr Surg Int*, 26(3), 293-298.
108. Cay A., Alver A., Kucuk M., Isik O., Eminagaoglu M. S., Karahan S. C., et al. (2006). The effects of N-acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *J Surg Res*, 131(2), 199-203.

109. Guimaraes S. B., Santos J. M., Aragao A. A., de Sandes Kimura O., Barbosa P. H. ve de Vasconcelos P. R. (2007). Protective effect of alpha-lipoic acid in experimental spermatic cord torsion. *Nutrition*, 23(1), 76-80.
110. Savas C., Dindar H., Aras T. ve Yucesan S. (2002). Pentoxifylline improves blood flow to both testes in testicular torsion. *Int Urol Nephrol*, 33(1), 81-85.
111. Yazawa H., Sasagawa I., Suzuki Y. ve Nakada T. (2001). Glucocorticoid hormone can suppress apoptosis of rat testicular germ cells induced by testicular ischemia. *Fertil Steril*, 75(5), 980-985.
112. Yapanoglu T., Aksoy Y., Gursan N., Ozbey I., Ziypak T. ve Calik M. (2008). Antiapoptotic effects of dehydroepiandrosterone on testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia*, 40(1), 38-43.
113. Aksoy H., Yapanoglu T., Aksoy Y., Ozbey I., Turhan H. ve Gursan N. (2007). Dehydroepiandrosterone treatment attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion in rats. *J Pediatr Surg*, 42(10), 1740-1744.
114. Mogilner J. G., Lurie M., Coran A. G., Nativ O., Shiloni E. ve Sukhotnik I. (2006). Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. *Pediatr Surg Int*, 22(1), 99-105.
115. Melli M. ve Kayaalp S. O. (2009) Non-Steroidial Antiinflamatuvar İlaçlar. (Kayaalp SO, editor). Ankara, Turkey: Pelikan Publishing.
116. Cullen L., Kelly L., Connor S. O. ve Fitzgerald D. J. (1998). Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. *J Pharmacol Exp Ther*, 287(2), 578-582.
117. Suleyman H., Demircan B. ve Karagoz Y. (2007). Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep*, 59(3), 247-258.
118. Nakatsugi S., Terada N., Yoshimura T., Horie Y. ve Furukawa M. (1996). Effects of nimesulide, a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor, on carrageenan-induced pleurisy and stress-induced gastric lesions in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 55(6), 395-402.
119. Verhoeven A. J., Tool A. T., Kuijpers T. W. ve Roos D. (1993). Nimesulide inhibits platelet-activating factor synthesis in activated human neutrophils. *Drugs*, 46 Suppl 1, 52-58.
120. Gomez-Gavira M. V., Gonzalez-Alvaro I., Dominguez-Jimenez C., Peschon J., Black R. A., Sanchez-Madrid F., et al. (2002). Structure-function relationship and role of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in the down-regulation of L-selectin by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, 277(41), 38212-38221.
121. Famaey J. P. (1997). In vitro and in vivo pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide: an overview. *Inflamm Res*, 46(11), 437-446.

122. Wallace J. L., Chapman K. ve McKnight W. (1999). Limited anti-inflammatory efficacy of cyclo-oxygenase-2 inhibition in carrageenan-airpouch inflammation. *Br J Pharmacol*, 126(5), 1200-1204.
123. Ferreira S. H. (2002). Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. *Int J Clin Pract Suppl*, (128), 2-10.
124. Chandra J. ve Bhatnagar S. K. (2002). Antipyretics in children. *Indian J Pediatr*, 69(1), 69-74.
125. Kataoka H., Horie Y., Koyama R., Nakatsugi S. ve Furukawa M. (2000). Interaction between NSAIDs and steroid in rat stomach: safety of nimesulide as a preferential COX-2 inhibitor in the stomach. *Dig Dis Sci*, 45(7), 1366-1375.
126. Bianco S., Robuschi M., Petrigni G., Scuri M., Pieroni M. G., Refini R. M., et al. (1993). Efficacy and tolerability of nimesulide in asthmatic patients intolerant to aspirin. *Drugs*, 46 Suppl 1, 115-120.
127. Wober W. (1999). Comparative efficacy and safety of nimesulide and diclofenac in patients with acute shoulder, and a meta-analysis of controlled studies with nimesulide. *Rheumatology (Oxford)*, 38 Suppl 1, 33-38.
128. Bjarnason I. ve Thjodleifsson B. (1999). Gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: the effect of nimesulide compared with naproxen on the human gastrointestinal tract. *Rheumatology (Oxford)*, 38 Suppl 1, 24-32.
129. Teixeira L. H. P., Fraga C. A. M. ve Barreiro E. J. (1998). Synthesis of new 1, 2-benzothiazin-3-one derivatives designed as dual cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibitors. *J Braz Chem Soc*, 9(2), 119-130.
130. Fabiola G. F., Patabhi V. ve Nagarajan K. (1998). Structural basis for selective inhibition of COX-2 by nimesulide. *Bioorg Med Chem*, 6(12), 2337-2344.
131. Demiryilmaz I., Turan M. I., Kisaoglu A., Gulapoglu M., Yilmaz I. ve Suleyman H. (2014). Protective effect of nimesulide against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: effects on oxidant/antioxidants, DNA mutation and COX-1/COX-2 levels. *Pharmacol Rep*, 66(4), 647-652.
132. Candelario-Jalil E. (2008). Nimesulide as a promising neuroprotectant in brain ischemia: new experimental evidences. *Pharmacol Res*, 57(4), 266-273.
133. Ohkawa H., Ohishi N. ve Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2), 351-358.
134. Sedlak J. ve Lindsay R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 25(1), 192-205.

135. Caraceni P., Rosenblum E. R., Van Thiel D. H. ve Borle A. B. (1994). Reoxygenation injury in isolated rat hepatocytes: relation to oxygen free radicals and lipid peroxidation. *Am J Physiol*, 266(5 Pt 1), G799-806.
136. Okur M. H., Arslan S., Aydogdu B., Zeytun H., Basuguy E., Arslan M. S., et al. (2017). Protective Effect of Cordycepin on Experimental Testicular Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *J Invest Surg*, 1-8.
137. Sekerci C. A., Tanidir Y., Sener T. E., Sener G., Cevik O., Yarat A., et al. (2017). Effects of platelet-rich plasma against experimental ischemia/reperfusion injury in rat testis. *J Pediatr Urol*.
138. Mertoglu C., Senel U., Cayli S., Tas U., Kusku Kiraz Z. ve Ozyurt H. (2016). Protective role of methylprednisolone and heparin in ischaemic-reperfusion injury of the rat testicle. *Andrologia*, 48(7), 737-744.
139. Kisaoglu A., Borekci B., Yapca O. E., Bilen H. ve Suleyman H. (2013). Tissue damage and oxidant/antioxidant balance. *Eurasian J Med*, 45(1), 47-49.
140. Clarkson P. M. ve Thompson H. S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*, 72(2 Suppl), 637s-646s.
141. Yildiz H., Durmus A. S., Simsek H. ve Yaman M. (2012). Dose-dependent protective effect of sildenafil citrate on testicular injury after torsion/detorsion in rats. *Andrologia*, 44 Suppl 1, 300-306.
142. Ahmed A. I. ve Lasheen N. N. (2016). Ginkgo Biloba Ameliorates Subfertility Induced by Testicular Ischemia/Reperfusion Injury in Adult Wistar Rats: A Possible New Mitochondrial Mechanism. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 6959274.
143. Guzel M., Sonmez M. F., Bastug O., Aras N. F., Ozturk A. B., Kucukaydin M., et al. (2016). Effectiveness of lycopene on experimental testicular torsion. *J Pediatr Surg*, 51(7), 1187-1191.
144. Niranjana R., Rajasekar N., Nath C. ve Shukla R. (2012). The effect of guggulipid and nimesulide on MPTP-induced mediators of neuroinflammation in rat astrocytoma cells, C6. *Chem Biol Interact*, 200(2-3), 73-83.
145. Niranjana R., Nath C. ve Shukla R. (2011). Guggulipid and nimesulide differentially regulated inflammatory genes mRNA expressions via inhibition of NF- κ B and CHOP activation in LPS-stimulated rat astrocytoma cells, C6. *Cell Mol Neurobiol*, 31(5), 755-764.
146. Turner T. T. (1985). Acute experimental testicular torsion. No effect on the contralateral testis. *J Androl*, 6(1), 65-72.
147. Minutoli L., Antonuccio P., Romeo C., Nicotina P. A., Bitto A., Arena S., et al. (2005). Evidence for a role of mitogen-activated protein kinase 3/mitogen-activated protein kinase in the development of testicular ischemia-reperfusion injury. *Biol Reprod*, 73(4), 730-736.

148. Llorente I. L., Pérez-Rodríguez D., Burgin T. C., Gonzalo-Orden J. M., Martínez-Villayandre B. ve Fernández-López A. (2013). Age and meloxicam modify the response of the glutamate vesicular transporters (VGLUTs) after transient global cerebral ischemia in the rat brain. *Brain Res Bull*, 94, 90-97.
149. Clària J. (2003). Cyclooxygenase-2 biology. *Current Pharmaceutical Design*, 9(27), 2177-2190.
150. Madrigal I. L., López H. S. ve Alcalá F. C. (2002). Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2: Usos potenciales en perros Cyclooxygenase-2 selective inhibitors: Potential usage in dogs. *Veterinaria México (México)*, 33(3), 285.
151. Sibert L., Lacarriere E., Safsaf A. ve Rives N. (2014). [Aging of the human testis]. *Presse Med*, 43(2), 171-177.
152. Tuglu D., Yuvanc E., Yilmaz E., Gencay I. Y., Atasoy P., Kisa U., et al. (2015). The antioxidant effect of dexmedetomidine on testicular ischemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras*, 30(6), 414-421.
153. Chi K. K., Zhang W. H., Chen Z., Cui Y., He W., Wang S. G., et al. (2016). Comparison of quercetin and resveratrol in the prevention of injury due to testicular torsion/detorsion in rats. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 908-912.
154. Aldemir M., Ozgun G., Onen E., Okulu E. ve Kayigil O. (2012). Quercetin has a protective role on histopathological findings on testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. *Andrologia*, 44 Suppl 1, 479-483.
155. Şahin B. Ç. (2008). Ketaminin Testiküler İskemi Reperfüzyon Hasarındaki Etkisi. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

Araştırmacı, 1992 yılında Erzincan'da doğmuştur. İlköğretim ve lise eğitimini Erzincan'da tamamlamıştır. 2010 yılında Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde lisans eğitime başlamıştır. Lisans eğitimini 2015 yılında tamamlayan araştırmacı, 2016 yılında Erzincan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbı Farmakoloji A.B.D.'de yüksek lisans eğitime başlamış, 2017 yılında Erzincan Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne araştırma görevlisi olarak atanmıştır.

