



**T.C  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

# **DENEYSEL TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON MODELİNDE NİMODİPİN'İN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Arş. Gör. Dr. Ebru KANAK**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Yurdun KUYUCU**

**ADANA-2024**



**T.C**  
**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ**  
**ANABİLİM DALI**

# **DENEYSEL TESTİKÜLER TORSİYON/DETORSİYON MODELİNDE NİMODİPİN'İN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Arş. Gör. Dr. Ebru KANAK**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Yurdun KUYUCU**

Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TTU-2022-14944  
No'lu proje ile desteklenmiştir.

**ADANA-2024**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve tamamlanması sırasında her konuda desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen, eğitimim boyunca rehberliği ve değerli önerileriyle her daim yanımda olan ve beraber çalışmaktan çok mutlu olduğum tez danışmanım Doç. Dr. Yurdun Kuyucu'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimi aldığım süre boyunca bilgi ve değerli katkılarını benimle paylaşan, yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sait Polat'a teşekkürü borç bilirim.

Uzmanlık eğitim süresince kendilerinden çok şey öğrendiğim, değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan ve bana çok şey kazandıran Sayın Hocalarım Prof. Dr. Ufuk Özgü Mete'ye, Prof. Dr. Özgül Tap'a ve Doç. Dr. Leman Sencar'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimimde ve tezimin tamamlanmasında bilgi ve değerli katkılarını içtenlikle benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Gülfidan Coşkun'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam sırasında her aşamada yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Dilek Şaker'e, Gizem Kaya'ya ve asistanlık sürecinde desteklerini benden esirgemeyen, hep yanımda olan ve bir aile gibi hissettiğim güleryüzlü çalışma arkadaşlarıma, canım dostlarıma ve değerli personellerimize çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca daima benim yanımda olan, bugünlere gelebilmem için elinden geleni yapan, her zaman sevgisini ve desteğini yanı başımda hissettiğim, canımın içi annem Emine Kanak'a, her daim yanımda olan, beni seven ve destekleyen bir tanecik kardeşlerim Elif Kanak'a ve Ezgi Kanak'a içtenlikle teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No:

|                                                                          |      |
|--------------------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR .....                                                           | i    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                        | ii   |
| TABLolar LİSTESİ .....                                                   | v    |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                   | vi   |
| KISALTMALAR LİSTESİ.....                                                 | viii |
| ÖZET .....                                                               | x    |
| ABSTRACT.....                                                            | xi   |
| 1. GİRİŞ .....                                                           | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                   | 3    |
| 2.1. Testis Anatomisi .....                                              | 3    |
| 2.2. Testis Histolojisi .....                                            | 6    |
| 2.2.1. Seminiferöz Tübül.....                                            | 8    |
| 2.2.2. Sertoli Hücresi.....                                              | 9    |
| 2.2.3. Kan Testis Bariyeri .....                                         | 12   |
| 2.2.4. Spermatojenik Hücreler .....                                      | 13   |
| 2.2.4.1. Spermatogonyumlar .....                                         | 13   |
| 2.2.4.2. Spermatozitler.....                                             | 14   |
| 2.2.4.3. Spermatidler .....                                              | 14   |
| 2.2.4.4 Spermatoozon.....                                                | 17   |
| 2.2.5. Seminiferöz Epitel Siklusu ve Seminiferöz Epitelin Dalgaları..... | 18   |
| 2.2.6. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücreleri.....                        | 19   |
| 2.3. Testis Embriyolojisi .....                                          | 20   |
| 2.4. Testis Torsiyonu.....                                               | 22   |
| 2.5. İskemi ve Reperfüzyon Hasarı .....                                  | 24   |
| 2.5.1. Reaktif Oksijen Radikalleri.....                                  | 25   |
| 2.5.2. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit .....                      | 27   |
| 2.5.3. Polimorfonükleer Lökositler ve Endotel Hücresi .....              | 28   |
| 2.5.4. Kalsiyum ve Apoptoz .....                                         | 29   |
| 2.5.5. Sitokinler .....                                                  | 31   |



|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.6. Nimodipin .....                                                                              | 32        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>                                                                    | <b>35</b> |
| 3.1. Deney Düzenegi .....                                                                         | 35        |
| 3.2. Işık Mikroskopik Doku Hazırlama Yöntemi.....                                                 | 36        |
| 3.3. Johnsen Tübüler Biyopsi Skorlaması.....                                                      | 37        |
| 3.4. İmmünohistokimyasal İnceleme Yöntemleri .....                                                | 38        |
| 3.4.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi.....                                                  | 39        |
| 3.5. Elektron Mikroskopi Doku Hazırlama Yöntemi.....                                              | 39        |
| 3.6. Biyokimyasal Analizlerin Yapılışı.....                                                       | 41        |
| 3.7. İstatistiksel Analiz.....                                                                    | 41        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                                           | <b>42</b> |
| 4.1. Işık Mikroskopik Bulgular .....                                                              | 42        |
| 4.1.1. Grup 1: Sham Grubu .....                                                                   | 42        |
| 4.1.2. Grup 2: Testis Torsiyon Grubu (TT).....                                                    | 44        |
| 4.1.3. Grup 3: Testis Torsiyon/Detorsiyon Grubu (TT/D).....                                       | 50        |
| 4.1.4. Grup 4: Testis Torsiyonu ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan Grup<br>(TT/N) .....              | 55        |
| 4.1.5. Grup 5: Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan<br>Grup (TT/D/N) .....  | 58        |
| 4.2. Johnsen Tübüler Biyopsi Skoru (JTBS).....                                                    | 61        |
| 4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular .....                                                           | 63        |
| 4.3.1. Kaspaz-3 İmmünreaktivitesi .....                                                           | 63        |
| 4.3.1.1. Grup 1: Sham Grubu .....                                                                 | 63        |
| 4.3.1.2. Grup 2: Testis Torsiyon Grubu (TT).....                                                  | 64        |
| 4.3.1.3. Grup 3: Testis Torsiyon/Detorsiyon Grubu (T/D) .....                                     | 65        |
| 4.3.1.4. Grup 4: Testis Torsiyonu ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan<br>Grup (TT/N) .....            | 66        |
| 4.3.1.5. Grup 5: Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin Tedavisi<br>Uygulanan Grup (TT/D/N)..... | 67        |
| 4.3.2. TNF- $\alpha$ İmmünoreaktivitesi .....                                                     | 68        |
| 4.3.2.1. Grup 1: Sham Grubu .....                                                                 | 68        |
| 4.3.2.2. Grup 2: Testis Torsiyon Grubu (TT).....                                                  | 69        |

|                                                                                                   |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.2.3. Grup 3: Testis Torsiyon/Detorsiyon Grubu (TT/D) .....                                    | 70         |
| 4.3.2.4. Grup 4: Testis Torsiyonu ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan<br>Grup (TT/N) .....            | 71         |
| 4.3.2.5. Grup 5: Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin Tedavisi<br>Uygulanan Grup (TT/D/N)..... | 72         |
| 4.3.3. İmmünohistokimyasal Skolama.....                                                           | 73         |
| 4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular .....                                                          | 75         |
| 4.4.1. Grup 1: Sham Grubu .....                                                                   | 75         |
| 4.4.2. Grup 2: Testis Torsiyon Grubu (TT).....                                                    | 81         |
| 4.4.3. Grup 3: Testis Torsiyon/Detorsiyon Grubu (TT/D).....                                       | 87         |
| 4.4.4. Grup 4: Testis Torsiyonu ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan Grup<br>(TT/N).....               | 94         |
| 4.4.5. Grup 5: Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan<br>Grup (TT/D/N).....   | 98         |
| 4.5. Biyokimyasal Bulgular.....                                                                   | 102        |
| 4.5.1. Süperoksit Dismutaz ve Malondialdehit Bulguları.....                                       | 102        |
| 4.5.2. Testosteron Bulguları.....                                                                 | 104        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                                                           | <b>106</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                                                                  | <b>117</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                                            | <b>119</b> |

## TABLÖLER LİSTESİ

**Tablo No:**

**Sayfa No:**

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tablo 1.</b> Işık mikroskopik doku takip yöntemi .....            | 37  |
| <b>Tablo 2.</b> Johnsen Tübüler Biyopsi Skoru .....                  | 37  |
| <b>Tablo 3.</b> Elektron mikroskopik doku takip yöntemi.....         | 40  |
| <b>Tablo 4.</b> Gömme materyalinin hazırlanışı .....                 | 40  |
| <b>Tablo 5.</b> Johnsen Tübüler Biyopsi Skoru (JTBS).....            | 62  |
| <b>Tablo 6.</b> Serum MDA konsantrasyonları ve SOD aktiviteleri..... | 103 |
| <b>Tablo 7.</b> Serum Testosteron konsantrasyonları .....            | 105 |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

| <u>Şekil No:</u>                                                                                              | <u>Sayfa No:</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Şekil 1. Erkek genital sistem anatomisi.....                                                                  | 4                |
| Şekil 2. Testisin yapısı .....                                                                                | 5                |
| Şekil 3. Testisin kanlanması.....                                                                             | 6                |
| Şekil 4. Testisin sagittal kesiti.....                                                                        | 7                |
| Şekil 5. Testisin histolojik görünümü. H&E .....                                                              | 9                |
| Şekil 6. Spermatogenik seri hücrelerinin gösterimi.....                                                       | 17               |
| Şekil 7. Bir insan spermatozoonunun şematik gösterimi.....                                                    | 18               |
| Şekil 8. Testis Torsiyonu Tipleri.....                                                                        | 24               |
| Şekil 9. Nimodipinin biyokimyasal yapısı. ....                                                                | 33               |
| Şekil 10. Torsiyon uygulanmış testis görünümü .....                                                           | 36               |
| Şekil 11. Detorsiyon uygulanmış testis görünümü. ....                                                         | 36               |
| Şekil 12. Sham grubu ışık mikroskopik görünümü .....                                                          | 43               |
| Şekil 13. Testis Torsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü .....                                               | 45               |
| Şekil 14. Testis Torsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü. ....                                               | 46               |
| Şekil 15. Testis Torsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü .....                                               | 47               |
| Şekil 16. Testis Torsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü .....                                               | 48               |
| Şekil 17. Testis Torsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü .....                                               | 49               |
| Şekil 18. Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü.....                                     | 51               |
| Şekil 19. Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü.....                                     | 52               |
| Şekil 20. Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü.....                                     | 53               |
| Şekil 21. Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü.....                                     | 54               |
| Şekil 22. Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup ışık mikroskopik görünümü.....                | 56               |
| Şekil 23. Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup ışık mikroskopik görünümü.....                | 57               |
| Şekil 24. Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup ışık mikroskopik<br>görünümü .....  | 59               |
| Şekil 25. Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup ışık mikroskopik<br>görünümü .....  | 60               |
| Şekil 26. Johnsen Tübüler Biyopsi Skoru .....                                                                 | 62               |
| Şekil 27. Sham grubu, kaspaz-3 immünreaktivitesi. ....                                                        | 63               |
| Şekil 28. Testis Torsiyon grubu, kaspaz-3 immünreaktivitesi .....                                             | 64               |
| Şekil 29. Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu, kaspaz-3 immünreaktivitesi.....                                   | 65               |
| Şekil 30. Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup, kaspaz-3 immünreaktivitesi.....              | 66               |
| Şekil 31. Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup, kaspaz-3<br>immünreaktivitesi..... | 67               |
| Şekil 32. Sham grubu, TNF- $\alpha$ immünreaktivitesi .....                                                   | 68               |

|                                                                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 33.</b> Testis Torsiyon grubu, TNF- $\alpha$ immünreaktivitesi.....                                                                 | 69  |
| <b>Şekil 34.</b> Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu, TNF- $\alpha$ immünreaktivitesi.....                                                      | 70  |
| <b>Şekil 35.</b> Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup, TNF- $\alpha$ immünreaktivitesi.....                                 | 71  |
| <b>Şekil 36.</b> Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup, TNF- $\alpha$ immünreaktivitesi.....                       | 72  |
| <b>Şekil 37.</b> Deney gruplarının testis doku kesitlerinde kaspaz-3 immünreaktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....      | 74  |
| <b>Şekil 38.</b> Deney gruplarının testis doku kesitlerinde TNF- $\alpha$ immünreaktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi..... | 74  |
| <b>Şekil 39.</b> Sham grubu elektronmikrografi .....                                                                                         | 76  |
| <b>Şekil 40.</b> Sham grubu elektronmikrografi .....                                                                                         | 77  |
| <b>Şekil 41.</b> Sham grubu elektronmikrografi .....                                                                                         | 78  |
| <b>Şekil 42.</b> Sham grubu elektronmikrografi .....                                                                                         | 79  |
| <b>Şekil 43.</b> Sham grubu elektronmikrografi .....                                                                                         | 80  |
| <b>Şekil 44.</b> Testis Torsiyon grubu elektronmikrografi .....                                                                              | 82  |
| <b>Şekil 45.</b> Testis Torsiyon grubu elektronmikrografi .....                                                                              | 83  |
| <b>Şekil 46.</b> Testis Torsiyon grubu elektronmikrografi .....                                                                              | 84  |
| <b>Şekil 47.</b> Testis Torsiyon grubu elektronmikrografi .....                                                                              | 85  |
| <b>Şekil 48.</b> Testis Torsiyon grubu elektronmikrografi .....                                                                              | 86  |
| <b>Şekil 49.</b> Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu elektronmikrografi .....                                                                   | 88  |
| <b>Şekil 50.</b> Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu elektronmikrografi .....                                                                   | 89  |
| <b>Şekil 51.</b> Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu elektronmikrografi .....                                                                   | 90  |
| <b>Şekil 52.</b> Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu elektronmikrografi .....                                                                   | 91  |
| <b>Şekil 53.</b> Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu elektronmikrografi .....                                                                   | 92  |
| <b>Şekil 54.</b> Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu elektronmikrografi .....                                                                   | 93  |
| <b>Şekil 55.</b> Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup elektronmikrografi.....                                               | 95  |
| <b>Şekil 56.</b> Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup elektronmikrografi.....                                               | 96  |
| <b>Şekil 57.</b> Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup elektronmikrografi.....                                               | 97  |
| <b>Şekil 58.</b> Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup elektronmikrografi.....                                     | 99  |
| <b>Şekil 59.</b> Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup elektronmikrografi.....                                     | 100 |
| <b>Şekil 60.</b> Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup elektronmikrografi.....                                     | 101 |
| <b>Şekil 61.</b> Serum MDA konsantrasyonları ve SOD aktivitelerinin istatistiksel değerlendirilmesi. ....                                    | 103 |
| <b>Şekil 62.</b> Serum Testosteron konsantrasyonlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....                                          | 105 |

## KISALTMALAR LİSTESİ

|                                   |                                                                |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>ABP</b>                        | : Androjen Bağlayıcı Protein                                   |
| <b>Ad</b>                         | : Tip A Koyu Spermatogonyum                                    |
| <b>Ap</b>                         | : Tip A Açık Spermatogonyum                                    |
| <b>AMH</b>                        | : Anti-Müllerian Hormon                                        |
| <b>ATP</b>                        | : Adenozin Trifosfat                                           |
| <b>Ca<sup>+2</sup></b>            | : Kalsiyum                                                     |
| <b>Ca<sup>+2</sup> ATPaz</b>      | : Kalsiyum Adenozin Trifosfataz                                |
| <b>CAD</b>                        | : Kaspaz-3 Tarafından Aktive Edilmiş DNaz                      |
| <b>C3a, C5a</b>                   | : Kompleman Faktörleri                                         |
| <b>CYP</b>                        | : Sitokrom P450                                                |
| <b>DAMP</b>                       | : Hasar ile İlişkili Molekül                                   |
| <b>DNaz</b>                       | : Deoksiribonükleaz                                            |
| <b>e<sup>-</sup></b>              | : Elektron                                                     |
| <b>FSH</b>                        | : Folikül Uyarıcı Hormon                                       |
| <b>FDA</b>                        | : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration) |
| <b>GnRH</b>                       | : Gonadotropin Salgılatıcı Hormon                              |
| <b>GER</b>                        | : Granüler Endoplazmik Retikülüm                               |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : Hidrojen Peroksit                                            |
| <b>HCl</b>                        | : Hidroklorik Asit                                             |
| <b>H&amp;E</b>                    | : Hematoksilen & Eozin                                         |
| <b>ICAM-1 ve 2</b>                | : Hücreler Arası Adezyon Molekülü 1 ve 2                       |
| <b>Ig</b>                         | : İmmünglobulin                                                |
| <b>IL-1</b>                       | : İnterlökin-1                                                 |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>     | : İnterlökin-1 beta                                            |
| <b>IL-6</b>                       | : İnterlökin-6                                                 |
| <b>İ/R</b>                        | : İskemi/Reperfüzyon                                           |
| <b>CAT</b>                        | : Katalaz                                                      |
| <b>LFA-1</b>                      | : Lenfosit Fonksiyon Antijen-1                                 |
| <b>LH</b>                         | : Lüteinizan Hormon                                            |
| <b>LTCC, Cav.1</b>                | : L Tipi Kalsiyum Kanalı                                       |
| <b>MAC-1</b>                      | : Makrofaj Antijen-1                                           |

|                                  |                                                                                                              |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>MDA</b>                       | : Malondialdehit                                                                                             |
| <b>MMP-8 ve 9</b>                | : Matriks Metalloproteinaz 8 ve 9                                                                            |
| <b>MPTP</b>                      | : Mitokondriyal Geçirgenlik Geçiş Gözeneği                                                                   |
| <b>NADPH</b>                     | : Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat                                                                      |
| <b>Na/K ATPaz</b>                | : Sodyum/Potasyum Adenozin Trifosfataz                                                                       |
| <b>NMD</b>                       | : Nimodipin                                                                                                  |
| <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> | : Süperoksit Radikali                                                                                        |
| <b>OH<sup>-</sup></b>            | : Hidroksil Radikali                                                                                         |
| <b>ONOO<sup>-</sup></b>          | : Peroksinitrit                                                                                              |
| <b>PAF</b>                       | : Trombosit Aktive Edici Faktör                                                                              |
| <b>PAS</b>                       | : Periyodik Asit-Schiff                                                                                      |
| <b>PECAM-1</b>                   | : Trombosit Endotel Hücresi Adhezyon Molekülü-1                                                              |
| <b>PMNL</b>                      | : Polimorfonükleer Lökositler                                                                                |
| <b>PSGL-1</b>                    | : P-Selektin Glikoprotein-1                                                                                  |
| <b>SAK</b>                       | : Subaraknoid Kanama                                                                                         |
| <b>SER</b>                       | : Agranüler Endoplazmik Retikülüm                                                                            |
| <b>SOD</b>                       | : Süperoksit Dismutaz                                                                                        |
| <b>SRY</b>                       | : Y kromozomu kısa kolu üzerinde bulunan cinsiyet belirleyici bölge<br>(Sex-determining Region on Y protein) |
| <b>ROS</b>                       | : Reaktif Oksijen Radikalleri                                                                                |
| <b>TBA</b>                       | : Tiyobarbitürik Asit                                                                                        |
| <b>TDF</b>                       | : Testis Belirleyici Faktör                                                                                  |
| <b>TRAIL</b>                     | : TNF ile ilişkili Apoptozi İndükleyen Ligand                                                                |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>   | : Tümör Nekrozis Faktör- $\alpha$                                                                            |
| <b>TNFR 1 ve 2</b>               | : Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü 1 ve 2                                                                     |
| <b>TT</b>                        | : Testis Torsiyonu                                                                                           |
| <b>TT/D</b>                      | : Testis Torsiyon/Detorsiyonu                                                                                |
| <b>TT/N</b>                      | : Testis Torsiyonu/Nimodipin                                                                                 |
| <b>TT/D/N</b>                    | : Testis Torsiyonu/Detorsiyonu/Nimodipin                                                                     |
| <b>VCAM</b>                      | : Vasküler Sellüler Adezyon Molekülü                                                                         |
| <b>Vit C</b>                     | : Askorbik Asit                                                                                              |
| <b>XOR</b>                       | : Ksantin Oksidoredüktaz                                                                                     |
| <b>4-HNE</b>                     | : 4-Hidroksinonenal                                                                                          |

## ÖZET

### Deneysel Testiküler Torsiyon/Detorsiyon Modelinde Nimodipin'in Etkilerinin İncelenmesi

**Amaç:** Testis torsiyonu (TT), spermatik kord ve içeriğinin kendi etrafında dönmesi sonucu oluşan, akut skrotumun en önemli nedenlerinden birisidir. TT sonrası iskemik hasar, detorsiyon sonrasında ise reperfüzyon hasarı oluşabilmektedir. İskemi ve reperfüzyon (İ/R) hasarını önlemek için birçok çalışma yapılmıştır. Literatürde kalsiyum kanal blokörü olan nimodipinin over ve karaciğerde İ/R hasarı üzerine etkilerini araştıran çalışmalar mevcut olup TT'deki etkilerini ultrastrüktürel düzeyde inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda, nimodipinin deneysel testiküler torsiyon/detorsiyon modelinde tedavi edici olası etkilerinin araştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** 250-300 gr ağırlığında, 40 adet Wistar-Albino türü erkek sıçan, 5 gruba (n=8) ayrıldı; Sham grubu, testis torsiyon grubu (TT), testis torsiyon/detorsiyon grubu (TT/D), testis torsiyon+nimodipin uygulanan grup (TT/N), testis torsiyon/detorsiyon+nimodipin uygulanan grup (TT/D/N). Sakrifikasyondan önce sıçanlardan alınan kan örneklerinde SOD aktivitesi, serum MDA ve testosteron analizleri yapıldı. Elde edilen testis doku örnekleri ışık ve elektron mikroskopik incelemeler için hazırlandı. Ayrıca testis doku kesitlerinde, apoptotik markır olan kaspaz-3 ve inflamasyon markırı olan TNF- $\alpha$  ekspresyonları immünohistokimyasal yöntemlerle araştırıldı.

**Bulgular:** Işık mikroskopik olarak TT ve TT/D gruplarında tunika albuginea da kalınlaşma, seminiferöz tübüllerde dejeneratif, litik ve apoptotik değişiklikler, interstisyel alanda ödem ve kanama izlendi. Elektron mikroskopik düzeyde, TT ve TT/D gruplarında bazal lamina ile membrana propria da kalınlaşma ve düzensizlik, seminiferöz tübül epitelinde bazal laminadan ayrılma, hücreler arası mesafede genişleme ve apoptotik cisimcikler, Sertoli hücrelerinde dejeneratif değişiklikler, okludens tipi bağlantıların yapısında bozulma, mitokondriyonlarda ve endoplazmik retikülüm sisternalarında genişleme, lipid damlacıklarında ve lizozom sayısında artış olduğu gözlemlendi. Spermatojenik seri hücrelerinde de mitokondriyonlarında ve endoplazmik retikülüm sisternalarında genişleme görüldü. İnterstisyel alanda ekstrasvasküler eritrosit varlığı, hücrelerarası alanlarda genişleme, Leydig hücre yapısında dejeneratif değişiklikler izlendi. T/D grubunda daha fazla olmak üzere inflamatuvar hücre artışı dikkati çekti. Nimodipin tedavisi uygulanan gruplarda (TT/N ve TT/D/N) ise, ışık ve elektron mikroskopik düzeyde nispeten normale yakın bir morfoloji gözlemlendi. TT ve TT/D gruplarında, kaspaz-3 ve TNF- $\alpha$  immünreaktivitelerinde artış, TT/N ve TT/D/N gruplarında ise azalma gözlemlendi. TT ve TT/D gruplarında serum MDA konsantrasyonlarında artış, SOD aktiviteleri ve serum testosteron konsantrasyonlarında azalma görüldü. TT/N ve TT/D/N gruplarında ise SOD aktiviteleri ve serum testosteron seviyelerinde hasar grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artma gözlenirken, serum MDA konsantrasyonlarında azalma görüldü.

**Sonuç:** Bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde; TT ve TT/D gruplarında meydana gelen yapısal değişiklikler ve biyokimyasal bozulmalar üzerine nimodipin tedavisinin iyileştirici etkiler gösterdiği ve testis İ/R hasarında alternatif tedavi ajanı olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı. Ancak bu tedavinin moleküler mekanizmaları ile ilgili daha fazla bilgi edinmek, doz ve süre düzenlemeleri yapılabilmesi için daha fazla deneysel ve klinik çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Testiküler torsiyon/detorsiyon, nimodipin, kalsiyum kanal blokörü.



## ABSTRACT

### Investigation the Effects of Nimodipine on Experimental Testicular Torsion/Detorsion Model

**Introduction:** Testicular torsion (TT) is one of the most significant causes of acute scrotum, occurring as a result of twisting the spermatic cord and its contents around themselves. Following TT ischemic injury, and after detorsion reperfusion injury may occur. Numerous studies have been conducted to prevent ischemia and reperfusion (I/R) injury. In the literature, there are studies investigating the effects of nimodipine, a calcium channel blocker, on I/R injury in the ovaries and liver, but no study has been found examining its effects on TT at the ultrastructural level. In our study, investigation the potential therapeutic effects of nimodipine on experimental testicular torsion/detorsion model was aimed.

**Materials and Methods:** Forty male Wistar-Albino rats, weighing 250-300 grams, were divided into 5 groups (n=8); the Sham group, testicular torsion group (TT), testicular torsion/detorsion group (TT/D), testicular torsion + nimodipine group (TT/N), and testicular torsion/detorsion + nimodipine group (TT/D/N). In blood samples collected from the rats before sacrifice SOD activity, serum MDA, and testosterone analyses were performed. The obtained testicular tissue samples were prepared for light and electron microscopic examinations. Additionally, the expressions of caspase-3 as an apoptotic marker, and TNF- $\alpha$  as an inflammation marker, were investigated in testicular tissue sections using immunohistochemical methods.

**Results:** Under light microscopy, in the TT and TT/D groups thickening in the tunica albuginea, degenerative, lytic, and apoptotic changes in the seminiferous tubules, edema and hemorrhage in the interstitial area were observed. At the electron microscopic level in the TT and TT/D groups thickening and irregularities in the basal lamina and membrana propria, detachment of the seminiferous tubule epithelium from the basal lamina, widening and the presence of apoptotic bodies in the intercellular spaces, degenerative change in Sertoli cells, disruptions in the structure of occluding junctions, enlargements of mitochondria and endoplasmic reticulum cisternae, and increases in the number of lipid droplets and lysosomes were observed. In spermatogenic series cells, enlargements of mitochondria and endoplasmic reticulum cisternae were also noted. In the interstitial area, the presence of extravascular erythrocytes, widening of intercellular spaces, degenerative changes in the structure of Leydig cells were observed. An increase in inflammatory cells, particularly in the T/D group, was noticeable. In the groups treated with nimodipine (TT/N and TT/D/N), a near normal morphology was observed at both light and electron microscopic levels. Increased caspase-3 and TNF- $\alpha$  immunoreactivities were observed in the TT and TT/D groups, while decreases were noted in the TT/N and TT/D/N groups. The TT and TT/D groups showed increases in serum MDA concentrations and decreases in SOD activity and serum testosterone concentrations. In the TT/N and TT/D/N groups, statistically significant increases in SOD activity and serum testosterone levels were observed compared to the damage groups, along with decreases in serum MDA concentrations.

**Conclusion:** When all the findings are considered together; it was concluded that nimodipine treatment demonstrated therapeutic effects on the structural changes and biochemical impairments observed in the TT and TT/D groups, suggesting that it could be used as an alternative therapeutic agent in testicular I/R injury. However, further experimental and clinical studies are needed to obtain more information about the molecular mechanisms of this treatment and to make dose and duration adjustments.

**Keywords:** Testicular torsion/detorsion, nimodipine, calcium channel blocker.

# 1. GİRİŞ

Testis torsiyonu (TT), inguino-skrotal bölgede ani başlayan kızarıklık, şişlik ve ağrı ile karakterize, yenidoğan ve adölesan dönem başta olmak üzere her yaşta görülebilen önemli ürolojik acillerden birisidir.<sup>1,3</sup> TT'de spermatik kord ve içeriği kendi etrafında dönerek testise giden kan akımının azalmasına ve akut skrotuma neden olur.<sup>2,3</sup> TT'ye yol açan nedenler arasında; travma, testis tümörü, testisin anormal yerleşimi, ergenlik döneminde testis hacmindeki ani artış ve anormal spermatik kord (Bell Clapper deformitesi, testis ile epididimisin ayrılması gibi)<sup>4</sup> yer alır.<sup>5</sup> Yirmi beş yaş altı erkeklerde TT görülme sıklığı 4000 kişide 1 olarak bildirilmiştir.<sup>6</sup> Testis torsiyonu intravajinal ve ekstravajinal olarak iki şekilde görülebilir.<sup>2</sup> Torsiyone olmuş testisin bu durumdan ne kadar etkileneceği torsiyonun süresi ve derecesine bağlıdır. TT'de ilk 4-6 saat çok önemlidir. Tanı konulur konulmaz acil müdahale edilmelidir. Tedavisinde manuel ya da cerrahi olarak torsiyone testis detorsiyone hale getirilmelidir. Detorsiyon işleminin ilk 6 saat içinde yapılmasının testiste oluşabilecek iskemik hasarı azalttığı ve testisin korunması için en kritik zaman olduğu rapor edilmiştir.<sup>7,8</sup> Başarılı bir cerrahi girişime rağmen bu hastaların belli bir kısmında testiküler atrofi ve ilerleyen yıllarda infertilite gelişebilmektedir.<sup>9</sup> Testis torsiyon/detorsiyonunun (TT/D) karmaşık fizyopatolojisinde çok sayıda moleküler mekanizmanın inhibisyonu ve aktivasyonu yer almaktadır.<sup>3,10</sup>

TT sonrası, testiste hücresel hasar iki şekilde oluşmaktadır; birincisi torsiyon sırasındaki iskemik hasar, ikincisi ise detorsiyon sonrasındaki reperfüzyon sonucu oluşan hasardır.<sup>11</sup> Şiddetli ve uzun süren iskemi, organ kaybına kadar ilerleyebilen hücresel hasarı indükler. Reperfüzyon ise kısır bir döngü halinde inflamatuvar mekanizmaları tetikleyerek doku hasarını şiddetlendirir. Bu mekanizmalar arasında reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşumu, lipid peroksidasyonu, apoptoz ve mikrovasküler kan dolaşımındaki değişiklikler yer almaktadır.<sup>6</sup>

İskemi sırasında oksijen yetersizliği ile anaerobik metabolizma etkinlik gösterir ve bu da hücre pH'ında azalmaya yol açar. İskemi ile hücre içi Adenozin Trifosfat (ATP) miktarı düşer. ATP düşüşü ile kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) iyon pompaları bozulur. Kalsiyum pompalarının bozukluğunda ya da iskemiden sonraki reperfüzyon hasarında hücre içine masif  $Ca^{+2}$  akışı ile sitoplazmada yoğun  $Ca^{+2}$  birikimi meydana gelir. Hücre içi  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonundaki değişimler iskemi ve reperfüzyondan (İ/R) sonra ortaya çıkan hücre

hasarının derecesinin belirleyici bir faktördür.<sup>12,13</sup> Bu birikim hücrede geri dönüşü olmayan apoptotik süreçleri başlatır. Bundan dolayı, TT/D araştırmalarının ana odağı, inflamasyon ve oksidatif strese bağlı oluşan sekonder hasarı azaltarak, hücrelerin apoptotik hücre ölümüne karşı korunmasını sağlamak olmaktadır.<sup>14</sup> Literatürde pek çok ajan tedavi amacıyla uygulanmış ve sonuçları yayınlanmıştır.<sup>15-17</sup> Son yıllarda, doğal ürünlerden elde edilen antioksidan bileşikler,<sup>18,19</sup> antioksidan özelliği bulunan kimyasal ajanlar<sup>20,21</sup> ve oluşan hasar mekanizmalarının herhangi bir basamağını engelleyen ilaçlar deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır.<sup>22-24</sup> Bununla birlikte, tedavi protokollerinin etkinliği ve etki mekanizmaları ile ilgili araştırmalar da devam etmektedir. İ/R hasarı sonrası hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarının değişimi, testiküler hasarın engellenmesinde  $Ca^{+2}$  kanal blokörlerinin rolüne dikkatleri çekmektedir.<sup>25,26</sup>

Nimodipin, klinikte subaraknoid kanamalı (SAK) hastalarda serebral vazokonstriksiyonun inhibisyonu amacıyla kullanılmakta olup, dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokörüdür.<sup>27</sup> Bu ilaç ilk olarak hipertansiyon hastalığının tedavisi için piyasaya sürülmüştür. Ancak ilerleyen dönemlerde SAK hastalarındaki kullanımı sonucunda serebral enfarktüs sıklığında azalma ve hastalarda iyileşme görülmüş ve bu hastalıkta etkili tek ilaç olarak yerini almıştır.<sup>28</sup> Literatürde çok sayıda hastalıkta nimodipinin etkinliği için araştırmalar yapılmıştır.<sup>29-31</sup> Bu ilacın vücuttaki diğer organ hasarları ile ilişkili ileri çalışmaları devam etmektedir. Literatürde nimodipinin over ve karaciğerde İ/R hasarı üzerine koruyucu etkileri rapor edilmekle birlikte,<sup>32,33</sup> testiste İ/R hasarında nimodipin uygulanması ile ilgili ultrastrüktürel düzeyde bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Sunulan bu çalışmada, deneysel testiküler torsiyon ve detorsiyon modelinde hücresel hasarın, serbest oksijen radikallerinin oluşumunun ve apoptozin nimodipin tedavisi ile önlenmesi amaçlanmıştır. İlacın etkilerinin ışık ve elektron mikroskopik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi ile elde edilecek sonuçların TT'de cerrahiye ek olarak medikal tedavi protokolünün oluşturulmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Testis Anatomisi

Erkek üreme sistemi; testisler, genital boşaltım kanalları, aksesuar bezler ve penisten oluşur. Testisler spermatogenezisin gerçekleştiği ve bu süreç için gerekli olan androjenlerin salgılandığı organdır. Genital boşaltım kanalları; tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes, epididimis, vaz deferens ve ejakülatuar kanallarından oluşur. Spermatozoonların vücut dışına taşınması genital boşaltım kanalları ile sağlanır. Spermatozoonlar hareket ve fertilizasyon yeteneğini duktus epididimiste kazanırlar. Aksesuar bezler (seminal veziküller, prostat, bulboüretral bezler), salgılarıyla hem semenin oluşumunu sağlar hem de spermatozoa için besin kaynağı oluşturur.<sup>34</sup>

Testisler, karın boşluğunun dışında, skrotal ligament ile skrotuma bağlı olan ve funikulus spermatikus ile abdominal duvara asılı halde bulunan bir çift organdır (Şekil 1). Her bir testis 4 cm x 3 cm x 2,5 cm boyutlarında ve yaklaşık 30 ml hacmindedir. Genellikle sol testis sağa göre daha aşağıda yer alır. Testisler, spermatozoon adını verdiğimiz erkek üreme hücrelerinin ve sekonder seks karakterlerinin (kas kitlesinde artış, ses kalınlaşması, bölgesel kıllanma artışı) gelişimi için önemli fonksiyona sahip olan androjenlerin üretiminden sorumludur.<sup>35</sup> Testis en dıştan bir kapsül ile sarılıdır.

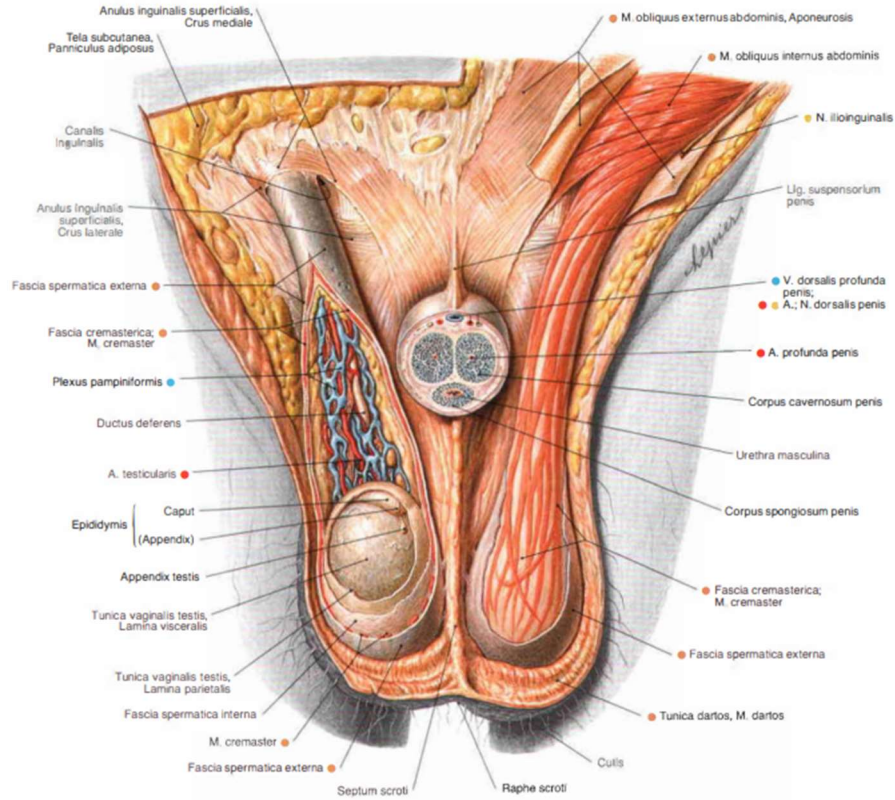
Testisin kapsülü üç tabakadan oluşur;

- 1) Tunica vaginalis
- 2) Tunica albuginea
- 3) Tunika vasküloza

Tunika vaginalis, embriyonik gelişim sürecindeki processus vaginalisin kalıntısı olan abdominal peritonun uzantısı ve testis kapsülünün en dış tabakasıdır. Tunika vaginalis iki tabakaya ayrılır. Bunlardan birisi lamina visseralis (epiorchium), diğeri ise lamina parietalistir (periorchium). Testislerin yüzeyi, testisin epididimis ve spermatik korda bağlandığı alanlar dışında, tunika vaginalisin visseral tabakası ile örtülüdür. Tunika vaginalisin visseral ve paryetal tabakaları arasındaki boşlukta az miktarda sıvı mevcuttur ve bu sıvı testislerin skrotum içerisinde rahatça hareket etmesine olanak sağlar (Şekil 2).<sup>36</sup>

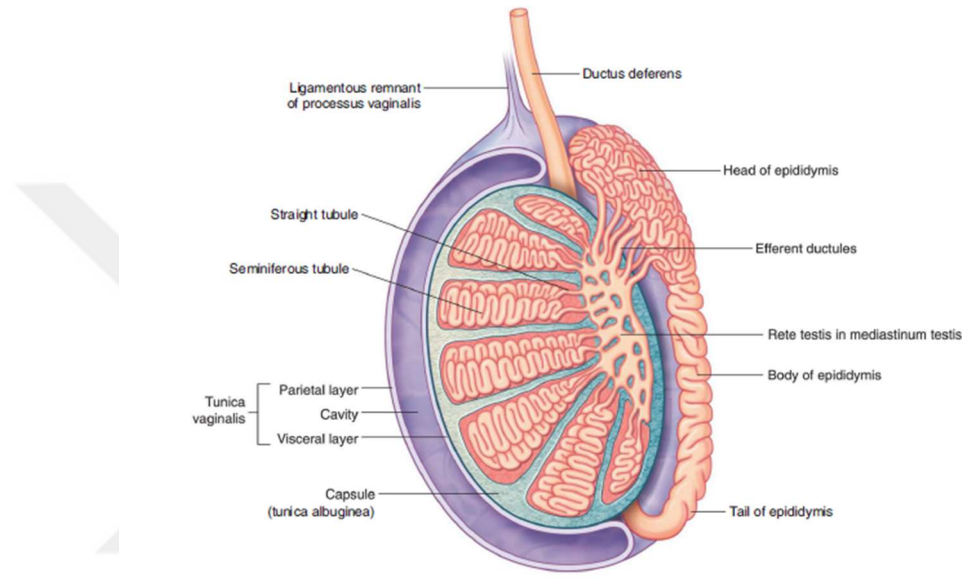
Tunika albuginea tabakası, fibröz bağ doku yapısındadır ve testisi kese biçiminde

çevreler. Tunika vaginalisin lamina visseralis tabakası tunika albugineayı arka kenarı hariç, en dıştan sarar. Visseral tabaka ile örtülmeeyen arka kenara epididimis tutunur. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testis arter, ven, lenfatik damarlar, sinirler ve boşaltım kanallarının girip çıktığı alandır. Mediastinum testisten ayrılan bağ dokusu yapısındaki septula testisler tunika albugineaya uzanarak testisi yaklaşık 250 lobüle ayırır. Piramite benzer yapıda olan lobüller farklı ebatlarda bulunmaktadır ve tepesi mediastinum testise, tabanı ise periferiye bakmaktadır. Lobüllerin içerisinde 1-4 arasında değişen sayılarda seminiferöz tübül (tubuli seminiferi contorti) bulunur. Seminiferöz tübüller arasında gevşek bağ dokusu yer alır.<sup>37</sup>



Şekil 1. Erkek genital sistem anatomisi.<sup>38</sup>

Testis lobülleri içerisindeki her bir seminiferöz tübül uzun olması sebebiyle kıvrımlı ve katlantılı yapıya sahip bir halka oluşturur. Piramitlerin mediastinum testise bakan kısmında seminiferöz tübüller düz bir yapıya sahip tübüli recti (düz tübül) ile devam eder. Tübüli rectiler mediastinumun içerisinde anastomozlaşarak rete testis kanallar ağını oluşturur. Mediastinumun üst kısmında rete testis 12 ile 15 arasında değişkenlik gösteren kanallar halinde duktuli efferentesleri oluşturur (Şekil 2).<sup>34</sup>



Şekil 2. Testisin yapısı.<sup>39</sup>

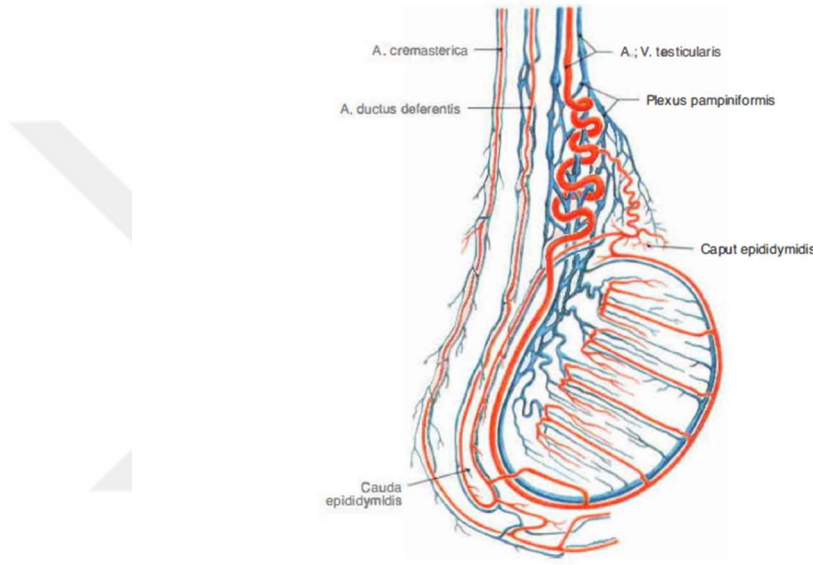
Tunica vasküloza kan damarlarından zengin, gevşek bağ dokusundan oluşan kapsülün en iç tabakasıdır. Testisin beslenmesi abdominal aortadan çıkan testiküler arter ile sağlanır. Testiküler arter böbreklerin alt kısmından başlayıp psoas majör kasının önünden geçerek aşağıya doğru devam eder. Daha sonra anulus inguinalis profundusdan geçip funikulus spermatikusa yerleşir ve mesorchiumdan testise giriş yapar.

Testiküler arter haricinde testisin beslenmesinde kollateral damarların da rolü vardır. Bunlar; duktus deferentis, kremasterik ve femoral arterlerden ayrılan küçük dallardır.

Testisin venleri vena testikularis'tir. Bu venler sağ tarafta vena kava inferiora, sol tarafta ise vena renalis'e boşalır. Vena testikularisin başlangıcı testisten abdominal venlere kanı taşımakla görevli bir ağ sistemi olan pampiniform venöz pleksus'tur. Bu pleksus testisteki ısı regülasyonunu sağlayan bir sistemdir.<sup>35</sup> Testiküler arter, pampiniform venöz pleksus ile sarılmış durumdadır. Bu şekilde arteriyal kan, testisten geri gelen soğuk venöz

kan ile zıt akım etkisiyle soğutulurak testisin normal vücut sıcaklığından 2-3°C daha düşük bir sıcaklıkta kalması sağlanır (Şekil 3).<sup>34,35</sup>

Ortam ısısındaki değişimden dolayı testislerdeki sıcaklık düzenlenmesinde bazı kasların da rolü vardır. Bunlardan birisi kremaster kasıdır. Bu kasın kasılması testisleri abdominal duvara doğru yakınlaştırır; gevşemesi ise testisleri abdominal duvardan uzaklaştırır. Diğer kas ise dartos kasıdır. Sıcaklık azaldığı zaman dartos kası kasılır ve ısı kaybının engellenmesi için skrotumun büzüşmesine sebep olur.<sup>34</sup>



**Şekil 3.** Testisin kanlanması.<sup>38</sup>

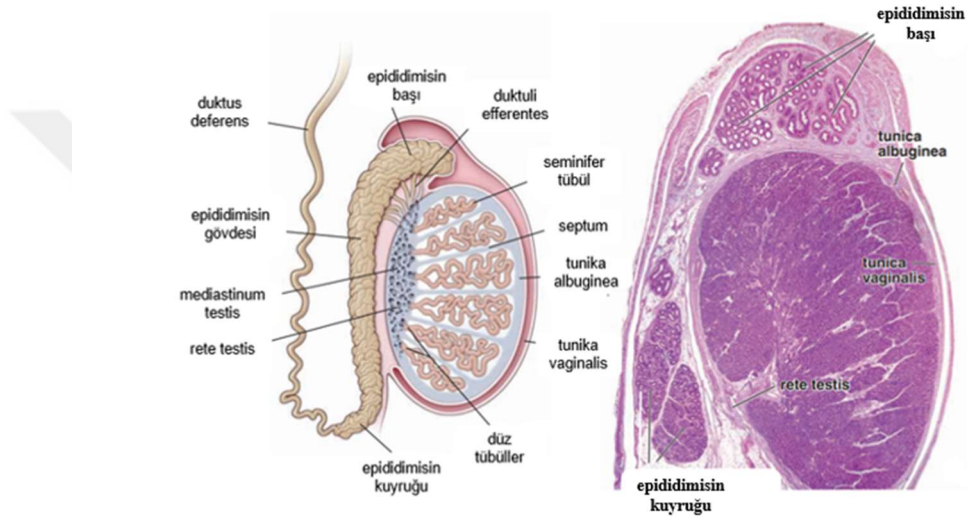
Testisin lenfatik drenajı testiküler ven seyrini takip ederek paraaortik lenf nodüllerine açılır.

Testisin sinir inervasyonu T10-12 medulla spinalis segmentleri tarafından oluşan sempatik lifler ile sağlanır.<sup>35</sup>

## **2.2. Testis Histolojisi**

Testisler oval bir şekle sahip, ekzokrin ve endokrin fonksiyonları olan bir çift organdır. Testisler dıştan testiküler kapsül ile sarılıdır. Testiküler kapsül üç tabakadan oluşmaktadır; tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza. Tunika vaginalis en dıştaki tabakadır ve abdominal peritonun uzantısıdır. Tunika albuginea oldukça kalın, düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındadır. Tunika albugineanın altında ise kan damarlarından

zengin gevşek bağ dokusu yapısındaki tunika vasküloza yer alır. Testis parankimi kapsülün içeriye doğru girintiler yapmasıyla oluşan septumlar tarafından yaklaşık 250 lobüle ayrılır. Tunika albuginea testisin arka yüzeyinde kalınlaşıp testis içerisine doğru sokularak mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testis içerisinden testisin beslenmesini sağlayan kan damarları, genital boşaltım kanalları ve lenfatik drenajdan sorumlu lenf damarları geçmektedir (Şekil 4).<sup>34</sup>



Şekil 4. Testisin sagittal kesiti.<sup>34</sup>

Testiste bulunan lobüller, spermatozoon üretiminin gerçekleştiği 1-4 arasında değişen sayıda seminiferöz tübülden ve tübüller arasında bulunan stromadan oluşur. Stroma yani interstisyel alan gevşek bağ dokusundan oluşmakla birlikte kan damarlarını, lenfatik damarları ve steroid yapıda hormon sentezi yapan Leydig hücrelerini (interstisyel hücre) içerir. Oldukça uzun ve sarmal bir yapıya sahip olan seminiferöz tübül bir halka oluşturur. Halkaların uçları düzleşip kısalarak mediastinuma yakın yerde düz tübülü (tubulus rektus) oluşturur. Düz tübüller mediastinumun üst ucunda anastomozlaşan kanallar bütünü olan rete testis ile devamlılık gösterir. Spermatozoonlar düz tübül ve rete testis aracılığıyla testis dışındaki genital boşaltım kanallarına iletilir.<sup>34</sup>



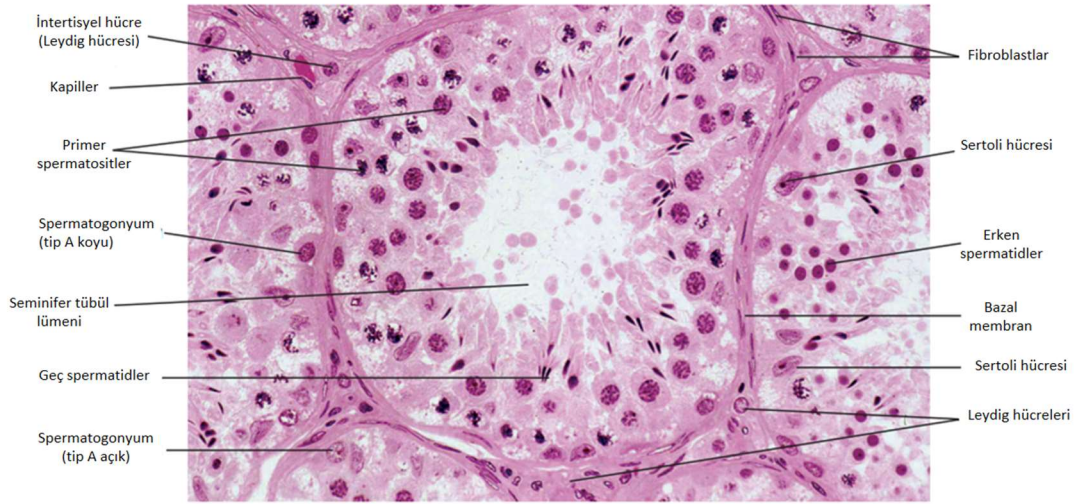
### 2.2.1. Seminiferöz Tübül

Seminiferöz tübüllerin her biri 150-250 µm çapta ve yaklaşık 50 cm (30-80 cm) uzunluğundadır. Bir testiste bulunan tübüllerin toplam uzunluğu ise yaklaşık 600 m'dir.<sup>40</sup>

Seminiferöz tübüller çok katlı, özelleşmiş ve kompleks bir epitelden oluşur. Bu epitel germinal veya spermatojenik epitel olarak da adlandırılır. Seminiferöz tübül epiteli ince bir bazal lamina üzerine oturmuştur ve dıştan peritübüler doku, diğer ismi ile membrana (lamina) propria ile sarılıdır.<sup>34</sup>

Peritübüler dokuda miyoid hücreler ve kollajen lifler bulunmaktadır. Tüm memeli türlerinde bulunan miyoid hücrelerin dokudaki organizasyonu türlere göre değişkenlik gösterir. Kemirgenlerde tek tabaka halindeyken, insanlarda ve bazı hayvanlarda 3-5 tabakalı bir düzenlenme gösterir. Küçük, ince ve yassı şekle sahip miyoid hücreler dışta bir bazal lamina yapısına sahiptir. Çekirdekleri hücre şekli ile uyumlu olacak şekilde ince ve uzun yapıdadır.<sup>34</sup> Miyoid hücreler, peritübüler doku içerisinde yer alan kollajenin sentezlenmesinden sorumlu hücreler oldukları için ve ultrastrüktürel olarak düz kas benzeri özellikleri nedeniyle peritübüler miyofibroblast benzeri hücreler olarak da isimlendirilmektedir. Miyoid hücrelerin sitoplazmaları içerisinde çok sayıda granüler endoplazmik retikülüm (GER) sisternası,<sup>34</sup> aktin, miyosin, vimentin, alfa-aktinin gibi hücre iskelet proteinleri yer alır. Sıçanlarda aktin filamentlerinin yerleşimleri seminiferöz tübül boyunca uzunlamasına veya dairesel olabilir.<sup>34,40</sup> Miyoid hücreler düz kas benzeri özellikleri sayesinde kontraksiyon göstererek spermatozoonların ve testiküler sıvının boşaltım kanallarına taşınmasını sağlar. Miyoid hücreleri androjen reseptörleri de içermektedirler. Böylece, seminiferöz tübüle desteklik sağlarken aynı zamanda spermatogenezis ve testis fonksiyonunun organizasyonuna da yardımcı olurlar.<sup>34,41</sup>

Germinal epitelde iki hücre tipi bulunur; Sertoli hücreleri ve spermatojenik seri hücreleri. Sertoli hücreleri, seminiferöz tübülün bazal laminasından tübül lümenine kadar uzanan prizmatik şekilli hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral bölgelerinde sitoplazmik kollar uzatarak oluşturduğu girintiler içerisinde ise spermatojenik hücreler yerleşim gösterirler. Spermatojenik hücre grupları arasında belirgin bir sınır yoktur. Bazal laminanın hemen üzerinde olgunlaşmamış spermatojenik hücreler olan spermatogonyumlar yer alır. Tübül lümen sınırında ise olgun hücreler olan spermatidler bulunur (Şekil 5).<sup>34,42</sup>



Şekil 5. Testisin histolojik görünümü. H&E.<sup>43</sup>

### 2.2.2. Sertoli Hücresi

Sertoli hücresi ilk olarak 1865 yılında Enrico Sertoli tarafından tanımlanmıştır. Sertoli hücreleri, diğer adıyla sustentaküler hücreler (destek hücreleri), seminiferöz tübülün bazal laminasından tübül lümenine kadar uzanan, uzun, prizmatik şekilli epitel hücreleridir. Replikasyon yetenekleri yoktur. Sertoli hücreleri gelişmekte olan spermatogonik hücrelere kriptalar sağlar, bu nedenle apikal ve lateral yüzeyinde plazma membranı düzensizdir. Rutin Hematoksilen & Eozin (H&E) boyamalarında Sertoli hücrelerinin sınırları ayırt edilemez.<sup>34</sup>

Sertoli hücresi yaklaşık 2000-7000 mikroküp hacme sahiptir. Bazal sitoplazma içerisinde yerleşmiş, büyük, oval veya üçgen şekilli, derin indentasyonlarla karakterize, 1-2 adet belirgin geniş çekirdekçik içeren ökromatik bir çekirdeğe sahiptir. Vimentin ara filamentlerinin varlığı ile çekirdek zarı çekirdek içerisine doğru indentasyonlar sergiler ve çekirdek girintili çıkıntılı bir yapı kazanır.<sup>34</sup> Bu modifikasyonun spesifik proteinlerin nüklear geçişi için uygun bölge sağladığı düşünülmektedir. Sıçanlar, fareler gibi bazı türlerde Sertoli hücre çekirdeği, karyozom adı verilen ve üç parçalı yapıda, RNA ve DNA içeren cisimcik çifti tarafından kuşatılan bir çekirdekçik içerir.<sup>44</sup>

Sertoli hücresinin sitoplazması içerisinde dağınık halde çok sayıda küre şekilli veya uzun mitokondriyon, genellikle mitokondriyonların yakınına yerleşmiş yaygın granülsüz endoplazmik retikülüm (SER) sisternası, hücrenin bazal sitoplazması içerisine yerleşmiş iyi gelişmiş GER ve Golgi aygıtı bulunur. Ayrıca sitoplazma değişken sayıda mikrotübül, lizozom, annulate lamellar kümeleri, lipid damlacıkları, veziküller, glikojen

granülleri ve filamentler içermektedir.<sup>34</sup> Sitoplazma içerisinde dağınık olarak yerleşmiş çok sayıdaki mitokondriyon, türe bağlı olarak değişmekle birlikte ağırlıklı olarak tübüler tipte veya karışık (tübüler ve plakalar) şeklinde düzenlenmiş krista yapısı sergiler.<sup>45</sup> Sertoli hücresinde yer alan çok sayıda SER'in mitokondriyonlara yakın yerleşimi ve sitoplazma içerisindeki lipid damlacıkları, bu hücrelerdeki lipid ve steroid metabolizmasının varlığını göstermektedir. Bununla birlikte SER sıkı bağlantılar, ektoplazmik özelleşmeler ve Sertoli-germ hücre bağlantılarıyla yakın ilişki içerisinde. Sitoplazma içerisinde çok miktarda bulunan mikrotübüller çekirdek çevresinde, apikal sitoplazma içerisinde ve Sertoli hücresi ile spermatid başları arasındaki ektoplazmik özelleşmelere yakın yerleşimde, devamlılık gösterecek şekilde ve çoğunlukla da hücre uzun eksenine paralel olarak yerleşmiştir.<sup>34,44</sup> Lizozomlar spermatogenezis sırasında oluşan artık cisimlerin ve hasarlı spermatojenik hücrelerin fagositozunda aktif rol alırlar. İnsanlarda, bazal sitoplazma içerisinde karakteristik inklüzyon cisimcikleri olan Charcot-Böttcher kristalleri bulunur. Bu kristaller, 10-25 µm uzunluğunda ve 1 µm genişliğinde olup fusiform şekilde görünüme sahiptirler. Transmisyon elektron mikroskopik incelemelerde 15 nm çapında paralel veya birleşmiş demetler halindeki filamentler olarak görülürler. Kimyasal bileşimi ve fonksiyonları halen bilinmemekle birlikte, yapılan çalışmalar bu kristallerde lipoprotein reseptör proteini (CLA-1) birikimi tespit etmiştir. Bu bulgular, inklüzyon cisimciklerinin, lipid taşıma ve Sertoli hücreleri tarafından kullanımıyla ilişkili olduğunu düşündürmektedir.<sup>34,42</sup>

Sertoli hücresi birçok önemli fonksiyona sahiptir. Bunlar;

- Kan-testis bariyerini oluştururlar. Bu yolla interstisyel bağ dokudan gelebilecek immünglobulin (Ig) ve lenfositlerin seminiferöz tübülün lümenal kompartmanına geçişini önler.<sup>46</sup>
- Spermatojenik hücreleri oluşturmak ve geliştirmek için destek sağlar. Spermiyasyon sırasında aktin aracılı kasılmalarla olgun spermatidlerin seminiferöz tübül lümenine salımını kolaylaştırır.<sup>47</sup> Seminiferöz tübül lümenine proteinlerden ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılayarak spermatojenik seri hücrelerini besleyen Sertoli hücresi "anne" veya "hemşire" hücresi olarak da anılmaktadır.<sup>44</sup>

- İmmün regülasyonda görev alır. Seminiferöz tübülü patojenlere karşı korumak için adaptif immüniteyi sağlarken aynı zamanda otoimmüniteyi baskılayarak spermatojenik hücrelerin korunmasını sağlar.<sup>48</sup>
- Spermatogenezisin sonunda oluşan rezidüel (artık) cisimcikleri ve hasarlı spermatojenik hücreleri fagosite ederek seminiferöz epitel bütünlüğünü korur ve makrofajlar gibi işlev görürler.<sup>49</sup>
- Salgılama fonksiyonları vardır; Çeşitli büyüme faktörleri ve antiapoptotik faktörler salgılar. Sentezledikleri androjen bağlayıcı proteinin (ABP) ile spermatogenezis için gerekli testosteronun seminiferöz tübülde yeterli seviyelerde olmasını sağlar. Anti-Müllerian Hormonu (AMH) salgılayarak fetal dönemde dişiye ait olan parametonefrik (Müller) kanalların gerilemesini sağlarlar.<sup>34</sup>
- Sertoli hücrelerinin yüzeyinde folikül uyarıcı hormon (FSH) reseptörleri bulunur ve hipofizden salgılanan FSH etkisiyle Sertoli hücrelerinde aktivin, inhibin ve östradiol sentezlenir. Östradiol testosteronun aromatisasyonu ile oluşur ve Leydig hücreleri üzerinde etki ederek testosteron üretimini inhibe eder. Sertoli hücresi tarafından üretilen aktivin ve inhibin B sırasıyla hipofiz üzerinde pozitif ve negatif geri bildirim oluşturur.<sup>50</sup>
- Sertoli hücresinde androjen reseptörü de bulunur ve ligandlarıyla (testosteron veya dihidrotestosteron) bir araya geldiğinde, çekirdeğe taşınarak transkripsiyonel uyarımı başlatır. Bu uyarı, özellikle spermatojenik seri hücrelerindeki mayotik ilerleme ve spermatid olgunlaşması için normal spermatogenezisde hayati öneme sahiptir. Sertoli hücreleri, spermatogenezisde androjen etkisinin ana aracısıdır.<sup>51</sup>
- Sertoli hücreleri demirin taşınmasında kullanılan transferini sentezler ve salgırlar. Sertoli hücresinde bulunan sıkı bağlantılar nedeniyle, demirin taşınması için transferrine gereksinim vardır. Ferrik iyonlar Sertoli üzerinde bulunan transferrin reseptörüyle etkileşime girip hücre içine alınırlar. İçeri alınan demir germ hücrelerine taşınır ve germ hücrelerinin gelişimi ve olgunlaşması için kullanılır.<sup>52</sup> Sertoli hücreleri aynı zamanda bir bakır taşıyıcı protein olan seruloplazmini ve plazminojeni aktif proteolitik hormon olan plazmine çeviren plazminojen aktivatör faktörü de salgılar.<sup>34</sup>

Sertoli hücreleri ile komşu Sertoli hücreleri ve spermatojenik hücreler arasında hücrelerarası bağlantılar bulunmaktadır. Sertoli hücrelerindeki bağlantı tipleri bazal ve apikal ektoplazmik özelleşmeler<sup>44</sup> (Sertoli hücrelerine has özelleşmelerdir), sıkı bağlantılar (zonula okludens tipi bağlantılar), desmozom benzeri bağlantılar, geçit bağlantıları (gap junctionlar) ve hemidesmozomlardır.<sup>34</sup> Hemidesmozomlar Sertoli hücrelerini alttaki bazal laminaya tutundurur. Zonula okludens, bazal ektoplazmik özelleşme, desmozom benzeri bağlantılar ve gap junctionlar iki Sertoli hücresi arasında bulunurken, desmozom benzeri bağlantılar, gap junctionlar ve apikal ektoplazmik özelleşmeler Sertoli hücreleri ile spermatojenik seriye ait hücreler arasında bulunur.<sup>45</sup>

### **2.2.3. Kan Testis Bariyeri**

Kan testis bariyerini esas olarak Sertoli hücreleri arasındaki zonula okludens tipi bağlantılar oluşturur.<sup>53</sup> Zonula okludens tipi bağlantılar ile birbirine sıkıca bağlanmış Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları içerisinde, zonula okludens tipi bağlantılara yakın komşulukta testise özgü bazal ektoplazmik özelleşmeler (hekzagonal şekilde düzenlenmiş aktin filamanları ve SER sisternaları) bulunur.<sup>34,53</sup> Gap junctionlar ve desmozom benzeri bağlantılar da bariyerin fonksiyonuna katkı sağlamaktadırlar.<sup>54</sup>

Kan testis bariyeri seminiferöz tübülü bazal ve luminal kompartmanlara ayırır. Tüm interstisyel hücre tipleri, kan damarları ve gelişimlerinin erken evrelerinde olan spermatojenik hücreler (spermatogonyum, preleptoten spermatositler) bazal kompartmanda yer alırken, daha sonraki mayotik (leptoten, zigoten ve pakiten spermatositler) ve post-mayotik (yuvarlak ve uzayan spermatidler) spermatojenik hücreler luminal kompartmanda izlenir.<sup>46</sup>

Kan testis bariyeri, seminiferöz epiteldeki hücrelerin ihtiyacı olan maddelerin (karbonhidrat, aminoasit, protein ve iyonların) geçişini kontrol ederek fizyolojik bir kompartmanlaşma oluşturur. Luminal kompartmandaki spermatojenik seri hücrelerini kan dolaşımındaki plazma proteinleri ve antikorlardan ayırır. Mayozun tamamlanması ve spermatojenik seri hücrelerinin korunması için immünolojik olarak korunan bir ortam sağlar. Spermiyogenezis sırasında seminal plazmadaki antiijenlerin veya kanda oluşabilecek anti-sperm antikorlarının seminiferöz tübüle girişini engeller. Preleptoten evresindeki spermatositlerin bazal kompartmandan luminal kompartmana kontrollü geçişini sağlar. Spermatositlerin geçişi sırasında kan testis bariyeri açılır. Geçiş

işleminde sonra kan testis bariyerini oluşturan bağlantı kompleksleri yeniden düzenlenerek bariyer tekrar kapanır. Açılma ve kapanma olayları Sertoli hücresinde bulunan bir dizi protein ve protein komplekslerinin kontrolü sayesinde gerçekleşir. Böylece spermatojenik seri hücrelerinin geçişi sırasında kan testis bariyeri korunmuş olur.<sup>34,55</sup>

#### **2.2.4. Spermatojenik Hücreler**

Spermatogenezis, pubertede başlayan ve spermatogonyumlardan spermatozoa oluşumunu kapsayan olaylar bütünüdür. Spermatogenezis puberteden hemen önce pitüiter bezden salgılanan gonodotroplar tarafından kontrol edilir ve yaklaşık 74 gün sürer. Spermatojenik hücreler, testisin erken gelişim evresinde yolk kesesinden kaynaklanan ve gonadal kabartılarda kolonize olan primordiyal germ hücrelerinden gelişirler. Spermatojenik hücreler spermatogenezis süresince komşu Sertoli hücreleri arasında seminiferöz tübülün bazalinden lümenine doğru ilerlerler. Germ ya da spermatojenik hücreler seminiferöz tübülün çok katlı epitelinin oluşturan 4-8 hücre tabakası halinde sıralanır.<sup>34</sup>

Spermatojenik hücre tipleri;

- 1) Spermatogonyumlar
- 2) Spermatositler
- 3) Spermatidler
- 4) Spermatozoonlar (Şekil 6)

##### **2.2.4.1. Spermatogonyumlar**

Spermatogonyal kök hücreler mitoz bölünmeler geçirerek farklı çekirdek görünümüne sahip spermatogonyumları oluştururlar. Üç farklı tipte spermatogonyum bulunur. Bunlar; Tip A koyu spermatogonyum (Ad), Tip A açık spermatogonyum (Ap) ve Tip B spermatogonyumdur. Ad spermatogonyumlar yoğun bazofilik boyanan, ince granüllü kromatinli ve oval yapıda bir çekirdeğe sahiptir. Ad spermatogonyumlar kök hücre özelliğindedir ve mitoz bölünme geçirerek hem kendisini yani Ad tipi spermatogonyumları, hem de Ap tipi spermatogonyumları oluşturabilirler. Ap spermatogonyumlar, ince granüllü kromatinli, oval ve açık renkte boyanan çekirdek

içerir. Mitotik bölünmeler gerçekleştirerek spermin oluşmasını sağlayan farklılaşma periyoduna girerler. Tip A spermatogonyumların geçirdikleri mitoz bölünmelerde sitokinezisin tam olarak tamamlanmaması nedeniyle hücreler sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı durumdadır. Bu sitoplazmik köprüler mitoz ve mayoz bölünmeler sırasında hücrelerin birbirleriyle haberleşmesine yardımcı olur. Aynı zamanda bu bağlantılar, her Ap çiftinin gelişimi için son derece önemlidir. Germ hücrelerinin ayrılması farklılaşma aşamasında olmaktadır.<sup>34,42</sup> Tip B spermatogonyumların, kümeler şeklinde yoğun kromatine sahip yuvarlak çekirdeği bulunur. Merkezi bir çekirdekçiğe sahiptir.<sup>34</sup> Tip A spermatogonyumlar iki ya da üç kez mitoz bölünme geçirdikten sonra Tip B spermatogonyum haline gelirler.<sup>42</sup>

#### **2.2.4.2. Spermatositler**

Spermatosit fazında, Tip B spermatogonyumlar son kez mitoz bölünme geçirerek ökromatik çekirdeğe sahip, sferikal şekilli primer spermatositleri meydana getirirler. Mayoz bölünme başlamadan önce bu hücrelerde DNA replikasyonu başlar ve primer spermatositlerde bulunan DNA (4d) miktarı iki katına çıkar. Normal kromozom (2n) sayısına sahip olan primer spermatositlerin birinci mayoz bölünme ile kromozom sayıları 2n'den 1n'e düşer ve DNA miktarları da 4d'den 2d'ye düşerek haploid duruma gelir. Birinci mayoz bölünme yaklaşık 22 gün sürer. Bu yüzden rutin H&E yöntemiyle boyanmış preparatlarda görülen spermatositlerin büyük çoğunluğu primer spermatositlerdir. Spermatojenik seri hücreleri arasında en büyük yapıda olanı primer spermatositlerdir ve mayoz I ile oluşan 23 kromozomlu (22+X veya 22+Y) hücrelere sekonder spermatosit adı verilir. İkinci mayoz bölünme öncesinde DNA replikasyonu gerçekleşmez. Mayoz II'ye hızlıca geçiş yapan sekonder spermatositlerin rutin preparatlarda görülmesi zordur. Mayoz II'den sonra her sekonder spermatositten haploid kromozoma (1n) ve tek bir kromatide (1d) sahip iki haploid spermatid oluşur.<sup>34,42</sup>

#### **2.2.4.3. Spermatidler**

Mayoz II sonucunda oluşan her spermatid haploid yapıda yani 23 kromozoma (22+X veya 22+Y) sahiptir. Spermatid fazında daha fazla hücre bölünmesi gerçekleşmez ve spermatidler olgun spermi (spermatozoon) oluşturmak üzere bir yeniden şekillenme sürecine (spermiyogenezis) girerler. Spermiyogenezis sırasında spermatidler Sertoli

hücre membranına özelleşmiş bağlantılar ile bağlı haldeyken, spermiyogenezisin sonunda tübül lümenine aktarılırlar.<sup>34</sup> Spermiyogenezis sıcaklığa son derece duyarlıdır.<sup>42</sup>

Spermiyogenezis 4 evreden oluşur;

- 1) Golgi fazı
- 2) Kep fazı
- 3) Akrozom fazı
- 4) Olgunlaşma fazı

**Golgi fazında**, spermatid sitoplazmasında çekirdeğe yakın yerleşimli Golgi kompleksi, bir çift sentriyol, mitokondriyonlar ve serbest ribozomlar bulunur. Golgi fazı spermatidin Golgi kompleksinde periyodik asit-Schiff (PAS) ile pozitif boyanan, glikoproteinden zengin proakrozomal granüllerin oluşmasıyla karakterizedir. Proakrozomal granüller biraraya gelerek akrozomal vezikülü oluşturur. Akrozomal vezikül, içeriği artarak genişler ve vezikülün bulunduğu konum spermatozoonun ön kutbunu oluşturur. Sentriyoller spermatidin arka kutbuna göç eder ve hücre zarına dik açı oluşturacak şekilde konumlanır. Sentriyolün bir tanesi kuyruk (flagellumun) aksonemini oluşturmaya başlar.<sup>34</sup>

**Kep fazında**, akrozomal kep adını verdiğimiz yapı, akrozomal vezikülün yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak biçimde yayılmasıyla oluşur. Akrozomal kepin altındaki çekirdek zarı porlarını kaydederek kalınlaşır ve çekirdek de yoğunlaşır.

**Akrozom fazında**, yeniden hizalanan spermatidin baş kısmı Sertoli hücresine iyice gömülü durumdadır. Spermatozoonun kuyruğunu oluşturan aksonem seminiferöz tübülün lümenine doğru yönelir. Spermatid çekirdeği yoğunlaşır ve yassılaşıp uzar. Akrozom çekirdeğin ön kısmında oluşur. Sitoplazmik mikrotübüller biraraya gelerek akrozomun arka kenarından spermatidin arka kutbuna doğru manşet adı verilen bir kılıf oluşturur. Flagellumun gelişimini sağlayan sentriyoller çekirdeğin arka yüzeyine taşınarak spermatozoonun boyun (bağlantı) parçasını oluşturmak üzere özelleşirler. Çekirdekle bağlantılı olan sentriyoller dokuz kalın fibril oluşturur ve bu fibriller kuyruğun içine doğru uzanarak çekirdek ile kuyruk arasındaki bağlantıyı sağlamış olur. Böylece spermatozoonun boyun kısmı oluşur.<sup>34</sup>

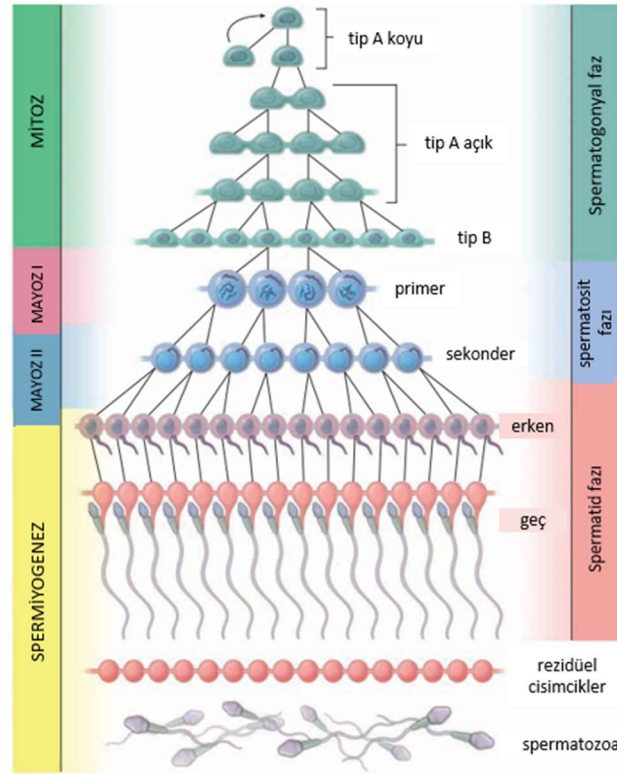


Flagellum büyümeye devam ederken plazma zarı da flagellumu sarmak için arkaya doğru uzanır. Bu sırada manşet kaybolur ve kuyruğun proksimal kısmında 9+2 aksonem yapısını, kaba lifleri ve mitokondriyonları içeren orta parça adı verilen kısım oluşur. Orta parça flagellumun hareketinde gerekli olan ATP üretiminden sorumludur. Orta parçanın distalinde fibröz kılıf ve bu fibröz kılıf ile sarılı durumda bulunan 9+2 aksonem yapısına sahip spermatozoon kuyruğunun esas parçası bulunur. Esas parçanın distalindeki kuyruğun son parçasında ise yalnızca aksonemal kompleks yer alır.<sup>34</sup>

**Olgunlaşma (maturasyon) fazında,** flagellumun etrafında bulunan fazla sitoplazma artık cisim olarak atılır ve hücreler arası sitoplazmik köprüler kaybolur. Rezidüel cisimcikler olarak da bilinen artık cisimler Sertoli hücrelerince fagosite edilerek ortamdan uzaklaştırılır. Böylece olgun ama hareketli olmayan spermatozoonlar oluşur ve tübül lümenine bırakılır. Olgun spermatozoonların tübül lümenine bırakılma sürecine spermiyasyon ismi verilir ve karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte Sertoli hücresi ve spermatidler arasından bulunan bağlantı komplekslerinin birbirinden ayrılması için integrin bağlı kinazların aktive olması gerekir. Bu aktivasyonla beraber olgun spermilerin tübül lümenine atılması sağlanmış olur. Spermiyasyonun hızı ejakülatta bulunan sperm hücre sayısının belirleyici faktörüdür.<sup>34,42</sup>

Spermatogenezis süreci çeşitli hormonal etkileşimler sayesinde düzenlenir. Hipotalamustan gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) salgılanmasıyla ön hipofiz uyarılır ve FSH ile lüteinizan hormon (LH) salgılanır. LH, Leydig hücre yüzeyinde bulunan LH reseptörüne bağlanarak kolesterolden testosteron yapımını uyarır. Hipofizden salgılanan FSH ve Leydig hücreleri tarafından oluşturulan testosteron etkisiyle Sertoli hücreleri uyarılır. Uyarılan Sertoli hücreleri ABP üretir. ABP, testosteronun seminiferöz tübülün sıvı kompartmanı içerisindeki konsantrasyonunun artmasını sağlayarak spermatogenezis sürecinde güçlü bir etki sağlar.<sup>56</sup>

Testis dokusunda gram başına günde üretilen tahmini sperm sayısını spermatogenezisin etkinliği ifade eder. Bu etkinlik germ hücrelerinin dejenerasyonundan, pubertal gelişimden, mevsimlerden ve insanların veya hayvanların yaşlanmasından etkilenir.<sup>57</sup> Hem perinatal hem de yetişkin testis dokusu yaşam tarzından (sigara kullanımı, obezite) ve çevresel faktörlerden (yanma ürünlerine ve egzoz dumanına maruz kalma, dioksinler) olumsuz yönde etkilenir ve spermatogenezisin etkinliğinde azalma görülür.<sup>58</sup>



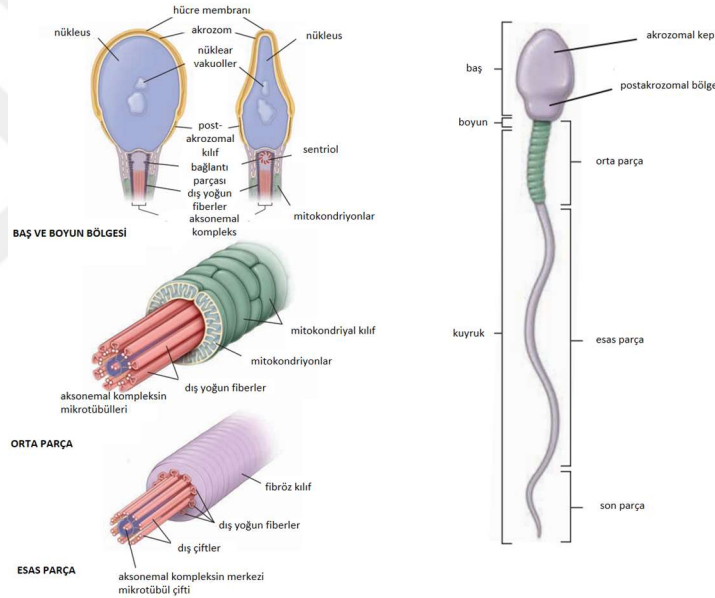
Şekil 6. Spermatogenik seri hücrelerinin gösterimi.<sup>34</sup>

#### 2.2.4.4 Spermatoozon

Olgun insan spermatozoonu; baş, boyun ve kuyruk kısımlarından oluşan yaklaşık 60  $\mu\text{m}$  uzunluğa sahip bir hücredir. Spermatozoon başının uzunluğu 4,5  $\mu\text{m}$  olup yassı ve sivri bir şekle sahiptir. Çekirdeğin ön 2/3'lük kısmı akrozomal kep ile sarılıdır ve burada akrozomal enzimler (hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin) bulunur. Fertilizasyon sürecinde spermatozoonun zona pellusidaya bağlanması ile akrozomun dış zarı ve spermatozoonun hücre zarı kaynaşır, akrozomal enzimler açığa çıkar ve zona pellusida geçer. Bu olaya akrozom reaksiyonu adı verilmektedir.<sup>34</sup>

Boyun kısmı kısa bir bölümdür ve sentriyoller burada bulunur. Spermatozoonun kuyruk kısmı orta parça, esas parça ve son parçadan oluşur. Uzunluğu 7  $\mu\text{m}$  olan orta parçada mitokondriyonlar yerleşmiş olup aksonemal kompleksi ve kalın fiberlerin etrafını tamamen sarmış vaziyettedir. Mitokondriyonlar spermatozoon hareketi için gerekli olan enerjinin kaynağıdır. Esas parça en uzun kısımdır ve yaklaşık 40  $\mu\text{m}$  uzunluğundadır. Esas parçada kalın fiberlerin ve aksonemal kompleksin dışında fibröz kılıf bulunur. Son parça kalan 5  $\mu\text{m}$ 'lik kısmı içerir ve burada sadece aksonemal kompleks vardır (Şekil 7).<sup>34</sup>

Spermiyogenezis sonucunda seminiferöz tübül lümenine geçen matür spermatozoonlar hareketsizdirler, Sertoli hücrelerinin salgıları ve lamina propriada bulunan miyoid hücrelerin kasılması sayesinde düz tübüllere taşınırlar, ardından da rete testise ve duktuli eferentese iletilirler. Daha sonra hareket yeteneklerini kazanmak için epididimise gelen spermatozoonlar bazı değişimler geçirir. Spermatozoon çekirdek DNA'sı yoğunlaşır ve sitoplazması azalır, bu durum spermatozoon başının boyutunda küçülmeye sebep olur. Dış akrozomal membrana yüzey ilişkili dekapasitasyon faktörü eklenir ve böylece spermatozoonun erken kapasitasyonu engellenmiş olur. Spermatozoonun fertilizasyon yeteneğini yani kapasitasyonu tamamlayacağı yer dışı üreme kanalıdır.<sup>34</sup>



Şekil 7. Bir insan spermatozoonunun şematik gösterimi.<sup>34</sup>

### 2.2.5. Seminiferöz Epitel Siklusu ve Seminiferöz Epitelin Dalgaları

Seminiferöz epitel siklusu tübüldeki herhangi bir bölgede zamanla meydana gelen, her biri 16 gün süren değişimleri tanımlamaktadır. İnsanlarda bir spermatogonyal kök hücrenin spermatogenezis sürecini tamamlayabilmesi için yaklaşık 4,6 sıklusa ihtiyacı vardır ve bu süre yaklaşık 74 gün kadardır. Spermatogenezis sonucu oluşan spermatozoonların epididimiste geçirmesi gereken süre yaklaşık 12 gündür. Seminiferöz epitel siklusunun süresi her tür için spesifiktir. Buna ek olarak seminiferöz epitelin dalgası, tübülün uzunluğu boyunca hücreler birliktelik (evreler) örüntüsünün dağılımını

tanımlamaktadır. Her hücre birliği örüntüsü (siklusun evreleri) insan seminiferöz tübülünde yama benzeri bir dağılıma sahiptir. Yamalar sıralı değildir ve tübülün çevresi boyunca uzanım göstermemektedir. Bu yüzden, insan seminiferöz tübülünden alınan her bir transvers kesitte iki ya da daha fazla evre görülebilir. Bu şekilde siklusun altı farklı evresi ortaya çıkabilir. Sıçanlarda yaklaşık 12 dalga vardır ve belirli bir hücre birliği tübül boyunca farklı uzunluklarda bulunabileceği için tübülün geçen enine bir kesitte sadece bir hücre birliği görülmektedir.<sup>34</sup>

### 2.2.6. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücreleri

Seminiferöz tübüller arasında bulunan gevşek bağ dokusu yapısındaki interstisyel alanda Leydig (interstisyel) hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, undiferansiye mezenşimal hücreler, sinir lifleri, kan damarları ve lenfatik damarlar bulunur.<sup>34</sup>

Leydig hücreleri ilk olarak 1850 yılında Alman zoolog Franz von Leydig tarafından tanımlanmıştır.<sup>59</sup> Leydig hücreleri, seminiferöz tübüller arasındaki interstisyel alanda kümeler halinde ya da tek tek bulunan, steroid yapıdaki androjenlerin salgılanmasında görevli, poligonal şekilli büyük ve eozinofilik hücrelerdir.<sup>34</sup> Leydig hücreleri bir bazal lamina ile çevrili değildir. Bu hücreler kendilerine yakın diğer Leydig hücreleri ve fibroblastlar ile temas halindedir.<sup>60</sup> Leydig hücrelerinin normalde bölünme yetenekleri yoktur fakat deneysel olarak imha edildiklerinde bölünme yeteneği ortaya çıkabilir.<sup>57</sup> Leydig hücrelerinin çekirdeği yuvarlak, büyük ve yoğunlaştırılmış ökromatin yapıda olup bir veya iki tane çekirdekçiğe sahiptir.<sup>61</sup> Leydig hücreleri lipid damlacığından zengindir. Aynı zamanda bu hücrelerde lipofuksin pigment granülleri ve Reinke kristalleri yer alır. Reinke kristalleri, Leydig hücrelerinin sitoplazması içerisindeki çubuk şeklinde ve 3 x 20 µm genişliğinde, ışık mikroskopik olarak da görülebilen protein yapılarıdır. Reinke kristalleri her zaman aynı karakterdedir ve kristaller arasında birleşme gözlenmez.<sup>34,62</sup>

Ribozomlar sitoplazmada dağınık halde bulunur. Küçük ve katmanlı sisternalara sahip GER genellikle plazma membranına ve mitokondriyonlara yakın olarak yerleşir. Çoğunlukla SER ile devamlılık gösterir. Leydig hücrelerinde, steroid salgılayan hücre olma özelliklerinden dolayı, fazla sayıda SER bulunur. SER birbiriyle anastomozlaşan tübüler yapıda sisternalar içerir. Sayıları oldukça fazla olan mitokondriyonlar

tübüloveziküler krista yapısına sahiptir ve sitoplazmada homojen bir şekilde dağılmıştır. Ayrıca Leydig hücreleri iyi gelişmiş Golgi kompleksine sahiptir.<sup>34,63</sup>

Leydig hücre salgısı hipotalamo-hipofizer gonadal aksın kontrolü altındadır. Hipotalamustan salgılanan GnRH, hipofiz bezini etkileyerek buradan LH salgılanmasını başlatır. LH, Leydig hücresi üzerinde bulunan LH reseptörüne (LHR) bağlanarak steroid sentezini başlatır. LH'nin Leydig hücresinde steroidogenezi başlatma görevine ek olarak bir diğer işlevi de Leydig hücreleri içerisindeki membran biyogenezi ve döngüsünü düzenlemesidir. Testosteron kolesterolden sentezlenir ve bu sentezde görevli enzimler SER ile bağlantılıdır. Sentezlenen androjenlerin temel işlevi, spermatogenez sürecini başlatmak, devamını sağlamak ve düzenlemektir. Aynı zamanda sekonder seks karakterlerinin ve genital boşaltım kanallarının devamlılığını sağlar.<sup>59</sup>

Yaşlanmaya bağlı olarak serum testosteron seviyeleri hem insanlarda hem de kemirgenlerde giderek azalır. Önceleri bu azalmanın Leydig hücrelerinde kayba bağlı olduğu düşünülmektedir. Ancak güncel araştırmalar bu azalmanın esas nedeninin LH tarafından uyarılan Leydig hücrelerinin testosteron sentezleme yeteneğindeki azalma olduğunu göstermektedir.<sup>64</sup>

### **2.3. Testis Embriyolojisi**

Embriyonun genetik cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlenmiş olup, gonadların erkek veya dişi yönde farklılaşması gelişimin 7. haftasından sonra olmaktadır. Cinsiyet farklılaşması kromozomlar tarafından ifade edilen genler ile sağlanır. Gelişim sadece cinsiyet kromozomları tarafından değil aynı zamanda hormonlar ve diğer faktörler tarafından da kontrol edilir.<sup>65,66</sup>

Gonadlar üç farklı kaynaktan köken alır;

- 1) İntraembriyonik, mezodermal sölom epiteli (epitel, mezotel)
- 2) Ara mezoderm
- 3) Epiblast kaynaklı primordial germ hücreleri

Gonadlar uzunlamasına bir çift gonadal (genital) sırt şeklinde ortaya çıkar. Primordiyal germ hücreleri epiblast kaynaklıdır ve primitif çizgi boyunca göç ederek gelişimin 3. haftasında yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm

hücrelerinin arasına yerleşir. Beşinci haftada primitif gonadlara ulaşan primordiyal germ hücreleri, gelişimin 6. haftasında gonadal sırtlar içerisine yerleşir. Bu hücreler gonadal sırtlara yerleşemediklerinde gonadlar gelişmez. Primordiyal germ hücrelerinin gonadlara olan göçü gerçekleştiği sırada, gonadal sırttaki epitel hücreleri çoğalarak alttaki mezenşimin içine doğru ilerler. Burada primitif cinsiyet kordonlarını oluştururlar. Bu kordonlar her iki cinsiyette de yüzey epiteli ile bağlantılıdır ve bu dönemde gonadların erkek mi yoksa dişi mi karakterde olduğu anlaşılamaz. Bunlara farklılaşmamış gonad adı verilir.<sup>66</sup>

Erkeklerde genetik olarak bir X bir de Y kromozomu bulunur ve Y kromozomu kısa kolu üzerinde bulunan cinsiyet belirleyici bölge (Sex-determining Region on Y protein, SRY) geni tarafından kodlanan testis belirleyici faktörü (TDF) erkek gelişimini tetikler. SRY geni yoksa veya kusurluysa gelişim kız yönünde farklılanır. TDF testiküler farklılaşmayı başlatır. SRY geninin etkisiyle SF1 ve SOX9 genleri de testis gelişimini sağlar. Testis veya medullar kordonlar primitif cinsiyet kordonlarının çoğalmasıyla oluşmaya başlar. Gelişimin 7. haftasında yüzey epitelinden Sertoli hücreleri ve genital sırt mezenşiminden interstisyel Leydig hücreleri meydana gelir. SRY geni etkisiyle Sertoli hücreleri primitif germ hücrelerinin etrafını sararak testis kordonlarını meydana getirir. Leydig hücreleri ise bu kordonların arasında bulunur ve gelişimin 8. haftasından itibaren androjenik hormonlar olan testosteronu ve androstenedionu sentezlemeye başlar. Testosteron dışında fetal testislerde bulunan Sertoli hücreleri tarafından AMH sentezlenir. AMH dişi karakter gelişimini sağlayan paramezonefrik kanalların inhibisyonunu sağlar.<sup>65,67</sup>

Testis kordonları bir ağ oluşturacak şekilde bezin hilusuna doğru dağılarak rete testisi meydana getirirler. Daha ileri evrelerde testis kordonları yüzey epitelinden tunika albuginea adı verilen sıkı bağ dokusuyla ayrılır.<sup>66,67</sup> Fibröz yapılı tunika albuginea gelişimi testis için karakteristiktir.<sup>67</sup>

Puberteye kadar testis kordonlarının lümeni yoktur ve pubertede kordonların lümenleri açılarak seminiferöz tübüller meydana gelir. Tübül lümenleri açılır açılmaz rete testis ile birleşerek duktuli eferenteslere girerler. Efferent duktuslar rete testis ile daha sonra epididim kanalı olacak olan mezonefrik kanalı birleştirirler.<sup>66,67</sup>

## 2.4. Testis Torsiyonu

Testis torsiyonu ilk olarak 1810 yılında Hunter tarafından tanımlanmıştır. 1840 yılında ise Delasiauve testis torsiyonunu cerrahi olarak tedavi ettiği ilk vakayı literatüre sunmuştur.<sup>68,69</sup> Testis torsiyonu, spermatik kord ve eklerinin kendi etrafında dönmesi sonucu skrotumdaki venöz ve arteriyel kan akışının kesilmesiyle oluşan en önemli acil ürolojik durumlardan birisidir. Akut skrotum vakalarının yaklaşık % 15-20'sini oluşturur.<sup>69-71</sup> Testis torsiyonunun yıllık insidansı 4000'de 1 olarak tanımlanmıştır.<sup>71,72</sup> Yapılan başka bir çalışmaya göre 18 yaş altında testis torsiyonu insidansı 100.000'de 3,8 olarak bildirilmiştir.<sup>73</sup> Testis torsiyonu her yaşta görülebilmekle beraber pik yaptığı iki dönem vardır. Bunlar yenidoğan (0-1 yaş) ve adölesan (12-15 yaş) dönemleridir.<sup>70,74</sup> Testis torsiyonu skrotumda genellikle tek taraflı, ani başlayan, şiddetli ağrı ile karakterizedir. Aynı zamanda bazı hastalarda bulantı, kusma da görülebilir.<sup>70,75</sup> Testis torsiyonu acil müdahale gerektiren bir durumdur ve torsiyonun cerrahi olarak detorsiyone edilerek tekrar eski pozisyonuna getirilmesi ve kan akışının tekrar başlaması (reperfüzyon) sağlanmalıdır. Başarılı bir cerrahi müdahaleden sonra bile, oluşan İ/R hasarı nedeniyle testiste hücre kaybı meydana gelmektedir. Bu durum testislerde atrofi, infertilite ve subfertilite gibi istenmeyen sonuçlara yol açmaktadır. Tedavide geç kalınması organın kaybı (orşiektomi) ile sonuçlanır.<sup>75,76</sup> Testis torsiyonunun oluşma nedeni genellikle idiyopatiktir. Ama altta yatan mekanizmalar arasında bell-clabber deformitesi<sup>79</sup>, travma (torsiyon vakalarının % 4-10'u)<sup>80</sup>, genetik faktörler<sup>81,82</sup> ve çevresel faktörler<sup>83,84</sup> yer almaktadır.

Testis torsiyonu sol taraftaki testiste sağa göre daha sık görülür. Bunun muhtemel nedeni sol taraftaki spermatik kordun sağa göre biraz daha uzun olmasıdır.<sup>69</sup> Testis torsiyonunda iskemik hasar testis torsiyonun derecesi ve torsiyon süresine bağlıdır. Testis torsiyonu görülen vakalarda derece genellikle 720 olarak belirtilmekle beraber bu derece 180 ile 1080 arasında değişebilir.<sup>74</sup> Testis torsiyonu tam, kısmi veya aralıklı olabilir. Tam torsiyon 360 ve daha fazla olan dereceler için tanımlanır. Kısmi torsiyon ise 360 dereceden düşük torsiyonları tanımlar. Kısmi torsiyonlarda bir miktar kan akışı devam eder ancak ağrının kendiliğinden düzelmesi söz konusu değildir. Aralıklı torsiyonda spermatik kordun dönme derecesi 360° veya 360°'nin üzerinde, tek taraflı ve ani başlangıçlıdır ancak torsiyon kısa sürelidir ve kendiliğinden düzelir. Aralıklı torsiyonun tam torsiyona dönme riski mevcuttur.<sup>74,85,86</sup> Testis torsiyonunda önemli olan diğer durum

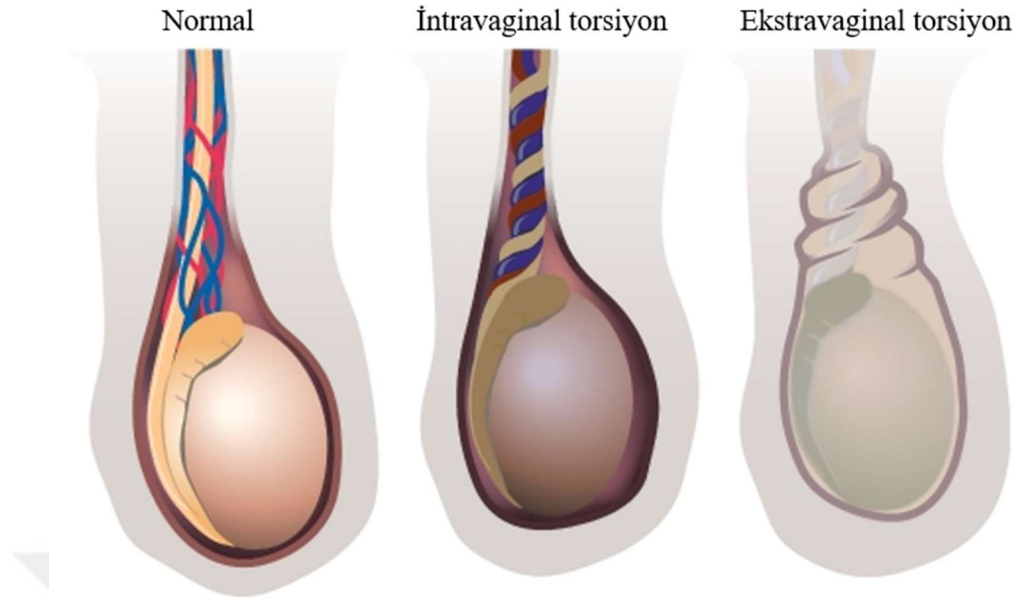
ise torsiyonun süresidir. Semptomlar başladıktan sonraki ilk 4-6 saat hastalar için kritik öneme sahiptir. Bu süre içerisinde yapılacak olan cerrahi müdahale ile testis fonksiyonları % 90-100 oranında kurtarılabilir. Cerrahi müdahale 6-12 saat aralığında yapılırsa testis fonksiyonları % 50 oranına, 12-24 saat aralığında yapılırsa bu oran % 10'un altına düşer.<sup>70,72</sup> Testis torsiyonu olan hastaların yaklaşık % 20-40'ının tedavisi testisin cerrahi olarak çıkartılması (orşiektomi) ile sonuçlanır.<sup>87</sup>

Testis torsiyonun iki tipi vardır; intravaginal ve ekstravaginal torsiyon (Şekil 8).<sup>74,88,89</sup>

**İntravaginal torsiyon,** torsiyon vakaları içerisinde % 90 oranıyla en yaygın görülen torsiyon tipidir. İntravaginal torsiyon ergenlik dönemindeki çocuklarda ve yetişkinlerde daha sık görülür. İntravaginal torsiyon tunika vaginalisin içerisinde spermatik kord yapılarının torsiyonu ile karakterizedir.<sup>74,89</sup> Bu durumun anatomik olarak predispozan faktörleri arasında; kremaster kas liflerinin anormal düzenlenişi, spermatik kordun tunika vaginalise olduğundan daha proksimalde tutunmasıyla oluşan bell-clapper (çan dili) deformitesi (en sık neden) ve spermatik kordun tamamen tunika vaginalis ile örtülü olması yer alır.<sup>69</sup> Bu faktörlere ek olarak ergenlik döneminde testisin hızlı büyümesi de intravaginal torsiyona neden olabilir.<sup>75</sup>

**Ekstravaginal torsiyon,** yenidoğanlarda görülen torsiyon tipidir. Bu torsiyon tipinin yaklaşık % 70 kadarı doğum öncesi anne karnında oluşurken, geri kalanı ise doğumdan sonraki ilk 1 ay içerisinde meydana gelmektedir. Ekstravaginal torsiyon, testis torsiyonu vakalarının % 5-10'unu oluşturur. Testis, spermatik kord ve tunika vaginalisin beraber torsiyonuyla oluşur. Etiyoloji genellikle idiyopatiktir ama testisin karın içinden esas yerine inişiyle ve tam anlamıyla sabitlenmemesiyle bu yapıların dönebileceği düşünülmektedir.<sup>90</sup>





Şekil 8. Testis Torsiyonu Tipleri.<sup>90</sup>

### 2.5. İskemi ve Reperfüzyon Hasarı

İskemi dokuya gelen kan akımının azalması veya durması olarak nitelendirilir. Reperfüzyon ise kan akımının tekrar sağlanması ile oksijenlenmenin başlaması olayıdır. İskemik kalan dokunun hızlıca reperfüzyona ihtiyacı vardır ama reperfüzyon paradoksal olarak doku hasarını ve tahribatını da arttırabilir. Bu süreç sonucunda ortaya çıkan klinik duruma ise iskemi-reperfüzyon hasarı adı verilir. İ/R hasarı sistemik inflamatuvar yanıtlar oluşturarak çoklu organ disfonksiyonu sendromu gelişmesine de neden olabilir.<sup>91</sup>

İskemi ve reperfüzyona bağlı doku hasarı, miyokard enfarktüsü<sup>92</sup>, iskemik inme, akut böbrek hasarı<sup>93</sup>, emboli, travma gibi çeşitli patolojilerde morbidite ve mortaliteye neden olur.<sup>91</sup> Testis torsiyonunun esas patofizyolojik mekanizması da İ/R hasarına bağlıdır.<sup>94</sup>

İskemi sırasında hücrede yapısal ve metabolik değişiklikler gözlenir. İskemik hasar, hipoksiye ve hücresel enerji depolarının azalmasına neden olur. İskemi ile oluşan anaerobik metabolizma sonucu açığa çıkan metabolitler daha derin doku hipoksisine ve mikrovasküler disfonksiyon ile hücre ölümüne neden olur. İskemik dokunun yenilenmesi ve toksik metabolitlerden arındırılması için kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) gerekir. Ancak reperfüzyonun başlamasıyla beraber dokuya gelen oksijen, ilk olarak ROS oluşmasına yol açar. ROS nötrofiller için kemotaktik aktivenin

oluşumundan sorumludur. Böylece lokal inflamasyon artar. Lipidler, proteinler ve nükleik asitler reperfüzyon hasarına oldukça duyarlı hücresel bileşenlerdir. Bu yapıların reperfüzyonda daha fazla etkilenmesiyle, iskemi sonucunda oluşan bağışıklık yanıtı ve hücre ölüm mekanizmaları daha da artar. Bölgeye gelen nötrofiller endotelyuma yapışarak proteolitik enzimlerin, özellikle de elastazın salgılanmasıyla hasara aracılık eder. Endotel hücrelerinin olaya dahil olmasıyla doku ödemi ve mikrovasküler permeabilite artışı meydana gelir. Endotel hücrelerinden ya da makrofajlardan interlökin ve sitokin ekspresyonu artar. Adezyon molekülleri aracılığıyla nötrofil ve trombosit agregasyonu, parankim veya dokuda revaskülarizasyonu engeller. Uzun süreli İ/R hasarı dokuda ya da hücrede nekroz, apopitoz ve nekropitoz gibi hücre ölüm mekanizmalarına yol açar.<sup>95-98</sup>

İ/R hasarının fizyopatolojisinden birçok mekanizma sorumludur. Bunlar arasında;

- 1) Reaktif oksijen radikalleri
- 2) Lipid peroksidasyonu ve malondialdehit
- 3) Polimorfonüklear lökositler ve endotel hücreleri
- 4) Kalsiyum ve apopitoz
- 5) Sitokinler yer alır.<sup>95,98</sup>

### **2.5.1. Reaktif Oksijen Radikalleri**

Serbest radikaller fizyolojik ve patofizyolojik birçok olaydan sorumlu vücut için önemli moleküllerdir. Fizyolojik olarak patojenlere karşı savunmada ve metabolizma, bağışıklık, büyüme ve farklılaşmayı içeren birçok homeostaz sürecinde önemli rol oynarlar. Patofizyolojik etkiler arasında hücreleri, hücresel elemanları ve dokuları bozmak yer alır. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşanlardır ve bunlara ROS adı verilir. ROS'lar kararsız yapıda eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Aşırı üretilen ROS vücutta oksidatif strese neden olur.<sup>99,100</sup> ROS'lar çoğu hücre tarafından üretilbildikleri gibi esas olarak fagositik hücrelerde meydana gelirler. Özellikle makrofajlar, polimorfonüklear nötrofiller ve endotel hücreleri burada görev alır.<sup>101</sup>

Moleküler oksijen, hücrede enerji üretimi için gereklidir. Normalde, oksijen hücre içinde sitokrom oksidaz sistemi ile suya dönüşür ( $O_2 + 4e^- + 4H + 2H_2O$ ).<sup>102</sup> İ/R

durumunda ilk olarak bir elektronun ( $e^-$ ) transferi sonucunda süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) oluşur. Süperoksit radikali kısa ömürlü, lokal ve membranı geçme potansiyeli düşüktür. Bu yüzden  $O_2^-$  kendinden daha fazla reaktif olan diğer oksijen radikallerin oluşumuna yol açarak hücrel toksisiteyi artırır. Süperoksit radikali, nitrik oksit ile reaksiyona girerek son derecede reaktif bir ürün olan peroksinitrite ( $ONOO^-$ ) dönüşür. Yine daha uzun ömürlü ve hücre membranına yayılma potansiyeli daha yüksek bir ürün oluşmak üzere  $O_2^-$  kendiliğinden veya süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) çevrilir.  $H_2O_2$ , peroksidazlar tarafından katalize edilerek son derece reaktif bir ürün olan hidroklorik asit (HCl) oluşturur.<sup>100</sup> Reaktiviteleri sınırlı olan  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$  beraber çok daha aktif olan hidroksil ( $OH^\cdot$ ) radikalini oluştururlar. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir.  $OH^\cdot$  iyonunun bir diğer oluşum mekanizması ise,  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$ 'nin metal iyonlarıyla (demir, bakır, nikel vs.) reaksiyona girmesidir (Fenton reaksiyonu). ROS oluşum mekanizmaları arasında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz ve ksantin oksidoredüktaz (XOR) enzimleri tarafından oluşturulan reaksiyonlar da yer alır. Bu reaksiyonlarla beraber hücrede aşırı ROS oluşumu meydana gelir.<sup>103,104</sup> Bu artış karşısında vücut kendini savunmaya alır. Bu savunma mekanizmaları glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan antioksidan biyomoleküllerdir ( tokoferol (E vitamini), askorbik asit (C vitamini), karotenoidler, ürik asit ve polifenoller).<sup>104</sup> Saydığımız antioksidan enzimler, ROS ile reaksiyona girerek onları toksik olmayan bileşiklere çevirir ve ROS'un etkilerini engellemeye çalışır. Oksidan ve antioksidan arasındaki denge fazla sayıda ROS artışıyla beraber bozulur. Bozulan dengeyle beraber ROS lipidler, proteinler ve karbonhidratlar gibi hücreyi oluşturan yapılarla etkileşime girerek hücre membran bütünlüğü bozulmasına ve DNA hasarına yol açarak hücrenin ölümüne neden olabilir.<sup>103,105</sup>

ROS, lipidlerin peroksidasyonuna ve nötrofil göçünü sağlayan kemoaktanların aktivasyonuna neden olarak da İ/R hasarının şiddetlenmesine yol açar. Bu durum mikrovasküler yatakta revaskülarizasyonun engellenmesine ve aktive nötrofiller, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan yan ürünler gibi çeşitli etkenlerle protein oksidasyonuna neden olabilir.<sup>95</sup>

### 2.5.2. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit

Lipidler, hücrenin temel yapı taşlarından birisidir. Lipidler iki gruba ayrılır; polar ve apolar. Apolar lipidler yani trigliserit, yağ dokuda birikerek vücudun esas enerji deposunu oluşturur. Polar lipidler ise hücre zarının ana bileşeni olup özellikle hücre polarite ve geçirgenlikten sorumludurlar. Aynı zamanda lipidler sinyal molekülü olarak da görev alırlar.<sup>106</sup>

Lipid peroksidasyonu, lipidlerin serbest radikaller veya radikal olmayan oksidan türler ile yükseltgenmesi sonucu bozulmasıdır.<sup>106</sup> Bu bozulma vücutta fizyolojik veya patolojik olarak meydana gelebilir. Fizyolojik olarak, lipid peroksidasyon ürünleri sinyal molekülü olarak görev yapabilir. Kanseri, iske-mi-reperfüzyon, diyabet ve inflamatuvar hastalıklar<sup>107</sup> gibi patolojik durumlarda antioksidan savunma sistemleri yeterli etkiyi gösteremez ve hücre ölümü meydana gelir. Lipidler arasında peroksidasyondan en çok etkilenenler araşidonik asit, linoleik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri<sup>108</sup>, glkolipidler, kolesterol ve fosfolipidlerdir.<sup>106</sup> Lipid peroksitler, enzimatik veya enzimatik olmayan reaksiyonlarla meydana gelebilir.<sup>108</sup> Her iki durumda da lipid molekülü, lipid radikali oluşturmak üzerine oksitlenir. Lipid peroksitlerin oluşumunu sağlayan enzimler arasında lipoksijenaz, siklooksijenaz, miyeloperoksidaz ve NADPH oksidaz yer alır.<sup>109</sup> Enzimatik olmayan reaksiyonlar ROS aracılı gerçekleşir. Lipidleri etkileyen esas reaktif radikal OH<sup>-</sup> iyonudur. Lipid peroksitler, özellikle ROS oluşumuna yol açan Fenton reaksiyonu ile meydana gelir.<sup>110</sup> Lipid peroksitler yapısı gereği bozulmaya eğilimlidirler ve sonuçta bu bozulmayla daha reaktif olan hidroksi asitler ve aldehitler oluşur. Hidroksi asitler, lipid peroksitlerin doğrudan indirgenme ürünleridir.<sup>108</sup> Diğer grup olan aldehitler ise hücre için oldukça toksiktir ve bunlar arasında malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (4-HNE), propanal ve heksanal yer alır. 4-HNE lipid peroksidasyon ürünlerinin en toksik olanı, MDA ise en mutajenik olanıdır.<sup>106</sup>

MDA, lipid peroksidasyonu ile üretildiği gibi prostoglandin biyosentezi yoluyla da endojen olarak üretilebilen bir dialdehittir. Yapılan araştırmalarda MDA'nın bakteri ve memelilerde mutajenik, sıçanlarda ise kanserojenik olduğu görülmüştür.<sup>111</sup> MDA, DNA veya proteinlerle kovalent çapraz bağlar oluşturur. Bunun sonucunda proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısının bozulmasına ve işlev kaybına neden olur.<sup>108</sup> MDA'nın proteinlerle etkileşimi sonucu bir yan ürün olarak MDA-asetaldehit-protein kompleksi oluşur. Albümin modifikasyonu ile plazmada MDA-asetaldehit seviyesinin artmasıyla

hücreler arası adezyon molekülü 1 (ICAM-1) ve vasküler sellüler adezyon molekülü (VCAM) faktörleri aktive edilir ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ekspresyonunda bir artış meydana gelir. Böylece bu kompleks proinflamatuvar reaksiyonları başlatmada rol alır.<sup>112</sup> MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile kolay reaksiyonu nedeniyle biyolojik numunelerde lipid peroksidasyonunu tespit etmek ve ölçmek için uygun bir belirteç olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır.<sup>106</sup>

Lipid peroksidasyonunda en çok etkilenen yapılardan birisi de hücre membranıdır. Hücre membranının yapısında bulunan lipid çift tabakada meydana gelen peroksidasyonla membran yapısı bozulur. Hücre zarının akışkanlığı azalır ve geçirgenliği artar. Bu durum hücrenin yapısında bozulmaya neden olur.<sup>108</sup> Aynı zamanda lipid peroksidasyon ürünleri apoptozi tetikleyebilir. Bunu membran reseptörleri ve transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girerek intrinsik ve ekstrinsik apoptoz yollarını uyarak gerçekleştirebilir.<sup>110</sup>

### **2.5.3. Polimorfonükleer Lökositler ve Endotel Hücresi**

Polimorfonükleer lökositler (PMNL) diğer ismiyle nötrofiller memelilerde % 50-70 oranında en çok bulunan beyaz kan hücreleridir.<sup>113,114</sup> PMNL, güçlü antimikrobiyal özelliğe sahip olan ve hasarlı dokuya ilk ulaşan bağışıklık hücreleridir. Bu hücreler akut yaralanma, otoimmün hastalıklar, kanser, İ/R ve kronik inflamatuvar hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarda rol oynar.<sup>115,116</sup> Nötrofillerin temel görevi enfeksiyöz ajanları tanımak ve fagositoz ile bu ajanların ortadan kaldırılmasını sağlamaktır.<sup>113</sup>

İ/R, dokuda bir inflamatuvar tepkiye ve hücre ölümüne neden olur. Doku hasarı sonucu ROS, lipid peroksidasyonu ve hasarla ilişkili moleküler patternler (DAMP) oluşur. Bunlar lökosit ve makrofaj aktivasyonuna, kemotaksise ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna neden olur. Nötrofillerin İ/R hasarına aracılık eden rolleri vardır. Bunlar arasında; ROS oluşumu, matriks metalloproteinaz (MMP-8, MMP-9) ve inflamatuvar sitokin (TNF- $\alpha$ ) üretimi, vasküler permeabilite artışı ve sitotoksik enzim salgısı yer alır. Bu mekanizmalarla nötrofiller İ/R yaralanma şiddetini arttırırlar.<sup>98,114,117,118</sup>

İ/R hasarı sonrası özellikle reperfüzyon sonra mikrovasküler geçirgenliğin artmasıyla nötrofillerin aktivasyonu, kemotaksisi, endotele yapışması ve bağ doku içerisine göçü meydana gelir.<sup>119</sup> Hasarlı bölgeye ulaşan lökositlerin endotel hücresine adhezyonunu sağlayan moleküller selektinlerdir. Üç çeşit selektin bulunur; L, P ve E

selektin.<sup>98</sup> İ/R hasarı ile endotelde bulunan P-selektin miktarı artar ve hasar bölgesine gelen lökositlerin yüzeyinde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) reseptörü ile birleşerek lökosit-endotel hücre bağlantısının ilk kısmı oluşur. Kan akımının etkisiyle nötrofil, endotel hücresi üzerinde yuvarlanmaya başlar.<sup>119</sup> Daha sonra lökositte bulunan beta 2 integrin ailesi üyeleri lenfosit fonksiyon antijen-1 (LFA-1 veya CD11a/CD18) ve makrofaj antijen 1 (MAC-1 veya CD11b/CD18) ile endotel hücresinde bulunan ICAM-1 ve ICAM-2 bağlanarak lökosit adhezyonu ve agregasyonu sağlanmış olur. Endotele sıkı bağlantı oluşması için LFA-1 ve ICAM-1 bağlanması esastır.<sup>116</sup> Bu olaydan sonra nötrofillerin endotel hücrelerinin arasından göçü başlar. Trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (PECAM-1), ICAM-2 gibi faktörler ile endotel hücre bağlantıları gevşer ve lökositlerin göçü gerçekleşmiş olur.<sup>98,120</sup> Endotel hücresini geçip damar dışına ulaşan nötrofillerin hasarlı dokuya gelebilmeleri çeşitli kemotaktik ajanlar sayesinde olur. Bu süreçte yer alan kemotaktik ajanlar arasında kompleman faktörleri (C3a, C5a), lökotrien B4, interlökin 1 (IL-1), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve prostoglandiler vardır.<sup>98</sup>

Hasarlı dokuya gelen nötrofiller; sitokinler (TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B), proteolitik enzimler (nötrofil elastaz gibi) ve ROS salgılayarak hasarın şiddetinde ve mikrovasküler geçirgenlikte artışa, ödem ve tromboza neden olur.<sup>98,120</sup> Nötrofillerde bulunan NADPH oksidaz, miyeloperoksidaz ve NOS, ROS oluşumundan sorumludur.<sup>120,121</sup> ROS salınımı ile ölü hücreler ve hücre kalıntıları temizlenir ancak oksidatif stresin şiddetlenmesiyle temel matriks proteinlerinde bozulma ve apoptoz meydana gelebilir.<sup>120</sup>

#### **2.5.4. Kalsiyum ve Apoptoz**

Kalsiyum hücre fonksiyonlarının en önemli düzenleyicilerinden birisidir. Kalsiyumun görev aldığı fizyolojik olaylar arasında hücre büyümesi/gelişimi, hücre fonksiyonların sürdürülmesi, proliferasyon ve hücre hareketliliği yer alır. Kalsiyum aynı zamanda ikinci haberci olarak hücre sinyallerinde de önemli yere sahiptir. Kalsiyumun bir diğer önemli görevi hücre ölümünü düzenlenmesidir. Vücutta sitoplazmik Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonunun korunması için çeşitli iyon kanalları, taşıyıcılar, pompalar ve proteinler bulunur. Aynı zamanda bazı sitoplazmik organellerde (mitokondriyon ve endoplazmik retikülüm) Ca<sup>+2</sup> depolanması sitozolik Ca<sup>+2</sup> homeostazını sağlamaya yardımcıdır.<sup>121–123</sup>

İskemi sırasında doku oksijenizasyonu bozulur ve hücre içi ATP miktarı düşmeye başlar ve buna bağlı olarak hücre pH'ı düşer. Hücre içindeki enerjinin düşmesi sonucu Sodyum/Potasyum Adenozin Trifosfataz (Na/K ATPaz) ve Kalsiyum Adenozin Trifosfataz ( $\text{Ca}^{+2}$  ATPaz) pompası inaktive olur. Reperfüzyon ile oksijenizasyonun yeniden sağlanmasıyla beraber ROS'ların aşırı üretimi meydana gelir. Bu olaylar intrasellüler  $\text{Ca}^{+2}$  dağılımını bozar ve hem sitozolik hem de mitokondriyal  $\text{Ca}^{+2}$ 'da aşırı artış meydana gelir. Bu durum mitokondriyonlarda mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenəğinin (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) açılmasına neden olur. MPTP'nin açılmasıyla içeriye giren su ve çeşitli maddeler mitokondriyonun şişmesine, dış mitokondriyal zarın hasarlanmasına, apoptoz, otofaji ve programlanmış nekroz (nekroptoz) gibi hücre ölüm mekanizmalarının başlamasına neden olur.<sup>124-126</sup> Mitokondriyonlara  $\text{Ca}^{+2}$  geçişinin önlenmesinin İ/R hasarında koruyucu etkisi olduğu bildirilmektedir.<sup>127</sup>

Apoptoz, genetik olarak kontrol edilen, kromatin yoğunlaşması, çekirdek parçalanması ve sonunda plazma zarının apoptotik cisimciklere tomurcuklanması ile karakterize, inflamatuvar olmayan programlanmış hücre ölüm mekanizmasıdır.<sup>128</sup> Apoptoz fizyolojik olarak embriyonik gelişim sırasında ve yetişkin organizmasında doku homeostazının sağlanmasında önemli rol oynar. İnsanlarda kanser, otoimmün hastalıklar, İ/R hasarı, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumlar apoptozin anormal aktivasyonuna neden olur. Apoptoz ile hücre ölümünün başlamasının altındaki ana neden hücredeki  $\text{Ca}^{+2}$  iyon miktarının artışıdır.<sup>126,129</sup> Apoptoz, hücrede sistein proteaz ailesi olan kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktif kaspazlar, endonükleazların aktivasyonu, nüklear proteinlerin yıkımı, proteinlerin çapraz bağlanması, fagositik hücreler için ligandların ekspresyonu ve apoptotik cisimciklerin oluşumuna yol açan bir dizi mekanizmayı başlatır.<sup>130</sup> Kaspazlar iki yol ile aktive olurlar; ekstrinsik ve intrinsik yol. Ekstrinsik yol doku hasarına birincil inflamatuvar yanıt gerektirmekle beraber  $\text{Ca}^{+2}$  ve ROS'a hemen yanıt veren intrinsik yolun biraz gerisinde kalabilir. Ekstrinsik yol, proinflamatuvar ligandlar olan FASL, TNF- $\alpha$  ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) ile uyarılan hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerin aktivasyonu ile başlar. İntrinsik yolu başlatan faktör ise, mitokondriyal  $\text{Ca}^{+2}$  iyon artışı ve ROS salınımıyla MPTP'nin açılması ve mitokondriyonlardan proapoptotik faktörlerin (sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör gibi) salınmasıdır.<sup>128,129</sup> Her iki yol da efektör

kaspazlardan biri olan kaspaz-3'ün aktivasyonu ile sonuçlanır. Kaspaz-3 hem çekirdek ve hücre iskelet proteinlerini sindirir hem de endonükleaz G gibi diğer deoksiribonükleazların (DNaz) aktivasyonunu sağlar. Kaspaz-3 tarafından aktive edilmiş DNaz (CAD), DNA'yı internükleozomal bağlanma bölgelerinden ayırarak DNA parçalanmasına neden olur. DNA'da kromatin yoğunlaşması ve fragmanlarına ayrılma gözlenir.<sup>131</sup> Kaspaz-3 diğer taraftan da hücre membranının tomurcuklanmasına neden olur, sonuçta apoptotik cisimcikler oluşarak sağlıklı hücreler ya da makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptotik cisimcikler fagosite edilmediği takdirde DAMP'ların salınması gerçekleşir ve onlar da proinflatuvar yanıtı neden olur.<sup>132</sup>

Bu etkilerden dolayı kaspaz-3'ün endojen olarak saptanması hem apoptozin varlığı ve mekanizmalarının anlaşılmasında hem de apoptoz ile ilişkili hastalıkların tanı ve tedavisinde önem oluşturur.<sup>133</sup>

#### **2.5.5. Sitokinler**

Sitokinler makrofajlar, monositler, lenfositler ve lökositler tarafından üretilen, suda çözünür salgisal polipeptitlerdir.<sup>134</sup> Otokrin, parakrin ve endokrin yollarla hücreler arası etkileşimi sağlarlar. Sitokinler spesifik reseptörleri ile bağlanıp bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını, çoğalmasını ve aktivasyonunu etkiler.<sup>135</sup> Aynı sitokin birkaç farklı hücre tarafından üretilebilir veya bir sitokin hedef hücreyi etkileyerek diğer sitokinlerin aktivasyonunu sağlayabilir ve birbirlerinin etkisini artırıp azaltarak etki gösterebilir. Sitokinler proinflatuvar veya antiinflatuvar etkiler gösterebilir.<sup>136</sup> Proinflatuvar sitokinler İ/R hasarı gibi oksitadif stres artışı ve inflamasyonda nötrofillerin toplanmasına, apoptoz sürecinin ilerlemesine neden olarak inflamasyonu düzenler.<sup>137</sup> TNF- $\alpha$ , interlökin 1-beta (IL-1 $\beta$ ), interlökin-6 (IL-6) ekspresyonlarının hasarlı testis dokularında artmış olduğu bildirilmektedir.<sup>138</sup>

TNF- $\alpha$ , diğer ismiyle kaşektin, inflamatuvar reaksiyonlarda ilk artan sitokindir. TNF- $\alpha$  esas olarak monositler ve makroflarda sentez edilseler de nötrofiller, endotel hücreleri, lenfositler de üretimde yer alır. Yarı ömrü 20 dakika kadar kısa olmasına rağmen, hasar bölgesinde hızla artarak diğer sitokinlerin aktivasyonuna ve hücrede metabolik değişikliklere neden olur. Aynı zamanda birçok molekülün aktivasyonunda ve salgılanmasında rol oynar. Bunlar arasında adezyon molekülleri, prostaglandinler, lenfositler, monositler, makrofajlar, trombosit aktive edici faktör (PAF), eikosanoidler ve



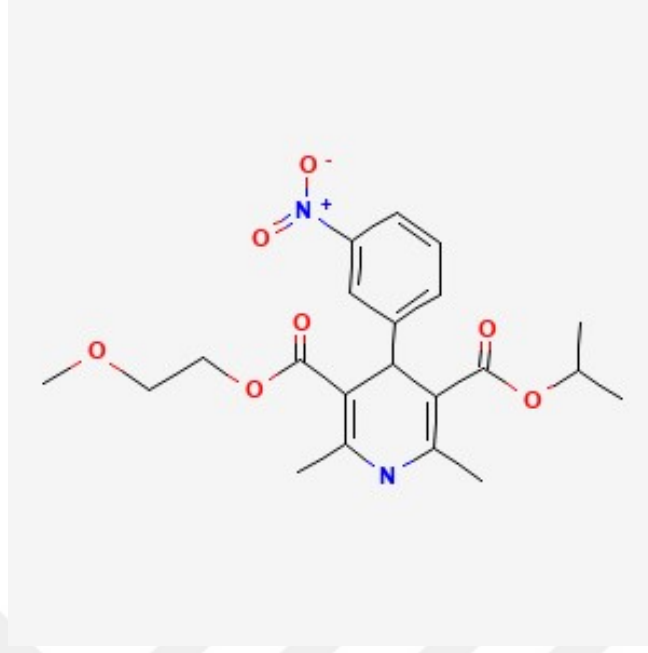
pıhtılaşma faktörleri yer alır. TNF- $\alpha$  sinyal yolları üzerindeki etkilerini tümör nekrozis faktör reseptörü 1 ve 2 (TNFR1 ve TNFR2) ismindeki iki reseptör aracılığıyla yapar.<sup>134,135,139</sup> TNF- $\alpha$ -TNFR1 kompleksi apoptoz ve nekropitoz aracılığıyla hücre ölümünü artırarak inflamasyonun şiddetinin artmasına neden olur. TNFR2 ise TNF- $\alpha$ 'nın ve TNFR1 aracılı toksisitenin artmasına yardımcıdır.<sup>140,141</sup>

TNF- $\alpha$ , sağlıklı testis dokusunda germ hücreleri, özellikle yuvarlak spermatidler tarafından sentez edilerek testis fonksiyonlarının korunmasında görev alır. TNFR'ler Sertoli ve Leydig hücrelerinde bulunur. İ/R hasarına uğrayan testiste özellikle reperfüzyonda TNF- $\alpha$  seviyesi yükselerek, inflamasyon daha da şiddetlenir; nötrofillerin ve lenfositlerin sayısı artar, makrofajlar aktive olur. Bu da germ hücre apoptozine ve spermatogenezisin bozulmasına neden olur.<sup>142</sup>

## 2.6. Nimodipin

Nimodipin, L tipi kalsiyum kanallarını bloke ederek hücre içine  $Ca^{+2}$  girişini engelleyen, lipofilik yapıda, ikinci nesil 1,4-dihidropridin kalsiyum kanal blokörüdür.<sup>143,144</sup> L tipi kalsiyum kanalları (LTCC'ler), Cav.1 olarak da bilinen voltaj duyarlı kalsiyum kanallarıdır. LTCC'ler uzun süreli içe doğru akımlara aracılık etmede önemli bir rol oynar ve düz kas kasılması, hücre döngüsü, myokardiyal kontraktilite, nöronlarda sinir iletimi ve gen ekspresyonu da dahil olmak üzere çeşitli dokularda fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır. Kalsiyum homeostazisinde bozulmalar nörolojik, kardiyovasküler, kas ve psikiyatrik hastalıklar ile ilişkilidir.<sup>145</sup> LTCC inhibitörleri, hücrelere  $Ca^{+2}$  iyonlarının girişini azaltarak etki gösterirler. Bu ilaçların kullanım alanı önceleri kardiyovasküler sistem hastalıkları ile sınırlı iken, yapılan güncel çalışmalarda beyin ve endokrin sistem dahil birçok organ ve sistem hastalığında pozitif etkileri gösterilmiştir.<sup>146</sup>

Nimodipin, 3-O-(2-metoksietil) 5-O-propan-2-il 2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat'a sahip olan 1,4-dihidropiridin halka yapısına sahiptir. Nimodipin, suda çözünmeyen sarı kristal bir bileşiktir. Nimodipinin çözündüğü maddeler arasında etanol, polietilen glikol 400 ve dimetil sülfoksit yer alır (Şekil 9).<sup>147</sup>



Şekil 9. Nimodipinin biyokimyasal yapısı.<sup>148</sup>

Nimodipin, LTCC'lerin vücutta dağılımın bağlı olarak özellikle serebral arterler ve nöronlar olmak üzere birçok hücreye etki eder.<sup>149</sup> Nimodipin amfipatik bir bileşik olup, beyin kan damarlarına olan seçiciliği, ilacın artan lipofilik özellikleri nedeniyle kan-beyin bariyerinden rahatlıkla geçebilmesine bağlanmıştır. Beyine spesifik bu etkisiyle SAK tedavisinde serebral arterlerde vazospazmı önlemek için kullanılır.<sup>147</sup> Aynı zamanda beyinde kan akışının düzenlenmesine ve serebral vazospazm sonucu oluşan komplikasyon riskini azaltmaya yardımcı olur. Bu iyileşmeyi sağlamada nimodipinin muhtemel etki mekanizmalarından birkaçı şöyledir;

- Anjiyografik vazospazmın azalması,
- Fibrinolizis aktivasyonunda artma ile pıhtı oluşumunun azalması,<sup>150</sup>
- Nöronal koruma sağlanması,
- Kortikal yayılan iskeminin sınırlandırılmasıdır.<sup>149,151</sup>

Nimodipin, vasküler düz kas hücrelerinde  $Ca^{+2}$  alınımasını inhibe eder ve periferik kan damarlarında vazodilatasyona neden olarak kan basıncının düşmesini sağlar. Bu etkinin oluşabilmesi için gerekli dozdan çok daha düşük dozlarda beyin kan damarlarında

vazodilatasyona neden olur. Böylelikle sistemik kan basıncı düşmeden serebral kan akımında iyileşme sağlanmış olur.<sup>152</sup>

Nimodipin sadece serebral vazospazmı engellemekle kalmaz aynı zamanda vücuttaki birçok hücre tipini de etkiler. Yapılan çalışmalar nimodipinin hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarının korunmasını sağlayarak hasar sonrası hücredeki apoptozi azalttığını ve böylelikle nöronal aktivitede iyileşme sağladığını göstermiştir.<sup>153</sup>

Nimodipinin kullanılan ilaç formları oral tablet, oral solüsyon ve intravenöz infüzyon şeklindedir. İntravenöz formu Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanmamıştır. Nimodipin, SAK hastalarında hastalığın başlangıcı itibariyle 21 gün boyunca 60 mg oral olarak uygulanmaktadır. Nimodipin karaciğerde sitokrom P450 (CYP) enzim sistemine ait CYP3A4 ve CYP3A5 tarafından metabolitlerine ayrılır. Nimodipinin terminal yarı ömrü yaklaşık 8-9 saattir ama ilk eliminasyon etkisi hızlı olduğu için ilaç dozu her 4 saatte bir tekrarlanmalıdır. Nimodipin metabolitler halinde böbrek yoluyla atılır. Nimodipinin karaciğerden ilk geçiş etkisi yani metabolizması ve ilacın etkinliği yaşa bağlıdır. Yapılan çalışmalarda yaşlı bireylerde bu oranların çok daha düşük olduğunu göstermiştir. İlacın cinsiyet üzerinde bir farklılığı bulunmamıştır.<sup>147,149,154</sup>

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney Düzenegi

Sunulan çalışma, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (SABİDAM) yapılmıştır. Deney sürecindeki tüm işlemler 1986 Uluslararası Strasbourg Hayvan Hakları Evrensel Beyannamesine uygun olarak, Ç.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile (toplantı sayısı 3, karar numarası 14, toplantı tarihi 22.04.2022) veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirildi.

Sıcaklık  $22\pm2^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutuldu. Aydınlik-karanlık döngüsü otomatik denetleyici bir aygıt yardımı ile 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Havalandırma pencere tipi aspiratörle sağlandı. Sıçanlar paslanmaz tel kapakları olan plastik kafesler içerisinde tutuldu. Kafeslerin içerisine altlık olarak talaş serildi ve her gün talaşları değiştirildi. Hayvanlar hazır pellet yem ile beslenirken, su gereksinimlerinde çeşme suyu kullanıldı. Tüm hayvanların su ve besin alımları serbest olarak sağlandı.

Çalışmada toplam 40 adet, 250-300 gr ağırlığında Wistar Albino türü erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar random olarak 5 gruba ayrıldı ( $n=8$ );

**1. Grup: Sham operasyon grubu:** Sıçanların skrotumuna iki cm uzunluğunda cilt ve cilt altı kesisi uygulanıp, 4/0 ipek sütür ile kapatıldı.

**2. Grup: Testis Torsiyon grubu (TT):** Testis torsiyonu, sol testis açığa çıkartılıp saat yönünde  $720^{\circ}$  döndürülerek gerçekleştirildi. Torsiyonun sürdürülebilmesi için testis tunika albugineasından skrotuma 4/0 ipek sütür ile tespit edildi. Sıçanlar 3 saatlik torsiyon süresinden sonra sakrifiye edildi (Şekil 10).

**3. Grup: Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu (TT/D):** Torsiyon grubundaki işlemler aynı şekilde uygulanıp, 3 saatlik torsiyonun ardından cilt sütürleri açıldı, tespit dikişleri alındıktan sonra testis saat yönünün tersine döndürülerek düzeltildi. İnsizyon tekrar 4/0 ipek sütür ile kapatılıp reperfüzyon sağlanan sıçanlar 3 saat boyunca normal laboratuvar şartlarında yaşatıldı. Sıçanlar 3. saatin sonunda sakrifiye edildi (Şekil 11).

**4. Grup: Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup (TT/N):** Torsiyon grubundaki işlemler aynı şekilde uygulanıp, 3 saatlik torsiyon süresinden 2,5 saat sonra 1 mg/kg nimodipin intraperitoneal (i.p) yolla uygulandı. Bu işlemten yarım saat sonra sıçanlar sakrifiye edildi.

**5. Grup: Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup (TT/D/N):** T/D grubundaki işlemler aynı şekilde uygulandı ve 3 saatlik torsiyon işleminden 2,5 saat sonra 1 mg/kg nimodipin i.p. yolla uygulandı. Bu işlemden yarım saat sonra detorsiyon işlemi gerçekleştirildi. Detorsiyon işleminden 3 saat sonra sıçanlar sakrifiye edildi.

Bütün cerrahi işlemler intramusküler uygulanan 2 mg/kg xylazine ve 12,5 mg/kg ketamin anestezisi altında gerçekleştirildi. Anestezi altında sıçanlardan biyokimyasal incelemeler için intrakardiyak kan örnekleri alındı. Sakrifiye edilen sıçanlardan elde edilen testis doku örnekleri ışık mikroskopik, immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik incelemeler için doku hazırlama yöntemlerine uygun olarak hazırlandı ve mikrografları elde edildi. Elde edilen veriler uygun istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi.



**Şekil 10.** Torsiyon uygulanmış testis görünümü.



**Şekil 11.** Detorsiyon uygulanmış testis görünümü.

### **3.2. Işık Mikroskopik Doku Hazırlama Yöntemi**

Bouin solüsyonuna alınan testis doku örnekleri 8 saatlik tespitin ardından, 6 saat boyunca % 50'lik alkolde bekletilip % 70'lik alkole alındı. Daha sonra dokuların Leica TP 1020 (Leica Biosystems, Germany) ototeknikon cihazı ile Tablo 1'de belirtilen rutin doku takipleri yapıldı.

**Tablo 1.** Işık mikroskopik doku takip yöntemi.

|                  |                     |                  |
|------------------|---------------------|------------------|
| Oda sıcaklığında | % 70'lik etil alkol | 1 saat           |
| Oda sıcaklığında | % 80'lik etil alkol | 1 saat           |
| Oda sıcaklığında | % 90'lik etil alkol | 1 saat 30 dakika |
| Oda sıcaklığında | Saf alkol           | 1 saat           |
| Oda sıcaklığında | Saf alkol           | 1 saat           |
| Oda sıcaklığında | Saf alkol           | 1 saat 30 dakika |
| Oda sıcaklığında | Saf alkol+Ksilol    | 1 saat           |
| Oda sıcaklığında | Ksilol              | 1 saat           |
| Oda sıcaklığında | Ksilol              | 1 saat 30 dakika |
| 60°C             | Parafin             | 1 saat           |
| 60°C             | Parafin             | 1 saat 30 dakika |

Doku takibi bittikten sonra dokular parafin içine gömülerek blok haline getirildi. Elden edilen bloklardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında parafin kesitler alınarak, Hematoksilen & Eozin boyama yöntemi ile boyandı. Olympus BX53 (Tokyo, 29 Japonya) ışık mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

### 3.3. Johnsen Tübüler Biyopsi Skoruması

Johnsen tübüler biyopsi skoruması (JTBS), seminiferöz tübüller boyunca karşılaşılan hücrelerin profiline göre spermatogenezisi ölçmek için on puanlık bir puanlama sistemi içerir. JTBS'nin 10 olması maksimum spermatogenezis aktivitesini gösterirken, 1 skoru germ hücrelerinin tamamen yokluğunu gösterir. Yöntem pratiktir ve uygulanması kolaydır ve seminal analizlerin sonuçları ile testis biyopsilerinin sonuçları arasında bir bağlantı sağlar. Her gruptan 10 farklı kesitten 20'şer seminiferöz tübül incelendi. Her grup için ayrı ayrı 200 adet tübül değerlendirildi ve her birine Tablo 2'deki kriterlere göre 1'den 10'a kadar puan verildi.<sup>155,156</sup>

**Tablo 2.** Johnsen Tübüler Biyopsi Skoru.

|           |                                                                            |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>1</b>  | Tübüler kesitlerde hücre yok                                               |
| <b>2</b>  | Germ hücreleri yok, sadece Sertoli hücreleri var                           |
| <b>3</b>  | Sadece spermatogonyum mevcut                                               |
| <b>4</b>  | Sadece birkaç spermatozoid mevcut                                          |
| <b>5</b>  | Spermatozoa yok, spermatid yok ama birkaç veya birçok spermatozoid bulunur |
| <b>6</b>  | Sadece birkaç spermatid mevcut                                             |
| <b>7</b>  | Spermatozoa yok ama çok sayıda spermatid var                               |
| <b>8</b>  | Sadece birkaç sperm mevcut                                                 |
| <b>9</b>  | Çok sayıda sperm mevcut ancak düzensiz germinal epitel                     |
| <b>10</b> | Tam spermatogenezis ve normal düzenli tübüller                             |

### 3.4. İmmünohistokimyasal İnceleme Yöntemleri

Apopitozin göstergelerinden birisi olan kaspaz-3, apopitozin hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarında önemli bir araçtır. TNF- $\alpha$  proinflamatuvar bir sitokin olmakla beraber testis yaralanmalarındaki patojenik süreçte değişiklik gösterir. Sakrifiye edilen sıçanlarda kaspaz-3 ve TNF- $\alpha$  immünreaktivite incelemeleri için testis doku örnekleri % 10'luk nötral formalin içerisinde alınarak 72 saat süreyle tespit edildi. Tespit edilen doku örnekleri Leica TP 1020 (Leica Biosystems, Germany) ototeknikon cihazı ile Tablo 1'de belirtilen rutin doku takipleri yapıldı. Daha sonra parafine gömülen örneklerden, polilizin kaplı lamlara 4  $\mu$ m kalınlığında kesitler alındı. Kesitler ilk olarak fön makinesi ile kurutularak 15 dakika buzdolabında bekletildi ve ardından 60°C'de etüvde ksilol içerisinde 15 dakika deparafinize edildi. Daha sonra oda ısısındaki ksilol içerisinde 3 dakika daha bekletilen testis doku kesitleri, derecesi giderek azalan alkol serileri ile hidrate edildi. Distile suyun ardından sitrat solüsyonu (pH: 6) içerisinde alınan kesitler 95°C'lik su banyosunda, 30 dakika bekletilerek antijenlerin açığa çıkması sağlandı. Ardından oda ısısında 45 dakika soğutulan kesitler, distile suda yıkanarak endojen peroksitlerin bloklanması için % 3'lük hidrojen peroksit içerisinde alındı ve 15 dakika bekletildikten sonra, distile su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesitin etrafı dikkatlice kurulandıktan sonra üzerine nonspesifik bağlanmayı engellemek için blocking solüsyonu (ab93705, abcam, USA) damlatıldı. Oda ısısında 20 dakika bekletildikten sonra kesitler distile su ve fosfat tamponundan geçirildi ve dokuların etrafı kurutma kağıdı ile kurulandı. 1/100 oranında dilue edilen Anti-TNF- $\alpha$  (STJ97489, St. John's Laboratory) ve 1/100 oranında dilue edilen Anti-CASP3 (STJ97448, St. John's Laboratory) primer antikörleri damlatıldı. Primer antikör damlatılan tüm kesitler +4°C'de, nemli ortamda 1 gece bekletildi. Ertesi gün oda ısısına alınan kesitler 1 saat daha primer antikör ile muamele edildi. Bir saatin sonunda distile su ile PBS'den geçirilen kesitlerin etrafı kurulandı. Üzerilerine Biotinlenmiş Keçi Anti-Polivalan (ab93705, abcam, USA) damlatılarak 15 dakika bekletildi. On beş dakika sonra distile su ve PBS ile yıkanan kesitlerin etrafı kurulanıp Streptavidin Peroksidaz (ab93705, abcam, USA) damlatılarak, 20 dakika oda ısısında bekletildi. Distile su ve PBS'den geçirilen kesitlerin üzerine, aminoetilkarbazol (AEC, ab93705, abcam, USA) solüsyonu damlatıldı ve 5 dakika bekletildi, çeşme suyu ile yıkandı ve doku kesitleri zıt boyama için hematoksilin solüsyonunda 30 saniye boyandı. Boyama işleminden sonra

kesitler, çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı kapama maddesi damlatılarak dokular lamel ile kapatıldı. Olympus BX53 ışık mikroskobu (Japan) ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

### 3.4.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi

Testis doku örneklerinde TNF- $\alpha$  ve kaspaz-3 ekspresyonlarının yaygınlık ve şiddetini semi-kantitatif olarak değerlendirmek için “Histoskor (H-skor) Sistemi” kullanıldı. Bu amaçla her bir testiste x40’lık objektifte rastgele seçilen 10 alanda immünpozitif hücre yüzdesiyle birlikte dört farklı boyanma yoğunluklarının çarpımları toplanarak her grup için bir H-skoru elde edildi.<sup>157</sup>

Boyanma derecesi = 0 (Boyanma yok)

= 1 (Zayıf boyanma)

= 2 (Orta derecede boyanma)

= 3 (Şiddetli boyanma) şeklinde değerlendirildi.

H-skor değerini hesaplamak için “ $\sum P_i(I + 1)$ ” formülü kullanıldı.

I: Intensity (Yoğunluk)

PC: Percentage of stained cells for each intensity (Her derecede boyanan hücre yüzdesi)

Gruplara ait her bir testiste x40’lık objektifte rastgele seçilen 10 alanda boyanma farklılığı gözetmeksizin TNF- $\alpha$  ve kaspaz-3 pozitif hücre sayısı hesaplandı.

### 3.5. Elektron Mikroskopi Doku Hazırlama Yöntemi

Elektron mikroskobik doku takibi için Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 5’lik glutaraldehit solüsyonuna alınan testis doku örnekleri, 1 saatin sonunda 1mm<sup>3</sup>’lük parçalara ayrıldı. Ayrılan doku parçaları tekrar % 5’lik glutaraldehit solüsyonuna alınarak 3 saat süresince tespit edildi. Böylece dokular toplamda 4 saat süreyle glutaraldehit solüsyonunda tespit edilmiş oldu. Birinci tespit işleminden sonra dokular Millonig fosfat tamponunda 2 kez 10’ar dakika süreyle yıkandı. Ardından Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış ikinci tespit solüsyonu olan % 1’lik osmium tetraoksit solüsyonunda 2 saat bekletildi. İkinci tespitten sonra dokular tekrar Millonig fosfat tamponu ile 2 kez 10’ar



dakika süreyle yıkandı. Daha sonra dokular Tablo 3’de belirtilen sıraya göre derecesi artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi.

**Tablo 3.** Elektron mikroskopik doku takip yöntemi.

|                                |                  |           |
|--------------------------------|------------------|-----------|
| % 50’lik etil alkol            | +4°C             | 15 dakika |
| % 70’lik etil alkol            | +4°C             | 15 dakika |
| % 86’lik etil alkol            | +4°C             | 15 dakika |
| % 96’lik etil alkol            | +4°C             | 15 dakika |
| % 100’lik etil alkol           | +4°C             | 15 dakika |
| % 100’lik etil alkol           | +4°C             | 15 dakika |
| % 100’lik etil alkol           | +4°C             | 15 dakika |
| Propilen oksit                 | Oda sıcaklığında | 15 dakika |
| Propilen oksit                 | Oda sıcaklığında | 15 dakika |
| Propilen oksit+Gömme materyali | Oda sıcaklığında | 30 dakika |
| Propilen oksit+Gömme materyali | Oda sıcaklığında | 30 dakika |

Bu işlemlerden sonra doku parçaları Tablo 4’de belirtilen şekilde hazırlanan rezin içerisine alınarak 1 gece boyunca rotatorda döndürülerek karıştırıldı. Bu şekilde rezinin doku parçaları içerisine daha iyi nüfuz etmesi sağlandı.

**Tablo 4.** Gömme materyalinin hazırlanışı.

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Aralaldehit (CY 212)             | 20 ml  |
| Sertleştirici (HY 964)           | 20 ml  |
| Hızlandırıcı (DY 064)            | 0,6 ml |
| Plastikleştirici-Dibütil Fitalat | 1 ml   |

Bir gün sonra rotatordan alınan doku parçaları, taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak beem kapsüllere gömülerek 60°C etüvde 48 saat polimerize edildi. Daha sonra bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Elde edilen bloklardan Ultracult S ultramikrotomu ile 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı ve bloklardan uygun alanların seçimi yapıldı. Belirlenen alanlardan ultramikrotom ile 50 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridler üzerinde toplanarak % 70’lik etil alkolde hazırlanan doymuş uranyum asetat ve Reynolds’un kurşun nitrat solüsyonu ile boyandı. Boyanan kesitler JEOL-JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu (Japonya) ile incelenerek mikrograftları elde edildi.

### **3.6. Biyokimyasal Analizlerin Yapılışı**

Anestezi altındaki sıçanlardan biyokimyasal analizler için enjektör yardımıyla intrakardiyak kan alındı ve serum seperatör tüplerine konuldu. Kanlar 3000 rpm’de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı. Ayrılan serum kısmı eppendorf tüplerine alınarak -80°C’de muhafaza edildi. Deneylerin tamamı bittikten sonra serum örnekleri oda ısısında bekletilerek çalışma periyoduna getirildi. Serum örneklerinde SOD (Sun Red, 201-11-0169, China), MDA (Sun Red, 201-11-0157, China), testosteron (Sun Red, 201-11-5126, China) değerleri Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarında CHROMATE marka yarı otomatize mikro-ELISA cihazında kit prosedürüne uygun olarak analiz edildi.

### **3.7. İstatistiksel Analiz**

İmmünohistokimyasal skorlamaların, Johnsen tübüler biyopsi skorlamalarının ve biyokimyasal verilerin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5 (Gradpad Software Inc. USA) Programı kullanıldı. Verilerin normal dağılımlı olup olmadıkları “D’Agostino&pearson omnibüs normality test” ile değerlendirildi. İmmünreaktivite skorları ile pozitif boyanan hücre sayıları, Johnsen tübüler biyopsi skor puanları ve biyokimyasal verilerin, kontrol grupları ile arasındaki farklılıkları değerlendirmek için “Mann Whitney U testi” kullanıldı. Hasar ve hasar sonrası tedavi gruplarının biyokimyasal verilerinin kontrol grubu ile kıyaslamada ise Unpaired t-testi uygulandı. 0,05’ten küçük değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Işıık Mikroskobik Bulgular

Sham grubu ve deney gruplarından elde edilen testis doku örneklerinin Hematoksilen & Eozin ile boyanmış kesitleri ışık mikroskobuyla incelendi.

#### 4.1.1. Grup 1: Sham Grubu

Sham grubu sıçanlardan elde edilen testis doku örneklerinin ışık mikroskobik olarak incelenmesinde, testisin en dıştan fibroelastik bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea ile sarılı olduğu görüldü. Testis parankiması normal görünümlü çok sayıda seminiferöz tübül ve bunların aralarını dolduran interstisyumdan oluşmaktaydı. Membrana propria ile çevrilmiş seminiferöz tübüller spermatojenik hücreler ve Sertoli hücreleri ile döşeliydi. Seminiferöz tübül epiteli bazal laminası üzerine oturan, prizmatik şekilli Sertoli hücreleri bazaldan seminiferöz lümenine kadar uzanmaktaydı. Sertoli hücrelerinin bazal sitoplazması içerisine yerleşmiş, oval veya üçgen şekilli çekirdekleri bulunmaktaydı. Sertoli hücrelerinin arasında, bazal lamina üzerinde bulunan spermatogonyumlar kondanse kromatinden zengin oval çekirdekleriyle belirgin olarak ayırt edildiler. Seminiferöz tübül epitelinin en büyük hücreleri olan primer spermatositler geniş sitoplazmaya ve oval bir çekirdeğe sahipti. Tübül lümenine yakın küçük spermatidler ve uzun iğ şekilli çekirdekleriyle karakterize spermatozoonlar seminiferöz tübül lümenine yakın yerleşimde bulunmaktaydı. Seminiferöz tübüller arasında bulunan gevşek bağ dokusundan oluşan interstisyum içerisinde kan damarları, lenfatikler, makrofajlar ve fibroblastlar ile birlikte poligonal şekilli, eozinofilik sitoplazmalı, büyük ve kromatinden fakir çekirdekleriyle karakterize Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) bulunmaktaydı (Şekil 12).



**Şekil 12.** Sham grubu ışık mikroskopik görünümü. Normal görünümlü tunika albuginea (TA), seminiferöz tübüller (ST) ve interstisyum (siyah ok) izlenmektedir. H&E. Bar = 100 µm.

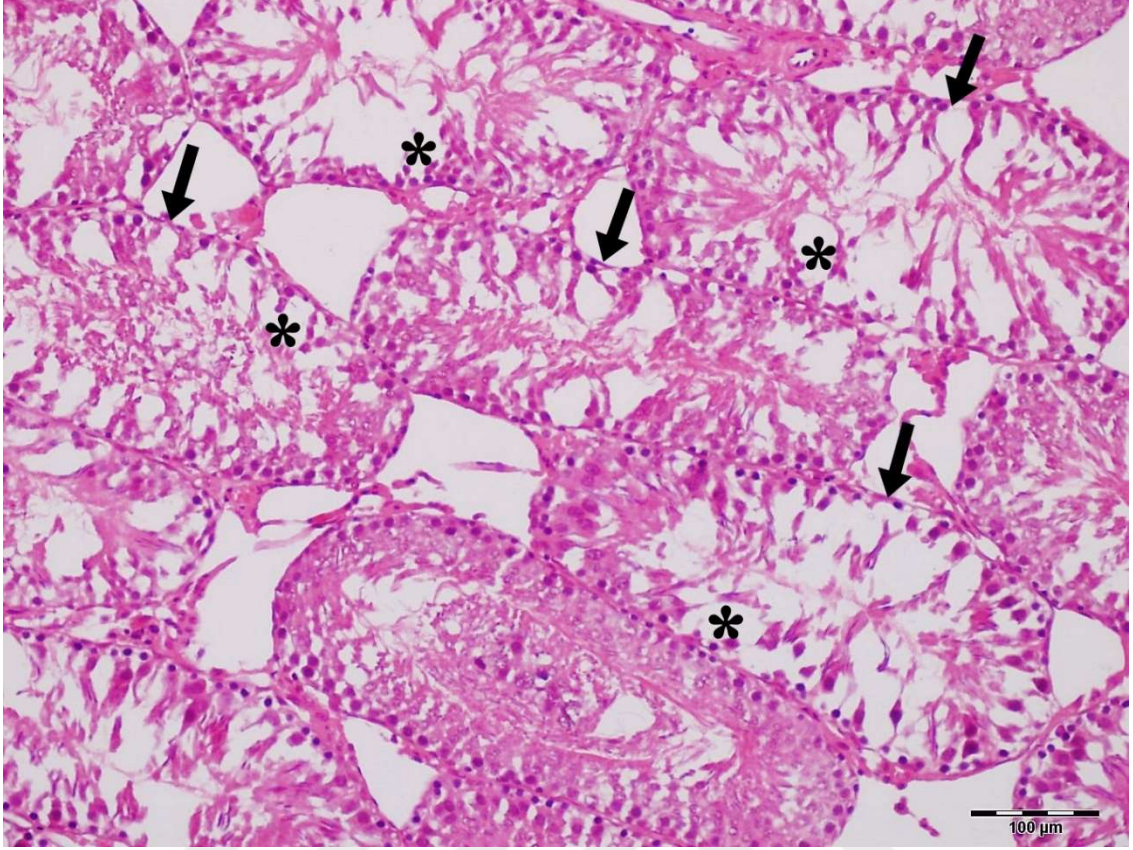
#### 4.1.2. Grup 2: Testis Torsiyon Grubu (TT)

Üç saatlik torsiyon uygulanan sıçanlardan alınan testislerde makroskopik olarak hiperemi, koyu mor renk değişimi, ödeme bağlı şişme ve testis boyutlarında artış olduğu izlendi (Şekil 10). Işık mikroskopik incelemede, tunika albugineanın kalınlaştığı ve bazı alanlarda testis parankiminden ayrıldığı dikkati çekti. Tunika vaskülozada bulunan kan damarlarında dilatasyon ve kanama alanları olduğu gözlemlendi (Şekil 13). Seminiferöz tübül epitel düzeninin bozulduğu, yaygın dejenerasyon olduğu, seminiferöz epitelin bazal laminadan ayrıldığı ve hücreler arası alanlarda genişleme olduğu izlendi (Şekil 14). Bazı seminiferöz tübüllerde epitelde dökülmeye bağlı olarak tübüllerin lümeninde immatür spermatojenik hücre varlığına rastlanıldı (Şekil 15). Seminiferöz tübülde piknotik çekirdeğe sahip hücreler (Şekil 16) ve apoptotik cisimcikler gözlemlendi (Şekil 17). İnterstisyel alanda ödemi temsil eden genişleme, yaygın hemoraji ve damarlarda konjesyon olduğu izlendi (Şekil 13 ve 15).



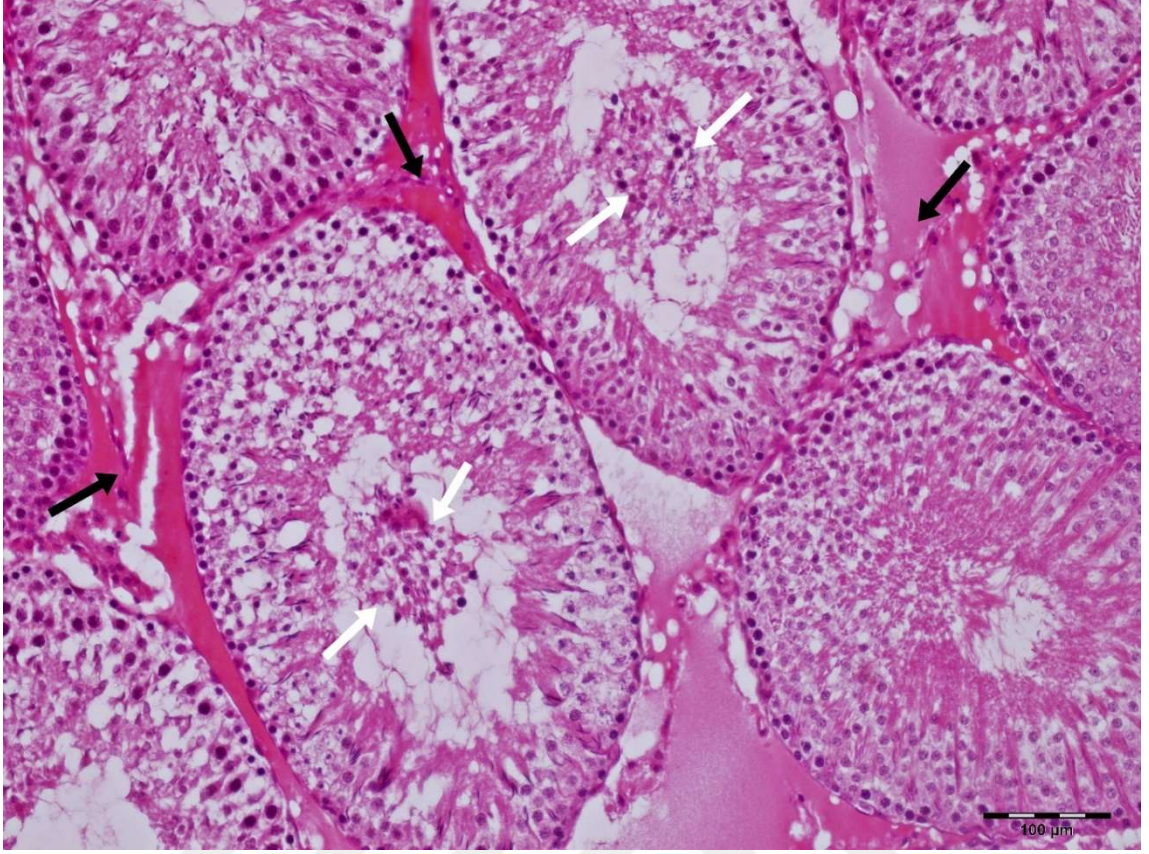


**Şekil 13.** Testis Torsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü. Tunika albugineanın (TA) kalınlaştığı, tunika vaskülozada bulunan kan damarlarında dilatasyon ve konjesyon olduğu (ok başları), interstisyel alanda ödemi temsil eden genişleme (yıldız) ile kanama alanlarının (siyah ok) varlığı izlenmektedir. H&E. Bar = 100 µm.



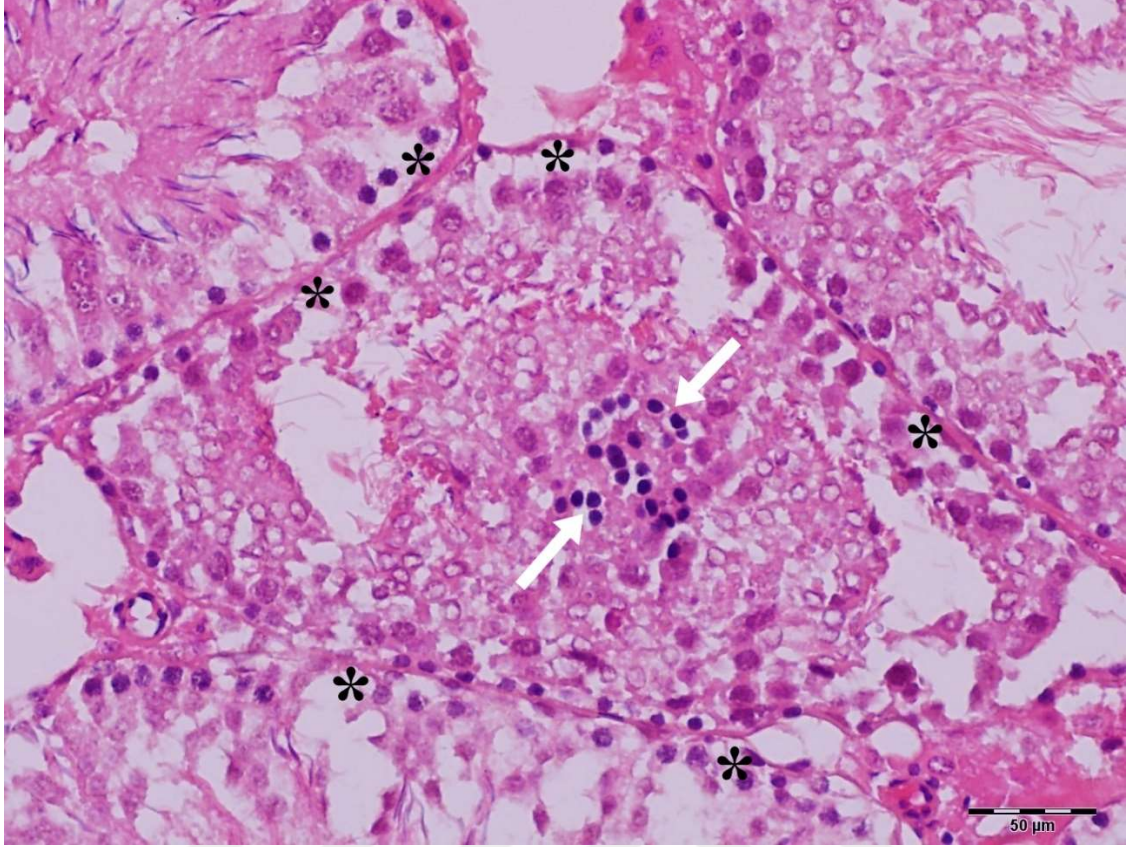
**Şekil 14.** Testis Torsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü. Seminiferöz tübül epitel düzeninin bozulduğu, yaygın dejenerasyon olduğu (siyah ok), seminiferöz epitelin bazal laminadan ayrıldığı ve seminiferöz epitelde hücreler arası alanlarda genişleme (\*) olduğu izlenmektedir. H&E. Bar = 100 µm.



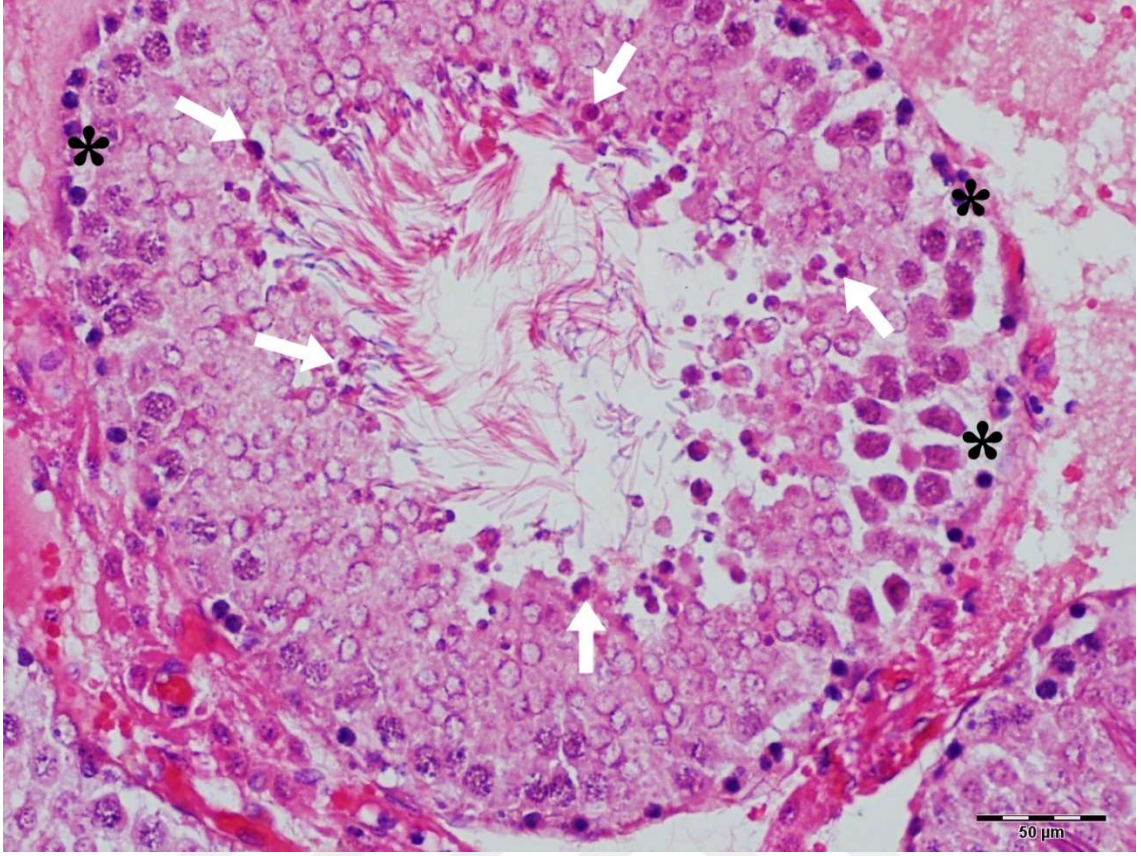


**Şekil 15.** Testis Torsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü. Seminiferöz tübül epitelinde dökülmeye bağlı olarak oluşan tübüllerin lümeninde immatür spermatojenik hücrelerin varlığı (beyaz ok) görülmektedir. İnterstisyel alanda yaygın kanama alanları (siya ok) izlenmektedir. H&E. Bar = 100 µm.





**Şekil 16.** Testis Torsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü. Seminiferöz tübül epitel düzeninin bozulduğu, seminiferöz epitelin bazal laminadan ayrıldığı (\*), seminiferöz tübülde piknotik çekirdeğe sahip hücrelerin (beyaz ok) varlığı görülmektedir. H&E. Bar = 50 µm.

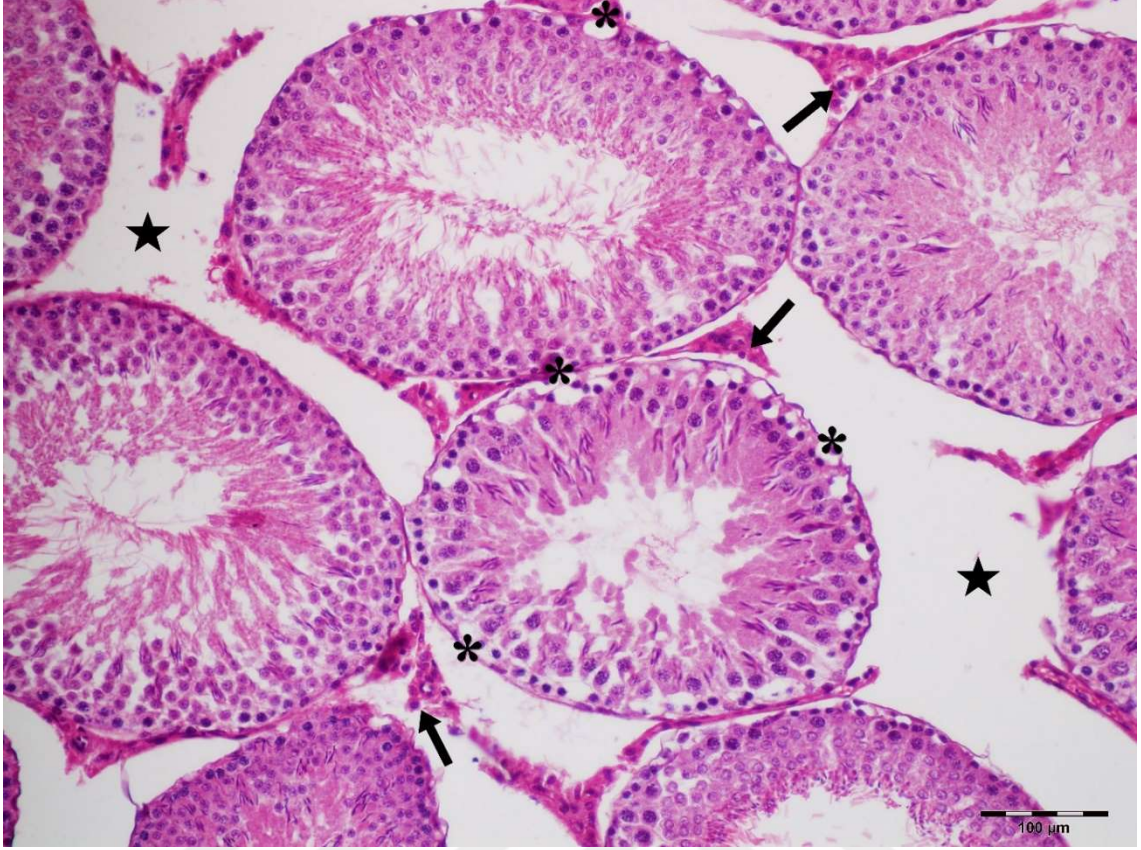


**Şekil 17.** Testis Torsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü. Seminiferöz tübül epitel düzeninin bozulduğu, seminiferöz epitelin bazal laminadan ayrıldığı (\*) ve apoptotik cisimciklerin varlığı (beyaz oklar) izlenmektedir. H&E. Bar = 50 µm.

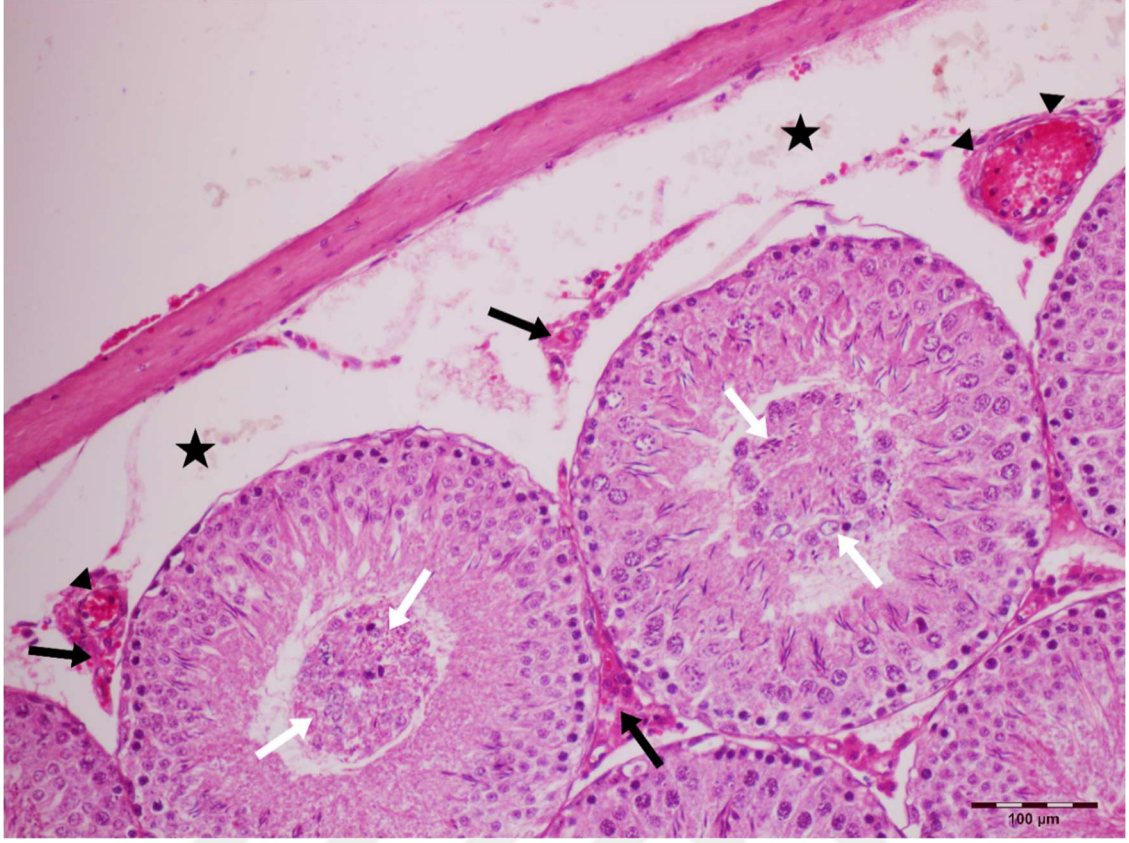
#### **4.1.3. Grup 3: Testis Torsiyon/Detorsiyon Grubu (TT/D)**

Testise 3 saatlik torsiyondan sonra detorsiyon uygulanan sıçanlara ait testis doku örneklerinde makroskopik olarak hafif bir hiperemi, pembe-mor arası renk değişikliği ve hafif ödem varlığı gözlemlendi (Şekil 11). Işık mikroskopik incelemede seminiferöz tübüllerde epitel düzeninin bozulduğu, seminiferöz epitelin bazal laminadan ayrıldığı (Şekil 18), tübül lümeninde olgunlaşmamış spermatojenik seri hücrelerinin bulunduğu (Şekil 19 ve 20), bazı alanlarda ise epitel düzeni bozulmuş seminiferöz tübüllerde apoptotik cisimciklerin varlığı izlendi (Şekil 21). Bunların yanı sıra bazı alanlarda seminiferöz tübüllerin normal morfolojik yapıya sahip olduğu görüldü. İnterstisyel alanda kapiller dilatasyon, yer yer hemoraji ve ödemi temsil eden hücreler arası alanda genişlemeler gözlemlendi. İnterstisyel alanda inflamatuvar hücre yoğunluğunda artış dikkati çekti (Şekil 18 ve 19).



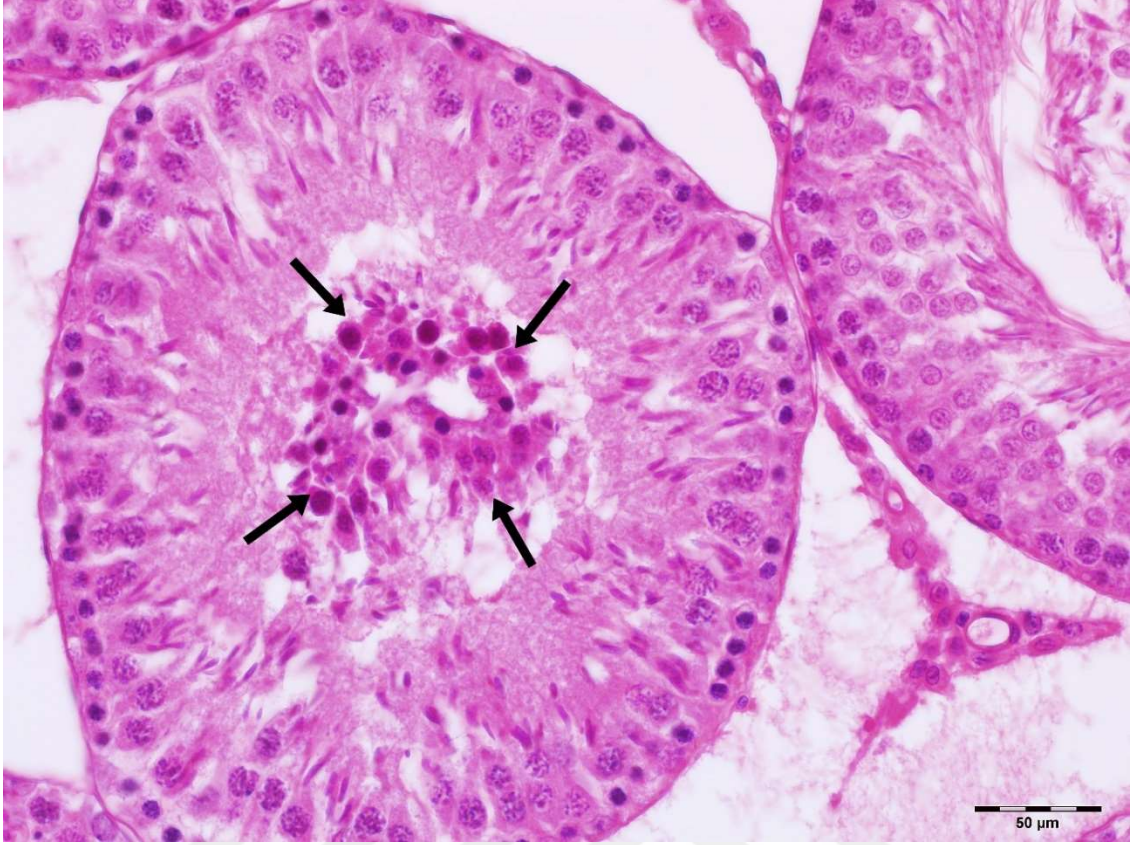


**Şekil 18.** Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü. Seminiferöz epitelin bazal laminadan ayrıldığı (\*) izlenmektedir. İnterstisyel alanda ödemi temsil eden hücrelerarası alanda genişlemeler (yıldız) ve inflamatuvar hücre varlığı (siyah ok) görülmektedir. H&E. Bar = 100 µm.

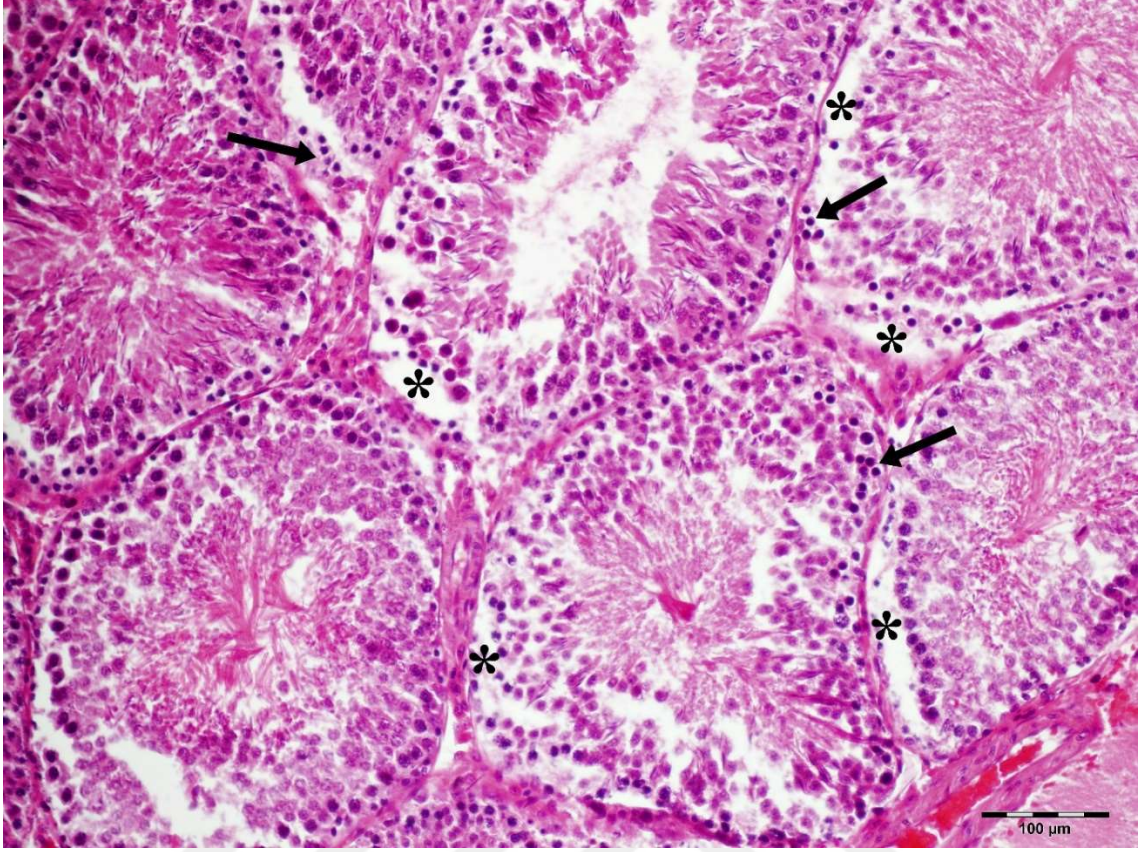


**Şekil 19.** Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü. Seminiferöz tübül lümenlerinde olgunlaşmamış spermatojenik seri hücreleri (beyaz ok) ve interstisyel alanda kapiller dilatasyon, konjesyon (ok başı), hemorajinin (siyah ok) varlığı, ödemi temsil eden hücreler arası alanda artma (yıldız) izlenmektedir. H&E. Bar = 100 µm.





**Şekil 20.** Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü. Seminiferöz tübül lümeninde olgunlaşmamış spermatojenik seri hücrelerinin varlığı (siyah ok) izlenmektedir. H&E. Bar = 50 µm.



**Şekil 21.** Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu ışık mikroskopik görünümü. Seminiferöz epitel düzeninin bozulduğu, seminiferöz tübül hücrelerinin bazal laminadan ayrıldığı (\*) ve seminiferöz tübüllerde apopitotik cisimciklerin (siyah oklar) varlığı görülmektedir. H&E. Bar = 100 µm.

#### **4.1.4. Grup 4: Testis Torsiyonu ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan Grup (TT/N)**

Testislere uygulanan torsiyondan 2,5 saat sonra nimodipin verilen ve bu uygulamadan yarım saat sonra sakrifiye edilen sıçanlardan alınan testis kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, TT grubu ile karşılaştırıldığında tunika albugineadaki kalınlaşmanın azaldığı, seminiferöz tübül yapılarının daha iyi korunmuş olduğu dikkat çekti. Seminiferöz tübül epitelindeki dökülmelerin daha az olduğu ve tübül lümeninde olgunlaşmamış spermatojenik hücrelerin bulunmadığı izlendi. İnterstisyel alanda ödem ve hemorajinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 22 ve 23).







**Şekil 22.** Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup ışık mikroskopik görünümü. Tunika albugineadaki (TA) kalınlaşmanın azaldığı, seminiferöz tübüllerin (ST) normal yapıda olduğu görülmektedir. İnterstisyel alanda ödem ve kanamanın azaldığı (siyah ok) izlenmektedir. H&E. Bar = 100 µm.



**Şekil 23.** Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup ışık mikroskopik görünümü. Tunika albuginea (TA), seminiferöz tübüller (ST) ve interstisyel alan (siyah ok) normal yapıda izlenmektedir. H&E. Bar = 100 µm.

#### **4.1.5. Grup 5: Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan Grup (TT/D/N)**

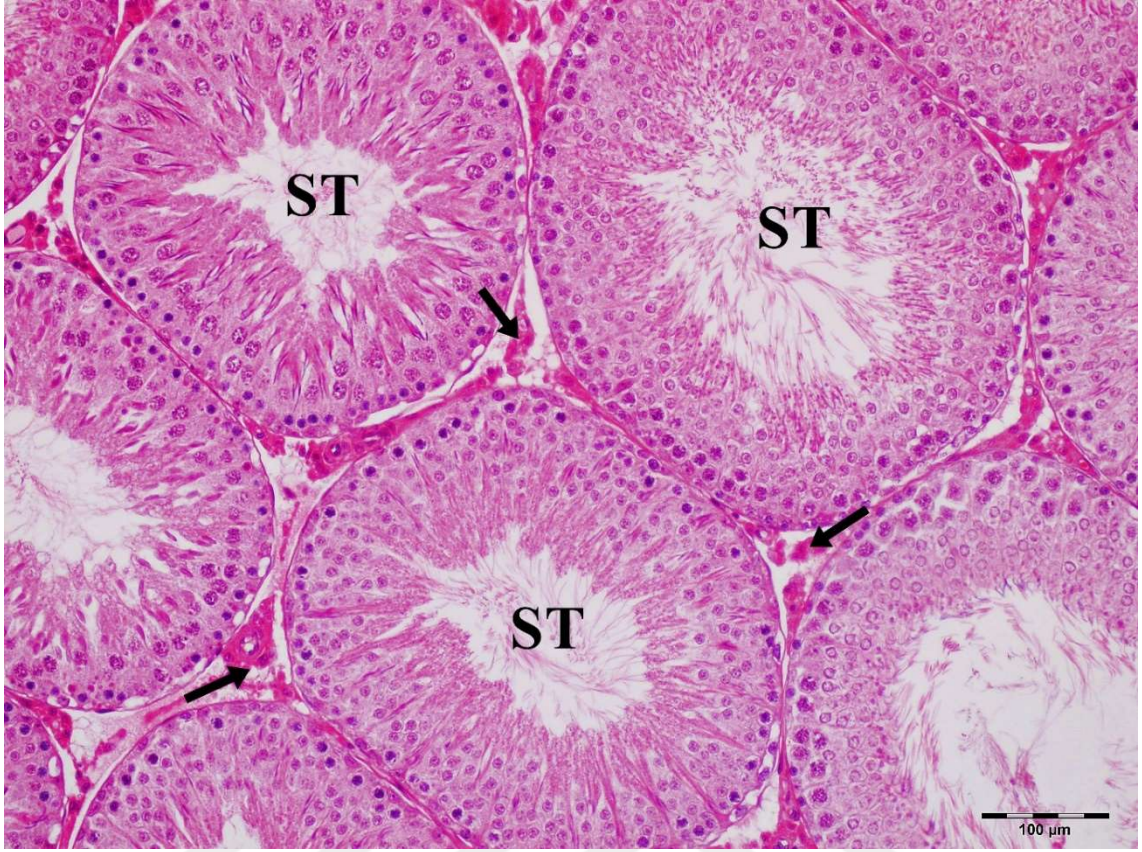
Testislere torsiyon yapılan ve torsiyondan 2,5 saat sonra nimodipin verilerek yarım saat sonra detorsiyon uygulanan sıçanların testislerinden alınan kesitlerin ışık mikroskopik incelemesinde, tunika albuginea ile tunika vaskülozanın, seminiferöz tübüllerin normal yapıda olduğu, Sertoli hücreleri ve spermatojenik seri hücrelerinin normal olarak görüldüğü, interstisyel alanda ödem ve kanamanın minimal düzeyde olduğu izlendi (Şekil 24 ve 25).







**Şekil 24.** Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup ışık mikroskopik görünümü. Tunika albuginea (TA), seminiferöz tübüller (ST), interstisyel alan (siyah oklar) normal olarak görülmektedir. H&E. Bar = 100 µm.



**Şekil 25.** Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup ışık mikroskopik görünümü. Seminiferöz tübüller (ST), interstisyel alan (siyah oklar) normal olarak görülmektedir. H&E. Bar = 100 µm.

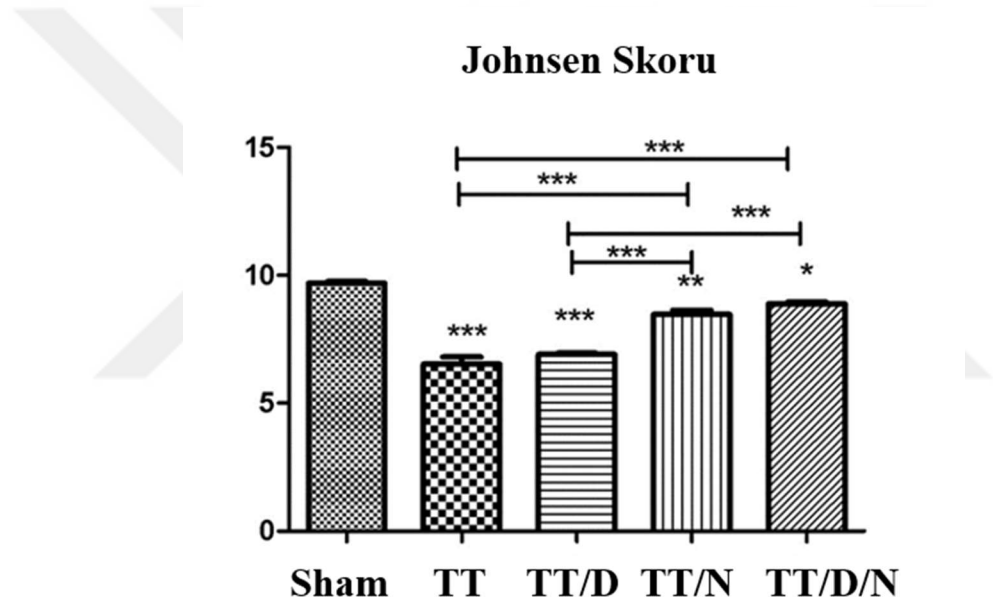
#### 4.2. Johnsen Tübüler Biyopsi Skoru (JTBS)

Testis dokusunda hasar değerlendirmesi için tüm gruplara JTBS yapıldı ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Johnsen tübüler biyopsi skoru, sham grubu ile karşılaştırıldığında bütün deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı. Sham grubu ile karşılaştırılarak elde edilen JTBS azalmasının, TT ( $p<0.0001$ ) ve TT/D ( $p<0.0001$ ) gruplarında, TT/N ( $p<0.001$ ) ve TT/D/N ( $p<0.01$ ) gruplarına kıyasla daha fazla olduğu görüldü. TT ve TT/D grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ( $p>0.01$ ). TT/N ve TT/D/N gruplarında JTBS'nin, TT ve TT/D gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ( $p<0.0001$ ). TT/N ve TT/D/N grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi ( $p>0.01$ ) (Tablo 5 ve Şekil 26).



**Tablo 5.** Johnsen Tübüler Biyopsi Skoru (JTBS) (ortalama±standart sapma).

| Gruplar | JTBS      |
|---------|-----------|
| Sham    | 9,70±0,05 |
| TT      | 6,53±0,26 |
| TT/D    | 6,90±0,05 |
| TT/N    | 8,46±0,17 |
| TT/D/N  | 8,90±0,05 |



**Şekil 26.** Johnsen Tübüler Biyopsi Skoru. \*p<0.01, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001.

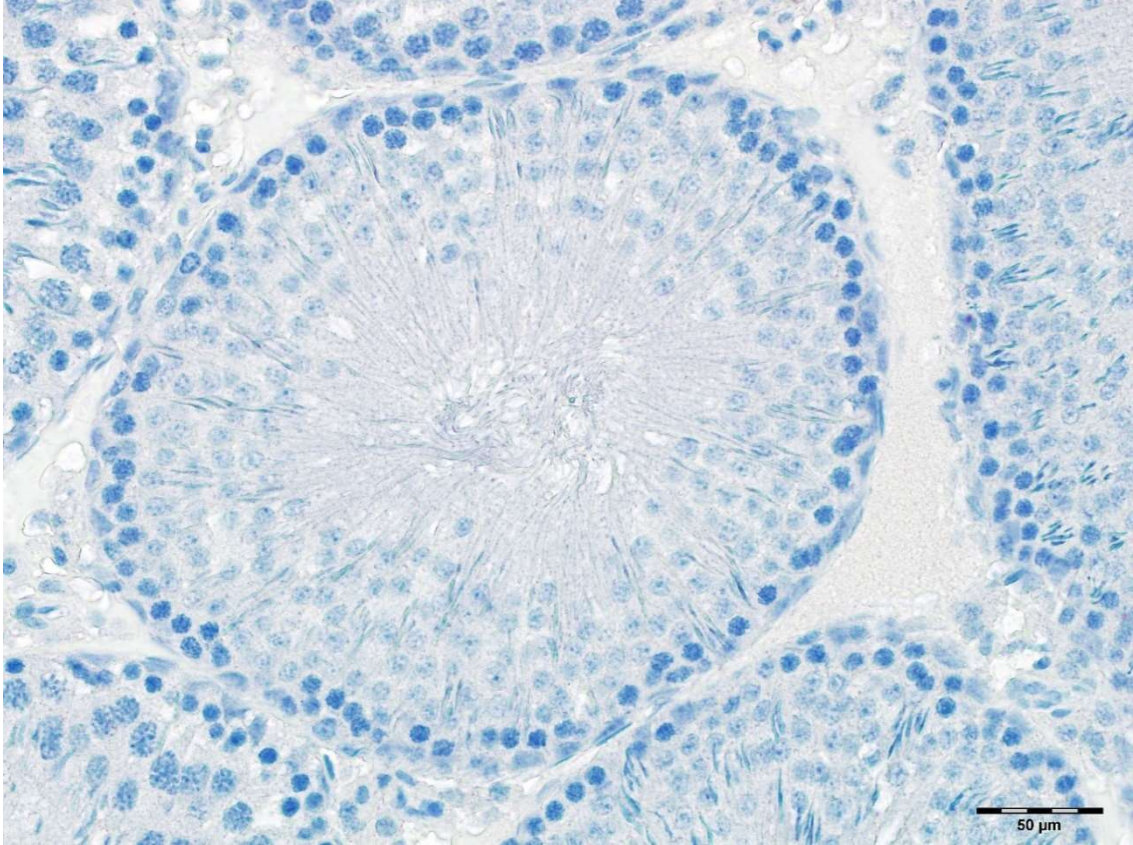


### 4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

#### 4.3.1. Kaspaz-3 İmmünreaktivitesi

##### 4.3.1.1. Grup 1: Sham Grubu

Skrotal kesi yapılan ve sadece testisleri dışarı çıkarılıp tekrar yerine konulan sham grubu sıçanlardan elde edilen testis doku örneklerinde apoptotik hücre markırı olarak kullanılan kaspaz-3 ekspresyonlarını araştırmak için immünohistokimyasal yöntemler uygulandı. Bu grupta seminiferöz tübüllerde ve interstisyel alanda minimal immünreaktivite olduğu görüldü (Şekil 27).

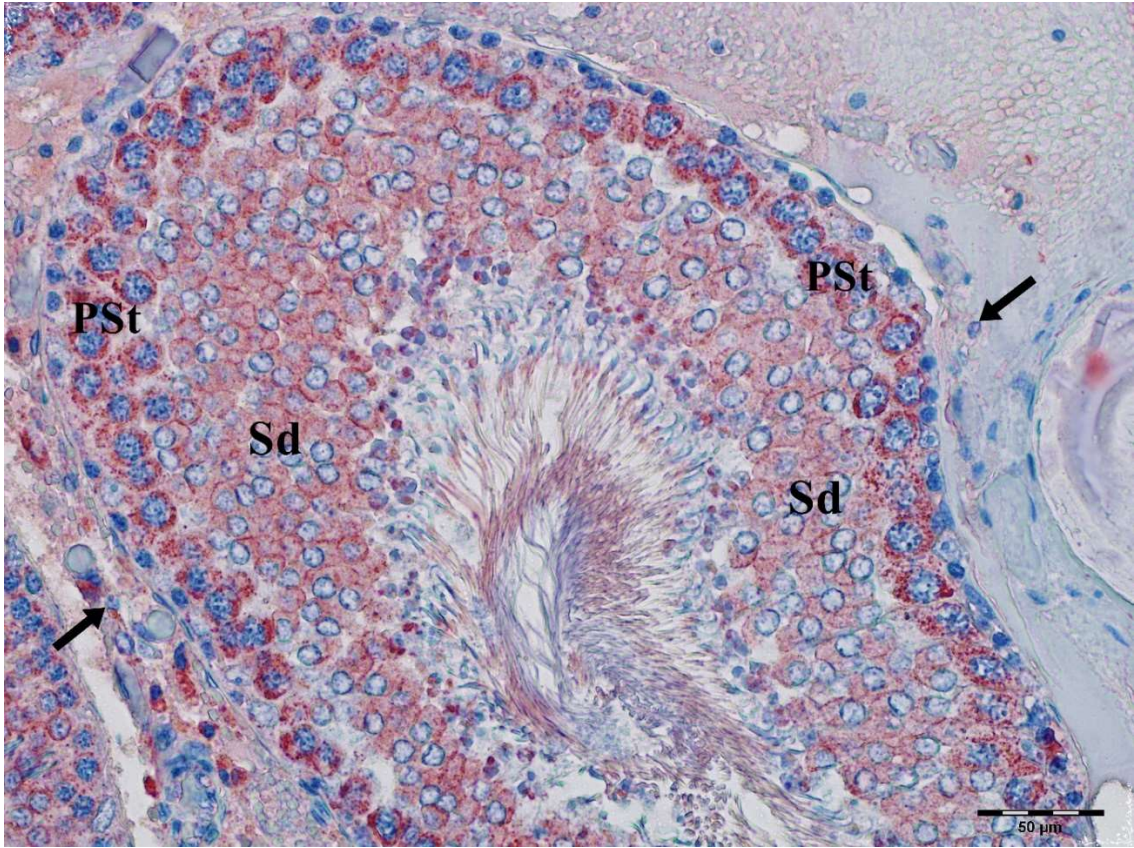


Şekil 27. Sham grubu, kaspaz-3 immünreaktivitesi. Bar= 50 µm.



#### 4.3.1.2. Grup 2: Testis Torsiyon Grubu (TT)

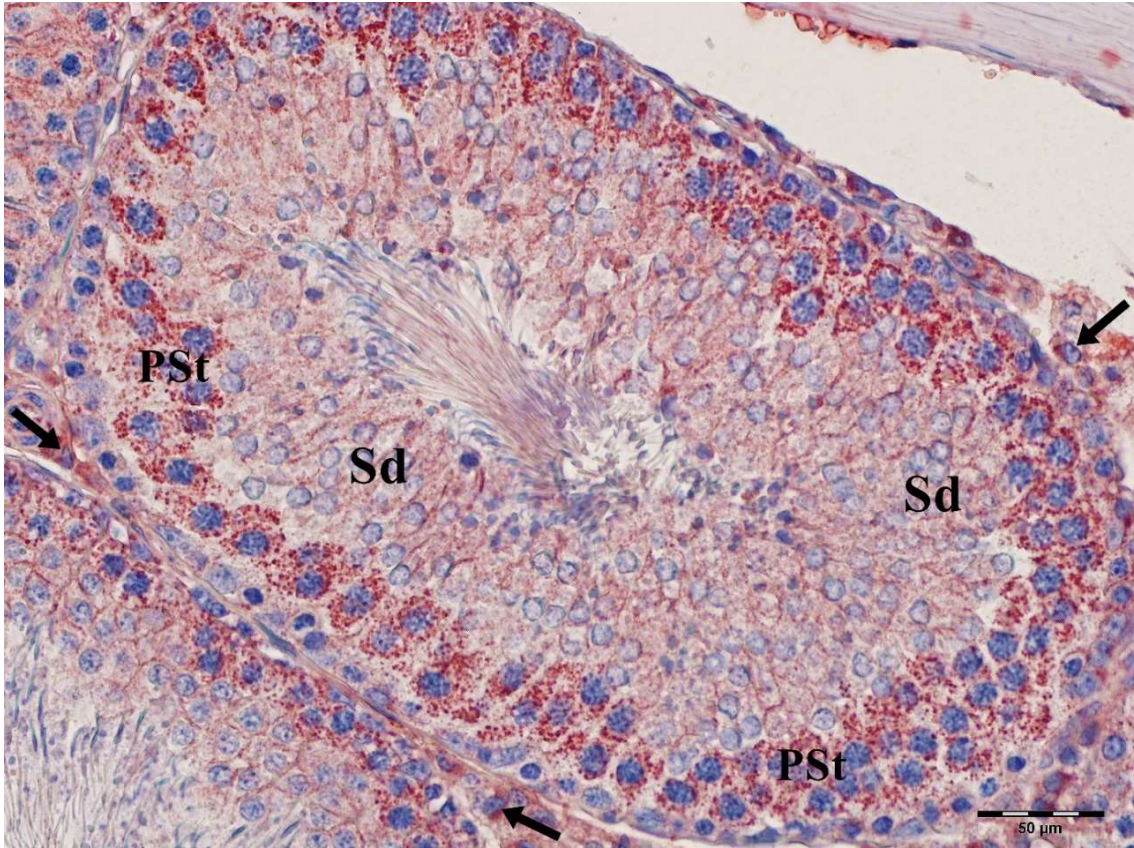
Üç saatlik torsiyondan sonra sakrifiye edilen sıçanların testis doku örneklerinde kaspaz-3 ekspresyonlarını araştırmak amacıyla immünohistokimyasal boyama yapıldı. Seminiferöz tübül içerisinde özellikle primer spermatositlerde ve spermatidlerde belirgin bir şekilde kaspaz-3 ekspresyonunun olduğu gözlemlendi. Spermatogonyumlar ve Sertoli hücrelerinde kaspaz-3 immünreaktivitesinin daha az olduğu izlendi. İnterstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinde ise immünreaktivitenin minimal düzeyde olduğu görüldü (Şekil 28).



**Şekil 28.** Testis Torsiyon grubu, kaspaz-3 immünreaktivitesi. Seminiferöz tübül içerisinde primer spermatositlerde (PSt) ve spermatidlerde (Sd) belirgin kaspaz-3 immünreaktivitesi görülmektedir. İnterstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinde (siyah ok) ise immünreaktivitenin minimal düzeyde olduğu izlenmektedir. Bar= 50 µm.

#### 4.3.1.3. Grup 3: Testis Torsiyon/Detorsiyon Grubu (T/D)

Üç saatlik torsiyon ve ardından 3 saatlik detorsiyondan sonra sakrifiye edilen sıçanların testis doku örneklerinde kaspaz-3 ekspresyon bulguları torsiyon grubuyla benzer özellikteydi. Primer spermatositlerde ve spermatidlerde çok yoğun immünreaktivite izlendi. Spermatogonyumlar ve Sertoli hücrelerinde kaspaz-3 immünreaktivitesi minimal düzeyde olduğu görülürken torsiyon grubundan farklı olarak interstisyel alanda Leydig hücre immünreaktivitesine artış görüldü (Şekil 29).

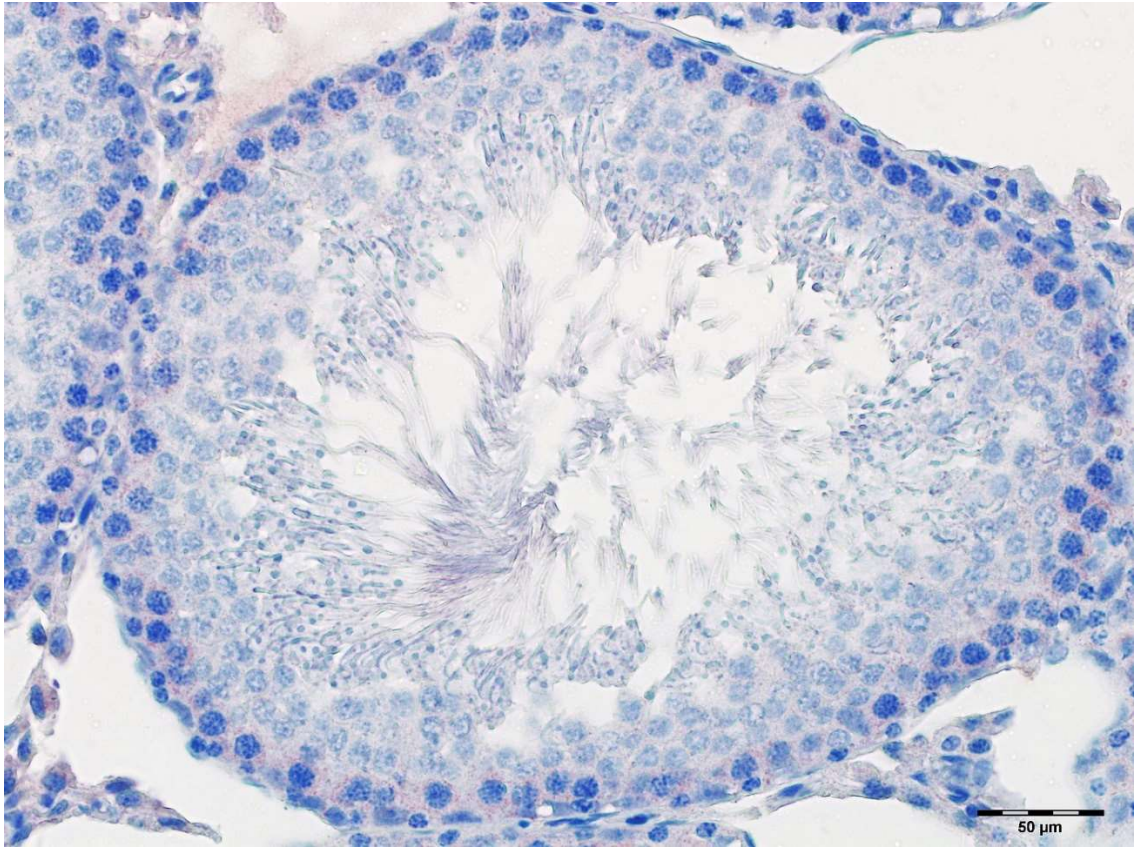


**Şekil 29.** Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu, kaspaz-3 immünreaktivitesi. Seminiferöz tübül içerisinde primer spermatositlerde (PSt) ve spermatidlerde (Sd) belirgin kaspaz-3 immünreaktivitesi izlenmektedir. İnterstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinde (siyah ok) belirgin kaspaz-3 immünreaktivitesi görülmektedir. Bar= 50 µm.



#### 4.3.1.4. Grup 4: Testis Torsiyonu ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan Grup (TT/N)

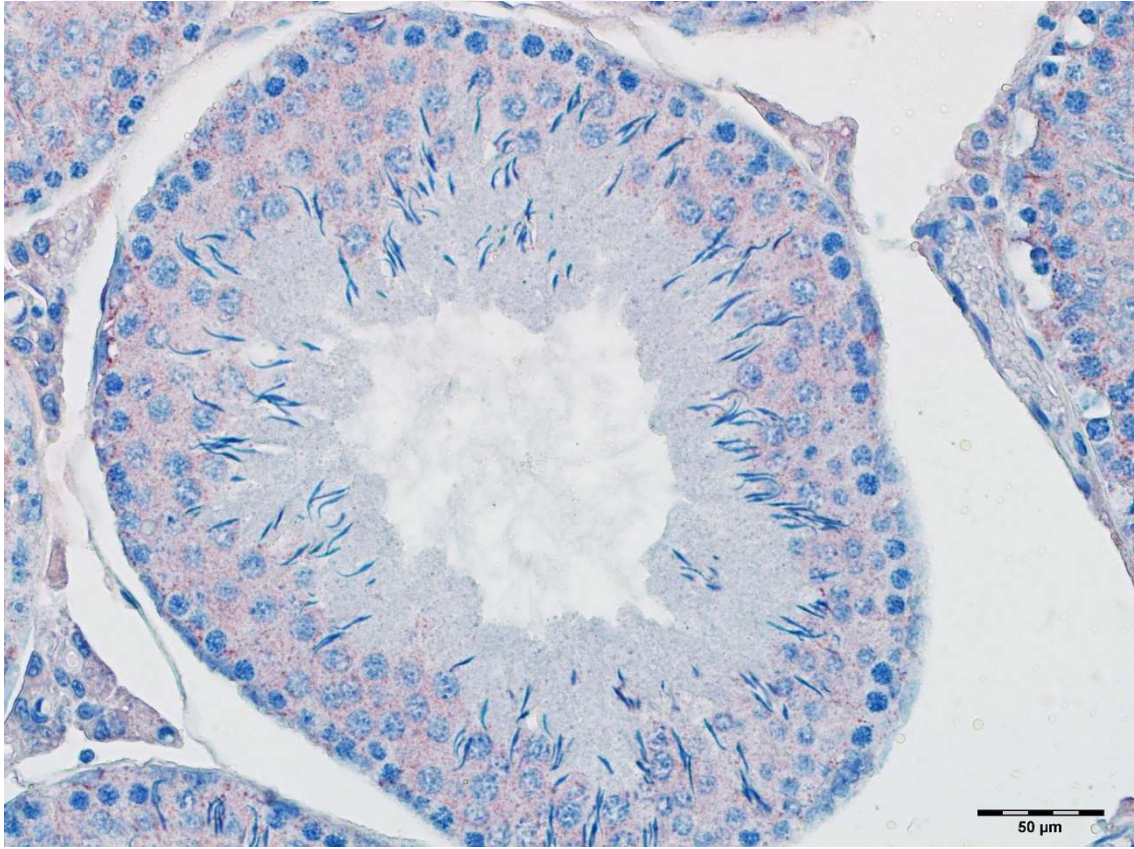
Testis dokusuna uygulanan torsiyondan 2,5 saat sonra nimodipin uygulanan sıçanların testis doku örneklerinde kaspaz-3 ekspresyonlarını araştırmak amacıyla immünohistokimyasal yöntemler uygulandı. Nimodipin tedavisi uygulanmayan TT ve TT/D gruplarıyla kıyaslandığında çoğu seminiferöz tübülde kaspaz-3 ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi. Primer spermatositlerde ve spermatidlerde minimal kaspaz-3 immünreaktivitesi görüldü. Yine interstisyel alanda Leydig hücrelerinde minimal kaspaz-3 immünreaktivitesi izlendi (Şekil 30).



**Şekil 30.** Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup, kaspaz-3 immünreaktivitesi. Bar= 50 µm.

#### 4.3.1.5. Grup 5: Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan Grup (TT/D/N)

Testis torsiyonundan 2,5 saat sonra nimodipin tedavisi uygulanan sıçanlara bu işlemten yarım saat sonra detorsiyon uygulandı ve 3 saat detorsiyonda kalan sıçanların doku örneklerinde kaspaz-3 ekspresyonları incelendi. Seminiferöz tübüllerde çoğu hücrede kaspaz-3 immünreaktivitesinin azaldığı gözlenmekle birlikte primer spermatositlerde orta düzeyde immünreaktivite izlendi. Spermatidlerde, Sertoli hücrelerinde ve spermatogonyumlarda minimal düzeyde kaspaz-3 immünreaktivitesi görüldü. Yine interstisyel alanda Leydig hücrelerinde minimal düzeyde kaspaz-3 immünreaktivitesi izlendi (Şekil 31).



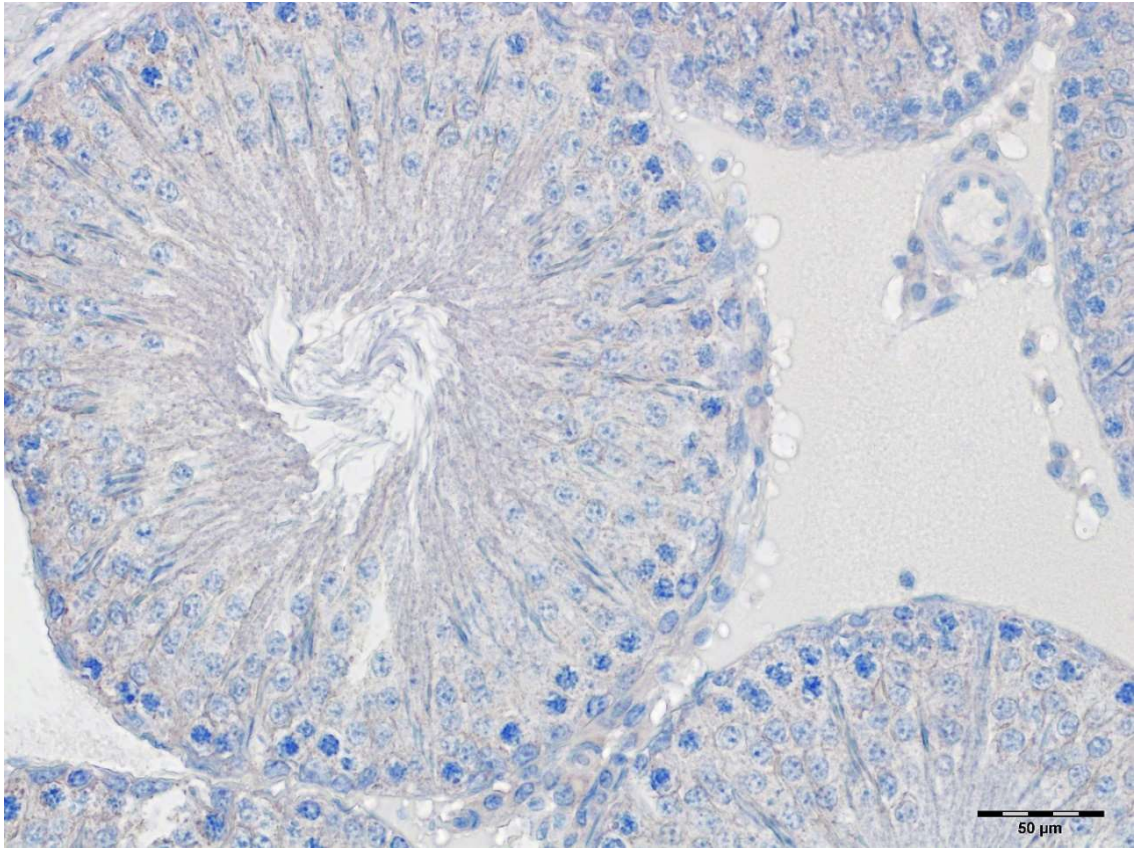
**Şekil 31.** Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup, kaspaz-3 immünreaktivitesi. Bar= 50 µm.



### 4.3.2. TNF- $\alpha$ İmmünoreaktivitesi

#### 4.3.2.1. Grup 1: Sham Grubu

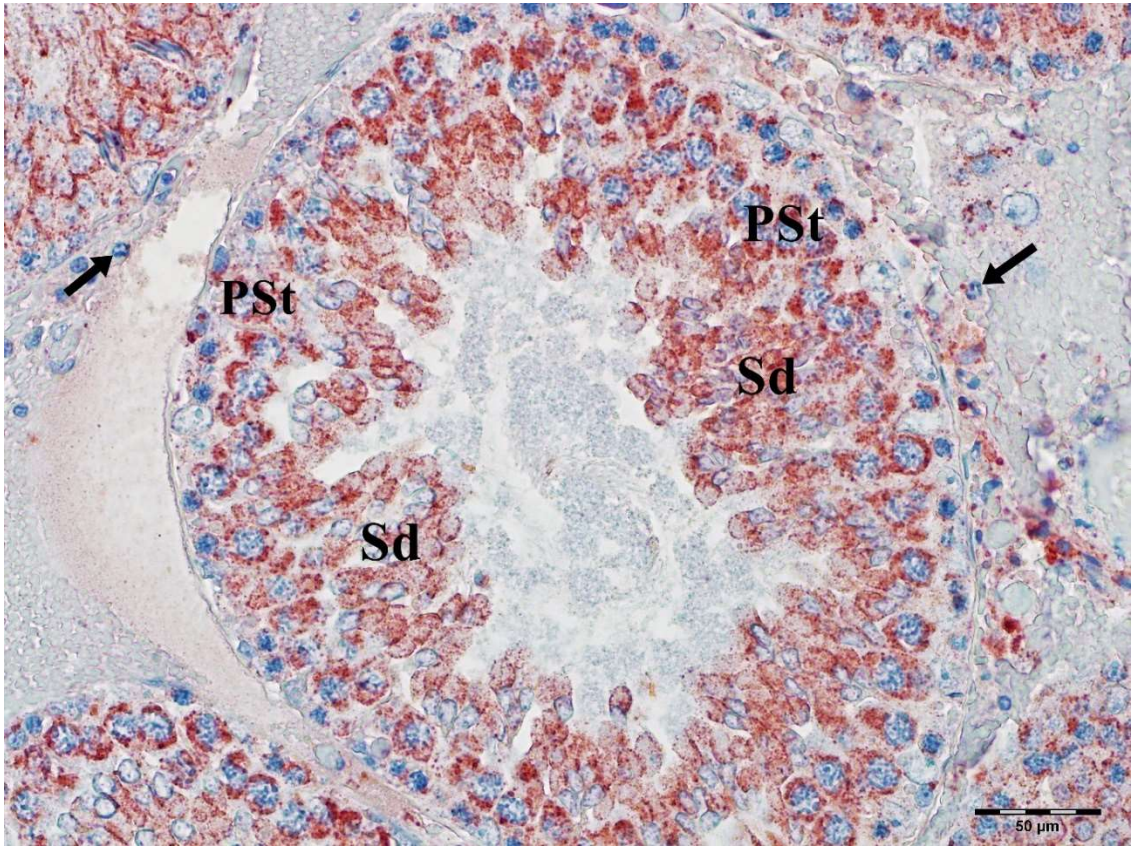
Skrotal kesi yapıp testisleri dışarı çıkarılıp tekrar yerine konulan sham grubu sıçanlardan elde edilen testis doku örneklerinde inflamatuvar hücre markırı olarak kullanılan TNF- $\alpha$  ekspresyonlarını araştırmak için immünohistokimyasal boyama yapıldı. Bu grupta seminiferöz tübüllerde ve interstisyel alanda TNF- $\alpha$  immünreaktivitesinin minimal olduğu görüldü (Şekil 32).



Şekil 32. Sham grubu, TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi. Bar= 50  $\mu$ m.

#### 4.3.2.2. Grup 2: Testis Torsiyon Grubu (TT)

Üç saatlik torsiyondan sonra sakrifiye edilen sıçanların testis doku örneklerinde TNF- $\alpha$  immünohistokimyasal boyama yapıldı. Seminiferöz tübül içerisinde özellikle primer spermatositlerde ve spermatidlerde TNF- $\alpha$  immünreaktivitesinin çok yoğun olduğu gözlenirken spermatogonyumlar ve Sertoli hücrelerinde TNF- $\alpha$  ile boyanmanın daha az olduğu görüldü. İnterstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinde TNF- $\alpha$  immünreaktivitesinin spermatositlerden çok daha az olduğu izlendi (Şekil 33).

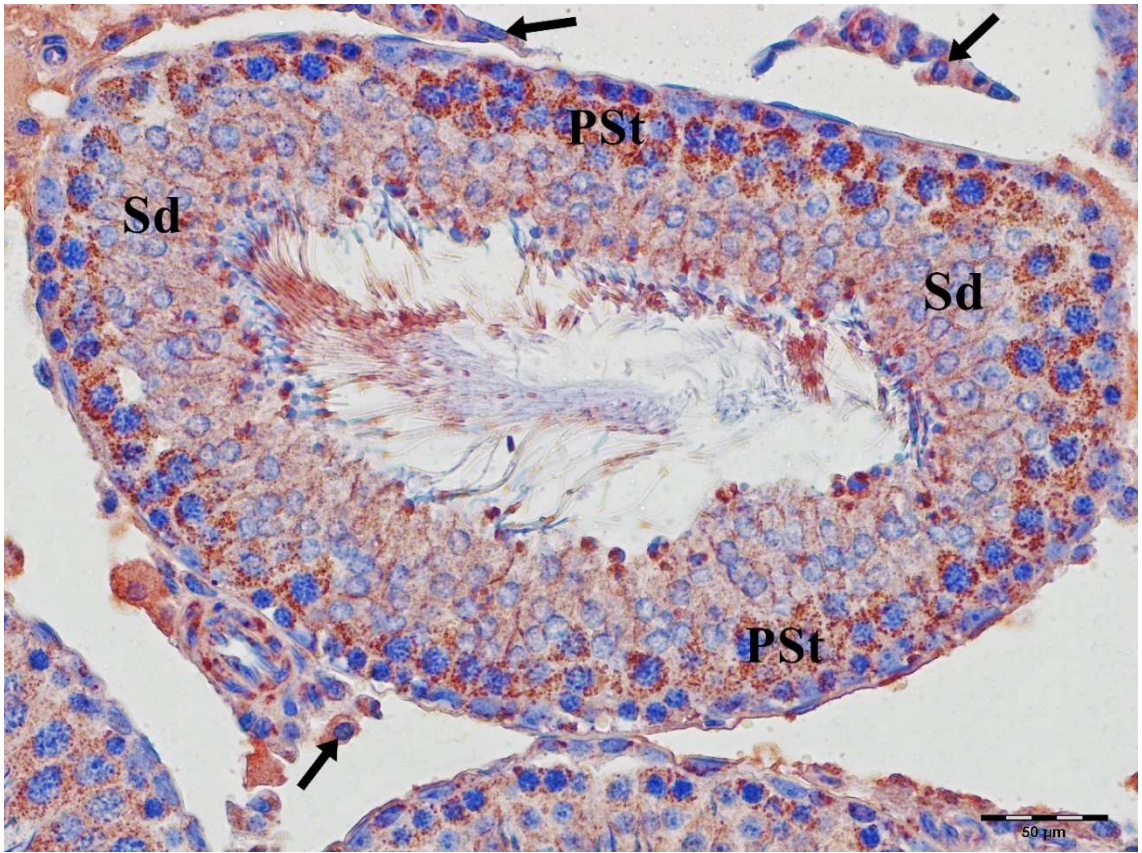


**Şekil 33.** Testis Torsiyon grubu, TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi. Seminiferöz tübül içerisinde primer spermatositlerde (PSt) ve spermatidlerde (Sd) belirgin TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi görülmektedir. İnterstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinde (siyah ok) TNF- $\alpha$  immünreaktivitesinin spermatositlerden daha az olduğu izlenmektedir. Bar= 50  $\mu$ m.



#### 4.3.2.3. Grup 3: Testis Torsiyon/Detorsiyon Grubu (TT/D)

Üç saatlik torsiyon ve 3 saatlik detorsiyondan sonra sakrifikasyon işlemiyle sıçanlardan elde edilen testis doku örneklerinde TNF- $\alpha$  ekspresyonlarının immünreaktivite bulguları torsiyon grubuyla benzer nitelikteydi. Primer spermatositlerde ve spermatidlerde belirgin immünreaktivite izlendi. Spermatogonyumlar ve Sertoli hücrelerinde minimal TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi gözlenirken, torsiyon grubundan farklı olarak interstisyel alanda Leydig hücrelerinde TNF- $\alpha$  immünreaktivitesinde artma fark edildi (Şekil 34).

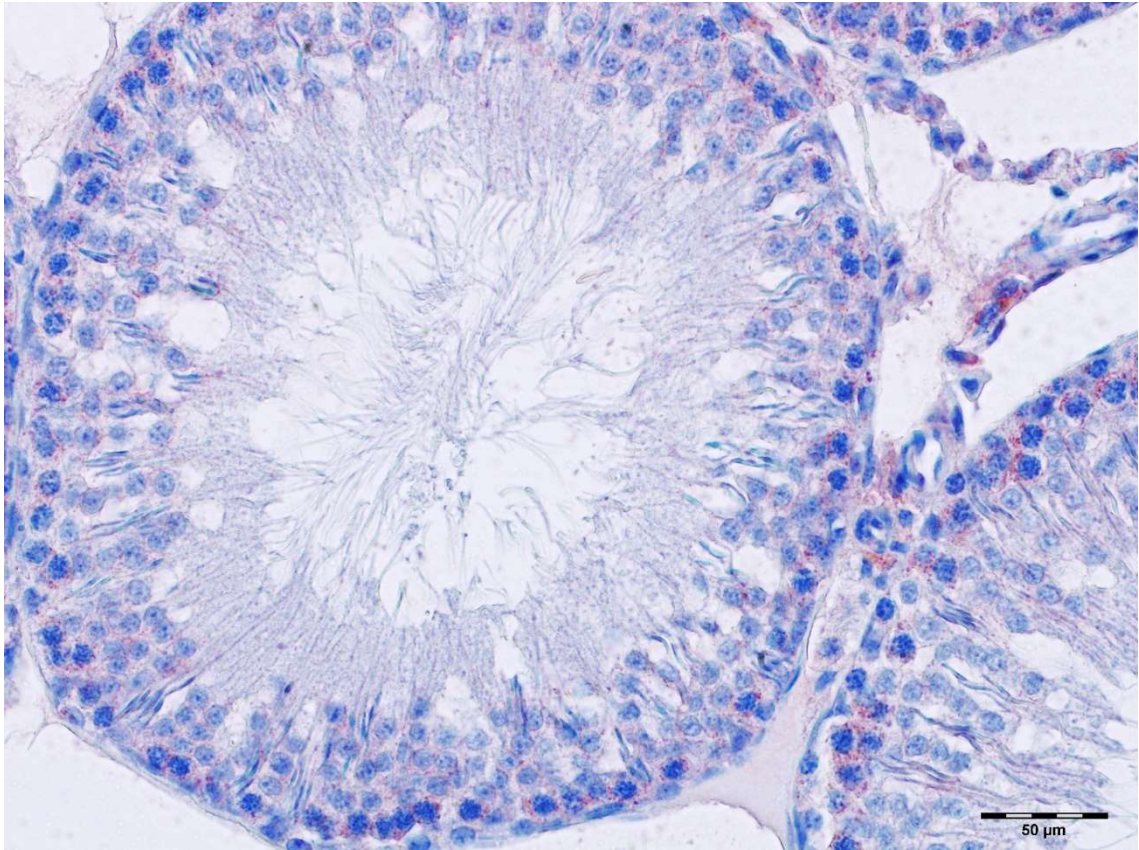


**Şekil 34.** Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu, TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi. Seminiferöz tübüllerdeki primer spermatositlerde (PSt) ile spermatidlerde (Sd), interstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinde (siyah ok) belirgin TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi izlenmektedir. Bar= 50  $\mu$ m.



#### 4.3.2.4. Grup 4: Testis Torsiyonu ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan Grup (TT/N)

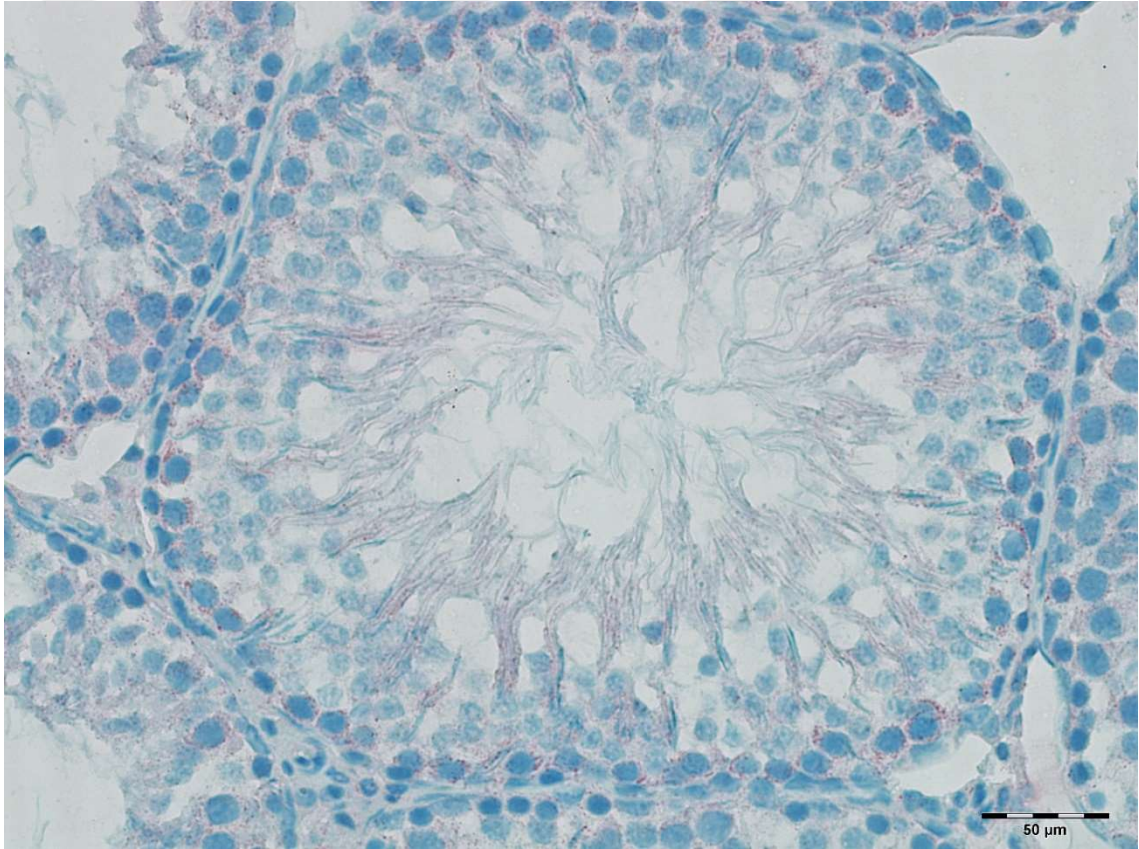
Testis dokusuna uygulanan 3 saatlik torsiyon süresinin 2,5 saatini doldurduktan sonra nimodipin uygulanan sıçanların testis doku örneklerinde TNF- $\alpha$  ekspresyonlarını araştırmak amacıyla immünohistokimyasal boyama yapıldı. Seminiferöz tübüllerin çoğunda TNF- $\alpha$  immünreaktivitesinin azaldığı gözlemlendi. Primer spermatositlerde ve spermatidlerde minimal TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi görüldü. İnterstisyel alanda Leydig hücrelerinde de TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi minimal düzeydeydi (Şekil 35).



**Şekil 35.** Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup, TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi. Bar= 50  $\mu$ m.

#### 4.3.2.5. Grup 5: Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan Grup (TT/D/N).

Testis dokusuna uygulanan 3 saatlik torsiyon işleminin 2,5 saatini dolduran sıçanlara nimodipin uygulandı ve bu işlemten yarım saat sonra detorsiyon gerçekleştirildi. Üç saat detorsiyonda kalan sıçanların testis doku örneklerinde TNF- $\alpha$  ekspresyonlarının immünreaktivitesi incelendiğinde, seminiferöz tübüllerde çoğu hücrede TNF- $\alpha$  ekspresyonlarının minimal düzeyde olduğu gözlenirken primer spermatositlerde boyanmanın diğer hücrelere kıyasla daha fazla olduğu dikkati çekti. İntersisyel alanda Leydig hücrelerinde TNF- $\alpha$  immünreaktivitesinin minimal düzeyde olduğu görüldü (Şekil 36).

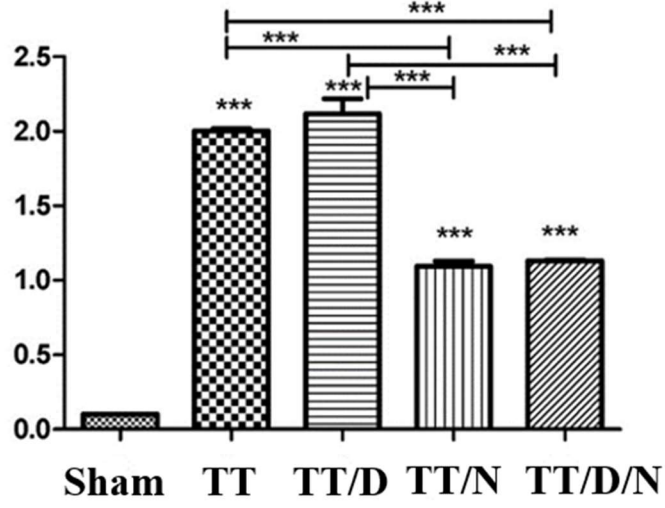


**Şekil 36.** Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup, TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi.  
Bar= 50 µm.

#### 4.3.3. İmmünohistokimyasal Skorlama

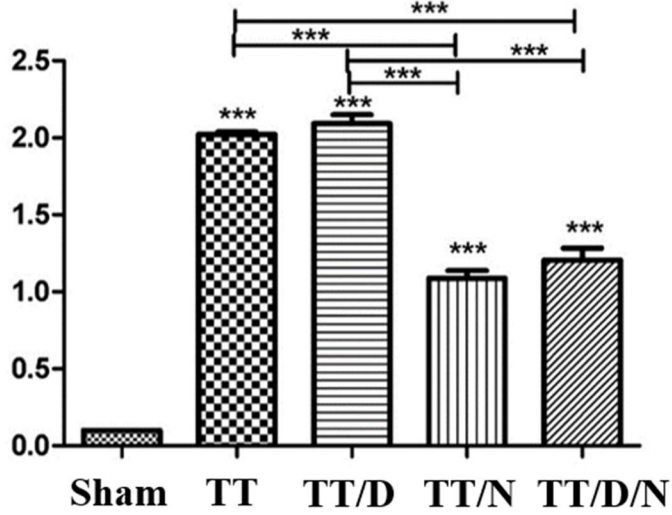
İmmünohistokimyasal skorlama sonuçlarına göre TT ve TT/D gruplarındaki sıçanların testis doku kesitlerinde kaspaz-3 ve TNF- $\alpha$  immünreaktiviteleri sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. TT ve TT/D kendi içinde değerlendirildiğinde immünohistokimyasal skorlama sonuçlarında anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen TT/D'deki artışın bir miktar yüksek olduğu dikkati çekti. Sadece torsiyon ve torsiyon/detorsiyon işlemleriyle beraber tedavi ajanı olarak nimodipin verilen TT/N ve TT/D/N gruplarında kaspaz-3 ve TNF- $\alpha$  immünohistokimyasal skorlama sonuçları, sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken hasar gruplarına (TT ve TT/D) kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu dikkati çekti. TT/N ve TT/D/N kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermezken TT/N'deki azalmanın bir miktar fazla olduğu görüldü (Şekil 37 ve 38).

### Kaspaz-3



Şekil 37. Deney gruplarının testis doku kesitlerinde kaspaz-3 immünreaktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi. \*\*\*p<0.0001.

### TNF- $\alpha$



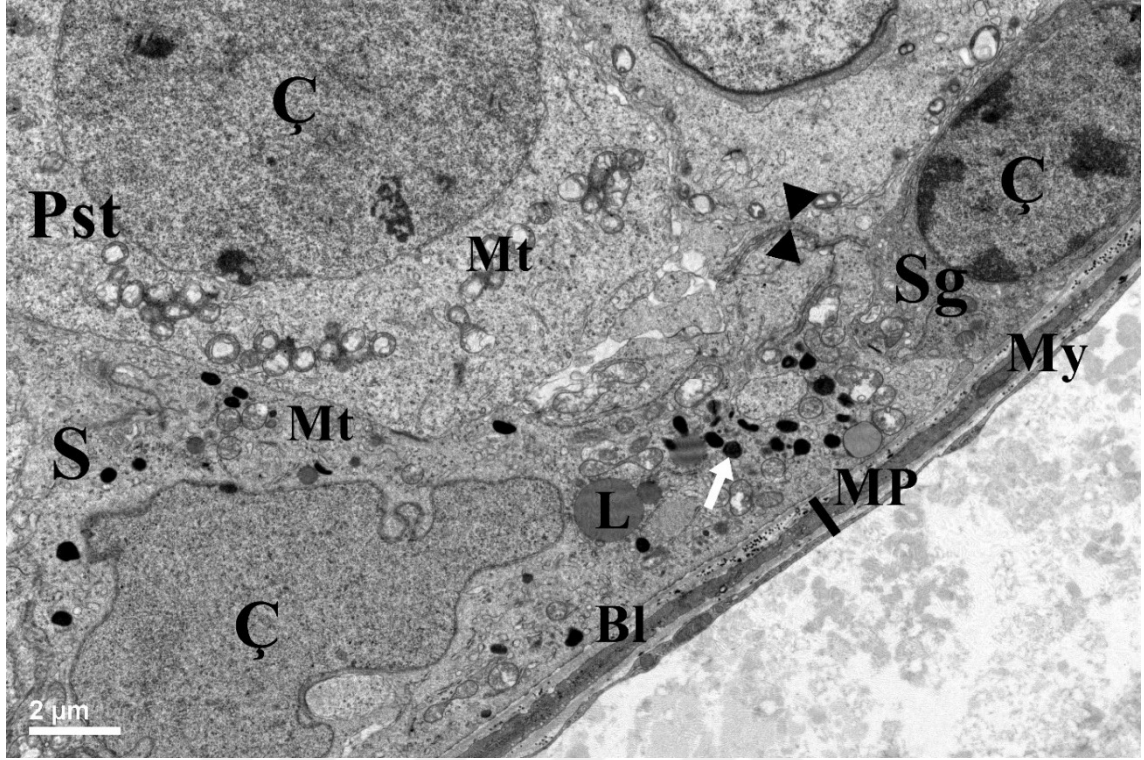
Şekil 38. Deney gruplarının testis doku kesitlerinde TNF- $\alpha$  immünreaktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi. \*\*\*p<0.0001.

#### 4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular

##### 4.4.1. Grup 1: Sham Grubu

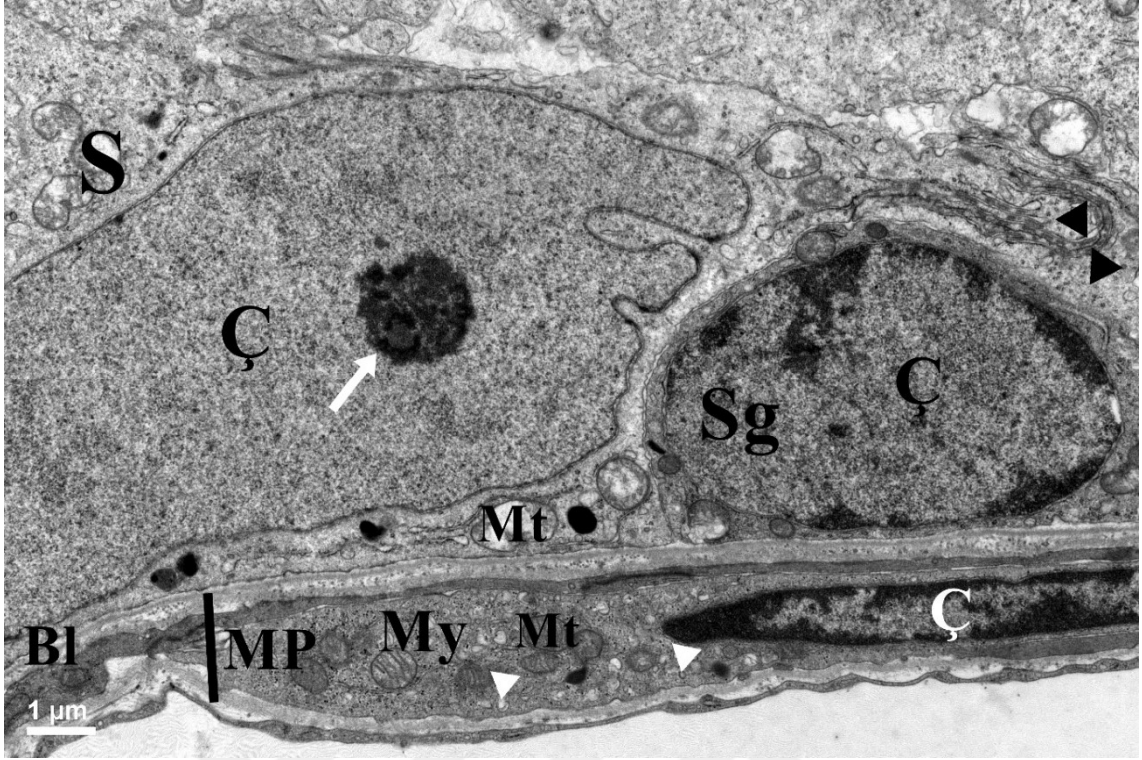
Skrotal kesi yapılan ve sadece testisleri dışarı çıkarılıp tekrar yerine konulan sham grubu sıçanlara ait testis doku örnekleri ince yapı düzeyinde değerlendirildi. Bazal lamina, miyoid hücreler ve membrana proprianın düzenli bir yapı sergilediği görüldü (Şekil 39). Yassı şekilli, periferik kromatin içeren çekirdekleri olan miyoid hücreler normal elektron densiteye sahipti. Miyoid hücrelerin sitoplazmalarında az sayıda mitokondriyon ve mikropinositotik veziküller yer almaktaydı (Şekil 40). Üçgen ya da oval şekilli, indentasyonlu çekirdeğe ve bir çekirdekçiğe sahip olan Sertoli hücreleri, bazaldan lümene kadar uzanmaktaydı. Sertoli hücrelerin sitoplazmasında çok iyi gelişmiş SER, belirgin Golgi kompleksi ve az gelişmiş GER ve lizozomlar gözlemlendi. Mitokondriyonlar tübüler yapıdaydı. Komşu Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantı kompleksleri yer almaktaydı (Şekil 39 ve 40). Bazal lamina üzerinde bulunan spermatogonyumların sferik ve merkezi yerleşim gösteren çekirdeğe sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 39 ve 40). Primer spermatositler oval bir çekirdeğe ve geniş sitoplazmaya sahipti. Mitokondriyonları sitoplazma içerisinde kümeler halinde yerleşmiş haldeydi (Şekil 39). Primer spermatositlerin üzerinde, lümene yakın konumda, spermatidler izlendi. Spermatid sitoplazması içerisinde mitokondriyonların periferde tek sıra oluşturacak şekilde düzenlendiği görüldü (Şekil 41 ve 42). İnteristisyumda, düzensiz, poligonal şekilli Leydig hücreleri, büyük eksantrik ve kromatinden fakir çekirdek içermekteydi. Sitoplazmada gelişmiş SER sisternaları, tübüler krista içeren mitokondriyonlar, lizozomlar ve çok sayıda lipid damlacıkları belirgin olarak izlenmekteydi (Şekil 43). Gevşek bağ dokusu yapısında olan interistisyum, kan ve lenf damarlarından zengindi (Şekil 43).



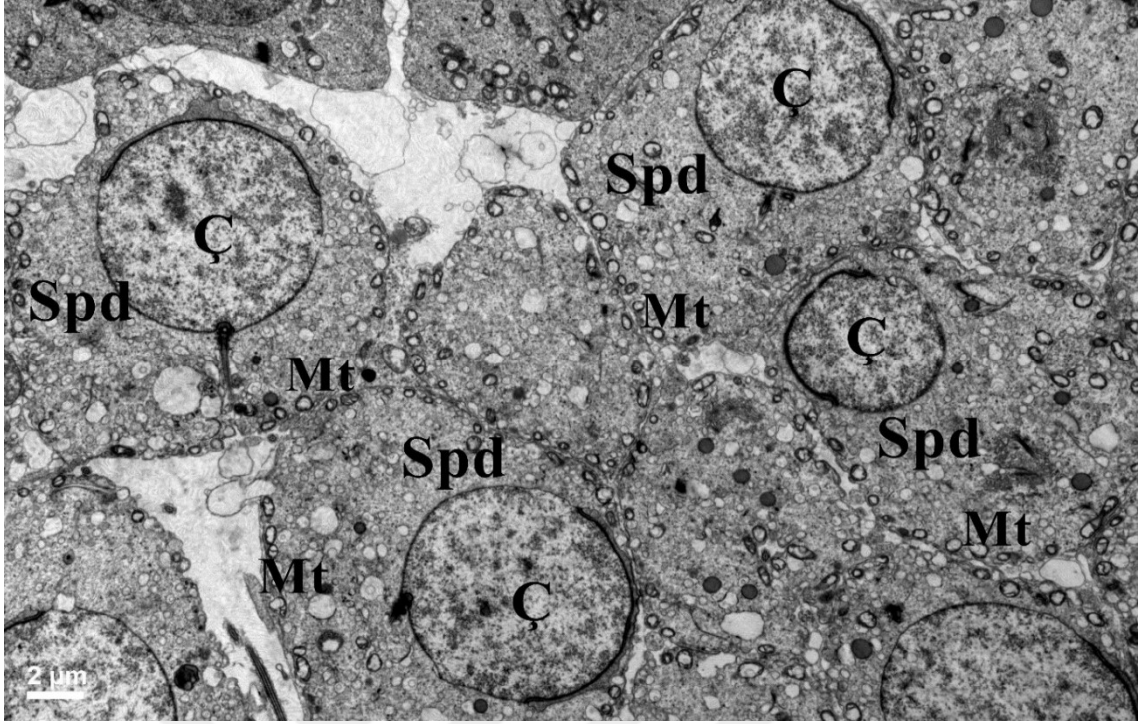


**Şekil 39.** Sham grubu elektronmikrografı. Bazal lamina (Bl), miyoid hücreler (My) ve membrana propria (MP) normal olarak görülmektedir. Sertoli hücreleri (S) arasındaki okludens tipi bağlantılar (siyah ok başları), sitoplazmaları içerisindeki mitokondriyonları (Mt), lipid damlacıkları (L) ve lizozomları (beyaz ok), spermatogonyum (Sg) ve primer spermatosit (Pst) normal yapıda izlenmektedir. Çekirdek (Ç). Bar= 2 µm.

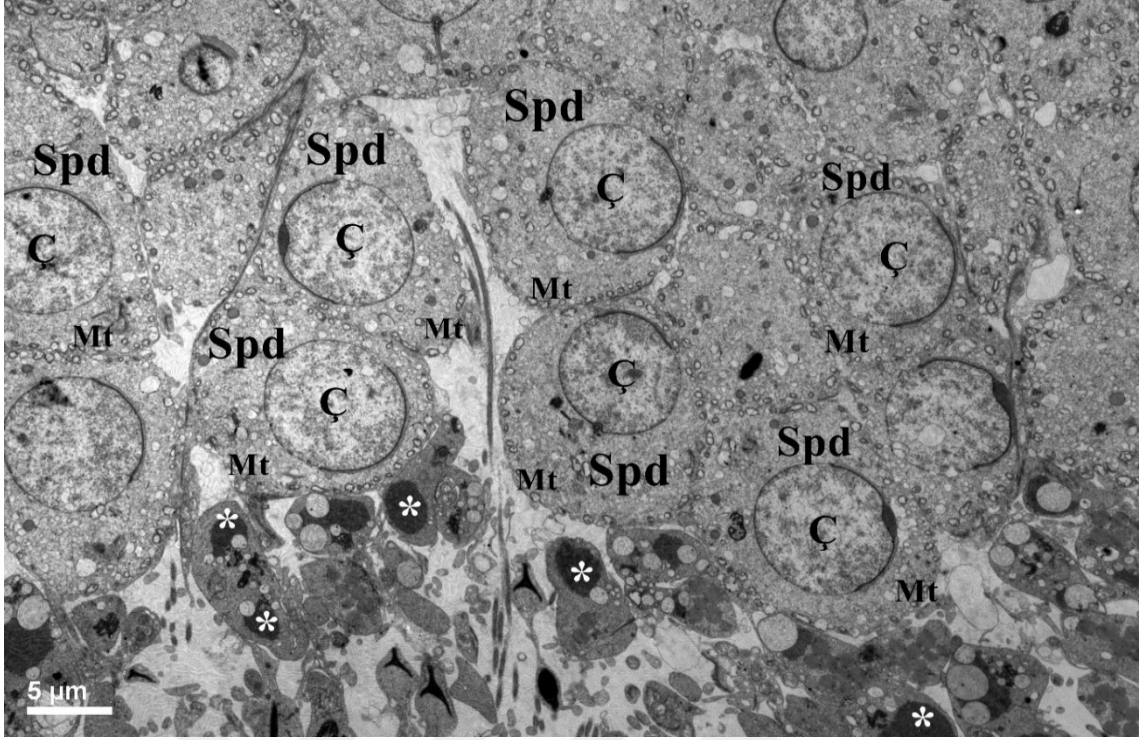




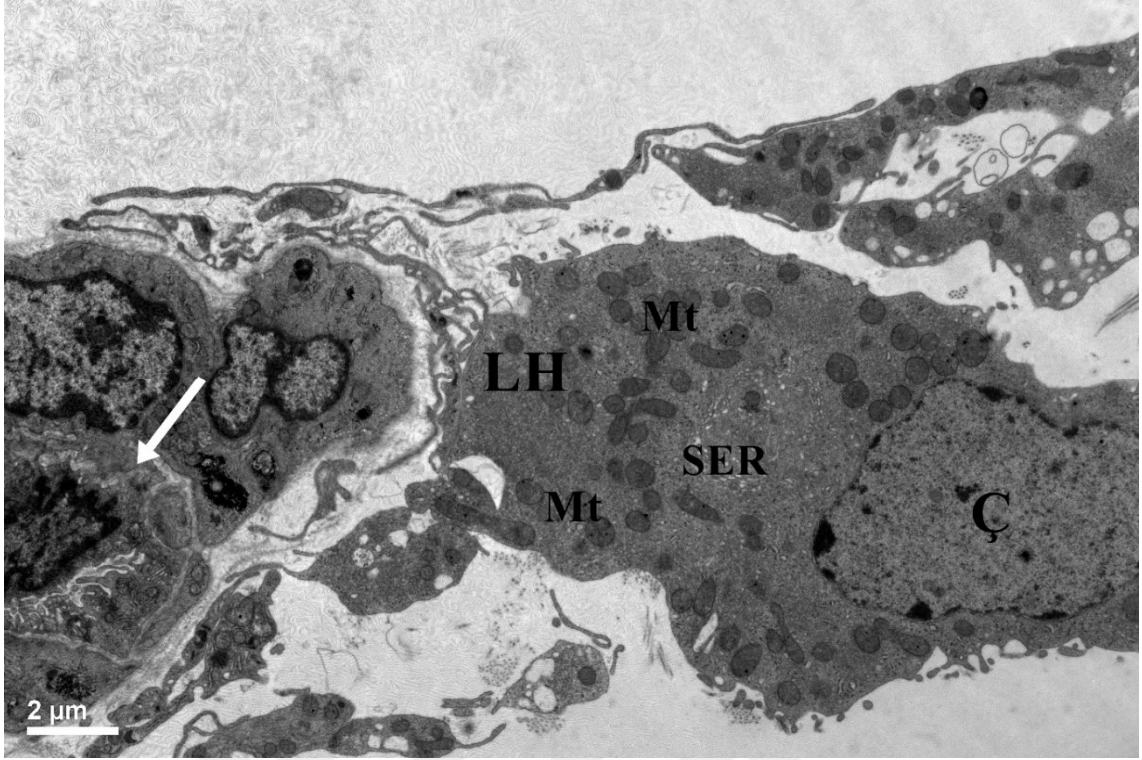
**Şekil 40.** Sham grubu elektronmikrografı. Bazal lamina (Bl), miyoid hücreler (My) ve membrana propria (MP) normal olarak görülmektedir. Miyoid hücrelerin yassı şekilli, periferel kromatin içeren çekirdekleri (Ç), sitoplazmaları içerisinde yer alan mitokondriyonlar (Mt) ve mikropinositotik veziküller (beyaz ok başları) normal olarak izlenmektedir. Sertoli hücreleri (S) arasındaki okludens tipi bağlantılar (siyah ok başları) normal olarak görülmektedir. Sertoli hücresinin bazal sitoplazması içerisinde yer alan, indentasyonlar gösteren, belirgin bir çekirdekçik (beyaz ok) içeren çekirdeği (Ç) ve mitokondriyonları (Mt) görülmektedir. Spermatogonyum (Sg) normal yapıda izlenmektedir. Bar= 1 µm.



**Şekil 41.** Sham grubu elektronmikrografı. Seminiferöz tübülde lümene yakın konumda spermatidler (Spd) izlenmektedir. Spermatid sitoplazması içerisinde çekirdeği (Ç) ve mitokondriyonları (Mt) normal yapıda görülmektedir. Bar= 2 µm.



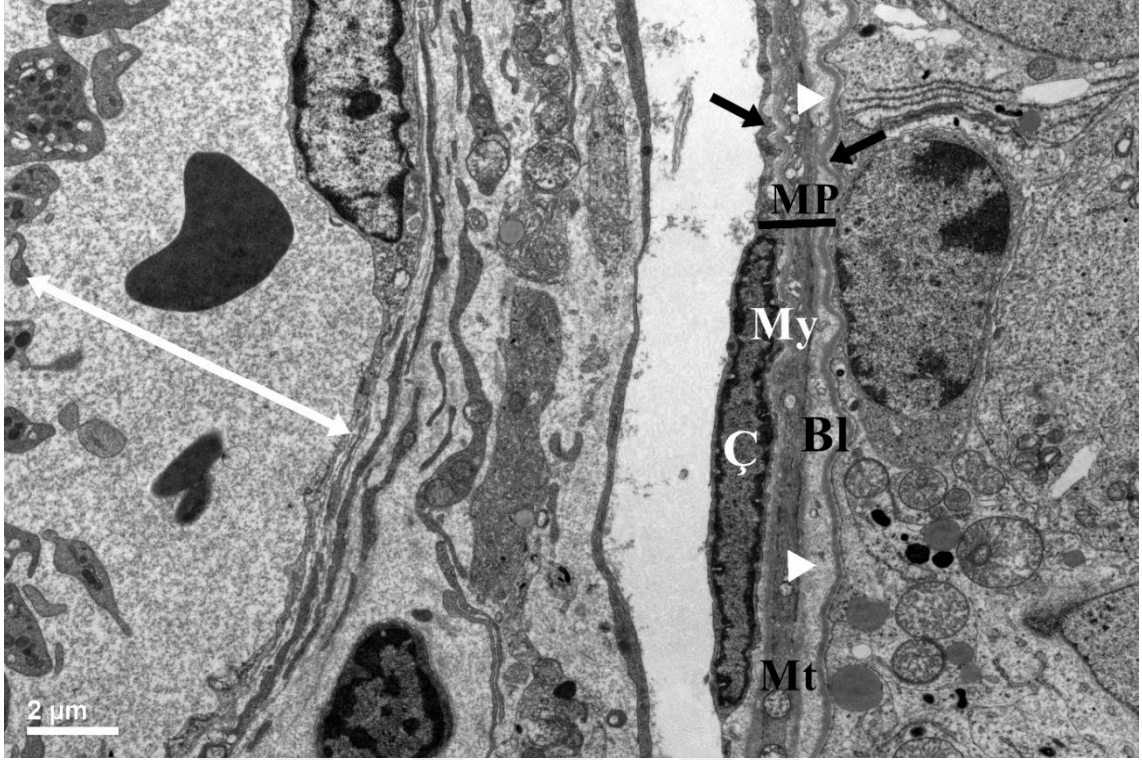
**Şekil 42.** Sham grubu elektronmikrografı. Spermatidlerin (Spd) çekirdeği (Ç) ve mitokondriyonları (Mt) normal yapıda görülmektedir. Rezidüel cisimcikler (\*). Bar= 5 µm.



**Şekil 43.** Sham grubu elektronmikrografı. İnterstisyumda düzensiz, poligonal şekilli Leydig hücresinin (LH) sitoplazması içerisinde kromatinden fakir çekirdeği (Ç), SER sisternaları (SER), tübüler yapıda krista içeren mitokondriyonları (Mt) izlenmektedir. İnterstisyel alanda kan damarı (beyaz ok) görülmektedir. Bar= 2 µm.

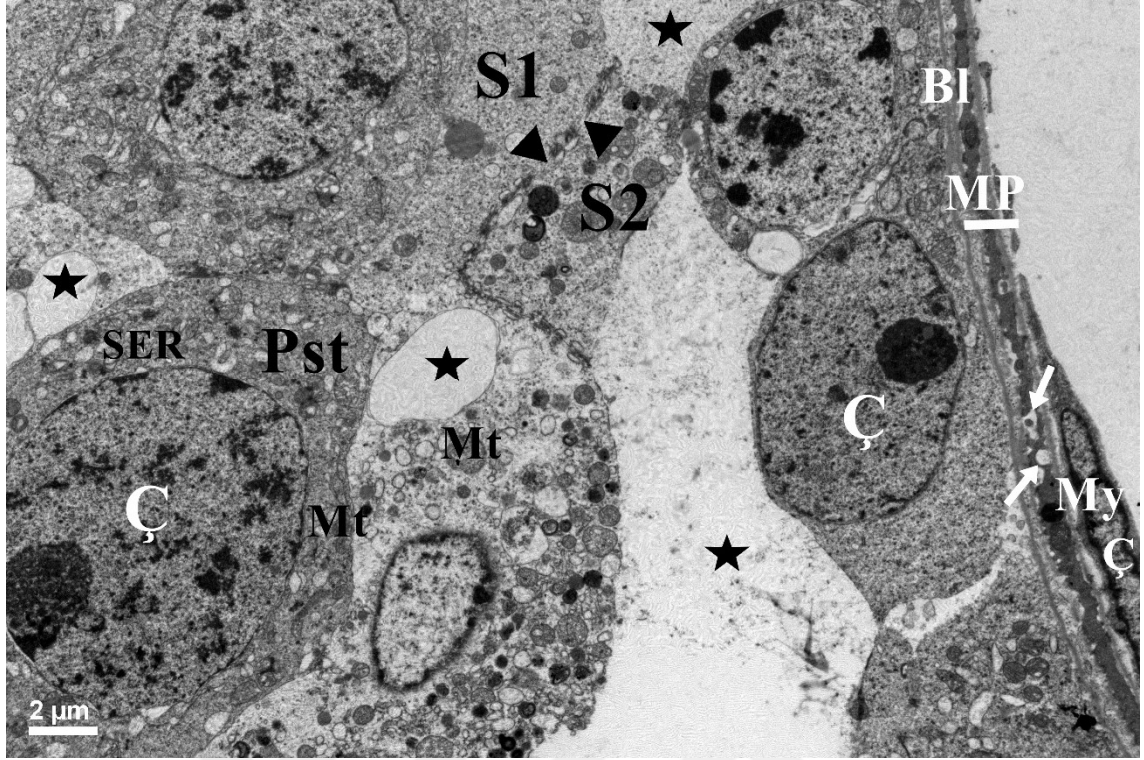
#### 4.4.2. Grup 2: Testis Torsiyon Grubu (TT)

Üç saat torsiyon uygulanan sıçanlara ait testis doku örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesinde, membrana proprianın kalınlaştığı ve düzensizleştiği, seminiferöz tübül bazal laminasının kalınlaştığı, düzensiz ve kıvrıntılı bir hal aldığı görüldü (Şekil 44). Seminiferöz tübül hücrelerinin bazal laminadan ayrıldığı, Sertoli hücreleri ve spermatojenik hücreler arasında geniş boşluklar oluştuğu izlendi (Şekil 45 ve 46). Sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi bağlantılarında bozulma olduğu görüldü. Sertoli hücrelerinde sitoplazma içerisinde mitokondriyonlarda ve SER sisternalarında şişme, vakuol oluşumu, lipid damlacığı ve lizozomlarda artış, dejeneratif ve litik değişiklikler görüldü (Şekil 45 ve 46). Spermatojenik seri hücre diziliminde düzensizlik görüldü. Spermatojenik hücrelerin çekirdeğinde kromatin dağılması, sitoplazmasında vakuolizasyonlar, mitokondriyonlarda şişme dikkati çekti (Şekil 46). Seminiferöz tübül içerisinde hasara bağlı olarak Sertoli hücreleri ve spermatojenik seri hücreleri arasında apoptotik cisimcikler görüldü (Şekil 47). İnterstisyumda bazı kan damarlarında damar bütünlüğünün bozulduğu ve hücreler arası alanda kanama olduğu gözlemlendi (Şekil 48). İnterstisyel alandaki hücrelerde hücre bütünlüğünde bozulma, hücrelerde litik değişiklikler ve apoptotik cisimcikler dikkat çekti (Şekil 48). Leydig hücrelerinde hücresel bütünlüğün bozulduğu, litik ve dejeneratif değişiklikler oluştuğu; sitoplazmik organellerin yapısının bozulduğu, mitokondriyon ve SER sisternalarında şişme oluştuğu görüldü. Leydig hücrelerinin sitoplazmasında lipid damlacıklarının azaldığı izlendi (Şekil 48).

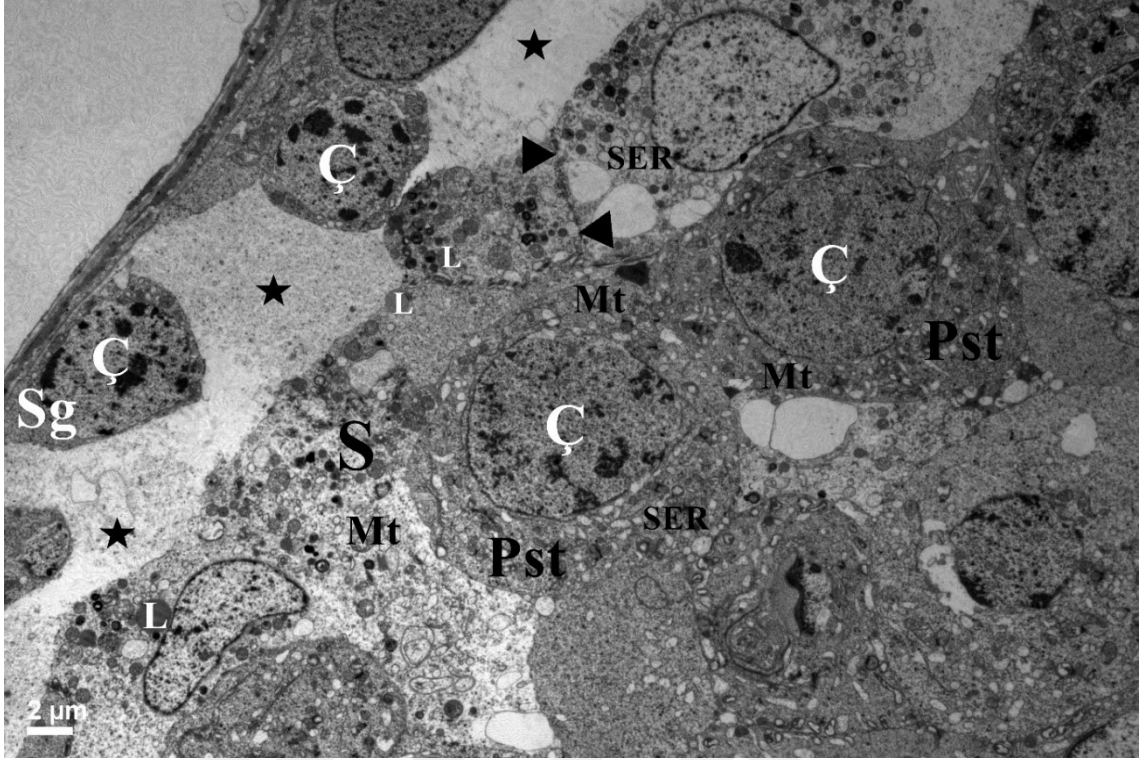


**Şekil 44.** Testis Torsiyon grubu elektronmikrografı. Bazal laminanın (Bl) kalınlaştığı, düzensiz ve kıvrıntılı bir hal aldığı, membrana proprianın (MP) düzensizleştiği (siyah oklar) görülmektedir. Miyoid hücrelerin yassı şekilli, periferik heterokromatin içeren çekirdekleri (Ç) izlenmektedir. Miyoid hücrelerin sitoplazmaları içerisinde yer alan mitokondriyonların (Mt) ve mikropinositotik veziküllerin (beyaz ok başı) genişlediği izlenmektedir. İnteristisyel alanda kan damarı (iki uçlu beyaz ok) görülmektedir. Bar= 2 µm.

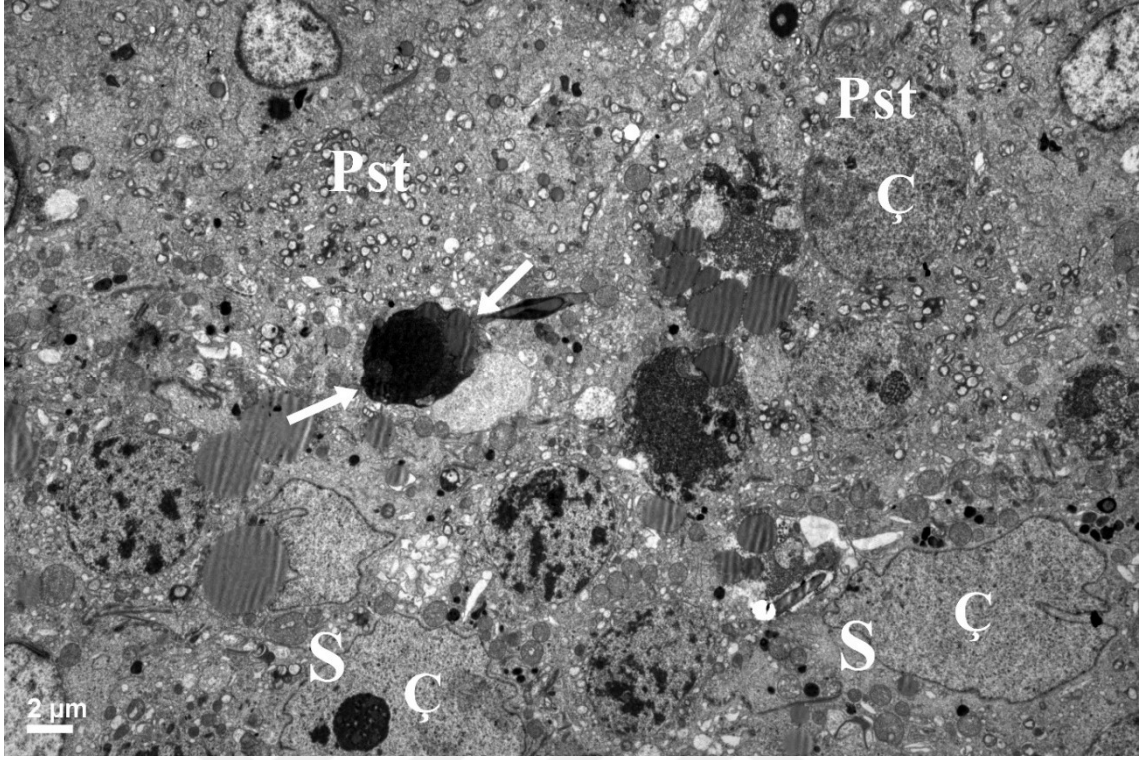




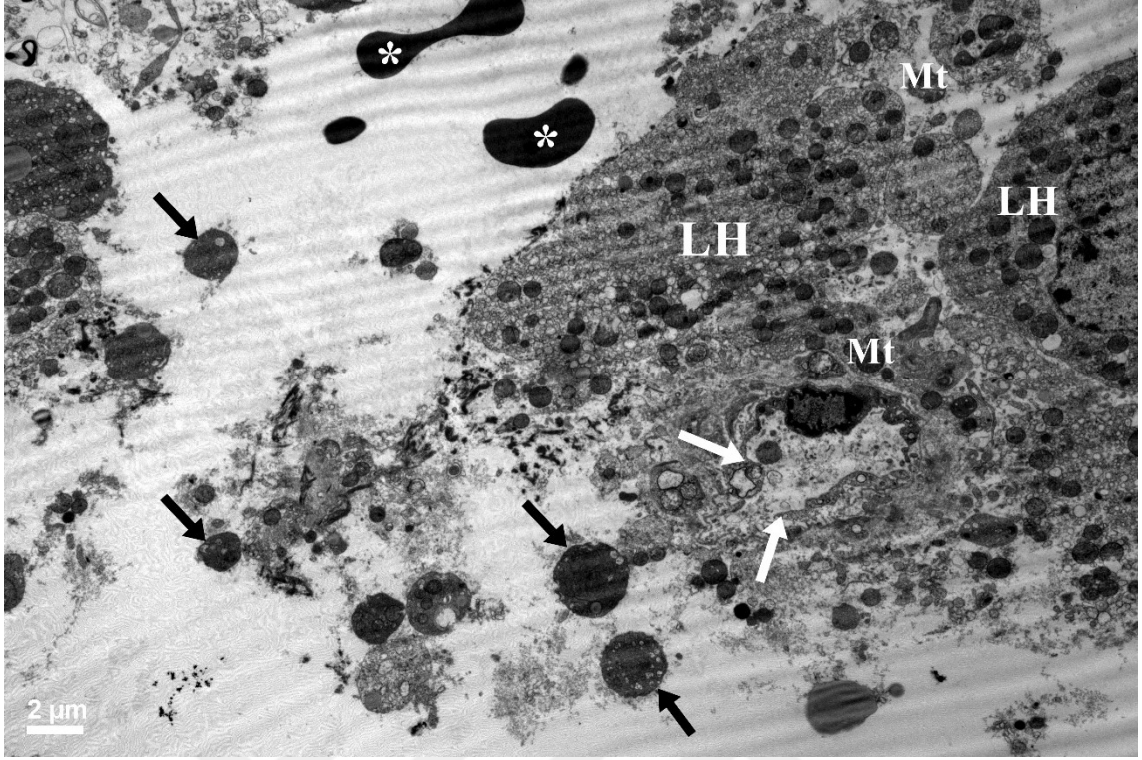
**Şekil 45.** Testis Torsiyon grubu elektronmikrografı. Bazal laminanın (BI) ve membrana proprianın (MP) düzensizleştiği görülmektedir. Miyoid hücrelerin (My) yassı şekilli, periferik yerleşimli heterokromatin içeren çekirdekleri (Ç), sitoplazmaları içerisindeki vakuoller (beyaz ok) izlenmektedir. Seminiferöz tübül epitel hücrelerinin bazal laminadan ayrıldığı, hücreler arası alanda geniş boşluklar (yıldız) olduğu görülmektedir. Sertoli hücrelerinin (S) sitoplazmik organellerinde, mitokondriyonlarında (Mt) şişme ve litik değişiklikler olduğu, Sertoli hücreleri (S1-S2) arasındaki okludens tipi bağlantıların (siyah ok başı) yapısında bozulmalar olduğu dikkati çekmektedir. Primer spermatositin (Pst) sitoplazmasında mitokondriyonlarda (Mt) ve SER sisternalarında (SER) genişlemeler izlenmektedir. Çekirdek (Ç). Bar= 2 µm.



**Şekil 46.** Testis Torsiyon grubu elektronmikrografı. Sertoli hücreleri (S) ile spermatogonyumların bazal laminadan (Bl) ayrıldığı, seminiferöz tübül epitelinde hücreler arasında genişlemeler (yıldız) olduğu görülmektedir. Sertoli hücrelerinde (S) litik ve dejeneratif değişiklikler olduğu, sitoplazmalarında lipid damlacığının (L) arttığı, Sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi bağlantılarda bozulmalar olduğu (siyah ok başı) izlenmektedir. Spermatogonyum (Sg) sitoplazmasının elektron densitesinin arttığı, çekirdekte (Ç) heterokromatin artışı dikkat çekmektedir. Primer spermatosit (Pst) çekirdek (Ç) yapısında düzensizlik ve sitoplazmada mitokondriyonlarda (Mt) şişme ve krista yapısında bozulmalar izlenmektedir. Bar= 2 µm.



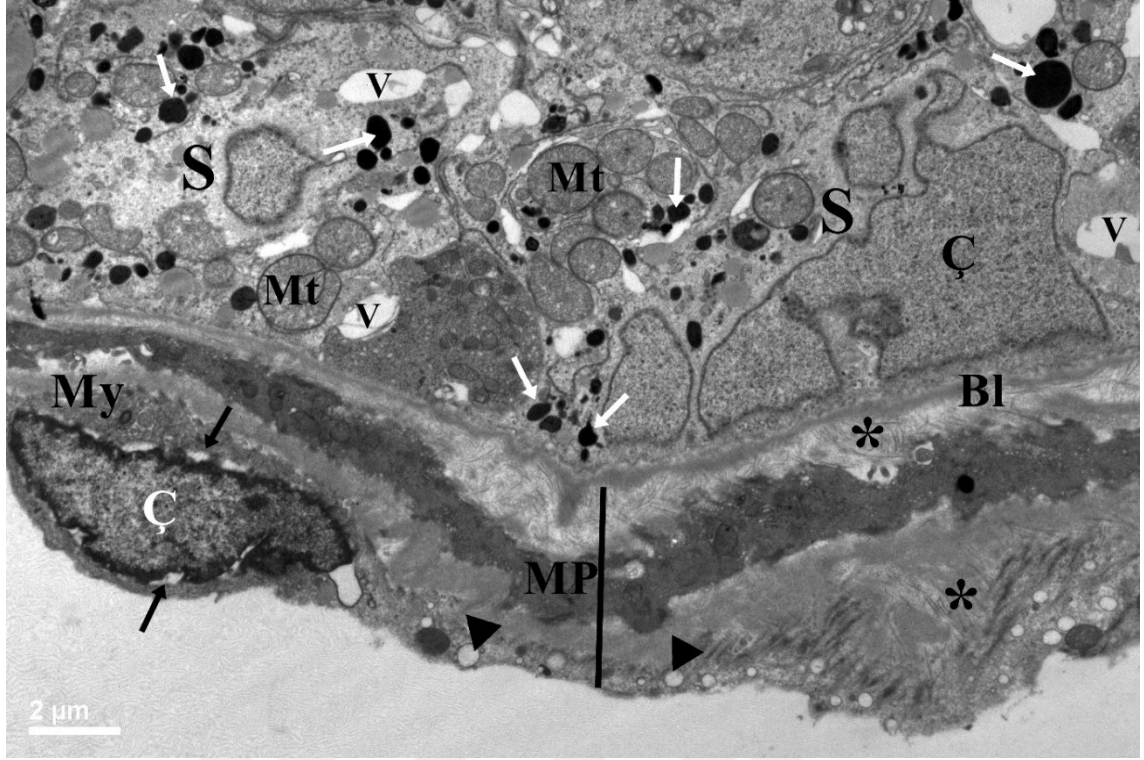
**Şekil 47.** Testis Torsiyon grubu elektronmikrografı. Seminiferöz tübül epitel hücreleri arasında apoptotik cisimcikler (beyaz ok) izlenmektedir. Sertoli hücresi (S), primer spermatosit (Pst), çekirdek (Ç). Bar= 2 µm.



**Şekil 48.** Testis Torsiyon grubu elektronmikrografı. İnterstisyel alandaki kan damarının bütünlüğünün bozulduğu (beyaz oklar) ve interstisyel alanda eritrositlerin (\*) varlığı dikkati çekmektedir. Leydig hücrelerinde (LH) litik ve dejeneratif değişiklikler gözlenmektedir. İnterstisyel alanda apoptotik cisimciklerin (siyah ok) varlığı dikkat çekmektedir. Mitokondriyon (Mt). Bar= 2 µm.

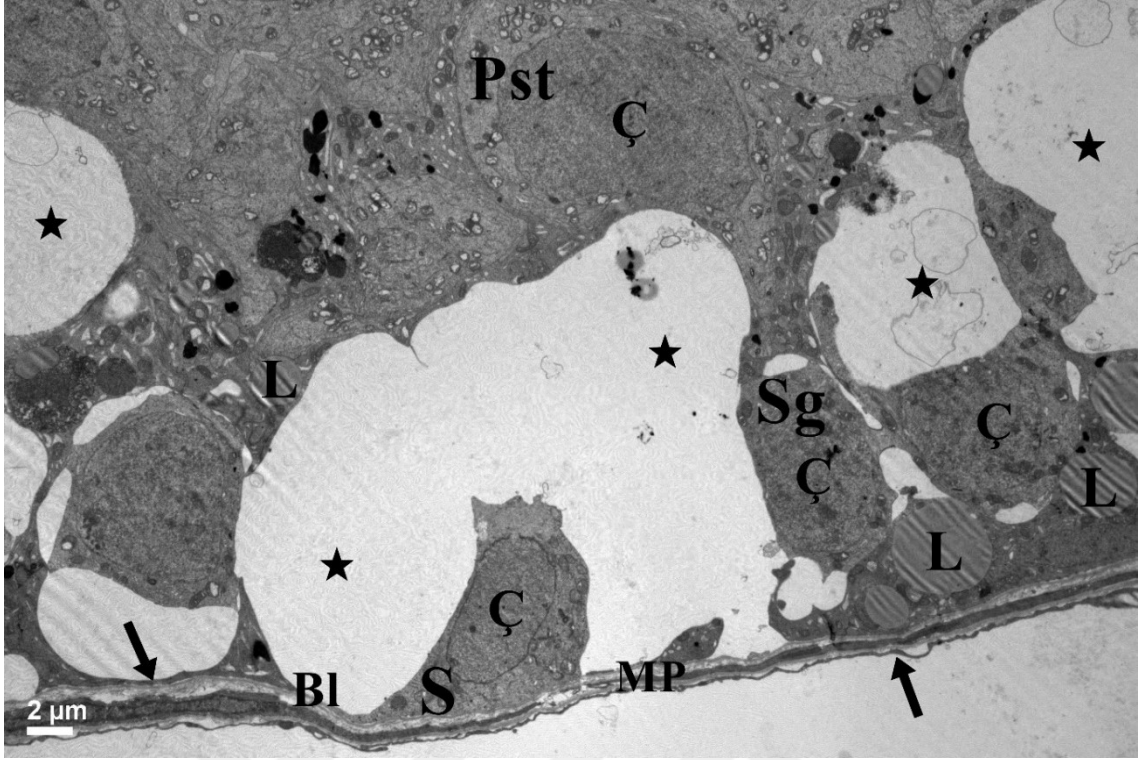
#### 4.4.3. Grup 3: Testis Torsiyon/Detorsiyon Grubu (TT/D)

Üç saatlik torsiyonun ardından üç saat detorsiyon uygulanan sıçanların testis doku örneklerinde, membrana proprianın kalınlaşıp düzensizleştiği, kollajen liflerin arttığı dikkati çekti. Miyoid hücrelerde perinükleer sisternada ve sitoplazma içerisindeki pinositotik veziküllerinde genişleme görüldü (Şekil 49). Seminiferöz tübül epitel hücrelerinin bazal laminadan ayrıldığı, hücreler arası alanda genişlemeler oluştuğu dikkati çekti (Şekil 50). Sertoli hücrelerinin çekirdeğinde heterokromatin artışı ile litik değişiklikler, sitoplazmasında vakuolizasyonlar, mitokondriyonlar ve SER sisternalarında genişleme, lipid damlacıkları ve lizozomlarda artış izlendi (Şekil 49, 50 ve 51). Primer spermatositlerin çekirdekleri anormal kromatin yoğunlaşması göstermekteydi (Şekil 51). Seminiferöz tübül içerisinde apoptotik cisimciklerin varlığı görüldü (Şekil 52). İnterstisyumda yaygın kanama (çok sayıda ve dağınık vaziyette eritrositler) görüldü (Şekil 51 ve 53). İnterstisyel alanda inflamatuvar hücre sayısında artış (nötrofil infiltrasyonu, makrofaj sayısında artış, eozinofili), bazı hücrelerde litik değişiklikler ve hücre bütünlüğünde bozulmalar dikkati çekti (Şekil 51 ve 53). Leydig hücresinde perinükleer sisternalarda genişleme, çekirdekte periferik yerleşimli heterokromatin artışı, çekirdeğin indentasyonlu bir hal aldığı aynı zamanda sitoplazmada krista yapısı bozulmuş mitokondriyonlar, SER sisternalarında genişleme dikkati çekti (Şekil 54). Genel olarak tüm Leydig hücrelerinin sitoplazmasında lipid damlacık sayısında belirgin bir azalmanın olduğu görüldü.

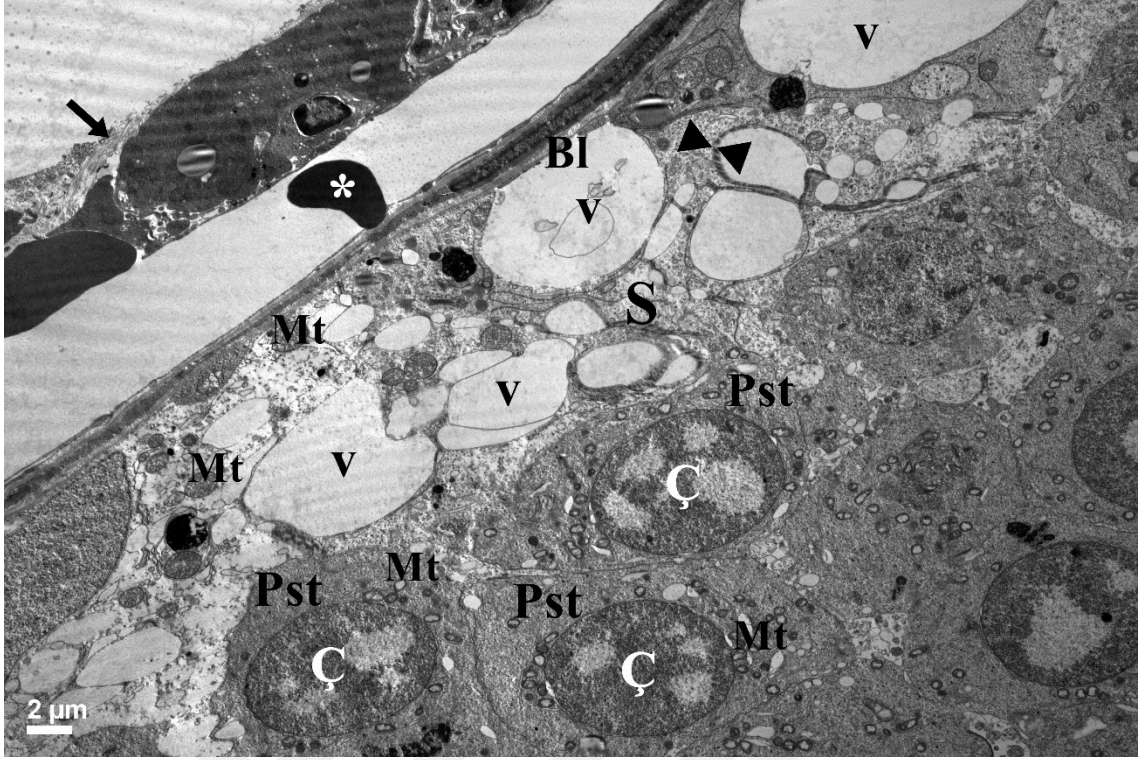


**Şekil 49.** Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu elektronmikrografı. Membrana prropriyada (MP) kalınlaşma ve düzensizleşme, kollajen liflerde (\*) artma gözlenmektedir. Miyoid hücre (My) çekirdeğinde (Ç) perinükleer sisternalarda (siyah ok) ve sitoplazmasında mikropinositik veziküllerde (ok başı) genişleme izlenmektedir. Sertoli hücre (S) sitoplazmasında mitokondriyonlarda (Mt) şişme, lizozom (beyaz ok) sayısında artış, vakuolizasyonlar (v) görülmektedir. Bar= 2 µm.

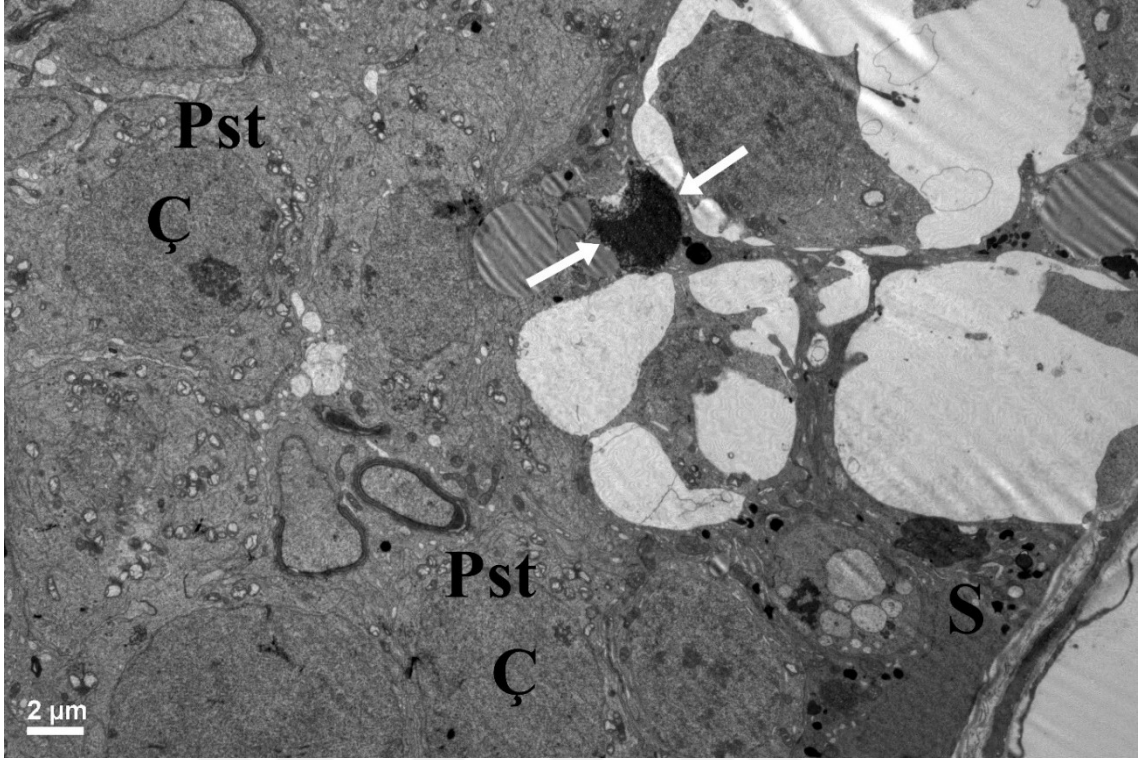




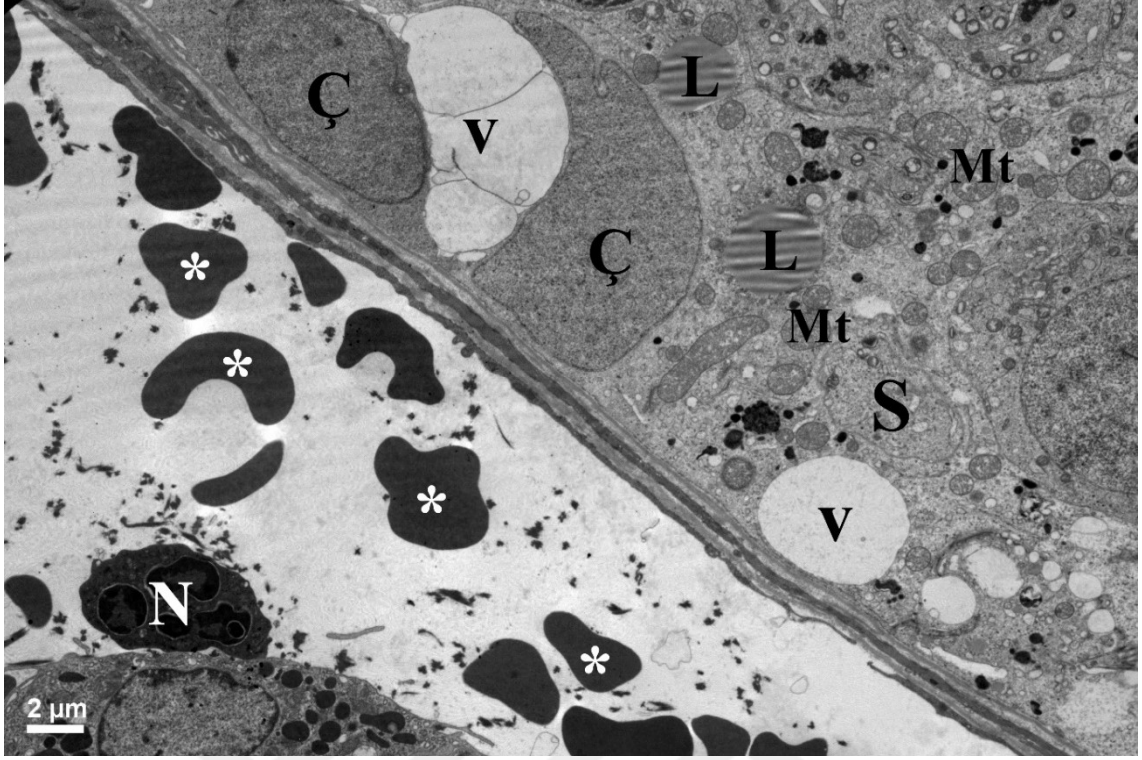
**Şekil 50.** Testis Torsiyon/Detorsiyon grubu elektronmikrografı. Bazal lamina (Bl) ve membrana proprianın (MP) düzensizleştiği (siyah oklar) gözlenmektedir. Sertoli hücreleri (S) ve spermatonyumların (Sg) bazal laminadan ayrıldığı, seminiferöz tübül epitel hücreleri arasında boşluklar (yıldız) oluştuğu izlenmektedir. Sertoli hücresi sitoplazmasında elektron densite artışı ve dev lipid damlacıklarının (L) varlığı dikkati çekmektedir. Çekirdek (Ç), Primer Spermatosit (Pst). Bar= 2 µm.



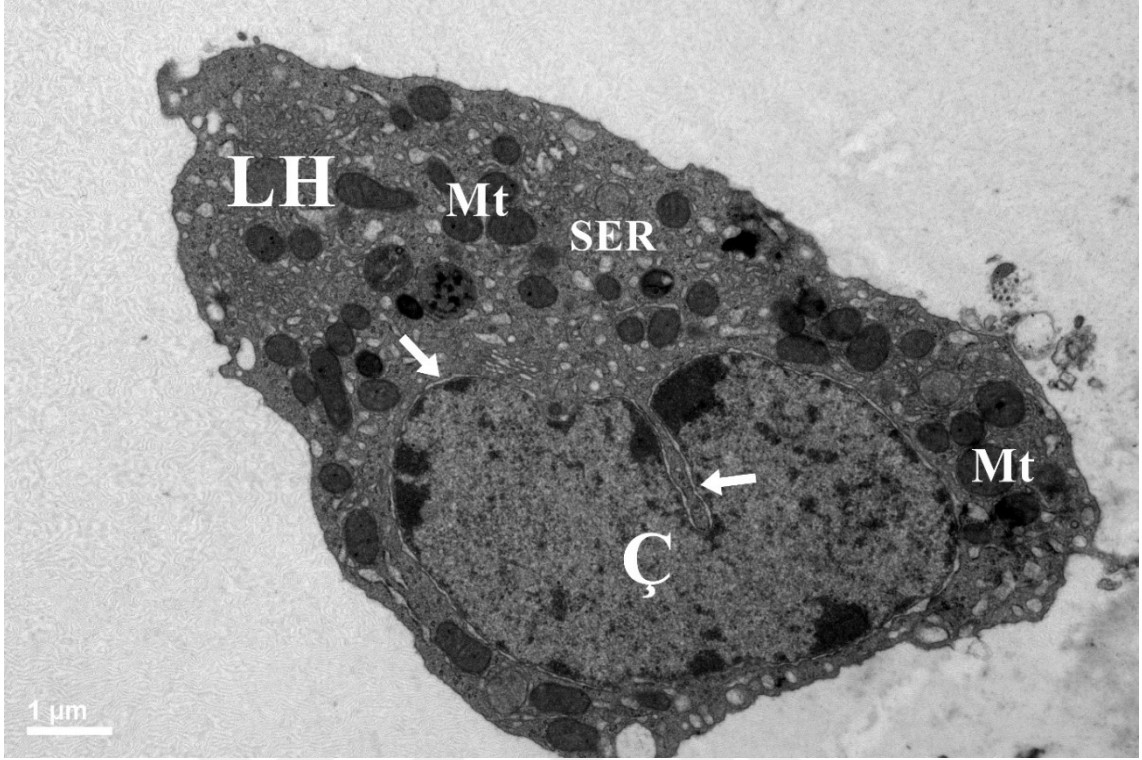
**Şekil 51.** Testis Torsiyon/Detosiyon grubu elektronmikrografı. Seminiferöz tübül epitelinin bazal laminadan (Bl) ayrıldığı gözlenmektedir. Seminiferöz epitel hücreleri arasında vakuolizasyonlar (v) dikkati çekmektedir. Sertoli hücre (S) yapısında bozulma, mitokondriyon (Mt) krista yapısında bozulma ve Sertoli hücreleri arasında bulunan okludens tipi bağlantılarda bozulma (ok başı) dikkati çekmektedir. Primer spermatosit (Pst) çekirdeklerinde (Ç) anormal kromatin yoğunlaşması izlenmektedir. İnterstisyel alanda kanama (\*) ve bazı hücrelerin bütünlüğünde bozulmalar (siyah ok) gözlenmektedir. Bar= 2 µm.



**Şekil 52.** Testis Torsiyon/Detosiyon grubu elektronmikrografı. Seminiferöz tübül epiteli içerisinde apoptotik cisimcik (beyaz ok) izlenmektedir. Sertoli hücresi (S), primer spermatosit (Pst), çekirdek (Ç). Bar= 2 µm.



**Şekil 53.** Testis Torsiyon/Detosiyon grubu elektronmikrografı. Seminiferöz tübül epitelinde vakuolizasyonlar (v) izlenmektedir. Sertoli hücre (S) sitoplazması içerisinde indentasyonlu çekirdeği (Ç), şişmiş ve krista yapıları bozulmuş mitokondriyonlar (Mt) ve dev lipid (L) damlacıkları dikkati çekmektedir. İnterstisyumda kanama varlığını gösteren eritrositler (\*) görülmektedir. Nötrofil (N). Bar= 2 µm.

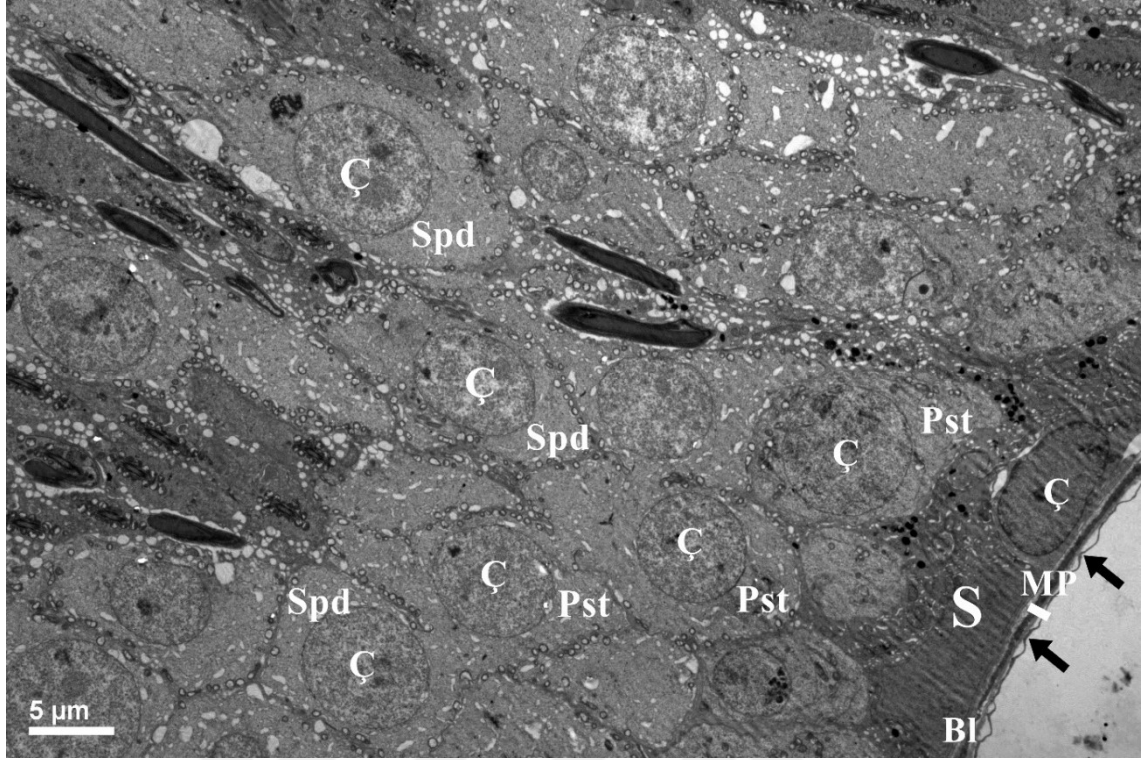


**Şekil 54.** Testis Torsiyon/Detosiyon grubu elektronmikrografı. İnterstisyel alanda Leydig hücresinin (LH) çekirdeğinde (Ç) periferik yerleşimli heterokromatin ve perinükleer sisternalarında (beyaz ok) genişlemeler dikkati çekmektedir. Sitoplazmada densite artışı, SER sisternaları (SER) ve mitokondriyonlarında (Mt) şişme izlenmektedir. Bar= 1 µm.

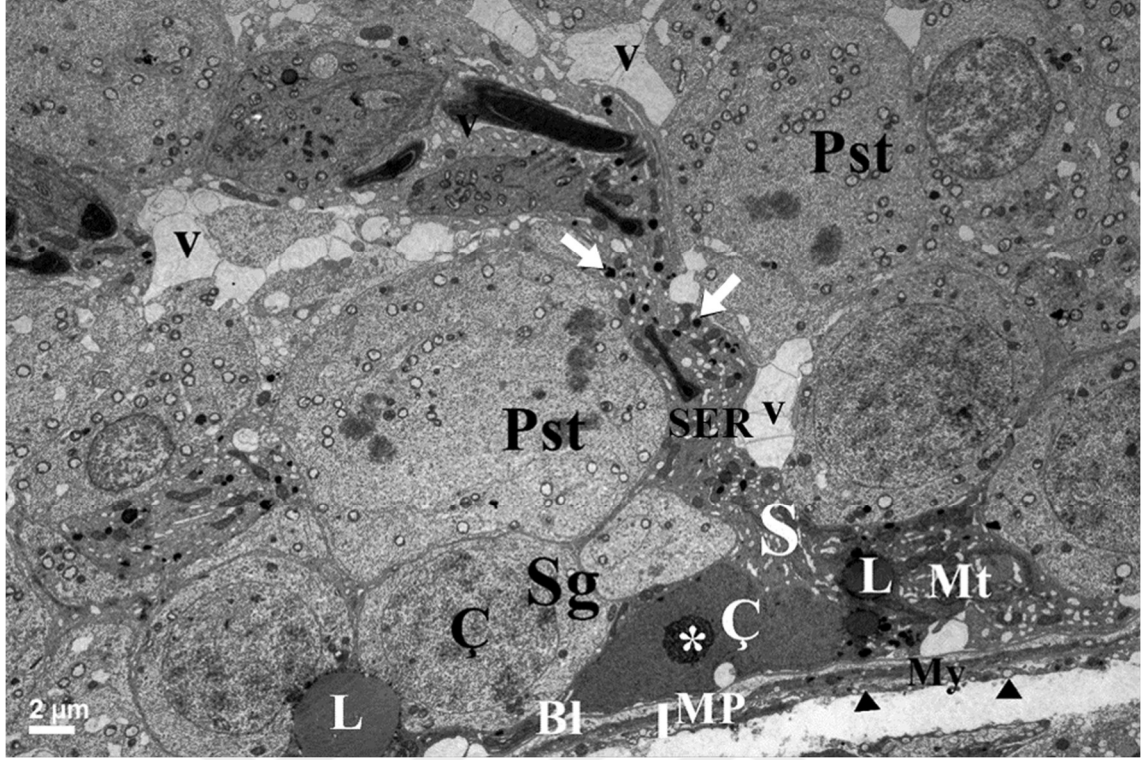
#### **4.4.4. Grup 4: Testis Torsiyonu ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan Grup (TT/N)**

Testis dokusuna uygulanan torsiyondan 2,5 saat sonra nimodipin uygulanan sıçanların doku örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesinde seminiferöz tübüllerin bazal laminası ve membrana propria çoğunlukla normal yapıda olmakla birlikte yer yer hafif düzensizlikler olduğu izlendi (Şekil 55 ve 56). Miyoid hücreler mikropinositik veziküllerinde hafif genişlemeler izlenmekle birlikte çoğunlukla normal görünümdeydi (Şekil 56). Seminiferöz tübül epiteli içerisinde hücreler arasında hasar gruplarına göre çok daha az vakuolizasyon izlendi. Bazı Sertoli hücre sitoplazması, hasar gruplarına kıyasla daha az olmak üzere elektron dens hale gelmişti. Sertoli hücre sitoplazmasında belirgin çekirdekçiğe sahip çekirdek, az miktarda lipid artışı, SER sisternalarında ve mitokondriyonlarda hafif genişleme olmakla birlikte çoğunlukla normal yapısını korumaktaydı. Sferikal çekirdekleriyle ve organel yönünden fakir sitoplazmalarıyla karakterize spermatogonyumların çevrelerinde yer yer düzensiz boşluklar bulunmaktaydı (Şekil 56). Yuvarlak çekirdekli primer spermatositlerde sitoplazma içerisinde gruplaşmış mitokondriyonlarda hafif genişleme olmakla birlikte normal elektron dens yapısındaydı. Spermatidler çekirdekleri ve hücre periferine sıra sıra yerleşmiş mitokondriyonları ile normal bir yapı sergilemekteydi (Şekil 55 ve 56). İnterstisyel alanda normal elektron densliğe sahip Leydig hücre sitoplazmasında düzensiz sınırlı periferik kromatin içeren çekirdek ve hafif genişlemiş SER sisternaları, farklı büyüklüklerde yer yer lipid damlacıkları ve tübüler krista yapısına sahip normal görünümlü mitokondriyonlar izlenmekteydi (Şekil 57). Leydig hücrelerinde hafif hasar olmakla birlikte litik yapılar bulunmamaktaydı.

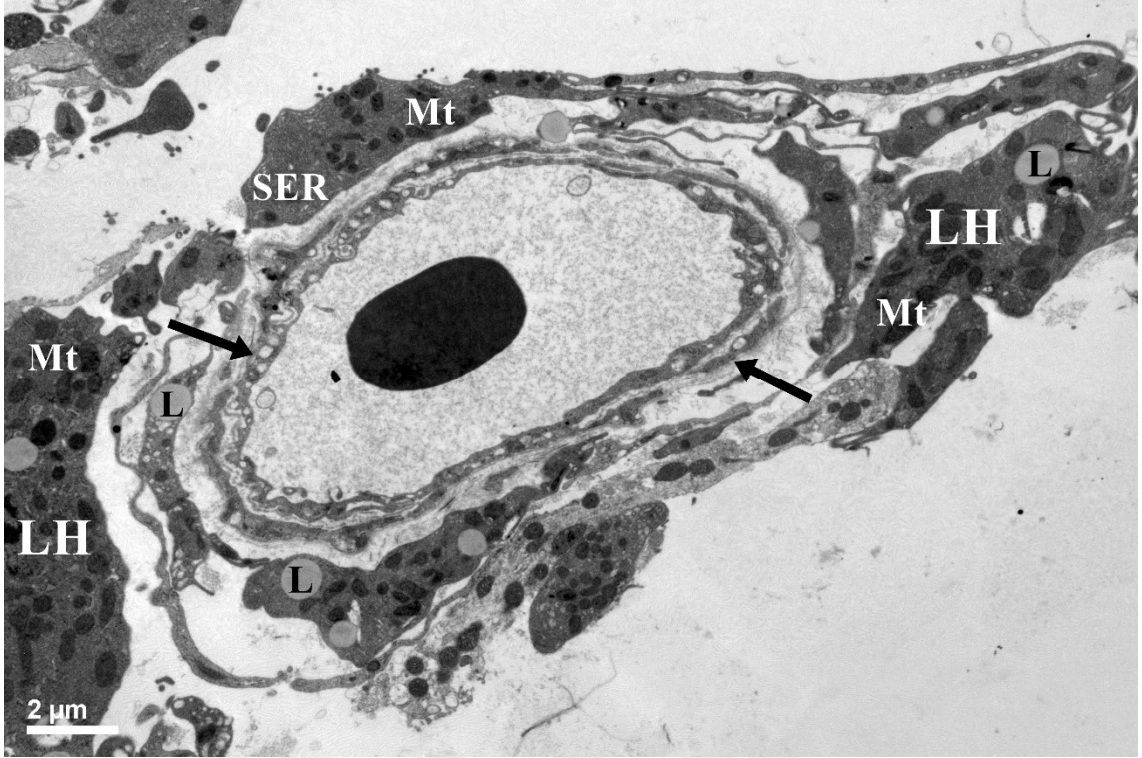




**Şekil 55.** Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup elektronmikrografı. Bazal lamina (Bl) normal görünmekle beraber membrana propriada (MP) hafif düzensizlik (siyak ok) izlenmektedir. Sertoli hücreleri (S), primer spermatosit (Pst), spermatid (Spd) normal yapıda izlenmektedir. Çekirdek (Ç). Bar= 5 µm.



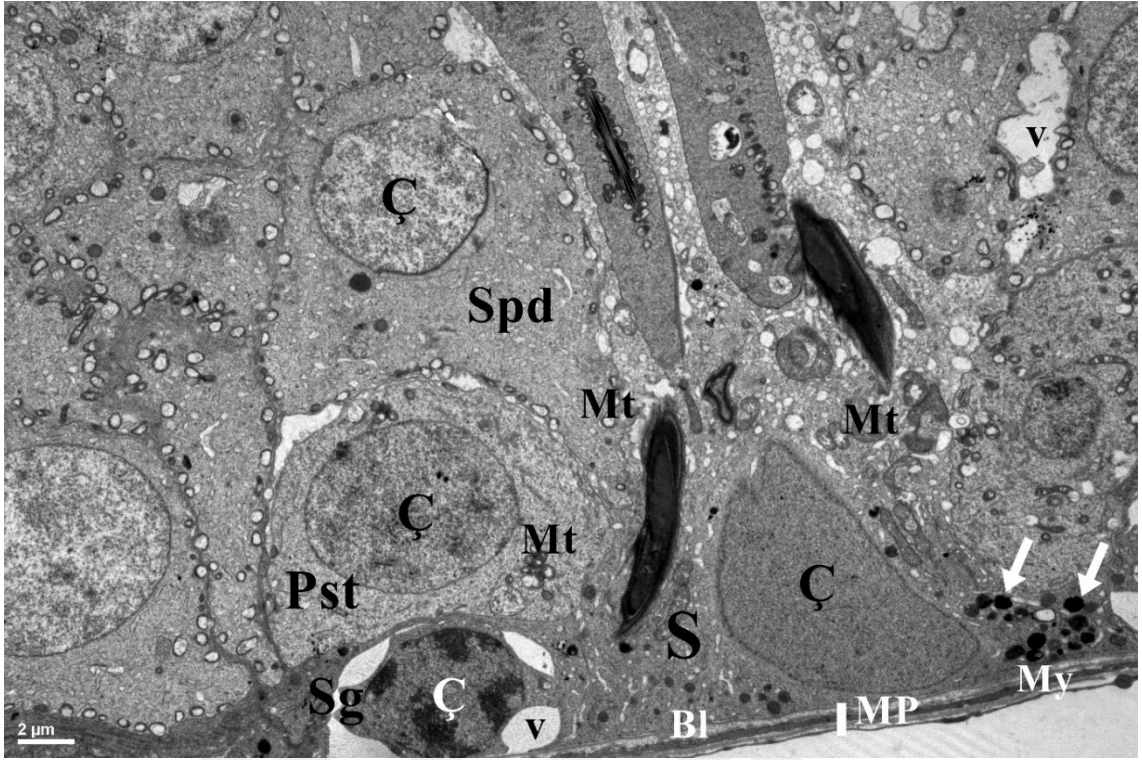
**Şekil 56.** Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup elektronmikrografı. Bazal lamina (Bl) normal yapıda izlenmektedir. Membrana propria (MP) çoğunlukla normal görünmekle birlikte, miyoid hücre (My) sitoplazması içerisinde mikropinositik veziküllerde yer yer genişlemeler (ok başı) görülmektedir. Seminiferöz tübül epitel hücreleri arasında hafif vakuolizasyonlar (v) dikkat çekmektedir. Sertoli hücresi (S) sitoplazmasında elektron densite artışı, SER sisternalarında (SER) genişlemeler izlenmektedir. Sertoli hücre çekirdeği (Ç), çekirdekçik (\*), mitokondriyon (Mt), lipid damlacıkları (L), lizozomlar (beyaz ok), spermatogonyum (Sg), primer spermatosit (Pst) normal yapıda izlenmektedir. Çekirdek (Ç). Bar= 2 µm.



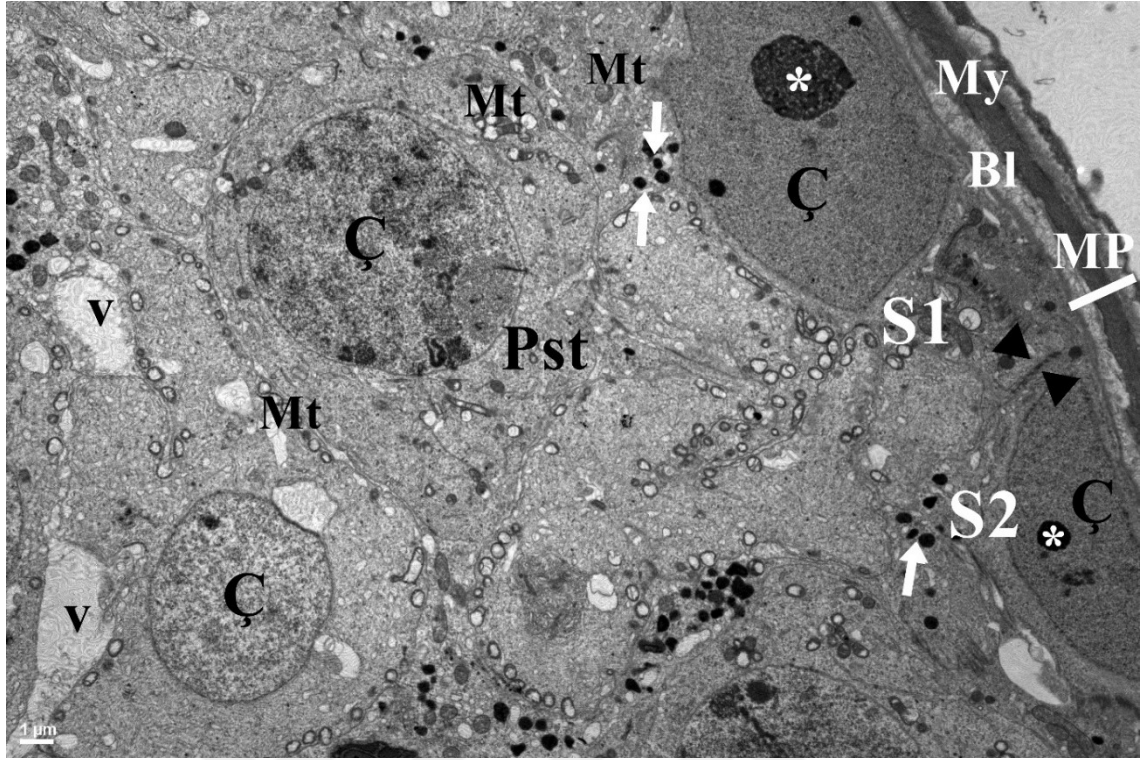
**Şekil 57.** Testis Torsiyonu ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup elektronmikrografı. İnterstisyel alanda Leydig hücre (LH) sitoplazmasında mitokondriyonlar (Mt), SER sisternaları (SER) ve lipid damlacıkları (L) normal yapıda gözlenmektedir. İnterstisyumda kan damarı (siyah ok) izlenmektedir. Bar= 2  $\mu$ m.

#### **4.4.5. Grup 5: Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin Tedavisi Uygulanan Grup (TT/D/N)**

Testis dokusuna uygulanan torsiyondan 2,5 saat sonra nimodipin uygulanan sıçanlara bu işlemten yarım saat sonra detorsiyon uygulandı ve 3 saat detorsiyonda kalan sıçanların testis doku örnekleri ince yapı düzeyinde incelendi. Membrana propria sham grubuna benzer özelliklerde ve normal görünümdeydi. Seminiferöz tübül epitel hücrelerinin bazal laminadan az miktarda ayrıldığı alanlar bulunmakla birlikte bu durum hasar grubuna kıyasla oldukça azalmıştı (Şekil 58). Sertoli hücrelerinin belirgin çekirdek ve derin invaginasyonlar içeren çekirdeklerinde az miktarda heterokromatin artışı, hasar grubuna kıyasla sitoplazmalarında daha az densite artışı ve sitoplazmada normal yapıda tübüler mitokondriyonlar ve lizozomlar gözlendi (Şekil 58 ve 59). Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar normal yapılarını korumaktaydı (Şekil 59). Bazal lamina üzerine yer alan spermatogonyumlar, kromatin yamalarına sahip oval şekilli çekirdek ve sitoplazma içerisinde küçük ve az miktarda vakuol içermekle birlikte çoğunlukla normal yapıda izlendi (Şekil 58). Primer spermatosit sitoplazmasında yuvarlak şekilli çekirdek ve gruplar halinde düzenlenmiş mitokondriyonların bazılarında hafif genişlemeler olmakla birlikte normal yapısını korumaktaydı. Spermatid sitoplazmasında çekirdek ve sıra sıra hücre periferine yerleşmiş mitokondriyonlar normal görünümdeydi (Şekil 58 ve 59). İnterstisyumda düzensiz sınırlı heterokromatin yamaları sergileyen çekirdeğe sahip Leydig hücreleri sitoplazmalarında normal yapıda SER sisternaları, tübüler kristalli mitokondriyonlar ve lipid damlacıkları içermekteydi (Şekil 60).

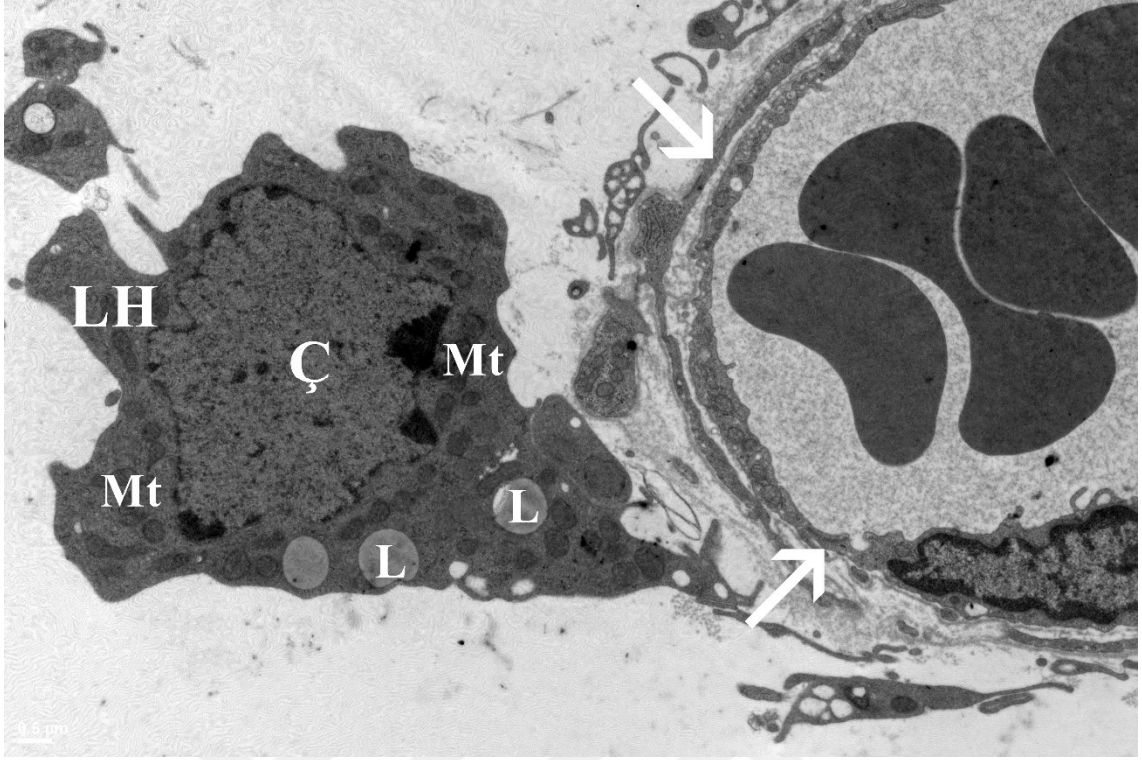


**Şekil 58.** Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup elektronmikrografı. Bazal lamina (Bl), miyoid hücreler (My) ve membrana propria (MP) normal olarak görülmektedir. Sertoli hücreleri (S) sitoplazmaları içerisindeki mitokondriyonları (Mt) ve lizozomları (beyaz ok) normal yapıda gözlenmektedir. Spermatogonyum (Sg) ve primer spermatosit (Pst) ve spermatidler (Spd) normal yapıda izlenmektedir. Seminiferöz tübül epitel hücreleri arasında yer yer vakuolizasyonlar (v) gözlenmektedir. Çekirdek (Ç), mitokondriyon (Mt). Bar= 2 µm.



**Şekil 59.** Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup elektronmikrografı. Bazal lamina (Bl), miyoid hücreler (My) ve membrana propria (MP) normal yapıda izlenmektedir. Sertoli hücreleri (S1-S2) arasındaki okludens tipi bağlantılar (siyak ok başı) normal olarak görülmektedir. Sertoli hücreleri bazal sitoplazması içerisinde yer alan belirgin çekirdekçik (\*) içeren çekirdekleri (Ç), mitokondriyonları (Mt) ve lizozomları (beyaz ok) normal yapıda görülmektedir. Primer spermatosit (Pst), spermatid (Spd) normal yapıda izlenmektedir. Spermatojenik hücreler arasında bazı alanlarda vakuolizasyonlar (v) görülmektedir. Çekirdek (Ç), mitokondriyon (Mt). Bar= 1 µm.





**Şekil 60.** Testis Torsiyon/Detorsiyon ve Nimodipin tedavisi uygulanan grup elektronmikrografı. İnterstisyel alanda düzensiz, poligonal şekilli Leydig hücresinin (LH) sitoplazması içerisinde çekirdeği (Ç), tübüler yapıda krista içeren mitokondriyonları (Mt) ve lipid damlacıkları (L) izlenmektedir. İnterstisyumda kan damarı (beyaz ok) gözlenmektedir. Bar= 0,5 µm.

## 4.5. Biyokimyasal Bulgular

### 4.5.1. Süperoksit Dismutaz ve Malondialdehit Bulguları

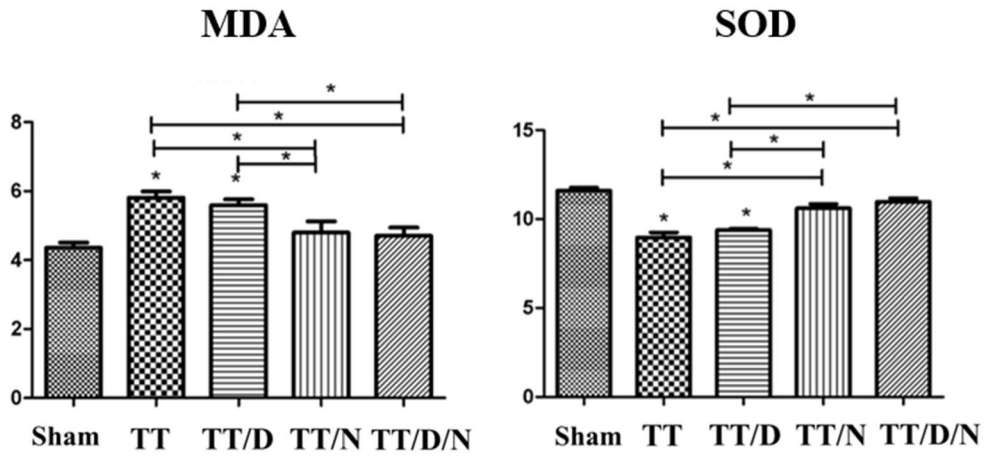
Deney sonunda anestezi altındaki sıçanlardan alınan intrakardiyak kan örneklerinde, oksidatif hasarı belirlemek için antioksidan savunma sistemi enzimlerinden SOD aktivitesi ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşan serum MDA konsantrasyonları ölçüldü. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Sıçanlardan elde edilen serum MDA konsantrasyonları, sham grubunda en düşük seviyede bulundu. Sham grubu ile karşılaştırıldığında, TT ve TT/D gruplarında serum MDA konsantrasyonlarının istatistiksel anlamlı olarak arttığı ( $p<0,01$ ), TT/N ve TT/D/N gruplarında ise bir miktar yükseklik olmakla birlikte farkın anlamlı olmadığı ( $p>0,01$ ) görüldü. TT/N ve TT/D/N gruplarında serum MDA konsantrasyonlarının TT ve TT/D gruplarına kıyasla anlamlı olarak azaldığı görüldü ( $p<0,01$ ). TT ve TT/D grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemesine rağmen MDA değerlerinin TT/D grubunda TT grubuna göre bir miktar azalmış olduğu izlendi. TT/N ile TT/D/N grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemesine rağmen MDA değerlerinin TT/D/N grubunda TT/N'e göre daha fazla azaldığı gözlemlendi (Tablo 6 ve Şekil 61).

Bir diğer biyokimyasal parametre olan SOD aktiviteleri incelendiğinde, en yüksek değerler sham grubuna aitti. TT ve TT/D uygulanan gruplardaki sıçanlar sham grubuna kıyasla daha düşük SOD aktivitesine sahipken ( $p<0,01$ ), TT/N ve TT/D/N gruplarındaki SOD aktivitesi değerleri sham grubuna yakın bulundu ( $p>0,01$ ). TT ve TT/D gruplarındaki SOD aktiviteleri TT/N ve TT/D/N gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük değerlerdeydi ( $p<0,01$ ). TT ve TT/D grupları arasındaki SOD değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemekteydi ( $p>0,01$ ). Ancak TT/D grubunda TT grubuna göre bir miktar artış olduğu dikkati çekti. TT/D/N grubunda TT/N'ye göre SOD değerlerinde daha fazla artış dikkati çekmekle birlikte bu iki grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 6 ve Şekil 61).

**Tablo 6.** Serum MDA konsantrasyonları ve SOD aktiviteleri (ortalama±standart sapma).

| Gruplar | MDA (nmol/ml) | SOD (ng/ml) |
|---------|---------------|-------------|
| Sham    | 4,35±0,15     | 11,60±0,17  |
| TT      | 5,80±0,17     | 8,97±0,27   |
| TT/D    | 5,59±0,17     | 9,37±0,08   |
| TT/N    | 4,79±0,32     | 10,60±0,24  |
| TT/D/N  | 4,70±0,24     | 10,97±0,21  |



**Şekil 61.** Serum MDA konsantrasyonları ve SOD aktivitelerinin istatistiksel değerlendirilmesi. \*p<0.01.

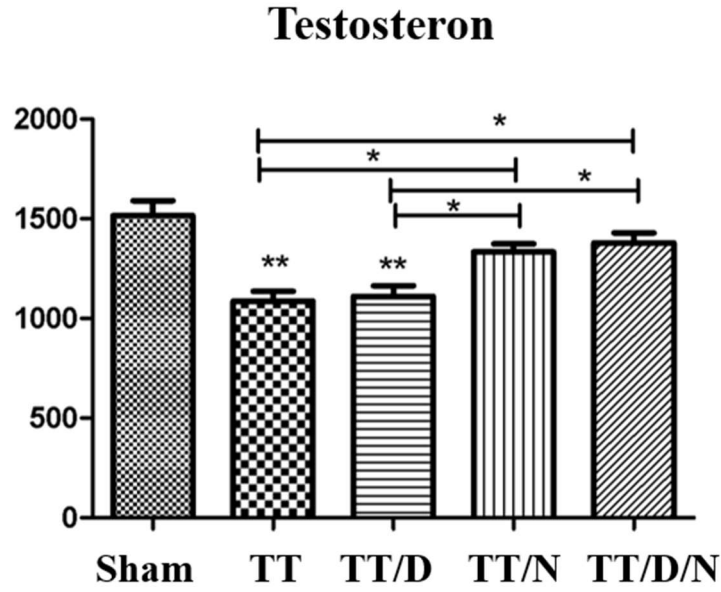
#### 4.5.2. Testosteron Bulguları

Deney sonunda genel anestezi altında sıçanlardan alınan intrakardiyak kan örneklerinde serum testosteron konsantrasyonlarına bakıldı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Sıçanlardan elde edilen serum testosteron konsantrasyonları sham grubuyla kıyaslandığında TT ve TT/D gruplarında istatistiksel olarak anlamlı oranda düştüğü ( $p<0.001$ ), TT/N ile TT/D/N gruplarında ise sham grubuyla karşılaştırıldığında bir miktar daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı ( $p>0.01$ ) görüldü. Tedavi grupları (TT/N ve TT/D/N) ile hasar grupları (TT ve TT/D) karşılaştırıldığında serum testosteron seviyesinin tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ( $p<0.01$ ). TT ve TT/D grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında TT/D grubunun serum testosteron konsantrasyonu TT grubuna göre bir miktar daha fazla olmasına rağmen, bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.01$ ). TT/D/N grubundaki testosteron seviyesi TT/N grubuna kıyasla bir miktar fazla olmakla birlikte bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanılmadı ( $p>0.01$ ) (Tablo 7 ve Şekil 62).

**Tablo 7.** Serum Testosteron konsantrasyonları (ortalama±standart sapma).

| Gruplar | Testosteron (pg/ml) |
|---------|---------------------|
| Sham    | 1516±74,94          |
| TT      | 1088±47,98          |
| TT/D    | 1111±53.29          |
| TT/N    | 1334±40,03          |
| TT/D/N  | 1379±51,04          |



**Şekil 62.** Serum Testosteron konsantrasyonlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi. \* $p < 0.01$   
\*\* $p < 0.001$ .

## 5. TARTIŞMA

Deneyisel testiküler torsiyon ve detorsiyon modelinde nimodipin tedavisinin etkilerinin incelendiği bu çalışmada, ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik incelemelerde TT ve TT/D gruplarında seminiferöz tübüllerde dejeneratif değişiklikler ve apoptoz varlığı ile membrana propria ve bazal laminada kalınlaşma, interstisyel alanda ödem, kanama, hücrelerde yapısal bozulma, biyokimyasal incelemelerde SOD aktivitesi ile serum MDA ve testosteron konsantrasyonlarında farklılıklar bulundu. Nimodipin tedavisi verilen TT/N ve TT/D/N gruplarında ise testiste oluşan hasarın azaldığı ve biyokimyasal sonuçlarda düzelme olduğu belirlendi.

Akut skrotum patolojisinin en sık sebeplerinden birisi olan TT, spermatik kordun kendi etrafında dönmesi sonucunda testise kan akışının kesilmesiyle karakterize ürolojik acil bir durumdur. TT, testiste kan dolaşımının engellenmesi sonucu iskemik hasara neden olur. Doku iskemisi hipoksiye ve hücrel enerji depolarının azalmasına neden olur, anaerobik metabolizma sonucu açığa çıkan metabolitler daha ileri doku hipoksisine ve mikrovasküler disfonksiyon ile hücre ölümüne neden olur. Sonuç olarak TT doku hipoksisine neden olarak testiste hasara, spermatogenezisin bozulmasına, doğurganlığın azalmasına ve infertiliteye neden olabilir.<sup>158,159</sup>

Klinikte TT'nin tedavisi cerrahi olarak ya da el ile manuel olarak torsiyone testisin detorsiyone hale getirilmesi ve böylece dolaşımın tekrar başlatılmasıdır. Ancak detorsiyon işlemi, iyileştirici etkileri olan cerrahi bir müdahale olmasının yanı sıra bazı yan etkilere de sahiptir.<sup>159</sup> Detorsiyon sonucu reperfüzyonun başlaması dokuya gelen oksijeni artırır ve oksijen ROS oluşmasına yol açar. ROS nötrofiller için kemotaktik aktive göstererek lokal inflamasyonu artırır. Ayrıca lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrel bileşenler reperfüzyonda artan ROS nedeniyle yapısal bozulmalar gösterir, sonuç olarak hücrel hasar ve hatta hücre ölümü oluşur. Artan inflamatuvar etki ile bölgeye gelen nötrofiller endotele yapışarak proteolitik enzimlerin, elastazın salgılanmasına neden olur. Endotel hücrelerinin de katkısıyla mikrovasküler permeabilite artışı ve ödem görülür. Endotel hücrelerinde ve makrofajlarda interlökin ve sitokin ekspresyonu artar. Adezyon moleküllerinin ekspresyonu ile nötrofil ve trombosit agregasyonu oluşur, parankim ve dokuda revaskülarizasyon engellenir. Uzun süreli İ/R hasarı nekroz, apoptoz ve nekropitoz gibi hücre ölüm mekanizmaların aktive olmasına



yola açar.<sup>95-97</sup> Testiste kan dolaşımının yeniden başlaması ile oluşan endotel hasarı, mikrovasküler disfonksiyona, sonuç olarak spermatogenezisin bozulmasına ve germ hücre kaybına neden olabilir.<sup>159</sup>

Klinikte TT, başarılı cerrahi müdahaleye rağmen, üreme sağlığını olumsuz etkileyen acil bir durumdur.<sup>158</sup> Günümüzde deneysel çalışmalar TT’de cerrahiye yardımcı olabilecek terapötik ajanlar üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalarda birçok ajanın oksidatif stres, inflamasyon veya apoptozi inhibe ederek, testisleri reperfüzyon hasarına karşı koruduğu gösterilmiştir.<sup>159</sup> Bunlar arasında C vitamini,<sup>160</sup> asetilsalisilik asit (anti-trombotik),<sup>161</sup> papaverin (alkoloid türevi),<sup>162</sup> melatonin,<sup>163</sup> roflumilast (fosfodiesteraz 4 inhibitörü)<sup>164</sup> ve ibuprofen (antinlamatuvar-analjezik)<sup>164</sup> yer alır. Çalışmamızda erkek sıçanlarda oluşturulan deneysel testiküler İ/R hasarında kalsiyum kanal blokörü olan nimodipinin tedavi edici etkileri ışık-elektron mikroskopik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak araştırılmıştır.

TT’de hasarın büyüklüğü torsiyonun süresine ve derecesine bağlıdır.<sup>165,166</sup> Turner ve arkadaşları, torsiyon derecelerini ve süresini karşılaştırmak için çalışmalarında torsiyonu 180°, 360° ve 720° uygulayıp 1, 2 ve 4 saatlik deneysel TT ve TT/D modelleri oluşturmuşlardır. Çalışmalarında 1 saatlik ve 360° TT’de sadece akut vasküler değişiklikler gözlenmiş, buna karşın 720° ve 4 saatlik TT’de ise tam iskemi olduğu sonucuna varmışlardır.<sup>167</sup> Sıçanlarda yapılan deneysel farklı bir çalışmada ise sol testise 3 saat torsiyon ve ardından 3 saat detorsiyon yapılarak testis hasarı gösterilmiş ve bu hasarın bir flavonoid türevi olan milrinon tedavisiyle düzeldiği rapor edilmiştir.<sup>168</sup> Literatür bilgilerinin ışığında, biz de çalışmamızda etkili bir torsiyon oluşturmak ve aynı zamanda testis hücrelerine kalıcı hasar vermeden reperfüzyona izin vermek için torsiyonu 720° ve süreyi 3 saat olarak tanımladık.

Literatürde TT ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına rağmen; İ/R hasarı klinik olarak ciddi bir sorun olmaya devam etmektedir.<sup>169</sup> TT ve TT/D sırasında oluşan ciddi histolojik hasarların infertiliteye neden olduğu bildirilmektedir.<sup>170</sup> TT ve TT/D sonrası membrana propria ve seminiferöz tübül epitel hücrelerindeki hasarı raporlayan birçok çalışma bulunmaktadır.<sup>171,172</sup> Maha Abo Gazia, 2 saatlik TT/D sıçan modelinde tedavi olarak trombosit zengin plazma (PRP) uygulayarak yaptıkları karşılaştırmalı çalışmalarında hasar grubunda histopatolojik olarak seminiferöz tübül epitelinde düzensizlik ve spermatozoa sayısında azalma ile birlikte, elektron mikroskopik düzeyde

düzensiz membrana propria, spermatogonyumlarda heterokromatin artışı ve spermatidlerde mitokondriyal dejenerasyon rapor etmişlerdir. PRP tedavisiyle hasar bulgularında iyileşmeyi göstermişlerdir.<sup>173</sup> Sunulan çalışmamızda ışık mikroskopik incelemede TT ve TT/D gruplarında TA'nın kalınlaştığı, tunika vaskülozada bulunan kan damarlarında dilatasyon ve konjesyon olduğu, seminiferöz tübül epitelinin bazal laminadan ayrıldığı, seminiferöz tübül epitelinde dejeneratif değişiklikler ve apoptotik cisimcikler bulunduğu, tübüllerin lümeninde immatür spermatojenik hücrelerin varlığı izlendi. İnterstisyel alanda yaygın ödem, hemoraji ve damarlarda konjesyon gözlemlendi. Yapılan birçok çalışmada membrana propria ve bazal laminada kalınlaşmanın seminiferöz epitel hücrelerinin beslenmesinde bozukluk oluşturarak spermatogenezis kaybına yol açtığı bildirilmektedir.<sup>174,175</sup> Çalışmamızda elektron mikroskopik incelemede TT ve TT/D gruplarında bazal lamina ve membrana propriada kalınlaşma ve düzensizlik izlendi. Seminiferöz tübül epitelinin bazal laminadan ayrıldığı, tübül içerisindeki hücreler arası mesafede genişleme ve apoptotik cisimcikler bulunduğu dikkati çekti. Sertoli hücrelerinde litik ve dejeneratif değişikliklerin olduğu, Sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi bağlantıların yapısının bozularak kan-testis bariyerinin bozulduğu, çekirdekte kromatin artışı, mitokondriyonlarda ve SER sisternalarında genişleme, lipid damlacıklarında ve lizozom sayısında artış olduğu gözlemlendi. Spermatojenik seri hücrelerinde de çekirdekte hiperkromatin artışı, mitokondriyonlarında ve SER sisternalarında genişleme görüldü. İnterstisyel alanda kanamayı gösteren ekstrasvasküler eritrosit varlığı, ödemi gösteren hücrelerarası alanlarda genişleme, Leydig hücre yapısında litik ve dejeneratif değişiklikler, hücre sitoplazmasında artmış elektrodens görünüm, SER sisternalarında genişleme ile beraber mitokondriyonların tübüller krista yapısında bozulmalar ve lipid damlacıklarının sayısında azalma izlendi. TT/D grubunda daha fazla olmak üzere, inflamatuvar hücre (makrofaj, nötrofil) artışı dikkati çekti. Tüm bu bulgular TT ve TT/D gruplarındaki hücresel hasarı göstermekteydi. Çalışmamızda rapor ettiğimiz ışık ve elektron mikroskopik düzeyde elde edilen bu bulgular, literatürde yapılan TT ve TT/D çalışmalarında belirtilen histopatolojik bulguları destekler niteliktedir.<sup>176-178</sup>

Histopatolojik değerlendirme ve sınıflandırma yöntemleri, gelecekteki spermatogenezis durumunu değerlendirebilmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.<sup>179</sup> Bu yöntemlerden biri de spermatogenezis kapasitesini ölçmek ve değerlendirmek için

kullanılan JTBS'dir.<sup>180</sup> Shokoohi ve ark. oluşturdıkları 4 saatlik TT modelinde, ROS üretimindeki artışın, spermatogenezisi olumsuz etkilediğini ve bunun da spermatozoon sayısı, kalitesi ve doğurganlık oranında azalmaya neden olduğunu kanıtlamışlardır. Araştırmada JTBS'nin TT/D grubunda oldukça düşük olduğunu göstermişlerdir.<sup>181</sup> Benzer şekilde Rezakhaniha ve ark. da, yaptıkları çalışmada torsiyon süresini 2 saat, detorsiyon süresini ise 24 saat olarak belirlemişlerdir. Yirmi dört saatlik detorsiyonun sonunda dokulardan elde edilen ışık mikroskopik kesitlerde JTBS değerlendirilmiş ve TT/D grubunda sham grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğunu, ancak bir antioksidan madde olan sitral enjeksiyonu sonrasında JTBS'de artış gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.<sup>182</sup> Ayrıca Ameli ve ark. sıçan testislerine 4 saat torsiyon ve torsiyonun ardından 24 saat detorsiyon uygulayarak yaptıkları çalışmada JTBS'nin sham grubuna kıyasla TT/D grubunda oldukça düşük olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada tedavi ajanı olarak verapamil (kalsiyum kanal blokörü) ve tadalafil (fosfodiesteraz-5 inhibitörü) kullandıkları gruplarda ise hasar grubuna göre JTBS'de anlamlı bir artışın gerçekleştiğini, sham grubuna kıyasla JTBS'nin hala önemli düzeyde düşük seviyelerde olduğuna dikkat çekmişlerdir.<sup>183</sup> Sunulan çalışmada da spermatogenezisi değerlendirmek amacıyla JTBS kullanılmıştır. Çalışmamız da TT ve TT/D hasar gruplarında JTBS'nin sham grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı, nimodipin ile tedavi edilen grupta ise JTBS'nin hasar gruplarına oranla anlamlı düzeyde artış gösterdiği tespit edildi. Tedavi ile sham grupları arasında JTBS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmış olsa da, nimodipin verilen grupta spermatojenik hücrelerin nispeten daha iyi korunduğu ve JTBS'nin TT ve TT/D grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi. Bu durum testis torsiyonu hasarında dokunun sağlıklı hale gelebilmesi için reperfüzyondan sonra belirli bir süre geçmesinin ve aynı zamanda nimodipin tedavisinde günlük doz ayarlamalarının gerekli olduğunu düşündürmektedir.

İ/R hasarının patofizyolojik mekanizması çok fazla etkene bağlı ve oldukça karmaşık bir süreçtir. Bu mekanizmalardan en önemlisinin hücrede oluşan ROS olduğu rapor edilmiştir.<sup>184</sup> Normal şartlarda ROS miktarı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar sayesinde denge halindedir ve düşük miktarlarda ROS spermatogenezis için de gereklidir.<sup>169</sup> TT'de oluşan iskemik hasarın yanında detorsiyon sonrası ROS'un aşırı miktarda artmasından dolayı koruyucu mekanizmalar yetersiz kalır ve ROS hücre içine salınır.<sup>185</sup> ROS miktarındaki dengesizlik oksidatif strese neden olur. ROS miktarının

artmasının, mitokondriyonların hasarına ve spermatozoonlara zarar vererek spermatozoon hareketliliğini düşürdüğü bildirilmiştir. Bunların yanında doğrudan spermatozoon DNA'sına da zarar vererek embriyonun genetik yapısını da olumsuz etkilediği rapor edilmiştir.<sup>186</sup> ROS'un, testis İ/R hasarında temel rolü oynadığı bilinmekle birlikte, ROS kaynaklı iskemi hasarının nedeni olan hücresel ve moleküler süreçler henüz tam olarak anlaşılamamıştır ve bu konu deneysel çalışmalar için hala merak konusudur.<sup>22</sup> Hücrede biriken ROS, proteinler ve DNA'nın yanı sıra lipidler ve çoklu doymamış yağ asitlerini de etkileyerek bu maddelerin peroksidasyonuna neden olur. Lipid peroksidasyonunun ve oksidatif stresin en önemli belirteçlerinden biri olan MDA, özellikle hücre membranındaki lipidlerin çapraz bağlanmasına neden olarak iyon geçirgenliğini bozar ve enzim aktivitesinde değişikliklere neden olur. Aynı zamanda MDA, DNA ve proteinlerle reaksiyona girer. Bunun sonucunda protein denatürasyonu ve DNA fragmentasyonuna neden olarak hücreye geri dönüşü olmayan hasarlar verebilir.<sup>166,187</sup> SOD, CAT ve glutatyon peroksidaz gibi endojen antioksidan enzimler sayesinde aşırı üretilen ROS nötralize edilir ve böylece erkek üreme sisteminde spermatozoon oksidatif stresin zararlı etkilerinden korunmuş olur.<sup>188</sup> İ/R hasarı ROS seviyelerinde artışa neden olurken bu antioksidan enzimlerin azalmasına yol açar. Literatürde İ/R hasarının araştırılmasında dokuda ve/veya serumda oksidan ve antioksidan maddelerin ölçülmesiyle ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır.<sup>189-191</sup> Ün ve ark. sıçanlarda 2 saatlik TT ve TT/D modeli oluşturarak, aliskirenin İ/R hasarı üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve testis dokusunda SOD aktivitesi ve MDA düzeylerini incelemişlerdir. TT ve TT/D hasar gruplarında MDA seviyelerinde kontrol grubuna göre artış, SOD aktivitelerinde ise azalma rapor etmişlerdir. Aliskiren ile tedavi sonrasında MDA düzeyleri hasar grubuna kıyasla azalmış ve SOD aktivitesi artmıştır.<sup>192</sup> Yapılan bir diğer çalışmada, güçlü antioksidan özelliği bilinen ve bir kalsiyum kanal blokörü olan amlodipinin testis İ/R hasarı üzerine olan etkileri incelenmiştir; 2 saatlik TT ve TT/D grupları oluşturulmuş ve amlodipinin 5 ve 10 mg'lık dozlarda tedavi etkinliği araştırılmıştır. Sham grubuna kıyasla TT ve TT/D gruplarında SOD aktiviteleri azalırken, MDA değerlerinde anlamlı oranda artış bildirmişlerdir. Amlodipin ile tedavi gruplarında hasar gruplarına göre SOD aktivitesi anlamlı olarak artarken, MDA seviyelerinde anlamlı bir azalma raporlamışlardır.<sup>26</sup> Mestrovic ve ark. deneysel TT modelinde 3 saat torsiyon ve 3 saat detorsiyon gerçekleştirmiş ve tedavi ajanı olarak başka bir kalsiyum kanal

blokörü olan nifedipin uygulamışlardır. MDA seviyesi TT/D grubunda sham grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yükselmiş ve SOD değeri ise anlamlı olarak azalmıştır. Nifedipin verilen tedavi grubunda MDA değerleri TT/D grubuna göre anlamlı olarak azalmış ve SOD aktivitesinde artış bulunmuştur.<sup>25</sup> Çalışmamızda oksidan kapasiteyi belirlemek için MDA düzeylerini ve antioksidan kapasiteyi değerlendirmek için SOD aktivitelerini biyokimyasal olarak analiz ettik. Çalışmamız sonucunda, sıçanlarda oluşturulan TT ve TT/D hasar gruplarında sham grubuna kıyasla, serum MDA düzeylerinin yüksek, SOD aktivitelerinin ise düşük olduğu tespit edildi. Nimodipin tedavisi verilen gruplarda ise hasar gruplarına göre MDA seviyelerinde anlamlı azalma ve SOD aktivitelerinde anlamlı bir artış gözlemlendi. Mevcut veriler eşliğinde sunulan çalışmada SOD ve MDA düzeylerinin İ/R hasarını desteklediği bulundu. Diğer taraftan nimodipinin İ/R hasarına karşı antioksidan tedavi edici etkileri de belirgin olarak gösterilmiştir.

Spermatogenezisin sağlıklı bir şekilde tamamlanabilmesi için gerekli olan bir diğer parametre ise testisin endokrin fonksiyonunu gösteren testosteron seviyeleridir. Testosteron sentezi, LH etkisiyle Leydig hücreleri tarafından gerçekleştirilir.<sup>184</sup> Leydig hücreleri oksidatif strese karşı çok hassastır ve TT sonrasında Leydig hücrelerinin hasara uğraması serum testosteron seviyelerinde azalmaya neden olur. Ancak literatürde tek taraflı torsiyon durumunda serum testosteron seviyesi ile ilgili çelişkili çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda tek taraflı torsiyonda ipsilateral testis etkilenirken, kontralateral sağlıklı testisin normal şekilde testosteron üretmesi sayesinde serum testosteronunda önemsiz bir azalmanın gerçekleştiği rapor edilmiştir. Diğer taraftan bazı çalışmalarda ise tek taraf testisin etkilenmesinin bile serum testosteron seviyesinde dikkate değer bir azalmaya yol açtığı bildirilmiştir.<sup>182</sup> Sangodele ve ark. tarafından yapılan 1 saatlik torsiyon ile ayrı ayrı 4 saat ve 7 gün uygulanan detorsiyondan sonra LH ve testosteron seviyeleri değerlendirilmiş, kontrol grubuna göre hasar gruplarında LH ve testosteron düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir.<sup>193</sup> Yapılan bir başka çalışmada da 2,5 saat torsiyon ve 3 gün reperfüzyon uygulaması sonrasında testosteron düzeylerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada Leydig hücreleri değerlendirilmiş ve TT/D grubunda sham grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir. Çalışmada 3 gün boyunca uygulanan glutamin tedavisiyle dokuda iyileşme sağlandığı ve testosteron düzeylerinin hasar grubuna göre dikkate değer bir şekilde yükseldiği gözlenmiştir.<sup>194</sup> TT sonrasında bu şekilde testosteron düzeylerinde

anlamlı azalma benzer birçok çalışmada gösterilmiştir.<sup>195,196</sup> Sunulan çalışmada TT ve TT/D sonrası serum testosteron seviyelerinin sham grubuna kıyasla önemli düzeyde azaldığı saptandı. Nimodipin ile tedavi edilen gruplarda ise testosteron düzeylerinde hasar gruplarına kıyasla anlamlı bir artışın gerçekleştiği dikkati çekti. TT'deki testosteron seviyelerinde bu azalmanın Leydig hücre hasarıyla ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Testosteronun Leydig hücrelerinde sentezlendiği, bu süreçte Leydig hücre sitoplazması içerisindeki SER sisternalarının, tübüler krista yapısına sahip mitokondriyonların ve lipid damlacıklarının görev aldığı bilinmektedir.<sup>59,60</sup> Çalışmamız da Leydig hücrelerinde lipid damlacıklarının miktarındaki azalma ve hücre hasarı ultrastrüktürel düzeyde gösterildi. Bu nedenle çalışmamızda izlediğimiz TT ve TT/D'deki düşük testosteron seviyelerinin Leydig hücre hasarı ile ilişkili olduğu sonucuna varıldı. Diğer taraftan nimodipin ile tedavi uygulanan gruplardan özellikle TT/D/N grubunda Leydig hücrelerindeki hücresel hasarın nispeten düzeldiği elektron mikroskopik bulgularla gösterildi. Bu durum nimodipinin testis İ/R hasarına karşı spermatogenezis ve hormon düzeylerini iyileştirdiğinin bir göstergesi olarak değerlendirildi.

İskemi de ortam pH'nın düşmesiyle beraber ATP sentezinde azalma meydana gelir ve bu durum ATP bağımlı iyon pompalarının bozulmasına neden olur. İyon pompalarının bozulmasıyla K hücre dışına atılır ve  $Ca^{+2}$  iyonları hücre içinde birikir. Dokuda  $Ca^{+2}$  iyonlarındaki bu artış ROS oluşumunun artmasına ve apoptoza neden olarak testiste hasar meydana getirir.<sup>184,197</sup>  $Ca^{+2}$ 'un bu etkilerinden dolayı yapılan son çalışmalarda, İ/R hasarına karşı tedavi amaçlı  $Ca^{+2}$  kanal blokörlerinin rolüne odaklanılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda verapamil, amlodipin, nifedipin gibi kalsiyum kanal blokörleri deneysel TT/D modellerinde kullanılmış ve yararlı etkileri gösterilmiştir.<sup>25,26,183</sup>

Nimodipin, dihidropiridin grubu bir  $Ca^{+2}$  kanal blokörüdür.<sup>198</sup> Lipofilik bir ilaç olan nimodipin, kan-beyin bariyerini geçerek nöronlara  $Ca^{+2}$  akışını azaltır. Nimodipinin ayrıca, ROS oluşumunu azaltır ve vasküler düz kasların gevşemesini sağlayarak vazospazmı engeller.<sup>199,200</sup> Bu etkileri nedeniyle, SAK tedavisinde hem semptomları iyileştirdiği, hem de serebral damarlarda kanamaya engel olarak mortaliteyi düşürdüğü için esas ilaç rolünü üstlenmiştir.<sup>200</sup> Lipofilitesinden dolayı nimodipinin, çeşitli sinir sistemi hastalıkları üzerindeki etkisine ilişkin çok sayıda araştırma bulunmaktadır.<sup>201-203</sup> Sinir sistemi dışında nimodipinin diğer sistemler ve hastalıklar üzerine olan etkileri de



merak konusudur. Behrooz-Lak ve ark. yaptıkları over torsiyonu çalışmasında tedavi ajanı olarak nimodipin kullanmış ve over torsiyonunda iyileştirici etkileri ışık mikroskopik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle gösterilmiştir. Ayrıca, nimodipin uygulamasının potansiyel bir antioksidan tedavi edici ajan olduğu rapor edilmiştir.<sup>33</sup> Yine başka bir çalışmada karaciğer İ/R hasarında nimodipinin etkinliği araştırılmış ve ilacın karaciğer hasarını azalttığı bildirilmiştir.<sup>32</sup> Çalışmamızda deneysel TT/D modelinde nimodipinin testis üzerine olan etkilerini ışık ve elektron mikroskopik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle inceledik. Nimodipinin uygulama dozu (1 mg/kg) Behrooz-Lak ve ark.nın<sup>33</sup> oluşturdukları over İ/R modeli referans alınarak ayarlandı. Nimodipin ile tedavi edilen gruplarda membra propria kalınlığının TT ve TT/D grubuna kıyasla azalmış olduğu ve seminiferöz tübül epitelinin ve bazal laminanın sham grubuna benzer olduğu saptandı. Bunlara ilaveten seminiferöz tübül içerisindeki hücreler arasındaki geniş boşlukların nispeten azaldığı dikkati çekti. Ayrıca Sertoli hücrelerinde SER sisternalarında genişlemenin azaldığı ve mitokondriyonların normal yapıda olduğu izlendi. Spermatojenik seri hücrelerindeki hasarın azaldığı ve seminiferöz tübül içerisindeki dizilimlerinin normal yapıda olduğu görüldü. Bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde TT/D/N grubunda TT/N grubuna kıyasla düzelmenin daha belirgin olduğu, nimodipin tedavisi uyguladığımız gruplara ait testis doku örneklerinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde sham grubu ile benzerlik gösterdiği belirlendi. Elde edilen tüm bulgular ışığında nimodipinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde özellikle TT/D sonrasında olumlu etkilerinin olduğunu ve nimodipinin testiste İ/R hasarının düzeltilmesinde yararlı olabileceği düşünüldü.

Kalsiyum kanal blokörlerinin erkek üreme sistemi üzerine yararlı etkilerinin olabileceğinin yanı sıra zararlı etkilere de sebep olduğunu savunan çalışmalar bulunmaktadır. Morakinyo ve ark. verapamil, diltiazem ve nifedipinin (kalsiyum kanal blokörleri) testis üzerine kronik kullanımda (30 gün) geri dönüşümlü olumsuz etkileri olabileceğini bildirmişlerdir. Kalsiyum kanal blokörleri verilen gruplarda sperm sayısı ve hareketliliğinde azalmanın meydana geldiğini, testosteron seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir fark göstermediğini rapor etmişlerdir.<sup>204</sup> Bir başka çalışmada ise farklı dozlarda 20, 40 ve 80 mg/kg nimodipin 30 gün boyunca uygulanmış ve doz bağımlı olarak testiste doku hasarı ve spermatogenezis sürecinde azalma olduğu dikkati çekmiştir.<sup>205</sup> Sunulan çalışmada ise, nimodipin tedavisinin TT'de doku hasarını, spermatogenezis

sürecini ve testosteron seviyesini iyileştirdiği belirlendi. Literatürdeki birçok çalışmadan farklı olarak, testiküler parametrelerdeki bu düzelmenin nimodipin tedavisinin tek ve düşük dozda uygulanmasından kaynaklandığı düşünüldü. Ancak TT tedavisinde nimodipin uygulamasının kesin dozu ve günlük doz aralığı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Konunun daha iyi anlaşılabilmesi için, testis İ/R hasarında nimodipin tedavisinin farklı doz ve sürelerde uygulanarak yapılacak ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

İskemi sonucu dokuda pH'nın düşmesiyle oluşan asidik ortam, çeşitli mekanizmalarla hücre içerisine  $Ca^{+2}$  akışına neden olur. Hücre içi  $Ca^{+2}$  seviyesinin artmasının, özellikle mitokondriyal yetmezlik sonucu, inflamatuvar yolların aktive olmasına ve hücre ölümünün tetiklenmesine yol açtığı bildirilmiştir.<sup>166</sup> İskemi sonrası reperfüzyon ile birlikte hücre sitoplazmasında ROS üretimindeki artış mitokondriyon bağımlı apoptoz sürecini başlatır. Mitokondriyal apoptotik yol boyunca, MPTP açılması sitokrom C ve apoptoz indükleyici faktörün (AIF) salınmasına neden olur. AIF salınımının, kaspazdan bağımsız DNA hasarına yol açarken, sitokrom C, Apaf-1 ve dATP ile birleşip apoptozom kompleksini oluşturarak kaspaz-9'u ve ardından kaspaz-3, 6 ve 7'nin aktivasyonunu sağlayarak hücre ölümüne neden olduğu rapor edilmiştir.<sup>206</sup> Saçık U. ve ark. yaptıkları çalışmalarında 2 saatlik TT ve TT/D sonrasında kaspaz-3 immünreaktivitesinde anlamlı bir artış olduğunu bildirmişlerdir.<sup>171</sup> Bizim çalışmamızda apoptoz belirteçlerinden biri olan kaspaz-3 immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda kaspaz-3 immünreaktivitesi TT ve TT/D gruplarında sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Aynı zamanda apoptoz varlığı ışık ve elektron mikroskopik düzeyde de gösterildi. Reperfüzyon sürecinin, apoptozun tamamlanması için gerekli olan enerjiyi sağlayarak apoptotik süreci hızlandığı rapor edilmiştir.<sup>25</sup> Bizim çalışmamızda da TT/D grubundaki kaspaz-3 immünreaktivitesi TT grubuna kıyasla anlamlı olmasa da, daha yüksek oranda görülmüştür. Ayrıca her iki grupta da kaspaz-3 immün boyanmasının özellikle primer spermatositlerde yoğunlaştığı, spermatogonyumlarda ise daha az yoğunlukta olduğu dikkati çekmiştir. Yaşlı erkeklerle yapılan bir çalışmada yaşa bağlı germ hücre kaybı nedeninin primer spermatositlerdeki artan apoptoz olduğu bildirilmiştir. Diğer taraftan yaşlı erkeklerde azalan proliferatif potansiyellerine karşılık spermatogonyumlardaki apoptoz baskılanmasının telafi edici bir rol oynayabileceği rapor edilmiştir.<sup>207</sup> Buna bağlı olarak TT/D sonrası kaspaz-3

immünreaktivitesinin spermatogonyumlarda primer spermatositlerden daha az gözlenmesinin sebebinin testislerde spermatogenezisin devamlılığı için spermatogonyal kök hücrelerini korumaya yönelik önemli bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, primer spermatositlerde kaspaz-3 immünreaktivitesinin spermatogonyumlardan daha fazla oluşunun, primer spermatositlerin mayoz bölünme sürecine başlayan spermatojenik hücreler olmasıyla ilişkili olduğunu ve bu nedenle hücrel hasara daha duyarlı hale geldiklerini söylenebilir. Literatürde TT ve TT/D sırasında meydana gelen kaspaz-3 aktivitesinin nifedipin (kalsiyum kanal blokörü), ferulik asit (hidroksisinnamik asit türevi bir antioksidan), galik asit (fenolik asit türevi antioksidan), pioglitazon (antidiyabetik) gibi çeşitli maddeler tarafından azaltıldığı gösterilmiştir.<sup>25,171,208,209</sup> Sunulan çalışmada da kalsiyum kanal blokörü olan nimodipinin hem TT hem de TT/D hasarında kaspaz-3 immünreaktivitesinde azalma gerçekleştirdiği ve apoptozi azalttığı belirlenmiştir.

İskemi sırasında rol oynayan mekanizmalardan bir diğeri ise inflamatuvar kaskad ve pro-inflamatuvar sitokinlerdir. Deneysel İ/R modellerinde inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun, doku hasarını artırıp, inflamasyonu daha da şiddetlendirerek çoklu organ yetmezliğine yol açtığı rapor edilmiştir.<sup>192</sup> Endotel hücrelerinin inflamatuvar hücrelerle etkileşime girerek dokudaki ROS üretiminin daha fazla artmasına neden olduğu bildirilmektedir. İskemi sırasında ilk olarak artan nötrofil aktivasyonunun, mikrovasküler geçirgenliğin artmasına neden olduğu, nötrofillerle beraber artan makrofajlardan da TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salındığı, sitokin salınımindaki artışın lokal oksidatif stresi artırarak uzak organ hasarına ve apoptozun artmasına neden olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir.<sup>210,211</sup> Abdelzher ve ark. sıçan testislerinde 2 saat torsiyon ve 4 saat detorsiyon oluşturarak antioksidan bir madde olan idebenonun (sentetik kinon grubu) TT/D hasarı üzerine olan etkilerini incelemiştir. Deney sonunda TNF- $\alpha$  düzeylerinin TT/D grubunda sham grubuna göre yükseldiğini ve idebenon ile tedavi grubunda ise TT/D grubuna göre azaldığını bildirmişlerdir.<sup>212</sup> Sunulan çalışmada TT ve TT/D durumlarında inflamasyonu göstermek ve nimodipinin iyileştirici etkisini araştırmak için TNF- $\alpha$  düzeyleri immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Bulgularımızda, TT ve TT/D gruplarında sham grubuna göre TNF- $\alpha$  immünreaktivitesinde önemli bir artış saptanırken, nimodipin ile tedavi gruplarında hasar gruplarına göre TNF- $\alpha$  immünreaktivitesinde anlamlı bir azalmanın gerçekleştiği

dikkati çekmiştir. Ancak sham grubuna kıyasla nimodipin ile tedavi gruplarında TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi yine de anlamlı oranda yüksekti. Taheri ve ark. yaptıkları 2 saatlik TT/D modelinde verapamil ve Salvia miltiorrhiza (antioksidan, antinflamatuar bitkisel ilaç) kombine tedavisinin etkilerini incelemişlerdir. Sonuçlarına göre tek başına verapamil tedavisi ile karşılaştırdıklarında kombine tedavinin histopatolojik parametreleri ve doku nekrozunu daha çok iyileştirdiğini rapor etmişlerdir.<sup>213</sup> Nimodipin TNF- $\alpha$  immünreaktivitesinde önemli bir azalma sağlamış, ancak inflamasyonun aktif bir şekilde devam etmesinin önüne geçemediği görülmüştür. Bu nedenle ileri de yapılacak TT çalışmalarında nimodipin tedavisinin yanına ek bir antinflamatuar tedavi ile daha etkin sonuçlar elde edilebileceğini öngörmekteyiz.

Sunulan çalışmada nimodipin tedavisinin TT ve TT/D'ye bağlı doku hasarını, spermatogenezisi ve Johnsen skorunu iyileştirdiği tespit edildi. Yapılan biyokimyasal analizlerde nimodipin verilen gruplarda bir antioksidan belirteci olan SOD aktivitesi anlamlı şekilde artarken, lipid peroksidasyonunun ana belirteci olan MDA değerlerinde ise anlamlı bir azalma görüldü. Bunlara ek olarak apoptoz ve inflamasyon değerlerdirme sonuçlarına göre sırasıyla kaspaz-3 ve TNF- $\alpha$  immünreaktivite skorlarının nimodipin ile anlamlı şekilde azaldığı belirlendi.

Sonuç olarak, TT ve TT/D sonrası oluşan İ/R hasarının patofizyolojik sonuçlarının en aza indirilmesi ve testis fonksiyonunun korunması için nimodipin uygulamasının cerrahi tedavinin yanında, tedavi edici alternatif bir ajan olarak kullanılabileceği düşünüldü. Bununla birlikte Nimodipin tedavisinde doz ve süre ayarlanması ile etki mekanizmasının moleküler düzeyde araştırılması için ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanaatine varıldı.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan testiküler torsiyon/detorsiyon modelinde nimodipinin etkilerinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde, immünohistokimyasal ve biyokimyasal analizlerle karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği bu çalışmanın sonucunda;

1. Sham grubunun ışık ve elektron mikroskopik incelemesinde normal morfolojik yapıda olduğu,
2. TT ve TT/D gruplarında tunika albugineada kalınlaşma, kanama ve ödem, seminiferöz tübüllerde dejeneratif, litik ve apoptotik değişiklikler, tübül lümeninde immatür spermatojenik seriye ait hücreler, interstisyel alanda ödem ve kanama alanları olduğu,
3. Spermatogenezisin değerlendirilmesi için yapılan JTBS'de TT ve TT/D gruplarında azalma olduğu ve spermatogenezisin bozulduğu, nimodipin tedavisi uygulanan gruplarda (TT/N ve TT/D/N) JTBS'de hasar grubuplarına göre anlamlı bir artış olduğu ve spermatogenezisin daha sağlıklı olduğu,
4. Elektron mikroskopik incelemelerde, TT ve TT/D gruplarında bazal lamina ile membrana propriada kalınlaşma ve düzensizlik, miyoid hücre içerisinde vakuolizasyonlar, seminiferöz tübül epitelinde bazal laminadan ayrılma, hücreler arası mesafede genişleme ve apoptotik cisimcikler, Sertoli hücrelerinde litik ve dejeneratif değişiklikler, okludens tipi bağlantıların yapısında bozulmalar, mitokondriyonlarda ve endoplazmik retikülüm sisternalarında genişleme, lipid damlacıklarında ve lizozom sayısında artış olduğu, spermatojenik seri hücrelerinde de mitokondriyonlarında ve endoplazmik retikülüm sisternalarında genişleme olduğu, interstisyel alanda ekstrasvasküler eritrosit varlığı, hücreler arası alanlarda genişleme, Leydig hücre yapısında litik, dejeneratif değişiklikler olduğu ve lipid damlacıklarının azaldığı, T/D grubunda daha fazla olmak üzere inflamatuvar hücre artışı olduğu,
5. Nimodipin tedavisi uygulanan gruplarda (TT/N ve TT/D/N) ise, ışık ve elektron mikroskopik düzeyde nispeten normale yakın bir morfoloji olduğu,

6. TT ve TT/D gruplarında, kaspaz-3 ve TNF- $\alpha$  immünreaktivitelerinde artış, TT/N ve TT/D/N gruplarında ise azalma olduğu,
7. TT ve TT/D gruplarında serum MDA konsantrasyonlarında artış, SOD aktiviteleri ve serum testosteron konsantrasyonlarında azalma olduğu, TT/N ve TT/D/N gruplarında ise SOD aktiviteleri ve serum testosteron seviyelerinde hasar grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artma gözlenirken, serum MDA konsantrasyonlarında azalma olduğu görüldü.

Sonuç olarak bu çalışmada sıçan testislerinde deneysel olarak uygulanan testis torsiyon/detorsiyon modelinde nimodipin tedavisinin, antioksidatif, antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkileri araştırıldı. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, nimodipinin TT ve TT/D gruplarında hasarı azalttığı, spermatogenezisi iyileştirdiği, apoptozi ve inflamasyonu azalttığı ve bununla birlikte hormon düzeylerini olumlu yönde etkilediği sonucuna varıldı. Buna bağlı olarak testis torsiyonunda uygulanan cerrahi detorsiyon tedavisine ek olarak, detorsiyonda oluşacak İ/R hasarının iyileştirilmesinde nimodipin tedavisinin alternatif bir tedavi yaklaşımı olabileceği düşünüldü.

Bu çalışmada, nimodipinin farklı dozlarda ve/veya farklı uygulama zamanlarında, testis İ/R hasarı üzerindeki etkileri araştırılmadı. Bu tedavinin doz ve süre düzenlemeleri yapılabilmesi için, ayrıca moleküler mekanizmaları ile ilgili daha fazla bilgi edinmek için, ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



## KAYNAKLAR

1. **Awad N, Abdulaziz K, Malalla B, Al Aradi AH, Al Rashed AA.** Degrees of Testicular Atrophy Following Orchidopexy for Testicular Torsion. *Cureus*. **2023**; 14:15(12):e50543.
2. **Gossman W, Boniface MP, Mohseni M.** Acute Scrotum Pain. *StatPearls*. (Elektronik. Journal) **2017**. <http://europepmc.org/books/NBK470335>
3. **Vaos G, Zavras N.** Antioxidants in experimental ischemia-reperfusion injury of the testis: Where are we heading towards?. *World J Methodol*. **2017**; 7(2):37.
4. **Beaud N, Kanbar A, Abdessater M.** Anatomical risk factors for spermatic cord torsion and their involvement in the choice of orchidopexy technique. *Morphologie*. **2021**; 105(348):1-9.
5. **Ringdahl E, Teague L.** Testicular torsion. *Am Fam Physician*. **2006**; 74(10):1739-43.
6. **Minas A, Mahmoudabadi S, Gamchi NS, Antoniassi MP, Alizadeh A, Bertolla RP.** Testicular torsion in vivo models: Mechanisms and treatments. *Andrology*. **2023**; 11(7):1267-1285.
7. **Hosokawa T, Tanami Y, Sato Y, Oguma E.** Point-of-care ultrasonography for the diagnosis and manual detorsion of testicular torsion. *Journal of Medical Ultrasonics*. **2024**; 51(1):59-70.
8. **Kwenda EP, Locke RA, DeMarco RT, Bayne CE.** Impact of hospital transfer on testicular torsion outcomes: A systematic review and meta-analysis. *J Pediatr Urol*. **2021**; 17(3):293.e1-293.e8.
9. **Hu S, Guo M, Xiao Y.** Mapping trends and hotspot regarding testicular torsion: A bibliometric analysis of global research (2000–2022). *Front Pediatr*. **2023**; 11:1121677.
10. **Shimizu S, Tsounapi P, Dimitriadis F, Higashi Y, Shimizu T, Saito M.** Testicular torsion–detorsion and potential therapeutic treatments: A possible role for ischemic postconditioning. *International Journal of Urology*. **2016**; 23(6):454-463.
11. **Celik E, Oguzturk H, Sahin N, Turtay MG, Oguz F, Ciftci O.** Protective effects of hesperidin in experimental testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Med Sci*. **2016**; 12(5):928-934.
12. **Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ.** Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. **2012**; 298:229-317.
13. **Sanada S, Komuro I, Kitakaze M.** Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2011**; 301(5):H1723-41.
14. **Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R.** Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol*. **2017**; 14(8):470-485.
15. **Kurt O, Yazici CM, Erboga M, Turan C, Bozdemir Y, Akbas A, Turker P, Aktas C, Aydin M, Yesildag E.** Mannitol has a protective effect on testicular torsion: An experimental rat model. *J Pediatr Urol*. **2016**; 12(3):167.e1-8.
16. **Can O, Canat L, Eraldemir FC, Acar E, Yildirim F, Sonmez K, Otunctemur A, Altunrende F.** Protective effect of oltipraz in testicular ischaemia/reperfusion injury: An experimental study. *Andrologia*. **2022** Feb;54(1):e14245.
17. **Rifaioglu MM, Motor S, Davarci I, Tuzcu K, Sefil F, Davarci M, Nacar A.** Protective effect of ebselen on experimental testicular torsion and detorsion injury. *Andrologia*. **2014**; 46(10):1134-1140.

18. **Moghimian M, Soltani M, Abtahi H, Shokoohi M.** Effect of vitamin C on tissue damage and oxidative stress following tunica vaginalis flap coverage after testicular torsion. *J Pediatr Surg.* **2017**; 52(10):1651-1655.
19. **Shahedi A, Talebi AR, Mirjalili A, Pouretezari M.** Protective effects of curcumin on chromatin quality, sperm parameters, and apoptosis following testicular torsion-detorsion in mice. *Clin Exp Reprod Med.* 2021; 48(1):27-33.
20. **Cay A, Alver A, Küçük M, Işık O, Eminağaoğlu MS, Karahan SC, Değer O.** The effects of N-acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *J Surg Res.* **2006** Apr;131(2):199-203.
21. **Yapanoglu T, Ozkaya F, Yilmaz AH, Mammadov R, Cimen FK, Hirik E, Altuner D.** Effect of etoricoxib on experimental oxidative testicular ischemia-reperfusion damage in rats induced with torsion-detorsion. *Korean J Physiol Pharmacol.* **2017**; 21(5):457-464.
22. **Arena S, Iacona R, Antonuccio P, Russo T, Salvo V, Gitto E, Impellizzeri P, Romeo C.** Medical perspective in testicular ischemia-reperfusion injury. *Exp Ther Med.* 2017; 13(5):2115-2122.
23. **Tusat M, Mentese A, Demir S, Alver A, Imamoglu M.** Medical ozone therapy reduces oxidative stress and testicular damage in an experimental model of testicular torsion in rats. *Int Braz J Urol.* **2017**; 43(6):1160-1166.
24. **Sekmenli T, Gunduz M, Öztürk B, Karabağlı P, Ciftci I, Tekin G, Yılmaz M.** The effects of melatonin and colchicine on ischemia-reperfusion injury in experimental rat testicular torsion model. *J Pediatr Surg.* **2017**; 52(4):582-586.
25. **Meštrović J, Drmić-Hofman I, Pogorelić Z, Vilović K, Šupe-Domić D, Šešelja-Perišin A, Capkun V.** Beneficial effect of nifedipine on testicular torsion-detorsion injury in rats. *Urology.* **2014**; 84(5):1194-8.
26. **Dogan C, Halici Z, Topcu A, Cadirci E, Karakus E, Bayir Y, Selli J.** Effects of amlodipine on ischaemia/reperfusion injury in the rat testis. *Andrologia.* **2016**; 48(4):441-452.
27. **Barker FG, Ogilvy CS.** Efficacy of prophylactic nimodipine for delayed ischemic deficit after subarachnoid hemorrhage: a metaanalysis. *J Neurosurg.* **1996**; 84(3):405-414.
28. **Sadow N, Diesing D, Sarrafzadeh A, Vajkoczy P, Wolf S.** Nimodipine Dose Reductions in the Treatment of Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit Care.* **2016**; 25(1):29-39.
29. **Lin RJ, Klein-Fedyshin M, Rosen CA.** Nimodipine improves vocal fold and facial motion recovery after injury: A systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope.* **2019**; 129(4):943-951.
30. **Hu Y, Chen G, Huang J, Li Z, Li Z, Xie Y, Chen Y, Li H, Su W, Chen X, Liang D.** The Calcium Channel Inhibitor Nimodipine Shapes the Uveitogenic T Cells and Protects Mice from Experimental Autoimmune Uveitis through the p38-MAPK Signaling Pathway. *J Immunol.* **2021**; 207(12):2933-2943.
31. **Romanov DV, Sheyanov AM, Samsonova MD, Iuzbashian PG.** Nimodipine in treatment of bipolar disorder. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* **2023**; 123(12):20-26.
32. **Chávez-Cartaya RE, Desola GP, Ramirez-Romero P, Calne RY, Jamieson N V.** Ischemia and reperfusion injury of the rat liver: The role of nimodipine. *Journal of Surgical Research.* **1996**; 60(1):199-206.

33. Behrooz-Lak T, Zarei L, Moloody-Tapeh M, Farhad N, Mohammadi R. Protective effects of intraperitoneal administration of nimodipine on ischemia-reperfusion injury in ovaries: Histological and biochemical assessments in a rat model. *J Pediatr Surg*. **2017**; 52(4):602-608.
34. Ross MH, Pawlina W. *Histology : A Text and Atlas : With Correlated Cell and Molecular Biology*. 7<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Wolters Kluwe Health, **2016**: 805-834.
35. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Kadioğlu A. *Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi*. 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, **2013**: 21-29.
36. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. AFDIAMRA. *Clinically Oriented Anatomy*. 8<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Wolters Kluwe Health, **2018**: 1491-1512.
37. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi 1. Cilt*. 4. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, **2006**: 322-337.
38. Sobotta J, Putz R, Pabst R. *Sobotta Atlas of Human Anatomy*. 14<sup>th</sup> Ed. Munich: Elsevier Urban & Fisher, **2006**: e239.
39. Drake RL, Vogl AW, Mitchell AWM. *Gray's Anatomy for Students*. 3<sup>rd</sup> Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, **2015**: e472.
40. Houda A, Nyaz S, Sobhy B M, Bosiliah AH, Romeo M, Michael JP, Eid H. M. Seminiferous tubules and spermatogenesis. *Male Reproductive Anatomy*. **2021**: 1-27
41. Maekawa M, Kamimura K, Nagano T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol*. **1996**; 59(1):1-13.
42. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology : Text and Atlas*. 14<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: McGraw-Hill Education, **2016**: 439-459.
43. Eroschenko V P. *Difiore's Atlas Of Histology With Functional Correlations*. 12<sup>th</sup> Ed. New York: Wolters Kluwer Health, **2013**: e481.
44. França LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC, Griswold MD. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*. **2016**; 4(2):189-212.
45. Russell LD, Griswold MD. *The Sertoli Cell*. 1<sup>th</sup> Ed. United States of America: Cache River Press, **1993**: 1-115.
46. Mruk DD, Cheng CY. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev*. **2015** Oct; 36(5):564-91
47. Ruthig VA, Lamb DJ. Updates in Sertoli Cell-Mediated Signaling During Spermatogenesis and Advances in Restoring Sertoli Cell Function. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **2022**; 13:897196.
48. Washburn RL, Hibler T, Kaur G, Dufour JM. Sertoli Cell Immune Regulation: A Double-Edged Sword. *Front Immunol*. **2022**; 13:913502.
49. Wang F, Han D. Sertoli Cell Phagocytosis: An Essential Event for Spermatogenesis. *Male Reproductive Health*. **2019**: 69-84
50. Alves MG, Rato L, Carvalho RA, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci*. **2013**; 70(5):777-93.
51. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol*. **2016**; 59:10-26.

52. **Griswold MD.** The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* **1998**; 9(4):411-416.
53. **Wong CH, Cheng CY.** The Blood-Testis Barrier: Its Biology, Regulation, and Physiological Role in Spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol.* **2005**; 71:263-296.
54. **Wong EW, Mruk DD, Cheng CY.** Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. *Biochim Biophys Acta.* **2008**; 1778(3):692-708.
55. **Yan Cheng C, Mruk DD.** The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev.* **2011**; 64(1):16-64.
56. **Carlson BM.** *Human Embryology and Developmental Biology.* 6<sup>th</sup> Ed. United States of America: Elsevier, **2019**: 372-391.
57. **Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL.** Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci.* **2000**; 60-61:471-480.
58. **Sharpe RM.** Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* **2010**; 365(1546):1697-1712.
59. **Zirkin BR, Papadopoulos V.** Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod.* **2018**; 99(1):101-111
60. **Haider SG.** Cell Biology of Leydig Cells in the Testis. *Int Rev Cytol.* **2004**; 233:181-241.
61. **Chen H, Wang Y, Ge R, Zirkin BR.** Leydig cell stem cells: Identification, proliferation and differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* **2017**; 445:65-73.
62. **Kerr JB.** Ultrastructure of the seminiferous epithelium and intertubular tissue of the human testis. *J Electron Microscop Tech.* **1991**; 19(2):215-240.
63. **PRINCE FP.** The human Leydig cell. *The Leydig cell in health and disease*, Humana Press, **2007**: 71-89.
64. **Wang Y, Chen F, Ye L, Zirkin B, Chen H.** Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. *Reproduction.* **2017**; 154(4):R111-R122.
65. **Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH.** *Larsen's Human Embryology.* 5<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, **2015**: 396-408.
66. **Sadler TW.** *Langman's Medical Embryology.* 14<sup>th</sup>. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, **2019**: 267-281.
67. **Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG.** *The Developing Human Clinically Oriented Embryology.* 10<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Elsevier, **2016**: 260-265.
68. **Nöske HD, Kraus SW, Altinkilic BM, Weidner W.** Historical milestones regarding torsion of the scrotal organs. *J Urol.* **1998**; 159(1):13-6
69. **Schill WB, Comhaire FH, Hargreave TB.** *Andrology for the Clinician.* 1<sup>th</sup>. Berlin: Springer, **2006**: 134-161.
70. **Shunmugam M, Goldman RD.** Testicular torsion in children. *Canadian Family Physician.* **2021**; 67(9):669-671.
71. **Günther P, Schenk JP.** Hodentorsion: Diagnose, Differenzialdiagnose und Therapie im Kindesalter Freies Thema. *Radiologe.* **2006**; 46:590-595.

72. Karaguzel E, Kadihasanoglu M, Kutlu O. Mechanisms of testicular torsion and potential protective agents. *Nat Rev Urol.* 2014; 11(7):391-399.
73. Zhao LC, Lautz TB, Meeks JJ, Maizels M. Pediatric Testicular Torsion Epidemiology Using a National Database: Incidence, Risk of Orchiectomy and Possible Measures Toward Improving the Quality of Care. *Journal of Urology.* 2011; 186(5):2009-2013.
74. Lacy A, Smith A, Koyfman A, Long B. High risk and low prevalence diseases: Testicular torsion. *American Journal of Emergency Medicine.* 2023; 66:98-104.
75. Ta A, D'Arcy FT, Hoag N, D'Arcy JP, Lawrentschuk N. Testicular torsion and the acute scrotum: Current emergency management. *European Journal of Emergency Medicine.* 2016; 23(3):160-165.
76. Mellick LB. Torsion of the testicle: It is time to stop tossing the dice. *Pediatr Emerg Care.* 2012; 28(1):80-86.
77. Laher A, Ragavan S, Mehta P, Adam A. Testicular Torsion in the Emergency Room: A Review of Detection and Management Strategies. *Open Access Emerg Med.* 2020; 12:237.
78. Greear GM, Romano MF, Katz MH, Munarriz R, Rague JT. Testicular torsion: epidemiological risk factors for orchiectomy in pediatric and adult patients. *Int J Impot Res.* 2021; 33(2):184-190.
79. Nassiri N, Zhu T, Asanad K, Vasquez E. Testicular Torsion From Bell-clapper Deformity. *Urology.* 2021; 147:275.
80. Zhong H, Bi Y. Pediatric Trauma-Induced Testicular Torsion: A Surgical Emergency. *Urol Int.* 2021; 105(3-4):221-224.
81. Cubillos J, Palmer JS, Friedman SC, Freyle J, Lowe FC, Palmer LS. Familial Testicular Torsion. *J Urol.* 2011; 185(6 Suppl.):2469-2473.
82. Gorbonos A, Cheng EY. Perinatal testicular torsion in siblings. *J Pediatr Urol.* 2007; 3(6):514-515.
83. Chiu B, Chen CS, Keller JJ, Lin CC, Lin HC. Seasonality of testicular torsion: a 10-year nationwide population based study. *J Urol.* 2012; 187(5):1781-1785.
84. Gomes Dde O, Vidal RR, Foeppel BF, Faria DF, Saito M. Cold weather is a predisposing factor for testicular torsion in a tropical country. A retrospective study. *Sao Paulo Med J.* 2015; 133(3):187-90.
85. Bandarkar AN, Blask AR. Testicular torsion with preserved flow: key sonographic features and value-added approach to diagnosis. *Pediatr Radiol.* 2018; 48(5):735-744.
86. Zvizdic Z, Bukvic M, Vranic S. Late-diagnosed complete intravaginal testicular torsion with preserved blood flow and viable testis in an adolescent. *Asian J Surg.* 2023; 46(7):2812-2813.
87. Schick MA, Sternal BT. Testicular Torsion. *StatPearls.* (Elektronic. Journal). 2023. Erişim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448199/>
88. Lavalley ME, Cash J. Testicular torsion: Evaluation and management. *Curr Sports Med Rep.* 2005; 4(2):102-104.
89. Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM. Testicular Torsion: Diagnosis, Evaluation, and Management. *Am Fam Physician.* 2013; 88(12):835-840.
90. Callewaert PRH, Van Kerrebroeck P. New insights into perinatal testicular torsion. *Eur J Pediatr.* 2010; 169(6):705-12

91. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med.* **2011**; 17(11):1391-1401.
92. Sánchez-Hernández CD, Torres-Alarcón LA, González-Cortés A, Peón AN. Ischemia/Reperfusion Injury: Pathophysiology, Current Clinical Management, and Potential Preventive Approaches. *Mediators Inflamm.* **2020**; 2020:8405370.
93. Li Z, Ludwig N, Thomas K, Mersmann S, Lehmann M, Vestweber D, Pittet JF, Gomez H, Kellum JA, Rossaint J, Zarbock A. The Pathogenesis of Ischemia-Reperfusion Induced Acute Kidney Injury Depends on Renal Neutrophil Recruitment Whereas Sepsis-Induced AKI Does Not. *Front Immunol.* **2022**; 13:843782.
94. Dokmeci D. Testicular torsion, oxidative stress and the role of antioxidant therapy. *Folia Med (Plovdiv).* **2006**; 48(3-4):16-21.
95. Çelik A. Sıçan Testis Torsiyon-Detorsiyon Modelinde Etil Pirüvat Etkisinin İncelenmesi Laboratuvar Hayvanlarının Sağlık Bilimlerinde Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, **2011**.
96. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem.* **2018**; 46(4):1650-1667.
97. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *British Journal of Surgery.* **1991**; 78(6):651-655.
98. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim*, **2009**, 22.3: 5-13.
99. Yang S, Lian G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Mol Cell Biochem.* **2020**; 467(1-2):1-12.
100. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* **2012**; 142(3334):w13659.
101. Fink MP. Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* **2002**; 5(2):p 167-174.
102. Hinder RA, Stein HJ. Oxygen-Derived Free Radicals. *Archives of Surgery.* **1991**; 126(1):104-105.
103. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* **2014**; 224:164-175.
104. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol.* **2023**; 97(10):2499-2574.
105. Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit Care Med.* **2005**; 33(12 Suppl.):498-501.
106. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* **2014**; 2014:360438.
107. Ramana KV, Srivastava S, Singhal SS. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease **2019**. *Oxid Med Cell Longev.* **2019**; 2019:7147235.



108. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* **2017**; 482(3):419.
109. Fruhwirth GO, Loidl A, Hermetter A. Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2007; 1772(7):718-736.
110. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, Jiang F, Peng ZY. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019:5080843.
111. Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *Journal of Biological Chemistry.* **2003**; 278(33):31426-31433.
112. Gęgotek A, Skrzydlewska E. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chem Phys Lipids.* **2019**; 221:46-52.
113. Pérez-Figueroa E, Álvarez-Carrasco P, Ortega E, Maldonado-Bernal C. Neutrophils: Many Ways to Die. *Front Immunol.* **2021**; 12:631821.
114. Piccolo EB, Thorp EB, Sumagin R. Functional implications of neutrophil metabolism during ischemic tissue repair. *Curr Opin Pharmacol.* **2022**; 63:102191.
115. Burn GL, Foti A, Marsman G, Patel DF, Zychlinsky A. The Neutrophil. *Immunity.* 2021; 54(7):1377-1391.
116. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's role during health and disease. *Physiol Rev.* **2019**; 99(2):1223-1248.
117. Dar WA, Sullivan E, Bynon JS, Eltzschig H, Ju C. Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: Cellular and molecular mechanisms. *Liver International.* **2019**; 39(5):788-801.
118. Becker F, Kebschull L, Rieger C, Mohr A, Heitplatz B, Van Marck V, Hansen U, Ansari J, Reuter S, Strücker B, Pascher A, Brockmann JG, Castor T, Alexander JS, Gavins FNE. Bryostatins Attenuates Ischemia-Elicited Neutrophil Transmigration and Ameliorates Graft Injury after Kidney Transplantation. *Cells.* **2022**; 11(6):948.
119. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull.* **2004**; 70(1):71-86.
120. Carbone F, Bonaventura A, Montecucco F. Neutrophil-Related Oxidants Drive Heart and Brain Remodeling After Ischemia/Reperfusion Injury. *Front Physiol.* **2019**; 10.
121. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  transfer in the control of apoptosis. *Oncogene.* **2008**; 27(50):6407.
122. Wang M, Tan J, Miao Y, Li M, Zhang Q. Role of  $\text{Ca}^{2+}$  and ion channels in the regulation of apoptosis under hypoxia. *Histol Histopathol.* **2018**; 33(3):237-246.
123. Sukumaran P, Nascimento Da Conceicao V, Sun Y, Ahamad N, Saraiva LR, Selvaraj S, Singh BB. Calcium Signaling Regulates Autophagy and Apoptosis. *Cells.* **2021**; 10(8):2125.
124. Petersen CE, Sun J, Silva K, Kosmach A, Balaban RS, Murphy E. Increased mitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  during ischemia is suppressed, but not eliminated by, germline deletion of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter. *Cell Rep.* **2023**; 42(7):112735.
125. Webster KA. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. *Future Cardiol.* **2012**; 8(6):863.

126. Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inserte J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res*. **2012**; 94(2):168-180.
127. Huang J, Li R, Wang C. The Role of Mitochondrial Quality Control in Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*. **2021**; 2021(1):5543452.
128. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. **2015**; 460(1):72-81.
129. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Brazilian Journal of Biology*. **2020**; 81(4):1133-1143.
130. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. **2019**; 43(6):582-592.
131. Eskandari E, Eaves CJ. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *J Cell Biol*. **2022**; 221(6):e202201159.
132. Newton K, Strasser A, Kayagaki N, Dixit VM. Cell death. *Cell*. **2024**; 187(2):235-256.
133. Li X, Hu L, Zhu X, Guo X, Deng X, Zhang J. The effect of caspase-3 in mitochondrial apoptosis activation on degradation of structure proteins of *Esox lucius* during postmortem storage. *Food Chemistry*. **2022**; 367:130767.
134. Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin*. **2007**; 45(2):27.
135. De Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Cytokines and Pain. *Brazilian Journal of Anesthesiology*. **2011**; 61(2):255-265.
136. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced Science*. **2021**; 8(15):e2004433.
137. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res*. **2004**; 94(12):1543-1553.
138. Ayengin K, Alp HH, Huyut Z, Yildirim S, Altındag F, Avcı V. The effects of CoQ10 supplement on matrix metalloproteinases, oxidative DNA damage and pro-inflammatory cytokines in testicular ischaemia/reperfusion injury in rats. *Andrologia*. **2021**; 53(2):e13839.
139. Koper-Lenkiewicz OM, Sutkowska K, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Kowalewska E, Matowicka-Karna J. Proinflammatory Cytokines (IL-1, -6, -8, -15, -17, -18, -23, TNF- $\alpha$ ) Single Nucleotide Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis—A Literature Review. *Int J Mol Sci*. **2022**; 23(4):2106.
140. Van Loo G, Bertrand MJM. Death by TNF: a road to inflammation. *Nat Rev Immunol*. **2023**; 23(5):289-303.
141. Idriss HT, Naismith JH. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. **2000**; 50(3):184-195.
142. Lysiak JJ. The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:9. doi:10.1186/1477-7827-2-9
143. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. Nimodipine. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. **2012**. Erişim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548041/>

144. De Jonge MC, Traber J. Nimodipine: Cognition, aging, and degeneration. *Clin Neuropharmacol.* 1993; 16(Suppl. 1).
145. Xu L, Sun L, Xie L, Mou S, Zhang D, Zhu J, Xu P. Advances in L-Type Calcium Channel Structures, Functions and Molecular Modeling. *Curr Med Chem.* 2021; 28(3):514-524.
146. Striessnig J, Ortner NJ, Pinggera A. Pharmacology of L-type Calcium Channels: Novel Drugs for Old Targets? *Curr Mol Pharmacol.* 2015; 8(2):110.
147. Mahmoud SH, Ji X, Isse FA. Nimodipine Pharmacokinetic Variability in Various Patient Populations. *Drugs R D.* 2020; 20(4):307.
148. Drugs and Lactation Database (LactMed®). Nimodipine. Drugs and Lactation Database (LactMed®). 2006.  
Erişim: (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000107/>)
149. Carlson AP, Hänggi D, Macdonald RL, Shuttleworth CW. Nimodipine Reappraised: An Old Drug with a Future. *Curr Neuropharmacol.* 2020; 18(1):65.
150. Roos YBWEM, Levi M, Carroll TA, Beenen LFM, Vermeulen M. Nimodipine Increases Fibrinolytic Activity in Patients With Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke.* 2001; 32(8):1860-1862.
151. Macdonald RL. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nat Rev Neurol.* 2014; 10(1):44-58.
152. Scriabine A, Van Den Kerckhoff W. Pharmacology of Nimodipine: A Review. *Ann N Y Acad Sci.* 1988; 522(1):698-706.
153. Hou C, Liu Q, Zhang H, Wang W, Wang B, Cui X, Li J, Ren W, Yang X. Nimodipine Attenuates Early Brain Injury by Protecting the Glymphatic System After Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Neurochem Res.* 2022; 47(3):701-712.
154. Das JM, Zito PM. Nimodipine. StatPearls, (Elektronik. Journal). 2024.  
Erişim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534870/>
155. Coşkun G, Özgür H, Doran Ş, Polat S. Ameliorating effects of curcumin on nicotine-induced mice testes. *Turk J Med Sci.* 2016; 46(2):549-560.
156. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones.* 1970; 1(1):2-25.
157. Bolat D, Oltulu F, Uysal A, Kose T, Gunlusoy B, Yigitturk G, Turk NS, Turan T. Effects of losartan on experimental varicocele-induced testicular germ cell apoptosis. *Andrologia.* 2016; 48(7):840-846.
158. Jacobsen FM, Rudlang TM, Fode M, Østergren PB, Sønksen J, Ohl DA, Jensen CFS, Collaborative C. The Impact of Testicular Torsion on Testicular Function. *World J Mens Health.* 2020; 38(3):298-307.
159. Thaker H, Nelson CP. Adjuvant pharmacological and surgical therapy for testicular torsion: Current state of the art. *J Pediatr Urol.* 2020; 16(6):807-814.
160. Azizollahi S, Babaei H, Derakhshanfar A, Oloumi MM. Effects of co-administration of dopamine and vitamin C on ischaemia-reperfusion injury after experimental testicular torsion-detorsion in rats. *Andrologia.* 2011; 43(2):100-105.
161. Gün Soytürk E, Biçakci Ü, Aslan S, Güvenç T, Ceyhan Bilgici M. Effects of acetylsalicylic acid and ultrasound elastography on testicular torsion in rats. *Turk J Med Sci.* 2023; 53(6):1605-1613.

162. Shirazi M, Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Ardeshtiri M, Afrasiabi MA, Monabati A. Comparison of the protective effects of papaverine, lidocaine and verapamil on the sperm quality of the testis after induced torsion–detorsion in rats. *Scand J Urol Nephrol*. 2010; 44(3):133-137.
163. Semercioz A, Baltaci AK, Mogulkoc R, Avunduk MC. Effect of Zinc and Melatonin on Oxidative Stress and Serum Inhibin-B Levels in a Rat Testicular Torsion–Detorsion Model. *Biochem Genet*. 2017; 55(5-6):395-409.
164. Özgür BC, Sürer H, Yüçetürk CN, Karakan T, Özer E, Ögüş E. The protective effect of roflumilast and ibuprofen on testicular ischemia reperfusion injury: An experimental study. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*. 2022; 28(6):730.
165. Dejban P, Rahimi N, Takzare N, Jahansouza M, Haddadi NS, Dehpour AR. Beneficial effects of dapsone on ischemia/reperfusion injury following torsion/detorsion in ipsilateral and contralateral testes in rat. *Theriogenology*. 2019; 140:136-142.
166. Ganjiani V, Ahmadi N, Raayat Jahromi A. Protective effects of Stevia rebaudiana aqueous extract on experimental unilateral testicular ischaemia/reperfusion injury in rats. *Andrologia*. 2020; 52(2):e13469.
167. Turner TT. Acute experimental testicular torsion. No effect on the contralateral testis. *J Androl*. 1985; 6(1):65-72.
168. Köllükçü E, Atılğan D, Uluocak N, Deresoy FA, Katar M, Unsal V. Milrinone ameliorates ischaemia-reperfusion injury in experimental testicular torsion/detorsion rat model. *Andrologia*. 2021; 53(8):e14128.
169. Aktoz T, Kanter M, Aktas C. Protective effects of quercetin on testicular torsion/detorsion-induced ischaemia-reperfusion injury in rats. *Andrologia*. 2010; 42(6):376-383.
170. Shamsi-Gamchi N, Razi M, Behfar M. Testicular torsion and reperfusion: evidences for biochemical and molecular alterations. *Cell Stress Chaperones*. 2018; 23(3):429-439.
171. Saçık U, Çavdar Z, Ural C, Ersoy N, Özoğul C, Erbil G. Effect of ferulic acid on testicular damage caused by torsion–detorsion in rats. *Biotech Histochem*. 2023; 98(2):77-85.
172. Meštrović J, Pogorelić Z, Drmić-Hofman I, Vilović K, Todorčić D, Popović M. Protective effect of urapidil on testicular torsion–detorsion injury in rats. *Surg Today*. 2017; 47(3):393-398.
173. GAZIA MA. Histological study on the possible ameliorating effect of platelet rich plasma on ischemia/reperfusion injury in testicular torsion model in adult albino rat. *Egyptian Journal of Histology*. 2020; 43.2:614-629.
174. Aboelwafa HR, Ramadan RA, El-Kott AF, Abdelhamid FM. The protective effect of melatonin supplementation against taxol-induced testicular cytotoxicity in adult rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2022; 55:e11614.
175. Pencheva M, Koeva Y, Pavlova E, Atanassova N. Stage Specific Expression of Angiotensin-Converting Enzyme and Thickened Lamina Propria in Relation to Male Fertility. *Folia Med (Plovdiv)*. 2022; 64(1):41-48.
176. Mohamed DI, Abou-Bakr DA, Ezzat SF, El-Kareem HFA, Nahas HHA, Saad HA, Mehana AE, Saied EM. Vitamin D3 Prevents the Deleterious Effects of Testicular Torsion on Testis by Targeting miRNA-145 and ADAM17: In Silico and In Vivo Study. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021; 14(12):1222.

177. Shamsi-Gamchi N, Razi M, Behfar M. Cross-link between mitochondrial-dependent apoptosis and cell cycle checkpoint proteins after experimental torsion and detorsion in rats. *Gene*. **2021**; 795:145793.
178. Davoodi F, Raisi A, Rajabzadeh A, Hablolvarid MH, Zakian A. The effects of verapamil and heparin co-administration on sperm parameters and oxidative stress in prevention of testicular torsion/detorsion damage in rats. *Andrologia*. **2020**; 52(2):e13479.
179. Ganjiani V, Ahmadi N, Divar MR, Sharifiyazdi H, Meimandi-Parizi A. Protective effects of crocin on testicular torsion/detorsion in rats. *Theriogenology*. **2021**; 173:241-248.
180. Akkuş E, Uygun N, Özkara H, ALICI B, Toksöz T, Hattat H. Testis Biyopsilerinin Johsen Skorlaması ile Değerlendirilmesinin Önemi. *Türk Üroloji Dergisi*. **1997**; 23:213-217.
181. Shokoohi M, Madarek EOS, Khaki A, Shoorei H, Khaki AA, Soltani M, Ainehchi N. Investigating the effects of onion juice on male fertility factors and pregnancy rate after testicular torsion/detorsion by intrauterine insemination method. *Int J Womens Health Reprod Sci*. **2018**; 6(4):499-505.
182. Rezakhaniha B, Ganjiani V, Siroosbakht S, Ahmadi N, Meimandi-Parizi A, Divar MR, Shrifiazdi H, Mirghazanfari SM. The evaluation of citral effects on experimental unilateral testicular ischemia/reperfusion injury. *Andrologia*. **2022**; 54(11):e14605.
183. Ameli M, Hashemi MS, Moghimian M, Shokoohi M. Protective effect of tadalafil and verapamil on testicular function and oxidative stress after torsion/detorsion in adult male rat. *Andrologia*. **2018**; 50(8):e13068.
184. Akhigbe RE, Odetayo AF, Akhigbe TM, Hamed MA, Ashonibare PJ. Pathophysiology and management of testicular ischemia/reperfusion injury: Lessons from animal models. *Heliyon*. **2024**; 10(9):e27760.
185. Chi A, Yang B, Cao X, Wang Z, Liu H, Dai H, Deng C, Zhang M. ICA II Alleviates Testicular Torsion Injury by Dampening the Oxidative and Inflammatory Stress. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **2022**; 13:871548.
186. Rezakhaniha B, Heidari R, Abbasi M. Can Melissa officinalis improve chromatin structure and sperm parameters in a rat model of varicocele?. *Andrologia*. **2018**; 50(8):e13058.
187. Toto A, Wild P, Graille M, Turcu V, Crézé C, Hemmendinger M, Sauvain JJ, Bergamaschi E, Guseva Canu I, Hopf NB. Urinary Malondialdehyde (MDA) Concentrations in the General Population—A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Toxics*. **2022**; 10(4):160.
188. Sengupta P, Dutta S, Irez T. Oxidants and antioxidants in male reproduction: roles of oxidative and reductive stress. *Journal of Integrated Science and Technology*. **2024**; 12.3:753-753.
189. Khezri MR, Ghasemnejad-Berenji H, Ghasemnejad-Berenji M. Protective effects of empagliflozin on testicular injury induced by torsion/detorsion in adult male rats. *J Pediatr Urol*. **2023**; 19(5):545.e1-545.e7.
190. Etensel B, Ozkisacik S, Ozkara E, Karul A, Oztan O, Yazici M, Gürsoy H. Dexpanthenol attenuates lipid peroxidation and testicular damage at experimental ischemia and reperfusion injury. *Pediatr Surg Int*. **2007**; 23(2):177-81
191. Cvetkovic T, Stankovic J, Najman S, Pavlovic D, Stokanovic D, Vlajkovic S, Dakovic-Bjelakovic M, Cukuranovic J, Zivkovic V, Stefanovic V. Oxidant and antioxidant status in experimental rat testis after testicular torsion/detorsion. *Int J Fertil Steril*. **2015**; 9(1):121-8.

192. Un H, Bayir Y, Halici Z, Akpınar E, Karakus E, Oral A, Ziypak T, Selli J. The Effects of RAAS Inhibition in Rate Limiting Step by Aliskiren on Testicular Torsion Injury in Rats. *J Urol.* **2015**; *194*(3):828-833.
193. Sangodele JO, Inuwa Z, Lawal B, Adebayo-Gege G, Okoli BJ, Mtunzi F. Proxceed plus salvage rat testis from ischemia- reperfused injury by enhancing antioxidant's activities and inhibition of iNOS expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* **2021**; *133*:111086.
194. Afolabi OA, Anyogu DC, Hamed MA, Odetayo AF, Adeyemi DH, Akhigbe RE. Glutamine prevents upregulation of NF-kB signaling and caspase 3 activation in ischaemia/reperfusion-induced testicular damage: An animal model. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* **2022**; *150*:113056.
195. Kutluhan MA, Özsoy E, Şahin A, Ürkmez A, Topaktaş R, Toprak T, Gümrükçü G, Verit A. Effects of platelet-rich plasma on spermatogenesis and hormone production in an experimental testicular torsion model. *Andrology.* **2021**; *9*(1):407-413.
196. Belhan S, Yıldırım S, Karasu A, Kömüroğlu AU, Özdek U. Investigation of the protective role of chrysin within the framework of oxidative and inflammatory markers in experimental testicular ischaemia/reperfusion injury in rats. *Andrologia.* **2020**; *52*(9):e13714.
197. McMichael M. Ischemia–reperfusion injury: assessment and treatment, part II. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.* **2004**; *14*(4):242-252.
198. Wang H, Ma D, Zhu X, Liu P, Li S, Yu B, Yang H. Nimodipine inhibits intestinal and aortic smooth muscle contraction by regulating Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>–</sup> channels. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2021**; *421*:115543.
199. Clough B, Tenii J, Wee C, Gunter E, Griffin T, Aiyagari V. Nimodipine in Clinical Practice: A Pharmacological Update. *Journal of Neuroscience Nursing.* **2022**; *54*(1):19-22.
200. Liu J, Sun C, Wang Y, Nie G, Dong Q, You J, Li Q, Li M. Efficacy of nimodipine in the treatment of subarachnoid hemorrhage: a meta-analysis. *Arq Neuropsiquiatr.* **2022**; *80*(7):663-670.
201. Desai RA, Davies AL, Del Rossi N, Tachrount M, Dyson A, Gustavson B, Kaynezhad P, Mackenzie L, van der Putten MA, McElroy D, Schiza D, Linington C, Singer M, Harvey AR, Tachtsidis I, Golay X, Smith KJ. Nimodipine Reduces Dysfunction and Demyelination in Models of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* **2020**; *88*(1):123-136.
202. Schwarting J, Harapan BN, Lin X, Plesnila N, Terpolilli NA. Nimodipine Reduces Microvasospasms after Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke.* **2023**; *54*(10):2666-2670.
203. Marcantoni M, Fuchs A, Löw P, Bartsch D, Kiehn O, Bellardita C. Early delivery and prolonged treatment with nimodipine prevents the development of spasticity after spinal cord injury in mice. *Sci Transl Med.* **2020**; *12*(539):167.
204. Morakinyo AO, Iranloye BO, Adegoke OA. Antireproductive effect of calcium channel blockers on male rats. *Reprod Med Biol.* **2009**; *8*(3):97-102.
205. Chalooob R, Numan I, Hussain S. Dose-dependent reproductive toxicity of nimodipine in male rats. *J Exp Integr Med.* **2013**; *3*(1):17.
206. Al-Maghrebi M, Kehinde EO, Anim JT. Long term testicular ischemia–reperfusion injury-induced apoptosis: Involvement of survivin down-regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* **2010**; *395*(3):342-347.
207. Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, Tsukamoto T. Balance of Apoptosis and Proliferation of Germ Cells Related to Spermatogenesis in Aged Men. *J Androl.* **2003**; *24*(2):185-191

208. Sögütçü N, Yokus B. Effects of gallic acid on ischemia-reperfusion induced testicular injury in a rat testicular torsion model. *Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology*. **2021**; 43.1:1-7.
209. Mohamed Mahmoud N, Lotfy Kabil S. Pioglitazone abrogates testicular damage induced by testicular torsion/detorsion in rats. *Iran J Basic Med Sci*. **2019**; 22(8):884-892.
210. Kölükçü E, Firat F, Deresoy FA, Katar M, Atılgan D. The effects of pirfenidone on ischaemia–reperfusion injury in testicular torsion-induced rat model. *Andrologia*. **2021**; 53(2):e13922.
211. Al-Maghrebi M, Renno WM, Al-Ajmi N. Epigallocatechin-3-gallate inhibits apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from ischemia/reperfusion-induced inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*. **2012**; 420(2):434-439.
212. Abdelzaher WY, Mostafa-Hedeab G, Sayed AboBakr Ali AH, Fawzy MA, Ahmed AF, Bahaa El-Deen MA, Welson NN, Aly Labib DA. Idebenone regulates sirt1/Nrf2/TNF- $\alpha$  pathway with inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in testicular torsion/detorsion in juvenile rats. *Hum Exp Toxicol*. **2022**; 41: 9603271221102515.
213. Taheri S, Davoodi F, Raisi A, Zakian A, Rajabzadeh A, Hablolvarid MH, Khezri A, Ahmadvand H. Co-administration of Salvia miltiorrhiza and verapamil inhibits detrimental effects of torsion/detorsion on testicular tissue in rats. *Andrologia*. **2021**; 53(6):e14049.