

İzogenol tabanlı etkili yeni bir antioksidanın testis torsiyonu oluşturulan ratlarda testis dokuları üzerine olan etkilerinin melatoninle karşılaştırılması

The comparison of the effect of Isoeugenol-based novel potent antioxidant and melatonin on testicular tissues in torsion induced rat model

Fikret Erdemir¹, Esra Fındık², Mustafa Ceylan², Erkan Söğüt³, Sevil Çaylı⁴, Hakan Kesici⁴

ÖZ

AMAÇ: Testis torsiyonu iskemik bir süreçtir. Her ne kadar tedavide detorsiyon gerekli olsa da bu yaklaşımın reaktif oksijen radikallerinin salınımına bağlı olarak oksidatif hasara yol açtığı gösterilmiştir. Daha önceki çalışmalarda pek çok organda çeşitli antioksidanlar iske mi re-perfüzyon hasarlarında antioksidan etkilerini göstermek üzere kullanılmıştır. Sunulan bu çalışmada testis torsiyonu oluşturulan rat modelinde yeni bir antioksidanın etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER: Bu çalışmada, ağırlıkları 250–300 gr, yaşları 5,5–6 ay olan toplam 32 Wistar cinsi erkek albino rat kullanıldı. Ratlar randomize olarak dört gruba ayrıldı. Grup 1 (n=8) kontrol grubu olarak alındı ve bu gruptaki ratlar doku ve biyokimyasal bazal değerlerin değerlendirilmesi için kullanıldı. Grup 2'de (n=8), torsiyon ve detorsiyon oluşturuldu. Grup 3'te (n=8) testis torsiyon/detorsiyon oluşturulduktan sonra melatoninin serum ve doku oksidatif stres parametreleri üzerine olan etkilerini değerlendirmek için 50 mg intraperitoneal melatonin verildi. Grup 4 (n=8) testis torsiyon/detorsiyon oluşturulduktan sonra yeni antioksidan ajanın serum ve doku oksidatif stres parametreleri üzerine olan etkilerini değerlendirmek için 50 mg intraperitoneal yeni ajan verildi. Malondialdehid (MDA), superoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz gibi doku oksidatif stres parametreleri tüm gruplarda çalışıldı. Ratların sakrifiye edilmelerinden hemen önce vena kava inferior-dan alınan 5 ml'lik kanda aynı parametrelerin serum seviyeleri çalışıldı.

BULGULAR: Serum MDA, SOD ve GSH seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Grup 2'de anlamlı olarak arttı (P<0,05). Melatonin verilmesi torsiyon grubu ile karşılaştırıldığında lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerini azalttı (P<0,05). Ayrıca, yeni antioksidan ajan verilmesi de Grup 2 ile kıyaslandığında serumda MDA, SOD ve GSH seviyelerini azalttı. Melatonin ve yeni antioksidan tedavisi sonrası testis hasarı azaldı. Testiküler germ hücre indeksi Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te sırasıyla %1,5, %15, %3,2 ve %6 olarak tespit edildi (p<0,05). Antioksidan aktivite açısından Grup 3 ve Grup 4 arasında anlamlı fark saptanmadı.

SONUÇ: Bu çalışmanın sonuçları ratlarda deneysel testis torsiyonu oluşturulmasının oksidatif strese neden olduğunu gösterdi. Yeni antioksidan ajan testis torsiyonundaki oksidatif stresi azalttı. Bu yeni antioksidan ajan testis torsiyonuna bağlı olumsuz etkileri azaltmak için alternatif olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Testis, torsiyon, tedavi, antioksidan, melatonin

ABSTRACT

OBJECTIVE: Testicular torsion is an ischemic process. Although detorsion of testis is necessary for treatment, it has been shown that this approach may lead to oxidative damage via release of reactive oxygen species. Various antioxidant agents have been used previously to show their antioxidative effects on ischemia-reperfusion injury in many organ systems. In present study the effect of new antioxidant agent on testicular tissues was evaluated in testicular torsion induced rat model.

MATERIAL and METHODS: Thirty-two male Wistar albino rats, age 5.5 to 6 months and weighing 250 to 300 g, were used in this study. The rats were randomly divided into four groups. Group 1 (n=8) control group; the rats in this group were used to determine basal values for biochemical and tissue evaluation. In Group 2 (n=8), torsion and detorsion was created. Group 3 (n=8) received a 50 mg intraperitoneally melatonin to determine the effect of melatonin on serum and tissue oxidative stress parameters after testicular torsion/detorsion is created. Group 4 (n=8) received a 30 mg intraperitoneally new antioxidant agent to determine the effect of this agent on serum and tissue oxidative stress parameters after testicular torsion/detorsion is created. The tissue levels of oxidative stress parameters such as malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GSH) were studied in all groups. The serum levels of the same parameters were also studied in the blood (5 ml) which were drawn from the vena cava inferior of all the rats just before sacrifice.

RESULTS: The serum levels of MDA, SOD and GSH increased in the Group 2 in comparison to the control (P<0.05). Administration of melatonin caused a decrease in lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities when compared to the torsion group (P<0.05). Administration of new antioxidant also decreased the levels of MDA, SOD and GSH in serum in comparison to Group 2. After treatment with melatonin and new antioxidant the testicular damage was diminished. Testicular germ cell apoptotic index was detected as 1.5%, 15%, 3.2% and 6% in Groups 1, 2, 3 and 4 respectively (p<0.05). There was no statistically significant difference between Group 3 and Group 4 in terms of serum antioxidant activity.

CONCLUSION: The results of this study showed that experimentally induced testicular torsion causes oxidative stress. The new antioxidant agent decreased the negative effect of oxidative stress in testicular torsion. This new antioxidant agent can be used alternatively to decrease the negative effects of testicular torsion.

Keywords: Testis, torsion, treatment, antioxidant, melatonin

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Tokat, ²Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Tokat, ³Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Tokat, ⁴Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tokat

Yazışma Adresi / Correspondence:

Prof. Dr. Fikret Erdemir; Bahçelievler Mah. Ülkü Cad. 4. Sok. No: 16 Genç İnşaat. C Blok. D: 2 Merkez, 60100 Tokat - Türkiye

Tel. +90 356 2129500 / 7706

E-mail: fikreterdemir2003@yahoo.com

Geliş / Received: 19.11.2017; **Kabul / Accepted:** 20.11.2017

GİRİŞ

Testis torsiyonu, özellikle adölesanlarda görülen acil ürolojik bir patolojidir. Testis torsiyonunda söz konusu olan iskemi ve detorsiyon tedavisi sonrası oluşan reperfüzyon oksidatif strese neden olmaktadır ki bu durum çok sayıda deneysel çalışmada ortaya konulmuştur. Oksidatif stres reaktif oksijen radikallerinin aşırı üretimi ile karakterize bir durumdur. Bu olayda, reaktif oksijen radikalleri ile antioksidan defans sistemi arasında imbalans bulunmaktadır.^[1,2] Reaktif oksijen radikalleri, hücrelerde özellikle lipid peroksidasyonuna yol açarak membran geçirgenliğini bozup hücrenin canlılığını kaybetmesine neden olmaktadır.^[3]

Spermiler, çok iyi bilindiği üzere, plazma membranlarında yer alan yüksek içerikli poliansatüre yağ asitlerinden dolayı oksidatif stresin neden olduğu lipid peroksidasyonuna oldukça duyarlıdır. Buna göre, oksidatif strese bağlı olarak oluşan reaktif oksijen radikalleri sperm motilite, canlılık, morfoloji, kapasite ve akrozom reaksiyonunu olumsuz olarak etkileyebilmektedir.^[4,5] Antioksidanlar reaktif oksijen radikallerinin bu olumsuz etkilerini farklı reaksiyonlarla azaltmaktadır. Bu ajanlar, testis torsiyonunda reaktif oksijen radikallerinin serum ve dokudaki negatif etkilerini önlemek için kullanılmışlardır.^[6] Günümüze kadar oksidatif hasarın zararlı etkilerini önlemek için çok sayıda antioksidan ajan kullanılmış olup yenileri üzerinde de çalışmalar ve araştırmalar devam etmektedir.^[6-8]

Bu çalışmada, yeni sentezlenen antioksidan ajanın testis torsiyonu oluşturulan ratlarda serum ve testis dokuları üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

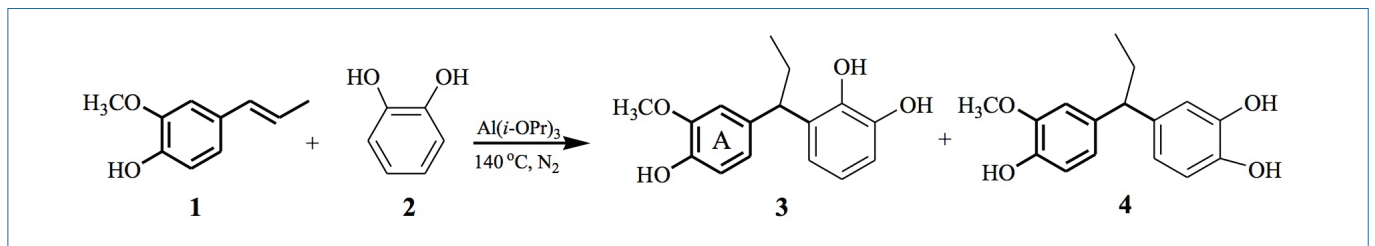
Yerel etik kurul onayı alındıktan sonra (2011-HAD-YEK-014) yaşları 5,5–6 ay, ağırlıkları 250–300 gr arasında değişen toplam 32 adet erkek Wistar cinsi albino rat çalışmaya alındı. Ratlar laboratuvar hayvanları kullanım ve bakım kurallarına uygun olarak ısı kontrollü odalarda (20–23 °C), 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünü sağlayacak şekilde standart beslenme şekli ve istedikleri kadar su içecek şekilde tutuldular. Bütün cerrahi girişimler, steril şartlarda

ksilazin/ketamin anestezisi altında yapıldı. Deneysel işlemlerin sonunda ratlar sakrifiye edildi. Ratlar randomize olarak dört gruba ayrıldı. Grup 1 (n=8) kontrol grubu olarak kabul edildi ve bu grupta elde edilen doku ve serum örnekleri bazal biyokimyasal ve doku değerlendirmeleri için kullanıldı. Grup 2 (n=8) testis torsiyonu oluşturulan grup olup, bu grupta sağ ilioinguinal insizyonla testise ulaşıldı ve saat yönünde 720 derece torsiyon oluşturularak 2 saat beklendi. Bu sırada testis 5/0 ipek sütürle skrotuma fiks edildi. Testis torsiyonu oluşturulmasından 2 saat sonra yine steril şartlarda detorsiyon oluşturuldu. Grup 2, testiküler iskemi reperfüzyon hasarının serum ve doku oksidatif stres parametrelerine etkisini ortaya koymak amacıyla oluşturuldu. Grup 3 (n=8) testis torsiyon/detorsiyon oluşturulan grup olup, melatoninin serum ve doku oksidatif stres parametrelerine olan etkisinin araştırılması amacıyla oluşturuldu. Bu grupta, iskemi/reperfüzyon oluşturulduktan sonra, ratlara intraperitoneal melatonin 50 mg/kg olacak şekilde verildi. Grup 4 (n=8), benzer şekilde yeni sentez edilen antioksidan olan (3-(1-(4-Hidroksi-3-metoksifenil) propil) benzen-1,2-diol ve 4-(1-(4-hidroksi-3-metoksifenil) propil) benzen-1,2-diol'ün iskemi/reoperfüzyon sonrası serum ve doku oksidatif stress parametrelerine olan etkisinin araştırılması amacıyla oluşturuldu. Bu grupta, antioksidan ajan intraperitoneal olarak 30 mg/kg olacak şekilde verildi. Bu ajanların sentezi literatürde tanımlandığı üzere yapıldı.^[9]

Bütün gruplarda malondialdehid (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz gibi oksidatif stres parametrelerinin doku düzeyleri çalışıldı. Aynı parametrelerin serum seviyeleri vena kava inferiordan alınan 5 ml'lik kan üzerinde çalışıldı. Deneysel çalışmanın sonunda ratlar sakrifiye edildi.

Biyokimyasal incelemeler

Alınan kan örnekleri biyokimyasal analizler için heparinsiz tüplere konuldu. 3000 devirde +4 derecede 15 dakikalık santrifüjü takiben serum örnekleri -70 °C'de saklandı. Aşağıda belirtilen parametreler Sigma (St. Louis, USA) firması tarafından sağlanan kimyasallarla tamamlandı.



Şekil 1. Bileşik 3 ve 4'ün sentezi.

Serum antioksidan enzim analizleri

Sun ve arkadaşlarının yöntemi ile süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi belirlenmiştir.^[10] Bu yöntemde, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin, nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanarak SOD aktivitesi tespit edilir. Ortaya çıkan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Meydana gelen kompleks 560 nm'de maksimum absorptans verir. Eğer ortamda enzim yoksa bu indirgenme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD varsa NBT indirgenmesi gerçekleşmeyip mavi-mor renk açığa çıkmakta ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır. Buna göre SOD enzim aktivitesi (1U), NBT'un indirgenmesini %50 inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Deney tüplerine öncelikle 2,85 mL SOD reaktifi konulmuştur. Üzerlerine 0,1 mL numunelerin ekstraktlarından eklenmiştir. Kör tüpüne ekstrakt yerine 0,1 mL distile su konulmuştur. Sonra tüm karışımların üzerine 0,05 mL ksantin oksidaz ilave edilip, hızlı bir şekilde alt üst edilerek karıştırılmıştır ve oda ısısında 20 dakika inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon süresi dolan tüplere bekletilmeden stop solüsyonu olarak 0,1 mL bakır klorür eklenmiş ve numuneler köre karşı 560 nm'de okunmuştur.

MDA lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve 90 °C'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek pembe renkli kromojen oluşturur. Oluşan pembe renkli bileşiğin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümüne göre MDA düzeyinin tayini yapılmıştır. Kapaklı cam deney tüplerine 2,5 ml %10'luk TCA konulduktan sonra üzerlerine 0,5 ml numune ilave edilerek vortekle karıştırılmıştır. Elde edilen karışımların ağızları kapatılarak 90 °C'de 15 dk. inkübasyonda bırakıldıktan sonra soğuk su altında soğutularak 1804xg'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Sonra elde edilen süpernatantlardan 2 ml ayrı tüplere alınarak üzerlerine %0,675'lik TBA eklenmiş ve tekrar 90 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi dolduktan sonra soğuk su altında soğutulan numuneler, 532 nm'de köre karşı okutulmuştur. Kör tüpüne numune yerine 0,5 ml distile su konularak aynı işlemler yapılmıştır.^[11]

Paglia ve arkadaşlarının yöntemine göre GSH-Px aktivitesi belirlenmiştir.^[12] Hidrojen peroksit bulunan ortamda GSH-Px redükte GSH'un okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. NADPH'in NADP'ye yükseltgenmesi sırasında absorptans seviyesindeki azalmanın, 340 nm'de okunmasıyla GSH-Px aktivitesi belirlenir. Hazırlanan deney tüplerine; 2,650 mL EDTA'lı fosfat tamponu, 0,1 mL redükte GSH, 0,1 mL NADPH, 0,01 mL GSH-Redüktaz, 0,01

mL NaN₃, 0,02 mL numune karışımları hazırlanarak 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra deney tüplerine 0,1 mL hidrojen peroksit ilave edilip, 5 dk boyunca dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede, numunelerin absorptans değerleri kaydedilmiştir. Aktivite azalışının lineer olduğu absorptans aralığının 1 dk'lık süresi esas alınarak hesaplamada kullanılmıştır.

Deneklere ait tüm kesitlerde apoptotik hücreleri belirlemek için TUNEL (Terminal deoksinükleotidiltransferaz deoksiüridin trifosfat *nick end labeling*) yöntemi uygulandı. TUNEL yöntemi ile histolojik doku kesitlerinde bulunan apoptozise uğramış ölü hücrelerin işaretlenmesi amaçlandı ve kitin üretici firma protokolü doğrultusunda preparatlar TUNEL kiti ile işleme tabi tutuldu. İşaretlenen apoptotik hücreler, araştırma mikroskobu (Nikon E200 ECLIPSE ve Nikon Digital Sight DS-U2, Basic Research NIS-Elements BR, Japan) iş istasyonu kullanılarak, X10 oküler ve X40 objektif büyütmede, ImageJ programı (ImageJ 1,45 s Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) kullanılarak sayıldı.

Apoptotik hücre sayım işlemi, her bir kesit üzerinde X400'lük büyütmede, her bir testiste, seminifer tübüldeki pozitif işaretlenmiş germ hücreleri sayılarak yapıldı ve aynı zamanda kesit başına düşen toplam (normal + apoptotik) hücreler de sayıldı. Apoptotik germ hücre sayıları, kesit başına düşen toplam hücre sayısına bölünerek apoptotik indeksler oluşturuldu.

Her bir denek için "apoptotik indeks (AI)" hesaplanması şu formüle göre yapıldı.

$$AI = (\text{Apoptotik hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı}) \times 100$$

BULGULAR

Kontrol grubuna kıyasla torsiyon oluşturulan Grup 2'deki serum MDA ve SOD düzeylerinin anlamlı olarak arttığı saptandı ($p < 0,001$). Buna göre kontrol grubunda $1,7 \pm 0,22$ ve $17,95 \pm 3,16$ olarak saptanan serum MDA ve SOD değerlerinin torsiyon oluşturulması sonrası sırasıyla $2,38 \pm 0,54$ ve $33,81 \pm 5,1$ seviyelerine çıktığı saptandı. Doku MDA ve SOD değerleri de kontrol grubuna kıyasla torsiyon grubunda arttı. Melatonin verilmesi sonrası Grup 3'teki serum MDA, SOD ve GSH seviyeleri sırasıyla $1,74 \pm 0,2$, $20,15 \pm 2,24$ ($p < 0,001$) ve $1,16 \pm 0,34$ olarak saptandı. Doku MDA seviyeleri ise $8,69 \pm 2,48$ olarak tespit edildi (Tablo 1). Yeni antioksidan verilmesi sonrası serum MDA, SOD ve GSH seviyeleri sırasıyla $1,79 \pm 0,24$, $19,2 \pm 3,44$ ($p < 0,001$) ve $1,1 \pm 0,19$ olarak saptandı. Buna göre melatonin ve yeni antioksidan ajan verilmesinin oksidatif hasarı azaltarak kontrol grubu seviyelerine yaklaştırdığı görüldü.

Tablo 1. Grupların karşılaştırılması

		Grup 1 (n=8)	Grup 2 (n=8)	Grup 3 (n=8)	Grup 4 (n=8)	F	p
Serum	MDA	1,7±0,22	2,38±0,54 ^a	1,74±0,2	1,79±0,24	7,456	0,001
	SOD	17,95±3,16	33,81±5,1 ^b	20,15±2,24 ^c	19,2±3,44 ^d	33,322	<0,001
	GSH-Px	1,07±0,19	1,35±0,38	1,16±0,34	1,1±0,19	1,530	0,228
Doku	MDA	9,02±3,76	11,89±3,94	8,69±2,48	7,02±0,99 ^e	3,563	0,027
	SOD	0,12±0,02	0,13±0,02	0,13±0,03	0,09±0,01 ^f	7,484	0,001
	GSH-Px	4,13±1,75	4,42±1,73	5,24±0,82	4,58±1,07	0,904	0,427

MDA: Malondialdehid, SOD: Superoksit dismutaz, GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

^aKontrol Grubu ile arasında anlamlı fark bulundu. (p=0,046)

^bKontrol Grubu anlamlı fark bulundu. (p<0,001)

^cTorsiyon Grubu ile arasında anlamlı fark bulundu. (p<0,001)

^dTorsiyon Grubu ile arasında anlamlı fark bulundu. (p<0,001)

^eTorsiyon Grubu ile arasında anlamlı fark bulundu. (p=0,049)

^fKontrol Grubu, Torsiyon Grubu ve Melatonin Grubu ile arasında anlamlı fark bulundu. (p=0,014; p=0,002; p=0,002)

Veriler Ort±SS şeklinde verilmiştir.

Doku MDA ve SOD düzeyleri kontrol grubunda sırasıyla 9,02±3,76 ve 0,12±0,02 seviyelerinde iken torsiyon grubunda 11,89±3,94 ve 0,13±0,02 olarak görüldü. Yeni antioksidan ajan verilmesi sonrası doku MDA ve SOD düzeyleri sırasıyla 7,02±0,99 (p=0,049) ve 0,09±0,01 (p=0,002) olarak bulundu. Testiküler germ hücre indeksi Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te sırasıyla %1,5, %15, %3,2 ve %6 olarak tespit edildi (p<0,05). Serum antioksidan aktivite açısından Grup 3 ve Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Doku SOD aktivitesinin ise yeni antioksidan ajan verilmesi ile melatonin grubuna göre daha fazla düzeldiği gözlemlendi.

İstatistiksel yöntem

Çalışmada genel özellikleri hakkında bilgi vermek amacı ile tanımlayıcı analizler yapılmıştır. Değişkenlere ait veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Gruplar arası farkları bulmak için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için ise varyansların homojenliğine göre Tukey veya Tamhane's T² kullanılmıştır. Önemlilik değeri 0,05'den küçük hesaplandığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Hesaplamalar hazır istatistik yazılımı ile yapılmıştır. (IBM SPSS Statistics 19, SPSS inc., an IBM Co., Somers, NY)

TARTIŞMA

Klinik olarak testis torsiyonu tipik bir iskemi ve reperfüzyondur. Bu patolojide, uygun olmayan ya da geç tedavinin erkeklerde infertiliteye yol açması söz konusu olduğundan, testislerin korunması için olabildiğince erken tanı ve tedavi gerekmektedir.^[13] Testis torsiyonunda tüm dünyada üroloji pratiğinde temel yaklaşım cerrahi detorsiyon olup, buna bağlı olarak reperfüzyon sağlanmış olmaktadır. Çalışmalarda iskemik dokunun reperfüzyonunun oksidatif strese neden olduğu ortaya konulmuştur.^[14-16] Bu nedenle,

detorsiyon testiste daha fazla hasara neden olabilmektedir. Oksidatif stres oksijen ve oksijen kaynaklı yapılar olan reaktif oksijen radikallerinin hücrede hasarı artırdığı patolojiye neden olabilmektedir.^[14,17]

Reaktif oksijen radikalleri kısa ömürlü reaktif kimyasal maddeler olup, yapılarında bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron içerir. Yapılarındaki bu eşleşmemiş elektronlar nedeniyle, reaktif oksijen radikaller kararsız, stabil olmayan oldukça reaktif yapılar halinde lipid, aminoasit ve nükleik asitlere zarar verebilmektedir.^[18] Aslında normal durumlarda reaktif oksijen radikalleri hücrelerin farklılaşması, sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyonun sağlanmasında fizyolojik rollere sahip olsalar da, stres durumlarına bağlı olarak aşırı miktarlarda fizyolojik sınırların üstüne çıktıklarında oksidatif stres söz konusu olmaktadır.^[19,20] Hücrelerin protein, karbonhidrat, nükleik asit ve özellikle de lipid yapıları dahil olmak üzere tüm yapıları ROS'un potansiyel hedefleri arasındadır. Bununla bağlantılı olarak, aşırı üretimi olan ROS yukarıda sayılan hücresel yapılarda hasara neden olarak inflamasyon, apoptozis, membran yıkımı, fibrozis ve hücre proliferasyonuna neden olabilmektedir.^[21]

Oksidatif stres, pek çok hastalığın patogenezinde önemli rollere sahiptir. Literatürde artrit^[22], kanser^[23], diabetes mellitus^[24], enfeksiyonlar^[25], santral sinir sistemi ve testis torsiyonu gibi patolojilerde ROS'un lipid peroksidasyonuna bağlı olarak hücre membranlarında hasara neden olduğu gösterilmiştir. Yine çalışmalarda, testis torsiyonu oluşturulan rat modelinde oksidatif stresin reperfüzyon oluşturulmasından sonra dakikalar ve saatler içerisinde olumsuz etkilere neden olduğu belirtilmiştir.^[26] Gerçekten de, testis torsiyonu oluşturulan rat modellerini içeren çalışmalarda antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı ve ROS üretiminin arttığı gösterilmiştir. Sunulan bu çalışmada da gösterildiği üzere, testi-

küler iskemi-reperfüzyon hasarının, biyokimyasal ve histolojik olarak hasara yol açtığı görülmüştür. Malonaldehid, lipid peroksidasyonunun bir belirteci olup bu çalışmada Grup 2'de kontrol grubuna kıyasla arttığı gösterilmiştir.

Oksidatif hasarı azaltmada temel strateji, antioksidanların kullanılmasıdır. ROS'ların etkilerini azaltan antioksidanlar, oksidatif zincir reaksiyonunu bozarak oksidatif hasarı azaltarak etki gösterir.^[27] Antioksidanların oksidatif stres parametrelerine karşı olan yararlı etkileri, ateroskleroz, hipertansiyon^[28], tip 2 diabetes mellitus^[29], renal hastalıklar, romatoid artrit, ülseratif kolit, Crohn hastalığı, kronik obstrüktif pulmoner hastalıklar^[30] ve testis torsiyonu gibi farklı patolojilerde gösterilmiştir. Buna göre, oksidatif stresin zararlı etkilerini önlemek amacıyla vitamin E, melatonin, retinol, β -karoten, omega-3, resveratrol, allopurinol, N-asetilsistein, çinko aspartat, kafeik asit, vitamin C ve koenzim Q10 gibi pek çok antioksidan ajan değişik başarı oranlarıyla kullanılmıştır.^[31,32] Her ne kadar testis torsiyonunda farklı antioksidanların serum ve doku düzeyinde hasarı azalttığı gösterilse de, yeni ajanlarla ilgili çalışmaların halen devam ettiği anlaşılmaktadır.

Bu ajanlar içerisinde fenolik türevleri önemli antioksidan gruplardan biridir.^[33] Kafeik asit ve resveratrol en iyi bilinen fenolik türevlerindedir.^[33] Bununla ilişkili olarak bu türevlerin antiviral, antiinflamatuvar, antiaterosklerotik, antitümöral ve kardiyak koruyucu etkileri çalışmalarda gösterilmiştir.^[34-36] Bu türevlerin antioksidan ve serbest oksijen radikallerinin olumsuz etkilerinden koruyucu kısımları, fenolik hidroksil grubu olarak kabul edilmektedir. Fenoller, fenolik OH'in H atomunu serbest radikallere vermekte ve böylece oksidasyon sürecinde büyüme zincirini kırmaktadır.^[37] Ayrıca, izogenol de antioksidan ve antiinflamauar özelliklere sahiptir. 3-(1-(4-Hidroksi-3-metoksifenil) propil) benzen-1,2-diol ve 4-(1-(4-hidroksi-3-metoksifenil) propil) benzen-1,2-diolfenolik türevler olup, bunlar Fındık ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir.^[9] Bu türevlerin, demir iyonu azaltıcı, lipid peroksidasyonunu önleyici ve serbest oksijen radikallerini temizleyici etkileri gösterilmiştir.^[9] Bu bileşiklerin antioksidan etkileri, standart antioksidanlar olan butilize hidroksiyanizol (BHA), butilize hidroksitoluen (BHT) ve troloks gibi pozitif kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Çalışmaların sonuçları, sentez edilen bu türevlerin standart antioksidanlardan (BHT, BHA ve troloks) daha iyi sonuçlar alındığını göstermiştir.^[9] Çalışmamızda da yeni antioksidan verilmesinin testiküler fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiştir.

Antioksidan ajanlar arasında, testiküler torsiyon sonrası testis dokularındaki hasarı azaltmada en güçlü olanın melatonin olduğu bilinmektedir. Melatonin, çok iyi bilindiği üzere,

sirkadian ritim ile pineal bezden salınmaktadır.^[37] Melatonin, antioksidan etkilerini ya doğrudan ROS'u temizleyerek ya da indirekt olarak SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimleri uyarak yapmaktadır. Bundan başka, proksidatif enzim olan nitrik oksit sentaz sentezini inhibe edebilmektedir.^[38] Melatoninin iskemi reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonu üzerine olan koruyucu etkileri pek çok dokuda gösterilmiştir.^[37,38] Yine çalışmalarda, testis torsiyonu dahil olmak üzere farklı durumlarda melatonin verilmesinin oksidatif hasarı düzelttiği gösterilmiştir. Testiküler iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan ratlardaki bir çalışmada, melatonin verilmesinin testisteki hasarı azalttığı, morfolojik yapıları düzelttiği ve antioksidan enzim seviyelerini düzenlediği gösterilmiştir.^[38] Benzer şekilde bizim çalışmamızda da, melatonin verilmesinin oksidatif stresi anlamlı olarak düzelttiği gösterilmiştir. Bundan başka, yeni sentez edilen antioksidan ajan verilmesinin de kontrol grubuna kıyasla testiküler torsiyona bağlı hasarı azalttığı; melatonin ve yeni sentez edilen antioksidan ajanın, tek taraflı testis torsiyonu oluşturulan ratlarda doku düzeyinde hasarı azalttığı ve biyokimyasal değişiklikleri düzelterek koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir.

SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre, yeni sentez edilen antioksidan ajanın melatonin gibi güçlü bir antioksidana alternatif olarak testis torsiyonuna bağlı oluşan iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu olarak kullanılabileceğini belirtebiliriz.

Hakem Değerlendirmesi

Dış bağımsız

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmişlerdir.

Peer-review

Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

KAYNAKLAR

1. Parlaktas BS, Atilgan D, Gençten Y, Akbas A, Markoc F, Erdemir F, Ozyurt H, Uluocak N. The effects of carvedilol on ischemia-reperfusion injury in the rat testis. *Int Braz J Urol* 2014;40:109–17. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.01.16
2. Unsal A, Devrim E, Guven C, Eroglu M, Durak I, Bozoklu A, Balbay MD. Propofol attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion. *World J Urol* 2004;22:461–5. doi: 10.1007/s00345-004-0451-7
3. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 2004;25:5–18.
4. Aktan G, Doğru-Abbasoğlu S, Küçükgergin C, Kadioğlu A, Ozdemirler-Erata G, Koçak-Toker N. Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk? *Fertil Steril* 2013;99:1211–5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.045

5. Morielli T, O'Flaherty C. Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in humanspermatozoa. *Reproduction* 2015;149:113–23. doi: 10.1530/REP-14-0240
6. Dilber Y, Inan S, Ercan GA, Sencan A. The role of CAPE in PI3K/AKT/mTOR activation and oxidative stress on testis torsion. *Acta Histochem* 2016;118(1):31–7.
7. Jeong SJ, Choi WS, Chung JS, Baek M, Hong SK, Choi H. Preventive effects of cyclosporine a combined with prednisolone and melatonin on contralateral testicular damage after ipsilateral torsion-detorsion in pubertal and adult rats. *J Urol* 2010;184:790–6. doi: 10.1016/j.juro.2010.03.109
8. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Beneficial effect of taurine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Urology* 2007;70:1237–42. doi: 10.1016/j.urology.2007.09.030
9. Findik E, Ceylan M, Elmastaş M. Isoeugenol-based novel potent antioxidants: synthesis and reactivity. *Eur J Med Chem* 2011;46:4618–24. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.07.041
10. Sun Y, Oberley LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497–500.
11. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In: Packer L, Glazer AN, editors. *Methods in Enzymology*, Vol 186. Oxygen Radicals in Biological Systems. New York: Academic Press; 1990. p.407–21.
12. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158–69.
13. Gielchinsky I, Suraqui E, Hidas G, Zuaite M, Landau EH, Simon A, Duvdevani M, Gofrit ON, Pode D, Rosenberg S. Pregnancy Rates after Testicular Torsion. *J Urol* 2016;196(3):852–5.
14. Guan W, Wang Z, Liu Y, Han Y, Ren H, Eric Wang W, Yang J, Zhou L, Zeng C. Protective effects of tirofiban on ischemia/reperfusion-induced renal injury in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol* 2015;761:144–52. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.009
15. Tsounapi P, Saito M, Dimitriadis F, Shimizu S, Kinoshita Y, Shomori K, Satoh I, Satoh K. Protective effect of sivelestat, a neutrophil elastase inhibitor, on ipsilateral and contralateral testes after unilateral testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. *BJU Int* 2011;107(2):329–36. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09481.x
16. Dokmeci D, Inan M, Basaran UN, Yalcin O, Aydogdu N, et al. Protective effect of L-carnitine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Cell Biochem Funct* 2006;25:611–8. doi: 10.1002/cbf.1355
17. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 2008;1:15–24.
18. Pham-Huy L, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 2008;4:89–96.
19. Du Plessis SS, Agarwal A, Halabi J, Tvrdá E. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:509–20. doi: 10.1007/s10815-014-0425-7
20. Ichikawa T, Oeda T, Ohmori H, Schill WB. Reactive oxygen species influence the acrosome reaction but not acrosin activity in human spermatozoa. *Int J Androl* 1999;22:37–42.
21. Tang D, Kang R, Zeh HJ III, Lotze MT. High-Mobility Group Box 1, Oxidative Stress, and Disease. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:1315–35. doi: 10.1089/ars.2010.3356
22. Datta S, Kundu S, Ghosh P, De S, Ghosh A, Chatterjee M. Correlation of oxidant status with oxidative tissue damage in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2014;33:1557–64. doi: 10.1007/s10067-014-2597-z
23. Glasauer A, Chandel NS. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2014;92:90–101. doi: 10.1016/j.bcp.2014.07.017
24. Udupa AS, Nahar PS, Shah SH, Kshirsagar MJ, Ghongane BB. Study of comparative effects of antioxidants on insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Diagn Res* 2012;6:1469–73. doi: 10.7860/JCDR/2012/4464.2535
25. Ware LB, Fessel JP, May AK, Roberts LJ 2nd. Plasma biomarkers of oxidant stress and development of organ failure in severe sepsis. *Shock* 2011;36:12–7. doi: 10.1097/SHK.0b013e318217025a
26. Cvetkovic T, Stankovic J, Najman S, Pavlovic D, Stokanovic D, Vljakovic 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;9:121–8.
27. Ribeiro CT, Milhomem R, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ, Pereira-Sampaio MA. Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *J Urol* 2014 May; 191(5 Suppl):1578–84.
28. Tang F, Wu X, Wang T, Wang P, Li R, Zhang H, Gao J, Chen S, Bao L, Huang H, Liu P. Tanshinone II A attenuates atherosclerotic calcification in rat model by inhibition of oxidative stress. *Vascu Pharmacol* 2007;46:427–38. doi: 10.1016/j.vph.2007.01.001
29. Soufi FG, Sheervalilou R, Vardiani M, Khalili M, Alipour MR. Chronic resveratrol administration has beneficial effects in experimental model of type 2 diabetic rats. *Endocr Regul* 2012;46:83–90.
30. MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest* 2000;117:303–17.
31. Karaguzel E, Kadihasanoglu M, Kutlu O. Mechanisms of testicular torsion and potential protective agents. *Nat Rev Urol* 2014;11:391–9. doi: 10.1038/nrurol.2014.135
32. Payabvash S, Salmasi AH, Kiamehr S, Tavangar SM, Nourbakhsh B, Faghihi SH, Dehpour AR. Salutary effects of N-acetylcysteine on apoptotic damage in a rat model of testicular torsion. *Urol Int* 2007;79:248–54. doi: 10.1159/000107958
33. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2:270–8. doi: 10.4161/oxim.2.5.9498
34. Ivanov V, Roomi MW, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Anti-atherogenic effects of a mixture of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, cysteine, and green tea phenolics in human aortic smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;49:140–5. doi: 10.1097/FJC.0b013e3180308489
35. Spilioti E, Jaakkola M, Tolonen T, Lipponen M, Virtanen V, Chinou I, Kassi E, Karabournioti S, Moutsatsou P. Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece. *PLoS One* 2014;9:e94860. doi: 10.1371/journal.pone.0094860
36. Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm Biol* 2011;49:396–402. doi: 10.3109/13880209.2010.519390
37. Kanter M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol* 2010;89:314–20. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.07.006
38. Parlaktas BS, Atilgan D, Ozyurt H, Gençten Y, Akbas A, Erdemir F, Uluocak N. The biochemical effects of ischemia-reperfusion injury in the ipsilateral and contralateral testes of rats and the protective role of melatonin. *Asian J Androl* 2014;16:314–8. doi: 10.4103/1008-682X.122202