

DENEYSEL TESTİS TORSİYONU SONRASI İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINDA İLOPROST VE DÜŞÜK DOZ METOTREKSAT'IN KORUYUCU ETKİSİ

*Protective Effect of Iloprost and Low Dose Methotrexate on Ischemia / Reperfusion
after Experimental Testis Torsion*

Ercan YUVANÇ¹, Devrim TUĞLU¹, Üçler KISA², Önder BOZDOĞAN³, Ertan BATİSLAM¹,
Erdal YILMAZ¹

¹Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji A.D., KIRIKKALE, TÜRKİYE

²Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya A.D., KIRIKKALE, TÜRKİYE

³Sağlık Bakanlığı Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, ANKARA, TÜRKİYE

ÖZ

ABSTRACT

Amaç: Testis torsiyonunda cerrahi olarak detorsiyone edilen testiste gelişen iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı üzerine Iloprost ve düşük doz Metotreksat'ın koruyucu etkilerini araştırmak.

Gereç ve Yöntem: Ratlar rastgele 4 gruba ayrıldı. Grup 1 (sham), Grup 2 = İskemi/Reperfüzyon, ilaç verilmedi. Grup 3 = İskemi/Reperfüzyon + İloprost (10 µg/kg) ve Grup 4 = İskemi/Reperfüzyon + Düşük doz Metotreksat (6 mg/kg). Torsiyon/iskemi ve detorsiyon/reperfüzyon süreleri 4'er saat olarak belirlenmiştir. Medikasyonlar intraperitoneal yolla testis torsiyonunu takiben 3. saatte verilmiştir. Her 4 grupta işlemin başlangıcından 8 saat sonra detorsiyone sağ testis çıkarılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda, iloprost ve düşük doz metotreksat verilmesinin total antioksidan kapasiteyi (TAK) istatistiksel olarak anlamlı arttırdığını, oksidan kapasite markırı olan total oksidan kapasite (TOK) ve oksidatif stres indeks oranını (OSI) ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığını belirledik. İskemi-reperfüzyon grubu testislerde testis grupları arasında Johnsen skorlama sistemine göre istatistiksel farklılık saptanmadı.

Sonuç: Bizim düşüncemize göre iloprost ve düşük doz metotreksat tedavisi, testis örneklerinde antioksidan aktiviteyi arttırmış, oksidan aktiviteyi de baskılamıştır. Ancak, histopatolojik incelemede ve spermatogenes skorlarında bir değişime neden olmamıştır.

Objective: To investigate the protective effects of iloprost and low-dose methotrexate on ischemia/reperfusion (I/R) injury in surgically detorsed testicular torsion.

Material and Methods: Rats were randomly divided into 4 groups: Group 1 (sham), Group 2: Only testicular I/R; Group 3: I/R+iloprost (10 µg/kg) and Group 4: I/R+low dose methotrexate (6 mg/kg). Torsion / ischemia and detorsion / reperfusion times were determined as 4 hours. Medications were given intraperitoneally at 3 hours following onset of testicular torsion. Detorsioned right testes were removed 8 hours after the beginning of the procedure in all 4 groups.

Results: In our study, we found that administration of iloprost and methotrexate significantly increased total antioxidant capacity (TAC) while reducing total oxidant status (TOS) and oxidative stress index (OSI) levels significantly. No statistically significant difference was found for testicles in I/R groups according to the Johnsen scoring system.

Conclusion: Administration of iloprost and low dose methotrexate treatment increased antioxidant activity in testicular samples while suppressing oxidant activity. However, there was no change in histopathological examination and spermatogenesis scores.

Anahtar Kelimeler: Testis torsiyonu, detorsiyon, antioksidan, iskemi/reperfüzyon, iloprost, düşük doz metotreksat

Keywords: Testis torsion, detorsion, antioxidant, ischemia/reperfusion, iloprost, methotrexate



Yazışma Adresi / Correspondence:
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji AnaBilim
Telefon: 0318 3335000
Geliş Tarihi / Received: 29.08.2017

Dr. Ercan YUVANÇ
Dalı, Yahşihan, 71100, KIRIKKALE, TÜRKİYE
E-posta: ercanyuvanc@gmail.com
Kabul Tarihi / Accepted: 04.12.2017

GİRİŞ

Adölesan ve çocukluk döneminde oluşan testis torsiyonu, doku hipoksisi ve nihayetinde germinal hücrelerin nekrozu ile karakterize, subfertilite veya infertiliteye neden olan ürolojik bir acildir (1,2). Testisin iyileşmesi için kan akımının erken dönemde yeniden tesis edilmesini gerektirir ve bu nedenle testis hızla detorsiyone edilmelidir. Reperfüzyon iskemik dokunun canlılığı için gerekli olsa da reperfüzyon sırasında reaktif oksijen türleri (ROS) nedeniyle reperfüzyon hasarı oluşabilir (3,4). İskemi-reperfüzyon (I/R) hasarının altında yatan temel patolojik mekanizma tam olarak bilinmemekle beraber, bu tablonun oksidatif stresle antioksidan sistem arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı düşünülmektedir (4). Bu sebeple, testiküler torsiyonda testisin reperfüzyon hasarından korunması çok önemlidir.

İloprost, esasen endotel hücreleri tarafından araşidonik asitten sentezlenen epoprostenolün sentetik bir analogudur (Prostaglandin I₂ = PGI₂, prostasiklin) (5,6). İloprost trombosit agregasyon inhibisyonu, vazodilatasyon, fibrinolizis, antienflamatuar etki, proanjiyojenik etki (vasküler endotelial büyüme faktörü aracılı) ve iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu yaparak etkinliğini gösterir (7-9).

Metotreksat (MTX), dihidrofolat redüktaz enzimini inhibisyonu ile DNA ve RNA sentezini engelleyerek folik asidi antagonize eder (10). Yüksek dozlarda çeşitli neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılmakla birlikte, düşük dozlarda güçlü bir antienflamatuar ajan olarak graft vs host hastalıkları (11), romatoid artrit (12) gibi iltihaplı hastalıklarda haftalık 0.1-0.3 mg / kg dozunda kullanılabilir. Metotreksatın antienflamatuar etkinliği esas olarak adenozinin salınması ile gerçekleşmektedir. Metotreksatın ayrıca enfarktüs boyutunu sınırladığı ve kalpteki I/R hasarına karşı güçlü bir kardiyovasküler koruma etkisi gösterdiği bildirilmiştir (13).

Çalışmamızda testis torsiyonu oluşturulan rat modelinde, iloprost ve düşük doz metotreksatın oksidatif ve antioksidatif mekanizmalara etkisini ve

testis hasarlanmasına yönelik koruyucu rollerini değerlendirmeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma 250-300 gr ağırlığında 24 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan ile yapıldı. Çalışma, Lokal Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan izni alındıktan sonra, Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi (Tarih/ No: 27.12.2013/249). Hayvanlara ilgili işlemlerde "Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals" kuralları uygulandı. Sıçanlar tel kafeslerde 12 saatlik gece-gündüz döngüsüne tabi tutuldu, standart besinler ve suyla beslendi. Hipotermiden kaçınmak için çalışma süresince ısıtıcı standart lamba ile vücut sıcaklıkları korundu. Anestezi amacıyla, kas içine 50 mg/kg ketamin (Ketalar®, Pfizer Pharma GMBH, Germany) ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorit (Alfazyne®, %2, Alfasan International, 3440 AB, Woerden, Holland) uygulandı.

Ratlar rastgele 4 gruba ayrıldı: Grup 1(Sham) = 6, Grup 2(I/R) = 6 (I/R ve medikasyon yok), Grup 3(I/R + İloprost) = 6 (I/R + 10 µg/kg İloprost) (Ilomedin 20, Schering, Almanya), Grup 4(I/R + Methotrexate) = 6 (I/R + 6 mg/kg MTX) (Methorexate, Koçak İlaç, İstanbul, Türkiye).

Grup 1 (kontrol, sham)'de, sağ testise skrotal insizyon ve diseksiyon ile ulaşıldı. Testis dışarı alınıp tekrar yerine yerleştirildi. Cilt 5/0 ipek sütür ile onarıldı. Ek işlem yapılmadı.

Grup 2 (I/R)'de ilk gruba ek olarak dışarı çıkarılan testis saat yönünde 720 ° döndürülüp skrotum cildine 5/0 ipek ile fikse edilerek deneysel ekstravaginal testis torsiyonu modeli oluşturuldu. Cilt 5/0 ipek ile onarıldı. Ek medikasyon uygulanmadı. Torsiyon süresi 4 saat olarak belirlendi, takiben detorsiyon gerçekleştirildi. Detorsiyon sonrası testis dört saatlik reperfüzyon uygulandı ve sonucunda deneklere unilateral orşiektomi uygulandı.

Grup 3 (I/R + İloprost, 10 µg/kg)'de, I/R işlemine ek olarak detorsiyondan 1 saat önce İloprost (1 ml %0.9 NaCl içinde çözünmüş 10 µg/kg) intraperitoneal (i.p.) uygulaması yapıldı. Detorsiyondan sonrası 4. saatin bitiminde unilateral orşiektomi uygulandı.

Grup 4 (I/R + MTX 6 mg/kg)'de, I/R işlemine ek olarak detorsiyondan 1 saat önce düşük doz MTX (1 ml %0.9 NaCl içinde çözünmüş 6 mg/kg) i.p. uygulandı. Dördüncü saat sonunda unilateral orşiektomi uygulandı.

Deney prosedürünün başlangıcından 8 saat sonra, tüm grupta da testisler histopatolojik ve spermatogenetik değerlendirme için alınırken biyokimyasal testler için kan örnekleri kardiyak yolla elde edildi.

Biyokimyasal Değerlendirme

Total Antioksidan Kapasite

Total antioksidan durum ölçümünde, TAK kiti kullanıldı. Yöntem de, antioksidanların, koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini, renksiz ABTS formuna indirgemesi esaslı gözetildi. TAK ölçümü, kitin uygulama yönergelerine uygun olarak, spektrofotometre (Shimadzu UV 1700A) 25 °C'ye ayarlanarak, 500 mL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 30 mL serum karıştırılıp 660 nm'de absorbansı ölçüldü. Karışıma 75 mL reaktif 2 (renkli ABTS solüsyonu) eklenerek 10 dk inkübasyondan sonra tekrar 660 nm'de absorbans ölçüldü. Standartlar, serum yerine 0 (standart 1) ve 1 (standart 2) milimolar Trolox ekivalan/litre (mmol Trolox Eq/L) konsantrasyondaki kitin standart çözeltileri kullanılarak çalışıldı. İkinci ve ilk ölçümler arasındaki farktan absorbans değişimi (ΔAbs) hesaplandı. Serumlardaki TAK düzeyleri (mmol Trolox Eq/L) kitle belirtilen aşağıdaki formülle hesaplandı. $TAK = \frac{(\Delta Abs \text{ standart 1}) - (\Delta Abs \text{ numune})}{[(\Delta Abs \text{ standart 1}) - (\Delta Abs \text{ standart 2})]}$ (14).

Total Oksidan Kapasite

Total oksidan durum ölçümünde, TOK kiti kullanıldı. Yöntem de, oksidanların ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside etmesine ve oluşan ferrik iyonların asidik ortamda kromojen madde ile

renk oluşturması esaslı gözetildi. TOK ölçümü, kitin uygulama yönergelerine uygun olarak, spektrofotometre (Shimadzu UV 1700A) 25 °C'ye ayarlanarak, 500 mL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 75 mL serum karıştırılıp 530 nm'de absorbansı ölçüldü. Karışıma 25 mL reaktif 2 (pro-kromojen solüsyon) eklenerek 10 dk inkübasyondan sonra tekrar 530 nm'de absorbans ölçüldü. Kitin kalite değerlendirilmesinde kit yönergesine uygun olarak örnek yerine deiyonize su kullanılarak çalışılan reaktif körünün absorbansı 0.500'den küçüktü. Standart, serum yerine 20 mikromolar hidrojen peroksit (H₂O₂) ekivalan/litre (mmol H₂O₂ Eq/L) içeren dilue standart çözeltisi kullanıldı. İkinci ve ilk ölçümler arasındaki farktan absorbans değişimi (ΔAbs) hesaplandı. Serumlardaki TOK düzeyleri (mmol H₂O₂ Eq/L) kitle belirtilen aşağıdaki formülle hesaplandı. $TOK = \frac{(\Delta Abs \text{ serum})}{(\Delta Abs \text{ standart})} \times 20$ (15).

Oksidatif Stres İndeksi

TAK ve TOK değerlerinin yüzde oranı ile hesaplanan Oksidatif Stres İndeksi (OSI) için öncelikle TAK değerleri mmol/L 'ye çevrildi. OSI değeri Formula yöntemine göre hesaplandı. $OSI (\text{Arbitrary Unit}) = \frac{TOK (\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L})}{TAK (\text{mmol Trolox Equiv./L})}$ (15).

Histopatolojik Değerlendirme

Testis dokuları %10 nötr formalin ile sabitlendi ve parafin blokları rutin bir prosedürle elde edildi. Bu bloklardan elde edilen kesitler Hematoksilin-Eozin boyamaya tabi tutuldu. Kamera eki olan bir ışık mikroskopu (Olympus DP 71; Olympus, Tokyo, Japonya) değerlendirme için kullanıldı. Seminifer tübüllerde histolojik bulgular Johnsen skorlama sistemine göre değerlendirildi. Bu sistem, olgunluk sırasına göre düzenlenen ana hücre tiplerinin yokluğuna veya varlığına göre 1 ile 10 arasındaki bir ölçekte spermatogenezinin korunmasını tanımlamaktadır. Johnsen skoru 9 veya 10 normal histolojiyi; 8 puan hipospermatogenezi; 3-7 puan olgunlaşma tutuklamasını; 2 puan germinal hücre

aplazisini ve 1 puan: tübüler fibrozu temsil etmektedir (16).

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler, SPSS istatistiksel yazılımı (Windows için SPSS, sürüm 16.0) kullanıldı. Tüm veriler, ortalama \pm standart sapma (SD) olarak sunuldu. Ölçülen parametrelerdeki dört grup arasındaki farklar nonparametrik test (Kruskal-Wallis) ile analiz edildi. Önemli değerler sergileyen gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar da Mann-Whitney U testi kullanıldı. ($p < 0.05$ anlamlı kabul edildi)

BULGULAR

Biyokimyasal Sonuçlar

Tablo 1. Biyokimyasal sonuçların değerlendirilmesi

	Grup 1 (n=6) (Sham)	Grup2 (n=6) (İ/R)	Grup 3 (n=6) (İ/R+İloprost)	Grup 4 (n = 6) (İ/R+ Düşük Doz Metotreksat)	p
TAK (nmol Trolox Equiv. per mg protein)	0.69 \pm 0.07	0.87 \pm 0.05	0.98 \pm 0.03	1.08 \pm 0.04	<0.001
TOK (nmol H2O2 Equiv. per mg protein)	18.16 \pm 0.42	28.35 \pm 2.76	14.85 \pm 0.94	12.28 \pm 1.15	<0.001
OSI (arbitrary unit)	26.31 \pm 3.26	32.58 \pm 2.79	15.24 \pm 1.71	11.37 \pm 2.32	<0.001

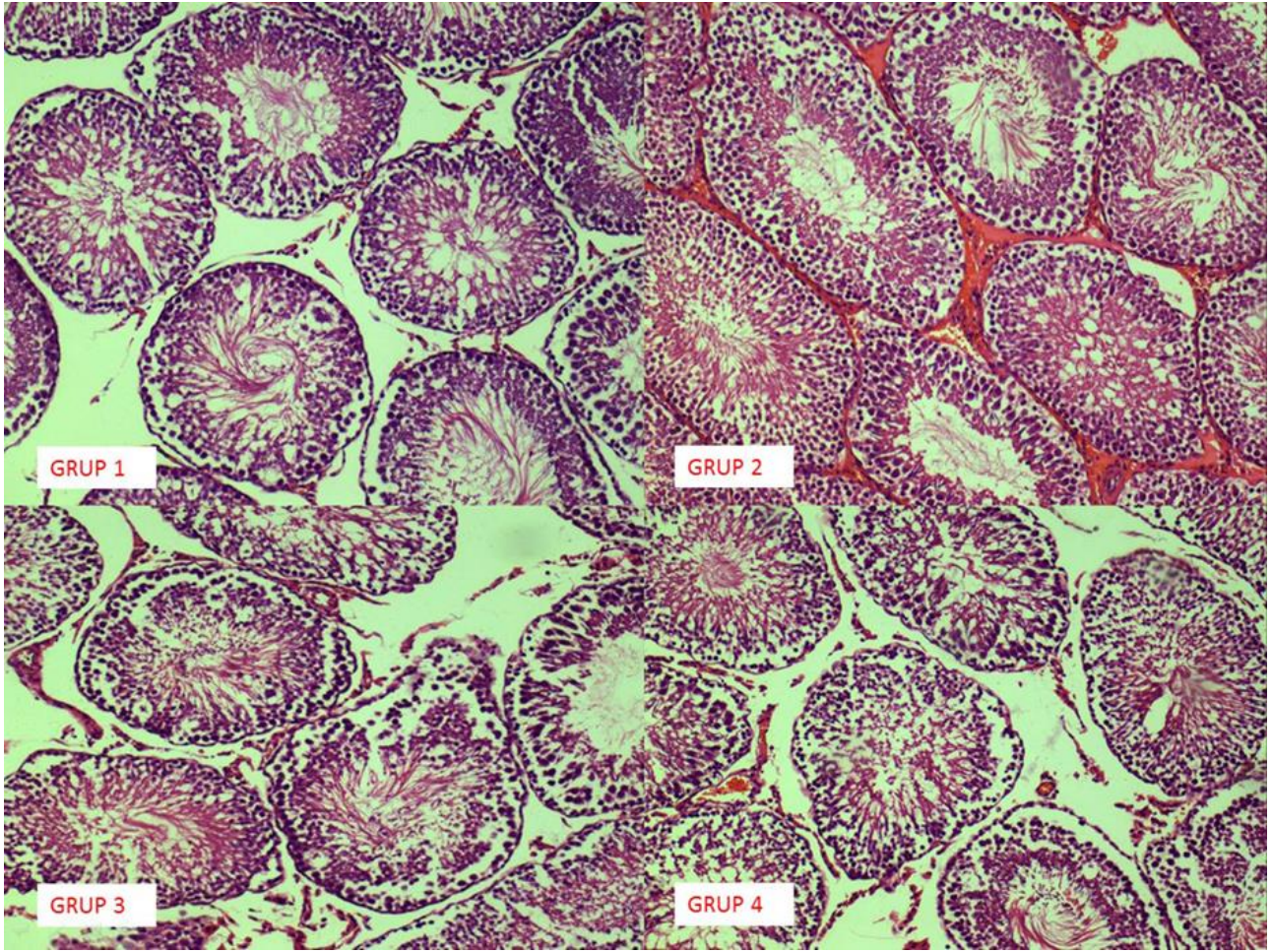
OSI: oksidatif stres indeksi; TAK: Total antioksidan kapasitesi; TOK,: Total oksidatif kapasite; I/R: İskemi/Reperfüzyon

Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

Histopatolojik değerlendirme için Johnsen testiküler biyopsi skoru; Grup 2 torsiyone testis gruplarında histopatolojik olarak dejenerasyon, deskuamasyon, germinal hücrelerde disorganizasyon, interstisyel ödem, kapiller konjesyon ve kanamanın, Grup 3 ve

Doku TAK düzeylerine incelendiğinde Grup 1 ve Grup 2'ye göre Grup 3 ve 4'de istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ($p < 0.001$); Grup 3 ve Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu değerlendirildi. ($p < 0.001$) (Tablo 1). Doku TOK değerleri incelendiğinde Grup 1 ve Grup 2'ye göre Grup 3 ve Grup 4'de oksidan düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşturduğu, yine Grup 3 ve Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu değerlendirildi ($p < 0.001$) (Tablo 1). Doku OSI parametresi incelendiğinde Grup 1'e ve Grup 2'ye göre Grup 3 ve 4'de OSI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi (Tablo 1). Ek olarak Grup 3 ve Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu değerlendirildi ($p < 0.001$) (Tablo 1).

Grup 4 aynı taraf testis gruplarında histopatolojik olarak dejenerasyon, deskuamasyon, germinal hücrelerde disorganizasyon, interstisyel ödem, kapiller konjesyon ve kanamanın azaldığı bu histopatolojik değişikliklerin istatistiksel bir anlamlılık oluşturmadığı gözlemlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Grup 1: Sham, Grup 2: I/R, Grup 3: I/R+İloprost (10), Grup 4: I/R+Düşük doz Metotreksat (6mg/kg). (X100, Hemotoxilen-Eosin Boyama)

TARTIŞMA

Testis torsiyonu sırasında germinal hücreler hipoksiye maruz kaldığında, torsiyon süresine bağlı olarak germinal hücrelerde nekroz oluşabilir. Bu subfertilite ve infertiliteye yol açabilir. (17,18). Testiküler kan akımı en kısa sürede tekrar geriye döndürülmelidir. Testiküler torsiyon iskemi hasarına ve detorsiyon işlemi ise reperfüzyon (I/R) hasarına yol açabilir. Testiküler hasarlanma ile ilgili mekanizma tamamen açık olmamasına karşın oksidatif stresin I/R yaralanmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stres, aşırı ROS üretimi ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengesizlik sonucu meydana gelir (19).

İloprost stabil bir prostasiklin analogu olarak, membran stabilizeri görevi görür ve aynı zamanda I/R hasarının potansiyel aracısı olan nötrofillerin fonksiyonunu inhibe eder. İloprost'un aynı zamanda lökosit hücresi agregasyonunu ve vasküler endotele adhezyonu, köpek ve insan nötrofillerinden süperoksit radikal üretimini ve miyokarddaki serbest radikal oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (20). Çeşitli iskemi-reperfüzyon çalışmalarında iloprostun sitoprotektif etkisiyle apoptoz üzerine faydalı etkileri olduğunu ve belirli sitokinlerin (TNF- α , IL-1 ve IL-6) seviyelerini azaltarak doku mikrodolaşımını korumada da yararlı olduğu gösterilmiştir (5,21,22). Canacankatan ve ark. iskemi reperfüzyon çalışmalarında iloprostun sitoprotektif etkisiyle apoptoz üzerinde faydalı etkileri

olduğunu göstermiştir (21). Yine başka bir çalışmada İloprostun endotoksemik farelerde intrarenal oksijenizasyonu arttırarak böbrek fonksiyonu üzerinde faydalı etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (23).

Chronstein ve ark. düşük doz MTX'nin bir inflamasyon bölgesinde hem lenfositlerin proliferasyonunu inhibe ettiğini hem de buraya ulaşan lökositlerin yıkıcı kapasitesini azaltabileceğini göstermiştir (24). Tam etki mekanizması henüz aydınlatılmamış olmasına rağmen, düşük doz MTX'in inflamasyon bölgelerinde ekstraselüler adenosin birikimine yardımcı olduğu, uyarılmış inflamatuvar hücrelerdeki reseptörler (Adenosin-2 reseptörü) ile etkileşen adenosinin salınan bazı sitokinleri inhibe ettiği (ancak makrofajlar değil), granülosit makrofaj koloni faktörü uyardığı; ayrıca monosit ve makrofajlar tarafından salınan süperoksit, nitrik oksit ve TNF- α 'yi inhibe ettiği bilinmektedir (25). Buna ek olarak, adenosin uyarılmış nötrofillerin endotele yapışması sonucu üretilen toksik oksijen metabolitlerinin inhibisyonu yoluyla sitoprotektif etkilere sahiptir (24,26).

Çalışmamızda, düşük doz MTX ve iloprost tedavisi, oksidatif stresi gösteren OSI ve TOK düzeylerini önemli ölçüde düşürürken ve testis dokusunda antioksidan kapasite gösteren TAK düzeylerini arttırmıştır. Dolayısıyla, serbest oksijen radikalleri aktivitesini azaltmanın yanında yaralanma bölgesinde nötrofil sayısının azaldığını göstermiştir. Böylece düşük doz MTX ve iloprost için anti-inflamatuvar aktivitenin yanında antioksidatif özelliğinin varlığını da desteklemektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, düşük doz MTX ve iloprostun iltihaplanmayı, lipid peroksidasyonunu ve oksidatif stresi biyokimyasal parametreler düzeyinde azaltarak normal testis torsiyonunu korumada faydalı etkilere sahip olduğunu düşündürmektedir. Oksidatif stres, proinflamatuvar sitokinlerin ve hücre adhezyon moleküllerinin sentezine yol açan mekanizmaları aktive eder. Bu nedenle, oksidatif stres, testis iskemisi reperfüzyonundan sonra endotoksemisinin indüklediği inflamatuvar cevaba katkıda bulunabilir. Grup 1 ile 2 arasındaki oksidatif

stres parametrelerinin istatistiksel olarak artışı, testis iskemisi reperfüzyonunun oksidatif stresini arttırdığını doğrulamaktadır. Bu etki, sadece direkt doku hasarına neden olmakla kalmamakta, aynı zamanda iltihaplanma ve lökosit infiltrasyonuna yol açan sitokinlerin üretimini düzenlemektedir. Dolayısıyla çalışmamızdaki bu bulgu, testis torsiyonunda sadece iskemi ortadan kaldırmanın testisin fonksiyonları açısından yeterli olmadığını aynı zamanda antioksidan tedavisinde eklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Öte yandan düşük doz MTX ve İloprost tedavisinin histopatolojik düzeyde istatistiksel bir fark oluşturmadığını tespit ettik. Bu durum tek doz antioksidan ajan ve 4 saatlik reperfüzyon süreleri ile açıklanabilir. Kimyasal ajanların farklı doz ve süreleri ile yapılacak çalışmalarda daha yüz güldürücü sonuçlar, doku düzeyinde de elde edilebilir.

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları vardı. Her grupta sıçan sayısı ve fonksiyonel, biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirme periyodları arttırılmalıdır. Doza bağımlılığın ve tedavi sürelerinin daha ayrıntılı bir incelemesi yapılmalıdır.

Sonuç olarak, histopatolojik düzeyde olmasa da biyokimyasal düzeyde düşük doz MTX'nin ve İloprost'un testisin I/R hasarında faydalı olabileceğini göstermektedir. Bu bulgulara dayanılarak yapılan daha ileri çalışmalar, testisin I/R hasarı için, gelecek vaat eden ilaçların değerlendirilmesinde yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab.* 2005; 6: 495-501.
2. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J Urol.* 1997; 157: 340-5.
3. Akgur FM, Kilinc K, Tanyel FC, Buyukpamukcu N, Hicsonmez A. Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral

- testicular torsion and detorsion. *Urology*. 1994; 44: 413-8.
4. Akgur FM, Kilinc K, Aktug T. Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urol Res*. 1993; 21: 395-9.
 5. Grant SM, Goa KL. Iloprost: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischemia, and extracorporeal circulation procedures. *Drugs*. 1992; 43: 889-924.
 6. Kisch-Wedel H, Kemming G, Meisner F, Flondor M, Bruhn S, Koehler C, et al. Effect of prostaglandin I2 analogues on left ventricular diastolic function *in vivo*. *Eur J Pharmacol*. 2005; 517: 208-16.
 7. Moncada S. Biological importance of prostacyclin. *Br J Pharmacol*. 1982; 76: 3-31.
 8. Bozkurt AK. Alpha-tocopherol (vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Surg*. 2002; 43: 693-6.
 9. Emreçan B, Tulukoglu E, Bozok S, Kestelli M, Onem G, Kupelioglu A, et al. Effects of iloprost and pentoxifylline on renal ischemia-reperfusion in rabbit model. *Eur J Med Res*. 2006; 31: 295-9.
 10. Yozai K, Shikata K, Sasaki M, Tone A, Ohga S, Usui H, et al: Methotrexate prevents renal injury in experimental diabetic rats via anti-inflammatory actions. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 3326-38.
 11. Nash RA, Pineiro LA, Storb R, Deeg HJ, Fitzsimmons WE, Furlong T, et al: FK506 in combination with methotrexate for the prevention of graft-versus-host disease after marrow transplantation from matched unrelated donors. *Blood*. 1996; 88: 3634-41.
 12. Weinblatt ME, Maier AL, Fraser PA, Coblyn JS: Longterm prospective study of methotrexate in rheumatoid arthritis: Conclusion after 132 months of therapy. *J Rheumatol*. 1998; 25: 238-42.
 13. Asanuma H, Sanada S, Ogai A, Minamino T, Takashima S, Asakura M, et al. Methotrexate and MX-68, a new derivative of methotrexate, limit infarct size via adenosine-dependent mechanisms in canine hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 43(4): 574-9.
 14. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*. 2004; 37: 112-9.
 15. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005; 38: 1103-11.
 16. Johnsen SG. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results of 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970; 1: 2-25.
 17. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Protective effect of rutin on testicular ischemia–reperfusion injury. *J Pediatr Surg*. 2011; 46: 1419-24.
 18. Gezici A, Ozturk H, Buyukbayram H, Ozturk H, Okur H. Effects of gabexate mesilate on ischemia–reperfusion induced testicular injury in rats. *Pediatr Surg Int*. 2006; 22: 435-41.
 19. Akgur FM, Kılınç K, Aktuğ T. Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urol Res*. 1993; 21: 395-9.
 20. Belkin M, Wright JG, Hobson RW. Iloprost infusion decreases skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg*. 1990; 11: 77.
 21. Canacankatan N, Sucu N, Aytacoglu B, Gul OE, Gorur A, Korkmaz B, et al. Affirmative effects of iloprost on apoptosis during ischemia-reperfusion injury in kidney as a distant organ. *Renal Fail*. 2012; 34: 111-8.
 22. Della Bella S, Molteni M, Mocellin C, Fumagalli S, Bonara P, Scorza R. Novel mode of action of iloprost: *in vitro* downregulation of endothelial cell adhesion molecules. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2001; 65:7 3.
 23. Johannes T, Ince C, Klingel K, Unertl KE, Mik EG. Iloprost preserves renal oxygenation and restores kidney function in endotoxemia-related acute renal failure in therat. *Crit Care Med*. 2009; 37: 1423-32.

24. Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J Clin Invest.* 1993; 92: 2675-82.
25. Chan ES, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res.* 2002; 4: 266-73.
26. Montesinos MC, Takedachi M, Thompson LF, Wilder TF, Fernández P, Cronstein BN. The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 1440-5.