

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL TESTİS TORSİYON MODELİNDE ANNE SÜTÜ
EKSOZOMUNUN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Ünal Turan ÖZTÜRK

TRABZON - 2022

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL TESTİS TORSİYON MODELİNDE ANNE SÜTÜ
EKSOZOMUNUN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Ünal Turan ÖZTÜRK

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Hatice Sonay YALÇIN CÖMERT

TRABZON - 2022

TEŞEKKÜR

Çocuk Cerrahisi eğitimim boyunca mesleki bilgi, beceri ve her türlü konuda sonsuz bir emek ve sabırla bana yol gösteren, fikir ve önerilerinden yaralandığım, tez çalışmalarımın her aşamasında yardımcı olan Anabilim Dalı başkanımız, değerli hocam Prof. Dr. Haluk SARIHAN'a

Uzmanlık eğitimim boyunca klinik bilgi, beceri ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa İMAMOĞLU'na,

Tüm bu süreç boyunca bana hem ablalık eden hem de tecrübelerinden yararlandığım, özellikle tezimin tasarlanması ve uygulanması aşamasında yol gösterici olan değerli hocam Doç. Dr. Hatice Sonay YALÇIN CÖMERT'e,

Çocuk Cerrahi kliniğimize öğretim üyesi olarak başladığından bu yana bilgilerini, klinik ve tecrübelerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Gül ŞALCI'ya,

Tez çalışmamın değerlendirmesinde yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi Doç. Dr. Sevdegül MÜNGAN'a, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim görevlisi Prof. Dr. Ahmet ALVER'e ve Arş. Gör. Şeniz ERDEM'e, istatistik değerlendirmesinde desteğini esirgemeyen Yusuf BAYKAL'a,

Asistanlığım süresince beraber çalıştığım ve çok sevdiğim asistan, hemşire, sekreter, teknisyen ve personel arkadaşlarıma,

Hayatımın her döneminde yanımda olan, bu günlere gelmemde büyük emek gösteren en kıymetlilerim annem Nuran ÖZTÜRK ve babam Münir ÖZTÜRK'e, sevgi ve destekleriyle bana her daim güç veren canım kardeşlerim Anıl ve Cansu'ya çok teşekkür ederim.

Dr. Ünal Turan ÖZTÜRK

Trabzon, 2022

ÖZET

DENEYSEL TESTİS TORSİYON MODELİNDE ANNE SÜTÜ EKSOZOMUNUN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Çalışmamızda, testis torsiyonunun tedavisinde anne sütü eksozomunun etkinliğinin incelenmesi ve gelecekte yapılacak çalışmalar için anne sütü eksozomunun önemini ortaya koymak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 8 er adet ağırlıkları 250-350 gr arasında değişen Sprague Dawley cinsi erkek ratlarla 3 grup şeklinde çalışma yapıldı. Grup 1'deki ratlara skrotal insizyon yapıp başka bir işlem yapılmaksızın kapatıldı. Grup 2'deki ratlara skrotal insizyon yapıldıktan sonra sol testis saatin aksi yönünde 720 derece döndürülüp karın ön duvarına 3/0 ipek dikişle tespit edildi; bu işlemden 4 saat sonra tekrar insizyon yapıldıktan sonra detorsiyon yapıldı. Grup 3'deki ratlara skrotal insizyon yapıp sonra sol testis saatin aksi yönünde 720 derece döndürülüp karın ön duvarına 3/0 ipek dikişle tespit edildi; bu işlemden 4 saat sonra yapılacak detorsiyondan 30dk önce sol testise intraperitoneal (ip) 1cc eksozom yapıp 2 saat daha beklendi. İlk ameliyattan 6 saat sonra tüm ratlara skrotal insizyon yapıp sol testisleri çıkarılıp biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için ikiye bölünüp uygun şartlarda laboratuvara gönderildi. Tüm deneklere kansızlaştırma yöntemi ile ötenazi uygulandı. Testis torsiyonunda reperfüzyon hasarının önlenmesinde eksozomun etkisi biyokimyasal olarak, doku malondialdehit (MDA), superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) düzeylerine bakıldı. Ayrıca histopatolojik etkisini göstermek için Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması (JTBS) ile değerlendirildi.

Bulgular: Grup 3 MDA değerlerinde Grup 2'ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir ($p<0.05$). Grup 3 ile Grup 2 SOD ve CAT değerleri karşılaştırıldığında, bu değerlerin Grup 3' te yüksek olduğu görüldü. Ancak bu değerlerin istatistiksel olarak incelenmesinde SOD değeri anlamlı çıkarken CAT değerinde anlamlı bir farklılık gösterilemedi ($p=0.012$ ve $p=0.071$). Histopatolojik incelemede ise Grup 3' te meydana gelen iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarında Grup 1 ve Grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Eksozom uygulamasının testis dokusundaki hasarı torsiyon grubuna göre histopatolojik açıdan anlamlı derecede azalttığı ancak kontrol grubuna yakın değerlere ulaşmadığı görüldü.

Sonuç: Testis torsiyonunda detorsiyonundan yarım saat önce verilen düşük doz eksozomun, reperfüzyon hasarını tam önlemediği ama anlamlı derecede testis dokusunu koruduğunu gösterdik.

Anahtar Kelimeler: Testis torsiyonu, iskemi/reperfüzyon hasarı, anne sütü eksozomu.

SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF MOTHER MILK EXOSOME IN EXPERIMENTAL TESTICULAR TORSION-DETORSION INJURY MODEL

Aim: In our study, it was aimed to examine the effectiveness of breast milk exosome in the treatment of testicular torsion and to reveal the importance of breast milk exosome for future studies.

Materials and Methods: In our study, 8 Sprague dawley male rats, each weighing between 250-350 gr, were studied in 3 groups. A scrotal incision was made in the rats in Group 1 and closed without any other procedure. After the scrotal incision was made in the rats in Group 2, the left testis was rotated 720 degrees counterclockwise and fixed to the anterior abdominal wall with 3/0 silk sutures; Detorsion was performed after the incision was made again 4 hours after this procedure. A scrotal incision was made in the rats in group 3, and then the left testis was rotated 720 degrees counterclockwise and fixed to the anterior abdominal wall with 3/0 silk sutures; 30 minutes before the detorsion to be made 4 hours after this procedure, 1cc exosome was applied to the left testis and waited for another 2 hours. Six hours after the first operation, scrotal incision was made in all rats, their left testicles were removed, and they were divided into two for biochemical and histopathological examination and sent to the laboratory under appropriate conditions. All subjects were euthanized by anemia method. The effect of exosome on the prevention of reperfusion injury in testicular torsion was evaluated biochemically, tissue MDA, SOD, CAT levels. It was also evaluated with JTBS to show its histopathological effect.

Results: It was shown that there was a statistically significant decrease in Group 3 MDA values compared to Group 2 ($p < 0.05$). When Group 3 and Group 2 SOD and CAT values were compared, it was seen that these values were higher in Group 3. However, in the statistical analysis of these values, while the SOD value was significant, no significant difference could be found in the CAT value ($p = 0.012$ and $p = 0.071$). In the histopathological examination, there was a statistically significant difference in ischemia/reperfusion (I/R) injury in Group 3 compared to Group 1 and Group 2 ($p < 0.05$). It was observed that exosome application reduced the damage in testicular tissue histopathologically significantly compared to the torsion group, but it could not reach values close to the control group.

Conclusion: We have shown that low dose exosome given half an hour before detorsion in testicular torsion does not completely prevent reperfusion injury, but significantly preserves testicular tissue.

Key Words: Testicular torsion, ischemia/reperfusion injury, breast milk exosome.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET.....	II
SUMMARY	III
İÇİNDEKİLER	IV
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Embriyolojisi	3
2.2. Testis Anatomisi	3
2.3. Testis Histolojisi	5
2.4. Testis Fizyolojisi.....	5
2.4.1. Spermatogenez	6
2.4.2. Testosteron ve Diğer Erkek Cinsiyet Hormonları	6
2.5. Testis Torsiyonu Epidemiyoloji ve Etiyolojisi	7
2.5.1. Ekstravajinal Testis Torsiyonu	8
2.5.2. İntravajinal Testis Torsiyonu	8
2.5.3. Testis Eklerinin Torsiyonu (Appendiks Testis ve Epididimis Torsiyonları)	9
2.5.4. Klinik ve Tanı	10
2.5.5. Tedavi	11
2.6. İskemi/Reperfüzyon Hasarı	12
2.6.1. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller	13
2.6.2. Antioksidan Sistemler	13
2.7. Testiste İskemi/Reperfüzyon Hasarı	14
2.7.1. Testisin İskemik Hasarlanmalarında Antioksidan Tedavi	15
2.8. Eksozom.....	15
2.8.1. Eksozomların Biyogenezi, Yapısı, Salınımı ve Hedef Hücreye Alımı	16
2.8.2. Eksozomların Fizyolojik Görevleri	17
2.8.3. Eksozomların Tanı ve Tedavideki Önemi	18

3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Deney Hazırlığı ve Yapılışı	20
3.2. Anne Sütü Eksozomunun Üretimi	21
3.2.1. Anne Sütünün Toplanması ve Eksozom İzolasyonu	21
3.2.2. Anne Sütü Eksozomunun İmmüno blot Yöntemiyle Doğrulanması	22
3.2.2.1. SDS-PAGE Aşaması	23
3.2.2.2. Western Blot	25
3.2.2.3. Membranın Bloklanması ve Proteinin İmmünokimya ile Görüntülenmesi	26
3.3. Biyokimyasal İnceleme	27
3.3.1. Testis Dokusunda MDA Düzeyinin Ölçülmesi	28
3.3.2. Testis Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini	29
3.3.3. Testis Dokusunda Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	31
3.3.4. Protein Miktar Tayini	32
3.4. Histopatolojik inceleme	33
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	34
4. BULGULAR	35
4.1. Anne Sütünden Elde Edilen Eksozomların Doğrulanması	35
4.2. Testis Hasarının Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi	35
4.3. Testis Hasarının Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi	37
4.3.1. Testisteki Histopatolojik Hasarın İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	39
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ	46
7. KAYNAKLAR	47

KISALTMALAR DİZİNİ

İ/R	: İskemi/reperfüzyon
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
MIF	: Mülleryan inhibe edici faktör
IGF-3	: İnsülin benzeri büyüme faktör-3
MR	: Manyetik rezonans
NO⁻	: Nitrik oksit
O₂⁻	: Süperoksit anyonları
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
OH⁻	: Hidroksil radikali
ATP	: Adenozin Trifosfat
Na⁺/K⁺	: Sodyum-Potasyum
CO₂	: Karbondioksit
H₂CO₃	: Karbonik asit
MDA	: Malondialdehit
SOD	: Superoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
PDE	: Fosfodiesteraz
TBA	: Tiyoarbiturik asit
NBT	: Nitroblue tetrazolium
JTBS	: Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması
GSH	: Glutasyon
miRNA	: Mikro RNA
Mrna	: Mesajcı RNA

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Torsiyone Testis ve Dönmüş Spermatik Kord (41).	7
Şekil 2. a. Normal Testis Anatomisi b. Tunika Vajinalisin Testise Anormal Fiksasyonu İle Birlikte Çan Tokmağı Deformitesi c. Torsiyone Testis (41).....	9
Şekil 3. Eksozomların Oluşumu ve Hücreden Salınımı (117).	16
Şekil 4. Eksozomların Hedef Hücreye Alınım Yolları (125).	17
Şekil 5. Anne Sütü Eksozomlarında Protein Miktarını Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği	22
Şekil 6. Doku MDA Seviyesi Ölçümü İçin Standart Grafiği	29
Şekil 7. SOD ve CAT Seviyesini Belirlemek İçin Yapılan Protein Miktarını Hesaplamada Kullanılan Standart Grafiği.....	32
Şekil 8. MDA Seviyesini Belirlemek İçin Yapılan Protein Miktarını Hesaplamada Kullanılan Standart Grafiği.....	33
Şekil 9. Anne Sütü Eksozomlarının Western Blot ile Doğrulanması.....	35
Şekil 10. Kontrol Grubuna Ait Testisteki Sertoli hücresi, Spermatogonia (↑) ve Spermatosit (▲)	37
Şekil 11. Torsiyon/Detorsiyon Grubuna Ait İnterstisyel Alanda Yaygın Taze Kanama ve Seminifer Tübül Lümenlerinde Eksfoliyasyon Nekrotik Hücreler, Sol Testis Tübül Lümeninde Az Sayıda Hayalet Germinal Eitel Hücreleri İzlendi (▲). (H&Ex100)	38
Şekil 12. Grup 3'e ait Testisteki Spermatid (↑) ve Spermatozoonlar (▲)	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Torsiyone Testis ve Dönmüş Spermatik Kord (41).	7
Şekil 2. a. Normal Testis Anatomisi b. Tunika Vajinalisin Testise Anormal Fiksasyonu İle Birlikte Çan Tokmağı Deformitesi c. Torsiyone Testis (41).....	9
Şekil 3. Eksozomların Oluşumu ve Hücreden Salınımı (117).	16
Şekil 4. Eksozomların Hedef Hücreye Alınım Yolları (125).	17
Şekil 5. Anne Sütü Eksozomlarında Protein Miktarını Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği	22
Şekil 6. Doku MDA Seviyesi Ölçümü İçin Standart Grafiği	29
Şekil 7. SOD ve CAT Seviyesini Belirlemek İçin Yapılan Protein Miktarını Hesaplamada Kullanılan Standart Grafiği.....	32
Şekil 8. MDA Seviyesini Belirlemek İçin Yapılan Protein Miktarını Hesaplamada Kullanılan Standart Grafiği.....	33
Şekil 9. Anne Sütü Eksozomlarının Western Blot ile Doğrulanması.....	35
Şekil 10. Kontrol Grubuna Ait Testisteki Sertoli hücresi, Spermatogonia (↑) ve Spermatosit (▲)	37
Şekil 11. Torsiyon/Detorsiyon Grubuna Ait İnterstisyel Alanda Yaygın Taze Kanama ve Seminifer Tübül Lümenlerinde Eksfoliyeye Nekrotik Hücreler, Sol Testis Tübül Lümeninde Az Sayıda Hayalet Germinal Epitel Hücreleri İzlendi (▲). (H&Ex100)	38
Şekil 12. Grup 3'e ait Testisteki Spermatid (↑) ve Spermatozoonlar (▲)	39

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Testis torsiyonu; yenidoğanlar, çocuklar ve adölesanlarda spermatik kordun vertikal ekseninde dönmesine bağlı olarak testis ve etrafındaki yapılara giden kan akımının kesilmesine neden olan acil bir durumdur(1). İnfertilite ve subfertiliteyi önlemek için erken tanı ve cerrahi müdahale gerekir(2). 25 yaş altı erkeklerde görülme sıklığı 1/4000'dir (3). Hastaların yaklaşık %61'i 21 yaş altında olup bimodal yaş dağılımı mevcuttur. Yenidoğan peryodunda ve 13 yaş civarında olmak üzere iki ayrı dönemde pik yapar(4).

Testis torsiyonu tanısı ilk 4-6 saat içerisinde konulmalıdır. Özellikle komplet spermatik kord torsiyonu varsa, yani 720 derecelik dönme mevcutsa testiste geri dönüşü olmayan iskemik hasara ve gonad kaybına neden olur(5). Başarılı bir cerrahi müdahaleye rağmen testiküler atrofi ve sonraki yıllarda hastaların %40-60'ında infertilite gelişebilir(6).

Testis torsiyonunda venöz dönüşün bozulmasına bağlı olarak ödem ve hemoraji meydana gelmesi sonrasında ilerleyen süreçte venöz konjesyon arteriyel dolaşımı da bozarak arteriyel obstrüksiyon bulgularının da meydana gelmesine neden olur. Bu süreçte kan akımı azalması sonucu testiste hipoksi ve devamında iskemi meydana gelir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda testis dokusunda iskemiye en duyarlı hücrelerin başlıca germ hücreleri olduğu saptanmıştır(7). Testis torsiyonu sırasında oluşan iskemik hasar reaktif oksijen radikallerine (ROS) bağlı olarak oksidatif stres ve inflamasyon sonucu meydana gelmektedir. İskemik hasar döneminde testiküler hasarın primer nedeni oksijen desteğinin azalması ile ilişkilidir(8). İskemi meydana gelmiş dokuların canlılığını koruyabilmek için en kısa sürede doku reperfüzyonun sağlanması gerekmektedir. Testisin detorsiyone edilmesi sonrasında reperfüzyonun da hücresel hasara neden olduğu bu hasarın ROS üretiminde artış ve nötrofil infiltrasyonu ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. Bu süreçte meydana gelen radikaller hücre membranında bulunan lipidlerin peroksidasyonuna, proteinlerin denaturasyonuna ve DNA hasarına neden olur(9).

Son yıllarda, kapsamlı araştırma çabaları testis iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarını en aza indirmek veya hatta önlemek için etkili stratejiler ve ilaçlar bulmayı amaçlamıştır. Ancak, skrotumun ısısının azaltılmaya çalışılmasından başka, klinik

pratikte bugüne kadar başka hiçbir yöntem başarıyla uygulanmadı(10). Bu nedenle morbidite oranlarını azaltmak için yeni terapötik ajanların geliştirilmesine ve standart bir tedavi protokolüne acilen ihtiyaç duyulmaktadır.

Eksozomlar, çeşitli hücre türlerinden salgılanan ve biyoaktif bileşenler içerdği tespit edilen nano ölçekli hücre kaynaklı ekstraselüler veziküllerdir(11). Tükürük, idrar, plazma, anne sütü ve daha pek çok vücut sıvılarından elde edilebilen eksozom adındaki keseciklerin genetik malzeme aktarımı, bağışıklığı düzenleyici rolleri ve hücreler arası iletişimi sağlamaları, tedavi amaçlı kullanımlarının mümkün olduğunu göstermektedir. Eksozomlar doğaldırlar ve çok küçük olmaları sayesinde de her türlü vücut bariyerinden kolaylıkla geçebilmektedirler. Bu faydaları göz önüne alındığında eksozomların tedavi amaçlı kullanımları kaçınılmazdır(12).

Son yıllardaki çalışmalarda anne sütünde de yüksek konsantrasyonda eksozomların olduğu kanıtlanmış olup literatürde çeşitli deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Biz de bu çalışmamızda eksozomun testis torsiyonunda İ/R hasarına karşı koruyucu etkisini ve bir tedavi şekli olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasını amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Embriyolojisi

Gonadlar, gelişimin 7. haftasına kadar erkek veya dişi olarak farklılaşmamıştır (13). Fertilizasyondaki spermin kromozomal yapısına bağlı olarak (xx veya xy) gonad üzerindeki erkek veya dişi ilk farklılaşma 7. haftada gözlenir (14).

Altıncı haftada Y kromozomunun kısa kolundaki seks belirleyici bölge (SRY) geni ve SOX9, FGF9 ve DAX1 gibi diğer testis belirleyici genlerin birlikte gerçekleşen aktivasyonu sonucunda gonadın korteks dokusu gerileyerek testis veya medullar kordonları oluşturulur (15). SRY geni testisin, mezonefrik kanal tubüllerinin gonadal sırtta penetre olabilmelerini ve testislerin gelişiminde etkili olan kemotaktik ajan salgılamasını uyarır. 6. haftada testis gelişiminde temel rolü olan Sertoli hücrelerinden salgılanan mülleryan inhibe edici faktör (MIF) mülleryan (paramezonefrik) kanalların regresyonuna neden olur. İnterstisyel leydig hücreleri 8. haftada ortaya çıkar ve testosteron salgılayarak, 5-alfa redüktaz enzimi vasıtasıyla dihidrotestosterona dönüştürür. Testosteron wolfian (mezonefrik) kanalların virilizasyonundan, dihidrotestosteron ise erkek dış genital yapılarının farklılaşmasından sorumludur (13).

2.2. Testis Anatomisi

Testis skrotum içerisinde yerleşmiş, sperm üretiminden sorumlu bir çift gonaddır (16). Ortalama 15-20 ml hacminde, oval yapıda ve 4×3×2,5 cm boyutlarındadır. Genellikle sol testis sağdakine göre 1 cm daha aşağıda yer alır (17, 18). Testisin 2/3 anterolateral kısmı serbest olarak bulunurken, posterolateral yüzü epididim, bağ dokusu ve damarlarla sarılıdır. Kranioposterior kısmı mediastinum testis olarak adlandırılır ve buradan seminal taşıyıcılar çıkar. Testis dıştan içe doğru tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vaskulosa adları verilen 3 yapının oluşturduğu sert bir kapsül ile kaplıdır. Peritondan kaynaklanan tunika vaginalis, visseral ve parietal 2 tabakadan oluşur. Bu iki tabaka arasında testisin etrafını saran az miktarda seröz sıvı bulunur, bu sıvının artışı ile hidrosel meydana gelir. Ekstravaginal testis torsiyonu bu boşlukta oluşur (19).

Embriyonel kökeni nedeniyle, testisin kanlanması böbrekle yakın ilişkilidir. İnsan testiküler parankimi için kan akımı 100 mg doku için yaklaşık 9 ml/dk'dır. Testisin kanlanmasından sorumlu ana arter olan internal testiküler arter aortadan renal arterin altından anterolateral yüzeyden çıkar ve testis kan akımının yaklaşık 2/3'ünü sağlar (20, 21). Eksternal spermatik (kremasterik) arter, arteria iliaca eksternanın dalı olan arteria epigastrika inferior'dan internal inguinal ring içinde ayrılır. Esas olarak tunika vajinalisi kanlandıran bu arter, aynı zamanda testis kan akımının da yaklaşık %15-20'sini sağlar. Deferensiyel (vazal) arter, arteria iliaca interna'nın uç dalları olan arteria vezikalıs superior veya inferiordan çıkarak, testis kan akımının 1/6'sını sağlar. Vaz deferens ve epididimisin globus minor'unu besler. Üç arter de testiküler mediastinumda anastomoz yaparak, testisin kanlanmasını sağlar. Testiküler arter, testise posteriordan girer. Tunika albuginea'yı geçer ve anteriorda testis parankimi üzerinde dallanır, ardından testisin posterior ve inferior bölgelerine doğru ilerler. Testisin anterior ve inferior bölgeleri, medial ve lateral bölgelerine kıyasla daha iyi kanlanır (18, 19, 22).

Testiküler venöz drenaj; internal spermatik (testiküler) ven, eksternal spermatik (kremasterik) ven, deferensiyel (vazal) ven ve gubernakuler ven ile sağlanır (19, 23). İnternal spermatik ven, internal spermatik arterle birlikte seyrederek; solda renal vene dik bir şekilde, sağda ise vena cava inferiora oblik olarak açılır (24). Sol testisin daha konumlanması nedeniyle, sol internal spermatik ven sağdakinden 8-10 cm daha uzundur. Eksternal spermatik ven, spermatik kordun posteriorunda uzanır ve eksternal inguinal ring bölgesinde yüzeysel ve derin inferior epigastrik venlere ve eksternal iliak vene açılır. Deferensiyel ven, vas deferens'e eşlik eder ve süperior-inferior vezikal venler aracılığıyla internal iliak ven'e dökülür. Gubernakular ven, eksternal iliak vene drene olur (24, 25). Testis ve epididimden kaynaklanan venler, mediastinumdan çıkar ve duktus deferens' in önü ve testiküler arter çevresinde 8-12 venden oluşarak anastomoz yaparak pampiniform pleksusu oluşturur (26). İnguinal ring hizasında pleksus pampiniformis ile skrotum ve epididimin venöz dönüşünü sağlayan kremasterik pleksus ve vazal ven sistemi, anastomoz oluşturur. Pleksuslar yukarıda ise gonadal veni meydana getirir. Böylelikle testiküler venin ligasyonu sonrasında deferansiyel ve kremasterik venöz yapılar ile kollateral dolaşım ağı oluşur (19, 27).

Testisin innervasyonundan T5-T12 seviyesinden çıkan torasik ve splanknik sinirler sorumludur. Bununla birlikte, genitofemoral sinirin genital dalı (L1-L2) ve iliolumbal sinir (L1) inguinal kanala girerek innervasyonda görev alır. Genitofemoral sinirin genital dalı (L1-L2), kremasterik kasın innervasyonunu sağlarken; iliolumbal sinir (L1), penis kökünün derisinin, skrotum'un üst kısmının ve uyluğun üst medial bölümünün innervasyonundan sorumludur (26, 28).

2.3. Testis Histolojisi

Testisler; embriyonik gelişimi düzenleyen, seksüel olgunlaşmayı ve üreme fonksiyonları üzerinde etkileri olan ekzokrin ve endokrin fonksiyonlara sahip bir çift organdır. Skrotumda yer alır ve dıştan içe doğru tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza olarak adlandırılan üç tabakalı bir kapsül ile çevrilidir (29). Kapsülün en kalın ve belirgin tabakası olan, yoğun bir fibroelastik bağ dokusundan meydana gelen tunika albuginea, posterioda kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Mediastinden tunika albugineaya doğru radyal olarak uzanan testiküler septa organı piramidal lobüllere ayırır. Testis lobülleri, son derece kıvrımlı kan damarı, sinir ve intersitisyel hücrelerden meydana gelen seminifer tübülleri oluşturur (29–31). Seminifer tübüller mediastinumda epitelle döşeli olan rete testis ile birleşir; rete testis ise sırasıyla duktuli efferentes ve epididim ile devam eder (30, 32). Histolojik olarak seminifer tübüller üç bileşenden oluşur. Bunlar; lamina propria, sertoli hücreleri ve spermatojenik hücrelerdir (31, 33). Spermatojenik hücreler sertoli hücrelerinin lateralinde bulunur. Kan-testis bariyerini bu iki hücre grubu arasındaki sıkı bağlantı kompleksi oluşturur (34).

2.4. Testis Fizyolojisi

Testisler interstisyel aralık ve seminifer tübüllerden oluşur. İnterstisyel aralık, testis hacminin %20-40'ını oluşturur ve Leydig hücrelerini içerir. Leydig hücreleri, spermatojenik hücrelerin üretimi ve olgunlaşması için gerekli olan testosteronun salınımından sorumludur (35). İnterstisyel aralık Leydig hücrelerine ek olarak, kan ve

lenf hücrelerini, sinir liflerini, fibroblastları, gevşek bağ dokusunu, makrofajları ve lenfositleri içerir.

Testis hacminin %60-80'ini oluşturan seminifer tübüller, peritübüler hücreler ve Sertoli hücrelerini içerir. Peritübüler hücreler, seminifer tübüllerin etrafında konsantrik tabakalar oluşturur ve spermatogenez için gerekli koşulları sağlar. Sertoli hücreleri, protein, sitokin, büyüme faktörleri, opioid, steroid ve prostaglandin sentezleyen ve salgılayan destek hücrelerdir. Spermatogenez koordine eder ve sıkı bağlantılar ile kan- testis bariyerini oluştururlar.

Testisler iki ana işlevden sorumludur: Spermatogenez ve testosteron ve diğer erkek cinsiyet hormonlarının salınması (36).

2.4.1. Spermatogenez

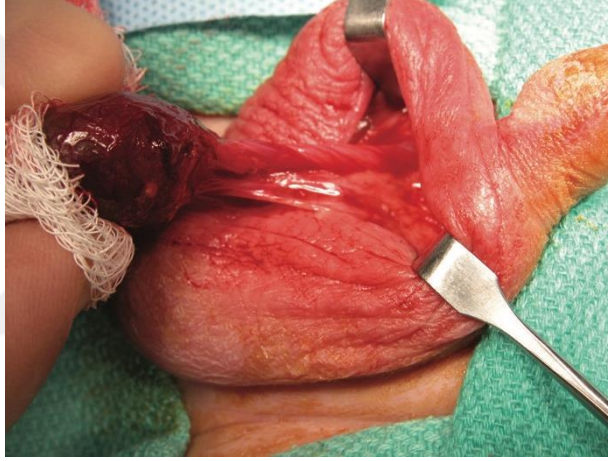
Spermatogenez, progenitör germ hücrelerinin olgun spermilere farklılaşma sürecidir. Bu süreç dört aşamadan oluşur: Diploid spermatogonia hücrelerinin mitoz bölünmesi, ikincil spermatositlerin ve spermatidlerin mayoz bölünmesi, spermatidlerin testiküler sperme dönüşmesi ve spermin olgun spermatozoa formunda seminifer tübüllerinin germinal epitelinden tübüler lümene salınması (37).

2.4.2. Testosteron ve Diğer Erkek Cinsiyet Hormonları

Testisler, testosteron, dihidrotestosteron, androstenedion gibi androjenler olarak tanımlanan pek çok seks hormonlarını salgılar. Testosteron, en önemli testis hormonu olarak kabul edilebilir fakat büyük bir kısmı hedef dokularda dihidrotestosterona dönüşür. Testosteron, interstisyel Leydig hücreleri tarafından üretilir. Androjenler, steroid yapıda bileşikler olup hem testislerde hem de adrenal bezlerde kolesterolden veya doğrudan asetil koenzim A'dan sentezlenir. Erkeklerde testosterona ek olarak az miktarda östrojen de sentezlenir. Östrojen oluşumu sertoli hücrelerinde testosteronun östradiole dönüştürülmesi sonucu gerçekleşir. Testosteron genel olarak vücuttaki belirgin erkek özelliklerinin oluşumundan sorumludur. Testisler genellikle gebeliğin son 2-3 ayında yeterli düzeyde testosteron salgılanmasıyla skrotuma iner (38).

2.5. Testis Torsiyonu Epidemiyoloji ve Etiyolojisi

Testis torsiyonu 1800'lü yıllarda Hunter tarafından tanımlanmıştır (39). Spermatik kord yapılarının vertikal ekseninde rotasyonu nedeniyle etkilenen testisin (Şekil 1) ve eklerinin kanlanması bozulmasına ve buna bağlı olarak kalıcı iskemik yaralanmaya sebep olabilen acil bir durumdur (39, 40). Testis torsiyonunun başlangıcında venöz tıkanıklık sorumludur buna bağlı olarak testiste ödem ve ağrı meydana gelir. Testisin tunikası elastik değildir ve venöz konjesyon arteriel dolaşımın bozulmasına neden olur. İlk olarak venöz tromboz, daha sonra da arteriel tromboz ve testiküler infarkt meydana gelir.



Şekil 1. Torsiyone Testis ve Dönmüş Spermatik Kord (41).

Yapılan çalışmalarda başta spermatogonia ve spermatositler olmak üzere germ hücrelerinin iskemiye karşı yüksek duyarlılığa sahip olduğu, testosteron üretiminden sorumlu Leydig hücrelerinin ise germ hücrelerine kıyasla iskemiye daha dirençli olduğu gösterilmiştir (42). Torsiyon sonucunda gelişen testiküler hasarın miktarı, torsiyonun derecesi ve süresi ile yakından ilişkilidir (42, 43). Etkilenen testisin nekrozunu önlemek için yapılan acil müdahalenin başarı oranı ilk 6 saat içinde %90-100 iken, 6-12 saat içinde %20-50'ye düşer ve 12 saatten sonra %10'dan daha azdır (41, 44). Başarılı bir cerrahiye rağmen bu hastaların %40-60'ında testiküler atrofi ve infertilite gelişmektedir (45).

Testis torsiyonunun en önemli etiyolojik faktörü çan tokmağı deformitesidir (Bell-clapper deformitesi) ve mevcut tüm testis torsiyonu vakalarının %90'ında

görülür. Torsiyonun gelişmesinde etkili olan diğer faktörlerden biri de kremasterik kas aktivitesidir. Kremasterik kas spazmı soğuk hava, travma veya spor ile tetiklenebilir. Gece ereksiyonları da kremasterik refleksi tetikleyerek uyku sırasında testis torsiyonuna neden olabilir. Ek olarak, 12-18 yaşlarında testisler spermatik kordda genişler ve dolayısıyla testis torsiyonu riski artar (46, 47). Testis torsiyonu, ekstravajinal testis torsiyonu, intravajinal testis torsiyonu ve testis eklerinin torsiyonu (appendiks testis ve epididim torsiyonu) olarak alt bölümlere ayrılabilir. İntravajinal testis torsiyonu en sık görülen tiptir (46).

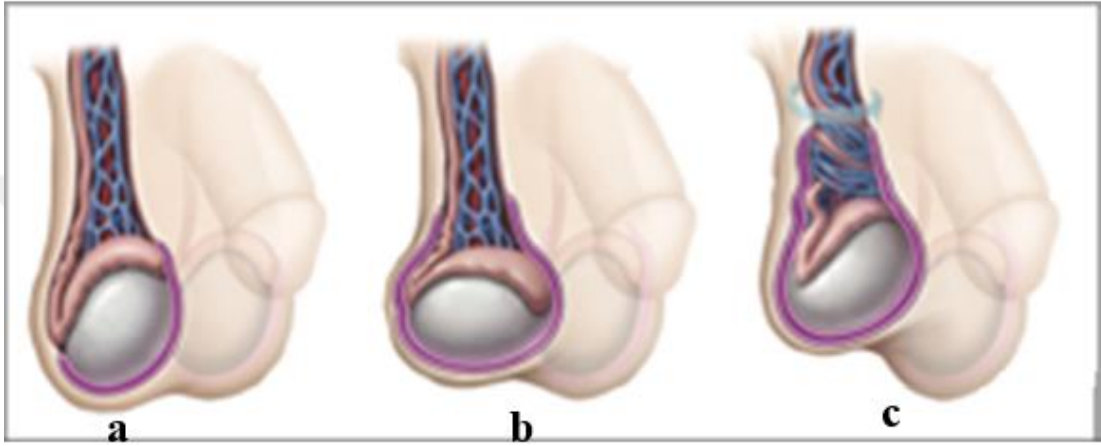
2.5.1. Ekstravajinal Testis Torsiyonu

Ekstravajinal testis torsiyonu, spermatik kord torsiyonu vakalarının yaklaşık %10'unu oluşturur ve yenidoğanlarda tipiktir (48, 49) . Testis ve epididim tunika vajinalis ile birlikte spermatik kordun üst seviyesinde torsiyone olur ve spermatik kord, tunika vajinalis üzerinde bükülür (44). Yenidoğan torsiyonu her zaman herhangi bir anatomik anormallikle ilgili olmamakla birlikte, testisin skrotuma inişi veya skrotuma yapışması sırasındaki anomaliler torsiyona neden olabilir. Testiküler atrofi veya inmemiş testis yenidoğan torsiyonuna bağlı olarak ortaya çıkabilir (50, 51). Torsiyon inguinal kanal düzeyinde olabileceği gibi daha distalde de oluşabilir. Ekstravajinal torsiyon, prenatal veya postnatal ilk bir ayda gelişir, tanı ancak doğum sonrası dönemde konabildiği için intrauterin torsiyonlarda testisin kurtarılabilmesi mümkün değildir (21). Doğum sonrası testis torsiyonu ise genelde ağrısız olur ve skrotal şişlik ile gözlenir (52).

2.5.2. İntravajinal Testis Torsiyonu

Testis torsiyonlarının yaklaşık %90'ı intravajinaldır. Anatomik yapıların intravajinal torsiyonu spermatik kordun tunika vajinalise yapıştığı yerin distal kısmında üç farklı seviyede yerleşim gösterir; vajinal spermatik kordun torsiyonu, testis ve epididim arasındaki mezorkiumun torsiyonu ve epididimin kendi içinde torsiyonu (46). Sıklıkla ergenlik döneminde görülen Bell-clapper deformitesi intravajinal torsiyondan sorumlu tutulur. Tunika vajinalis spermatik korda daha

proksimalinden tutulduğunda, Bell-clapper deformitesi (Şekil 2) ortaya çıkar ve torsiyon için temel predispozan faktör olarak kabul edilir. Bell-clapper deformitesi sıklıkla bilateral olarak izlenir ve spermatik kordun hareketlerle veya kremasterik kontraksiyonlarla rahatça dönmesine ve böylece skrotal kesede horizontal olarak konumlanmasına neden olur (53). Torsiyon genellikle tek taraflı ve mediale doğrudur. Spermatik kord sol tarafta daha uzun olduğu için sol taraf daha sık etkilenir (54).



Şekil 2. a. Normal Testis Anatomisi b. Tunika Vajinalisin Testise Anormal Fiksasyonu İle Birlikte Çan Tokmağı Deformitesi c. Torsiyone Testis (41).

Spermatik kord torsiyonunun etiyolojik faktörü tam olarak açıklanmasa da kremasterik kas aktivitesi de etkili olduğu düşünülmüştür (55). Kasın travmaya, fiziksel egzersize, ereksiyona veya ani ısı düşüşüne sekonder olarak kasılması venöz damarların ve dolayısıyla testisin tıkanmasına neden olur, daha sonra arter tıkanır ve testiste iskemi gelişir. Nötrofil sayısının artması ve oksidatif stres ise hemorajik nekroz ve hücre apoptozuna yol açar (56). Testiküler fonksiyon kaybı, torsiyonun süresi ve derecesi ile doğrudan ilişkilidir (57).

2.5.3. Testis Eklerinin Torsiyonu (Appendiks Testis ve Epididimis Torsiyonları)

Appendiks testis ve epididimislerin üstünde bulunan embriyolojik kalıntıların torsiyonudur. Sıklıkla 16 yaş sonrasındaki dönemde görülür. Aniden ortaya çıkan şiddetli ağrı nedeniyle yapılan muayenede testisin veya epididimisin üst kısmında ele

gelen kitle tanıda patognomoniktir (58). Appendiks testis torsiyonuna sahip vakaların %14 ila 22' sinde skrotum cildinde mavi-nokta bulgusu (blue-dot sign) gözlenir (59). Palpasyonda appendiks testis ödemli ve şiş iken, geri kalan testis dokusu normaldir. Tedavisinde ağrı kesici ve skrotal elevasyon önerilmektedir.

2.5.4. Klinik ve Tanı

Testis torsiyonunun tipik belirtisi, ani başlayan şiddetli ağrıdır (60). Ağrı, skrotum bölgesinden kaynaklanır ve kasık ve karnın alt çeyreğine yayılır. Skrotal şişlik, ödem ve kızarıklık da sıklıkla ağrıya eşlik eder ve bazı vakalarda bulantı ve kusma da görülebilir. Ancak yüksek ateş alışıldık bir durum değildir (16, 59).

Puberte döneminde özellikle kış aylarında ve geceleri testis torsiyonu görülme sıklığı artmıştır (61). Torsiyon genellikle sol testiste görülür. Etkilenen testis genellikle retrakte yüksek skrotal yerleşimli ve horizontal konumdadır (62). Testis henüz nekroze değilse lokal palpasyonda şiddetli ağrı vardır. Koyu ve mavimsi renkte cilt ve hemiskrotumun şiddetli olarak iltihaplanması ise nekroza işaret eder(63). Kremasterik refleksin kaybolması testis torsiyonunun tanısında oldukça belirleyicidir (60, 64). Epididimit ve orşitle ayırıcı tanısında Prehn bulgusu kullanılabilir. Testis eleve edildiğinde torsiyonda ağrının şiddetlendiği görülürken, epididimit ve orşitte ağrı azalır (64).

Anamnez ve fizik muayene elde edilen bulgular testis torsiyonuna güçlü bir şekilde işaret ediyorsa ultrasonografi ve diğer tetkiklerle zaman kaybedilmemeli, acilen cerrahi skrotal eksplorasyon yapılmalıdır. Tanıda şüphe mevcut ise görüntüleme yöntemlerine başvurulmalıdır (65). Renkli doppler ultrasonografi non-invazif olması ve testis torsiyonunun teşhisinde sintigrafiyle neredeyse eşdeğer güvenilirliğe sahip olması nedeniyle en çok tercih edilen görüntüleme yöntemidir. Renkli dopplerin en önemli özelliği skrotum duvarındaki ve testis içindeki kan akımını ayırt edebilmesidir. Kan akımının azalmış veya kaybolmuş olması testis torsiyonunu gösterir. Epididimit-orşitte ise kan akımı aksine artmıştır (16, 66). Testis torsiyonu tanısında manyetik rezonans (MR) da kullanılabilir, ancak klinik uygulamada çocuklarda anestezi gerekliliği nedeniyle tercih edilmemektedir (67). Ek olarak, akut skrotumlu hastalarda rutin olarak kan örnekleri alınır. Enfeksiyon veya doku hasarı

sırasında, yükselmiş beyaz kan hücresi sayısı (WBC), C-reaktif protein (CRP) ve eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), çeşitli serum proteinlerinin konsantrasyonlarındaki değişikliklere eşlik eder. Bu belirteçler, akut skrotumun enflamatuvar nedenlerini, enflamatuvar olmayan nedenlerinden ayırmada yardımcı olabilir (68).

2.5.5. Tedavi

Testis torsiyonu vakalarında iskemik testise kan akışının hızlı bir şekilde sağlanması kritik bir öneme sahiptir. İskemik hasar testiküler histopatolojide morfolojik değişikliklere neden olur ve spermatogenezi olumsuz etkiler(69). Semptomların başlamasından sonraki ilk 6 saat içinde cerrahi eksplorasyon yapılırsa, testisin kurtarılma oranı %90-100'dür, semptomlar 12 saatten uzun süredir mevcutsa bu oran %50'ye düşerken, semptom süresi 24 saat veya daha uzunsa %10'dan daha azdır(4, 62, 70). Testis torsiyonunun tedavisi cerrahi eksplorasyondur(71).

Eksplorasyonda testis torsiyonu tanısı doğrulandıktan sonra testis ve spermatik kord detorsiyone edilir ve testisin reperfüzyonu değerlendirilir. Testise sıcak serum fizyolojik ile gazlı bezlerle kompres yapılır. Etkilenen testisin reperfüzyonu iyiye ve testis doğal rengine döndüyse testis fiksasyonu (orşiopeksi) uygulanır(72, 73). Operasyon esnasında karşı scrotumda değerlendirilmelidir. Çünkü testis hareketliliğini arttıran 'Bell clapper' deformitesi sıklıkla bilateral görüldüğü için sonrasında da karşı testiste de torsiyon olma ihtimali yaklaşık olarak %80 olduğundan fiksasyon bilateral yapılmalıdır(70, 74-76). Eğer etkilenen testis nekrotik ise orşiektominin yanı sıra karşı testiste de torsiyon gelişimini önlemek için profilaktik olarak bilateral fiksasyon yapılır. Testisin canlılığını değerlendirmek için tunika albuginea üzerine insizyon yapılarak kanama olup olmadığına bakılabilir (72, 73).

İskeminin kan-testis bariyerinde hasara neden olduğu ve çocuk yaş grubunda kendi spermatogoniasına karşı otoimmünizasyon riski oluşturduğu bilinmektedir. Adölesan dönemde iskemik testisin fiksasyonunun erişkin dönemde spermatogenesis ile ilgili sorunlara neden olduğu saptanmıştır (77, 78). Yaş faktörü orşiektomi kararı için belirleyicidir (76). On yaşından küçük çocuklarda, spermatogenesis tam oluşmadığından ve kan-testis bariyeri olmadığından şüpheli testis eksize

edilmeyebilir. On yaşından büyük iskemik testis saptanan çocuklarda ise orşiektomi yapılması önerilir (77, 78).

2.6. İskemi/Reperfüzyon Hasarı

Testis torsiyonu sonrasında testiküler hasarın meydana gelmesinden torsiyon sırasındaki iskemi ve bunu takiben detorsiyon ile sağlanan reperfüzyon sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri sorumludur (79, 80). İskemik dokuda kan akımı, hücresel fonksiyonlarını karşılayamayacak kadar düşer (81). Oksijen yetersizliği sonucunda oksidatif fosforilasyon mekanizması bozulur ve adenozin trifosfat (ATP) gibi fosfat depolarında yetersizlik meydana gelir ve gereken enerji sağlanamaz. Hücre membranındaki ATP bağımlı sodyum-potasyum (Na^+/K^+) pompası inhibe olur, bunun sonucunda iyon dengesizliğine bağlı olarak hücre içinde izo-ozmotik su birikir ve hücreler şişer. Anaerobik glikolizin neden olduğu asidoz, karbondioksit (CO_2) birikimi sonucunda oluşan karbonik asit (H_2CO_3) ile daha da artar (82). ATP olmadığından hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) dengesi sağlanamaz. (Ca^{2+})' un artması sonucunda proteolitik enzimler, fosfolipazlar aktive olur ve sitotoksik etki gösterir. Fosfolipazların aktivasyonu ile oluşan araşidonik asit, mitokondriyal enzimleri inhibe ederek serbest radikallerin oluşumunu hızlandırır ve hücre lizise uğrar (83, 84).

İskemi sürecinde ATP hipoksantin'den ATP elde edilir. Bu indirgenme olayında ilk ATP'den adenozin monofosfat (AMP) ve adenozin meydana gelmektedir. Adenozin inozine ve hipoksantine ayrışır. İskemi sırasında hücrelerde artan Ca^{+2} , proteazları aktifleştirip hipoksantin'in ksantine oksitlenmesini sağlayan ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümüne neden olur ve dokularda aşırı hipoksantin birikir. Reperfüzyon ile dokuya giren oksijen ve ksantin oksidaz, hipoksantin ile reaksiyona girerek serbest oksijen radikallerini oluşturur (85, 86). Oluşan serbest oksijen radikallerine ve aktive edilmiş kan hücrelerine bağlı olarak "reperfüzyon hasarı" oluşur. Reaktif oksijen radikalleri, hücre membranlarında oluşturduğu lipid peroksidasyonu sonucunda protein denatürasyonuna ve nükleik asit hasarına yol açar (87, 88).

İskemi sonrasında sağlanan reperfüzyon, dokuyu daha fazla zarara uğratar. Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif fosforilasyonun mekanizmalarının zarar görmesi ile mitokondriyal oksijen radikallerinin üretimi artar. İskemi hücrenin antioksidan savunma sistemlerini de olumsuz etkilediğinden, serbest radikallerin birikimi kolaylaşır (89, 90).

2.6.1. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Fizyolojik ve patolojik reaksiyonlarda başka moleküllerle kolayca elektron alışverişine girerek onların yapısını bozan moleküllere serbest radikaller denir (91). Vücutta serbest radikaller oksidatif fosforilasyon, ürik asit metabolizması ve prostoglandin sentezi gibi biyokimyasal olaylar sonucu sürekli olarak oluşur (92). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşanlardır ve bunlara serbest oksijen radikalleri adı verilir. Bunların arasında en önemlileri ise süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir. Serbest radikaller hücrelerdeki protein, DNA, karbonhidrat, lipidler ve diğer moleküllerle reaksiyona girerek metabolizmalarını etkilerler (93). Serbest oksijen radikalleri (SOR), lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehitin (MDA) artışına neden olur (91).

Fizyolojik olarak serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünüdür. Yüksek düzeyde reaktif olan radikaller aynı zamanda potansiyel olarak zararlıdır (94). Antioksidanlar tarafından sağlanan savunma sistemi sayesinde serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve bu radikallerin oluşturduğu hasar önlenir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlarla nötralize edilme hızı arasında bir denge olması gereklidir. Reaktif oksijen radikalleri ile antioksidan defans sistemi arasında denge serbest radikaller lehine bozulursa, hücre içerisinde serbest radikaller artar. Artan serbest radikallerin hücrede ve fonksiyonları üzerinde yapmış olduğu olumsuz etkiye “oksidatif stres” adı verilir. Reaktif oksijen radikalleri, hücrelerde özellikle lipid peroksidasyonuna yol açarak membran geçirgenliğini bozup hücrenin canlılığını kaybetmesine neden olmaktadır. Oksidatif stres, hücresel antioksidan sistemi oluşturan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve melatonin tarafından giderilir (95, 96).

2.6.2. Antioksidan Sistemler

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek, bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” ya da “antioksidanlar” adı verilir (86). Antioksidanlar, hücre zarındaki lipidleri peroksidasyona karşı korur, serbest oksijen radikallerini zayıf bir moleküle çevirerek etkisiz hale getirir, metal iyonları bağlayarak radikal oluşumunun engeller, serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onarır ve hasarlı hücreleri ortamdan temizler (97). Antioksidanlar, endojen ve eksojen olmak üzere sınıflandırılabilir (98).

2.7. Testiste İskemi/Reperfüzyon Hasarı

Testis torsiyonunda venöz kan akışı azalır, ödem, hemoraji ve daha sonraki süreçte arteriyel tıkanıklık başlar ve iskemi gelişir (45). Torsiyonun neden olduğu iskemi ve detorsiyonun sonrasında oluşan reperfüzyonla birlikte açığa çıkan serbest oksijen radikalleri (SOR) testis dokusunda hasara neden olur (80, 99, 100).

Vücuttaki antioksidan sistemler ve serbest oksijen radikalleri arasındaki dengenin SOR lehine bozulmasının sonucunda ortaya çıkan oksidatif stres, spermilere zarar verir ve infertiliteye neden olabilir. Oksidatif strese bağlı ortaya çıkan hasarın derecesi; SOR miktarına, SOR maruziyet süresine ve hücre dışı faktörlere bağlıdır. Oksidatif stres; yağlar, proteinler, nükleik asitler ve şekerler gibi tüm hücrel bileşenleri hedef alır. Yağlar sperm plazma zarında doymamış yağ asitleri şeklinde bulunur ve oksidasyona en hassas moleküllerdir. SOR, lipid peroksidasyonu denilen kimyasal bir zinciri başlatır. Lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan malondialdehit, spermatozoanın peroksizomal hasarını gösteren biyokimyasal testlerde kullanılır (101). Bu testler bozuk sperm fonksiyonları, hareket bozuklukları ve sperm-oosit füzyon kapasitesi ile ilgili değerli bilgiler sunar (102).

Artmış SOR seviyelerinin, azalmış sperm motilitesi ile ilgili olduğu bilinmektedir ancak etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (103). Bir hipoteze göre, H_2O_2 hücre membranını geçer ve heksoz monofosfat şantı yolu ile glukoz-6-fosfat dehidrojenaz gibi bazı vital enzimlerin işlevini engeller (104). Diğer bir hipotez ise aksonemal proteinlerin fosforilasyonunda ve sperm hareketliliğinde azalma ile

sonuçlanan bir olay dizisine dayanır ki, her ikisi de sperm-oosit füzyonu için gerekli olan membran akışkanlığının azalmasına neden olur (105).

Germ hücrelerindeki DNA hasarı; düşük fertilizasyon, implantasyon bozuklukları, yüksek abort oranları ve gelişme gerilikleri ile ilişkilidir. SOR nokta mutasyonlar, polimorfizm gibi semen kalitesini düşüren mutasyonlara da neden olabilir (106). DNA hasarı küçük ise spermatozoa kendini tamir edebilir ayrıca oositin de hasarlı spermatozoayı tamir yeteneği mevcuttur. Ancak hasar büyük ise apoptoz ve embriyo harabiyetine neden olabilir (107). Y kromozomundaki DNA hasarı gen delesyonuna sebep olarak yeni kuşaklarda infertiliteye yol açabilir (108).

2.7.1. Testisin İskemik Hasarlanmalarında Antioksidan Tedavi

Antioksidanların görevi, oksidatif stres sonucunda ortaya çıkan serbest radikallerden dokuyu korumaktır (109). Antioksidanlar, hücre zarındaki lipidleri peroksidasyona karşı korur, serbest oksijen radikallerini zayıf bir moleküle çevirerek etkisiz hale getirir. Ayrıca metal iyonları bağlayarak radikal oluşumunu engeller, serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onarır ve hasarlı hücreleri ortamdan temizler. Seminal plazmada süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaza ilaveten askorbat, urat, vitamin E, piruvat, glutatyon, albumin, vitamin A, ubikinol ve hipotaurin gibi enzimatik olmayan antioksidanlar bulunur (97, 110).

2.8. Eksozom

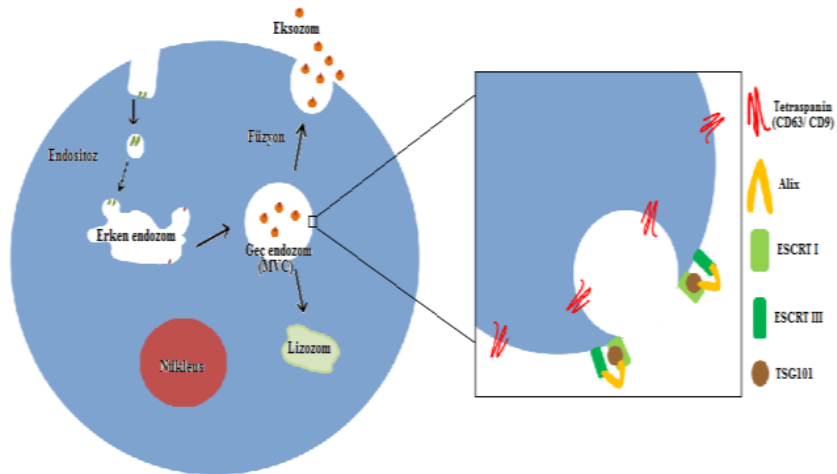
Eksozomlar bilinen tüm hücreler tarafından ortama salınır ve ekstarsellüler veziküllerin, en küçük grubudur (167). Çift lipit tabakalı bir membranla çevrili 50-100 nm çapında olan eksozomlar (endozom kökenli veziküller) aracılığıyla proteinler, DNA, mRNA, kodlamayan RNA'lar gibi moleküller bir hücreden diğerine gönderilerek genetik bilgi alışverişi ve alıcı hücrelerin yeniden programlanması sağlanır. Farklı hücre kökenine sahip eksozomlar, fosfolipid tabaka, endoplazmik retikulum, sitozol ve golgi kompleksinden kaynaklanan proteinleri, ısı şok proteinlerini, tetraspanin aile proteinlerini, hücre iskelet proteinlerini ve lipit ile ilişkili proteinleri, mRNA, miRNA ve DNA fragmanlerini barındırır (168). Kendilerine özgü

biyogenez yollarına ve lipid kompozisyonlarına sahip olmaları ve taşıdıkları kargo ve boyutları gibi özellikleri onları diğer hücre dışı keseciklerden ayırır (169).

Eksozomların immün düzenleyici özellikleri sayesinde kanser, otoyangısal ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanımları her geçen gün yaygınlaşmaktadır (173, 174). Eksozomlar aynı zamanda, lipid içinde çözünen ilaçlar ve genetik materyaller için taşıyıcı kesecik ve antijen ile adjuvanın birlikte taşınabildiği aşı taşıyıcıları olarak da kullanılır. Doğal olmaları, hücre dışı ortama salınan eksozomların serum (111), plazma (112), idrar (113), amniyotik sıvı (114), anne sütü (115) ve tükürük (115) gibi vücut sıvılarından toplanabilmeleri, çok küçük olmaları sayesinde her türlü vücut engelinden geçebilmeleri en büyük avantajlarıdır.

2.8.1. Eksozomların Biyogenezi, Yapısı, Salınımı ve Hedef Hücreye Alımı

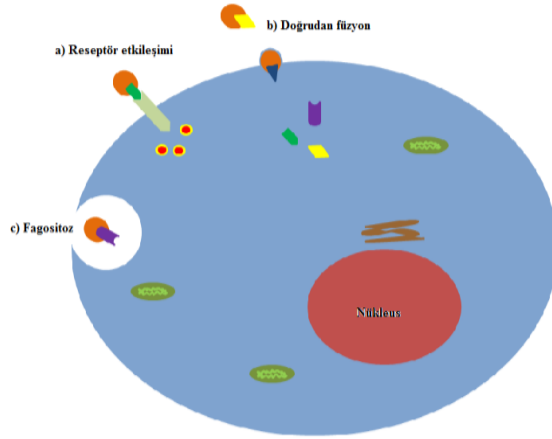
Eksozomlar, plazma membranından içe doğru tomurcuklanma ile oluşan erken endozomun farklılaşması sonucunda meydana gelir. Erken endozomlar tomurcuklanarak çok sayıda intralüminal vezikülleri (İLV) oluşturur. İLV içeren erken endozomlar, multiveziküler cisimcik (MVC) veya geç endozom olarak adlandırılır. MVC'ler, lizozomda ortadan kaldırılabilir veya plazma membranında ekzositoz ile eksozom adını alarak hücre dışına salgılanabilir (Şekil 3) (116).



Şekil 3. Eksozomların Oluşumu ve Hücreden Salınımı (117).

Eksozomlar, hedef aldığı hücreler tarafından membranlarında bulunan serin membran lipidleri, kolesterol, sfingolipid, gliserofosfolipid, sfingomyelin, seramid gibi membran lipidleri aracılığıyla tanınır. Ayrıca köken aldığı hücrenin plazma membranında bulunan özgün proteinler, tetraspaninler ve reseptörleri de üzerlerinde taşımaları sayesinde diğer hücrelerce tanınmaları ve hücre içine alınmaları kolaylaşır(118). Kanda, idrarda, ağız içi salgıda, amniyotik sıvıda, beyin-omurilik sıvısında, eklem sıvısında, nasal salgılarda, anne sütünde, serum ve plazma dahil, bütün vücut sıvılarında bulunurlar (119, 120).

Eksozom içeriğinin hücreye alınması; reseptör aracılığıyla, eksozomun hedef hücre membranı ile füzyonuyla ve fagositozla olmak üzere üç farklı şekilde gerçekleşir (Şekil 4) (121). Reseptör aracılı alımda, eksozomlar ve hedef hücreleri arasında üç aşamalı etkileşim söz konusudur. İlk olarak eksozomların transmembran proteinleri hedef hücrelerin reseptörlerine bağlanır. Ardından eksozomlar hedef hücrelerin plazma membranı ile birleşir ve içeriklerini sitoplazmaya boşaltır. Daha sonra da eksozomlar endozomlarla birleşir (122, 123). Doğrudan füzyonda, hücre zarı ve eksozom membranının doğrudan füzyonu sonucunda eksozom içeriği sitoplazmaya alınırken (124), fagositozda ise eksozom bütün olarak hücre içerisine alınır (125).



Şekil 4. Eksozomların Hedef Hücreye Alınım Yolları (125).

2.8.2. Eksozomların Fizyolojik Görevleri

Eksozomlar; hücreler arası sinyal iletimi, antiviral aktivite, mikrobiyal patogenezin düzenlenmesi, programlı hücre ölümü, anjiyogenez, immun cevabın

düzenlenmesi ve koagulasyonda rol oynar (126, 127). Semende bulunan eksozomların erkek fertilitesinde de önemli rol oynadığı bildirilmiştir (128, 129).

Eksozomlar immün yanıtlarda önemli görevler üstlenir. Yapılan çalışmalarda farklı hücre kökenli eksozomların bağışıklık hücreleri üzerinde hem baskılayıcı hem de etkinleştirici etki gösterdiği saptanmıştır (130).

2.8.3. Eksozomların Tanı ve Tedavideki Önemi

Eksozomlar köken aldıkları hücrelere göre pleiotropik etki gösterirler. Bu özellikleri nedeniyle farklı biyomedikal uygulamalarda kullanımları yaygınlaşmıştır. İmmün kararlı dengenin sağlanmasında etkili olan eksozomlar, otoimmün ve immün yetmezlik durumlarında tedavi amaçlı kullanılmaktadır ve immün hücrelerini etkiliyor olmaları aşıların geliştirilmesinin de önünü açmaktadır. Eksozomların fizyolojik görevlerine ek olarak patolojik mekanizmalarda da var olmaları, eksozom tabanlı tanı yöntemlerinin oluşmasını sağlamaktadır (131).

Eksozomlar, kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılır. Taşıdıkları kargo içeriklerinin (özellikle mRNA ve miRNA içeriği) hastalıkların tanısında avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Eksozomların ultra-santrifüj ve izolasyon kitleri ile tüm vücut sıvılarından elde edilebiliyor olması, araştırmaların yapılmasını kolaylaştırmıştır (132).

Eksozomlar, doğal lipozom oldukları için tedaviye yönelik araştırmalarda da öneme sahiptir. Nano boyutta olmaları ve membranlarındaki protein ve lipid içerikleri sayesinde kanda rahatça dolaşarak kan beyin bariyerini de geçebilirler (133).

Günümüzde yapılan çalışmalar, eksozomun oksidatif stres hasarını hafifletebileceğini göstermiştir. Sun ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada deneysel karaciğer iskemik hasarına karşı eksozom ve melatoninin birlikte kullanılmasının etkili olduğunu bildirmişlerdir (134). Zahran ve ark. (2020), sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada renal iskemi-reperfüzyon hasarını en aza indirmek için melatonin, mezenkimal kök hücreler ve bunların eksozomlarının birlikte kullanılmasını önermişlerdir (135). Lin ve ark. (2016), adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre ve eksozomun kombine olarak kullanılmasının sıçanlarda akut iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruma sağladığını bildirmişlerdir (136).

Angoulvant ve ark. (2011), kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreden eksozomlarının, miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığı bildirmiştir (137).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma KTÜ Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından planlanıp 2021/10 protokol numaralı etik kurul izni alındıktan sonra Biyokimya ve Patoloji Anabilim Dallarının katkılarıyla yapılmıştır. Çalışmada KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi tarafından sağlanan ağırlıkları 250-300 gram arasında olan 24 adet Sprague Dawley cinsi ratlar kullanıldı. Ameliyatlar KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarında yapıldı. Çalışmamız Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

3.1. Deney Hazırlığı ve Yapılışı

Araştırmada 8'er adet, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen, Sprague Dawley cinsi ratlardan oluşan 3 grup kullanıldı. Deney süresi 1 gün olarak belirlendi. Çalışma gününe kadar ratlar 22 ± 2 °C sabit oda sıcaklığı, %60 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık standart laboratuvar şartlarında kafeslerde 8'er adet ve altlarında talaş olacak şekilde barındırıldı. Ratlar ameliyat öncesinde 24 saat süreyle aç bırakıldı ve bu süre içerisinde sadece su verildi. Her grupta 8 adet rat olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Oluşturulan gruplar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Her Grupta 8 Adet Rat Olmak Üzere 3 Grup Oluşturuldu.

Grup 1	Sham grubu
Grup 2	Torsiyon-Detorsiyon grubu
Grup 3	Torsiyon yapıp Detorsiyondan 30 dk önce 1mg/kg ip eksozom verilen grup

Anestezi: Tüm cerrahi işlemlerde anestezi uygulaması intraperitoneal 10 mg/kg ksilazin hidroklorid ve 50 mg/kg ketamin verilerek yapıldı. Cerrahi Teknik: Ameliyat bölgesi traş edilip daha sonra betadin solüsyonuyla temizlendi. Ameliyatlarda skrotal orta hattan yapılan insizyon kullanıldı. Torsiyon/detorsiyon modeli; sol testis dışarı alınarak, saatin aksi yönünde 720 derece döndürüldü. Daha sonra testis tekrar detorsiyone olmasın diye tunika albugineaya 6/0 monoflaman ile sütüre edilip skrotuma tespit edildi. Skrotum 4/0 ipekle kapatılıp torsiyon işleminden

4 saat sonra testis detorsiyone edilerek beklendi. Detorsiyon işleminden 2 saat sonra sol testise orşiektomi yapıldı.

Grup 1: Anestezi sonrası skrotal orta hattın vertikal kesi yapılarak sol testis gubernakulum kesilerek dışarı alındı ve daha sonra torsiyon yapılmaksızın skrotuma anatomik pozisyonda yerleştirildi. Katlar 4/0 ipekle kapatılıp 4 saat sonra sol orşiektomi yapıldı.

Grup 2: Bu gruptaki ratlara torsiyon/detorsiyon modeli oluşturulup detorsiyondan 2 saat sonra sol testise orşiektomi yapıldı.

Grup 3: Bu gruptaki ratlara torsiyon/detorsiyon modeli oluşturulup detorsiyondan 30 dakika önce 1mg/kg ip eksozom verildi. Detorsiyondan 2 saat sonra sol orşiektomi yapıldı. Orşiektomi materyali 2 parçaya bölündü. Elde edilen testis dokusunun yarısı derhal sıvı nitrojen ile işlem edilerek donduruldu ve biyokimyasal incelemeler yapılana kadar -80 derecede saklandı. Diğer yarısı ise patolojik incelemeler için ayrıldı.

3.2. Anne Sütü Eksozomunun Üretimi

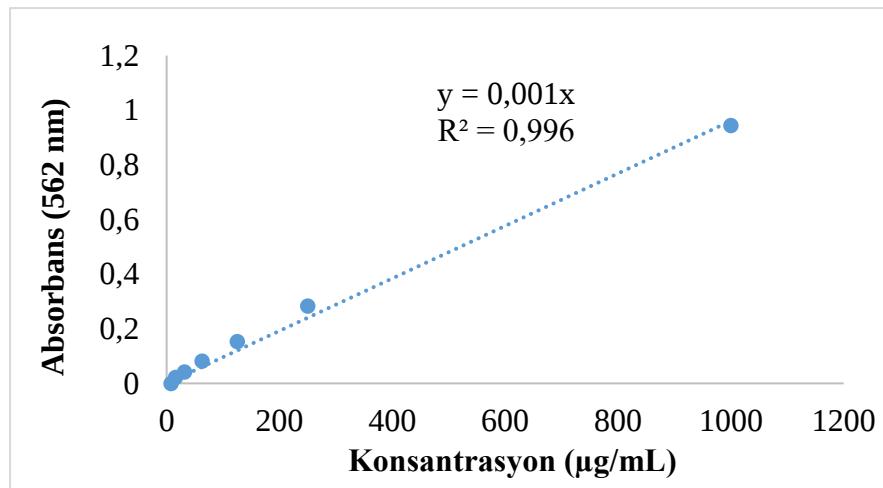
3.2.1. Anne Sütünün Toplanması ve Eksozom İzolasyonu

KTÜ Tıp Fakültesi çocuk cerrahisi polikliniğine başvuran gönüllü sağlıklı annelerden (onam formu imzalatılıp) yaklaşık 200-300 mL anne sütü alınacaktır. Alınan anne sütü örnekleri laboratuvarında analiz edilene kadar -80 °C'de saklanacaktır. Depolanan ham anne sütü örnekleri (yaklaşık 200-300 mL) buz üzerinde çözülür. Anne sütünden eksozom izolasyonu diferansiyel santrifüj ve ultrasantrifüj yöntemleriyle yapılır. Anne sütü örnekleri santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra, süt lipid tabakasını ayırmak için +4°C, 10 dakika, 3,000×g'de (F0650 rotor, Beckman Coulter Instruments, USA) santrifüj edildi. Ardından, büyük hücresel kalıntıları ve kalan lipidleri uzaklaştırmak için +4°C, 30 dakika, 5,000×g'de (F0650 rotor, Beckman Coulter Instruments, USA) santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süt süpernatanı yeni bir tüpe alınarak +4°C, 10 dakika, 12,000×g'de (F0650 rotor, Beckman Coulter Instruments, USA) daha küçük hücresel kalıntıları ve apoptotik hücreleri uzaklaştırmak için santrifüj edildi. Santrifüj edilen süt süpernatanı ham eksozom izole

etmek için JS 24.15 rotorunda (Beckman Coulter Instruments, USA) +4°C, 2 saat, 110,000×g'de ultrasantrifüj edildi. Ham eksozom pelleti fosfat tamponlu salin (PBS) (pH 7.4) içerisinde süspanse edildi ve izole edile eksozomlar hem deney aşamalarında kullanılmak üzere hem de doğrulanması için -80°C'de saklandı. Deneyde kullanılacak olan anne sütü eksozomlarının protein konsantrasyonu bikinkoninik asit (BCA) yöntemiyle 1 µg/mL olacak şekilde ayarlandı.

3.2.2. Anne Sütü Eksozomunun İmmünoblot Yöntemiyle Doğrulanması

Anne sütü eksozom proteinlerinin eldesi için proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyli (PPC1010, SIGMA) içeren RIPA lizis solüsyonu (SE3924401, SERVA) eklenerek eksozomlar 15 dk buz üzerinde bekletildi. Sonrasında 15,000xg, +4°C 15 dk santrifüj edilerek protein elde edildi ve konsantrasyonları BCA kiti (LOT: UD282967, Thermo Scientific, USA) kullanılarak analiz edildi. Bu yöntem, alkali ortamda mevcut proteinler tarafından Cu^{2+} 'nin Cu^{1+} 'e indirgenmesi esasına dayanır. Oluşan bakır katyonunun (Cu^{1+}) BCA ile reaksiyona girmesiyle kolorimetrik tayin gerçekleştirilir. Çalışmada standart olarak 2 mg/mL konsantrasyonda sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Anne sütü eksozom proteinlerinden elde edilen protein fazların konsantrasyonları sırasıyla Şekil 5'teki standart grafiğine göre µg/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 5. Anne Sütü Eksozomlarında Protein Miktarını Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği

3.2.2.1. SDS-PAGE Aşaması

Anne sütü eksozomlarından elde edilen total proteinlerle SDS-PAGE aşaması, Laemmli tarafından belirtilen yöntemle gerçekleştirildi(138).

Kullanılan Çözeltiler

Ayırma Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCl pH 8.8): 44.2 g Tris HCl 180 mL deiyonize suda çözüldü, pH 8.8'e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Yükleme Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCl pH 6.8): 22.1 g Tris HCl 90 mL deiyonize suda çözüldü, pH 6.8'e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

%10 (w/v) Sodyum Dodesil Sulfat (SDS): 2 g SDS 20 mL deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

SDS-PAGE Tank Tamponu (10 X): 30.3 g Tris HCl, 144 g glisin ve 10 g SDS (%0,1 w/v) 1 L deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında saklandı. Çalışma çözeltisi deiyonize su ile 1X olacak şekilde sulandırıldı.

%10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS): 100 mg APS 1 mL deiyonize suda çözüldü ve 4 °C'de saklandı.

SDS PAGE Numune Yükleme Tamponu (5X): 0.67 mL yükleme tamponu, 5 mL gliserol, 0.5 g SDS, 5 mg bromfenol mavisi, 0.5 mL 2-merkaptetanol, 3.8 mL deiyonize su içerisinde çözüldü ve aligotlanarak -20 °C'de saklandı.

Sabitleme Çözeltisi: %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 saf su içerecek şekilde hazırlandı (jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılır).

Renklendirme Çözeltisi: 0.66 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 120 mL metanol, 24 mL asetik asit ve 120 mL saf su ilavesi ile hazırlandı.

Renksizleştirme Çözeltisi: %7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5 saf su içerecek şekilde hazırlandı.

SDS- PAGE Jellerinin Hazırlanması

Çalışmalarda %8'lik ayırma jeli ve %15'lik yükleme jeli kullanıldı.

Tablo 2. % 5-12'lik (2x1mm) SDS Poliakrilamid Jelinin Hazırlanışı

Kimyasallar	%5'lik Yükleme Jeli (mL)	%12'lik Ayırma Jeli (mL)
ddH₂O	3,08 ml	4,34 ml
Acrylamid (%40 mix)	0,56 ml	3,00 ml
0.5 M Tris-HCl pH: 6.8	1,25 ml	-
1.5 M Tris-HCl pH: 8.8	-	2,50 ml
%10 SDS	0,05 ml	0,10 ml
%10 APS	0,05 ml	0,10 ml
TEMED	3 µl	10 µl

Camlar kontaminasyonları veya jel kalıntılarını engellemek için önce saf su ile ardından %70'lik etil alkol ile temizlendi. Temizlenen camlar peçete ile kurulandı. Uzun ve kısa camlar birleştirilerek jel hazırlama standına yerleştirildi. Bu sırada jelin alt kısımdan sızmasına dikkat edildi. Öncelikle ayırma jeli yüklenmektedir. Gereksinim duyulan ayırma jeli yüzdesine göre jellerin hazırlanması için gerekli olan kimyasallar kabin içerisine yerleştirildi. Kimyasallar yukarıda Tablo 2'de verilen sıraya ve miktarlara göre 50 mL falkonda karıştırıldı istenilen yüzdeye göre hazırlandı. SDS ve APS ekledikten sonra karışımın homojen hale gelmesi için dairesel biçimde bir hareket yapılarak karıştırıldı. Polimerleşmeyi sağlayacak olan TEMED eklenmeden önce jeli dökmek için kullanılacak pipet 1 mL'e ayarlandı. TEMED eklendikten sonra birkaç kez pipetaj yapılarak TEMED'in homojen bir biçimde yayılması sağlandı. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı. Hazırlanan karışım camlar arasına hava kabarcığı bırakmadan aktarıldı. Jel kısa camın üst kısmından 1 cm aşağısına kadar eklendi. Bu kısma soğuk izopropanal eklenerek üst kısmın düz bir şekilde polimerleşmesi sağlandı. Falkonda arta kalan jel baz alınarak polimerizasyonun tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edildi (Polimerleşme yaklaşık 30-60 dk).

Ayırma jeli polimerleştikten sonra, jelin üzerindeki izopropanol (bütanol su karışımı da olabilir) dökülerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan az miktardaki izopropanol kâğıt mendile emdirilerek jelin üzerinden alındı. Ayırma jeline benzer şekilde Tablo 5'da verilen sıraya ve miktarlara göre hazırlanan yükleme jeli hızlı biçimde camlar arasında kalan 1 cm'lik boşluğa aktarıldı. Alkolle dezenfekte edilen tarak dikkatlice camlar arasına yerleştirildi. Polimerizasyon için beklendi (Polimerleşme yaklaşık 30-60 dk). Bu şekilde hazırlanan jel hemen kullanılacağı gibi ıslak bir peçeteye ardından streç filme sarılıp kurumasına izin verilmezse bir haftaya kadar 4 °C'de saklanabilir.

SDS-PAGE

Polimerizasyonun tamamlanmasından ardından camlar tanktaki haznesine dikkatlice yerleştirildi. Tank tamponu tank üzerinde belirtilen noktalara kadar dolduruldu. Tarak tanka tampon doldurulduktan sonra kuyucuklara zarar vermeden çıkartıldı. Kuyucuklara tamponla birkaç kez pipetaj yapıldı. Bu şekilde jel, örneklerin yüklenmesi için hazır hale getirildi.

Yürütülecek proteinlerin (örneklerin) üzerine uygun miktarda yükleme boyası eklendi [1:4 (yükleme boyası (5x): numune)]. Örnek-yükleme boyası karışımı 95 °C’de 5 dk kaynatıldı (denatürasyon için). Kuyucuklara maksimum 35 µg örnek ve aynı şekilde markır yüklendi. Tanka bir buz aküsü atılarak aşırı ısınma engellendi. Örnekler 70 Voltta 15 dk ardından 100 Voltta yaklaşık 1-1.5 saat (60-90 dk) yürütüldü. Yürüme, markırın yürüme hızı kontrol edilerek ayarlandı.

Yürütme işlemi biten jel tanktan çıkarıldı. Saf suyla yıkandı. İki cam arasına spatula sokularak camlar birbirinden dikkatlice ayrıldı. Jelin artık kısımları (yükleme jeli, jelin kenar kısımları gibi) spatula ile kesilip atıldı. Jel sabitleştirme çözeltisine alındı bu çözeltide 30-40 dakika çalkalanarak proteinlerin jele sabitlenmesi sağlandı. Ardından jel başka bir kaba alınıp üzerini örtecek kadar renklendirme çözeltisi ilave edilip 1-2 saat çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkartılıp rensizleştirme çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla çözelti değiştirilip jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içerisinde çalkalandı. Son olarak jel saf su içine alınıp görüntülendi.

3.2.2.2. Western Blot

Kullanılan Çözeltiler

Transfer Tamponu: 3 g Tris ve 14.4 g glisin 700 mL deiyonize su içerisinde çözüldü 200 mL metanol eklendi ve hacmi 1L’ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

TBS (10X): 31.52 g Tris HCl ve 80 g NaCl çözülerek toplam hacim deiyonize su ile 900 ml’ye tamamlandı pH 7.6’ya ayarlanarak son hacim 1L’ye tamamlandı.

TBST: 100 mL 10X TBS ve 1 mL Tween-20 1 L deiyonize suda dilue edildi.

Bloklama Çözeltisi (%5 BSA-TBST / Süt Tozu-TBST): 5 g BSA veya süt tozu 100 mL 1X TBST içerisinde çözülerek 4 °C’de saklanır. Gerekli durumda BSA ve süt tozu birlikte kullanılabilir.

Primer Antikor: Bloklama tamponu ile primer antikor için üretici firmanın tavsiye ettiği oranda seyreltilerek hazırlandı.

Sekonder Antikor: Bloklama tamponu ile sekonder antikor için tavsiye edilen oranlarda seyreltilerek hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Yukarıda anlatıldığı gibi SDS-PAGE işlemi aynı şekilde gerçekleştirildi. Yürütülecek proteinlerin miktarları primer antikoru ölçebileceği ve üretici firma tarafından tavsiye edilen konsantrasyon değerleri kontrol edilerek belirlendi. Örneklerin üzerine uygun miktarda yükleme boyası eklenerek yürütüldü. Fakat sabitleştirme çözeltisine alınmadan membrana transfer edildi. Kaset açılıp kasetin siyah kısmından başlayarak üzerine transfer tamponu ile ıslatılan siyah sünger yerleştirildi. İki cam arasına spatula sokularak camlar birbirinden dikkatlice ayrılıp, jelin artık kısımları (yükleme jeli, jelin kenar kısımları gibi) spatula ile kesilip atıldı. Jelin sağ alt tarafında işaretlemek amacıyla hafifçe kesildi. Transfer tamponu ile ıslatılan 2 tane ince Whatman kâğıdı siyah sünger üzerine yerleştirildi. Jel uygun biçimde Whatman kâğıtlarının üzerine yerleştirildi. Nitroselüloz membran jelin üzerine yerleştirildi (membran ile jel arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir). Son olarak transfer tamponu ile ıslatılmış 2 tane ince Whatman kâğıdı membran üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilerek sandviç oluşturuldu. Sandviç oluşturulduktan sonra tüm hava boşluklarının giderilmesi için yuvarlak bir silindir ile hafif basınç uygulanarak sandviç üzerinde yuvarlandı. Siyah sünger en üste konularak kaset kapatıldı. Kutuplara dikkat edilerek bu kaset tanka yerleştirildi. Tank transfer tamponu ile doldurulup içine ısınmayı engellemek için bir buz aküsü konuldu. Transfer işleminin gerçekleşmesi için 100 Voltta 1 saat 15 dk yürütüldü.

3.2.2.3. Membranın Bloklanması ve Proteinin İmmünokimya ile Görüntülenmesi

Blotlama işlemi bittikten sonra membran, bloklama için hazırlanan 10 mL bloklama çözeltisi 50 mL’lik falkon içerisine yerleştirilip, oda sıcaklığında 1 saat roller

mikserde inkübasyona bırakıldı. Bloklanan membran, taze olarak üretici firmanın önerdiği gibi bloklama çözeltisinde seyreltilerek hazırlanan primer antikor çözeltileri (pozitif eksozom membran belirteci olarak anti-CD63 ve negatif belirteç olarak ise anti-kalneksin antikor çözeltisi) içerisinde roller mikserde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Primer antikorla inkübasyonun ardından membran 3 defa 10'ar dk TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Daha sonra membran primer antikora uygun bloklama tamponuyla üretici firmanın önerdiği gibi bloklama tamponuyla 10000 kat seyreltilerek hazırlanan sekonder antikor çözeltisi ile roller mikserde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu inkübasyondan sonra membran tekrar 3 defa 10'ar dk TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Üçüncü yıkamadan sonra membran pens ile kenarından tutularak bir kurulama kâğıdı üzerinde kenarından değdirilerek kuruması sağlandı ve temiz bir kaba aktarıldı. İmmünokimya ile saptamak için hazırlanan 1 mL ECL solüsyonu ile muamele edildi (3 dk). Üzeri şeffaf plastik bir membranla kapatılarak ve hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek kemilünesans görüntüleme yapıldı.

3.3. Biyokimyasal İnceleme

Yaklaşık 70-100 mg testis dokusu 2 mL soğuk homojenizasyon tamponu ile deney tüpünde dokular tamamen parçalanıncaya kadar yaklaşık 20 sn buz içerisinde homojenize edildikten sonra 3,000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. 1,5 mL'lik ependorfa 750 µL süpernatant koyuldu. Üzerine 600 µL etanol- kloroform (2:3) olan karışımdan ilave edildi. +4 °C'de 10,000xg'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında ependorfun üst kısmındaki protein fazlarda protein tayini, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitesi ölçüldü.

3.3.1. Testis Dokusunda MDA Düzeyinin Ölçülmesi

Testis dokularının homojenizasyonu için yaklaşık 100 mg testis dokusu 2 mL soğuk homojenizasyon tamponu ile deney tüpünde dokular tamamen parçalanıncaya kadar yaklaşık 30 sn buz içerisinde homojenize edildikten sonra 3,000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve MDA seviyesi belirlendi. Bu yöntem MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit ile oluşturduğu kompleksin renginin 532 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanan metod modifiye edilerek yapıldı(139).

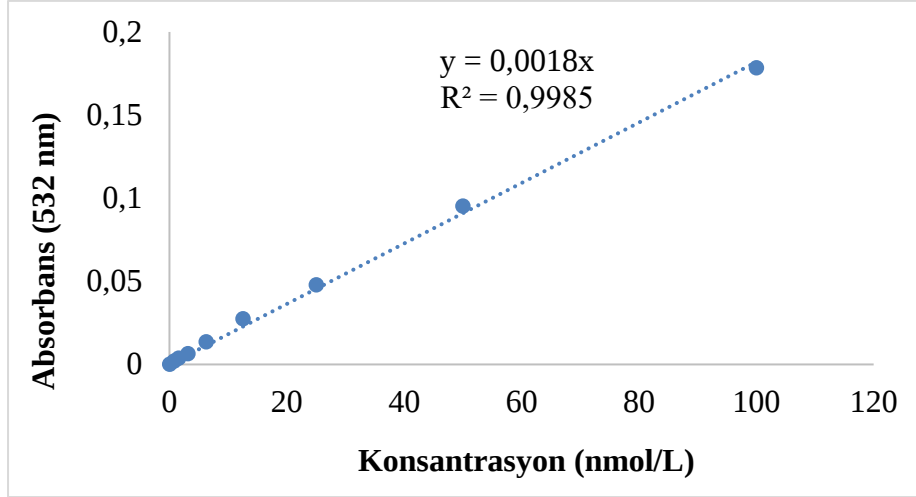
Kullanılan Çözeltiler

1. Doku homojenizasyon tamponu: 1.15 g KCl hassas terazide tartıldı ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Oluşan çözeltinin üzerine 0.5 mL Triton X-100 eklendi.
2. %1'lik H₃PO₄ çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL %85'lik H₃PO₄ alındı ve son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.
3. Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: 0.67 g TBA tartıldı ve 50 mL distile suda magnetik bar yardımıyla 10 dk karıştırıldı. Ardından üzerine 50 mL asetik asit ilave edilerek çözüldü.
4. Standart çözeltiler: 8.3 µL tetrametoksiopropan 0.01 M HCl çözeltisine eklendi ve 50 oC'de 1 saat inkübe edildi. Bu oluşan 10 µmol/mL'lik ara stok çözeltiden dilüsyonlar yapılarak 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 3. Doku MDA Seviyesi Ölçümü İçin Yapılan Reaksiyon Karışımı

Reaktifler	Eklenen Miktar (mL)
Doku homojenatı	0.5
H ₃ PO ₄	3
Tiyobarbitürik asit	1

Tablo 3'te verilen karışım vortekslendi. Ardından 100°C de etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernatantlar ELISA pleytine pipetlendikten sonra 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Şekil 6'daki standart grafik kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar ise nmol/g doku olarak hesaplandı.



Şekil 6. Doku MDA Seviyesi Ölçümü İçin Standart Grafiği

3.3.2. Testis Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley'in geliştirdiği yöntemin modifiye edilmesi sonucu yapıldı (140). Bu metod, ksantin-ksantin oksidaz ile oluşan süperoksitlerin SOD tarafından kullanılarak, nitroblue tetrazolium (NBT)'dan mor renkli formazan boyası oluşumunun engellenmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar yüksek ise ortamdan o kadar çok O_2^- kullanacağı için reaksiyondan sonra oluşan rengin şiddetinde azalma gözlenir. Reaksiyon sonucu oluşan renkli bileşiğin absorbansı 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Kullanılan Çözeltiler

1. 0.3 mM Ksantin Çözeltisi: 3.65 mg ksantin alındı ve 80 mL deiyonize suda çözöldü.
2. 0.6 mM EDTA Çözeltisi: 8.93 mg EDTA alındı ve 40 mL deiyonize suda çözöldü.
3. 150 μ M NBT Çözeltisi: 4.9 mg NBT alındı ve 40 mL deiyonize suda çözöldü. NBT çözeltisi SOD reaktif karışımına en son eklendi.
4. 400 mM Na_2CO_3 çözeltisi: 1.01 g Na_2CO_3 alındı ve 24 mL deiyonize suda çözöldü.
5. % 0.1'lik Bovin Serum Albumin (BSA) çözeltisi: 12 mg BSA'dan alındı ve 12 mL deiyonize suda çözöldü.
6. Yukarıdaki beş çözelti karıştırılarak SOD reaksiyon karışımı elde edildi.

7. 2 M Amonyum Sülfat Çözeltisi: 2.64 g amonyum sülfat 10 mL deiyonize suda çözöldü. Ksantin oksidaz enziminin dilüsyonunda kullanıldı.

8. 0,8 mM CuCl₂ Çözeltisi: 5.37 g CuCl₂ alındı ve 50 mL deiyonize suda çözöldü. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanılır.

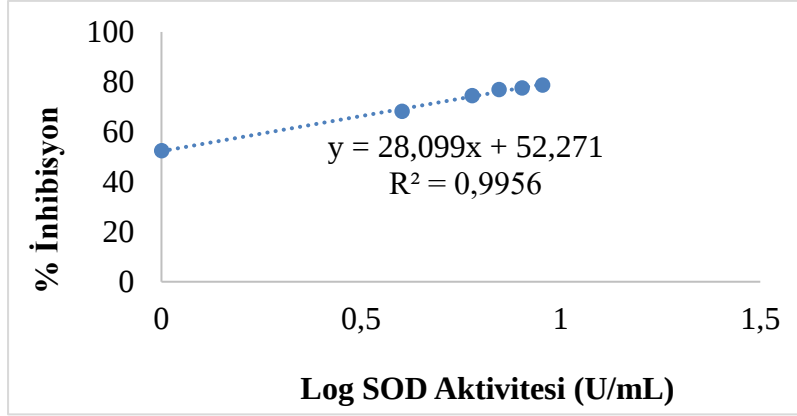
9. 167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 3,3 U/mL’lik orijinal şişeden 101 µL alınıp 2 mL’ye amonyum sülfat çözeltisi ile tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlandı. 100, 50, 25, 12.5, 5, 4, 3, 2, 0.5, 0.25 U/mL’lik SOD standartları kullanıldı. SOD standartları pH’sı 7.4 olan 50 mM’lık Tris-HCl çözeltisi ile dilue edilerek hazırlandı. Standart veköreetanol/kloroform aşaması uygulanmadı. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 4’e göre hazırlandı.

Tablo 4. SOD Aktivitesi Ölçümü İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımı

Reaktifler	Miktar (mL)
Standart /Dilue Numune	0.25
SOD reaksiyon karışımı	1.25
Ksantin oksidaz (25 0C’de 20 dakika karanlıkta inkübasyon	0.25
Bakır Klorür (560 nm’de spektrofotometrik ölçüm)	0.5

Standart grafiği, % inhibisyona karşılık gelen konsantrasyonların logaritması belirlenerek Şekil 7’de gösterildiği gibi çizildi. Standart grafiğinde belirlenen denklem kullanılarak numunelerin % inhibisyonlarına karşılık gelen SOD konsantrasyonlarının logaritmik değeri hesaplandıktan sonra bunların anti logaritmaları alınarak numunelerin SOD konsantrasyonu hesaplandı. Seyreltme faktörü ile çarpıldı. Belirlenen SOD konsantrasyonu, toplam protein miktarına bölünerek SOD aktivitesi belirlendi. Sonuçlar U/mg protein olarak hesaplandı.

Eşitlik 1: % inhibisyon = $(Abs\ K\ddot{o}r - Abs\ Numune) \div (Abs\ K\ddot{o}r) \times 100$



Tablo 5. SOD Aktivitesi İçin Standart Konsantrasyonların Logaritmasına Karşı % İnhibisyon Grafiği

3.3.3. Testis Dokusunda Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

CAT enzim aktivitesini belirlemede Aebi yöntemi kullanıldı.(141). Bu yöntemin temeli H_2O_2 'nin enzimatik bozulması sonucu 240 nm'de absorbanstaki düşüşün takip edilmesine dayanır.

Kullanılan Çözeltiler

1. Fosfat Tamponu (pH=7,0; 50 mM): 6.81 g KH_2PO_4 deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. 8.9 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve gerektiğinde asit veya baz ilavesi yapılarak pH=7,0'ye ayarlandı.

2. Hidrojen Peroksit: 240 μ L %30'luk H_2O_2 'den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 mL'ye tamamlandı (günlük hazırlandı). Doku homojenatları fosfat tamponu ile 25 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu. Kuartz küvetlere Tablo 6'ya göre pipetlemeler kör ve numune karışımları için ayrı ayrı yapıldı.

Tablo 6. Katalaz Aktivite Tayini İçin Yapılan Reaksiyon Karışım

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	0.75	-
Numune	1.5	1.5
H_2O_2	-	0.75

H₂O₂ eklenir eklenmez kuartz küvetler altüst edildi ve 240 nm’de 30 s süreyle her 10 s’de bir absorbanslar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi. Absorbanslardaki düşüşün dakikada 0.015 ile 0.100 arasında olmasına dikkat edildi. Eğer bu aralıkta düşüş olmazsa numune dilüsyonları yeniden ayarlanmalıdır. CAT aktivite tayininde birinci mertebede reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. Absorbanslardaki 10 s’lik düşüş için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı

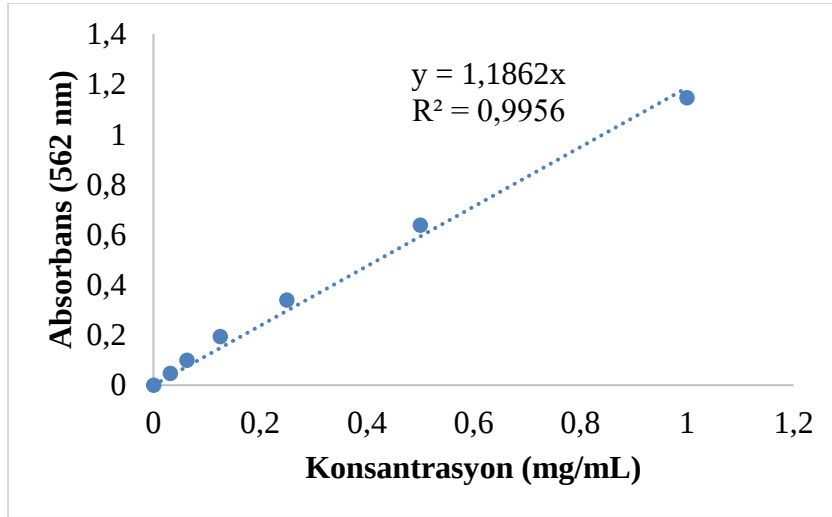
$$k = (2.3/10) \times \log(A1/A2) \text{ s}^{-1} \text{ (2)}$$

Burada; A1= Başlangıç absorbansı, A2= 10 s sonraki absorbanstır.

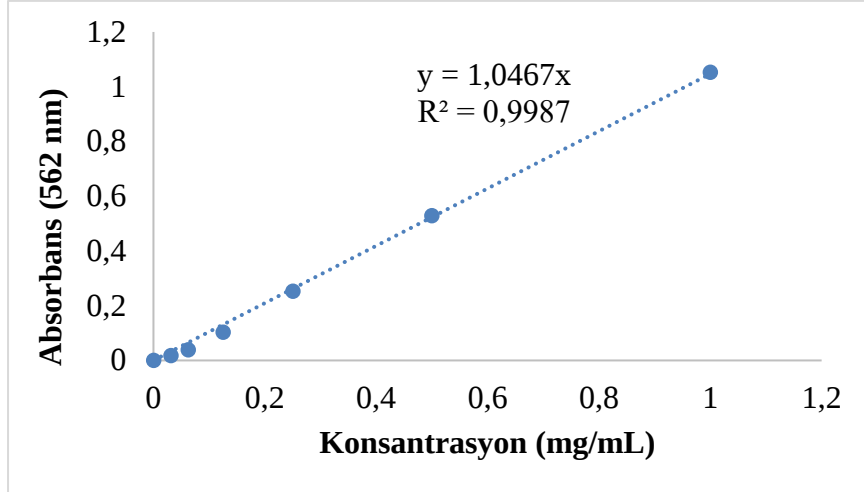
Eş. 1’e göre bulunan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı. Ardından testis dokularında g protein başına CAT aktivitesi hesaplandı. Sonuçlar k /g protein olarak verildi.

3.3.4. Protein Miktar Tayini

Testis dokusunda protein konsantrasyonları BCA kiti (LOT: UD282967, Thermo Scientific, USA) kullanılarak analiz edildi. Testis dokusu proteinlerinden elde edilen protein fazların konsantrasyonları sırasıyla Şekil 8 ve 9’daki standart grafiğine göre mg/mL cinsinden ifade edildi.



Şekil 7. SOD ve CAT Seviyesini Belirlemek İçin Yapılan Protein Miktarını Hesaplamada Kullanılan Standart Grafiği



Şekil 8. MDA Seviyesini Belirlemek İçin Yapılan Protein Miktarını Hesaplamada Kullanılan Standart Grafiği

3.4. Histopatolojik inceleme

Testis dokuları histopatolojik olarak değerlendirmek üzere takibe alındı. Takibe alınan dokular Bovin solüsyonu içinde 72 saat fikse edildi. Fikse edilen doku parçaları %70, %90, %96 ve %100 lük dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra ksilen solüsyonundan geçirilerek şeffaflaştırıldı. Dokuların parafin blokları hazırlandıktan sonra tam otomatik mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon işleminden sonra hematoksileneozin (H&E) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar Işık mikroskopik (Olympus BX 51; Olympus Optical Co, Ltd, Tokyo, Japan) olarak değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirme çalışma gruplarından habersiz bu konuda deneyimli bir patolog tarafından yapıldı. Testis dokularındaki hasar Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması (JTBS) ile derecelendirildi. Bu skorlamada ışık mikroskopisinde yüksek büyütmede (200X) 5 farklı alanda testis dokuları yarı kantitatif olarak değerlendirildi. Tablo 7’de JTBS verilmiştir.

Tablo 7. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Skor 1	Seminifer tübüllerde hiç hücre olmaması
Skor 2	Sadece Sertoli hücreleri olması
Skor 3	Germ hücresi olarak sadece spermatogonia olması
Skor 4	Hiç spermatozoa veya spermatid olmaması ve 5'den az sayıda spermatosit olması
Skor 5	Spermatozoa veya spermatid olmaması, sadece spermatositlerin olması,
Skor 6	Spermatozoa olmaması ve 10'dan az sayıda spermatid olması
Skor 7	Spermatozoa olmaması, çok sayıda spermatid olması
Skor 8	Germinal epitelin çok tabakalı olması ancak lümende 10'dan az sayıda spermatozoa bulunması
Skor 9	Germinal epitel görülmekle birlikte lümeni tıkayabilecek önemsiz miktarda döküntü, tıkalı lümende spermatozoa ve döküntü epitel görülmesi
Skor 10	Germinal epitelin santral lümen çevresinde çok katlı yapıda olması, lümenin açık ve çok sayıda spermatozoa içermesi

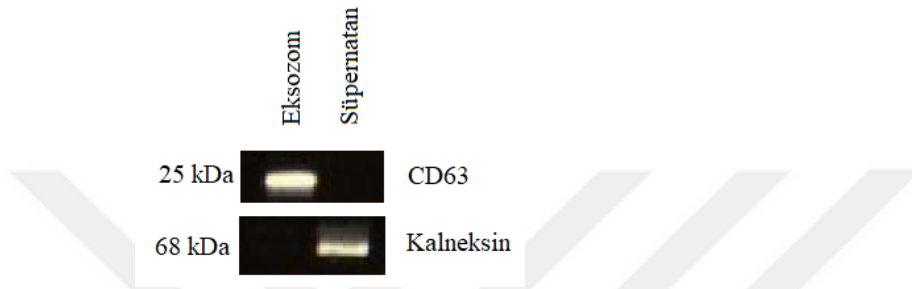
3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analiz aşamasında SPSS 23,0 istatistik paket programı kullanıldı. Değerlendirme sonuçlarının tanımlayıcı istatistikleri ortalama, standart sapma olarak verildi. Elde edilen veriler ölçümsel ve normal dağılıma uymadığı için istatistiksel analizinde iki farklı yöntem kullanıldı. 3 grubun karşılaştırılmasında, Kruskal Wallis varyans analizi; grupların ikiyeşerli karşılaştırılmasında ise Mann Whitney-U testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi Kruskal Wallis testinde $p < 0.05$ olarak alındı. Mann Whitney-U testinde Bonferroni düzeltmesi kullanılarak $p < 0.05$ olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Anne Sütünden Elde Edilen Eksozomların Doğrulanması

Anne sütünden elde edilen eksozomların varlığı, eksozom membran belirteçleri CD63 ve negatif marker kalneksin Western Blot yöntemi ile doğrulandı (Şekil 9).



Şekil 9. Anne Sütü Eksozomlarının Western Blot ile Doğrulanması

4.2. Testis Hasarının Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

Yapılan deneysel çalışmada oluşturulan 3 grubun doku MDA, SOD ve CAT değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Değerler Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Gruplara Göre Doku Parametrelerinin Ortalama Değerleri

	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	p
Ortalama MDA kons/ağırlık (nmol/g doku)	29,82±9,71	72,71±34,3	20,95±2,8	<0,001*
Ortalama SOD (U/mg protein doku)	10,27±2,31	7,9±1,35	11,45±2,66	0,012*
Ortalama CAT (k/g protein doku)	6,47±1,93	3,2±0,81	5,41±1,62	0,007*

* p< 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.

Grupların ikişerli MDA değerleri karşılaştırıldığında Grup1-Grup2, Grup2-Grup3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p< 0.05). Grup1- Grup3

arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Doku MDA değerlerinin ikiyeşerli karşılaştırılması Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Grupların MDA Değerlerinin İkiyeşerli Karşılaştırılması

	Ortalama MDA kons/ağırlık (nmol/g doku)	p
GRUP 1-GRUP 2	29,82±9,71 - 72,71±34,3	0,044*
GRUP 1- GRUP 3	29,82±9,71 - 20,95±2,8	0,413
GRUP 2- GRUP 3	72,71±34,3 - 20,95±2,8	<0,001*

* Bonferonni düzeltmesi yapılmıştır. Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Grupların ikiyeşerli SOD değerleri karşılaştırıldığında Grup2-Grup3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Grup1-Grup2 ve Grup1- Grup3 arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Doku SOD değerlerinin ikiyeşerli karşılaştırılması Tablo 9’de verilmiştir.

Tablo 9. Grupların SOD Değerlerinin İkiyeşerli Karşılaştırılması

	SOD(U/mg protein doku)	p
GRUP 1-GRUP 2	10±2,31 - 7,9±1,35	0,102
GRUP 1- GRUP 3	10±2,31 - 11,45±2,66	1
GRUP 2- GRUP 3	7,9±1,35- 11,45±2,66	0,013*

* Bonferonni düzeltmesi yapılmıştır. Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Grupların ikiyeşerli CAT değerleri karşılaştırıldığında Grup1-Grup2 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Grup1-Grup3 ve Grup2- Grup3 arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Doku CAT değerlerinin ikiyeşerli karşılaştırılması Tablo 10’da verilmiştir.

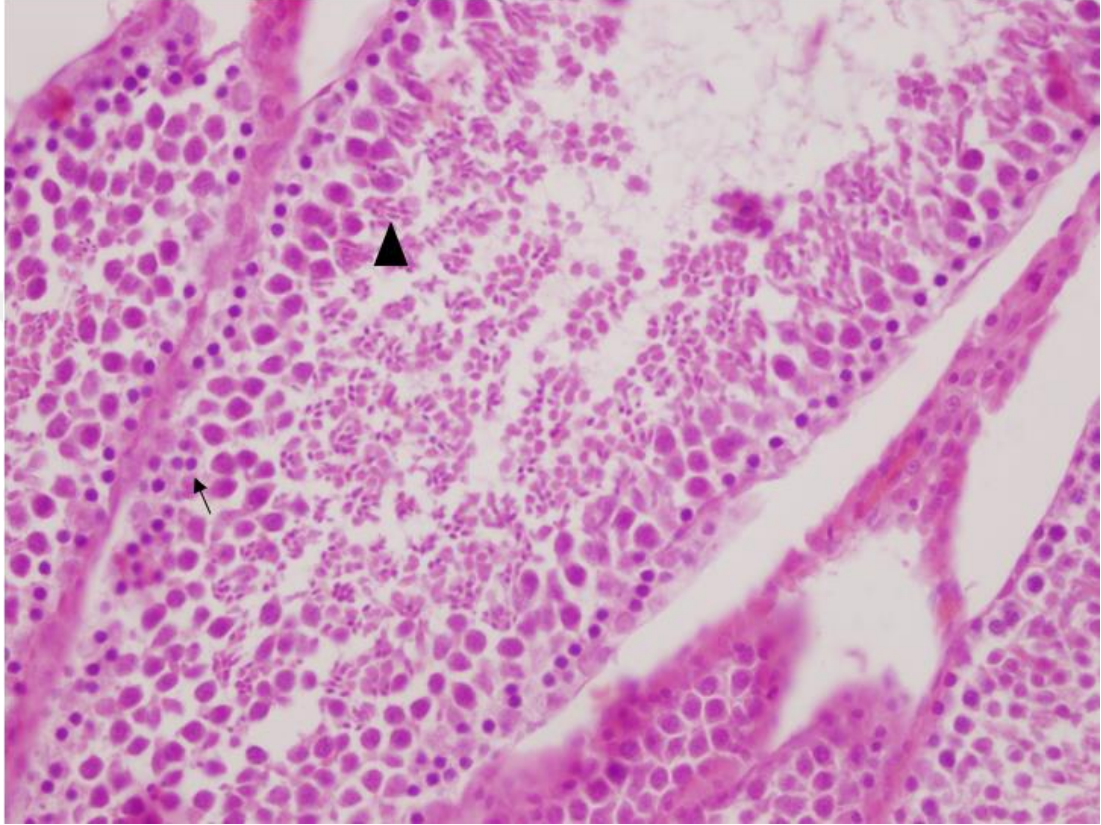
Tablo 10. Grupların CAT Değerlerinin İkiyeşerli Karşılaştırılması

	CAT (k/g protein doku)	p
GRUP 1-GRUP 2	6,47±1,93 - 3,2±0,81	0,004*
GRUP 1- GRUP 3	6,47±1,93 - 5,41±1,62	1
GRUP 2- GRUP 3	3,2±0,81 - 5,41±1,62	0,071

* Bonferonni düzeltmesi yapılmıştır. Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

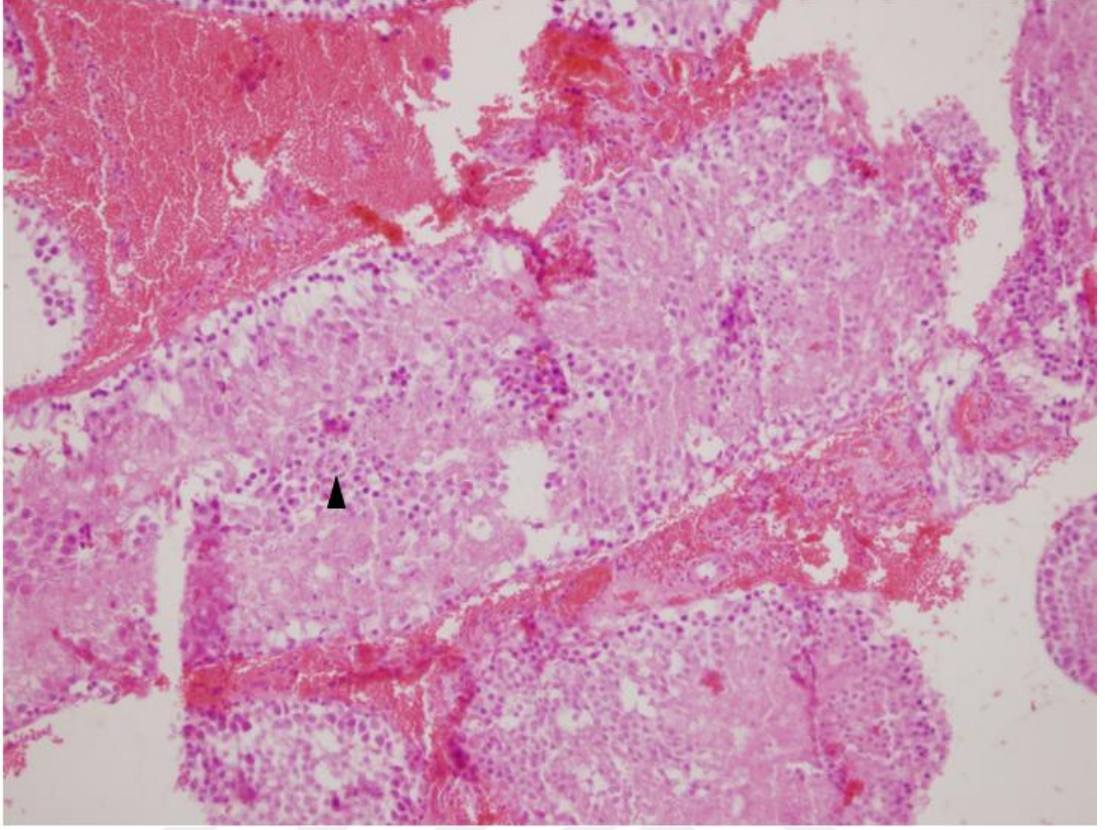
4.3. Testis Hasarının Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

Deney gruplarının ışık mikroskopik değerlendirilmesinde, kontrol grubundaki ratların testislerinde normal histolojik yapı izlendi (Şekil 10).



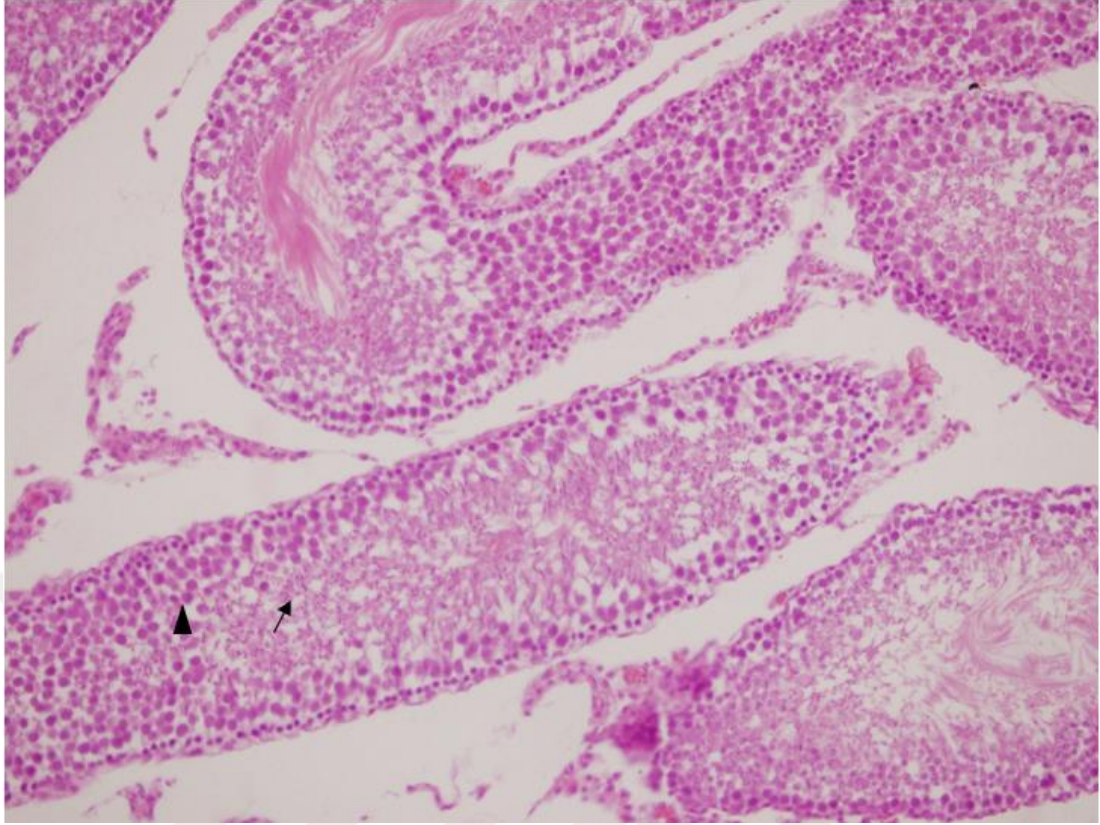
Şekil 10. Kontrol Grubuna Ait Testisteki Sertoli hücresi, Spermatogonia (↑) ve Spermatozit (▲)

Grup 2'ye ait testis seminifer tübül epitellerinde torsiyona sekonder rejenerasyon bulgusu ve artmış mitotik aktivite izlendi. Yaygın denüdasyon, deskuamasyon, fokal nekroz görünümü mevcuttu. Tübül lümeninde az sayıda hayalet germinal epitel hücreleri izlendi (Şekil 11).



Şekil 11. Torsiyon/Detorsiyon Grubuna Ait İnterstisyel Alanda Yaygın Taze Kanama ve Seminifer Tübül Lümenlerinde Eksfoliyasyonlu Nekrotik Hücreler, Sol Testis Tübül Lümeninde Az Sayıda Hayalet Germinal Epitel Hücreleri İzlendi (▲). (H&Ex100)

Grup 3'teki testis dokusuna ait spermatid ve spermatozoonlar gösterilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Grup 3'e ait Testisteki Spermatid (↑) ve Spermatozoonlar (▲)

4.3.1. Testisteki Histopatolojik Hasarın İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Gruplara ait sol testis preparatlarının histopatolojik incelenmesi sonucu elde edilen JTBS'ları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Değerler Tablo 11'da verilmiştir.

Tablo 11. Gruplara Göre JTBS'larının Ortalama Değerleri

	JTBS ortalama değerleri
Grup 1	9,38±0,74
Grup 2	3,38±0,52
Grup 3	7,75±0,71
p	<0,001*

*p< 0.05

Grupların JTBS değerlerinin ikişerli karşılaştırılmasında Grup1-Grup2 ve Grup2-Grup3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Grup1-Grup3 arasında anlamlı fark bulunmamıştır. ($p < 0.05$). Değerler Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12. Grupların JTBS Değerlerinin İkişerli Karşılaştırılması

	JTBS ortalama değerleri	p
Grup1-Grup2	9,38±0,74 - 3,38±0,52	<0,001*
Grup1- Grup3	9,38±0,74 - 7,75±0,71	0,145
Grup2- Grup3	3,38±0,52 - 7,75±0,71	0,042

* Bonferonni dőzeltmesi yapılmıştır. Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA

Testis torsiyonu, akut tedavi edilmemesi halinde germinal hücre nekrozu ve infertilite ile sonuçlanabilen acil bir durumdur. Torsiyonun derecesi ve süresine bağlı olarak testis hasarının derecesi değişmektedir(142). Testis torsiyonda ana patoloji testiste ödeme ve ağrıya yol açan venöz tıkanıklıktır. Ancak bu venöz tıkanıklık testisin tunikası elastik olmadığından arteriyel dolaşımı bozarak tıpkı diğer dokularda olduğu gibi testiste de hipoksiye neden olur. Venöz, arteriyel ve kapiller düzeyde oluşan trombüsler testiküler iskemi ve devamında nekroza neden olur. (143).

Spermatik kord torsiyonu, doku hipoksisi ve bunun sonucunda germinal hücre nekrozu ile karakterize olup yapılan bir deneysel hayvan çalışmasında 90 derecelik testis torsiyonunun testis dolaşımını etkilemediği, 180 derecelik torsiyonun 3-4. günlerde; 360 derece torsiyonun 12-24 saat içerisinde ve 720 derece torsiyonun ise 2 saat içerisinde testisin canlılığını kalıcı olarak kaybetmesine neden olduğu gösterilmiştir. Torsiyone testis opere edilmesine rağmen torsiyon olayından 12 yıl sonra dahi infertilite ve subfertiliteye neden olduğu için acil cerrahi müdahale gerektirmektedir(99).

Testis torsiyonunda meydana gelen iskemik hasarın temelinde fazla miktarda üretilen reaktif oksijen metabolitlerine bağlı oksidatif stres ve inflamasyon süreci yer almaktadır. İskemik hasar dönemi olarak adlandırılan bu süreçte testiste meydana gelen hasar öncelikli olarak oksijen desteğinin azalması sonucunda gelişen hipoksiye bağlıdır. İskemiye uğramış dokuların canlılığını koruyabilmesi için en kısa sürede doku reperfüzyonunun sağlanması gerekir(144). Reperfüzyon gerçekleştiğinde ise nötrofil infiltrasyonu, reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin oluşması sonucu doku hasarı meydana gelir(145).

Reperfüzyonda iskemiye sebep olan etkenin ortadan kaldırılması sonucu iskemik organa kan akımının tekrar sağlanması ile geri dönüşümsüz hasarın önüne geçilip, kaybolan fonksiyonlar geri kazanılabilir. Ancak oluşan serbest oksijen radikallerine ve kandaki aktive edilmiş kan hücrelerine bağlı olarak “reperfüzyon hasarı” oluşur. İskemi sonrasında meydana gelen reperfüzyon, dokuyu iskemi hasarından daha fazla zarara uğratar(87, 88).

Testis torsiyonu üzerine yapılan deneysel çalışmalarda testisin 720° torsiyonunda kan akımının tam olarak kesildiği ve geri dönüşümsüz şekilde iskemi meydana geldiği saptanmıştır(142). Turner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ratlarda testise 180°, 360°, 720° torsiyon uygulamış ve sonrasında torsiyone testisleri sırası ile 1, 2, 4 saat sonra detorsiyone etmiştir. Sonuç olarak 360° ve 1 saatlik torsiyonun yalnızca akut vasküler değişikliklere yol açtığını, 720° ve dört saatlik torsiyonun ise tam iskemi ile sonuçlandığını saptamışlardır. Torsiyon sonucu oluşan hasar torsiyonun derecesi yanında süresine de bağlıdır (43). Torsiyon ve detorsiyon sürelerinin, torsiyon derecesinin, iskemi reperfüzyon hasarına etkilerinin araştırıldığı literatür çalışmalarından elde ettiğimiz bilgiler doğrultusunda, yaptığımız çalışmada testislere 4 saatlik 720° torsiyon uygulanmıştır.

Testis torsiyonu tedavisine yönelik alternatif medikal tedavi yöntemleri araştırılmasına rağmen acil cerrahi halen geçerliliğini koruyan ve yaygın olarak uygulanan tedavi şeklidir. Testis dokusunun torsiyondan etkilenmesi torsiyonun süresi, derecesiyle ilişkili olmasına rağmen, asıl önlenabilir doku hasarı detorsiyon sonrası reperfüzyon döneminde meydana geldiği için yapılan hayvan modellerinde testis reperfüzyon hasarını önlemek amaçlı sayısız farmakolojik ajan ve tedavinin etkinliği değerlendirilmiştir(146). Bu nedenle yapılan deneysel çalışmalarda allopürinol, katalaz, heparin, verapamil, anti-inflamatuar ilaçlar, asetilsistein, ozon ve hiperbarik oksijen gibi ajanlar kullanılmış. Bu ajanların bazılarının etkisinin yetersizliği, bazılarının kullanım güvenilirliği ve dozajı hakkında yeterli bilgi olmaması ve yan etkilerinin belirsizliği yüzünden rutin klinik kullanıma girememiştir (147).

Eksozomlar, çeşitli hücre türlerinden salgılanan ve biyoaktif bileşenler içerdiği gösterilen nano ölçekli hücre kaynaklı ekstraselüler veziküllerdir(11). Ciddi bir hücre hücre iletişim habercisi olup, hücreler arası iletişime ve immun cevaba aracılık etmek için hücreler arasında taşınabilen proteinler, lipidler ve genetik materyaller içermektedirler(148). Doğal taşıyıcı olarak var olmaları, biyodağılımlarının ve plazmadaki kararlılıklarının yüksek olması, oldukça da küçük olmaları sayesinde her türlü vücut engelinden geçebilecek olmaları onları tedavi edici uygulamalar için oldukça uygun bir aday haline getirmektedir(12). Tükürük, idrar, plazma ve anne sütü gibi pek çok sayıda vücut sıvısında bulunurlar. Yakın zamanda yapılan bir çalışma anne sütünden üretilen eksozomların oksidatif stresi azalttığı ve bağışıklık sisteminin

gelişimini destekleyebileceğini öne sürmüştür(149). Bu da bizi çalışmamızda anne sütü eksozomu kullanmaya teşvik etmiştir.

Yapmış olduğumuz deneysel çalışmada öncelikle KTÜ Biyokimya Anabilim Dalında üretilen anne sütü eksozomunun varlığı, CD63 olması ve kalneksin olmaması ile Western Blot yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır.

Admyr ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada insan anne sütündeki eksozomların bebeğin bağışıklık sistemini etkileme potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir(150).

Torsiyon ve detorsiyon nedeniyle oluşan testis hasarı, diğer dokularda gözlenen İ/R hasarı fenomeniyle benzerlik göstermektedir(1). Angoulvant ve ark. (2011), kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomlarının, miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığı bildirmiştir(137). Biz de burdan yola çıkarak eksozomun testiste iskemi/reperfüzyon hasarını azaltacağını öngördük.

Sun ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada deneysel karaciğer iskemik hasarına karşı eksozom ve melatoninin birlikte kullanılmasının etkili olduğunu bildirmişler. Ayrıca eksozomların sadece anti-inflamatuar etkiye sahip olmadığını, aynı zamanda immünomodülatör ve anti-apoptotik özellikleri de olduğunu göstermişlerdir (134).

Zahran ve ark. (2020), sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada renal iskemi-reperfüzyon hasarını en aza indirmek için melatonin, mezenkimal kök hücreler ve bunların eksozomlarının birlikte kullanılmasını önermişlerdir(135). Lin ve ark.' da (2016), adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre ve eksozomun kombine olarak kullanılmasının sıçanlarda akut renal iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruma sağladığını bildirmişlerdir(136).

Eksozomun yukarıda sayılan reperfüzyon hasarındaki koruyucu etkileri, ayrıca sperm motilitesi ve viabilitesi üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı testis torsiyonunda İ/R hasarına karşı etkisini araştırmak için daha önce literatürde denenmemiş olan anne sütünden elde edilen eksozom kullandık. Torsiyon yapılan testise detorsiyondan 30 dk önce ip düşük doz(1cc) eksozom uygulandı. Hasarlı testise yapılan lokal enjeksiyonunun karşı testis üzerinde hiçbir olumsuz etkisinin olmadığını gösteren çalışmalarda literatürde mevcuttur(151, 153).

Yapmış olduğumuz deneysel çalışmada, Grup 2 MDA değerlerinin Grup 1'e göre yüksek olduğu görüldü. İstatistiksel olarak bu iki grup karşılaştırıldığında anlamlı

bir farklılık olduğu gösterildi. Grup 1 ile Grup 2 arasındaki SOD ve CAT değerleri karşılaştırıldığında Grup 2'deki SOD ve CAT değerlerinin Grup 1'e göre düşük olduğu görüldü. Bu iki grup arasındaki SOD değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında sonuçların anlamlı olduğu ama CAT değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı bir fark olmadığı gösterildi. Elde ettiğimiz bu sonuçlar bize testiste İ/R hasarının meydana geldiğini, testis dokusunda nekrozun oluştuğunu göstermektedir. Yani oluşturulan bu modelin uygun olduğunu kanıtlamış olduk.

Keivan ve ark. (2022), sıçanların kendi kan serumundan türetilen eksozomların, testis torsiyonunu takiben oluşan yüksek NO ve MDA seviyeleri nedeniyle seminifer tübül dejenerasyonu ve interstisyel dokunun kaybolması dahil testis hasarını engellediğini; NO, MDA ve apoptotik gen ekspresyonu seviyeleri azaltıp sağlıklı sperm üretimi sağladığını göstermiştir(152) . Benzer şekilde bizim çalışmamızda da Grup 2 ile Grup 3 MDA değerleri karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu tespit ettik. Grup 3'ün MDA değerleri belirgin olarak düşüktü. Eksozomun doku hasarını azaltıcı etkisinden dolayı MDA değerinin yükselmediğini düşünmekteyiz. Ayrıca Grup 1 ve Grup 3'ün MDA değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Deneysel çalışmamızda Grup 2 ile Grup 3'ün SOD ve CAT değerleri karşılaştırıldığında; Grup 3'te SOD ve CAT değerlerinin Grup 2'ye göre yüksek olduğu görüldü. Ancak bu değerlerin istatistiksel olarak incelenmesinde SOD değerlerinde anlamlı bir farklılık varken, CAT değerlerinde anlamlı bir farklılık gösterilemedi. Bunun sebebinin hayvan hakları nedeniyle oluşturulan gruptaki rat sayısının minimalde tutulmuş olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca Grup 1 ve Grup 3'ün SOD ve CAT değerlerinin karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Bu da bize antioksidan enzimlerin Grup 3'te daha az tüketildiği ve bunun yerine eksozomun antioksidan olarak kullanıldığını düşündürmektedir.

Bu verilerin sonucunda MDA ve SOD değerlerinin anlamlı şekilde farklı olması, CAT değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamış olmasına rağmen Grup 2'ye oranla yüksek olması nedeniyle eksozomun İ/R hasarında biyokimyasal olarak etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Histopatolojik açıdan Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında, Grup1'in testisinde normale yakın histoloji izlenirken Grup 2'nin İ/R hasarına bağlı olarak ağır hasar bulgusu gösteren histopatolojiye sahip olduğu görüldü. İstatistiksel olarak bu iki grup incelendiğinde aralarında anlamlı bir fark olduğu, yani İ/R hasarının olduğu gösterildi.

Liu ve ark. (2022), testis torsiyon hasarından sonra kaspaz bağımlı apoptoz yollarının aktive olduğunu ve spermatojenik hücrelerin büyük ölçüde apoptotik olduğunu, oysa eksozom ile tedavinin spermatojenik hücrelerde apoptoz derecesini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Ayrıca eksozomun spermatojenik hücreler üzerindeki proliferatif etkisinin birincil spermatositlerle sınırlı kalmadığını, spermatojenik hücre apoptozunu inhibe edebileceğini ve testis torsiyone-detorsiyon yaralanmasından sonra proliferasyonunu teşvik edebileceğini histopatolojik olarak göstermiştir(151). Bizim çalışmamızda da Grup 2 ile Grup 3 karşılaştırıldığında Grup 3'e ait testislerde Grup 2'ye göre daha az hasarlanma belirtileri olduğu gösterildi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Grup 1 ile Grup 3 karşılaştırıldığında histopatolojik olarak farklılıklar olsa da, istatistiksel anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Eksozom uygulamasının testis dokusundaki reperfüzyon hasarını torsiyon grubuna göre histopatolojik açıdan anlamlı derecede azalttığı için istatistiksel olarak anlamlı çıkmaması beklenen sonuç olarak görüldü. Grup 3'te spermatid ve spermatozoaların normali kadar olmasa da korunduğu; Grup 2'ye oranla anlamlı derecede fark olduğu gösterilmiştir.

Eksozomlar, doğal lipozom oldukları için tanı ve tedaviye yönelik araştırmalarda öneme sahiptir. Son yıllarda anne sütünden elde edilen eksozom çalışmaları başarılı olup giderek artsa da henüz insanlarda klinik olarak kullanımı bulunmamaktadır. Eksozomun testisteki İ/R hasarına tam olarak önleyici etkisi olmamasına rağmen torsiyon grubuna göre anlamlı ölçüde testis dokusunu ve germ hücrelerini koruduğunu çalışmamızda gösterdik. Bu etkisinin kalıcı olup olmadığını anlamak için uzun süreli farklı dozlarda yeni bir deneysel çalışmaya gerek vardır.

6. SONUÇ

Testis torsiyonu en çok çalışılan deneysel modellerden biri olmasına rağmen, hala rutin bir medikal tedavi protokolü maalesef yoktur. Eksozomların doğal olmaları, plazmadaki biyodağılımının ve kararlılığının yüksek olması, oldukça küçük boyutta olup her türlü vücut engelinden geçebilmeleri, taşıdıkları kargo ve bağışıklığı düzenleyici rolleri bu nanokeseceklerin tedavi amaçlı kullanımlarının mümkün olduğunu ortaya koymaktadır. Pek çok vücut sıvısından üretilen eksozomların anne sütünden de üretilerek testis torsiyonu tedavisine umut kaynağı olabileceğini düşündük. Anne sütü eksozomu pek çok alanda kullanılmış olsa da testis torsiyon modelinde ilk defa kullanılmış olup yüz güldürücü sonuçlar ortaya koyulmuştur.

1. Eksozomun, reperfüzyon hasarı sonucu testis dokusunda artan MDA düzeyini azalttığını tespit ettik. Ayrıca histopatolojik olarak da torsiyon grubuna göre dokuda daha az hasar oluşturduğunu gösterdik.
2. Spermatid ve spermatozoaların korunmuş olması mevcut testisin eksozom sonrası sperm canlılığının korunduğunu düşündürmektedir.
3. Sonuç olarak bu deneysel çalışmamızda testis torsiyonundaki İ/R hasarını önlemede eksozomun olumlu etkisini gösterdik. Bu etkisinin uzun süreli kalıcı olup olmadığını araştırmak için yeni çalışmalar önermekteyiz.
4. Anne sütü eksozomunun pek çok alanda kullanılmaya başlanması ve olumlu sonuçların alınmasına dayanarak ileriye dönük yeni çalışmaların yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Yilmaz E, Hizli F, Afşarlar ÇE, Demirtaş C, Apaydin S, Karaman İ, Karaman A (2015). Early diagnosis of testicular torsion in rats by measuring plasma d-dimer levels: comparative study with epididymitis. *Journal of pediatric surgery* 50: 651–4.
2. Akgür FM, Kiliç K, Aktuğ T (1993). Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urological research* 21: 395–9.
3. Mansour M, Degheili J, Khalifeh I, Tamim H, Jaafar RF, El-Hout Y (2019). Remote ischemic conditioning in a rat model of testicular torsion: does it offer testicular protection? *Journal of pediatric urology* 15: 43.e1-43.e7.
4. Kapoor S (2008). Testicular torsion: a race against time. *International journal of clinical practice* 62: 821–827.
5. Asgari SA, Mokhtari G, Falahatkar S, Mansour-Ghanaei M, Roshani A, Zare A, Zamani M, Khosropanah I, Salehi M (2006). Diagnostic accuracy of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in patients with acute scrotum. *Urology journal* 3: 104–8.
6. Yildirim C, Yuksel OH, Urkmez A, Sahin A, Somay A, Verit A (y.y.). Protective effects of Tadalafil and darbepoetin against ischemia - reperfusion injury in a rat testicular torsion model. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology* 44: 1005–1013.
7. Becker EJ, Turner TT (y.y.). Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *Journal of andrology* 16: 342–51.
8. Turner TT, Lysiak JJ (y.y.). Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of andrology* 29: 488–98.
9. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D (2001). Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological reviews* 53: 135–59.
10. AJ V, CF H (2003). Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU international* 92: 200–203.
11. Miyake H, Lee C, Chusilp S, Bhalla M, Li B, Pitino M, Seo S, O'Connor DL, Pierro A (2020). Human breast milk exosomes attenuate intestinal damage. *Pediatric surgery international* 36: 155–163.
12. Kahraman T (2014). Exosomes: Natural Nanovesicle Candidates Used in the Diagnosis and Treatment. *Turkish Journal of Immunology* 2: 34–40.

13. Sadler TW, Başaklar AC (2011). Langman Medikal embriyoloji.
14. Şeftalioğlu A. (1998). Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. Ankara, Feryal Matbaası 3. baskı.
15. Wilhelm D, Koopman P (2006). The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. *Nature Reviews Genetics* 2006 7:8 7: 620–631.
16. Başaklar AC. (2006). Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları. *Palme Yayıncılık* 1717–1752.
17. Tanagho EA, McAninch JW (2008). Smith's general urology.
18. BAYDİNÇ C (1998). Ürogenital organların anatomik ve histolojik yapısı; Temel Üroloji. *Güneş kitabevi Ltd Şti, Ankara*.
19. Brooks JD. (2002). Campbell's Urology. Philadelphia:, WB saunders Walsh PCRA, Vaughan ED, Jr, Wein AJ, editors 8. Baskı.
20. Pettersson S, Söderholm B, Persson JE, Eriksson S, Fritjofsson Å (2009). Testicular Blood Flow in Man Measured with Venous Occlusion Plethysmography and Xenon. <https://doi.org/103109/00365597309133685> 7: 115–119.
21. Anafarta K, Bedük Y AN (2007). Ürogenital Organların Anatomik Ve Histolojik Yapısı İçinde: Temel Üroloji (Eds Anafarta K), Ankara. *Güneş Kitabevi* 16–17.
22. Jarow JP (1991). Clinical significance of intratesticular arterial anatomy. *Journal of Urology* 145: 777–779.
23. A S, A M, S O, M M-D, A el-S (1990). Testicular veins: anatomy and role in varicocelogenesis and other pathologic conditions. *Urology* 35: 175–182.
24. PABST, R., PUTZ R (2006). Sobotta İnsan Anatomisi Atlası (Gövde, Organlar, Alt Ekstremité).
25. Nosnik IP, Friedmann P, Nagler HM, Dinlenc CZ (2010). Resume Fraud: Unverifiable Publications of Urology Training Program Applicants. *Journal of Urology* 183: 1520–1523.
26. SNELL, R. S., YILDIRIM M (1998). Tıp Fakültesi öğrencileri için klinik anatomi. *Nobel Tıp*.

27. MJ C, MH P (1992). Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. *Fertility and sterility* 57: 174–177.
28. JE S, LJ S, GL C (1996). Testicular atrophy and neuropathy in herniorrhaphy. *The American Surgeon* 62: 775–782.
29. Esrefoglu M. (2009). Özel Histoloji. *Malatya Medipres Yayıncılık* 253–264.
30. Bloom W FD (1986). Male reproductive system. In: A Textbook of Histology. 11th ed WB Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto 796–835.
31. Wrobel KH (1998). Male reproductive system. In Dellmann HD, Eurell J.A (Eds). *Textbook of Veterinary Histology 5th.ed Williams and Wilkins, Pennsylvania, USA* 226–235.
32. Junqueira, L. C., Carneiro J (2005). Basic Histology Text and Atlas. *London: McGraw Hill*.
33. Leeson, T LR (1970). The male reproductive system. In. Histology. 2nd ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.
34. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH (2015). Larsen's Human Embriology. *Larsen's Human Embryology* 155–171.
35. Burkitt, G., Young, B., Heath J (2000). Male Reproductive System. In: Wheater's Functional Histology. Churchill Livingstone.
36. Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E (2010). Physiology of Testicular Function. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction* 11–59. doi:10.1007/978-3-540-78355-8_2.
37. Sadler T (2000). Chapter 14 : Urogenital System. In: Langman's Medical Embryology. Lippincott Williams and Wilkins.
38. Guyton AC HJ (y.y.). Erkeklerde Üreme İşlevleri ve Hormonal İşlevler. In: Çavuşoğlu H, Çağlayan-Yeğen B, editors. Tıbbi Fizyoloji. 11. ed 2007 996–1010.
39. Saba M, Morales CR, De Lamirande E, Gagnon C (1997). Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *Journal of Urology* 157: 1149–1154.
40. Jukić M, Bolnički K, Split C, Mestrovic J, Pogorelić Z, Mustapić K, Todorić J, Mrklić I, Meštović J, Jurić I, vd. (2016). Management of acute scrotum in children: A 25-year single center experience on 558 pediatric patients Our experiences with ESIN and ESIN like methods View project Systematic

reviews and Meta-analyses in Pediatric Surgery View project Zenon Pogorelić Klini. *Article in The Canadian Journal of Urology* 23.

41. Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM (2013). Testicular Torsion: Diagnosis, Evaluation, and Management. *American Family Physician* 88: 835–840.
42. DY T, E S (1970). A quantitative study of the effect of ischaemia on the germinal epithelium of rat testes. *Journal of reproduction and fertility* 21: 489–494.
43. TT T, KJ B (1993). Spermatoc cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biology of reproduction* 49: 401–407.
44. Z P, I M, I J (2013). Do not forget to include testicular torsion in differential diagnosis of lower acute abdominal pain in young males. *Journal of pediatric urology* 9: 1161–1165.
45. T K (1978). The testes after torsion. *British journal of urology* 50: 43–46.
46. Heyns CF VA (2006). Problem: Emergencies in Andrology. In: Schiller WB, Comhaire FH, editors. *Andrology for the Clinician Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag*; 134–47.
47. Zupančić B. (1999). Akutni skrotum. *Paediatr Croat* 43: 175–80.
48. SB P, GE B (1998). Pediatric testicular problems. *Pediatric clinics of North America* 45: 813–830.
49. PM C, JD F (2000). Torsion of the testis. *BJU international* 86: 349–353.
50. DS H, HY W, HM S, F H, B B, JW D (1991). Evidence in favor of the mechanical (intrauterine torsion) theory over the endocrinopathy (cryptorchidism) theory in the pathogenesis of testicular agenesis. *The Journal of urology* 146: 630–631.
51. Blackhouse KM (1982). Embryology of Testicular Descent and Maldescent. *Urologic Clinics of North America* 9: 315–325.
52. Demir Ö, Çelebi İ EAA (2011). Ürogenital Sistemin Acil Yaklaşım Gerektiren Hastalıkları, Anafarta K, Arıkan N, Bedük Y (eds.). Temel Üroloji dördüncü baskı. *Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri* 1030–1031.
53. DJ J (1991). Recurrent subacute torsion: prospective study of effects on testicular morphology and function. *The Journal of urology* 145: 297–299.

54. PA A, JM G, RD S (1989). Acute scrotal pain in children: prospective study of diagnosis and management. *Canadian Journal of surgery Journal Canadien de Chirurgie* 32: 29–32.
55. SW B (1998). Acute scrotal pain. *Emergency medicine clinics of North America* 16: 781–809.
56. M D, R K (2013). Torsion of spermatic cord in children: a review. *Journal of pediatric urology* 9: 259–266.
57. PJ D, BS O (2000). Testicular torsion: time is the enemy. *The Australian and New Zealand journal of surgery* 70: 441–442.
58. ML D (1973). Torsed appendage. Diagnosis and management: blue dot sign. *Urology* 1: 63–66.
59. Knight PJ, Vassy LE (1984). The diagnosis and treatment of the acute scrotum in children and adolescents. *Annals of Surgery* 200: 664.
60. HA K, RG B (1998). A retrospective review of pediatric patients with epididymitis, testicular torsion, and torsion of testicular appendages. *Pediatrics* 102: 73–76.
61. Gomes D de O, Vidal RR, Foeppel BF, Faria DF, Saito M (2014). Cold weather is a predisposing factor for testicular torsion in a tropical country. A retrospective study. *Sao Paulo Medical Journal* 133: 187–190.
62. AO C, ME S, FC T, N B (2004). Clinical predictors for differential diagnosis of acute scrotum. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery . [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie* 14: 333–338.
63. MW S, MA K (1993). The acute pediatric scrotum. *The Journal of emergency medicine* 11: 565–577.
64. R R (1984). The importance of the cremasteric reflex in acute scrotal swelling in children. *The Journal of urology* 132: 89–90.
65. Baker LA, Sigman D, Mathews RI, Benson J, Docimo SG (2000). An Analysis of Clinical Outcomes Using Color Doppler Testicular Ultrasound for Testicular Torsion. *Pediatrics* 105: 604–607.
66. G B, S F, H M, G M (1980). Testicular torsion: late results with special regard to fertility and endocrine function. *The Journal of urology* 124: 375–378.

67. A K, P R, E M, M A, V K, M K (2005). Magnetic resonance imaging of experimental testicular torsion. *International journal of andrology* 28: 355–359.
68. Meštrović J, Biočić M, Pogorelić Z, Furlan D, Družijanić N, Todorčić D, Čapkun V (2013). Differentiation of inflammatory from non-inflammatory causes of acute scrotum using relatively simple laboratory tests: Prospective study. *Journal of Pediatric Urology* 9: 313–317.
69. Romeo C, Impellizzeri P, Arrigo T, Antonuccio P, Valenzise M, Mirabelli S, Borruto FA, Scalfari G, Arena F, De Luca F (2010). Late hormonal function after testicular torsion. *Journal of pediatric surgery* 45: 411–413.
70. Ringdahl EN, Teague L (2006). Testicular Torsion. *American Family Physician* 74: 1739–1743.
71. Johnston BI, Wiener JS (2005). Intermittent testicular torsion. *BJU international* 95: 933–934.
72. Bolln C, Driver CP, Youngson GG (2006). Operative management of testicular torsion: current practice within the UK and Ireland. *Journal of pediatric urology* 2: 190–193.
73. Anderson JB, Williamson RCN (1988). Testicular torsion in Bristol: a 25-year review. *The British journal of surgery* 75: 988–992.
74. Barteczko KJ, Jacob MI (2000). The Testicular Descent in Human. *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology* 156.
75. Favorito LA, Cavalcante AG, Costa WS (2004). Anatomic aspects of epididymis and tunica vaginalis in patients with testicular torsion. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology* 30: 420–424.
76. Mansbach JM, Forbes P, Peters C (2005). Testicular torsion and risk factors for orchiectomy. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 159: 1167–1171.
77. Kaye JD, Shapiro EY, Levitt SB, Friedman SC, Gitlin J, Freyle J, Palmer LS (2008). Parenchymal echo texture predicts testicular salvage after torsion: potential impact on the need for emergent exploration. *The Journal of urology* 180: 1733–1736.
78. Beni-Israel T, Goldman M, Bar Chaim S, Kozler E (2010). Clinical predictors for testicular torsion as seen in the pediatric ED. *The American journal of emergency medicine* 28: 786–789.

79. Cadenas E (1995). Mechanisms of Oxygen Activation and Reactive Oxygen Species Detoxification. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology* 1–61. doi:10.1007/978-1-4615-9689-9_1.
80. Prillaman HM, Turner TT (1997). Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *The Journal of Urology* 157: 340–345.
81. Langer JC, Sohal SS, Blennerhassett P (1995). Mucosal permeability after subclinical intestinal ischemia-reperfusion injury: an exploration of possible mechanisms. *Journal of pediatric surgery* 30: 568–572.
82. Wu HC, Sun SS, Kao A, Chuang FJ, Lin CC, Lee CC (2002). Comparison of radionuclide imaging and ultrasonography in the differentiation of acute testicular torsion and inflammatory testicular disease. *Clinical nuclear medicine* 27: 490–493.
83. Kumar, V., Abbas, A. K., Aster JC (2013). Robbins Basic Pathology. *St Louis: Elsevier*.
84. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ (2005). Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *International journal of cardiology* 100: 179–190.
85. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB (1991). Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *American journal of surgery* 161: 488–503.
86. Şener G YB (2009). İskemi-Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi* 22: 5–13.
87. Siemionow M, Arslan E (2004). Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 24: 468–475.
88. Lysiak JJ, Nguyen QAT, Turner TT (2002). Peptide and Nonpeptide Reactive Oxygen Scavengers Provide Partial Rescue of the Testis After Torsion. *Journal of Andrology* 23: 400–409.
89. Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Graham B, Suchy H, Kucan JO (1993). Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plastic and reconstructive surgery* 91: 1110–1123.
90. Tentori L, Portarena I, Graziani G (2002). Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Pharmacological research* 45: 73–85.

91. Scarabelli TM, Mariotto S, Abdel-Azeim S, Shoji K, Darra E, Stephanou A, Chen-Scarabelli C, Marechal JD, Knight R, Ciampa A, vd. (2009). Targeting STAT1 by myricetin and delphinidin provides efficient protection of the heart from ischemia/reperfusion-induced injury. *FEBS letters* 583: 531–541.
92. Kalra J, Chaudhary AK, Prasad K (1991). Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. *International Journal of Experimental Pathology* 72: 1.
93. Janos Z KD (2005). *Oxidative Stres and Disease 10: Nutrients and Cell Signaling*. Taylor & Francis.
94. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK (2000). Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses. *Molecular and Cellular Biochemistry* 205:1 205: 1–11.
95. Parlaktas BS, Atilgan D, Gencten Y, Akbas A, Markoc F, Erdemir F, Ozyurt H, Uluocak N (2014). The effects of carvedilol on ischemia-reperfusion injury in the rat testis. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology* 40: 109–117.
96. Ünsal A, Devrim E, Guven C, Eroglu M, Durak I, Bozoklu A, Balbay MD (2004). Propofol attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion. *World journal of urology* 22: 461–465.
97. Rangan U, Bulkley GB (1993). Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *British Medical Bulletin* 49: 700–718.
98. Sen S, Chakraborty R (2011). The role of antioxidants in human health. *ACS Symposium Series* 1083: 1–37.
99. Filho DW, Torres MA, Bordin ALB, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A (2004). Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Molecular aspects of medicine* 25: 199–210.
100. Ozturk H, Buyukbayram H, Ozdemir E, Ketani A, Gurel A, Onen A, Otçu S (2003). The effects of nitric oxide on the expression of cell adhesion molecules (ICAM-1, UEA-1, and tenascin) in rats with unilateral testicular torsion. *Journal of pediatric surgery* 38: 1621–1627.
101. Aitken J, Buckingham D, Krausz C (1994). Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Molecular reproduction and development* 39: 268–279.

102. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW (1993). Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Molecular reproduction and development* 35: 302–315.
103. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR (1994). Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *The Journal of urology* 152: 107–110.
104. Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S (1997). Reactive Oxygen Species Generation by Human Spermatozoa Is Induced by Exogenous NADPH and Inhibited by the Flavoprotein Inhibitors Diphenylene Iodonium and Quinacrine. *Mol Reprod Dev* 47: 468–482.
105. DE LAMIRANDE E, GAGNON C (1992). Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa: I. Effects on the Motility of Intact Spermatozoa and on Sperm Axonemes. *Journal of Andrology* 13: 368–378.
106. Spiropoulos J, Turnbull DM, Chinnery PF (2002). Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Molecular Human Reproduction* 8: 719–721.
107. Agarwal A, Makker K, Sharma R (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)* 59: 2–11.
108. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A (2007). Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology* 33: 603–621.
109. Othman AI, El-Missiry MA, Amer MA (2001). The protective action of melatonin on indomethacin-induced gastric and testicular oxidative stress in rats. *Redox report : communications in free radical research* 6: 173–177.
110. Demirtaş A, Üntan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İ, Anabilim Dalı Ü (y.y.). Seminal Sıvı ve Spermde Oksidatif Stres ve Antioksidanlar Antioxidants and Oxidative Stress in Seminal Fluid and Sperm. doi:10.5152/tus.2011.05.
111. Taylor DD, Gercel-Taylor C (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 110: 13–21.
112. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International immunology* 17: 879–887.

113. Keller S, Rupp C, Stoeck A, Runz S, Fogel M, Lugert S, Hager HD, Abdel-Bakky MS, Gutwein P, Altevogt P (2007). CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney international* 72: 1095–1102.
114. Skriner K, Adolph K, Jungblut PR, Burmester GR (2006). Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis and rheumatism* 54: 3809–3814.
115. Lässer C, Seyed Alikhani V, Ekström K, Eldh M, Torregrosa Paredes P, Bossios A, Sjöstrand M, Gabrielsson S, Lötval J, Valadi H (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of translational medicine* 9.
116. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M (2014). Sorting it out: regulation of exosome loading. *Seminars in cancer biology* 28: 3–13.
117. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of neuro-oncology* 113: 1–11.
118. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH (2013). Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer metastasis reviews* 32: 623–642.
119. Brinton LT, Sloane HS, Kester M, Kelly KA (2015). Formation and role of exosomes in cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72: 659–671.
120. Corrado C, Raimondo S, Chiesi A, Ciccia F, De Leo G, Alessandro R (2013). Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *International journal of molecular sciences* 14: 5338–5366.
121. Zhang X, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W (2015). Exosomes in cancer: small particle, big player. *Journal of Hematology & Oncology* 8.
122. Zhang G, Yang P (2018). A novel cell-cell communication mechanism in the nervous system: exosomes. *Journal of neuroscience research* 96: 45–52.
123. Tian T, Zhu YL, Hu FH, Wang YY, Huang NP, Xiao ZD (2013). Dynamics of exosome internalization and trafficking. *Journal of cellular physiology* 228: 1487–1495.
124. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhani S, Wood MJA (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology* 29: 341–345.

125. Kahlert C, Kalluri R (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 91: 431–437.
126. Vlassov A V., Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et biophysica acta* 1820: 940–948.
127. Madison MN, Roller RJ, Okeoma CM (2014). Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. *Retrovirology* 11: 1–16.
128. Barceló M, Mata A, Bassas L, Larriba S (2018). Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. *Human reproduction (Oxford, England)* 33: 1087–1098.
129. Gabrielsen JS, Lipshultz LI (2019). Rapid progression in our understanding of extracellular vesicles and male infertility. *Fertility and sterility* 111: 881–882.
130. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, vd. (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *The Journal of experimental medicine* 195: 1303–1316.
131. Eksozomlar: Tanı ve Tedavide Kullanılabilen Doğal Nanokesecik Adayları Exosomes: Natural Nanovesicle Candidates Used in the Diagnosis and Treatment (y.y.). doi:10.5606/tji.2014.323.
132. Sun Y, Liu J (2014). Potential of cancer cell-derived exosomes in clinical application: a review of recent research advances. *Clinical therapeutics* 36: 863–872.
133. Dai S, Wei D, Wu Z, Zhou X, Wei X, Huang H, Li G (2008). Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16: 782–790.
134. Sun CK, Chen CH, Chang C Lo, Chiang HJ, Sung PH, Chen KH, Chen YL, Chen SY, Kao GS, Chang HW, vd. (2017). Melatonin treatment enhances therapeutic effects of exosomes against acute liver ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Translational Research* 9: 1543.
135. Zahran R, Ghozy A, Elkholy SS, El-Taweel F, El-Magd MA (2020). Combination therapy with melatonin, stem cells and extracellular vesicles is effective in limiting renal ischemia-reperfusion injury in a rat model. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 27: 1039–1049.

136. Lin KC, Yip HK, Shao PL, Wu SC, Chen KH, Chen YT, Yang CC, Sun CK, Kao GS, Chen SY, *vd.* (2016). Combination of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes for protecting kidney from acute ischemia-reperfusion injury. *International journal of cardiology* 216: 173–185.
137. Angoulvant D, Ivanov F, Ferrera R, Matthews PG, Nataf S, Ovize M (2011). Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 30: 95–102.
138. LAEMMLI UK (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
139. Uchiyama M, Mihara M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 86: 271–278.
140. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry* 34: 497–500.
141. Ulrich EH, Verlag B (1984). Methods of Enzymatic Analysis : Third Edition Vitamine I n Fettlosliche Vitamine (Vitamins I - - Fat soluble vitamins) 1983: 1984.
142. Hutson JM, Baker ML (1994). A hypothesis to explain abnormal gonadal descent in persistent müllerian duct syndrome. *Pediatric Surgery International* 1994 9:8 9: 542–543.
143. PR B, JM G, JP M (2017). Pediatric Testicular Torsion. *The Surgical clinics of North America* 97: 161–172.
144. Yagmurdur H, Ayyildiz A, Karaguzel E, Ogus E, Surer H, Caydere M, Nuhoglu B, Germiyanoglu C (2006). The preventive effects of thiopental and propofol on testicular ischemia-reperfusion injury. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 50: 1238–43.
145. Shiraishi K, Naito K, Yoshida K (2001). Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biology of reproduction* 65: 514–21.
146. Shimizu S, Tsounapi P, Dimitriadis F, Higashi Y, Shimizu T, Saito M (2016). Testicular torsion-detorsion and potential therapeutic treatments: A possible role for ischemic postconditioning. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 23: 454–63.

147. M T, A M, S D, A A, M I (2017). Medical ozone therapy reduces oxidative stress and testicular damage in an experimental model of testicular torsion in rats. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology* 43: 1160–1166.
148. B W, Y Z, C G, J L (2017). Myricetin ameliorates scopolamine-induced memory impairment in mice via inhibiting acetylcholinesterase and down-regulating brain iron. *Biochemical and biophysical research communications* 490: 336–342.
149. Martin C, Patel M, Williams S, Arora H, Brawner K, Sims B (2018). Human breast milk-derived exosomes attenuate cell death in intestinal epithelial cells. *Innate immunity* 24: 278–284.
150. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filén J-J, Lahesmaa R, Norman M, Neve EPA, Scheynius A, Gabrielsson S (2007). Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 179: 1969–78.
151. Liu H, Shi M, Li X, Lu W, Zhang M, Zhang T, Wu Y, Zhang Z, Cui Q, Yang S, vd. (2022). Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Prevent Testicular Torsion Injury via Activating PI3K/AKT and MAPK/ERK1/2 Pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2022: 8065771.
152. Keivan M, Mansouri Torghabeh F, Davoodi S, Moradi Maryamneghari S, Dadfar R (2022). Single intratesticular injection of blood-serum-derived exosomes can potentially alleviate testopathy following testicular torsion. *Animal models and experimental medicine*. doi:10.1002/ame2.12232.
153. Hsiao C-H, Ji AT-Q, Chang C-C, Cheng C-J, Lee L-M, Ho JH-C (2015). Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem cell research & therapy* 6: 113.