



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL TESTİS TORSİYON MODELİNDE
ANNE SÜTÜ EKSOZOMUNUN UZUN DÖNEM
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Ceren TOPSAKAL

Uzmanlık Tezi

Prof. Dr. Haluk SARIHAN

TRABZON-2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL TESTİS TORSİYON MODELİNDE
ANNE SÜTÜ EKSOZOMUNUN UZUN DÖNEM
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Ceren TOPSAKAL

Uzmanlık Tezi

Prof. Dr. Haluk SARIHAN
ORCID: 0000-0002-0991-8235

Doç. Dr. Hatice Sonay YALÇIN CÖMERT
ORCID: 0000-0002-5281-4933

TRABZON-2025

TEŞEKKÜR

Çocuk Cerrahisi eğitimim süresince mesleki bilgi, becerileri ve hayata bakış açısı ile yolumu aydınlatan, her zaman kendisini örnek aldığım rol modelimiz, değerli bilgilerini bizlerle paylaşan, tez aşamalarımnda her daim yardımcı olan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer Anabilim Dalı Başkanımız, değerli hocam Prof. Dr. Haluk SARIHAN'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca klinik bilgi, beceri ve tecrübelerini benimle paylaşan, deontoloji üzerine hoş sohbetleri ile ufkumu açan, kapısını her çaldığımda aynı kibarlıkla sorularımı yanıtlayan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa İMAMOĞLU'na,

Tüm bu süreçte iş ve aile yaşamı ile bir kadın olarak nasıl başa çıkılabileceğini gösteren, her türlü sıkıntıda varlığını yanımda hissettiğim, tezimin de her aşamasında bana rehberlik etmiş olan ve değerli görüşleriyle tezimin kalitesini arttıran değerli hocam, Doç. Dr. Hatice Sonay YALÇIN CÖMERT'e,

Asistanlık eğitimim boyunca bana olan inancını hep hissettiğim, güvenimi her daim tazeleyen, her zaman bir telefon uzağımda olduğunu bildiğim, bana dik durmayı öğreten değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Gül ŞALCI'ya,

Tez çalışmamın histopatolojik değerlendirmesinde yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi, sayın dekanımız Prof. Dr. Sevdegül AYDIN MUNGAN'a, anne sütü eksozomu üretiminde bol emek harcayan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim görevlisi Prof. Dr. Ahmet ALVER ve Arş. Gör. Şeniz ERDEM ile Arş. Gör. Neslihan SAĞLAM'a, istatistik değerlendirmesinde desteğini asla unutamayacağım Dr. Öğr. Üyesi Serdar KARAKULLUKÇU'ya,

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

Hayatımın her döneminde yanımda olup uzakları yakın edenlerim, bugünlerin mimarı, en kıymetlilerim canım annem Güzin AŞMAN, canım babam Çınar AŞMAN, canım kardeşim Mustafa AŞMAN'a çok teşekkür ederim.

Son olarak da her zaman ve her koşulda elimi tutan, asla bırakmayan hayat arkadaşım, canımdan öte biricik eşim Dr. Öğr. Üyesi Ali Samet TOPSAKAL'a çok teşekkür ederim.

ÖZET

Deneyisel Testis Torsiyon Modelinde Anne Sütü Eksozomunun Uzun Dönem Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Amaç: Çalışmamızda, testis torsiyonu sonucu oluşan iskemi reperfüzyon hasarının sebep olduğu uzun dönem etkilerine anne sütünden elde edilen eksozomun etkinliğini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda ağırlıkları 300-350 gr arasında değişen toplam 32 adet Sprague Dawley cinsi rat, 4 eşit gruba ayrıldı. Grup 1 (kontrol)'deki ratlara anestezi sonrası skrotal insizyon yapıp başka bir işlem yapılmaksızın kapatıldı. Grup 2 (torsiyon), 3 (torsiyon+l) ve 4 (torsiyon+s)'teki ratlara skrotal insizyon sonrası sol testis saat yönünde 720 derece döndürülüp skrotuma 3/0 ipek dikişle tespit edildi; 4 saat sonra detorsiyon yapıldı. Grup 3'teki ratların sol testis yüzeyine detorsiyondan hemen sonra lokal 1 cc eksozom verildi. Grup 4'teki ratlara detorsiyondan hemen sonra intraperitoneal 1 cc eksozom verildi. Katlar tüm gruplarda anatomik pozisyonda kapatıldı. Detorsiyon işleminden 6 hafta sonra sol testise orşiektomi yapıldı. Orşiektomi materyalleri biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için ikiye bölünüp uygun şartlarda laboratuvara gönderildi. Tüm deneklere kansızlaştırma yöntemi ile ötenazi uygulandı. Biyokimyasal analizde, doku malondialdehit (MDA), superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) düzeylerine bakıldı. Histopatolojik etkisini göstermek için Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması (JTBS) ile değerlendirildi.

Bulgular: Gruplar arasında MDA enziminin değerlendirmesinde anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,042$). Torsiyon grubunun MDA değeri, kontrol grubundan yüksek saptanmıştır ($p=0,025$). Gruplar arasında SOD değeri karşılaştırıldığında önemli fark bulunmamıştır ($p=0,089$). Gruplar arasında CAT değeri karşılaştırıldığında önemli fark yoktur ($p=0,828$). Gruplar arasında GPX enziminde yapılan değerlendirmede anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,016$). Torsiyon grubunun GPX değeri, kontrol grubuna göre anlamlı çıkmıştır ($p^{1-2}=0,019$). Torsiyon grubuna göre torsiyon+l grubundaki sayısal düşüklük anlamlı bulunmuştur ($p^{2-3}=0,038$). JTBS değerlendirmesinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$). Kontrol ve torsiyon grupları arasındaki sayısal düşüş önemli bulunmuştur ($p^{1-2}= <0,001$). Kontrol ve torsiyon+l grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p^{1-3}=0,004$). Torsiyon ve torsiyon+s gruplarının arasındaki sayısal yükselik anlamlı bulunmuştur ($p^{2-4}= 0,003$).

Sonuç: Çalışmamız, anne sütü eksozomunun testis torsiyonu modelinde yapıp uzun dönem etkinliğine bakılan ilk çalışmadır. Tüm bu sonuçlar anne sütü eksozomunun testis torsiyonu-detorsiyonu olan hastalar için etkili bir teröpatik ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Testis Torsiyonu, Eksozom, Anne Sütü, Kronik

SUMMARY

Evaluation of Long-Term Efficacy Of Breastmilk Exosome In Experimental Testicular Torsion Model

Aim: In our study, we aimed to investigate the effectiveness of exosomes obtained from breast milk on the long-term effects of ischemia reperfusion injury caused by testicular torsion.

Materials and Methods: In our study, a total of 32 Sprague Dawley rats weighing between 300-350 g were divided into 4 equal groups. In Group 1 (control), a scrotal incision was made after anesthesia and closed without any other procedure. In Groups 2 (torsion), 3 (torsion+l) and 4 (torsion+s), after a scrotal incision, the left testis was rotated 720 degrees clockwise and fixed to the scrotum with a 3/0 silk suture; detorsion was performed 4 hours later. In Group 3, 1 cc of exosome was administered locally to the left testicular surface immediately after detorsion. In Group 4, 1 cc of exosome was administered intraperitoneally immediately after detorsion. The layers were closed in anatomical position in all groups. Orchiectomy was performed on the left testis 6 weeks after detorsion. Orchiectomy materials were divided into two for biochemical and histopathological examination and sent to the laboratory under appropriate conditions. All subjects were euthanized by exsanguination. In biochemical analysis, tissue malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) levels were examined. The Johnsen Testicular Biopsy Scoring (JTBS) was used to show the histopathological effect.

Results: A significant difference was found between the groups in the evaluation of MDA enzyme ($p=0.042$). The MDA value of the torsion group was determined to be higher than the control group ($p=0.025$). When the SOD value was compared between the groups, no significant difference was found ($p=0.089$). When the CAT value was compared between the groups, no significant difference was found ($p=0.828$). A significant difference was found in the evaluation of GPX enzyme between the groups ($p=0.016$). The GPX value of the torsion group was significant compared to the control group ($p_{1-2}=0.019$). The numerical decrease in the torsion+l group compared to the torsion group was found to be significant ($p_{2-3}=0.038$). A significant difference was found between the groups in the JTBS evaluation ($p<0.001$). The numerical decrease between the control and torsion groups was found to be significant ($p_{1-2}= <0.001$). A significant difference was found between the control and torsion+l groups ($p_{1-3}=0.004$). The numerical difference between the torsion and torsion+s groups was found to be significant ($p_{2-4}= 0.003$).

Conclusion: Our study is the first to investigate the long-term efficacy of breast milk exosomes in a testicular torsion model. All these results suggest that breast milk exosomes may be an effective therapeutic agent for patients with testicular torsion-detorsion.

Key Words: Testicular Torsion, Exosome, Breast Milk, Chronic

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Embriyolojisi	3
2.2. Testis Anatomisi	4
2.3. Testis Histolojisi.....	7
2.4. Testis Fizyolojisi	8
2.5 Testis Torsiyonu	10
2.5.1 Tanımı, Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi.....	10
2.5.2 Patogenezi	12
2.5.3 Tipleri	13
2.5.4 Klinik, Tanı ve Tedavi	14
2.6. İskemi-Reperfüzyon Hasarı	16
2.6.1. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller.....	16
2.6.2. Antioksidan Sistemler	19
2.7. Testiste İskemi/Reperfüzyon Hasarı	20
2.7.1. Testisin İskemik Hasarlanmalarında Antioksidan Tedavi	20
2.8. Eksozom.....	21
2.8.1. Eksozomların Biyogenezi, Yapısı, Salınımı ve Hedef Hücreye Alımı.....	21
2.8.2. Eksozomların Fizyolojik Görevleri.....	23
2.8.3. Eksozomların Tanı ve Tedavideki Önemi	25

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Deney Hazırlığı ve Yapılışı	28
3.2. Anne Sütü Eksozomunun Üretimi	31
3.2.1. Anne Sütünün Toplanması ve Eksozom İzolasyonu	31
3.2.2. Anne Sütü Eksozomunun İmmünoelot Yöntemiyle Doğrulanması	32
3.3. Biyokimyasal İnceleme.....	38
3.3.1. Testis Dokusunda MDA Düzeyinin Ölçülmesi	38
3.3.2. Testis Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini.....	40
3.3.3. Testis Dokusunda Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	41
3.3.4. Protein Miktar Tayini	42
3.4. Histopatolojik İnceleme	43
3.5 İstatistiksel Değerlendirme	44
4. BULGULAR	45
4.1. Anne Sütünden Elde Edilen Eksozomların Doğrulanması	45
4.2 Testis Hasarının Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi.....	45
4.3 Testis Hasarının Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi	47
5. TARTIŞMA	50
6. SINIRLAMALAR	60
7. SONUÇ.....	61
8. KAYNAKÇA.....	62
EKLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

KISALTMALAR DİZİNİ

ALS	: Amyotrofik lateral skleroz
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
AMP	: Adenozin monofosfat
APS	: Amonyum Persülfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BAP	: Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
BBA	: Büyük Büyütme Alanı
BCA	: Bikinkoninik asit
BSA	: Sığır (bovin) serum albümini
Ca ²⁺	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
circRNA	: Sirküler RNA
CO ₂	: Karbondioksit
CRP	: C-reaktif protein
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DST	: Seminifer tübül çapları
ESR	: Eritrosit sedimentasyon hızı
FSH	: Follikül uyarıcı hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GPX	: Glutasyon peroksidaz
H&E	: Hematoksileneozin
H ₂ CO ₃	: Karbonik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
ILVs	: İntralüminal veziküller
Ip	: İntraperitoneal
IVC	: İnferior vena kava

I/R-İ/R	: İskemi /reperfüzyon
JTBS	: Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LH	: Lüteinleştirici hormon
MDA	: Malondialdehit
miRNA	: Mikro RNA
MR	: Manyetik rezonans
mRNA	: Haberci RNA
MVBs	: Multiveziküler Cisimcikler
NBT	: Nitroblue tetrazolium
NEC	: Nekrotizan enterokolit
PBS	: Pelleti fosfat tamponlu salin
RNA	: Ribonükleik asit
siRNA	: Girişimci RNA
SOD	: Superoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SRY	: Sex-determining Region Y
T/D	: Torsiyon/detorsiyon
TBA	: Tiyoarbiturik asit
TT	: Testis torsiyonu
USG	: Ultrasonografi
WBC	: Beyaz kan hücresi

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
1	Başlıca antioksidanlar 19
2	Çalışma Grupları 28
3	Anne sütü eksozomlarında protein miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafiği 32
4	% 5-12'lik (2x1mm) SDS poliakrilamid jelinin hazırlanışı..... 34
5.	Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı 39
6	Doku MDA seviyesi ölçümü için standart grafiği 39
7	SOD Aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı..... 41
8	SOD Aktivitesi İçin Standart Konsantrasyonların Logaritmasına Karşı % İnhibisyon Grafiği..... 41
9.	Katalaz Aktivite Tayini İçin Yapılan Reaksiyon Karışım 42
10	SOD ve CAT seviyesini belirlemek için yapılan protein miktarını hesaplamada kullanılan standart grafiği 43
11	MDA Seviyesini Belirlemek İçin Yapılan Protein Miktarını Hesaplamada Kullanılan Standart Grafiği 43
12	Johnsen testiküler biyopsi skorlaması..... 44
13	MDA enziminin değerlendirilmesi 45
14.	SOD enziminin değerlendirilmesi..... 46
15	CAT enziminin değerlendirilmesi 46
16	GPX enziminin değerlendirilmesi..... 46
17	Histopatolojik değerlendirme sonuçlarının gruplara göre dağılımı 49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
1	Testis anatomisi..... 5
2	Testisin arteryal ve venöz damarları 6
3	İnterstisyel doku ile seminifer tübülün bir parçası..... 8
4.	Testosteron, FSH ve LH’ın erkek üreme sistemi üzerine etkisi..... 9
5	Spermatogenez 10
6	a. Normal testis anatomisi, b. Tunika vajinalisin testise anormal fiksasyonu ile birlikte çan tokmağı deformitesi, c. Torsiyone testis. 13
7	Serbest oksijen radikallerinin dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri..... 18
8	Hücre hasarlanmasında sitoplazmik kalsiyum artışının nedenleri ve sonuçları . 19
9	Eksozomların oluşumu ve hücreden salınımı 22
10	Eksozomların biyogenezisi ve tanımlama belirteçleri: CD81, CD63, TSG101, seramid, flotilin ve Alix 22
11	Eksozomların Hedef Hücreye Alınım Yolları 23
12	Akut cilt yarası için ekzosom tedavisinin mekanizması 24
13	Ekstrasellüler vezikül üretimi 38
14	Anne Sütü Eksozomlarının Western Blot ile Doğrulanması..... 45

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa No
1	Torsiyone testis ve dönmüş spermatik kord.....	12
2	Preoperatif hazırlık	29
3	Peroperatif görüntü	29
4	Sol testis eksplorasyonu.....	30
5	Sol testis torsiyonu (720°)	30
6	Torsiyone testisin tespiti	30
7	4 saatlik iskemi sonrası.....	30
8	Orşioektomi materyalleri	30
9	Eksozom	32
10	Grup 1 Kontrol: HE X 400 BBA* Doğal histolojik görünüme sahip seminifer tübül yapısı	47
11	Grup 2 Torsiyon: HE X 100 BBA* Tamamı nekrotik görünümde, canlı hücre içermeyen seminfer tübüller	48
12	Grup 3 Lokal: HE X 400 BBA* Lümenleri açık fakat sadece sertoli hücresi (kırmızı ok) içeren (spermatogonia içermeyen) seminfer tübüller	48
13	Grup 4 Intraperitoneal: HE X 400 BBA* Çok sayıda matür spermatozoa (mavi ok) içeren seminfer tübüller	49

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Testis torsiyonu (TT), yenidoğan ve adolesan yaş gruplarında olmak üzere bimodal dağılım gösteren bununla birlikte her yaş grubunda görülebilen ürolojik acil cerrahi bir durumdur. Teşhis ve tedavisinde hızlı olunmalıdır. 25 yaşından küçük erkeklerde insidansı 1/4000'dir. Testis torsiyonunda tüm başarılı cerrahi tedaviye rağmen %40-60'ında testiküler atrofi ve infertilite gelişmektedir(1).

Testis torsiyonu tanısı ağrının ortaya çıkmasıyla beraber ilk 4-6 saat içerisinde konulmalıdır (2).

4-6 saat içerisinde tedavi edilmez ise başlayan doku iskemisi ile germ hücreleri ölmeye başlar ki bu da fertilitenin azalmasına hatta infertiliteye yol açar(3)(4).

Yapılan deneysel çalışmalar ile testis dokusunda iskemide en duyarlı hücrelerin başında germ hücreleri olduğu bulunmuştur(5).

Testis torsiyonu sırasında oluşan iskei ile ortaya çıkan serbest oksijen radikallerine (SOR) bağı olarak oksidatif stres ve inflamasyon meydana gelmektedir(6).

İskei oluşan dokularda canlılığın korunabilmesi için en kısa sürede doku reperfüzyonu sağlanmalıdır. Testisin detorsiyonu sonrasında reperfüzyonun da hücresel hasara neden olduğu, bu hasarın SOR üretiminde ve nötrofil infiltrasyonundaki artış ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. Bu süreçte iskei /reperfüzyon (İR) hasarı ile meydana gelen radikaller, hücre membranında bulunan lipidlerin peroksidasyonuna, proteinlerin denaturasyonuna ve DNA hasarına sebep olur(7).

Son yıllarda testis iskei/reperfüzyon (İR) hasarını en aza indirmek hatta önlemek için etkili stratejiler ve ilaçlar bulmak amaçlanmıştır. Ancak klinik pratiğe yansıyan etkin bir ilaç ya da molekülde ortak fikre varılamamıştır. Morbidite oranlarını azaltmak için yeni terapötik ajanların geliştirilmesine acilen ihtiyaç duyulmaktadır.

Eksozomlar bilinen tüm hücreler tarafından ortama salınan nanokeseciklerdir. 1980'li yıllarda ilk keşiflerini takiben sadece istenmeyen molekülleri hücre dışına ataktan sorumlu hücre artıkları olarak anılsalar da son 20 yılda yapılan çalışmalar bu keseciklerin önemli fizyolojik görevleri olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Tükürük, idrar, plazma, anne sütü ve daha pek çok vücut sıvılarından elde edilebilen eksozom adındaki keseciklerin hücreler arası iletişim, sinyal iletimi, genetik materyal

transferi ve immünolojik yanıtın düzenlenmesi gibi birçok biyolojik aktivitede önemli rol almaktadır. Tüm bu görevleri göz önüne alındığında eksozomlar hem tanı hem de tedavide kullanılabilir. Farklı hücrelerden köken alan eksozomların immün baskılayıcı ve etkinleştirci özelliklerinin bulunması otoimmün ve immün baskılama gibi durumlarda, immün işlevin düzenlenmesini sağlayacak terapötik uygulamaları söz konusudur. Bunun yanı sıra, doğal bir nanotaşıyıcı olmalarından dolayı eksozomlar hem adjuvanın hem de antijenin taşınabildiği yeni nesil aşıların tasarımına olanak sağlamaktadır. Eksozomların tedavi edici uygulamalarının yanı sıra hastalık patogenezerinde rol almasından dolayı prostat kanseri, glioblastom, akciğer yassı hücreli karsinomu ve hepatoselüler karsinom gibi kanser çeşitlerinin tanısında da kullanılabileceğine dair bulgular vardır(8).

Son yıllardaki çalışmalarda görülen o ki anne sütünde de yüksek konsantrasyonda eksozomların olduğu kanıtlanmıştır. Anne sütü eksozomunun bazı çalışmalarda özellikle nekrotizan enterokolit ve korozif özofagus modellerinde pozitif sonuçlara sebep olduğu gösterilmiştir.

Daha önce iskemik testis detorsiyon sonrası canlılığının korunmasında çeşitli tedavi yöntemleri klinik ve deneysel olarak çalışılmıştır. Anne sütü eksozomu testis torsiyonunda akut dönem için değerlendirilmiş ve umut vaat eden verilere ulaşılmıştır. Ancak literatürde testis torsiyonunun kronik dönem içerisinde sahip olduğu patofizyolojik değişiklikler ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır. Hatta bir çalışmada testislerin 6 aylık takibinde orşiektomi ya da orşiopeksi yapılmasının gelecekteki fertilite üzerine etkisi olmadığı, karşı testislerin fertiliteyi devam ettirecek düzeyde sağlıklı hale geldiği ve yerinde bırakılan tüm detorsiyone testislerin ise atrofiye gittiği görülmüş (9).

Bizim kliniğimizde daha önce yapılmış olan testis torsiyon modelinde anne sütü eksozomunun değerlendirilmesi adlı çalışmada akut dönem etkiler biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirilmiş ve verilen anne sütü eksozomu ile tedaviyi destekleyecek nitelikte istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (10).

Biz de bu çalışmamızda anne sütünün yenidoğan döneminden elde edilen eksozomun testis torsiyonunda  /R hasarına karşı koruyucu etkisini ve bunun bir tedavi şekli olarak kullanılabilirliğinin kronik dönemde etkinliğinin araştırılmasını amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Embriyolojisi

İlkel gonadlar, embriyonun 4. haftasında mezodermal kökenli genital kabarcıklardan gelişmeye başlar(11).

Fertilizasyondaki spermin kromozomal yapısına bağlı olarak (xx veya xy) gonad üzerindeki erkek veya dişi ilk farklılaşma 7. haftada gonadda gözlenir(12).

Embriyonun cinsiyeti, Y kromozomunda bulunan SRY (Sex-determining Region Y) geninin varlığı ile belirlenir. Bu gen, testislerin gelişimini başlatır(13).

Testislerin gelişiminin ardından diferansiyasyon safhası başlar. SRY geninin etkisiyle, gonadların medüller kısmı testis kordlarına dönüşür. Bu kordlar, ilerde seminifer tübüllere dönüşecek olan yapıların temelini oluşturur(14). Testisin kortikal kısmı ise dejenere olur(15).

Testis kordlarının gelişmesiyle birlikte, Leydig hücreleri ve Sertoli hücreleri de oluşur. Leydig hücreleri testosteron salgılar, iç ve dış genital yapıların erkeksi özellikler kazanmasını sağlar. Sertoli hücreleri ise sperm hücrelerinin gelişimini destekler(13).

Başlangıçta testisler böbreklerin yakınında yer alır. 8-15. Haftalar arasında gerçekleşen transabdominal iniş sırasında, gubernakulum adı verilen bağ dokusu yapısının çekmesiyle aşağıya doğru hareket eder(16).

Sonuç olarak; gubernakulumun genişlemesi-migrasyonu, kraniyal süspansör ligamanın regrese olması karın ön duvarının normal olarak gelişmesi, karın içi organların oluşması ve diğer faktörlerin de etkisi ile testis 12. haftada internal inguinal ring hızasına iner ve transabdominal iniş tamamlanır. Ardından inguinokrotal faz başlar. Prosessus vajinalis, intrauterin hayatın 3. ayında peritondan bir cep olarak gubernakulum boyunca inguinal kanala uzanır. Testisler inguinal kanaldan geçip skrotuma inerler ve sonrasında ise prosessus vajinalis katlantısı ile sarılırlar. Testisin skrotuma inişi 35. haftada tamamlanır. Inguinal kanal içindeki prosessus vajinalis % 85 oranında oblitere olur(17).

2.2. Testis Anatomisi

Sağlıklı erişkin insanda skrotum içerisinde 2 adet testis bulunmaktadır(18). Testisin 2/3 anterolateral kısmı serbest haldeyken, posterolateral yüzü epididim, bağ dokusu ve damarlarla sarılıdır(19). Testisler oval yapıda olup ortalama 15-20 ml hacminde ve 4×3×2,5 cm boyutlarındadır. Sol testis genelde sağdakine göre 1 cm daha aşağıda yer alır (20).

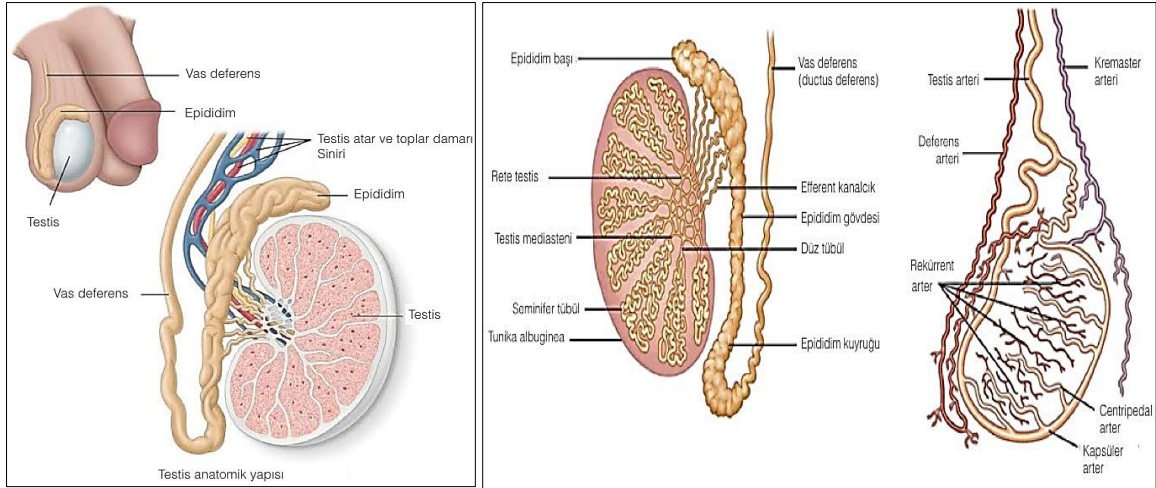
Skrotum, dartos kası adı verilen ince bir kas tabakası içerir. Skrotum, testisleri travmadan korur ve sperm üretimi için gerekli olan düşük sıcaklığı sağlar(21).

Testis dıştan içe doğru tunika vaginalis, tunica albuginea ve tunica vaskulosa adları verilen 3 yapının oluşturduğu sert bir kapsül ile kaplıdır. Peritondan kaynaklanan tunika vaginalis, visseral ve parietal 2 tabakadan oluşur(19). Visseral tabaka testisin yüzeyini kaplarken, parietal tabaka skrotumun iç yüzeyine yapışmıştır. Bu zarlar arasında ince bir sıvı tabakası bulunur, bu da testislerin hareket etmesini kolaylaştırır(22).

Testisin dışında, kalın ve fibröz bir kapsül olan tunica albuginea bulunur. Bu kapsül hem testisin iç yapısını korur ve destekler hem de testisin iç kısmına doğru uzantılar göndererek lobülleri oluşturur (21).

Testis içindeki yaklaşık 250 lobül, tunica albuginea tarafından oluşturulan septalarla ayrılmıştır. Her lobül, ortalama 1-4 kıvrımlı seminifer tübül içerir. Seminifer tübüller, spermatogenez adı verilen süreçle sperm hücrelerini üretir. Bu tübüller, spermatogonial hücrelerden olgun spermatozoa oluşumuna kadar çeşitli gelişim aşamalarındaki hücreleri içerir(23).

Seminifer tübüller, testisin merkezine yakın bir bölgede bulunan ve tübüllerin birleştiği bir ağ olan rete testise bağlanır. Rete testis, spermleri efferent kanallar aracılığıyla epididimise taşır(24).



Şekil 1. Testis anatomisi (25)

Seminifer tübüllerin içinde bulunan Sertoli hücreleri, sperm hücrelerinin beslenmesi ve desteklenmesi için gereklidir. Sertoli hücreleri, spermatogenez sürecinde önemli rol oynar ve kan-testis bariyerini oluşturur. Bu bariyer, immün sistemin sperm hücrelerine saldırmasını önler(24).Seminifer tübüller arasındaki bağ dokusunda bulunan Leydig hücreleri vardır ve bunlar testosteron üretir. Testosteron, erkek cinsiyet özelliklerinin gelişimi ve spermatogenezin sürdürülmesi için gereklidir. Leydig hücreleri, fetal gelişim sırasında da aktif olup erkek genital sisteminin farklılaşmasını sağlar(26).

Abdominal aortadan çıkan testiküler arter (internal spermatik arter) testislere kan akımını sağlayan ana arterdir. Testis kan akımının 2/3'ünü sağlar. Testiküler arter, abdominal aortadan, renal arterin hemen altından L2 seviyesinde çıkar. Retroperitoneal olarak ilerleyerek üreter ve eksternal iliak arterin alt kısmını çaprazlar ve inguinal kanal iç halkasında spermatik korda katılır. Orta pol posteriorda, epididimisin altında tunikayı oblik olarak geçerek testise girip dallanarak geniş bir kapiller ağ oluşturur. Testis ve spermatik kordun bazı kısımlarına kan sağlayan kremasterik arter (a. cremasterica), inferior epigastrik arterden dallanır. Kremasterik kasın içinde ilerleyerek testislere ulaşır ve testislerin yüzeysel bölgelerine kan akımı sağlar (24) (27) (28).

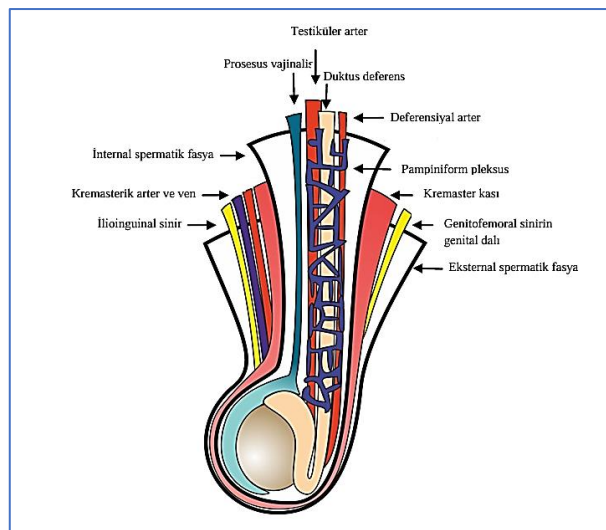
Ductus deferens arteri (a. ductus deferentis), genellikle inferior vezikal arterden kaynaklanır ve ductus deferens boyunca ilerleyerek testis ve epididimise küçük dallar verir. Bu arter, testis ve epididimis için ek kan kaynağı sağlar (13). Testiküler arter, alt polde deferensiyel ve kremasterik arterlerle, üst polde ise deferensiyel arter ile anastomoz yapar. Üç arter de testiküler mediastinumda anastomoz yaparak, testisin kanlanmasını sağlar (27).

Testislerin venöz drenajı, pampiniform pleksus adı verilen bir damar ağı aracılığıyla gerçekleşir. Pampiniform pleksus, testis arterinin etrafını sarar ve soğuk venöz kanın, arteriyel kanı soğutmasına olanak tanıyan bir termoregülasyon sistemi oluşturur. Bu mekanizma, testislerin sıcaklığını düzenlemede kritik öneme sahiptir (29). Pampiniform pleksus, testisin üst kısmında v. Testicularis'e dönüşür. Sağ testiküler ven, doğrudan inferior vena kavaya (IVC) oblik drenaj yaparken, sol testiküler ven ise sol renal venaya dik boşalır(30). Sol internal spermatic ven, sağdakine göre 8-10 cm daha uzundur (31).

Lenfatik drenaj, interlobülerden başlayan 4-8 arası lenf damarının spermatic kord içinden geçerek paraaortik, interaortokaval ve perikaval lenf nodlarına dökülmesiyle sağlanır (32).

Testisin sinirsel innervasyonundan T5-T12 seviyesinden çıkan torasik ve splanknik sinirler sorumludur. Aynı zamanda, genitofemoral sinirin genital dalı (L1-L2) ve ilioluminal sinir (L1) inguinal kanala girerek innervasyonda görev alır. Genitofemoral sinirin genital dalı (L1-L2), kremasterik kasın innervasyonunu sağlarken; ilioluminal sinir (L1), penis kökünün derisinin, skrotum'un üst kısmının ve uyluğun üst medial bölümünün innervasyonundan sorumludur (33).

Seminifer tübüller etrafında görülmeyen lenfatik kapiller, interlobüler septadan başlar. Daha sonra spermatic kordu takip eder ve paraaortik, interaortokaval ve perikaval lenf düğümlerine açılırlar (34).



Şekil 2. Testisin arteriyel ve venöz damarları (35)

2.3. Testis Histolojisi

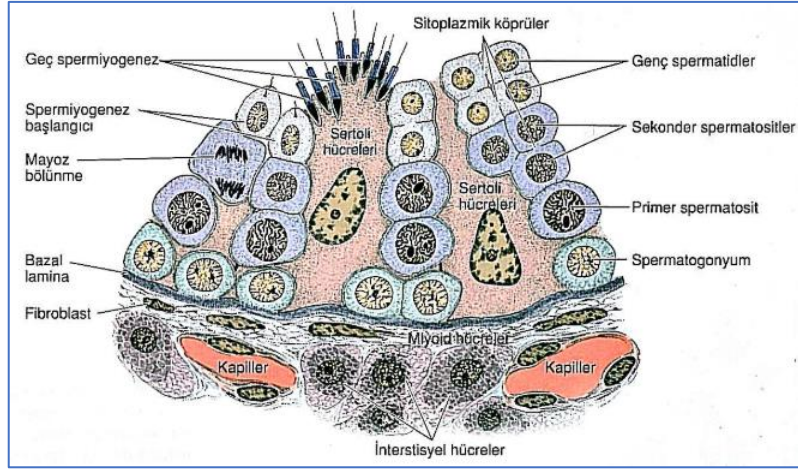
Testisler skrotumda yer alan bir çift organdır. Olgun testisin posterior yüzünde epididimis vardır. Skrotal kese içerisinde vas deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordon ile asılıdır. Bu yerleşimleri sayesinde kısmi mobilizasyon ile testislerin vücut ısısından 2-3 derece düşük bir ısıda olmalarını sağlar ki bu da normal bir spermatogenez için gerekli olan 34-35 derece ortam ısını mevcut kılar (36).

Testisler, fetal hayatta androjenlerin üretiminde, pubertede testosteron salgısı ile sperm üretimi ve sekonder seks karakterlerinin oluşmasında, yetişkin hayatta ise sperm üretiminin devamı ile sekonder seks karakterlerinin korunmasında görev oynar.

Üç tabakalı bir kapsülü vardır; dıştan içe doğru tunika vajinalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza olarak adlandırılır (37). Kapsülün en kalın ve belirgin tabakası tunika albugineadır. Yoğun bir fibroelastik bağ dokusundan meydana gelir, posteriorda kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Mediastenden tunika albugineaya doğru radyal olarak uzanan fibröz uzantılar organı yaklaşık 250 adet olan piramidal lobüllere ayırır. Testis lobülleri, son derece kıvrımlı kan damarı, sinir ve intersitisyel hücrelerden meydana gelen seminifer tübülleri oluşturur (38–40). Seminifer tübüller mediastinumda epitelle döşeli olan rete testis ile birleşir; rete testis ise sırasıyla duktuli efferentes ve epididim ile devam eder (41,42). Histolojik olarak seminifer tübüller üç bileşenden oluşur. Bunlar; lamina propria, sertoli hücreleri ve spermatojenik hücrelerdir (43,44). Spermatojenik hücreler sertoli hücrelerinin lateralinde bulunur. Bu iki hücre grubu arasındaki sıkı bağlantı kompleksi ile kan-testis bariyerini oluşturur(29) .

Spermatogenezde en immatür hücre spermatogonyadır ve bazal laminada yer alır. En olgun hücre olan spermatidler ise en üstte tübül lümeni kenarındadırlar (45).

Mediastinumun bağ dokusunda bulunan rete testis, duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır (46).



Şekil 3. İnterisyel doku ile seminifer tübülün bir parçası (47)

2.4. Testis Fizyolojisi

Testislerin iki ana işlevi vardır, bunlar; testosteron ile diğer testiküler androjenlerin salınması ve spermatogenezdir yani hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonu olan birleşik tübüler bir bezdir.

Testisler %30-35 interisyel aralık ve %65-70 seminifer tübüllerden oluşur. İnterisyel dokuda Leydig hücreleri, fibroblast, makrofajlar, mast hücreleri, kan damarları, sinirler ve lenfatikler bulunur. Testisin endokrin işlevini Leydig hücrelerinin salgıladığı testosteron gerçekleştirir(48).

Testosteron, en önemli androjenik hormondur. Ergenlik sırasında erkek bedenindeki ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişimi, fizyolojik değişiklikler, libido ve sperm olgunlaşmasını yönetirken puberteyle birlikte yetişkin erkeklerin yaşamı boyunca sperm üretimi ve seks gücünün korunmasında rol oynar (49).

Testosteron üretimi adenohipofizden salgılanan LH (lütinleştirici hormon) etkisiyle gerçekleşir. Testosteronun yükselince LH salgısı durur. LH dışında spermatogenezin başlaması ve devam etmesinde adenohipofizden salgılanan bir diğer hormon FSH (Folikül uyarıcı hormon) da etkilidir(50).

Testisin ekzokrin işlevi ise seminifer tübüllerin ekzokrin salgı ürünü olan spermatozoonlardır(50).

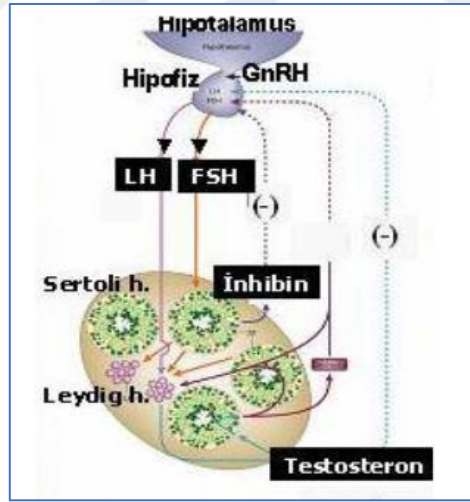
Seminifer tübüller ise peritübüler hücreler ve Sertoli hücrelerini barındırır. Peritübüler hücreler, seminifer tübüllerin etrafında konsantrik tabakalar oluşturur ve

spermatogenez için gerekli koşulları sağlar. Sertoli hücreleri, protein, sitokin, büyüme faktörleri, opioid, steroid ve prostaglandin sentezleyen ve salgılayan destek hücrelerdir. Ana görev olarak spermatogenez koordine eder ve spermatojenik hücreler ile kan-testis bariyerini oluştururlar (51).

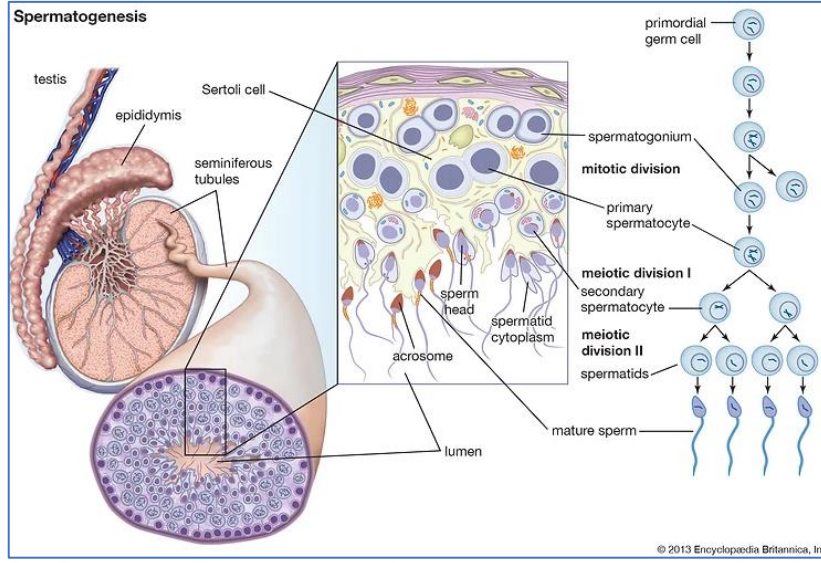
Spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar kan testis bariyeri ile kan desteğinden ayrı olduğu için, bu spermatogenik hücreler besin maddelerinin ve metabolitlerin alıp verilmesinde Sertoli hücrelerine gereksinim duyarlar. Kan-testis bariyerinin immünolojik anlamda da çok önemli bir işlevi vardır(50).

Sertoli hücreleri spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmelerinin düzenlenmesi yanı sıra fagositoz, sekresyon, Anti-Müllerian Hormon (AMH) üretimi gibi görevlere de sahiptir(46).

Spermatogenezin başlaması için testosteron gereklidir. Aynı zamanda hipotalamus-hipofiz-gonadlar ekseninin çalışması ile FSH salgılanıp sertoli hücreleri uyarılıp spermiyogenez gerçekleşir ve olgun spermatidler oluşur (52).



Şekil 4. Testosteron, FSH ve LH'nin erkek üreme sistemi üzerine etkisi



Şekil 5. Spermatogenez

2.5 Testis Torsiyonu

2.5.1 Tanımı, Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Testis torsiyonu 1800'li yıllarda Hunter tarafından tanımlanmıştır (53). Ombredanne, 1917 yılında orşitli infantlarda torsiyonu atlamamak için erken skrotal eksplorasyon önermiştir(54).

Spermatik kord yapılarının vertikal ekseninde dönmesi sonucunda testisin ve eklerinin dolaşımının bozulmasına ve buna bağlı olarak kalıcı iskemik yaralanmaya sebep olabilen acil bir durumdur (55,56).

Puberte (%65 ve ortalama yaş 13) ve yenidoğan dönemi olmak üzere iki yaş aralığında pik yapar. Görülme sıklığı daha sonra yavaş yavaş azalır(57,58).

Testis torsiyonu sol tarafta sağa göre iki misli daha fazla görülür, bu durumun da sol kordun daha uzun olmasına bağlı olabileceği belirtilmiştir. Ameliyat edilmemiş inmemiş testislerde ve ektopik testislerde torsiyon riski artmaktadır(59) .

Akut skrotum tablosu ile başvuran hastaların yaklaşık sadece %30'unda testis torsiyonu görülmektedir(60).

Ayakta duran çocukta testisin vertikal yerine horizontal durması torsiyonu destekler. Normalde skrotumda aşağıda yer alan testisin, dönme sonucunda skrotum üst kısmına çıkması ve yukarı kaldırmakla testisteki ağrının artması (Prehn belirtisi) torsiyonu lehinedir.

Klinik olarak testis torsiyonu olgularında epididimiorşitten farklı olarak ısı artışı yoktur. Laboratuar bulgularında da lökositoz genellikle saptanmaz(61).

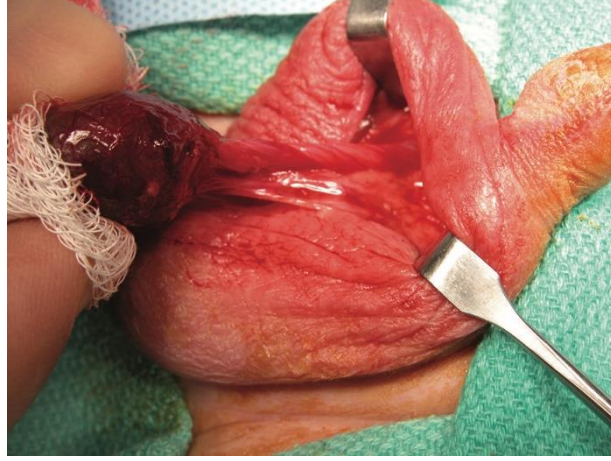
Testis torsiyonu, intravajinal testis torsiyonu (en sık), extravajinal testis torsiyonu ve testis eklerinin torsiyonu (appendiks testis ve epididim torsiyonu) olarak alt bölümlere ayrılabilir (62).

Torsiyonun kesin nedeni bilinmemektedir ancak çeşitli kolaylaştırıcı etkenlerden söz edilmektedir.

Testis torsiyonunun en önemli etiyolojik faktörü çan tokmağı deformitesidir (Bell-clapper deformitesi) ve intravajinal testis torsiyonu vakalarında görülür. Normalde testis, tunika vajinalis tarafından, posterolateraldeki skrotuma tutunma bölgesi haricinde çepeçevre sarılı durur. Bu deformitede tunika vajinalis testisi tamamen sararak yukarı doğru uzanır ve testisin skrotum duvarına posterolateral fiksasyonunu engelleyerek testisin tunika vajinalis içinde havada asılı kalmasına dolayısı ile spermatik kordonun vertikal aksı etrafında serbestçe dönebilmesine neden olur(63).

Ekstravajinal torsiyonun nedenleri arasında ise yenidoğan testisinde tunikal bağlantıların zayıflığı veya yokluğu ve perinatal testiküler dokulardaki elastikiyet ve aşırı hareketlilik, inmemiş testiste anormal gubernakulum bağlantıları sayılabilir(64–68).

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 (69,70).



Resim 1. Torsiyone testis ve dönmüş spermatik kord (71)

2.5.2 Patogenezi

Testis torsiyonunun başlangıcında venöz tıkanıklık başlar, buna bağlı olarak testiste ödem ve ağrı meydana gelir. Testisin tunikası elastik olmadığından venöz konjesyon arteriel dolaşımın bozulmasına neden olur. İlk olarak venöz tromboz, daha sonra da arteriel tromboz ve bunların sonucunda testiküler infarkt meydana gelir.

Yapılan çalışmalarda başta spermatogonia ve spermatositler olmak üzere germ hücrelerinin iskemiye karşı yüksek duyarlılığa sahip olduğu saptanmıştır. Germ hücrelerine kıyasla testosteron üretiminden sorumlu Leydig hücrelerinin ise iskemiye daha dirençli olduğu gösterilmiştir (72). Torsiyon sonucunda gelişen testiküler hasar, torsiyonun derecesi ve süresi ile yakından ilişkilidir (73,74). Yapılan çalışmalarda kan akımının tamamen kesilmesi için 720°'lik bir torsiyona gereksinim olduğu anlaşılmıştır(75). Etkilenen testisin nekrozunu önlemek için yapılan acil müdahale etmek gerekir. Buna rağmen 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 (76,77). Bu hastaların başarılı bir cerrahiye rağmen %40-60'ında testiküler atrofi ve infertilite geliştiği görülmüştür (78).

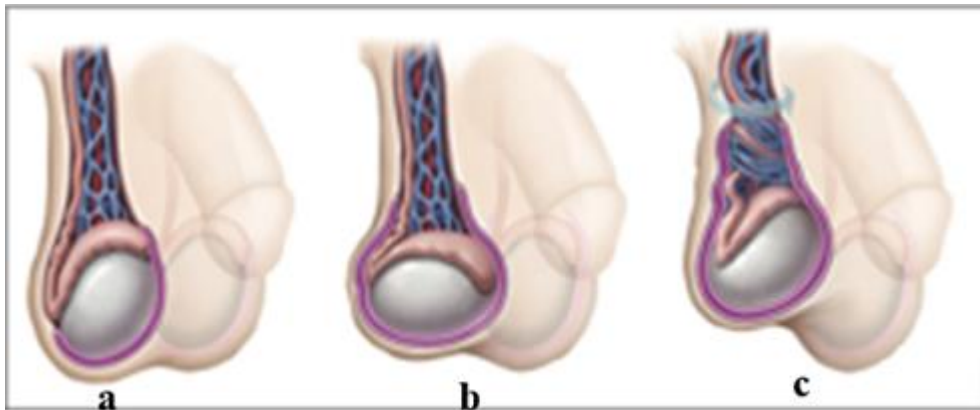
Torsiyon esnasında gelişen testiküler hasarı iki döneme ayırabiliriz. Arteryel akımın kesildiği ve oksijen sunumunun azaldığı iskemik hasar dönemi ve ardından detorsiyon sonrasında açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin neden olduğu reperfüzyon hasarı dönemi gelir.

2.5.3 Tipleri

Ekstravajinal torsiyon (%10), perinatal dönemde görülen torsiyon tipidir. Genelde intrauterin dönemde görülür (%70). Doğumdan hemen sonra ya da sağlıklı yenidoğanda da (%30) akut olarak gelişebilir. Torsiyon tunika vaginalisin yapıştığı yerin hemen üzerinden testisin longitudinal aksı boyunca olur. Bu dönemde testisin skrotuma inişi ile testiküler fiksasyon tamamlanamamış olması sebep gösterilmektedir. İntrauterin torsiyonlar ‘vanishing testis’ sendromundan sorumlu tutulur. Bu grupta hasar ağırdır ve testis sıklıkla kaybolmuştur. Doğum sırasında fark edilen torsiyone testisler için de durum çok farklı olmadığından elektif şartlarda orşiektomi önerilmektedir(79).

İntravajinal torsiyon (%90), spermatik kordun tunika vaginalise yapıştığı noktanın distalinde torsiyone olmasıdır. Genelde peripubertal yaş grubunda rastlanır. Ekstravajinal torsiyondan farklı olarak anatomik predispozan yapı mevcuttur; Bell-Clapper deformitesi. Burada kremasterin kasılması, spermatik kordu kısaltarak torsiyonu başlatır(79). Kasların kontraksiyonu ile sağ testis saat yönünde, sol testis ise saat yönünün tersi yönde torsiyone olur. Gelişimsel bir anomali olduğundan bilateral olma ihtimali diğer tiplere göre yüksektir(80–82).

Diğer torsiyon tipi olarak testis eklerinin torsiyonundan bahsetmek gerekir ki bu durum appendiks testis ve epididimislerin üst kısımlarında bulunan embriyolojik kalıntıların torsiyonu ile gelişen akut patolojilerdir. Genelde 16 yaş öncesi gözlenir. Ani başlangıçlı ağrının ardından testisin veya epididimisin üst bölümünde kitle ele gelmesi patognomiktir. Appendiks torsiyonunda skrotum cildinde mavi-nokta bulgusu ‘blue-dot sign’ gözlenirken, palpasyonda appendiks ödemli ve şiş ama testis normal palpe edilir (83).



Şekil 6. a. Normal testis anatomisi, b. Tunika vaginalisin testise anormal fiksasyonu ile birlikte çan tokmağı deformitesi, c. Torsiyone testis (77).

2.5.4 Klinik, Tanı ve Tedavi

En belirgin yakınma ani başlayan skrotal ağrıdır. Ağrı inguinal bölgeye ve karın alt kadrantlarına yayılabilir. Ağrının yanında bulantı, kusma gibi yakınmalar eşlik edebilir. Fizik muayenede testis büyük, hassas, üst skrotal yerleşimli ve horizontal konumdadır. Skrotumda kızarıklık ve ödem görülür(84). Genellikle kış aylarında, aktivite ve travmayı takiben ya da uyku esnasında gerçekleşebilir(85).

Erken safhalarda epididim önde palpe edilerek tanıya gidilebilir. Ancak birkaç saat sonra tüm gonadın şişmesinden dolayı palpasyon ile epididim ile testis ayrımı yapmak zorlaşır(86).

Koyu ve mavimsi renkte cilt rengi ve hemiskrotumun şiddetli iltihaplanması testisin nekroza gittiğini gösterir(87).

Testisin eleve edilmesi, vasküler oklüzyonu ve ağrıyı artırır, buna 'Pren bulgusu' denir. Pratikte epididimit ve orşit ile ayırıcı tanı için kullanılabilir, epididimit ve orşitte ağrı azalır (88).

Horizontal yerleşimli testisler torsiyona daha meyillidir. Bu anomaliye sahip çocukların anamnezinde geçmişte birçok kez testis ağrısı yaşamış oldukları ancak sonrasında bu ağrının kendiliğinden gerilediği dikkat çeker. Bu durum spontan detorsiyone olan torsiyon epizodlarını gösterir(86) .

Ani başlayan karın ağrısı ile kasıkta kitlesi olan ancak skrotumun boş saptandığı hastalarda inmemiş testisin torsiyone olabileceği akla gelmelidir(67).

Rabinowitz, kremaster refleks kaybının testis torsiyonu ile %100 uyumlu olduğunu göstermiştir(64). Karamazyn ve arkadaşları çalışmalarında kremaster refleksinin kaybolmasının torsiyon ile birlikteliğini %90 olarak verirken diğer akut skrotum tablolarında ise bu refleksin %75 oranında devam ettiğini belirtmiştir(89).

Testis torsiyonunun tanısında anamnez ve fizik muayene çok önemlidir. Anamnez ve fizik muayene testis torsiyonu ile uyumlu ise vakit kaybetmeden cerrahi skrotal eksplorasyon yapılmalıdır çünkü hastalarda yapılacak laboratuvar testlerinin özel bir yeri yoktur. Ancak tanı şüpheli ise skrotal doppler ultrasonografi %88 sensitivite, %98 spesivite ve %1 yanlış negatiflik oranı ile büyük katkı sağlamaktadır. Doppler ultrasonda kan akımının azalması ya da kaybolması torsiyon; artması epididimit-orşit lehinedir(90–92).

Tanıda yardımcı olan diğer görüntüleme yöntemleri ise Teknesyum-99m ile yapılan radyonüklid sintigrafi ve manyetik rezonans (MR) dır ancak pratikte tercih edilmezler (93).

Akut skrotumlu hastalarda rutin olarak kan örnekleri alınır. Yükselmiş beyaz kan hücresi sayısı (WBC), C-reaktif protein (CRP) ve eritrosit sedimantasyon hızı (ESR), çeşitli serum proteinlerinin konsantrasyonlarındaki pozitif değişiklikler akut skrotumun enflamatuvar nedenlerini ön planda tutar. İdrar tahlilinde piyüri olması ve lökositoz daha çok epididimitte karşımıza çıkar(94).

Aksi ispat edilene kadar her akut skrotum testis torsiyonu olarak değerlendirilmelidir. Testis perfüzyonundan şüphe var ise vakit kaybetmeden cerrahi eksplorasyon yapılmalıdır (95).

Cerrahi öncesinde manuel redüksiyon denemeyi öneren yazarlar da mevcuttur. Testis laterale doğru iki ya da üç kez detorsiyone edildiğinde ağrının aniden rahatlaması, kaybolması torsiyonun düzeldiğine işaret eder. Doppler USG ile akımın varlığı teyit edilebilir. Ancak manuel redüksiyon sadece zaman kazandırır(68,82,96) .

Detorsiyone edilen vakalara bilateral testiküler fiksasyon uygulanmalıdır. Etkilenen testise bekleme süresince buz ile terapötik olarak soğutma uygulanmasının ratlarda ve insanlarda iskemiyi azalttığına yönelik kanıtlar mevcuttur(97).

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(98–100).

Eksplorasyonda testis ve spermatik kord detorsiyone edilir ve testisin reperfüzyonuna bakılır. Testise sıcak serum fizyolojik ile gazlı bezlerle kompres yapılır. Etkilenen testisin reperfüzyonu iyiye ve testis doğal rengine döndüyse testis fiksasyonu (orşiopeksi) uygulanır (65).

Operasyon esnasında karşı skrotum da değerlendirilmelidir. 'Bell clapper' deformitesi sıklıkla bilateral görüldüğü için sonrasında karşı testiste de torsiyon olma ihtimali yaklaşık olarak %80 olduğundan fiksasyon bilateral yapılmalıdır(101–104).

Testis torsiyon sonrası nekroza gittiyse orşiektominin yanı sıra karşı testiste de torsiyon gelişimini önlemek için profilaktik olarak fiksasyon yapılır. Testisin canlılığını değerlendirmek için tunika albuginea üzerine insizyon yapılarak kanama olup olmadığına bakılabilir (105,106).

Testis nekroze değil ve korunacak ise testisin tespit sütürü konmadan oluşturulmuş olan dartos poşuna yerleştirilmesi önerilmektedir. Bellinger ve arkadaşları tunika albuginea'ya dikiş koymanın oluşturabileceği lokal reaksiyonların testise zarar verebileceğini göstermiştir(107).

İskeminin kan-testis bariyerinde hasara neden olduğu ve çocuk yaş grubunda kendi spermatogoniasına karşı otoimmünizasyon riski oluşturduğu bilinmektedir. Adölesan dönemde iskemik testisin fiks edilmesinin erişkin dönemde spermatogenesis ile ilgili sorunlara neden olduğu saptanmıştır. Yaş faktörü orşioektomi kararı için belirleyicidir. On yaşından küçük çocuklarda, spermatogenesis tam oluşmadığından ve kan-testis bariyeri olmadığından şüpheli testis eksize edilmeyebilir. On yaşından büyük iskemik testis saptanan çocuklarda ise orşioektomi yapılması önerilir (108,109).

Literatürdeki orşioektomi oranlarının %39 ile %71 arasında olduğu görülmektedir. Orşioektomi ve testis detorsiyonu + orşiopeksi sonrasındaki karşılaştırmada semen kalitesi benzer bulunmuş ancak orşioektomi yapılan grupta semen morfolojisi daha iyi saptanmıştır(110,111).

2.6. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İskemide hasarın derecesi hipoksinin derinliği ve süresine bağlı olarak değişir. Geri dönüşümlü evrede müdahale edilmemesi durumunda hücre ölümü meydana gelir (112,113). İskemik organa geri dönüşümlü evrede kan akımının tekrar sağlanması hasarlanmayı önler, kaybolan hücre fonksiyonları geri kazanılır, fakat oluşan serbest oksijen radikallerine ve kandaki aktive edilmiş kan hücrelerine bağlı olarak “reperfüzyon hasarı” oluşur(114).

Testis torsiyonu sırasındaki iskemik ve bunu takiben detorsiyon sonucu reperfüzyon sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri hasardan başlıca sorumlu tutulur (115,116). 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 (117,118).

2.6.1. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

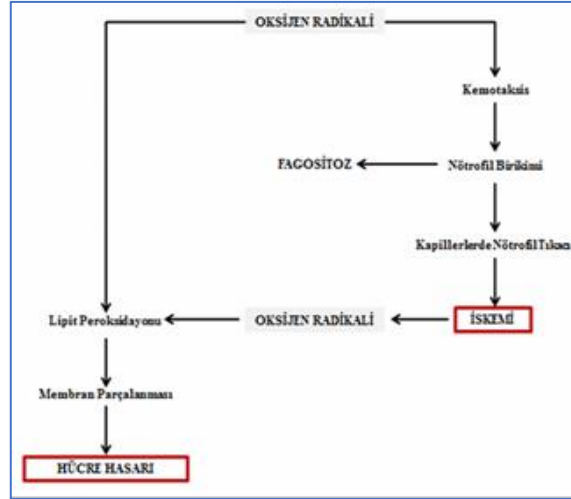
Serbest radikaller, fizyolojik ya da patolojik olaylar sonucunda meydana gelen ve kolayca elektron alışverişine giren moleküllerdir (119).

Biyolojik ve hücre içi olmak üzere iki ana kaynağı vardır. Biyolojik olanlar; aktive olmuş fagositlerin, radyasyonun, alkol ve uyuşturucunun, antineoplastik ajanların, çevresel ajanların ve stresin etkisi ile oluşunlardır. Enzimler ve proteinler (ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin), mitokondrial elektron transportu, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom P-450), peroksizomlar, oksidatif stres etkenleri (iskemi, travma) ile oluşunlar ise hücre içi kaynaklı serbest radikallerdir(120).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşunlardır ve bunlara serbest oksijen radikalleri adı verilir. Bunların arasında en önemlileri ise süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir (121).

Fizyolojik olarak serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünüdür. Yüksek düzeyde reaktif olan radikaller aynı zamanda potansiyel olarak zararlıdır (122). Antioksidanlar savunma sistemi oluşturarak serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bu radikallerin oluşturduğu hasarı önlerler. 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(123,124).

Serbest radikallerin hücre içi etkilerini özetlersek; DNA tahribi, nükleotid yapıli koenzim yıkımı, tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, protein ve lipidler ile kovalan bağılantılar yapması, enzim aktivitesinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler, mukopolisakkarid yıkımı, lipid peroksidasyonu, zar yapısının ve fonksiyonunun değişmesi, protein tahribatı, zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması, steroid ve yaşlılık pigmentlerinin birikimi sayılabilir. Serbest radikaller birçok hastalığın patogeneğinde rol oynarlar. Diabet ve komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriasis, romatoid artrit ve daha birçok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir(125).

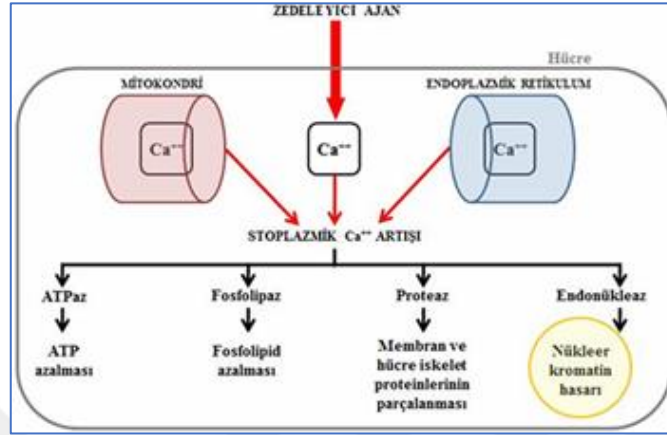


Şekil 7. Serbest oksijen radikallerinin dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri (126)

Oksijen yetersizliğinde oksidatif fosforilasyon gerçekleşemez. 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 (127). ATP olmadığında hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) dengesi sağlanamaz. Ca^{2+} 'un artması sonucunda proteolitik enzimler, fosfolipazlar aktive olur ve sitotoksik etki ortaya çıkar. Fosfolipazların aktivasyonu ile oluşan araşidonik asit, mitokondriyal enzimleri inhibe ederek serbest radikallerin oluşumunu hızlandırır ve hücre lizise uğrar (128,129). Birbirini izleyen bu olaylar sırasında granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır ve polizomlar monozomlara parçalanarak protein sentezi azalır hatta inhibe olur. Hipoksi devam ederse membran geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları azalır. Bu sırada mitokondriler normal, hafif yoğunlaşmış ya da şişmiş; endoplazmik retikulum ise genişlemiş olarak görülür(130).

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 aktifleştiririp 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 (131,132).

Serbest oksijen radikalleri hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna da yol açarak proteinleri denatüre eder ve hücre harabiyetine neden olur(133).



Şekil 8. Hücre hasarlanmasında sitoplazmik kalsiyum artışının nedenleri ve sonuçları (134)

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” adı verilir (135). Antoksidanlar SOR’ları parçalayarak su ve oksijen haline çevirirler(136). 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 (137). Antioksidanlar endojen ve eksojen olarak ayrılabilirler. Eksojen olanlar, vitaminler, ilaçlardan oluşur iken endojenler; enzim ve enzim olmayanlar olarak ikiye ayrılır(138).

Tablo 1. Başlıca antioksidanlar

Enzimler	Yağda Çözünen Radikal Tutucular	Suda Çözünen Radikal Tutucular	Metal İyonlarını Bağlayan Proteinler
Süperoksit dismutaz	E vitamini	İndirgenmiş glutatyon	Ferritin
Katalaz	B- karoten	C Vitamini	Transferrin
Glutatyon peroksidaz	Bilirubin	Ürik asit	Haptogloblin
Glutatyon transferaz	Ubiquinol	Glikoz	Hemopeksin
Glikoz 6 fosfat dehidrogenaz	Flavonoidler	Sistein	Seruloplazmin
Sitokrom oksidaz	Melatonin	Mukus	Albumin
		Taurin	Laktoferrin
		Sisteamin	

2.7. Testiste İskemi/Reperfüzyon Hasarı

Testis torsiyonunda venöz kan akışı azalır, ödem, hemoraji ve daha sonraki süreçte arteriyel tıkanıklık başlar ve iskemi gelişir (139). İskemi/reperfüzyon hasarı ile ortaya çıkan SOR'lara karşı testis oldukça duyarlıdır. Germ hücreleri oksidatif stres veya artan radyasyon karşısında ciddi şekilde hasar görüp ölürlür(140).

Oksidatif stres, spermlere 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 peroksidasyonunu başlatır ve bu kimyasal olay sonucu oluşan malondialdehit, spermatozoanın peroksizomal hasarını gösteren biyokimyasal testlerde kullanılır (141). Bu testler bozuk sperm fonksiyonları, hareket bozuklukları ve sperm-oosit füzyon kapasitesi ile ilgili bilgi verir (142).

Artmış SOR seviyelerinin, azalmış sperm motilitesi ile ilgili olduğu bilinmektedir ancak etki mekanizması tam olarak çözülememiştir (143). Bir hipoteze göre, H_2O_2 hücre membranını geçer ve heksoz monofosfat şantı yolu ile glukoz-6-fosfat dehidrojenaz gibi bazı hayati enzimlerin işlevini bozar (144). 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 (145).

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 (146). 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 (147). Y kromozomundaki DNA hasarı gen delesyonuna sebep olarak yeni kuşaklarda infertiliteye yol açabilir (148).

2.7.1. Testisin İskemik Hasarlanmalarında Antioksidan Tedavi

Yapılan çalışmalarda antioksidanların spermatozoayı SOR üreten anormal spermatozoalardan koruduğu, lökositlerin ürettiği SOR'u temizlediği, DNA kırılmalarını önlediği, sigara içenlerde semen kalitesini arttırdığı, soğğun spermatozoaya olan etkisini

azalttığı, erken sperm olgunlaşmasını engellediği ve spermatozoayı destekleyerek yardımcı üreme tekniklerinin başarısını arttırdığı gösterilmiştir. Seminal plazmada enzimatik antioksidan olarak süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz bulunurken vitamin C, ürat, vitamin E, piruvat, glutatyon, albumin, vitamin A, ubikinol ve hipotaurin gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da bulunur (149,150).

Literatürde testis torsiyonu ve detorsiyonunun bir tür iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı oluşturduğunu, inflamatuvar sitokinlerin açığa çıktığını, apoptozisin arttığını biyokimyasal ve histopatolojik olarak gösteren ve hasarın oluşumunu engellemeyi amaçlayan birçok yayın mevcuttur (151).

2.8. Eksozom

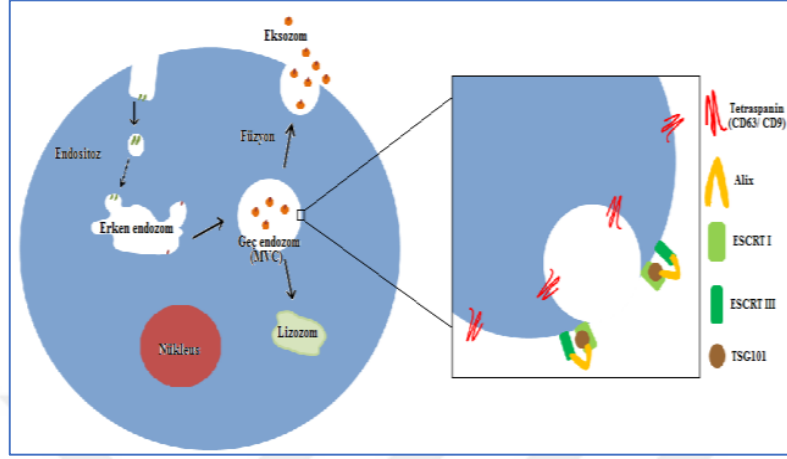
Eksozomlar, hücreler arası iletişimde önemli rol oynayan bilinen tüm hücrelerden salınan ektraveziküler yapıların en küçük birimidir. Çift tabakalı membranla çevrilidir ve 50-100 nm çapındadır. Bu veziküller, hücre içinde çeşitli biyomolekülleri (proteinler, lipitler, RNA ve DNA) taşıyarak hücreler arasında sinyal iletimini, genetik bilgi alışverişini ve alıcı hücrelerin yeniden programlanmasını sağlarlar. Farklı hücre kökenine sahip eksozomlar içinde, 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 barındırır. Kendilerine özgü biyogenez yollarına ve lipid kompozisyonlarına sahip olmaları ve taşıdıkları kargo ve boyutları (her türlü vücut engelinden geçebilirler) gibi özellikleri onları diğer hücre dışı keseciklerden ayırır(152).

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

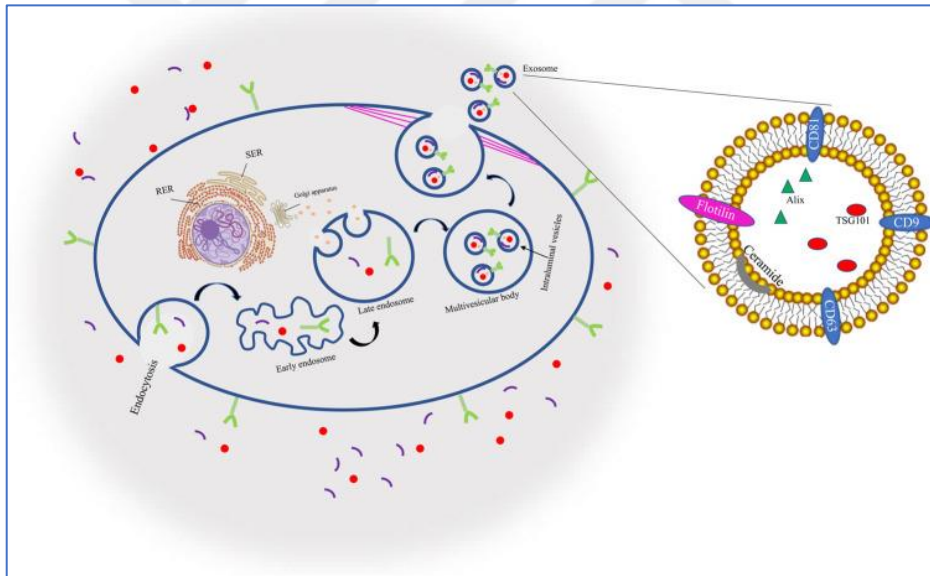
Eksozomlar, hücre içinde oluşan ve hücre zarından salınan küçük ekstraselüler veziküllerdir (153). Bu veziküller, çift katmanlı bir lipit zarla çevrili olup, içerdikleri çeşitli bileşenlerle hücreler arası iletişimi sağlarlar(154). Eksozomların yapıları, içerdikleri proteinler, nükleik asitler ve lipitlerle belirlenir(153). Özellikle eksozom zarında bulunan tetraspaninler (CD9, CD63, CD81) gibi proteinler ve çeşitli hücre yüzey reseptörleri, eksozomların tanınmasında ve hedef hücreye bağlanmasında önemli rol oynar(152).

Eksozomlar, hücre içinde endozomal yollarda oluşurlar. Hücre zarında içe doğru tomurcuklanma sonucu oluşan erken endozomlar intralüminal vezikülleri oluşturup ardından geç endozomlara dönüşür ve Multiveziküler Cisimcikler (MVBs) oluştururlar. MVB'lerin

içinde intralüminal veziküller (ILVs) bulunur ve bu ILV'ler, MVB'ler hücre zarı ile füzyon yaparak hücre dışına salınır ve eksozom oluştururlar(153).



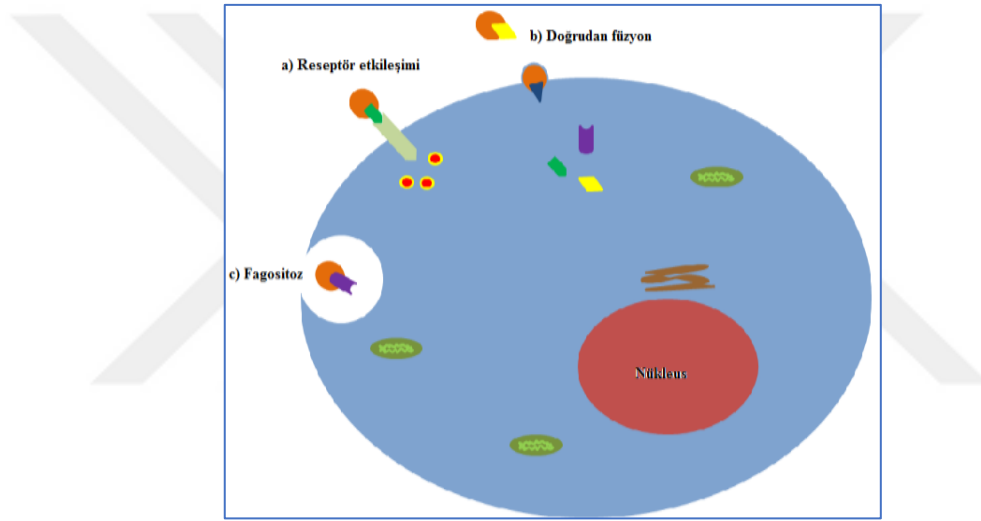
Şekil 9. Eksozomların oluşumu ve hücreden salınımı (155)



Şekil 10. Eksozomların biyogenezisi ve tanımlama belirteçleri: CD81, CD63, TSG101, seramid, flotilin ve Alix, (156)

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(157).

Eksozom içeriğinin hücreye alınması; reseptör aracılığıyla, füzyonla ve fagositozla olmak üzere üç farklı şekilde gerçekleşir (Şekil 4) (158). 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 (159,160). Doğrudan füzyonda, hücre zarı ve eksozom membranının doğrudan füzyonu sonucunda eksozom içeriği sitoplazmaya alınır (161). Fagositozda eksozom bütün olarak hücre içerisine alınır ve bu süreç, hücre içindeki çeşitli endozomal ve lizozomal yolları etkinleştirir(162).



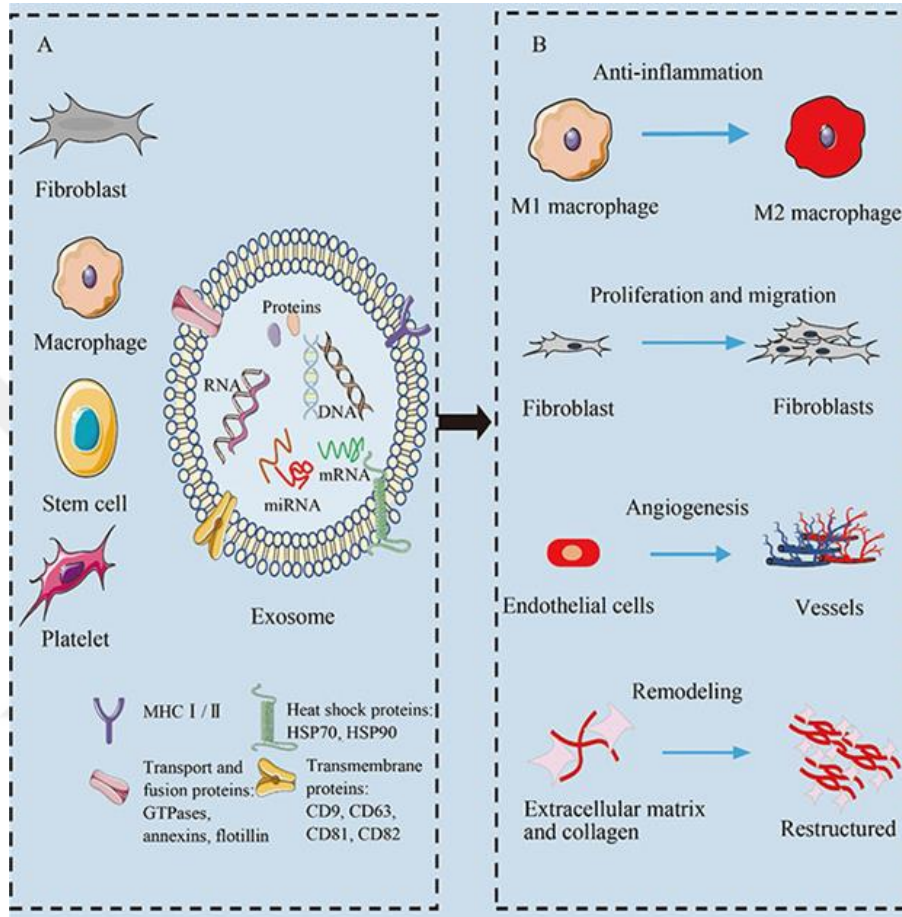
Şekil 11. Eksozomların Hedef Hücreye Alınım Yolları (163)

2.8.2. Eksozomların Fizyolojik Görevleri

Bağışıklık sisteminde, antijen sunumu ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde rol alan eksozomlar doku rejenerasyonunu teşvik ederler ve metastazlarda da rol oynayabilirler.

Eksozomlar, biyomedikal araştırmalarda ve klinik uygulamalarda önemli bir potansiyele sahiptir. Özellikle kanser, nörolojik hastalıklar, doku rejenerasyonu, otoyangısal ve otoimmün hastalıkların tedavisi gibi alanlarda kullanımları üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Eksozomlar, serum, plazma, idrar, amniyotik sıvı, anne sütü ve tükürük gibi vücut sıvılarında toplandığından biyomarker olarak hastalıkların tanısında ve prognozunda kullanılabilirler. Ayrıca, hücresel tedavilerde ve ilaç taşıma sistemlerinde potansiyel uygulamaları bulunmaktadır (152,164,165).

Kök hücrelerden elde edilen eksozomlar, doku onarımını teşvik edebilir ve yaralı dokunun iyileşme sürecini hızlandırabilir. Bu nedenle, eksozomlar doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında umut vaat eden bir strateji olabilirler (166).



Şekil 12. Akut cilt yarası için eksozom tedavisinin mekanizması

(A) Fibroblast, makrofaj, kök hücre ve trombosit gibi farklı hücresel kökenli eksozomlar. (B) Eksozomların yara iyileşmesindeki rolü, inflamatuvar reaksiyonları hafifletmek, fibroblastların çoğalmasını ve göçünü teşvik etmek, endotel hücrelerinin anjiyogenezini teşvik etmek ve hücre dışı matris ve kolajenin yeniden şekillenmesini hızlandırmaktır (167).

Semende bulunan eksozomların erkek fertilitesinde de önemli rol oynadığı bildirilmiştir (168,169).

2.8.3. Eksozomların Tanı ve Tedavideki Önemi

Eksozomları popüler yapan aslında protein ve lipid taşımalarından ziyade Hepatit C virüsü ile enfekte olmuş hasta kanları ile yapılan çalışmalarda hasta eksozomlarının virüs zar proteinlerine ait mRNA bulunması ve mast hücresi kökenli eksozomlarda miRNA bulunduğunun saptanması olmuştur (170,171).

Normal koşullarda eksozomlar genomik DNA içermiyor olsalar da yapılan bir çalışmada glioblastoma ve astrositoma hücrelerinden salınan eksozomların mitokondriyal DNA taşıdıkları gösterilmiştir (172).

Eksozomların tanısalları kullanımlarına yönelik en önemli kanıtlar prostat kanseri ile ilgili yapılan çalışmalarda bulunmuştur. Bu çalışmalarda belirlenen prostat kanseri belirteçlerinin, plazma ve serumdan elde edilen eksozomlarda da bulunduğu gösterilmiştir (173).

Ayrıca glioblastoma, akciğer yassı hücreli karsinomu ve hepatoselüler karsinom gibi kanser tiplerinin tanısında da eksozomların kullanılabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (174–176).

Eksozomların köken aldıkları hücrelere göre pleiotropik etki gösterme özelliğinden ötürü farklı biyomedikal uygulamalarda kullanımları yaygınlaşmıştır. İmmün kararlı dengenin sağlanmasında etkili olan eksozomlar, otoimmün ve immün yetmezlik durumlarında tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır ve immün hücrelerini etkiliyor olmaları aşılarda geliştirilmesinin de önünü açmaktadır. Eksozomların fizyolojik görevlerine ek olarak patolojik mekanizmalarda da var olmaları, eksozom tabanlı tanı yöntemlerinin oluşmasını sağlamaktadır (177).

Eksozomlar, yapıları gereği yapay taşıyıcılara göre önemli faydalar içermektedir. Kendi lipid kompozisyonlarından ötürü lipid içinde çözünen ilaçların taşınımında görevli olmakla beraber tüm vücut sıvılarında toplanabilmeleri hem düzgün biyodağılımlarının olduğunu hem de vücut sıvılarında kararlı bir yapıya sahip olduklarını göstermektedir. Ayrıca çok küçük olmaları sayesinde her türlü vücut engelinden geçebilmektedirler. Bu faydaları göz önüne alındığında farklı yükleme yöntemleri kullanılarak eksozomların tedavi edici amaçlı kullanımları yaygınlaşmaktadır (177).

Nörolojik hastalıkların tedavisinde eksozomlar üzerindeki araştırmalar git gide yaygınlaşmaktadır. Özellikle Alzheimer, Parkinson ve ALS gibi nörodejeneratif hastalıkların

üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Sinir hücreleri arasında iletişimi düzenleyen ve nöronal sağlığı etkileyebilecek faktörlerin eksozomlar aracılığıyla taşındığı düşünülmektedir (178).

Günümüzde yapılan çalışmalar, eksozomun oksidatif stres hasarını hafifletebileceğini göstermiştir ve çeşitli hastalıklara yönelik çalışma ağını genişletmiştir. Bunlara birkaç örnek vermek gerekirse;

Sun ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada deneysel karaciğer iskemik hasarına karşı eksozom ve melatoninin birlikte kullanılmasının etkili olduğunu bildirmişlerdir (179).

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 (180).

Lin ve ark.' da (2016), adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre ve eksozomun kombine olarak kullanılmasının sıçanlarda akut iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruma sağladığını bildirmişlerdir (181).

Angoulvant ve ark. (2011), kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreden eksozomlarının, miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığı bildirmiştir (182).

Yuyama ve ark. (2012), beyin mikrogliaları tarafından salınan eksozomların, amiloid- β plaklarının temizlenmesine katkıda bulunarak Alzheimer hastalığı patolojisini azaltabileceği öne sürülmüştür(183).

Hu ve ark. (2020), derleme çalışmasında, mesenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların kardiyovasküler hastalıklarda oksidatif stresi azaltıcı ve doku iyileşmesini teşvik edici etkilere sahip olduğu belirtilmiştir(184).

Zhou ve ark. (2021), eksozomların romatoid artritte anti-inflamatuar ve oksidatif stres azaltıcı etkilere sahip olabileceği ve hastalık belirtilerini hafifletebileceği öne sürülmüştür(185).

Sonuç olarak, eksozomlar önemli fizyolojik görevlere sahiptir. Birlikte köken aldığı hücreye ve durumuna göre farklı tip ve etkide eksozomun ortama salınması, eksozomların biyomedikal kullanımlarını hem tedaviye yönelik hem de tanıya yönelik uygulamalarda mümkün kılmaktadır.

Bu çalışma KTÜ Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından planlanıp 2023/16 protokol numaralı etik kurul izni alındıktan sonra Biyokimya ve Patoloji Anabilim

Dallarının katkılarıyla yapılmıştır. Çalışmada KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi tarafından sağlanan ağırlıkları 250-350 gram arasında olan 32 adet Sprague Dawley cinsi ratlar kullanıldı. Ameliyatlar KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarında yapıldı. Çalışmamız Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hazırlığı ve Yapılışı

Çalışmada ağırlıkları 300-350 gr arasında değişen toplam 32 adet Sprague Dawley cinsi rat, 4 eşit gruba ayrıldı. Deney süresi 6 hafta 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 4'er adet ve altlarında talaş olacak şekilde barındırıldı. Ratlar ameliyat öncesinde 24 saat aç bırakıldı ve bu süre içerisinde sadece su verildi. Her grupta 8 adet rat olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Oluşturulan gruplar Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışma Grupları

Grup 1	Sham grubu (kontrol)
Grup 2	Torsiyon-Detorsiyon grubu (torsiyon)
Grup 3	Torsiyon yapıp detorsiyondan hemen sonra 1 cc lokal eksozom verilen grup (torsiyon+l)
Grup 4	Torsiyon yapıp detorsiyondan hemen sonra 1 cc ip eksozom verilen grup (torsiyon+s)

Torsiyon+l: torsiyon+lokal

Torsiyon+s: torsiyon+sistemik

Anestezi: Tüm cerrahi işlemlerde anestezi uygulaması intraperitoneal 10 mg/kg ksilazin hidroklorid ve 50 mg/kg ketamin verilerek yapıldı.

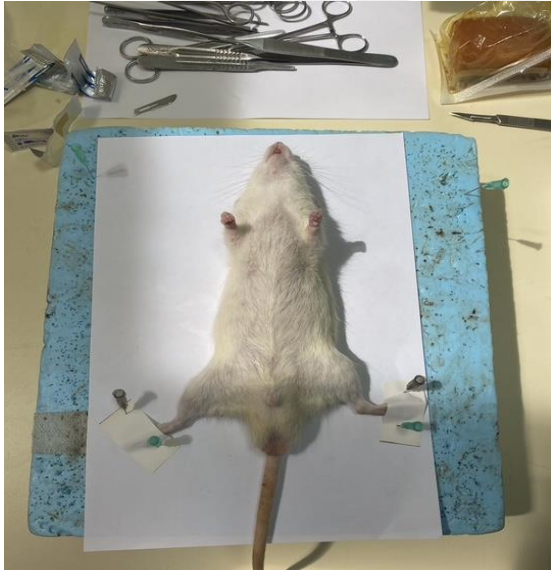
Cerrahi Teknik: Ameliyat bölgesi traş edilip daha sonra betadin solüsyonuyla temizlendi. Ameliyatlarda skrotal orta hattan yapılan insizyon kullanıldı. Torsiyon/detorsiyon modeli; sol testis dışarı alınarak, saatin aksi yönünde 720 derece döndürüldü. Daha sonra testis tekrar detorsiyone olmasın diye tunika albugineaya 3.0 ipek ile suture edilip skrotuma tespit edildi. Skrotum 4/0 ipekle kapatılıp torsiyon işleminden 4 saat sonra testis detorsiyone edilerek planlanan işlemler uygulandı beklendi. Detorsiyon işleminden 6 hafta sonra sol testise orşiektomi yapıldı.

Grup 1 (kontrol): Ratlara anestezi sonrası skrotal orta hattan vertikal kesi yapıp sol testis gubernakulum kesilerek dışarı alındı ve daha sonra torsiyon yapılmaksızın skrotuma anatomik pozisyonda yerleştirildi. Katlar 4/0 ipekle kapatıldı.

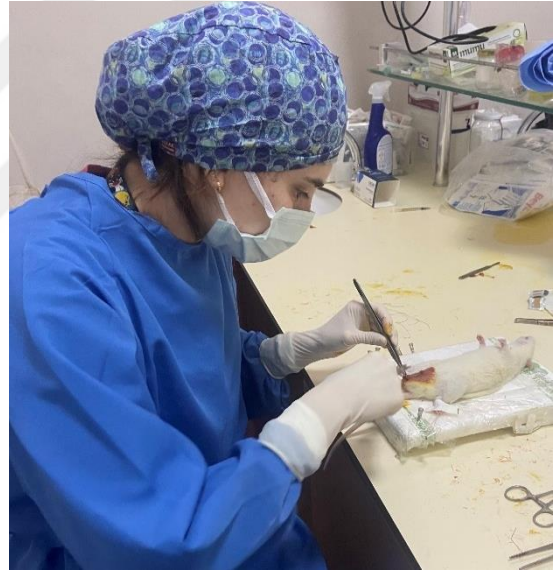
Grup 2 (torsiyon): Ratlara skrotal insizyon yapıldıktan sonra sol testis saat yönünde 720 derece döndürölüp skrotuma 3/0 ipek dikişle tespit edildi; bu işlemden 4 saat sonra tekrar insizyon yapıldıktan sonra detorsiyon yapıldı ve katlar anatomik pozisyonda kapatıldı.

Grup 3 (torsiyon+l): Ratlara skrotal insizyon yapıp sonra sol testis saat yönünde 720 derece döndürölüp skrotuma 3/0 ipek dikişle tespit edildi; bu işlemden 4 saat sonra tekrar insizyon ve detorsiyon yapıldı. Grup 3 teki ratların sol testis yüzeyine detorsiyondan hemen sonra lokal 1 cc eksozom verildi. Katlar anatomik pozisyonda kapatıldı.

Grup 4 (torsiyon+s): Ratlara skrotal insizyon yapıp sonra sol testis saat yönünde 720 derece döndürölüp skrotuma 3/0 ipek dikişle tespit edildi; bu işlemden 4 saat sonra tekrar insizyon ve detorsiyon yapıldı. Grup 4 teki ratlara detorsiyondan hemen sonra intraperitoneal (ip) (sistemik) 1 cc eksozom verildi. Katlar anatomik pozisyonda kapatıldı.



Resim 2. Preoperatif hazırlık



Resim 3. Peroperatif görüntü



Resim 4. Sol testis eksplorasyonu



Resim 5. Sol testis torsiyonu (720°)



Resim 6. Torsiyone testisin tespiti



Resim 7. 4 saatlik iskemi sonrası



Kontrol Grubu



Torsiyon Grubu



Torsiyon+l Grubu



Torsiyon+s Grubu

Resim 8. Orşioektomi materyalleri

6 hafta sonra tüm ratların sol testisleri çıkarılıp formaldehitte fiksle edildi. Ardından testis dokuları 2 eşit parçaya ayrılıp bir yarısı biyokimyasal analiz için, diğer yarısı histopatolojik değerlendirme için ayrıldı. Daha sonra ratlara, laparotomi yapılarak aorta kansızlaştırma yöntemi ile ötenazi uygulandı.

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 alınmıştır. Alınan anne sütü örnekleri laboratuvarında analiz edilene kadar -80 °C'de saklanmıştır. Depolanan ham anne sütü örnekleri (yaklaşık 200-300 mL) buz üzerinde çözöldü. Anne sütünden eksozom izolasyonu diferansiyel santrifüj ve ultrasantrifüj yöntemleriyle yapıldı. 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.

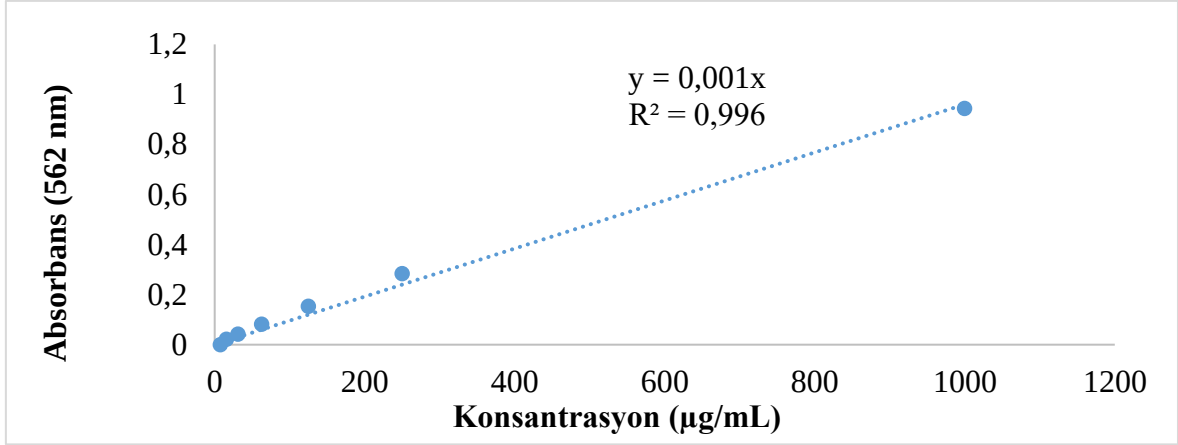


Resim 9. Eksozom

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 $\mu\text{g/mL}$ cinsinden hesaplandı.

Tablo 3. 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(186).

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-merkaptotanol, 3.8 mL deiyonize su içerisinde çözüldü ve aligotlanarak -20 °C'de saklandı.

Sabitlenme 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 4. % 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-yüklem 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 (yüklem jeli, jelin kenar kısımları gibi) spatula ile kesilip atıldı. Jel sabitleştirme çözeltisine alındı bu çözeltide 30-40 dakika çalkalanarak proteinlerin jeli 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 renksizleştirme 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 çözöldü 200 mL metanol eklendi ve hacmi 1L'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

TBS (10X): 31.52 g Tris HCl ve 80 g NaCl çözölerək 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 Çözeltilisi (%5 BSA-TBST / Süt Tozu-TBST): 5 g BSA veya süt tozu 100 mL 1X TBST içerisinde çözölerək 4 °C'de saklanır. Gerekli durumda BSA ve süt tozu birlikte kullanılabilir.

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

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

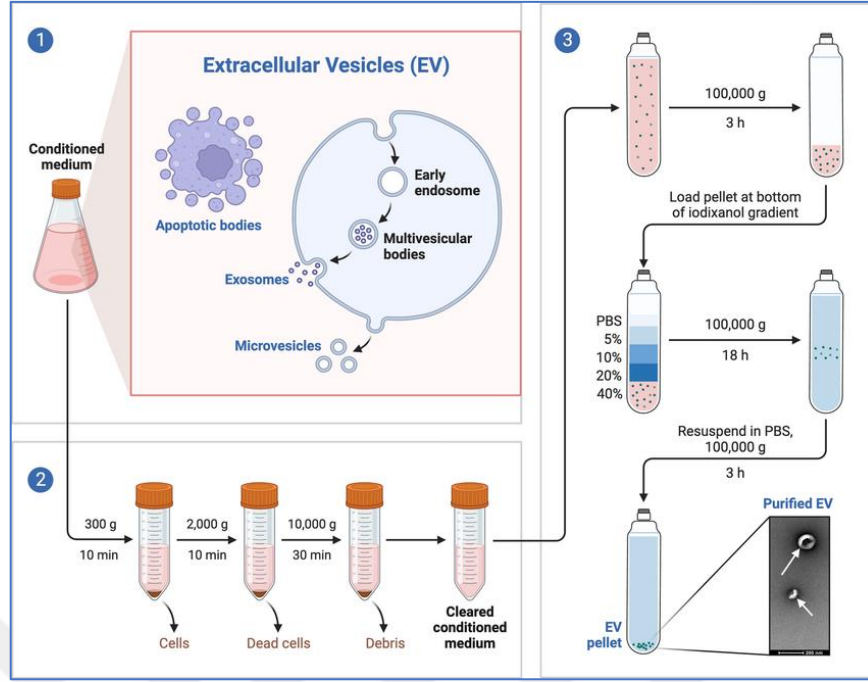
Deneyin Yapılışı:

Yukarıda anlatıldığı gibi SDS-PAGE işlemleri aynı şekilde gerçekleştirildi. Yürütölecek proteinlerin miktarları primer antikorun ölçebileceğı ve üretici firma tarafından tavsiye edilen konsantrasyon değeri kontrol edilerek belirlendi. Örneklerin üzerine uygun miktarda yükleme boyası eklenerek yürütöldü. Fakat sabitleştirme çözeltilisine 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. Nitroselöloz 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 antikör çözeltisi (pozitif eksozom membran belirteci olarak anti-CD63 ve negatif belirteç olarak ise anti-kalneksin antikör çözeltisi) içerisinde roller mikserde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Primer antikörle 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 antikör 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.



Şekil 13. Ekstrasellüler vezikül üretimi (187)

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(188).

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. Tiyobarbiturik 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.

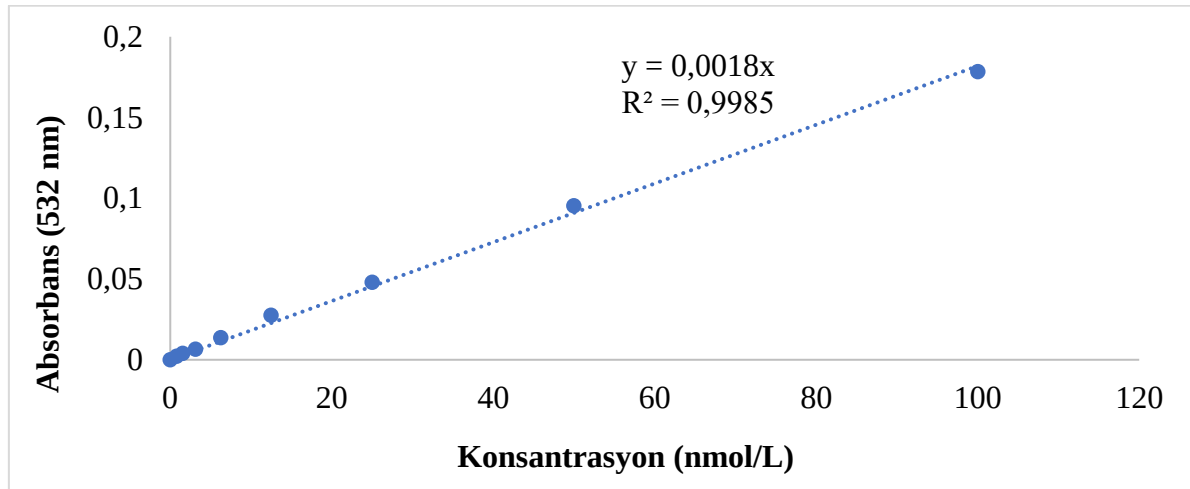
4. Standart çözeltiler: 8.3 µL tetrametoksiopropan 0.01 M HCl çözeltisine eklendi ve 50 oC'de 1 saat inkübe edildi. Bu oluşan 10 µmol/mL'lik ara stok çözeltiden dilüsyonlar yapılarak 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 5. Doku MDA Seviyesi Ölçümü İçin Yapılan Reaksiyon Karışımı

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

Tablo 5'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.

Tablo 6. Doku MDA seviyesi ölçümü için 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 (189). 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 ortamdaki o kadar çok O_2^- kullanacağı için reaksiyondan sonra oluşan rengin şiddetinde azalma gözlenir. Reaksiyon sonucu oluşan renkli bileşiğin absorbanansı 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Kullanılan Çözeltiler

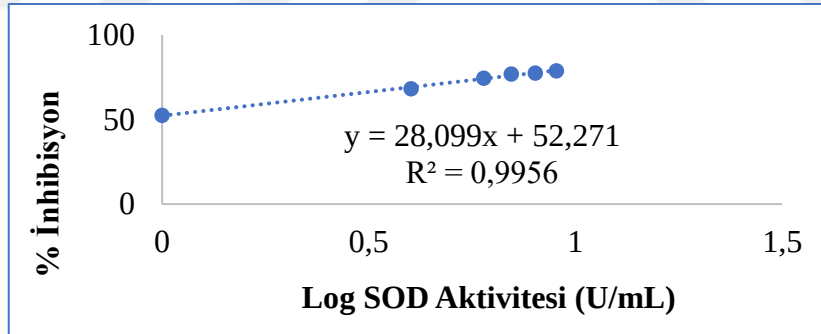
1. 0.3 mM Ksantin Çözeltisi: 3.65 mg ksantin alındı ve 80 mL deiyonize suda çözözüldü.
2. 0.6 mM EDTA Çözeltisi: 8.93 mg EDTA alındı ve 40 mL deiyonize suda çözözüldü.
3. 150 μ M NBT Çözeltisi: 4.9 mg NBT alındı ve 40 mL deiyonize suda çözözüldü. NBT çözeltisi SOD reaktif karışımına en son eklendi.
4. 400 mM Na_2CO_3 çözeltisi: 1.01 g Na_2CO_3 alındı ve 24 mL deiyonize suda çözözüldü.
5. % 0.1'lik Bovin Serum Albumin (BSA) çözeltisi: 12 mg BSA'dan alındı ve 12 mL deiyonize suda çözözüldü.
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 çözözüldü. Ksantin oksidaz enziminin dilüsyonunda kullanıldı.
8. 0,8 mM $CuCl_2$ Çözeltisi: 5.37 g $CuCl_2$ alındı ve 50 mL deiyonize suda çözözüldü. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanılır.
9. 167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 3,3 U/mL'lik orijinal şişeden 101 μ L 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'luk 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 7. 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.

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

Tablo 8. 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(190). Bu yöntemin temeli H₂O₂’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 KH₂PO₄ deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L’ye tamamlandı. 8.9 g Na₂HPO₄.2H₂O 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 µL %30'luk H₂O₂'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 9. Katalaz Aktivite Tayini İçin Yapılan Reaksiyon Karışım

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	0.75	-
Numune	1.5	1.5
H ₂ O 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

$$k = (2.3/10) \times \log(A_1/A_2) \text{ s}^{-1} \text{ (2)}$$

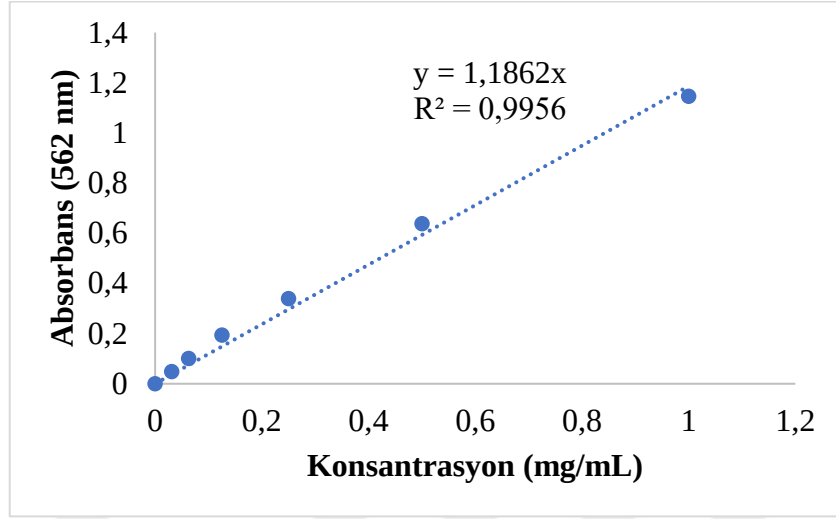
Burada; A₁= Başlangıç absorbansı, A₂= 10 s sonraki absorbanstır.

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.

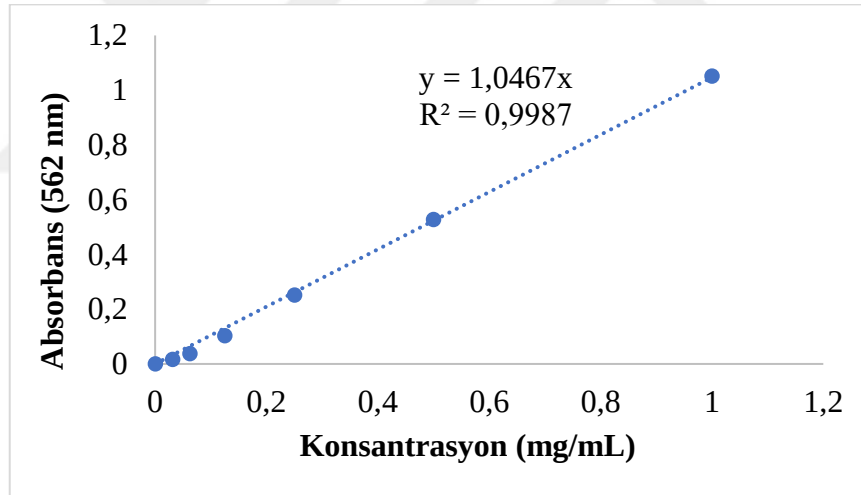
3.3.4. Protein Miktar Tayini

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.

Tablo 10. SOD ve CAT Seviyesini Belirlemek İçin Yapılan Protein Miktarını Hesaplamada Kullanılan Standart Grafiği



Tablo 11. MDA Seviyesini Belirlemek İçin Yapılan Protein Miktarını Hesaplamada Kullanılan Standart Grafiği



3.4. Histopatolojik İnceleme

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 Skorlaması (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 12. 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’ten 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

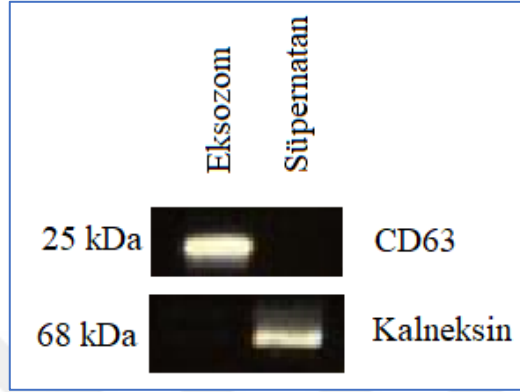
3.5 İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analiz aşamasında SPSS 27,0 istatistik paket programı kullanılmıştır. Değerlendirme sonuçlarının tanımlayıcı istatistikleri; sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum olarak verilmiştir. Grupların normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testi ile belirlenmiştir. Bağımsız üç veya daha fazla grubun karşılaştırılmasında normal dağılım koşulu sağlandığında ANOVA testi, sağlanmadığında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal Wallis Testinde önemli farklılıkların görülmesi durumunda Post hoc karşılaştırmalar ise Bonferroni ile test edilmiştir. İstatistiksel alfa önemlilik seviyesi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

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 14. Anne Sütü Eksozomlarının Western Blot ile Doğrulanması

4.2 Testis Hasarının Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

Tablo 13. MDA enziminin değerlendirilmesi

	MDA (nmol/g protein)		p*	Post Hoc
	Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (min-max)		
G1 kontrol	6,89 $\pm$ 1,53	6,59 (5,14-9,02)	0,042	1-2
G2 torsiyon	16,03 $\pm$ 5,96	18,80 (6,11-22,54)		
G3 torsiyon+l	11,96 $\pm$ 5,84	12,10 (3,43-20,58)		
G4 torsiyon+s	12,14 $\pm$ 8,50	10,46 (4,82-28,81)		

SS: Standart Sapma, *ANOVA TESTİ

Gruplar arasında MDA enziminde yapılan değerlendirmede anlamlı fark bulunmuştur (**p=0,042**). Torsiyon grubunun MDA değeri, kontrol grubundan yüksek saptanmıştır (**p¹⁻²=0,025**).

Tablo 14. SOD enziminin değeriendirilmesi

	SOD (U/mg protein)		p*
	Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (min-max)	
G1 kontrol	8,10 $\pm$ 4,17	6,59 (4,16-14,47)	0,089
G2 torsiyon	9,69 $\pm$ 2,00	10,51 (5,40-11,46)	
G3 torsiyon+l	9,71 $\pm$ 2,31	10,34 (6,01-12,46)	
G4 torsiyon+s	12,86 $\pm$ 5,47	11,92 (7,50-24,87)	

SS: Standart Sapma *Kruskal Wallis testi

Gruplar arasında SOD değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır (p=0,089).

Tablo 15. CAT enziminin değeriendirilmesi

	CAT (U/g protein)		p*
	Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (min-max)	
G1 kontrol	5,45 $\pm$ 1,73	5,60 (3,32-7,85)	0,828
G2 torsiyon	5,12 $\pm$ 2,47	4,03 (2,84-9,44)	
G3 torsiyon+l	5,91 $\pm$ 1,95	5,61 (3,43-10,24)	
G4 torsiyon+s	5,53 $\pm$ 2,76	5,03 (2,77-9,63)	

SS: Standart Sapma, *ANOVA TESTİ

Gruplar arasında CAT değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli fark yoktur (p=0,828).

Tablo 16. GPX enziminin değeriendirilmesi

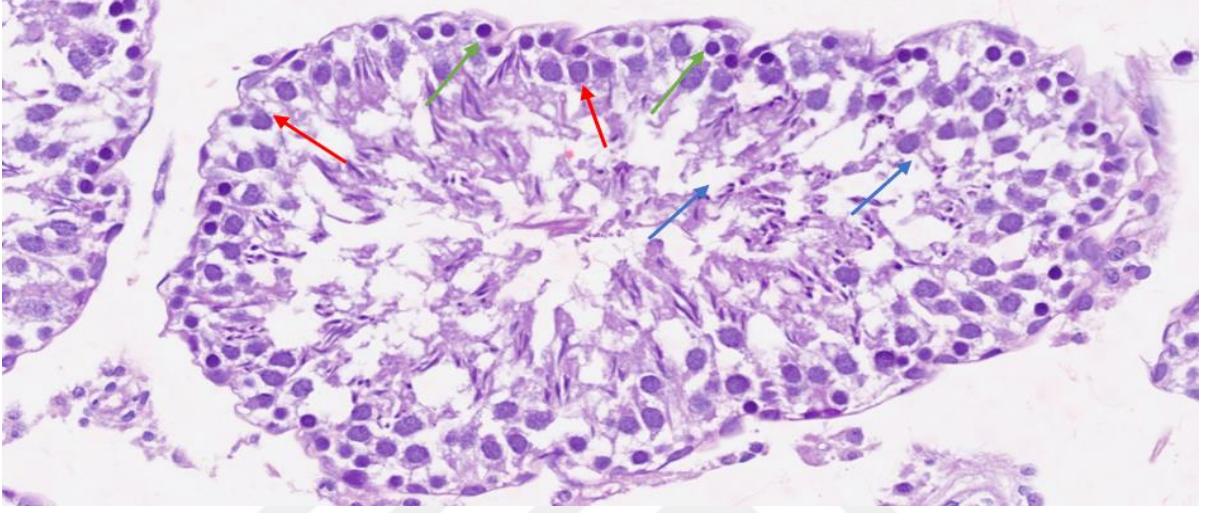
	GPX (U/mg protein)		p*	Post Hoc
	Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (min-max)		
G1 kontrol	0,87 $\pm$ 0,32	0,86 (0,44-1,31)	0,016	1-2 2-3
G2 torsiyon	1,71 $\pm$ 0,73	1,50 (1,03-2,96)		
G3 torsiyon+l	0,95 $\pm$ 0,42	0,91 (0,49-1,46)		
G4 torsiyon+s	1,22 $\pm$ 0,57	1,11 (0,52-2,19)		

SS: Standart Sapma, *ANOVA TESTİ

Gruplar arasında GPX enziminde yapılan değeriendirmede anlamlı fark bulunmuştur (p=0,016).

Torsiyon grubunun GPX değeri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. ($p^{1-2}=0,019$). Torsiyon grubuna göre torsiyon+I grubundaki sayısal düşüklük de yine istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p^{2-3}=0,038$).

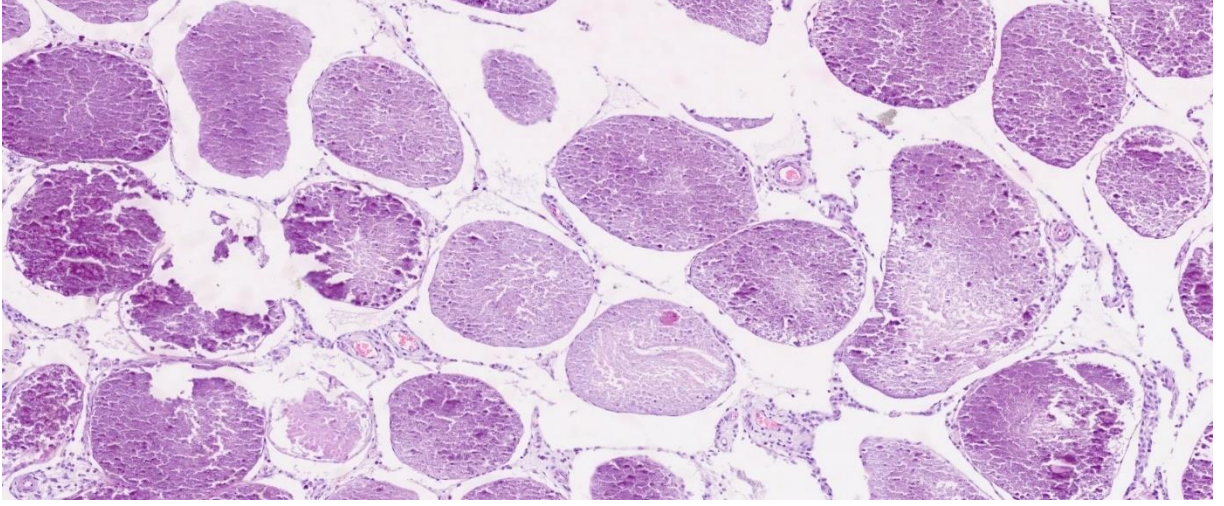
4.3 Testis Hasarının Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi



Resim 10. Grup 1 Kontrol: HE X 400 BBA* Doğal histolojik görünümüne sahip seminifer tübül yapısı

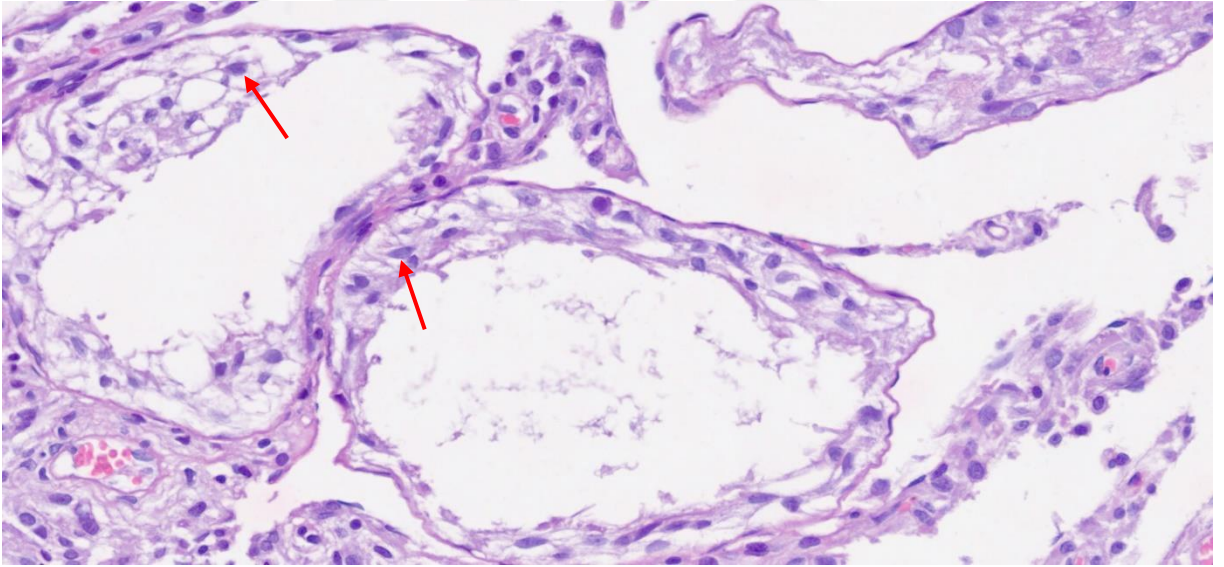
Bazalde dizilmiş sertoli hücreleri (kırmızı ok), farklı matürasyon evrelerinde spermatogonialar (yeşil ok) ve lümende matür spermatozoalar (mavi ok)

* *Büyük Büyütme Alanı (BBA)*



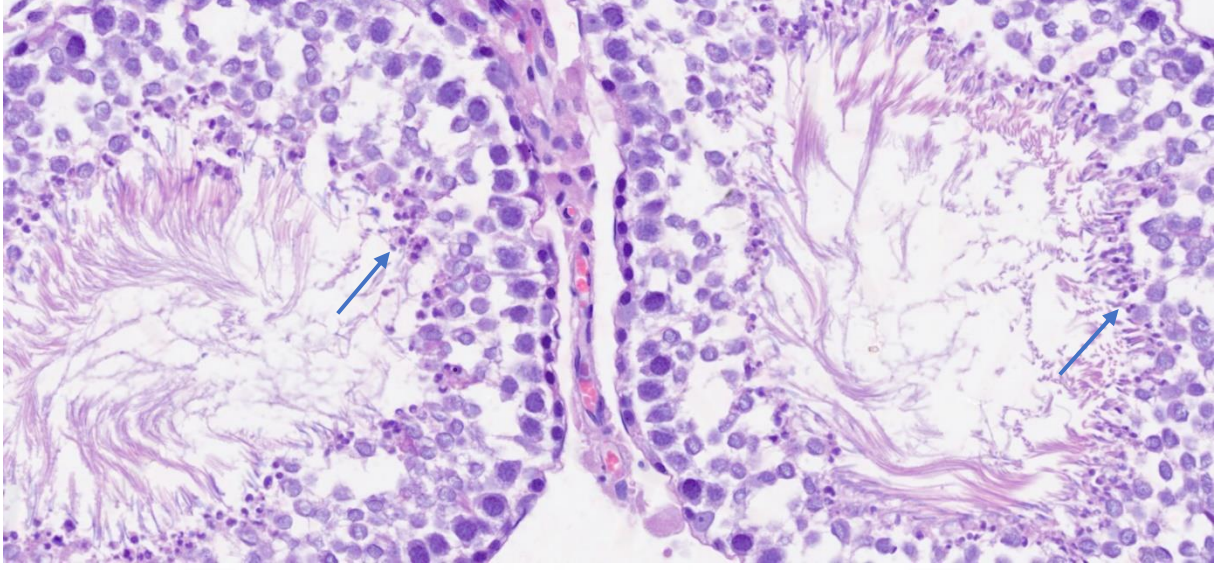
Resim 11. Grup 2 Torsiyon: HE X 100 BBA* Tamamı nekrotik görünümde, canlı hücre içermeyen seminifer tübüller

* *Büyük Büyütme Alanı (BBA)*



Resim 12. Grup 3 Torsiyon+1: HE X 400 BBA* Lümenleri açık fakat sadece sertoli hücresi (kırmızı ok) içeren (spermatogonia içermeyen) seminifer tübüller

* *Büyük Büyütme Alanı (BBA)*



Resim 13. Grup 4 Torsiyon+s: HE X 400 BBA* Çok sayıda matür spermatozoa (mavi ok) içeren seminifer tübüller

* Büyük Büyütme Alanı (BBA)

Tablo 17. Histopatolojik değerlendirme sonuçlarının gruplara göre dağılımı

	JOHNSEN TESTİKÜLER BİYOPSİ SKORLAMASI		p*	Post Hoc
	Ortalama ± SS	Ortanca (min-max)		
G1 kontrol	9,63 ± 0,51	10 (9-10)		
G2 torsiyon	1,88 ± 0,83	2 (1-3)		1-2
G3 torsiyon+l	4,88 ± 0,64	5 (4-6)	<0,001	1-3
G4 torsiyon+s	7,75 ± 0,70	8 (7-9)		2-4

SS: Standart Sapma, *Kruskal Wallis testi

Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlamasında yapılan değerlendirmede gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur (**p<0,001**).

Kontrol ve torsiyon grupları arasındaki sayısal düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (**p¹⁻²= <0,001**).

Kontrol ve torsiyon+l grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur (**p¹⁻³=0,004**).

Torsiyon ve torsiyon+s gruplarının arasındaki sayısal yükselik istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**p²⁻⁴= 0,003**).

5. TARTIŞMA

Testis torsiyonu (TT), yenidoğan ve adolesan yaş gruplarında olmak üzere bimodal dağılım gösteren bununla birlikte her yaş grubunda görülebilen ürolojik acil cerrahi bir durumdur. Testis torsiyonunda tüm başarılı cerrahi tedaviye rağmen %40-60'ında testiküler atrofi ve infertilite gelişmektedir(1). 4-6 saat içerisinde tedavi edilmez ise başlayan doku iskemisi ile germ hücreleri ölmeye başlar ki bu da fertilitenin azalmasına hatta infertiliteye yol açar(3,4).

Semptomların başlangıcından itibaren altı saat içinde opere edildiğinde testislerin kurtarma oranları %90 ila %100 arasında değişmektedir ancak semptomlar 12 saatten uzun sürdüğünde bu oranlar %50'ye düşer. Semptomların süresi 24 saat veya daha fazla olduğunda ise testisin kurtarılma oranı %10'un altına düşer (111). Testis torsiyonu başarıyla tedavi edilse bile bu hastalar yaşamları boyunca testis atrofisi, semen kalitesinde bozulma, ekzokrin fonksiyonlarda azalma ve kısırlık gibi bazı önemli patolojilerle karşı karşıya kalabilirler (90,191), .

Torsiyon esnasında gelişen testiküler hasarı iki döneme ayırabiliriz. Arteriyel akımın kesildiği ve oksijen sunumunun azaldığı iskemik hasar dönemi ve ardından detorsiyon sonrasında açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin neden olduğu reperfüzyon hasarı dönemi gelir.

Testis torsiyonu sırasında oluşan iskemi ile ortaya çıkan serbest oksijen radikallerine (SOR) bağlı olarak oksidatif stres ve inflamasyon meydana gelmektedir(6).

Testis, yüksek oranda doymamış yağ asidi içerdiği için oksidatif strese karşı oldukça savunmasızdır. Oksidatif stres, spermatozoa zarlarının oksidatif hasara karşı çok hassas olması nedeniyle sperm fonksiyonlarını azaltır, seminifer tübüllerin normal yapısını bozarak ve germ hücrelerinin sayısını azaltarak testis fonksiyonlarını bozar. Oksidatif stresin biyokimyasal belirteçleri , doku hasarının hassas göstergeleridir ve histolojik değişikliklerden çok daha erken tespit edilebilir (192).

İskemi oluşan dokularda canlılığın korunabilmesi için en kısa sürede doku reperfüzyonu sağlanmalıdır (7). 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 (117,118).

Bu klinik sonuçlar iskemi-reperfüzyon hasarıyla ilişkilidir. Artmış SOR ve yükselmiş intramitokondrial kalsiyum seviyeleri ve hücresel apoptozdaki artışlar, testis parankimal dokusunda oluşan bu hasarın patofizyolojisindeki kritik unsurlardır (193,194). Bu yüzden iskemi-reperfüzyon hasarının olumsuz etkilerini azaltmak için cerrahi tedavi ile birleştirilebilen tıbbi tedavi seçenekleri yoğun olarak araştırılmaktadır. Bunun için de odak nokta antioksidan tedaviler olmuştur.

Yapılan çalışmalarda antioksidanların, spermatozoayı SOR üreten anormal spermatozoalardan koruduğu, lökositlerin ürettiği SOR'u temizlediği, DNA kırılmalarını önlediği, sigara içenlerde semen kalitesini arttırdığı, soğukun spermatozoaya olan etkisini azalttığı, erken sperm olgunlaşmasını engellediği ve spermatozoayı destekleyerek yardımcı üreme tekniklerinin başarısını arttırdığı gösterilmiştir (149,150).

Oksidatif stres, oksidan üretimi ile yok edilmesinin dengesizliği durumunda ortaya çıkmaktadır. Günümüzdeki yoğun araştırmanın sebebi bu istenmeyen hasarın sonuçlarını en aza indirmek ve/veya geri çevirmektir. Bunun için çeşitli kimyasalların antienflamatuvar, antioksidan ve SOR temizleyici özelliklerinden faydalanılmaya çalışılmıştır. (195). Melatonin, omega-3, N-asetilsistein, C vitamini ve E vitamini gibi çeşitli antioksidan moleküllerin dokuları, iskemi-reperfüzyon hasarından çok etkili bir şekilde koruduğu çalışmalarda ortaya konmuştur (196). Ancak bu ajanların hiçbiri insanlarda torsiyon tedavisinde ek medikal tedavi olarak kullanılmamıştır.

Antioksidan bileşenlerin seviyeleri akut dönem testis hasarının incelendiği çalışmalarda düşük seviyelerde bulunmuş olsalar da bu bileşenler hücre hasarına karşı savunma ve hücre yenilenmesi ile ilişkili oldukları için kronik dönem iyileşme süreçlerinde seviyelerinin artması beklenir. Bu artış hücre yenilenmesi ve oksidatif hasarın azaltılmasına pozitif yönde bir etki olduğunu göstermektedir (197).

Günümüzde hala etkili bir medikal tedavi literatüre tedavi amaçlı girmediği için çalışmalar önem arz etmeye devam etmektedir. Birçok farklı madde kullanılarak oluşan bozuklukların önlenmesi ya da tedavisi amaçlanmaktadır ve her ne kadar moleküler mekanizması henüz açıklığa kavuşturulmamış olsa da testiste iskemi/reperfüzyon hasarını inhibe etmek için çeşitli antioksidanlar tanımlanmıştır (198).

Literatür iskemî reperfüzyon sonucu ortaya çıkan oksidatif stres üzerine ele alınmış yüzlerce çalışmayı barındırmaktadır. Bu çalışmalar içerisinde testis torsiyonu modeli uygulanabilirliği ve maliyeti nispeten az olan modellerden biridir. Antioksidan mekanizmalar ise oksidatif stresin etkilerini yenmek için hepimizin aklına ilk gelen çözümlerin başında gelmektedir. Tüm bunların içerisinde bizlerin maliyeti etkin olan ve hem ulaşımı hem uygulanabilirliği kolay olan yöntemi derinleştirip mevcut pratiklerimize eklememiz gerekmektedir. Bu sorulara yanıt ararken de biz de kendimizi hem son 30 yılın temel araştırma konularından olan eksozomun hem de eksozom açısından zengin mucizevi anne sütünün içerisinde bulduk.

Eksozomlar bilinen tüm hücreler tarafından ortama salınan nanokeseciklerdir. Tükürük, idrar, plazma, anne sütü ve daha pek çok vücut sıvılarından elde edilebilen eksozom adındaki keseciklerin hücreler arası iletişim, sinyal iletimi, genetik materyal transferi ve immünolojik yanıtın düzenlenmesi gibi birçok biyolojik aktivitede önemli rol almaktadır. Tüm bu görevleri göz önüne alındığında eksozomlar hem tanı hem de tedavide kullanılabilir. Çeşitli doku onarım süreçlerinde görev alırlar, örneğin nekrotik apoptozu düzenler, renal tübüler epitel hücre hasarını azaltır ve onarımı artırır, pankreasın işlevini arttırıp pankreas nakli için bağışıklık izolasyonu sağlar ve obstrüktif olmayan azoospermik farelerde endojen sperm iyileşmesini destekler. Ayrıca eksozom tedavisi anjiyogenezi uyararak yeni damar oluşumunu indükler, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik ederek ve iltihabı azaltarak yara iyileşmesini destekler. (199–201).

Eksozomlar ilk olarak 2007 yılında insan kolostrumundan ve anne sütünden çıkarılıp karakterize edildi. Akış sitometrisi ile veziküllerde MHC sınıfları I ve II, CD63, CD81 ve CD86 tespit edildi (202). Bizim çalışmamızda da anne sütünden elde edilen eksozomların varlığı, eksozom membran belirteçleri CD63 pozitifliği ve negatif marker kalneksin ile Western Blot yöntemi ile doğrulandı.

Bugüne kadar eksozomlar *invivo* ve *invitro* çalışmalarda antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri sayesinde kanserler de dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır ve yaygın olarak kemoterapi ajanlarının iletimi için umut verici taşıyıcılar olarak gündeme gelmiştir (203–205) . Bu eksozomlar kan, idrar, tükürük, anne sütü, amniyon sıvısı, asit, beyin-omurilik sıvısı ve semen dahil olmak üzere birçok vücut sıvısından izole edilmiştir (156,205,206) .

Bunlar arasında, gıda olarak da tanımlanabilen anne sütü, çeşitli memeliler tarafından üretildiği için ve geniş hacim aralığı nedeniyle büyük rağbet görmüştür (207). Ancak süt eksozomları üzerine yapılan çalışma sayısı nispeten azdır.

Sütten elde edilen eksozomlar iyi bir stabilite, düşük immünogenite ve mükemmel çapraz özgüllük toleransı göstermektedirler (208,209). Eksozomlar, genetik manipülasyona gerek kalmadan anne sütünden de dahil çeşitli kaynaklardan izole edilebilir ve saflaştırılabilirler. Eksozomların canlı hücrelerden daha kolay depolanabilir ve taşınabilir olması esnek tedavi seçenekleri doğurur (210). Bu şekilde hasarlı dokularda doku homeostazını geri kazandırır ve kronik inflamasyonu hafifletmeye yardımcı olabilirler (211) Tüm bunlar eksozomları bir dizi rahatsızlığı tedavi etmek için umut verici bir terapötik yaklaşım haline getirmektedir.

Yapılan bir çalışmada, eksozom sayısının kolostrumda en yüksek olduğunu ortaya konulmuştur (212). Kolostrumdan elde edilen eksozomların doğuştan gelen bağışıklık tepkisi, inflamatuvar yanıtı, akut faz tepkisi, trombosit aktivasyonu, hücre büyümesi ve kompleman aktivasyonunda rol oynayan proteinler açısından oldukça zengin olduğunu, buna karşın taşıma ve apoptozda rol oynayan proteinlerin olgun sütten elde edilen eksozomlarda zengin olduğunu ortaya koymuştur (213). Anne sütünün tüm bu antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri bizim testis torsiyon modelinde eksozomu seçmemizi sağlamıştır.

Taşçı ve arkadaşları (2022), sol testis torsiyonu sonrası 84 sığana orşiektomi veya orşiopeksi uygulanmış ve torsiyonun her iki testisi etkilediği, ancak karşı testisteki hasarın zamanla düzeldiği gözlemlenmiş. Altı aylık takipte, orşiektomi ya da orşiopeksinin uzun vadeli fertilité üzerine etkisi olmadığı ve yerinde bırakılan detorsiyone testislerin tamamı ise atrofiye uğradığı görülmüş (9). Bu detaylı çalışmada herhangi bir terapötik madde kullanılmadan sadece doğal süreçler incelenmiş. Fertilitéyi devam ettirecek kadar sağlıklı olduğu bulunan semenin kalitesindeki değişimin ne ölçüde olduğu bilinmemektedir. Ancak detorsiyone edilen testisin atrofiye uğramasını engelleyecek terapötik ajanın bulunması da ilerleyen dönemde hem semen kalitesinde düzelmeye yol açabilir hem de kozmetik açıdan hastaları tatmin edebilir hem de ilerleyen yaşlarda testis protez uygulamasının maliyetinin önüne geçebilir. Anne sütü eksozomunun bu açıdan da olumlu sonuçlar vaat ettiğini öngörmekteyiz.

Daha önce iskemik testis detorsiyon sonrası canlılığının korunmasında çeşitli tedavi yöntemleri klinik ve deneysel olarak çalışılmıştır. Anne sütü eksozomunun bazı çalışmalarda özellikle nekrotizan enterokolit ve korozif özofagus modellerinde olduğu gibi pozitif sonuçlara sebep olduğu gösterilmiştir (214–221). Kliniğimizde daha önce yapılan deneysel çalışmada anne sütü eksozomu testis torsiyonunda akut dönem için değerlendirilmiş ve umut vaat eden verilere ulaşılmıştır (10). Ancak literatürde testis torsiyonunun kronik dönem içerisinde sahip olduğu patofizyolojik değişiklikler ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır.

Biz de bu çalışmamızda anne sütünün yenidoğan döneminden elde edilen eksozomun testis torsiyonunda kronik süreçte gelişen İ/R hasarına karşı koruyucu etkisini ve bunun bir tedavi şekli olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasını amaçladık.

Eksozom tedavisinin uygulama metodu ele alındığında literatürde lokal enjeksiyon (222), topikal uygulama (223), sistemik enjeksiyon (intreperitonel, intravenöz ve intramuskuler) (224,225), inhalasyon (226) ve oral uygulama (227) örnekleri görülmüştür.

Biz de çalışmamızda eksozomları hem doğrudan yara bölgesine enjekte ederek iyileşmeyi teşvik etmek için lokal yöntemden hem de intraperitonel vererek eksozomların tüm vücuda ulaşmasını sağlayıp doku rejenerasyonunu sağlamak için sistemik yöntemden faydalandık. Lokal uygulama, vücudun diğer hücreleri üzerindeki etkiyi azaltabilen ve fagositik hücrelerin ve in vivo siklik klirensin etkisinden kaçınabilen sistemik uygulamaya göre daha güvenli ve daha biyoyararlanımlı olmasına rağmen ilaç konsantrasyonu dış faktörler tarafından kolayca etkilenir. Dahası, lokal veya sistemik uygulama olsun, farklı uygulama konsantrasyonları farklı biyolojik etkiler üretecektir (228,229).

Daha önce sıçanlarda deneysel testis I/R hasarının 540° torsiyonda başladığı ve torsiyonun 4 saatten uzun sürmesi durumunda kan akımının yeniden başlamadığı kanıtlanmıştı (230–233). Ayrıca klinikte sol testisin daha uzun bir spermatik korda sahip olmasından dolayı sol taraftaki testis torsiyonunun sağ taraftakine göre 2 kat daha sık görüldüğü bildirilmiştir (234). Tüm bunlara göre, biz de çalışmamızda klinik modellere uymak ve yeterli iskemi oluşturmak için ratların sol testislerine 4 saatlik 720° ekstravajinal torsiyon uyguladık.

Patojenler, kimyasal maddeler ve travma gibi herhangi bir nedenle oluşan doku hasarı, iltihaplı hücreleri ve sitokinleri harekete geçirebilir ve tüm bunların sonucunda inflamasyon ortaya çıkabilir (235). İltihaplanma süreci, vücudun nekrotik ve hasarlı dokuları

temizlemesine yardımcıdır (236). İnflamasyon çözülme süresine göre 3 gruba ayrılır. 1) Hızla başlayan ve semptomları birkaç gün süren akut inflamasyon. 2) 2-6 hafta süren subakut inflamasyon. 3) 6 hafta ve üstü bir süre devam eden ve hatta yaşam boyu sürebilen kronik inflamasyon (237,238). Kronik inflamasyonun hayvan modelleri, bilim insanlarının inflamasyon mekanizmalarını daha iyi anlamalarına yardımcı olmaktadır. Biz de literatürdeki bu bilgilerden yola çıkarak hem hayvan bakımının minimum düzeyde tutulması hem sonucumuzu en erken ve etkin görebilmek adına deneysel modelimizde kronik dönemi 6 hafta ile sınırlandırdık.

Bizim çalışmamızda 6 hafta sonundaki kronik dönem sonuçlar ele alındığı için biz bu 6 haftalık süreçte oksidan-antioksidan mekanizmada rejenerasyon dönemi nedeniyle dengelerin değiştiğini görmekteyiz.

Reaktif oksijen türlerinin ölçümü reaktif doğası ve kısa ömrü nedeniyle oldukça zordur. Lipid peroksidasyonunun son ürünü malondialdehitir. Bu nedenle, malondialdehit, reaktif oksijen türlerinin yaygın bir belirteci olarak kabul edilir (239). Sonuçlarımız, kontrol grubuyla torsiyon grubu karşılaştırıldığında, ipsilateral testislerde artmış malondialdehit seviyesi ve azalmış spermatogenez ortaya koydu. Bu bulgular, aşırı reaktif oksijen türevlerinin üretiminin testis iskemi-reperfüzyonu sırasında spermatogenez kaybına neden olduğunu göstermektedir.

Temel olarak oksidatif stresi azaltmak için iki terapötik fırsat vardır. İlki SOD, CAT, GPX gibi spesifik enzimlerin uygulanarak ve/veya bunların in vivo etkinliklerinin artırılarak SOR'ların ortadan kaldırılması, ikincisi ise radikal üretiminin antioksidan temizleme sistemleri tarafından önlenmesidir (240).

Enzimatik antioksidan sisteminin en önemli ögeleri arasında SOD, CAT ve GPX yer almaktadır (197).

Klinik çalışmamızın başlangıç noktası olan Turan ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı çalışmada benzer model üzerinde akut dönem etkileri araştırılmış ve biyokimyasal olarak MDA, SOD VE CAT düzeyleri ele alınmıştır. Diğer testis torsiyon-detorsiyon modellerinde olduğu gibi lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA düzeylerinde artış ve antioksidan SOD ve CAT enzim değerlerinde ise düşüş gözlemlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan ve istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilen eksozom dozajı 1mg/kg olarak bizim çalışmamıza da referans olmuştur (10).

Testis dokusunun oksidan-antioksidan dengesi torsiyon durumunda değişir. Yaptığımız literatür taramasında özellikle yakın geçmişte testis torsiyon modeli üzerinde çeşitli etken maddeler denenmiş; antioksidan, antifibrotik ve antienflamatuvar etkilerinin üzerinde durulan bu maddelerin hepsinde akut dönemde MDA seviyelerinin azaldığı, SOD ve GPX değerlerinin arttığı ve spermiyogenezin olumlu yönde etkilendiğini gördük. Kimi sonuç istatistiksel olarak anlamlı çıkmasa da sayısal verilerde benzer artış ve düşüşler elde edilmiş. Tüm çalışmaların tek ortak özelliği ise sadece akut dönem torsiyon sonuçlarını ele almalarıydı (241–247) .

Literatürle uyumlu olarak, deneysel modelimizde uygulanan torsiyon işleminin torsiyon grubu ratlarda kontrol grubu ratlara göre testiste oksidatif hasara yol açtığı, testis MDA seviyelerinde anlamlı artışa yol açtığı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da kontrol ve torsiyon grubu arasındaki MDA düzeylerindeki artış ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olması torsiyon modelimizin güvenilirliğini göstermektedir. Torsiyon grubuna göre de lokal/sistemik uygulanan anne sütü eksozomu total doku MDA düzeylerinin azalmasını pekişirmiştir ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak elde edilen veriler ile antiperoksidatif mekanizma sayesinde lipid peroksidasyonunu ve oksidatif doku hasarını inhibe ettiğini gösterebildik.

Çalışmamızdaki antioksidan özellikteki enzimler olan SOD, CAT ve GPX'i ele alırsak; SOD enziminin istatistiksel olarak anlamlı çıkmasa da sayısal verileri ele alındığında kontrol grubuna göre hem torsiyon hem lokal hem sistemik grupta artışı görmekteyiz. Akut dönemi kapsayan çalışmalarda SOD'un istatistiksel olarak yükselmesi ancak bizim çalışmamızda kronik süreçte anlamlı yükselmenin olmamasını hayvan hakları nedeniyle oluşturulan gruplardaki rat sayısının minimalde tutulmuş olmasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Sayısal olarak değerlendirildiğinde torsiyon grubunda kontrol grubuna göre SOD'un yükselmiş olması antioksidan mekanizmanın halen daha devrede olduğunu göstermektedir özellikle sistemik grupta sayısal değerin torsiyon grubuna göre yüksek olması da terapötik olarak verdiğimiz anne sütü eksozomunu antioksidan etkisi sonucunda olduğunu düşünmekteyiz.

CAT enzimini değerlendirdiğimizde kronik süreçte anlamlı bir yükselme olmadığını görmekteyiz. Ancak sayısal verilerin ortalaması dikkate alındığında enzimatik tepkimenin niceliği torsiyon grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna yaklaşmış olduğunu

görmekteyiz. Bu sayısal değerlerin rat sayısının hayvan hakları nedeniyle minimalde tutulmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Erkek sıçan üreme sisteminde ana SOR temizleyici enzimleri SOD ve GPX'tir. Antioksidan enzim olarak testis ve epididimal dokulardaki spermi korumada GPX'in önemli rolü vardır. GPX'in, hasarlı testislerde iskemi/reperfüzyon yoluyla ortaya çıkan oksidatif strese karşı primer koruma hattı olarak görev yaptığı bildirilmiştir (243,248). Özellikle GPX enziminin, hasarlı testislerde iskemi/reperfüzyon yoluyla ortaya çıkan oksidatif strese karşı primer koruma hattı olarak görev yapması (243,248) bizim çalışmamızda da bu enzimin üzerinde durmamızı ve çalışmaya dahil etmemizi sağlamıştır.

Bizim çalışmamızda, GPX enzimini değerlendirdiğimizde torsiyon grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükselişi görmekteyiz. Bu durum torsiyon modelinin güvenilirliğini desteklemektedir. 6 hafta sonraki kronik dönemde lokal/sistemik verilen anne sütü eksozomu sonrası GPX değerlerinin torsiyon grubu kadar artmadığı görmekteyiz. Bunun, verilen antioksidan maddenin oksidatif hasarı akut dönemden itibaren baskılanmasına yardımcı olduğu için torsiyon grubundaki kadar yükselmesine gerek kalmamıştır olarak düşünmekteyiz. Bir diğer deyişle verilen anne sütü eksozomunun antioksidan mekanizmayı en baştan itibaren indüklediği için torsiyon grubundaki kadar yükselmesine engel olduğunun göstergesi olarak da değerlendirmekteyiz.

Erkek sıçan üreme sisteminde ana SOR temizleyici enzimleri SOD ve GPX'tir. GPX'in özellikle oksidatif strese karşı primer koruma hattında olmasından ötürü (243,248) çalışmamızın elde edilen sonuçları ile terapötik etkisinin yüksek olduğunu görmekteyiz.

İmamoğlu ve ark., 2013 yılında yaptığı bir çalışmada deneysel laparoskopi modelinde testislerde pnömoperitoneum uygulamasının uzun dönem sonuçlarını belirlemek temel amaç olarak ele alınmış ve testislerdeki hasarı kronik dönemde değerlendirmek için deney süresi 6 hafta olarak belirlenmiştir. Deney esnasında Grup A (kontrol), Grup B (10 mmHg intraabdominal basınca maruz bırakılan grup) ve Grup C (20 mmHg intraabdominal basınca maruz bırakılan grup) olmak üzere 3 ana grup belirlenmiştir. Histopatolojik inceleme için JTBS sistemi kullanılmış ve tüm gruplar arasında anlamlı farklar belirlenmiştir. Bu çalışma, pnömoperiton sırasında artan intraabdominal basıncın (IAP), IAP artışının büyüklüğüne bağlı olarak uzun vadede testislerde histopatolojik ve apoptotik olarak belirgin hasara neden olduğunu ve bunun da sub/infertiliteye neden olabileceğini göstermiştir (249).

Biz de çalışmamızın spermatogenezin kantitatif histolojik değerlendirmesinde JTBS kullanarak torsiyonun ürettiği hasarı çalışmamızda değerlendirdik (250).

Johnsen skorlama yöntemi ile ilgili olarak, farklı çalışmalarda da T/D grubunda kontrol grubuna göre Johnsen skorlarının önemli oranda azaldığı bildirilmiştir (251–253). Mevcut çalışmada da önceki çalışmalarla paralel olarak, torsiyon grubunda gözlemlediğimiz histopatolojik bulgular literatürle uyumluydu ve testis hasarının geliştiğini gösteriyordu. Torsiyon grubunda Johnsen skorlarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir. T/D kaynaklı iskemi/reperfüzyon hasarındaki ilgili histopatolojik değişikliklerin aşırı SOR üretimi sonucu ortaya çıkan oksidatif stresten kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Aynı şekilde histopatolojik araştırmaların sonuçları anne sütü eksozomunun testis dokusunun iskemik-reperfüzyon hasarında olumlu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Lokal uygulanan eksozomun torsiyon grubu ile karşılaştırıldığında testiküler biyopsi skorlarının yükseldiğini görmekteyiz ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Bunun sebebinin hayvan hakları nedeniyle oluşturulan gruplardaki rat sayısının minimalde tutulmuş olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Sistemik verilmiş olan anne sütü eksozomunun ise sonuçları değerlendirildiğinde biyopsi skorlama sisteminde kontrol grubuna oldukça yaklaşmış olduğunu, ipsilateral testislerdeki histopatolojik hasarı iyileştirdiği ve spermatogenezini neredeyse normale döndürdüğünü görmekteyiz ki bu durum da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçla anne sütünün potansiyel bir terapötik değere sahip olabileceği ve klinikte testis torsiyonlu hastalarda doğurganlığı arttırabileceği sonucuna vardık.

SOD ve CAT gibi diğer non spesifik antioksidan enzimlere göre GPX'teki sayısal parametreler değerlendirildiğinde 6 haftalık kronik dönem içerisine girilmesine rağmen torsiyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı yükselişin devam ettiğini görmekteyiz. Bunun için antioksidan olarak kullandığımız anne sütü eksozomunun da hem lokal hem sistemik gruplarda oksidatif stresi baskıladığı için sayısal azalmayı görmekteyiz ve bu durum lokal grubunda istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ve hem lokal grupta hem de sistemik grupta Johnsen skorlarının yükselmesi de histopatolojik olarak iyileşmeyi desteklemiştir.

Hipotezimizin tüm destekçileri ile yola çıktığımız bu çalışmada anne sütünden elde edilen eksozomların, günümüzde cerrahi tedavinin yanında ek desteği olmayan testis

torsiyonu tedavisinde inflamasyonu ve apaptozu azaltarak sperm kalitesi işlevine katkı sağladığını düşünmekteyiz ve bu şekilde olası infertiliteyi azaltacağına inanmaktayız.

Alanındaki sürekli ilerlemeler ile kendini yenileyen eksozomların modern tıbbı devrim niteliğinde değiştireceğini düşünmekteyiz.



6. SINIRLAMALAR

Çalışmamızın temel sınırlaması, yalnızca tek bir doz uygulayarak testis torsiyonu üzerindeki kronik etkilerine odaklanmamızdır. Gelecekteki çalışmalar, anne sütü eksozomunun testis torsiyonu için kısa ve uzun vadeli etkilerini, optimum dozaj rejimini ve uygulama sıklıklarını da değerlendirmeyi düşünmelidir. Yukarıda belirtilen sınırlamalara ek olarak, çalışmamızın diğer sınırlamalarını da kabul etmek önemlidir. İlk olarak etki mekanizmalarına ilişkin ek içgörüler sağlayabilecek olan hormon profillerini değerlendirmemiz ve patolojik incelemelerimizde immünohistokimyasal analizlerin olmaması, belirli hücrel belirteçleri ve moleküler yolları araştırma yeteneğimizi sınırladı. Son olarak yaptığımız literatür taramasında kontralateral testis değerlendirilmesinin de oldukça nadir yapıldığını gördük. Tüm bu sınırlamalar, anne sütü eksozomunun testis dokusu üzerindeki etkilerini incelemede iyileştirme alanlarını ve gelecekteki araştırma yönlerini vurgulamaktadır.

7. SONUÇ

Sonuçta bu çalışma anne sütü eksozomunun testis torsiyonu modelinde yapıp uzun dönem etkinliğine bakılan ilk çalışmadır. Tüm bu sonuçlar anne sütü eksozomunun testis torsiyonu-detorsiyonu olan hastalar için etkili bir teröpatik ajan olabileceğini düşündürmektedir. Eksozom tedavisini yalnızca eksozom izolasyonu, karakterizasyonu ve mühendisliği alanlarında değil, aynı zamanda eksozom tedavisinin optimum dozunu, zamanlamasını, uygulamasını ve sıklığını belirlemede de optimize etmek için daha fazla araştırma gereklidir. Fizyolojik aktivite, güvenlik, biyouyumluluk ve ilaç iletim potansiyeli göz önüne alındığında süt eksozomlarının testis torsiyonu medikal tedavisinde uygulamaları heyecan uyandırmaktadır. Ancak, bu etkinliğin moleküler mekanizması hakkında ayrıntılar elde etmek için sonuçlarımız gelecekte prospektif, randomize ve kontrollü klinik çalışmalarla desteklenmelidir. Mutlaka doza bağlı analizler yapılmalıdır ve doğrulamak için klinik çalışmaları yapılmalıdır.



8. KAYNAKÇA

1. Yagmurdur H, Ayyildiz A, Karaguzel E, Ogus E, Surer H, Caydere M, vd. The preventive effects of thiopental and propofol on testicular ischemia-reperfusion injury. *Acta Anaesthesiol Scand* [Internet]. Kasım 2006 [a.yer 27 Mayıs 2024];50(10):1238-43. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17067323/>
2. Diagnostic accuracy of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in patients with acute scrotum - PubMed [Internet]. [a.yer 27 Mayıs 2024]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17590844/>
3. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Protective effect of rutin on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* [Internet]. Temmuz 2011 [a.yer 27 Mayıs 2024];46(7):1419-24. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21763845/>
4. Gezici A, Ozturk H, Buyukbayram H, Ozturk H, Okur H. Effects of gabexate mesilate on ischemia-reperfusion-induced testicular injury in rats. *Pediatr Surg Int* [Internet]. Mayıs 2006 [a.yer 27 Mayıs 2024];22(5):435-41. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16557390/>
5. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat - PubMed [Internet]. [a.yer 27 Mayıs 2024]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8537252/>
6. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl* [Internet]. Eylül 2008 [a.yer 27 Mayıs 2024];29(5):488-98. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18567643/>
7. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*. Mart 2001;53(1):135-59.
8. Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi B, Mühendisliği Bölümü B, Teknik Üniversitesi G. EKSOZOMLARIN HASTALIKLARDAKİ ROLÜ, TANI VE TEDAVİ AMAÇLI KULLANIMI. *Beykent Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* [Internet]. 22 Ekim 2021 [a.yer 27 Mayıs 2024];14(1):15-26. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/bujse/issue/65185/874609>
9. Tasci A, Uguralp S, Akatli AN, Arslan AK, Karabulut AB. Long-term effects of orchiopexy and orchiectomy on the testes of rats with testicular torsion. *J Pediatr Urol*. Haziran 2022;18(3):376.e1-376.e7.
10. Ünal T, Öztürk, Hatice S.Y. Cömert, Gül Şalcı, Ahmet Alver, Sevdegül A. Mungan, Neslihan Sağlam, vd. Evaluation of the effectiveness of human breast milk exosomes in experimental testicular torsion-detorsion injury model. *Cir Cir*. 2024;1-7.
11. Moore KL, Persaud TVN. *Potter's Pathology of the Fetus and Infant E-Book: 2-Volume Set*. C. 2. 2013. 293-295 s.
12. Şeftalioğlu A. Genel ve özel insan embriyolojisi. C. 3. 1998. 346-350 s.
13. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. 2018. 234-236 s.

14. Keith L. Moore, T. V. N. Persaud. The Developing Human. 2013;298-9.
15. Larsen WJ. Human Embryology. 2001. 328-330 s.
16. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human. 2013. 301-303 s.
17. James a. O'Neill, Marc I. Rowe, Arnold Coran, Eric Fonkalsrud. Pediatric Surgery. 5. bs. C. 2. 1998. 1073-1106 s.
18. Başaklar AC. Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları. 2006. 1717-1752 s.
19. WB saunders Walsh PCRA, Vaughan ED, Jr WA. Campbell's Urology. 8. bs. Philadelphia; 2002.
20. Tanagho EA, McAninch JW. Smith's general urology. 2008.
21. Anne M. R. Agur, Keith L. Moore, Arthur F. Dalley. Moore's Clinically Oriented Anatomy. 2018. 334-335 s.
22. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 2018. 320 s.
23. Larsen W. Human Embryology. 2001. 353-355 s.
24. Anne M. R. Agur, Keith L. Moore, Arthur F. Dalley. Moore's Clinically Oriented Anatomy. 2018. 337 s.
25. <https://www.tibeterdogru.com/testis-nedir-erbezi-nedir/>.
26. Anne M. R. Agur, Keith L. Moore, Arthur F. Dalley. Moore's Clinically Oriented Anatomy. 2018. 336 s.
27. Netter FH. Atlas of Human Anatomy. 3. bs. 2005.
28. Fritjofsson Å, Persson JE, Pettersson S. Testicular Blood Flow in Man Measured with Xenon-133. Scand J Urol Nephrol. 09 Ocak 1969;3(3):276-80.
29. Larsen WJ. Larsen's human embryology. 2001. 355-356 s.
30. Moore KL, DAF, & AAMR. Clinically Oriented Anatomy. 2018. 338-338 s.
31. Harrison RG (1949). Harrison RG (1949),The comparative anatomy of the blood supply of the mammalian testis. . 1949. 325-344 s.
32. Kim ED LL HS. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins-In Adult and pediatric urology. 4. bs. C. 1683-58. 2002.
33. Snell RS. Clinical anatomy. 3rd ed. Boston: Brown and Company ; 1986. 168 s.
34. Kuran O, editör. Sistematiik anatomi. 1.Baskı. 1983. 512-514 s.
35. https://www.wikilectures.eu/w/Spermatic_cord.
36. Paker ğ. Paker,ğ. Histoloji. BURSA: Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1990. 448-467 s.
37. Esrefoglu M. Özel Histoloji. Malatya Medipres Yayıncılık. 2009;253-64.
38. Bloom W FD. Male reproductive system. In: A Textbook of Histology. 11th ed WB Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto. 1986;796-835.

39. Wrobel KH. Male reproductive system. In Dellmann HD, Eurell J.A (Eds). Textbook of Veterinary Histology 5th.ed Williams and Wilkins, Pennsylvania, USA. 1998;226-35.
40. Esrefoglu M. Özel Histoloji. Malatya Medipres Yayıncılık. 2009;253-64.
41. Junqueira, L. C., Carneiro J. Basic Histology Text and Atlas. London: McGraw Hill. 2005;
42. Bloom W FD. Male reproductive system. In: A Textbook of Histology. 11th ed WB Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto. 1986;796-835.
43. Leeson, T LR. The male reproductive system. In. Histology. 2nd ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto. 1970;
44. Wrobel KH. Male reproductive system. In Dellmann HD, Eurell J.A (Eds). Textbook of Veterinary Histology 5th.ed Williams and Wilkins, Pennsylvania, USA. 1998;226-35.
45. Esrefoglu M. Özel Histoloji. . Malatya Medipres Yayıncılık ; 2009. 253-264 s.
46. Gartner PG HJ. Color Text Book of Histology. . C. 3. Baskı. Philadelphia, WB Saunders Co; 2006. 406-412 s.
47. <https://www.biyolojigunlugu.com/topic/1800/#comment-1863>.
48. Kayalı H. Özel histoloji. İstanbul Üniversitesi Film Merkezi; 1989. 218-228 s.
49. El Osta R, Almont T, Diligent C, Hubert N, Eschwège P, Hubert J. Anabolic steroids abuse and male infertility. Basic Clin Androl. 06 Şubat 2016;26(1):2.
50. Çilenk KT, Öztürk İ, Sönmez MF. Ameliorative effect of propolis on the cadmium-induced reproductive toxicity in male albino rats. Exp Mol Pathol. Ekim 2016;101(2):207-13.
51. Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of Testicular Function. İçinde: Andrology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. s. 11-59.
52. Feldmana GJ MJRM. Occludin: structure, function and regulation. . Adv Drug Deliv Rev;; 2005. 883-817 s.
53. Saba M, Morales CR, De Lamirande E, Gagnon C. Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. Journal of Urology. 1997;157(3):1149-54.
54. Nöske HD KWABWW. Historical milestones regarding torsion of the scrotal organs. 159; 1998.
55. Jukić M, Bolnički K, Split C, Mestrovic J, Pogorelić Z, Mustapić K, vd. 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. 2016;23(6).
56. Saba M, Morales CR, De Lamirande E, Gagnon C. Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. Journal of Urology. 1997;157(3):1149-54.

57. Bartsch G FSMHMG. Testicular torsion: late results with special to fertility and endocrine function. J Urol., editör. 1980. 375-378 s.
58. Cuckov PM and Frank JD. Torsion of the testis. BJU. International.; 2000. 349-353 s.
59. Testicular torsion. Pediatric Urology. Edited by Achcraft KW Leape LL. Testicular torsion. Pediatric Urology. Edited by Achcraft KW . Achcraft KW. W.B., editör. Saunders Company Philadelphia.; 1990. 429-436 s.
60. Özdemir K SÇ. Çocuklarda akut skrotum. SDÜ Tıp Fakültesi dergisi . 2000;7(4):50-60.
61. Prater JM, Overdorf BS. Testicular torsion: a surgical emergency. Am Fam Physician. Eylül 1991;44(3):834-40.
62. Heyns CF VAJ. Problem: Emergencies in Andrology. In: Schiller WB, Comhaire FH, editors. Andrology for the Clinician Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2006;134-47.
63. Haynes BE, Bessen HA, Haynes VE. The diagnosis of testicular torsion. JAMA. 13 Mayıs 1983;249(18):2522-7.
64. Rabinowitz R. The Importance of the Cremasteric Reflex in Acute Scrotal Swelling in Children. Journal of Urology. Temmuz 1984;132(1):89-90.
65. Anderson JB, Williamson RCN. Testicular torsion in Bristol: A 25-year review. Journal of British Surgery. 01 Ekim 1988;75(10):988-92.
66. Bloom DA WJKD. Disorders of the male external genitalia and inguinal canal. Clinical Pediatric Urology. Kelalis PP KLBABWB, editör. Saunders Company, Philadelphia; 1992. 1032-1034 s.
67. Bowlin PR, Gatti JM, Murphy JP. Pediatric Testicular Torsion. Surgical Clinics of North America. Şubat 2017;97(1):161-72.
68. Cilento BG, Najjar SS, Atala A. Cryptorchidism and Testicular Torsion. Pediatr Clin North Am. Aralık 1993;40(6):1133-49.
69. Heyns CF VAJ. Problem: Emergencies in Andrology. In: Schiller WB, Comhaire FH, editors. Andrology for the Clinician Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2006;134-47.
70. Zupančić B. Akutni skrotum. Paediatr Croat. 1999;43:175-80.
71. Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM. Testicular Torsion: Diagnosis, Evaluation, and Management. Am Fam Physician. Aralık 2013;88(12):835-40.
72. DY T, E S. A quantitative study of the effect of ischaemia on the germinal epithelium of rat testes. J Reprod Fertil. 1970;21(3):489-94.
73. TT T, KJ B. Spermatoc cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. Biol Reprod. 1993;49(2):401-7.
74. DY T, E S. A quantitative study of the effect of ischaemia on the germinal epithelium of rat testes. J Reprod Fertil. 1970;21(3):489-94.
75. Williamson RC, Thomas WE. Sympathetic orchidopathia. Ann R Coll Surg Engl. Temmuz 1984;66(4):264-6.

76. Z P, I M, I J. Do not forget to include testicular torsion in differential diagnosis of lower acute abdominal pain in young males. *J Pediatr Urol.* 2013;9(6 Pt B):1161-5.
77. Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM. Testicular Torsion: Diagnosis, Evaluation, and Management. *Am Fam Physician.* Aralık 2013;88(12):835-40.
78. T K. The testes after torsion. *Br J Urol.* 1978;50(1):43-6.
79. Hutson JM. Undescended Testis, Torsion, and Varicocele. İçinde: *Pediatric Surgery.* Elsevier; 2012. s. 1003-19.
80. Sharer WC. Acute Scrotal Pathology. *Surgical Clinics of North America.* Aralık 1982;62(6):955-70.
81. Currie BG, Kern IB, Hagan BE. Torsion of the testis. *Med J Aust.* 20 Kasım 1989;151(10):568-74.
82. Shergill I, Foley C, Arya M, Bott S, Mundy A. Testicular torsion unravelled. *Hospital Medicine.* Ağustos 2002;63(8):456-9.
83. Sade M EAÇİMU. Ürogenital sistemin acil yaklaşım gerektiren hastalıkları. *Temel Üroloji.* Güneş Kitapevi, Ankara; 1998. 963-963 s.
84. Ciftci AO, Şenocak ME, Cahit Tanyel F, Büyükpamukçu N. Clinical Predictors for Differential Diagnosis of Acute Scrotum. *European Journal of Pediatric Surgery.* Ekim 2004;14(5):333-8.
85. Noske HD, Kraus SW, Altinkilic BM, Weidner W. HISTORICAL MILESTONES REGARDING TORSION OF THE SCROTAL ORGANS. *Journal of Urology.* Ocak 1998;159(1):13-6.
86. Tanagho E WMJ. In the disorders of the testes, scrotum spermatic cord:Smith's General Urology. *Lange Medical Books/McGraw-Hill Companies;* ; 2000. 687-687 s.
87. MW S, MA K. The acute pediatric scrotum. *J Emerg Med.* 1993;11(5):565-77.
88. R R. The importance of the cremasteric reflex in acute scrotal swelling in children. *J Urol.* 1984;132(1):89-90.
89. Karmazyn B, Steinberg R, Kornreich L, Freud E, Grozovski S, Schwarz M, vd. Clinical and sonographic criteria of acute scrotum in children: a retrospective study of 172 boys. *Pediatr Radiol.* 16 Mart 2005;35(3):302-10.
90. Bartsch G, Frank St, Marberger H, Mikuz G. Testicular Torsion: Late Results with Special Regard to Fertility and Endocrine Function. *Journal of Urology.* Eylül 1980;124(3):375-8.
91. Baker LA, Sigman D, Mathews RI, Benson J, Docimo SG. An Analysis of Clinical Outcomes Using Color Doppler Testicular Ultrasound for Testicular Torsion. *Pediatrics.* 01 Mart 2000;105(3):604-7.
92. Rabinowitz R, Hulbert WC. Acute scrotal swelling. *Urol Clin North Am.* Şubat 1995;22(1):101-5.
93. KAIPIA A, RYYMIN P, MÄKELÄ E, AALTONEN M, KÄHÄRÄ V, KANGASNIEMI M. Magnetic resonance imaging of experimental testicular torsion. *Int J Androl.* 18 Aralık 2005;28(6):355-9.

94. Meštrović J, Biočić M, Pogorelić Z, Furlan D, Družijanić N, Todorčić D, vd. Differentiation of inflammatory from non-inflammatory causes of acute scrotum using relatively simple laboratory tests: Prospective study. *J Pediatr Urol.* Haziran 2013;9(3):313-7.
95. Eds Ashcraft MSSS. Testicular Torsion. İçinde: *Pediatric Surgery 3rd Edition.* United States of America: Saunders Company.; 2000. s. 674-80.
96. Marcozzi D, Suner S. THE NONTRAUMATIC, ACUTE SCROTUM. *Emerg Med Clin North Am.* Ağustos 2001;19(3):547-68.
97. Miller DC, Peron SE, Keck RW, Kropp KA. Effects of Hypothermia on Testicular Ischemia. *Journal of Urology.* Mayıs 1990;143(5):1046-8.
98. Ringdahl EN, Teague L. Testicular Torsion. *Am Fam Physician.* Kasım 2006;74(10):1739-43.
99. Kapoor S. Testicular torsion: a race against time. *Int J Clin Pract.* Mayıs 2008;62(5):821-7.
100. AO C, ME S, FC T, N B. Clinical predictors for differential diagnosis of acute scrotum. *Eur J Pediatr Surg.* Ekim 2004;14(5):333-8.
101. Barteczko KJ, Jacob MI. The Testicular Descent in Human. 2000;156.
102. Favorito LA, Cavalcante AG, Costa WS. Anatomic aspects of epididymis and tunica vaginalis in patients with testicular torsion. *Int Braz J Urol.* 2004;30(5):420-4.
103. Mansbach JM, Forbes P, Peters C. Testicular torsion and risk factors for orchiectomy. *Arch Pediatr Adolesc Med.* Aralık 2005;159(12):1167-71.
104. Ringdahl EN, Teague L. Testicular Torsion. *Am Fam Physician.* Kasım 2006;74(10):1739-43.
105. Anderson JB, Williamson RCN. Testicular torsion in Bristol: a 25-year review. *Br J Surg.* 1988;75(10):988-92.
106. Bolln C, Driver CP, Youngson GG. Operative management of testicular torsion: current practice within the UK and Ireland. *J Pediatr Urol.* Haziran 2006;2(3):190-3.
107. Bellinger MF, Abromowitz H, Brantley S, Marshall G. Orchiopexy: An Experimental Study of the Effect of Surgical Technique on Testicular Histology. *Journal of Urology.* Ağustos 1989;142(2 Part 2):553-5.
108. Kaye JD, Shapiro EY, Levitt SB, Friedman SC, Gitlin J, Freyle J, vd. Parenchymal echo texture predicts testicular salvage after torsion: potential impact on the need for emergent exploration. *J Urol.* Ekim 2008;180(4 Suppl):1733-6.
109. Beni-Israel T, Goldman M, Bar Chaim S, Kozer E. Clinical predictors for testicular torsion as seen in the pediatric ED. *Am J Emerg Med.* Eylül 2010;28(7):786-9.
110. Kapoor S. Testicular torsion: a race against time. *Int J Clin Pract.* 11 Nisan 2008;62(5):821-7.
111. Mäkelä E, Lahdes-Vasama T, Rajakorpi H, Wikström S. A 19-Year Review of Paediatric Patients with Acute Scrotum. *Scandinavian Journal of Surgery.* 01 Mart 2007;96(1):62-6.
112. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of Surgical Research.* Haziran 2002;105(2):248-58.

113. Orhan İ HHDİ et al. Tek taraflı testis torsiyonunda PAF antagonistinin karşı taraf testisin iskemik hasarındaki koruyucu etkinliği. Türk Üroloji Dergisi . 2004;1(30):11-6.
114. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J Pathol. Şubat 2000;190(3):255-66.
115. Cadenas E. Mechanisms of Oxygen Activation and Reactive Oxygen Species Detoxification. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. 1995;1-61.
116. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. J Urol. Ocak 1997;157(1):340-5.
117. Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Graham B, Suchy H, Kucan JO. Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. Plast Reconstr Surg. 1993;91(6):1110-23.
118. Tentori L, Portarena I, Graziani G. Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. Pharmacol Res. 2002;45(2):73-85.
119. Scarabelli TM, Mariotto S, Abdel-Azeim S, Shoji K, Darra E, Stephanou A, vd. Targeting STAT1 by myricetin and delphinidin provides efficient protection of the heart from ischemia/reperfusion-induced injury. FEBS Lett. Şubat 2009;583(3):531-41.
120. Oruc O, Inci K, Aki FT, Zeybek D, Muftuoglu SF, Kilinc K, vd. Sildenafil attenuates renal ischemia reperfusion injury by decreasing leukocyte infiltration. Acta Histochem. Temmuz 2010;112(4):337-44.
121. Janos Z KD. Oxidative Stres and Disease 10: Nutrients and Cell Signaling. Taylor & Francis. 2005;
122. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses. Molecular and Cellular Biochemistry 2000 205:1. 2000;205(1):1-11.
123. Parlaktas BS, Atilgan D, Gencten Y, Akbas A, Markoc F, Erdemir F, vd. The effects of carvedilol on ischemia-reperfusion injury in the rat testis. Int Braz J Urol. Ocak 2014;40(1):109-17.
124. Ünsal A, Devrim E, Guven C, Eroglu M, Durak I, Bozoklu A, vd. Propofol attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion. World J Urol. Aralık 2004;22(6):461-5.
125. de Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage. Free Radic Biol Med. Ocak 1999;26(1-2):202-26.
126. SCHOENBERG MH, BEGER HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. Crit Care Med. Eylül 1993;21(9):1376-86.
127. Wu HC, Sun SS, Kao A, Chuang FJ, Lin CC, Lee CC. Comparison of radionuclide imaging and ultrasonography in the differentiation of acute testicular torsion and inflammatory testicular disease. Clin Nucl Med. Temmuz 2002;27(7):490-3.
128. Kumar, V., Abbas, A. K., Aster JC. Robbins Basic Pathology. St Louis: Elsevier. 2013;

129. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol.* Nisan 2005;100(2):179-90.
130. Mitchell RN CR. Temel patoloji 6. Baskı. 6. bs. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi ; 2000.
131. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991;161(4):488-503.
132. Şener G YB. İskemi-Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi.* 2009;22:5-13.
133. ◆nsal A, Devrim E, Guven C, Eroglu M, Durak I, Bozoklu A, vd. Propofol attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion. *World J Urol.* 04 Aralık 2004;22(6):461-5.
134. Kumar V CRRSL. Basic Pathology. 6th ed. 2000. 30-36 s.
135. Şener G YB. İskemi-Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi.* 2009;22:5-13.
136. Joannidis M, Bonn G, Pfaller W. Lipid Peroxidation – An Initial Event in Experimental Acute Renal Failure. *Kidney Blood Press Res.* 1989;12(1):47-55.
137. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull.* Ocak 1993;49(3):700-18.
138. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. *ACS Symposium Series.* Kasım 2011;1083:1-37.
139. T K. The testes after torsion. *Br J Urol.* 1978;50(1):43-6.
140. Filho DW, Torres MA, Bordin ALB, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia–reperfusion injury. *Mol Aspects Med.* Şubat 2004;25(1-2):199-210.
141. Aitken J, Buckingham D, Krausz C. 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. *Mol Reprod Dev.* 1994;39(3):268-79.
142. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 1993;35(3):302-15.
143. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol.* 1994;152(1):107-10.
144. Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, vd. 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.* 1997;47:468-82.
145. DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa: I. Effects on the Motility of Intact Spermatozoa and on Sperm Axonemes. *J Androl.* 1992;13(5):368-78.

146. Spiropoulos J, Turnbull DM, Chinnery PF. Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Hum Reprod.* Ağustos 2002;8(8):719-21.
147. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol.* Ocak 2008;59(1):2-11.
148. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 2007;33(5):603-21.
149. Demirtaş A, Üntan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İ, Anabilim Dalı Ü. Seminal Sıvı ve Spermde Oksidatif Stres ve Antioksidanlar Antioxidants and Oxidative Stress in Seminal Fluid and Sperm.
150. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull.* Ocak 1993;49(3):700-18.
151. Al-Maghrebi M, Kehinde EO, Anim JT. Long term testicular ischemia–reperfusion injury-induced apoptosis: Involvement of survivin down-regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* Mayıs 2010;395(3):342-7.
152. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17 Nisan 2018;19(4):213-28.
153. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11 Ekim 2014;30(1):255-89.
154. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, vd. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 23 Aralık 2018;7(1).
155. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* Mayıs 2013;113(1):1-11.
156. Rashidi M, Bijari S, Khazaei AH, Shojaei-Ghahrizjani F, Rezakhani L. The role of milk-derived exosomes in the treatment of diseases. *Front Genet.* 2022;13:1009338.
157. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev.* Aralık 2013;32(3-4):623-42.
158. Zhang X, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol.* Temmuz 2015;8(1).
159. Zhang G, Yang P. A novel cell-cell communication mechanism in the nervous system: exosomes. *J Neurosci Res.* Ocak 2018;96(1):45-52.
160. Tian T, Zhu YL, Hu FH, Wang YY, Huang NP, Xiao ZD. Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J Cell Physiol.* Temmuz 2013;228(7):1487-95.
161. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJA. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* Mart 2011;29(4):341-5.

162. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)*. Nisan 2013;91(4):431-7.
163. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)*. Nisan 2013;91(4):431-7.
164. Lässer C, Seyed Alikhani V, Ekström K, Eldh M, Torregrosa Paredes P, Bossios A, vd. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med*. 14 Aralık 2011;9(1):9.
165. Kalluri R, LeBleu VS. The biology , function , and biomedical applications of exosomes. *Science* (1979). 07 Şubat 2020;367(6478).
166. Zhang B, Shen L, Shi H, Pan Z, Wu L, Yan Y, vd. Exosomes from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: Identification, Purification, and Biological Characteristics. *Stem Cells Int*. 25 Ocak 2016;2016(1).
167. Sun T, Li M, Liu Q, Yu A, Cheng K, Ma J, vd. Insights into optimizing exosome therapies for acute skin wound healing and other tissue repair. *Front Med*. Nisan 2024;18(2):258-84.
168. Barceló M, Mata A, Bassas L, Larriba S. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. *Hum Reprod*. Haziran 2018;33(6):1087-98.
169. Gabrielsen JS, Lipshultz LI. Rapid progression in our understanding of extracellular vesicles and male infertility. *Fertil Steril*. Mayıs 2019;111(5):881-2.
170. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvald JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 07 Haziran 2007;9(6):654-9.
171. Masciopinto F, Giovani C, Campagnoli S, Galli-Stampino L, Colombatto P, Brunetto M, vd. Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur J Immunol*. 24 Ekim 2004;34(10):2834-42.
172. van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, vd. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Dev Cell*. Ekim 2011;21(4):708-21.
173. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. *Journal of Biological Chemistry*. Haziran 2010;285(23):17442-52.
174. Wang H, Hou L, Li A, Duan Y, Gao H, Song X. Expression of Serum Exosomal MicroRNA-21 in Human Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-5.
175. Aushev VN, Zborovskaya IB, Laktionov KK, Girard N, Cros MP, Herceg Z, vd. Comparisons of microRNA Patterns in Plasma before and after Tumor Removal Reveal New Biomarkers of Lung Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*. 09 Ekim 2013;8(10):e78649.
176. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, vd. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 16 Aralık 2008;10(12):1470-6.

177. Eksozomlar: Tanı ve Tedavide Kullanılabilen Doğal Nanokesecek Adayları Exosomes: Natural Nanovesicle Candidates Used in the Diagnosis and Treatment.
178. Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E, Schwartz JB, vd. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimer's & Dementia*. 14 Haziran 2015;11(6):600.
179. Sun CK, Chen CH, Chang C Lo, Chiang HJ, Sung PH, Chen KH, vd. Melatonin treatment enhances therapeutic effects of exosomes against acute liver ischemia-reperfusion injury. *Am J Transl Res*. 2017;9(4):1543.
180. Zahran R, Ghazy A, Elkholy SS, El-Taweel F, El-Magd MA. Combination therapy with melatonin, stem cells and extracellular vesicles is effective in limiting renal ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Int J Urol*. Kasım 2020;27(11):1039-49.
181. Lin KC, Yip HK, Shao PL, Wu SC, Chen KH, Chen YT, vd. Combination of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes for protecting kidney from acute ischemia-reperfusion injury. *Int J Cardiol*. Ağustos 2016;216:173-85.
182. Angoulvant D, Ivanov F, Ferrera R, Matthews PG, Nataf S, Ovize M. Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant*. Ocak 2011;30(1):95-102.
183. Yuyama K, Sun H, Mitsutake S, Igarashi Y. Sphingolipid-modulated Exosome Secretion Promotes Clearance of Amyloid- β by Microglia. *Journal of Biological Chemistry*. Mart 2012;287(14):10977-89.
184. Hade MD, Suire CN, Suo Z. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Applications in Regenerative Medicine. *Cells*. 01 Ağustos 2021;10(8):1959.
185. Zhang B, Zhao M, Lu Q. Extracellular Vesicles in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Functions and Applications. *Front Immunol*. 14 Ocak 2021;11.
186. LAEMMLI UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. Ağustos 1970;227(5259):680-5.
187. Roszkowski S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes for regenerative medicine applications. *Clin Exp Med*. 01 Mart 2024;24(1):46.
188. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. Mayıs 1978;86(1):271-8.
189. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. Mart 1988;34(3):497-500.
190. Ulrich E in chief H, Verlag B. *Methods of Enzymatic Analysis : Third Edition Vitamine I n Fettlösliche Vitamine (Vitamins I - - Fat soluble vitamins)*. 1984;1983:1984.
191. Moghimian M, Soltani M, Abtahi H, Shokoohi M. Effect of vitamin C on tissue damage and oxidative stress following tunica vaginalis flap coverage after testicular torsion. *J Pediatr Surg*. Ekim 2017;52(10):1651-5.
192. Tatjana Cvetkovic 1 Jablan Stankovic 2 Stevo Najman 3 Dusica Pavlovic 4 Dragana Stokanovic 5 Slobodan Vlajkovic 6 Marija Dakovic-Bjelakovic 6 Jovana Cukuranovic

- 6 Vladimir Zivkovic 6 Vladislav Stefanovic 7. Oxidant and Antioxidant Status in Experimental Rat Testis after Testicular Torsion/Detorsion. *Int J Fertil Steril*. Nisan 2015;121-8.
193. Meštrović J, Drmić-Hofman I, Pogorelić Z, Vilović K, Šupe-Domić D, Šešelja-Perišin A, vd. Beneficial Effect of Nifedipine on Testicular Torsion-detorsion Injury in Rats. *Urology*. Kasım 2014;84(5):1194-8.
 194. Arena S, Iacona R, Antonuccio P, Russo T, Salvo V, Gitto E, vd. Medical perspective in testicular ischemia-reperfusion injury. *Exp Ther Med*. Mayıs 2017;13(5):2115-22.
 195. Soltani M, Moghimian M, Abtahi-Eivari SH, Shoorei H, Khaki A, Shokoohi M. Protective Effects of *Matricaria chamomilla* Extract on Torsion/ Detorsion-Induced Tissue Damage and Oxidative Stress in Adult Rat Testis. *Int J Fertil Steril*. Haziran 2018;12(3):242-8.
 196. Erdemir F, Fındık E, Ceylan M, Söğüt E, Çaylı S, Kesici H. İzogenol tabanlı etkili yeni bir antioksidanın testis torsiyonu oluşturulan ratlarda testis dokuları üzerine olan etkilerinin melatoninle karşılaştırılması. *Androloji Bülteni*. 2017;
 197. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4(8):118.
 198. Vaos G, Zavras N. Antioxidants in experimental ischemia-reperfusion injury of the testis: Where are we heading towards? *World J Methodol*. 26 Haziran 2017;7(2):37-45.
 199. Deng C, Xie Y, Zhang C, Ouyang B, Chen H, Lv L, vd. Urine-Derived Stem Cells Facilitate Endogenous Spermatogenesis Restoration of Busulfan-Induced Nonobstructive Azoospermic Mice by Paracrine Exosomes. *Stem Cells Dev*. 01 Ekim 2019;28(19):1322-33.
 200. Canning P, Alwan A, Khalil F, Zhang Y, Opara EC. Perspectives and Challenges on the Potential Use of Exosomes in Bioartificial Pancreas Engineering. *Ann Biomed Eng*. Ekim 2022;50(10):1177-86.
 201. Yu Y, Chen M, Guo Q, Shen L, Liu X, Pan J, vd. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosome-derived miR-874-3p targeting RIPK1/PGAM5 attenuates kidney tubular epithelial cell damage. *Cell Mol Biol Lett*. 07 Şubat 2023;28(1):12.
 202. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filén JJ, Lahesmaa R, Norman M, vd. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*. 01 Ağustos 2007;179(3):1969-78.
 203. El-Kattawy AM, Algezawy O, Alfaifi MY, Noseer EA, Hawsawi YM, Alzahrani OR, vd. Therapeutic potential of camel milk exosomes against HepaRG cells with potent apoptotic, anti-inflammatory, and anti-angiogenesis effects for colostrum exosomes. *Biomed Pharmacother*. Kasım 2021;143:112220.
 204. Del Pozo-Acebo L, Hazas MCL de Las, Tomé-Carneiro J, Gil-Cabrero P, San-Cristobal R, Busto R, vd. Bovine Milk-Derived Exosomes as a Drug Delivery Vehicle for miRNA-Based Therapy. *Int J Mol Sci*. 22 Ocak 2021;22(3).
 205. Kim KU, Kim WH, Jeong CH, Yi DY, Min H. More than Nutrition: Therapeutic Potential of Breast Milk-Derived Exosomes in Cancer. *Int J Mol Sci*. 03 Ekim 2020;21(19).

206. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, vd. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. Kasım 2010;56(11):1733-41.
207. Yi DY, Kim SY. Human Breast Milk Composition and Function in Human Health: From Nutritional Components to Microbiome and MicroRNAs. *Nutrients*. 02 Eylül 2021;13(9).
208. Liao Y, Du X, Li J, Lönnnerdal B. Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells. *Mol Nutr Food Res*. Kasım 2017;61(11).
209. Sanwlani R, Fonseka P, Chitti S V, Mathivanan S. Milk-Derived Extracellular Vesicles in Inter-Organism, Cross-Species Communication and Drug Delivery. *Proteomes*. 13 Mayıs 2020;8(2).
210. Bian D, Wu Y, Song G, Azizi R, Zamani A. The application of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derivative exosome in skin wound healing: a comprehensive review. *Stem Cell Res Ther*. 24 Ocak 2022;13(1):24.
211. Tang TT, Wang B, Lv LL, Liu BC. Extracellular vesicle-based Nanotherapeutics: Emerging frontiers in anti-inflammatory therapy. *Theranostics*. 2020;10(18):8111-29.
212. Verma P, Mohanty N, Pruseth B, Sahoo S, Katiyar A, Singh H, vd. Identification of Candidate Immune System MicroRNAs Differentially Found in Colostrum and Milk Exosomes. *Microrna*. 2022;11(3):216-26.
213. Samuel M, Chisanga D, Liem M, Keerthikumar S, Anand S, Ang CS, vd. Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth. *Sci Rep*. 19 Temmuz 2017;7(1):5933.
214. He S, Liu G, Zhu X. Human breast milk-derived exosomes may help maintain intestinal epithelial barrier integrity. *Pediatr Res*. Ağustos 2021;90(2):366-72.
215. Bozoğlu ST, Cömert HSY, Şalcı G, Alver A, Saygın İ, Sağlam N, vd. Evaluation of the effectiveness of mother milk exosomes in the experimental corrosive esophagitis model. *Pediatr Surg Int*. 02 Mayıs 2024;40(1):118.
216. Güngör D, Nadaud P, Dreibelbis C, LaPergola CC, Wong YP, Terry N, vd. Infant milk-feeding practices and childhood leukemia: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 01 Mart 2019;109(Suppl_7):757S-771S.
217. Ip S, Chung M, Raman G, Chew P, Magula N, DeVine D, vd. Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. Nisan 2007;153:1-186.
218. ESPGHAN Committee on Nutrition, Agostoni C, Braegger C, Decsi T, Kolacek S, Koletzko B, vd. Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. Temmuz 2009;49(1):112-25.
219. Melendez Hebib V, Taft DH, Stoll B, Liu J, Call L, Guthrie G, vd. Probiotics and Human Milk Differentially Influence the Gut Microbiome and NEC Incidence in Preterm Pigs. *Nutrients*. 31 Mayıs 2023;15(11).

220. Zhou Y, Yu Z, Wang X, Chen W, Liu Y, Zhang Y, vd. Exosomal circRNAs contribute to intestinal development via the VEGF signalling pathway in human term and preterm colostrum. *Aging*. 04 Nisan 2021;13(8):11218-33.
221. Dong P, Zhang Y, Yan DY, Wang Y, Xu X, Zhao YC, vd. Protective Effects of Human Milk-Derived Exosomes on Intestinal Stem Cells Damaged by Oxidative Stress. *Cell Transplant*. 2020;29:963689720912690.
222. Hu Y, Tao R, Chen L, Xiong Y, Xue H, Hu L, vd. Exosomes derived from pioglitazone-pretreated MSCs accelerate diabetic wound healing through enhancing angiogenesis. *J Nanobiotechnology*. 21 Mayıs 2021;19(1):150.
223. Li Q, Hu W, Huang Q, Yang J, Li B, Ma K, vd. MiR146a-loaded engineered exosomes released from silk fibroin patch promote diabetic wound healing by targeting IRAK1. *Signal Transduct Target Ther*. 13 Şubat 2023;8(1):62.
224. Hu L, Wang J, Zhou X, Xiong Z, Zhao J, Yu R, vd. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci Rep*. 12 Eylül 2016;6:32993.
225. Zhou Y, Zhao B, Zhang XL, Lu YJ, Lu ST, Cheng J, vd. Combined topical and systemic administration with human adipose-derived mesenchymal stem cells (hADSC) and hADSC-derived exosomes markedly promoted cutaneous wound healing and regeneration. *Stem Cell Res Ther*. 01 Mayıs 2021;12(1):257.
226. Dinh PUC, Paudel D, Brochu H, Popowski KD, Gracieux MC, Cores J, vd. Inhalation of lung spheroid cell secretome and exosomes promotes lung repair in pulmonary fibrosis. *Nat Commun*. 28 Şubat 2020;11(1):1064.
227. Liu C, Yan X, Zhang Y, Yang M, Ma Y, Zhang Y, vd. Oral administration of turmeric-derived exosome-like nanovesicles with anti-inflammatory and pro-resolving bioactions for murine colitis therapy. *J Nanobiotechnology*. 29 Nisan 2022;20(1):206.
228. Al-Masawa ME, Alshawsh MA, Ng CY, Ng AMH, Foo JB, Vijakumaran U, vd. Efficacy and safety of small extracellular vesicle interventions in wound healing and skin regeneration: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Theranostics*. 2022;12(15):6455-508.
229. Jia Y, Yu L, Ma T, Xu W, Qian H, Sun Y, vd. Small extracellular vesicles isolation and separation: Current techniques, pending questions and clinical applications. *Theranostics*. 2022;12(15):6548-75.
230. Janetschek G, Schreckenberger F, Grimm W, Marberger M. Hemodynamic effects of experimental testicular torsion. *Urol Res*. Eylül 1987;15(5).
231. TURNER TT. Acute Experimental Testicular Torsion: No Effect on the Contralateral Testis. *J Androl*. 02 Ocak 1985;6(1):65-72.
232. Tunçkiran A, Çayan S, Bozlu M, Yılmaz N, Acar D, Akbay E. Protective effect of vascular endothelial growth factor on histologic changes in testicular ischemia-reperfusion injury. *Fertil Steril*. Ağustos 2005;84(2):468-73.

233. Heindel RM, Pakyz RE, Reinking LN, Cosentino MJ. The Effect of Various Degrees of Unilateral Spermatid Cord Torsion on Fertility in the Rat. *Journal of Urology*. Ağustos 1990;144(2 Part 1):366-9.
234. Fonkalsrud EW. Testicular Undescent and Torsion. *Pediatr Clin North Am*. Ekim 1987;34(5):1305-17.
235. Pahwa R, Goyal A, Jialal I. *Chronic Inflammation*. 2025.
236. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 25 Haziran 2019;43(6):582-92.
237. Michels da Silva D, Langer H, Graf T. Inflammatory and Molecular Pathways in Heart Failure-Ischemia, HFpEF and Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *Int J Mol Sci*. 10 Mayıs 2019;20(9).
238. Zhang X, Wu X, Hu Q, Wu J, Wang G, Hong Z, vd. Mitochondrial DNA in liver inflammation and oxidative stress. *Life Sci*. Kasım 2019;236:116464.
239. Kohsaka T, Yoneda Y, Yoshida T, Minagawa I, Pitia AM, Iwasawa A, vd. Relaxin exerts a protective effect during ischemia-reperfusion in the rat model. *Andrology*. Ocak 2022;10(1):179-89.
240. Agarwal A, Aitken RJ, Alvarez JG, editörler. *Studies on Men's Health and Fertility*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012.
241. Kölükçü E, Firat F, Deresoy FA, Katar M, Atılğan D. The effects of pirfenidone on ischaemia-reperfusion injury in testicular torsion-induced rat model. *Andrologia*. Mart 2021;53(2):e13922.
242. Parlaktas BS, Atılğan D, Gençten Y, Akbas A, Markoc F, Erdemir F, vd. The effects of carvedilol on ischemia-reperfusion injury in the rat testis. *International braz j urol*. Ocak 2014;40(1):109-17.
243. Abdel-Kader MS, Abdel-Rahman RF, Althurwi HN, Soliman GA, Ogaly HA, Albaqami FF. Samarcandin protects against testicular ischemia/reperfusion injury in rats via activation of Nrf2/HO-1-mediated antioxidant responses. *Saudi Pharmaceutical Journal*. Temmuz 2023;31(7):1186-96.
244. Sarıkaya K, Kölükçü E, Unsal V, Özdemir S. Protective Effects of Syringic Acid on Ischemia-Reperfusion Injury in Testicular Torsion: An Experimental Study in a Rat Model. *Cureus*. Temmuz 2023;15(7):e42390.
245. Jafari A, Ghasemnejad-Berenji H, Nemati M, Pashapour S, Sadeghpour S, Ghasemnejad-Berenji M. Beneficial effects of memantine on ischemia/reperfusion injury following torsion/detorsion induced testicular damage in rats: Improvement in histological and biochemical parameters. *J Pediatr Urol*. Ağustos 2021;17(4):441.e1-441.e7.
246. Wei SM, Huang YM. Baicalein Alleviates Testicular Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Model of Testicular Torsion-Detorsion. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:1603469.
247. Elshaari F, Elfagih R, Sheriff D, Barassi I. Oxidative and antioxidative defense system in testicular torsion/detorsion. *Indian Journal of Urology*. 2011;27(4):479.

248. Sangodele JO, Inuwa Z, Lawal B, Adebayo-Gege G, Okoli BJ, Mtunzi F. Proxied plus salvage rat testis from ischemia- reperused injury by enhancing antioxidant's activities and inhibition of iNOS expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Ocak 2021;133:111086.
249. Imamoglu M, Sapan L, Tekelioglu Y, Sarihan H. Long-term effects of elevated intra-abdominal pressure on testes an experimental model of laparoscopy. *Urol J*. 26 Eylül 2013;10(3):953-9.
250. Johnsen SG. Testicular Biopsy Score Count – A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Horm Res Paediatr*. 1970;1(1):2-25.
251. Taheri S, Davoodi F, Raisi A, Zakian A, Rajabzadeh A, Hablolvarid MH, vd. Co-administration of *Salvia miltiorrhiza* and verapamil inhibits detrimental effects of torsion/detorsion on testicular tissue in rats. *Andrologia*. Temmuz 2021;53(6):e14049.
252. Ganjiani V, Ahmadi N, Raayat Jahromi A. Protective effects of *Stevia rebaudiana* aqueous extract on experimental unilateral testicular ischaemia/reperfusion injury in rats. *Andrologia*. 11 Mart 2020;52(2).
253. Ghasemnejad-Berenji M, Ghazi-Khansari M, Yazdani I, Nobakht M, Abdollahi A, Ghasemnejad-Berenji H, vd. Effect of metformin on germ cell-specific apoptosis, oxidative stress and epididymal sperm quality after testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia*. Mart 2018;50(2):e12846.